

二倍体、四倍体泥鳅与大鳞副泥鳅杂交子代 DNA 相对含量与染色体组型的比较

方礼豹¹ 周小云¹ 崔 蕾¹ 阎里清² 王卫民¹

1. 华中农业大学水产学院/农业动物遗传育种与繁育教育部重点实验室, 武汉 430070;
2. 湖北省漳水库水产公司, 荆门 448156

摘要 利用二倍体(D)、四倍体(T)泥鳅与大鳞副泥鳅(P)间的自交与杂交, 获得 9 种细胞型子代, 分别为($\text{♀} \times \text{♂}$): $\text{D} \times \text{D}$ 、 $\text{D} \times \text{T}$ 、 $\text{D} \times \text{P}$ 、 $\text{T} \times \text{D}$ 、 $\text{T} \times \text{T}$ 、 $\text{T} \times \text{P}$ 、 $\text{P} \times \text{D}$ 、 $\text{P} \times \text{T}$ 和 $\text{P} \times \text{P}$ 。采用流式细胞计数法和染色体制片技术分别对其进行了 DNA 相对含量测定和染色体组型分析。DNA 相对含量结果显示: $\text{D} \times \text{D}$ 、 $\text{D} \times \text{P}$ 、 $\text{P} \times \text{D}$ 和 $\text{P} \times \text{P}$ 属于二倍体; $\text{D} \times \text{T}$ 、 $\text{T} \times \text{D}$ 、 $\text{P} \times \text{T}$ 和 $\text{T} \times \text{P}$ 属于三倍体; $\text{T} \times \text{T}$ 属于四倍体, 且 3 种类型 DNA 含量比值接近 2:3:4。 $\text{D} \times \text{D}$ 的染色体数 $2n=50$, 核型为 $8m+6sm+36t$, 臂数 $\text{NF}=64$; $\text{T} \times \text{T}$ 染色体数为 $4n=100$, 抗型 $16m+12sm+72t$, $\text{NF}=128$; $\text{P} \times \text{P}$ 为 $2n=48$, $12m+4sm+32t$, $\text{NF}=64$; $\text{D} \times \text{P}$ 和 $\text{P} \times \text{D}$ 为 $2n=49$, $10m+5sm+34t$, $\text{NF}=64$; $\text{D} \times \text{T}$ 和 $\text{T} \times \text{D}$ 为 $3n=75$, $12m+9sm+54t$, $\text{NF}=96$; $\text{T} \times \text{P}$ 和 $\text{P} \times \text{T}$ 为 $3n=74$, $14m+8sm+52t$, $\text{NF}=96$ 。经比较分析可知, 杂交子代染色体是由双亲各提供一组单倍体染色体组成。

关键词 泥鳅; 大鳞副泥鳅; 杂交; DNA 相对含量; 染色体组型

中图分类号 S 917; Q 959.46⁺8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)04-0500-06

泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)和大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)分别隶属于鳅科(Cobitidae)、花鳅亚科(Cobitinae)中的泥鳅属(*Misgurnus*)和副泥鳅属(*Paramisgurnus*)^[1]。杂交是一种鱼类育种的基本手段, 能够生产出具有杂种优势的杂种^[2]。赵振山等^[3]通过对泥鳅(♀)与大鳞副泥鳅(♂)杂交子代染色体的观察, 探讨了 2 种泥鳅远缘杂交的可能性。龙良启等^[4]利用分子生物学方法对其杂交子代及其亲本进行了遗传变异分析, 探索了 2 种泥鳅杂交的遗传规律。已有的研究表明泥鳅的染色体存在着广泛的核型多态性^[5-7]。我国不仅有二倍体泥鳅与大鳞副泥鳅, 还广泛分布有四倍体泥鳅, 且个体较大^[8-11]。同时, 大鳞副泥鳅具有生长快和抗病力强的特点, 而泥鳅具有较理想的体形与体色^[12]。因此, 利用 2 种泥鳅的杂交, 有望获得生长速度快、抗病力强、个体大、体形与体色较好的杂交新品种。

笔者利用天然二倍体、四倍体泥鳅与大鳞副泥鳅间的杂交与自交, 获得 9 组子代, 然后对其进行了 DNA 相对含量检测和染色体组型的比较分析, 旨在

探讨不同倍性泥鳅以及泥鳅与大鳞副泥鳅杂交后代遗传结构组成和亲缘关系, 也为泥鳅的良种选育奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

用于繁殖的泥鳅和大鳞副泥鳅亲本均购买于武汉市水产品市场。根据陈景星^[1]的分类标准区分出泥鳅和大鳞副泥鳅后, 再利用流式细胞计数法鉴别二倍体与四倍体泥鳅, 然后进行人工催产。将二倍体、四倍体泥鳅与大鳞副泥鳅的卵子和精子各自分成 3 等份, 两两人工授精, 获得如下自交与正、反杂交组合($\text{♀} \times \text{♂}$): $\text{D} \times \text{D}$ 、 $\text{D} \times \text{T}$ 、 $\text{D} \times \text{P}$ 、 $\text{T} \times \text{D}$ 、 $\text{T} \times \text{T}$ 、 $\text{T} \times \text{P}$ 、 $\text{P} \times \text{D}$ 、 $\text{P} \times \text{T}$ 、 $\text{P} \times \text{P}$ 。将这 9 组子代人工饲养至 8 月龄时, 进行 DNA 相对含量测定与染色体标本的制备。

1.2 DNA 相对含量测定

将每种细胞型泥鳅的雌、雄各随机选出 30 尾, 用于 DNA 含量测定和染色体标本制备。经 MS-222(100 mg/L)麻醉鱼体后, 用 1 mL 无菌注射器

收稿日期: 2011-01-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(31001103); 教育部博士点基金项目(20100146120012)

方礼豹, 硕士研究生, 研究方向: 鱼类遗传育种。E-mail: fanglibao07@webmail.hzau.edu.cn

通讯作者: 王卫民, 教授, 研究方向: 鱼类遗传育种。E-mail: wangwm@mail.hzau.edu.cn

(1%肝素湿润)从尾静脉取血,将血液用 PBS(NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, Na₂ HPO₄ 1.42 g, KH₂ PO₄ 0.27 g, ddH₂O 1 000 mL)稀释至血细胞浓度为 10⁶ 个/mL。用实验室内饲养的二倍体泥鳅血样做参照,处理方法与待测组相同。染色方法为:将二倍体泥鳅血样与待测组血样同时加入样品杯中,再用 DA-PI 染液进行染色,三者体积比为 1 : 1 : 2,染色 5 min 后即可用流式细胞仪(Cell Lab Quanta™ SC, Beckman Coulter)进行检测。

1.3 染色体标本制备

采用 PHA 体内注射法制备染色体标本,具体方法参考文献[13]。染色体标本制备后,油镜下选取分散良好、形态清晰的分裂相,每种鱼至少计 50 个完整分裂相,计算其众数,确定染色体数,并选择长度适中、无重叠的中期分裂相进行核型分析。核型分析参照 Levan 等^[14]的方法进行。

2 结果与分析

2.1 红细胞核的 DNA 相对含量

泥鳅杂交子代红细胞核 DNA 相对含量直方图(荧光值)见图 1。由于采用内参进行检测,当试验组与对照组 DNA 含量相同或比较接近时,荧光峰值重合,当 DNA 含量不同时,荧光峰值分离。由图 1 中试验组与对照组荧光值的比例可以将检测结果分为 3 类,图 1-A,C,G,I 为一类,图 1-B,D,F,H 为第 2 类,图 1-E 为第 3 类。根据图中荧光值之比可以得到以上 3 类的 DNA 含量之比约为 2.00 : 3.10 : 4.16,这一比值基本符合二倍体、三倍体、四倍体 DNA 含量的理论比值(2 : 3 : 4)。因此,可以判定 D×D、D×P、P×D 和 P×P 属于二倍体,D×T、T×D、P×T 和 T×P 属于三倍体,T×T 属于四倍体。

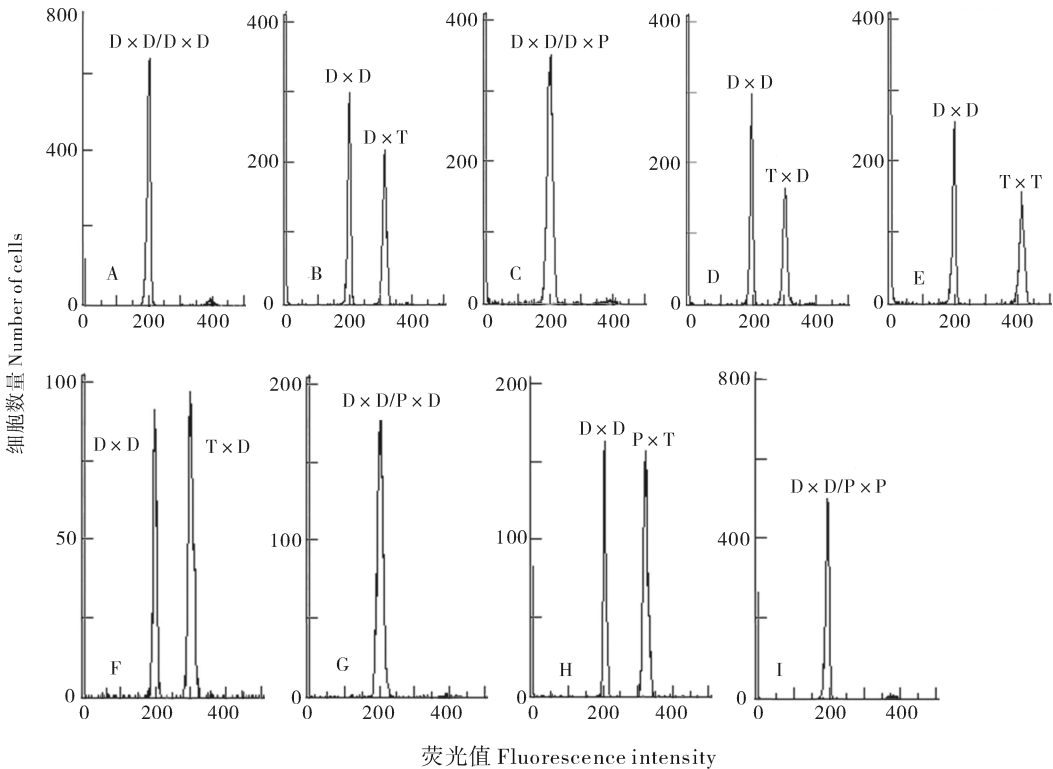


图 1 红细胞核的 DNA 相对含量直方图

Fig.1 Flow cytometric histograms of RBC (red blood cell) nuclear relative DNA content

2.2 染色体计数与核型分析

泥鳅杂交子代的染色体数、染色体中期分裂相

以及核型如图 2 所示。所有正交子代与其对应的反交子代的染色体数与核型均相同,且染色体数与臂

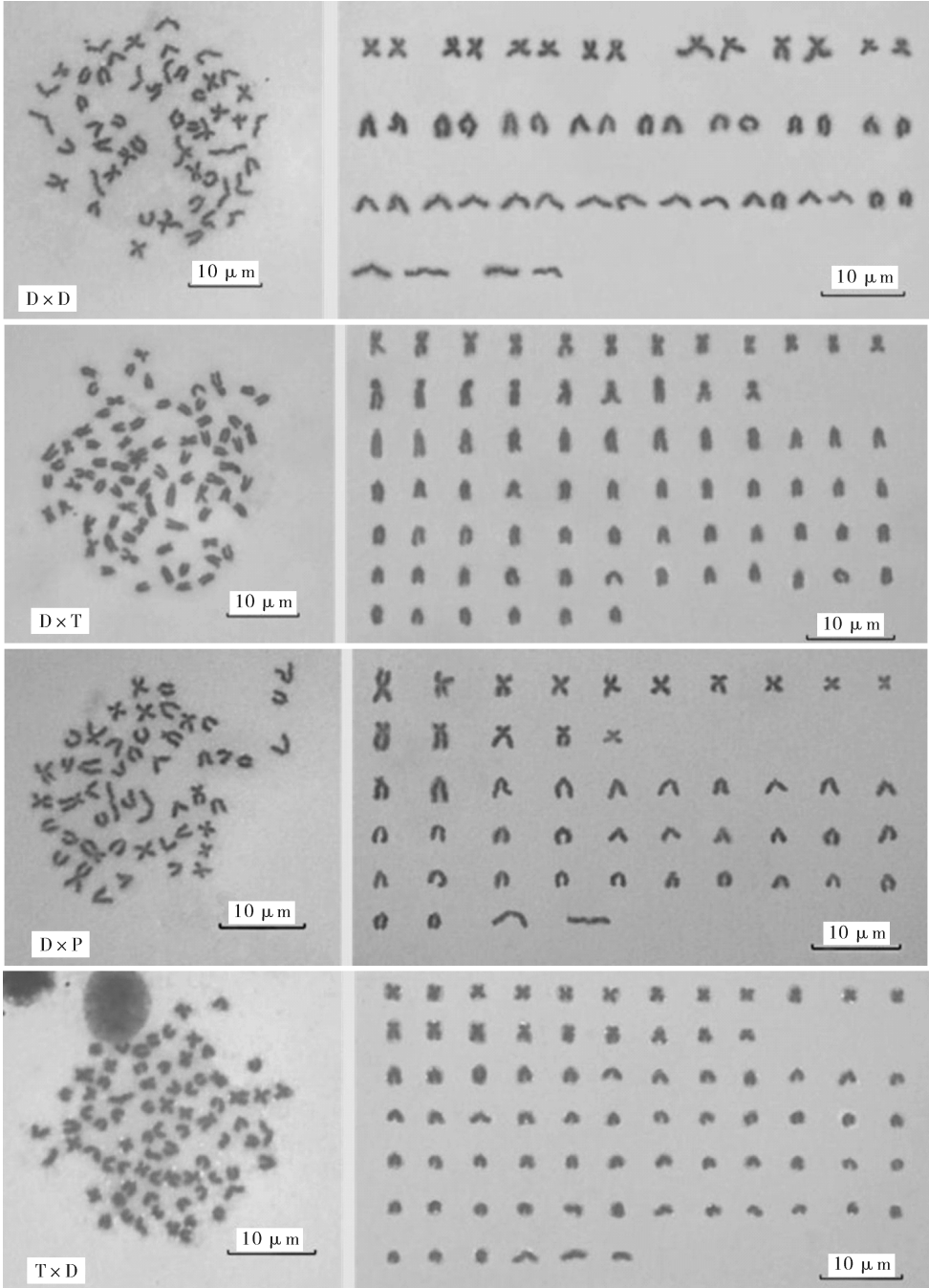
数都为双亲之和的一半。经比较分析可知,杂交子代染色体由双亲各提供一组单倍体组成。染色体计数结果表明 $D \times D$ 、 $D \times P$ 、 $P \times D$ 和 $P \times P$ 属于二倍体, $D \times T$ 、 $T \times D$ 、 $P \times T$ 和 $T \times P$ 属于三倍体, $T \times T$ 属于四倍体,与流式细胞仪测定结果一致。

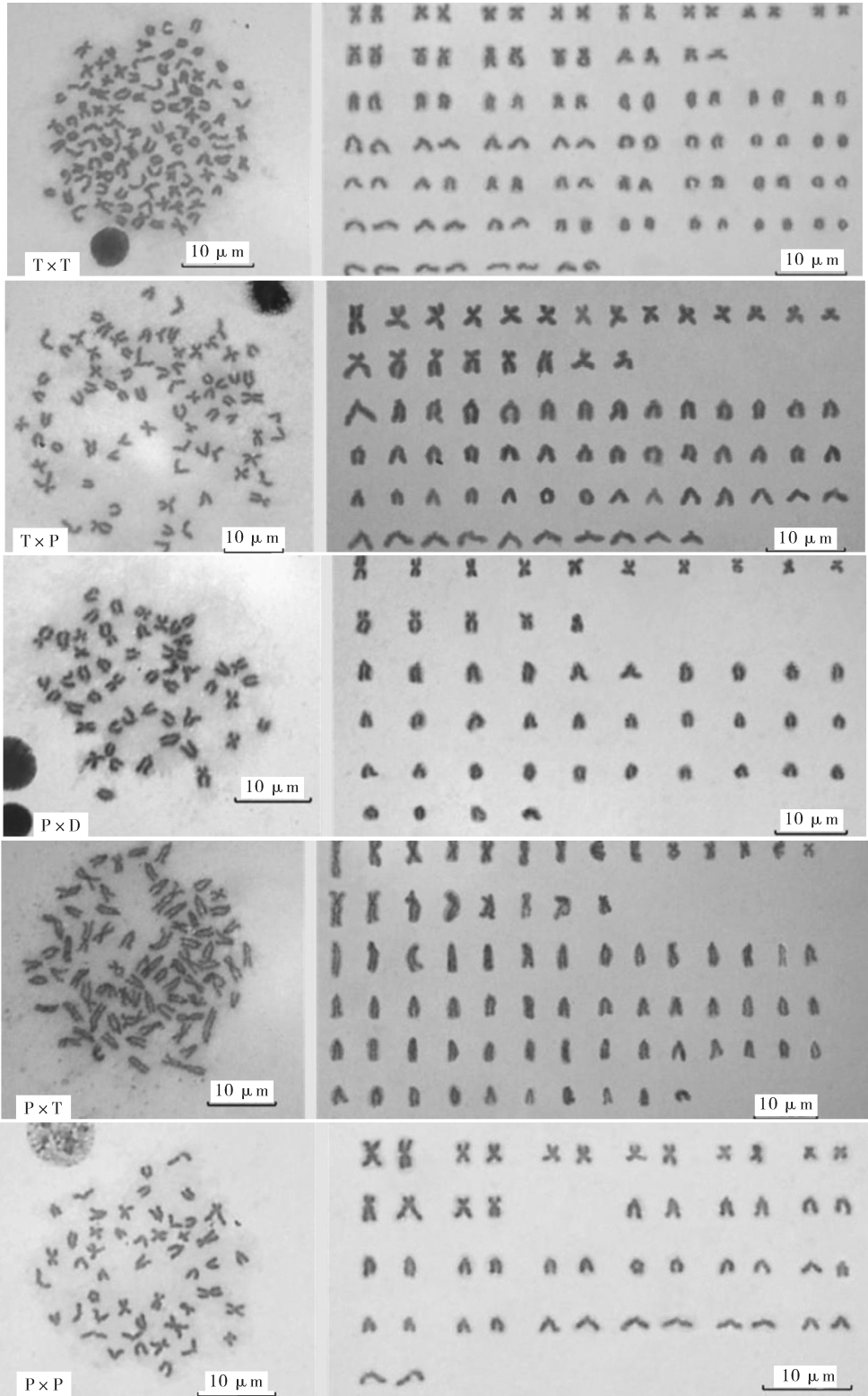
3 讨 论

3.1 DNA 相对含量

DNA 是染色体的主要组成部分,可以反应染色

体数量和细胞倍性。Ojima 等^[15]测定了 15 种鲤科鱼类的 DNA 含量,结果显示细胞核 DNA 含量与倍性成正比关系。因此,可以通过测定鱼类细胞的 DNA 含量来确定其倍性。但是,由于不同的研究者在测定方法、仪器设备,尤其是参照标准上有所不同,从而会出现同一研究对象有不同的研究结果。本文针对研究对象的特点,用二倍体泥鳅作为参照,测定 DNA 相对含量。结果显示,子代泥鳅中四倍体、三倍体、二倍体类型的 DNA 含量与对照组比值





D×D:2n=50,8m+6sm+36t,NF=64;T×T:4n=100,16m+12sm+72t,NF=128;P×P:2n=48,12m+4sm+32t,NF=64;
D×T,T×D:3n=75,12m+9sm+54t,NF=96;D×P,P×D:2n=49,10m+5sm+34t,NF=64;T×P,P×T:3n=74,14m+8sm+
52t,NF=96.

图 2 子代泥鳅的染色体中期分裂相及相应的核型
Fig. 2 Metaphase spreads and corresponding karyotypes of the progenies

分别为 2.08、1.55 和 1.00, 杂交子代 DNA 含量接近双亲之和的一半, 与染色体计数结果一致。另外, 由于采用内参(试验组和对照组血样在同一样品杯中, 同时染色, 同时检测)进行检测, 避免了因为染色时间不同或检测结果偏移而造成的误差, 且试验组和对照组荧光峰值(DNA 含量)在同一张图中显示, 便于观察比较。本研究结果表明选择已知倍性的同一物种或近缘种作为内参照, 能够更快速、准确、直观地反应研究对象的倍性。

3.2 染色体组型比较与泥鳅的杂交

泥鳅与大鳞副泥鳅分别属于鳅科鱼类中的泥鳅属和副泥鳅属, 其中泥鳅的染色体主要为 $2n=50$ 和 $4n=100$ 两种, 据报道泥鳅的核型曾发生过 $2n=50$ 到 $4n=100$ 的自然加倍过程, 四倍体泥鳅 m 、 sm 、 t 染色体以及臂数均是二倍体泥鳅的 2 倍^[8-10], 本研究也证实了这一结论。从核型分析结果可以看出, $P \times P$ 染色体数为 $2n=48$, 比 $D \times D$ 少 2 条染色体, 而其臂数却相同($NF=64$)。 $P \times P$ 与 $D \times D$ 相比多了 1 对明显偏大的 m 染色体, 而少了 2 对 t 染色体。这一结果表明, $P \times P$ 可能是由 $D \times D$ 罗伯逊易位而来。罗伯逊易位在其他鱼类中也有过报道^[9]。这也说明了泥鳅与大鳞副泥鳅具有较近的亲缘关系, 因而将它们进行正反杂交才能顺利获得杂交后代。

鱼类的属间杂交可能造成单倍体、二倍体、多倍体以及雌核发育、雄核发育等情况的发生, 核型分析则是确定杂交后代遗传结构组成的较好的方法^[2]。本试验中杂交子代的染色体总数以及各类型的染色体数均是双亲单倍体数目之和, 而且在泥鳅与大鳞副泥鳅所有杂交子代中均有 1 条未配对且明显偏大的 m 染色体(图 2)。比较泥鳅与大鳞副泥鳅的核型后不难发现, 这一较大的 m 染色体来自 $P \times P$ 。这些结果表明, 本试验得到的杂交子代染色体是由双亲各提供一组单倍体组成, 是精子与卵子经过正常受精发育而成, 而不是雌核发育等其他发育类型。

一般认为, 鱼类杂交不亲和性产生的原因在于双亲基因组间的差异, 双亲核型越相近, 杂交越可能成功, 反之胚胎发育越难正常进行^[16]。在自然状态下, 许多鱼类存在杂交现象, 李雅娟等^[6]、Ojima 等^[15]都曾发现过有少量天然三倍体泥鳅($3n=75$)的存在, 而印杰等^[11]发现少量的天然三倍体泥鳅的染色体数为 $3n=74$ 。结合本试验杂交子代的染色体组型, 可以推测 $3n=75$ 的天然三倍体应该是二倍体与四倍体泥鳅自然繁殖的结果; 而 $3n=74$ 的天然

三倍体则是四倍体泥鳅与大鳞副泥鳅自然繁殖的结果。关于二倍体、四倍体泥鳅和大鳞副泥鳅的地理分布已有很多报道^[8-11], 二倍体与四倍体泥鳅存在明显的地理种群现象, 但是在有些地区也存在两者共存情况^[17], 而泥鳅与大鳞副泥鳅则是普遍共存^[1]。根据本文杂交试验结果可知二倍体、四倍体泥鳅和大鳞副泥鳅彼此杂交可以得到正常生长的后代, 但是自然界中检测到的杂交类型个体却很少。这可能是由于染色体数目的不同, 杂交后代无法顺利完成减数分裂形成正常的配子, 从而不能进行繁殖与扩大种群数量。那么, 杂交后代性腺发育情况如何、能否进行繁殖, 则有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 陈景星. 中国花鳅亚科鱼类系统分类的研究[C]. 中国鱼类学会. 鱼类学论文集: 第 1 集. 北京: 科学出版社, 1981: 21-32.
- [2] CHEVASSUS B. Hybridization in fish [J]. Aquaculture, 1983, 33: 245-262.
- [3] 赵振山, 高贵琴, 吴清江. 两种泥鳅杂交及人工诱导大鳞副泥鳅雄核发育的染色体变化[J]. 大连水产学院学报, 2002, 17(1): 15-19.
- [4] 龙良启, 赵振山, 汤保贵, 等. 泥鳅与大鳞副泥鳅正反交子代遗传变异的 RAPD 分析[J]. 水生生物学报, 2000, 24(6): 659-662.
- [5] ARAI K. Genetics of the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*, recent progress and perspective[J]. Folia Biol-Prague, 2003, 51: 107-117.
- [6] 李雅娟, 田萍萍, 李莹, 等. 中国洪湖不同倍性泥鳅的染色体组型及形态特征比较分析[J]. 大连水产学院学报, 2009, 24(3): 236-241.
- [7] ABBAS K, LI M Y, WANG W M, et al. First record of the natural occurrence of hexaploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* in Hubei Province, China [J]. J Fish Biol, 2009, 75: 435-441.
- [8] 李康, 李渝成, 周瞰. 两种泥鳅染色体组型的比较研究[J]. 动物学研究, 1983, 4(1): 75-81.
- [9] 余先觉, 周瞰, 李渝成, 等. 中国淡水鱼类染色体[M]. 北京: 科学出版社, 1989: 104-106.
- [10] 马纲. 中国淡水鱼类染色体形态及其数目变异的研究进展[J]. 甘肃科学学报, 1996, 8(3): 77-80.
- [11] 印杰, 赵振山, 陈小奇, 等. 二倍体和四倍体泥鳅染色体组型比较[J]. 水生生物学报, 2005, 29(4): 469-472.
- [12] PARK I S, NAM Y K, KIM D S. Growth performance, morphometric traits and gonad development of induced reciprocal diploid and triploid hybrids between the mud loach (*Misgurnus mizolepis*) and cyprinid loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) [J]. Aquac Res, 2006, 37: 1246-1253.
- [13] 林义浩. 快速获得大量鱼类肾细胞中期分裂相的 PHA 体内注射法[J]. 水产学报, 1982, 6(3): 201-204.

[14] LEVAN A,FREDGA K,SANDBERG A A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes[J]. Hereditas,1964,52 (2):201-220.

[15] OJIMA Y,HAYASHI M,UENO K. Cytogenetic studies in lower vertebrates: X. Karyotype and DNA studies in 15 species of Japanese Cyprinidae[J]. Jpn J Genet,1972,47(6):431-440.

[16] 王祖雄,张锦霞,靳光琴. 鱼类杂交不亲和性的研究[J]. 水生生物学报,1986,10(2):171-179.

[17] 单磊,魏开建,张桂蓉,等. 长江中下游二倍体泥鳅 4 个种群的遗传多样性[J]. 华中农业大学学报,2009,28(4):453-458.

Comparison on karyotypes and relative DNA contents of reciprocal hybrids among diploid,tetraploid loach (*Misgurnus anguillicaudatus*), and large scale loach (*Paramisgurnus dabryanus*)

FANG Li-bao¹ ZHOU Xiao-yun¹ CUI Lei¹ YAN Li-qing² WANG Wei-min¹

1. College of Fisheries ,Huazhong Agricultural University/
Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics ,Breeding and Reproduction
of Ministry of Education ,Wuhan 430070,China;
2. Fisheries Company of Zhanghe Reservoir ,Jingmen 448156,China

Abstract Diploid (D) and tetraploid (T) loach (*M. anguillicaudatus*), large scale loach (*P. dabryanus*) (P) and their reciprocal hybrids were produced by artificial fertilization. Nine genetic crosses were made. These were ($\text{♀} \times \text{♂}$): D×D, D×T, D×P, T×D, T×T, T×P, P×D, P×T and P×P. The relative DNA contents of the progenies were examined by flow cytometry. The results showed that D×D, D×P, P×D and P×P were diploid, D×T, T×D, P×T and T×P were triploid, T×T were tetraploid. The ratio of relative DNA contents of the three types was about 2 : 3 : 4. The karyotypes of the progenies were analyzed and compared by the PHA colchicine hypotonic-air drying technique. D×D has 2n=50 chromosomes, consisting of 8 metacentrics (m), 6 submetacentrics (sm) and 36 telocentrics (t) chromosomes. P×P has 2n=48 chromosomes, consisting of 12 m, 4 sm and 32 t. Both species have a fundamental arm number (NF) of 64. T×T has 4n=100 chromosomes, consisting of 16m, 12sm, 72t, NF=128. D×P and P×D are 2n=49, 10m+5sm+34t, NF=64; D×T and T×D are 2n=75, 12m+9sm+54t, NF=96; T×P and P×T are 2n=74, 14m+8sm+52t, NF=96. By comparative analysis, the karyotypes of diploid and triploid hybrids are intermediate between the parental species, consisting of a haploid maternal set and a haploid paternal set.

Key words *Misgurnus anguillicaudatus*; *Paramisgurnus dabryanus*; hybridization; relative DNA content; karyotype

(责任编辑:边书京)