

不同流域细鳞鱼染色体遗传多态性分析

徐革锋¹ 牟振波¹ 薛淑群¹ 张玉勇¹ 李永发¹ 杜佳² 陈玉春²

(1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 哈尔滨 150070; 2. 东北农业大学水产养殖系, 哈尔滨 150030)

ANALYSIS ON GENETIC POLYMORPHISM OF CHROMOSOME OF BRACHMYSTAX LENOK IN DIFFERENT VALLEYS

XU Ge-Feng¹, MU Zhen-Bo¹, XUE Shu-Qun¹, ZHANG Yu-Yong¹, LI Yong-Fa¹, DU Jia² and CHEN Yu-Chun²

(1. Heilongjiang River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Harbin 150070;

2. Department of Aquaculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

关键词: 细鳞鱼; 染色体; DNA 绝对含量; 牡丹江; 鸭绿江; 乌苏里江

Key words: *Brachymystax lenok*; Chromosome; Absolute DNA content; Mudan River; Yalu River; Wusuli River

中图分类号: Q346⁺.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2009)05-0975-05

细鳞鱼 *Brachymystax lenok* 属鲑形目 (Salmoniformes)、鲑科 (Salmonidae)、细鳞鱼属 (*Brachymystax*); 地方名为细鳞鱼 (东北地区), 该鱼在我国东北地区的乌苏里江、鸭绿江、牡丹江、松花江等流域广泛分布^[1-3]。目前对于细鳞鱼属是否存在两个甚至更多种仍存在争议, 早期学者认为只存在一个种^[1, 3], 而分子生物学和形态学方面的最新证据表明, 该属鱼类至少可分为两个种^[4-6]。细鳞鱼是我国名贵的鲑科冷水性经济鱼类, 具有很高的营养和食用价值。但近年来随着渔业资源的过度开发利用、环境污染、外来种鱼类的引入以及对水域生态环境的破坏等等, 使细鳞鱼的生存受到了前所未有的威胁, 乃至濒临绝灭的危险境地^[4, 7]。因此, 为了保护我国北方这一珍贵的土著冷水性鱼类, 已有一些研究者分别对细鳞鱼的人工养殖^[8, 9]、资源保护^[11]、生物学特性^[1, 5]和遗传多样性^[6]等进行了研究。但国内关于细鳞鱼染色体数目、核型分析及其 DNA 含量等细胞遗传学方面的研究尚无报道。因此, 本文采用细胞遗传学方法对不同流域的细鳞鱼进行了染色体遗传多态性分析, 以求在细胞水平上探讨细鳞鱼染色体数目、核型分类、细胞核 DNA 含量以及不同流域细鳞鱼之间的相互关系 (遗传背景), 这将为细鳞鱼的遗传学分析和种质标准建立提供科学的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 细鳞鱼分别采捕于乌苏里江的虎头段、鸭绿江下游和牡丹江的海浪河支流, 共 100 尾, 体重为 108—418 g, 叉长为 20.30—34.50 cm, 试验前暂养于中国水产科学研究院黑龙江水产研究所渤海冷水鱼实验站。

1.2 方法 染色体制备: 采用活体肾细胞直接制片法制备染色体玻片标本。由于 Kang, *et al.*^[10]、Viktorovsky, *et al.*^[11]和 Shed'ko, *et al.*^[12]分别对东亚地区与远东地区 (乌苏里江流域) 细鳞鱼的染色体数目和核型均有报道, 因此本研究在染色体多态性方面只对牡丹江和鸭绿江流域的细鳞鱼进行研究。在实验前一周分别将两个不同流域的细鳞鱼各 10 尾暂养于室内控温、充气水族箱中, 水温为 16—18℃。按 10 μg/g 鱼体重胸腔注射 PHA (FBS 溶解), 16—18h 后按 1—2 μg/g 鱼体重注射秋水仙素溶液, 2—4h 后剪鳃放血, 取出头肾, 置于盛 0.75% 生理盐水的平皿中, 用研钵将肾组织磨碎, 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 离心 6min, 弃掉上清液, 加低渗液 (0.5% KCl) 处理 40min, 细胞悬液然后用卡诺氏固定液 (甲醇: 冰醋酸 = 3: 1, 体积比) 固定 3 次, 每次 15min, 用预先处理好的冰冷玻片滴片, 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

收稿日期: 2008-01-03; 修订日期: 2008-11-29

基金项目: 黑龙江水产研究所基本科研专项 (2007HSYZX-YY-21); 黑龙江省科技攻关项目 (GC03B511; GA06B203-4); 科技部农转资金项目 (2007GB23260395); 国家十一五支撑计划 (2006BAD03B08) 资助

作者简介: 徐革锋 (1979—), 男, 助理研究员; 主要从事鱼类遗传育种与健康养殖研究。E-mail: xgffish@yahoo.com.cn

通讯作者: 牟振波 (1961—), 男, 研究员; 主要从事冷水性鱼类养殖、增殖研究。E-mail: mouzhenbo@163.com

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 (物镜倍数为 100 \times),按照 Levan, *et al.*^[13] 的标准测量染色体的有关参数,做出染色体核型图。

DNA 绝对含量测定:三个流域的细鳞鱼分别采 30 尾,取鱼尾鳍浸于 75% 酒精中固定。小公鸡 (*Gallus sp.*) 血液红细胞作为内参对照,鸡翅膀下采集血液 10 mL,肝素钠抗凝。采用机械研磨法获取鱼尾鳍破碎组织,将其浸泡于 PBS (pH7.2) 缓冲液中,之后 DAPI 荧光染色,震荡器中震荡,用 15—30 μm 的滤网筛选出较为纯的体细胞悬液 1.5—2.0 mL。在上 Coulter 流式细胞仪检测 (USA BECKMAN) 时,每检测 10 尾鱼,即用鸡血标定一次。鸡血细胞是国际公认的

对照标准^[14],其绝对含量按 2.30 pg/N 计算。

1.3 数据统计 DNA 含量数据通过统计软件 SPSS12.0 进行分析,主要采用单因素 (ANOVA) 以及 Duncans 多重比较法进行数据分析。

2 结果

2.1 细鳞鱼染色体数目与核型

根据 Levan, *et al.*^[11] 的分类标准,对牡丹江和鸭绿江流域的细鳞鱼细胞中期分裂相进行放大测定,分别计数了 80 个和 100 个中期分裂相的染色体数目,两个流域细鳞鱼的体细胞染色体均为二倍数, $2n=90$,牡丹江细鳞鱼的染色体臂数 (NF) 为 120,核型 (图 1) 公式: $16m + 14sm + 60st$; 鸭绿江的细鳞鱼 NF 为 110,核型公式 (图 2): $14m + 6sm + 70st$ 。

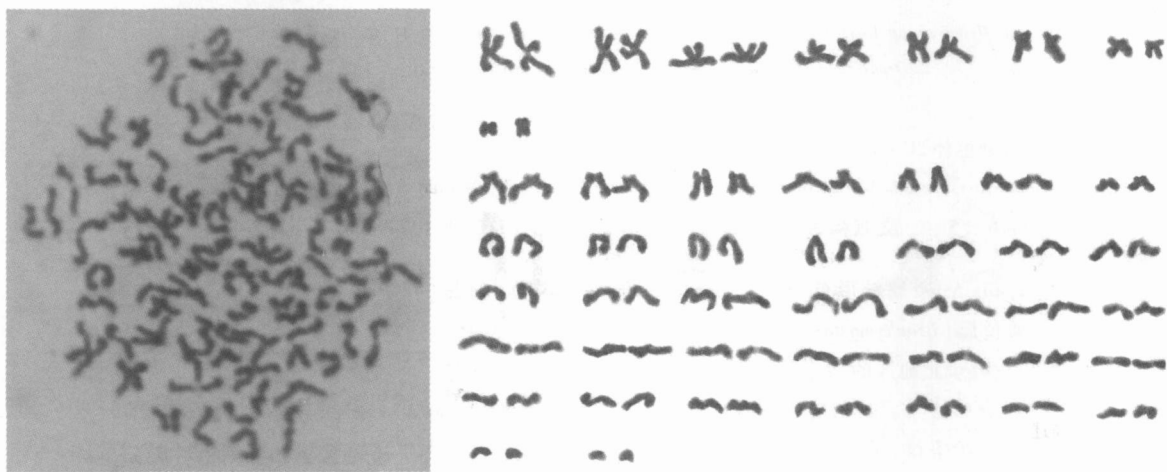


图 1 牡丹江流域细鳞鱼染色体中期分裂相及其核型

Fig. 1 Metakinesis phase of chromosome and Karyotype of *B. lenok* from Mudanjiang River

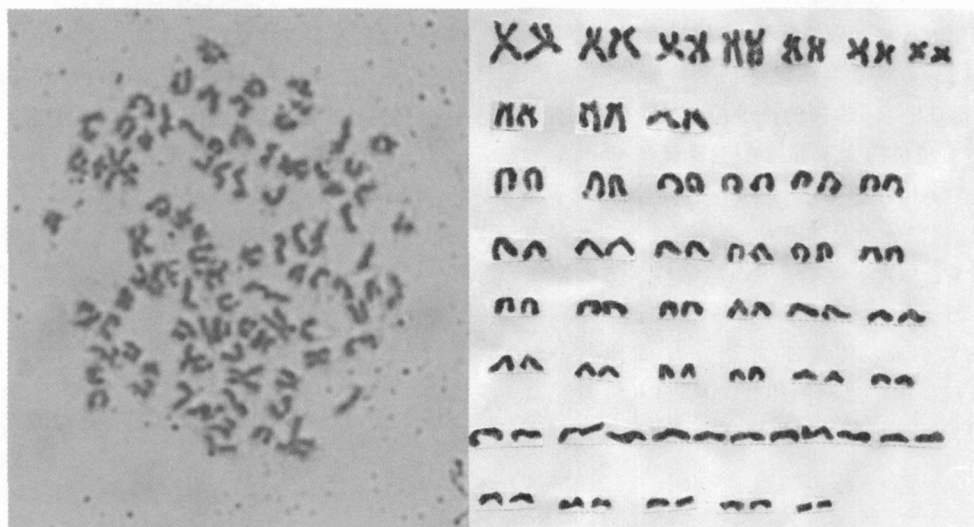


图 2 鸭绿江流域细鳞鱼的染色体中期分裂相及其核型

Fig. 2 Metakinesis phase of chromosome and Karyotype of *B. lenok* from Yalu River

2.2 DNA含量分析

三个流域的细鳞鱼体细胞核 DNA 含量检测结果 (图 3—6)。从图 3 中可以看出乌苏里江细鳞鱼 DNA 含量的消光值分布宽度最大,鸭绿江的次之,牡丹江的最为集中。牡丹江、乌苏里江和鸭绿江流域细鳞鱼的细胞核 DNA 绝对含量分别为 (5.24 ± 0.30) 、 (5.04 ± 0.46) 和 (4.86 ± 0.42) pg/N,牡丹江细鳞鱼与乌苏里江细鳞鱼差异不显著 ($P > 0.05$),牡丹江与鸭绿江细鳞鱼存在显著性差异 ($P < 0.05$),乌苏里江与鸭绿江之间存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

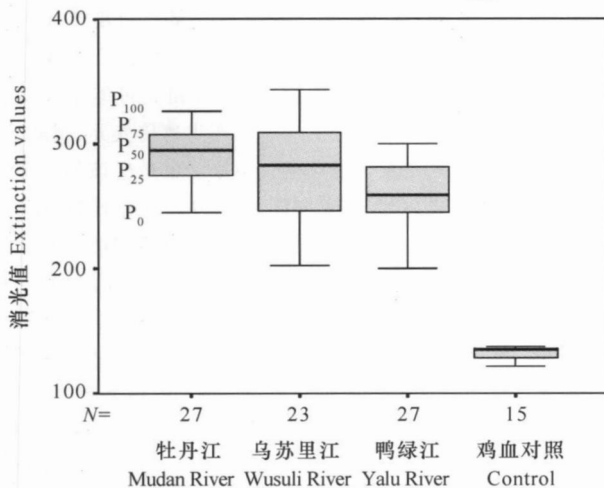


图 3 不同流域细鳞鱼细胞核 DNA 含量的消光值及鸡血对照值
Fig. 3 Extinction values of absolute DNA contents of *B. lenok* in different valleys and control value of chicken blood

5 个百分位点用以描述消光值,即 P_0 (最小值)、 P_{25} (第 25 百分位数)、 P_{50} (中位数)、 P_{75} (第 75 百分位数)、 P_{100} (最大值),该图主要说明不同流域细鳞鱼检测的 DNA 含量的消光值的大小分布情况, N 为样本数
The five terciles are used to describe the extinction value, P_0 (the minimum value), P_{25} (No. 25 percentiles), P_{50} (median), P_{75} (No. 75 percentiles) and P_{100} (the maximum), Fig. 3 can show that disposition of extinction value, which is absolute DNA content of *B. lenok* in different valleys. N is number of samples

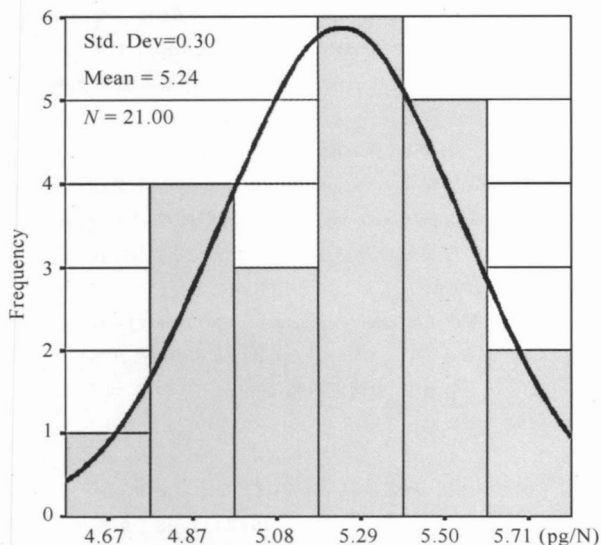


图 4 牡丹江流域细鳞鱼 DNA 绝对含量
Fig. 4 Absolute DNA content of *B. lenok* from Mudan River

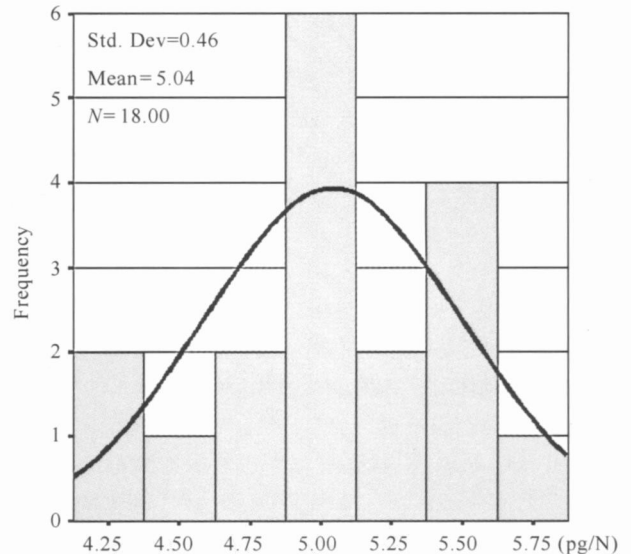


图 5 乌苏里江流域细鳞鱼 DNA 绝对含量
Fig. 5 Absolute DNA content of *B. lenok* from Wusuli River

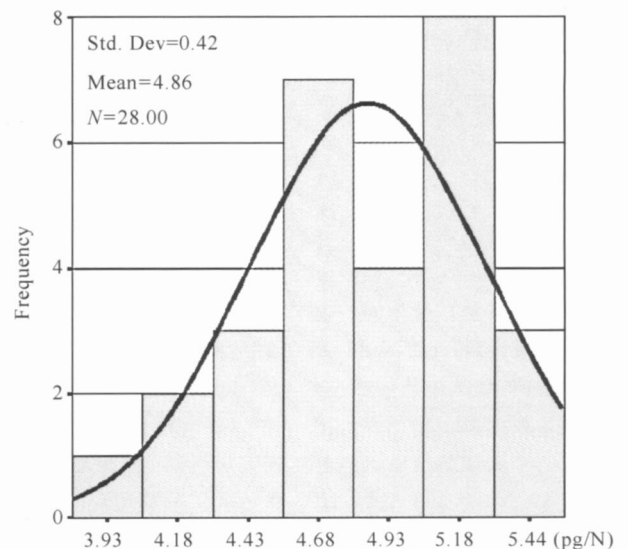


图 6 鸭绿江流域细鳞鱼 DNA 绝对含量
Fig. 6 Absolute DNA content of *B. lenok* from Yalu River

图 4—6 的纵坐标均为各个不同检测值出现的频率 (Frequency), 横坐标为不同流域细鳞鱼 DNA 绝对含量的分位数, 图中的 Std. Dev 为标准偏差, Mean 为所有检测数值得平均值, N 为样本数。该图主要体现细鳞鱼 DNA 绝对含量的正态分布情况
Y-axis of Fig. 4—6 is frequency of different detection, X-axis is the quantile of absolute DNA content of lenok in different valleys, Std. Dev in picture is standard deviation, Mean is the average value of detection, N is number of samples. This picture is used to describe the normal distribution of absolute DNA content of *B. lenok*

3 讨论

3.1 不同流域细鳞鱼染色体多态性比较

通过对牡丹江、乌苏里江和鸭绿江流域的细鳞鱼染色体核型进行比较发现, 细鳞鱼属于二倍体鱼类, 其染色体

数目及其核型构成表现为遗传多态性。本研究检测牡丹江和鸭绿江流域细鳞鱼染色体数为 $2n = 90$, 而 Shed'ko, *et al.*^[12]对远东地区不同吻部特征(尖吻和钝吻)的细鳞鱼染色体研究的结果为, $2n = 90—92$, 这种差别可能与染色体罗伯逊易位有关。因为 Philips and Røe^[15]的最新研究认为, 具有亲缘关系的分类群通常是由一种或若干种罗伯逊融合或裂变来区分。例如, 欧洲哲罗鱼 ($2n = 82$) 与西伯利亚哲罗鱼 ($2n = 82—84$)^[16], 红点鲑的种 ($2n = 84$)^[17]与各种西伯利亚种 ($2n = 76—80$)^[18]。因此, 说明广泛分布的细鳞鱼种群的染色体数表现为多态性存在合理性, 虽然目前在遗传学方面还不能区分出具体的分类群, 但通过比较可以确定乌苏里江细鳞鱼的染色体数具有更大的多态性。Viktorovsky, *et al.*^[11]和 Shed'ko, *et al.*^[12]报道乌苏里江流域细鳞鱼的 NF 为 106—124, $ms+m$ 为 26—32, $st+t$ 为 60—64, 这与本研究中牡丹江流域的细鳞鱼的核型构成相一致, 但与鸭绿江流域的细鳞鱼核型构成有较大差异。相对其他两个流域比较, 鸭绿江流域细鳞鱼的 $ms+m$ 数目最少。对于同种鱼类而言, 染色体核型呈多态性应属正常现象。余先觉^[19]认为, 大部分鱼类的染色体核型确实存在差异。在《中国淡水鱼类染色体》一书中曾对中国淡水鱼类的染色体核型进行初步统计, 仅在染色体核型上存在差异的种类就有 47 种, 占所统计鱼类的 27.6%。可见, 鱼类染色体的多态现象较为普遍。咎端光^[19]认为鱼类长期地理隔离是染色体核型差异的主要原因。因此, 本研究认为处于三个不同流域的细鳞鱼出现的染色体多态性, 可能与不同的栖息环境有关, 从而也可能延伸出这样一种假设, 即牡丹江、乌苏里江和鸭绿江流域的细鳞鱼具有相同的遗传背景, 其祖先都来自于乌苏里江流域。Philips, *et al.*^[15]在对鲑科鱼类的染色体进化研究表明, 鱼类染色体多态性与其栖息的环境确实有极大关系。根据 Hartley^[20]的鱼类染色体核型分类理论, 本研究认定三个流域的细鳞鱼染色体核型均属 A 型, 即染色体数接近 80, NF 为 100 左右, 这与 Osinov^[21]的研究结果一致。Philips, *et al.*^[15]认为, A 型核型鱼类与较多变的栖息环境相关, 即在不同栖息地广泛分布的鱼类均具有 A 型染色体组型。而细鳞鱼能够适应不同流域的栖息环境正是因为其具有 A 型染色体组型, 所以染色体呈多态性表现。Qumsiyeh^[22]认为, 在同种鱼类进化过程中, 其染色体数或 NF 数增加, 可导致变异增加, 这对适应变化的环境非常重要。牡丹江和鸭绿江流域的细鳞鱼染色体数和 NF 均较乌苏里江流域的少, 说明乌苏里江流域的细鳞鱼遗传变异更大, 这与该流域细鳞鱼的染色体数和核型变化范围大也是相一致的。乌苏里江流域细鳞鱼种群具有较为复杂的构成, 该流域栖息着不同吻部特征(尖吻和钝吻)的细鳞鱼及其杂交种^[4], 由于鱼类基因组的可塑性较强, 加之交配后隔离机制的相对不完善, 使杂交渐渗(Introgressive hybridization)可能成为该流域细鳞鱼新物种起源及遗传多样性来源不可忽视的途径^[23], 所以造成了该流域细鳞鱼的染色体核型差异较大。

3.2 不同流域细鳞鱼 DNA 含量的比较

通过细胞核 DNA 含量的检测分析来确定鱼类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^[24]。本研究采用流式细胞仪, 以鸡红细胞作对照, 计算测得细鳞鱼细胞 DNA 绝对含量。牡丹江、乌苏里江和鸭绿江细鳞鱼的 DNA 含量分别为 (5.24 ± 0.30)、(5.04 ± 0.46) 和 (4.86 ± 0.42) pg/N, 在拟合细胞消光值结果的箱式图中可以发现(图 3), 乌苏里江流域细鳞鱼的 DNA 含量的分布宽度最大, 这与其种群构成和染色体变异是相关的。因为染色体是遗传物质 DNA 的载体, 凡是导致染色体遗传变异的因素均可影响细胞核 DNA 含量的变化^[25]。我们之前曾假设牡丹江和鸭绿江流域细鳞鱼的祖先可能是来自于乌苏里江, 其染色体由于罗伯逊易位产生遗传变异, 因此, 三个流域的细鳞鱼 DNA 含量存在大小差别也是应该的。将细鳞鱼的 DNA 含量与 58 种淡水鱼类的 DNA 含量比较分析可以发现^[25], 鲤科绝大多数鱼类(鲃、鲴和鲢等, DNA 含量都在 1.2—5.1 pg), 雅罗鱼等亚科(2.1—3.7 pg)的多数种类都具有较低的 DNA 含量, 裂腹鱼、鲤及鲃等亚科多具有较高的 DNA 含量(2.3—19.3 pg)。细鳞鱼属于淡水鱼类, 其 DNA 含量介于鲤科与裂腹鱼亚科的 DNA 含量之间, 从物种演化上分析, 细鳞鱼应该有罗伯逊易位和多倍体化的进化特征。将三个流域细鳞鱼 DNA 绝对含量数据构建成正态分布的柱状图(图 4—6)可以发现, 其各个流域的细鳞鱼 DNA 含量变化范围都很大, 这可能是由于个别细胞核内 DNA 降解造成的, 但峰值还是较为明显。比较图 4 和图 5 可以看出, DNA 含量变化趋势基本一致, 这可能是由于牡丹江和乌苏里江流域的细鳞鱼具有相同的遗传背景或基因组结构。而鸭绿江流域的 DNA 含量偏小, 原因不明, 还有待于以后进一步研究。

参考文献:

- [1] Dong C Z, Liu Y X, Zhang S C, *et al.* The population ecology characteristic and resources conservation of *B rachymystax lenok* in Huma River [J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 1997, **10** (1): 77—81 [董崇志, 刘玉仙, 张士臣, 等. 呼玛河细鳞鱼种群生态学特征及资源保护. 水产学杂志, 1997, **10** (1): 77—81]
- [2] Xu G F. The ovary development and oogenesis of lenok (*B rachymystax lenok*) [D]. Degree Thesis of Agronomy Master, Northeast Agricultural University. 2006 [徐革锋. 细鳞鱼 (*B rachymystax lenok*) 卵巢发育及卵子发生. 东北农业大学, 农学硕士学位论文. 2006]
- [3] Li S Z. The discussion of geographic distribution for Chinese Salmonidae fish [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 1984, **7** (2): 76—79 [李思忠. 中国鲑科鱼类地理分布讨论. 动物学杂志, 1984, **7** (2): 76—79]
- [4] Mou Z B, Liu W, Xu G F. Study on comparative biology of two species lenok (*B rachymystax lenok*) in Ussuri River [J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2006, **19** (2): 1—8 [牟振波, 刘伟, 徐革锋. 乌苏里江二种细鳞鱼生物学比较研究. 水产学杂志, 2006, **19** (2): 1—8]

- [5] Ma B, Yin J S, Li J P. Comparative studies on morphology and taxonomic position of two species of lenk [J]. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 2005, **30** (2): 257—260 [马波, 尹家胜, 李景鹏. 黑龙江流域两种细鳞鲑的形态学比较及其分类地位初探. 动物分类学报, 2005, **30** (2): 257—260]
- [6] Xia Y Z, Sheng Y, Chen Y Y. DNA sequence variation in the mitochondrial control region of lenok (*Brachymystax lenok*) populations in China [J]. *Biodiversity Science*, 2006, **14** (1): 48—54 [夏颖哲, 盛岩, 陈宜瑜. 利用线粒体 DNA 控制区序列分析细鳞鲑种群的遗传结构. 生物多样性, 2006, **14** (1): 48—54]
- [7] Wang S. China Red Data Book of Endangered Animals [M]. Beijing: Science Press 1998, 35—37 [汪松. 中国濒危动物红皮书: 鱼类 (乐佩琦, 陈宜瑜分主编) (第一版). 北京: 科学出版社. 1998, 35—37]
- [8] Bai G Z, Wen S L, Ma J Q, *et al*. The experiment of taming the wild brachymystax lenok in Taming pool [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 1999, **12**: 22—23 [白桂枝, 温淑兰, 马建强, 等. 水泥池驯养野生细鳞鱼试验. 中国水产, 1999, **12**: 22—23]
- [9] Liu X T, Cao J Y, Zhang Z Z, *et al*. Studies on the techniques of domestication in pond and artificial reproduction for the natural *Brachymystax lenok* individuals [J]. *Hebei Fishery*, 2000, (5): 6—9 [刘希泰, 曹杰英, 张子珍, 等. 野生细鳞鱼池塘驯养及人工繁殖技术研究. 淡水渔业, 2000, (5): 6—9]
- [10] Kang Y S and Park E H. Somatic chromosomes of the Manchurian trout, *Brachymystax lenok* (Salmonidae) [J]. *Chromosome Information Service*, 1973, **15**: 10—11
- [11] Viktorovskiy R M, Makoedov A N and Shevchishin A A. The chromosomal sets of *Brachymystax lenok* and *Hucho taimen* and the divergency of the salmonid genera [J]. *Tsitologiya*, 1985, **27**: 703—709 (in Russian)
- [12] Shed'ko S V, Ginatulina L K, Papura I Z, *et al*. Evolutionary and taxonomic relationships among Far-Eastern salmonid fishes inferred from mitochondrial DNA divergence [J]. *Journal of Fish Biology*, 1996, **49**: 815—829
- [13] Levan A, Fredya K, Sandberd A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes [J]. *Hereditas Band*, 1964, **52** (2): 201—220
- [14] Swanson C P, Merz T and Young W J. Cytogenetics, the chromosome in division, inheritance and evolution [M]. Prentice Hall International, Inc., London 1981, 473—548
- [15] Philips R and R \dot{a} P. Chromosome evolution in the Salmonidae (Pisces): an update [J]. *Biol Rev*, 2001, **7**: 1—25
- [16] R \dot{a} P, Slechta V and Flajshans M. Cytogenetics, cytotoxicity and biochemical genetics of huchonine salmonids [J]. *Fish Zool*, 1994, **43**: 97—107
- [17] Ueda T and Ojima Y. Geographic and chromosomal polymorphisms in the iwana (*Salvelinus leucomaenis*) [J]. *Proceedings of Japanese Academy*, 1983, **59** (8B): 259—262
- [18] Frolov S V. Polymorphism and mosaicism in additional chromosomes of the Siberian least cisco [J]. *Tsitologiya*, 1986, **28**: 740—744 (in Russian)
- [19] Zan R G. The study for caryotype of eight kinds fish (*Cyprinus* and *Anabarrilius Cockerell*) [J]. *Zoological Research*, 1980, **1** (2): 141—146 [晁瑞光. 八种鱼类 (鲤属和白鱼属) 的染色体组型研究. 动物学研究, 1980, **1** (2): 141—146]
- [20] Hartley S E. The chromosomes of salmonid fishes [J]. *Biological Reviews*, 1987, **62**: 197—214
- [21] Osinov A G. Genetic divergence and phylogenetic relationships between lenoks of genus *Brachymystax* and huchens of genera *Hucho* and *Parahucho* [J]. *Genetika (Moscow)*, 1991, **27**: 2127—2135 (in Russian)
- [22] Qunsiyeh M B. Evolution of number and morphology of mammalian chromosomes [J]. *Journal of Heredity*, 1994, **85**: 455—465
- [23] Luo J, Yang J X, Zhang Y P. Genetic basis of fish diversity [J]. *Zoological Research*, 2000, **21** (2): 158—164 [罗静, 杨君兴, 张亚平. 鱼类多样性的遗传基础. 动物学研究, 2000, **21** (2): 158—164]
- [24] Yin H B, Sun Z W, Sun D J, *et al*. 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, 等. 俄罗斯鲟的细胞遗传学分析. 水产学报, 2006, **30** (2): 181—184]
- [25] Ren X H, Cui J X. A study of the genome size variations in 14 species of Chinese fresh-water fishes [J]. *Hereditas*, 1994, **16** (3): 17—20 [任修海, 崔建勋. 14种淡水鱼基因组大小变异的研究. 遗传, 1994, **16** (3): 17—20]