

黑龙江茴鱼(*Thymallus arcticus grubei* Dybowski) 的细胞遗传学分析

薛淑群, 尹洪滨, 赵吉伟*

(中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要: 采用体内注射 PHA 和秋水仙素, 肾细胞短期培养, 常规空气干燥法制备黑龙江茴鱼(*Thymallus arcticus grubei* Dybowski) 的染色体。对其肾细胞染色体数目统计分析表明, 黑龙江茴鱼染色体组有 92 条染色体, 核型公式为 $2n = 36m + 10sm + 8st + 38t$, 其染色体总臂数(NF) 为 138。采用流式细胞分析仪, 测定了黑龙江茴鱼的 DNA 含量, 与鸡血细胞标准对照相比为 (1.44 ± 0.07) , 以鸡红细胞 DNA 含量 2.3 pg/N 计, 则黑龙江茴鱼的体细胞 DNA 含量为 5.03 pg/N 。与已知的报道比较, 黑龙江茴鱼染色体数目和 DNA 含量都体现为四倍体特征。

关键词: 黑龙江茴鱼; 染色体; 核型; DNA 含量

中图分类号: S965.199.616 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)02-0350-05

Cytogenetic Analysis of *Thymallus arcticus grubei* Dybowski

XUE Shu-qun, YIN Hong-bin, ZHAO Ji-wei*

(Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Harbin 150070, China)

Abstract: Metaphase chromosome specimens of *Thymallus arcticus grubei* Dybowski injected with PHA and colchicin were prepared from short-term culture of kidney cells with air-drying technique. Its diploid chromosome number was $2n = 92$. The karyotype was composed of $36m$, $10sm$, $8st$ and $38t$ chromosomes, $NF = 138$. Its diploid nucleus DNA content was measured from the somatic cell of *T. a. grubei* using flow cytometer (Beckman cellLab Quant, made in USA) and the DNA content (2.3 pg/N) of erythrocytes of chick (*Gallus* sp) as standard. The *T. a. grubei* DNA content was 5.03 pg/N . According to the present results and reported date, *T. a. grubei* is possibly an tetraploid ($4n$).

Key words: *Thymallus arcticus grubei* Dybowski; chromosome; karyotype; DNA content

黑龙江茴鱼(*Thymallus arcticus grubei* Dybowski) 属鲑形目(Salmoniformes)、茴鱼科(Thymallidae)、茴鱼属(Thymallus), 俗称: 斑鲢子、红鳞鱼。分布于欧亚大陆, 在我国自然分布于黑龙江流域的支流中, 为黑龙江水系特有的名贵冷水性鱼类^[1]。黑龙江茴鱼肉质鲜美, 为名贵的食用鱼类。该鱼对环境条件要求苛刻, 在自然状态下很难形成大规模群体, 更不能形成一定的捕捞量^[2]。由于环境条件的变化, 栖息地渔民在洄游期进行捕捞及兴修水库和水利设施, 改变了茴鱼的产卵、摄食、越冬环境, 对其繁殖和生存造成了极大影响。黑龙江茴鱼已经濒临灭绝, 已被《中国濒危动物红皮书》收录, 被列为我国易危鱼类^[3]。

收稿日期: 2010-10-14 修回日期: 2011-02-14

基金项目: 科技部科技基础专项基金项目(2006DKA30470-005)、黑龙江水产研究所基本科研业务费专项资金(2007HSYZX-YZ-01)和黑龙江水产研究所科研专项基金(2009HSYZX-SJ-06)

作者简介: 薛淑群(1978—), 女, 博士生, 主要从事鱼类细胞遗传学研究, E-mail: xueshuqun@yahoo.com.cn; * 通讯作者: 赵吉伟, 副研究员, E-mail: zhaojiwei@hotmail.com。

目前,黑龙江茴鱼的繁殖^[4]、精子活力^[5]及分类^[6]等方面的研究已经有过报道,关于染色体和 DNA 含量的细胞遗传学研究国内外尚无报道。本文报道了黑龙江茴鱼的染色体数目,核型和 DNA 含量,以求在细胞水平上探讨黑龙江茴鱼的进化地位,旨在为鲑形目鱼类种质标准的建立、种质保存和合理开发利用提供基础资料和科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用黑龙江茴鱼为 2006 年秋季在牡丹江支流海浪河捕获,饲养于黑龙江水产研究所渤海冷水性鱼类试验站。2007 年 4 月,选择体质健壮、体表无伤、成熟良好的个体 25 尾(15 ♀ 10 ♂),年龄为 2~4 龄(多为 3 龄),其体重 132.1~185.4 g,体长为 22.8~27.3 cm。

1.2 方法

1.2.1 染色体制片 实验鱼在实验前 1 周暂养于室内控温、充气水族箱中,水温(13 ± 1) °C。按 10 $\mu\text{g/g}$ 鱼体重胸鳍注射 PHA(小牛血清溶解),16~18 h 后按 1~2 $\mu\text{g/g}$ 鱼体重注射秋水仙素溶液,2~4 h 后剪鳃放血,取出肾脏,置于盛有体积分数为 0.75% 生理盐水的平皿中,用镊子将肾组织磨碎,使其中的细胞游离出来,然后将细胞悬浮液吸入 10 mL 离心管中,将肾组织磨碎,使细胞游离出来,然后将细胞悬浮液吸入 10 mL 离心管中,轻轻吹打细胞使其分散均匀后离心(1 000 r/min, 5 min),弃去上清,仅留 0.5 mL 上清液及细胞沉淀。每管加入 8 mL 左右的 0.075 mol/l KCl 溶液(预先放入 37 °C 水浴预热),轻轻吹打至细胞均匀分散后置 37 °C 水浴 35 min,使红细胞完全破坏并使染色体分散开后,加入 200 μL 甲醇、冰醋酸(体积比为 3:1)固定液防止细胞结团。固定 15 min 后离心(1 000 r/min 5 min)去上清。每管加入甲醇、冰醋酸(体积比为 3:1)固定液 6 mL 左右,轻轻吹打至细胞分散均匀,4 °C 固定 15 min 后离心去上清,保留底部沉淀 0.5 mL 左右。反复固定 3 次。第 3 次固定后离心弃上清,每管加少许新鲜固定液($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{乙酸}}$ 为 1:1 或 1:3)制成细胞悬液,然后取细胞悬液 2~3 滴,滴至冷冻载玻片上,使之均匀的平铺于载玻片上,并迅速地在火焰上烤干。将干燥的染色体玻片放入体积分数为 4% Giemsa 染色液中染色 20~30 min,洗去多余的染色液,然后吹干、镜检^[7]。

在显微镜下选择分散度好、形态清晰、数目完整的中期分裂相,统计每个分裂相的染色体数目,最终确定黑龙江茴鱼的染色体数目。选择 10 个染色体分散好、没有重叠、形态清晰、长度适中的分裂相拍照,冲洗放大,测量染色体的相关参数,按照 Levan 等^[8]的标准进行分类、配对、剪贴,做出黑龙江茴鱼的染色体核型图。

1.2.2 体细胞 DNA 含量检测 取实验鱼(25 尾)的尾鳍用 φ (乙醇) = 70% 固定,可在 4 °C 保存 3 个月。检测前,机械法切取少量尾鳍于小研钵中,加入 5 mL(10 mg/l)的 DAPIP,用剪刀剪碎组织块,研磨 2 min 左右,振荡器振荡,用 20~40 目的尼龙丝网过滤悬液 1.5~2.0 mL 于样品管中,样品细胞的最终浓度为 $10^5 \sim 10^6$ 个细胞/mL,美国 Beckman cellLab Quant 高分辨细胞分析系统进行样品分析。以鸡(*Gallus sp.*)红细胞做对照,其绝对 DNA 含量按 2.30 pg/N 计算。本试验采用外定标法^[9]。

2 结果分析

2.1 黑龙江茴鱼细胞染色体数目

共计数 73 个中期分裂相的染色体数目,结果见表 1。观察及计数结果表明:染色体数目在 86~96 之间,其中在 90~94 条的分裂相相对集中,92 条占总计数的 52.05%,所以认定 92 为众数染色体数,确定黑龙江茴鱼二倍体染色体数($2n$)为 92。

2.2 黑龙江茴鱼的核型

根据 Levan 等的分类标准,对黑龙江茴鱼 10 个中期分裂相进行放大测定,按染色体臂比及相对长度把黑龙江茴鱼染色体分为 4 组:中部着丝点染色体(m) 36 条、亚中部着丝点染色体(sm) 10 条、端着丝点染色体(st) 8 条、亚端着丝点染色体(t) 38 条,染色体臂数(NF)为 138,未发现异型染色体和随体染色体,其核型公式为 $2n = 36m + 10sm + 8st + 38t$,黑龙江茴鱼的中期分裂相见图 1;黑龙江茴鱼核型见图 2。

表1 黑龙江茴鱼的染色体数分布频率

Tab.1 Statistics of the diploid chromosome number of *T. a. grubei*

染色体数 Chromosome number	<86	88	90	92	>94	Total
细胞数 Cell number	3	6	14	38	12	73
百分比/% Percentage	4.11	8.22	19.18	52.05	16.44	100

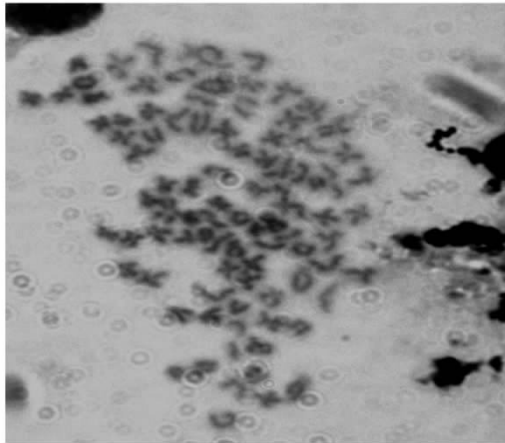


图1 黑龙江茴鱼染色体的中期分裂相

Fig.1 Chromosome of *T. a. grubei*

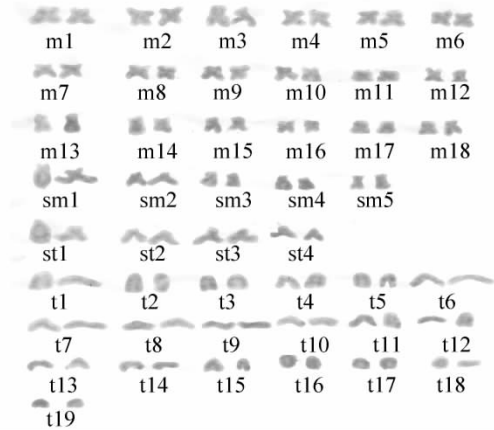


图2 黑龙江茴鱼核型

Fig.2 karyotype of *T. a. grubei*

2.3 DNA 含量

对25尾黑龙江茴鱼体细胞DNA含量进行测定,其结果见表2。以鸡红细胞DNA含量2.3 pg/N计,则黑龙江茴鱼体细胞绝对DNA含量为5.03 pg/N。图3、图4为样本1的流式细胞分析仪的测量结果。从图3、图4可以看出,体细胞的DNA含量图和红细胞的DNA含量图相比较,有一定的杂峰,这主要是因为尾鳍细胞研磨处理后,还是有一定的杂质存在。

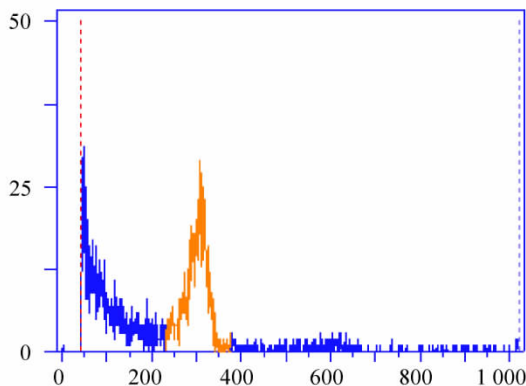


图3 黑龙江茴鱼体细胞DNA含量

Fig.3 DNA contents of *T. a. grubei*

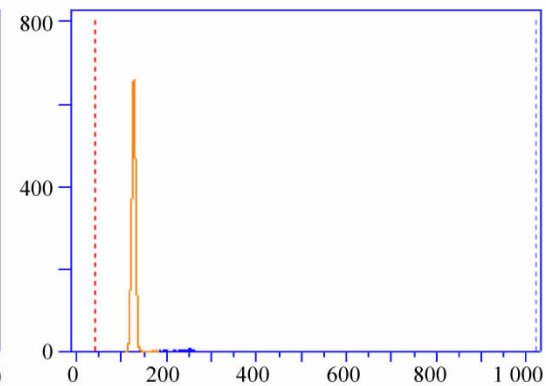


图4 鸡红细胞DNA含量

Fig.4 DNA contents of chicken

3 讨论

曾经报道茴鱼属在中国有3个亚种^[10]:黑龙江茴鱼(*T. a. grubei*),产于黑龙江流域;北极茴鱼(*T. arcticus Pallas*),产于额尔齐斯河流域;鸭绿江茴鱼(*Thymallus arcticus yaluensis*),产于鸭绿江上游。目前已经证明鸭绿江茴鱼并非有效种,应为黑龙江茴鱼(*T. a. grubii*)的同种异名,可视为黑龙江茴鱼的一个地理生态种群^[11]。这3个流域分布的茴鱼外形和习性颇相似,极有可能是同一亚种,仅地理分布不同而已。

本文报道了黑龙江茴鱼是染色体数为92。从核型分析看,黑龙江茴鱼的染色体配对具有4条染色体同源的倾向。茴鱼科与鲑科同属鲑形目,血缘关系相对较近,因此他们的染色体组成有相似之处,具

表2 黑龙江茴鱼 DNA 含量测定值

Tab.2 DNA contents of *Thymallus arcticus grubei*

序号 No.	体细胞相对含量 Relative contents of <i>T. a. grubei</i>	对照相对含量 Relative contents of chicken	体细胞:对照 <i>T. a. grubei</i> / Chicken' DNA contents	体细胞 DNA 含量 /(pg · N ⁻¹) DNA contents of <i>T. a. grubei</i>
1	299	127	2.35	5.41
2	285	144	1.98	4.55
3	286	143	2.00	2.60
4	299	104	2.88	6.62
5	312	135	2.31	5.31
6	307	122	2.52	5.80
7	297	135	2.20	5.06
8	308	132	2.33	5.36
9	295	111	2.66	6.12
10	276	132	2.09	4.81
11	284	133	2.14	4.92
12	253	139	1.82	4.19
13	299	124	2.41	5.54
14	275	142	1.94	4.46
15	273	128	2.13	4.90
16	312	137	2.28	5.24
17	308	127	2.43	5.59
18	275	132	2.08	4.78
19	293	131	2.24	5.15
20	326	126	2.59	5.96
21	257	134	1.92	4.42
22	303	121	2.50	5.75
23	262	136	1.93	4.44
24	238	142	1.68	3.86
25	291	134	2.17	4.99
平均值 Average	288.52 ± 21.02	130.84 ± 9.49	2.22 ± 0.28	5.03 ± 0.82

有新四倍体的一些特征,例如染色体数和染色体臂数均接近于多数鲑科鱼类。与已有研究的鲑科鱼类相比较,黑龙江茴鱼的染色体数目相对较多,但染色体臂数则相对接近多数鲑科鱼类的数目。这可能是不同物种长期的基因交流的缺失导致的结果,同时不同程度的罗伯逊易位也可能是染色体数目差异的一个原因。

近年来,在低等脊椎动物中陆续发现了一些多倍体化的类型。越来越多的研究表明,不仅脊椎动物在从水生到陆地的进化过程中伴随着遗传物质的成倍增加,而且在鱼类进化的不同分支上,也常常发生多倍化^[12]。周墩^[13]研究发现鲑形目、鲤形目等系统地位较低的类群中,二倍体类型 DNA 含量范围为 1.8 ~ 2.8 pg/N。例如鲤形目的团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)^[14]、尼罗罗非鱼(*Sarotherodon nilotica*)^[15]、青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、鲢(*Hypophthal michthys molitrix*)、鳊(*Aristichthys mobilis*)^[16],鲑形目的黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)、鲇鱼(*Parasilurus asotus*)^[17]、大口鲇(*Silurus meridionalis*)^[18]等,DNA 含量均处于这一范围内。Ohno,范兆廷等^[19]根据核型和 DNA 含量分析,认为鲤鱼(*Carassius carpio*)和鲫鱼(*Carassius auratus*)为四倍体类型。从表 3 统计可以推断,DNA 含量和相应的二倍体染色体数目之间存在着正比例相关性。

鲑形目鱼类的 DNA 含量是血缘相近种类的 2 倍^[20],因此许多研究认为多数鲑科鱼类是四倍体^[21-24]。黑龙江茴鱼体细胞的 DNA 含量为 5.03 pg/N,与染色体结果相一致,同样具有四倍体的特征。

表 3 相关鱼类染色体和 DNA 含量对比

Tab.3 Comparison with other reports about chromosome and DNA content

种类 Species	染色体数目 Chromosome no	DNA 含量/(pg · N ⁻¹) DNA contents	研究者 Reporter
尼罗罗非鱼 <i>S. nilotica</i>	44	2.27	尹洪滨
团头鲂 <i>M. amblycephala</i>	48	2.66	尹洪滨
青鱼 <i>M. piceus</i>	48	2.20	范兆廷
草鱼 <i>C. idellus</i>	48	2.18	范兆廷
鲢 <i>H. m. molitrix</i>	48	2.18	范兆廷
鳊 <i>A. mobilis</i>	48	2.15	范兆廷
镜鲤 <i>C. carpio</i>	100	3.73	范兆廷
银鲫 <i>C. auratus</i>	150	6.09	范兆廷
黄颡鱼 <i>P. fulvidraco</i>	52	2.00	李渝成
鲇鱼 <i>P. asotus</i>	58	2.90	李渝成
大口鲇 <i>S. meridionalis</i>	58	2.20	邹桂伟
虹鳟 <i>S. gairdneri</i>	60	6.00	Hinegardner
虹鳟 <i>O. mykiss</i>	60	3.47	宋苏祥, 范兆廷
黑龙江茴鱼 <i>T. a. grubei</i>	92	5.03	本文作者

参考文献:

- [1] Dybowski B N. Vorläufige mittheilungn uber die fishfauna des ononflusses and des ingoda in Transbaicalien [J]. Verb Zool Bot Ges vien, 1869, 19: 209 - 222.
- [2] 张觉民. 黑龙江省鱼类志 [M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1995: 60 - 62.
- [3] 乐佩琦, 陈宜瑜. 中国濒危动物红皮书(鱼类) [M]. 北京: 科学出版社, 1998: 44 - 46.
- [4] 徐革锋, 梁双, 孙冬梅. 黑龙江茴鱼的人工繁殖技术研究初报 [J]. 水产学杂志, 2006, 19(2): 51 - 53.
- [5] 韩英, 张澜澜, 徐革锋, 等. 黑龙江茴鱼(*Thymallus arcticus grubei* Dybowski) 精子活力的观察 [J]. 水产学杂志, 2008, 21(1): 9 - 14.
- [6] 李思忠. 中国鲢科鱼类地理分布的探讨 [J]. 动物学杂志, 1984(1): 34 - 37.
- [7] 余先觉, 周墩. 中国淡水鱼类染色体 [M]. 北京: 科学出版社, 1989: 4 - 9.
- [8] Levan A, Fredya K, Sandberd A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes [J]. Hereditas Band, 1964, 52(2): 201 - 220.
- [9] Birstein V J, Poletaev A I, Goncharov B F. DNA content in Eurasian sturgeon species determined by flow cytometry [J]. Cytometry, 1993, 14: 377 - 383.
- [10] 董崇智. 中国淡水冷水性鱼类 [M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 2001: 63 - 65.
- [11] 马波, 霍堂斌, 姜作发. 线粒体 DNA 序列变异显示鸭绿江茴鱼为黑龙江茴鱼同物异名 [J]. 动物分类学报, 2008, 33(2): 414 - 419.
- [12] 李树深. 脊椎动物的多倍体 [J]. 动物学杂志, 1980(2): 52 - 54.
- [13] 周墩. 主要淡水养殖鱼类种质研究 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1991: 133 - 144.
- [14] 尹洪滨, 范兆廷. 团头鲂核型与 DNA 含量分析研究 [J]. 水产学杂志, 1995, 8(1): 22 - 26.
- [15] 尹洪滨, 范兆廷. 奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼核型及 DNA 含量的比较研究 [J]. 东北林业大学学报, 1995, 23(1): 46 - 51.
- [16] 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 - 326.
- [17] 李渝成. 十四种淡水鱼的 DNA 含量 [J]. 遗传学报, 1983, 10(5): 384 - 389.
- [18] 邹桂伟, 潘光碧, 梁拥军. 胡德高大口鲇染色体组型和 DNA 含量的研究 [J]. 中国水产科学, 1997, 4(5): 96 - 99.
- [19] Ohno S. Sex chromosome and sex - linked genes Springer [J]. Chromosoma, 1967, 23(1): 1 - 9.
- [20] 宋苏祥, 孙大江. 虹鳟核型及 DNA 含量分析 [J]. 水产学杂志, 1995, 8(1): 27 - 31.
- [21] Cueillar O, Uyeno T. Triploidy in rainbow trout [J]. Cytogenetics, 1972, 11(6): 508 - 515.
- [22] Thorgaard G H, Gall G A E. Adult triploids in a rainbow trout family [J]. Genetics, 1979, 93(4): 961 - 973.
- [23] Allen S K, Stanley J G. Reproductive sterility in polyploid brook trout, *Salvelinus fontinalis* [J]. Trans Am Fish Soc, 1978, 107(3): 473 - 478.
- [24] 楼允东. 国外对鱼类多倍体育种的研究 [J]. 水产学报, 1984, 8(4): 343 - 356.