

文章编号:1000-0615(2009)01-0009-06

太湖似刺鲃染色体组型分析及细胞核 DNA 含量

顾若波, 徐钢春, 闻海波, 华丹

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业部水生动物遗传育种和
养殖生物学重点开放实验室, 江苏 无锡 214081)

摘要:采用 PHA、秋水仙素碱腹腔或背部肌肉注射, 活体培养法, 用空气干燥法制片, 运用 Micromesure version 3.3 染色体分析软件和 Photoshop 7.0 对似刺鲃染色体数目和核型进行了分析; 同时, 取似刺鲃血细胞、尾鳍、鳃、肌肉、性腺和肝脏为材料, 以鸡血细胞为 DNA 标准(2.50 pg/2c), 使用 EPICS-XL 型流式细胞仪测定了似刺鲃细胞核 DNA 含量。结果显示: 染色体众数 $2n=50$, 染色体大小的绝对值为 $0.86 \sim 2.32 \mu\text{m}$, 平均长度为 $1.63 \mu\text{m}$, 未观察到次缢痕及异配型染色体, 亦未发现随体, 核型公式为 $18m+20sm+8st+4t, NF=88$ 。6 个组织细胞核 DNA 含量分别为: 尾鳍 $3.779 \text{ pg}/2c$, 鳃 $4.007 \text{ pg}/2c$, 肌肉 $3.819 \text{ pg}/2c$, 性腺(卵巢 $4.242 \text{ pg}/2c$ 、精巢 $1.842 \text{ pg}/2c$), 肝脏 $3.905 \text{ pg}/2c$ 。尾鳍、鳃、肌肉和肝脏的细胞核 DNA 含量不存在显著差异($P>0.05$), 但都极显著高于血细胞 DNA 含量($P<0.01$); 卵巢细胞核 DNA 含量约为精巢的 2 倍。

关键词:似刺鲃; 染色体; 核型; DNA 含量

中图分类号:Q 813.4; S 917

文献标识码:A

似刺鲃(*Paracanthobrama guichenoti* Bleeker), 隶属鲤形目(Cypriniformes)、鲤科(Cyprinidae)、鲃亚科(Gobioninae)、似刺鲃属(*Paracanthobrama*)^[1], 又叫拟刺鲃^[2], 俗称石鲫, 主要分布在我国长江中、下游干流及附属湖泊的一种中小型经济鱼类, 在太湖、澄湖有一定量的分布。似刺鲃肉质细嫩、味道鲜美、营养丰富, 深受消费者青睐, 是餐桌上的珍品^[3], 随着近年来太湖等湖泊自然生态环境的改变和人为滥捕, 导致水域中似刺鲃群体数量急剧减少, 因此, 此资源的保护和增殖是目前亟待解决的问题。

近年来, 有关似刺鲃的研究报道较少, 虽然记载有湖北群体和太湖群体染色体模式核型的报道^[4-6], 但尚未见有对太湖似刺鲃染色体核型和 DNA 含量的系统研究, 特别是多组织细胞核 DNA 含量的比较。本文系统研究了太湖似刺鲃的染色体组型, 并测定了多组织的细胞核 DNA

含量, 旨在为似刺鲃的遗传背景研究和资源保护提供相关资料, 以期对太湖似刺鲃种质标准制定提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

所用似刺鲃于 2007 年 4 月 1 日采集自太湖苏州湖区。用于染色体核型分析的似刺鲃体长 $15 \sim 25 \text{ cm}$, 体重 $100 \sim 200 \text{ g}$, 5 尾(3 ♀, 2 ♂); 用于 DNA 含量测定的似刺鲃规格见表 1。

1.2 方法

肾细胞染色体标本的制备 采用林义浩^[7]的植物血球凝集素(PHA)体内注射法和同步升温法。对 $10 \sim 15 \text{ }^\circ\text{C}$ 下暂养的似刺鲃, 利用加热棒使水体升温到 $23 \text{ }^\circ\text{C}$, 似刺鲃适应一定时间后, 每尾似刺鲃按体重 $6.5 \mu\text{g}/\text{g}$ 的剂量注射 PHA(购自上海伊华医学科技有限公司), 24 h

收稿日期:2008-04-13 修回日期:2008-06-10

资助项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心)资助项目(2007JBFB03);农业部水生动物遗传育种和养殖生物学重点开放实验室开放课题项目(BM2007-08);中国水产科学研究院淡水生态与健康养殖重点开放实验室开放课题项目(2007FEA0203)共同资助

通讯作者:顾若波, Tel:0510-85552220, E-mail:gurb@ffrc.cn

后,再按同样的剂量注射 PHA,12 h 后,以 5 $\mu\text{g/g}$ 体重注射秋水仙碱,4 ~ 5 h 后断尾及鳃部动脉在水中放血 10 min。取出肾脏于 0.75% 的生理盐水中清洗并充分剪碎,取上层细胞悬液以转速 2 000 r/min 离心 7 min 收集细胞,加入预热的 0.075 mol/L KCl,37 $^{\circ}\text{C}$ 下低渗 60 min。低渗后

的细胞,打匀后加卡诺氏固定液(甲醇:冰醋酸 = 3:1)固定 30 min,以 2 000 r/min 离心 10 min,重复固定两次。空气干燥法制片,10% 的 Giemsa 液 [pH = 6.8,磷酸缓冲液(PBS)配制]染色 15 min,用水充分冲洗,自然干燥后封片。

表 1 用于 DNA 含量测定的似刺鲃规格生物学数据

Tab.1 The biologic data of *P. guichenoti* for the cellular DNA contents test

编号 number	性别 sex	年龄 age	体长(cm) length	体重(g) weight	体高(cm) height
样品 1 sample 1	♀	3	22.7	261.3	6.9
样品 2 sample 2	♂	2	22.5	222.3	6.1
样品 3 sample 3	♀	3	24	268	6.4
样品 4 sample 4	♂	1	18.9	136.8	5.2
样品 5 sample 5	♀	3	22.7	252.9	6.4

染色体数目统计及组型分析 选取来自不同个体的 100 个分散良好的分裂相,用 NIKON 90i 型全自动显微图像分析仪逐一进行拍照,记录每个分裂相的染色体数目,统计染色体众数分布。

选择 5 个图像清晰、数目完整、形态清晰的中期分裂相,用 Micromasure version 3.3 染色体分析软件测量和分析其全长、长臂长、短臂长和臂比值,计算其相对长度;按 Levan 等^[8]提出的标准进行配对,用 Photoshop 7.0 分类裁剪、排列组型,臂数计算参照余先觉等^[9]的方法。

细胞核 DNA 含量的测定 活体解剖分别取少量似刺鲃组织,取约 0.1 g 新鲜组织用眼科剪刀剪碎,用 5 mL 磷酸缓冲液(PBS)制备细胞悬液,以 1 000 r/min 离心去细胞碎片,洗涤 2 ~ 3 次;用 300 目筛绢过滤,去除大组织块获得细胞悬液。离心去上清,加 200 μL 组织裂解(DNA-prep A)液,10 min 后加 1 mL DNA-prep B 液(DAPI,二脒基二苯基吡啶),避光静置 10 min,EPICS-XL 型(美国 Beckman Coulter 公司)流式细胞仪测定 DNA 相对含量,液流速度保持在每秒 150 ~ 200 个细胞。所用试剂均为 Beckman Coulter 公司生产。比较似刺鲃肌肉细胞和肝脏细胞与鸡血 2n 峰的相对位置,计算 DNA 含量,鸡红细胞 DNA 绝对含量以国际上通用的 2.50 pg/2c 为标准。

1.3 数据处理

所有实验数据用 SPSS11.5 统计分析,结果表示为 mean \pm SE。

2 结果

2.1 染色体数目

镜检似刺鲃染色体中期分裂相 100 个作统计。结果(表 2)表明:似刺鲃 84% 的细胞染色体数目为 50,少于或者多于 50 的染色体共 16%。对于非众数染色体细胞,很可能是低渗过度或者制片操作导致,因而,确定似刺鲃二倍体染色体的数目为 $2n = 50$ 。此外,未观察到次缢痕及异配型染色体,亦未发现有随体。

表 2 似刺鲃肾细胞中染色体数目统计

Tab.2 Chromosome number in cells of *P. guichenoti*

染色体数目 diploid chromosome number (2n)	细胞数 cell number	分布频率(%) distribution frequency
<50	13	13
50	84	84
>50	3	3

2.2 染色体组型

经显微测量、分析,染色体大小的绝对值为 0.86 ~ 2.32 μm ,平均长度为 1.63 μm 。根据似刺鲃染色体臂比和相对长度(表 3)进行同源染色体配对,似刺鲃全部染色体配成 25 对。按 Levan 命名法分为 4 组,其中:具中部着丝粒染色体(m)有 9 对,亚中部着丝粒染色体(sm)有 10 对,亚端部着丝粒染色体(st)有 4 对,端部着丝粒染色体(t)2 对。核型公式为 $2n = 50 = 18m + 20sm + 8st + 4t$,染色体臂数(NF)为 88(图 1)。

表 3 似刺鲃染色体相对长度和臂比
Tab. 3 The relative length and arm ratio of chromosome of *P. guichenoti*

mean \pm SE, n = 5		
染色体相对长度(%) relative length of chromosome	臂比值 arm ratio	类型 type
5.04 \pm 0.56	1.38	m1
4.49 \pm 0.11	1.24	m2
4.34 \pm 0.14	1.44	m3
4.32 \pm 0.10	1.07	m4
4.24 \pm 0.11	1.47	m5
4.11 \pm 0.14	1.42	m6
3.89 \pm 0.15	1.35	m7
3.85 \pm 0.08	1.53	m8
3.67 \pm 0.21	1.35	m9
5.45 \pm 0.17	2.05	sm1
5.20 \pm 0.51	2.30	sm2
4.83 \pm 0.21	2.01	sm3
4.37 \pm 0.17	2.71	sm4
4.07 \pm 0.08	1.85	sm5
3.41 \pm 0.11	2.23	sm6
3.39 \pm 0.12	1.84	sm7
3.36 \pm 0.07	2.11	sm8
3.10 \pm 0.08	1.89	sm9
3.04 \pm 0.21	2.04	sm10
4.17 \pm 0.14	3.62	st ₁
4.09 \pm 0.08	3.12	st ₂
3.74 \pm 0.35	3.15	st ₃
3.51 \pm 0.13	3.42	st ₄
4.76 \pm 0.12	7.78	t ₁
2.46 \pm 0.16	∞	t ₂

注: m. 中部着丝粒染色体; sm. 亚中部着丝粒染色体; st. 亚端部着丝粒染色体; t. 端着丝粒染色体; ∞ . 无穷大

Notes: m. metacentric chromosome; sm. sub-metacentric chromosome; st. sub-telocentric chromosome; t. telocentric chromosome; ∞ . infinity.

2.3 DNA 含量测定

似刺鲃血细胞 DNA 相对值为: mean (coulter) = 218.26; area (%) = 54.52; CV (%) = 6.684, 与鸡血细胞 2n 峰的相对位置见图 2, 鸡血细胞 DNA 相对值为: mean (coulter) = 198; area (%) = 68.9; CV (%) = 4.77, 其他不同组织的 DNA 含量测定结果见表 4。

以鸡血细胞 DNA 含量值为 2.50 pg/2c 计算^[10-13], 似刺鲃血细胞 DNA 含量与鸡血细胞的比值为 1.10, 其绝对含量为 2.756 pg/2c, 其他组织的细胞 DNA 平均值绝对含量分别为: 尾鳍 3.779 pg/2c, 鳃 4.007 pg/2c, 肌肉 3.819 pg/2c, 性腺(卵巢 4.242 pg/2c、精巢 1.842 pg/2c), 肝脏为 3.905 pg/2c。

在实验所用的 6 个组织中, 尾鳍、鳃、肌肉和肝脏的细胞核 DNA 含量不存在显著差异 ($P > 0.05$), 但都极显著高于血细胞 DNA 含量 ($P < 0.01$); 雄鱼和雌鱼性腺细胞核 DNA 含量中存在显著差异 ($P < 0.01$), 雌鱼 DNA 含量约为雄鱼的 2 倍。

3 讨论

3.1 染色体核型分析

李康等^[4]报道了湖北沙市似刺鲃群体的染色体核型, 周密等^[5]也对湖北武汉群体进行了银

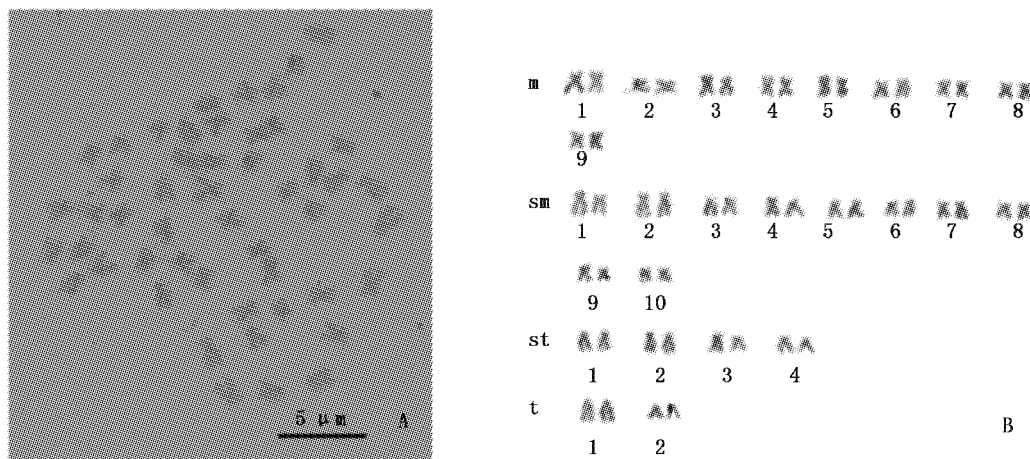


图 1 似刺鲃染色体中期分裂相 (A) 及染色体核型 (B)

Fig. 1 The metaphase chromosome (A) and karyotype (B) of *P. guichenoti*

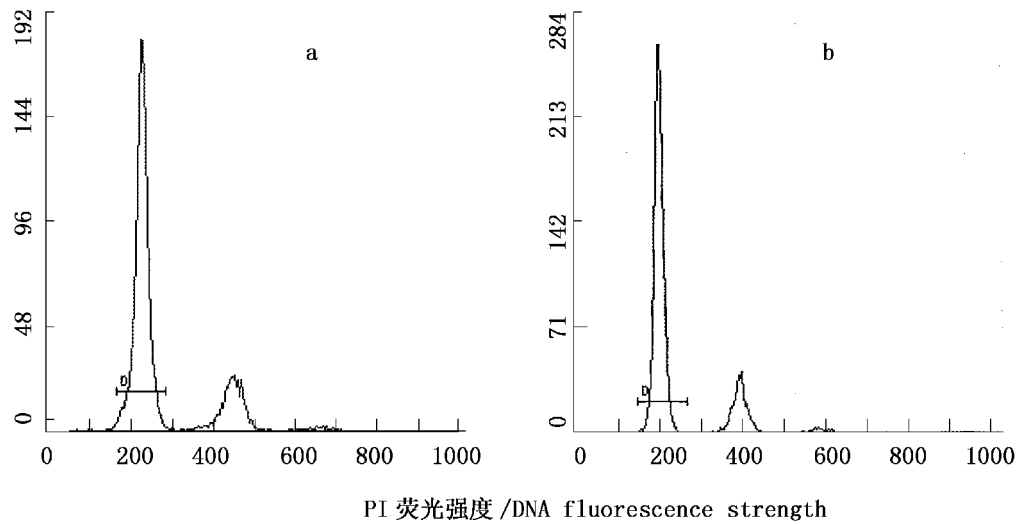


图2 似刺鲃血细胞DNA直方图(a)和对照鸡血红细胞标准DNA直方图(b)
Fig.2 DNA histogram of erythrocytes of *P. guichenoti*(a) and erythrocytes of chicken(b)

表4 似刺鲃各组织的DNA相对值

Tab.4 DNA contents of several tissues in *P. guichenoti*

组织 tissue	项目 parameter	样品1 sample 1	样品2 sample 2	样品3 sample 3	样品4 sample 4	样品5 sample 5	平均值 mean
血细胞 blood cell	mean(coulter)	215.0	211.8	217.2	220	227.3	218.26
	area(%)	50.5	51.5	51.7	55.8	63.1	54.52
	CV(%)	7.19	7.12	7.14	7.10	4.87	6.684
尾鳍 caudal fin	mean(coulter)	309.4	298.3	301.2	295.7	291.9	299.3
	area(%)	52.2	58	60.3	55.7	56.2	56.48
	CV(%)	4.7	6.84	4.87	4.01	4.34	4.952
鳃 gill	mean(coulter)	322.8	305.7	310.9	324.1	323.3	317.36
	area(%)	56	54.3	68	51.4	71.3	60.2
	CV(%)	4.12	4.75	4.61	6.92	3.2	4.72
肌肉细胞 muscle cell	mean(coulter)	300	307.0	316.4	298.7	290.2	302.46
	area(%)	59.2	58.6	52.2	58.9	63.2	58.42
	CV(%)	2.5	3.88	2.62	2.14	2.71	2.77
性腺 sex gland	mean(coulter)	335.0	141.5	338.5	150.3	333	259.66
	area(%)	77.2	57.2	74.1	55.8	82.1	—
	CV(%)	2.2	2.96	2.39	3.27	2.06	—
肝脏 liver	mean(coulter)	324.4	299.1	307.5	299.2	316.0	—
	area(%)	75.2	74.4	80.2	90.4	65.5	77.14
	CV(%)	3.88	2.19	1.8	2	3.29	2.632

染核型研究,均发现有1对末端次缢痕;葛志亮等^[6]也对太湖群体进行了染色体模式核型图的建立,未观察到有1对末端次缢痕。从本研究结果来看,太湖似刺鲃染色体核型为 $2n = 18m + 20sm + 8st + 4t$,在亚端部着丝粒染色体(st)比前人报道^[4-6]的少了1对,而在端部着丝粒染色体(t)则多了1对;这些差异可能是由于不同研究者所使用的方法、仪器不同,测量染色体的时相不一

致,以及测量和配组误差所造成的。本研究中未观察到次缢痕及异配型染色体,也未发现有随体。这一结果与葛志亮等^[6]的研究结果相一致,而与李康等^[4]和周密等^[5]的研究结果不同,这可能与其所处的生态条件和地理分布不同有关,需进一步采用更多地区似刺鲃群体染色体进行比较。张永普等^[14]研究的中国石子龙也存在由于地理隔离导致次缢痕有无的差异。

此外,采用同步升温法并正确掌握 PHA 和秋水仙碱的浓度及处理时间能获得较好染色体分裂相。同时,通过 Micromasure version 3.3 染色体分析软件和 Photoshop 7.0 来处理和分析染色体组型,可以大大降低工作量和减少误差。

3.2 DNA 含量测定

流式细胞仪是本世纪 70 年代末发展起来的一种能快速、准确测量细胞大小、DNA 含量的高新技术仪器。目前,已经广泛运用于鱼类、贝类、虾类等 DNA 含量、倍性检测^[15-19]。由于 4 月份为似刺鲃的繁殖旺季,精巢处于成熟期经历减数分裂,形成了单倍体的精子细胞;而此时的卵巢尚处于 IV 期卵母细胞的大生长期未进行减数分裂成单倍体卵子,实验取样的是卵巢组织细胞。根据本实验测定的尾鳍、鳃、肌肉和肝脏 4 个组织细胞核的 DNA 含量相对于单倍体的精子细胞来看,都可以确定似刺鲃为二倍体鱼类。

此外,尾鳍、鳃、肌肉和肝脏的细胞核 DNA 含量无显著差异,与吴洪喜等^[17]对泥蚶肌肉和鳃的 DNA 含量的测定和张晓军等^[19]对刀额新对虾细胞肌肉、鳃、卵巢细胞的 DAN 含量测定结果相似。但血红细胞细胞核 DNA 含量与其他组织存在差异,这可能外周血红血球中也存在着直接分裂的细胞周期现象原因^[20]。雌鱼卵巢细胞核 DNA 含量约为雄鱼精巢的 2 倍,这是取样时间刚好处于繁殖期间所致。

对于同一种生物来讲,体细胞的 DNA 含量是恒定的,具有种的特征,在亲缘关系相近的类群中可以作为探讨其演化地位和亲缘关系的依据^[18]。似刺鲃的细胞核 DNA 含量与同亚科的花鲢接近,但比花鲢具有稍多的 DNA 含量^[21],是否说明在进化程度上似刺鲃要比花鲢略显高等有待于今后测定更多种类的 DNA 含量来加以深入的讨论。目前,叶玉珍等^[13]对 3 个鲫品系的研究表明,染色体数目多的鲫 DNA 含量高,染色体数目少的鲫其 DNA 含量低,鲫 DNA 含量的高低可能与它进化程度不同有密切关系;吴洪喜等^[22]测定的泥蚶与毛蚶和魁蚶的 DNA 含量相差不大,表明它们之间有非常接近的亲缘关系,但,泥蚶比毛蚶和魁蚶具有稍多的 DNA 含量,因此认为泥蚶在进化程度上要比毛蚶和魁蚶高级。

细胞核 DNA 含量研究是检验其种质资源和种质质量的主要指标之一,而本研究的 6 个组织

细胞核 DNA 研究结果表明,可以在活体条件下取尾鳍进行似刺鲃的细胞核 DNA 含量的检测。

参考文献:

- [1] 倪勇,朱成德. 太湖鱼类志[M]. 上海:上海科学技术出版社,2005:139-142.
- [2] 朱松泉,刘正文,谷孝鸿. 太湖鱼类区系变化和渔货物分析[J]. 湖泊科学,2007,19(6):664-669.
- [3] 顾若波,徐钢春,华丹,等. 似刺鲃肌肉营养成分与品质的评价[J]. 中国海洋大学学报,2008,38(3):320-325.
- [4] 李康,桂建芳,洪云汉,等. 中国鲤科鱼类染色体组型的研究:V. 鲃亚科 10 种鱼的染色体组型[J]. 武汉大学学报(自然科学版),1984,3:113-119.
- [5] 周密,康杨,李渝成,等. 鲤科七种鱼的银染核型研究[J]. 动物学研究,1988,9(2):225-228.
- [6] 葛志亮,卢敏德,王平. 太湖似刺鲃染色体核型的研究[J]. 水产养殖,1991,3:14-15.
- [7] 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.
- [8] Levan A, Fredga K, Sandberg A A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes [J]. Hereditas,1964,52(2):201-220.
- [9] 余先觉,周敏,李渝成,等. 中国淡水鱼类染色体[J]. 北京:科学出版社,1989:84.
- [10] Bachmann K, Harrington B A, Craig J P. Genome size in birds [J]. Chromosoma, 1972, 37:405-416.
- [11] Tiersch T R, Chandler R W, Wachtel S S, et al. Reference standards for flow cytometry and application in comparative studies of nuclear DNA content [J]. Cytometry, 1989, 10:706-710.
- [12] Vinogradov A E. Genome size and GC-percent in vertebrates as determined by flow cytometry: the triangular relationship [J]. Cytometry, 1998, 31:100-109.
- [13] 叶玉珍,周建峰,王忠卫,等. 三个鲫品系 DNA 含量的比较研究[J]. 水生生物学报,2004,28(1):13-16.
- [14] 张永普,刘永章,胡健饶. 中国石龙子不同地理居群染色体组型研究[J]. 科技通报,2004,20(4):293-297.
- [15] 范兆廷,尹洪滨,宋苏祥,等. 十三种淡水养殖鱼

- 类的 DNA 含量[J]. 水产学报,1995,19(4):322-326.
- [16] 尹洪滨,孙中武,孙大江. 五种养殖鲟、鳊鱼 DNA 含量的比较[J]. 上海水产大学学报,2004,13(2):112-114.
- [17] 吴洪喜,柴雪良,吴建波,等. 乐清湾泥蚶血细胞周期和 DNA 含量[J]. 海洋科学,2002,26(3):47-49.
- [18] 方旅平,张馥厚,曹文清,等. 刀额新对虾和日本囊对虾细胞核 DNA 含量的测定和比较[J]. 厦门大学学报(自然科学版),2007,46(1):146-148.
- [19] 张晓军,周岭华,相建海. 刀额新对虾染色体核型及细胞核 DNA 含量[J]. 海洋与湖沼,2002,33(3):225-231.
- [20] Kendall C, Valentino S, Bodine A B, *et al.* Flow cytometric DNA analysis of nurse shark, *Ginglymoscoma cirratum* (Bonaterce) and clearnose skate, *Raja eglanteria* (Bose) peripheral red blood cells[J]. J Fish Biol,1992,41:123-129.
- [21] 顾若波,徐钢春,闻海波,等. 花鲮染色体组型分析及细胞核 DNA 含量的测定[J]. 广东海洋大学学报,2008,28(1):11-14.
- [22] 吴洪喜,柴雪良,吴建波,等. 三种蚶 DNA 含量和种间亲缘关系的探讨[J]. 水产科技情报,2000,27(2):51-53.

Karyotypic analysis and cellular DNA contents of *Paracanthobrama guichenoti* in Lake Taihu

GU Ruo-bo, XU Gang-chun, WEN Hai-bo, HUA Dan

(Key Open Laboratory for Genetic Breeding of Aquatic Animals and Aquaculture Biology, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

Abstract: The metaphase chromosome number and karyotype of *Paracanthobrama guichenoti* were analyzed using chromosome analysis software (Micromeasure version 3.3) and Photoshop 7.0. Kidney cells treated with PHA and colchicine through intramuscular and intra-peritoneal injections were cultivated, and finally were sliced by air-drying method. The cellular DNA contents of *Paracanthobrama guichenoti* were determined using Flow cytometer (EPICS-XL) based on blood corpuscle and the cells from tail fin, gill, muscle, gonad and liver of fish compared with standard DNA of chicken erythrocyte (2.50 pg/2c). The results indicate that the telocentric chromosome number of *Paracanthobrama guichenoti* is 50 ($2n=50$) and the absolute value of chromosome size ranges from 0.86-2.32 μm with the average value of 1.63 μm . The karyotype of *Paracanthobrama guichenoti* is $2n=18m+20sm+8st+4t$, $NF=88$. However, secondary constriction, heterozygosity chromosome and satellite chromosome were not observed. The cellular DNA contents of tissue from tail fin, gill, muscle, ovary, spermary and liver are 3.779 pg/2c, 4.007 pg/2c, 3.819 pg/2c, 4.242 pg/2c, 1.842 pg/2c, and 3.905 pg/2c respectively. Moreover, the cellular DNA contents are not significantly different in tail fin, gill, muscle and liver of *Paracanthobrama guichenoti* ($P > 0.05$), but they are significantly higher than the cellular DNA contents in erythrocyte ($P < 0.01$). In addition to above, the cellular DNA contents in ovary are twice as great as those in spermary.

Key words: *Paracanthobrama guichenoti* Bleeker; chromosomes; karyotype; DNA content