论文

通过染色体位点揭示鲫鱼的同源三倍体起源

覃钦博[†], 王娟[†], 胡敏, 黄胜男, 刘少军^{*}

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, 长沙 410081

[†] 同等贡献^{*} 联系人, E-mail: lsj@hunnu.edu.cn

收稿日期: 2015-08-01; 接受日期: 2015-09-06; 网络版发表日期: 2015-12-29

国家自然科学基金(批准号: 31201987, 31430088, 31210103918)、国家重点基础研究发展计划前期项目(批准号: 2012CB722305)、湖南省青年人才联合培养项目(批准号: 14JJ6008)、湖南省“生物发育工程及新产品研发协同创新中心”(批准号: 20134486)资助

摘要 在洞庭湖水系统中, 鲫鱼复合体表现出二倍体群体($2n=100$, 简称 $2nCC$)和多倍体群体共存的特征. 虽然染色体数目与核型分析已经揭示了这些多倍体鲫鱼分别为三倍体($3n=150$)和四倍体($4n=200$), 但是一直缺乏直接的遗传证据. 本研究通过对 5S rDNA 的染色体位点进行分析, 证明了拥有 150 条染色体的鲫鱼个体(简称 $3nCC$)是三倍体起源($3n=150$). 进一步对具有物种特异性的染色体着丝粒位点进行分析, 揭示了 $3nCC$ 拥有的 3 套染色体均来源于鲫鱼. 相关研究结果提供了直接的细胞遗传学证据, 证明了鲫鱼复合体群体中拥有 150 条染色体的鲫鱼个体是同源三倍体起源. 相关研究结果有利于脊椎动物多倍体化和进化研究.

关键词 同源三倍体, 染色体位点, 染色体位点, 进化

鲫鱼(*Carassius auratus*)广泛分布于整个欧亚大陆. 虽然在银鲫(*Carassius auratus gibelio*)群体中早已发现了 3 种不同倍性个体的存在^[1-3], 但是鲫鱼一直被认为是只存在二倍体形式($2n=100$)^[4,5]. 自 20 世纪 80 年代以来, 三倍体鲫鱼($3n=150$)和四倍体鲫鱼($4n=200$)被相继报道^[6]. 因此, 鲫鱼才被发现具有二倍体和多倍体共存的特点. 在鲫鱼复合体群体中^[7-9], 二倍体和多倍体鲫鱼的外形特征非常相识, 但是繁殖方式却又明显不同. 二倍体鲫鱼的繁殖方式为两性繁殖, 而多倍体鲫鱼表现出同时具有单性雌核发育和有性繁殖的双重繁殖模式^[10-12]. 虽然鲫鱼复合体中的染色体数目与核型多样性说明了多倍体鲫鱼

($3n=150$ 和 $4n=200$)是三倍体和四倍体起源^[6,13,14], 但是一直缺乏直接的遗传证据. 此外, 多倍体鲫鱼染色体组中的额外组染色体是否来自相同或亲缘关系较近的物种(“同源多倍体”), 或者来自不同物种(“异源多倍体”)并不是很清楚.

5S rDNA 和物种特异性着丝粒序列拥有大量拷贝数, 并且表现出明显的物种特异性. 它们在染色体上的位置可以通过相应的分子探针进行荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)而轻松检测到^[15-20]. 在以前的研究中, 通过使用 5S rDNA 和物种特异性的着丝粒探针进行 FISH 实验, 证明了通过红鲫(*Red crucian carp*)($2n=100$, AA)(♀)×团头鲂

引用格式: 覃钦博, 王娟, 胡敏, 等. 通过染色体位点揭示鲫鱼的同源三倍体起源. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 178–182, doi: 10.1360/05SCLS-2015-0173.R3

英文版见: Qin Q B, Wang J, Hu M, et al. Autotriploid origin of *Carassius auratus* as revealed by chromosomal locus analysis. *Sci China Life Sci*, 2016, 59, in press.

(*Megalobrama amblycephala*)($2n=48$, BB)(♂)杂交获得的异源四倍体鲫鲂($4n=148$, AABB)能同时产生具有 3 套($3n=150$, AAA)和 2 套红鲫染色体的配子($2n=100$, AA)^[18,19]. 本研究使用这些探针进行 FISH 实验, 为证明拥有 150 条染色体的鲫鱼是同源三倍体起源提供了直接的细胞遗传学证据. 本研究对于探索脊椎动物的多倍化和进化具有极其重要的意义.

1 方法

1.1 样品来源

2012~2014 年间, 在湖南省洞庭水系统的沅江流域和湘江流域收集了所有的鲫鱼样品, 然后湖南师范大学的教育部工程研究中心进行饲养和繁殖. 实验是按照农业研究中农业动物的护理和使用规范及其教学指导方针进行处理. 在本文进行的实验不需要野生动物行政主管部门批准. 实验用鱼在使用前用 100 mg/L MS-222(Sigma-Aldrich 公司, 美国)对其深度麻醉.

1.2 染色体的制备

为了确定实验鱼的倍性水平, 从 15 月龄的实验鱼上抽取外周血进行培养后制备染色体. 用吸入有 0.1%肝素钠的注射器从每条实验鱼收集 0.2 mL 的血液样本. 将外周血细胞在 25.5℃, 5%CO₂ 环境下的培养基中培养 68~72 h, 然后在收集培养产物前 3.5 h 加入秋水仙碱. 通过离心收集细胞, 然后加入 0.075 mol/L 氯化钾溶液, 在 26℃ 下进行低渗处理 25~30 min, 最后在甲醇:冰醋酸 (3:1, 体积比)混合溶液中固定. 将细胞滴到冷冻玻片, 自然风干, 并用 4%吉姆萨溶液染色 30 min. 将制备的染色体玻片在放大倍率为 3330×的油镜检查下, 对清晰的染色体分裂相拍照. 每种实验样品中, 共 200 个染色体中期分裂相被检测(每条实验鱼检测 20 个).

1.3 荧光原位杂交技术

利用引物 5'-GCTATGCCCGATCTCGTCTGA-3'和 5'-CAGGTTGGTATGGCCGTAAGC-3', 5'-AAGCTTTTCTCTCTAGTAGAGAAAGC-3'和 5'-TTGAGCAGATTTGGGCTTGATTTC-3'在二倍体鲫鱼基因组中分别扩增出 5S rDNA 序列和物种特异性的着丝粒序列, 并以这些序列为模板, 采用 PCR 法以

Dig-11-dUTP 间接标记探针(PCR DIG Probe Synthesis Kit, Roche, Germany), 纯化探针后在各种实验鱼有丝分裂中期染色体标本上进行荧光原位杂交(FISH). 具体的 FISH 实验步骤参考 He 等人研究^[20]. 每种实验样品种, 共 200 个染色体中期分裂相被检测(每条实验鱼检测 20 个).

2 结果

2.1 检查染色体数目

表 1 列出了 2nCC 和 3nCC 染色体数目的分布. 2nCC 有 92%的染色体中期分裂相拥有 100 条染色体(图 1A), 这表明它们是具有 100 条染色体的二倍体鲫鱼. 3nCC 有 83.5%的染色体中期分裂相拥有 150 条染色体(图 1B), 表明它们是具有 150 条染色体的三倍体鲫鱼. 在 3 年时间内(2012~2014 年), 陆续从洞庭湖水系中采集了 300 条鲫鱼样本, 其中 2nCC 和 3nCC 个体比例各占 22%和 78%, 但是一直没能检测到四倍体鲫鱼($4n=200$)样本.

2.2 荧光原位杂交技术

利用 5S rDNA(340 bp)探针针对 2nCC、3nCC、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)和团头鲂的中期染色体分裂相进行 FISH 实验, 相关结果见表 2. 在 2nCC 中, 有 86%的染色体中期分裂相(图 2B)拥有 2 强和 2 弱的 5S

表 1 2nCC 和 3nCC 染色体数目的分布

鱼类	中期染色体数目	染色体数目分布			
		<100	100	<150	150
2nCC	200	16	184	—	—
3nCC	200	—	—	33	167

图 1 2nCC 和 3nCC 的中期染色体分裂相

A: 拥有 100 条染色体的 2nCC 染色体中期分裂相; B: 拥有 150 条染色体的 3nCC 染色体中期分裂相. 箭头所指为微小染色体(箭头处)

图2 5S rDNA 探针杂交信号

A: $2nCC$ 的染色体位点图谱表明, 1 对强的 5S rDNA 位点定位于 1 对同源的亚中部着丝粒染色体上(红色箭头), 而一对弱的 5S rDNA 位点定位于 1 对同源的亚端部着丝粒染色体上(白色箭头); B: 在 $2nCC$ 的染色体分裂相中有 2 个强的 5S rDNA 位点(红色箭头)和 2 个弱的 5S rDNA 位点(白色箭头); C: 在 $3nCC$ 的染色体分裂相中有 3 个强的 5S rDNA 位点(红色箭头)和 3 个弱的 5S rDNA 位点(白色箭头), 黄色箭头指示微小染色体; D: 鲤鱼的染色体分裂相中没有发现 5S rDNA 位点信号; E: 团头鲂的染色体分裂相中没有发现 5S rDNA 位点信号

rDNA 位点. 通过染色体位点图谱分析, 发现这 2 个强位点定位于 1 对同源的亚中部着丝粒染色体上, 2 个弱位点定位于 1 对同源的亚端部着丝粒染色体上(图 2A). 这说明 $2nCC$ 每套染色体中拥有 1 个强的和 1 个弱的 5S rDNA 位点. 在 $3nCC$ 中, 有 79% 染色体中期分裂相(图 2C)拥有 3 强和 3 弱的 5S rDNA 位点, 这表明 $3nCC$ 个体拥有 3 套染色体. 然而, 在鲤鱼和团头鲂的染色体分裂相中没有发现相应的 5S rDNA 位点信号(图 2D 和 E).

利用物种特异性的染色体着丝粒探针进行 FISH 实验, $2nCC$ 的 100 条染色体均标记上荧光信号(图 3A), 但是在鲤鱼(图 3D)、团头鲂(图 3E)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)和翘嘴红鲌(*Erythroculter ilishaeformis*)(表 2)的染色体分裂相中均未发现荧光信号. 这说明该探针能特异标记鲫鱼染色体. 在 $3nCC$ 中, 有 84.5% 的染色体中期分裂相其 150 条染色体均被标记上荧光信号(图 3B), 这表明 $3nCC$ 的 150 条染色体均来自于鲫鱼. 研究结果为 $3nCC$ 是同源三倍体起源提供了直接的证据.

3 讨论

广泛认为硬骨鱼类比哺乳动物多经历了一次全

图3 物种特异性的染色体着丝粒探针杂交信号

A: $2nCC$ 染色体中期分裂相中的 100 条染色体均被标记上荧光信号; B: $3nCC$ 染色体中期分裂相中的 150 条染色体均被标记上荧光信号, 黄色箭头表示微小染色体; C: 鲤鱼染色体中期分裂相中没有发现杂交信号; D: 团头鲂染色体中期分裂相中没有发现杂交信号

基因组复制即 3R 假说. 第三轮全基因组复制(3R)可能发生在约 3.6 亿年前并产生了辐鳍鱼进化分支, 早

表 2 $2nCC$ 、 $3nCC$ 、鲤鱼、团头鲂、草鱼和翘嘴红鲌探针杂交信号

鱼类	染色体数目	着丝粒探针	5S rDNA 探针	
		位点数目	强信号数目	弱信号数目
$2nCC$	100	100	2	2
$3nCC$	150	150	3	3
鲤鱼	100	0	0	0
团头鲂	48	0	0	0
草鱼	48	0	未检测	
翘嘴红鲌	48	0	未检测	

于硬骨鱼^[21]。鲤鱼和鲫鱼($2n=100$)的染色体数目是其他鲤科鱼类的两倍。因此,推测鲤鱼和鲫鱼经历第四轮全基因组复制($4R$)^[22,23]。近些年来,大量研究结果均表明多倍体鲫鱼在成功经历了几次基因组加倍后又在最近经历了一次额外的全基因组复制事件^[7,24,25]。在洞庭湖水系中,鲫鱼复合体群体中表现出二倍体形式($2n=100$)和多倍体形式($3n=150$, $4n=200$)共存的特点。虽然二倍体鲫鱼与多倍体鲫鱼在外形特征上非常相似,但在他们的繁殖模式却明显不同^[10-12]。相对于二倍体鲫鱼($2n=100$)来说,三倍体鲫鱼($3n=150$)虽然不是全基因组复制,但还是能说明当前自然界中还在自发地进行基因组复制。在洞庭水系统鲫鱼群体中有四倍体($4n=200$)个体有记录^[6],但是本研究收集的鲫鱼样品中未检出这一倍性的个体。这可能是因为在鲫鱼复合体群体中四倍体鲫鱼个体的比例很小,所以在有限的样品中未能检测到。

鲫鱼复合体群体中的染色体与核型的多样性说明了多倍体鲫鱼($3n=150$ 和 $4n=200$)是三倍体和四倍体的起源^[13,14]。然而直到现在,也没有直接的遗传学证据。虽然已有研究揭示了多次同源多倍化发生在鲫鱼复合体群体中^[7],但是本研究最重要的发现是为证明 150 条染色体的鲫鱼是同源三倍体的起源提供了直接的细胞遗传学证据。那么鲫鱼复合体中同源三倍体鲫鱼可能的起源是什么?一些研究推测是杂交导致了自然界中的多倍体鱼形成。例如,异育银鲫就被认为是起源于远古时期雌性二倍体鲫鱼与雄性鲤鱼的杂交^[26]。通常来说,由于染色体来源于两个不同的物种,远缘杂交是形成异源多倍体,而不形成同源多倍体^[27]。事实上,远缘杂交是可以通过特殊的减数分裂方式诱导同源多倍体形成^[19]。以前的研究中,在红鲫($2n=100$, AA)(♀)×团头鲂($2n=48$, BB)(♂)的远缘杂交后代中获得了两性可育的异源四倍体鲫群体($4n=148$, AABB)^[28,29]。有趣的是,异源四倍体鲫在减数分裂过程中发生了亲本染色体完全分离,导致产生了同源三倍体的配子(AAA),同源二倍体配子(AA)和单倍体配子(A)^[18]。因此,当异源四倍体鲫的同源二倍体精子和同源二倍体卵子受精后获得了两性可育同源四倍体鱼($4n=200$, AAAA),并形成了遗传稳定的同源四倍体鱼品系($F_2 \sim F_8$)^[19]。因此推测,洞庭湖水系中的同源三倍体鲫鱼来源于雌性的二倍体鲫鱼和不同物种的雄性鱼类杂交。

参考文献

- Zhou L, Gui J F. Karyotypic diversity in polyploid gibel carp, *Carassius auratus gibelio* Bloch. *Genetica*, 2002, 115: 223–232
- Zhu H P, Ma D M, Gui J F. Triploid origin of the gibel carp as revealed by 5S rDNA localization and chromosome painting. *Chromosome Res*, 2006, 14: 767–776
- Cherfas N B. Natural triploidy in females of the goldfish (*Carassius auratus gibelio*). *Genetica*, 1966, 12: 16–24
- Zan R G, Song Z. Analysis and comparison between the karyotypes of *Cyprinus carpio* and *Carassius auratus* as well as *Aristichthys nobilis* and *Hypophthalmichthys molitrix*. *Acta Genet Sin*, 1980, 17: 72–80
- Yu X J. China Freshwater Fisheries Chromosome. Beijing: Science Publishing House, 1989
- Xiao J, Zou T M, Chen Y B, et al. Coexistence of diploid, triploid and tetraploid crucian carp (*Carassius auratus*) in natural waters. *BMC Genet*, 2011, 12: 20
- Luo J, Gao Y, Ma W, et al. Tempo and mode of recurrent polyploidization in the *Carassius auratus* species complex (Cypriniformes, Cyprinidae). *Heredity*, 2014, 112: 415–427
- Jakovlić I, Gui J F. Recent invasion and low level of divergence between diploid and triploid forms of *Carassius auratus* complex in Croatia. *Genetica*, 2011, 139: 789–804
- Jiang F F, Wang Z W, Zhou L, et al. High male incidence and evolutionary implications of triploid form in northeast Asia *Carassius auratus* complex. *Mol Phylogenet Evol*, 2013, 66: 350–359
- Yang X Q, Chen M R, Yu X M, et al. Preliminary studies on the mode of reproduction in crucian carp (*Carassius auratus*) of Pengze. *Acta Hydrobiol Sin*, 1992, 16: 277–280

- 11 Mezhzherin S, Kokodiy S. Genetic structure of silver Prussian carp *Carassius (Superspecies auratus) (Linnaeus, 1758)* colonies from the Middle Dnieper. *Basin Russian J Genet*, 2010, 46: 725–731
- 12 Koboyasi H. A Cytological study on gynogenesis of the triploid gibel carp (*Carassius auratus langsdorffi*). *Zool Mag*, 1971, 80: 316–322
- 13 Zan R G. Studies of sex chromosomes and C-banding karyotypes of two forms of *Carassius auratus* in Kunming Lake. *Acta Genet Sin*, 1982, 9: 32–39
- 14 Yu H X, Xu H, Guan H W. Preliminary study on the karyotypes of the natural gynogenetic crucian carp *Carassius auratus* (A form) of Puan, Guizhou province. *Acta Hydrobiol Sin*, 1992, 16: 87–89
- 15 Martins C P, Galetti P M. Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. *Genome*, 2001, 44: 903–910
- 16 Murakami M, Fujitani H. Characterization of repetitive DNA sequences carrying 5S rDNA of the triploid gibel carp (Japanese silver crucian carp, *Carassius auratus langsdorffi*). *Genes Genet Syst*, 1998, 73: 9–20
- 17 覃钦博, 戴婧, 刘少军, 等. 异源三倍体鲫鲂的遗传组成和生殖特性观察. *水产学报*, 2014, 38: 356–361
- 18 Qin Q B, Wang Y D, Wang J, et al. The abnormal chromosome behavior during meiosis was revealed in allotetraploid of *Carassius auratus red var.* (♀)×*Megalobrama amblycephala* (♂). *BMC genetics*, 2014, 15: 95
- 19 Qin Q B, Wang Y D, Wang J, et al. The autotetraploid fish derived from hybridization of *Carassius auratus red var.* (female)×*Megalobrama amblycephala* (male). *Biol Reprod*, 2014, 91: 93
- 20 He W G, Qin Q B, Liu S J, et al. Organization and variation analysis of 5S rDNA in different ploidy-level hybrids of red crucian carp×topmouth culter. *PLoS One*, 2012, 7: e38976
- 21 Venkatesh B. Evolution and diversity of fish genomes. *Curr Opin Genet Dev*, 2003, 13: 588–592
- 22 Wang J T, Li J T, Zhang X F, et al. Transcriptome analysis reveals the time of the fourth round of genome duplication in common carp (*Cyprinus carpio*). *BMC Genomics*, 2012, 13: 96
- 23 Luo J, Stadler P F, He S P, et al. PCR survey of hox genes in the goldfish *Carassius auratus auratus*. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 2007, 308B: 250–258
- 24 Gui J, Zhou L. Genetic basis and breeding application of clonal diversity and dual reproduction modes in polyploidy *Carassius auratus gibelio*. *Sci China Life Sci*, 2010, 53: 409–415
- 25 Li X Y, Zhang X J, Li Z, et al. Evolutionary history of two divergent *Dmrt1* genes reveals two rounds of polyploidy origins in gibel carp. *Mol Phylogenet Evol*, 2014, 78: 96–104
- 26 Chun F L, Yang S T, Gui J F. Differential screening and characterization analysis of the egg envelope glycoprotein ZP3 cDNAs between gynogenetic and gonochoristic crucian carp. *Cell Res*, 2001, 11: 17–27
- 27 刘少军. 远缘杂交导致不同倍性鱼的形成. *中国科学: 生命科学*, 2010, 40: 104–114
- 28 Liu S J, Qin Q B, Xiao J, et al. The formation of the polyploidy hybrids from different subfamily fish crossing and its evolutionary significance. *Genetics*, 2007, 176: 1023–1034
- 29 Qin Q B, He W G, Liu S J, et al. Analysis of 5S rDNA organization and variation in polyploid hybrids from crosses of different fish subfamilies. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 2010, 314B: 403–411