

沅水五强溪水库斑点叉尾鲴的染色体组型分析

刘哲同¹, 刘良国^{2*}

(1. 常德芷兰实验学校, 湖南常德 415000; 2. 湖南文理学院生命与环境科学学院, 湖南常德 415000)

摘要 [目的]了解沅水五强溪水库引进外来物种斑点叉尾鲴的体细胞染色体组型。[方法]采用植物血球凝集素和秋水仙素胸腔注射, 取活体肾细胞低渗、固定、火焰干燥法制作染色体标本, 对沅水五强溪水库引进外来物种斑点叉尾鲴的染色体核型进行分析。[结果]斑点叉尾鲴中期染色体二倍体数为 $2N = 58$, 染色体配成 29 对, 其中中部着丝点染色体 4 对, 亚中部着丝点染色体 5 对, 亚端部着丝点染色体 13 对, 端着丝点染色体 7 对。核型公式为 $2N = 8M + 10SM + 26ST + 14T$, 染色体臂数(NF) = 76。[结论]该研究可为洞庭湖区斑点叉尾鲴的种质资源保护、遗传育种改良提供参考依据, 也为进一步探讨引进外来种对本地相近物种的遗传多样性影响提供基础性资料。

关键词 斑点叉尾鲴; 引进外来物种; 五强溪水库; 染色体组型

中图分类号 S965.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)06-0099-02

Karyotype Analysis of *Ictalurus punctatus* in Wuqiangxi Reservoir of Yuanshui River

LIU Zhe-tong¹, LIU Liang-guo^{2*} (1. Changde Zhilan Experimental School, Changde, Hunan 415000; 2. College of Life and Environmental Sciences, Hunan University of Arts and Science, Changde, Hunan 415000)

Abstract [Objective] To understand the somatic cells karyotype of introduced alien species *Ictalurus punctatus* in Wuqiangxi Reservoir of Yuanshui River. [Method] After intrapleural injection of phytohemagglutinin (PHA) and colchicine, live renal cells were sampled to make chromosome specimen by low-permeability, fixation and flame-drying technique. The karyotype of introduced alien species *I. punctatus* in Wuqiangxi Reservoir of Yuanshui River were analyzed. [Result] The diploid number ($2N$) of metaphase chromosomes in *I. punctatus* was 58, which matched 29 pairs of chromosomes, including 4 pairs of metacentric chromosomes, 5 pairs of submetacentric chromosomes, 13 pairs of subtelocentric and 7 pairs of telocentric chromosomes. The karyotype formula of *I. punctatus* was $2N = 8M + 10SM + 26ST + 14T$, NF = 76. [Conclusion] The research can provide references for germplasm resources' protection and genetic improvement and basic data for further discussion on the effects of introduced alien species *I. punctatus* on the genetic diversity of local similar species.

Key words *Ictalurus punctatus*; Introduced alien species; Wuqiangxi Reservoir; Karyotype

斑点叉尾鲴 (*Ictalurus punctatus*) 又称沟鲿, 隶属鲇形目 (Siluriformes) 鲴科 (Ictaluridae) 鲴属 (*Ictalurus*)^[1], 原产于北美洲, 是一种大型淡水经济鱼类, 具有食性杂、生长快、适应范围广、抗逆性强、肉质鲜美等优点。我国于 1984 年由湖北省水产科学研究所从美国引进该鱼进行原种驯化, 并于 1987 年首次繁育成功^[2], 于 20 世纪 90 年代末引入湖南, 并率先在沅水五强溪水库进行网箱养殖示范, 发展网箱规模化养殖^[3]。经过多年的养殖推广, 目前斑点叉尾鲴已遍及我国 20 多个省、市、自治区, 成为我国重要的淡水养殖鱼类之一。然而, 由于引进后多年的累代养殖、人为的近亲繁殖、养殖技术规范等原因, 导致斑点叉尾鲴的种质退化严重, 主要表现为抗病力下降、生长缓慢和规格变小, 高密度集约化养殖时容易发生大规模病害和死亡, 这些问题严重制约了斑点叉尾鲴的养殖发展^[4]。为了进一步提高养殖斑点叉尾鲴的质量和产量, 确保鲴鱼养殖业的可持续发展, 开展斑点叉尾鲴种质资源保护和遗传育种改良的研究具有重要的理论和实践指导意义。同时, 近年来由于网箱养殖逃逸或人为因素导致一些斑点叉尾鲴进入天然水体, 有可能与本地相近物种进行杂交, 从而对本地物种构成遗传侵蚀。因此, 有必要对引进外来物种斑点叉尾鲴的遗传学特性开展研究。笔者以取自湖南沅水五强溪水库的斑点叉尾鲴为研究对象, 对其染色体组型进行了分析, 旨在了解五强溪水库引进外来物种斑点叉

尾鲴的染色体核型, 为斑点叉尾鲴的种质资源保护和遗传育种改良提供参考依据, 也为进一步探讨引进外来种对本地相近物种遗传多样性的影响提供基础性资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料 试验用鱼取自沅水五强溪水库, 随机选取健康活泼的斑点叉尾鲴 6 尾 (3 ♀、3 ♂), 体长 13.10 ~ 21.04 cm, 体重为 230 ~ 320 g。将试验鱼放入室内水族箱 (温度控制在 21 ~ 24 °C) 中暂养 1 d 后, 开始试验。

1.2 方法

1.2.1 肾细胞染色体标本的制备。 染色体标本的制作方法参照刘良国等^[5]肾细胞染色体标本的制备方法并加以改进, 具体操作步骤如下: 试验前 1 d 进行腹腔注射植物血球凝集素 (PHA), 12 h 后再次进行 PHA 腹腔注射, 2 次注射剂量分别为 10 和 8 μg/g, 第 2 次注射 PHA 溶液 4.5 h 后, 按 2 μg/g 的剂量注射秋水仙素, 1.5 ~ 2.0 h 后取材; 将试验鱼剪鳃失血 10 min, 解剖取出肾脏 (头肾) 放入盛有生理盐水的培养皿中清洗干净, 剔除脂肪组织和血块; 剪碎, 吸入 10 mL 离心管, 用吸管充分吹打 (100 次以上); 吸入生理盐水, 混合均匀, 静置 5 min 后, 吸取上层细胞悬液置于另 1 个离心管中; 离心后的细胞沉淀用 0.075 mol/L KCl 液低渗处理, 卡诺氏液固定, 换液 3 次; 采用火焰干燥方法制片, 用 Giemsa 染液染色, 玻片反面用微流水冲洗, 室温下晾干后, 获得 6 尾斑点叉尾鲴的染色体玻片标本。

1.2.2 染色体数目统计及核型分析。 在光学显微镜下对斑点叉尾鲴的染色体玻片标本进行观察, 油镜下选择 50 个分散良好、形态清晰的中期分裂相, 使用显微数码成像系统进

基金项目 国家自然科学基金项目 (31572619); 湖南省高校创新平台基金项目 (13K103)。

作者简介 刘哲同 (1998—), 男, 湖南常德人, 高中生。* 通讯作者, 教授, 博士, 硕士生导师, 从事鱼类资源多样性与遗传育种研究。

收稿日期 2017-01-03

行逐一拍照,使用 Photoshop 软件计数每个分裂相的染色体数目,并统计染色体众数分布;选取 10 个染色体完整、分散良好、形态清晰的中期分裂相,放大打印后剪下打印纸上中期分裂相的每条染色体,测量其全长、短臂长和长臂长,计算其相对长度和臂比,得到斑点叉尾鲷染色体对的核型数据,根据核型数据并参照 Levan 等^[6]的染色体分组标准进行核型分析。

2 结果与分析

2.1 五强溪水库斑点叉尾鲷体细胞染色体数目 由表 1 可知,计数 6 尾斑点叉尾鲷的中期分裂相共 50 个,染色体数目分别在 55 以下、55、60 和 60 以上的各有 1 个细胞,染色体数目为 56、59 的各有 2 个细胞,染色体数目为 58 的有 39 个细胞,染色体数目为 57 的有 3 个细胞。染色体数目为 58 的占计数细胞总数的 78%,众数百分率高于 75%的常规标准,因此确定五强溪水库斑点叉尾鲷的标准染色体数目 $2N = 58$ (图 1)。在斑点叉尾鲷的雌、雄个体间未发现与性别有关的异形性染色体,也未发现带有特殊标志性特征(如随体、次缢痕)的染色体。

表 1 五强溪水库斑点叉尾鲷的染色体数目分布

Table 1 Distribution of chromosome number of *I. punctatus* in Wu-qiangxi Reservoir

染色体数目 Chromosome number	中期分裂相细胞数 Number of metaphase cells	众数百分率 Proportion of chromosome number // %
<55	1	2
55	1	2
56	2	4
57	3	6
58	39	78
59	2	4
60	1	2
>60	1	2



图 1 斑点叉尾鲷染色体中期分裂相($2N = 58$) (1 000 ×)

Fig. 1 The chromosome in metaphase of *I. punctatus* ($2N = 58$) (1 000 ×)

2.2 五强溪水库斑点叉尾鲷的染色体组型 根据染色体相对长度和臂比值的测量结果(表 2),将斑点叉尾鲷的全部染色体配成 29 对,参照 Levan 命名法^[6],五强溪水库斑点叉尾鲷的核型由 4 对中部着丝点染色体、5 对亚中部着丝点染色体、13 对亚端部着丝点染色体和 7 对端部着丝点染色体组成(图 2),核型公式为 $2N = 8M + 10 SM + 26 ST + 14 T$,染色体

臂数(NF) = 76。

表 2 斑点叉尾鲷的核型数据

Table 2 The karyotype data of *I. punctatus*

相对长度 Relative length // %	臂比 Arm ratio	类型 Type
3.40 ± 0.01	1.25 ± 0.01	M ₁
2.74 ± 0.04	1.17 ± 0.16	M ₂
2.55 ± 0.04	1.46 ± 0.19	M ₃
2.26 ± 0.14	1.25 ± 0.12	M ₄
4.72 ± 0.07	2.25 ± 0.35	SM ₁
3.36 ± 0.01	2.07 ± 0.09	SM ₂
3.32 ± 0.04	2.14 ± 0.11	SM ₃
2.74 ± 0.04	2.25 ± 0.35	SM ₄
2.70 ± 0.07	2.30 ± 0.11	SM ₅
4.43 ± 0.12	4.37 ± 0.28	ST ₁
4.43 ± 0.20	4.75 ± 0.17	ST ₂
4.34 ± 0.07	4.87 ± 0.25	ST ₃
4.25 ± 0.04	3.45 ± 0.07	ST ₄
3.91 ± 0.01	3.55 ± 0.31	ST ₅
3.94 ± 0.01	3.17 ± 0.09	ST ₆
3.93 ± 0.01	3.49 ± 0.41	ST ₇
3.96 ± 0.02	3.20 ± 0.01	ST ₈
3.60 ± 0.01	3.66 ± 0.12	ST ₉
3.53 ± 0.02	3.62 ± 0.03	ST ₁₀
3.45 ± 0.01	3.25 ± 0.10	ST ₁₁
3.40 ± 0.04	3.50 ± 0.01	ST ₁₂
3.43 ± 0.01	3.34 ± 0.22	ST ₁₃
3.77 ± 0.01	∞	T ₁
3.77 ± 0.02	∞	T ₂
3.49 ± 0.04	∞	T ₃
3.02 ± 0.06	∞	T ₄
2.64 ± 0.06	∞	T ₅
2.64 ± 0.08	∞	T ₆
2.26 ± 0.02	∞	T ₇



图 2 斑点叉尾鲷的染色体组型

Fig. 2 The karyotype of *I. punctatus*

3 讨论与结论

斑点叉尾鲷自 1984 年从美国引进至今已有 30 多年的历史,由于它具有较高的养殖经济效益,目前在国内许多地区的水库、池塘中都有养殖。该试验以沅水五强溪水库的斑点叉尾鲷为研究对象,对其体细胞染色体组型进行了研究。

(下转第 132 页)

- morphic DNA [J]. *Planta Med*, 2001, 67(4): 379-381.
- [13] MÖRCHEN M, CUGUEN J, MICHAELIS G, et al. Abundance and length polymorphism of microsatellite repeats in *Beta vulgaris* L. [J]. *Theoretical and applied genetics*, 1996, 92(3): 326-333.
- [14] BROUN P, TANKSLEY S D. Characterization and genetic mapping of simple repeat sequences in the tomato genome [J]. *Molecular & general genetics*, 1996, 250(1): 39-49.
- [15] WILLIAM J G K, KUBELIK A R, LIVAK K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucl Acid Res*, 1990, 18(22): 6531-6535.
- [16] 卢家仕, 卜朝阳, 吕维莉, 等. 不同产地石斛属种质资源的 ISSR 遗传多样性分析 [J]. *中草药*, 2013, 44(1): 96-100.
- [17] 郑连群, 张庆宝, 符秀玉. 荷花品种分类研究现状及建议 [J]. *现代农业科技*, 2009(15): 221-222.
- [18] KASTURE A, KRISHNAMURTHY R, RAJKUMAR K. Genetic variation in the endangered Indian sweet flag (*Acorus calamus* L.) estimated using ISSR and RAPD markers [J]. *Journal of applied research on medicinal & aromatic plants*, 2016, 3(3): 112-119.
- [19] 林立, 王志龙, 付涛, 等. 39 个樱花品种亲缘关系的 ISSR 分析 [J]. *植物研究*, 2016, 36(2): 297-304.
- [20] 曾兵. 鸭茅种质资源遗传多样性的分子标记及优异种质评价 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2007.
- [21] 张杰. 蒙古栎地理种源遗传多样性的研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2005.
- [22] 王国霞. 古银杏雄株遗传多样性的 ISSR 分析及花粉用优良单株初步选育研究 [D]. 南京: 南京林业大学, 2007.
- [23] 姚明哲. 利用 ISSR 和 EST-SSR 标记研究中国茶树资源的遗传多样性和遗传结构 [D]. 杭州: 浙江大学, 2009.
- [24] 张党权, 田华, 谢耀坚, 等. 桉树 4 个种遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. *中南林业科技大学学报*, 2010, 30(1): 12-17.
- [25] 李昕珈, 吴明根, 潘刚. 8 个青花菜栽培品种的 ISSR 和 SSR 的遗传多样性分析 [J]. *长江大学学报(自然科学版)*, 2010, 7(1): 53-55.
- [26] FANG D Q, ROOSE M L. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 95(3): 408-471.
- [27] 刘威, 冯晨静, 杨建民, 等. 杏 ISSR 反应体系的优化和指纹图谱的构建 [J]. *果树学报*, 2005, 22(6): 626-629.
- [28] 缪恒彬, 陈发棣, 赵宏波, 等. 应用 ISSR 对 25 个小菊品种进行遗传多样性分析及指纹图谱构建 [J]. *中国农业科学*, 2008, 41(11): 3735-3740.
- [29] 张敏, 黄苏珍. 鸢尾属种质资源的 ISSR 分析 [J]. *南京农业大学学报*, 2008, 31(4): 43-48.
- [30] 隋春, 魏建和, 陈士林, 等. 柴胡 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化 [J]. *时珍国医国药*, 2008, 19(8): 1837-1839.
- [31] 黄宇, 何天友, 荣俊冬, 等. 荷花 ISSR-PCR 反应体系的建立及优化 [J]. *亚热带农业研究*, 2009, 5(4): 284-288.
- [32] YEH F C, YANG R, BOYLE T J, et al. POPGENE 32, Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis [M]. Version 1.32. Edmonton, Canada: University of Alberta, 2000.
- [33] NEI M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. *Genetics*, 1978, 89(3): 583-590.

(上接第 100 页)

结果表明,五强水库斑点叉尾鲴的二倍体染色体数目为 58,核型公式为 $2N = 8M + 10SM + 26ST + 14T$,染色体臂数(NF) = 76,与张芹等^[7]报道的河南省水产科学研究院引进的斑点叉尾鲴进行比较,发现二者的染色体数目均为 58,但核型存在一定差异,河南斑点叉尾鲴种群的核型公式为 $2N = 6M + 10SM + 22ST + 20T$,NF = 74。该研究中沉水五强水库斑点叉尾鲴的 M 和 ST 染色体比河南种群分别多 1 对和 2 对,SM 染色体不变,T 染色体减少 3 对,染色体总臂数增加 2 条。造成这种差异的原因,可能与不同研究者使用的试验方法不同,或者与测量和配组产生的误差有关;但也可能是由于不同种群所表现出的染色体多态性所造成的。张芹等^[7]报道国内引进的斑点叉尾鲴大多来自于美国的德克萨斯州、阿拉巴马州、密西西比州等地理种群,其染色体数目为 56 或 58,染色体臂数为 72、90 或 92 不等,染色体组型也不尽相同。刘海韵等^[8]和崔蕾等^[9]采用分子生物学方法也证实了斑点叉尾鲴不同地理种群的遗传差异和多样性。斑点叉尾鲴种群丰富的遗传多样性,为这一养殖品种的资源保护和遗传改良提供了物质基础,利用这些遗传多样性丰富的群体进行杂交选育,生产上可以避免种质的退化,保证我国斑点叉尾鲴养殖业的健康可持续发展。

斑点叉尾鲴作为一种引进的外来养殖品种,在带来较高经济效益的同时,亦可能给当地生态安全造成影响。由于斑点叉尾鲴食性杂、抗逆性强、适应范围广,像五强水库这样的水面资源和天然饵料丰富的水域生态系统,非常适合斑点叉尾鲴的生长,若不加以人为控制,其种群数量将会大幅增加,除了与本地鱼种争夺生存空间,导致本地土著鱼种和数

量的急剧减少外,还可能与本地近缘种进行杂交,杂交后代再与本地其他近缘种杂交而造成遗传侵蚀^[2,10]。该试验中斑点叉尾鲴的染色体数目与同属于鲇形目的本地鲇^[11]、大口鲇^[12]的染色体数目相同(均为 58),虽然核型上存在差异,但在天然水体中如果长期共存,不排除它们存在科间杂交并产生可繁育子代的可能性。因此,对于网箱和池塘养殖或者已经逃逸到天然水体的斑点叉尾鲴,都必须采取相应的强有力措施,严防其向天然水体大量扩散,避免对本地鱼种的遗传污染。

参考文献

- [1] 刘良国,杨春英,杨品红,等. 湖南境内沉水鱼类资源现状与多样性分析 [J]. *海洋与湖沼*, 2013, 44(1): 148-158.
- [2] 卜跃先,谢初响,刘鑫宇,等. 引进外来物种的环境风险评估初探:以美国斑点叉尾鲴为例 [J]. *水利渔业*, 2008, 28(1): 82-84.
- [3] 麻韶霖. 华中斑点叉尾鲴产业发展走势分析 [J]. *当代水产*, 2012(1): 42-44.
- [4] 周国平. 中国斑点叉尾鲴产业的现状及发展建议 [J]. *中国水产*, 2005(6): 26-28.
- [5] 刘良国,赵俊,崔淼,等. 尖鳍鲤的染色体组型分析 [J]. *华南师范大学学报(自然科学版)*, 2004(1): 108-111.
- [6] LEVAN A, TREDGA K, SANDBERG A A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes [J]. *Heredita*, 1964, 52(2): 201-220.
- [7] 张芹,宋威,惠筠,等. 斑点叉尾鲴染色体组型的研究 [J]. *河南水产*, 2009(1): 35-36.
- [8] 刘海韵,周勤洁,雷靖靖,等. 不同地区斑点叉尾鲴种内遗传多样性分析 [J]. *氨基酸和生物资源*, 2008, 30(4): 1-6.
- [9] 崔蕾,谢从新,李艳和,等. 斑点叉尾鲴 4 个群体遗传多样性的微卫星分析 [J]. *华中农业大学学报*, 2012, 31(6): 744-751.
- [10] 楼允东,李小勤. 中国鱼类远缘杂交研究及其在水产养殖上的应用 [J]. *中国水产科学*, 2006, 13(1): 151-158.
- [11] 韩庆,秦杰,席在星. 洞庭湖土鲇染色体核型分析 [J]. *水产科学*, 2009, 28(8): 462-464.
- [12] 邹桂伟,潘碧碧,梁拥军,等. 大口鲇染色体组型和 DNA 含量的研究 [J]. *中国水产科学*, 1997, 4(5): 96-99.