

研究简报

异源四倍体鲫鲤雌雄差异的 RAPD 标记

李建中 刘少军 张轩杰 刘筠

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

RAPD MARKER OF THE DIFFERENCE BETWEEN THE MALE AND FEMALE OF ALLOTETRAPLOID CRUCIAN CARP

LI Jianzhong, LIU Shaojun, ZHANG Xuajie and LIU Yun

(College of Life Science, Hunan Normal University; Key Lab of Protein Chemistry and Developmental Biology, Ministry of Education, Changsha 410081)

关键词: 异源四倍体鲫鲤; RAPD; 性别标记

Key words: Albtetraploid crucian carp; RAPD; Sex-linked marker

中图分类号: Q319 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2004)06-0674-03

异源四倍体鲫鲤是从红鲫和湘江野鲤的杂交后代选育出来的, 已经形成了一个遗传性状稳定的四倍体鱼新种群^[1-6]。用异源四倍体鲫鲤(雄性)和二倍体白鲫(雌性)生产的三倍体湘云鲫已经在全国推广应用。因此, 如果能够了解异源四倍体鲫鲤的性别分化机制, 人为地控制异源四倍体鲫鲤的性别分化, 生产出大量的“超雄鱼”, 这对于三倍体湘云鲫的产业化生产有重要的意义。刘少军等^[3]对异源四倍体鲫鲤的染色体组型进行了分析, 并没有发现异源四倍体鲫鲤有明显的特化的性染色体, 这说明通过细胞遗传学研究异源四倍体鲫鲤的性别遗传机制是有困难的。

寻找性别特异的 DNA 片段, 作为性别决定遗传基础的分子标记是一种简捷的鉴别方法。RAPD 技术由于具有操作简便、实验成本低、快速等优势, 是研究性别特异性标记的一种极其重要的工具^[7-8]。应用 RAPD 技术来寻找性别特异性片段的研究工作在中华绒螯蟹、鸟类、鱼类已经有一些成功的报道^[9-13]。而在国内虽然有不少学者应用 RAPD 技术来寻找鱼类的性别标记^[14-15], 但是到目前为止, 尚未见到成功的报道。作者利用 RAPD 分子标记对雌雄异源四倍体鲫鲤进行了研究, 发现了一条与雄性有关的特异性标记。本研究发现的雌雄差异的 RAPD 标记, 为进一步探讨异源四倍体鲫鲤的性别决定机制奠定了基础; 同时, 还可以作为分子遗传标记, 用于异源四倍体鲫鲤早期性别鉴定的研究。

1 材料和方法

1.1 实验材料 异源四倍体鲫鲤取自于湖南师范大学国家四倍体鱼种质资源保护基地, 为红鲫和湘江野鲤的杂交后代 F₁₀, 经染色体检测, 其染色体均为 4n=200。雌雄异源四倍体鲫鲤各取 10 尾, 均要达到性成熟。实验鱼取来以后, 先从实验鱼的尾静脉中取新鲜血液, 作为基因组 DNA 抽提的实验材料; 然后解剖活鱼, 查看性腺, 确定异源四倍体鲫鲤的性别, 并做好标记。

1.2 基因组 DNA 的提取、RAPD 扩增及产物的检测 雌雄异源四倍体鲫鲤基因组 DNA 的提取和浓度、纯度及分子量的检测以及 RAPD 反应体系、扩增条件和 RAPD 扩增产物的检测同以前的报道^[9]。

1.3 引物的筛选 采用 120 个随机引物(G、C 含量一般为 60%—70%), 以雌、雄性异源四倍体鲫鲤 10 个个体的 DNA 分别等量混合构成的雌、雄性 DNA 池为模板, 同时进行 RAPD 扩增, 筛选出重复性好、带型清晰明亮且雌、雄性 DNA 池有差异的随机引物, 对雌性和雄性异源四倍体鲫鲤群体的每个个体进行 RAPD 扩增, 验证这种差异是由雌雄性别差异引起的还是由于异源四倍体鲫鲤的个体多态性引起的。

1.4 目的片段的克隆和序列测定 切下琼脂糖凝胶板上的目的片段, 用 DNA Gel Purification 试剂盒(上海生物工程公

收稿日期: 2003-12-29; 修订日期: 2004-02-12

基金项目: 国家自然科学基金资助(30170733)

作者简介: 李建中(1969—), 男, 湖南湘乡人; 副教授, 博士; 主要从事鱼类生殖生理的研究

通讯作者: 刘筠(1929—), 男, 湖南武冈人; 中国工程院院士; E-mail: liuyun@hunnu.edu.cn

司) 纯化回收 PCR 产物; 纯化后的产物用 pMD18-T 载体进行连接反应, 连接产物转化大肠杆菌 DH5a 的感受态细胞后, 涂布于含 IPTG 和 X-gal 的选择平板上, 倒置培养过夜。挑白斑, 纯化质粒, 经 Sal I、Sba I 双酶切鉴定, 并以质粒为模板进行 PCR 扩增检测, 将 PCR 扩增获得阳性结果的重组质粒送往上海生物工程公司测序。

2 结果

2.1 RAPD 筛选

本实验共采用了 120 个随机引物, 以雌、雄性异源四倍体鲫鲤 DNA 池为模板, 同时进行 RAPD 扩增, 其中能明显扩增出 DNA 带的引物有 112 个。在能够扩增出 DNA 条带的

112 个随机引物中, 发现有 14 个重复性好、带型清晰明亮且雌雄群体有差异, 但用这些引物对雌雄各 10 个个体进行验证时, 除引物 S129 以外, 均找不到雌雄个体的特征差异带。由于 RAPD 技术可以得到大量的个体多态性, 用等量的混合个体 DNA 构建 DNA 池的方法来筛选引物时, 一些个体差异会上升为群体差异, 这是造成这种群体差异能发现较多性别差异的原因^[12]。

如图 1 所示, 引物 S129 所扩增的 DNA 条带在雌、雄性异源四倍体鲫鲤的个体之间具有明显的性别差异, 10 个雄性个体都有一条片段大小约为 560bp 的特异带(白箭头所示), 而 10 个雌性个体都没有这条带。因此这条特异性的 DNA 带可以作为异源四倍体鲫鲤性别差异的分子标记。

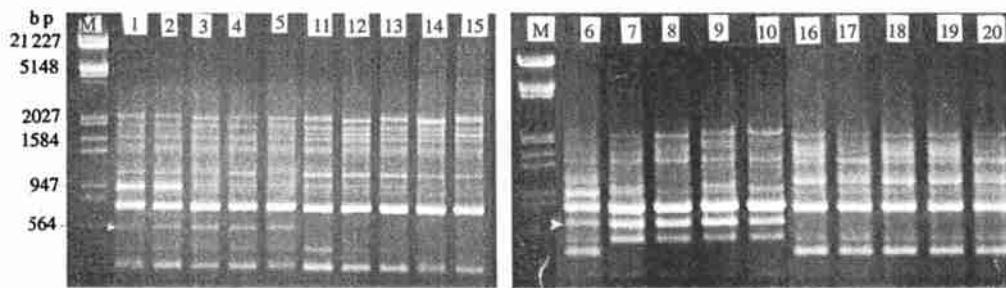


图 1 引物 S129 对雌(11—20)、雄(1—10)异源四倍体鲫鲤各 10 个个体的扩增电泳图谱

Fig. 1 Electropherogram of amplification of DNA isolated from female(11—20) and male (1—10) allotraploid crucian carp using prime S129

2.2 测序结果及序列分析 测序结果表明, 该片段全长 551bp(将该序列在 GenBank 上登录, 登录号为 AY512656), 其中 A+T 含量(53.3%) 大于 G+C 含量(46.7%)。在 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)上, 利用 BLAST 分析软件对所得序列进行查询, 结果显示该序列与 GenBank 上登记的其他序列同源性均小于 20%。这和 Balazs K. et al^[9] 在非洲鲤鱼中发现的两个雄性 RAPD 标记与 GenBank 上登记的其他序列的同源性较低的结果是一致的。

3 讨论

大多数学者认为^[16—18], 鲤鱼类的性别决定类型属于雄性异配型即 XX-XY 型。刘少军^[6]等通过雌核发育的方法, 得到了全雌的异源四倍体鲫鲤后代(XXXX), 表明异源四倍体鲫鲤的性别决定类型属于雌性同型。从本实验的研究结果来看, 引物 S129 所扩增出来的雄性特异性片段由于在雌性中空缺, 所以该片段很有可能是与异配性别紧密连锁的 DNA 片段, 从分子水平支持异源四倍体鲫鲤的性别决定机制为雄性异配型, 即 XXXX(♀)-XXYY(♂) 型, 这与刘少军等的研究结果是一致的。

如果异源四倍体鲫鲤的性别决定类型是 XXXX(♀)-XXYY(♂) 型, 那么雄性最大可能产生三种比例分别为 XX:4XY:YY 的精子, 但是 XY 的精子是否能产生? 这种精子与 XX 的卵子结合产生的 XXXY 个体是否能存活? 这些问题现

在还不是很清楚。如果是 Y 染色体决定雄性的话, 那么 XXXY 个体应该是雄性, 从理论上来说, 异源四倍体鲫鲤的后代中雄性应该多于雌性。但是从刘少军等^[2]随机检测的结果来看, 3225 尾异源四倍体鲫鲤中, 雄性只有 1020 尾, 而雌性有 2102 尾, 雌雄比例约为 2:1, 即雌性远远多于雄性, 这个结果与 Y 染色体决定雄性似乎有矛盾。如何解释这种现象呢? 作者认为, 异源四倍体鲫鲤的性别决定还可能与常染色体有关。Hammerman 和 Avtalion(1979) 提出鱼类的常染色体对性别的决定起一定的作用, 性别是由雄性和雌性的基因产物数量优势来决定的^[18]。如果雄性决定因素超过雌性决定因素, 则雄性比例较高; 反之, 雌性决定因素超过雄性决定因素, 则雌性比例较高。这一理论是以性调节基因定位于性染色体(X, Y, W)和常染色体(A, a)的假设为基础的, 故又称为“常染色体平衡理论”。当然, 异源四倍体鲫鲤的常染色体是否存在性别决定的因素还有待于今后进一步的研究来证实。

本研究结果表明, 雌雄异源四倍体鲫鲤基因组中确实存在差异, 这一差异是否与两性的形态、行为差异相关, 尚需要进一步研究。许多工作, 例如把这个雄性特异性的 DNA 片段作为探针进行 southern 杂交, 进一步证实这个片段是否为雄性所特有; 或者通过荧光原位杂交(FISH 技术)把这个特异性的片段定位在染色体上, 进一步确定这个雄性特异性的 DNA 片段是否与 Y 染色体紧密连锁等等, 这些工作还有待于

今后深入的研究。

参考文献:

- [1] Liu Y, Zhou G J. Cytological study on the gonadal development of F₁: hybrid produce by crossing *Carassius auratus* L. (♀) with *Cyprinus carpio*(♂) [J]. *Acta Hydrobiol Sin*, 1986, **10**(2): 101—107[刘筠, 周工健. 红鲫(♀)×湘江野鲤(♂)杂交一代生殖腺的细胞学研究. 水生生物学报, 1986, 10(2): 101—107]
- [2] Liu S J, Cao Y C, He X X, et al. The formation of tetraploid hybrids of common carp with red crucian carp and the evolutionary significance of tetraploidization in vertebrate [J]. *Engineering science*, 2001, **3**(12): 33—41[刘少军, 曹运长, 何晓晓, 等. 异源四倍体鲫鲤群体的形成及四倍体化在脊椎动物中的作用. 中国工程科学, 2001, 3(12): 33—41]
- [3] Liu S I, 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
- [4] Li J Z, Zhang X J, Liu S J, et al. Studies on the gonadal development in allotetraploid hybrids *Carassius auratus* L. (♀) with *Cyprinus carpio* (♂) [J]. *Acta Hydrobiol Sin*, 2002, **26**(2): 116—122[李建中, 张轩杰, 刘少军, 等. 异源四倍体鲫鲤的性腺发育 [J]. 水生生物学报, 2002, 26(2): 116—122]
- [5] Li J Z, Lu S Q, Liu S J, et al . RAPD analysis of genetic variation between the allotetraploid hybrid of red crucian carp × common carp and their original parents[J]. *J Fish China*, 2002, **27**(5): 403—408[李建中, 鲁双庆, 刘少军, 等. 异源四倍体鲫鲤及其原始亲本遗传变异的 RAPD 分析 [J]. 水产学报, 2002, 27(5): 403—408]
- [6] Liu S J, Sun Y D, Zhang C, et al. Production of gynogenetic progeny from allotetraploid hybrids red crucian carp × common carp[J]. *Aquaculture*, 2004, **236**: 193—200
- [7] Chang Z J, Du Q Y. Sex determination and sex chromosome in fishes [J]. *Freshwater Fisheries*, 2002, **32**(2): 56—58[常重杰, 杜启艳. 鱼类的性别决定和性染色体. 淡水渔业, 2002, 32(2): 56—58]
- [8] Zhou L, Wang Y, Gui J F. Genetic evidence for gonochoristic reproduction in gynogenetic silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch) as revealed by RAPD assays[J]. *J. Mol Evol*, 2000, **51**: 498—506
- [9] Balazs Kovacs, Sandor E, Richard B, et al. Male specific DNA markers from African catfish(*Clarias gariepinus*) [J]. *Genetica*, 2001, **110**: 267—276
- [10] McGowan C, and Davidson W S. The RAPD technique fails to detect a male specific genetic marker in Atlantic Salmon[J]. *Journal of Fish Biology*, 1998, **53**: 1134—1136
- [11] Iturra P, Medrano J F, Bagley M, et al. Identification of sex chromosome molecular markers using RAPDs and fluorescent in situ hybridization in rainbow trout [J]. *Genetica*, 1998, **101**: 209—213
- [12] Bello N, Sanchez A. The identification of a sex specific DNA marker in the ostrich using a random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay[J]. *Molecular Ecology*, 1999, **8**: 667—669
- [13] Qiu T, Lu R H, Xiang C M, et al. Identification of sex differentiation in *Eriocheir sinensis* with RAPD[J]. *J Fish China*, 1998, **22**(2): 175—177[邱涛, 陆仁后, 项超美, 等. 用 RAPD 技术识别中华绒螯蟹性别差异. 水产学报, 1998, 22(2): 175—177]
- [14] Chang Z J, Zhou R X, Yu Q X. Genetic variation of two bach species revealed by RAPD analysis[J]. *Acta Zoo . Sin*, 2001, **47**(1): 89—93[常重杰, 周荣家, 余其兴. 两种泥鳅不同群体遗传变异的 RAPD 分析. 动物学报, 2001, 47(1): 89—93]
- [15] Song P, Pan Y F, Xiang Z et al. RAPD markers and genetic diversity in *Pelteobagrus fulvidrauo* [J]. *J Wuhan Univ. (Nat. Sci. Ed.)*, 2001, **47**(2): 233—237[宋平, 潘云峰, 向筑, 等. 黄颡鱼 RAPD 标记及其遗传多样性的初步分析. 武汉大学学报, 2001, 47(2): 233—237]
- [16] Wu Q J, Gui J F. Genetics and engineering[M]. Shanghai: Scientific and Technology Publisher, 1999[吴清江, 桂建芳. 鱼类遗传育种工程. 上海: 上海科学技术出版社, 1999]
- [17] Lou Y D. Fish breeding[M]. Beijing: China agricultural publisher, 1999[楼允东. 鱼类鱼种学. 北京: 农业出版社, 1999]
- [18] Liu Y. Propagation physiology of main cultivated fish in China[M]. Beijing: Agricultural publishing house, 1999[刘筠. 中国养殖鱼类繁殖生理学. 北京: 农业出版社, 1999]