

泉水鱼的细胞遗传学分析

邹远超 文正勇 岳兴建 王永明 覃川杰 陶敏 李斌
谢碧文 王涓 齐泽民

内江师范学院生命科学学院, 长江上游鱼类资源保护与利用四川省重点实验室 内江 641112

摘要: 以泉水鱼 (*Pseudogyrinocheilus prochilus*) 的肾为材料, 采用体内注射植物血球凝集素 (PHA) 和秋水仙素、肾组织细胞短期培养、常规空气干燥法制备泉水鱼染色体标本, 对其核型进行分析。以泉水鱼外周血细胞为样本, 鸡 (*Gallus gallus*) 血细胞 DNA 含量 (2.50 pg/2c, 2c 指二倍体) 为标准, 用流式细胞仪测定了泉水鱼的 DNA 含量。结果表明: (1) 泉水鱼的染色体数量为 $2n = 50$, 核型公式为 $12m + 14sm + 14st + 10t$, 总臂数 $NF = 76$, 未发现性别相关的异型染色体; (2) 泉水鱼的 DNA 含量为鸡血对照的 (1.05 ± 0.04) 倍, 其绝对 DNA 含量为 (2.62 ± 0.10) pg/2c。泉水鱼的染色体数目和 DNA 含量显示出二倍体的特征。

关键词: 泉水鱼; 染色体; 核型; DNA 含量

中图分类号: Q953 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2016) 01-66-07

Cytogenetic Analysis of *Pseudogyrinocheilus prochilus*

ZOU Yuan-Chao WEN Zheng-Yong YUE Xing-Jian WANG Yong-Ming QIN Chuan-Jie
TAO Min LI Bin XIE Bi-Wen WANG Yu QI Ze-Min

College of Life Sciences, Neijiang Normal University, Conservation and Utilization of Fishes Resources in the Upper Reaches of
the Yangtze River Key Laboratory of Sichuan Province, Neijiang 641112, China

Abstract: The chromosome number and karyotype of *Pseudogyrinocheilus prochilus* were analyzed using a routine method including intraperitoneal injection of phytohemagglutinin (PHA) and colchicine, cultivation *in vivo*, and slides preparation with air-drying. Erythrocyte nuclear DNA content of *P. prochilus* was determined by using a flow cytometer (Beckman Coulter Inc., USA) with the chicken (*Gallus gallus*) erythrocytes (their DNA content is 2.50 pg/2c) serving as reference cells. The results showed that the diploid chromosome number of *P. prochilus* was $2n = 50$, and the karyotype of this species was $2n = 12m + 14sm + 14st + 10t$, $NF = 76$ (Fig. 1 and Table 1). The heterosomes were not observed. The diploid cellular DNA content of *P. prochilus* was 2.62 ± 0.10 pg/2c ($n = 20$), which was 1.05 ± 0.04 times of that of the chicken erythrocytes (Fig. 2). The result of karyotype and DNA contents of *P. prochilus* indicate that *P. prochilus* is diploid.

Key words: *Pseudogyrinocheilus prochilus*; Chromosome; Karyotype; DNA content

基金项目 四川省教育厅科技创新科研团队基金项目 (No. KYTD201009), 四川省教育厅项目 (No. 15ZA0285);

第一作者介绍 邹远超, 女, 副教授; 研究方向: 鱼类遗传育种及种质资源保护; E-mail: zou3891@163.com。

收稿日期: 2015-05-08, 修回日期: 2015-10-15 DOI: 10.13859/j.cjz.201601008

泉水鱼 (*Pseudogyrinocheilus prochilus*) 属鲤形目 (Cypriniformes) 野鲮亚科 (Labeoninae) 泉水鱼属, 是我国特有的一种鲤科鱼类 (乐佩琦 2000)。主要分布于长江上游干流及四川境内的支流和乌江中, 因其肉质细嫩, 肉味鲜美且富含脂肪, 故当地俗称为“油鱼”, 为产区上等的经济鱼类 (丁瑞华 1994)。但近年来由于长江上游支流水土流失、梯级电站建设, 加上过度捕捞等因素导致泉水鱼的野生资源量急剧下降, 生存面临严峻的挑战。目前有关泉水鱼的生物学研究较少, 主要集中于其系统发育 (Zhang 1994)、分布概况 (于晓东等 2005)、遗传多样性 (史方等 2009, 司从利等 2012)、生殖力 (熊美华等 2012)、营养 (朱成科等 2013) 等方面。而有关其细胞遗传学方面的研究较少, 且很不全面 (宋灿等 2012)。本文通过对泉水鱼的染色体数量、核型和 DNA 含量进行研究, 以期在细胞水平上探讨泉水鱼的进化地位, 丰富泉水鱼的细胞遗传学资料, 也为泉水鱼种质资源保护和遗传育种提供基础资料和科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用泉水鱼来自四川省泸州市叙永县赤水镇江段。雌雄各 10 尾, 健康状况良好, 体重 50 ~ 80 g。

1.2 方法

1.2.1 染色体标本制备 参照林义浩 (1982) 植物血球凝集素 (phytohemagglutinin, PHA) 直接注射法制备染色体标本。按鱼体重 10 $\mu\text{g/g}$ 的剂量腹腔注射 PHA 溶液 (PHA 粉剂从广州市达晖生物技术有限公司购买, 制备成 0.01 g/L 的溶液), 将鱼置于 24 $^{\circ}\text{C}$ 的水族箱中饲养 20 ~ 24 h 后, 按照鱼体重 0.5 ~ 1.0 $\mu\text{g/g}$ 的剂量向鱼腹腔注射秋水仙素。饲养 2 ~ 3 h 后取鱼断鳃放血 10 min, 解剖取肾组织于 0.8% 的等渗生理盐水中洗涤并去结缔组织后置于 1.5 ml 离心管中, 用手术剪将其剪碎。静置 10 min, 取细胞

悬液于另一离心管中 1 000 r/min 离心 15 min 并收集细胞, 加入 0.075 mol/L KCl 溶液于 30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中低渗处理 90 min, 1 000 r/min 离心 15 min, 收集细胞加入新配制的卡诺氏固定液 (甲醇: 乙酸 = 3: 1, 体积比) 固定 15 min, 固定结束后 1 000 r/min 离心 20 min。重复固定 2 次。然后收集细胞加入卡诺氏固定液并敲打均匀, 将细胞悬液在距冰冻玻片 50 cm 处滴下, 空气中自然干燥。Giemsa 染液染色 20 min, 用自来水将玻片冲洗干净, 待其自然干燥后于显微镜 (Motic BA400) 下观察并在油镜下拍照。

1.2.2 核型分析 在显微镜下选取 100 个染色体形态清晰、数目清楚的中期分裂相, 进行计数, 并确定染色体众数。选取 15 个分散效果良好的染色体分裂相进行测量, 计算染色体的相对长度、臂比值、臂数等。按照相对大小由大到小编号, 以 Levan (1964) 提出的标准进行染色体的核型分析。

1.2.3 DNA 含量的测定 用加有抗凝剂 (肝素钠) 的注射器采取实验鱼 (20 尾) 血 0.2 ~ 0.5 ml, 加入 PBS 稀释, 低速离心机 (800 r/min) 获取红细胞。缓慢加入冰预冷的 75% 乙醇 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 1 h, 离心去除固定液, PBS 洗涤两次, 重悬 5 min, 30 μm 的滤网过滤, 制备细胞悬液 1.5 ~ 2.0 ml, 离心去除 PBS, 加入 1 ml 碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染液 (100 mg/L, RNA 酶 0.5 g/L 溶解入 PBS), 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光染色 20 min。美国 Beckman Coulter, CytoFlex 流式细胞仪进行样品分析。选择国际上通用的鸡 (*Gallus gallus*) 红细胞 DNA 含量 (2.50 pg/2c) 作为对照标准进行检测。泉水鱼的 DNA 含量依照以下公式计算: $P = 2.50 \times E_2/E_1$, 式中, E_1 表示鸡红细胞荧光强度, E_2 表示泉水鱼红细胞荧光强度, P 表示泉水鱼的 DNA 含量 (pg/2c)。

2 结果

2.1 泉水鱼的细胞染色体数目

本实验共对 100 个 (50 ♀ , 50 ♂) 中期分裂

相进行染色体计数、统计。染色体为 50 条的 88 个, 占计数细胞总数的 88%; 大于 50 条的 3 个, 占 3%; 小于 50 条的 9 个, 占 9%。因此可以确定泉水鱼的染色体众数为 50。

2.2 泉水鱼的染色体核型

泉水鱼 25 对染色体的相对长度、臂比和类型见表 1, 染色体中期分裂相见图 1。按照 Levan

(1964) 的标准将泉水鱼的染色体分为 4 组, 即中部着丝粒染色体 (m) 6 对, 亚中部着丝粒染色体 (sm) 7 对, 亚端部着丝粒染色体 (st) 7 对, 端部着丝粒染色体 (t) 5 对, 泉水鱼的核型公式为 $12m + 14sm + 14st + 10t$, 染色体臂数 (NF) 为 76。在所观察的泉水鱼中期分裂相中未发现多倍体及异型染色体。

表 1 泉水鱼染色体的相对长度、臂比及其分类类型

Table 1 Relative length, arm ratio and classification type of each pair chromosome in *Pseudogyrinocheilus prochilus*

染色体编号 Chromosome No	染色体相对长度 Relative length	臂比 Arm ratio	类型 Type
1	3.60 ± 0.44	1.35 ± 0.05	m
2	3.02 ± 0.40	1.33 ± 0.04	m
3	3.10 ± 0.38	1.30 ± 0.10	m
4	2.26 ± 0.25	1.24 ± 0.10	m
5	1.77 ± 0.30	1.23 ± 0.40	m
6	1.82 ± 0.09	1.23 ± 0.03	m
7	4.12 ± 0.30	2.51 ± 0.88	sm
8	4.01 ± 0.27	2.35 ± 0.09	sm
9	3.44 ± 0.75	2.26 ± 0.31	sm
10	3.21 ± 0.39	2.17 ± 0.18	sm
11	3.20 ± 0.43	2.74 ± 0.15	sm
12	3.02 ± 0.38	2.81 ± 0.11	sm
13	2.30 ± 0.31	2.53 ± 0.96	sm
14	1.52 ± 0.29	5.01 ± 0.94	st
15	1.56 ± 0.25	5.03 ± 0.39	st
16	1.48 ± 0.30	4.63 ± 0.75	st
17	1.07 ± 0.29	3.95 ± 0.35	st
18	2.25 ± 0.27	3.03 ± 0.39	st
19	1.87 ± 0.26	3.63 ± 0.68	st
20	1.53 ± 0.23	3.55 ± 0.87	st
21	1.54 ± 0.27	∞	t
22	1.02 ± 0.23	∞	t
23	1.56 ± 0.13	∞	t
24	0.96 ± 0.17	∞	t
25	0.80 ± 0.15	∞	t

m 为中部着丝粒染色体; sm 为亚中部着丝粒染色体; st 为亚端部着丝粒染色体; t 为端部着丝粒染色体; 相对长度 = (染色体长度/染色体组总长度) × 100%; 臂比 = 长臂长/短臂长。∞ 表示臂比值趋于无穷大。

m donates metacentric chromosome; sm donates submetacentric chromosome; st donates subtelocentric chromosome; t donates telocentric chromosome. Relative length = (chromosome length / total length of the genome) × 100%; Arm ratio = long arm length/galianconism length; ∞ arm ratio approaches infinity.

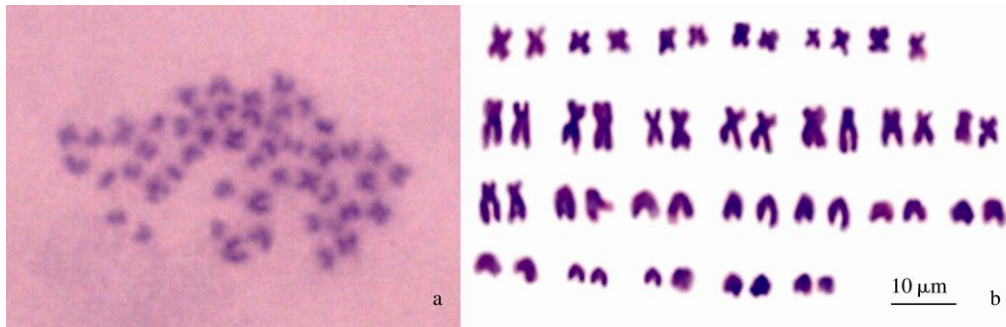


图 1 泉水鱼染色体中期分裂相 (a) 及核型 (b)

Fig. 1 Metaphase chromosomes (a) and karyotype (b) of *Pseudogyrinocheilus prochilus*

2.3 泉水鱼 DNA 含量

以碘化丙啶 (PI) 作为荧光染料, 应用流式细胞仪分析 20 尾泉水鱼体细胞 DNA 含量。实验鱼与鸡血的流式细胞分析测量结果见图 2, 鸡血细胞荧光强度为 200.40 ± 5.20 ($n = 5$), 泉水鱼血细胞荧光强度为 209.50 ± 7.20 ($n = 20$), 根据公式 $P = 2.50 \times E_2/E_1$ 计算得到泉水鱼血细胞绝对 DNA 含量为 (2.62 ± 0.10) pg/2c (2c 指二倍体)。泉水鱼的 DNA 含量为鸡血对照的 1.05 ± 0.04 倍。

3 讨论

3.1 染色体特征分析

染色体核型是对鱼类染色体特征的基本描述, 研究鱼类的染色体核型, 对于认识和探索鱼类的遗传变异、分类、系统演化、性别决定、杂交育种以及应用生物工程技术育种等均有重要意义 (余先觉等 1989, 吴仲庆 1991, 楼允东 1997)。迄今, 国内外关于野鲮亚科鱼类染色体的研究较少, 已报道的鱼类中有 9 属 13

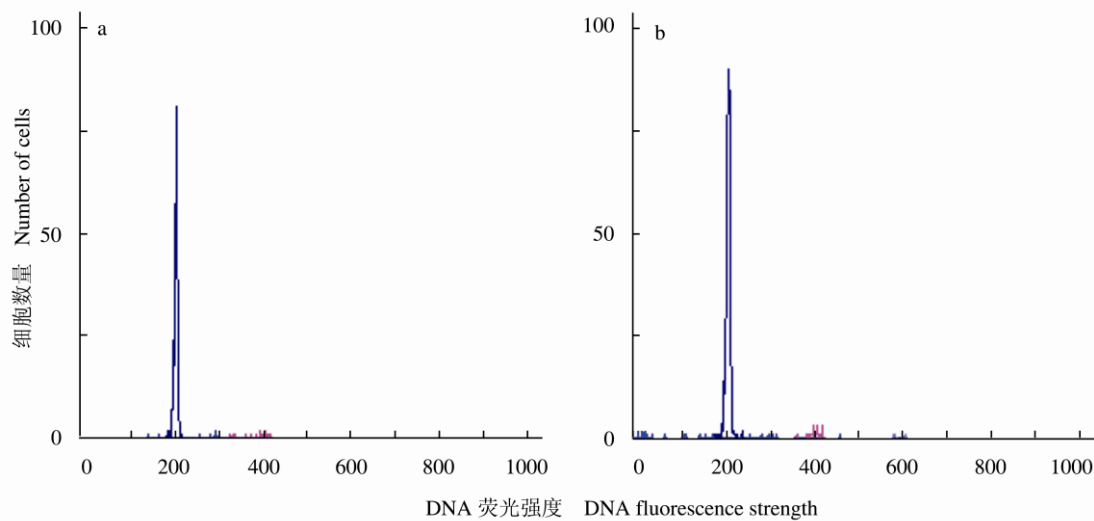


图 2 鸡血细胞 (a) 和泉水鱼血细胞 (b) DNA 荧光强度直方图

Fig. 2 Flow cytometric DNA content histograms of standard chicken erythrocytes (a) and *Pseudogyrinocheilus prochilus* erythrocytes (b)

表 2 野鲮亚科鱼类的染色体核型比较

Table 2 The comparison of the karyotype of Labeoninae

属 Genus	种 Species	染色体数(2n) Chromosome number	核型 Karyotype	臂数(NF) Arm number	参考文献 References
唇鲮属 <i>Semilabeo</i>	唇鲮 <i>S. notabilis</i>	50	8m + 10sm + 12st + 20t	68	安苗等 2008
野鲮属 <i>Labeo</i>	露斯塔野鲮 <i>L. rohita</i>	50	10m + 16sm + 12st + 12t	76	邬国民等 1989
鲮属 <i>Cirrhinus</i>	麦瑞加拉鲮 <i>C. mrigala</i>	50	10m + 16sm + 12st + 12t	76	邬国民等 1989
	鲮 <i>C. molitorella</i>	50	18m + 22sm + 10st	90	邬国民等 1989
	桂华鲮 <i>S. decorus</i>	50	10m + 18sm + 10st + 12t	78	桂建芳等 1986
华鲮属 <i>Sinilabeo</i>	湘华鲮 <i>S. decorus tungting</i>	50	12m + 16sm + 10st + 12t	78	张锦霞等 1984
	华鲮 <i>S. rendahli</i>	50	10m + 14sm + 18st + 8t	74	李渝成等 1986
异华鲮 <i>Parasinilabeo</i>	异华鲮 <i>P. assimilis</i>	50	16m + 12sm + 18st + 4t	78	桂建芳等 1986
盘鲮属 <i>Discogobio</i>	四须盘鲮 <i>D. tetrabarbus</i>	50	10m + 18sm + 12st + 10t	78	桂建芳等 1986
墨头鱼属 <i>Garra</i>	东方墨头鱼 <i>G. orientalis</i>	50	16m + 12sm + 14st + 8t	78	桂建芳等 1986
	墨头鱼 <i>G. pingi</i>	50	14m + 20sm + 12st + 4t	84	李渝成等 1986
卷口鱼属 <i>Ptychidio</i>	卷口鱼 <i>P. jordani</i>	50	12m + 16sm + 18st + 4t	78	刘毅辉等 2007
泉水鱼属 <i>Pseudogyrinocheilus</i>	泉水鱼 <i>P. prochilus</i>	50	12m + 14sm + 14st + 10t	76	本研究

种(包括本研究在内),约占野鲮亚科种类总数的4%(表2),其染色体数目均为 $2n = 50$ 。李渝成等(1986)认为野鲮亚科是鲤科中较为原始的类型, $2n = 50$ 是其基本的染色体二倍数。周噉(1984)的研究也显示鲤科鱼类染色体核型的原始类型为 $2n = 50$ 。由此可以推断,野鲮亚科的原始核型是 $2n = 50$ 。根据染色体的类型可将真骨鱼类分为低位类、中位类和高位类3个演化类群。一般染色体越收敛、端部着丝粒染色体数越多、臂数越少的鱼类,在系统进化分类上属于高位类(小岛吉雄 1991)。本研究得出泉水鱼端部着丝粒染色体(t)较多,染色体臂数明显低于野鲮亚科的鲮(*Cirrhinus molitorella*)(邬国民等 1989)和墨头鱼(*Garra pingi*)(李渝成等 1986),在鱼类系统进化上应属于高位类鱼类。李树深等(1983)认为,在特定的分类阶元中,具有较多端部着丝粒(t)和亚端部着丝粒(st)染色体的是原始类型,而具有较多中部着丝粒(m)和亚中部着丝粒(sm)染色体的是特化类型。由此推断泉水鱼在进化上是比较原始的类群,处于唇鲮

(*Semilabeo notabilis*)和鲮之间,特化程度较低。到目前为止,据相关文献报道,泉水鱼仅分布于长江上游干流及四川境内的支流和乌江(乐佩琦 2000),说明该鱼生境狭窄,这种地理分布证实了泉水鱼进化程度较低,适应性不强的特点。

3.2 DNA含量的测定

流式细胞仪是20世纪70年代末发展起来的一种能快速、准确测量细胞大小及DNA含量的高新技术仪器。利用流式细胞术技术能快速准确地鉴定物种倍性。DNA的含量和倍性在描述物种的分类和系统演化上具有十分重要的应用价值(叶玉珍等 2004,许晓军等 2012)。目前,已广泛运用于鱼类、虾类等DNA含量和倍性检测(李靖等 2008, Filipiak et al. 2012)。方旅平等(2007)运用流式细胞仪测定了刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)和日本囊对虾(*M. japonicus*)体细胞DNA含量,从而确定了两种对虾均为二倍体,因两种对虾的DNA含量的绝对值相差不大,推测两种虾在系统发生上具有相近的亲缘关系。高静等(2010)测定了6

种重要经济鱼类条纹斑竹鲨 (*Chiloscyllium plagiosum*)、斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)、赤点石斑鱼 (*E. akaara*)、大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*)、中华乌塘鳢 (*Bostrichthys sinensis*)、大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 的基因组大小, 结果证实鱼类基因组大小与相应的染色体数目之间存在着显著的正相关性, 即染色体数目越多, 其基因组相对越大, 鱼类进化地位越高则 DNA 含量越少。本实验运用流式细胞仪, 以鸡血 (DNA 含量为 2.50 pg/2c) 作为对照标准, 测定了泉水鱼的 DNA 含量为 (2.60 ± 0.10) pg/2c, 显示出二倍体特征, 这点与染色体核型分析结果一致。就同一种生物而言, 体细胞的 DNA 含量是恒定的, 具有种的特征 (李靖等 2008)。因此, 鱼类的红细胞核 DNA 含量研究是检验其种质特征的主要指标之一, 而利用流式细胞术测定组织细胞核 DNA 含量具有快速、准确、可靠的优点, 弥补了制备鱼类细胞染色体及分析需计数大量的中期分裂相细胞、耗时长、方法复杂的不足。由于流式细胞术测定细胞核 DNA 含量的精确性高, 通过比较细胞核 DNA 含量来鉴定倍性的可靠性比间接鉴定更加准确。因此流式细胞术是一种快速准确鉴定倍性的理想方法, 将会得到更广泛的应用。

参 考 文 献

- Filipiak M, Tylko G, Kilarski W. 2012. Flow cytometric determination of genome size in European sunbleak *Leucaspis delineatus* (Heckel, 1843). *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(2): 355–362.
- Levan A, Fredga K, Sandberg A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52(2): 201–220.
- Zhang E. 1994. Phylogenetic relationships of the endemic Chinese cyprinid fish *Pseudogyrinocheilus prochilus*. *Zoological Research*, 15(Suppl): 26–35.
- 安苗, 潘光群. 2008. 唇鲮染色体核型的研究. *山地农业生物学报*, 27(6): 508–511, 521.
- 丁瑞华. 1994. 四川鱼类志. 成都: 四川科学技术出版社, 353–356.
- 方旅平, 张馥厚, 曹文清, 等. 2007. 刀额新对虾和日本囊对虾细胞核 DNA 含量的测定与比较. *厦门大学学报: 自然科学版*, 46(1): 146–148.
- 高静, 黄晓红, 曾华嵩, 等. 2010. 中国 6 种经济鱼类的基因组大小测定. *中国水产科学*, 17(4): 689–694.
- 桂建芳, 李渝成, 李康, 等. 1986. 中国鲤科鱼类染色体组型的研究 (VIII): 鲃亚科 15 种鱼的核型及其系统演化 // 中国鱼类学会. 鱼类学论文集. 北京: 科学出版社, 119–126.
- 李靖, 李成斌, 顿文涛, 等. 2008. 流式细胞术 (FCM) 在生物学研究中的应用. *中国农学通报*, 24(6): 107–110.
- 李树深, 王蕊芳, 刘光佐, 等. 1983. 八种淡水真骨鱼类的核型研究. *遗传*, 5(4): 25–28.
- 李渝成, 李康, 蒋建桥, 等. 1986. 中国鲤科鱼类染色体组型的研究 X. 鲃亚科五种鱼和鮡亚科四种鱼的染色体组型. *动物学研究*, 7(2): 183–189.
- 林义浩. 1982. 快速获得大量鱼类肾细胞中期分裂相的 PHA 体内注射法. *水产学报*, 6(3): 201–208.
- 刘毅辉, 焦宗垚, 陈永乐, 等. 2007. 珠江卷口鱼形态特征与染色体组型. *水产学报*, 31(6): 721–725.
- 楼允东. 1997. 中国鱼类染色体组型研究的进展. *水产学报*, 21(增刊): 82–96.
- 史方, 徐念, 熊美华, 等. 2009. 利用微卫星标记评估乌江彭水水电站对泉水鱼的遗传多样性影响. *水生态学杂志*, 2(2): 117–121.
- 司从利, 章群, 马奔, 等. 2012. 基于线粒体细胞色素 b 基因序列分析的泉水鱼遗传多样性研究. *广东农业科学*, 39(1): 6–8.
- 宋灿, 刘少军, 肖军, 等. 2012. 多倍体生物研究进展. *中国科学: 生命科学*, 42(3): 173–184.
- 邬国民, 陈焜慈, 罗建仁, 等. 1989. 鲮鱼、麦瑞加拉鲮鱼和露斯塔野鲮的染色体组型比较. *水产学报*, 13(3): 259–263.
- 吴仲庆. 1991. 水产生物遗传育种学. 厦门: 厦门大学出版社, 7–25.
- 小島吉雄: 林义浩, 译. 1991. 鱼类细胞遗传学. 广州: 广东科技出版社.
- 熊美华, 邵科, 史方, 等. 2012. 乌江泉水鱼个体生殖力的研究. *水生态学杂志*, 33(5): 41–46.
- 许晓军, 杜建明, 张海琪, 等. 2012. 翘嘴鳊和翘嘴红鲌血细胞 DNA 含量测定. *浙江农业学报*, 24(3): 392–395.

- 叶玉珍, 周建峰, 王忠卫, 等. 2004. 三个鲫品系 DNA 含量的比较研究. *水生生物学报*, 28(1): 13–16.
- 于晓东, 罗天宏, 周红章. 2005. 长江流域鱼类物种多样性大尺度格局研究. *生物多样性*, 13(6): 473–495.
- 余先觉, 周墩, 李渝成, 等. 1989. 中国淡水鱼类染色体. 北京: 科学出版社, 2–3.
- 乐佩琦. 2000. 中国动物志: 硬骨鱼纲 下卷 鲤形目. 北京: 科学出版社, 226–228.
- 张锦霞, 刘肖芳, 王祖熊, 等. 1984. 湘华鲮 (♂) × 鲮鱼 (♀) 杂交一代与其双亲染色体组型的比较研究. *水生生物学报*, 8(3): 313–321.
- 周墩. 1984. 鱼类染色体研究. *动物学研究*, 5(增刊 1): 38–51.
- 朱成科, 黄辉, 向泉, 等. 2013. 泉水鱼肌肉营养成分分析及营养学评价. *食品科学*, 34(11): 246–249.