

匙吻鲟的细胞遗传学分析

薛淑群 尹洪滨

(中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 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匙吻鲟 (*Polyodon spathula*) 的染色体标本。对其肾细胞染色体数目统计分析表明, 匙吻鲟染色体组由 120 条染色体所组成。以测得的核型参数和按 Levan, *et al.* 提出的染色体划分标准得出: 具有 22 对中部着丝粒染色体 (m), 16 对亚中部着丝粒染色体 (sm), 22 对亚端部着丝粒染色体 (st) 和端部着丝粒染色体 (t); 染色体臂数 (NF) 为 196, 核型公式为 $44m + 32sm + 44st + 10t$ 。再采用流式细胞仪分析系统测定匙吻鲟体细胞的 DNA 含量, 与鸡血细胞标准对照相比为 2.69 ± 0.19 , 以鸡红细胞 DNA 含量 2.3 pg/N 测算, 则匙吻鲟体细胞 DNA 含量为 6.18 pg/N 。根据所得到的结果并结合已发表的鲟鱼类 DNA 含量和染色体资料, 判定匙吻鲟为四倍体物种。鲟形目鱼类全部为多倍体起源的鱼类, 在细胞水平的进化比较特殊, 以染色体加倍的方式进行。染色体加倍及分化, 可能是造成鲟形目鱼类种类较多及多倍体类型 ($4n$, $8n$, $12n$ 等) 丰富的主要原因。

关键词:匙吻鲟; 染色体; 核型; DNA 含量

中图分类号: R394.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2009)06-1078-05

匙吻鲟 (*Polyodon spathula*) 属鲟形目、白鲟科, 是北美洲特有的一种个体最大、最古老的鱼类。匙吻鲟是世界上现有的匙吻鲟科鱼类中仅有两个种的其中一种, 与我国白鲟是同科异属的珍稀动物^[1,2]。对这一珍贵物种的保存、保护和开发利用, 成为世界瞩目的研究课题。匙吻鲟自 1988 年从美国引进我国以来, 经过多年养殖, 已取得了良好的效果^[3]。匙吻鲟的经济价值极高, 可以预见到不久的将来, 匙吻鲟将成为我国水产养殖业广受欢迎的一个名优新品种^[4]。

目前, 匙吻鲟的养殖技术及胚胎发育等方面的研究已经有过报道^[5], 关于染色体和 DNA 含量的细胞遗传学研究国内尚无系统的报道。本文报道了匙吻鲟的染色体数目、核型和 DNA 含量, 以求在细胞水平上探讨匙吻鲟的进化地位, 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 匙吻鲟 1 龄鱼, 体重 240—350 g, 采自

于中国水产科学院北京房山鲟鱼繁育工程技术中心。

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 $18\text{—}20^\circ\text{C}$ 。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 $1\text{—}2 \mu\text{g/g}$ 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 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, 以 1000 r/min 的速度离心 6 min, 弃掉上清液, 加低渗液 (0.5% 氯化钾) 处理 40 min。细胞悬液用卡诺氏固定液 (3 倍甲醇 1 倍冰醋酸) 固定 3 次, 每次 15 min, 用预先处理好的冰玻片滴片, 酒精灯烤干, 用 4% Giemsa (pH 6.8 的磷酸盐缓冲液) 染色液染色 20 min, 自来水冲洗, 晾干, 观察^[6]。

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

收稿日期: 2008-11-27; 修订日期: 2009-05-19

基金项目: 科技部科技基础专项 水产种质资源标准化整理、整合与共享 (2006DKA30470 - 005); 黑龙江水产研究所科研专项基金 (2009HSYZX-SJ-06) 资助

作者简介: 薛淑群 (1978—), 女, 黑龙江省哈尔滨人; 助理研究员; 主要从事鱼类细胞遗传学研究。E-mail: xueshuqun@yahoo.com.cn

通讯作者: 尹洪滨, E-mail: hongbinyin@yahoo.com.cn

确定匙吻鲟的染色体数目。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, *et al.*^[7]的标准测量染色体的有关参数,做出匙吻鲟的染色体核型图。

1.2.2 体细胞 DNA 含量检测 取实验鱼 (30 尾) 的血液,加入适量 (10 mg/L) 的 DAPI,振荡器中振荡,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 10⁵—10⁶ 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,鸡血细胞为国际上公认的对照标准,其绝对 DNA 含量按 2.30 pg/N 计算。本试验采用外定标法^[8]。

2 结 果

2.1 匙吻鲟体细胞染色体数目

共计数 68 个染色体中期分裂相 (表 1)。匙吻鲟的中期分裂相的染色体数目在 118—128 条,其中在 120—124 条之间的分裂相相对集中,120 占 41.18%,所以认定 120 为众数染色体数 (表 1)。即匙吻鲟二倍体染色体数 (2n) 为 120。

2.2 匙吻鲟的核型

根据 Levan, *et al.* 的分类标准,对匙吻鲟 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匙吻鲟染色体分为 3 组:中部着丝点粒染色体 (m) 44 条、亚中部着丝粒染色体 (sm) 32 条、亚端部着丝粒染色体 (st) 和端部着丝粒染色体 (t) 44 条。染色体臂数 (NF) 为 196,其核型公式为 44m + 32sm + 44st, t。匙吻鲟染色体的中期分裂相 (图 1),匙吻鲟核型 (图 2)。



图 1 匙吻鲟染色体的中期分裂相
Fig. 1 Chromosome of *Polyodon spathula*

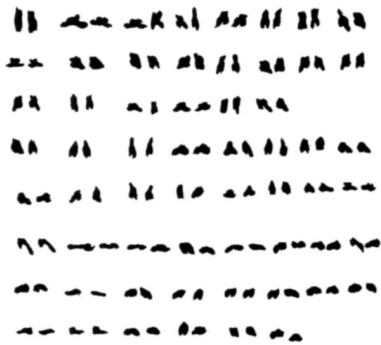


图 2 匙吻鲟染色体核型
Fig. 2 Karyotype of *Polyodon spathula*

2.3 DNA 含量

对 30 尾匙吻鲟体细胞 DNA 含量进行测定 (表 2), DNA 绝对含量为 6.18 pg/N。以样本 1 为例,图 3、图 4 显示为流式分析仪实验结果。可见采用血液进行 DNA 含量分析,相对于用鳍条或肝脏进行测定,无杂质污染,图片清晰干净。

表 1 匙吻鲟的染色体数分布频率

Tab. 1 The amount and percentage of the chromosome of *Polyodon spathula*

染色体数 Chromosome number	<110	110—119	120	121—126	>126	Total
细胞数 number	7	15	28	12	6	68
百分比 Percentage (%)	10.29	22.06	41.18	17.65	8.82	100

表 2 匙吻鲟 DNA 含量测定值

Tab. 2 DNA contents of *Polyodon spathula*

种 类 Species	样本数量 Samples number	匙吻鲟 DNA 相对 含量 Relative DNA Contents of <i>P. spathula</i>	鸡血 DNA 相对 含量 Relative DNA contents of chicken	比例 Ratio of <i>P. spathula</i> / chicken	匙吻鲟 DNA 绝对含量 DNA contents of <i>P. spathula</i> (pg/N)
匙吻鲟 <i>P. spathula</i>	30	351.87 ±21.91	131.3 ±9.42	2.69 ±0.19	6.18 ±0.44

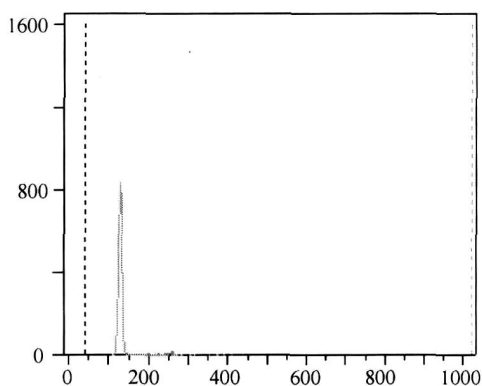


图3 匙吻鲟红细胞 DNA 含量
Fig. 3 DNA contents of *Polyodon spathul*

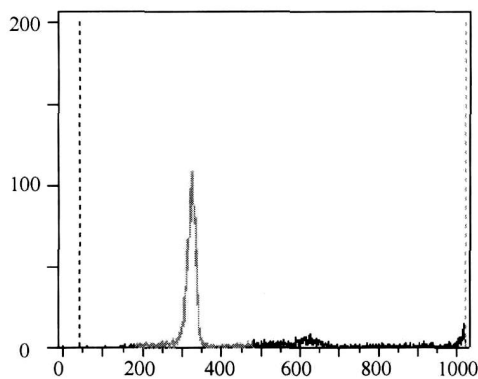


图4 鸡红细胞 DNA 含量
Fig. 4 DNA contents of chicken

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,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。

3.1 染色体

国内外许多研究者均认为鲟鱼类是多倍体起源的鱼类,其染色体数 60 为其原始核型,以染色体加倍方式进行,其染色体数 60 为其原始核型,120 为四倍体,240 为八倍体^[9]。已报道的相关鲟鱼染色体数目及核型公式(表 3)。鲟鱼染色体数是迄今研究报道最多的鱼类,如中华鲟 (*Acipenser sinensis*)^[6] 染色体数达 264 ±,俄罗斯鲟 (*Acipenser gueldenstaedti*)^[10] 二倍体染色体数为 236 ±6,施氏鲟 (*Acipenser schrencki*)^[11] 染色体数为 238 ±8,这三种鲟鱼具有明显着丝粒的染色体数均为 120 条,其余为小染色体(点状染色体)。鲟形目鱼类在细胞水平的进化

比较特殊,以染色体加倍的方式进行,大染色体的组型非常相似^[12],这一点可以从表 3 中的核型公式上可以得到验证。

3.2 DNA 含量

与有关鲟鱼体细胞 DNA 含量的研究报道结果比较(表 3)。史氏鲟(施氏鲟)染色体数目 238 ±8, DNA 绝对含量有报道分别为 11.73、11.59,确定为八倍体;俄罗斯鲟染色体数目 250 ±8, DNA 绝对含量为 12.24^[13],确定为八倍体;中华鲟染色体数达 264 ±, DNA 绝对含量为 9.07^[14],确定为八倍体,可见染色体数目与 DNA 含量之间存在正比关系;鲤鱼(达氏鲤 *Huso dauricus*)的染色体数目和 DNA 绝对含量也符合这一规律。小体鲟 (*Acipenser ruthenus*) 染色体数目为 116 ±4, DNA 绝对含量为 6.06,我们确定为四倍体(待发表)。本文报道了匙吻鲟是染色体数为 120, DNA 绝对含量为 6.18 pg/N,与报道过的八倍体鲟鱼相比较,匙吻鲟的染色体数目和 DNA 含量都体现为四倍体特征^[15],两方面研究结果一致,证明实验数据真实可靠。匙吻鲟体细胞 DNA 绝对含量分别有报道为 3.96、7.17、3.90^[16]、4.89^[17],本文报道为 6.18,居于中间水平,也说明实验数据的准确性。

3.3 倍性

从匙吻鲟核型分析看,匙吻鲟的染色体配对具有四条染色体同源的倾向,因其偶倍性 (Artio-ploidy) 的特征和长期的进化适应,该鱼已经达到某种程度的二倍化并以此形式繁衍后代。匙吻鲟染色体组中具有大量的小染色体,这符合鲟鱼类共有的特征^[18,19]。匙吻鲟与我国长江白鲟 (*Psephurus gladius*) 是现存仅有的两种白鲟科鱼类,长江白鲟已被列入国家一级保护动物名录,目前长江白鲟的细胞遗传研究仍属空白。从长江白鲟的 DNA 含量 (4.11) 推测,长江白鲟的染色体数目应该在 120 条左右,亦可能为四倍体物种。

3.4 研究方法

通过细胞 DNA 含量的检测分析来确定染色体数量及其倍性,是目前国内外通用的方法。所用仪器有显微分光光度计和流式细胞仪两种。本文的匙吻鲟 DNA 含量与张四明^[12] 用显微分光光度计测得的匙吻鲟 DNA 含量 (3.96 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

表 3 几种鲟鱼的体细胞 DNA 含量、染色体及核型公式
Tab. 3 DNA contents, chromosome and karyotype of some species of sturgeon

种类 Species	鸡血 DNA 含量 DNA contents of chicken (pg/N)	鲟鱼 DNA 含量 DNA contents of sturgeon (pg/N)	染色体数及核型公式 Chromosome number and karyotype	研究者 Reporter
施氏鲟 <i>A. schrencki</i>	2. 30pg/ N	11. 73	2n = 238 ±8, 78m + 12sm + 28st, t + 120 ±mc	宋苏祥
俄罗斯鲟 <i>A. gueldenstaedti</i>	2. 30pg/N	12. 24	2n = 250 ±8, 80m + 16sm + 24st, t + 116 ±mc	尹洪滨
中华鲟 <i>A. sinensis</i>	3. 22pg/2c	9. 07	2n = 264 ±, 78m + 20sm + 26st, t + 140 ±mc	张四明 余先觉
小体鲟 <i>A. ruthenus</i>	2. 30pg/N	6. 06	2n = 116 ±4, 40m + 34sm + 26st, t + 16 ±mc	尹洪滨
达氏鳇 <i>H. dauricus</i>	2. 30pg/N	4. 77	2n = 118 ±2, 60 ±2m, sm + 58 st, t	尹洪滨 Birstein
匙吻鲟 <i>P. spatul</i>	2. 30pg/N	6. 18	2n = 120, 44 m + 32sm + 44st, t	本文作者

分光光度计法)有关,与标准 DNA (可用人淋巴细胞或鸡红细胞)以及 DNA 的绝对含量 (鸡红细胞 DNA 的绝对含量 2. 30 pg/ N 或 3. 22 pg/2c)等均有关系。细胞的分期不同可以产生差异,采用显微分光光度计测定时的人为操作存在误差也是不可避免的。以目前的技术水平来看,采用流式细胞仪测定鱼类细胞 DNA 含量比采用显微分光光度计测定要更加准确。史氏鲟 (施氏鲟)采用流式细胞仪测定的 2 次报道结果相近 (11. 73,宋苏祥; 11. 59,尹洪滨),说明流式细胞仪测定 DNA 含量的结果比较稳定。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,相同的标准才具有实验内容可比性。

参考文献:

[1] Liu J S, Yu Z T. The paddlefish (*Polyodon spatul*) and its fisheries in U. S. A. [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1990, **14** (1): 77—83 [刘家寿, 余志堂. 美国的匙吻鲟及其渔业. 水生生物学报, 1990, **14** (1): 77—83]

[2] Bemis W E. The sturgeon 's plight [J]. *Nature*, 1994, **370**: 600—602

[3] Shi Z G, Wang Y S, Li W L. Sturgeons and cultured [M]. Harbin: Heilongjiang Science and Technology Press 2000 [石振广, 王云山, 李文龙. 鲟鱼与鲟鱼养殖. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社. 2000]

[4] Liu H B, Hua Y P., Qiu Q Z, et al. Microstructure and ultrastructure of peripheral blood cells of amur sturgeon *Acipenser schrencki brandt* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, **30** (2): 214—220 [刘红柏, 华育平, 曲秋芝, 等. 史氏鲟外周血细胞的显微及超微结构. 水生生物学报, 2006, **30** (2): 214—220]

[5] Chen J, Liang Y Q, Hu X J, et al. Research on embryo growth of

Polyodon spatul [J]. *Water Conservancy and Fishery*, 2008, **28** (3): 34—36 [陈静, 梁银铨, 胡小建, 等. 匙吻鲟胚胎发育的观察. 水利渔业, 2008, **28** (3): 34—36]

[6] Yu X J, Zhou T, Li Y C, et al. Chromosomes of Chinese freshwater fishes [M]. Beijing: Science Press. 1989, 4—9 [余先觉, 周嗽, 李渝成, 等. 中国淡水鱼类染色体. 北京: 科学出版社. 1989, 4—9]

[7] Levan A, Fredya K, Sandberd A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes [J]. *Hereditas Band*, 1964, **52** (2): 201—220

[8] 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

[9] Birstein V J, Vasiliev V P. Tetraploid-octoploid relationships and karyological evolution in the order Acipenseriformes (Pisces) karyotypes, nucleoli, and nucleolus-organizer regions in four acipenserid species [J]. *Genetica*, 1987, **16**: 257—263

[10] Yin H B, Sun Z W, Sun D J. Cytogenetic analysis of *Acipenser gueldenstaedti* Brandt [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2006, **30** (2): 181—184 [尹洪滨, 孙中武, 孙大江. 俄罗斯鲟的细胞遗传学分析. 水产学报, 2006, **30** (2): 181—184]

[11] Song S X, Liu H B, Sun D J, et al. The karyotype and cellular DNA contents of Amur sturgeon [J]. *Hereditas*, 1997, **19** (3): 5—8 [宋苏祥, 刘洪柏, 孙大江, 等. 施氏鲟的核型及 DNA 含量研究. 遗传, 1997, **19** (3): 5—8]

[12] Liang L Q, Sun X W, Dong C Z, et al. PCR analysis on genetic diversity of five species of Acipenseridae and *Huso* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2002, **9** (3): 273—276 [梁利群, 孙效文, 董崇智, 等. 5 种鲟、鳇鱼基因组 DNA 遗传多样性分析. 中国水产科学, 2002, **9** (3): 273—276]

[13] Yin H B, Sun Z W, Sun D J. Comparative study on DNA contents of five cultured fishes of Acipenseridae and *Huso* [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2004, **13** (2): 111—114 [尹洪滨, 孙中武, 孙大江. 五种养殖鲟、鳇鱼 DNA 含量的比较. 上海水产大学学报, 2004, **13** (2): 111—114]

- [14] Zhang SM, Yan Y, Deng H, *et al.* Genome size, ploidy characters of several species of sturgeons and paddlefishes with comment on cellular evolution of acipenseriformes [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1999, **45**(2): 200—206 [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. *动物学报*, 1999, **45**(2): 200—206]
- [15] Dingerkus G, Howell W M. Karyotypic analysis and evidence of tetraploidy in the North American paddlefish, *Polyodon spathula* [J]. *Science*, 1976, **3**: 151—155
- [16] Tiersch T R, Chandler R W, Wachtel S M, *et al.* Reference standards for flow cytometry and application in comparative studies of nuclear DNA content [J]. *Cytometry*, 1989, **10**: 706—710
- [17] Blacklidge K H, Bidwell C A. Three ploidy levels indicated by genomes quantification in Acipenseriformes of North America [J]. *Heredity*, 1993, **84**: 427—430
- [18] Dingerkus G, Howel W M. Karyotypic analysis and evidence of tetraploidy in the North American paddlefish, *Polyodon spathula* [J]. *Science*, 1976, **4**: 67—72
- [19] Arefjev V A. Issledovanie Karyotipa Osetra *Acipenser gueldenstaedti* Brandt (Chondrostei) [J]. *Cytologia Genetica*, 1989, **24**(4): 7—13

CYTOGENETIC ANALYSIS OF POLYODON SPATHULA

XUE Shu-Qun and YIN Hong-Bin

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

Abstract: Metaphase chromosome specimens of *Polyodon spathula*, injected with PHA and colchicin, were prepared from short-term culture of kidney cells with air-drying technique. Its diploid chromosome number was $2n = 120$. The karyotype was composed of 44m, 32sn and 44st, t chromosomes, $NF = 196$. Diploid nucleus DNA content was measured from the somatic cell of *P. spathula*, using flow cytometer (Beckman cell Lab Quant, made in USA) and the DNA content (2.3pg/N) of erythrocytes of chicken (*Gallus domesticus*) as standard. The DNA content of *P. spathula* was 6.18pg/N, which corresponded with the result measured chromosome number as ploidy. According to the present results and data reported, *P. spathula* was possibly a tetraploid (4n). Combination of the present results and data reported among Acipenseriformes including two families and six genera, Acipenseriformes was the polyploid origin's fish, and was quite completely special at the cell level which evolved by chromosome doubling. The chromosome's doubling and differentiation possibly were primarily caused of polyploidization and polyploid type (4n, 8n, 12n and so on) richly. Polyploidization had played an important role in the diversity of Acipenseriformes.

Key words: *Polyodon spathula*; Chromosome; Karyotype; DNA content