

DOI: 10.12264/JFSC2023-0049

苏丹鱼染色体核型及系统进化分析

曲照球^{1,2}, 麻艳群², 唐瞻杨¹, 黄凯², 肖俊¹, 陈丽婷¹, 黄婷¹, 罗永巨¹, 郭忠宝¹, 黎明¹, 陆专灵¹, 高雪梅¹

1. 广西壮族自治区水产科学研究院, 广西 南宁 530021;

2. 广西大学动物科学技术学院, 广西 南宁 530004

摘要: 鱼类染色体核型和系统进化分析在鱼类种质资源保护和利用等方面发挥着重要作用, 为丰富苏丹鱼(*Leptobarbus hoevenii*)种质资源研究内容, 本研究以苏丹鱼为研究对象, 采用染色体冷滴片制备法分析了染色体核型特征, 运用线粒体 16S rRNA 基因序列比对分析了其系统进化关系, 探讨了鲃亚科鱼类种属间亲缘关系。染色体核型分析结果显示: 苏丹鱼二倍体的染色体数为 $2n=50$, 其中包含中部着丝粒染色体(m) 8 条、亚中部着丝粒染色体(sm) 14 条、亚端部着丝粒染色体(st) 2 条和端部着丝粒染色体(t) 1 条, 核型公式为 $2n=16m+28sm+4st+2t$, 染色体臂数(NF)为 94。14 种鲃亚科鱼类的线粒体 16S rRNA 基因比对分析结果表明: 鲃亚科鱼类的种间遗传距离为 0.016~0.134, 平均遗传距离为 0.074; 苏丹鱼与粗须白甲鱼(*Onychostoma barbata*)的种间遗传距离最大(0.134), 与泰国短吻鱼(*Sikukia stejnegeri*)的种间遗传距离最小(0.090); 系统进化关系结果显示: 苏丹鱼位于进化树的基部, 与四须鲃属亲缘关系较近。本研究结果可为苏丹鱼种质资源鉴定、品种改良、系统进化等提供理论支撑。

关键词: 苏丹鱼; 染色体; 核型分析; 16S rRNA; 系统发育

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2023)07-0821-10

苏丹鱼(*Leptobarbus hoevenii*)学名何氏细须鲃, 属鲤形目(Cypriniformes)、鲤科(Cyprinidae)、鲃亚科(Barbinae)、细须鲃属(*Leptobarbus*), 原产于马来西亚、印度尼西亚、老挝、婆罗洲等淡水水域, 是马来西亚高端的野生食用河鱼^[1]。苏丹鱼体形狭长, 体表呈银白色, 鳍条略带红色, 吻部有两对胡须, 常栖息在水底层, 嗜跳跃, 为杂食性鱼类, 适宜的生长水温是 15~30 ℃。苏丹鱼肉质细嫩, 无鱼腥味, 腹内没有黑膜, 口感较好, 且生长速度较快, 体长 5 cm 的鱼苗养殖 4 个月可达到每尾 0.5 kg, 养殖两年可达到每尾 1.5~2 kg 的成鱼规格。2001 年, 苏丹鱼首次由浙江省淡水水产研究所引入国内, 因其肉质鲜美、适应性强、易于饲养等特点, 现已成为国内一个新的养殖品

种, 养殖效益可观。苏丹鱼具有较高的经济价值和良好的水产养殖前景, 但现有养殖群体一直以来未经选育, 已出现种质退化现象, 因此需要开展苏丹鱼的遗传育种研究。了解物种的遗传学特征是开展种质创新、种质资源保护、品种选育的前提。目前, 仅见苏丹鱼形态发育^[2]、繁殖性能^[3-4]、饲料配比^[5-7]、人工养殖^[8]和运动生理^[9]等方面的相关报道, 未见细胞学、分子生物学的遗传特征相关研究。本研究对其染色体核型及线粒体 16S rRNA 基因进行比对研究分析, 旨在为苏丹鱼种质资源开发利用、遗传育种的提供理论参考。

染色体是遗传物质的主要载体, 研究染色体核型有助于了解生物的遗传组成、遗传变异规律和发育机制, 对物种分类、遗传育种和种质保护等均有重要

收稿日期: 2023-05-04; 修订日期: 2023-06-16.

基金项目: 国家自然科学基金项目(32260917); 广西壮族自治区农业科技自筹经费项目(Z2022216)

作者简介: 曲照球(1996-), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产动物遗传育种. E-mail: 632720328@qq.com

通信作者: 唐瞻杨, 正高级农艺师, 研究方向为水产动物遗传育种. E-mail: tangzhanyang123@163.com

作用^[10-11]。染色体核型分析技术已广泛应用于水产动物研究中,包括石斑鱼(*Epinephelus*)^[12]、黄带拟鲈(*Pseudocaranx dentex*)^[13]、刀鲚(*Coilia nasus*)^[14]、贝类^[15-16]、水生节肢动物^[17-18]等。鲃亚科鱼类的系统分类及种属间的亲缘关系历来是学者们感兴趣的研究课题,目前已有对光唇鱼(*Acrossocheilus fasciatus*)^[19]、中华倒刺鲃(*Spinibarbus sinensis*)^[20]、大鳞鲃(*Luciobarbus capito*)^[21]等鲃亚科鱼类核型特征的分析研究。前人结果表明,鲃亚科鱼类存在染色体进化类型 $2n=48$ 、 $2n=52$ 和 $2n=96$ 、 $2n=98$ 。此外,朱新平等^[22]于 1990 年报道何氏细须鲃(*Leptobarbus hoevenii*)的染色体数目和核型,但鱼类中存在较多的染色体多态现象,因此,仍需进行现有种群的染色体核型进行分析。

线粒体 16S rRNA 基因序列高度保守、结构简单,其一个基因片段包含了种间乃至科间的进化信息,是常见的 DNA 条形码基因^[23-25],已被广泛应用于水产动物遗传多样性评估、系统进化和种类鉴定等领域,如鳢科(Channidae)^[26]、鲃属(*Seriola*)^[27]、仿石鲈科(Haemulidae)^[28]、鲷科(Haliotidae)^[29]、长臂虾科(Palaemonidae)^[30]等。鲃亚科是鲤科鱼类重要的一个分支,已有学者从其形态^[31-32]、细胞学^[33]和分子生物学^[34-35]等领域分析了鲃亚科部分鱼类的系统进化,研究内容包括鱼类外部形态特征、染色体核型特征以及线粒体基因标记等,但以上研究均未涉及苏丹鱼线粒体 16S rRNA 基因。本研究以苏丹鱼为实验对象,阐述苏丹鱼的染色体核型特征和系统进化关系,以期为苏丹鱼的遗传学研究与种质资源鉴定、利用和保护等提供基础理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验鱼来源于广西壮族自治区水产科学研究院广西特色淡水鱼综合实验基地,实验鱼全长为 15~20 cm,体重达 80~150 g,养殖池塘面积约 1500 m²,水温为 26~28 °C, pH 为 7.5~8.5,溶氧 5 mg/L 以上,氨氮含量为 0.2 mg/L,亚硝酸盐含量 0.002 mg/L。日投喂量为体重的 0.5%,每日投喂 2 次,投喂时间为上午 10:00 和下午 5:00。随机

挑选 5 尾实验鱼用于下一步实验。

1.2 染色体标本制备

参照林义浩^[36]PHA 体内注射法,制作苏丹鱼头肾组织的染色体标本。

预处理 实验鱼按 10 µg/g 的剂量胸腔注射植物血球凝集素 PHA (Solarbio),暂养 24 h,再次胸腔注射 3.5 µg/g 剂量的秋水仙素(Solarbio),暂养 3 h,将实验鱼剪掉鳃部及尾部放血 20 min,使用的实验用品均提前消毒。

制备头肾细胞悬液 采集实验鱼头肾组织,放置在盛有少量生理盐水的培养皿中,反复扯散、清洗 2~3 遍。再用剪刀将头肾组织反复剪切约 20 min,过滤至 10 mL 离心管中,用胶头滴管反复吹打均匀,制备细胞悬液备用。

低渗 将制备好的细胞悬液置于离心机(BECKMAN COULTER, Allegra X-30R Centrifuge)中,1000 r/min 离心 8 min,弃上清;加入 8 mL 浓度为 0.075 mol/L 的 KCl 低渗液,置于预热至 37 °C 的水浴锅中低渗处理 30 min,随后 1000 r/min 离心 8 min,弃上清。

固定在低渗保留的细胞悬液中,加入 8 mL 现配的卡诺氏固定液($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{冰醋酸}}=3:1$),常温放置 30 min,随后 1000 r/min 离心 8 min,弃上清,此过程再重复两次。

制片 采用冷滴片法制作切片,按照快速 Giemsa 染液试剂盒(Solarbio)说明进行染色,染色时间为 10 min,超纯水缓慢冲洗,自然干燥后镜检并拍摄。

1.3 染色体核型分析

选取分散良好、形态清晰的染色体中期分裂像在油镜下(上海永亨 XSP-2CA)进行观察、拍照。利用 Adobe Photoshop 2020 软件统计染色体数目,利用 Image J 软件计算染色体的相对长度和臂比。依据 Levan 等^[37]的方法确定染色体类型划分标准如下:

中部着丝粒染色体(metacentric chromosomes, m): 臂比值 1.0~1.7 的染色体;

亚中部着丝粒染色体(submetacentric chromosomes, sm): 臂比值 1.7~3.0 染色体;

亚端部着丝粒染色体(subtelocentric chromosomes, st): 臂比值 3.0~7.0 的染色体;

端部着丝粒染色体(telocentric chromosomes, t): 臂比值 7.0 以上的染色体。

染色体的相对长度(%)=(实测染色体长度/全部染色体长度总和)×100%

臂比=长臂长度/短臂长

1.4 线粒体 16S rRNA 基因的提取、扩增与测序

根据 DNA 提取试剂盒(OMEGA BIO-TEK)说明, 提取实验鱼鳍条组织 DNA。利用 Primer-Premier5 软件设计引物。其中, 正向引物为 16S-F: 5'-GAAAGCGTTAAAGCTCAGAC-3', 反向引物为 16S-R: 5'-TTTGACGTGGTTGAAGTT TG-3'。

PCR 反应体系共 50 μL, 包括: 模板 DNA 3 μL, 上下游引物各 2 μL, PCR 酶 25 μL, 超纯水 18 μL。PCR 扩增反应条件为: 94 ℃预变性 5 min, 94 ℃变性 30 s, 55 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 1 min, 共循环 35 次; 72 ℃延伸 10 min。PCR 产物用 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测, 并送至生工生物工程(上海)股份有限公司完成测序, 运用 SeqMan 软件对扩增序列进行剪切、拼接。

1.5 系统进化分析

从 GenBank 下载鲃亚科 10 属 13 个物种的线粒体 16S rRNA 基因序列, 将下载序列与本研究测定的序列一并利用 MEGA X 软件进行分析。运用 Clustal W 方法进行多重序列比对, 去除首尾两端的冗余序列, 运用 Kimura-2-parameter 模型计算遗传距离, 以斑马鱼(*Danio rerio*)为外类群, 采用最大似然法(maximum likelihood, ML)构建鲃亚科物种系统进化树, 采用 Bootstrap 法分析(1000 个循环)检验进化树节点的置信度。

2 结果与分析

2.1 苏丹鱼染色体数目

筛选分散良好、形态清晰的染色体中期分裂相 100 个, 统计染色体数目, 结果见表 1。实验结果表明, 染色体数目为 50 条的分裂相最多, 达 77 个, 占比是 77%, 染色体数目为 46、47、48、49 的分裂相占比分别为 4%、3%、7%、9%, 由此确定苏丹鱼二倍体染色体众数为 2n=50。

2.2 苏丹鱼染色体核型

选取 5 个形态清晰、分散良好的中期分裂相

表 1 苏丹鱼染色体中期分裂相统计

Tab. 1 Statistical table of the mid chromosome division phase in *Leptobarbus hoevenii*

项目 item	染色体数目 chromosome number				
	46	47	48	49	50
分裂相个数/个 metaphase number	4	3	7	9	77
百分比/% percentage of metaphase	4	3	7	9	77

进行分析(图 1、图 2), 测量染色体的实际长度, 并计算其相对长度和臂比(表 2)。实验结果表明, 苏丹鱼二倍体染色体组的核型公式为: 16m+28sm+4st+2t, NF=94。包含中部着丝粒染色体(m) 8 条、亚中部着丝粒染色体(sm) 14 条、亚端部着丝粒染色体(st) 2 条和端部着丝粒染色体(t) 1 条。绘制染色体核型模式图(图 3), 由图 3 可知, 编号为 9、10、11 的染色体相对长度较大, 分别为 5.59±0.30、5.43±0.65、5.02±0.16, 核型均为 sm 型, 编号为 25 的染色体相对长度最小, 为 2.55±0.03, 核型为 t 型。

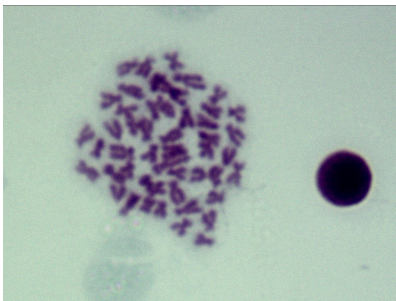


图 1 苏丹鱼染色体中期分裂相
Fig. 1 Metaphase division phase of *Leptobarbus hoevenii*

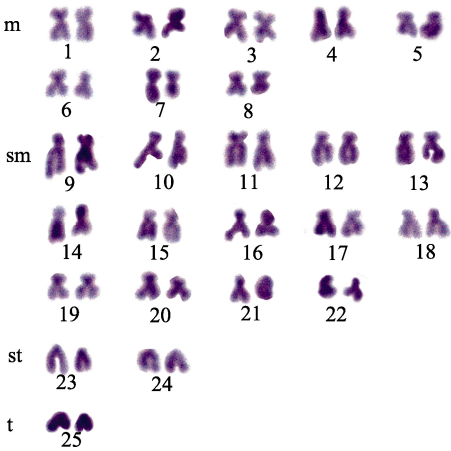


图 2 苏丹鱼染色体核型图
Fig. 2 Chromosome karyotype of *Leptobarbus hoevenii*

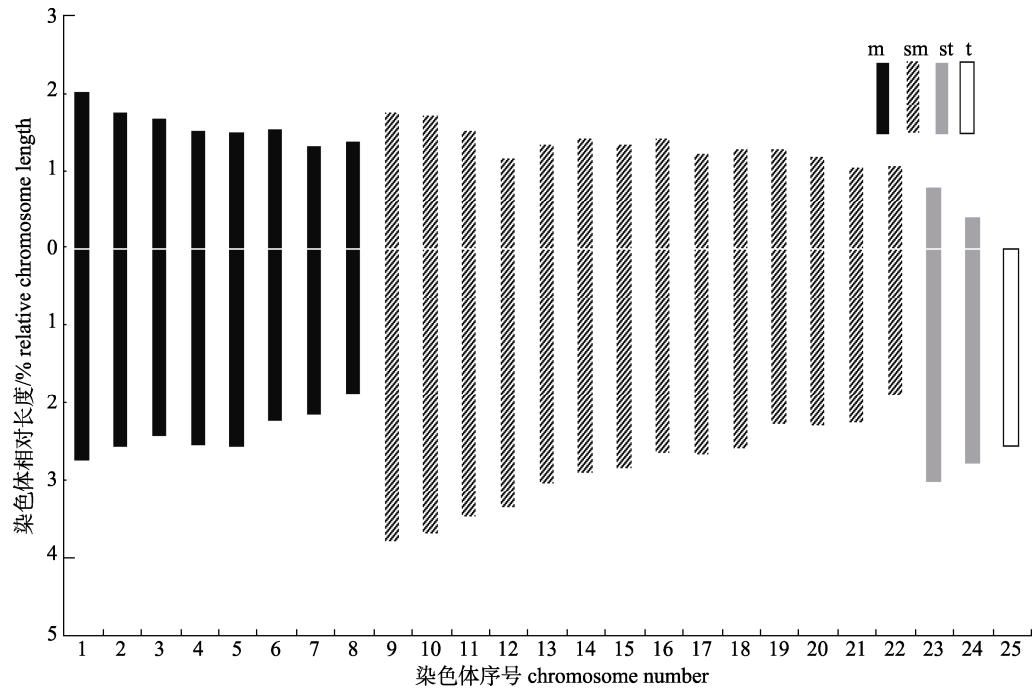


图 3 苏丹鱼染色体核型模式图

Fig. 3 Chromosome karyotype pattern diagram in *Leptobarbus hoevenii*

表 2 苏丹鱼染色体相对长度及臂比

Tab. 2 Relative length and arm ratio of metaphase chromosome of *Leptobarbus hoevenii*

染色体序号 chromosome no	相对长度/% relative length	臂比 arm ratio	类型 type
1	4.81±0.27	1.35±0.22	m
2	4.34±0.33	1.45±0.03	m
3	4.13±0.42	1.43±0.04	m
4	4.10±0.04	1.69±0.06	m
5	4.10±0.20	1.67±0.06	m
6	3.81±0.15	1.44±0.10	m
7	3.48±0.03	1.62±0.12	m
8	3.29±0.10	1.35±0.17	m
9	5.59±0.30	2.14±0.28	sm
10	5.43±0.65	2.13±0.06	sm
11	5.02±0.16	2.28±0.12	sm
12	4.53±0.09	2.87±0.28	sm
13	4.40±0.03	2.24±0.02	sm
14	4.34±0.23	2.04±0.21	sm
15	4.22±0.09	2.09±0.04	sm
16	4.08±0.11	1.85±0.23	sm
17	3.90±0.18	2.16±0.03	sm
18	3.88±0.33	2.01±0.41	sm
19	3.57±0.06	1.74±0.17	sm
20	3.49±0.09	1.92±0.13	sm
21	3.32±0.09	2.16±0.34	sm
22	3.00±0.10	1.75±0.23	sm
23	3.83±0.07	3.80±0.12	st
24	2.79±0.21	6.71±0.52	st
25	2.55±0.03	∞	t

2.3 线粒体 16S rRNA 基因序列特征分析

经过 PCR 扩增和序列测定, 获得苏丹鱼线粒体 16S rRNA 基因片段 592 bp, 碱基 A、T、G、C 含量分别为 37.5%、19.6%、18.6%、24.3%, A+T 的含量(57.1%)高于 G+C 的含量(42.9%)。从 GenBank 下载 13 种鲃亚科鱼类线粒体 16S rRNA 基因序列, 将下载序列与测序序列的碱基组成列于表 3。由表 3 可知, 14 种鲃亚科鱼类线粒体 16S rRNA 基因片段中 A、T、G、C 的平均含量分别为 35.9%、19.6%、19.2%、25.3%, A+T 含量均大于 G+C 含量, 其中, 光倒刺鲃(*Spinibarbus hollandi*)的 A+T 含量最大, 达 57.5%, 苏丹鱼的 A+T 含量排第二。

2.4 鲃亚科种间遗传距离分析

基于 Kimura-2-parameter 模型, 计算鲃亚科鱼类线粒体 16S rRNA 基因序列的种间遗传距离列于表 4。14 种鲃亚科鱼类的种间遗传距离为 0.016~0.134, 平均遗传距离达 0.074。苏丹鱼与其余鲃亚科鱼类的种间遗传距离为 0.090~0.134, 平均遗传距离为 0.110。苏丹鱼与粗须白甲鱼(*Onychostoma barbata*)种间遗传距离最大(0.134), 与泰国短吻鱼(*Sikukia stejnegeri*)的种间遗传距离最小(0.090)。

表 3 14 种鲃亚科鱼类 16S rRNA 基因序列的碱基组成
Tab. 3 Base composition of 16S rRNA gene sequences
of 14 species in Barbidae

种类 species	碱基含量/% base composition					
	T	C	A	G	A+T	G+C
瓣结鱼 <i>Tor brevifilis</i>	18.7	26.6	34.9	19.7	53.6	46.3
粗须白甲鱼 <i>Onychostoma barbata</i>	19.1	25.8	35.6	19.4	54.7	45.2
倒刺鲃 <i>Spinibarbus denticulatus</i>	19.8	25.3	36.1	18.8	55.9	44.1
中华倒刺鲃 <i>Spinibarbus sinensis</i>	20.1	24.7	35.9	19.2	56.0	43.9
泰国短吻鱼 <i>Sikukia stejnegeri</i>	19.7	24.5	36.1	19.7	55.8	44.2
多鳞白甲鱼 <i>Onychostoma macrolepis</i>	18.8	26.4	35.7	19.1	54.5	45.5
红鳍方口鲃 <i>Cosmochilus cardinalis</i>	20.0	25.1	36.0	18.9	56.0	44.0
光倒刺鲃 <i>Spinibarbus hollandi</i>	20.5	24.1	37.0	18.4	57.5	42.5
大鳞裂峡鲃 <i>Hampala macrolepidota</i>	19.0	26.3	35.4	19.3	54.4	45.6
墨脱四须鲃 <i>Barbodes hexagonlepis</i>	20.6	24.9	35.6	18.9	56.2	43.8
云南吻孔鲃 <i>Poropuntius huangchuchieni</i>	20.1	24.8	36.3	18.8	56.4	43.6
长臀鲃 <i>Mystacoleucus marginatus</i>	18.4	26.7	35.8	19.1	54.2	45.8
大鳞鲃 <i>Luciobarbus capito</i>	19.9	24.9	34.9	20.3	54.8	45.2
苏丹鱼 <i>Leptobarbus hoevenii</i>	19.6	24.3	37.5	18.6	57.1	42.9
平均 average	19.6	25.3	35.9	19.2	55.5	44.5

2.5 苏丹鱼系统进化分析

运用最大似然法(maximum likelihood, ML), 基于 General Time Reversible 模型构建鲃亚科 11 属 14 种鱼类的系统进化树, 结果如图 4 所示。进化树由 2 大分支构成, 其中, 白甲鱼属(*Onychostoma*)、裂峡鲃属(*Hampala*)、结鱼属(*Tor*)、亮鲃属(*Luciobarbus*)、倒刺鲃属(*Spinibarbus*) 构成 Clade I 分支; 短吻鱼属(*Sikukia*)、长臀鲃属(*Mystacoleucus*)、方扣鲃属(*Cosmochilus*)、吻孔鲃属(*Poropuntius*)构成 Clade II 分支; 苏丹鱼和墨脱四须鲃(*Barbodes hexagonlepis*)位于进化树的根部, 不与其他物种聚类。

3 讨论

3.1 苏丹鱼染色体标本制备

选择适宜的材料是获得良好染色体标本的前提, 本研究以分裂增殖旺盛的头肾组织细胞为材料, 利用 PHA-秋水仙素体内注射法获得了大量较清晰的苏丹鱼染色体中期分裂相。经过反复摸索, 确立了制备染色体中期分裂相的最佳剂量

表 4 14 种鲃亚科鱼类 16S rRNA 序列种间遗传距离
Tab.4 Interspecific genetic distances of 16S rRNA sequences of 14 species in Barbidae

物种 species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1													
2	0.060												
3	0.060	0.062											
4	0.065	0.072	0.016										
5	0.079	0.081	0.053	0.060									
6	0.053	0.018	0.050	0.060	0.064								
7	0.064	0.072	0.053	0.063	0.053	0.060							
8	0.093	0.095	0.031	0.035	0.077	0.082	0.080						
9	0.069	0.060	0.069	0.074	0.078	0.048	0.089	0.092					
10	0.107	0.130	0.079	0.090	0.102	0.121	0.090	0.108	0.129				
11	0.072	0.079	0.042	0.053	0.048	0.069	0.040	0.065	0.086	0.085			
12	0.069	0.077	0.042	0.051	0.035	0.060	0.040	0.067	0.074	0.087	0.042		
13	0.069	0.074	0.037	0.042	0.066	0.067	0.065	0.067	0.081	0.097	0.060	0.057	
14	0.120	0.134	0.095	0.106	0.090	0.114	0.103	0.112	0.121	0.130	0.101	0.093	0.111

注: 1. 瓣结鱼 HQ235711.1; 2. 粗须白甲鱼 NC 019630.1; 3. 倒刺鲃 JX042131.1; 4. 中华倒刺鲃 DQ845864.1; 5. 泰国短吻鱼 DQ845872.1; 6. 多鳞白甲鱼 GQ406258.1; 7. 红鳍方口鲃 HQ235710.1; 8. 光倒刺鲃 DQ845865.1; 9. 大鳞裂峡鲃 DQ845863.1; 10. 墨脱四须鲃 DQ845874.1; 11. 云南吻孔鲃 HQ235718.1; 12. 长臀鲃 DQ845913.1; 13. 大鳞鲃 MH136825; 14. 苏丹鱼。
Note: 1. *Tor brevifilis* HQ235711.1; 2. *Onychostoma barbata* NC 019630.1; 3. *Spinibarbus denticulatus* JX042131.1; 4. *Spinibarbus sinensis* DQ845864.1; 5. *Sikukia stejnegeri* DQ845872.1; 6. *Onychostoma macrolepis* GQ406258.1; 7. *Cosmochilus cardinalis* HQ235710.1; 8. *Spinibarbus hollandi* DQ845865.1; 9. *Hampala macrolepidota* DQ845863.1; 10. *Barbodes hexagonlepis* DQ845874.1; 11. *Poropuntius huangchuchieni* HQ235718.1; 12. *Mystacoleucus marginatus* DQ845913.1; 13. *Luciobarbus capito* MH136825; 14. *Leptobarbus hoevenii*.

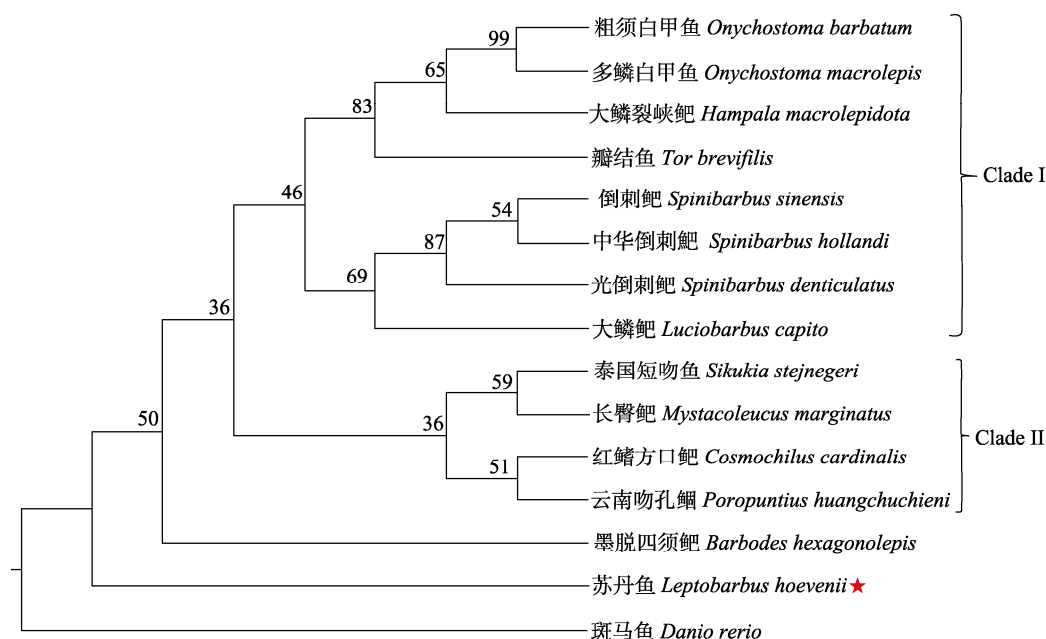


图 4 基于线粒体 16S rRNA 序列构建的鲃亚科部分鱼类 ML 系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree (ML) of several species in the subfamily Barbinae based on mitochondrial 16S rRNA sequences

和时间, PHA 和秋水仙素的最佳处理剂量分别为 $10 \mu\text{g/g}$ 、 $3.5 \mu\text{g/g}$, 作用时间分别为 24 h、3 h。测量及制图软件能有效提高实验的效率和准确性, 实验数据与传统的人工测量相比更可靠^[21]。本研究运用 Image J 软件及 Photoshop 软件测量染色体的体臂长度, 并绘制染色体核型图, 获得苏丹鱼二倍体的染色体数目为 $2n=50$, 核型公式为: $16m+28sm+4st+2t$, $NF=94$ 。然而, 据朱新平等^[22]于 1990 年报道, 何氏细鲃鱼染色体核型为 $16m+30sm+2st+2t$, $NF=96$, 与本研究结果存在差异, 推测是使用了不同的地理隔离种群制作染色体切片、运用软件测量及制图等原因所致。

3.2 苏丹鱼染色体核型分析

硬骨鱼类的染色体基数为 24 或 25, 经历了染色体加倍事件后, 形成 $2n=48$ 和 $2n=50$ 两种主要核型, 再经倍体化、基因重组、罗伯逊易位等形成现今的多种核型, 鲤科鱼类最原始的核型是 $2n=50$, 核型 $2n=100$ 可能由多倍体演化而来, $2n=48$ 和 $2n=52$ 的类型则通过罗伯逊易位演化而来, 鲃亚科鱼类的原始核型被认为是 $2n=50$ ^[37-38]。本研究结果显示, 苏丹鱼染色体数目为 $2n=50$, 具有鲃亚科的原始核型特征。未发现苏丹鱼存在明显的异形性染色体。苏丹鱼和部分鲃亚科鱼类

的染色体数目和核型公式列于表 5。由表可知, 鲃亚科鱼类的染色体有 $2n=50$ 和 $2n=100$ 两种类型, 说明鲃亚科鱼类的演化主要分为两种方式, 一是通过多倍体化($2n=100$ 、 $2n=96$), 增加染色体数目和体臂数, 提高适应环境变化和演化的能力; 二是通过基因和染色体重组, 减少端部(t)和亚端部(st)着丝粒染色体数量, 相应增加中部(m)和亚中部(sm)着丝粒染色体数量, 从而增加染色体臂数(NF), 增加适应环境变化和演化的能力。李树深^[39]将特定的分类种群下, 端部(t)和亚端部(st)着丝粒染色体较多的类群称为原始类群, 其染色体结构在演化过程中变化不大, 与原始核型较为相似; 中部(m)和亚中部(sm)着丝粒染色体较多的类群称为特化类群, 在演化过程中染色体产生了较大程度的变化。本研究结果表明, 苏丹鱼中部(m)和亚中部(sm)着丝粒染色体数量较多, 属于鲃亚科中的特化类群。小岛吉雄^[40]依据真骨鱼类的系统演化关系, 将真骨鱼类分为低位、中位、高位 3 种演化类群, 端部着丝粒染色体(t)较多、体臂数较少的类群处于系统演化的高位, 反之则处于低位。本研究结果表明苏丹鱼染色体核型为 $2n=16m+28sm+4st+2t$, 中部(m)和亚中部(sm)着丝粒染色体数量较多, 属于典型的低位类群。

表 5 几种鲃亚科鱼类染色体核型的比较

Tab. 5 Comparison of karyotypes of several species in the subfamily Barbidae

物种 species	染色体数目 2n chromosome number	核型公式 karyotype formula	体臂数 NF	NF/2n
光倒刺鲃 <i>Spinibarbus hollandi</i> ^[21]	100	18m+30sm+26st+26t	148	1.48
中华倒刺鲃 <i>Spinibarbus sinensis</i> ^[21]	100	18m+28sm+28st+26t	146	1.46
倒刺鲃 <i>Spinibarbus sinensis</i> ^[41]	100	18m+32sm+26st+24t	150	1.50
大鳞鲃 <i>Luciobarbus capito</i> ^[22]	100	12m+38sm+38st+12t	150	1.50
抚仙金线鲃 <i>Sinocyclocheilus grahami tingi</i> ^[42]	96	20m+32sm+44st	148	1.54
南方白甲鱼 <i>Onychostoma sima</i> ^[19]	50	12m+14sm+12st+12t	76	1.52
云南光唇鱼 <i>Acrossocheilus yunnanensis</i> ^[43]	50	10m+18sm+12st+10t	78	1.56
光唇鱼 <i>Acrossocheilus fasciatus</i> ^[20]	50	14m+16sm+6st+14t	80	1.60
湖四须鲃 <i>Barbodes lacustris</i> ^[44]	50	12m+18sm+20st	80	1.60
银鲃 <i>Puntius gonionotus</i> ^[45]	50	12m+12sm+4st+22t	74	1.48
苏丹鱼 <i>Leptobarbus hoevenii</i>	50	16m+28sm+4st+2t	94	1.88

综上所述, 苏丹鱼在真骨鱼类的系统演化中属于低位类群, 在鲃亚科中属特化类群。

3.3 苏丹鱼 16S rRNA 基因系统进化分析

线粒体 16S rRNA 基因是非编码蛋白质基因, 由于其大部分区域发生的变异为中性突变, 进化速度大于细胞核, 因此, 常被用于鱼类系统进化研究。目前, 已有鲹科(Carangidae)^[46]、鲷亚目(Stromateoidei)^[47]、鲤形目(Cypriniformes)^[48]、南极鱼科(Notothenioidei)^[49]等鱼类线粒体 16S rRNA 基因系统进化分析的相关报道。利用进化速率稳定、结构存在差异的线粒体基因构建进化树, 可直观地反映不同物种的系统发育关系。本研究获得线粒体 16S rRNA 基因片段 592 bp, A、T、G、C 含量分别为 37.5%、19.6%、18.6%、24.3%, A+T 的含量(57.1%)高于 G+C 含量(42.9%), 具有明显的 AT 偏好性。14 种鲃亚科鱼类的 16S rRNA 基因片段中存在 39 个变异位点, 保守位点占比 93.17%, 表明 16S rRNA 基因片段保守性较高, 可应用于鲃亚科系统进化分析。

形态学研究发现鲃亚科的演化途径为四须鲃→二须鲃→无须鲃, 再演化至其他分支, 其中, 四须鲃属是鲃亚科较早分化的种群^[31]。对鲃亚科 11 属 14 种鱼类进行遗传距离分析及系统进化分析, 结果表明: 苏丹鱼和墨脱四须鲃位于系统进化树的基部, 不与其他物种聚类; 结合遗传距离分析, 苏丹鱼、墨脱四须鲃与其余物种的种间遗

传距离分别为 0.090~0.134、0.079~0.130, 大于平均种间遗传距离 0.074。因此, 本研究结果支持形态学上四须鲃属最先分化的观点。同时, 系统进化树结果显示本研究的实验对象苏丹鱼与四须鲃属的亲缘关系较近, 同样属于较早分化的类群, 与形态学上两者均具有四条胡须的特征相符合。

参考文献:

[1] Lim L S, Au H L, Amornsakun T, et al. Sense organs development in larvae of the Sultan fish *Leptobarbus hoevenii*[J]. Fisheries Science, 2022, 88(4): 461-475.

[2] Srithongthum S, Loong A H, Amornsakun T, et al. Yolk-sac absorption, mouth size development, and first exogenous feeding of Sultan fish, *Leptobarbus hoevenii*[J]. AACL Bioflux, 2020, 13(3): 1320-1327.

[3] Srithongthum S, Hsein L A, Amornsakun T, et al. Reproductive characteristics of the pond-farmed Sultan fish (*Leptobarbus hoevenii*)[J]. Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan, 2021, 13(2): 171-180.

[4] Srithongthum S, Au H L, Amornsakun T, et al. Observation on the embryonic development of Sultan fish, *Leptobarbus hoevenii*[J]. AACL Bioflux, 2021, 14(3): 1359-1364.

[5] Au H L, Lim L S, Amornsakun T, et al. Feeding and nutrients requirement of Sultan fish, *Leptobarbus hoevenii*: A review[J]. International Journal of Aquatic Science, 2020, 11(1): 3-28.

[6] Farahiyah I J, Abidin Z, Ahmad A, et al. Optimum protein requirement for the growth of Jelawat fish (*Leptobarbus hoevenii*)[J]. Malaysian Journal of Animal Science, 2017, 20(2): 39-46.

- [7] Yanto H, JUNIANTO J, Rostika R, et al. Different levels of the fermented yellow cornmeal in diets for Jelawat, *Leptobarbus hoevenii*[J]. Nusantara Bioscience, 2017, 9(4): 378-384.
- [8] Srithongthum S, Amornsakun T, Musikarun P, et al. Length-weight relationship and relative condition factor of the Sultan fish, *Leptobarbus hoevenii* broodstock farmed in earthen ponds[J]. Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries, 2020, 24(3): 53-59.
- [9] Lim L S, Amornsakun T, Au H L, et al. Vision-mediated feeding behaviour of early juvenile Sultan fish, *Leptobarbus hoevenii*[J]. Aquaculture Research, 2021, 52(4): 1784-1787.
- [10] Zhu C K, Pan Z J. Progress of karyotype studies on Siluriformes in China[J]. Journal of Fisheries of China, 2022, 46(4): 657-673. [朱传坤, 潘正军. 中国鲇形目鱼类核型研究进展[J]. 水产学报, 2022, 46(4): 657-673.]
- [11] Wang X G, Yu J, Miao Y T, et al. Research progress and prospect of marble goby (*Oxyeleotris marmorata*)[J/OL]. Journal of Fisheries of China: 1-13 [2023-04-28]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1283.S.20230111.1140.002.html>. [王学耕, 余杰, 苗玉涛, 等. 云斑尖塘鳢研究进展与前景展望[J]. 水产学报: 1-13[2023-04-28]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1283.S.20230111.1140.002.html>.]
- [12] Chen S, Tian S Y, Cheng M L, et al. Karyotype analysis of hybrid *Epinephelus awoara* (♀) and *Epinephelus tukula* (♂) progenies and their parents[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2021, 28(8): 988-1000. [陈帅, 田永胜, 成美玲, 等. 青石斑鱼(♀)×蓝身大斑石斑鱼(♂)杂交后代及其父母本群体的染色体核型分析[J]. 中国水产科学, 2021, 28(8): 988-1000.]
- [13] Ma Q, Jiang C, Zhou L Q, et al. Karyotype characteristics of white trevally (*Pseudocaranx dentex*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2021, 28(5): 561-568. [马青, 姜晨, 周丽青, 等. 黄带拟鲹染色体核型特征分析[J]. 中国水产科学, 2021, 28(5): 561-568.]
- [14] Jiang J, Song C, Zhou L Q, et al. Chromosome karyotype and LDH isoenzyme in different tissues of *Coilia nasus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2022, 29(2): 234-244. [蒋俊, 宋超, 周丽青, 等. 刀鲚染色体核型及不同组织中的 LDH 同工酶[J]. 中国水产科学, 2022, 29(2): 234-244.]
- [15] Duan H B, Chen Y H, Dong Z G, et al. Chromosome preparation and karyotype analysis of *Cyclina sinensis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(5): 735-741. [段海宝, 陈义华, 董志国, 等. 青蛤染色体制备及核型分析[J]. 水产学报, 2020, 44(5): 735-741.]
- [16] Feng S L, Ren G L, Gan S S, et al. Chromosome preparation and karyotype analysis of clam *Moerella iridescens*[J]. Fisheries Science, 2022, 41(6): 1052-1056. [冯森磊, 任国梁, 甘树胜, 等. 彩虹明樱蛤染色体制备及核型分析[J]. 水产科学, 2022, 41(6): 1052-1056.]
- [17] Zhang S, Yu S H, Qiu G F. Chromosome and karyotype of the crayfish (*Procambarus clarkii*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2018, 42(10): 1513-1519. [张莎, 俞树惠, 邱高峰. 克氏原螯虾染色体及其核型[J]. 水产学报, 2018, 42(10): 1513-1519.]
- [18] Zhu D F, Wang C L, Li Z Q. Karyotype analysis on *Portunus trituberculatus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2005, 29(5): 67-71. [朱冬发, 王春琳, 李志强. 三疣梭子蟹核型分析[J]. 水产学报, 2005, 29(5): 67-71.]
- [19] Jiang J, Li M Y, Wu E M. Karyotype analysis of *Acrossocheilus fasciatus*[J]. Freshwater Fisheries, 2009, 39(3): 77-79. [蒋进, 李明月, 吴尔苗. 光唇鱼染色体核型分析[J]. 淡水渔业, 2009, 39(3): 77-79.]
- [20] Zou P Z, Zhu B F, Liu Z. Karyotype Analyses of *Spinibarbus hollandi* and *Spinibarbus sinensis*[J]. Fisheries Science, 2006, 25(5): 240-245. [邹佩贞, 朱必凤, 刘主. 光倒刺鲃与中华倒刺鲃染色体组型研究[J]. 水产科学, 2006, 25(5): 240-245.]
- [21] Geng L W, Jiang H F, Xu W. Comparative study on the karyotype of chromosome of *Barbus capito* with two methods[J]. Journal of Fisheries of China, 2018, 42(3): 334-344. [耿龙武, 姜海峰, 徐伟. 两种方法分析大鳞鲃染色体核型的比较研究[J]. 水产学报, 2018, 42(3): 334-344.]
- [22] Zhu X P, Wu G M, Hu H L, et al. The karyotype of *Leptobarbus hoevenii* Bleeker[J]. Hereditas (Beijing), 1990, 12(3): 20-21. [朱新平, 邬国民, 胡红罗, 等. 何氏细鲃鱼染色体组型[J]. 遗传, 1990, 12(3): 20-21.]
- [23] Chen M, Man M H, Xie R L, et al. Molecular phylogenetic relationship of Muraenidae species in China Sea based on 16S rRNA gene sequences[J]. Journal of Fisheries of China, 2022, 46(2): 183-195. [陈铭, 范蔓桦, 谢瑞琳, 等. 基于 16S rRNA 序列探讨我国海鳗科鱼类分子系统进化关系[J]. 水产学报, 2022, 46(2): 183-195.]
- [24] Mao Z C, Duan Y F, Liu P, et al. Sequence comparison in *Parapenaeopsis hardwickii* and its phylogenetic analysis of mtDNA 16S rRNA and CO I gene sequences with genus *Parapenaeopsis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(7): 1006-1017. [毛智超, 段亚飞, 刘萍, 等. 哈氏仿对虾线粒体 16S rRNA 和 CO I 基因的序列比较及其与仿对虾属之间的系统进化分析[J]. 水产学报, 2016, 40(7): 1006-1017.]
- [25] Ma C Y, Ma L B, Ni Y, et al. Phylogenetic relationship of *Thryssa* inferred from morphologic characteristic and mitochondrial 16S rRNA gene sequences[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(3): 471-477. [马春艳, 马凌波, 倪勇, 等. 基于形态特征和线粒体 16S rRNA 基因序列探

- 讨棱鳃属的系统进化[J]. 中国水产科学, 2010, 17(3): 471-477.]
- [26] Zhao J, Liang H W, Sun B, et al. Phylogenetic and species identification analysis on the snakeheads (Channidae) based on the DNA barcoding sequence[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2018, 25(4): 793-802. [赵建, 梁宏伟, 孙博, 等. 基于 DNA 条码基因的鳢科鱼类系统进化与物种鉴定[J]. 中国水产科学, 2018, 25(4): 793-802.]
- [27] Wang K J, Xu Y J, Liu X Z, et al. Species identification and phylogenetic relationships in *Seriola* based on DNA barcoding[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2022, 29(2): 171-183. [王开杰, 徐永江, 柳学周, 等. DNA 条形码在鲷属鱼类物种鉴定和系统进化分析中的适用性[J]. 中国水产科学, 2022, 29(2): 171-183.]
- [28] Chen M, Fan M H, Zhang K X, et al. Molecular phylogenetic relationships of Haemulidae species and related families/genera based on Cyt *b* and AFLP markers[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2021, 28(7): 832-844. [陈铭, 范蔓桦, 张癸新, 等. 基于 Cyt *b* 及 AFLP 标记探讨仿石鲈科及相关科属分子系统进化关系[J]. 中国水产科学, 2021, 28(7): 832-844.]
- [29] An H S, Jee Y J, Min K S, et al. Phylogenetic analysis of six species of Pacific abalone (*Haliotidae*) based on DNA sequences of 16S rRNA and cytochrome C oxidase subunit I mitochondrial genes[J]. Marine Biotechnology, 2005, 7: 373-380.
- [30] Zhu L Q, Zhu Z H, Lin Q, et al. Characteristics and phylogenetic analysis of the mitochondrial genome in *Palaemonidae*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2021, 28(7): 852-862. [朱陇强, 朱志煌, 林琪, 等. 长臂虾科线粒体基因组结构与系统进化分析[J]. 中国水产科学, 2021, 28(7): 852-862.]
- [31] Wu X W. Fauna of Cyprinidae in China II [M]. Shanghai: Shanghai Science & Technology Press, 1982: 229-234. [伍献文. 中国鲤科鱼类志(下卷)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1982: 229-234]
- [32] Yue P Q, et al. Fauna Sinica • Osteichthyes • Cypriniformes III [M]. Beijing: Science Press, 2000: 3-6. [乐佩琦. 中国动物志 • 硬骨鱼纲 • 鲤形目(下卷)[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 3-6.]
- [33] Cui W Y, Zhou L Q, Yang J H, et al. Embryonic development and phylogenetic analysis of *Puntius tetrazona*[J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(8): 1286-1295. [崔文耀, 周丽青, 杨继辉, 等. 四带小鲃胚胎发育及系统进化分析[J]. 水产学报, 2020, 44(8): 1286-1295.]
- [34] Durand J D, Tsigenopoulos C S, Ünlü E, et al. Phylogeny and biogeography of the family Cyprinidae in the Middle East inferred from cytochrome *b* DNA—evolutionary significance of this region[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2002, 22(1): 91-100.
- [35] Li Y Z, Li J, Xu W J, et al. Phylogenetic status of five species of subfamily Barbinae in Lancang River of Jinghong based on partial sequences of 12S rDNA and 16S rDNA[J]. Journal of Yunnan Normal University, 2017, 37(5): 40-45. [李云臻, 李俊, 徐伟江, 等. 基于 12S rDNA 和 16S rDNA 部分序列对澜沧江流域景洪段 5 种鲃亚科(Barbinae)鱼类的进化地位研究[J]. 云南师范大学学报(自然科学版), 2017, 37(5): 40-45.]
- [36] Lin Y H. A PHA injection method *in vivo* for the rapidobtainment of large numbers of metaphase[J]. Journal of Fisheries of China, 1982, 6(3): 201-208. [林义浩. 快速获得大量鱼类肾细胞中期分裂相的 PHA 体内注射法[J]. 水产学报, 1982, 6(3): 201-208.]
- [37] Levan A, Fredga K, Sandberg A A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes[J]. Hereditas, 1964, 52(2): 201-220.
- [38] Kasahara M, Naruse K, Sasaki S, et al. The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution[J]. Nature, 2007, 447(7145): 714-719.
- [39] Li S S. Taxonomy of fish cell[J]. Science Trends of Biology, 1981(2): 8-15. [李树深. 鱼类细胞分类学[J]. 生物科学动态, 1981(2): 8-15.]
- [40] Kojima Y. Fish cytogenetics[M]. Lin Y H, Translation. Guangzhou: Guangdong Science & Technology Press, 1991: 46-63. [小岛吉雄. 鱼类细胞遗传学[M]. 林义浩, 译. 广州: 广东科学技术出版社, 1991: 46-63]
- [41] Gui J F, Li Y C, Li K H, et al. Studies on the karyotypes of Chinese Cyprinid fishes vi. karyotypes of three Tetraploid species in Barbinae and one Tetraploid species in Cyprininae[J]. Journal of Genetics and Genomics, 1985, 12(4): 302-308. [桂建芳, 李渝成, 李康洪, 等. 中国鲤科鱼类染色体组型的研究 vi. 50 亚科 3 种四倍体鱼和鲤亚科 1 种四倍体鱼的核型[J]. 遗传学报, 1985, 12(4): 302-308.]
- [42] Li S S, Wang X F, Li G Z, et al. A karyotypic study of eight species of teleost fish[J]. Hereditas(Beijing), 1983, 5(4): 25-28. [李树深, 王蕊芳, 刘光佐, 等. 八种淡水真骨鱼类的核型研究[J]. 遗传, 1983, 5(4): 25-28.]
- [43] Li Y C, Li K, Jiang J Q, et al. Studies on the karyotypes of Chinese Cyprinid fishes X. karyotypes of five species of Barbinae and four species of Gobioninae[J]. Zoological Research, 1986, 7(2): 183-189. [李渝成, 李康, 蒋建桥, 等. 中国鲤科鱼类染色体组型的研究 X. 鲃亚科五种鱼和鮡亚科四种鱼的染色体组型[J]. 动物学研究, 1986, 7(2): 183-189.]
- [44] Zan R G, Song Z, Liu W G. Studies of karyotypes of seven species of fishes in Barbinae, with a discussion on

- identification of fish polyploid[J]. Zoological Research, 1984, 5(1): 82-90. [胥瑞光, 宋峥, 刘万国. 七种鲃亚科鱼类的染色体组型研究, 兼论鱼类多倍体的判定问题[J]. 动物学研究, 1984, 5(1): 82-90.]
- [45] Wu G M, Zhu X P, Hu H, et al. The karyotype of *Puntius gonionotus*[J]. Chinese Journal of Zoology, 1991, 28(1): 370-372. [邱国民, 朱新平, 胡红, 等. 银鲃的染色体组型[J]. 动物学杂志, 1991, 28(1): 370-372.]
- [46] Wang Z D, Guo Y S, Liu C W, et al. The complete mitochondrial DNA of *Cobia (Rachycentron canadum)* and phylogenetics of Carangoid[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2011, 35(2): 229-237. [王中锋, 郭昱嵩, 刘楚吾, 等. 军曹鱼线粒体 DNA 全序列与鲈鱼宗系的系统进化[J]. 水生生物学报, 2011, 35(2): 229-237.]
- [47] Wu R X, Li C, Liu J. Mitochondrial 16S rRNA sequence variation and molecular phylogenetic relationships of Stromateoidei fishes (Teleostei: Perciformes)[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(1): 16-25. [吴仁协, 李超, 刘静. 鲷亚目鱼类线粒体 16S rRNA 基因序列变异及其分子系统进化关系[J]. 水产学报, 2013, 37(1): 16-25.]
- [48] Li J, Wang X, Kong X, et al. Variation patterns of the mitochondrial 16S rRNA gene with secondary structure constraints and their application to phylogeny of cyprinine fishes (Teleostei: Cypriniformes)[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2008, 47(2): 472-487.
- [49] Near T J, Pesavento J J, Cheng C C. Phylogenetic investigations of Antarctic notothenioid fishes (Perciformes: Notothenioidei) using complete gene sequences of the mitochondrial encoded 16S rRNA[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2004, 32(3): 881-891.

Analysis of chromosome karyotype and phylogenetic evolution on *Leptobarbus hoevenii*

QU Zhaoqiu^{1,2}, MA Yanqun², TANG Zhanyang¹, HUANG Kai², XIAO Jun¹, CHEN Liting¹, HUANG Ting¹, LUO Yongju¹, GUO Zhongbao¹, LI Ming¹, LU Zhuanling¹, GAO Xuemei¹

1. Academy of Fishery Sciences of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China;

2. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China

Abstract: *Leptobarbus hoevenii* is an economically significant fish found in Malossia and worldwide that has been introduced to China owing to its high economic value and good aquaculture prospects. However, the existing culture population has been unselected and degraded in germplasm, generating a need for genetic breeding-related studies on *L. hoevenii*. Since karyotyping and phylogenetic analysis play an important role in the conservation and utilization of fish germplasm resources, the karyotype of *L. hoevenii* was prepared by the chromosome cold-drop method. In order to study the evolutionary and interspecific genetic relationship among 14 species of the Barbinae subfamily, the mitochondrial 16S rRNA gene sequences were compared and used to construct phylogenetic trees. The karyotype results of *L. hoevenii* showed a diploid chromosome number of $2n=50$, containing 8 metacentric (m) chromosomes, 14 submetacentric (sm) chromosomes, 2 subtelocentric (st) chromosomes, and 1 telocentric (t) chromosome. Furthermore, the number of chromosome arms (NF) was 94, revealing the karyotype formula to be $2n=16m+28sm+4st+2t$, $NF=94$. Regarding the comparison of mitochondrial 16S rRNA genes of the 14 Barbidae species, the genetic distances ranged from 0.016 to 0.134, with an average of 0.074. Notably, the interspecific genetic distances between *L. hoevenii* and *Onychostoma barbata* was the largest at 0.134, while that between *L. hoevenii* and *Sikukia stejnegeri* was the smallest at 0.090. Finally, the resulting phylogenetic tree showed that these 14 species were clustered into two respective branches, indicating a closer relationship between *L. hoevenii* and *Barbodes hexagonlepis*. *L. hoevenii* was basal in the phylogenetic tree. These results provide a foundation for the evaluation, breeding, and phyletic evolution of fish germplasm resources.

Key words: *Leptobarbus hoevenii*; chromosome; karyotype analysis; 16S rRNA; phylogenetic analysis

Corresponding author: TANG Zhanyang. E-mail: tangzhanyang123@163.com