

利用异源精子激发雌核发育的银鲫 及亲本的 RAPD 分析

RAPD ANALYSIS OF GYNOGENEIC CRUCIAN CARP ACTIVATED BY HETEROLOGOUS SPERM AND THEIR PARENTS

滕春波 孙孝文 沈俊宝 阎学春 梁利群

(中国水产科学院黑龙江水产研究所, 哈尔滨 150070)

TENG Chun-Bo, SUN Xiao-Wen, SHEN Jun-Bao, YAN Xue-Chun, LIANG Li-Qun
(Heilongjiang River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Harbin 150070)

关键词 雌核发育, 方正银鲫, 随机扩增多态 DNA 分析

KEYWORDS Gynogenesis, Fangzheng Crucian Carp, RAPD Analysis

方正银鲫是黑龙江水系营天然雌核发育的两性型种群, 这已被许多研究结果证实。但是从八十年代中期以来, 国内一些研究者对该鱼的雌核发育特性, 提出了不同的看法。一般认为银鲫的雌核发育机制同种或异种精子进入卵子后只刺激其发育, 并不发生雌雄原核的结合, 精子进入卵子后固缩成致密状态, 并不形成雄性原核。也就是说子代的发育只是在雌原核的参与下进行的, 子代完全继承母本的遗传特性[沈俊宝等 1983]。但 1983 年蒋一珪等用鲫、红鲫和兴国红鲤的精子刺激银鲫卵子发育, 发现其子代(称异育银鲫)的生长较母本不同程度加快了, 个别个体鳞被出现红斑, 同工酶谱染色反应表现较母本快的特点等。因此, 他们认为异源精子不仅可以刺激银鲫卵子的发育, 而且对子代的生长等也有影响, 并把这种现象称为“异精生物学效应”。后来, 丁军等[1993]应用 DNA 杂交技术, 发现虽然异源精子进入银鲫卵子后呈固缩状态, 但父母本之间仍发生了有限 DNA 片断的杂交。陈洪等[1993]应用 RAPD(随机扩增多态 DNA)技术通过对方正银鲫、野鲤及其子代(各一尾)的分析也发现子代中有与父本相同的 DNA 条带。不过楼允东等[1991]对也具有雌核发育特性的淇河鲫(母本)与兴国红鲤(父本)杂交子代的血清生化指标的分析, 结果发现子代与母本无明显差异, 而与父本差异则十分显著。因此, 认为异源精子对雌核发育银鲫卵子只起刺激作用, 不产生“异精效应”, 异育淇鲫及其双亲同工酶的比较研究也表明异源精子并没有参与雌核发育子代的遗传, 父本基因对子代无影响[张英培等 1990]。八十年代以来, 我们对“异精效应”现象曾做过较多的实验观察和池塘实验, 并未找到异精生物学效应的充分证据。因此, 进一步探讨银鲫的雌核发育特性, 受精生物学以及异精对子代的影响等问题, 是十分必要的。我们也采用 RAPD 技术对异精生物学效应进行深入的研究, 通过三年来的工作, 得到了不同的结果, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

亲本荷包红鲤(♂)、方正银鲫(♀)及雌核发育子代(♂、♀)均由本所育种室提供。

1.2 基因组 DNA 的提取

父母本剪取鳍条。雌核发育子代解剖取其肝脏。将所取的鳍条和肝脏用组织裂解液 0.5M EDTA (pH 8.0)、200 μ g/ml Proteinase K、0.5% Sarcosyl 于 55 $^{\circ}$ C 消化过夜。随后消化液用酚、氯仿、异戊醇(24:24:1)抽提三次, RNaseA 消化去除 RNA, 样品 DNA 再抽提一次后用 2L 50mmol/L TrisHCl (pH 8.0)、10mmol/L EDTA (pH 8.0) 透析至 OD270 < 0.05 检测 DNA 浓度, 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.3 RAPD 引物及扩增条件

PCR 扩增仪为 Perkin Elmer Cetus 公司的 PE-9600。

RAPD 扩增引物购自北方同正生物技术发展公司, 为美国 Operon 公司产品, 包括有 OPC, OPD, OPH, OPL, OPM, OPN, OPP 组的随机引物, 每组含有 20 个, 总计 120 个随机引物。Taq 聚合酶购自 Promega 公司。参照 Williams 等[1990] 的方法, RAPD 体系包括: 10mmol/L Tris HCl (pH 8.3)、50mmol/L KCl、2.0mmol/L MgCl₂、0.001% 明胶; dATP、dGTP、dCTP、dTTP 各为 0.1mmol/L; 引物 15ng 基因组 DNA 15ng, 1 单位 Taq 聚合酶。反应条件为: 93.5 $^{\circ}$ C 变性 1min, 36 $^{\circ}$ C 退火 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2min, 共 45 个循环。循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶检测, 溴化乙锭染色, 紫外光下观察, 拍照。

1.4 数据处理

根据 Nei 和 Li[1979] 的相似率分析公式进行数据分析。

$$\text{相似率}(\%) = (2 \times Nab) / (Na + Nb) \times 100$$

Nab: a、b 之间共有片段数; Na: a 具有的扩增片段数; Nb: b 具有的扩增片段数 2。

2 实验结果

对父母本及子代雌、雄异育银鲫四种鱼基因组的 120 个随机引物扩增结果, OPD 组引物除 OPD-05 和 OPD-08 扩增到数条带外, 其它引物均未扩增到任何条带。OPL 组的 OPL-03、OPL-06、OPL-10、OPL-11、OPL-12、OPL-13 和 OPL-17 均未获得任何扩增条带。而 OPC、OPH、OPM、OPP 组引物除 OPC-03、OPC-05 和 OPP-20 外, 都获得了较好的扩增效果。共扩增得到 1504 条 DNA 条带, 其中母本 362 条, 父本 416 条, 子代平均为 363 条带, 最多可获得 9 条 DNA 条带。随机扩增 DNA 大小在 350~2200bp 之间, 每次扩增均可产生特定的 DNA 带型, 且重复性良好。

从表 1 可见子代雌雄鱼基因组的 RAPD 条带都与母本条带相同, 没有与母本不同而与父本相同的 DNA 条带。在 OPH 和 OPP 组引物中, 雌雄子代均出现了一条与父母本均不相同的 DNA 条带, 也就是较母本多一条带, 见图 1。以及雄性子代缺少与雌性子代及母本共有的条带, 见图 2。

表 1 四组引物雌雄子代与父母本随机扩增条带比较

Tab. 1 Compare random amplifying bands of offsprings (♂, ♀) with that of their parents in four groups primers

比 项		子代与父母本均相同条带数		子代与母本相同而与父本不同的条带		子代与母本不同而与父本相同条带		子代与父母本均不相同的 DNA 条带数	
		♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
		DNA 条带数引物							
	OPC	15	15	62	62	0	0	0	0
	OPH	13	13	49	49	0	0	1	1
	OPM	17	17	67	67	0	0	0	0
	OPP	18	18	65	64	0	0	1	1



图1 OPH-13的四种模板 RAPD 扩增图谱 (箭头所示为子代有而母本没有的条带)

Fig. 1 RAPD analysis of four models by primer OPH13 (The arrow shows the band that offsprings have but their mother does not have)



图2 OPP-13、OPP-14、OPP-15、OPP-16 四种模板 RAPD 扩增图谱(箭头所示为雄性子代较母本和雌性多或少的条带)

Fig. 2 RAPD analysis of four model by OPP13, OPP14, OPP15, OPP16 (The arrow shows the different bands that male offsprings compare with the female offsprings and their mother)

1: 父本红鲤, 2: 母本方正银鲫, 3: 雄性子代
4: 雌性子代, M: EcoRI+Hind III酶的λDNA

表2 四种模板 DNA 基因组随机扩增 DNA 片段相似率比较

Tab. 2 Comparison of the randomly amplifying band of four model DNA genome

模板	A	B	C	D
A		21.82	21.40	21.40
B			98.98	99.12
C				99.39

注: A—父本荷包红鲤; B—母本方正银鲫; C—异育银鲫(♂); D—异育银鲫(♀)。

按Nei和Li[1979]的公式计算四种模板DNA之间随机扩增的DNA片段的相似率,结果见表2。

从表2中我们可以看出红鲤与方正银鲫虽同为鲤科类,但其亲缘关系较远,相似仅为21.82%。以红鲤做父本、方正银鲫做母本所获得的异育银鲫子代与红鲤的相似率也仅为21.40%。此结果说明子代与父本基本无关。子代与母本相似率高达99%左右,而雌雄子代相似率也为99.39%,并非完全相同。

3 分析与讨论

在四种鱼基因组作模板的RAPD分析中,我们随机选用120个引物,其中OPC、OPH、OPM、OPP组的80个引物扩增效果好,这样使得我们通过采取一系列序列不同的引物,从而大大增加了引物与模板DNA结合的概率。既保证了扩增的实现,又使检测区域几乎覆盖了整个基因组,增加了实验结果的可靠性。在本实验结果分析中,子代基因组随机扩增片段与母本相似率达99%左右,说明子代的遗传物质与母本完全相同。子代与父本相似率为21.4%,这与母本和父本相似率21.82%,是基本相似的。这可能是同亚种不同属的相同遗传物质部分。同时,没有发现子代的谱带中有与父本相同而与母本不同的DNA条带。这些结果排除了异源精子DNA片段的有限杂交。

在扩增子代的条带中,发现子代中与母本不同的条带,以及雌雄个体间与母本条带不同的现象。这是由于RAPD技术分辨率高,它不仅可检测到物种间的差异也可检测到个体间的差异,因此被广泛应用于品种鉴定和物种亲缘关系探讨方面。同时,雌雄两性间遗传结构上存在着差异,因此RAPD图谱也出现差异,这是可

以解释的。

银鲫雌核发育的生殖方式, 是一种隔离机制, 以保证这种单性群体在与两性鲫或其它鱼的雄鱼受精繁殖时, 既延续其种群, 又保持该种群原有的遗传特性。因此, 很难想像在与异源精子受精时, 发生片断 DNA 的杂交, 即使这种杂交是“有限”的, 而这种单性银鲫完全是靠异源精子来繁衍后代, 其长期的“有限片断 DNA 杂交”后果必然导致形成另外的一个物种。目前, 欧洲、日本等的单性银鲫仍然保持原有的遗传特性。现在的问题是, “异精效应”的确切证据是什么? 蒋一珪等[1983]提出: (1) 子代生长加快了, 比母本快 34.7% (12.9~64.4); (2) 子代个别个体体表出现 7~8 个鳞片大小的红色(千尾出现一尾); (3) 子代肝脏 LDH 同工酶显色反应比母本快 3 分钟(在 26℃下, 母本显色 45min, 父本 15min, 子代 42min)。丁军等[1993]通过 DNA 杂交结果, 提出异源精子影响子代的效应。可能是片断 DNA 杂交的结果。同时认为, 还不能排除异源精子带入的其它微量物质(如线粒体、核质及少量胞质等)也可能影响其子代的某些性状的可能。陈洪等[1994]用 RAPD 技术对亲本及子代只作了一尾的研究结果。可以认为, 方正银鲫的生长受环境影响很大。其次, 提出一种“现象”、“假说”应具有普遍性, 不能是个别现象, 更何况在鲤、鲫中本来就存在红色的基因突变。酶的显色反应受温度等因素影响很大, 每次显色反应都不相同, 而且子代仅快 3min, 这些都不能说明异精效应的确凿性。

参 考 文 献

- 丁 军, 谢岳峰, 蒋一珪等. 1993. 异育银鲫及其人工杂合种外源遗传物质的检测分析. 水生生物学报, 17(1): 22~26
- 沈俊宝, 范兆廷, 王国瑞. 1983. 黑龙江一种银鲫(方正银鲫)群体三倍体雄鱼的核型研究. 遗传学报, 10(2): 133~136
- 张英培, 刘 红, 楼允东. 1990. 异育淇鲫及其双亲同工酶的比较研究. 遗传学报, 17(1): 34~37
- 陈 洪, 杨 靖, 薛国雄等. 1993. RAPD 技术在异精激发方正银鲫比较研究中的应用. 科学通报, 39(7): 661~663
- 蒋一珪, 梁绍昌, 陈本德等. 1983. 异源精子在银鲫雌核发育子代中的生物学效应. 水生生物学集刊, 8(1): 1~13
- 楼允东, 沈 斌, 陆君武. 1991. 异育淇鲫及其亲本血清生化组成的比较研究. 动物学研究, 12(2): 181~185
- Nei M, Li W H. 1979. Mathematical mode for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc Natl Acad Sci. USA. 76(10): 5269~5273
- Williams J G K, Kubelk A R, Livak K J. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res. 1990. 18: 6531~6535