

# 人工诱导泥鳅与大鳞副泥鳅雄核发育单倍体子代的 RAPD 分析\*

龙良启 赵振山 汤保贵 熊帮喜

(华中农业大学农业部淡水水产增养殖生物学重点实验室 武汉 430070)

**摘要:** 用 30 个经过筛选的随机引物对 3 组泥鳅雄核发育单倍体、2 组大鳞副泥鳅雄核发育单倍体及其相应亲本进行了 RAPD 分析。结果表明,雄核发育单倍体子代与其父本的 RAPD 谱带相似率为 97.0%~97.8%,与母本相似率为 30.3%~59.5%,子代中的非亲本谱带率为 0~0.029,极少母本特异谱带。这一结果说明雄核发育鱼类单倍体的遗传信息主要来自父本,且存在着个体差异,雄核发育子代存在 DNA 变异和母本 DNA 非特异带,但并非其必要条件。

**关键词:** RAPD; 雄核发育单倍体; 泥鳅; 大鳞副泥鳅

**中图分类号:** Q953 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2001)01-02-05

## RAPD Analysis of Artificially Induced Androgenesis Haploid of *Misgurnus anguillicandatus* and *Paramisgurnus dabryanus*

LONG Liang-Qi ZHAO Zhen-Shan TANG Bao-Gui XIONG Bang-Xi

(The Agricultural Ministry Key Laboratory of Freshwater Aquaculture and Enhancement Biology  
in Huazhong Agricultural University Wuhan 430070, China)

**Abstract:** An overall RAPD analysis of three groups of androgenesis haploid of *Misgurnus anguillicandatus*, two groups of androgenesis haploid of *Paramisgurnus dabryanus* and their parents were made by selected 30 primers of random decamer oligonucleotide. The results showed: the similarity index was 97.0%~97.8% between androgenesis haploid and their male parents; 30.3%~59.5% between androgenesis haploid and their female parents; the non-parent band ratio of androgenesis haploid was 0~0.029; mother specific band was rarely found in the androgenetic haploid. It was concluded that the major genetic informations of androgenetic haploid came from their male parents; moreover there were differences among the androgenetic haploid produced by different sire; the non-parents bands and maternal specific bands would be unnecessary for androgenesis haploid.

**Key words:** RAPD; Androgenesis haploid; *Misgurnus anguillicandatus*; *Paramisgurnus dabryanus*

\* 国家自然科学基金资助项目(No. 39770592);

第一作者简介 龙良启, 49 岁, 博士, 副教授; 研究方向: 动物生化与遗传;

收稿日期: 1999-02-12, 修回日期: 1999-09-27

人工诱导雄核发育和雌核发育技术在鱼类遗传育种中具有广阔的应用前景。从理论上,无论雄核发育还是雌核发育,子代在其发育过程中均不发生雄性与雌性原核的融合。然而,在雌核发育中,从形态学与酶学<sup>[1]</sup>、用微卫星与小卫星 DNA 指纹<sup>[2]</sup>和 RAPD(random amplified polymorphic DNA)分析<sup>[3]</sup>等多方面都证实了外源精子的效应;在雄核发育研究中,用染色体组型分析<sup>[4]</sup>、VNTR(variable number of tandem repeat)指纹<sup>[5]</sup>和 RAPD-PCR 分析<sup>[6]</sup>等均未检测到母本基因参与雄核发育,但也有报道曾发现雄核发育单倍体染色体中混有雌核染色体片断<sup>[7]</sup>。本实验采用 30 个经过 PCR 扩增筛选的引物对人工诱导的泥鳅(*Misgurnus anguillicandatus*)、大鳞副泥鳅(*Paranisgurnus dabryanus*)雄核发育单倍体子代及其相应亲本 DNA 进行了 RAPD 检测,并对产生的 DNA 片断多态性进行了比较分析,从 DNA 水平探讨了外源卵子对雄核发育的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 亲鱼的来源与选择** 泥鳅和大鳞副泥鳅样本于 1998 年 4 月采自武汉市汤逊湖区。体重 30~50 g,体长 15~25 cm。根据典型特征区别种类与雌雄。性成熟泥鳅个体大,尾鳍基部上方有一黑色大斑,尾柄长大于尾柄高。大鳞副泥鳅个体小,土黄色,尾部上方无黑斑,尾柄高大于尾柄长。两种鱼中,雌鱼腹部膨大,尾鳍小而宽,末端钝圆,雄鱼腹部较小,尾鳍大而窄长,末端尖而翘起,背鳍后方两侧有肉质隆起。

**1.2 雄核发育单倍体的制备** 将泥鳅、大鳞副泥鳅亲鱼雌雄各 5 尾肌肉注射绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG),剂量:雌鱼 800~1 000 IU/尾,雄鱼 400~500 IU/尾。8~12 小时后,各取雌鱼一尾挤卵,参照 Bongers<sup>[8]</sup>的方法,将卵子平铺于盛有人工合成孵巢液的培养皿中,用 240 mJ/cm<sup>2</sup> 紫外辐射剂量照射,然后将处理过的泥鳅卵子分成 2 份,处理过的大鳞副泥鳅卵子分成 3 份,分别与大鳞

副泥鳅和泥鳅异种精子“受精”。受精后在 26℃ 孵化,培育 48 小时出膜后再培育 48 小时,然后按单倍体的典型特征收集鱼苗。单倍体鱼苗(鳔一室期)具有头小、身体小,躯干短而阔,尾短小,头、躯干、尾三者比例失常,尾鳍弯曲,水肿等典型单倍体综合症,很易与正常二倍体鱼苗区别。

**1.3 DNA 的制备** 亲本采取断尾取血收集全血 100 μl,参照 Taggart 的方法制备 DNA<sup>[9]</sup>。雄核发育单倍体子代各取 100 尾混合,按我室建立的方法制备 DNA<sup>[10]</sup>。

**1.4 RAPD 检测** 随机引物(10-mer)100 种购自上海 Sangon 生物工程公司。PCR 扩增仪为 PE 公司 9600 型。Tag 酶购自华美生物工程公司(批号:HA100499)。

扩增反应体积 25 μl。其中 10×buffer 2.5 μl, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1 μl, 2 mmol/L dNTP 1.5 μl,引物(15 ng/nl)1 μl, Tag 酶(5 u/μl)0.4 μl, 模板 DNA(50 ng/μl)2 μl, ddH<sub>2</sub>O 16.6 μl。

PCR 程序:混合反应物先 94℃ 变性 2 分钟,再进行 35 次循环反应(94℃ 1 min-36℃ 1 min-72℃ 2 min),最后 72℃ 保温 10 分钟。扩增产物在 2% 琼脂糖凝胶中电泳,EB 染色后拍照。

**1.5 实验设计** 先按 Dawis 等提出的方法<sup>[11]</sup>,将各组 DNA 等量混合,分别用 100 种引物 PCR 扩增进行引物筛选,再以筛选的引物对各组 DNA 扩增。

**1.6 数据处理** 参照 Lynch 等提出的方法计算相似系数<sup>[12]</sup>,公式:

$$S_{AB} = 2N_{AB}/(N_A + N_B)。$$

## 2 结果

**2.1 大鳞副泥鳅雄核发育单倍体与其亲本比较** 30 个 RAPD 引物在 2 组大鳞副泥鳅雄核发育单倍体子代、2 尾大鳞副泥鳅父本和 1 尾泥鳅母本中分别扩增了 280、264、162 条谱带,平均每个引物扩增出 4.7、4.2、5.4 条。三者扩增结果统计列入表 1。

表 1 大鳞副泥鳅雄核发育单倍体及其亲本 RAPD 扩增结果

样 本	总带数	PMA 共有	PA 共有	MA 共有	相似系数	P 特有率	M 特有率	非亲本带率
P	264	80	264		$S_{MP}$ 0.45			
M	162	80		88	$S_{AM}$ 0.492			
A <sub>1</sub>	126	56	126	56	$S_{AM}$ 0.389 $S_{AM}$ 0.595	0.941	0	0.059
A <sub>2</sub>	144	80	138	88	$S_{AP}$ 0.971 $S_{AP}$ 0.971	0.944	0.056	0
A <sub>1</sub> + A <sub>2</sub>	280	80	264	88	$S_{AP}$ 0.97	0.942	0.029	0.029

P:父本,大鳞副泥鳅; M:母本,泥鳅; A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub> 雄核发育单倍体。S<sub>MP</sub>、S<sub>AM</sub>……等分别代表下角所注样本间的相似系数

以 4 个随机引物 (S<sub>29</sub>GGGTAACGCC、S<sub>96</sub>AGCGTCCTCA、S<sub>97</sub>GTCAGGGCAA、S<sub>99</sub>AC-GACCGACA)扩增结果见图 1。由图 1 可见它

们的结果与 30 个随机引物扩增的总结果是一

致的。

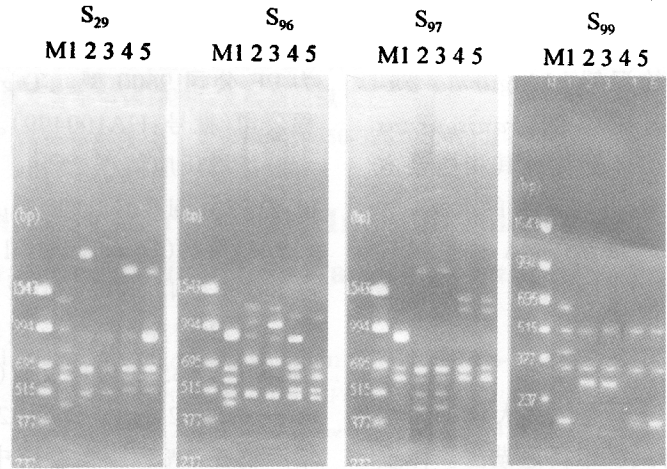


图 1 引物 S<sub>29</sub>、S<sub>96</sub>、S<sub>97</sub>、S<sub>99</sub> 扩增结果

1. 母本,泥鳅; 3、5. 父本,大鳞副泥鳅; 2、4. 大鳞副泥鳅雄核发育单倍体; M. PCR marker

2.2 泥鳅雄核发育单倍体与其亲本比较

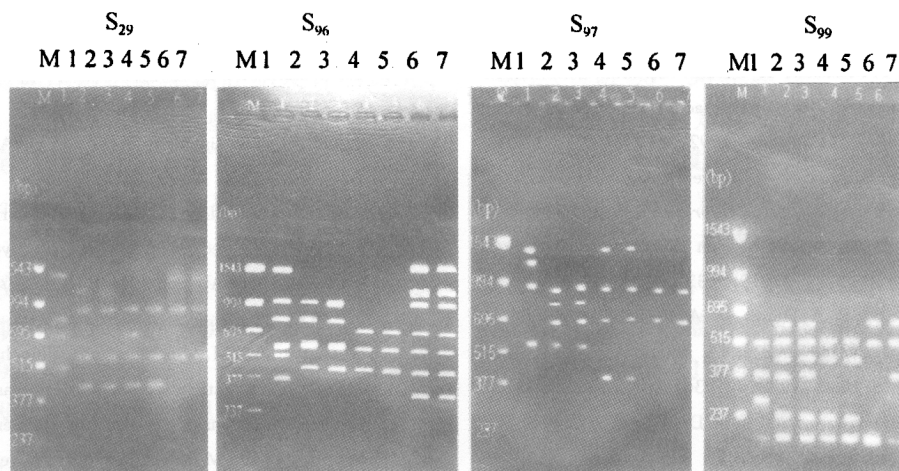
30 个 RAPD 引物在 3 组泥鳅雄核发育单倍体子代、3 尾泥鳅父本、1 尾大鳞副泥鳅母本进行扩增,扩增结果及相关系数数据列于表 2。

用 4 个随机引物 (S<sub>29</sub>、S<sub>96</sub>、S<sub>97</sub>、S<sub>99</sub>) 对泥鳅雄核发育单倍体扩增结果如图 2。扩增结果与 30 个随机引物扩增结果一致。

表 2 泥鳅雄核发育单倍体及其亲本 RAPD 扩增结果

样 本	总带数	PMA 共有	PA 共有	MA 共有	相似系数	P 特有率	M 特有率	非亲本带率
P	384	72		336	$S_{MP}$ 0.409			
M	144	72	72		$S_{MA}$ 0.978			
A <sub>1</sub>	144	56	64	144	$S_{AIM}$ 1.000 $S_{AIP}$ 0.364	0	1.000	0
A <sub>2</sub>	120	32	36	112	$S_{A2M}$ 0.966 $S_{A2P}$ 0.303	0.067	0.973	0
A <sub>3</sub>	120	56	56	120	$S_{A3M}$ 0.968 $S_{S3P}$ 0.424	0	1.000	0
A <sub>1</sub> + A <sub>2</sub> + A <sub>3</sub>	384	72	92	336	$S_{AP}$ 0.364	0.021	0.978	0

P:母本,大鳞副泥鳅; M:父本,泥鳅; A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub> 雄核发育单倍体。S<sub>MP</sub>、S<sub>MA</sub>……分别代表下角所注两组间的相似系数

图2 4种引物  $S_{29}$ 、 $S_{96}$ 、 $S_{97}$ 、 $S_{99}$  扩增结果

1. 母本,大鳞副泥鳅; 2、4、6. 泥鳅雄核发育单倍体; 3、5、7. 父本,泥鳅; M. PCR marker

### 3 讨 论

实验中无论泥鳅还是大鳞副泥鳅雄核发育单倍体与其父本相似系数为 0.97 以上,证实了雄核发育单倍体的遗传信息主要来自父本。雄核发育子代与其母本比较,相似系数为 0.303~0.595 之间,因母本是未经处理的样本,不能反映遗传信息的传递状态,但母本的特异带绝大部分未在子代中出现,反映了卵子灭活的效应,而父本特异带均出现在子代中,说明了雄核发育子代与父本相似率高的原因。

检测的雄核发育子代 DNA 的非亲本带率为 0 与 0.029,与 Kari Elo 等结果一致,小于 0.03%<sup>[13]</sup>。非亲本带可能是子代鱼 DNA 变异的结果,也可能是灭活卵子与精子 DNA 发生重组交换的结果。值得提出的是泥鳅雄核发育单倍体中存在非亲本带,而大鳞副泥鳅未见非亲本带,泥鳅与大鳞副泥鳅染色体分别为  $2n=100$ ,  $2n=48$ ,是否存在父本染色体数多而母本染色体较少的雄核发育子代不具有非亲本带,而父本染色体少母体染色体多产生的雄核发育子代具有非亲本带?这显然是一令人感兴趣的问题。此外非亲本带的存在是否影响二倍体的形成?也是值得进一步研究的课题。无论如何,本实验证明雄核发育单倍体子代发育中,非亲本带并非其必要条件。

对虹鳉 (*Oncorhynchus mykiss*) 和斑马鱼 (*Danio reio*) 雄核发育单倍体子代分别用 VN-TR 指纹和 RAPD 技术都未能检测到母本特异谱带的存在<sup>[2,14]</sup>,而在本实验中发现雄核发育单倍体中有个别母本特异带,说明了存在卵子效应且与 K. Arai 等实验结果一致<sup>[7]</sup>。联系子代与母本仍具有一定的谱带相似率,灭活卵子的 DNA 效应这一问题有待于进一步分析。

本实验采用同一卵子灭活与不同精子“受精”产生雄核发育单倍体子代,RAPD 分析表明不同父本个体间存在较大差异,为不同父本产生雄核发育子代进一步研究提供了初步数据。

### 参 考 文 献

- [1] 朱蓝菲,桂建芳,梁绍昌等.复合四倍体异育银鲫的血红蛋白与红细胞同工酶分析.水生生物学报,1995,19(1):66~69.
- [2] Carter, R. E., G. C. Mair, D. O. F. Skibinski *et al.* The application of DNA fingerprinting in the analysis of gynogenesis in tilapia. *Aquaculture*, 1991, 95:41~52.
- [3] 陈洪,杨靖,薛国雄等. RAPD 技术在异精激发方正银鲫比较研究中的应用.科学通报,1994,39(7):661~665.
- [4] 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.遗传学报,1998,25(5):416~421.
- [5] Young, W. P., P. A. Wheeler, R. D. Field. DNA fingerprinting confirms isogenecity of androgenetically derived rainbow trout lines. *J. Hered.*, 1996, 87(1):77~80.
- [6] Corley-smith, G. E., J. Lim G., E. P. Brandhorst. Production of androgenetic zebrafish (*Danio rerio*). *Genetics*,

- 1996, 142: 1 265 ~ 1 278.
- [ 7 ] Arai, K. , T. Masaoka, R. Suzuki. Optimum condition of UV ray irradiation for genetic inactivation of *Coach* eggs. *Nippon Suisan Gakkaishi* ., 1992, 58(7): 1 197 ~ 1 201.
- [ 8 ] Bongers, A. B. J. , E. P. C. Intveld, Abo-Hashema. Androgenesis in common carp (*Cyprinus carpio*) using UV irradiation in a synthetic ovarian fluid and heat shocks. *Aquaculture* , 1994, 122: 19 ~ 132.
- [ 9 ] Taggart, J. B. , R. A. Hynes, P. A. Probohl. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. *J. Fish Biol.* , 1992, 40: 936 ~ 965.
- [ 10 ] 龙良启, 汤保贵, 徐永福. 鱼苗 DNA 制备方法的研究. 内陆水产, 1998, 5: 6 ~ 7.
- [ 11 ] Dawis, T. M. , H. Yu, K. M. Haigis. Template mixing: a method of enhancing detection and interpretation of codominant RAPD markers. *Ther. Appl. Genet.* , 1995, 91: 528 ~ 588.
- [ 12 ] Lynch. M. The similarity index and DNA fingerprinting. *Mol. Biol. Evol.* , 1990, 7: 478 ~ 484.
- [ 13 ] Kari, E. , Saku Lvaroff, A. Jukka. Inheritance of RAPD markers and detection of interspecific hybridization with Brown trout and Atlantic salmon. *Aquaculture* , 1997, 152: 55 ~ 65.
- [ 14 ] Thongpan, A. , M. Mingmuang, S. Thinchant. Genomic identification of catfish species by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis of the gene encoding the immunoglobulin M heavy chain constant region. *Aquaculture* , 1997, 156: 129 ~ 137.