

同源雌核发育银鲫子代微卫星杂合位点的分离

鲁翠云¹, 佟广香², 杨彦豪², 贾智英¹, 梁利群¹, 孙效文¹, 雷清泉³

(1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070; 2. 大连水产学院 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023; 3. 哈尔滨理工大学 材料科学与工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150080)

摘要:使用14对银鲫(*Carassius auratus gibelio* Bloch)微卫星引物对同源雌核发育的银鲫子代及其亲本进行多态性研究, 探讨雌核发育银鲫的母本微卫星杂合位点在同源传代中是否有分离的情况发生。在所选用的14对微卫星引物中, 有8对在父母本间检测出不同的多态性, 在所检测的第1组银鲫自交的子代中, 只有1个个体在所检测的8个微卫星位点均存在变异, 有明显的父本特异性条带出现, 表现出了大量父本遗传信息, 出现率为4.55%; 在第2组检测到1个个体只在SCM13位点上出现母本部分特异性条带的缺失、弱化, 而在其他位点上没有发现变异, 出现率为1.52%。此结果表明, 雌核发育银鲫卵子大部分在配子发生过程中没有发生减数分裂, 即使用同源精子刺激, 也行雌核发育生殖; 但是, 有极少数卵子在配子发生过程中, 可能发生了部分减数分裂, 具有部分融合同源精子的能力, 从而在子代中检测到父本以及在融合过程中重组来的特异条带, 用微卫星分子标记证实了银鲫两种生殖方式的存在, 即雌核发育生殖和两性融合生殖。[中国水产科学, 2006, 13(2): 200-205]

关键词:雌核发育; 银鲫; 杂合位点

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2006)02-0200-06

银鲫(*Carassius auratus gibelio* Bloch)是行雌核发育的两性型种群^[1-2], 在其天然群体中存在着5%~25%的雄性^[3-4], 对其精子的生物研究表明, 这些精子是可育的^[5]。方正银鲫这种行雌核发育而又雄性可育的银鲫种群有别于传统理论雌核发育产生单性种群的概念, 成为研究单性和多倍体脊椎动物进化遗传学及其生殖方式调控机制的一个独特系统。国内外学者利用不同的生物学研究手段对其生殖机制进行了大量的研究^[6-11]。

对银鲫的受精生物学研究发现, 同源雌核发育银鲫精子和异源两性融合鱼类精子在雌核发育银鲫卵中具有不同的发育行为特征。异源精子在银鲫卵中不能启动发育, 精核高度固缩, 从而呈现出典型的雌核发育过程。而在种内自繁情况下, 同源精子则可以解凝, 并能与卵核接合, 但这种解凝精核不能进一步充分发育转化为雄性原核。研究认为, 这是一种介于典型的雌核发育和两性融合生殖之间的中间类型^[12]。复合四倍体异育银鲫的发现及对其生殖方式细胞学研究也发现和证明了银鲫两种生殖方式

的存在, 即雌核发育生殖和拟两性融合生殖^[13-14]。自此, 中国学者用不同的方法研究了同源和异源精子对银鲫传代的影响, 得出了一些相同或相悖的结论^[15-17], 有待于更多的细胞和分子生物学实验证据证明。

微卫星标记由于共显性特征, 可以准确鉴定子代中来自父本和来自母本的基因型, 因而成为鉴定雌核发育银鲫父本遗传物质是否传递给子代的较适用的工具。2003年中国水产科学研究院黑龙江水产研究所生物技术研究室通过构建和筛选基因组文库的方法, 分离出一批银鲫微卫星分子标记, 以用于探索银鲫遗传和进化机制的研究^[18]。本实验采用所筛选的14对微卫星引物对同源银鲫为父本繁育的子代及其亲本进行检测, 以期给出银鲫在配子发生过程中是否发生减数分裂和两性融合生殖的分子生物学证据。

1 材料与方法

1.1 材料

雌核发育银鲫于2003年9月取自黑龙江水系

收稿日期: 2005-04-28; 修订日期: 2005-07-20。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30271010)。

作者简介: 鲁翠云(1980-), 女, 硕士, 主要从事水产动物基因遗传育种研究。E-mail: stley_123@163.com

通讯作者: 孙效文。Tel: 0451-84842646。E-mail: sunxw2002@163.com

方正县双龙水库,经德国产 Partec PasIII 型流式细胞仪检测倍性(农业部海水增殖生态重点实验室——大连水产学院)。

选取三倍体进行杂合位点检测,获得具有杂合位点的银鲫作为亲本。三倍体方正银鲫(♀)与同种群三倍体方正银鲫(♂)于2004年5月繁育的子代,分2组进行。10月采样分别得到22尾、66尾子代个体。

1.2 基因组 DNA 提取

将剪取的约0.1 g 鳍条加入约300 μ L 的裂解液(100 mmol/L EDTA, pH 8.0; 200 μ g/mL 蛋白酶K;0.5%十二烷基肌氨酸钠),50 $^{\circ}$ C 消化3 h,用酚、

氯仿、异戊醇混合液(体积比为25:24:1)抽提3次,无水乙醇沉淀,自然干燥后溶解于1/10 TE 中,4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3 PCR 扩增

1.3.1 SSLP 引物设计 本研究室用构建银鲫基因组文库的方法筛选出微卫星序列,利用美国白头医学研究所的 Primer 3 程序,根据银鲫的微卫星序列在重复序列的上、下游设计 PCR 引物,上海生物工程公司合成2 OD 的银鲫 SSLP 引物。本实验用已筛选出的14对有稳定扩增的引物对样品进行PCR扩增分析,其中有8对引物在父母本中表现出不同的多态性(表1)。

表1 SSLP 引物序列
Tab.1 Sequence of SSLP

引物 Primer	序列 5' - 3' Sequence 5' - 3'	重复序列 Motifs	退火温度/ $^{\circ}$ C Annealing temperature
SCM04	F TTCACTAGAACAGCAGGAGT R ACAATGGTAACAGGGACAC	(CA) ₁₈	52
SCM09	F GCTTGTTTTGCTGCTCAAGA R ATATGACTGGGCCACAGAGG	(TG) ₂₅	52
SCM10	F GAGCGCTCTTACCTTGATG R GTCJCATCCGCTCCAAACTG	(GT) ₃₄	60
SCM13	F ACCGTTTGTGAGAGCGAGTGT R AACCAGGTGTGACACAATGC	(CA) ₁₀	60
SCM17	F CGGATCAGTCACCAAGTCAG R CGACAGACGCATGAGGTAGA	(GT) ₃ T(TG) ₁₂	62
SCM21	F CCGCAGTATGCTCTGCTGT R CTAGAGGATCCGCATGGAAA	(AG) ₁₁ (TG) ₁₈	57
YJ05	F CGGGGATCAATAACAACC R GACGCCATTTTACCAGTG	(CA) ₂₁	51.5
YJ12	F GGTCCTTAGAACTTCACAA R AGTGCTCTACCTTCGCTAT	(GT) ₉ GC(GT) ₅	55

注:F—正向引物;R—反向引物。

Note: F—Forward; R—Reverse.

1.3.2 PCR 反应体系 反应总体积为25 μ L,其中模板DNA 1 μ L(50 ng),10 mmol/L Tris-Cl (pH 8.3),50 mmol/L KCl,15 mmol/L MgCl₂,0.001% 明胶,0.1% Tween-100,dATP、dGTP、dTTP、dCTP 各2 mmol/L,引物为0.2 mmol/L,Taq 酶为1 U。

1.3.3 PCR 反应程序 94 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,X $^{\circ}$ C* 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环;72 $^{\circ}$ C 5 min。在 PERKING Gene Amp PCR System 9700 型 PCR 仪上进行反应。

1.4 扩增产物的电泳分析

PCR 产物用2%的琼脂糖凝胶(内含1/21 体积的荧光染料 Goldview)进行检测,在5V/cm 的低电压常温下进行电泳,电泳完毕后用凝胶成像仪 UVP8000 扫描,Gelworks 软件包(3.0 版本)进行条带的定量分析。

1.5 数据处理

根据 Nei 和 Li^[19] 的相似性系数分析公式进行数据分析。

* 各引物退火温度不同,详见表1。

$$F = 2N_{ab} / (N_a + N_b)$$

式中, N_{ab} 为 a 、 b 之间共有片段数; N_a 为 a 具有的扩增片段数; N_b 为 b 具有的扩增片段数。

2 结果

2.1 微卫星分子标记的扩增结果与分析

所选用的 14 对银鲫微卫星引物, 其重复数均在 10 次以上。用此 14 对微卫星引物对 2004 年 5 月繁育的 2 组同源雌核发育银鲫子代及其亲本进行检测, 用 2% 琼脂糖凝胶电泳进行分析, 结果有 8 对微卫星引物在父、母本间扩增出不同的多态性, 个体在琼脂糖凝胶电泳图谱上表现出的等位基因数为 1—3 个, 大小为 138—301 bp。其余 6 对微卫星引物在父、母本均扩增出纯合的单条微卫星条带, 且父、母本间无差异或在琼脂糖凝胶电泳图谱上差异不明显。

2.2 子代及其亲本的基因型分析

同源繁育的银鲫子代及其亲本在 8 个微卫星位点扩增出各微卫星座位特异的基因型。两组同源繁育的子代群体大部分扩增出与母本相同的基因型,

母本微卫星杂合位点在传代中没有分离, 符合银鲫雌核发育的生殖特性。但是在第一组同源繁育的子代群体检测到 1 个个体 (第 5 个个体), 在 8 个微卫星位点均表现出不同于母本的特异基因型, 其中 SCM9、SCM21、YJ12 位点上与父本的基因型相同 (图 1), 而 SCM4、SCM10、SCM13 位点上与父本的基因型相似 (图 2), 出现率为 4.55%。第二组同源繁育子代群体检测到 1 个个体 (第 22 个个体), 只在 SCM13 位点上表现出母本杂合位点上条带的缺失或弱化 (图 3), 出现率为 1.52%, 66 尾子代个体在其他微卫星位点均扩增出与母本相同的基因型。

2.3 子代与其亲本的相似性分析

根据 Nei 等^[19]相似性分析公式, 分别对两组子代及其亲本之间共有的 DNA 扩增片段以及各自具有的 DNA 片段进行统计分析。结果显示, 第一组子代与其母本及其父本的相似率分别为 73.68%、33.33%, 第一组母本与父本的相似率为 7.69%; 第二组子代与其母本的相似率为 100%。可见两组子代与其母本的相似率均远高于其与两父本的相似率, 黑龙江水系银鲫子代在基因组 DNA 水平上

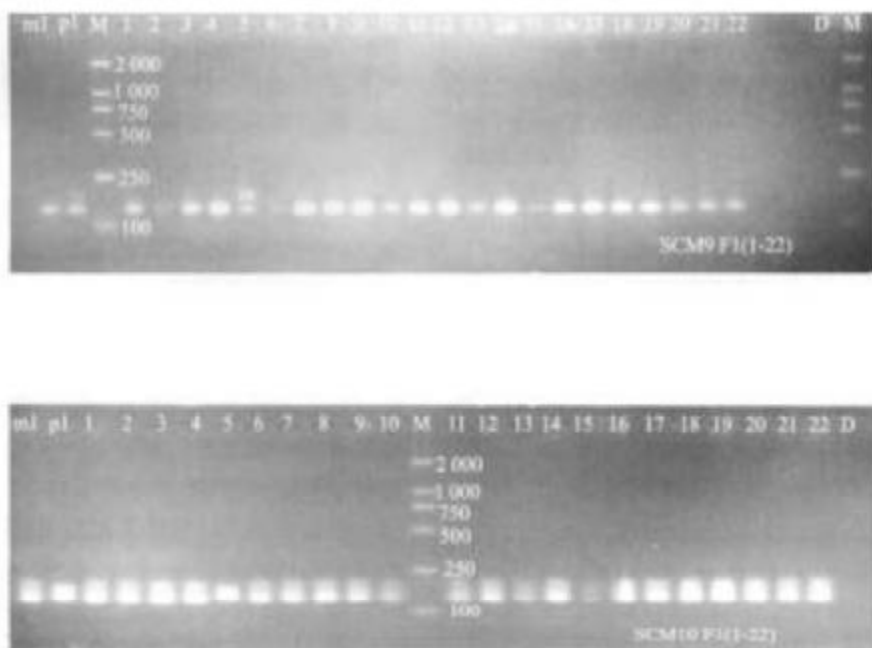


图2 SCM10 扩增的第一组亲本及其子代微卫星琼脂糖凝胶电泳图谱
ml—第一组母本; pl—第一组父本; F1—第一组子代; D—阴性对照; M—DL2000 DNA 分子量标准

Fig.2 Electrophoretogram of microsatellite marker amplified by SCM10

ml—maternity of group I; pl—paternity of group I; F1—progeny of group I;

D—negative control; M—DL2000 DNA molecular marker

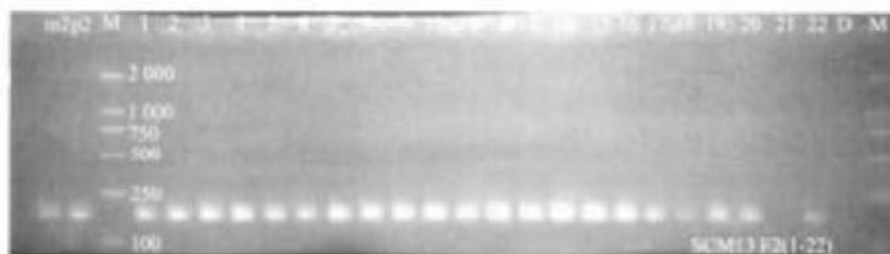


图3 SCM13扩增的第二组亲本及其子代琼脂糖凝胶电泳图谱

m2—第二组母本;p2—第二组父本;F2—第二组子代;D—阴性对照;M—DL2000 DNA分子量标准

Fig.3 Electrophoretogram of group II parents and progenies amplified by SCM13

m2—maternity of group II; p2—paternity of group II; F2—progeny of group II;

D—negative control; M—DL2000 DNA molecular marker

基本与母本相同,表现出雌核发育的特性。第一组子代与父本的相似性要高于其母本与其父本的相似率,可见,第一组子代中所检测到的1尾特异个体,整合了大量的父本DNA片段,其存在影响到繁育群体整体相似率,而第二组子代检测到特异个体变异较小,不足以对整个雌核发育体系以及群体的遗传相似性产生影响。

3 讨论

自从发现方正银鲫为两性型雌核发育种群以来,对银鲫生殖机制的研究逐渐深入。早期的细胞学研究认为,行天然雌核发育的银鲫用同源和异源精子受精,进入其卵子后均受到抑制,一直保持固缩的致密状态,不能形成雄性原核,也不与雌性原核融合,整个个体发育所需要的遗传信息均来自雌核^[20-21]。有关银鲫卵子发生的细胞学研究普遍认为,银鲫卵子发生过程中第一次减数分裂受到抑制,而只是完成了一次同型核分裂,产生的卵子具有和母本完全相同的染色体组成。

银鲫天然和人工群体中5%~25%雄鱼的存在是不争的事实。繁育实验表明,银鲫后代中雄性所占的比例与精子的种类有关,银鲫与不同亲缘关系的雄鱼杂交,后代具有不同比例的雄鱼,亲缘关系越远,后代中雄性越少或没有^[22],且雄性可育^[5]。葛伟等^[12]研究发现,银鲫卵子对同源和异源精子的受精过程表现出两种不同的发育行为,异源精子在银鲫卵中不能启动发育,精核高度固缩,从而呈现出典型的雌核发育过程;而在种内自繁情况下,同源精子则可以解凝,并能与卵核接合,但这种解凝精核不能进一步充分发育转化为雄性原核,认为这是一种介

于典型的雌核发育和两性融合生殖之间的中间类型。复合四倍体异育银鲫的发现从另一个侧面证明了方正银鲫两性生殖方式的存在^[16],研究发现复合四倍体异育银鲫虽然整合了一套鲤鱼的染色体,但仍然保留了银鲫雌核发育的特性^[23],进一步研究发现复合四倍体异育银鲫在应答父本精子和母本精子的过程中,表现出两种不同的发育方式^[13]。细胞学观察证明了复合四倍体异育银鲫具有两种不同的生殖方式——异精雌核发育生殖和拟两性融合生殖^[14]。

分子标记的发展和应用为现有观点提供了更多的检验手段和实验证据。RAPD研究认为同源和异源父本对银鲫后代均没有在DNA水平产生影响^[17],而周莉等^[9]的研究结果则相反,认为银鲫可以受到父本的影响,存在两种生殖方式。银鲫微卫星分子标记的分离和应用为深入研究银鲫的受精方式提供了新的机会^[18]。本研究从14个银鲫微卫星分子标记中检测到8个多态性标记,在琼脂糖凝胶电泳图谱上表现出明显的多态性,且检测快速、简便,适用于银鲫的遗传育种实践及研究。用此8个微卫星多态性标记对同源繁育的2组亲本及子代进行分析,发现同源繁育的银鲫子代有少量个体出现母本多态性位点的分离和大量父本遗传信息的掺入,出现率为1.52%~4.55%。此结果表明,银鲫卵子有少量发生了两性融合,同源受精过程中有遗传物质交流发生。由于检测的样本数有限,银鲫同批卵子发生融合的比例,还有待进一步的调查研究。这似乎说明母本在配子形成的过程中有极少量的配子发生了部分减数分裂,从而与同源父本提供的精子发生了相当部分的融合。自然水体中三倍体雄性银鲫产生的精子除具有激活雌性银鲫卵子发育的作

用外,还兼有与卵子进行两性融合的能力。子代越冬后检测第1组22尾个体存活19尾,其中雌性18尾,雄性1尾,雄性比例为5.26%,特异个体为雌性个体,流式细胞仪检测倍性呈三倍体,对于特异个体所具有的父本特异条带及个体特异的DNA条带在未来传代中的命运,将做进一步的研究报道。沈俊宝等^[5]通过研究提出黑龙江银鲫除具有雌核发育的能力外,还具有两性融合的生殖能力。而且据此提出了黑龙江银鲫雌性具有两种类型卵的假设,在一般情况下,雌性银鲫产生两种卵,一种卵不具有精卵结合两性生殖的能力,与同种或异种精子受精都只能进行雌核发育,这种卵称为A型卵;另一种卵(即B型卵)与第一种卵的区别是具有与同种精子结合正常发育的能力,由于精卵的结合,精子带入了染色体或雄性决定基因染色体,因此这种卵就能发育出雄性个体。A、B型卵的假设可以很好地解释银鲫天然种群中雄性的存在,但是两种卵的存在还只是一种推测,没有确实的实验证据。

自然界银鲫可以利用同地共居的近缘甚至远缘两性鱼的雄鱼繁殖后代,然而却能保持其种的特征的相对稳定性。在这种情况下,雌核发育银鲫集两种繁殖方式于一身具有重要的生物学意义。一方面,雌核发育银鲫通过抑制异源精子的发育,在细胞学水平上阻止了异源遗传物质的渗入,避免种间杂种的产生,这一机制使得雌核发育银鲫利用异源雄鱼繁衍后代的同时,可以有效地维持其物种的自身稳定;另一方面,在种内自繁情况下,银鲫后代中可以产生一定比例的雄鱼,其精子在雌核发育银鲫卵中可有部分程度的进入发育状态(解凝),并与卵核接合。这是一种既类似于传统的典型雌核发育过程,又类似于两性融合过程的独特的中间发育类型。这一机制既保证了雌核发育银鲫种群各克隆的相对独立和稳定,又可以实现克隆间有限的有性遗传交换。这对于促使克隆的进一步分化,维持和增强雌核发育种的生存竞争能力,防止物种退化具有重要意义。银鲫种群中产生的少量雄鱼在沟通种群各克隆间的遗传交流方面可能起着某种桥梁作用。

参考文献:

- [1] 蒋一佳,俞豪祥,陈本德,等. 鲫鱼的人工和天然雌核发育[J]. 水生生物学集刊,1982,7(4):471-477.
- [2] 周嘉申,沈俊宝,刘明华. 黑龙江方正银鲫雌核发育的细胞学初步探讨[J]. 动物学报,1983,29(1):11-15.
- [3] 沈俊宝,王国瑞,范兆廷. 黑龙江主要水域鲫鱼倍性及其地理分布[J]. 水产学报,1983,7(2):87-94.
- [4] 蒋一佳,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[J]. 水生生物学集刊,1983,8(1):1-13.
- [5] 沈俊宝,刘明华,范兆廷. 黑龙江银鲫[M]. 哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1997.
- [6] 余豪祥. 银鲫雌核发育的细胞学观察[J]. 水生生物学集刊,1982,7(4):481-487.
- [7] 朱蓝菲,蒋一佳. 组织移植对银鲫不同雌核发育系的遗传监测[J]. 水生生物学报,1990,14(1):16-21.
- [8] Yang L, Yang S T, Wei X H, et al. Genetic diversity among different clones of the gynogenetic silver crucian carp, *Carassius auratus gibelio*, revealed by transferring and isozyme markers[J]. Biochem Gen, 2001, 39:213-225.
- [9] Zhou L, Wang Y, Gui J. Genetic evidence for gynogenetic reproduction in gynogenetic silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch) as revealed by RAPD assays[J]. J Mol Evol, 2000, 51:498-506.
- [10] 周 莉,刘静霞,桂建芳. 应用微卫星标记对雌核发育银鲫的遗传多样性初探[J]. 动物学研究, 2001,22(4):257-264.
- [11] 刘 军,石耀华,尹 勇,等. 雌核发育银鲫四种孵化酶基因全长 cDNA 的克隆及其特征分析[J]. 高技术通讯,2003,7:38-45.
- [12] 葛 伟,单仕新,蒋一佳. 雌核发育银鲫的受精生物学研究—天然雌核发育银鲫繁殖方式的讨论[J]. 水生生物学报,1992,16(2):97-100.
- [13] 桂建芳,梁绍昌,朱蓝菲,等. 人工复合四倍体异育银鲫卵子应答父本种精子和母本种精子两种不同发育方式的发现[J]. 科学通报,1992,11:1030-1033.
- [14] 杨仲安,桂建芳,朱蓝菲,等. 复合四倍体异育银鲫两种不同生殖方式的细胞学观察[J]. 动物学报,1994,40(1):69-74.
- [15] 丁 军,单仕新,葛 伟,等. 银鲫卵对两类精核发育的初级控制作用模式的研究[J]. 中国科学(B辑),1991,11:1160-1165.
- [16] 丁 军,蒋一佳,单仕新,等. 复合四倍体异育银鲫产生的细胞学机制[J]. 水生生物学报,1992,16(2):186-187.
- [17] 滕春波,孙敬文,沈俊宝,等. 利用异源精子诱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.
- [18] 贾智英. 方正银鲫、南美白对虾和栉孔扇贝微卫星序列的筛选[D]. 大连:大连水产学院,2004,6.
- [19] Nei M, Li E H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proc Natl Acad Sci, 1979, 75:2113-2119.
- [20] 俞豪祥. 银鲫雌核发育的细胞学观察[J]. 水生生物学集刊,1982,7(4):481-487.
- [21] 周嘉申,沈俊宝,刘明华. 黑龙江方正银鲫雌核发育的细胞学初步探讨[J]. 动物学报,1983,29(1):11-16.
- [22] 蒋一佳,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[J]. 水生生物学集刊,1983,8(1):1-13.
- [23] 桂建芳,梁绍昌,朱蓝菲,等. 人工复合四倍体异育银鲫雌核发育生殖方式的初步证明[J]. 科学通报,1992,836-838.

Segregation of microsatellite heterozygous loci in homologous gynogenetic silver crucian carp (*C. a. gibelio* Bloch) offspring

LU Cui-yun¹, TONG Guang-xiang², YANG Yan-hao², JIA Zhi-ying¹, LIANG Li-qun¹, SUN Xiao-wen¹, LEI Qing-quan³

(1. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Science, Harbin 150070, China; 2. Life Science and Technology College, Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China; 3. Material Science and Engineering College, Harbin Science and Technology University, Harbin 150080, China)

Abstract: The silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch) is a triploidy gynogenetic species, which provides a unique model system for understanding evolutionary genetics and for elucidating the regulatory mechanisms underlying diverse reproduction modes in vertebrates. In this study, PCR was performed on homologous gynogenetic parents and its offspring by 14 pairs of microsatellite primers, which was expected to disclose the segregation of maternal heterozygous loci in generation passage. There were two groups of parents and its offspring to test in this study. Eight microsatellite loci showed different polymorphism between father and mother in selected 14 loci. In group I, only one individual, that occupied 4.55% of the population, was detected to show the obvious specific bands of paternal in each of the 8 loci, which showed abundant paternal genetic information. Meanwhile, an individual represented the deletion and weakening of partly maternal specific bands in microsatellite locus SCM13 in group II, which occupied 1.25% of the population. It was concluded that meiosis did not happen during the most process of gametogenesis in gynogenetic silver crucian carp eggs, even when they were stimulated by homologous sperms. However, minority eggs maybe complete meiosis partly at gametogenesis that can lead to fusing the homologous sperms partly. In this case, the specific bands from pater and recombination during the fusion can be detected in filial generation. It is confirmed that there exist two reproduction modes in silver crucian carp including gynogenesis and amphimixis by microsatellite molecular markers. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(2): 200–205]

Key words: *Carassius auratus gibelio*; heterozygous loci; segregation

Corresponding author: SUN Xiao-wen. Tel: 0451–84842646; E-mail: sunxw2002@163.com