

异源精子遗传物质对雌核发育草鱼基因组的影响分析

胡海星^{1,2*} 郑康^{1,2*} 陈金辉^{1,2} 刘正华^{1,2} 张琼宇^{1,2} 罗琛²

(1. 湖南师范大学生命科学学院, 长沙 410081; 2. 浙江大学生命科学院, 杭州 310058)

摘要:为分析外源精子对人工诱导雌核发育草鱼基因组的影响,用随机扩增多态性和微卫星技术对经两代连续人工诱导,遗传背景一致的雌核发育草鱼以及母本草鱼和父本鲤鱼的基因组 DNA 进行了比较分析。10 个随机引物在雌核发育草鱼中共检测到 104 个 RAPD 位点,在鲤鱼中检测到 103 个位点。7 对微卫星引物在雌核发育草鱼中共扩增出 4 个微卫星位点,在鲤鱼中检测到 22 个位点。两种方法在雌核发育草鱼和鲤鱼中所检测到的位点均没有一个相同。根据 RAPD 和微卫星分析数据进行的遗传相似性分析表明二代人工雌核发育草鱼群体与其一代人工诱导雌核发育草鱼母本的遗传相似性从 0.9903 到 1.000,与父本鲤鱼的遗传相似性为 0.000。这些实验结果证明在适当的紫外线处理强度下,鲤鱼精子的遗传物质能够被完全破坏,不会对雌核发育草鱼的基因组造成遗传污染。

关键词:雌核发育草鱼; RAPD; 微卫星; 遗传相似性; 异源遗传物质

中图分类号: Q173 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2008)05-0701-10

人工诱导雌核发育是指通过物理或化学方法使精子遗传物质失活,并以此精子激活卵子,但精子不参与合子核的形成,而使卵子染色体二倍体化,卵子仅靠雌核而发育成胚胎的技术。人工雌核发育在鱼类遗传育种中已应用于快速建立纯系、性别遗传机制分析、选育新品等方面^[1-3]。草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)生长快、养殖成本低,是我国优良的淡水养殖品种。但草鱼性成熟时间较长,对草鱼进行人工雌核发育诱导是实现快速育种的有效方法之一。通过紫外线照射使鲤鱼(*Cyprinus carpio*)精子遗传物质失活,用处理过的鲤鱼精子激活草鱼成熟卵子,再用冷休克方法处理可以得到人工雌核发育草鱼^[4]。已有研究证明这种用紫外线照射处理的鲤鱼精子激活草鱼卵子得到的雌核发育草鱼群体中有比例不定的雄性个体的存在,雌核发育草鱼自交繁殖产生的 F1 代草鱼的成活率、生长速度明显高于常规草鱼^[5]。为揭示这些现象产生的原因,了解异源精子的一些遗传物质是否进入了雌核发育草鱼的基因组并对其上述的经济性状产生了影响,需要对雌核发育草鱼的基因组 DNA 进行分析。

遗传育种中常用的基因组分析技术有 DNA 随

机扩增多态性(Random Amplified Polymorphism DNA, RAPD)和微卫星 DNA(Microsatellite DNA)技术。RAPD 技术是以聚合酶链式反应(PCR)为基础,通过扩增产物 DNA 片段的多态性来检测基因组 DNA 多态性的一种分子标记方法^[6,7]。该技术具有简单快速灵敏,引物无种族特异性,覆盖的基因组范围广,同时检测的位点多等优点,已被广泛地应用于物种种群鉴定、遗传多样性分析、遗传图谱构建以及其他的研究领域^[8-13]。RAPD 技术的缺陷是显性遗传,不能识别杂合子位点;且由于随机引物较短,对一些 PCR 因素更敏感,准确性、重复性较低。微卫星 DNA 广泛均匀分布于真核生物基因组中,遵循简单孟德尔遗传规律,等位基因呈共显性遗传,可简便的区分出杂合子和纯合子,并具有较高的多态信息容量与信息质量、位点特异性等特点。该技术由于精确性高和重复性好,已被广泛应用于基因组作图、亲缘关系分析和群体遗传学研究等方面^[13-16]。而微卫星技术的缺点是微卫星标记的获得要建立、筛选基因组文库和克隆、测序,实验工作量比较大、耗时长。本研究采用 RAPD 和微卫星两种分析技术进行了外源精子对人工诱导雌核发育草鱼基因组影响的分析。

收稿日期: 2007-06-01; 修订日期: 2008-03-12

基金项目: 浙江省重大科技攻关项目(2006C12005)资助

通讯作者: 罗琛, E-mail: luoc@zju.edu.cn *共同第一作者

1 材料与方法

1.1 材料与来源 父本鲤鱼 1尾,购自农贸市场。经两代人工诱导所产生的雌核发育草鱼(二代雌核草鱼, Two-generation artificially induced gynogenetic grass carp) 14尾, 6尾一代人工雌核发育草鱼(一代雌核草鱼, One-generation artificially induced gynogenetic grass carp)均取自本实验室的试验基地。1尾一代雌核草鱼为二代雌核发育草鱼的亲本用于提取 DNA, 其余 5尾雌核一代草鱼用于染色体制片。鲤鱼精子的紫外线照射处理条件, 以及一代和二代人工诱导雌核发育的方法参见文献 [4, 17]。使用基因型纯合的一代人工雌核发育母本及其所繁殖的遗传背景完全一致的二代人工诱导雌核发育草鱼群体可以避免不同个体之间的差异可能造成的实验误差, 有利于简明可靠地判断二代人工诱导雌核发育草鱼群体中基因座位的遗传来源。取材时分别剪取草鱼的幼嫩尾鳍, 用双蒸水漂洗干净后分装入 1.5mL 的离心管中, 标号, 放入液氮中快速冷冻 5min 左右, 然后保存于 -70℃ 冰箱, 作为提取基因组 DNA 的材料。

1.2 染色体制片 5尾一代人工雌核发育草鱼在剪取尾鳍后, 同时用于染色体制片。染色体制片的方法是 PHA-秋水仙素腹腔注射后, 取肾细胞直接制片。取分析良好、完整的中期分裂相 30个以上进行染色体数目计数和统计分析。

1.3 基因组 DNA 的提取 采用酚/氯仿法提取尾鳍样品 DNA。提取过程中蛋白酶 K 消化过夜, 用 NaCl 乙醇沉淀, 双蒸灭菌水溶解。通过 Eppendorf 公司的 Bio Photometer 测定基因组 DNA 紫外光吸收的光度值以检测 DNA 的浓度和纯度, 经琼脂糖电泳检测 DNA 的完整性以评估提取的基因组 DNA 能否用于 PCR 扩增。符合要求的 DNA 贮存于 4℃, 备用。

1.4 RAPD 反应条件 PCR 扩增仪为美国 Applied Biosystems 公司的 GeneAmp[®] PCR System 2720 热循环仪。RAPD 扩增引物购自上海生工生物工程技术有限公司 (Sangon), Taq 酶、dNTP、PCR 反应 Buffer 以及 Lamada DNA / Hind + EcoR Marker 购自华美生物工程公司 (Sino-American Biotechnology Company)。

所用 10 条 RAPD 多态性引物及反应条件选自陈金辉、黄明敏所筛选出的多态性引物^[18, 19], 分别为 S14、S31、S51、S64、S66、S69、S115、S331、S326、S333。

1.5 微卫星反应条件 PCR 扩增仪为 Applied Biosystems 公司的 GeneAmp[®] PCR System 2720 热循环仪。微卫星引物购自上海生工生物工程技术有限公司 (Sangon)。

Taq 酶、dNTP、PCR 反应 Buffer 以及 pBR322 Marker 购自晶美生物工程有限公司 (Jingmei Biotech)。

PCR 反应体系: 反应体积为 20μL, 反应混合液组成为 10 × Taq 酶缓冲液 (2μL), Taq 聚合酶 (1.0U), dNTP (0.8mmol/L), DNA 模板 (50ng), Primer + (0.2μmol/L), Primer- (0.2μmol/L), MgCl₂ (1.25mmol/L), 加 ddH₂O 至反应体积为 20μL。

PCR 反应程序为: 94℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 30s, 退火 30s (温度因引物而异), 72℃ 延伸 30s, 共 30 个循环; 72℃ 延伸 2min, 4℃ 保存。PCR 反应退火温度 (表 1)。

PCR 扩增产物的分离与检测: 扩增产物经 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 银染色。聚丙烯酰胺凝胶显影后在凝胶成像系统中扫描、摄像和分析, 用 Tanon GIS 软件计算各微卫星等位基因的大小。

适合于分析草鱼基因组 DNA 的 7 对微卫星引物系从 28 对鲤鱼微卫星引物中筛选而来^[16, 20, 21], 引物的碱基序列 (表 1)。

表 1 七对微卫星引物的序列和扩增条件

Tab. 1 The sequences and annealing temperature of 7 pairs of microsatellite primers

微卫星基因座 Microsatellite locus	引物序列 Primer sequence	退火温度 Annealing temperature (°C)
MFW 1	FGTCCA GACTGTCA TCA GGAG GAGGTGTACACTGA GTCACGC	61.0
MFW 2	FCACACCGGGCTACTGCA GAG GTGCA GTGCA GGCA GTTTGC	61.0
MFW 4	FTCCAA GTCA GTTTAA TCACCG GGGAA GCGTTGCA CAACAAGC	58.0
MFW 8	FCACTTAGCA TGGCAAA TTTTCC CTATAACTCTGAA GGCA GAC	58.0
MFW 22	FGTTC TA TAAACA TACACGCTG CAAAA GGA ACTGA GCA TAGT	58.0
MFW 24	FGCTCCA GATTGCACA TTA TAG CTACACACCGCAGA GCCTTTC	58.0
MFW 26	FCCCTGAGA TA GAAACCACTG TACCATGCCTTGGATGCAAAAAG	58.0

1.6 测序 上海生工生物工程技术有限公司 (Sangon) 完成。

1.7 数据处理 按 Nei^[22] 的公式计算遗传相似度 F :

$$F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$$

其中 N_x 和 N_y 分别为个体 x 和个体 y 各自拥有的谱带数, N_{xy} 为个体 x 和个体 y 共同拥有的谱带数。

2 结果

2.1 染色体核型

通过对一代雌核发育草鱼 30个中期分裂相的观

察统计结果表明:一代雌核发育草鱼具 24对染色体,染色体核型为 $2N = 48 = 18m + 24sm + 6st$,核型与野生草鱼完全一致。这说明所用的雌核发育一代亲本中没有异源鲤鱼精子染色体片段的存(图 1)。

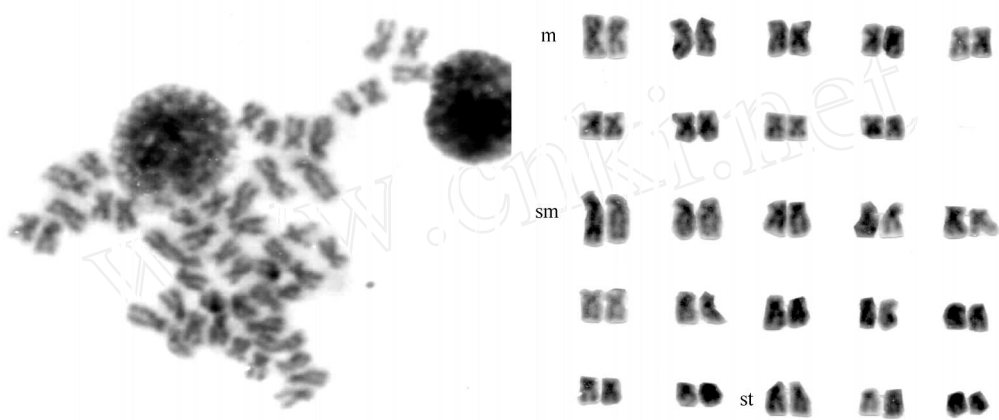


图 1 一代雌核发育草鱼染色体中期分裂相及相应组型

Fig.1 Metaphase chromosome and the karyotype of one-generation gynogenetic grass cap

2.2 RAPD 扩增

用 10条 RAPD 多态性引物对 14尾二代雌核草鱼及其亲本个体的基因组 DNA 进行了两次以上重复的 RAPD 分析,并且每次扩增反应均设立了空白

对照。单个引物检测到的扩增片段数目在 6—13之间,大小在 0.2—3kb之间,且鲤鱼的电泳图谱与草鱼的电泳图谱完全不同(图 2)。10个随机引物在二代雌核发育草鱼,母本雌核草鱼和父本鲤鱼中分

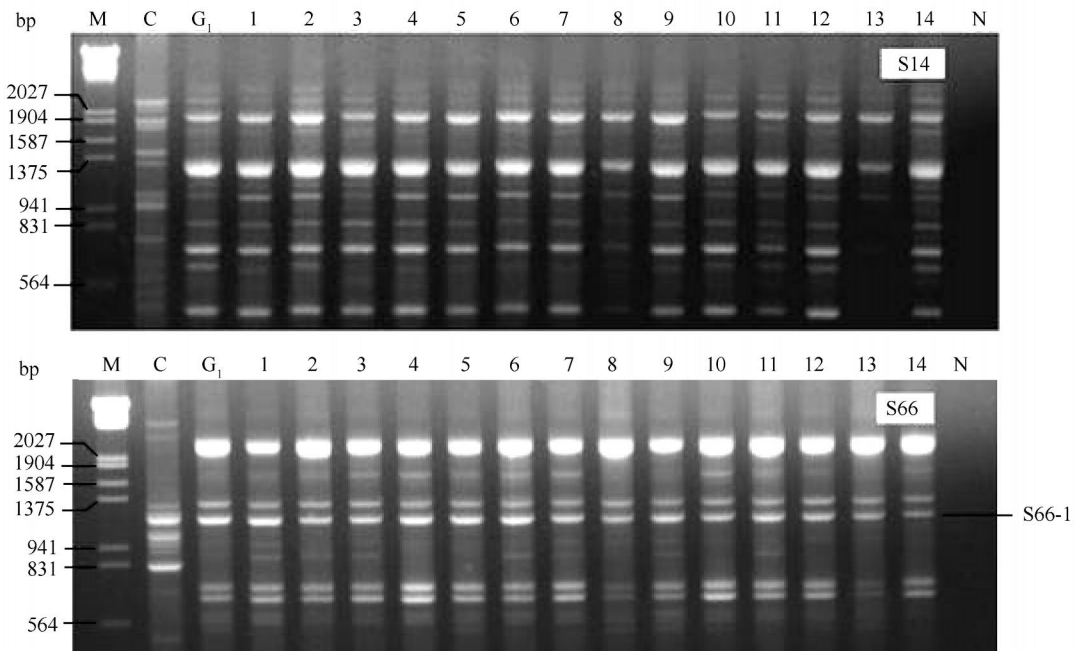


图 2 引物 S14、S66在二代雌核草鱼及其亲本中的 RAPD 扩增图谱

Fig.2 Electrophoretogram of RAPD products amplified from primers S14 and S66 in the two-generation gynogenetic grass cap and its parents
 C: 鲤鱼父本; G₁: 一代雌核草鱼母本; 1—14: 二代雌核草鱼; M: Lambda DNA /Hind + EcoR Marker; N: 空白对照; S66-1: 二代雌核草鱼与亲本均有的条带
 C: Paternal common cap; G₁: One-generation gynogenetic grass cap mother; 1—14: Samples two-generation gynogenetic grass cap; M: Lambda DNA / Hind + EcoR Marker; N: Negative control; S66-1: The band that presents in all the three samples

别检测到 104、104、103 条扩增带,二代雌核发育草鱼中共扩增出 104 条片段与母本雌核草鱼相同(表 2)。10 条引物中仅 S66 在二代雌核发育草鱼母本雌核草鱼和父本鲤鱼中扩增出 1 条大小相同的条带(图 2: S66-1),其他 9 条引物均未扩增出与父本鲤鱼片段大小相同的条带(图 2、表 2)。对该长度相

同条带 S66-1 进行的序列分析结果表明二代雌核发育草鱼和父本鲤鱼的核酸序列相似性为 46.1%,碱基相同区域是不连续的,且每个连续相似区域的碱基数目小于 11 个(图 3),证明草鱼中的该片段只是长度与鲤鱼的片段一致,而 DNA 序列不同,因此可以确定不是来自于鲤鱼精子。

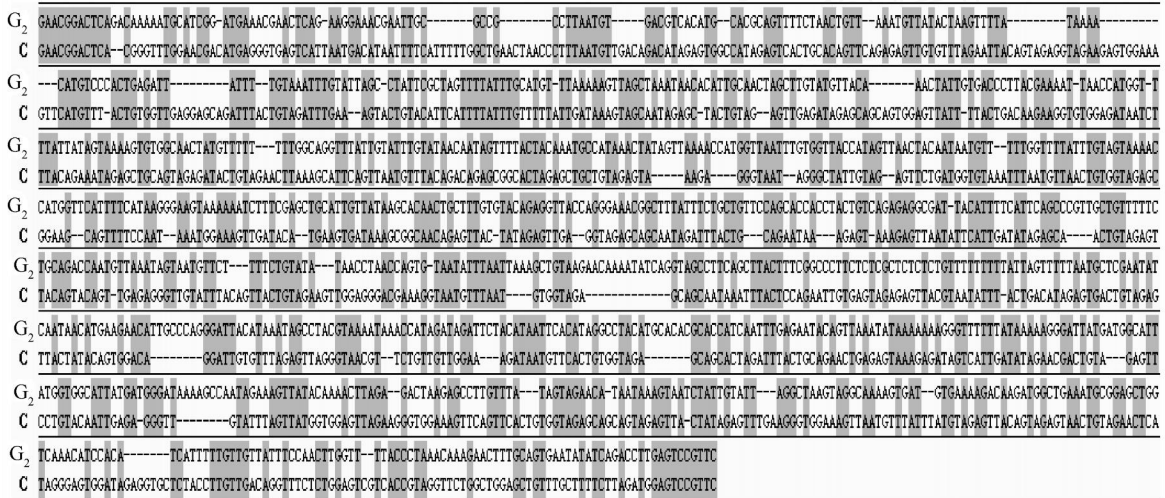


图 3 二代雌核草鱼和鲤鱼的 S66-1 片段的核苷酸序列比较

Fig. 3 Nucleotide sequence comparison of the S66-1 of the two-generation gynogenetic grass carp and common carp

表 2 二代雌核草鱼及亲本的 RAPD 扩增结果比较

Tab. 2 Comparison of the RAPD results of the two-generation gynogenetic grass carp and its parents

引物编号 Primers	扩增带数 Amplified bands			G ₂ 与亲本大小相同的带数 Similar bands in the G ₂ and its parents	
	G ₂	G ₁	C	G ₂ , G ₁	G ₂ , C
S14	TCCGCTCTGG	11	11	9	0
S31	CAATCGCCGT	13	13	12	0
S51	AGCGCCATTG	13	13	12	0
S64	CCGCA TC TAC	10	10	14	0
S66	GAACGGACTC	10	10	9	1
S69	CTCACCGTCC	6	6	6	0
S115	AA TGCGCGA G	11	11	9	0
S326	GTGCCGTTC	12	12	14	0
S331	CTCA GTCGCA	11	11	10	0
S333	GACTAA GCCC	7	7	8	0
SUM		104	104	103	1

注: G₂:二代雌核草鱼; G₁:一代雌核草鱼母本; C:鲤鱼父本

Note: G₂: Two-generation gynogenetic grass carp; G₁: One-generation gynogenetic grass carp mother; C: Paternal common carp

2.3 微卫星扩增

用 7 对鲤鱼微卫星引物对 14 尾二代雌核发育草鱼及其亲本基因组 DNA 进行了两次以上重复的微卫星分析。7 对引物共扩增出 26 个位点,大小在 124—297 bp 之间,且 7 对引物在二代雌核发育草鱼和其母本一代雌核草鱼中的扩

增条带完全相同,而与鲤鱼的完全不同(图 4、图 5)。其中 MFW 1、MFW 4、MFW 8、MFW 26 在二代雌核发育草鱼及其母本中扩增出 1 条片段大小一致的条带, MFW 2、MFW 22、MFW 24 在二代雌核发育草鱼及其母本中检测不到位点(图 5、表 3)。

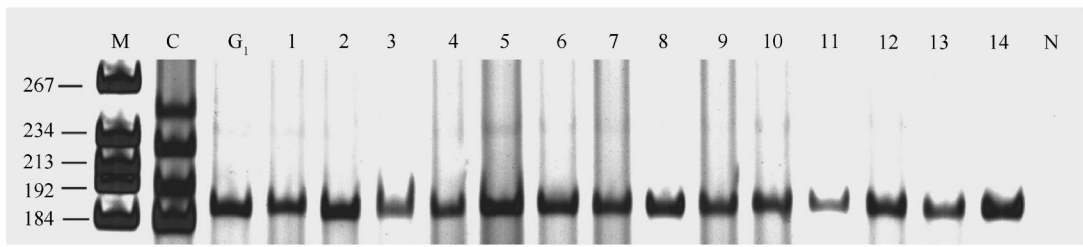


图 4 MFW1在二代雌核草鱼及其亲本上的扩增电泳图谱

Fig. 4 Electrophoretogram of PCR products amplified from MFW1 in the two-generation gynogenetic grass carp and its parents
C: 鲤鱼父本; G₁: 一代雌核草鱼母本; 1—14: 二代雌核草鱼; M: pBR322 Marker; N: 空白对照

C: Paternal common carp; G₁: One-generation gynogenetic grass carp mother; 1—14: Samples of two-generation gynogenetic grass carp; M: pBR322 Marker; N: Negative control

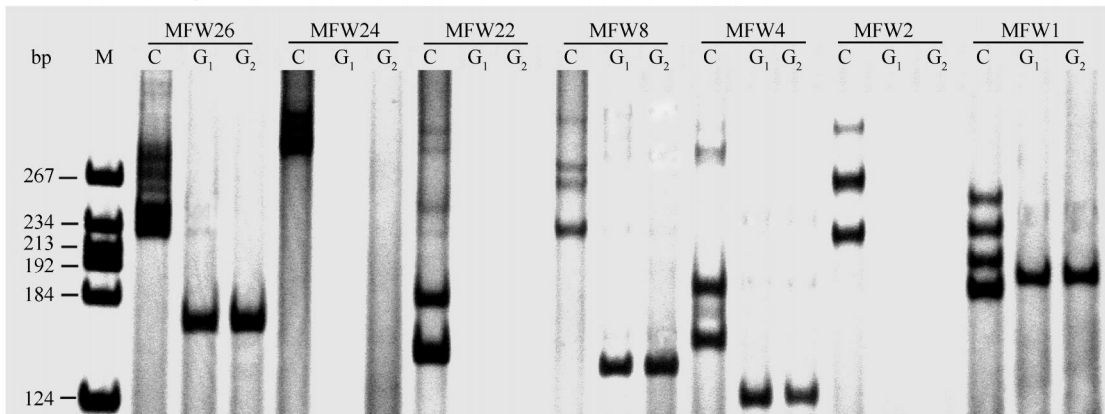


图 5 七对微卫星引物在二代雌核草鱼及其亲本上的扩增电泳图谱

Fig. 5 Electrophoretogram of PCR products amplified by 7 pairs of microsatellite primers in the two-generation gynogenetic grass carp and its parents
C: 鲤鱼父本; G₁: 一代雌核草鱼母本; G₂: 二代雌核草鱼; M: pBR322 Marker

C: Paternal common carp; G₁: One-generation gynogenetic grass carp mother; G₂: Two-generation gynogenetic grass carp; M: pBR322 Marker

表 3 七对微卫星引物在二代雌核草鱼及亲本中检测到的等位基因大小及数目

Tab. 3 The size and the number of alleles amplified from 7 pairs of microsatellite primers in Two-generation gynogenetic grass carp and its parents

微卫星标记 Marker	等位基因大小 Size of alleles (bp)	等位基因数 Number of alleles		
		G ₂	G ₁	C
MFW1	186	0	0	1
	189	1	1	0
	195	0	0	1
	232	0	0	1
MFW2	252	0	0	1
	227	0	0	1
	263	0	0	1
MFW4	293	0	0	1
	124	1	1	0
	158	0	0	1
MFW8	186	0	0	1
	284	0	0	1
	143	1	1	0

续表

微卫星标记 Marker	等位基因大小 Size of alleles (bp)	等位基因数 Number of alleles		
		G ₂	G ₁	C
MFW22	232	0	0	1
	261	0	0	1
	271	0	0	1
	297	0	0	1
	150	0	0	1
MFW24	182	0	0	1
	282	0	0	1
MFW26	300	0	0	1
	169	1	1	0
	232	0	0	1
	259	0	0	1
	268	0	0	1
	276	0	0	1
SUM		4	4	22

注: G₂: 二代雌核草鱼; G₁: 一代雌核草鱼母本; C: 鲤鱼父本

Note: G₂: Two-generation gynogenetic grass carp; G₁: One-generation gynogenetic grass carp mother; C: Paternal common carp

2.4 遗传相似度分析

RAPD 结果的遗传相似度分析 按 Nei的公式计算,二代雌核发育草鱼群体内不同个体间的遗传相似度比较高,其中最大的是 G₂-4和 G₂-5、G₂-4和 G₂-13、G₂-5和 G₂-13(为 1.000);最小为 G₂-6和 G₂-14(为 0.9563)(表 4)。群体内平均遗传相似度为 0.9797。而与母本遗传相似性最高的是 G₂-4、G₂-5

(为 1.000);最小的是 G₂-7(为 0.9781)。对于 S66-1,测序结果表明二代雌核发育草鱼和父本鲤鱼的核酸序列相似性为 46.1%。所以,二代雌核发育草鱼与其母本的平均遗传相似度为 0.9903,与父本的遗传相似度为 0.000。RAPD 实验结果在基因水平上揭示:二代雌核发育草鱼的遗传物质来自与母本,没有父本鲤鱼遗传物质的整入。

表 4 基于 RAPD 分析所得的 14尾二代雌核草鱼及其亲本的遗传相似度

Tab.4 Genetic similarity of 14 individuals of two-generation gynogenetic grass carp and its parents based on the RAPD analysis

	G ₂ -1	G ₂ -2	G ₂ -3	G ₂ -4	G ₂ -5	G ₂ -6	G ₂ -7	G ₂ -8	G ₂ -9	G ₂ -10	G ₂ -11	G ₂ -12	G ₂ -13	G ₂ -14
G ₂ -1														
G ₂ -2	0.9													
G ₂ -3	0.9	0.9												
G ₂ -4	0.9	0.9	0.9											
G ₂ -5	0.9	0.9	0.9	1.0										
G ₂ -6	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9									
G ₂ -7	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9								
G ₂ -8	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9							
G ₂ -9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9						
G ₂ -10	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9					
G ₂ -11	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9				
G ₂ -12	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9			
G ₂ -13	0.9	0.9	0.9	1.0	1.0	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9		
G ₂ -14	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	
G ₁	0.9	0.9	0.9	1.0	1.0	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
C	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

微卫星结果的遗传相似度分析 经比较母本和子代的基因型,在所有检测个体中未发现异于母本的等位基因,也未发现与父本相同的等位基因。依

据微卫星实验结果,按 Nei的方法对二代雌核发育草鱼群体及其父母本的遗传相似度进行了分析(表 5)。由表 5可见二代人工诱导雌核发育草鱼各个

体之间以及与母本雌核发育草鱼的遗传相似度均为 1.000,而与父本鲤鱼的遗传相似度均为 0.000。此结果在基因水平上进一步确认了二代雌核发育草鱼的纯合度。

表 5 基于微卫星分析所得的 14 尾二代雌核草鱼及其亲本的遗传相似度

Tab. 5 Genetic similarity of 14 individuals of two-generation gynogenetic grass carp and its parents based on microsatellite analysis

	G ₂ -	G ₂ -	G ₂ -	G ₂ -	G ₂ -	G ₂ -	G ₂ -	G ₂ -	G ₂ -	G ₂ -	G ₂ -	G ₂ -	G ₂ -	G ₂ -
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
G ₂ -														
1														
G ₂ -	1.0													
2	00													
G ₂ -	1.0	1.0												
3	00	00												
G ₂ -	1.0	1.0	1.0											
4	00	00	00											
G ₂ -	1.0	1.0	1.0	1.0										
5	00	00	00	00										
G ₂ -	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0									
6	00	00	00	00	00									
G ₂ -	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0								
7	00	00	00	00	00	00								
G ₂ -	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0							
8	00	00	00	00	00	00	00							
G ₂ -	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0						
9	00	00	00	00	00	00	00	00						
G ₂ -	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0					
10	00	00	00	00	00	00	00	00	00					
G ₂ -	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0				
11	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00				
G ₂ -	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0			
12	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00			
G ₂ -	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0		
13	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00		
G ₂ -	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
14	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	
G ₁	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
C	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000

3 讨论

在银鲫和彭泽鲫中,已有关于外源遗传物质整入的报道。周莉^[11]通过 RAPD 技术证明异精雌核发育银鲫中整入了异源 DNA;张海发等^[23]对异精激发彭泽鲫雌核发育子代及双亲的 RAPD 分析中发现子代中含有与父本相同而与母本相异的特异条带。但银鲫和彭泽鲫属于天然雌核发育鱼类,激活

其卵子雌核发育的异种鱼的精子是正常的。在人工诱导鱼类雌核发育中,作为激活卵子雌核发育的异源精子要经过紫外线等照射处理破坏其遗传物质。这种遗传物质被破坏处理后的精子是否也会同天然异精雌核发育那样可能有少量遗传物质进入雌核发育子代中是一个目前尚有争议的问题。邹桂伟等^[24]在对雌核发育鲢及其父母本的研究中发现雌核鲢与父本相同而亲本鲢没有的 DNA 扩增片段,推

断雌核鲢基因组 DNA 可能带有父本基因组 DNA 的特性。而贾方钧等^[25]通过 RAPD 分析证明没有异源鲤鱼基因组成分进入雌核发育稀有鲟鲫基因组;凌去非等^[26]在对丁鲷雌核发育子代与父母本基因组的 RAPD 分析中未发现子代与父本共有而母本没有的扩增片段。

人工诱导雌核发育中的异精效应研究中出现不同研究结果的原因是多方面的。首先,不同人工雌核发育实验中对异源精子的破坏程度可能不一样。在比较低剂量的处理条件下,雌核发育子代可能受异源精子的某些未失活遗传物质的影响。我们也曾在雌核一代草鱼的中期分裂相中发现过外源染色体片段的存在^[4],通过 RAPD 方法在不同物种样品中检测到的大小一致的片段,其序列并不一定相同,必须通过进一步的序列分析才能确定其来源。此外,分析对象的遗传背景如果不一致,也可能干扰对结果的判断。

本研究用同一条一代人工雌核发育草鱼的卵子,经第二代人工诱导雌核发育所产生的草鱼群体,每个个体的基因型都是纯合的,群体中所有个体的基因型都是一致的^[21,27]。因而通过 RAPD 和微卫星方法检测外源物质介入的灵敏度更高。对二代雌核发育草鱼,一代雌核发育草鱼母本和鲤鱼父本基因组的比较分析结果表明:子代与草鱼母本的遗传相似度为 0.9903 (RAPD 分析)和 1.000 (微卫星分析),与鲤鱼父本的遗传相似度均为 0.000。未发现子代与父本共有而母本没有的片段。对于在三者均有的大小一致的 RAPD 片段 (S66-1),通过测序证明,二代雌核发育草鱼的核酸序列与父本鲤鱼在 S66-1 位点的相似性为 46.1%,并非来源于雄核基因组。因此可以在 DNA 水平上确定此二代人工诱导雌核发育草鱼的遗传物质完全来自于母本,与父本无关。这证明在适当紫外线处理强度照射下,鲤鱼精子的遗传物质能够被完全破坏,不会对雌核发育草鱼的基因组造成遗传污染。这些结果也说明人工诱导雌核发育草鱼抗病能力的增强,个别雄性个体的出现,并非异源精子作用的结果。

参考文献:

- [1] Wang ZW, Ye YZ, Zhou JF, *et al* Research of establishing pure line of hypophthalmichthys molitrix and aristichthys nobilis [J]. *Progress in Natural Science*, 2003, 13 (10): 1104—1107 [王忠卫,叶玉珍,周建峰,等.快速建立鲢、鳙纯系的初步研究.自然科学进展,2003,13(10):1104—1107]
- [2] Wang Z Y. Research progress of fish sex control in China [J]. *Journal of Minxi Vocational College*, 1999, 4: 28—30 [王占云.我国鱼类性别控制的研究现状.闽西职业大学学报,1999,4:28—30]
- [3] Luo X Z, Zou G W, Zhou J G, *et al* Growth comparison between different strains of gynogenetic silver carp and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) [J]. *Journal of Jinxi University Natural Science*, 2003, 8 (3): 203—207 [罗相忠,邹桂伟,周剑光,等.雌核发育鲢各系及与普通鲢生长的比较研究.集美大学学报(自然科学版),2003,8(3):203—207]
- [4] Luo C, Liu Y. Study on production of gynogenetic grass carp and crucian carp [J]. *Journal of Natural Science of Hunan Normal University*, 1991, 14 (2): 154—159 [罗琛,刘筠.人工诱导草鱼和鲫鱼雌核发育的研究.湖南师范大学自然科学学报,1991,14(2):154—159]
- [5] Long J J, Chen L H. Experimental comparison study on resistance gynogenetic grass carp [J]. *Inland Fisheries*, 2005, 3: 9 [龙建军,陈礼和.雌核发育抗病草鱼池塘养殖对比试验.内陆水产,2005,3:9]
- [6] Williams J G K, Kubelik A R. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primer are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18 (22): 6531—6535
- [7] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers [J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18 (24): 7213—7218
- [8] Zou SM, Li S F, Cai W Q, *et al* Establishing gynogenetic groups of genetic improved *Megalobrama amblycephala* and its genetic analysis [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2001, 25 (4): 311—316 [邹署明,李思发,蔡完其,等.团头鲂良种雌核发育群体的建立及其遗传变异.水产学报,2001,25(4):311—316]
- [9] Infante-Malachias M E, Yotoko K S C, Lima de Azeredo Esp A M. Random amplified polymorphic DNA of screwworm fly populations (Diptera: Calliphoridae) from Southeastern Brazil and Northern Argentina [J]. *Genet*, 1999, 42: 772—779
- [10] Xia D Q, Cao Y, Wu T T, *et al* Study on lineages of *Protosalanx chinensis*, *Neosalanx taihuensis* and *N. oligodontis* in Taihu Lake with RAPD technique [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2000, 7 (1): 12—15 [夏德全,曹莹,吴婷婷,等.用 RAPD 方法分析太湖大银鱼、太湖新银鱼和寡齿新银鱼的亲缘关系.中国水产科学,2000,7(1):12—15]
- [11] 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—303 [周莉,樊连春,桂建芳.银鲫复合种外源遗传物质整入的 RAPD 分析.水生生物学报,1998,22(4):301—303]
- [12] Yue G H, Li Y, Chen F, *et al* Comparison of three DNA marker systems for assessing genetic diversity in Asian arowana (*Scleropages formosus*) [J]. *Electrophoresis*, 2002, 23: 1025—1032
- [13] Richa rd Ba rtfai, La szb Orba n, *et al* Genetic analysis of two common carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers [J]. *Aquaculture*, 2003, 219: 157—167
- [14] O 'Connell M, Wright J M. Microsatellite DNA in fishes [J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 1997, 7: 331—363

- [15] David L, Rajasekaran P, Fang J, *et al* Polymorphism in ornamental and common carp strains (*Cyprinus carpio* L.) as revealed by AFLP analysis and a new set of microsatellite markers [J]. *Mol Genet Genomics*, 2001, **266**: 353—362
- [16] Crooijmans R P M A, Bierbooms V A F, Komen J, *et al* Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Animal Genetics*, 1997, **28**: 129—134
- [17] Li B X and Luo C. Cytological observations on induction of mitogynogenesis by heat-shocking of the eggs in grass carp [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, **27** (2): 155—160 [李冰霞, 罗琛. 热休克法抑制第一次卵裂实现草鱼雌核发育的细胞学观察. 水生生物学报, 2003, **27** (2): 155—160]
- [18] Chen J H, Huang M M, Zheng K, *et al* RAPD analysis on genomic DNA of two artificial gynogenetic groups of grass carp, *Ctenopharyngodon idellus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28** (5): 471—477 [陈金辉, 黄明敏, 郑康, 等. 两个不同雌核发育群体基因组 DNA 的 RAPD 分析. 水生生物学报, 2004, **28** (5): 471—477]
- [19] Huang M M, Chen J H, Zheng K, *et al* Screening of polymorphic primers and polymorphic locus for grass carp genomic RAPD analysis, *Ctenopharyngodon idellus* [J]. *Science Technology and Engineering*, 2004, **4** (2): 91—96 [黄明敏, 陈金辉, 郑康, 等. 草鱼基因组随机扩增多态性引物及多态性位点的筛选. 科学技术与工程, 2004, **4** (2): 91—96]
- [20] Lin K D, Luo C. Preliminary study on applicability of microsatellite primers developed from common carp for genomic analysis of grass carp [J]. *Acta Laserbiology Sinica*, 2003, **12** (2): 121—127 [林凯东, 罗琛. 鲤鱼的微卫星引物对草鱼基因组分析适用性的初步研究. 激光生物学报, 2003, **12** (2): 121—127]
- [21] Zheng K, Lin K D, Liu Z H, *et al* Comparative microsatellite analysis of grass carp genomes of two gynogenetic groups and the Xiangjiang River group [J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2007, **34** (4): 321—330
- [22] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76** (10): 5269—5273
- [23] 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]
- [24] Zou G W, Pan G B, Wang D Q, *et al* Genetic diversity of artificial gynogenetic 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. 人工雌核发育鲢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]
- [25] Jia F J, Wang J W, Wu Q J. Gynogenetic rare minnow (*Gobiocypris rarus*) induced by heterogeneous sperms [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2002, **26** (3): 246—252 [贾方钧, 王剑伟, 吴清江. 异源精子诱导稀有鮡鲫的人工雌核发育. 水生生物学报, 2002, **26** (3): 246—252]
- [26] Ling Q F, Li S F, Zhang H J, *et al* The inducing of gynogenetic tench by heterologous sperm and comparison with parents by PARD [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2005, **29** (1): 120—123 [凌去非, 李思发, 张海军, 等. 丁鱥雌核发育鱼的异源精子诱导及其与亲本的 RAPD 比较分析. 水产学报, 2005, **29** (1): 120—123]
- [27] Liu Z H, Chen J H, Huang M M, *et al* Genetic analysis on some RAPD loci for identification of molecular markers in grass carp genomic DNA [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, **30** (3): 292—297 [刘正华, 陈金辉, 黄明敏, 等. 草鱼基因组 DNA 一些 RAPD 位点的遗传分析及分子标记筛选. 水生生物学报, 2006, **30** (3): 292—297]

ANALYSIS ON THE GENETIC INFLUENCE OF HETEROLOGOUS SPERM IN THE GENOME OF GYNOGENETIC GRASS CARP

HU Hai-Xing^{1,2}, ZHENG Kang^{1,2}, CHEN Jin-Hui^{1,2}, LIU Zheng-Hua^{1,2}, ZHANG Qiong-Yu^{1,2} and LUO Chen²

(1. Institute of Biology, Hunan Normal University, Changsha 410081; 2. College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058)

Abstract: Grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*, is one of the most important freshwater fish cultivated in China. Pure lines or highly pure inbred lines have to be generated for selecting genes with desired economical characters during the breeding of grass carp and to avoid genetic separation that could degenerate the population character. Since the sexually maturation of grass carp needs more than 4 years, to obtain a pure line of grass carp by sib mating would take several decades and require much of labor and material resources. Modern artificial gynogenetic technology provides a rapid and economic way to establish pure line or highly pure inbred line of grass carp. By inducing the gynogenetic development of mature grass carp eggs with UV-irradiated heterologous sperm and then inhibiting the first cleavage or the second polar body release of the gynogenetic eggs, absolute pure diploid individual or very highly pure diploid individual could be obtained. After the maturation of the gynogenetic individuals, by reinducing the gynogenesis of mature eggs from a gynogenetic individual, absolute pure line or highly pure inbred line of grass carp could be generated. The genetic and developmental impact of the UV-irradiated heterologous sperm on artificial gynogenetic fish, however, it remains a subject of debate in the fish artificial gynogenetic studies.

In order to determine the genetic influence of heterologous sperm in the genome of artificial gynogenetic grass carp, genomes of artificially induced gynogenetic grass carp and their parents were comparatively analyzed with the techniques of random amplification polymorphism DNA (RAPD) and microsatellite analysis. The 14 gynogenetic grass carp individuals used in the examination is from a two-generation artificially induced gynogenetic grass carp group (meio-gynogenetic-2 group), in which all the individuals share an identical gene type. The mother of this meio-gynogenetic-2 group is an individual from a one-generation artificially induced gynogenetic grass carp group (meio-gynogenetic-1 group). Chromosome analysis provided that there is no chromosome or chromosomal fragments of the heterologous sperm in the metaphase of the meio-gynogenetic-1 grass carp group. Pure mother could simplify ascertaining the heritable origin of gene loci in the gynogenetic grass carp. The pseudofather of the meio-gynogenetic-2 group is a common carp and its sperm being irradiated by UV before used for activating the matured eggs of grass carp.

With 10 polymorphic random primers, total 104 RAPD loci were detected in both the genomes of the meio-gynogenetic-2 group and their grass carp mother, and 103 loci in the paternal common carp. In microsatellite survey with 7 pairs of microsatellite primers, 4 microsatellite loci in both of the meio-gynogenetic-2 grass carp group and their grass carp mother, and 22 in their paternal common carp were detected respectively. On one RAPD locus, through the PCR products of the meio-gynogenetic-2 grass carp group could not be distinguished from that of the paternal common carp by their length, obvious differences were observed in their nucleotide sequences. Genetic similarity analysis was 0.9903 to 1.000 between the meio-gynogenetic-2 grass carp group and the meio-gynogenetic-1 grass carp mother, but 0.000 between the meio-gynogenetic-2 grass carp group and the paternal common carp. These results indicated that no locus of the detected loci was identical in gynogenetic grass carp and paternal common carp, the genetic materials of the heterologous sperm did not contaminate the genome of the meio-gynogenetic-2 grass carp group and the genetic materials of common carp sperm could be completely destroyed by properly UV-irradiation.

Key words: Gynogenetic grass carp; RAPD; Microsatellite; Genetic similarity; Heterologous genetic material