

## 人工四倍体鲤鲫后代遗传同一性的 FCM 及 RAPD 证明

叶玉珍 吴清江 王小虎 王中卫 周建峰

(中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072)

### THE EVIDENCES OF FCM AND RAPD FOR GENETIC IDENTITY IN AN ARTIFICIAL TETRAPLOID CRUCIAN CARP OFFSPRING

YE Yu-Zhen, WU Qing-Jiang, WANG Xiao-Hu, WANG Zhong-Wei and ZHOU Jian-Feng

(State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

关键词: 人工四倍体鲤鲫; 遗传同一性; FCM; RAPD

**Key words:** Artificial tetraploid crucian carp; Genetic identity; FCM; RAPD

中图分类号: Q173 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2008)02-0290-05

人工四倍体鲤鲫是本实验室采用人工染色体组叠加构建的一个以雌核发育为生殖模式的鲫克隆系, 现已繁殖至第五代。它生长快、体型好、抗病力强、易捕捞, 比普通二倍体鲫和三倍体鲫经济性状更优良, 将具有广阔的生产应用前景。从表型看, 子代是由四倍体鲤鲫原代母本拷贝而成, 与母本极其相似, 表明异源精子启动发育的后代无分离现象。我们曾对原代四倍体雌核发育生殖方式的遗传进行过基因组、形态学和同工酶分析研究<sup>[1-4]</sup>, 为了获得更进一步的证据, 本文应用 FCM 和 RAPD 分子遗传标记方法进行验证。

流式细胞术(FCM)和经典的细胞培养法一样是以分析染色体倍性为目的。Frederick J A, Robert Q M, *et al.*<sup>[5]</sup>在诱导鲮多倍体的研究中, 发现胚胎发育的早期就可用 FCM 进行 DNA 倍性鉴定。肖亚梅等<sup>[6]</sup>曾对人工雌核发育草鱼做了倍性鉴定。叶玉珍等<sup>[7]</sup>对3种天然多倍体鲫群体进行过研究, 并获得了理论与实践相一致的满意结果。RAPD 和 RFLP 是以检测 DNA 多态性为目的, 但前者比后者检测多态性检出率更高且更加简便和快速。为此, 国内外在动植物遗传研究方面已应用得相当广泛。周建峰等<sup>[8]</sup>运用 RAPD 方法研究了三个鲤鱼地理亚种 DNA 的遗传和变异, 并确定了各种鲤鱼养殖品种的起源及品种间的亲缘关系。王忠卫等<sup>[9]</sup>对雌核发育和人工转性鲮、鲮进行了遗传多样性的研究, 并找到遗传配型完全一致且可作为与其同胞雌核发育雌鱼进行纯系繁殖的生理雄性个体。但迄今为止, 应用 FCM 和 RAPD

来研究人工四倍体天然雌核发育后代的同质性尚未曾进行, 本文报道以这两种方法研究几种不同鱼的精子启动四倍体鲤鲫卵子所发育后代的遗传同一性的初步实验结果。

### 1 材料与方法

**1.1 DNA 提取** 供本实验用的四倍体鲤鲫母本、3种“父本”(红鲤、红鲫和麦穗鱼)及其子代均由本所试验场提供。按照周建峰等<sup>[8]</sup>的方法提取总 DNA, 95%乙醇固定尾鳍, 取0.2g置于1.5mL塑料离心管中, 加入1mL细胞裂解液(10mmol/L Tris·HCl, 0.1mol/L EDTA, pH 8.0), 10<sup>4</sup>L 蛋白酶 K 溶液(20mg/mL), 10% SDS 溶液 100<sup>4</sup>L, 混匀, 55℃消化3—5h, 4℃离心15min, 吸出上层黏稠的 DNA 溶液, 加等体的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提三次, 再用等体积的氯仿:异戊醇(24:1)抽提两次, 每次抽提后均在4℃离心10min, 取上清液, 最后加入 NaAc 溶液和无水乙醇沉淀, 将沉淀物用适量的 TE 缓冲液(10mmol/L Tris·HCl, 1mmol/L EDTA, pH 8.0)溶解, -20℃保存备用。

**1.2 RAPD 分析** 使用 Operon 公司(上海分公司)Opp 和 Opj 两组的16个引物。RAPD 反应体系的总体积为25<sup>4</sup>L, 内含2.5<sup>4</sup>L 10× Reaction Buffer, 1<sup>4</sup>L 2.5mmol/L dNTP 混合物, 1<sup>4</sup>L 引物, 3<sup>4</sup>L 模板 DNA, 1单位 Taq 酶, 17<sup>4</sup>L 超纯水。RAPD 反应条件, 预变性94℃ 300s, 变性94℃ 30s, 退火37℃ 30s, 延伸72℃ 90s。共进行40个循环, 末端延伸, 72℃ 600s。RAPD 扩增产物在1.5%琼脂糖凝胶上(含0.5<sup>4</sup>g/mL的溴化乙锭)

电泳, 紫外扫描。

1.3 DNA 血样采集与制备 从本所试验场采集四倍体鲤鲫亲代母本、“父本”红鲫和子一代, 抽取血液进行分析研究。以肝素钠湿润注射针筒, 在鱼尾动脉抽 0.5 mL 血液置于 1 mL 离心管, PBS 缓冲液洗涤 2 次, 弃上清液, 加等体积的 PBS 缓冲液, 吹匀后加入 1% 胃蛋白酶和 0.2 mol/L 盐酸进行通透处理, 再加 0.5 mL 柠檬酸三钠液, 进行测定前 10—20 min 加 PI 溶液染色, 以 300 目尼龙筛绢过滤。详细检测步骤见以前报道的方法<sup>[7]</sup>。

1.4 染色体倍性鉴定 每组实验鱼取 30 尾, 采用常规鱼类肾细胞直接制片方法制作染色体标本, 在显微镜油浸物镜下分别计数染色体数目, 并找出染色体的众数, 确定其染色体倍性。

## 2 结 果

### 2.1 DNA 含量的 FCM 分析

亲本和子代的红血球核 DNA 含量的详细数据结果(表 1)。DNA 含量测定的结果以直方图表示。在图 1—图 3 中, C 表示鱼红血球细胞核的 DNA 含量, D 表示鸡红血球细胞核的 DNA 含量。根据所检测的 3 种鱼和鸡红细胞核所吸收 PI 的荧光强度, 以参数荧光面积消光值与对照样品鸡的消光值之比可计算出各种鱼的 DNA 含量。依据计算结果, “父本”红鲫的 DNA 含量为 3 pg, 母本的 DNA 含量为 6.08 pg, 而子代的 DNA 含量与母本几乎完全一样, 为 6.04 pg。这样, 子代的 DNA 含量约为“父本”的 2 倍。由此分析鉴定人工四倍体鲤鲫的遗传物质 DNA 基本是母性遗传的。

表 1 流式细胞仪检测四倍体鲤鲫母本、“父本”及子代 DNA 含量

Tab. 1 Results of flow cytometry (FCM) of the DNA contents from artificial tetraploid crucian carp female parent, “male parent” and their offspring						
检测种类	细胞数	平均消光值	消光比值(鱼/鸡)	DNA 含量(pg)	染色体数	倍性(n)
四倍体鲤鲫(母本)	28673	643.8	2.43	6.08	200	4
红鲫(父本)	21522	307.0	1.21	3.00	100	2
四倍体鲤鲫子代	25914	707.2	2.42	6.04	200	4

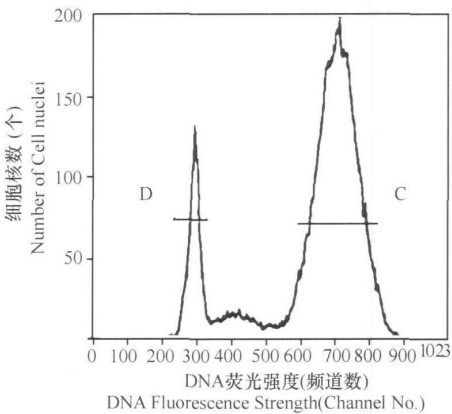


图 1 人工四倍体鲤鲫原代母本的 DNA 含量

Fig. 1 Results of flow cytometry of the DNA contents from female parent of artificial tetraploid crucian carp

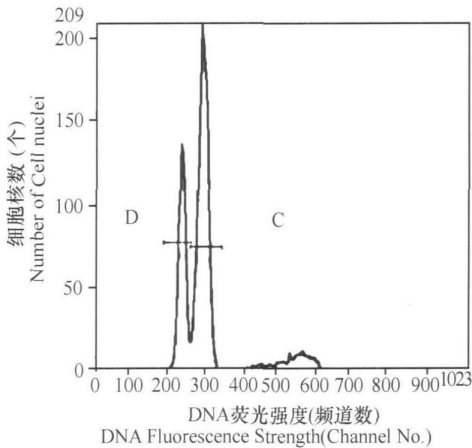


图 3 红鲫的 DNA 含量

Fig. 3 Results of flow cytometry of the DNA contents from red crucian carp

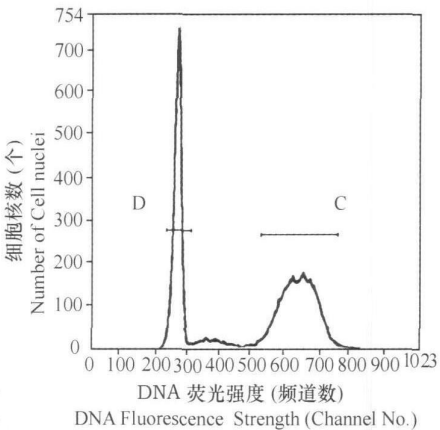


图 2 人工四倍体鲤鲫的子代 DNA 含量

Fig. 2 Results of flow cytometry of the DNA contents from artificial tetraploid crucian carp offspring

### 2.2 RAPD 分析

根据对成熟的四倍体鲤鲫卵进行 RAPD 遗传标记分析结果表明: 同一尾四倍体, 无论是用红鲤, 还是用红鲫、麦穗鱼的精子启动, 它们所产生的后代, 其遗传组成几乎完全一致; 其外型和四倍体母本也十分相似, 却与父本不同。

试验 1 是用一尾四倍体母本的后代(卵子以红鲤和红鲫的精子作启动源)共 12 个个体用两组 RAPD 引物进行扩增, 有 16 个引物获得较好的扩增带型, 共计扩出 946 条带, 其中只有引物  $\phi$ p12 在 12 个个体中获得 2 条带的差异, 其余的引物扩增结果则完全一致, RAPD 检出的突变率为 0.2% (2/946)(表 2)。

表 2 试验 I 四倍体鲤卵以红鲤和红鲫精子启动后代的扩增结果

Tab 2 Primers tested and produced alleles of gynogenetic offspring produced from allotetraploid maternal eggs activated by red crucian carp sperm				
引物	扩增带数/个体数	扩增总带数	差异带数	引物序列
opp1	5	60	2	GTAGCACTCC
opp2	10	120		TCGGCACGCA
opp3	3	36		CTGATACGCC
opp6	4	48		GTGGGCTGAC
opp8	4	48		ACATCGCCCA
opp10	3	36		TCCCCGCCTAC
opp11	5	60		AACGGCTCGG
opp12	3	34		AAGGGCGAGT
opp15	3	36		GGAAGCCAAAC
opp18	4	48		GGCTTGGCCT
opj4	6	72		CCGAACACGG
opj10	11	132		AAGCCCGAGG
opj12	4	48		GTCCCGTGGT
opj13	3	36		CCCACTACC
opj14	4	48		CACCCGAATG
opj18	7	84		TGGTCGCAGA
总计	76	946	2	

试验 II 是用另一尾四倍体母本的后代(卵子以红鲤、红鲫和麦穗鱼的精子作启动源)共 17 个个体用 10 个 RAPD 引物进行扩增,共扩出 1068 条带,其中引物 opj4 在 2 个个体中共扩出 2 条带的差异, opp4 则只获得一条带的差异,其余引物则完全一致, RAPD 检出的突变率不超过 0.187%(表 3)。

表 3 试验 II 四倍体鲤卵以红鲤、红鲫和麦穗鱼精子启动后代的扩增结果

Tab 3 Primers tested and produced alleles of gynogenetic offspring produced from allotetraploid maternal eggs activated by red common carp, red crucian carp and topmouth gudgeon sperms				
引物	扩增带数/个体数	扩增总带数	差异带数	引物序列
opp1	7	119	1	GTAGCACTCC
opp4	8	136		GTGTCTCAGG
opp6	4	68		GTGGGCTGAC
opp8	6	102		ACATCGCCCA
opm2	8	136		ACAAGCCCTC
opm4	7	119		GGCGTTGTC
opm5	6	102		GGGAACGTGT
opj4	6	100		CCGAACACGG
opj12	4	68		GTCCCTGCGA
opj20	7	119		AAGCGGCCTC
总计	63	1068	3	

2.3 染色体比较分析

分别观察计数 100 个四倍体鲤鲫的亲代“父本”、母本及子代的体细胞染色体,结果“父本”红鲤具有两套染色体组,数目是 100,为二倍体;母本具有四套染色体组,数目是 200(图 4),为四倍

体;检查子代也都具有四套染色体组,数目是 200(图 5),为四倍体。根据以上细胞学实验数据再对照 FCM 检测 DNA 含量的研究数据分析发现,两种结果完全相同(表 1),因此鉴定四倍体鲤鲫的子代染色体组的遗传方式为母系遗传。



图 4 人工四倍体鲤鲫母本细胞染色体

Fig. 4 Chromosomes of female parent of artificial tetraploid crucian carp

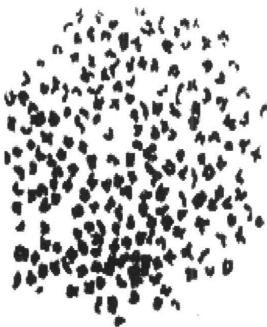


图 5 人工四倍体鲤鲫的子代细胞染色体

Fig. 5 Chromosomes of artificial tetraploid crucian carp offspring

3 讨 论

3.1 关于人工四倍体鲤鲫的产生

关于自然界中的多倍体鱼类的形成, 一直是令国内外许多学者非常感兴趣的研究课题。已有一些形态学、细胞学和同工酶的研究资料证实了多倍体的发生是由杂交引起的<sup>[10, 11]</sup>。本实验室早已发现在鱼类的种间杂交中能够获得行雌核发育的多倍体鱼类种群, 人工四倍体鲤鲫就是极好的成功实例。事实上人工四倍体鲤鲫的培育成功最早是我们具有两性生殖的红鲤和红鲫之间进行人工杂交开始的。在鲤鲫杂交群体中, 通过筛选获得卵母细胞不进行第一次成熟分裂的鲤鲫杂种与镜鲤进行回交产生人工复合三倍体。之后, 再经过不断的人工培育筛选出能与红鲫精子杂交产生四倍体鲤鲫。这些成熟的四倍体个体能产生不减数的四倍体卵子, 无论是进行人工雌核发育还是异精受精后代都是四倍体, 从而形成了四倍体克隆。这一鲤鲫杂交多倍体体系为揭示自然界中天然雌核发育的遗传基础及起源提供了一个极好的研究模型。

3.2 DNA 倍性遗传

长期以来, 分子遗传学和细胞遗传学研究结果为天然和人工培育的鱼类的分类及鉴定提供了有力的理论依据。特别是近年来, FCM 的发展应用使得我们为鉴定人工四倍体鲤鲫天然雌核发育克隆系找到了更为快捷和准确的技术方法。因此本实验中用 FCM 测定 DNA 含量技术研究分析鉴定四倍

体鲤鲫天然雌核发育克隆系的结果是可信的, 子代与母本的 DNA 含量和染色体数量有惊人的一致, 而与父本则完全不同。结合染色体检测, 父本为二倍体, 子代与原代母本的倍性相同, 都为四倍体。这些结果充分证明: 该种 DNA 为母系遗传。到目前为止, 已知自然界中的雌核发育鱼类 DNA 遗传倍性依靠染色体内有丝分裂或无减数分裂的形式进行。研究发现, 四倍体鲤鲫维系倍性属无减数分裂类型, 当成熟卵产出后它的染色体仍然为四倍, 并不接受任何外来染色体的参与, 尽管需要外源精子激活发育, 但精核不能参与雌核的遗传, 因此就导致了后代的 DNA 含量不变, 倍性自然也就不变了。

3.3 RAPD 扩增产物的高度一致

随机扩增多态 DNA (RAPD) 技术是在 PCR 技术基础上发展起来的一项 DNA 多态性检测技术, 可以在对物种没有任何分子生物学研究背景的情况下, 对其 DNA 进行多态性分析, 具有检测效率高、样品用量少、灵敏度高等特点, 因此广泛应用于农作物和畜禽品种及品系的鉴定、物种亲缘关系的确定及构建基因图谱等方面的研究。应用 26 个 RAPD 通用引物对 29 尾由 3 种不同鱼类精子启动的人工四倍体鲤鲫后代的总 DNA 模板进行扩增, 共产生 2014 条条带, 差异的带数仅为 4 条, 且集中于 2 个引物, 其变异率还不及 0.2%, 说明人工四倍体鲤鲫的卵子不管在何种近类精子启动下都能行雌核发育, 而且后代的遗传同一性都十分高。

参考文献:

[ 1 ] Dong X H, Ye Y Z, Wu Q J. Two unisexual artificial polyploid clones constructed by genome addition of common carp (*Cyprinus carpio*) and crucian carp (*Carassius auratus*) [ J ]. *Science in China (Life Sciences)*, 2003 46(6): 595—604

[ 2 ] Wu Q J, Ye Y Z, Chen R D. An artificial multiple triploid carp with natural gynogenesis characteristics [ J ]. *Progress in Natural Science*, 1997, 7(3): 340—344 [ 吴清江, 叶玉珍, 陈荣德. 具有天然雌核发育特性的人工复合三倍体鲤鱼. 自然科学进展, 1997, 7(3): 340—344 ]

[ 3 ] Ye Y Z, Wu Q J. Production of artificial allotetraploid from common carp and crucian carp [ J ]. *Progress in Natural Science*, 1997, 9(7): 658—661 [ 叶玉珍, 吴清江. 人工鲤鲫四倍体的产生. 自然科学进展, 1997, 9(7): 658—661 ]

[ 4 ] Ye Y Z, Zhou J F, Wang X H, et al. Reproduction mode of an artificial allotetraploid carp (Pisces: Cyprinidae) [ J ]. *Hereditas*, 2002, 137: 140—144

[ 5 ] Frederick J A, Robert Q M, Jerome V S. Induced triploids and tetraploid in bighead carp, *Aristichthys nobilis*. Verified by multi-embryo cytofluometric analysis [ J ]. *Aquaculture*, 1990 87: 121—131

[ 6 ] Xiao Y M, Luo C, Liu Y, et al. Ploid analysis of the gynogenetic grass carps [ J ]. *Life Science Research*, 2001, 5(4): 290—293 [ 肖亚梅, 罗琛, 刘筠, 等. 人工雌核发育草鱼染色体倍性的鉴定. 生命科学研究, 2001, 5(4): 290—293 ]

[ 7 ] Ye Y Z, Zhou J F, Wang Z W, et al. Comparative studies of the DNA content from three strains of crucian carp (*Carassius auratus*)

[ J] . *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **22**(3): 291—294 [ 叶玉珍, 周建峰, 王忠卫, 等. 三个鲫鱼品系 DNA 含量的比较研究. 水生生物学报, 2004, **22**(3): 291—294]

[ 8] Zhou J F, Wang Z W, Ye Y Z, *et al.* PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA ND5/6 region among 3 subspecies of common carp (*Cyprinus carpio* L.) and its application to genetic discrimination of subspecies [ J] . *Chinese Science Bulletin*, 2003, **48**(5): 465—468

[ 9] Wang Z W, Ye Y Z, Zhou J F, *et al.* Rapid establishing of pure lines of silver carp (*Hypophthalmichthys molitx*) and bighead carp (*Aristichthys nobilis*) [ J] . *Progress in Natural Science*, 2004, **14**: 60—63

[ 10] Naeves W B, *et al.* Lactate dehydrogenase isozymes in parthenogenetic teiid lizards (*Chamidophorus*) [ J] . *Science*, 1968, **160**(3831): 1004—1005

[ 11] Vrijenhoek R C, Schultz R J. Evolution of a triploid unisexual fish (*Poeciliopsis*, Poeciliidae) [ J] . *Evolution*, 1974, **28**: 306—319