

厚颌鲂核型分析与 DNA 含量的测定

易少奎 张新辉 杨 坤 高泽霞 王卫民

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/农业部淡水生物繁育重点实验室, 武汉 430070

摘要 为了解厚颌鲂(*Megalobrama pellegrini*)的细胞遗传学特征,分析了厚颌鲂的染色体核型并对其进行 DNA 含量进行了测定。采用 PHA 和秋水仙素活体注射、肾细胞短期培养和空气干燥制片法,经 Giemsa 染色,对厚颌鲂染色体数目和核型进行研究,结果表明:厚颌鲂 $2n = 48$,染色体核型公式为 $24 m + 20 sm + 4 st$,臂数 $NF = 92$,具有 1 对特大染色体,未发现性染色体。以厚颌鲂外周血细胞为样本,鸡血细胞 DNA 为标准(2.30 pg),使用流式细胞仪测定了厚颌鲂二倍体细胞的 DNA 含量,厚颌鲂 DNA 含量为鸡血的 1.23 倍,绝对含量为 2.82 pg。

关键词 厚颌鲂; 染色体; 核型; DNA 含量

中图分类号 S 917 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2014)01-0080-05

厚颌鲂(*Megalobrama pellegrini*)隶属于鲤科(Cyprinidae)鲃亚科(Cultrinae)鲂属(*Megalobrama*)。曾一度被当作三角鲂(*Megalobrama tarminalis*)的同种异名,1930年,罗云林首次对厚颌鲂进行了性状差异分析,确定为有效种^[1]。厚颌鲂分布仅限于长江上游地区,由于长江上游的水利建设导致环境急剧变迁,加之存在较大的捕捞压力,其分布范围和种群规模已经呈明显的下降趋势^[2],属于长江上游急切保护鱼类,研究和保护工作迫在眉睫^[3-4]。

厚颌鲂作为鲂属中唯一分布于长江上游地区的物种,其研究主要涉及个体生物学、种群生物学、遗传标记、毒理等方面^[5-8],还未见对其染色体及 DNA 含量进行研究的报道。染色体是生物遗传物质的主要载体,其数目和形态不仅具有种的特征,且能反映出生物进化的历史^[9]。核型(karyotype)是指生物染色体的数目、大小和形态特征的总和,是细胞遗传学的研究基础。研究鱼类染色体核型对了解鱼类的遗传组成、遗传变异、系统演化、发育机制等具有重要意义,同时还对预测种间杂交和多倍体育种结果的鉴定等问题都具有重要的意义^[10]。脱氧核糖核酸(DNA)是绝大多数生物的遗传物质,细胞核中所含的 DNA 总量对于物种是一定的。生物 DNA 含

量的研究不仅是研究物种间差别的重要方法,而且对分类和系统演化的探讨、物种进化研究等具有参考意义^[11]。笔者对厚颌鲂的染色体核型与 DNA 含量进行分析,旨在了解其细胞遗传特性,为厚颌鲂的遗传育种研究和资源保护积累基础资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试厚颌鲂于 2011 年 9 月采自四川省泸州市龙溪河,暂养于湖北省鄂州市团头鲂原种场,共 12 尾,雌雄各半,体质量为 150~300 g。

1.2 厚颌鲂核型分析

厚颌鲂肾细胞染色体标本的制备参照林义浩的植物血球凝集素(PHA)体内注射法^[12]。按照 11 $\mu\text{g/g}$ (鱼体质量)的剂量腹腔注射 PHA,4 h 后再按照 8 $\mu\text{g/g}$ 剂量注射秋水仙素,2 h 后剪鳃及断尾放血,15 min 后解剖鱼体取肾脏组织进行试验。染色体玻片制备的具体步骤参考杨坤等^[13]的制备方法。

将制备好的染色体玻片用 10% Giemsa 染液染色 13 min,最后用双蒸水缓缓冲洗,待玻片干燥后在显微镜下选取 100 个分散良好、形态清晰、数目完整的中期分裂相,用 Adobe Photoshop 12.1 软件系统手工统计每个分裂相的染色体数目,找出出现频

收稿日期: 2012-03-27

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-46-05)和中央高校基本科研业务费专项(2011PY023)

易少奎,硕士研究生,研究方向: 鱼类遗传与育种。E-mail: yishaokui@foxmail.com

通信作者: 王卫民,教授,研究方向: 鱼类遗传与育种。E-mail: wangwm@mail.hzau.edu.cn

率最高的染色体数目,并确定其为该地区厚颌鲂的染色体数目,然后选取 10 个数目完整的最佳中期分裂相显微拍照、放大,进行染色体绝对长度及长臂与短臂长度的测量,再计算出染色体的平均相对长度和臂比,确定染色体的着丝粒位置,按 Levan 等^[14]的标准测量染色体的有关参数,配组分析。

1.3 厚颌鲂 DNA 含量测定

用浸有肝素钠的 1 mL 一次性注射器在厚颌鲂尾静脉采血 0.2~0.5 mL,然后加入到含有 1.5 mL 磷酸缓冲液(PBS)的 EP 管中。选择国际上通用的鸡血细胞 DNA 绝对含量(2.30 pg)作对照进行检测,相同方法采集公鸡血液后,将厚颌鲂血样与公鸡血样同时加入 3 mL 样品杯中,再用 DAPI 染液进行染色,三者体积比为 1 : 1 : 2,4 ℃ 下避光染色 5 min,用流式细胞仪(Cell Lab Quanta SC Analysis,美国贝克曼库尔特公司)进行检测。

厚颌鲂 DNA 含量依照以下公式计算:

$$P_1 = E_2 / E_1 \times P_2$$

式中: P_1 表示厚颌鲂血细胞的 DNA 含量,pg; P_2 表示对照鸡血细胞 DNA 含量,pg; E_1 表示鸡血细胞消光值; E_2 表示厚颌鲂血细胞消光值。

2 结果与分析

2.1 厚颌鲂染色体数目

在显微镜油镜下选取 100 个染色体中期分裂相,进行染色体计数,其计数结果见表 1。由表 1 可以看出,在 100 个中期分裂相中,厚颌鲂染色体数为 48 的细胞有 66 个,占观察细胞总数的 66%,其

表 1 厚颌鲂细胞染色体出现频率

Table 1 The occurrence frequency of chromosome number in the cell of *M. pellegrini*

染色体数目 No. of chromosomes	细胞数目 No. of cells	出现频率/% Occurrence frequency
<42	11	11
42	3	3
43	2	2
44	3	3
45	2	2
46	3	3
47	3	3
48	66	66
49	1	1
50	2	2
51	2	2
52	2	2
合计 Total	100	100

余染色体数目的细胞数所占比例均小于 5%。因此,可以确定厚颌鲂为二倍体鱼类,体细胞染色体数目为 $2n=48$ 。此外,未观察到次缢痕及性染色体,亦未发现随体。厚颌鲂的染色体中期分裂相图片见图 1。

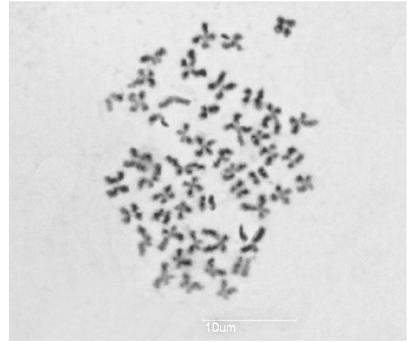


图 1 厚颌鲂肾细胞中期分裂相

Fig. 1 metaphase chromosome of kidney cell of *Megalobrama pellegrini*

2.2 厚颌鲂染色体核型分析

选取 8 个染色体数目完整、形态清晰的中期分裂相染色体拍照放大,测定染色体长、短臂长度,然后计算染色体的相对长度、臂比和着丝粒指数,并进行统计分析。得到厚颌鲂的染色体核型指数(表 2)。根据表 2 的结果,可将厚颌鲂二倍体细胞的 48 条染色体配成 24 对,根据 Levan 等^[14]按照着丝粒的位置进行染色体命名和分类的原则,可将这 24 对染色体分为 3 组。其中中部着丝粒染色体(m)为 12 对,亚中部着丝粒染色体(sm)为 10 对,亚端部着丝粒染色体(st)为 2 对,未发现有端部着丝粒染色体(t),具有 1 对特大染色体位于 sm 组,没有发现与性别有关的异型染色体,也没有发现有次缢痕及随体等标志性特征。因此厚颌鲂核型公式为 $24 m+20 sm+4 st$,染色体臂数(NF)为 92,厚颌鲂的染色体核型见图 2。根据统计结果计算出厚颌鲂染色体相对长度,并作出核型模式图,见图 3。



图 2 厚颌鲂染色体核型

Fig. 2 The karyotype of *M. pellegrini*

表 2 厚颌鲂肾细胞中各染色体对的相对长度、臂比、着丝点指数及其分类类型¹⁾Table 2 Relative length, arm ratio, centromeric index and classified types of each chromosome pair in kidney cells of *M. pellegrini*

染色体序号 Chromosome No.	臂比 Arm ratio ($M \pm S_D$)	相对长度/% Relative length ($M \pm S_D$)	着丝点指数 Centromeric index ($M \pm S_D$)	类型 Types
1	1.31±0.11	5.80±0.28	43.42±2.30	m
2	1.18±0.14	4.78±0.33	45.96±1.40	m
3	1.44±0.18	4.50±0.65	41.09±1.27	m
4	1.44±0.16	4.32±0.25	41.06±2.56	m
5	1.35±0.15	4.16±0.34	42.80±2.80	m
6	1.31±0.13	4.14±0.39	43.29±1.46	m
7	1.06±0.23	3.94±0.22	48.70±1.58	m
8	1.18±0.17	3.92±0.49	45.94±2.26	m
9	1.58±0.19	3.80±0.34	38.78±1.12	m
10	1.33±0.13	3.50±0.32	41.41±2.51	m
11	1.28±0.20	3.12±0.36	44.32±1.66	m
12	1.35±0.18	2.88±0.26	42.55±1.13	m
13	2.54±0.15	6.62±0.21	28.03±1.82	sm
14	2.20±0.21	5.60±0.33	31.28±0.88	sm
15	1.82±0.11	3.02±0.54	35.89±1.18	sm
16	1.92±0.12	3.92±0.30	34.22±0.45	sm
17	1.85±0.12	3.78±0.28	35.17±1.56	sm
18	2.03±0.13	3.78±0.39	32.70±1.60	sm
19	1.81±0.14	3.70±0.20	35.86±2.04	sm
20	2.53±0.16	3.60±0.25	28.38±1.34	sm
21	2.45±0.13	3.39±0.28	29.07±2.28	sm
22	2.43±0.20	3.25±0.34	29.27±1.65	sm
23	3.48±0.15	4.55±0.30	22.36±1.50	st
24	3.17±0.13	4.04±0.32	24.05±1.44	st

1) M : 平均数 Mean value; S_D : 标准差 Standard deviation.

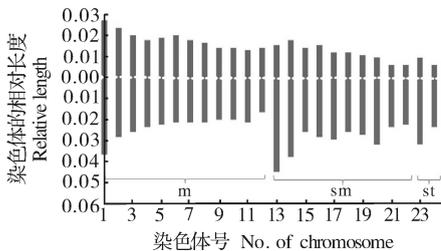
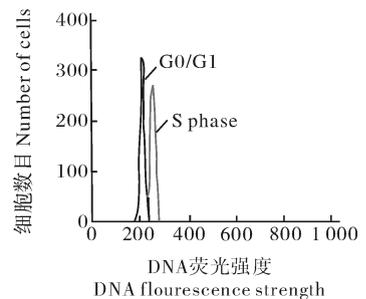


图 3 厚颌鲂核型模式图

Fig. 3 Ideogram of *M. pellegrini*

2.3 厚颌鲂的 DNA 含量测定

用公鸡血细胞作为参照,对 6 尾厚颌鲂(雌雄各半)外周血红细胞 DNA 含量进行测定,结果如下:公鸡血细胞荧光峰值为 199.7,厚颌鲂血细胞荧光峰值为 245.3,二者血细胞荧光峰值比值为 1.23。以公鸡血细胞 DNA 绝对含量值 2.30 pg 作为标准,计算出厚颌鲂血细胞 DNA 绝对含量为 2.82 ± 0.07 pg ($M \pm S_D$)。厚颌鲂血细胞荧光密度峰型见图 4。



G0/G1 表示公鸡血细胞 DNA 含量 G0/G1 represents DNA content of chicken erythrocyte nucleus; S phase 表示厚颌鲂血细胞 DNA 含量 S phase represents DNA content of *M. pellegrini* erythrocyte nucleus.

图 4 厚颌鲂与鸡血细胞 DNA 含量对照直方图

Fig. 4 DNA histogram of erythrocytes of *M. pellegrini*

3 讨论

3.1 厚颌鲂核型分析

我国对鱼类染色体的研究始于 20 世纪 70 年

代,据余先觉等^[10]报道,我国已有 200 多种鱼类染色体被研究过。关于鲂属鱼类的染色体研究始于 1975 年,国内学者^[15]最早对团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)的染色体进行了研究,得出团头鲂染色体数目为 $2n=52$ 。1979 年,咎瑞光等^[16]分析了团头鲂的染色体组型,得出团头鲂染色体数目为 $2n=48$,核型公式为 $20m+24sm+2st$ 。随后,国内学者对团头鲂染色体的研究越来越广泛^[17-19],在这些研究结果中,染色体数目都为 $2n=48$,但其核型公式和臂数却不尽相同。朱新平等^[20]报道了广东鲂的染色体数目为 $2n=48$, $NF=88$,核型公式为 $26m+18sm+4st$ 。刘思阳^[21]运用空气干燥法对三角鲂染色体组型进行了研究,结果为 $2n=48$,核型公式为 $18m+22sm+8st$ 。厚颌鲂染色体组型的研究还未见报道。

本研究得出厚颌鲂为二倍体鱼类,染色体数目为 $2n=48$,核型公式为 $24m+20sm+4st$,臂数 $NF=92$,未发现与性别有关的染色体。厚颌鲂染色体数目与鲂属其他鱼类的染色体数目一致,染色体配组与染色体臂数与鲂属其他鱼类存在差异,可能是由于厚颌鲂为长江上游特有鱼类,其生活的地理位置与鲂属其他鱼类不同,造成了这种差异。这一结果与徐革峰等^[22]对细鳞鱼研究时不同的地理环境鱼类的染色体组型存在多态性的结论相符。同时,各研究者对鲂属鱼类的核型分析实验中可能由于所使用的方法、仪器不同,测量染色体的时相不一致,以及测量和配组误差而造成鲂属鱼类核型的差异性。国内学者研究发现团头鲂^[18]、广东鲂(*Megalobrama hoffmanni*)^[20]、三角鲂^[21]均具有 1 对特大染色体位于 sm 组,在本研究中,厚颌鲂也具有 1 对特大染色体位于 sm 组,这之前鲂属其他鱼类的研究结果是一致的。

鱼类染色体与进化存在密切的联系,小岛吉雄^[23]在研究鱼类染色体时,曾将真骨鱼类划分为低位类、中位类和高位类 3 个演化类群,并探讨了鱼类的进化与染色体的关系,根据现代鱼类演化的理论:在进化上越是处于上位的鱼类,其染色体越收敛,端部着丝粒染色体多,染色体臂数少。而从本研究结果看,厚颌鲂染色体核型中没有发现端部着丝粒染色体,大部分染色体为中部着丝粒与亚中部着丝粒染色体,可认为厚颌鲂在鱼类系统进化上属于低位类鱼类。

3.2 厚颌鲂的 DNA 含量

流式细胞仪测定鱼类细胞 DNA 含量的方法始于 20 世纪 70 年代,流式细胞仪技术较显微分光光度技术具有操作方便、快速以及测量结果准确、客观的优点,目前已广泛运用于鱼类、虾类等 DNA 含量和倍性检测^[13]。同一种鱼类的 DNA 含量是恒定的,具有种的特异性,可作为一个物种种质的特征性参数^[24],而目前还未见厚颌鲂 DNA 含量的研究报道。

本试验运用流式细胞仪,以鸡血(DNA 含量为 2.30 pg)作为参照,测定了厚颌鲂血细胞核的 DNA 含量为 2.82 pg,稍高于团头鲂^[18] DNA 含量(2.65 ± 0.06 pg),但明显高于同科具有相同染色体数目的草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)(2.18 ± 0.07 pg)、鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)(2.18 ± 0.07 pg)、鳊(*Aristichthys nobilis*)(2.15 ± 0.07 pg)以及青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)(2.20 ± 0.07 pg)^[24]的 DNA 含量。厚颌鲂与团头鲂为同属鱼类,在进化过程中进化方式较为相似,血缘关系较近,DNA 含量的较小差异可能是种间差异的体现。而厚颌鲂与草鱼、鲢、鳊以及青鱼为不同属鱼类,血缘关系较远,因而 DNA 含量差异较大。

参 考 文 献

- [1] 罗云林. 鲂属鱼类的分类整理[J]. 水生生物学报, 1990, 14(2): 160-165.
- [2] 李文静, 王剑伟, 谢从新, 等. 厚颌鲂的繁殖生物学特征[J]. 生态学报, 2007, 27(5): 1918-1924.
- [3] 高欣, 谭德清, 刘焕章, 等. 长江上游龙溪河厚颌鲂种群资源的利用现状和保护[J]. 四川动物, 2009, 28(3): 323-333.
- [4] 刘军. 长江上游特有鱼类受威胁及优先保护顺序的定量分析[J]. 中国环境科学, 2004, 24(4): 395-399.
- [5] 王剑伟, 谭德清, 李文静. 厚颌鲂人工繁殖初报及胚胎发育观察[J]. 水生生物学报, 2005, 29(2): 130-136.
- [6] 李文静. 厚颌鲂的个体生物学与种群生态研究[D]. 武汉: 华中农业大学图书馆, 2006.
- [7] WANG J J, YU X M, ZHAO K, et al. Microsatellite development for an endangered bream *Megalobrama pellegrini* (Teleostei, Cyprinidae) using 454 sequencing[J]. Int J Mol, 2012, 13: 3009-3021.
- [8] 李代金, 黄辉, 谭德清. 6 种常用渔药对厚颌鲂鱼苗的急性毒性试验[J]. 水生态学杂志, 2009, 2(6): 25-29.
- [9] 牛文涛, 蔡泽平. 中国海水鱼类核型研究概述[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2006, 45(2): 125-131.
- [10] 余先觉, 周敏, 李康, 等. 中国淡水鱼类染色体[M]. 北京: 科学出版社, 1989.

- [11] 李渝成, 李康, 周敦. 十四种淡水鱼的 DNA 含量[J]. 遗传学报, 1983, 10(5): 384-389.
- [12] 林义浩. 快速获得大量鱼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.
- [13] 杨坤, 王子健, 祝冬梅, 等. 麦穗鱼的组型分析和 DNA 含量测定[J]. 华中农业大学学报, 2012, 31(3): 371-375.
- [14] LEVAN A, FREDGA K, SANDBERG A A. Nomenclature for centromeric position on chromosome [J]. Hereditas, 1964, 52(2): 201-220.
- [15] 长江水产研究所育种室, 武汉大学生物系动物教研室. 几种经济鱼类及其杂种染色体的初步研究[J]. 淡水渔业, 1975(2): 11-13.
- [16] 管瑞光, 宋峥. 草鱼、团头鲂染色体组型的分析比较[J]. 遗传学报, 1979, 6(2): 205-209.
- [17] 宗琴仙, 柯鸿文, 郝思平, 等. 五种水体团头鲂的染色体数目、组型以及电泳分析[J]. 水产科技情报, 1987(3): 1-4.
- [18] 尹洪滨, 范兆廷, 孙中武, 等. 团头鲂核型与 DNA 含量分析研究[J]. 水产学杂志, 1981, 8(1): 22-26.
- [19] 欧阳敏. 鄱阳湖团头鲂染色体组型研究[J]. 江西农业学报, 2000, 12(2): 61-64.
- [20] 朱新平, 林礼堂, 夏仕玲. 广东鲂染色体组型的研究[J]. 淡水渔业, 1990(5): 12-13.
- [21] 刘思阳. 三倍体草鲂杂种及其双亲的细胞遗传学研究[J]. 水生生物学报, 1987, 11(1): 52-57.
- [22] 徐革锋, 牟振波, 薛淑群, 等. 不同流域细鳞鱼染色体遗传多态性分析[J]. 水生生物学报, 2009, 33(5): 975-979.
- [23] 小岛吉雄. 鱼类细胞遗传学[M]. 林义浩, 译. 广州: 广东科学技术出版社, 1991: 8-33.
- [24] 范兆廷, 尹洪滨, 宋苏祥. 十三种淡水养殖鱼类的 DNA 含量[J]. 水产学报, 1995, 19(4): 322-325.

Karyotype and cellular DNA content analysis of *Megalobrama pellegrini*

YI Shao-kui ZHANG Xin-hui YANG Kun GAO Ze-xia WANG Wei-min

College of Fisheries, Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Ministry of Education/Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract In order to investigate the cytogenetic characters of *Megalobrama pellegrini*, the karyotype and DNA content were studied in the present study. The chromosome number and karyotype were analyzed by a routine method including intraperitoneal injection of PHA and colchicine, cultivation *in vivo*, and slides preparation with air-drying and Giemsa staining. The results showed that *M. pellegrini* had a chromosome number of 48 ($2n=48$), with a large and long chromosome pair and no heterosome, and the karyotype was $2n=24m+20sm+4st$, $NF=92$. Erythrocyte nuclear DNA content of *M. pellegrini* was determined by flow cytometry using the chicken erythrocytes (DNA content is 2.30 pg) as a standard. The DNA content of *M. pellegrini* is 2.82 pg and the ratio of DNA content between *M. pellegrini* and chicken is 1.23.

Key words *Megalobrama pellegrini*; chromosome; karyotype; DNA content

(责任编辑:边书京)