

金鱼生殖细胞多倍化现象分析

张纯, 刘少军*, 李涛, 肖俊, 赵如榕, 刘筠

(湖南师范大学生命科学学院, 教育部蛋白质化学与鱼类发育生物学重点实验室, 湖南长沙 410081)

摘要: 通过精巢染色体制片观察金鱼的生殖细胞染色体数, 结合流式细胞仪测定成熟精子DNA含量, 探讨了金鱼生殖细胞发生过程中染色体特征及产生的精子的倍性。结果表明, 金鱼初级精母细胞大部分行正常减数分裂, 形成50个二价体, 另外还发现17.0%分裂相的二价体数呈现不同程度的加倍现象, 观察到了二价体数为100、150、200、250、300, 甚至远远超过300的分裂相, 与鲫鲤远缘杂交导致生殖细胞染色体数加倍一致, 不一样的是金鱼稳定产生DNA含量减半的精子。结果表明, 近缘杂交和远缘杂交都可以导致生殖细胞染色体数加倍, 但是否能产生染色体数加倍的功能性配子与杂交亲本亲缘关系的远近有关。

关键词: 金鱼; 生殖细胞染色体; 减数分裂; 二价体; 流式细胞仪

中图分类号: Q 954.43; S 917

文献标识码: A

长期的生物进化研究表明, 物种杂交是增加遗传变异的重要途径, 杂交导致多倍化在动植物进化中起着非常重要的作用^[1]。对已有的鲫鲤远缘杂交研究结果表明, 远缘杂交可以致使杂交种生殖细胞染色体数加倍, 从而产生染色体数不减半的二倍体配子, 最终导致在鲫鲤杂交F₃中选育出了两性可育的异源四倍体鲫鲤。异源四倍体鲫鲤又能稳定地产生二倍体卵子和精子, 目前已经繁殖到F₁₈, 形成了两性可育、遗传性状稳定的异源四倍体鲫鲤群体, 为脊椎动物多倍化研究及鱼类多倍体育种提供了宝贵的材料^[2-6]。

金鱼起源于我国的野生鲫^[7], 至今已有千余年的选育历史, 它是在野生鲫变异的基础上, 经过人工选择, 结合近缘杂交, 使基因重组出现新的基因型, 从而逐渐演化为当今形形色色的品种, 在体色、体型、背鳍、臀鳍、头型、眼型、鳞片、鳃盖、鼻膜等方面出现了明显的差异, 品种数目已达240个以上^[8]。学者们已经通过肌肉蛋白质电泳及RAPD聚类技术得出鲫和金鱼的系统进化关系, 野生鲫首先演化成为金鲫(红色鲫), 再演化为草

金鱼, 之后演化为文种金鱼, 最后演化成龙种和蛋种两个亲缘关系很近的品种^[9-10]。动物学家通过多方面实验验证了金鱼起源于鲫的本质, 将金鱼归为鲤科(Cyprinidae), 鲤亚科(Cyprininae), 鲫属(*Carassius*), 鲫(*Carassius auratus*)^[11]。

本文选用金鱼代表种——文种珍珠鳞(Fantail pearlscale)进行研究, 它在头部、体型、体色、鳞片、鳍条等外型特征上与野生鲫鱼已有明显的差异, 如珍珠鳞头尖而腹部膨大, 体短而圆, 鳞呈珍珠状, 鳍条短, 鱼体近似球形等, 它作为金鱼的代表种, 在外部形态上有如此显著和丰富的变异, 特别是对有机体生命如此重要的身体各部分眼、鳍、鳃盖等的变异, 在动植物的变异中非常罕见, 这种由突变和杂交重组产生的变异使得金鱼具有非常重要的进化研究价值。通过精巢染色体制片观察了文种珍珠鳞的生殖细胞染色体数, 结合流式细胞仪测定成熟精子DNA含量, 探讨金鱼生殖细胞发生过程中染色体特征及产生精子倍性的稳定性, 以期在对比近缘杂交和远缘杂交的基础上获得杂交与多倍化进化相关的数据, 也为金鱼的育种提供有意义的指导。

收稿日期:2010-07-25 修回日期:2010-08-11

资助项目:国家自然科学基金青年项目(30901100);国家杰出青年科学基金(30725028);湖南省教育厅科学研究项目(09B060)

通讯作者:刘少军, E-mail:lsj@hunnu.edu.cn

1 材料与方 法

1.1 实验鱼

繁殖季节(4-6月)和非繁殖季节(12月)雄性金鱼各10尾均取自湖南师范大学多倍体鱼繁殖与育种技术教育部工程研究中心,全部用于肾细胞染色体及精巢染色体检测,繁殖季节雄性金鱼精液还用于测定精子DNA含量。繁殖季节雄性红鲫1尾用于流式细胞仪检测血细胞和精子DNA含量的对照实验鱼。

1.2 肾细胞染色体制片及精巢染色体制片

肾细胞有丝分裂中期染色体制备过程:在20℃左右的水温下培育实验鱼1~3h后,对实验鱼注射PHA 1~3次,每次剂量为2~8 μg/g体重,间隔时间为12~24h,在解剖取材前2~6h,注射秋水仙素,剂量为2~4 μg/g体重;取出肾组织于盛有0.8%生理盐水的培养皿中,用剪刀剪碎材料;剪碎的材料移于离心管中,吹打;1 000 r/min离心5 min,弃上清液;收集的细胞沉淀在0.075 mol/L KCl 低渗液中低渗40~60 min,低渗期间吹打多次;离心,收集沉淀;在甲醇和冰醋酸(3:1)混合液中固定,离心,再固定,重复2~3次;在冷冻的玻片上滴片,火焰干燥;Giemsa染色。在肾细胞染色体制片同时,取样品鱼的性腺用于生殖细胞染色体观察,其制片过程类似于肾细胞染色体制片法。在显微镜下观察染色体特征,采用Pixera pro600ES(美国)数码显微摄像系统拍摄。

1.3 DNA含量测定

用于检测样品DNA含量的仪器为德国(Partec GmbH)生产的流式细胞仪(Cell CounterAnalyserCCA2 II)。选取能挤出精液的红鲫1尾,金鱼10尾,采红鲫血液作为体细胞DNA含量标准,另外,用手轻挤鱼腹部,挤出白色精液;用微量移液器汲取0.3 mL精液于盛有0.5 mL 0.8%生理盐水的Eppendorf管中,在0.3 mL精液和生理盐水混合液中加入2 mL细胞核提取液(由产商Partec GmbH提供),处理时间10~15 min;样品经过滤器(由产商Partec GmbH提供)过滤;DNA染色液(DAPI DNA染色液,由产商Partec GmbH提供)染色样品5~10 min,最后上机测定。把各个样品的DNA含量与红鲫血细胞和精子的DNA含量进行比较,算出比值,用卡平

方(χ^2)测定实际比值与理论比值间的好适度($P>0.05$ 时,实得比与理论比没有显著差异)。

2 结果

2.1 肾细胞染色体制片

在显微镜下观察10尾金鱼的染色体分裂相,从每尾鱼中选取50个有丝分裂中期分裂相,统计其染色体数分布情况见表1。在金鱼中,染色体众数值主要分布在95~100范围内,其所占比例为80%,从染色体水平证明金鱼为二倍体($2n=100$),其染色体组型公式为 $22m+34m+22st+22t$ (图版I)。

表1 金鱼染色体数分布情况
Tab.1 Distribution of chromosome number in metaphase of mitosis for goldfish

样本 sample	个体数 sample number	分裂相数 spread number	染色体数分布 chromosome number distribution	
			<95	95~100
金鱼 goldfish	10	500	100	400

2.2 精巢染色体制片

非繁殖季节金鱼生殖细胞染色体制片观察到了大量初级精母细胞行减数分裂的分裂相。在统计单尾金鱼的200个分裂相中,166个分裂相为由50个二价体组成的减数第一次分裂中后期分裂相,占总统计数的83.0%。在50个二价体中,配对后正在进行分离的二价体形态丰富,有的拉成环形,有的呈现棒状,有的呈“十”字状(图版II),为不同着丝粒染色体(中部着丝粒、亚中部着丝粒、亚端部着丝粒和端部着丝粒)配对形成的正常配对分离特征。另外,染色体制片上观察到了丰富的不同程度的染色体数(二价体数)加倍现象,占总分裂相数的17.0%,观察到了二价体数为100、150、200、250、300,甚至有远远超过300的二价体分裂相(表2,图版II)。繁殖季节的金鱼成熟精巢染色体制片仅观察到了大量颜色深染、直径均一的精子核。

2.3 精子DNA含量测定

流式细胞仪检测结果表明,金鱼产生的精子DNA平均含量与红鲫产生的单倍体精子DNA平均含量比值为1:1.06,与红鲫的血细胞DNA平均含量比值为1:1.78,上述比值与预计的1:1和1:2理论比值间无显著差异($P>0.05$)(表3,图1)。另外,红鲫精子和金鱼精子中有呈现DNA

含量加倍的 2 号峰、3 号峰等,经荧光显微镜观察 多个精子粘连形成的。
上机的样品涂片发现,该加倍的峰值是由于 2 到

表 2 金鱼初级精母细胞二价体数分布情况
Tab. 2 Distribution of bivalent number in meiosis I of spermatocytes in goldfish

样本 sample	总二价体相数 spread number	二价体数分布 bivalent number distribution						
		50	100	150	200	250	300	> 300
金鱼 goldfish	200	166	10	5	6	5	5	3

表 3 金鱼精子 DNA 含量平均值
Tab. 3 Mean DNA content (MDC) of the sperms in goldfish

样本 sample	血细胞/精子 DNA 平均含量 MDC of sperms or blood cells	与红鲫血细胞/精子 DNA 平均含量比值 ratio of MDC observed	与期望值的差异 ^a difference of the ratio of MDC expected
红鲫 red crucian carp	血细胞(107.38) blood cells 精子(56.89) sperms		
金鱼 goldfish	精子(60.52) sperms	与红鲫血细胞 DNA 平均 含量比值为 1:1.78 与红鲫精子 DNA 平均 含量比值为 1:1.06	与 1:2 无显著差异($P > 0.05$) NS from 1:2 与 1:1 无显著差异($P > 0.05$) NS from 1:1

注:a. 当 $P > 0.05$ 时, 实得比与理论比没有显著差异。NS: 实得比与理论比没有显著差异。

Notes: a. At $P > 0.05$, the observed ratio was not significantly different from the expected ratio. NS means the observed ratio is not significantly different from the expected ratio.

3 讨论

基因组多倍化现象在鱼类中比较普遍^[12]。由于获得了额外的重复基因组,多倍化可为基因功能创新提供必要的遗传资源,是一种重要的进化动力^[13]。如由不同属间的鲫鲤远缘杂交可以导致杂交种生殖细胞基因组多倍化,最终选育出了两性可育、遗传性状稳定的异源四倍体鲫鲤新群体,充分展现了多倍化在脊椎动物进化过程中发挥的潜在推动力^[2]。因此,在品种间近缘杂交而来的金鱼中,可能存在类似的多倍化潜力并推动新变异、新品种甚至是新物种的产生。

文种珍珠鳞肾细胞染色体计数及染色体组型研究结果表明染色体数稳定为 $2n = 100$ 条,染色体组型特征仍然保持与鲫及其它报道的金鱼代表种相类似,为 $22m + 34m + 22st + 22t$,说明长期的近缘品种间的重组杂交虽然产生了丰富的基因型和表现型,但在遗传本质上金鱼与鲫鱼没出现种质分离,至今没有金鱼产生多倍体的报道。

但生殖细胞染色体制片则说明了金鱼具备有限的多倍化潜能。金鱼初级精母细胞大部分行正

常减数分裂,形成 50 个二价体,进而可以产生染色体数减半的精子。我们在本次试验的精巢染色体制片上发现了 17.0% 的分裂相二价体数不同程度的加倍现象,说明金鱼品种间的近缘杂交也能导致染色体数加倍。已有的相关报道也证明,高比例的多倍化生殖细胞可能是最终维持产生有限数目的不减半配子的重要保证,其中,鲫鲤杂交 F_2 精原细胞染色体数加倍的染色体相占到总统计量的 21.6%,能够产生染色体数不减半的二倍体精子,导致在 F_3 中获得了少量的四倍体个体^[3]。另外,人工三倍体水晶彩鲫雌性型间性体生殖细胞中也普遍含有经一次或两次甚至多次核内有丝分裂形成的倍性成倍增加的多倍体细胞^[14],但至今没有后续的多倍体生殖细胞是否产生更高倍性的功能性配子的报道。在本研究金鱼精子 DNA 含量的测定结果表明,金鱼稳定产生 DNA 含量减半的精子,另外,成熟精巢染色体制片观察到金鱼产生的精子核直径是大小均一的,说明本组金鱼代表种没有产生染色体数不减半的二倍体或多倍体精子。也就是说,那些二价体数加倍的初级精母细胞最终不能完成减数分裂使命,产生导致多倍体发生的功能性二倍体或多倍体精子。

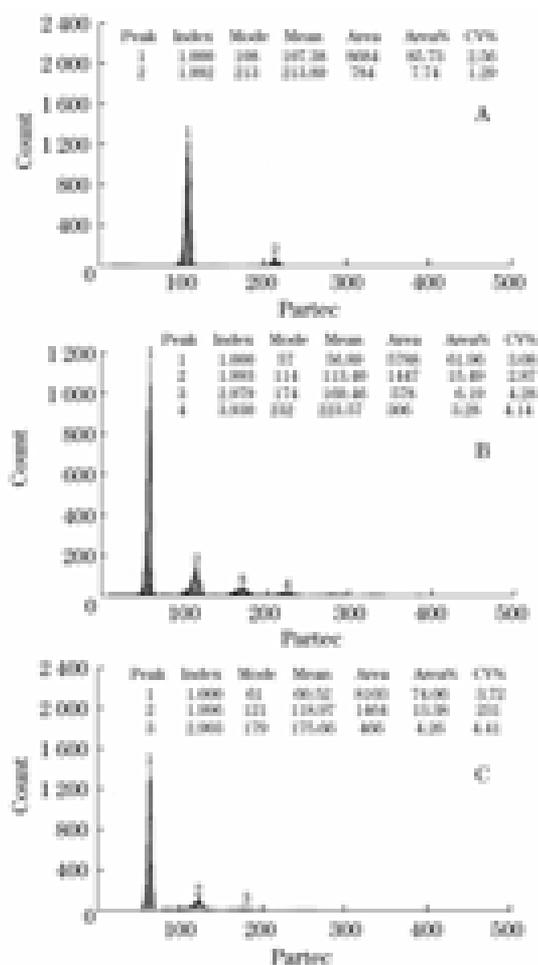


图1 金鱼精子 DNA 含量平均分布

A. 红鲫血细胞 DNA 平均含量(107.38,1 号峰); B. 红鲫精子 DNA 平均含量(56.89,1 号峰); C. 金鱼精子 DNA 平均含量(60.52,1 号峰)。

Fig. 1 Distribution of DNA content in the sperms of goldfish

A. the mean DNA content(107.38, Peak No. 1) of blood cells in red crucian carp; B. the mean DNA content(56.89, Peak No. 1) of sperms in red crucian carp; C. the mean DNA content(60.52, Peak No. 1) of sperms in goldfish.

可见,近缘杂交和远缘杂交都可以导致生殖细胞染色体数加倍,但近缘杂交不能产生染色体数不减半的功能性配子,远缘杂交则能产生染色体数不减半的配子最终导致多倍体的发生。上述结果综合说明,远缘杂交和近缘杂交种的生殖细胞都具有多倍化潜力,但是否最终能产生染色体数不减半的功能性配子则和杂交亲本的亲缘关系的远近有关。另外,桂建芳等^[15]认为银鲫的起源与金鱼的多倍化进化有关,金鱼生殖细胞现有的多倍化潜能能否通过长期的进化和演变产生新的

多倍体物种有待进一步研究。

再者,从金鱼初级精母细胞二价体数的加倍规律(50,100,150,200,250,300……)预示的相应精原细胞染色体数加倍规律为100,200,300,400,500,600……,这种以100(体细胞染色体数)为基数的增长规律提示染色体加倍发生在精原细胞增殖阶段,通过核内有丝分裂或核融合等机制发育成染色体数增倍的初级精母细胞。

参考文献:

- [1] James M. Hybrid speciation [J]. Nature, 2007, 446 (15):279-283.
- [2] 刘少军. 远缘杂交导致不同倍性鱼的形成[J]. 中国科学,2010,40(2):104-114.
- [3] 张纯,刘少军,孙远东,等. 远缘杂交形成的二倍体鱼和多倍体鱼生殖细胞染色体研究[J]. 分子细胞生物学报,2008,41(1):53-60.
- [4] Liu S J, Liu Y, Zhou G J, et al. The formation of tetraploid stocks of red crucian carp × common carp hybrids as an effect of interspecific hybridization [J]. Aquaculture,2001,192:171-186.
- [5] 刘少军,曹运长,何晓晓,等. 异源四倍体鲫鲤群体的形成及四倍体化在脊椎动物进化中的作用[J]. 中国工程科学,2001,3(12):33-41.
- [6] 孙远东,刘少军,张纯,等. 异源四倍体鲫鲤 F₀-F₁₁ 染色体和性腺观察[J]. 遗传学报,2003,20(5):414-418.
- [7] 陈桢. 金鱼的家化与变异[M]. 北京:科学出版社,1959:100.
- [8] 王春元,李延龄. 金鱼(*Carassius auratus*)染色体组型的研究, I. 鲫鱼和红龙睛金鱼染色体组型的比较[J]. 遗传学报,1982,9(3):238-242.
- [9] 王晓梅,宋文芹,李秀兰,等. 用 RAPD 技术检测野生鲫鱼和四个金鱼代表品种的基因组 DNA 多态性[J]. 遗传,1998,22(5):7-11.
- [10] 梁前进. 金鱼起源及演化的研究[J]. 生物学通报,1995,30(3):14-16.
- [11] 王春元,李延龄. 我国现有的金鱼品种的分类及其系统发育的探讨[J]. 动物学报,1983,29(3):267-277.
- [12] Leggatt R A, Iwama G K. Occurrence of polyploidy in the fishes [J]. Rev Fish Biol Fish, 2003, 13: 237-246.
- [13] Comai L. The advantages and disadvantages of being polyploid [J]. Nature Reviews Genetics, 2005, 6: 836-846.
- [14] 桂建芳,梁绍昌,蒋一珪. 人工三倍体水晶彩鲫雌

- 性型间性体减数分裂的染色体行为[J]. 中国科学,1991,4:388-396.
- [15] 桂建芳,周莉. 多倍体银鲫克隆多样性和双重生殖方式的遗传基础和育种应用[J]. 中国科学,2010,40(2):97-103.

Polyploidization analysis of germ cells in goldfish(*Carassius auratus*)

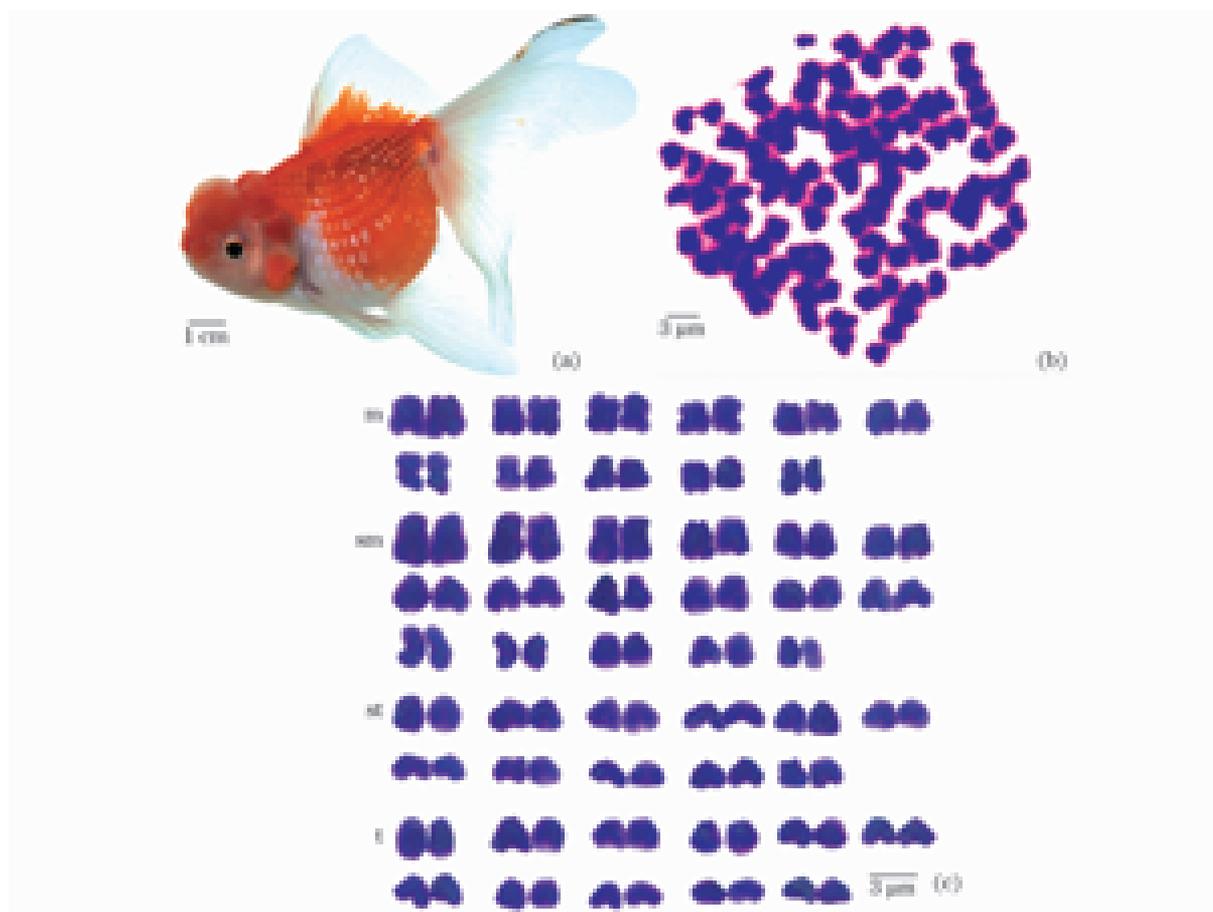
ZHANG Chun, LIU Shao-jun^{*}, LI Tao, XIAO Jun, ZHAO Ru-rong, LIU Yun

(Key Laboratory of Fish Developmental Biology of Education Ministry of China,
College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

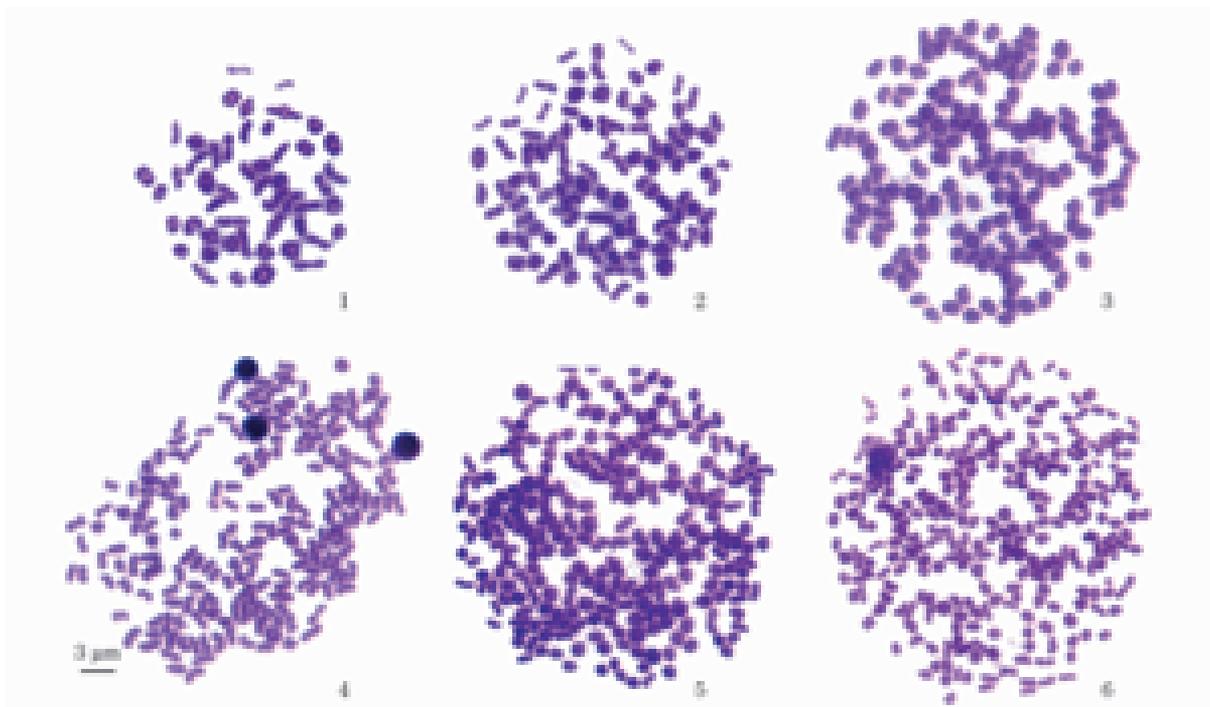
Abstract: The previous studies had indicated that the distant crossing between red crucian carp (*Carassius auratus* red var.) and common carp (*Cyprinus carpio* L.) results in chromosomal double in germ cells. In order to explore the potential ability of polyploidization in the goldfish from close crossing, by observing the chromosomal spreads of germ cells in testis, combining the flow cytometer examined DNA content of sperms, we studied the chromosomal characterization of spermiogenesis and the ploidy of sperms in goldfish. The results showed that the majority of spermatocytes in goldfish had normal chromosomal behavior in meiosis I, like chromosome pairing with 50 bivalents. Furthermore, the bivalent number of a part of germ cells in goldfish doubled obviously among 17.0% of all examined chromosomal spreads, the doubling showed 100, 150, 200, 250, 300 and even more bivalents, which is similar to the chromosomal number doubling in distant crossing between red crucian carp and common carp. Unlike distant crossing species, the goldfish stably produced haploid sperms though. Taken together, it was concluded that both close crossing and distant crossing lead to chromosome doubling in germ cell. However, the production of functional gametes in process of chromosome doubling depends mainly on the genetic relationship between the parents.

Key words: *Carassius auratus*; chromosomal spreads of germ cells; meiosis; bivalent; flow cytometer

Corresponding author: LIU Shao-jun. E-mail: lsj@hunnu.edu.cn



图版 I 金鱼外形图 (a) 及肾细胞染色体有丝分裂中期分裂相 (b) 及染色体组型图 (c)
Plate I Appearance (a), spreads in metaphase of mitosis (b) and karyotypes (c) of goldfish



图版 II 金鱼初级精母细胞二价体分裂相

1. 示 50 个二价体; 2. 示 100 个二价体; 3. 示 150 个二价体; 4. 示 200 个二价体; 5. 示 250 个二价体; 6. 示 300 个二价体。

Plate II Bivalent number in meiosis I of spermatocytes in goldfish

1. showing 50 bivalents; 2. showing 100 bivalents; 3. showing 150 bivalents; 4. showing 200 bivalents; 5. showing 250 bivalents; 6. showing 300 bivalents.