

# 白暨豚的核型及其 C-带核型的研究

陈敏容 刘汉勤 官之梅 陈道权

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

## 提 要

采用常规的白细胞培养技术及 BSGC-带技术分析了白暨豚的核型、C-带核型。结果是: 白暨豚的染色体数目  $2n=44$ , 其核型由 12 条中部着丝点染色体、18 条亚中部着丝点染色体、4 条亚端部着丝点染色体、8 条端部着丝点染色体和 2 条性染色体所组成。染色体臂数 (NF) 雌性为 76, 雄性为 75。C-带异染色质呈现出很深的着色区, 主要分布在染色体臂上, 着丝点区则几乎没有。C-带异染色质的量约为总染色质量的 12%。这一结果表明白暨豚与海生豚类的核型、C-带核型有较明显的相似性。

关键词 白暨豚, 核型, C-带核型

白暨豚 (*Lipotes vexillifer* Miller) 是一种淡水豚类。属鲸目, 齿鲸亚目, 淡水豚科。关于豚类染色体的研究始于 1948 年, Makino<sup>[1]</sup>利用雄性生殖细胞直接制片的方法, 研究了白胸拟鼠海豚 (*Phocoenoides truei*) 的染色体, 确定其数目是  $2n=44$ , 且有一异形对。他认为这就是白胸拟鼠海豚的性染色体对。后来的几十年中, 豚类的核型研究进展较慢, 可能是因为尚未找到较好的研究方法。1965 年以来由于组织培养技术的发展和利用, Walen 和 Madin<sup>[2]</sup>做了宽吻海豚 (*Tursiops truncatus*) 和巨头鲸 (*Gloicephala macrorhynchus*) 等两种齿鲸类的核型, 其染色体数目皆为  $2n=44$ 。此后豚类的核型研究进展很快。Uifur Arnason<sup>[3]</sup>对齿鲸亚目和须鲸亚目的十几种豚类的染色体组型进行了比较, 并全面地讨论了这些豚类的核型以及它们的 Q 带、G 带、C 带和放射自显影等现代染色体研究技术, 对豚类遗传学研究提供了大量的细胞学依据。截至目前为止, 鲸目中已经研究过的不同科的豚类染色体组型已达 30 多种。

现存淡水豚科只有亚河豚科 (*Inia geoffrensis*)、恒河豚 (*Platanista gangetica*)、印河豚 (*Platanista indi*)、普河豚 (*Pontoporia blainvilliei*) 以及白暨豚等五种。Kulu<sup>[4]</sup>研究了亚河豚的染色体组型, 陈敏容等<sup>[5]</sup>也报道了白暨豚核型的初步研究。但尚未见带型研究的报道。鉴于白暨豚是世界上稀有的种类, 数量稀少且仅生活于我国长江中下游干流中, 研究白暨豚的遗传变异无疑是我国豚类学和遗传学的重要课题。本文对白暨豚的核型进行了较细致的研究, 并初步探讨了它的 C-带核型。

## 1 材料和方法

**1.1 材料来源和染色体制片** 从 1986 年捕获的雄性白暨豚联联和雌性白暨豚珍珍的尾柄静脉采血, 常规白细胞培养。培养液的配方是 8ml RPMI 1640(或 TC199)+2ml 小牛血清+0.4mg PHA+常量抗菌素。培养温度为  $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ 。培养 72h 后加入秋水仙素处理 3.5h, 秋水仙素的终浓度为  $0.05\text{--}0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ 。空气干燥制片, 低渗液为  $0.0375\text{mol/L KCl}$ ,  $38^{\circ}\text{C}$  低渗 20min。

**1.2 C-带处理** 采用改良的 BSG 法。其步骤是: (1) 酒精系列回水处理, 从 95% AlC—85% AlC—75% AlC—50% AlC—30% AlC 至水, 每次 2min, 气干。(2)  $0.5\%$   $\text{Ba(OH)}_2$  ( $22^{\circ}\text{C}$ ) 处理 5min 后用  $0.9\%$   $\text{NaCl}$  冲洗并在此溶液中漂洗两次, 每次 2min, 气干。(3)  $2\times$  SSC ( $0.3\text{mol/L}$  氯化钠,  $0.03\text{mol/L}$  柠檬酸三钠) ( $60^{\circ}\text{C}$ ) 处理 3h, 并在此溶液中漂洗 3 次, 每次 5min。(4) 酒精系列脱水处理。 $30\%$  AlC— $50\%$  AlC— $75\%$  AlC— $85\%$  AlC— $95\%$  AlC 每次 5min。(5) Giemsa 溶液(用磷酸—柠檬酸缓冲液配制, 浓度为 4%) 染色 5min。

**1.3 镜检分析** 雌、雄各计数 20 个中期分裂相, 确定其数目, 同时分别选取 7 个清晰的中期分裂相进行核型分析。4 个做过 C-带处理的分裂相(雄性)进行 C-带分析。

## 2. 结果

### 2.1 核型分析

白暨豚的核型作者曾经做了简要的描述, 与本文结果基本上一致。它是由 21 对常染色体, 1 对性染色体组成(图版 I: 1, 2)。单倍体总长雌性为  $85.67\mu\text{m}$ , 雄性为  $87.13\mu\text{m}$ 。根据它们的臂比按 Levan 命名法<sup>[6]</sup>分为四组(表 1, 2)。每一组染色体按其长度从大到小排列, 分别描述如下:

**M 组 (Metacentri)**  $r = 1.00\text{--}1.70$ : 中着丝点染色体, 由 6 对常染色体组成。这一组的主要特点是染色体较小, 其相对长度在  $40.6\text{--}26.7\%$  内变动, 每对染色体之间的差别甚微, 同时它们的臂比很接近, 用常规的染色方法很难正确配对。

**SM 组 (Submetacentri)**  $r = 1.70\text{--}3.00$ : 具亚中着丝点染色体, 由 9 对常染色体组成。这组染色体较 M 组长, 其相对长度在  $79.4\%\text{--}24.4\%$  之间。其中, SM1 和 SM2 两对染色体较大, 最易识别。SM1 的相对长度为  $75.22\%(\text{♀})$ ,  $79.43\%(\text{♂})$ , 仅次于两对最大的亚端着丝点染色体, 位居染色体组的第三。SM9 染色体的短臂附着容易识别。其余 6 对 SM 用常规染色方法也较难配对。

**ST 组 (Subtelocentri)**  $r = 3.01\text{--}7.00$ : 具亚端着丝点染色体, 由 2 对常规染色体组成。它们是这一组型中两对最大的染色体。ST1 的相对长度为  $99.22\%(\text{♀})$ ,  $97.95\%(\text{♂})$ , ST2 为  $84.43\%(\text{♀})$ ,  $88.21\%(\text{♂})$ , 最容易识别和配对。

**T 组 (Telocentri)**  $r = 7.01\text{--}\infty$ : 具端着丝点染色体, 由 4 对常染色体组成。它的主要特点是短臂不明显, 长度较长, 其相对长度范围是  $41.6\text{--}27.4\%$ 。它们之间有一定差异, 容易识别。

表 1 雌性白暨豚核型数据(7个细胞)

Tab.1 Chromosome measurement of female *Lipotes vexillifer* (based on 7 cells)

染色体 Chromosome	绝对长度 Absolute length		相对长度 Relative length		臂比 Arm ratio	
	平均 Mean	幅度 Ranges	平均 Mean	标准误 Standard error	平均 Mean	标准误 Standard error
	X	3.91	2.84—5.57	44.89	4.29	1.33
M1	3.50	2.74—4.44	40.65	3.51	1.32	0.08
M2	3.12	2.47—3.57	36.34	2.25	1.43	0.20
M3	2.85	2.37—3.50	33.30	2.62	1.51	0.10
M4	2.71	2.14—3.25	31.67	2.42	1.34	0.13
M5	2.57	2.04—2.90	30.14	2.83	1.41	0.19
M6	2.33	1.74—2.64	27.49	3.45	1.45	0.14
SM1	6.49	4.10—8.75	75.22	4.96	2.36	0.22
SM2	5.91	4.10—7.24	69.17	3.93	2.40	0.26
SM3	5.11	3.67—7.07	58.84	2.72	2.51	0.35
SM4	3.99	3.00—4.64	46.44	3.06	1.97	0.21
SM5	3.78	2.74—4.63	43.87	1.84	2.16	0.22
SM6	3.61	2.73—4.18	41.95	2.26	2.35	0.41
SM7	3.34	2.44—4.17	38.86	2.46	2.16	0.36
SM8	2.79	2.00—3.70	32.21	3.30	1.93	0.13
SM9	2.12	1.43—3.34	24.41	5.06	2.11	0.15
ST1	8.65	5.80—11.47	99.22	5.36	3.29	0.23
ST2	7.37	5.04—10.00	84.43	4.97	3.20	0.11
T1	3.62	2.60—4.85	41.60	2.73	$\infty$	
T2	3.29	2.27—4.64	37.77	2.92	$\infty$	
T3	2.99	2.07—3.95	34.44	3.24	$\infty$	
T4	2.37	1.73—2.87	27.38	2.77	$\infty$	

性染色体 X 染色体是具中着丝点染色体。属 M 组中最长的染色体, 相对长度是 44.89%<sub>oo</sub>(♀), 43.73%<sub>oo</sub>(♂)。Y 染色体则是 T 组染色体中一微小染色体, 其相对长度只有 11.53%<sub>oo</sub>。

## 2.2 C-带分析

雄性白暨豚的 C-带核型[图版 I: 3], C-带异染色质呈现很深的着色区, 主要分布在染色体的臂上, 着丝点区则几乎没有。分别描述如下:

M 组: 这一组的 C-带不明显, 其中 M1 长臂, M3 长臂, M4 短臂, M5 长臂等 C-带隐约可见, 染色模糊, 无法计算出它的量。

SM 组: SM1 长臂, SM2 长臂 C-带明显, 其它染色体的 C-带染色模糊。如 SM1 短

臂, SM2 短臂, SM5, SM6 等染色体长臂均有很淡的着色区。

表 2 雄性白暨豚核型数据(7个细胞)

Tab.2 Chromosome measurement of male *Lipotes vexillifer* (based on 7 cells)

染色体 Chromosome	绝对长度 Absolute length		相对长度 Relative length		臂比 Arm ratio	
	平均 Mean	幅度 Ranges	平均 Mean	标准误 Standard error	平均 Mean	标准误 Standard error
X	3.81	2.67—4.93	43.73	2.32	1.44	0.17
M1	3.36	2.50—3.97	38.88	2.83	1.40	0.11
M2	3.08	2.27—3.74	35.67	2.11	1.40	0.10
M3	2.95	2.24—3.59	34.29	2.59	1.35	0.16
M4	2.70	2.20—3.17	31.50	3.40	1.40	0.12
M5	2.55	2.04—3.17	29.66	3.35	1.55	0.13
M6	2.31	1.80—3.03	26.77	2.24	1.40	0.09
SM1	7.00	4.20—9.94	79.43	5.64	2.66	0.18
SM2	6.37	3.70—9.03	72.41	5.71	2.58	0.26
SM3	4.77	3.10—6.50	54.60	3.98	2.49	0.35
SM4	4.11	2.84—5.30	47.74	2.78	2.20	0.26
SM5	3.71	2.73—4.63	42.90	2.12	2.49	0.39
SM6	3.56	2.33—4.50	40.91	1.48	2.13	0.41
SM7	3.26	2.30—4.40	37.58	2.24	2.06	0.24
SM8	2.95	2.07—3.94	33.86	2.79	2.10	0.34
SM9	2.09	1.80—2.53	24.81	4.72	2.04	0.07
ST1	8.65	4.94—12.64	97.95	7.94	3.19	0.21
ST2	7.88	4.70—11.39	88.21	4.43	3.41	0.20
T1	3.53	2.20—4.77	40.20	3.24	$\infty$	
T2	3.30	2.20—4.50	37.70	0.97	$\infty$	
T3	2.82	2.07—3.67	32.61	2.50	$\infty$	
T4	2.52	2.00—3.00	29.40	3.25	$\infty$	
Y	0.94	0.67—1.20	11.53	2.97		

ST 组: 这一组的两对大染色体不仅在长臂上有很深的着色区, 而且短臂的着色也不浅。ST1 同源染色体的短臂上的 C-带有明显的大小异态现象。

T 组: T 组 C-带染色不明显。T1 和 T2 C-带尚隐约可见而 T3 和 T4 则完全没有。性染色体: X 和 Y 均没有明显的 C-带。

在一个细胞中 C-带异染色质的量约占总染色质 12% 左右, 除 SM1、ST1 同源染色体短臂上的 C-带异染色质有明显的大小异态外, SM5 长臂、T1 等同源染色体中均有 C-带异染色质大小异态现象存在。这种 C-带异染色质区的大小异态现象在豚类的染色体

带型研究中是经常出现的。

### 3. 讨论

对于豚类这样一种大型水生哺乳动物而言, 制备染色体标本的样品来源受到一定的限制。从目前已发表的鲸目动物核型报道来看, 除抹香鲸(*Physeter Catodon*)采用外周血白细胞培养来制备染色体标本外<sup>[7]</sup>, 其它几乎是采用组织培养的方法。有的用活体解剖方法, 对正在游泳的鲸取下表皮组织进行培养来制备染色体标本, 如虎鲸(*Orcinus orca*)<sup>[8]</sup>、蓝鲸(*Balaenoptera musculus*)<sup>[9]</sup>捕获后将动物杀死, 取肺、肾、表皮、角膜等组织经培养后作为制备染色体标本的样品来源<sup>[3, 8, 10, 11]</sup>。有的则捕获后杀死取其骨髓直接制片, 如江豚(*Neophocaena phocaenoides*)<sup>[12]</sup>。然白暨豚数量稀少, 捕获不易, 且已被国家列为一类保护动物, 更不能滥捕滥杀, 在这种情况下, 本实验室采用外周血白细胞培养方法来制备白暨豚染色体标本更显意义重要。白暨豚是一种水生哺乳动物, 只按哺乳动物血细胞培养常规方法想获得大量清晰分裂相还不够稳定, 它的最适条件尚待进一步探索。

白暨豚的核型具有一般齿鲸类所共有的核型特征。除抹香鲸和小抹香鲸(*Kogia breviceps*)<sup>[7, 13]</sup> $2n = 42$  外, 其它豚类均为  $2n = 44$ 。它们的核型大都有这样的特点: 最大的染色体在 SM 和 ST 组, SM 组中最小的一对染色体常常有短臂附着现象出现, X 染色体是 M 组(少数为 SM 组)中最大的染色体, 而 Y 则是 t 组中最小的染色体。

白暨豚的 C-带核型也具有一般齿鲸类 C-带核型的共同特点: C-带异染色质区段存在于染色体臂的中间或短臂的末端, 而着丝点区则很少, 有的几乎没有。在两个同源染色体之间常常显示出 C-带异染色质的异态现象。同时有几对染色体臂间 C-带异染色质区段特大, 以至于在常规染色的片子中也能看到它们的存在。C-带异染色质的量估计为总染色质的 12%。

豚类核型和带型的相似性, 证明了鲸目中各科之间的核型是比较稳定和保守的<sup>[3, 13]</sup>。Arnason 曾经多次强调, 由于海生哺乳动物性成熟迟, 繁殖率低, 漫游广阔以及在环境中无明显的物理障碍而未发生象嚼齿类和食虫目那样近亲繁殖而造成的核型多样化<sup>[13, 14]</sup>, 因此它们的核型相对是稳定的。白暨豚与海生豚类的核型 C-带核型的相似性, 是否表明白暨豚的祖先原就生活在海洋? 作者认为这一问题的深入探讨将有助于进一步研究白暨豚的起源和进化。

### 参 考 文 献

- [1] Makino S. The chromosomes of Dall's porpoise, *phocoenoides* Dallii (True), with remarks on the phylogenetic relation of the Cetacea. *Chromosoma*, 1948, 3: 220—231.
- [2] Walen K. H. and Madin S. H. Comparative chromosome analyses of the bottlenosed dolphin (*Tursiops truncatus*) and the pilot whale (*Globicephala scammoni*). *Nature*, 1965, 99: 349—354.
- [3] Arnason U. Comparative chromosome studies in Cetacea. *Hereditas*, 1974, 77: 1—36.
- [4] Kulu DD, Veomett I, Sparres R. Cytogenetic comparison of four species of cetaceans. *J. Mammal.* 1971, 52: 828—832.
- [5] 陈敏容等. 白暨豚核型的初步研究. 水生生物学报, 1986, 10(3): 290—292.
- [6] Levan A, et al. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 1964, 52: 201—220.
- [7] Atwood R P, Razavi L. Chromosomes of the sperm whale. *Nature*, 1965, 207: 328—329.

- [8] Arnason U, Lutley R, Sandholt B. Banding studies on six killer whales: an account of C-band polymorphism and G-band patterns. *Cytogenet. Cell Genet.* 1980, **28**: 71—78.
- [9] Arnason U, et al. Conventionally stained and C-band karyotypes of a female blue whale. *Hereditas*. 1985, **102**: 251—253.
- [10] 张锡然等. 江豚分带核型的研究. 鲸类学报, 1989, **9**(4): 281—284.
- [11] Arnason U, et al. Banded karyotypes of three whales: *Mesoplodon europaeus*, *M. carlhubbsi* and *Balaenoptera acutorostrata*. *Hereditas*, 1977, **87**: 189—200.
- [12] 彭步、陈俊才. 江豚的染色体核型研究. 鲸类学报, 1985, **5**(3): 161—165.
- [13] Arnason U. Banding studies on the gray and sperm whale karyotypes. *Hereditas*, 1981, **95**: 277—281.
- [14] Arnason U. Karyotype stability in marine mammals. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1982, **33**: 274—276.

## THE KARYOTYPE AND THE C-BAND PATTERNS OF THE BAIJI DOLPHIN, *LIPOTES VEXILLIFER*

Chen Minrong, Liu Hanjin, Guan Zhimei and Chen Daoquan

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

### Abstract

The karyotype and the C-band patterns of the Baiji dolphin (*Lipotes vexillifer*) was performed on cultures of peripheral leucocytes. The chromosome number of diploid is 44 ( $2n=44$ ). The karyotype was composed of 12M, 18SM, 4St, 8T and 2 sex chromosome. The largest autosome was ST1, and the smallest was T4. X chromosome was the largest in M group, and Y was the smallest in T group. The C-band heterochromatin was mainly present in the chromosome arm area as distinct blocks. The centromeric regions were faintly stained. The largest heterochromatic blocks were seen proximal to the middle of the long arms of the chromosome SM1, SM2, ST1 and ST2. The size heteromorphism was found in the terminal heterochromatic blocks of SM1, ST1 and in the interstitial of SM5, T1, T2. The C-heterochromatin approximated 12% of the total chromatin in one cell measured.

**Key words** *Lipotes vexillifer*, Keryotype, C-band pattern