

文章编号:1000 - 0615(2001)04 - 0311 - 06

团头鲂良种雌核发育群体的建立及其遗传变异

邹曙明, 李思发, 蔡完其, 赵金良

(农业部水产增殖生态、生理重点开放实验室, 上海水产大学, 200090)

摘要:为了巩固经 15 年选育而成的团头鲂良种—浦江一号的成果, 并建立纯系以供进一步研究和开发, 1999 年和 2000 年, 先后对团头鲂选育系三龄鱼 (F_5) 和二龄鱼 (F_6) 进行了雌核发育(抑制第二次成熟分裂)研究。利用 UV 照射遗传失活的鲤鱼精子诱导, 采用冷休克方法, 抑制团头鲂第二极体排出; 探索了适合团头鲂二龄及三龄鱼卵的休克温度、起始时间和持续时间, 结果发现: 二龄鱼和三龄鱼诱导起始时间均在受精后 3min 效果最好, 而在休克温度和持续时间上稍有差异, 其中三龄鱼在 0~2 冷休克处理 30min、二龄鱼在 4~6 冷休克处理 20min 效果较佳。2 年期间, 建立了源于选育系 3 尾雌亲鱼的 3 个雌核发育群体, 共获得正常的雌核发育鱼后代 1000 余尾。RAPD 分析发现, 选育系群体具有引物 S_8 扩增的 1100bp 条带, 而雌核发育群体具有引物 S_{18} 扩增的 860bp 条带; 雌核发育群体内遗传相似度显著高于选育系群体, 其遗传距离仅为选育系群体内遗传距离的 54%。

关键词:团头鲂; 雌核发育; 选育系; 随机扩增多态 DNA 分析

中图分类号: S917:Q3 - 3 **文献标识码:** A

Establishing gynogenetic groups of genetic improved *Megalobrama amblycephala* and its genetic analysis

ZOU Shu-ming, LI Si-fa, CAI Wan-qi, ZHAO Jin-liang

(Key Laboratory of Ecology & Physiology in Aquaculture of Ministry of Agriculture,
Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: In 1999 and 2000, gynogenesis was carried out based on 3-year old (F_5) and 2-year old (F_6) fish respectively, in order to maintain the response of genetic improved blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) which was named strain Pujiang 1 (selected for 15 years), and establish pure lines for further study. Gynogenetic fry were produced by cold-shocking eggs, activated with UV-irradiated common carp sperm (1:3 diluted, two Philips 30W germicidal tubes, 253.7nm, 10cm distance between lamp and sperm surface), inhibiting the second polar body extrusion. The optimal treatment conditions including cold-shock temperature, treat time after fertilization and duration time were investigated and selected to fit for 2-year old eggs and 3-year old eggs. The optimal treat time after fertilization was similar 3min in 2-year and 3-year old eggs. But the optimal cold-shock temperature and duration time had some differences (0 - 2, 30min for 3-year eggs and 4 - 6, 20min for 2-year eggs). Three gynogenetic groups were established and more than 1000 normal gynogenetic fry were produced by 2-year experiment. Using RAPD methods, heredity differences (genetic variations) of gynogenetic fry (G_1) and non-gynogenetic fry (F_6) were compared and analyzed. The 1100bp band amplified by

收稿日期:2000-09-04

基金项目:上海市科技兴农重点攻关项目[农科攻字(98)第 01 - 12 号]。

第一作者:邹曙明(1972 -),男,江西宜黄人,助研。E-mail: smzou@shfu.edu.cn

primer S₈ was only found in F₆ group, the 860bp band amplified by primer S₁₈ was only found in gynogenetic fry (G₁) group. The two bands could be used as molecular markers of these two groups. The genetic distance among gynogenetic fry G₁ was much less and only 54 % of F₆ group.

Key words: *Megalobrama amblycephala*, gynogenesis, selective strain, RAPD analysis

团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 原产于我国长江中游一些湖泊中,系草食性经济鱼类^[1]。自 1956 年湖北梁子湖被发现、命名并驯化成为养殖对象以来,由于病害少、易捕捞、繁殖简单、成活率高及肉质鲜美等优点,已成为重要养殖对象之一^[2]。然而,近年来,我国各地团头鲂的许多养殖群体出现了较为严重的退化现象,表现在生长速度减慢、性成熟个体变小、体型变长、变薄等。近亲繁殖、亲鱼管理不善是造成养殖性能退化的主要原因^[3-5]。为此,本室于 1986 年引进淤泥湖团头鲂,通过系统选育方法,经 15 年努力育出了生长速度快、体型好、遗传稳定的团头鲂新品系,即团头鲂良种“浦江一号”^[6]。

为使选育系的优良性状基因进一步纯化、巩固和发展,1999 年以来,我们先后对团头鲂选育系三龄鱼 (F₅) 和二龄鱼 (F₆) 进行了人工雌核发育 (抑制第二次成熟分裂) 的研究,探索人工诱发团头鲂卵雌核发育的最适休克温度、起始时间和持续时间,并成功地生产了一定数量的雌核发育鱼;随后,采用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术,比较了雌核发育鱼和正常发育鱼基因组 DNA 的遗传差异,并寻找其分子标记。

1 材料和方法

1.1 材料

雌核发育亲鱼材料:团头鲂选育系三龄雌鱼 (F₅),团头鲂选育系二龄雌鱼 (F₆),均来自上海水产大学南汇水产动物种质实验站;诱导雌核发育用的雄鱼为鲤 (野鲤)。

RAPD 分析材料:团头鲂选育系三龄雌鱼 (F₅) 的一个雌核发育群体 (1999 年建立,以下简称 G₁) 和该选育系产生的 F₆ 群体 (以下简称 F₆),各 15 尾。

1.2 试验方法

1.2.1 鲤鱼精子的照射和受精卵处理

采用自制紫外线照射装置处理鲤鱼精子,精液 (约 2mL) + Hank 氏液 (约 6mL) 在预冷的直径 12cm 表面皿内混合均匀,铺平,呈薄薄的一层,将表面皿放在冰盒上,置于磁力搅拌器上搅动 (转子速度为 5 ~ 10 r/sec);用 2 支各 30W 紫外灯管 (波长 253.7nm),预热 30min,距离 10cm 进行照射,根据精子活动能力的变化来决定照射时间,约 30min ~ 1h,一般为 45min。以精子活动明显减弱,但又不死为度。

实验用的团头鲂选育系亲鱼经促排卵素 2 号 (类似物,LRH-A) 和绒毛膜促性腺激素 (HCG) 进行混合催产。采用 2 次注射法,第一次每 500g 鱼注射 LRH-A 2 μg;6h 后进行第二次注射,每 500g 鱼注射 LRH-A 2 μg, HCG 2000u。用照射过的鲤鱼精子进行人工干法授精。精卵混合均匀后,均匀洒在预先准备好的盛有水的培养皿 (直径 15cm) 中,每个培养皿均匀洒 600 ~ 1000 粒。受精后进行冷休克处理。同时设置阳性对照 (团头鲂 ×)、阴性对照 (团头鲂 × 照射过的鲤,不作休克处理) 和杂交对照 (团头鲂 × 鲤)。

1.2.2 受精卵冷休克处理条件的确定

三龄鱼 (F₅) 冷休克处理条件的确定按表 1 进行,共 9 × 2 个试验组合,设 2 个平行,通过计算每个试验组合的受精率 (发育到原肠期) 和正常出苗率,来确定合适的起始时间和处理持续时间。

二龄鱼 (F₆) 处理条件:受精后 3min (三龄鱼的结果),按不同的处理温度 0 ~ 2, 2 ~ 4, 4 ~ 6 和 6 ~ 8 和处理持续时间 15 min, 20 min, 30 min 和 45min;计算胚胎存活率 (T = 30h) 和正常苗出苗率。试验设 2 个平行。

1.2.3 孵化

培养皿上的受精卵在冷休克处理完以后,在室温条件下孵化,室温变化范围在 23 ± 1 。每隔 1~2h 换水,直至孵化出苗。

1.2.4 受精率、30h 胚胎存活率及正常苗出苗率的统计

参照桂建芳等^[7]的方法:以阳性对照组发育到原肠期的胚胎占总卵数的比例作为受精率分别折算出阳性对照组和处理组在各个阶段胚胎的发育存活率,再将处理组各个阶段的发育存活率除以阳性对照组相应阶段的发育存活率,分别求得各个阶段处理组相对于阳性对照组的存活率。以上用于统计的总卵数大于 100 粒。

1.2.5 RAPD 分析

基因组 DNA 提取、RAPD 分析及群体遗传变异分析,参照李思发和邹黎明^[8]、邹黎明等^[9]的方法进行。

2 结果

2.1 三龄鱼冷休克处理条件

1999 年试验期间,水温为 23 ± 1 ,研究了团头鲂三龄鱼人工雌核发育的处理条件,结果如表 1。冷休克温度为 $0 \sim 2$,各个组合的受精率差异并不大,比例从 66% 到 84%,平均为 $(74 \pm 6)\%$;而正常苗孵化率从 0 到 5.21%,差异显著。在鱼卵受精后 3min,冷休克持续时间在 15min、20min 及 30min,正常出苗率均较高,尤其在处理时间 30min 的效果较好,正常出苗率达 5.67%。1999 年度建立了选育系三龄鱼 (F_5) 的一个雌核发育鱼群体(150 尾)。

表 1 三龄鱼最适处理条件的试验结果

Tab.1 Results of optimum cold-shock treatments of 3-year old fish (F_5)

编号	起始时间(min)	持续时间(min)	处理温度()	受精率(%)	正常出苗率(%)
1	0	15	$0 \sim 2$	66	1.25
2	0	20	$0 \sim 2$	69	1.38
3	0	30	$0 \sim 2$	74	0.95
4	3	15	$0 \sim 2$	78	3.08
5	3	20	$0 \sim 2$	84	5.21
6	3	30	$0 \sim 2$	77	5.67
7	7	15	$0 \sim 2$	79	0.25
8	7	20	$0 \sim 2$	68	0.38
9	7	30	$0 \sim 2$	67	0

2.2 二龄鱼冷休克处理条件

2000 年试验期间,水温为 23 ± 1 ,采用三龄鱼的处理条件(受精后 3min, $0 \sim 2$ 处理 30min)诱发二龄鱼的雌核发育,正常出苗率不甚理想($< 2\%$),而三龄鱼却能产生与 1999 年相一致的结果。为此,本试验进一步研究了适合二龄鱼卵的处理温度和处理时间。图 1 结果表明(受精后 3min):处理温度为 $4 \sim 6$,持续时间为 20min,胚胎发育到 30h 的存活率为 $(36.05 \pm 3.46)\%$,显著的高于其它组合($P = 0.05$)。

由图 2 所示(受精后 3min),处理温度为 $4 \sim 6$,持续时间为 20min,正常苗孵化率为 $6.90\% \pm 0.11\%$,同胚胎发育 30h 的成活率一样,也显著的高于其它组合($P = 0.01$)。

在相同的水温和受精后 3min 条件下,诱导条件(休克温度和持续时间)在不同龄鱼卵表现出一定的差异,其原因可能主要与亲鱼的年龄有关^[7,10]。事实上,二龄鱼卵往往表现为直径较小,卵子大小差别较大,而且也不如三龄鱼卵饱满。2000 年度建立了团头鲂 F_6 的 2 个雌核发育鱼群体(共约 1200 尾)。

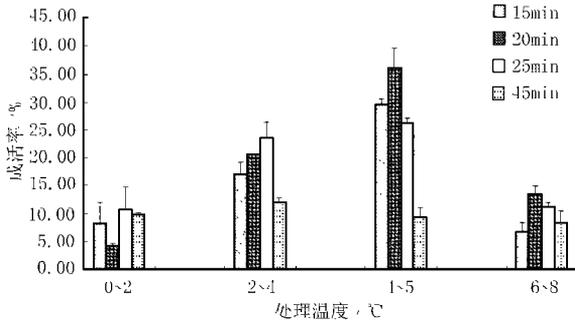


图1 不同的处理温度和持续时间诱发二龄鱼卵雌核发育胚胎期(30h)的成活率

Fig. 1 The effects of different combinations of cold shock temperature and duration on the survival rate of embryos

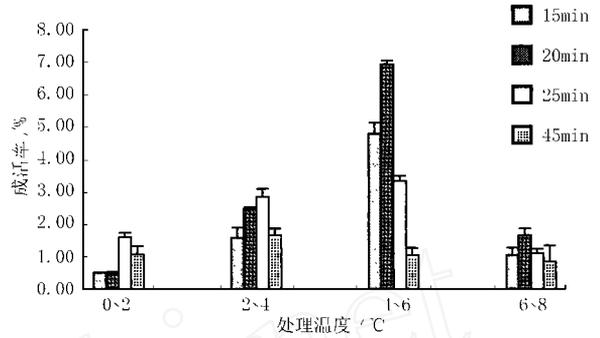


图2 不同的处理温度和持续时间诱发二龄卵雌核发育的正常苗孵化率

Fig. 2 The effects of different combinations of cold shock temperature and duration on the survival rate of normal fry

2.3 雌核发育鱼的胚胎发育

本试验用遗传失活的鲤鱼精子诱发团头鲂雌核发育二倍体,与正常二倍体(团头鲂雌雄受精)相比,胚胎发育各个阶段的形态特征并无区别,但由于前者经过一段时间的冷休克,在发育进度上要滞后于正常二倍体。本试验设计了杂交对照(团头鲂 × 鲤),杂交胚胎绝大多数只能发育到尾芽期,只有极少数畸形苗孵出,在1d内陆续夭折。还设计了阴性对照,即照射过的鲤鱼精子与团头鲂卵子受精但不作冷休克处理的对照,孵化出的苗均表现出单倍体特征:头小、眼小而黑、尾短而弯曲,解剖镜下可见围心腔扩大、心血管发育不全及血流不畅等;单倍体均在二倍体雌核发育鱼平游前夭折。

2.4 雌核发育群体的遗传变异和分子标记

2.4.1 PCR 扩增结果

先用30个10碱基随机引物对团头鲂F₅选育系的一个雌核发育群体(G₁)和该选育系产生的F₆群体(F₆)各15尾样品基因组DNA进行扫描,其中有8个引物无扩增产物或因效果不稳定而未作进一步分析。其余22个随机引物在G₁和F₆共30个体中表现为扩增结果稳定,重复性佳。DNA扩增带大小分布在0.20~2.5kb之间。22个引物在G₁和F₆群体内共扩增出144条带。

2.4.2 RAPD 分子标记

引物S₈(GTCCACACCGG)和S₁₈(CCACAGCAGT)扩增的结果在G₁和F₆显示特异性扩增带。其中引物S₈扩增的1100bp带为F₆群体的特异性扩增带(图3);而引物S₁₈扩增的860bp带为G₁群体的特异性扩增带(图4)。

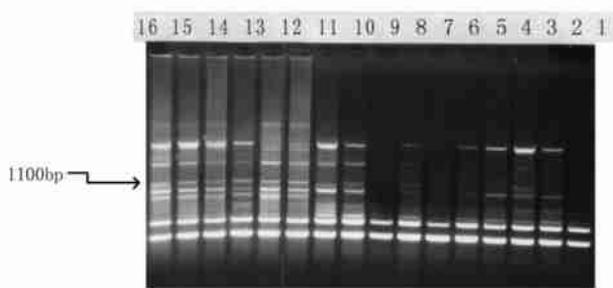


图3 引物S₈扩增的结果
Fig. 3 The results amplified by primer S₈
(其中1至8为G₁;9至16为F₆)
(1-8: G₁, 9-16: F₆)

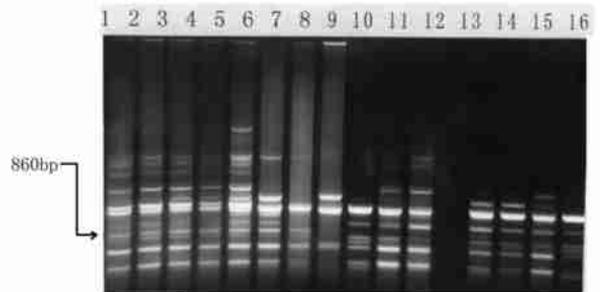


图4 引物S₁₈扩增的结果
Fig. 4 The results amplified by primer S₁₈
(其中1至8为G₁;9至16为F₆)
(1-8: G₁, 9-16: F₆)

2.4.3 雌核发育群体的遗传变异

对雌核发育群体 G_1 的 15×14 矩阵的遗传相似性分析表明,个体间的遗传相似性最大为 0.998,最小为 0.910,平均为 0.965 ± 0.009 ;群体内的遗传距离平均为 0.035 ± 0.004 。而团头鲂选育群体 (F_6) 的 15×14 矩阵的遗传相似性分析结果表明,个体间的遗传相似性最大为 0.990,最小为 0.875,平均为 0.935 ± 0.025 ;群体内的遗传距离平均为 0.065 ± 0.012 。该雌核发育群体内遗传距离仅为选育系群体内遗传距离的 54%。

3 讨论

3.1 雌核发育在鱼类育种上的应用价值及前景

人工雌核发育的应用主要在性别控制、基因-着丝点作图、自交系的快速建立、产生单性种群、突变以及染色体组型研究等方面^[10]。水产养殖科学与渔业文摘 (ASFA) 检索到 1988 - 1998 的 10 年间全世界共发表水产动物雌核发育方面的论文 252 篇,几乎涉及所有的水产养殖动物。人们如此热衷于雌核发育研究,除上述用途外,主要想利用雌核发育技术提高鱼类养殖性能。然而,在鱼类育种应用方面,人工雌核发育结果往往是负面的,因雌核发育后裔中存在高度的自交衰退现象。

然而,利用自交系进行杂交,从而可以获得高产,这在植物育种中已得到广泛应用。近年来,国内外学者也开始利用雌核发育纯系杂交提高鱼类养殖性能。Taniguchi^[11]认为,抑制第一次有丝分裂 (mitotic-G2N) 建立的雌核发育纯系的效果相当于反复同胞交配 20 代,得到的纯合雌核发育后代,尽管存在一些近交衰退现象,但如果这些雌核发育二倍体后代中进行选择,可以得到具有高遗传率的任何目标性状的纯系,利用具备不同优良互补性状的纯系亲本进行相互间杂交,可为生产提供优质种苗。他还指出,由于在一些鱼类抑制第一次有丝分裂的雌核发育后代表现出过于强烈的近交衰退,在此情况下,可以在抑制第二次成熟分裂 (meiotic-G2N) 所建立的雌核发育子代中选择优良形状亲本加以利用。Inada^[12]在研究了雌核发育 (meiotic-G2N) 香鱼 (*Plecoglossus altivelis*) 和正常的二倍体鱼在注射用福尔马林灭活的 A 型鳃弧菌后相应抗体增加的差异,发现在雌核发育子代中抗体增加差异很大,并显著高于正常的二倍体鱼。用该活菌株在雌核发育子代中进行感染,筛选出存活的个体再进行一次雌核发育 (meiotic), 结果发现,经过两次雌核发育的后代抗病力大大高于对照鱼。Bongers^[13]利用数理统计的方法研究了纯合雌核发育子代的遗传方差分布,发现纯合雌核发育的加性遗传方差几乎是奠基群体的 2 倍。在此基础上建立了纯系的遗传模型:纯系内的方差等于加性方差和环境方差分量之和,而在纯系间的方差则仅仅表现为加性方差。利用 5 个鲤鱼雌核发育纯系,发现 5 个纯系之间的性腺成熟系数 (GSI) 和卵子质量差异显著;受加性遗传效应的影响,13 个月的性腺成熟系数和 19 个月的卵子孵化率 (表示卵子质量) 的遗传率分别高达 0.71 和 0.72;这表明,可以选育出具有高质量卵的早熟或晚熟的鲤鱼雌核发育纯系,并应用于实践。Inada 和 Bongers 的实验均支持了谷口顺彦的观点,即建立优良纯系作种,纯系间杂交产苗,并表明雌核发育方法可以被人们用来进行优良性状基因的选育。

本研究在团头鲂选育系的基础上,建立了选育系 3 尾鱼的 3 个雌核发育群体。今后在该 3 个群体中进行有目的的选择和杂交,有可能进一步提高团头鲂选育系的种质性能。

3.2 确立雌核发育诱导条件的意义

桂建芳^[7]认为,处理条件的优化与开始处理的效应期、处理的强度 (压力大小和水温高低) 和处理的持续时间这三大要素有密切关系。Bongers^[14]也研究了导致雌核发育 (雄核发育) 纯系子代表型差异显著的原因,认为纯系子代遗传方差不变而主要受环境效应的影响,他探讨了 3 种类型的环境因子: (1) 个体间相互作用的方差 (V_E), (2) 个体自身发育不平衡的方差 (D_I), (3) 诱导方式导致的胚胎损伤的方差 (E_D)。他比较了鲤鱼 3 个等位基因系 F_1 (近交系数 F 值从 0 到 0.99) 和 1 个部分远系交配后代,发现 V_E 随着等位基因系 F_1 近交系数 F 值的增加而迅速减小, D_I 在部分远系交配后代中值最大,而在不同的等位基因系中保持不变。表明在雌核发育纯系中 V_E 的影响是很小的, D_I 也保持不变,导致雌核发育纯系

子代表型差异显著的原因主要来自诱导方式导致的胚胎损伤的方差(ED),其后续的实验也证实了这一点。

本研究利用遗传失活的鲤鱼精子,采用冷休克方法,抑制团头鲂第二极体排出,较详细研究了团头鲂的雌核发育条件,获得较高的正常鱼苗孵化率,为进一步进行团头鲂染色体组操作奠定了基础。

3.3 遗传失活的鲤鱼精子诱导的雌核发育后代的检测

本研究采用经紫外线照射的鲤鱼精子来诱发团头鲂进行雌核发育。鲤鱼染色体数目为 $2n = 100$, 而团头鲂为 $2n = 48$, 两种鱼属于不同的亚科, 未见团头鲂 \times 鲤 能杂交的报道。杂交对照组(团头鲂 \times 鲤)也未发现有正常鱼苗孵出。因此, 经过紫外线失活的鲤鱼精子, 诱发团头鲂进行雌核发育孵出的鱼苗, 除了单倍体和畸形苗外(不能正常存活), 都应是正常的二倍体雌核发育鱼, 作者认为不需要进行特殊的检测。

3.4 雌核发育团头鲂基因组的遗传变异

杨书婷和桂建芳^[15]利用同工酶技术研究了白鲢雌核发育群体(第二次成熟分裂), 发现其群体内个体间与正常对照相比具有更高的一致性, 并找到了 2 个雌核发育群体的生化遗传标记。Guyomard^[16]研究褐鳟(*Salmo trutta*)的第二次成熟分裂雌核发育群体同工酶分析发现, 12 个同工酶座位都存在不同程度的表达减退和丢失现象, 其中有 7 个座位发生系统的改变。本实验采用 RAPD 方法进行对比研究, 结果表明: 群体内个体间的遗传相似度雌核发育(0.965 \pm 0.009) 大于团头鲂 F_6 选育群体(0.935 \pm 0.025), 雌核发育群体内遗传距离仅为选育系群体内遗传距离的 54%; 这与文献[15]的结果相一致。

参考文献:

- [1] 张兴忠, 冯光任, 张四明, 等. 湖北淤泥湖团头鲂优良性状及种质研究[J]. 淡水渔业, 1991, 3: 12 - 16.
- [2] 柯鸿文. 团头鲂的人工繁殖与饲养试验[J]. 水生生物学集刊, 1965, 5 (2): 282 - 283.
- [3] 李思发, 周碧云, 林国清. 淤泥湖团头鲂的生长与繁殖—兼谈资源的保护[J]. 动物学杂志, 1991, 26(6): 7 - 12, 22.
- [4] 李思发, 蔡完其, 周碧云. 团头鲂种群间的形态差异和生化遗传差变异[J]. 水产学报, 1991, 15(3): 204 - 211.
- [5] 李思发, 杨学明. 双向选择对团头鲂生化遗传变异的影响[J]. 中国水产科学, 1996, 3(1): 1 - 5.
- [6] 李思发, 蔡完其. 团头鲂的双向选择效应[J]. 水产学报, 2000, 24(3): 201 - 205.
- [7] 桂建芳, 孙建明, 梁绍昌, 等. 鱼类染色体组操作的研究 II. 静水压处理和静水压与冷休克结合处理诱导水晶彩鲫四倍体[J]. 水生生物学报, 1991, 15(4): 333 - 342.
- [8] 李思发, 邹曙明. 中国大陆沿海六水系绒螯蟹(中华绒螯蟹、日本绒螯蟹)群体亲缘关系. RAPD 指纹标记[J]. 水产学报, 1999, 23(4): 325 - 330.
- [9] 邹曙明, 楼允东, 孙效文, 等. 用 RAPD 方法研究草鱼、柏氏鲤和 3 个地理种群鲤的亲缘关系[J]. 中国水产科学, 2000, 7(1): 6 - 11.
- [10] 楼允东. 人工雌核发育及其在遗传学和水产养殖上的应用[J]. 水产学报, 1986, 10(1): 111 - 123.
- [11] Taniguchi N. Genetic improvement by gynogenesis-selection method[J]. Isr J Aquacult Bamidgeh, 1992, 44(4): 135.
- [12] Inada Y, Chikushi Y, Tsujimura A, et al. Selection response of resistance to vibriosis in gynogenetic ayu plecoglossus altivelis[J]. Bull Jap Fish Soc Sci, 1997, 63(5): 722 - 727.
- [13] Bongers A B J, Ben A, Komen J, et al. Origin of variation in isogenic, gynogenetic and androgenetic strains of common carp, *Cyprinus carpio* [J]. J Exp Zool 1997, 277(1): 72 - 79.
- [14] Bongers A B J, Bovenhuis H, Vanstokkom A C, et al. Distribution of genetic variance in gynogenetic or androgenetic families[J]. Aquac, 1997, 153(3 - 4): 225 - 238.
- [15] 杨书婷, 桂建芳. 两个雌核发育白鲢群体同工酶分析及遗传标记的确定[J]. 水生生物学报, 1999, 23(3): 264 - 268.
- [16] Guyomard R. Gene segregation in gynogenetic brown trout (*Salmo trutta* L.): Systematically high frequencies of post-reduction[J]. Genet Sel Evol, 1986, 18(4): 385 - 392.