



四带小鲃胚胎发育及系统进化分析

崔文耀^{1,2,3}, 周丽青⁴, 杨继辉^{1,2,3}, 熊加奉^{1,2,3}, 李伟明⁵, 任建峰^{1,2,3*}

(1. 上海海洋大学, 科技部海洋生物科学国际联合研究中心, 上海 201306;

2. 上海海洋大学, 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;

3. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;

4. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室, 青岛 266071;

5. 密歇根州立大学渔业与野生动物系, 密歇根州 东兰辛 48824)

摘要: 四带小鲃是一种具有较高经济价值的小型热带观赏鲤科鱼类。本实验利用光学显微镜观察了其胚胎发育全过程, 采用小鱼游泳法和流式细胞术检测了其染色体数目及DNA含量, 最后利用线粒体基因组序列对其在鲃亚科中的系统进化地位进行了分析。结果显示, 水温 28 °C 条件下, 四带小鲃的胚胎发育经历了卵裂前期、卵裂期、囊胚期、原肠期、神经胚期、器官形成期和出膜期 7 个时期, 24 h 孵化出膜。与斑马鱼出膜时开始形成色素不同, 四带小鲃出膜时色素未形成, 这有利于早期器官形成和发育的观察。以公鸡血细胞 DNA 含量 2.30 pg/2c 为标准, 四带小鲃 DNA 含量为 1.50 pg/2c。四带小鲃染色体为 2n=50, 系统进化树显示, 四带小鲃在鲃亚科鱼类进化史上属于较早出现的鱼类, 染色体数为原始的数目类型, 鲃亚科其他属的鱼类独立发生多倍化。上述结果为四带小鲃的繁殖和遗传改良研究提供了基础资料。

关键词: 四带小鲃; DNA 含量; 染色体; 胚胎发育; 系统发育

中图分类号: Q 954.4; S 917.4

文献标志码: A

四带小鲃 (*Puntius tetrazona*), 俗称虎皮鱼, 隶属于鲤科 (Cyprinidae)、鲃亚科 (Barbinae)、小鲃属 (*Puntius*), 是一种小型热带鱼类, 原产于印度尼西亚的加里曼丹岛和苏门答腊岛。四带小鲃成鱼体长 5~6 cm, 身形高扁, 体侧 4 道黑色斑纹纵向贯穿浅棕色躯体, 整个胸鳍、腹鳍及背鳍边缘为鲜艳橘红色, 性成熟雌、雄个体体色呈现差异, 因其体表远看似虎皮而得名虎皮鱼 (图 1)。四带小鲃因其活泼好动、颜色艳丽和易饲养等特点受到市场的欢迎, 是一种具有良好养殖前景和经济价值的观赏鱼。四带小鲃个体较小、体外受精、胚胎透明、发育时间短、产卵多、性成熟期约为 6 个月, 全年可繁殖, 因此也是一种具有良好发展前景的模式生物^[1-2]。



图 1 四带小鲃性成熟雌、雄鱼形态比较

(a) 雌性四带小鲃, 腹部膨大, 卵粒隐约可见; (b) 雄性四带小鲃, 吻部为鲜红“婚姻色”

Fig. 1 Morphological comparison between the sexually mature male and female *P. tetrazona*

(a) female *P. tetrazona*, the abdomen is swollen and the oocytes are faintly visible; (b) male *P. tetrazona*, the coloration of snout is red

目前, 对于四带小鲃的研究报道较少, 国内外学者的研究主要集中在养殖和繁殖条件^[3]、病

收稿日期: 2019-04-05 修回日期: 2019-11-23

资助项目: 中国水产科学院黄海水产研究所基本科研业务费专项 (20603022018004)

通信作者: 任建峰, jfren@shou.edu.cn

理观察^[2,4]和毒性胁迫^[5]等方面。对四带小鲃胚胎发育、DNA含量和染色体倍性等基础生物学的详细报道较少。本实验通过对四带小鲃胚胎发育过程、DNA含量、染色体数目及系统进化地位等方面进行了研究,以期丰富其基础生物学资料,为繁殖和遗传改良研究提供基础资料。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

本研究所用的四带小鲃种鱼均来自上海市青浦区淀山湖现代农业示范园6月龄性成熟鱼。DNA含量测定对照所用的公鸡(*Gallus gallus domesticus*)和草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)购自上海市浦东新区古棕路农贸市场;斑马鱼(*Danio rerio*)为本实验室购自中国科学院生物化学与细胞生物学研究所野生型AB品系斑马鱼后代。

1.2 胚胎发育观察

挑选生殖色艳丽和追逐现象明显的种鱼作为亲本,一雌一雄于孵化盒分开避光处理15 h,次日拔掉隔板收集受精卵,繁殖水温28℃,纯净水:养殖水=1:1($V:V$)。受精卵收集于直径90 mm一次性培养皿中,放置于恒温培养箱,温度控制在(28±1)℃,静水孵化。每次取30枚受精卵作为样本,按50%受精卵为同一发育时期时间统计胚胎发育时序,使用显微镜(Zeiss, Axio Imager2)拍照记录胚胎发育过程。

1.3 DNA含量测定

四带小鲃DNA含量的测定以公鸡血细胞(DNA标准含量为2.30 pg/2c)作为对照标准^[6-9],以草鱼和斑马鱼作为阳性二倍体对照。按十分之一采血量的比例用一次性注射器吸入肝素钠溶液,从鸡翼静脉和草鱼尾静脉取血,四带小鲃和斑马鱼采用断尾取血法^[10]。使用磷酸盐缓冲溶液(PBS)悬浮血细胞,300 r/min离心5 min,去上清液重复洗涤2次;重悬后使用40 μm的细胞筛过滤,利用全自动细胞计数分析仪(Nexcelom)计数,制备 1×10^6 个/mL血细胞悬液,加入1 mL预冷的70%乙醇于-20℃固定过夜。取固定样本,离心弃上清液,使用预冷PBS洗涤2次,最后加入1 mL的DNA染液[10 μL Triton-X 100, 200 μL 1 mg/mL的碘化丙啶(propidium iodide, PI), 2 mg RNase, 9.79 mL PBS]处理30 min,使用流式细胞仪(BD Accuri™ C6 Plus)上机检测,

通过NovoExpress软件分析处理实验数据,计算样本 G_0/G_1 (G_0 为细胞离开细胞周期并停止分裂的时期; G_1 为DNA合成前期)期细胞的平均荧光强度。因草鱼DNA含量与公鸡DNA含量较为接近,故采用外定标法测定物种DNA含量^[11]。DNA含量(P , pg/2c)计算公式:

$$P = 2.3 \times X / H$$

式中, X 为实验鱼外周血 G_0/G_1 期细胞DNA荧光强度, H 为公鸡外周血 G_0/G_1 期细胞DNA荧光强度。

1.4 染色体的制备

参照张四名^[12]和周丽青等^[13]小鱼游泳法制备染色体。取5~10条体长为1~2 cm四带小鲃幼鱼浸泡在盛有0.01%秋水仙素溶液的培养器皿中,让其游动4 h;剪取鳃和鳍条分成3份,分别放入0.038、0.050和0.075 mol/L KCl溶液中低渗50 min,以摸索最佳低渗液浓度;低渗结束后将组织转入预冷的卡诺氏固定液($V_{乙醇}:V_{冰醋酸}=3:1$),置于冰箱中固定,每隔15 min更换1次固定液,更换固定液3~4次后静置4℃冰箱中;将固定样品挑入1.5 mL离心管中,加入0.5 mL的预冷解离液(50%冰醋酸),解离30 min;采用热滴法滴片,风干后使用10%的吉姆萨染液染色,清水冲洗,晾干后镜检。

1.5 线粒体基因组测序及系统进化分析

根据天根生化科技(北京)有限公司DNA快速提取试剂盒说明书,提取四带小鲃基因组DNA。采用NanoDrop 2000c微量分光光度计检测DNA浓度,2%琼脂糖凝胶电泳检测DNA的质量。对野生型四带小鲃和2种体色(金色和绿色)突变体的线粒体基因组进行测序,测序工作由上海迈浦生物科技有限公司进行。从NCBI数据库下载鲃亚科等多个物种线粒体基因组序列,利用线粒体13个编码蛋白的氨基酸序列构建系统进化树。将每个物种的13个蛋白序列串联,利用Clustal W在线软件进行多重序列比对,然后使用MEGA 7软件构建系统进化树。选择Jones-Taylor-Thornton(JTT)模型,利用NJ法构建系统进化树,Bootstrap值为1 000次抽样结果。

2 结果

2.1 四带小鲃胚胎发育

四带小鲃受精卵为圆球形沉性卵,微黏性,透明易于观察。受精卵直径约1.15~1.20 mm。受

精后 10 min 原生质开始聚集形成隆起, 此时即为 1 细胞期; 此后约 10 min 分裂 1 次, 其胚胎发育过程分为卵裂前期、卵裂期、囊胚期、原肠期、神经胚期、器官形成期和出膜期, 共 7 个时期。幼鱼出膜后未形成色素, 身体透明, 具有较大的卵黄囊, 沉于水体底部, 贴壁发育。胚胎发育形态变化和发育时序见表 1 和图版。

2.2 四带小鲃 DNA 含量测定

以 PI 作为荧光染料, 选用公鸡血细胞 DNA 含量作为标准二倍体参照, 草鱼和斑马鱼血细胞 DNA 含量作为阳性二倍体参照, 使用流式细胞仪测定四带小鲃外周血 DNA 含量。公鸡、草鱼、斑马鱼和四带小鲃 G₀/G₁ 期细胞荧光强度直方图显示, 斑马鱼 DNA 含量最高, 四带小鲃的

DNA 含量最低(图 2)。公鸡、草鱼、斑马鱼和四带小鲃 G₀/G₁ 期细胞的平均荧光强度值分别为 97 849.8、92 535.1、142 337.2 和 63 699.3。以公鸡血细胞 DNA 含量的绝对值 2.30 pg/2c 作为标准, 计算出草鱼 DNA 含量为 2.18 pg/2c, 斑马鱼为 3.35 pg/2c, 四带小鲃为 1.50 pg/2c(表 2), 四带小鲃的 DNA 含量最低。

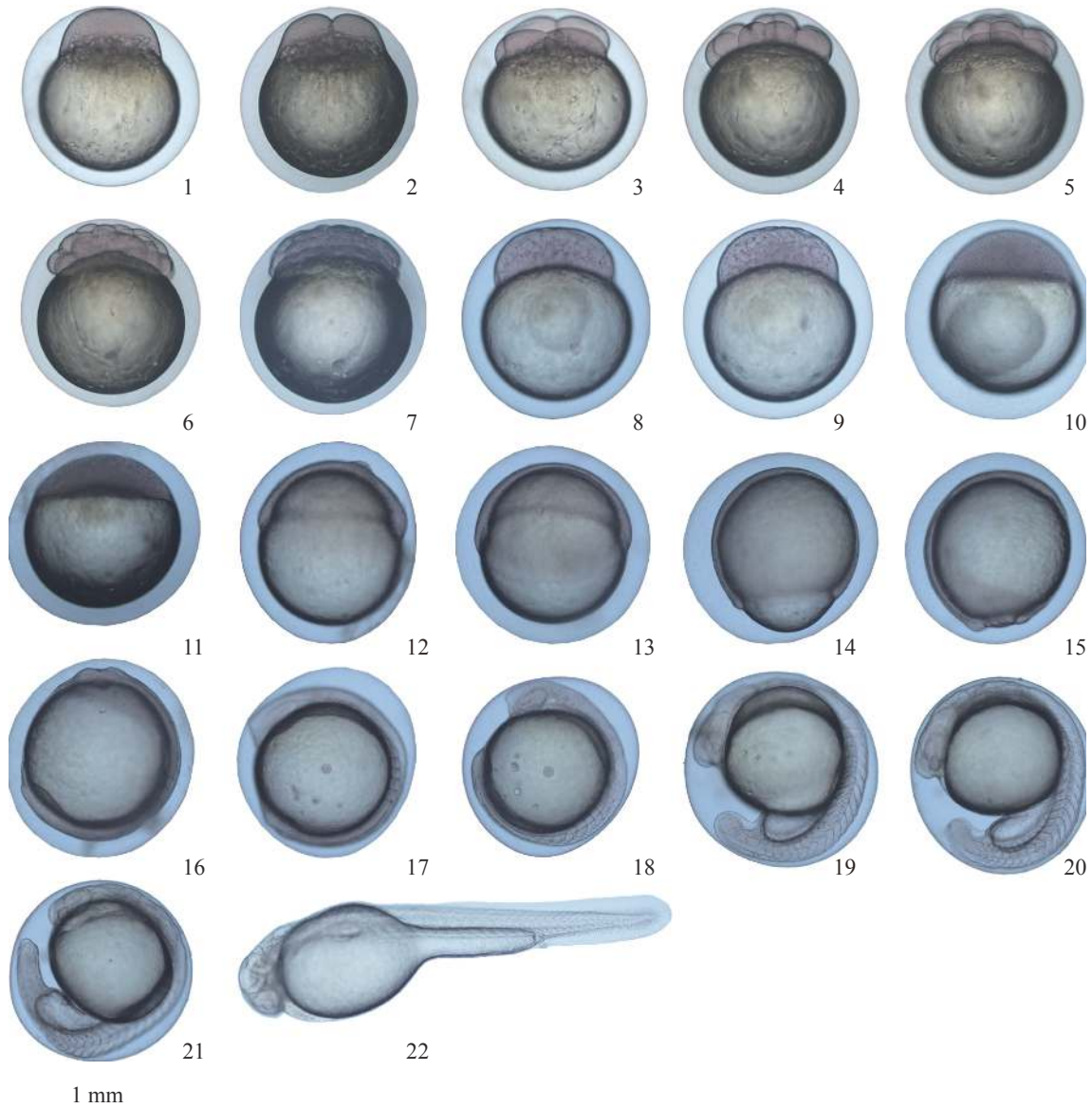
2.3 染色体数目分析

3 个低渗液浓度以 0.050 mol/L KCl 低渗效果为佳, 0.038 mol/L KCl 低渗的分裂相多, 但染色体丢失严重; 0.075 mol/L KCl 低渗的分裂相较少, 且染色体分散效果不好。在光学显微镜油镜下观察四带小鲃染色体形态偏小, 最大的染色体长约 2 μm(图 3)。共统计 161 个染色体中期分裂

表 1 四带小鲃胚胎发育时序 [(28±1) °C]

Tab. 1 Features of embryonic development of *P. tetrazona* [(28±1) °C]

发育时期 developmental period	发育阶段 developmental stage	主要特征 main features	发育时间 developmental time	图版 image
卵裂前期 fertilized egg	1细胞期	原生质向动物极移动, 形成突起的胚盘	0	1
卵裂期 cleavage stage	2细胞期	胚盘纵裂, 分为2个大小均等的细胞	10 min	2
	4细胞期	2细胞纵裂为4细胞	21 min	3
	8细胞期	4细胞纵裂为8细胞	34 min	4
	16细胞期	8细胞纵裂为16细胞	47 min	5
	32细胞期	16细胞纵列为32细胞, 此为经裂	1 h 01 min	6
	64细胞期	细胞纬裂分为大小、形状不规则的2层	1 h 11 min	7
	多细胞期	细胞不断在动物极分裂累积如桑葚	1 h 31 min	8
囊胚期 blastula stage	囊胚早期	卵黄上大量的细胞聚集, 胚层隆起较高	2 h 05 min	9
	囊胚中期	细胞继续分裂, 胚层高度降低	3 h 20 min	10
	囊胚晚期	胚层向四周扩散, 变得扁平	4 h 27 min	11
原肠期 gastrula stage	原肠早期	胚层下包卵黄1/3, 胚环出现	5 h 20 min	12
	原肠中期	胚层下包卵黄1/2, 胚盾出现	6 h 17 min	13
	原肠晚期	胚层下包卵黄3/4	7 h 24 min	14
神经胚期 neurula stage	神经胚期	胚体一端加厚, 出现胚体雏形和卵黄栓	8 h 22 min	15
	胚孔封闭期	胚层封闭, 脊索柱状, 前部有明显凹槽	9 h 03 min	16
器官形成期 organogenesis stage	肌节出现期	身体中部形成多个肌节	9 h 41 min	17
	眼基出现期	胚体前出现眼囊	10 h 52 min	18
	尾芽期	尾部出现尾芽, 与卵黄分离	12 h 20 min	19
	耳石形成期	胚体脑后方出现耳石1对	14 h 34 min	20
	肌肉效应期	胚胎时而扭动	15 h 09 min	21
出膜期 hatching stage	出膜	胚胎在膜内剧烈扭动, 尾部先出膜	23 h 56 min	22



图版 四带小鲃胚胎发育过程

1. 1细胞期; 2. 2细胞期; 3. 4细胞期; 4. 8细胞期; 5. 16细胞期; 6. 32细胞期; 7. 64细胞期; 8. 多细胞期; 9. 囊胚早期; 10. 囊胚中期; 11. 囊胚晚期; 12. 原肠胚早期; 13. 原肠胚中期; 14. 原肠胚晚期; 15. 神经胚期; 16. 胚孔封闭期; 17. 肌节出现期; 18. 眼基出现期; 19. 尾芽期; 20. 耳石出现期; 21. 肌肉效应期; 22. 出膜期

Plate Embryonic development of *P. tetrazona*

1. 1-cell stage; 2. 2-cell stage; 3. 4-cell stage; 4. 8-cell stage; 5. 16-cell stage; 6. 32-cell stage; 7. 64-cell stage; 8. multicellular stage; 9. early blastula stage; 10. mid blastula stage; 11. late blastula stage; 12. early gastrula stage; 13. mid gastrula stage; 14. late gastrula stage; 15. neurula stage; 16. blastopore closed stage; 17. metameres appearance; 18. optic vesicle stage; 19. tail bud stage; 20. otoliths formed stage; 21. muscle effector phase; 22. hatching stage

相, 并对染色体数目进行计数(表3)。分析结果显示, 染色体数目 $2n=50$ 的分裂相数目占统计分裂相数目的46.6%, 鉴定四带小鲃染色体数目为 $2n=50$ 。

2.4 四带小鲃线粒体基因组及系统进化分析

测序结果显示, 3种体色四带小鲃线粒

体基因组序列一致, 线粒体DNA(mtDNA)全长16 570 bp, 碱基组成为A 32.8%、T 27%、C 25%和G 15.2%, A+T的碱基含量(59.8%)远大于C+G的含量(40.2%), 具有AT偏好性, 与典型的脊椎动物mtDNA组成相似。与Genbank数据库中四带小鲃线粒体基因组(NC_010110)序列相似性为99.95%, 与其相比, 在*l-rRNA*、*tRNA*-

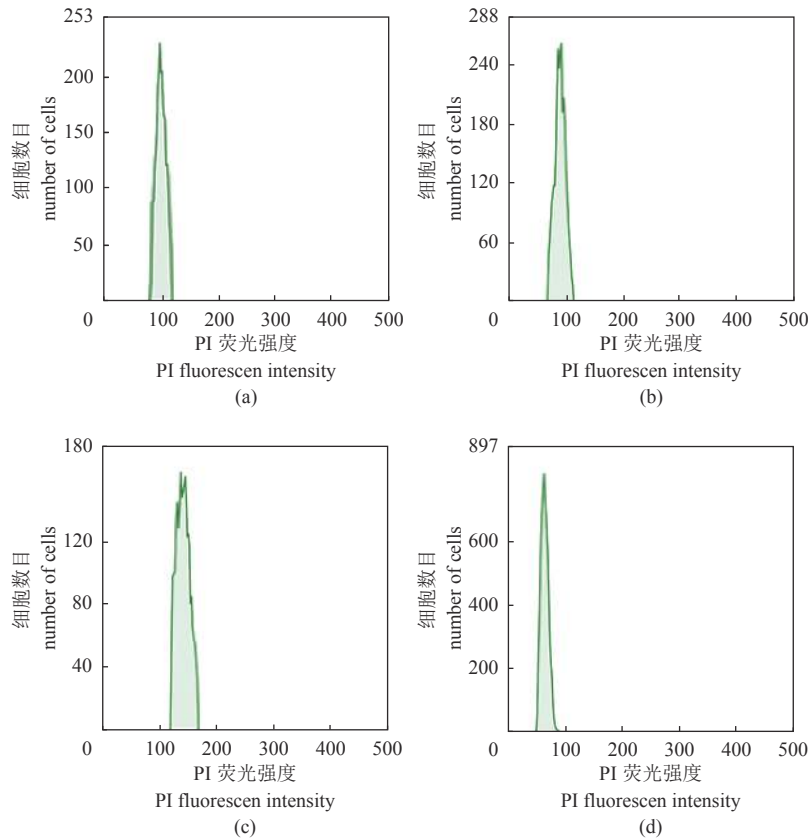


图 2 公鸡 (a)、草鱼 (b)、斑马鱼 (c) 和四带小鲃 (d) G₀/G₁ 期血细胞 DNA 荧光强度直方图

Fig. 2 Fluorescence intensity histogram of blood cells at G₀/G₁ phase. *G. gallus* (a), *C. idella* (b), *D. rerio* (c) and *P. tetrazona* (d)

表 2 四带小鲃 DNA 含量测定值

Tab. 2 DNA content of *P. tetrazona*

物种 species name	G ₀ /G ₁ 期细胞 荧光强度 fluorescence intensity of G ₀ /G ₁ phase cell	比值 (鱼/鸡) ratio (fish/rooster)	DNA 含量/ (pg/2c) DNA content
公鸡 <i>G. gallus</i>	97 849.8	-	2.30±0.00
草鱼 <i>C. idella</i>	92 535.1	0.946	2.18±0.04
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	142 337.2	1.455	3.35±0.08
四带小鲃 <i>P. tetrazona</i>	63 699.3	0.651	1.50±0.05

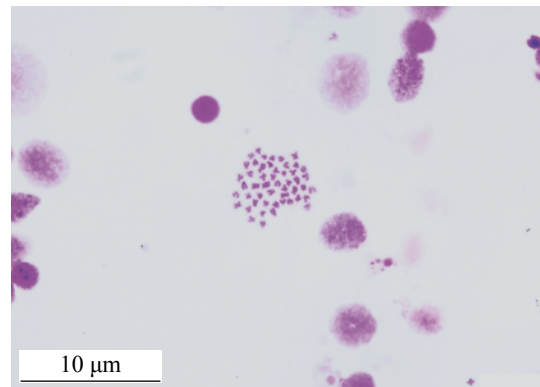


图 3 四带小鲃染色体中期分裂相

Fig. 3 Metaphase of chromosomes in *P. tetrazona*

Met、*ND2*、*ND5*、*CYTB* 和 *D-Loop* 等区域出现 8 处单核苷酸多态性 (SNP)，且 *D-Loop* 区序列长度多 20 bp。

进化树分析中，以斑马鱼为外群。分析结果显示，金线鲃属 (*Sinocyclocheilus*) 和小鲃属分支聚为一类，再与裂腹鱼属 (*Schizothorax*) 分支聚类，然后再与光唇属 (*Acrossocheilus*) 聚类，最后又与小鲃属另外 2 个物聚类，四带小鲃则出现在进化树的根部 (图 4)。

3 讨论

3.1 四带小鲃胚胎发育

四带小鲃胚胎发育与其他鲤科鱼类如斑马鱼相似，胚胎发育过程分为卵裂前期、卵裂期、囊胚期、原肠胚期、神经胚期、器官形成期和出膜期 7 个阶段。除有相似外，也有几点不同：

表 3 四带小鲃染色体数目

Tab. 3 Chromosome number of *P. tetrazona*

	染色体数量/条 chromosome number				
	46	47	48	49	50
分裂相数/个 metaphase number	14	21	29	22	75
出现频率/% frequency of occurrence	8.7	13.0	18.0	13.7	46.6

①四带小鲃胚胎发育较快, 在 28 °C 孵化条件下, 四带小鲃 24 h 即可出膜, 而斑马鱼则需要 48 h; ②四带小鲃受精卵微黏性, 斑马鱼受精卵不具有黏性; ③四带小鲃出膜时无色素形成, 而斑马鱼出膜时已经开始形成色素; ④四带小鲃卵黄囊比例大于斑马鱼^[14]。

斑马鱼因其各方面的优点, 被作为多种实验的模式生物, 常被用来研究早期器官的发生和发育, 而色素的形成会影响早期器官发育的观察, 化学试剂如 1-苯基-2-硫脲 (1-pheny-2-thiourea, PTU) 能够有效抑制色素形成, 但会对胚胎发育造成影响。四带小鲃因早期胚胎发育迅速、色素形成较晚等特点, 因此可作为研究鱼类早期器官发育的材料。

3.2 四带小鲃 DNA 含量和染色体数目及进化

DNA 包含了一个物种全部的遗传信息, 每

个物种细胞核中的 DNA 含量是一定的, 具有物种特异性^[15]。在近缘物种中, DNA 含量可以作为探讨进化地位的依据^[16], DNA 含量可以反映出该物种的基因组大小和倍性关系。因流式细胞仪测定 DNA 含量的方法具有准确和快速的优点而被广泛应^[17-22]。在测定鱼类基因组 DNA 过程中, 不同课题组所测定的结果会有一些的差异^[23]。差异产生的原因有很多, 主要由流式细胞仪、荧光染料^[24]、对样品^[25-26]及绝对 DNA 含量标准的不同所造成^[25, 27]。鱼类 DNA 含量检测都是采血检测, 小型鱼类的采血较困难, 本研究参照 Zang 等^[10]采用断尾取血法, 采血效果较好。

以公鸡血细胞 DNA 含量 (2.30 pg/2c) 作为标准, 以常见的草鱼和斑马鱼作为阳性二倍体对照, DNA 含量测定结果显示, 草鱼 DNA 含量为 2.18 pg/2c, 与范兆廷等^[15]和肖亚梅等^[28]检测结果一致。斑马鱼的 DNA 含量为 3.35 pg/2c, 与 Hinegardner^[29]、Vinogradov^[30]和 Ciudad 等^[31]检测结果差距较小, 其测定的斑马鱼 DNA 含量分别为 3.50、3.60 和 3.36 pg/2c。四带小鲃 DNA 含量测定结果为 1.50 pg/2c, 与 Vinogradov^[30](1.49 pg/2c)、Wolf 等^[32](1.40 pg/2c) 和 Ohno 等^[33](1.42 pg/2c) 结

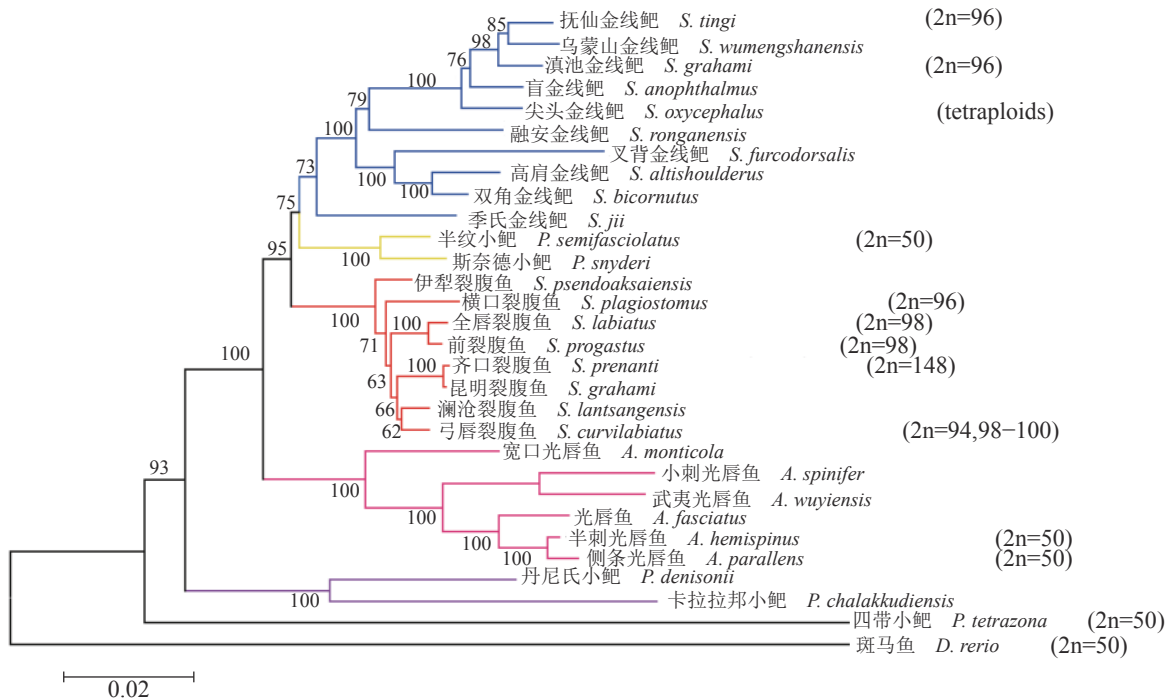


图 4 基于线粒体 13 个编码蛋白序列构建的部分鲃亚科鱼类系统进化树
Fig. 4 Phylogenetic tree of fish in partial Barbinae subfamily constructed with the protein sequences of 13 mtDNA protein-coding genes

果相近,比 Hinegardner 等^[34](1.92 pg/2c) 和 Suzuki 等^[35](2.00 pg/2c) 测定的含量低。四带小鲃染色体形态偏小与其 DNA 含量偏低是相对应的。四带小鲃 DNA 含量的精确测定,为该物种基因组解析和基因组组装效果的评估提供依据。

硬骨鱼类经过第三次全基因组加倍事件后,鲤科鱼类中又发生了谱系特异的基因组加倍事件,因此鲤科鱼类包含了多种染色体组型,如 2n、4n、6n 和 8n。染色体 2n=50 是鲤科鱼类中最为原始的一类核型,进化过程中基因组加倍,造成染色体多倍化,染色体数目为 2n=100,再由染色体易位或者着丝点融合特化成其他类型^[36]。鲃亚科中的鱼类四倍体占多数,甚至是六倍体(图 4),如滇池金线鲃和抚仙金线鲃染色体数为 2n=96,全唇裂腹鱼和前裂腹鱼染色体数为 2n=98,齐口裂腹鱼染色体数为 2n=148 等^[37]。本实验结果显示,四带小鲃染色体数目为 2n=50,与 Ohno 等^[38]的结果一致,但不同于 Post^[39]的结果(2n=48),可能是其统计的分裂相数目较少的原因为。四带小鲃染色体数目属于原始的染色体类型,在第三次基因组加倍事件后未发生全基因组复制事件。四带小鲃染色体数目与斑马鱼相同,基因组编码基因数目相近,因此,斑马鱼基因组信息可以为四带小鲃的研究提供参考。

四带小鲃胚胎发育快速,基因组较小,是典型的二倍体鱼类,未发生谱系特异性的基因组加倍事件。本研究结果为四带小鲃基因克隆、基因操作和遗传改良研究奠定基础。

参考文献 (References):

- [1] Wang F, Wang X G, Liu C, *et al.* Transparent tiger barb *Puntius tetrazona*, a fish model for *in vivo* analysis of nocardial infection[J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 211: 67-73.
- [2] Li K B, Chang O Q, Wang F, *et al.* Ultrastructure, development, and molecular phylogeny of *Pleistophora hyphessobryconis*, a broad host microsporidian parasite of *Puntius tetrazona*[J]. *Parasitology Research*, 2012, 111(4): 1715-1724.
- [3] 洪松柏, 巫绍明, 刘顺宇. 不同繁殖条件对虎皮鱼受精卵数量的影响[J]. *现代农业科技*, 2012(12): 251-252, 255.
Hong S B, Wu S M, Liu S Z. Influences of different reproduction factors on quantity of *Barbus tetrazonas'* spawns[J]. *Modern Agricultural Sciences and Technology*, 2012(12): 251-252, 255(in Chinese).
- [4] Li K B, Chang O Q, Wang F, *et al.* Identification of a transparent mutant tiger barb *Puntius tetrazona* and its use for *in vivo* observation of a *Pleistophora* sp. (Microsporidia) infection[J]. *Journal of Fish Biology*, 2012, 80(7): 2393-2404.
- [5] Domínguez-Castanedo O, Toledano-Olivares Á, Martínez-Espinosa D, *et al.* Morphological changes in gametes of tiger barb *Puntius tetrazona* (Cypriniformes: Cyprinidae) and the implementation of *in vitro* fertilization[J]. *Revista de Biología Tropical*, 2014, 62(4): 1353-1363.
- [6] Zhu D, Song W, Yang K, *et al.* Flow cytometric determination of genome size for eight commercially important fish species in China[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology- Animal*, 2012, 48(8): 507-517.
- [7] Jakobsen A. The use of trout erythrocytes and human lymphocytes for standardization in flow cytometry[J]. *Cytometry*, 1983, 4(2): 161-165.
- [8] Vindeløv L L, Christensen I J, Nissen N I. Standardization of high-resolution flow cytometric DNA analysis by the simultaneous use of chicken and trout red blood cells as internal reference standards[J]. *Cytometry*, 1983, 3(5): 328-331.
- [9] Vindeløv L, Christensen I J. An integrated set of methods for routine flow cytometric DNA analysis[J]. *Methods in Cell Biology*, 1990, 33: 127-137.
- [10] Zang L Q, Shimada Y, Nishimura Y, *et al.* A novel, reliable method for repeated blood collection from aquarium fish[J]. *Zebrafish*, 2013, 10(3): 425-432.
- [11] Birstein V J, Poletaev A I, Goncharov B F. DNA content in eurasian sturgeon species determined by flow cytometry[J]. *Cytometry*, 1993, 14(4): 377-383.
- [12] 张四明. 一种制备鱼类染色体的新方法[J]. *遗传*, 1993, 15(3): 35-36.
Zhang S M. A new method for fish chromosomes preparation[J]. *Hereditas*, 1993, 15(3): 35-36(in Chinese).
- [13] 周丽青, 杨爱国, 柳学周, 等. 半滑舌鲷染色体核型分析[J]. *水产学报*, 2005, 29(3): 417-419.
Zhou L Q, Yang A G, Liu X Z, *et al.* The karyotype of the tonguefish *Cynoglossus semilaevis*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(3): 417-419(in Chinese).
- [14] Kimmel C B, Ballard W W, Kimmel S R, *et al.* Stages of 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- embryonic development of the zebrafish[J]. *Developmental Dynamics*, 1995, 203(3): 253-310.
- [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.
Fan Z T, Yin H B, Song S X, *et al.* DNA content from thirteen species of cultured freshwater fishes in China[J]. *Journal of Fisheries of China*, 1995, 19(4): 322-326(in Chinese).
- [16] 朱蓝菲, 桂建芳. 四类不同倍性鲫鱼在胚胎发育期间同工酶基因表达的比较分析[J]. *实验生物学报*, 1998, 31(4): 369-376.
Zhu L F, Gui J F. Comparative studies on gene expression of isozymes in 4 types of various ploidy crucian carp during embryogenesis[J]. *Acta Biologicae Experimentalis Sinica*, 1998, 31(4): 369-376(in Chinese).
- [17] 杨坤, 祝东梅, 张新辉, 等. 麦穗鱼不同组织DNA含量及细胞周期的分析研究[J]. *中国农学通报*, 2012, 28(32): 113-118.
Yang K, Zhu D M, Zhang X H, *et al.* Analysis of DNA contents and cell cycle of different tissues of *Pseudorasbora parva*[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28(32): 113-118(in Chinese).
- [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含量的测定与比较[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2007, 46(1): 146-148.
Fang L P, Zhang F H, Cao W Q, *et al.* Measurement and comparison of cellular DNA contents between *Metapenaeus ensis* and *Marsupenaeus japonicus* (Decapoda: Crustacean)[J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2007, 46(1): 146-148(in Chinese).
- [19] 王昭萍, 高凌云, 于瑞海, 等. 双壳纲八种贝类的核DNA定量分析及其与进化地位关系的初步探讨[J]. *中国海洋大学学报*, 2007, 37(4): 576-580.
Wang Z P, Gao L Y, Yu R H, *et al.* Quantitative analysis of DNA contents of eight species belonging to bivalvia and primary discussion on the relationship between C-values and evolutionary degrees[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2007, 37(4): 576-580(in Chinese).
- [20] 弓娜, 田新民, 周香艳, 等. 流式细胞术在植物学研究中的应用—检测植物核DNA含量和倍性水平[J]. *中国农学通报*, 2011, 27(9): 21-27.
Gong N, Tian X M, Zhou X Y, *et al.* Applications of flow cytometry in plant research-analysis of nuclear DNA content and ploidy level in plant cells[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2011, 27(9): 21-27(in Chinese).
- [21] 李诗琦, 张程, 高信芬. 应用流式细胞术测定17种中国野生蔷薇核DNA含量[J]. *植物科学学报*, 2017, 35(4): 558-565.
Li S Q, Zhang C, Gao X F. Estimation of nuclear DNA content of 17 Chinese wild rose species by flow cytometry[J]. *Plant Science Journal*, 2017, 35(4): 558-565(in Chinese).
- [22] 薛卫国, 孙洁, 薛子超, 等. 流式细胞术检测鼻腔鼻窦肿瘤细胞周期的DNA分析[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2008, 14(3): 169-172.
Xue W G, Sun J, Xue Z C, *et al.* Flow cytometric analysis of DNA index and cell cycle in rhinosinusal neoplasm[J]. *Chinese Journal of Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery*, 2008, 14(3): 169-172(in Chinese).
- [23] Lamatsch D K, Steinlein C, Schmid M, *et al.* Noninvasive determination of genome size and ploidy level in fishes by flow cytometry: detection of triploid *Poecilia formosa*[J]. *Cytometry*, 2000, 39(2): 91-95.
- [24] 祝东梅, 杨坤, 王卫民, 等. 中国胭脂鱼的细胞遗传学分析[J]. *中国水产科学*, 2013, 20(3): 682-688.
Zhu D M, Yang K, Wang W M, *et al.* Cytogenetic analysis of Chinese sucker *Myxocyprinus asiaticus*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(3): 682-688(in Chinese).
- [25] 薛淑群, 尹洪滨, 尹家胜. 哲罗鱼(*Hucho taimen*)染色体组型与DNA含量分析[J]. *广东海洋大学学报*, 2010, 30(3): 6-10.
Xue S Q, Yin H B, Yin J S. Analysis on chromosome and DNA content of *Hucho taimen*[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2010, 30(3): 6-10(in Chinese).
- [26] 耿波, 孙效文. 流式细胞术在水生生物DNA含量和倍性分析中的应用[J]. *水产学杂志*, 2008, 21(2): 21-24.
Geng B, Sun X W. The application of Flow cytometry on the DNA content and ploidy analysis of hydrophilic organisms[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2008, 21(2): 21-24(in Chinese).
- [27] 徐钢春, 董晶晶, 聂志娟, 等. 刀鲚不同组织的乳酸脱氢酶同工酶及DNA含量研究[J]. *上海海洋大学学报*, 2012, 21(4): 481-488.
Xu G C, Dong J J, Nie Z J, *et al.* Studies on lactate dehydrogenase isozymes and DNA content in different

- tissues of *Coilia nasus*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2012, 21(4): 481-488(in Chinese).
- [28] 肖亚梅, 罗琛, 刘筠, 等. 人工雌核发育草鱼染色体倍性的鉴定[J]. 生命科学研究, 2001, 5(4): 290-293.
Xiao Y M, Luo C, Liu Y, *et al.* Ploidy analysis of the gynogenetic grass carps[J]. *Life Science Research*, 2001, 5(4): 290-293(in Chinese).
- [29] Hinegardner R. Evolution of cellular DNA content in teleost fishes[J]. *The American Naturalist*, 1968, 102(928): 517-523.
- [30] Vinogradov A E. Genome size and GC-percent in vertebrates as determined by flow cytometry: the triangular relationship[J]. *Cytometry*, 1998, 31(2): 100-109.
- [31] Ciudad J, Cid E, Velasco A, *et al.* Flow cytometry measurement of the DNA contents of G₀/G₁ diploid cells from three different teleost fish species[J]. *Cytometry*, 2002, 48(1): 20-25.
- [32] Wolf U, Ritter H, Atkin N B, *et al.* Polyploidization in the fish family *Cyprinidae*, order *Cypriniformes*[J]. *Humangenetik*, 1969, 7(3): 240-244.
- [33] Ohno S, Muramoto J, Christian L, *et al.* Diploid-tetraploid relationship among old-world members of the fish family *Cyprinidae*[J]. *Chromosoma*, 1967, 23(1): 1-9.
- [34] Hinegardner R, Rosen D E. Cellular DNA content and the evolution of teleostean fishes[J]. *The American Naturalist*, 1972, 106(951): 621-644.
- [35] Suzuki A, Taki Y, Mochizuki M, *et al.* Chromosomal speciation in Eurasian and Japanese Cyprinidae (Pisces, Cypriniformes)[J]. *Cytobios*, 1995, 83(334): 171-186.
- [36] 罗旭光. 达赉湖四种鲤科野生经济鱼类染色体组型研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2006.
Luo X G. Studies on chromosomes karyotype of four species of wild *Culter erythropterus* Basilewsky in Dalai Lake[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2006(in Chinese).
- [37] Yang L, Sado T, Hirt M V, *et al.* Phylogeny and polyploidy: resolving the classification of cyprinine fishes (Teleostei: Cypriniformes)[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2015, 85: 97-116.
- [38] Ohno S, Wolf U, Atkin N B. Evolution from fish to mammals by gene duplication[J]. *Hereditas*, 1968, 59(1): 169-187.
- [39] Post V A. Vergleichende untersuchungen der chromosomenzahlen hei süßwasser-teleosteern[J]. *Journal of Zoological Systematics Evolutionary Research*, 1965, 3(1-2): 47-93.

Embryonic development and phylogenetic analysis of *Puntius tetrazona*

CUI Wenyao^{1,2,3}, ZHOU Liqing⁴, YANG Jihui^{1,2,3}, XIONG Jiafeng^{1,2,3},
LI Weiming⁵, REN Jianfeng^{1,2,3*}

(1. International Research Center for Marine Biosciences, Ministry of Science and Technology,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

4. Yellow Sea Fisheries Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Ministry of Agriculture and Rural Sciences Key Laboratory of
Sustainable Development of Marine Fisheries, Qingdao 266071, China;

5. Department of Fisheries and Wildlife, Michigan State University, East Lansing 48824, USA)

Abstract: *Puntius tetrazona* is a small tropical ornamental fish with high economic value. In this study, the process of embryonic development was observed. The chromosome number and DNA content of *P. tetrazona* were detected with the small fish swimming method and the flow cytometry. Meanwhile, the phylogenetic analysis of the Barbinae subfamily was performed with mitochondrial genome sequences. The results showed that the embryonic development process of *P. tetrazona* was classified into 7 stages, including the fertilized egg stage, cleavage stage, blastocyst stage, gastrula stage, neurula stage, organogenesis stage and hatching stage. Compared to zebrafish which hatched out 48 hours post fertilization (hpf) with pigment, *P. tetrazona* hatched 24 hpf at the water temperature of 28 °C without pigment. The chromosome number and DNA content of *P. tetrazona* are $2n=50$ and 1.50 pg/2c, respectively. The phylogenetic tree showed that *P. tetrazona* appeared earlier during the speciation of the Barbinae subfamily. These results will provide the basis for *P. tetrazona* breeding and genetic improvement.

Key words: *Puntius tetrazona*; DNA content; chromosome; embryonic development; phylogeny

Corresponding author: REN Jianfeng. E-mail: jfren@shou.edu.cn

Funding projects: Special Funding Project for Basic Research Business Fees of Yellow Sea Fisheries Research Institute of Chinese Academy of Fishery Sciences (20603022018004)