

异源精子诱导稀有鮡鲫的人工雌核发育

贾方钧 王剑伟 吴清江

(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)

摘要:用经过紫外线灭活的异源精子启动稀有鮡鲫卵子发育,再经过热休克分别抑制极体排放和第一次卵裂,得到了极体雌核发育和有丝分裂雌核发育的存活个体。通过正交试验确定诱导极体雌核发育的最佳参数为受精后 2min、40℃休克处理 2min;诱导有丝分裂雌核发育的最佳参数为受精后 17min、40℃休克处理 2min。雌核发育个体的形态学特征没有显示出受到父本影响的迹象。RAPD 分析表明雌核发育个体扩增片段全部来自于母本,没有发现异源父本 DNA 成分进入稀有鮡鲫基因组的迹象。实验中还发现,鲤♂×稀有鮡鲫♀的正常杂交组合能以极低的几率产生出雌核发育的稀有鮡鲫。

关键词:稀有鮡鲫;雌核发育;远缘杂交

中图分类号: S965.117 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2002)03-0246-07

稀有鮡鲫(*Gobiocypris rarus* Ye et Fu)具有适应力强、性成熟周期短、繁殖季节长、产卵频次高等特点,是一种有发展前途的实验动物^[1]。雌核发育的子代,由于没有发生雄原核的融合,遗传物质全部来源于卵子,一代雌核发育即可得到纯合程度相当于 14 代同胞近交的子代^[2],因此人工诱导雌核发育可以在短期内建立起纯系,以满足研究和应用的需要。具有实用价值的雌核发育诱导方法主要有温度休克(包括热休克和冷休克)和药物处理,在启动卵子发育时,前人较多采用了遗传失活的同种精子,但也有采用异源精子的报道^[3-5]。由于光修复效应等因素的存在,用紫外线辐射处理不能绝对保证所有精子达到完全的遗传失活^[6]。如果采用杂种不能存活的远缘种的精子,辅以紫外线辐射处理,就可以有效避免精子灭活不彻底给实验结果带来的干扰。笔者用鲤和泥鳅的精子经紫外线照射后启动稀有鮡鲫卵子的胚胎发育,再用热休克的方法完成染色体组的加倍,成功诱导了稀有鮡鲫的雌核发育,详细报道如下。

1 材料与方法

1.1 试验鱼 稀有鮡鲫, $2n = 50$, 由本所鱼类学研究室繁育饲养。红鲤(*Cyprinus carpio*, red var.), $2n = 100$, 取自本所关桥试验场。泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus* contor), $2n = 100$, 购买于水果湖集贸市场。

收稿日期:2001-09-12;修订日期:2001-09-27

基金项目:国家自然科学基金重点项目(39830300)

作者简介:贾方钧(1966—),男,吉林省吉林市人;中国科学院水生生物研究所遗传学博士研究生

通讯作者:吴清江, Email: qjwu@ihb.ac.cn

1.2 精子的遗传失活 挤压雄性红鲤的腹部,采集精液。用 TC199 培养液稀释 10 倍,置于 15W 的紫外灯下,照射 5min,照射距离为 17cm。泥鳅精子的灭活处理与此相同。

1.3 人工授精 湿法授精。将正处在排卵状态中的雌性稀有鮡鲫捞出,用 0.8% 的氨基甲酸乙酯麻醉。将稀有鮡鲫的卵挤入盛有少许人工卵巢液的玻璃平皿,摇动平皿使卵均匀分布在皿底部,弃掉卵巢液,加入适量的精液及曝气水完成授精。

1.4 极体雌核发育的诱导 针对休克起始时间、休克温度和休克持续时间三种参数,按照三因子三水平的正交试验要求设计试验组合。分别在受精后 1—3min,将盛有受精卵的玻璃平皿迅速置于 39—41℃ 控温水浴锅内,摇动玻璃皿,使鱼卵受热均匀。持续 1—3min 后,将玻璃皿取出并置于 25℃ 水中继续孵化。

1.5 有丝分裂雌核发育的诱导 选择休克起始时间为受精后 15—19min,其余操作同上。

以上的诱导雌核发育的各组试验均设立以下的对照,对照组 1 作为标准对照,采用正常稀有鮡鲫精液给稀有鮡鲫卵授精,对照组 2 采用未经紫外线处理的鲤精子给稀有鮡鲫卵授精,对照组 3 采用经过紫外线照射处理的鲤精子给稀有鮡鲫卵授精,对照组均不经受温度休克处理。分别取出膜前的胚胎以及存活两周的仔鱼,参照洪云汉的快速制备法^[7],稍加改进作检查染色体。

1.6 存活率计算 统计囊胚期、孵化期以及孵化后两周各个试验组和对照组的个体数,以对照组 1 发育至囊胚期的胚胎占卵数的比例作为标准受精率,折算出标准对照组在各个发育阶段的存活率,进而得出各试验组在相应发育阶段相对存活率。

1.7 雌核发育稀有鮡鲫的形态学鉴定 选择具有分类学意义的形态特征观察记录,与正常的稀有鮡鲫个体比较鉴定。

1.8 雌核发育稀有鮡鲫的 RAPD 分析 在同一母本经不同途径获得的子代中,选择有丝分裂雌核发育个体,极体雌核发育个体,正常两性生殖个体各 5 尾,剪取尾鳍组织提取基因组 DNA,同时也从父本鲤的尾鳍组织中提取基因组 DNA,提取方法按照 Ausubel^[8] 等进行。RAPD 扩增反应应用 Williams 等的方法^[9],引物为 OPERON 公司的第 V 组共 20 个引物,序列见表 1:PCR 反应体系: H₂O, 16.5μL; 10 × 反应缓冲液, 2.5μL; 25mol/L MgCl₂, 2.5μL; 10mol/L dNTPs, 1.25μL; 随机引物 1μL; 模板 DNA, 1.5μL; Taq DNA 聚合酶, 0.25μL 扩增产物用琼脂糖凝胶和溴化乙锭染色后置于紫外线透射检测仪观察记录。

表 1 用于 RAPD 分析的引物序列

Tab.1 The sequences of primers for RAPD analysis

引物 Primer	序列 Sequences	引物 Primer	序列 Sequences	引物 Primer	序列 Sequences
V-01	TCACGCATGG	V-08	GGACGGCGTT	V-15	CAGTGCCGGT
V-02	AGTCACTCCC	V-09	TGTACCCGTC	V-16	ACACCCACACA
V-03	CTCCCTGCAA	V-10	GGACCTGCTG	V-17	ACCGGCTTGT
V-04	CCCCTCACGA	V-11	CTCGACAGAG	V-18	TGGTGGCGTT
V-05	TCCGAGAGGG	V-12	ACCCCCACT	V-19	GGGTGTGCAG
V-06	ACCCCCAGGT	V-13	ACCCCCTAGG	V-20	CAGCATGGTC
V-07	GAAGCCAGCC	V-14	AGATCCCGCC		

2 结果

2.1 按照正交试验设计,在诱导稀有鮡鲫极体雌核发育的过程中,针对不同的休克起始时间、休克温度和休克持续时间,进行了 9 个批次的试验。结果见表 2。

表 2 热休克诱导极体雌核发育的结果

Tab.2 Survival rate of polar-body gynogenetic progenies induced by heat shocking

试验组编号 Trial No.	休克起始时间 Time of shocking triggered (min)	休克温度 Temperature (°C)	休克持续时间 Duration (min)	孵化期相对存活率 Survival at hatching (%)	仔鱼相对存活率 Survival at fry (%)
A	1	39	1	2.1	0.5
B	1	40	2	1.2	0
C	1	41	3	0.3	0
D	3	39	3	14	7.5
E	3	40	1	8.8	2.4
F	3	41	2	5.4	1.3
G	2	39	3	21.2	10.1
H	2	40	2	26	12.2
I	2	41	1	16.5	5.7

结果显示,按受精后 2min、40℃持续 2min 处理的 H 组的存活率最高,应为人工诱导极体雌核发育的最佳条件。

2.2 在预备试验中发现,若休克起始时间早于 15min 或晚于 20min 则不能按照早期休克的操作程序得到成活仔鱼。因此选择起始休克时间为 15—20min 诱导有丝分裂雌核发育,各参数组合遵循正交实验方案设计,结果总结于表 3。

表 3 的结果表明,受精后 17min、40℃持续 2min 休克处理的 H 组的存活率最高,为诱导有丝分裂雌核发育的最佳条件。

2.3 用未经过紫外辐射的鲤精子给稀有鮡鲫卵授精,杂种胚胎中有少数雌核发育单倍体 ($1n=25$),其余的胚胎细胞则为不同程度的非整倍体,包含的染色体数目在 25—70 之间。个别杂种胚胎可以出膜,但在出膜后一周内死亡。也有极个别的个体 ($<10^{-4}$) 能够正常存活至性成熟;用经过紫外辐射的鲤精子给稀有鮡鲫卵授精,也有个别的胚胎 (大约为 10^{-3}) 能够正常存活至性成熟,这些个体根据其染色体数目和形态学特征确认为稀有鮡鲫,对于这种现象目前还缺乏令人信服的解释。按雌核发育方法诱导出的胚胎也有两种类型,细胞的染色体数目分别为 25、50;正常存活至性成熟的个体经过形态学分析确认为稀有鮡鲫,其染色体数目经鉴定均为 50。

2.4 RAPD 分析 使用的 20 个引物中 V04, V09, V11 和 V13 没有扩增产物, V05, V06, V14, V16 的扩增条带不甚清晰,其余的 12 个引物可以得到条带清晰的扩增图谱。在这 12 个引物中有 10 个引物对于所有稀有鮡鲫个体 (包括母本和正常两性生殖组的父本) 产生完全一致的扩增图谱,引物 V15 和 V18 在个体间尤其是两亲本间存在差异。两个雌核发育组的所有个体均未观察到母本中未出现的条带,也没有出现父本鲤独有的条带。正常两性生殖组的个体中则显然存在来自父本的条带 (图 1)。

表 3 热休克诱导有丝分裂雌核发育的结果

Tab.3 Survival rate of mitotic gynogenetic progenies induced by heat shocking

试验组编号 Trial No.	休克起始时间 Time of shocking triggered (min)	休克温度 Temperature (℃)	休克持续时间 Duration (min)	孵化期相对存活率 Survival at hatching (%)	仔鱼相对存活率 Survival at fry (%)
A	15	39	2	3.4	0.1
B	15	40	1	2.3	0.1
C	15	41	3	0.2	0
D	16	39	1	4.6	0.3
E	16	40	3	2.2	0.1
F	16	41	2	1.4	0.1
G	17	39	3	5.9	2.8
H	17	40	2	7.8	3.4
I	17	41	1	1.6	1.1
J	18	39	1	6.5	1.8
K	18	40	3	3.2	2.3
L	18	41	2	1.3	0.4
M	19	39	3	3.7	1.2
N	19	40	2	2.7	0.6
O	19	41	1	1.2	0.3
P	20	39	2	3.9	0.2
Q	20	40	1	3.7	0.1
R	20	41	3	0.5	0

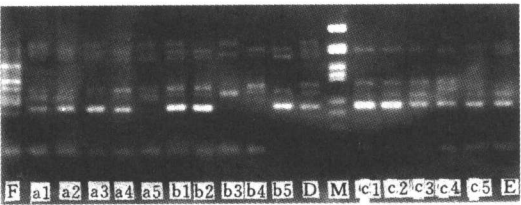


图 1 引物 V-15 对同一稀有鮡鲫母本经过不同途径产生的子代的扩增结果

Fig.1 Electrophoretogram of products amplified with primer V-15 for offspring originated from identical mother (*G. rarus*) through different approach

a1— a5:有丝分裂雌核发育的个体(Individuals by mitotic gynogenesis), b1— b5:极体雌核发育的个体(Individuals by polar body gynogenesis), c1— c5:正常两性生殖的个体(Individuals by amphigenesis), D:母本稀有鮡鲫(Mother, *G. rarus*), E:父本稀有鮡鲫(Father, *G. rarus*), F:父本红鲤(Father, *C. carpio*, red var.), M: λ DNA(EcoR I /Hind III)

2.5 雌核发育稀有鮡鲫的形态特征及性别 检查6月龄雌核发育稀有鮡鲫标本5尾,全长45—48mm,体长35.5—37mm。

鱼体稍侧扁,胸、腹部圆,无腹棱。吻钝,口端位,口裂较小,向下倾斜。上下颌约等长,边缘平滑,无口须。背鳍短,无硬刺,外缘无内凹,其起点与腹鳍起点相对或稍后。臀鳍起点在背鳍之后,无硬刺,最后一根不分枝鳍条后缘无锯齿。第一鳃弓外侧鳃耙4—5,下咽齿2行,2.4—4.2。侧线不完全。

雌核发育稀有鮡鲫的形态特征与叶妙荣等^[10]、丁瑞华^[11]、陈宜瑜等^[12]对野生稀有鮡鲫的形态描述较为一致,未见分类意义上的差别;也未发现鲤独有的特征在雌核发育稀有鮡鲫上出现。雌核发育稀有鮡鲫在4月龄左右部分个体发育成熟,并在水族箱中产卵,但目前尚未发现成熟的雄性个体。

以泥鳅的精子重复上述试验,得到与采用鲤精子时基本一致的结果。(数据略)

3 讨论

3.1 休克处理参数的选择

热休克处理涉及三个实验参数,其中休克起始时间的选择最为重要。在实验中,作者观察到在约3—4min左右稀有鮡鲫陆续排放出第二极体,因此抑制卵子第二极体排放的休克敏感期在此之前,且以受精后2min开始休克效果最好。休克处理时间过早可能导致受精卵不能完成启动,也达不到满意的效果。

热休克诱导有丝分裂雌核发育的休克起始时间有早期休克和晚期休克的不同选择,早期休克选择在第一次卵裂的前半程,晚期休克则大体接近第一次卵裂的末期。研究表明,早期休克诱发染色体组加倍的效果优于晚期休克^[13,14],因此本研究仅对早期休克的有关参数进行了筛选。对于热休克诱导有丝分裂雌核发育的机制,以前的研究者大都认为热休克导致微管蛋白解聚,破坏了有丝分裂器,是导致染色体组滞留的原因^[15]。稀有鮡鲫胚胎从受精到完成第一次卵裂需要45min,胚盘在35min始形成。热休克抑制稀有鮡鲫第一次卵裂的最佳时间为受精后17min,此时受精卵细胞尚未进入分裂期。鱼类在胚胎发育的早期不存在G1和G2期^[16],作者因此认为选择在第一次卵裂前期热休克处理可能影响了着丝粒的复制。

3.2 异源精子的使用

鲤的染色体数目为 $2n=100$,稀有鮡鲫的染色体数目为 $2n=50$,两者的分类地位相距甚远,外部形态迥异,其杂种不能存活。但是经过遗传失活的鲤精子可以有效启动稀有鮡鲫的雌核发育,即便有少量雄核未能有效灭活,也会在胚胎发育过程中被自然淘汰,虽然异源精子的启动效率略低于同源精子(数据未列出),却排除了雄核基因组对子代的可能干扰,保障了实验的可靠性。Cherfas在1981年的综述中总结了10例经过遗传失活的雄鱼精子与远缘种雌鱼配合产生雌核发育后裔的报道^[5],吴清江等在诱导红鲤雌核发育系时使用了鲫鱼和团头鲂的精子^[13],潘峰在1994年报道了鳊鱼精子诱导罗非鱼的雌核发育^[6]。目前还不清楚在诱导人工雌核发育的过程中,异源基因组中的小片段遗传成分是否也会像天然异精雌核发育那样可能进入到雌核发育子代中^[17—19],本文的RAPD分析结果没有显示出鲤鱼基因组成分进入稀有鮡鲫基因组的证据,这可能是由于此处使用的引

物数量还不够多,不能反映出整个基因组的全貌,另一方面也说明使用异源精子启动雌核发育时即使发生基因组成分的横向转移其规模也不会很明显。

用未经遗传失活的鲤精子给稀有鮡鲫卵授精,能够产生出正常的稀有鮡鲫个体,说明在某些情况下有目前还缺乏了解的雌核发育机制在起作用。由于这样的例外存在,尽管比率很低,仍可能导致即使在有丝分裂雌核发育的子代中也会混有个别基因杂合型个体。因此在构建纯系的工作中需要对 F1 代个体加以甄别,才能确保在 F2 代建立纯系。对于远缘杂交导致雌核发育的现象,作者认为与基因的表达调控有关,并将在另文中更详尽地阐述自己的理解。

3.3 鱼类性别决定的类型

通过雌核发育与雄核发育相结合的方法,可以推测某个物种的性别决定类型,但是并不足以得到确定的结论。剑尾鱼(*Xiphophorus maculatus*)的观赏品系均为雌性异配,后来却发现自然界中还存在着雄性异配的类型,进一步的研究发现剑尾鱼存在 3 种性染色体类型,当初引入水族箱的个体恰好是由 WY 和 YY 两种类型组成^[20]。Streisinger 诱导的斑马鱼有丝分裂纯合二倍体多为雌性,仅有少量雄性^[21],Horstgen-Schwark 诱导的斑马鱼有丝分裂纯合二倍体则均为雄性^[22],Corley-Smith 进行了斑马鱼雄核发育的研究,遗憾的是他未说明得到的雄核发育子代的性别组成^[16]。基于这样的例证,作者认为在断言某种鱼的性别决定类型时应谨慎从事。

参考文献:

- [1] 王剑伟. 稀有鮡鲫的繁殖生物学[J]. 水生生物学报, 1992, 16(2): 165—174
- [2] 陈宏溪. 鱼类的雌核发育[C]. 鱼类学论文集(第三辑), 北京: 科学出版社, 1983
- [3] 吴清江, 叶玉珍, 陈荣德, 等. 雌核发育系红鲤 8305 的产生及其生物学特性. 海洋与湖沼, 1991, 22(4): 295—299
- [4] 潘峰, 胡玫, 王和海. 异源精子诱导的罗非鱼人工雌核发育[J]. 水生生物学报, 1994, 18(1): 90—91
- [5] Cherfas N B. Gynogenesis in Fish [C]. In: Kirpichnikov V S., Genetic Bases of Fish Selection Berlin Heidelberg, New York: Springer Verlag, 1981: 255—273
- [6] 赵振山, 吴清江. 人工诱导大鳞副泥鳅雄核发育二倍体克隆鱼的产生[J]. 遗传学报, 1998, 25(5): 416—421
- [7] 洪云汉. 鱼类单个胚胎染色体标本的快速制备法[J]. 淡水渔业, 1987, (1): 35—36
- [8] Ausubel F M. Short protocols in Molecular Biology (2nd Ed) [M]. London: John Wiley & Sons, 1992
- [9] Williams C E, Clair A. St. Phenetic relationships and levels of variability detected by restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA analysis of cultivated and wild accession of *Lycopersicon esculentum* [J]. Genome, 1993, 36(3): 619—630
- [10] 叶妙荣, 傅天佑. 鲟亚科鱼类一新属新种的记述(鲤形目: 鲤科)[J]. 动物分类学报, 1983, 8(4): 434—437
- [11] 丁瑞华(主编). 四川鱼类志. [M]. 1994, 成都: 四川科学技术出版社, 133—135
- [12] 陈宜瑜等(编著). 中国动物志. 硬骨鱼纲. 鲤形目(中卷). [M]. 1998, 北京: 科学出版社, 51—52
- [13] 陈敏容, 俞小牧, 杨兴琪, 等. 白鲫(♀) × 红鲫(♂) 异源四倍体鱼的倍性操作及其生殖力的研究[J]. 水生生物学报, 1997, 21(3): 197—205
- [14] Corley-Smith G E, Lim C J, Brandhorst B P. Production of Androgenetic Zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Genetics, 1996, 142: 1265—1276
- [15] Gaillard G, Jaylet A. Cytological mechanism of induced tetraploidy in the newt *Pleurodeles waltlii* [J]. Chromosoma, 1975, 51(2): 125—133
- [16] Kane D A, Warga R M, Kimmel C B. Mitotic domains in the early embryo of the zebrafish [J]. Nature, 1992, 360: 735—

737

- [17] 丁军, 谢岳峰, 蒋一珪, 等. 异育银鲫及其人工杂合种外源遗传物质的检测分析[J]. 水生生物学报, 1993, 17(1): 22—26
- [18] 陈洪, 杨晶, 薛国雄, 等. RAPD 技术在异精激发方正银鲫比较研究中的应用[J]. 科学通报, 1993, 39(7): 661—663
- [19] Scharf M, Nandati I, Schlupp I, *et al.* Incorporation of subgenomic amounts of DNA as compensation for mutational load in a gynogenetic fish [J]. *Nature*, 1995, 373: 68—71
- [20] 张兴忠, 仇潜如, 陈曾龙, 等. 鱼类遗传与育种[M]. 北京: 农业出版社, 1988
- [21] Streisinger G, Walker C, Dower N, *et al.* Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*) [J]. *Nature*, 1981, 291: 293—296
- [22] Horstgen-Schwark G. Production of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*) [J]. *Aquaculture*, 1993, 112: 25—37

GYNOGENETIC RARE MINNOW (*GOBIOCYPRIS RARUS*) INDUCED BY HETEROGENEOUS SPERMS

JIA Fang-jun, WANG Jian-wei and WU Qing-jiang

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences;

State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Wuhan 430072)

Abstract: The rare minnow (*Gobiocypris rarus*) eggs were activated by UV irradiated heterogeneous sperms that were gathered from the red common carp (*Cyprinus carpio*, red var.), and heat shocking was performed to inhibit the second polar body extrusion and the first cleavage, respectively. Viable individuals derived from polar body gynogenesis and mitotic gynogenesis were available by such processing. The optimum parameters were screened as heat shocking for 2 min at 40°C, 2 min post fertilizing, for polar body gynogenesis, and 2 min at 40°C, 17 min post fertilizing, by an orthonormal programming. The morphological characteristics of red common carp were not detected. RAPD analysis confirmed that all the amplified fragments were derived from the mother for every gynogenetic individuals, while no evidences supported the occurrences that heterogeneous DNA elements from their father, the red common carp, had penetrated into the descendant genome. In addition, it had been revealed in this study that the normal distant hybridization, *Gobiocypris rarus* ♀ × *Cyprinus carpio* ♂, could produce viable rare minnow individuals in an extremely lower occurrence, which might be produced by natural gynogenesis.

Key words: Rare minnow (*Gobiocypris rarus*); Gynogenesis; Distant hybridizations