

异育银鲫及其人工杂合种外源 遗传物质的检测分析*

丁军 谢岳峰 蒋一珪 单仕新

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

提 要

采用 DNA 杂交的方法, 对异育银鲫及其人工杂合种进行了外源 DNA 的检测分析, 发现两个雌核发育系的异育银鲫及其人工杂合种的 DNA 与红鲤 DNA 片段间的分子杂交均有阳性斑点出现, 这表明, 在异育银鲫及其人工杂合种产生过程中, 父本(红鲤)的 DNA 片段的确可以随机地掺入到母本细胞的 DNA 中, 从而产生了异精效应, 使其子代生长加快, 并出现父本性状。

关键词 异育银鲫, 异育银鲫人工杂合种, DNA 杂交, 检测父本(红鲤) DNA 片段

过去认为, 在行雌核发育生殖的鱼类中只表达母本的遗传性状, 人卵精子的作用仅是刺激卵子发育^[1,2]。但蒋一珪等(1983)却在银鲫的异精雌核发育子代中发现了群体的快速生长效应和一些具有父本遗传性状的个体, 他们认为在银鲫雌核发育生殖中, 异源精子不仅可刺激卵子发育, 而且还可以影响其子代的某些生物学性状, 并将异源精子的这种作用称为“异精效应”^[3]。此后, 本实验室在培育异育银鲫人工杂合种的工作中, 也同样观察到了“异精效应”, 如子代中出现了某些具有较为明显父本性状的个体、子代生长速度明显加快等^[1]。类似的效果也曾出现在其它行雌核发育生殖的鱼类中^{[2][4-6]}。尽管有诸多证据证实异精效应的存在, 但迄今对其产生的遗传学机制还不甚明了。蒋一珪等认为, 异精效应的产生是由于父母本间发生了片段 DNA 的杂交, 但目前尚缺乏直接的证据。为此, 我们采用 DNA 斑点杂交的方法, 对异育银鲫及其人工杂合种进行了外源遗传物质分析, 为初步了解异精效应的遗传学机制提供了实验依据。

材 料 与 方 法

实验所用材料鱼均取自本所关桥试验场。

* 本研究获国家自然科学基金(39170602)、湖北省自然科学基金(89J17)和国家淡水生态及生物技术开放实验室(FEBL)资助。

1) 单仕新等, 异育银鲫人工杂合种的研究(待发表)。

2) 许昌光等, 1985。异精激发银鲫雌核发育所获后代的比较研究。齐鲁渔业, (4): 26—32。

1992年5月4日收到。

1. 方正银鲫 为 1983 年引自黑龙江省方正县的亲本银鲫自繁的子代
2. 异育银鲫 方正银鲫(♀)×兴国红鲤(♂)子代
3. 异育银鲫人工杂合种 异育银鲫(♀)(人工脱膜卵予以去除初级控制)×兴国红鲤(♂)子代(F2)
4. 兴国红鲤(♂)

实验设计 由于红鲤与银鲫存在属间差异,因此二者的总 DNA 中应当存在一些非同源(或种特异)片段。如果在异育银鲫或其人工杂合种产生时有父本(红鲤) DNA 片段掺入,那么这两种鱼的 DNA 就应是方正银鲫 DNA 与微量红鲤 DNA 片段的混合体,因此,可首先用方正银鲫总 DNA 与待测鱼的 DNA 进行杂交,反应完全后待测鱼 DNA 中应只剩下父本(红鲤)特异的 DNA 片段,此时再以标记 ^{32}P 的红鲤 DNA 片段作为探针进行杂交,就应该获得阳性斑点(图 1)。

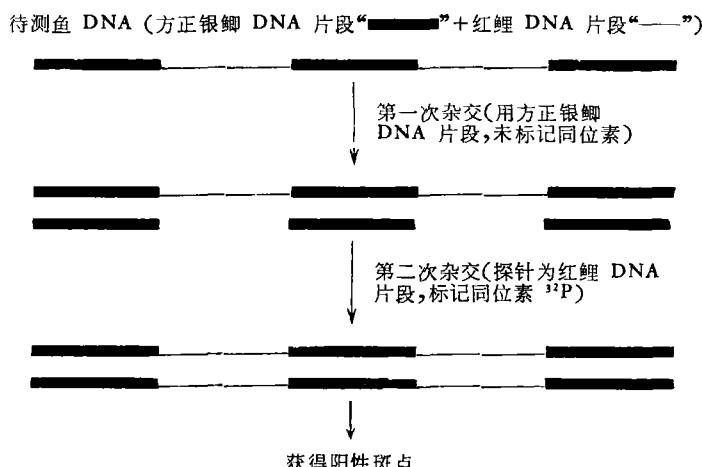


图 1 检测待测鱼中父本(红鲤)特异 DNA 片段的实验原理

Fig. 1 The principle of the analysis of the specific paternal DNA fragments in the test fish.

实验步骤 提取方正银鲫、异育银鲫、异育银鲫人工杂合种及红鲤 DNA: 分别取上述四种鱼的肝脏组织,在 DNA 抽提液 (300 mmol NaCl, 2% SDS, 10 mmol Tris-HCl, 10 mmol EDTA) 中匀浆,加入终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 proteinaseK, 37°C 保温 3 h。经用酚-氯仿抽提,乙醇沉淀, TE (10 mmol Tris-HCl, pH 8.0, 1 mmol EDTA) 缓冲液溶解, -20°C 保存备用。

点膜及预杂交: DNA 样品点膜前在 95°C 水浴保温 5 min, 使 DNA 变性。将变性的异育银鲫、异育银鲫人工杂合种和方正银鲫 DNA 按 10 $\mu\text{g}/\text{孔}$ 点于硝酸纤维素膜上, 室温干燥, 80°C 恒温烤膜 2 h。预杂交基本按 Maniatis 的方法^[7]。

预杂交液为: 6 \times SSc, 0.5% SDS, 5 \times Denhardt's 液和 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的变性鲑鱼精子 DNA。

第一次 DNA 杂交: 杂交液为 6 \times SSc, 0.5% SDS, 5 \times Denhardt's 液和 150

$\mu\text{g}/\text{ml}$ 经超声处理的变性方正银鲫 DNA (不标记同位素), 68°C 杂交(两次), 共 12h。

标记探针及第二次 DNA 杂交: 红鲤 DNA 超声处理成 1 Kb 左右的片段, 用 α - ^{32}P -dCTP 按缺口翻译法进行标记, 过 Sephadex-G-50 柱, 收集第一峰即为标记探针。第二次 DNA 杂交基本按 Maniatis 的方法^[7]。

杂交液为 $6 \times \text{SSC}$, 0.5% SDS, $5 \times \text{Denhardt's}$ 液和 $50 \mu\text{g}/\text{ml}^{32}\text{P}$ 标记的红鲤单链 DNA 片段。

结 果 与 讨 论

异育银鲫、异育银鲫人工杂合种 (F2 代) DNA 与 ^{32}P 标记的红鲤 DNA 片段分子杂交结果见表 1 及图 2。

表 1 DNA 分子杂交结果

Tab. 1 The results of dot hybridization of DNA

被测鱼种类及其所属雌核发育系 ^[8] Species and clone	被测鱼编号 Test fish No.	被测鱼体重 (g) Fish weight	斑点杂交阳性率 Positive rate	生长比较 Growth comparison
C 系异育银鲫人工杂合种 (F2)	1*, 2*, 3*, 4*, 5, 6, 7	10.4, 10.0, 10.0, 8.0, 5.0, 3.2-3.4	85.7%	比 C 系异育 银鲫快 35.0%
C 系异育银鲫	8, 9, 10, 11, 12, 13	3.0, 2.7, 2.5, 2.4, 2.1, 3.1	66.7%	
D 系异育银鲫人工杂合种 (F2)	14, 15, 16, 17, 18, 19	6.8, 7.0, 7.1, 6.7, 6.7, 6.4	33.3%	比 D 系异育 银鲫快 17.1%
D 系异育银鲫	20, 21, 22, 23	5.9, 4.7, 4.7, 4.1	25.0%	
方正银鲫	24, 28, 29, 30	250.0	0	
红鲤与方正银鲫 DNA 混合物 (红鲤 DNA 含量分别为 1, 0.1, 0.01 ng)	25, 26, 27	—	100%	

* C 系异育银鲫人工杂合种群体中出现的较大个体, 均为阳性(阳性率为 100%)。

从表 1 及图 2 中可以看出, 两个雌核发育系的异育银鲫及其人工杂合种的 DNA 与红鲤 DNA 片段间的分子杂交均有阳性斑点出现。这说明, 在异育银鲫及其人工杂合种产生的过程中, 父本精子的 DNA 片段的确可以掺入到卵子的 DNA 中。可以认为, 由于父母本间存在片段 DNA 杂交, 导致异育银鲫及其人工杂合种表达了父本性状^[1]。

此外, 表 1 所示的杂交结果还表明, 阳性斑点的出现率在各类被测鱼中明显不同, 其中在相同雌核发育系中, 异育银鲫人工杂合种的斑点阳性率高于异育银鲫, 与此相对应, 同系的异育银鲫人工杂合种的生长也的确比异育银鲫快, 其中 C 系异育银鲫人工杂合种 (F2) 比 C 系异育银鲫快 35%, D 系异育银鲫人工杂合种 (F2) 快 17%。同时, 作者在 C 系异育银鲫人工杂合种群体(同池发塘)中发现了体重远高于其平均生长水平的个体, 其

1) 同 22 页的脚注 1)。

DNA 斑点杂交的阳性率为 100% (表 1 及图 2), 从这两个结果可以看出, DNA 斑点杂交阳性率与被测鱼的生长率 (Growth rate) 存在一致的关系, 父本 DNA 片段与母本 DNA 间的整合可能会以某种机制大大加快其子代个体的生长。

本实验结果虽然为异精效应产生于父母本片段 DNA 杂交的假设提供了直接证据, 但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) 也可影响其子代的某些性状的可能性, 因此, 要全面了解异精效应的遗传学机制, 还需更为深入的研究。

总之, 通过对异育银鲫及其人工杂合种进行的遗传分析, 作者认为, 雌核发育的银鲫卵在受精过程中与异源的红鲤精子之间可以发生片段 DNA 的杂交, 从而导致了异精效应, 使其子代生长加快, 并表现出某些父本性状。

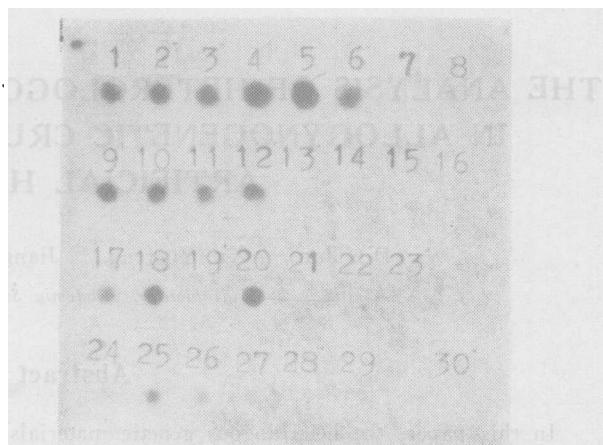


图 2 DNA 分子杂交结果
(照片中的斑点号与表 1 中的被测鱼编号相同)
Fig. 2 The results of dot hybridization of DNA
(Dots are coded by the fish No. listed in Tab. 1)

1 ⁺	2 ⁺	3 ⁺	4 ⁺	5 ⁺	6 ⁺	7 ⁻	8 ⁻
9 ⁺	10 ⁺	11 ⁺	12 ⁺	13 ⁻	14 ⁻	15 ⁻	16 ⁻
17 ⁺	18 ⁺	19 ⁻	20 ⁺	21 ⁻	22 ⁻	23 ⁻	24 ⁻
25 ⁺	26 ⁺	27 ⁺	28 ⁻	29 ⁻	30 ⁻		

参 考 文 献

- [1] Monaco P J, Ellen M R, Joseph S B. Apomictic reproduction in the Amazon Molly, *Poecilia formosa* and its triploid hybrids. In: *Evolutionary Genetics of Fishes* (Bruce J T, ed). New York and London: Plenum Press, 1984: 311—328.
- [2] Scheultz R J, Kallman K D. Triploid hybrids between the all-female teleost *Poecilia formosa* and *Poecilia Sphenops*. *Nature*, 1968, 219(5151): 280.
- [3] 蒋一珪等. 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.
- [4] 孙兴旺. 淇河鲫的生物学特征. 淡水渔业, 1986, (2): 5—8.
- [5] Haskins C P, Haskins E F, Hewitt R E. Pseudogamy as an evolutionary factor in the poeciliid fish *Mollisnisa formosa*. *Evolution*, 1960, 14: 473—483.
- [6] Kallman K D. Gynogenesis in teleost *Mollisnisa formosa* with a discussion of the detection of parthenogenesis in vertebrates by tissue transplantation. *J. Genet.*, 1962a, 58(1): 7—12.
- [7] Maniatis T. Molecular cloning, a laboratory Manual, Cold spring Harbor laboratory, 1982.
- [8] 朱蓝菲, 蒋一珪. 银鲫种内的遗传标记及其在选种中的应用. 水生生物学报, 1987, 11(2): 105—111.

THE ANALYSIS OF HETEROLOGOUS GENETIC MATERIALS IN ALLOGYNOGENETIC CRUCIAN CARP AND ITS ARTIFICIAL HYBRIDS

Din Jun Xie Yuefeng Jiang Yigui and Shan Shixin

(*Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan, 430072*)

Abstract

In this paper, the heterologous genetic materials in allogynogenetic crucian carp and its artificial hybrids were analysed by using the method of dot hybridization of DNA. There were some positive dots when the DNA in two clones of allogynogenetic crucian carp and their artificial hybrids were crossed with the pieces of DNA in red carp. Based on this result, it was suggested that, in the breeding of the allogynogenetic crucian carp and its artificial hybrids, some pieces of paternal DNA can integrate to maternal DNA at random, resulting in the effect of allogynogenesis', i.e. the allogynogenetic offspring have higher growth rate and some paternal characteristics.

Key words

Allogynogenetic crucian carp, Artificial hybrids of allogynogenetic crucian carp, DNA hybridization, Detection of paternal (red carp) DNA fragments