

· 研究报告 ·

施氏鲟的核型及 DNA 含量研究^①

宋苏祥 刘洪柏 孙大江 范兆廷

(中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 哈尔滨 150070)

桂建芳

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要 采用体内注射小牛血清、肾组织细胞短期培养、常规空气干燥法制备了施氏鲟(*Acipenser schrencki* Brandt)的染色体, 并进行了核型分析。施氏鲟二倍体的染色体为 238 ± 8 条, 其核型为 $78m+12sm+28st, t+120 \pm mc, NF: 328 \pm$ 。以外周血红细胞为样本, 鸡的红细胞为对照, 用美国产的 FACStar Plus 流式细胞仪测定了施氏鲟二倍体细胞核的 DNA 含量, 其 DNA 含量为鸡的 5.06 倍, 绝对含量为 $11.73 \pm 0.68 \text{ pg} / N$ 。

关键词 施氏鲟, 核型, DNA 含量

The Karyotype and Cellular DNA Contents of Amur Sturgeon (*Acipenser schrencki*)

Song Suxiang Liu Hongbai Sun Dajiang Fan Zhaoting

(Heilongjiang River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Harbin 150070)

Gui Jianfang

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

Abstract Metaphase chromosome specimens of Amur Sturgeon, injected with fetal calf serum, were prepared from short-term culture of kidney cells with air-drying technique. Its diploid chromosome number is $2n = 238 \pm 8$. Karyotype consists of $78m+12sm+28st, t+120 \pm mc, NF: 328 \pm$. Diploid nucleus DNA content was measured from the peripheral erythrocytes, using flow cytometer (FACStar Plus, made in USA) and erythrocytes of chick (*Gallus sp*) as internal standard. DNA content of the fish is $11.73 \pm 0.68 \text{ pg} / N$ and the ratio to that of chickens is 5.06.

Key words Amur Sturgeon, Karyotype, DNA content

鲟形目是一类比较原始且又具有重要渔业价值的鱼类, 是分布于北半球的淡水性或溯河性鱼类。由于鲟鱼籽是鱼籽酱的原料, 国际市场对鱼籽酱的需求和高昂的价格刺激了对鲟鱼的捕捞, 使得一些鲟鱼的资源量急剧下降, 甚至有些种类濒于灭绝。施氏鲟是中俄界黑龙江的特有鲟科鱼类, 有着重要的经济价值和广阔的开发前景。早在 50 年代我国就对施氏鲟的人工繁殖进行了研究, 近年来已开始进行人工养殖工作, 并取得了可喜的成

^①本研究获 International Foundation for Science 机构资助, 项目编号为 A / 2209-1。

果⁽²⁾。虽然前苏联及一些欧洲国家对鲟鱼进行了大量的研究工作,但涉及施氏鲟的内容较少,只是些形态和生态方面的研究,尚未见到细胞生物学等方面的报道。为了更进一步利用和保护鲟鱼类宝贵的遗传资源,我们利用 IFS 基金对施氏鲟的发育生物学和遗传学进行了研究,本文是这一研究的部分结果。

1 材 料 和 方 法

施氏鲟(*Acipenser schrencki* Brandt)取自黑龙江省农场总局勤得利鲟鱼放流站人工繁殖的仔鱼,室内养殖至体重为 50~150g。实验鱼按着每 100g 体重注射 0.5ml 小牛血清,在试验前 4 天注射第一针,24 小时前注射第二针。实验时将鱼杀死,取其前肾置于鱼用生理盐水或 RPMI-1640 培养液中,用镊子将肾组织撕碎,使其中的细胞游离出来后,将结缔组织取出,按 1~2 μ g/ml 生理盐水或培养液的浓度加入秋水仙素,在 20℃ 左右的条件下培养 3 小时,然后将细胞悬浮于生理盐水或培养液中,用 1 000r/min 的速度离心 8 分钟,弃掉上清液,用 0.5% 的 KCl 溶液在 30℃ 水浴条件下低渗处理 30 分钟,用卡诺氏固定液固定,按常规空气干燥法制备染色体玻片标本。

染色体玻片用 3% 的 Giemsa 染液染色 15 分钟。在显微镜下拍照中期分裂相,放大后计数,确定染色体数目。选择 5 个数目完整、收缩适中和形态清晰的分裂相显微拍照、放大,按着 Levan 等的标准^[12]测量染色体的有关参数,配组分析。

用加入抗凝剂的注射器在施氏鲟的尾动(静)脉采血 0.2~0.5ml,经低速离心机(<500 r/min)离心分离白血球和红血球,将分离好的红血球用生理盐水洗涤离心后,卡诺氏固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)固定,固定好的红细胞样本在 4℃ 避光条件下用碘化丙啶(Propidium iodide)染色 20 分钟。用美国 Becton Dickinson 公司生产的 FACStar Plus 流式细胞仪,在氩离子激光 innova 90-5、波长 488nm、检测功率 200mw 的条件下测量每个红血球的 DNA 含量。按上述方法采鸡血(*Gallus sp.*)做对照样同时测量。

2 结 果

对 60 个中期分裂相的染色体数进行了统计,结果见表 1。施氏鲟的染色体数目分布范围在 221~251 之间,其中在 236~240 之间相对集中,众数占 33.5%,故可认定 236~240 的中间值为众数染色体数,即施氏鲟的二倍染色体数(2n)为 238 \pm 8。其中具有明显着丝点的染色体数为 118 条。

根据 Levan 等的分类标准,对施氏鲟 5 个中期分裂相进行放大测定,染色体中期分裂相见图版 I, 1,染色体的核型见图版 I, 2。

表 1 施氏鲟的染色体数分布频率

染色体数	221~230	231~235	236~240	241~245	246~251	细胞总数
细胞数	813.3	8	24	12	8	60
%	13.3	13.3	33.5	26.6	13.3	100

在施氏鲟的 238 \pm 8 个染色体中,有 45 对中部和亚中部着丝点染色体(m,sm),有 14 对亚端部和端部着丝点染色体(st, t),有 120 \pm 微小染色体,染色体臂数(NF)约为 328 \pm ,其核型为 78m+12sm+28st, t+120 \pm mc, NF: 328 \pm 。

对 10 尾施氏鲟的红细胞 DNA 含量进行了测定,其结果经过统计处理,所得数据见表 2。

以小公鸡血细胞 DNA 含量值为 2.30pg/N 计算,施氏鲟红细胞的消光值与小公鸡血细胞消光值的比值为 5.06 \pm 0.35,其绝对 DNA 含量为 11.73 \pm 0.68pg/N。

表 2 施氏鲟的 DNA 含量测定值

序 号	消 光 值	鸡 血 对 照	鱼 鸡 比	含 量 (pg / N)
1	319	72	4.43	10.19
2	322	66	4.40	11.22
3	321	64	5.02	11.55
4	305	57	5.35	12.30
5	308	56	5.50	12.65
6	305	58	5.26	12.10
7	295	59	5.00	11.50
8	308	60	5.13	11.80
9	303	58	5.22	12.01
10	313	60	5.22	12.01
平 均	309.9 ± 8.7	61.0 ± 4.9	5.06 ± 0.35	11.73 ± 0.68

3 讨 论

每一种真核生物都有一个基本稳定不变的染色体组, 这样才能保持世代间遗传的稳固传递。这个染色体组的染色体数不能缺失或增加, 否则将导致遗传平衡的失调, 甚至个体的死亡。也有人将点状染色体(dot like chromosome)或小染色体(microchromosome)称为超数染色体(supernumerary chromosome)^[1, 4, 8, 17]。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, 因此, 鲟形目鱼类的染色体组几乎都有点状染色体, 而且数量之大也是其他具有点状染色体的种类所无法比拟的。虽然点状染色体并不能肯定为进化欠发达的象征, 但大量的点状染色体的存在则是鲟形目鱼类特有的特点。

对于鱼类的点状染色体, 在已有的研究中多限于形态和数量的描述, 关于其构成成分和在遗传中的作用, 尚未见报道。鲟鱼类中大量点状染色体的存在是否为必须的, 在染色体上携带的基因如何, 对个体的遗传作用如何等问题尚需进一步研究。

在已研究过核型的鱼类中, 染色体数量最多的种类是鲟鱼, 已报道的最高数量是中华鲟, $2n = 264 \pm$ ^[1], 这说明鲟鱼染色体同时具有染色体数量多、个体小、B 染色体多的特点。而 B 染色体在个体间的数量变异又为准确确定该种染色体数目带来困难, 加之染色体数多, 玻片标本制作难度大, 染色体易丢失等更加剧了这一难度。因此, 对于染色体数较多的鲟鱼, 染色体数只能确定一个范围^[1, 5, 10, 15, 16, 18]。

表 3 鲟鱼类的染色体数量及核型

种 类	染色体数量	中部着丝点染色体	亚中部着丝点染色体	亚端部和端部着丝点染色体	微小染色体	研究 者
施氏鲟	238 ± 8	78	12	28	120 ±	笔 者
中华鲟	264 ±	78	20	26	140 ±	余先觉 1989
俄国鲟	250 ± 8	92 ± 4			76 ±	Arefjev, 1989
红 鲟	118 ± 4	82 ± 4		36		Birstein, 1987
闪光鲟	118 ± 2	70 ± 4		48		Birstein, 1987
鳊 鱼	118 ± 2	60 ± 2		58		Birstein, 1987

此外, 不同的研究者在研究同一种鲟鱼时, 由于研究者所采用的方法和手段的不同, 得到的结果也不尽一

致, 如 Birstein (1987) 报道, 鲟鱼(*Huso huso*) $2n = 118 \pm 2$ ⁽⁷⁾, 而 Ojima (1986) 的报道则为 116 ± 4 ⁽¹⁵⁾。

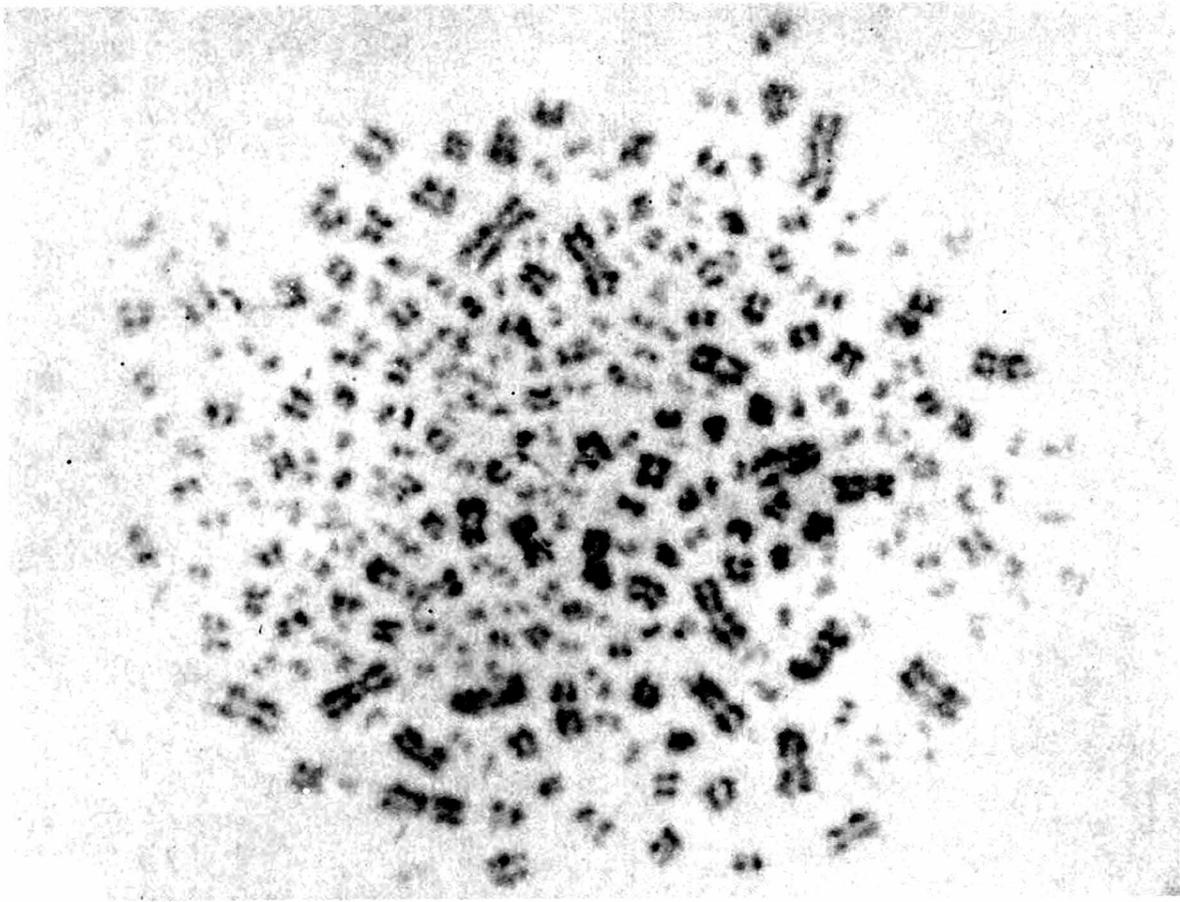
表 3 是不同研究者对鲟鱼的核型分析结果, Berg (1955) 根据古生物学资料指出, 鲟形目(Acipenseriformes) 形成于 200 万年前, 鲟科(Acipenseridae) 才形成 8 万年^(6, 14)。该目鱼类的原始核型大概为 60 条染色体, 其亲缘种的 $2n \approx 60$, 如, *Lepisosteus oculatus* 的 $2n = 68$; *L. osseus* 的 $2n = 56$ ^(13, 15)。因此, Birstein 和 Vasilev (1987) 认为, $2n = 120 \pm$ 的鲟形目鱼类为四倍体, 而 $2n = 240 \pm$ 则为八倍体⁽⁷⁾。

根据这一观点, 施氏鲟应为八倍体鱼类。在鱼类中普遍存在着多倍体现象, 而且多倍化在鱼类进化中起了重要的作用, 许多鲤科、胭脂鱼科、鲑科等科的鱼类都曾发生过多倍化, 而且经过长期的进化, 这些鱼类都已趋向于功能二倍化。无疑鲟科鱼类也经历了二倍化过程, 虽然在进化或二倍化过程中, 染色体数量的变异是不可避免的, 但鲟科鱼类之间可以杂交并可获得后代^(3, 7), 表明这一类群的遗传基础还保持着较大的一致性。

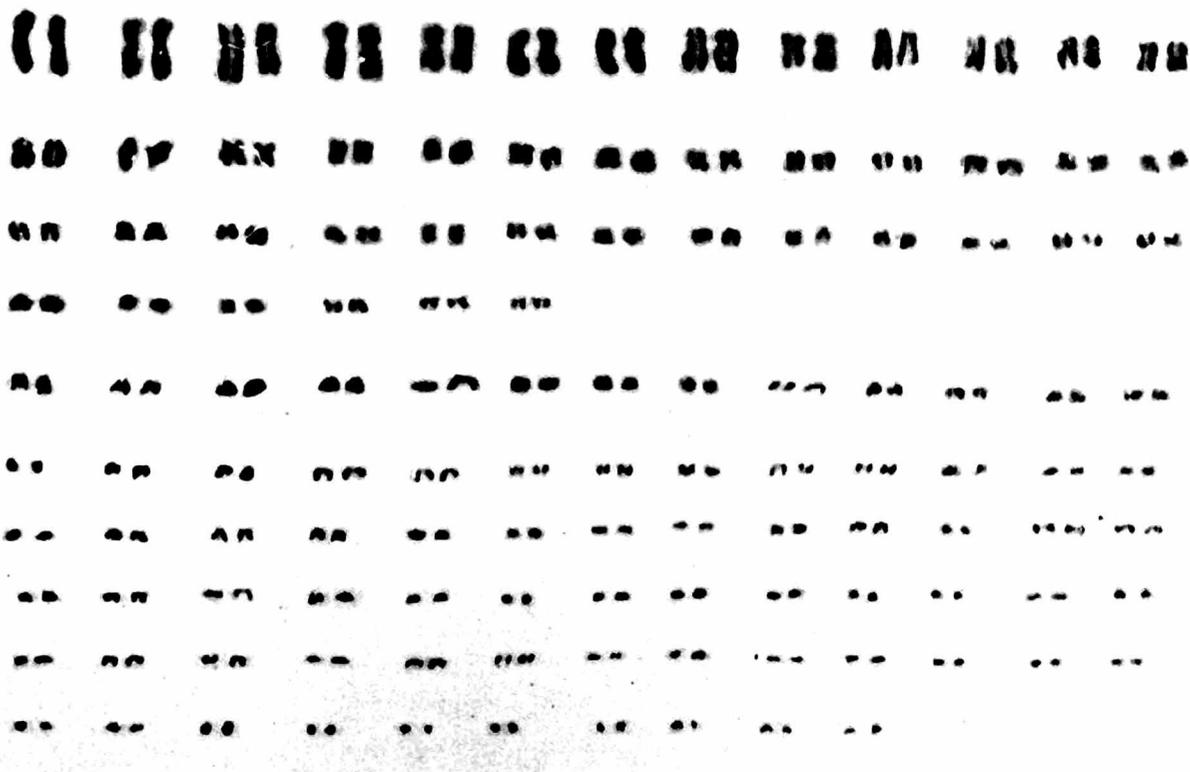
染色体的主要构成成分是脱氧核糖核酸, 因此, 测定 DNA 含量也是研究生物基因组的一个手段, 它可以从另一侧面反映出染色体数的多少和倍性。然而, 因不同作者研究的方法、仪器设备都不尽一致, 更重要的是对照标准不同, 使得不同研究结果横向比较失去意义。如有的研究者以人血为对照测定 DNA 含量, 也有的以小鼠、蟾蜍、虹鳟鱼血作对照, 还有的采用小公鸡血作为对照^(8, 9, 11)。即使是用小公鸡血作为对照, 也因其标准的 DNA 含量不等 ($2c = 2.0, 2.3, 2.8 \text{pg} / \text{N}$)⁽¹⁷⁾, 测定结果也不相同。本研究采用内定标流式细胞仪测量, 以小公鸡血作为对照, 以 $2.30 \text{pg} / \text{N}$ 为标准, 测得的施氏鲟的 DNA 含量高于常见的淡水鱼类。

参 考 文 献

- 1 余先觉, 周 瞰等. 中国淡水鱼类染色体. 北京: 科学出版社, 1989, 4~9
- 2 陈声栋等. 施氏鲟幼鲟人工配合饵料室内饲养试验报告. 黑龙江水产, 1993, 3: 14~17
- 3 张觉民等. 黑龙江省鱼类志. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1995, 24~36
- 4 小岛吉雄. 鱼类细胞遗传学. 东京: 水交社, 1983, 35~42
- 5 Arefjev V A. Issledovanie Karyotypa Osetra *Acipenser gueldenstaedti* Brandt (Chondrostei). *Cytologia Genetica*, 1989, 24(4): 7~13
- 6 Berg L S. System of fishes, contemporary and fossil. Tr. Zool. Inst. Acad. Sci. USSR, Moscow-Leningrad, 1955, 20: 1~286
- 7 Birstein V J, Vasilev V P. Tetraploid-octoploid Relationships and Karyological Evolution in the Order *Acipenseriformes* (Pisces). *Karyotypes, Nucleoli and Nucleolusorganizer Regions in Four Acipenserid Species*. *Genetica*, 1987, 72: 3~12
- 8 Birstein V J, Poletaev A I, Goncharov B F. DNA Content in Eurasian Sturgeon Species Determined by Flow Cytometry. *Cytometry*, 1993, 14(4): 377~383
- 9 Cui J, et al. Nuclear DNA Content Variation in Fishes. *Cytologia*, 1991, 56: 425~429
- 10 Fontana F, Colombo G. The Chromosomes of Italian Sturgeons. *Experientia*, 1974, 30 / 7: 739~742
- 11 Fontana F. Nuclear DNA Content and Cytometry of Erythrocytes of *Huso huso* L., *Acipenser sturio* L. and *Acipenser naccarii* (Bonaparte). *Karyologia*, 1976, 29(1): 127~138
- 12 Leván A, Fredya K, Sandber A. Nomenclature for Centromeric position on chromosomes. *Hereditas* Band, 1964, 52(2): 201~220
- 13 Ohno S, Muramoto J, Stenius C, et al. Microchromosomes in holocephalian, chondrosteian and holostean fishes. *Chromosoma*, 1969, 26: 35~40
- 14 Ojima Y, Yamano T. A chromosome study of the holostean long lose gar *Lepisosteus osseus*. *Chrom. Inform. Sery*, 1980, 28: 7~8
- 15 Ojima Y, Nakanishi Y, Takai A. Chromosomal Studies of Cultured Cells from the Hybrids between *Huso huso* and *Acipenser ruthus*. *Proceedings of the Japan Academy*, 1996, 62(3): 87~90
- 16 Rab P A. A Note on the Karyotype of the Sterlet, *Acipenser ruthus* (Pisces, Acipenseridae). *Folia zoologica*, 1986, 35(1): 73~78
- 17 Swanson C P, Mera T, Young W J. Cytogenetics, the chromosome in division, inheritance and evolution. London: Prentice-Hall-International, 1981, 473~548
- 18 Vasilev V P, Sokolov L I, Serebrjakova E V. Karyotype Sibirskovo Osetra *Acipenser baeri* Brandt. *Reki Leny i Nekotorie Voprosy Evoljucii Karyotipov Osetroobraznyh*. *Voprosy Ichtiologii*, 1980, 20(6): 814~823



1



2

1. 施氏鲟的染色体中期分裂相; 2. 施氏鲟的核型.