

不同精子激发彭泽鲫卵子产生的 子代及其双亲同工酶的比较^{*}

董成稳¹, 赵俊¹, 刘良国^{1,2}, 陈湘¹, 崔森¹

(1. 华南师范大学生命科学学院, 广东 广州 510631;

2. 湖南文理学院生物系, 湖南 常德 415000)

摘 要: 用彭泽鲫和尖鳍鲤的精子分别与彭泽鲫的卵子授精, 产生 2 种子代 PP 和 PS。采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术对子代及父母本 3 种组织 (心脏、肾脏、肝脏) 的 4 种同工酶 (LDH, EST, SOD, MDH) 以及肌肉蛋白进行了比较分析, 结果表明: 两种子代的同工酶表型几乎完全一致, 且在肝脏 LDH、肾脏 EST 和 SOD 以及肌肉蛋白表型上与母本彭泽鲫存在差异, 说明精子来源的不同对子代成体的同工酶和肌肉蛋白表型没有影响。暗示在正常情况下, 无论与同源精子还是异源精子授精, 彭泽鲫都行雌核发育生殖方式。而子代与母本存在差异的事实又意味着彭泽鲫的雌核发育与传统意义上的单性型雌核发育鱼类不同, 可能属于非典型的雌核发育。

关键词: 雌核发育; 彭泽鲫; 同工酶; 肌肉蛋白; 尖鳍鲤

中图分类号: Q953; Q959.468 文献标识码: A 文章编号: 0529-6579 (2004) S1-0086-05

彭泽鲫 *Carassius auratus* of Pengze 原产于江西省彭泽县丁家湖、芳湖和太白湖等天然水体中, 有关其生殖方式的问题已有不少的研究报道。杨兴棋等^[1]最早报道彭泽鲫属于两性型天然雌核发育鱼类。之后许多学者分别从细胞学、染色体组型和分子生物学等多方面证实了彭泽鲫的雌核发育性质^[2-5]。虽然研究者对彭泽鲫的雌核发育生殖方式基本没有疑义, 但在异源精子对雌核发育子代的遗传贡献上却存在两种截然不同的观点。一种观点认为异源精子对雌核发育鲫鱼的卵子发育只起刺激作用, 精子的遗传物质并没有遗传给子代, 也就是说子代完全继承了母本的遗传特性。相关的证据涉及到受精生物学^[3]、同工酶表型^[6]和分子生物学^[7]等多个方面。另一种观点则认为异源精子对子代的遗传有贡献, 也就是说父本的遗传物质进入子代, 子代与母本的遗传特性并不完全一致^[4,8-10]。

为了探讨父本对子代的影响情况, 我们用不同精子授精得到子代, 对子代及父母本不同组织的乳酸脱氢酶 (LDH)、酯酶 (EST)、超氧化物歧化酶 (SOD)、苹果酸脱氢酶 (MDH) 以及肌肉蛋白 (Muscle protein) 进行了比较研究, 试图从生化同工酶表型的角度分析子代与双亲在遗传上的异同。

1 材料与方法

1.1 材 料

实验鱼取自华南师范大学生命科学学院南海试验基地。母本彭泽鲫 ♀1 尾 (P ♀), 父本彭泽鲫 ♂ (P ♂) 和尖鳍鲤 ♂ (S ♂) 各 1 尾。常规人工催产, 将雌性彭泽鲫的成熟卵子平均分为 2 份, 分别用雄性彭泽鲫和尖鳍鲤的精子进行体外人工授精, 受精卵常规室外水泥池孵化。2 组鱼苗在 2 个面积约 650 m² 的培苗池中分池养殖。催产之后 3 尾亲本养于室内水族箱中备用。当子代长至体质量 50 g 以上时, 每组各取 10 尾进行实验。彭泽鲫精子授精组的子代以 PP 表示, 尖鳍鲤精子授精组的子代以 PS 表示。

1.2 酶液制备

将上述实验鱼活体解剖, 取肾脏、肝脏、心脏和背部肌肉, 置于 -20 °C 冰箱中备用。按 1:10 的比例 (组织重/缓冲液体积) 加入预冷的磷酸缓冲液 (0.2 mol/L, pH 7.0), 将组织低温研磨充分, 在 TGL-16G A 型高速冷冻离心机上进行离心, 4 °C 100 00 r/min 离心 30 min, 提取液置于 -20 °C 冰箱中备用。

* 收稿日期: 2003-11-26

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (031525); 广东省科技攻关资助项目 (2002C20324); 广东省教育厅科学基金资助项目 (2001-72-0121)

作者简介: 董成稳 (1978 年生), 男, 硕士研究生; 通讯联系人: 赵俊; E-mail: zhaojun@snu.edu.cn

1.3 电泳

分离胶为 $w=7.5\%$ 的聚丙烯酰胺, 浓缩胶为 $w=2.5\%$ 。电泳缓冲液为 pH 8.3 的 Tris-甘氨酸溶液^[11]。采用 DYY-III 型垂直板电泳槽, DYY 2 型稳压稳流电泳仪在 4℃ 冰箱中进行电泳。同工酶染色按照朱蓝菲的方法并略有改变^[12], 肌肉蛋白染色按照 Barnes N 等^[13] 的方法进行。

1.4 拍照及模式图的绘制

对已染色及固定好的凝胶在 BIO IMAGING SYSTEM 下进行拍照, 并根据胶片绘制模式图。

2 结果

2.1 乳酸脱氢酶 (LDH, 1.1.1.27)

由图 1 可以看出, 彭泽鲫心脏和肾脏的 LDH 分别有 9 条和 8 条酶带, P♀、P♂、PP 和 PS 的酶带完全相同。尖鳍鲤的 LDH 相应酶带的迁移率与其它 4 组明显不同, 心脏中的迁移率相对较大, 而肾脏中的迁移率相对较小。在肝脏的 LDH 中, P♀表现为 7 条酶带; 与 P♀相比, P♂和 PP 多一条染色较浅的酶带, PS 多一条染色较深的酶带; 而尖鳍鲤的酶带为 13 条, 其迁移率比彭泽鲫相应酶带明显要大。

2.2 酯酶 (EST, 3.1.1.1)

鱼类的酯酶 (EST) 绝大多数为单体, 只含 1 个亚基, 一般由 2 个以上的等位基因编码, 多态现象非常普遍。在心脏组织中, P♀、PS 为 4 条酶带, 第 1 条染色较深, 其它 3 条染色较浅 (图 2 (a)); P♂、PP 和 S♂各为 3 条, 但 S♂与 P♂和 PP 的迁移率不同。在肾脏组织中, P♀、P♂和 S♂为 4 条酶带, 其中 P♀和 P♂的酶带完全相同, S♂除第 1 条酶带之外, 其余 3 条的迁移率与 P♀和 P♂相差较大 (图 2

(b)); PP 和 PS 都表现为 3 条酶带, 即比 P♀和 P♂各少了 1 条染色较浅的酶带。而在肝脏组织中, S♂表现为 3 条酶带, 与其余四组一致表现为 4 条酶带存在明显差异 (图 2 (c))。

2.3 超氧化物歧化酶 (SOD, 1.15.1.1)

鱼类的超氧化物歧化酶 (SOD) 分为线粒体型 (m SOD) 和细胞质型 (s SOD) 2 种^[14]。在心脏组织中, 除了 S♂表现为 4 条清晰酶带之外, 其余都为 2 条酶带, 但 P♀的第 2 条酶带比 P♂、PP、PS 的染色要深 (图 3 (a))。在肾脏组织中, P♀和 P♂同为 6 条酶带; PP 和 PS 同为 5 条酶带, 它们比 P♀和 P♂少了 1 条染色很浅的酶带; 而 S♂则表现为十条酶带, 除第 2 条染色较深而且较宽之外, 其余九条都比较细且染色不深 (图 3 (b))。

2.4 苹果酸脱氢酶 (MDH, 1.1.1.37)

鱼类的苹果酸脱氢酶也分为线粒体型 (m-MDH) 和细胞质型 (s MDH) 2 种^[14], 它是由两个基因座位编码的二聚体酶。P♀、P♂、S♂、PP 和 PS 在心脏组织中都表现为 7 条酶带 (图 4)。其中 m MDH 均为 3 条, 各组的迁移率也完全一致, 但活性高低有较大差异; s-MDH 均为 4 条, 彭泽鲫各组迁移率完全一致, 尖鳍鲤的迁移率明显比彭泽鲫要慢。

2.5 肌肉蛋白

肌肉蛋白的条带清晰而且较多 (图 5)。P♀、P♂、S♂、PP 和 PS 依次具有 19、17、14、16 和 16 条谱带。在第 1 区段, 除 S♂外各有 7 条带, 且 P♂的头 2 个条带与其它的有些差别, 其迁移率非常接近, 好像是 1 条带, 但在自然光下两条带清晰可见; 在第 2 和第 3 区段 P♀比 PP 和 PS 各多出 1 条和 2 条酶带, 比 P♂分别多出 1 条酶带; 而在第

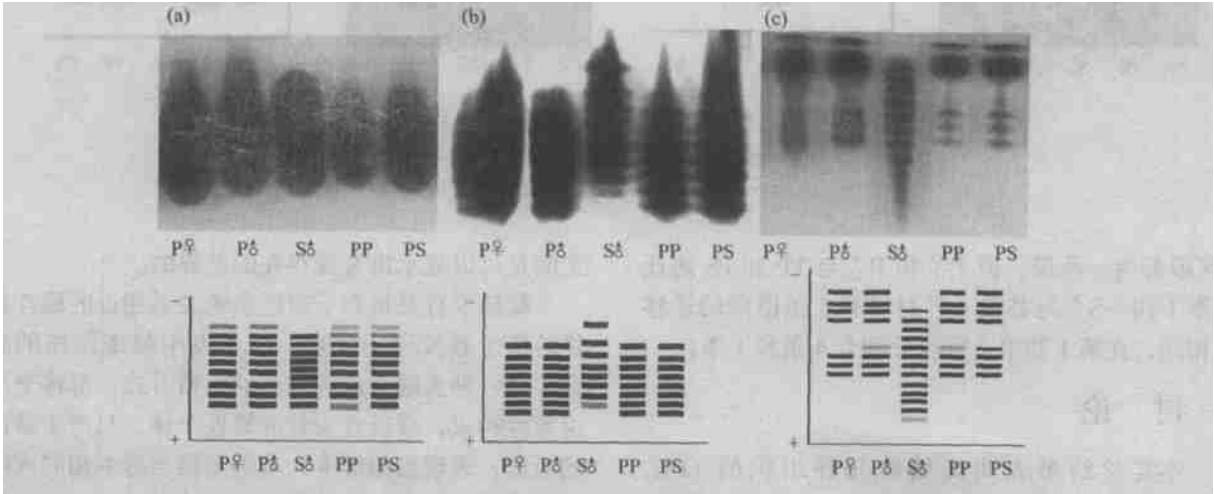


图 1 LDH 电泳图谱 (上) 和模式图 (下)

Fig. 1 Electrophoretograms (up) and models (down) of LDH isozymes (a) 心脏; (b) 肾脏; (c) 肝脏

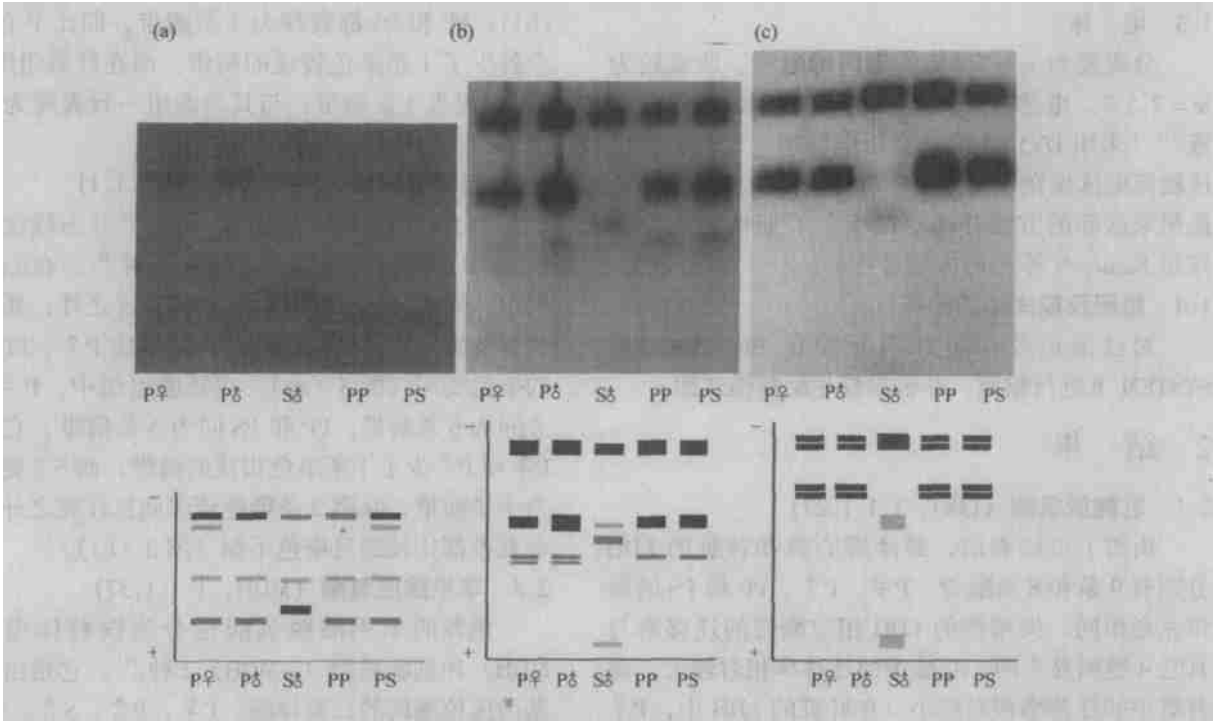


图 2 EST 电泳图谱 (上) 和模式图 (下)

Fig 2 Electrophoretograms (up) and models (down) of EST isozymes
(a) 心脏; (b) 肾脏; (c) 肝脏

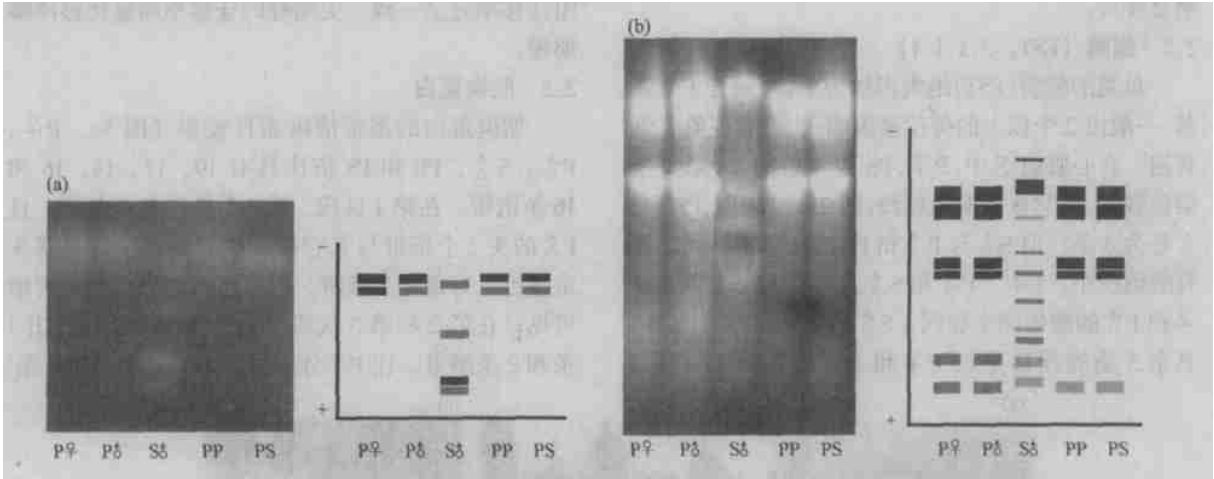


图 3 SOD 电泳图谱 (左) 和模式图 (右)

Fig 3 Electrophoretograms (left) and models (right) of SOD isozymes
(a) 心脏; (b) 肾脏

4 区段都为一条带, 但 $P \text{♀}$ 和 $P \text{♂}$ 与 PP 和 PS 的迁移率不同。 $S \text{♂}$ 与其他 4 种材料有 5 条谱带的迁移率相同, 在第 1 和第 2 区段分别有 4 条和 1 条。

3 讨 论

本实验结果表明尖鳍鲤几种组织的 LDH, EST, SOD 和 MDH 与彭泽鲫存在较大差异, 同时这几种同工酶在不同研究对象中都存在明显的组织特异性, 说明作为一种检测手段, 本文采用的几种同

工酶是可以显示出客观存在的差异的。
雌核发育是指卵子需经亲缘关系相近的雄性提供的精子激发卵子发育, 但不发生雌雄原核的融合, 是一种无融合或假融合的生殖方式。群体全部由雌性构成, 或仅含少量的雄性个体, 只产生雌性的后裔, 表现型似母本, 基因型则与母本相同或略有差异, 视卵核发育的途径而定^[13]。关于鱼类的雌核发育, 国内外学者提出了不同的看法。Schultz 等^[16]推断花鳉属 *Poecilia* 的雌核发育三倍体雌, 雄

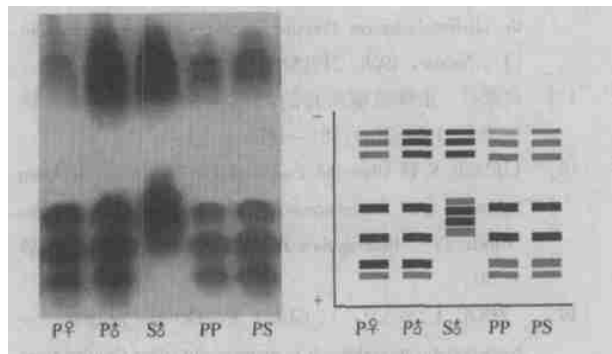


图4 心脏MDH电泳图谱(左)和模式图(右)
Fig 4 Electrophoretograms (left) and models (right)
of MDH isozymes in heart

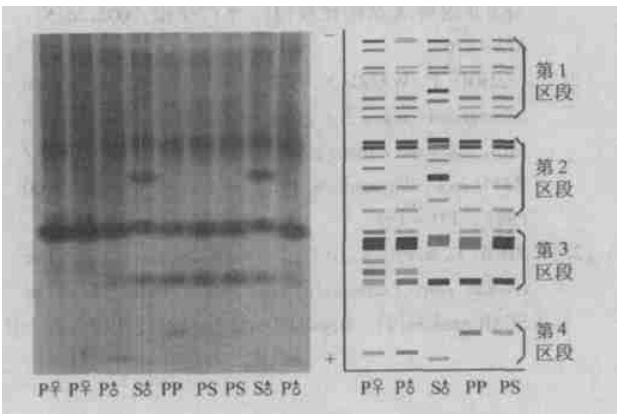


图5 肌肉蛋白电泳图谱(左)和模式图(右)
Fig 5 Electrophoretograms (left) and models (right)
of muscle protein

原核并不融合，父本染色体不能掺入到合子中，精子的惟一作用是刺激卵子发育。因此，雌核发育过程中使雄性染色体失活或排除的机制仍是一个谜。在雌核发育鲫鱼中，当同源或异源精子进入银鲫或彭泽鲫卵动物极后，只排出唯一的一个极体，精核始终受到抑制而不形成雄性原核，保持固缩状态^[3,17]。Lieder也曾观察到在8细胞时精核仍保持固缩状^[18]。但蒋一^[8]等认为异源精子对银鲫的雌核发育子代有遗传贡献，并称之为“异精生物学效应”。随后，不少学者都找到了异精效应的分子证据^[4,9,19]，但迄今为止，尚未发现更直接的形态学或蛋白质表型上的证据。

从我们的实验结果来看，彭泽鲫精子或尖鳍鲤精子刺激彭泽鲫卵子产生的子代在几种组织同工酶和肌蛋白的表型上基本完全一致（心脏的EST有1条染色很浅的酶带只存在于PS中，而PP中缺失的事实不能作为可靠的差异），说明异源精子即使对子代有遗传贡献，也不表现在成体或幼体常见的同工酶表型上。但本文的实验设计使我们发现了另一

个较少被注意到的现象，即子代（无论是同源子代还是异源子代）与母本在一些同工酶弱带上存在差异（图1(c)，图2(b)，图3(b)，图5)，且这些差异与父本没有直接关系。虽然弱带的差异可能会受实验条件的影响，但本实验中约有40%的组织同工酶表现出类似的弱带差异，特别是在肝脏LDH和肌肉蛋白的表型上这种差异比较明显。即使不足以得出明确的结论，应当也可以说明一些问题。这是否意味着彭泽鲫具有的雌核发育生殖方式与传统意义上的雌核发育不同？即不论精子来源如何，都有可能对子代产生影响，而不是单单起刺激卵子发育的作用？其雌核发育子代都有可能产生变异，而并非完全的母性遗传？当然，这只是一个初步的推测，需要更加充分的证据。

Zhou等^[19]对银鲫应答不同来源精子采用不同的生殖方式提出了明确的分子证据，认为银鲫在与同源精子受精时采用两性生殖，而与异源精子受精时则采用雌核发育生殖方式。本文结果与上述观点并不一致。同时他们认为彭泽鲫是银鲫的一个品系，与银鲫的A系有着相似的遗传背景^[20-22]。据此推论，彭泽鲫也应当具有两种生殖方式，显然这一观点较难解释本文的结果。虽然我们发现的差异都是弱带的差异，但几乎都是子代相同而与母本不同，这很难让人相信精子来源的不同会对子代同工酶表型产生影响。而异源子代与同源子代的表型完全相同，并非与母本完全相同，也说明在应答不同来源的精子时，彭泽鲫可能采取同样的生殖方式，即非典型的雌核发育。同样，对这一问题还需要作进一步深入系统的研究。

参考文献:

[1] 杨兴棋,陈敏容,俞小牧,等. 江西彭泽鲫生殖方式的初步研究[J]. 水生生物学报,1992,16(3): 277-280.

[2] 陈湘,赵俊,马广智,等. 雌核发育鲫鱼在育种上的应用[J]. 华南师范大学学报(自然科学版),1998(增刊): 1-3.

[3] 舒琥,张海发,陈湘. 彭泽鲫雌核发育的细胞学研究[J]. 动物学杂志,2000,35(5): 12-15.

[4] 张海发,陈湘,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[J]. 应用与环境生物学报,1999,5(5): 507-511.

[5] 赵振山,高贵琴,黄峰,等. 彭泽鲫的受精细胞学. 上海水产大学学报,1999,8(1): 25-30.

[6] 王茜,董仕,张学成. 彭泽鲫繁殖特性的研究[J]. 南开大学学报(自然科学版),2001,34(4): 103-106.

[7] 滕春波,孙孝文,沈俊宝,等. 利用异源精子激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.

[8] 蒋一 , 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.

[9] 陈洪, 杨靖, 薛国雄, 等. RAPD 在异精激发方正银鲫比较研究中的应用[J] . 科学通报, 1994, 39(7): 661—663.

[10] SCHARIL M, NANDAL I, SCHLUPP I et al. Incorporation of subgenomic amounts of host species DNA in the gynogenetic *Amazon molly* [J] . Nature, 1995, 373: 67—71.

[11] 李建武, 余瑞元, 袁明秀, 等. 生物化学实验原理和方法[M] . 北京: 北京大学出版社, 1994: 189—194.

[12] 朱蓝菲. 鱼类同工酶和蛋白质的聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳法[J] . 水生生物学报, 1992, 16(2): 183—185.

[13] BARNES N, CZYBULKA S G, HABECK C. Electrophoresis in Practice[M] . VCH press Weinheim, 1993: 181.

[14] SHAKLEE J B, ALLENDORF F W, MORIZOT D C, et al. Genetic nomenclature for protein-coding loci in fish: proposed guidelines[J] . Transactions of the American Fisheries Society, 1989(118): 218—227

[15] 陈宏溪. 鱼类的雌核发育 //中国鱼类学会. 鱼类学论文集[C] . 北京: 科学出版社, 1983(3): 135—146.

[16] SCHULTZ R J, KALLMAN K D. Triploid hybrids between the all-female teleost *Poecilia formosa* and *Poecilia phenops* [J] . Nature, 1968, 219(5150): 280—282.

[17] 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.

[18] LIEDER V U. Über die Entwicklung bei männchenlosen Stämmen der Silberkarausche *Carassius auratus gibelio* (Bloch) [J] . Biologisches Zentralblatt Heft, 1959, 2: 284—291.

[19] 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

[20] 李名友, 周莉, 杨林, 等. 彭泽鲫的分子遗传分析及其与方正银鲫 A 系的比较[J] . 水产学报, 2002, 26(5): 472—476.

[21] ZHOU L, WANG Y, GUI J F. Analysis of genetic heterogeneity among five gynogenetic clones of silver crucian carp, *Carassius auratus gibelio* Bloch, based on detection of RAPD molecular markers[J] . Cytogenet Cell Genet, 2000 (88) : 131—139.

[22] ZHOU L, WANG Y, GUI J F. Molecular analysis of silver crucian carp *Carassius auratus gibelio* Bloch clones by SCAR markers[J] . Aquaculture, 2001(201): 219—228.

Comparative Study on the Isozymes of Offspring Developed from *Pengze crucian* Carp Eggs Activated by Different Sperms and Their Parents

DONG Cheng wen¹, ZHAO Jun¹, LIU Liang guo^{1,2}, CHEN Xiang lin¹, CUI Miao¹

(1. College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China;

2. Department of Biology, Hunan University of Arts and Science, Changde 415000, Hunan, China)

Abstract: The eggs of pengze crucian carp (*Carassius auratus* of Pengze) were stimulated by pengze crucian carp and sea carp (*Cyprinus acutidorsalis* Wang) sperms, respectively. The offspring were called PP and PS, respectively. Four isozymes (LDH, EST, SOD, MDH) of three tissues (heart, kidney and liver) and muscle proteins of the offspring and their parents above were investigated used by polyacrylamide gel electrophoresis method. The results showed that the isozymes patterns of PP and PS were almost identical, that means no influence on the offspring coming from different sperms. But differences were found in some isozymes and muscle protein phenotype between the offspring and their maternal parent. That maybe hinted the gynogenesis of pengze crucian carp is different from the traditional gynogenesis of unisexual animals.

Key words: gynogenesis; *Carassius auratus* of Pengze; isozyme; muscle protein; *Cyprinus acutidorsalis* Wang