

梁子湖中华沙塘鳢染色体核型和核 DNA 含量

许红霞¹ 杨学芬^{1,2} 杨瑞斌^{1,2}

1. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070; 2. 淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心, 武汉 430070

摘要 为了丰富中华沙塘鳢的细胞遗传学内容,并为中华沙塘鳢的种质鉴定、育种及沙塘鳢科的进化研究提供基础资料,采用 PHA-秋水仙素体内注射法、空气干燥法及 Giemsa 染色等方法分析中华沙塘鳢模式种产地梁子湖的中华沙塘鳢的染色体数目、核型、染色体臂数等;以国际通用的公鸡血细胞核 DNA 绝对含量(2.50 pg/2C)为参照标准,利用流式细胞仪测定中华沙塘鳢血细胞核 DNA 含量。结果表明:梁子湖中华沙塘鳢的染色体数目 $2n=44$,核型为 44T,染色体臂数 $NF=44$ 。染色体相对长度 3.332%~5.914%。未见与性别有关的异型染色体,也没有观察到随体或次缢痕。中华沙塘鳢的核 DNA 绝对含量为 2.38 pg/2C,基因组大小为 1.17×10^9 bp。

关键词 梁子湖; 中华沙塘鳢; 核型; 核 DNA 含量; 进化

中图分类号 Q 959.483 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)01-0093-05

染色体核型是指一种生物的染色体数目、大小及形态等特征的总和。核型分析是染色体研究的基本方法,有助于了解生物的遗传组成及发育机制,对物种鉴定和多倍体育种有重要意义^[1]。鱼类染色体标本的制备方法主要有头肾-PHA 注射法、小鱼游泳法、外周血培养法、细胞培养法、组织浸泡法、头肾-PHA 注射-淋巴细胞富集法等,其中,头肾-PHA 注射法由于操作简单,实验周期短,在鱼类染色体标本制备中广泛应用。

多数生物以 DNA 作为遗传物质,物种的一个细胞核 DNA 含量是一定的,可以反映生物基因组的大小、非编码区的相对比例等^[2],为种质鉴定提供参考依据,丰富物种的细胞遗传学数据,对于系统分类和物种进化等也具有一定的参考价值。目前测定核 DNA 含量的方法有福尔根-显像密度计法、福尔根-图像分析法、荧光定量分析、流式细胞术法(FCM)等,但是,由于流式细胞术法具有准确、快速、敏感性高、采集数据量大、分析全面和操作简单等优点,现已成为测定 DNA 含量的一种重要手段。在流式细胞术法中比较常见的参照标准有人淋巴细胞和鸡、鳖、鲟及鲑的红细胞。其中,由于鸡红细胞具有来源丰富、着色性好、大小均匀等优点,在 DNA

含量测定中被广泛采用。

沙塘鳢属(*Odontobutis*)是一类小型淡水底栖鱼类,形态差异非常小,主要分布在长江、珠江、鸭绿江、辽河及海南岛等地。伍汉霖^[3]根据梁子湖沙塘鳢头部没有感觉管孔 C 的鉴别特征,将其定名为中华沙塘鳢(*Odontobutis sinensis*)。中华沙塘鳢又称沙乌鳢、蒲鱼、土布鱼、虎头鱼等,广泛分布于长江中、上游的江西、湖南、湖北及珠江水系的广东、广西和海南岛等地。多栖息在湖泊、河沟的静水区或近岸浅水区,以小鱼、小虾为主要食物。中华沙塘鳢肉质细嫩、味道鲜美,是一种上品鱼类。目前,有关中华沙塘鳢的研究主要有生物学特性^[3]、胚胎发育^[4-5]、线粒体^[6-7]、微卫星^[8]等,核型方面的研究仅见洞庭湖水域^[9]。本文采用头肾-PHA 体内注射法和流式细胞术法研究梁子湖中华沙塘鳢的染色体核型和核 DNA 含量,旨在丰富中华沙塘鳢的细胞遗传学内容,为中华沙塘鳢的种质鉴定、育种及沙塘鳢科的进化研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

中华沙塘鳢于 2015 年 4 月采自湖北省鄂州梁

收稿日期: 2016-04-22

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201403012)

许红霞, 硕士研究生。研究方向: 鱼类遗传育种。E-mail: xuhx2546268807@163.com

通信作者: 杨瑞斌, 博士, 副教授。研究方向: 水产健康养殖。E-mail: rbyang@mail.hzau.edu.cn

子湖, 试验前先暂养于华中农业大学南湖基地。共检测 18 尾(8♀, 10♂), 体质量 16.77~34.73 g, 体长 8.95~11.20 cm。水温 23~25 ℃。

1.2 核型分析

参考林义浩^[10]的头肾-PHA 体内注射法并稍作修改。自中华沙塘鳢的腹腔注射 PHA(惠州鸿雨科技有限公司, 10 mg/瓶) 20 μg/g, 12 h 后注射秋水仙素(Biosharp, 100 mg/瓶) 10 μg/g; 5 h 后取头肾制备肾细胞悬液。1 000 r/min 离心 7 min, 弃上清液并收集细胞; 加入 0.075 mol/L KCl 低渗液, 37 ℃水浴 60 min; 新配制的卡诺氏固定液预固定, 混匀后离心并收集细胞; 冰上固定 3 次, 每次 30 min; 冰冻滴片, 空气干燥, 10% Giemsa 染色 7 min, 镜检、拍照。

用 Adobe Photoshop CS 5 软件统计 128 个分散良好、形态清晰的中期分裂相的染色体数目, 确定染色体众数, 即为梁子湖中华沙塘鳢的染色体数目。再选取 7 个染色体数目完全、轮廓清晰且分散良好的中期分裂相, 参考 Levan 等^[11]的染色体分类标准进行中华沙塘鳢的同源染色体配对。实验数据用 Excel 和 SPSS 17.0 进行统计分析。

1.3 DNA 含量测定

将 1 mL 一次性注射器用 1% 的肝素钠充分润洗后于中华沙塘鳢(3♀, 7♂)尾静脉采血 0.2 mL, 加入 1.5 mL 磷酸盐缓冲液。以国际上通用的公鸡血细胞 DNA 绝对含量(2.50 pg/2C)^[12]为参照标准, 用相同方法采集公鸡血液。外标法。在避光条件下用 DAPI 染液(美国贝克曼库尔特公司)按 $V_{\text{鱼血}}/V_{\text{公鸡血}}:V_{\text{染液}}=1:1$, 染色 5 min 后, 流式细胞仪(美国贝克曼库尔特公司)检测。中华沙塘鳢的血细胞核 DNA 绝对含量的计算参考易少奎等^[13]的方法。

2 结果与分析

2.1 中华沙塘鳢的染色体核型

统计 128 个图像清晰、分散状态良好的染色体中期分裂相(表 1)。结果表明: 梁子湖中华沙塘鳢为二倍体鱼类, 染色体数目 $2n=44$ 的细胞占 61.72%, 因此, 中华沙塘鳢的染色体数目 $2n=44$ 。未见与性别有关的异型染色体, 也没有观察到随体或次缢痕。根据染色体相对长度和臂比的分析测量结果(表 2), 梁子湖中华沙塘鳢的 44 条染色体可配

表 1 梁子湖中华沙塘鳢的染色体数目分布

Table 1 Distribution of chromosome numbers of *O. sinensis* in Liangzi Lake

染色体数目 No. of chromosomes	<40	40	41	42	43	44	45
细胞数 No. of cells	8	4	8	13	15	79	1
出现频率/% Occurrence frequency	6.25	3.13	6.25	10.16	11.72	61.72	0.78

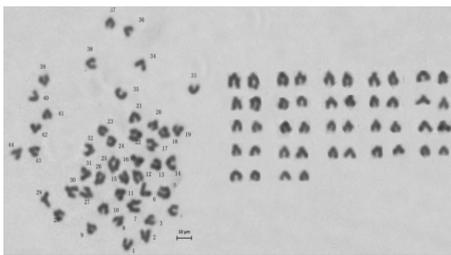


图 1 梁子湖中华沙塘鳢的染色体中期分裂相及染色体核型

Fig.1 The metaphase chromosome and karyotype of *O. sinensis* in Liangzi Lake

成 22 对, 均为端部着丝粒染色体(T), 核型公式为 $2n=44T$ (图 1), 染色体臂数 $NF=44$ 。

2.2 中华沙塘鳢血细胞核 DNA 含量

采用外标法, 并以公鸡血细胞 DNA 绝对含量(2.50 pg/2C)为参照标准, 用流式细胞仪检测 10 尾

(3♀, 7♂)中华沙塘鳢的血细胞核 DNA 含量(图 2)。统计结果显示, 个体之间的 DNA 含量无显著差异($P>0.05$); 梁子湖中华沙塘鳢的血细胞核 DNA 绝对含量为 (2.38 ± 0.03) pg/2C; 根据公式: 基因组大小(bp) = 单倍体 DNA 含量(pg) $\times 0.978 \times 10^9$, 得出中华沙塘鳢基因组大小为 1.17×10^9 bp。

3 讨论

3.1 中华沙塘鳢的染色体核型

梁子湖中华沙塘鳢的染色体数目与洞庭湖中华沙塘鳢及沙塘鳢属其他种完全相同, 但核型和洞庭湖水系的中华沙塘鳢不同, 与沙塘鳢属其他种也有差异(表 3)。

不同学者对同一物种的核型分析产生不同的结果可能是由于: (1)染色体自身的多态性^[15], 种间甚

表 2 梁子湖中华沙塘鳢染色体核型数据(平均值±标准差)

Table 2 The karyotype data of the chromosome pairs of *O. sinensis* in Liangzi Lake (Mean ± SD)

染色体序号 Chromosome No.	相对长度/% Relative length	臂比 Arm ratio	染色体类型 Classification of chromosome
1	5.914 ± 0.405	∞	T
2	5.707 ± 0.371	∞	T
3	5.409 ± 0.213	∞	T
4	5.196 ± 0.162	∞	T
5	5.000 ± 0.109	∞	T
6	4.887 ± 0.076	∞	T
7	4.800 ± 0.053	∞	T
8	4.704 ± 0.067	∞	T
9	4.630 ± 0.063	∞	T
10	4.593 ± 0.064	∞	T
11	4.541 ± 0.053	∞	T
12	4.493 ± 0.058	∞	T
13	4.434 ± 0.078	∞	T
14	4.363 ± 0.100	∞	T
15	4.259 ± 0.103	∞	T
16	4.186 ± 0.121	∞	T
17	4.141 ± 0.122	∞	T
18	4.033 ± 0.128	∞	T
19	3.911 ± 0.160	∞	T
20	3.735 ± 0.214	∞	T
21	3.554 ± 0.198	∞	T
22	3.332 ± 0.239	∞	T

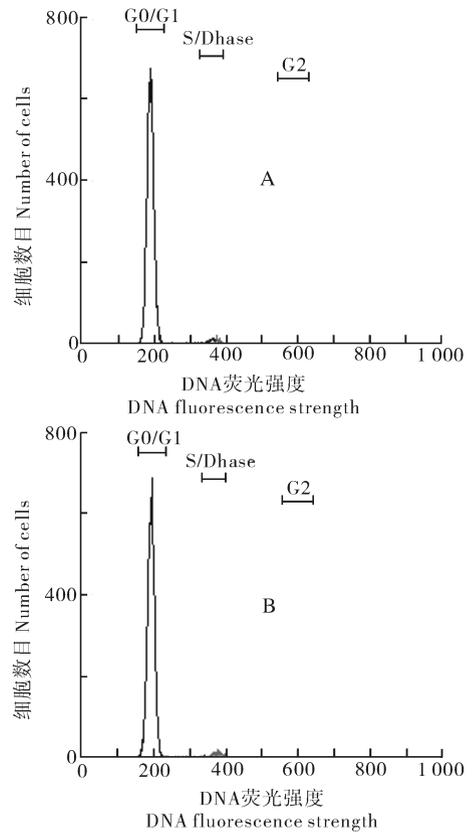


图 2 中华沙塘鳢血细胞 DNA 直方图(A)和 公鸡血细胞标准 DNA 直方图(B)

Fig.2 DNA histogram of erythrocytes of *O. sinensis* (A) and erythrocytes of *Gallus* sp.(B)

表 3 沙塘鳢属鱼类的染色体核型比较

Table 3 Karyotypes of *Odontobutis* fishes

序号 No.	物种 Species	染色体数目 No.of chromosomes	核型 Chromosome formula	臂数 NF	参考文献 References
1	中华沙塘鳢 <i>Odontobutis sinensis</i>	44	44t	44	本文 This study
		44	8st+36t	44	[9]
2	沙塘鳢 <i>O. obscura</i>	44	44t	44	[14]
		44	4sm+40t	48	[15]
3	鸭绿沙塘鳢 <i>O. yaluensis</i>	44	8st+36t	44	[16]
		44	2st+42t	44	[17]
4	河川沙塘鳢 <i>O. potamophila</i>	44	2st+42t	44	[17]
		44	44t	44	[18]

至是同种的不同地理群体之间的核型分化的根本原因可能是由于地理环境的差异,染色体出现多倍化或罗伯逊易位,造成染色体数目不同,产生了生殖隔离,形成了在形态结构上难以辨别的孟德尔式群体^[19]。洞庭湖水系中华沙塘鳢的第一背鳍棘数(全为Ⅶ)与伍汉霖等^[3]描述的梁子湖中华沙塘鳢(多

为Ⅵ,鲜有Ⅶ)明显不同。至于梁子湖和洞庭湖的中华沙塘鳢是否由于地理环境的差异而导致 2 个地理群体核型及形态的差异进而产生孟德尔式群体甚至是已经分化成不同的种,还有待进一步研究。(2)测量误差,不同学者在测量分析时所选择的分裂相可能并不都是正中后期,而相邻 2 条染色体的形态特征

差异较小,导致难以对其进行精确划分^[14]。多数鱼类的染色体数目多且较小,仅仅根据目前采用的 Levan 等^[11]的染色体分类标准,无法满足鱼类染色体分类的需要,因此,目前迫切需要制定一种适合鱼类染色体分类的更细致的通用标准,建议在进行同源染色体配对时引进更多的参数,如银染、C-带、G-带等带纹特征,从而使染色体核型更能体现物种自身的特点,以便不同水系的地理隔离所产生的染色体多态性的分析结果具有横向比较的意义。

3.2 中华沙塘鳢染色体核型在探讨鰕虎鱼亚目鱼类进化中的应用

鲈形目是鱼类中最大的目,而中华沙塘鳢所属的鰕虎鱼亚目是鲈形目中最大的亚目。巨大的物种数目以及为了适应多样化的栖息环境而产生的形态分化导致鰕虎鱼的分类一直是一个难以攻克的难题^[20]。本文结合梁子湖中华沙塘鳢的染色体核型以及其他学者^[21-23]有关鰕虎鱼亚目鱼类的染色体核型研究结果,从染色体水平探讨了鰕虎鱼亚目鱼类的系统演化。这些核型数据的分析结果表明,该类群的染色体数目(30~56)、类型(m, sm, st, t/a)和臂数(38~98)变化较大,说明鰕虎鱼亚目在进化过程中变异较多、分化活跃,这与鰕虎鱼的分布范围广泛、种类繁多、适应能力强的特性是一致的。

染色体核型表现出随着生物特化程度的上升而染色体臂数(NF)增加的进化趋势。为使 NF 值具有可比性并消除染色体数目(2n)的影响,余祥勇等^[24]提出了新的参数 NF/2n,随着鱼类特化程度的上升,NF/2n 值也出现上升的进化趋势。根据现有的鰕虎鱼亚目鱼类的染色体核型数据^[21-23]计算得到其中 4 科的平均 NF/2n 大小顺序是:带鰕虎鱼科(Microdesmidae)(1.00) < 沙塘鳢科(Odontobutidae)(1.11) < 塘鳢科(Eleotridae)(1.24) < 鰕虎鱼科(Gobiidae)(1.36)。据此推测,带鰕虎鱼科的进化地位在这 4 科中最低,其次是沙塘鳢科和塘鳢科,鰕虎鱼科的进化地位最高。这与 Thacker 等^[25]根据 ND1、ND2、CO I 和 *cyt b* 基因分析沙塘鳢科、塘鳢科及鰕虎鱼科之间的系统发育关系所得的结果一致。

3.3 中华沙塘鳢血细胞核 DNA 含量

本文以国际公认的公鸡血细胞核 DNA 绝对含量(2.50 pg/2C)为标准并以流式细胞术法测得的梁子湖中华沙塘鳢的血细胞核 DNA 绝对含量((2.38±0.03)pg/2C)和 Cui 等^[26]以相同参照标准

并以福尔根-显像密度计法测得的采自武汉的沙塘鳢(*O. obscura*)的 DNA 含量((2.54±0.20)pg/2C)有一定的差别。这是由于 Cui 等^[26]所用的 DNA 含量的测定方法与本试验完全不同。本文采用目前测定 DNA 含量的主要手段——流式细胞术法^[27],每条鱼检测的细胞数超过 600 个,一共检测了 10 尾鱼,且个体之间无显著差异($P > 0.05$)。中华沙塘鳢血细胞核 DNA 含量的确定为鰕虎鱼亚目鱼类的系统演化及亲缘关系的鉴定等提供了基础资料。

参 考 文 献

- [1] 李岑,毛欢欢,姜玉声,等.泰国斗鱼的染色体组型分析[J].大连海洋大学学报,2013,6(6):553-556.
- [2] 童金苟,俞小牧,张菁,等.稀有鮡鲫与其他模式实验鱼类基因组大小的比较[J].水生生物学报,2003,27(2):208-210.
- [3] 伍汉霖,陈义雄,庄捷华.中国沙塘鳢属(*Odontobutis*)鱼类之一新种(鲈形目:沙塘鳢科)[J].上海海洋大学学报,2002,11(1):6-13.
- [4] 郝天和.梁子湖沙塘鳢的生态研究[J].水生生物学报,1960(2):145-158.
- [5] 曹晋飞.梁子湖中华沙塘鳢年龄生长、胚胎发育和消化道组织学的研究[D].武汉:华中农业大学,2014.
- [6] 任岗,章群.中国沙塘鳢属鱼类线粒体 12S rRNA 基因序列分析[J].水生生物学报,2007,31(4):473-478.
- [7] MA Z H, YANG X F, ZHANG X J, et al. Organization of the mitochondrial genome of *Odontobutis sinensis* (Perciformes: Odontobutidae): rearrangement of tRNAs and additional non-coding regions [J]. Mitochondrial DNA, 2013; 327-328.
- [8] 邱平.中华沙塘鳢微卫星标记的开发及三个野生群体的遗传多样性分析[D].武汉:华中农业大学,2015.
- [9] 刘良国,杨春英,杨品红,等.洞庭湖水系中华沙塘鳢的形态和核型研究[J].四川动物,2013,32(2):378-387.
- [10] 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(3):201-208.
- [11] LEVAN A, TRED K, SANDBERG A A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes [J]. Heredita, 1964, 52(2): 201-220.
- [12] RASCH E M, PREHN L M, RASCH R W. Cytogenetic studies of *Poecilia (Pisces)*. II. Triploidy and DNA levels in naturally occurring populations associated with the gynogenetic teleost, *Poecilia formosa* (Girard) [J]. Chromosoma, 1970, 31: 18-40.
- [13] 易少奎,张新辉,杨坤,等.厚颌鲂核型分析与 DNA 含量的测定[J].华中农业大学学报,2014,33(1):80-84.
- [14] 张克俭.长体鳊、黑鳍鳊及塘鳢的染色体组型研究[J].水产学报,1989,13(1):52-57.
- [15] 桂建芳,李渝成,李康,等.鰕虎鱼亚目三种鱼染色体组型的比较研究[J].动物学研究,1984(增刊),67-69.
- [16] 杨春英.沅水鱼类物种资源多样性及几种经济鱼类染色体组型

- 分析[D].长沙:中南林业科技大学,2012.
- [17] 张丽娟,祝斐,尹绍武,等.河川沙塘鳢(♀)×鸭绿沙塘鳢(♂)双亲及其杂交子代的核型分析[J].海洋渔业,2013,35(2):183-188.
- [18] 张君,汤俊,沈颂东,等.河川沙塘鳢染色体核型研究[J].江苏农业科学,2010(2):253-256.
- [19] 马纲.中国淡水鱼类染色体形态及数目变异的研究进展[J].甘肃科学学报,1996,31(3):77-80.
- [20] AKIHITO, IWATA A, KOBAYASHI T, et al. Evolutionary aspects of gobioid fishes based upon a phylogenetic analysis of mitochondrial cytochrome B genes [J]. Gene, 2000, 259(1/2): 5-15.
- [21] 陈小曲,黄韧,李建军.诸氏鳊鰕虎鱼染色体组型分析[J].热带海洋学报,2013(6):88-95.
- [22] GALVÃO B, BERTOLLO L A, MOLINA W F. Chromosomal complements of some Atlantic Blennioidei and Gobioides species (Perciformes) [J]. Comparative cytogenetics, 2011, 5(4): 259-275.
- [23] LIMA-FILHO P A, AMORIM K D J, CIOFFI M B, et al. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in *Gobionellus oceanicus* and *G. stomatus* (Gobiidae; Perciformes): a shared XX/XY system and an unusual distribution of 5S rDNA sites on the Y chromosome [J]. Cytogenetic & genome research, 2015, 144(4):333-340.
- [24] 余祥勇,李渝成,周瞰.中国鲤科鱼类染色体组型研究—8种裂腹鱼亚科鱼类[J].武汉大学学报(理学版),1990(2):97-104.
- [25] THACKER C, HARDMAN M. Molecular phylogeny of basal gobioid fishes: Rhyacichthyidae, Odontobutidae, Xenisthmidae, Eleotridae (Teleostei; Perciformes; Gobioides) [J]. Molecular phylogenetics & evolution, 2005, 37(3):858-871.
- [26] CUI J X, REN X H, YU Q X. Nuclear DNA content variation in fishes [J]. Cytologia, 1991, 56(3):425-429.
- [27] 杜波,王丁,张先锋,等.长江江豚基因组大小测定[J].动物学报,2006,52(4):731-737.

Karyotype and nuclear DNA content of *Odontobutis sinensis* in Liangzi Lake

XU Hongxia¹ YANG Xuefen^{1,2} YANG Ruibin^{1,2}

1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Freshwater Aquaculture Collaborative Innovation Center of Hubei Province, Wuhan 430070, China

Abstract To enrich the cytogenetics of *Odontobutis sinensis* and provide fundamental information for the establishment of the germplasm standard, breeding of *O. sinensis* and evolution of Odontobutidae species, karyotype of *O. sinensis* collected from Liangzi Lake were analyzed by intraperitoneal injection of PHA and colchicines, cultivation *in vivo* and slides preparation with air-drying and Giemsa staining. The erythrocyte nuclear DNA content (2.50 pg/2C) of *Gallus* sp. was used as the standard reference, and the erythrocyte nuclear DNA content of *O. sinensis* were measured by flow cytometry. Cytogenetic analysis of *O. sinensis* inferred a diploid chromosome number of $2n=44$, with a chromosome formula equal to $44T$ ($NF=44$), irrespective of sex. The karyotype exhibited large and small chromosome pairs; telocentric pairs 1 (5.914%) and telocentric pair 22 (3.332%). Neither the secondary constriction nor the satellites were found. Nuclear DNA content analysis of *O. sinensis* suggested an average value of 2.38 pg/2C, while the genome size of the species was 1.17×10^9 bp.

Keywords Liangzi Lake; *Odontobutis sinensis*; karyotype; nuclear DNA content; evolution

(责任编辑:边书京)