

# 准噶尔雅罗鱼染色体核型及带型的初步研究

王佳君 胡文革\* 孔磊

(石河子大学生命科学学院 新疆 石河子 832003)

**摘要:**以肾细胞作材料,采用秋水仙素-低渗-空气干燥法、Ag-NORs、C-带和G-带显带技术对准噶尔雅罗鱼(*Leuciscus merzbacheri*)染色体进行了研究。结果表明:(1)准噶尔雅罗鱼  $2n = 50$ ,核型组成为  $18m + 14sm + 6st + 12t$ ,  $NF = 82$ ,没有异型性染色体分化。(2)Ag-NORs的数目在不同的细胞中表现出多态性,数目为1~2个,出现1个Ag-NORs的频率最低(10%),出现2个的频率最高(70%);Ag-NORs主要出现在m1对和m4对同源染色体上;未发现有Ag-NORs联合的现象。(3)准噶尔雅罗鱼的染色体均呈现C-带阳性,可分为着丝粒C-带和端粒C-带。(4)同源染色体上G-带带纹基本一致,其带纹在每对染色体上的数目及分布具有明显特征性。

**关键词:**准噶尔雅罗鱼;核型;Ag-NORs;C-带;G-带

中图分类号:Q953 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2010)06-120-07

## Karyotype and Banding Pattern of *Leuciscus merzbacheri*

WANG Jia-Jun HU Wen-Ge\* KONG Lei

(College of Life Sciences, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003, China)

**Abstract:**The chromosome spreading of metaphase kidney cells was conducted by colchicine-low concentration-air drying technique in *Leuciscus merzbacheri*, and Ag-NORs, C-band and G-band were analyzed in this paper. *L. merzbacheri* had a diploid chromosome number of  $2n = 50$ , its karyotype formula was  $18m + 14sm + 6st + 12t$ ,  $NF = 82$ , and sex chromosome was not found. The Ag-NORs polymorphisms were individually specific, 1-2 in number, and the frequency of single Ag-NORs was the lowest (10%), while the frequency of 2 Ag-NORs was the highest (70%). Ag-NORs mostly appeared in the chromosome m1 and m4. The associations of Ag-NORs were not observed. All the chromosomes were C-band positive, and composed of centromeric C-band and telocentric C-band. The G-bands in homologous chromosomes were basically coincident, and distinctive character of banding number and distribution could be identified in every homologous chromosome.

**Key words:***Leuciscus merzbacheri*; Karyotype; Ag-NORs; C-band; G-band

准噶尔雅罗鱼(*Leuciscus merzbacheri*)属鲤形目(Cypriniformes)鲤科(Cyprinidae)雅罗鱼亚科(Leuciscinae),又名新疆雅罗鱼<sup>[1-2]</sup>。在世界地理分布区划上,准噶尔雅罗鱼是新疆特有鱼类,仅分布于新疆准噶尔盆地各水系<sup>[3]</sup>。近十几年来,由于过度捕捞,水域环境的改变,导致其分布区域减少,资源严重衰退,面临濒危的局面。

迄今为止,国内学者对准噶尔雅罗鱼形态

特征<sup>[3]</sup>、生活习性<sup>[4]</sup>、线粒体DNA序列<sup>[5-6]</sup>、骨骼系统及分类学意义<sup>[7]</sup>等方面曾作过研究,但在核型组成、C-带、G-带及Ag-NORs等方面尚

基金项目 国家自然科学基金项目(No. 30860215);

\* 通讯作者, E-mail: hwg-t@163.com;

第一作者介绍 王佳君,女,硕士研究生;研究方向:生物化学与分子生物学;E-mail: jiajunwanganhui@163.com;

收稿日期:2010-05-24,修回日期:2010-09-20

未涉及。针对这一情况,我们开展了准噶尔雅罗鱼核型和带型方面的研究工作,旨在探讨其遗传学特性,填补领域内对该物种研究的空白,为准噶尔雅罗鱼的遗传、变异、系统演化、杂交育种及物种资源保护提供基础资料和依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 实验所用的准噶尔雅罗鱼 10 尾(2 ♀ 8 ♂),体重 25 ~ 50 g,均为采自新疆准噶尔盆地精河的野生鱼类。

### 1.2 方法

**1.2.1 染色体标本制备** 参照林义浩的方法<sup>[8]</sup>,按体重的 10 μg/g 剂量在鱼的胸鳍基部 45°角注射植物血凝素 PHA,20 h 后注射秋水仙素(1 μg/g) 2 h 后剪断腓动脉失血 20 min,取头肾和肾于 0.8% 生理盐水中洗涤,撕碎,取上清液于离心管收集细胞,加入 0.075 mol/L KCl 低渗液处理 25 min,再离心收集细胞,经 3 次卡诺氏固定液固定后,冰片滴片,用 10% Giemsa 染色 15 min,蒸馏水清洗,自然干燥镜检。

**1.2.2 核型分析** 从染色体标本上选出清晰的中期分裂相进行染色体计数,并选出分散良好、长度适中、着丝点清晰、两条染色单体适度分开的标本显微摄影,按 Levan 等<sup>[9]</sup>的标准进行分类归组。

**1.2.3 银染** 参照 Howell 等<sup>[10]</sup>快速银染法略作修改。标本上加 2 滴 2% 明胶溶液(内含 1% 甲酸)显影,涂匀,再加 4 滴 50% 的硝酸银溶液,覆盖玻片,在 60℃ 恒温箱处理 10 ~ 15 min,流水冲去盖玻片,干燥后镜检。

**1.2.4 C-带带型** 采用 Sumner<sup>[11]</sup>的 BSG 法略作修改。将染色体标本放入 0.2 mol/L HCl 染缸中 25℃ 处理 1 h,蒸馏水冲洗,空气干燥;然后放入新配制的 5% Ba(OH)<sub>2</sub> 液中 60℃ 处理 30 ~ 60 s,用 0.2 mol/L HCl 中和后,蒸馏水冲洗,空气干燥;再转入 60℃ 的 2 × SSC 液中处理 1 h,蒸馏水冲洗,空气中干燥;用 10% 的 Giemsa 染色 20 min,蒸馏水冲洗,干燥后镜检。

**1.2.5 G-带带型** 按照 Seabright<sup>[12]</sup>的方法略

作修改。将染色体标本置 60℃ 烘箱中处理 2 h 后,37℃ 预温的 0.25% 胰酶溶液(pH 7.0)中处理 30 s,蒸馏水冲洗,自然干燥;10% Giemsa 染色 8 min,蒸馏水冲洗,干燥后镜检。

## 2 结果

**2.1 染色体组型** 根据对 100 个中期分裂相的观察结果,确定准噶尔雅罗鱼  $2n = 50$  (表 1),NF = 82 核型分成 A、B、C、D 4 组。A 组:9 对,为中部着丝粒染色体(m);B 组:7 对,为亚中部着丝粒染色体(sm);C 组:3 对,为亚端部着丝粒染色体(st);D 组:6 对,为端部着丝粒染色体(t),未发现异型性染色体,也未发现带有特殊标志性特征(如随体、次缢痕等)的染色体。核型公式为  $2n = 18m + 14sm + 6st + 12t$  (表 2,图 1)。

表 1 准噶尔雅罗鱼分裂中期染色体数的出现频率

Table 1 Frequency of chromosomal number of mitotic metaphase cells

染色体数目(2n) Chromosome numbers	分裂相数 Splitting phase	出现频率(%) Frequency
47	3	3
48	6	6
49	13	13
50	77	77
51	1	1

**2.2 银染核型** 准噶尔雅罗鱼的银染明显(图 2)。中期分裂相及间期核中 Ag-NORs 数目在不同的细胞中表现出多态性,数目为 1 ~ 2 个,出现 1 个 Ag-NORs 的频率低(10%),2 个 Ag-NORs 的频率高(70%),故判定其 Ag-NORs 的数目为 2 个。在大部分分裂相中,银染点位于 m1 和 m4 中一条染色体的短臂末端。未见其有 Ag-NORs 联合的现象。

**2.3 C-带带型** 准噶尔雅罗鱼的 50 条染色体均呈现 C-带阳性,且 C-带非常发达(图 3)。同源染色体 C-带的大小、位置以及着色强度有所不同,不同染色体的 C-带强度也有一定的差异。A 组的 No. 1 其中一条染色体和 No. 2 ~ 7 染色体上同时出现着丝粒 C-带和端粒 C-带,

表 2 准噶尔雅罗鱼染色体组型分析数据  
Table 2 The karyotype data of *Leuciscus merzbacheri*

染色体序号 Number of chromosome	相对长度 Relative length	臂比 Arm ratio	着丝点位置 Centromere position	染色体序号 Number of chromosome	相对长度 Relative length	臂比 Arm ratio	着丝点位置 Centromere position
1	5.31 ± 0.45	1.11 ± 0.07	m	14	3.77 ± 0.06	2.01 ± 0.11	sm
2	4.42 ± 0.01	1.20 ± 0.01	m	15	3.61 ± 0.01	2.03 ± 0.01	sm
3	4.23 ± 0.11	1.32 ± 0.05	m	16	3.41 ± 0.02	2.20 ± 0.02	sm
4	4.04 ± 0.03	1.53 ± 0.09	m	17	4.92 ± 0.15	3.21 ± 0.05	st
5	3.95 ± 0.01	1.13 ± 0.02	m	18	3.85 ± 0.15	3.53 ± 0.26	st
6	3.77 ± 0.03	1.34 ± 0.15	m	19	3.52 ± 0.18	3.03 ± 0.01	st
7	3.59 ± 0.02	1.39 ± 0.19	m	20	5.17 ± 0.06	∞	t
8	3.26 ± 0.03	1.48 ± 0.19	m	21	3.91 ± 0.01	∞	t
9	2.99 ± 0.02	1.51 ± 0.02	m	22	3.66 ± 0.13	∞	t
10	6.06 ± 0.28	2.04 ± 0.03	sm	23	3.13 ± 0.02	∞	t
11	5.30 ± 0.27	2.06 ± 0.09	sm	24	2.96 ± 0.06	∞	t
12	4.35 ± 0.05	1.97 ± 0.03	sm	25	2.72 ± 0.06	∞	t
13	4.12 ± 0.13	2.76 ± 0.03	sm				

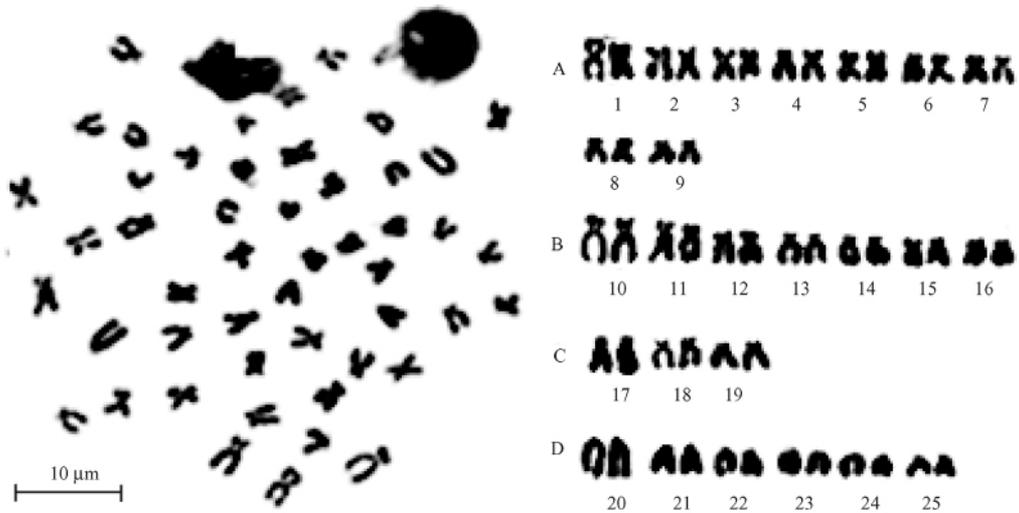


图 1 准噶尔雅罗鱼的染色体核型

Fig.1 The karyotype of *Leuciscus merzbacheri*

A: m 型染色体; B: sm 型染色体; C: st 型染色体; D: t 型染色体。

A: Metacentric chromosome; B: Submetacentric chromosome; C: Sutelocentric chromosome; D: Telocentric chromosome.

No. 1 另外一条染色体和 No. 8、9 染色体上呈着丝粒 C-带,其中 No. 1 两条染色体的着丝粒 C-带明显较大,约为其他染色体着丝粒 C-带的两倍或两倍以上;B 组的 No. 10 其中一条染色体和 No. 11 ~ 16 染色体呈端粒 C-带,其中 No. 10 的一条染色体的整个长臂被深染, No. 10 另一条染色体呈明显着丝粒 C-带,而且整个长臂上

靠近末端 2/3 的区域被深染;C 组的 No. 17 染色体呈着丝粒 C-带, No. 19 染色体呈端粒 C-带, No. 18 染色体同时出现着丝粒 C-带和端粒 C-带;D 组的 No. 20 ~ 24 染色体呈着丝粒 C-带, No. 25 中有一条染色体同时出现着丝粒 C-带和端粒 C-带,另一条染色体整个呈 C-带阳性。C-带核型模式图见图 4。

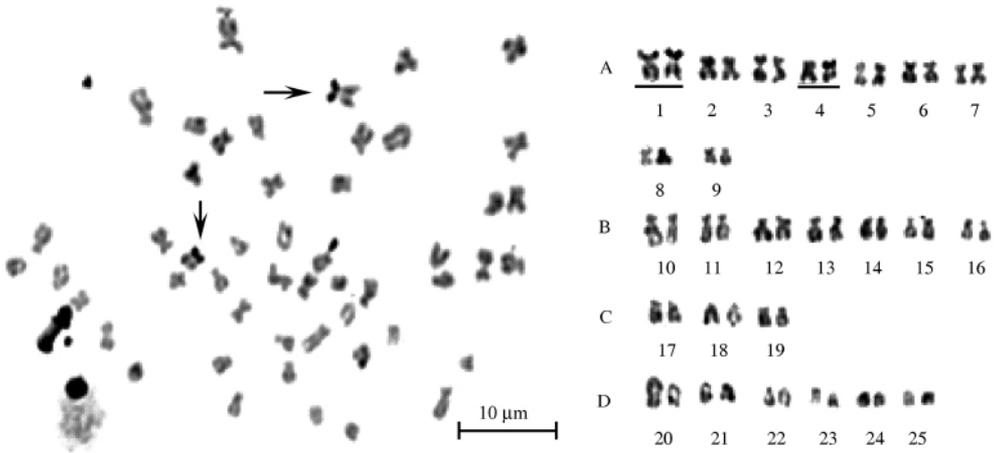


图2 准噶尔雅罗鱼的 Ag-NORs

Fig.2 The Ag-NORs of *Leuciscus merzbacheri*

箭头所示为银染点。The arrows indicate the Ag-NORs staining spots.

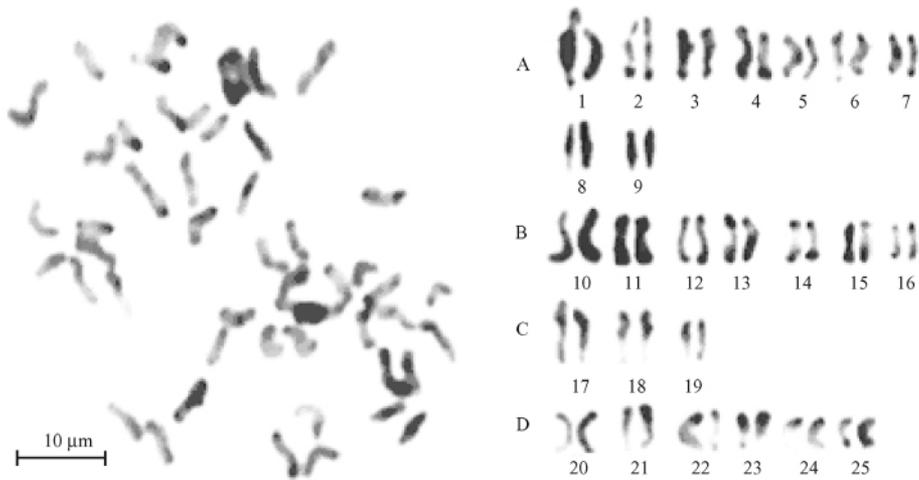


图3 准噶尔雅罗鱼的 C-带

Fig.3 The C-banding of *Leuciscus merzbacheri*

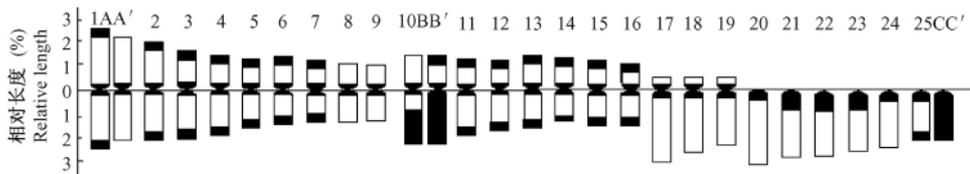


图4 噶尔雅罗鱼的 C-带核型模式图

Fig.4 The C-banding of *Leuciscus merzbacheri*

2.4 G-带带型 准噶尔雅罗鱼的 50 条染色体基本上都能显示出细致的带纹(图 5)。从染色体 G-带带型看,同源染色体带纹基本一致,其带纹在每对染色体上的数目及分布具有明显特征性。不同长度的染色体具有不同数目的带纹,随染色体长度增加,带纹数目也有增加;带纹的分布也不均匀,大部分集中在较长的染色

体上,且带纹细致,而小染色体上带纹少,带较宽。阳性 G-带数目最多的是 No. 10、11、17 染色体,单体各显示 5 条带。阳性 G-带数目最少的是 No. 24、25 染色体,单体各显示 2 条带。其余染色体阳性 G-带的数目均介于两者之间。G-带核型模式图见图 6。

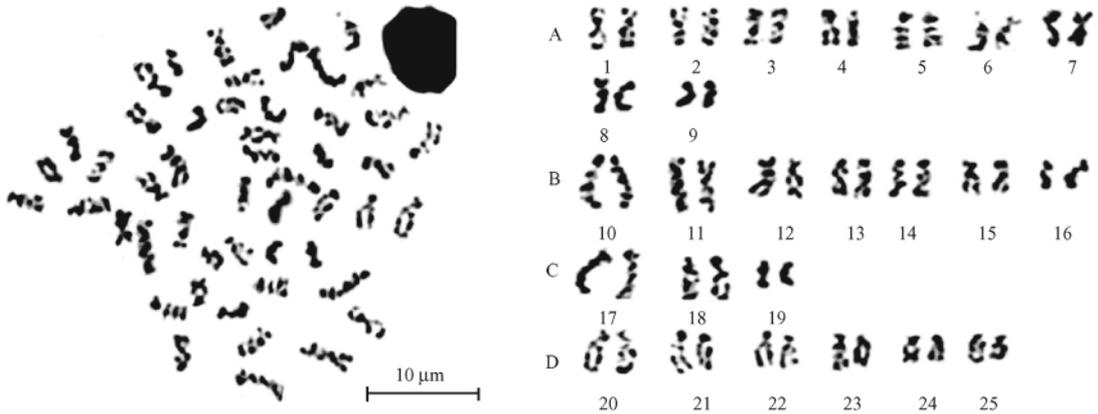


图 5 准噶尔雅罗鱼的 G-带  
Fig. 5 The G-banding of *Leuciscus merzbacheri*

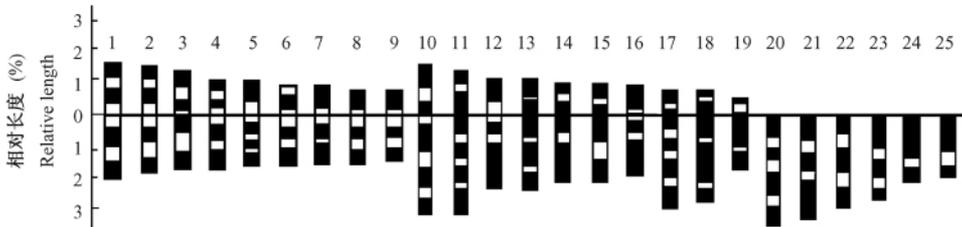


图 6 准噶尔雅罗鱼 G-带核型模式图  
Fig. 6 The G-banding of *Leuciscus merzbacheri*

### 3 讨论

3.1 性染色体与银染 本研究通过对准噶尔雅罗鱼的核型、银染、C-带和 G-带分析,均没有发现异形性染色体。迄今为止已经做过分类记载和研究的鱼类约两万多种,其中做了染色体研究的约 2 000 多种,被证明具有性染色体机制的种数很少,大约有 40 多种,其中能从细胞学鉴别出性染色体的可能不超过 30 种,这种情况可能表明绝大多数鱼类还没有进化到具有性染色体机制的程度,即使具有这种机制也不一

定就有形态异形的性染色体分化<sup>[13]</sup>,准噶尔雅罗鱼可能属于这种类型的鱼类。

准噶尔雅罗鱼的 NORs 呈现出多态性。在大部分分裂相中,银染点位于 m1 中一条染色体的短臂末端,呈银染阳性,而另一条染色体没有着色,表现银染阴性,同样 m4 上也只观察到一条染色体的短臂末端着色,而另一条染色体没有着色。这说明准噶尔雅罗鱼的 rRNA 基因转录活性即使在同源染色体也不一致。NORs 的 rDNA 的活性不同,转录出的 rRNA 的数量有多有少,结合的非组蛋白质量也不同,导致银染

区大小不一。NORs 转录活性越强,则银染越强,染色面积越大。准噶尔雅罗鱼位于 m1 和 m4 上的 2 个 Ag-NORs,染色区域占整个短臂,可见其 NORs 转录活性较强。

**3.2 C-带** C-带技术是显示结构异染色质的分布和数量的主要方法。准噶尔雅罗鱼 50 条染色体均呈现 C-带阳性,大部分染色体的 C-带阳性明显,说明其有较丰富的结构异染色质;只有部分染色体的着丝粒区呈 C-带阳性,可能是部分染色体着丝粒区异染色质化程度太低,易被碱性溶液抽提掉。在生物进化过程中,结构异染色质是一种能促进核型进化的遗传结构,有助于我们对鱼类的染色体进行更精确的分析。Hsu 等<sup>[14]</sup>及 Shi<sup>[15]</sup>认为,染色体间不对称易位和臂间倒位可导致异染色质的增加或分布位置的改变,如插入异染色质增加或完全异染色质臂,这些都是物种进化的特征。从准噶尔雅罗鱼的 C-带特征来看,具有着丝粒 C-带、端粒 C-带,最为显著的是 No. 25 中一条染色体整条臂表现为完全深染,具有插入异染色质增加或完全异染色质臂的特点,可推测准噶尔雅罗鱼是比较进化的类群。

本实验在研究 C-带时,结果显示 m1 和 m4 染色体的端粒区呈现 C-带阳性,与 Ag-NORs 带中 NOR 带出现的位置一致,这与通常认为 NOR 带的区域分布大量结构异染色质相吻合<sup>[16]</sup>,其呈 C-带阳性,可间接显示 NORs 位置,该相关性的发现为探讨鱼类细胞遗传学特征提供了一条有益的线索。

**3.3 G-带** 我们对不同时期的染色体进行 G-带处理分析,发现前期末染色体的 G-带数目普遍较多,而且清晰,但稳定性较差。早中期、中期到晚中期染色体 G-带数较少,但带型稳定。这可能是因为随着前期向中期转换,染色体压缩导致带纹压缩,许多细小的亚带集成较大带纹的结果所致。显然,由于处于不同时期的染色体伸展长度不同,自然存在的带纹易于显示与否,与之成正相关。这一结论与蔡志华<sup>[17]</sup>利用胰酶-Giemsa 技术显示南方大口鲶

(*Soldatovi meridionalis*) 白血球细胞的染色体 G-带的分析结果一致。另外,我们还发现 G-带带型特征及数目与显带处理条件有密切关系。一般胰酶处理的强弱对阳性 G-带的数目、带纹的宽度及染色的深浅也有影响。因此,通常认为考察鱼类 G-带数目时,不能单纯看分带的数目,而应看分带的分布趋势,以及稳定性,特别是以某些深色区带或非着色区的位置作为鉴定的依据<sup>[17]</sup>。

每个分裂相中同源染色体带纹基本相同,按照带纹的特征能将同源染色体准确配对,G 显带的研究结果确证了准噶尔雅罗鱼的核型公式为  $2n = 50 = 18m + 14sm + 6st + 12t$ 。除此之外,染色体 G 显带特征,对开展鱼类细胞遗传学特性、染色体基因定位及染色体多态性改变的研究有重要意义。

**3.4 系统演化** 雅罗鱼属鱼类在世界上约有 20 余个种和亚种,我国已知有 6 个种和亚种,其中新疆自然水系分布有 3 个种及亚种:准噶尔雅罗鱼(又名新疆雅罗鱼)、贝加尔雅罗鱼(*Leuciscus baicalensis*)和高体雅罗鱼(*L. idus*,即圆腹雅罗鱼)<sup>[1-2]</sup>。准噶尔雅罗鱼为新疆特有鱼类,新疆分布的 3 种雅罗鱼分类上都属鲤形目鲤科雅罗鱼亚科雅罗鱼属<sup>[1-2]</sup>。本研究的准噶尔雅罗鱼,将其核型与已报道的贝加尔雅罗鱼<sup>[18]</sup>、圆腹雅罗鱼<sup>[19]</sup>进行比较(表 3),它们的染色体数目一致,准噶尔雅罗鱼和圆腹雅罗鱼核型组成相似,但与贝加尔雅罗鱼核型差异较大。据此推测  $2n = 50$  可能是雅罗鱼类的共同特征,在进化过程中雅罗鱼类核型具有较高的保守性;从核型的差异可以看出,准噶尔雅罗鱼与圆腹雅罗鱼(即高体雅罗鱼)亲缘关系较近,而与贝加尔雅罗鱼亲缘关系较远。这一结论与胡文革等<sup>[6]</sup>利用鲤科鱼类线粒体 DNA 细胞色素 b 序列的差异对新疆 3 种雅罗鱼系统进化分析结果一致。

目前,国内关于雅罗鱼染色体的研究,参考文献资料尚不多,因此,以上的研究结果和讨论还有待于进一步深入。

表 3 新疆雅罗鱼属 3 种鱼的核型分析  
Table 3 The karyotype of three *Leuciscus* species

种名 Species name	2n	核型公式 Karyotype formula	NF	作者 Author	采样地 Sampling
贝加尔雅罗鱼 <i>Leuciscus baicalensis</i>	50	8m + 16sm + 26t	72	张立萍 (1997) [18]	新疆伊犁河三道口
圆腹雅罗鱼 <i>L. idus</i>	50	18m + 22sm + 4st + 6t	90	金万昆 (2009) [19]	天津市换新水产良种场
准噶尔雅罗鱼 <i>L. merzbacheri</i>	50	18m + 14sm + 6st + 12t	82	本文	新疆准噶尔盆地精河

参 考 文 献

[ 1 ] 中国科学院动物研究所,中国科学院新疆生物土壤沙漠研究所,新疆维吾尔自治区水产局,等. 新疆鱼类志. 乌鲁木齐:新疆人民出版社,1979.

[ 2 ] 陈宜瑜. 中国动物志:硬骨鱼纲:鲤形目(中卷). 北京:科学出版社,1998.

[ 3 ] 李思忠. 中国淡水鱼类的分布区划. 北京:科学出版社,1981.

[ 4 ] 廖文林,范喜顺. 赛里木湖准噶尔雅罗鱼食性研究. 新疆渔业科技,1997 2: 42-43.

[ 5 ] 胡文革,段子渊,王金富,等. 新疆 3 种雅罗鱼线粒体 DNA 控制区序列差异和系统进化关系. 遗传学报,2004 31(9): 970-975.

[ 6 ] 胡文革,段子渊,王金富,等. 新疆 3 种雅罗鱼线粒体 DNA 细胞色素 *b* 序列差异和系统进化. 动物学杂志,2005 40(3): 6-11.

[ 7 ] 陈星玉. 中国雅罗鱼亚科的骨骼系统及其分类学意义. 动物分类学报,1987 12(3): 311-322.

[ 8 ] 林义浩. 快速获得大量鱼肾细胞中期分裂相的 PHA 体内注射法. 水产学报,1982 6(3): 201-204.

[ 9 ] Levan A, Fredga K, Sandberg A A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas, 1964, 52(2): 201-220.

[ 10 ] Howell W M, Black G. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a step method. Experientia, 1980, 36: 1014-1015.

[ 11 ] Sumner A T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Expl Cell Res, 1972, 75(1): 304-306.

[ 12 ] Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. Lancet, 1971 2(7731): 971-972.

[ 13 ] 余先觉,周曦,李渝成,等. 中国淡水鱼类染色体. 北京:科学出版社,1989, 11-18.

[ 14 ] Hsu T C, Arrigh F. Distribution of constitutive retrochromatin in mammalian chromosomes. Chromosoma (Berl), 1971 34: 243-253.

[ 15 ] Shi L M. Comparative cytogenetic studies on the muntjac, Chinese muntjac and their F1 hybrids. Cytogenet Cell Genet, 1980 26(1): 22-27.

[ 16 ] 任修海,余其兴,韦萍. 黄鳝染色体 Ag-NORs 多态性的研究. 遗传学报,1991 18(4): 304-311.

[ 17 ] 蔡志华. 南方大口鲇染色体 G-带带型研究. 重庆师范学院学报:自然科学版,1991 8(4): 69-72.

[ 18 ] 张立萍. 贝加尔雅罗鱼核型比较. 干旱区研究,1997 14(1): 80-83.

[ 19 ] 金万昆,赵宜双,张慈军,等. 圆腹雅罗鱼的染色体核型分析. 内陆水产,2009,(1): 56-61.