

文章编号: 1000-0615(2005)01-0120-04

• 研究简报 •

丁 雌核发育鱼的异源精子诱导 及其与亲本的 RAPD 比较分析

凌去非¹, 李思发¹, 张海军², 殷建国²

(1. 上海水产大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 200090;

2. 新疆生产建设兵团农十师额河特种鱼类繁育场, 新疆 北屯 836000)

关键词: 丁 雌核发育; 随机扩增多态 DNA

中图分类号: S917

文献标识码: A

The inducing of gynogenetic tench by heterologous sperm and comparison with parents by RAPD

LING Qū-fei¹, LI Sī-fā¹, ZHANG Hāi-jūn², YIN Jiān-guó²

(1. Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquaculture Ecosystem Certified by the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;

2. Eltrix River Fish Breeding Farm, 10th Subgroup of Xinjiang Construction Group, Beitun 836000, China)

Abstract: Gynogenesis is thought to be a useful method to generate fully inbred line and to initiate monosex culture in teleost fish. This article presents results of a study of gynogenesis of tench, *Tinca tinca* L. from Eltrix River of Xinjiang, China, induced by the common carp (*Cyprinus carpio*) sperm inactivated with UV irradiation. When cold shocking method was used to prevent extrusion of the second polar body in order to produce gynogenetic diploids, the optimum treated parameters were screened as cold shocking for 20min at 4°C, 5min after insemination. On this condition, 10.23% of the treated eggs survived at feeding stage. A comparative study between the gynogenesis and their parents was made by RAPD technique. 82 random primers of 10 nucleotide long sequence were used in RAPD analysis. The results showed that each primer gives 3-12 fragments for each sample with the fragment length 330-2460 bp, and the genetic similarity between gynogenesis and their mother was 97.4%, while the genetic similarity between gynogenesis and their father was 27.4%, and there were no bands only shared by gynogenesis and their father, the common carp. It revealed that the chromosome of their father, the common carp, did not penetrate into the construction of gynogenetic tench.

Key words: *Tinca tinca*; gynogenesis; random amplified polymorphic DNA (RAPD)

鱼类人工雌核发育的研究始于 20 世纪 50 年代, 在随后的 50 年里发展迅速。雌核发育可以为纯系建立、性别控制、基因定位等研究提供一种有效途径, 乃鱼类遗传育种研究工作活跃领域之一^[1-3]。丁 (*Tinca tinca*) 隶属于鲤科、雅罗鱼亚科、丁属, 是一种广温性鱼类(0~37°C)。主要分布于欧洲, 在我国仅分布于新疆额尔齐斯河流域^[4]。

由于丁雌核鱼生长比雄鱼快, Linhart 等^[5]对其人工诱导雌核发育和雌核发育子代性逆转进行了研究。但到目前为止, 与其他大多数鱼类雌核发育研究工作一样, 尚未获得功能性雄鱼。本研究旨在对丁人工雌核发育条件进行探索, 以期为进一步开展丁遗传育种和全雌性培育研究奠定基础。

收稿日期: 2003-08-26

资助项目: 新疆生产建设兵团科委农业科学研究与技术开发项目(NKB02N10NK16XM)

作者简介: 凌去非(1965-), 男, 江苏丹阳人, 副教授, 博士研究生, 研究方向为鱼类种质资源。现工作单位: 苏州大学水产科学研究所。E-mail: quling0118@sohu.com

通讯作者: 李思发, E-mail: lisifak@online.sh.cn

1 材料与方 法

1.1 材 料

诱导雌核发育的雌鱼由新疆生产建设兵团农十师额河特有鱼类繁育场提供, 雄鱼为额尔齐斯河产鲤。

精液保存液用 Hank 氏液, 其配方为: NaCl 0.7%、KCl 0.05%、NaHCO₃ 0.1%、葡萄糖 1.2%。

紫外线照射装置: 用木制灯柜, 其内悬挂 2 支 30W、波长为 2 537 Å 的紫外灯管。

1.2 试 验 方 法

鲤精子的照射 用挤压法采取精液, 精液用 Hank 氏液(按 1:5)稀释, 然后均匀地涂在预冷的直径为 12 cm 的培养皿上, 精液厚度约为 0.2 mm。将培养皿置于冰面上, 用自制的紫外灯照射处理精子, 距离为 10 cm, 照射 8~15 min。处理好的精子置于冰箱中备用。

卵子激活 试验用丁鱥促排卵激素 2 号(LRH A₂)注射, 雌鱼用量为 20 μg·kg⁻¹体重, 采用一次注射法。用照射过的鲤精子进行人工干法授精。精卵充分混合后, 均匀地洒在预先盛有水的直径为 20 cm 的培养皿中。每个培养皿均匀洒 400~800 粒。受精后作冷休克处理。

染色体加倍条件的确定 按 0~2、4、6℃作为冷休克温度, 每组设 3 个重复。以在该温度下 30min 后, 卵子损坏解体的比例作为冷休克的合适温度。按精卵结合后 3、5、7、10min 作为开始冷休克起始时间, 每组设 3 个平行。冷休克持续时间分设 20、25、30、35、40min 共 5 个组合, 每组重复 3 个平行。通过计算各试验组合的原肠期、出膜期和摄食期存活率来确定合适的卵子染色体加倍条件。

孵化 将载有鱼卵的培养皿置于室温条件下(24±1℃)孵化。每隔 1 小时左右换水 1 次, 直至孵化出苗。雌核发育子一代与亲本基因组的比较取整尾雌核发育子一代幼鱼, 母本和父本鱼剪取鳍条, 切碎, 加入 400 μL STE 缓冲液(30 mmol·L⁻¹tris-HCl, pH 8.0, 200 mmol·L⁻¹EDTA, 50 mmol·L⁻¹NaCl)。混匀后加入 40 μL 10% SDS 和 10 μL 蛋白酶 K(浓度为 20 mg·mL⁻¹), 于 55℃ 恒温培养箱过夜(12 h)。

反应在 Eppendorf Mastercycler Gradient PCR 仪上进行,

反应体系为 3 μL buffer(100 mmol·L⁻¹tris-HCl), pH 9.5, 500 mmol·L⁻¹ KCl, 30 mmol·L⁻¹MgCl₂, 0.01% 明胶, 最后调 pH 值至 9.0, 1 μL 每种 dNTP(2.5 mmol·L⁻¹), 2 μL 引物(5 μmol·L⁻¹), 2 μL 基因组 DNA(40~200 ng), 1.2U TaqDNA 聚合酶, 16.4 μL 无菌水, 总反应体积为 25 μL, 加入 20 μL 石蜡油。循环程序为: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 45 s, 36℃ 45 s, 72℃ 90 s, 45 个循环, 72℃ 延伸 10 min。

取 8 μL 扩增产物经 1.5% 进口琼脂糖凝胶(含适量 EB)电泳, 电泳缓冲液为 1×TBE, 电压为 4.5 V·cm⁻¹, 经 2.5 h 后, 用 Gene-Genius 凝胶成像系统拍照、记录和分析。

1.3 数 据 处 理

根据 Nei 和 Li^[6] 计算遗传相似度 $S = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$

其中: N_{xy} 是个体 X 和 Y 共同拥有的带数, N_x 和 N_y 分别是个体 X 和 Y 所具有的总带数。

2 结 果

2.1 雌核发育条件的选择

用冷休克方法使被紫外线照射激活的卵子实现染色体的二倍化, 必需考虑卵子对低温的忍受能力, 才能选择相应的最适冷休克温度条件。丁鱥是粘性卵, 激活卵子在 0~2℃ 水温条件下, 30 min 时 3 次重复试验平均有 25% 卵解体成絮状; 而在 4℃ 水温条件下仅有 2% 卵子解体。

经紫外线照射处理的鲤精子激活的丁鱥卵子, 在不同冷休克起始时间下, 胚胎发育各阶段存活率见表 1。在精卵结合后 5 min 开始进行冷休克处理, 鱼苗出膜存活率和摄食期存活率平均值分别为 24.97% 和 10.02%, 均高于其他组别。经 10 min 紫外线照射处理的鲤精子激活的丁鱥卵子, 在不同冷休克持续时间下, 胚胎发育各阶段存活率见表 2。冷休克处理时间为 20 min 时, 出膜期存活率和摄食期存活率的平均为 31.25% 和 10.23%, 高于其他组。

2.2 丁鱥雌核发育鱼的胚胎发育

用紫外线照射过的鲤精子诱导丁鱥雌核发育二倍体, 未见其胚胎发育与丁鱥通常子代有何差异。未经冷休克处理组合的大部分鱼卵在胚胎发育过程中即停止发育, 部分鱼苗能见出膜, 表现为典型单倍体症状: 头小、眼黑、尾

表 1 丁鱥卵在不同冷休克起始时间下胚胎发育各阶段存活率

Tab. 1 Survival rate of tench embryo under different starting time of cold shock

冷休克起始 时间(min) starting time of cold shock	处理持续 时间(min) duration of cold shock	总卵数 no. of eggs	原肠期存活率(%) survival rate during gastrula stage	出膜期存活率(%) survival rate during hatching stage	摄食期存活率(%) survival rate during feeding stage
3	20	482±15.82	8.19±1.03	2.77±0.46	0.013±0.013
5	20	512±34.59	46.73±2.93	24.97±2.85	10.02±0.66
7	20	486±22.81	14.29±1.82	1.58±0.23	0.006±0.0067
10	20	567±37.24	8.00±0.78	0.35±0.35	0.00±0.00

表2 丁鱥卵在不同冷休克处理持续时间下胚胎发育各阶段存活

Tab.2 Survival rate of tench embryo under different durations of cold shock

鲤精子(UV)处理 时间(min) spermatozoon UV-treated time	冷休克处理时间(min) duration of cold shock	总卵数 no. of eggs	原肠期存活率(%) survival rate during gastrula stage	出膜期存活率(%) survival rate during hatching stage	摄食期存活率(%) survival rate during feeding stage
--	--	505	61.98	0.00	0.00
10	--	495	19.19	0.00	0.00
10	20	635±83.50	54.79±2.59	31.25±0.86	10.23±1.25
10	25	514±17.84	34.7±10.39	24.39±1.39	7.33±0.87
10	30	528±16.02	1.29±0.72	0.06±0.06	0.06±0.06
10	40	471±26.77	0.35±0.56	0.00±0.00	0.00±0.00

短且多向上弯曲、围心腔大、卵黄囊不消失等,单倍体个体不能进入摄食期。

2.3 丁鱥雌核发育子一代与亲本基因组的 RAPD 分析

从 150 个随机引物中筛选出扩增带清晰、重复性好的引物 82 个。各引物扩增的片段为 3~12, 分子量为 330~2460 bp, 其中母本扩增片段 519 个, 雌核发育子带扩增片段 520 个, 父本扩增片段 406 个。子代与母本遗传相似度为

0.974, 子代与父本遗传相似度为 0.274, 父本与母本遗传相似度为 0.277。

母本与子代共有而父本没有的片段 254 个, 如引物 S27 在母本和雌核发育的子代中扩增出 1059 bp 的片段, 而父本(鲤)却无此片段(图 1)。在雌核发育子代中未发现父本(鲤)有而母本(丁鱥)没有的扩增片段。引物 S10、S31 和 S27 分别在父本鲤中扩增的出 791、947 和 929 bp 的片段, 在母本和雌核发育子代却无。



图1 丁鱥雌核发育子代与父母本 RAPD 扩增

Fig.1 RAPD amplified bands of gynogenesis and their parents

M 为标记(ADNA EcoRI HIND ④); Mo 代表母本; Fa 代表父本; G1、G2、G3、G4、G5 分别为雌核发育子代不同个体; S10、S31、S27 为随机引物

M represents marker (ADNA EcoRI HIND ④); Mo represents mother; Fa represents father; G1、G2、G3、G4、G5 represent gynogenesis; S10、S31、S27 represent random primer

3 讨论

丁鱥卵为弱粘性, 发现其在 0~2℃ 水温条件下 30min, 即有 25% 卵子发生解体, 与罗琛和刘筠^[7]提出的粘性卵对低温(0~2℃)有较强的耐受力不相吻合。这可能是由于解体温度不但与水温有关, 也与鱼的种类有关, 可能还与卵的粘性强弱以及处理时间的长短有关。本试验

将冷休克水温控制在 4℃, 能获得较好的处理效果。Linhart 等^[5]在进行丁鱥雌核发育试验时, 将被激活的丁鱥卵放置于牛奶与水的混合溶液中进行冷休克处理, 以期对卵进行保护。本试验发现被激活的丁鱥卵可以直接在低温的水中进行冷休克处理, 并能获得良好的试验效果。

人工诱导丁鱥雌核发育二倍体的冷休克处理开始时间以精卵结合后 5min 较合适, 而处理持续时间以 20min

较为合适。比人工诱导鲫雌核发育二倍体冷休克处理持续时间短,与人工诱导草鱼雌核发育二倍体冷休克处理持续时间相近。Linhart 等^[5]对丁 捷克群体进行人工诱导雌核发育试验时,冷休克持续时间 20、30、40、50、60min 均能产生雌核发育二倍体。本次试验发现冷休克持续时间在 20、25min 能诱导雌核发育二倍体,而 40min 以后不能诱导产生雌核发育二倍体,且冷休克处理时间越长,解体的卵比例越高。

近年来,国内外一些学者对鱼类雌核发育中雄性遗传物质的作用提出了不同的观点。一是“异精生物学效应”观点。如蒋一 等^[8]用兴国红鲤精子诱导方正银鲫雌核发育,发现异源精子能影响雌核发育子代的某些性状,如对子代的生长、性比、体色和肝脏 LDH 同工酶等产生影响,提出了“异精生物学效应”。陈洪等^[9]应用 RAPD 技术对方正银鲫、野鲤及其子代的分析发现了子代中有与父本相同的 DNA 条带,由此推断两亲本间可能发生了 DNA 的重组交换。Carter 等^[10]用 DNA 指纹技术也发现奥利亚罗非鱼(*Oreochromis aureus*)和尼罗罗非鱼(*O. niloticus*)的雌核发育后代中有父本微染色体渗入的迹象。Manfred 等^[11]认为雌核发育可能是一种集无性与有性生殖优点于一体的适应性生殖模型,即以近缘两性微染色体作为载体,结合了大量的近缘两性种的亚基因组 DNA 作为无性生殖的补偿。

另一观点则不支持“异精效应”。如楼允东等^[12]未发现具有雌核发育特性的淇河鲫子代与母本(淇河鲫)在血清生化指标方面无明显差异,但发现与父本(兴国红鲤)差异十分显著。张英培等^[13]对上述淇河鲫子代与亲本同工酶研究,发现子代同工酶与母本同工酶酶型一致。滕春波等^[14]对银鲫及其亲本间的 RAPD 分析,子代与母本相似率 99%。贾方钧等^[15]用红鲤诱导稀有 鲫进行人工雌核发育, RAPD 分析,雌核发育个体中扩增片段全部来自于母本,没有发现父本 DNA 成分进入稀有 鲫基因组的迹象。由此认为,异源精子只起激活作用,而不参与子代的生长、发育,即无“异精效应”。

我们对丁 雌核发育子代与其母本和“父本”基因组 DNA 进行 RAPD 分析,发现雌核发育的子代与其母本遗传相似度为 0.974,未发现与父本(鲤)共有而母本(丁)没有的扩增片段。这一研究结果进一步支持了人工诱导雌核发育过程中,异源精子只起诱导作用,而不参与子代染色体组成和发育的观点。

应予注意的是,在已有的对异源精子激发雌核发育子代中有其父本遗传物质的报道中,父母本多为同科不同属,或同属不同种,甚至是不同的亚种,亲缘关系较近。而本研究父本(鲤)与母本(丁)属于不同亚科,通过线粒体细胞色素氧化酶 ④(mitochondrial gene cytochrome oxidase

subunit ④)对 25 种鲤科鱼类系统发育分析,发现丁 与贝加尔雅罗鱼(*Leuciscus leuciscus baicdensis* Dybowski)、东方欧鳊(*Abramis brama orientalis* Berg)等构成单系群,与鲤却不直接相聚^[16]。丁 与鲤的 Kimura-2 因素模型的遗传距离为 0.1547,比丁 与 亚科几种鱼类的遗传距离还要大^[19]。由此可见,丁 与鲤的亲缘关系较远。因此,可以推断在异源精子激发的雌核发育中,父方基因或染色体片段能否“渗入”到子代基因组中,可能还与父母本的亲缘关系有关。因此,如企图通过雌核发育来导入外源目的基因,以达到遗传改良目的时,对父母本的亲缘关系要给予足够的注意。

硕士研究生乔德亮和新疆生产建设兵团农十师额河特种鱼类繁育场李若平、蔡晓琴、何智杰在野外试验中提供了帮助,特致感谢!

参考文献:

- [1] 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.
- [2] Hollebecq M G, Chourtout D, Wohlfarth G, et al. Diploid gynogenesis induced by heat shocks after activation with UV-irradiated sperm in common carp[J]. Aquac, 1986, 54: 69-76.
- [3] 邹曙明, 李思发, 蔡完其, 等. 团头鲂良种雌核发育群体的建立及其遗传变异[J]. 水产学报, 2001, 25(4): 311-316.
- [4] 伍献文. 中国鲤科鱼类志[M]. 上海科学技术出版社, 1982. 10-11.
- [5] Linhart O, Kvasnicka P, Flajshans M, et al. Genetic studies with tench, *Tinca tinca* L.: induced meiotic gynogenesis and sex reversal[J]. Aquac, 1995, 132: 239-251.
- [6] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76(10): 5269-5273.
- [7] 罗琛, 刘筠. 人工诱导草鱼和鲫鱼雌核发育的研究[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 1991, 14(2): 154-159.
- [8] 蒋一珪, 梁绍昌, 陈本德, 等. 异源精子在银鲫雌核发育中的生物学效应[J]. 水生生物学集刊, 1983, 8(1): 1-13.
- [9] 陈洪, 杨靖, 薛国雄, 等. RAPD 技术在异精激发方正银鲫比较研究中的应用[J]. 科学通报, 1993, 39(7): 661-663.
- [10] Carter R E, Mair G C, Skibinski D O F, et al. The application of DNA fingerprinting in the analysis of gynogenesis in tilapia[J]. Aquac, 1991, 95: 41-52.
- [11] Manfred S, Indrajit N, Ingo S, et al. Incorporation of subgenomic amounts of DNA as compensation for mutational load in a gynogenetic fish[J]. Nature, 1995, 373(5): 68-71.
- [12] 楼允东, 沈 , 陆君. 异育淇鲫及其亲本血清生化组成的比较研究[J]. 动物学研究, 1991, 12(2): 181-185.
- [13] 张英培, 刘红, 楼允东. 异育淇鲫及其双亲同工酶的比较研究[J]. 遗传学报, 1990, 17(1): 34-37.
- [14] 滕春波, 孙孝文, 沈俊宝, 等. 利用异源精子激发雌核发育的银鲫及亲本的 RAPD 分析[J]. 水产学报, 1999, 23(4): 420-423.
- [15] 贾方钧, 王剑伟, 吴清江. 异源精子诱导稀有 鲫的人工雌核发育[J]. 水生生物学, 2002, 26(3): 246-252.
- [16] 凌去非. 丁 遗传多样性与繁殖生物学的研究[D]. 上海水产大学博士论文, 2003.