

文章编号: 1000-0615(2006)02-0181-04

俄罗斯鲟的细胞遗传学分析

尹洪滨¹, 孙中武², 孙大江¹, 邱岭泉¹

(1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070;

2. 东北林业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

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俄罗斯鲟(*Acipenser gueldenstaedti* Brandt) 的染色体, 对其肾细胞染色体数目统计分析表明, 俄罗斯鲟染色体组由 236 ± 2 条染色体组成, 其中具有明显着丝点的染色体为 120 条, 其余为小染色体(点状染色体); 核型公式为 $80m + 16sm + 24st, t + 116mc, NF = 332$; 采用德国 Partecpas 型流式细胞分析仪, 以鸡红细胞为标准 DNA(含量为 $2.3 \text{ pg} \cdot \text{N}^{-1}$), 测定俄罗斯鲟体细胞 DNA 含量为 $12.24 \text{ pg} \cdot \text{N}^{-1}$, 与染色体分析结果比较倍性一致。综合以上两项结果可得出, 俄罗斯鲟为八倍体鱼。

关键词: 俄罗斯鲟; 核型; DNA 含量; 倍性

中图分类号: S917 **文献标识码:** A

Cytogenetic analysis of *Acipenser gueldenstaedti* Brandt

YIN Hong-bin¹, SUN Zhong-wu², SUN Da-jiang¹, QIU Ling-quan¹

(1. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Harbin 150070, China;

2. Life Scientific College, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: Metaphase chromosome specimens of *Acipenser gueldenstaedti* Brandt injected with PHA and colchicin, were prepared from short-term culture of kidney cells with air-drying technique. Its diploid chromosome number is $2n = 236 \pm 2$. The kinetic bodies of the 120 chromosomes were watched and the others are microchromosome. Karyotype consists of $80m + 16sm + 24st, t + 116mc, NF = 332$. Diploid nucleus DNA content was measured from the somatic cell of *Acipenser gueldenstaedti* Brandt, using flow cytometer (Partec pas made in Germany) and the DNA content ($2.3 \text{ pg} \cdot \text{N}^{-1}$) of erythrocytes of chick (*Gallus* sp) as standard. Its DNA content is $12.24 \text{ pg} \cdot \text{N}^{-1}$, which corresponds with the result measured chromosome number as ploidy. Synthesizing above results, the conclusion was obtained that *Acipenser gueldenstaedti* Brandt is octaploid. Compared with the reports about sturgeons and paddlefishes, the results of this paper were identical with the one measured by Song Shu-xiang *et al.* about *A. schrenckii* (DNA content is $11.73 \text{ pg} \cdot \text{N}^{-1}$; chromosome number is $238 \pm$) using flow cytometer, but is different from the ones of *P. spatula* (3.96 pg), *P. gladius* (4.11 pg), *A. dabryanus* (8.26 pg), *A. schrenckii* (6.07 pg), *A. sinensis* (9.07 pg) by Zhang siming using microspectrophotometer. These differences are relevant to the methods used (flow cytometer or microspectrophotometer), standard DNA (erythrocytes of chick or human lymphocyte) and the DNA absolute content (for example, the DNA absolute content of erythrocytes of chick is 2.3 pg or 3.22 pg).

Key words: *Acipenser gueldenstaedti*; karyotype; DNA content; ploidy

鲟形目(Acipenseriformes)是一类比较原始且又具有较高渔业价值的鱼类,分布在北半球的北美洲和欧亚大陆。全世界鲟鱼类均处于不同程度

的濒危状态,有的种类已近灭绝^[1,2]。俄罗斯鲟(*Acipenser gueldenstaedti* Brandt)主要分布在与前苏联相通的流域中,我国于1999年和2001年从俄

收稿日期: 2004-12-21

资助项目: 科技部科技基础专项基金项目(主要水产养殖品种种质资源收集、整理、保存)

作者简介: 尹洪滨(1954-),女,黑龙江泰来人,研究员,主要从事鳇鱼类细胞遗传学研究。E-mail: hongyinyin@yahoo.com.cn

罗斯引进俄罗斯鲟发眼卵后,遗传多样性分析^[3]和肌肉营养成分分析^[4]等方面的研究已有报道,但关于俄罗斯鲟染色体核型及倍性的细胞遗传学研究方面国内尚无报道。

鲟鱼类的核型构成和进化与我国多见的鲤型目鱼类差异较大,主要区别是染色体数目众多,染色体由大染色体(macrochromosome)和微型染色体也称小染色体(microchromosome)两部分组成^[5,6],是一类多倍体起源的鱼类,以染色体加倍方式形成的。这也意味着通过细胞DNA含量测定便可预测其染色体数目,确定其倍性^[7],以了解其在细胞水平的进化地位。本文报道了俄罗斯鲟的染色体数目,核型和DNA含量,以求在细胞水平上探讨俄罗斯鲟的进化地位,旨在为鲟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

俄罗斯鲟1龄鱼15尾,体重320~400g,采自于中国水产科学研究院北京房山鲟鱼繁育工程技术中心。

1.2 方法

染色体制片 采用活体肾细胞直接制片法制备染色体玻片标本。实验鱼在实验前一周暂养于室内控温、充气水族箱中,水温为18~20℃。按 $10\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 鱼体重胸鳍注射PHA(小牛血清溶解),16~18h后按 $1\sim 2\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 鱼体重注射秋水仙素溶液,2~4h后剪鳃放血,取出肾脏,置于盛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10mL离心管中,以 $1000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心6min,弃掉上清液,加低渗液(0.5%氯化钾)处理40min。

细胞悬液然后用卡诺氏固定液(3倍甲醇:1

倍冰醋酸)固定3次,每次15min,用预先处理好的冰玻片滴片,酒精灯烤干,用4%Giemsa染色液染色20min,自来水冲洗,晾干,观察。

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,确定染色体数目。选择6个数目完整、分散良好和形态清晰的分裂相拍照,放大,按照Levan等^[8]的标准测量染色体的有关参数,做出俄罗斯鲟的染色体核型图。

体细胞DNA含量检测 取实验鱼(7尾)的尾鳍用70%乙醇固定送检。机械法切取待测样品一定量的组织于小培养皿中,加入适量($10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的DAPIP,用手术刀片切碎组织块,振荡器中振荡,用20~40目尼龙丝网过滤悬液1.5~2.0mL于样品管中,样品细胞最终浓度为 $10^5\sim 10^6\text{cell}\cdot\text{mL}^{-1}$,用德国产Partec pas ④型流式分析仪进行样品分析。

每个样品稳定计数为5000个细胞以上。本文以鸡(*Gallus sp.*)红细胞做对照,鸡血细胞为国际上公认的对照标准,其绝对DNA含量按 $2.30\text{pg}\cdot\text{N}^{-1}$ 计算。本试验采用外定标法。外定标法是流式细胞仪开机稳定后首先测定1个鸡血样品,每测定5~10个鱼样品后再测1次鸡血样,如果两次鸡血样数据无误差,则数据可靠,否则重新测定。

2 结果

2.1 俄罗斯鲟体细胞染色体数目

计数88个中期分裂相的染色体数目,结果见表1。俄罗斯鲟的中期分裂相的染色体数目在226~252条,其中在236~240条之间的分裂相相对集中,众数占35.22%,所以认定236~240的中间值为众数染色体。即俄罗斯鲟二倍体染色体数(2n)为 (236 ± 2) ,其中具有明显着丝点的染色体数为120条,其余为小染色体(点状染色体)。

表1 俄罗斯鲟的染色体数分布频率

Tab. 1 The amount and percentage of the chromosome of *A. gueldenstaedti*

染色体数 chromosome no.	226~230	231~235	236~240	241~245	246~252	总数 total
细胞数 cell no.	15	18	31	19	5	88
百分比(%) percentage	17.05	20.45	35.22	21.59	5.68	100

2.2 俄罗斯鲟的核型

根据 Levan 等^[8]的分类标准,对俄罗斯鲟6个中期分裂相进行放大测定,按染色体臂比及相对长度把俄罗斯鲟染色体分为4组:中部着丝点染色体(m)80条、亚中部着丝点染色体(sm)16条、亚端部着丝点染色体(st)和端部着丝点染色体(t)24

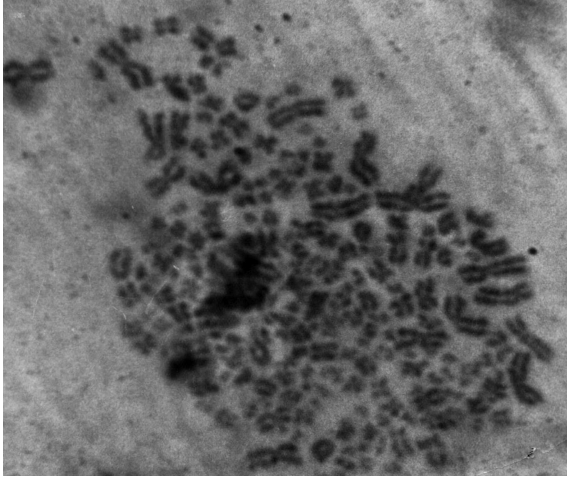


图1 俄罗斯鲟染色体的中期分裂相

Fig. 1 Chromosome of *A. gueldenstaedti*

条、微小染色体(mc)116条。染色体臂数(NF)为 $322 \pm$,其核型公式为 $80m + 16sm + 24st, t + 116mc$, $NF = 322 \pm$ 。俄罗斯鲟染色体的中期分裂相见图1,俄罗斯鲟核型见图2。对7尾俄罗斯鲟体细胞DNA含量进行测定其结果见表2。DNA绝对含量为 $12.24 \text{ pg} \cdot \text{N}^{-1}$ 。

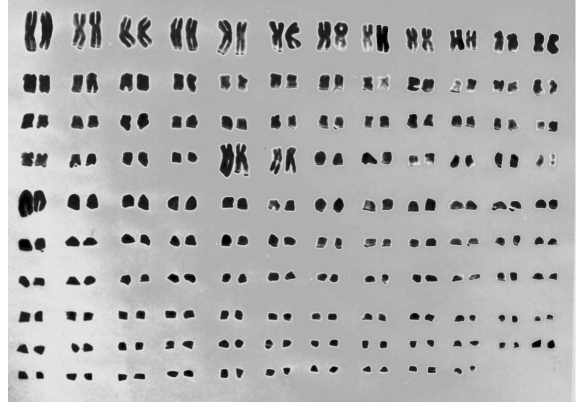


图2 俄罗斯鲟核型

Fig. 2 Karyotype of *A. gueldenstaedti*

3 讨论

鲟鱼类系较古老的生物类群,在进化过程中处于较原始的阶段,然而全面系统地从事不同层次开展鲟鱼类的系统演化研究是很有意义的。用细胞遗传学方法研究鲟鱼类系统演化是其中之一。

鲟鱼染色体数是迄今研究报道较多的鱼类,如中华鲟(*A. sinensis*)^[5]染色体数达 $264 \pm$,而且具有相当数量的小染色体。本研究共计数俄罗斯鲟88个中期分裂相的染色体数目,认定俄罗斯鲟二倍体染色体数($2n$)为 (236 ± 6) ,其中具有明显着丝点的染色体数为120条,其余为小染色体(点状染色体)。鲟鱼类是多倍体起源的鱼类,其染色体数60为其原始核型,120为其四倍体,240为八倍体,因此,俄罗斯鲟是染色体数为 236 ± 2 的八倍体;其中部着丝点染色体(m)80条、亚中部着丝点染色体(sm)16条、亚端部着丝点染色体(st)和端部着丝点染色体(t)24条,具有明显的8倍染色

体同源的倾向,因此本研究进一步证明俄罗斯鲟是8倍体起源。

小染色体数含量高(约占染色体总数的一半),是俄罗斯鲟以及其他鲟鱼在染色体组型上的一大特点。小染色体数含量高给研究者做染色体组型分析,确定染色体数目带来了困难。有人认为鲟鱼类染色体中含有大量小染色体可能与其进化滞后有关^[6],但是这样推测对否;小染色体在鲟鱼类染色体组进化过程中如何形成的,是染色体的罗伯逊易位,还是染色体缺失或结构重排产生的;由于鲟型目鱼类具有比较大的基因组(DNA含量),其中必然有大量的冗余基因,小染色体可能是鲟型目冗余基因的载体,大量冗余基因的存在也可能是鲟鱼类存在大量小染色体的原因。小染色体上包含着哪些基因,这些基因在鲟鱼类染色体组进化过程中又是如何表达起着怎样的作用,以上诸点迄今均难定论,有待进一步的研究。

表2 俄罗斯鲟 DNA 含量测定值
Tab.2 DNA contents of *A. gueldenstaedti*

序号 no.	消光值 extinction	鸡血对照 control of erythrocytes of chick	鱼鸡比 ratio of fish to chick	含量($\text{pg} \cdot \text{N}^{-1}$) content
1	665.34	129.57	5.13	11.81
2	650.82	128.32	5.07	11.66
3	654.68	128.23	5.11	11.74
4	650.00	113.47	5.73	13.17
5	653.33	110.25	5.93	13.62
6	660.00	126.36	5.22	12.01
7	655.20	126.13	5.19	11.94
平均值 average	655.62±27.89	123.19±9.85	5.32±0.78	12.24±1.45

通过细胞 DNA 含量的检测分析来确定染色体数量及其倍性是目前国内外通用方法。所用仪器有显微分光光度计和流式细胞仪两种。本研究采用流式细胞仪,以鸡红细胞(国际公认的对照标准)作对照,以其绝对含量按 $2.30 \text{ pg} \cdot \text{N}^{-1}$ 计算测得俄罗斯鲟体细胞 DNA 绝对含量为 $12.24 \text{ pg} \cdot \text{N}^{-1}$ 。综合以上两项结果可得出如下结论,俄罗斯鲟是染色体数为 (236 ± 6) 的八倍体, DNA 绝对含量为 $12.24 \text{ pg} \cdot \text{N}^{-1}$ 。与有关鲟鱼染色体组型及倍性的研究报道结果比较,本文的俄罗斯鲟和宋苏祥等^[6]用流式细胞仪测得的施氏鲟(*A. schrenckii*) (DNA 绝对含量 $11.73 \text{ pg} \cdot \text{N}^{-1}$, 染色体为 $238 \pm$ 的八倍体)的结果一致;与张四明等^[9]用显微分光光度计测得的匙吻鲟(*P. spatulata*) (3.96 pg), 长江白鲟(*P. gladius*) (4.11 pg), 达氏鲟(*A. dabryanus*) (8.26 pg), 施氏鲟(*A. schrenckii*) (6.07 pg), 中华鲟(*A. sinensis*) (9.07 pg) 的结果具有一定的差异。这些差异与所用方法(流式细胞仪法和显微分光光度计法)有关,与标准 DNA(人淋巴细胞和鸡红细胞)以及 DNA 的绝对含量(例如,鸡红细胞 DNA 的绝对含量 2.30 pg 与 3.22 pg) 等均有关。从上述差异可见,利用细胞 DNA 含量的

检测分析进行染色体数量及其倍性比较,只有选择相同的方法,相同的标准才具有可比性。

参考文献:

- [1] Bemis W E, Findeis E K. The sturgeon's plight[J]. Nature, 1994, 370: 602-602.
- [2] 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.
- [3] 梁利群,孙效文,董崇智,等. 5 种鲟、鳊鱼基因组 DNA 遗传多样性分析[J]. 中国水产科学, 2002, 9(3): 273-276.
- [4] 石振广,王云山,李文龙. 鲟鱼与鳊鱼养殖[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 2000.
- [5] 余先觉,周 敏,李渝成,等. 中国淡水鱼类染色体[M]. 北京: 科学出版社, 1989. 4-9.
- [6] 宋苏祥,刘洪柏,孙大江,等. 施氏鲟的核型及 DNA 含量研究[J]. 遗传, 1997, 19(3): 5-8.
- [7] 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): 111-114.
- [8] Levan A, Fredya K, Sandberd A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes[J]. Hereditas Band, 1964, 52(2): 201-220.
- [9] 张四明,晏 勇,邓 怀,等. 几种鲟鱼基因组大小、倍体的特性及鲟形目细胞进化的探讨[J]. 动物学报, 1999, 45(2): 200-206.