

异源四倍体鲫鲤雌核发育后代及其亲本 RAPD 分析

颜金鹏 刘少军 刘筠

(湖南师范大学生命科学学院 蛋白质化学与鱼类发育生物学教育部重点实验室, 长沙 410081)

RAPD ANALYSIS OF GYNOGENS OF ALLOTETRAPLOID HYBRIDS AND THEIR PARENTS

YAN Jin-Peng, LIU Shao-Jun and LIU Yun

(Key Laboratory of Protein Chemistry and Fish Developmental Biology of Ministry of Education, College of Life Sciences,
Hunan Normal University, Changsha 410081)

关键词: 异源四倍体鲫鲤; 雌核发育; 随机扩增多态 DNA (RAPD); 异源遗传物质

Key words: Allotetraploid crucian carp; Gynogenesis; Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD); Heterologous genetic material

中图分类号: S961. 2 Q344⁺. 5 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2007)06-0905-04

异源四倍体鲫鲤是湖南师范大学鱼类发育生物学实验室和湖南湘阴县东湖渔场在红鲫(♀)和湘江野鲤(♂)的杂交后代中选育出来的四倍体鱼, 目前已连续繁殖14代(F_3-F_{16}), 已形成一个四倍体性能代代相传、遗传性状稳定的四倍体鱼群体, 这是世界上唯一人工培育的两性可育的异源四倍体鱼^[1-2]。利用四倍体鱼与二倍体白鲫、二倍体鲤鱼杂交, 可获得生长快、肉质鲜美、抗病力强等优良性状的不育三倍体湘云鲫、三倍体湘云鲤^[3], 并已在全国28个省市推广养殖, 取得了显著的经济和社会效益。异源四倍体鲫鲤雌性个体产生的二倍体卵子具有两套染色体, 在没有染色体加倍处理情况下, 经紫外线照射灭活的散鳞镜鲤精子激活后, 发育成存活的全雌性雌核发育第1代二倍体鱼(简称G₁, $2n=100$)^[4-5]。全雌性G₁的获得具有重要的生物学意义: (1)证明异源四倍体鲫鲤雌性个体的性别决定类型为XXXX^[4]; (2)G₁能产生二倍体卵子, 为四倍体和三倍体的产生提供了重要的二倍体配子资源^[4-5]; (3)G₁的产生为雌核发育二倍体鲫鲤杂交克隆品系的建立奠定了基础^[5-6]。

RAPD(Random amplified polymorphic DNA)是建立在PCR技术基础上的分子标记技术^[7], 它是利用少数(通常为9—10个)碱基随机排列的寡核苷酸单链为引物, 以研究对象的基

因组DNA为模板进行PCR扩增反应, 通过扩增产物DNA片段多态性来检测基因组DNA多态性。自1990年诞生以来, 它已逐步被应用于基因组研究的各个方面, 尤其在对未知基因组序列的生物品种鉴定和物种亲缘关系探讨等方面更具有独到之处^[8-9]。本研究根据RAPD技术可检测未知DNA序列的不同基因组DNA多态性差异的特点, 使用筛选的34个随机引物对异源四倍体鲫鲤雌核发育后代及其亲本基因组DNA进行RAPD检测, 并对其产生的DNA片段多态性进行相似率分析, 对异源四倍体鲫鲤雌核发育二倍体鱼进行遗传鉴定。同时, 从DNA水平探讨外源精子对其激发产生的后代鱼的影响。

1 材料与方法

1.1 人工雌核发育鱼的获得 异源四倍体鲫鲤F₁₀(简称AT)取自位于湖南师范大学校内的四倍体鱼国家保护基地。用经紫外线照射(两盏15W, 254 nm)而遗传失活的散鳞镜鲤精子(简称SSC)与异源四倍体鲫鲤F₁₀卵子授精激活其发育, 不作任何处理或用冷休克(0℃—4℃)处理, 都获得雌核发育第1代二倍体鱼(简称G₁)。经染色体检测和性腺切片观察G₁为二倍体($2n=100$), 而且全是雌性。

收稿日期: 2006-10-19 修订日期: 2006-12-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30170733 和 No. 30330480); 国家“973”项目(No. 2001CB109006); 教育部跨世纪人才培养基金(No. 200248)资助

作者简介: 颜金鹏(1978—), 男, 湖南永州祁阳人, 博士, 研究方向为发育生物学。E-mail: jpyan0903@sina.com

通讯作者: 刘少军, E-mail: lsj@hunnu.edu.cn

的^[4,5]。因而本实验所选用的鱼全都是雌核发育二倍体鱼,而不是三倍体杂交鱼。随机选取 G₁、AT 和 SSC 各 4 尾用于 RAPD 分析。

1.2 基因组总 DNA 的提取 三种鱼基因组总 DNA 的提取参照标准酚/氯仿法从全血中提取^[10]。以 Lambda DNA/Hind III+ Eco RI Markers DNA 为标准,用 0.8% 琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/mL 的溴化乙锭)电泳(5—10V/cm)1h,紫外灯下拍照,确

定 DNA 的质量及浓度。

1.3 引物的筛选 分别以 4 尾 AT、4 尾 G₁ 和 4 尾 SSC 的基因组 DNA 混合构建的三个 DNA 池为模板,采用 174 个上海生工系列随机引物 S1—S100、S110—S140、S220—240、S320—S340 进行 RAPD 扩增,从中选出重复性好、图谱清晰、扩增产物条带数较多且多态性强的 34 个随机引物(表 1)用于 12 个个体基因组 DNA 的 RAPD 扩增。

表 1 筛选的 34 个引物的序列及其扩增谱带数

Tab. 1 The sequence of screened 34 primers and their amplified bands

引物 Primers	序列 (5' → 3') Sequence	扩增谱带数 Amplified bands	引物 Primers	序列 (5' → 3') Sequence	扩增谱带数 Amplified bands
S8	GTCCACACGG	6—9	S120	GGGAGACATC	5—6
S11	GTAGACCCGT	8—11	S128	GGGATATCGG	4—10
S20	GGACCCCTAC	6—9	S129	CCAAGCTTCC	7—10
S22	TG CCGAGCTG	6—7	S130	GGAAGCTTGG	6—11
S27	GAAACGGGTG	7—12	S134	TGCTGCAGGT	6—8
S28	GTGACGTAGG	7—9	S221	TGACCGATGG	6—9
S31	CAATCGCCGT	7—8	S222	AGTCACTCCC	8—11
S35	TTCCGAACCC	3—5	S228	GGACGGCGTT	4—6
S38	AGGTGACCGT	6—9	S229	TGTACCCGTC	4—10
S42	GGACCCAACC	5—8	S234	AGATCCCGCC	8—9
S45	TGAGCGGACA	3—9	S235	CAGTGCCGGT	8—10
S51	AGCGCCATTG	5—8	S236	ACACCCACAA	5—7
S53	GGGGTAACGA	6—8	S237	ACCGGCTTGT	8—10
S68	TGGACCGGTG	3—7	S238	TGGTGGCGTT	7—8
S69	CTCACCGTCC	6—14	S240	CAGCATGGTC	5—10
S75	GACGGATCAG	6—10	S321	TCTGTGCCAC	3—8
S112	ACCGCGATGT	4—6	S323	CAGCACCGCA	6—10

1.4 RAPD 反应 PCR 扩增仪为美国 Applied Biosystems 公司生产的 GeneAmp[®] PCR System 2700 热循环仪。Taq 酶和 dNTPs 为北京华美生物工程公司产品。RAPD 反应的总体积为 25 μL, 内含 2.5 μL 10× reaction buffer, 2.5 μL 25 mmol/L MgCl₂, 5 μL 1.0 mmol/L dNTP, 1 μL 引物(约 15 ng), 1.5 U 的 Taq 酶, 50—100 ng 核 DNA。RAPD 反应的扩增程序参照 Williams 等^[7]的方法, 94℃ 预变性 4min, 然后循环 35 次(94℃, 1min → 36℃, 1min → 72℃, 2min), 最后 72℃ 延伸 10min。扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上含 0.5 μg/mL 溴化乙锭进行电泳, 用 GDS 7500 凝胶成像分析系统进行扫描和分析。

1.5 相似率分析 根据 Lynch 等^[11]提出的相似率分析公式进行数据分析: $S_{xy} = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ 计算, 其中 N_{xy} 表示个体 x 和 y 之间共有的 DNA 扩增片段数, N_x 和 N_y 分别是个体 x 和 y 的 DNA 扩增片段数。

2 结 果

使用筛选的 34 个 RAPD 引物分别对 AT、G₁ 及 SSC 基因组 DNA 进行 RAPD 扩增, 且在每次扩增中均可产生特定的扩

增带型。这些引物扩增出 3—14 条稳定清晰的条带(表 1), 扩增片段大小在 500—2100 bp 之间。在 AT、G₁ 及 SSC 中分别扩增出 1033、1039 和 961 条 DNA 带, 平均每个引物在每尾鱼中分别扩增出 7.60、7.63 和 7.07 条可分辨的 DNA 带。在所有的 RAPD 扩增图谱中发现子代 G₁ 的扩增谱带基本上与母本相同(图 1A、B)。但是, 两个引物(S28、S128)扩增出 2 条与父本 SSC 相同而与母本 AT 相异的特异性带(图 1C、D), 占 G₁ 扩增总带数的 0.19%; 两个引物(S221、S222)扩增出 4 条与父、母本均不同的特异性带(图 1E、F), 占 G₁ 扩增总带数的 0.38%。

分别对 AT 与 SSC、G₁ 与 AT、G₁ 与 SSC 之间相互共享的 DNA 扩增片段数以及各自具有的 DNA 扩增片段数进行统计分析(表 2)。从表 2 可知, G₁ 与 AT 间共享的 DNA 扩增片段数要远远多于其与 SSC 而 G₁ 与 SSC 间共享的 DNA 扩增片段数和母本 AT 与 SSC 间共享的 DNA 扩增片段数是基本一致的。根据 Lynch 提出的相似率分析公式求得: G₁ 与 AT 间的相似率为 97%, 而 G₁ 与 SSC 间的相似率仅为 60%; AT 与 SSC 间的相似率为 59%。

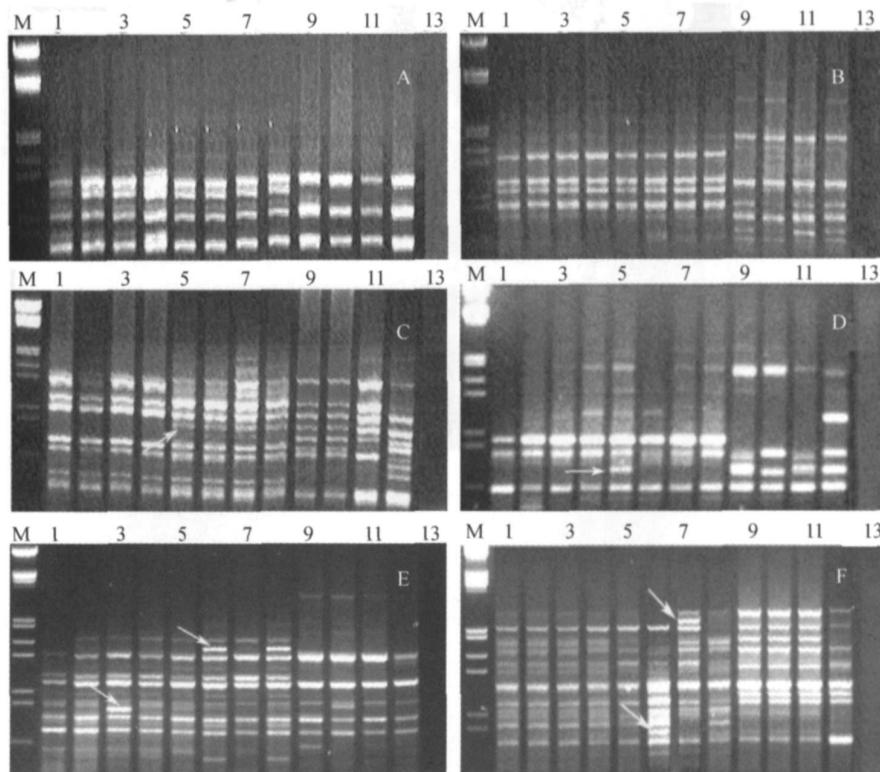


图 1 引物 S35 (A)、S42 (B)、S28 (C)、S128 (D)、S221 (E) 和 S222 (F) 在 G_1 及其父母本中 RAPD 扩增产物的电泳图谱

Fig. 1 RAPD amplification profiles generated with primers S35, S42, S28, S128, S221 and S222 in G_1 and their parents

箭头表示特异性的扩增片段。泳道 M 表示 Lambda DNA/ *Hind* III + *Eco* RI Markers DNA; 泳道 1—4 表示 AT; 泳道 5—8 表示 G_1 ; 泳道 9—12 表示 SSC; 泳道 13 表示空白对照

Arrows indicate species-specific bands. The lane M represents Lambda DNA/ *Hind* III + *Eco* RI Markers DNA; The lanes 1—4 represent AT; The lanes 5—8 represent G_1 ; The lanes 9—12 represent SSC; The lanes 13 represents negative control

表 2 AT、SSC 及 G_1 相互间共享 DNA 片段数及其相似率

Tab. 2 The common DNA bands and similarity of AT, SSC and G_1

DNA 片段总数 Total DNA bands	共有 DNA 片段数 Similar DNA bands		相似率 Similarity		DNA 片段平均数 Average DNA bands
	SSC	G_1	SSC	G_1	
AT	1033	146	242	0.59	0.97
SSC	961		147		0.60
G_1	1039				7.63
					7.07

3 讨 论

在三种鱼基因组 DNA 作模板的 RAPD 分析中, 结果表明: 筛选的 34 个引物扩增效果较好, 能够较好地进行 3 种模板之间的比较分析。由于采用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, 又使检测区域覆盖整个基因组, 增加了实验结果的可靠性。在本实验结果分析中, 子代 G_1 与母本 AT 间的相似率为 97%, 远远高于子代 G_1 与父本 SSC 间的 60%, 说明异精激发产生的雌核发育后代 G_1 的遗传物质与母本相同。子代 G_1 与父本 SSC 间的相似率为 60%, 这与母本 AT 和父本 SSC 间的相似率 59% 是基本相似的, 这进一步说明 G_1 的遗传物质主要

来自母本 AT。同时, G_1 、AT 分别与 SSC 间存在一定的相似性, 这可能是同亚种不同属间的相同遗传物质部分。 G_1 与 AT 间共享的 DNA 扩增片段数要远远多于其与 SSC 间共享的 DNA 扩增片段数, 这也说明 G_1 的遗传物质主要来自母本 AT。图 1E、F 箭头所指的是 G_1 所独有的 DNA 扩增片段, 这可能是子代鱼 G_1 DNA 变异的结果, 也有可能是在遗传过程中两亲本鱼 DNA 发生重组交换所致。至于两亲本鱼之间 DNA 重组交换是如何进行的, 是否是第一次卵裂前发生片段 DNA 分子杂交? 还有待于今后更深入的研究。

Manfred 等^[12] 对雌核发育提出全新的概念, 认为雌核发育可能是一种集无性和有性生殖优点于一体的适应性生殖

模型, 他们发现 *P. formosa* 以近缘两性种微染色体作为载体, 从而结合了大量的近缘两性种的亚基因组 DNA, 作为无性的补偿, 这也许是 *P. formosa* 获得种群延续的行为方式。丁军等^[13]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, 但父母本之间仍可发生有限 DNA 片段的杂交。陈洪等^[14]应用 RAPD 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而与母本相异的 DNA 条带。张海发等^[15]对彭泽鲫雌核发育子一代及双亲进行了 RAPD 分析, 发现异育彭泽鲫子一代中含有少数与父本相同而与母本相异的特异条带, 从基因水平上证实了异育彭泽鲫基因组 DNA 中可能带有异源父本基因组部分 DNA 片段的特性。邹桂伟等^[16]运用 RAPD 技术分析雌核发育鲤, 发现在人工雌核发育后代中也整入了异源父本基因组 DNA 片段。本研究在引物 S28、S128 扩增出子代 G₁与父本 SSC 相同的 DNA 片段, 而母本 AT 在同一位置没有这些 DNA 片段, 说明 G₁基因组 DNA 中可能整入了异源父本基因组部分 DNA 片段, 当然准确的结论需经 DNA 片段测序分析等实验验证后方能得出。同时, 这也意味着在 DNA 水平上父系遗传物质在某种程度上不是绝对被排斥的。蒋一珪等^[17]研究认为异源精子不仅能激发银鲫的雌核发育, 还能影响雌核子代的某些生物学性状(如生长等), 于是提出了“异育效应”的观点。“异育效应”在异源四倍体鲫鲤的雌核发育后代中是否也同样存在? 当然准确的结论还需要进行 DNA 全序列分析、基因组作图以及遗传连锁图谱才可得出。

参考文献:

- [1] Liu S J, Liu Y, Zhou G J, et al. The formation of tetraploid stocks of red crucian carp common carp hybrids as an effect of interspecific hybridization [J]. *Aquaculture*, 2001, **192**: 171—186
- [2] Sun Y D, Liu S J, Zhang C, et al. The chromosome number and gonadal structure of F₉—F₁₁ allotetraploid crucian carp [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2003, **30**(5): 414—418 [孙远东, 刘少军, 张纯, 等. 异源四倍体鲫鲤 F₉—F₁₁ 染色体和性腺观察. 遗传学报, 2003, **30**(5): 414—418]
- [3] Liu S J, Hu F, Zhou G J, et al. Gonadal structure of triploid crucian carp produced by crossing allotetraploid hybrids of *carassius auratus* red var. (♀) × *cyprinus carpio* (♂) with Japanese crucian carp (*carassius auratus* cavieri T. et S) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2000, **24**(4): 301—308 [刘少军, 胡芳, 周工建, 等. 三倍体湘云鲫繁殖季节的性腺结构观察. 水生生物学报, 2000, **24**(4): 301—308]
- [4] Liu S J, Sun Y D, Zhang C, et al. Production of gynogenetic progeny from allotetraploid hybrids of red crucian carp × common carp [J]. *Aquaculture*, 2004, **236**: 193—200
- [5] Zhang C, Liu S J, Liu Y, et al. Evidence of the unreduced diploid eggs generated from the diploid gynogenetic progeny of allotetraploid hybrids [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2005, **32**(2): 136—144 [张纯, 刘少军, 刘筠, 等. 二倍体雌核发育鱼产生而倍体卵子的证据. 遗传学报, 2005, **32**(2): 136—144]
- [6] Liu S J, Duan W, Liu Y, et al. The establishment of the diploid gynogenetic hybrid clonal line of crucian carp × common carp [J]. *Science in China Ser. C*, in press [刘少军, 段巍, 刘筠, 等. 雌核发育二倍体鲫鲤杂交克隆品系建立. 中国科学(C辑), 2007, **37**(1): 28—34]
- [7] Williams J G, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Res.*, 1990, **18**: 6531—6535
- [8] Long L Q, Zhao Z S, Tang B G, et al. Analysis of genetic variation in hybrids between *Misgurnus anguillicaudatus* cross *Paramisgurnus dabryanus* reciprocally by using RAPD [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2000, **24**(6): 659—662 [龙良启, 赵振山, 汤保贵, 等. 泥鳅与大鳞副泥鳅正反交子代遗传变异的 RAPD 分析. 水生生物学报, 2000, **24**(6): 659—662]
- [9] Zhou L, Fan L C, Gui J F. RAPD analysis of incorporation of heterologous genetic materials in multiple species of silver crucian carp [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1998, **22**(4): 301—309 [周莉, 樊连春, 桂建芳. 银鲫复合种外源遗传物质整入的分析. 水生生物学报, 1998, **22**(4): 301—309]
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual ed2 [M]. New York : Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, 463—468
- [11] Lynd M. The similarity index and DNA fingerprinting [J]. *Mol. Biol. Evol.*, 1990, **7**: 478—484
- [12] 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
- [13] Ding J, Xie Y F, Jiang Y G, et al. The analysis of heterologous genetic materials of allogynogenetic gibel carp and its artificial hybrids [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1993, **17**(1): 22—26 [丁军, 谢岳风, 蒋一珪, 等. 异育银鲫及其人工杂交体中外源遗传物质的检测分析. 水生生物学报, 1993, **17**(1): 22—26]
- [14] Chen H, Yang J, Zhu L H, et al. Application of RAPD on comparative study of silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) triggering by heterologous sperms [J]. *Chinese Science Bulletin*, 1994, **39**(7): 661—663 [陈洪, 杨靖, 朱立煌, 等. RAPD 技术在异精激发方正银鲫比较研究中的作用. 科学通报, 1994, **39**(7): 661—663]
- [15] Zhang H F, Chen X L, Shu H, et al. RAPD analysis of gynogenetic F1 progeny triggering by heterologous sperms and their parents of Pengze crucian carp (*Carassius auratus*) [J]. *Chin. J. Appl. Environ. Biol.*, 1999, **5**(5): 507—511 [张海发, 陈湘麟, 舒琥, 等. 异源精子激发彭泽鲫雌核发育产生的子一代及亲本 RAPD 分析. 应用与环境生物学报, 1999, **5**(5): 507—511]
- [16] Zou G W, Pan G B, Wang D Q, et al. Genetic diversity of artificial gynogenesis silver carp and RAPD analysis of incorporation of heterologous genetic materials in gynogenetic progeny [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28**(2): 180—185 [邹桂伟, 潘光碧, 汪登强, 等. 人工雌核发育鲤的遗传多样性及异源遗传物质整入的 RAPD 分析. 水生生物学报, 2004, **28**(2): 180—185]
- [17] Jiang Y G, Liang S C, Chen B D, et al. Biological effect of heterologous sperm on gynogenetic offspring in *Carassius auratus gibelio* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1983, **8**(1): 1—13 [蒋一珪, 梁绍昌, 陈本德, 等. 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, 1983, **8**(1): 1—13]