

团头鲂同源四倍体、倍间三倍体与二倍体红细胞的形态特征比较

邹曙明, 李思发, 蔡完其, 杨怀宇

(上海水产大学 农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 200090)

摘要: 通过比较同源四倍体、倍间三倍体与二倍体团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)的红细胞、红细胞核的形态大小差异, 探讨不同倍性团头鲂的红细胞形态遗传特征。结果表明: (1) 团头鲂多倍体(同源4n和倍间3n)的红细胞数量显著低于二倍体(2n)团头鲂($P < 0.05$)。其中, 倍间三倍体团头鲂每毫升血液的红细胞数为二倍体的78.95%, 而同源四倍体的红细胞数量下降幅度较大, 仅为2n团头鲂的56.87%。(2) 团头鲂同源四倍体、倍间三倍体的红细胞短径和长径、核短径和长径、红细胞表面积、红细胞体积和核体积均依倍性增加而显著增大($P < 0.05$); 其中, 又以核体积增大最为显著, 同源四倍体、倍间三倍体的核体积分别为2n团头鲂的1.97倍和1.39倍。(3) 团头鲂同源四倍体每毫升血液红细胞的总体积和总表面积, 均明显低于二倍体和倍间三倍体团头鲂($P < 0.05$); 倍间三倍体每毫升血液红细胞的总体积要多于二倍体团头鲂($P < 0.05$), 但红细胞的总表面积在倍间三倍体与二倍体团头鲂间不存在显著差异($P > 0.05$)。(4) 在团头鲂同源四倍体中还观察到一定比例的异常红细胞现象。[中国水产科学, 2006, 13(6): 891-896]

关键词: 团头鲂; 同源四倍体; 倍间三倍体; 红细胞

中图分类号: Q954.6

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2006)06-0891-06

与两栖类、鸟类相似, 鱼类红细胞也有核, 随着染色体倍性增加, 细胞核的大小也成正比增加; 同时, 细胞核与细胞质在细胞中总是维持较稳定的核质比, 当细胞核增大时, 整个红细胞的体积也会随着增大。因此, 在三倍体和四倍体鱼中, 由于染色体的倍性发生变化, 势必会引起细胞和细胞核体积的相应变化。基于此原理, 在多倍体鱼的研究中, 红细胞和核体积的测量已被广泛用来作为倍性鉴定的指标之一^[1-3]。

此外, 鱼类血液中的红细胞具有重要的生理功能, 除了运输 O_2 、 CO_2 和维持血液中的电解质平衡外, 还在细胞代谢、物质运输、信号传导、免疫识别和非特异性免疫方面起着重要的作用^[4]。因此, 倍性增加所引起的红细胞的大小、形态和数量的变化将影响多倍体鱼正常生理功能的发挥, 对其生存能力和养殖性能将产生重要影响。

染色体核型分析表明, 团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)人工同源四倍体含有4套染色体, 倍间三倍体含有3套染色体^[5-6]。本研究对团头鲂同

源四倍体、倍间三倍体鱼与二倍体鱼的红细胞、细胞核的形态大小差异进行了比较, 同时, 探讨大小差异可能造成的生理影响, 旨在进一步阐明团头鲂人工多倍体的细胞、细胞核形态遗传特征与染色体倍性之间的相关关系。

1 材料与方法

1.1 材料

团头鲂人工同源四倍体(同源4n)为2000年采用热休克方式抑制第1次卵裂而产生的^[6]。

倍间三倍体(倍间3n)为团头鲂二倍体(♀) × 同源四倍体(♂)子代。

对照二倍体(2n)为团头鲂“浦江1号”良种^[7-8]。

所有材料均取自上海水产大学南汇水产动物种质试验站, 年龄均为12月龄, 平均体质量约52 g, 养殖环境和模式完全相同, 样本数量为18~30尾。

1.2 红细胞的涂片制备及测量

常规血液涂片, 甲醇固定8 min, Giemsa染色,

收稿日期: 2006-01-19; 修订日期: 2006-04-09。

基金项目: 国家自然科学基金项目(30500382); 国家“十五”科技攻关项目(2001BA505B0514); 上海市科技兴农重点攻关项目; 上海市科技启明星项目(05QMX1446); 上海市重点学科建设项目(Y1101)。

作者简介: 邹曙明(1972-), 男, 副研究员, 博士, 主要从事水产动物种质资源与遗传育种研究。Tel: 021-65710705; E-mail: smzou@shfu.edu.cn

通讯作者: 李思发(1938-), 男, 首席教授, 博导, Tel: 021-65710333; E-mail: lsf038@mail.online.sh.cn

油镜下观察,测量红细胞及其核的长径、短径,每尾鱼均测定 30 个细胞。

红细胞数量、表面积、体积及核体积测量:对幼鱼进行尾静脉抽血($<5\ \mu\text{L}$),采用 Coulter-Counter 颗粒分析仪(Beckman-Coulter Company, USA)进行测量^[9]。

每毫升血液中红细胞的总表面积和红细胞总体积为:单个红细胞表面积或体积的平均值 $\times$ 每毫升血液中红细胞的数量。

1.3 统计分析

采用 t 检验(t -test)检测 2 个组之间的差异显著性, $P<0.05$ 为存在显著性差异, $P>0.05$ 为不存在显著性差异。

2 结果

2.1 红细胞数量和大小

从血涂片上观察(图 1),团头鲂同源四倍体、倍间三倍体和二倍体的红细胞均为有核椭圆形,着色效果相同。

团头鲂同源四倍体、倍间三倍体和二倍体的红细胞数量分别为 $0.886 \times 10^6/\text{mL}$ 、 $1.230 \times 10^6/\text{mL}$ 和 $1.558 \times 10^6/\text{mL}$ (表 1),其中倍间三倍体团头鲂

每毫升血液的红细胞数为二倍体的 78.95%,而同源四倍体的红细胞数量下降幅度最大,仅为二倍体的 56.87%,多倍体的红细胞数量要显著低于二倍体($P<0.05$)。

如表 1 所示,团头鲂同源四倍体、倍间三倍体和二倍体的红细胞长径、短径、核长径、核短径、红细胞表面积、红细胞体积及红细胞核体积均依倍性增加而显著增大($P<0.05$)。在这些指标中,同源四倍体和倍间三倍体的核体积增大最为显著,分别为二倍体的 1.97 倍和 1.39 倍,接近四倍体和三倍体鱼所期望的理论值(2.00 倍和 1.50 倍),通过测量红细胞核体积更能反映出多倍体的倍性关系(表 1)。

在团头鲂同源四倍体、倍间三倍体和二倍体的血液中,红细胞的总体积分别为 $168.9\ \mu\text{m}^3/\text{mL}$ 、 $182.2\ \mu\text{m}^3/\text{mL}$ 和 $168.4\ \mu\text{m}^3/\text{mL}$,倍间三倍体显著高于同源四倍体和二倍体($P<0.05$);血液中红细胞的总表面积分别为 $131.4\ \mu\text{m}^2/\text{mL}$ 、 $154.5\ \mu\text{m}^2/\text{mL}$ 和 $157.7\ \mu\text{m}^2/\text{mL}$,倍间三倍体与二倍体团头鲂间不存在显著差异($P>0.05$),而团头鲂同源四倍体无论在红细胞总体积还是在总表面积指标上,均明显低于二倍体和倍间三倍体团头鲂($P<0.05$)。

表 1 团头鲂同源四倍体、倍间三倍体及二倍体对照的红细胞(核)的测量值

Tab. 1 Measurable parameters of erythrocyte(nuclear) volume of auto-4n, interploid 3n and 2n control

		<i>Megalobrama amblycephala</i>			$\bar{X} \pm \text{SD}$
项目	Item	二倍体(2n) Diploid 2n	倍间三倍体 Interploid 3n	同源四倍体 Auto-4n	
测定尾数	No. of fish	30	30	18	
红细胞数/($\times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$)	RBC	1.558 ± 0.356^a	1.230 ± 0.285^b	0.886 ± 0.254^c	
红细胞长径/ μm	Long diameter of erythrocytes	9.86 ± 1.42^a	10.27 ± 1.23^b	11.89 ± 1.07^c	
红细胞短径/ μm	Short diameter of erythrocytes	5.96 ± 1.14^a	6.27 ± 1.13^b	6.81 ± 1.11^c	
核长径/ μm	Long diameter of erythrocyte nuclei	4.76 ± 0.76^a	5.00 ± 1.10^b	5.31 ± 1.00^c	
核短径/ μm	Short diameter of erythrocyte nuclei	2.76 ± 0.84^a	3.30 ± 0.98^b	3.80 ± 0.81^c	
红细胞表面积/ μm^2	Erythrocyte surface area	101.2 ± 11.3^a	125.6 ± 12.2^b	148.3 ± 11.2^c	
红细胞体积/ μm^3	Erythrocyte volume	108.1 ± 10.4^a	148.1 ± 11.1^b	190.6 ± 11.4^c	
核体积/ μm^3	Erythrocyte nuclear volume	9.4 ± 0.2^a	13.1 ± 1.2^b	18.5 ± 0.4^c	
红细胞总体积/($\mu\text{m}^3 \cdot \text{mL}^{-1}$)	Total erythrocyte volume	168.4^a	182.2^b	168.9^a	
红细胞总表面积/($\mu\text{m}^2 \cdot \text{mL}^{-1}$)	Total erythrocyte surface area	157.7^a	154.5^a	131.4^b	

注:同行数值上标字母不同表示存在显著差异($P<0.05$)。

Note: Values in the same line with different superscripts are significantly different according to the t -test($P<0.05$).

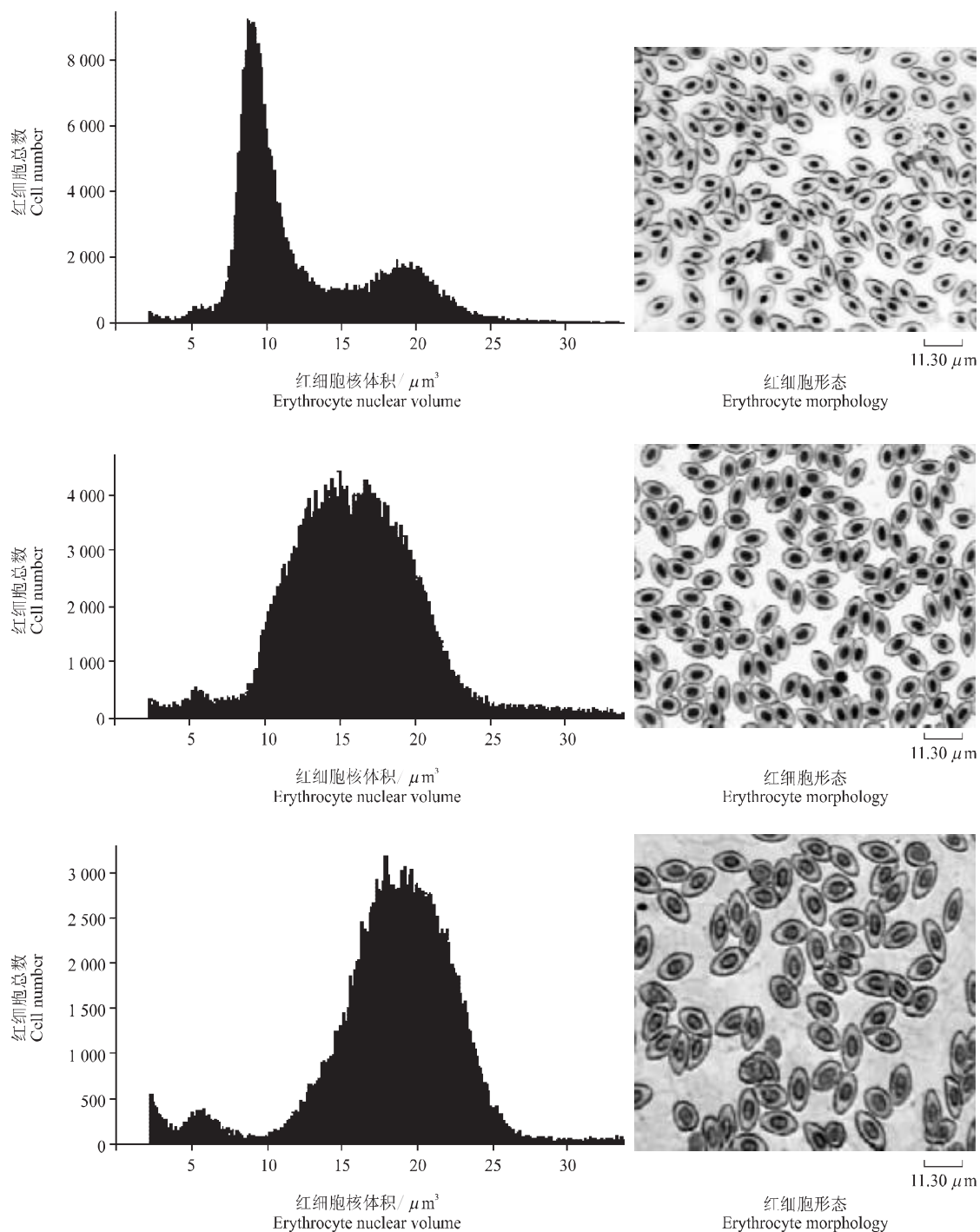


图1 二倍体团头鲂(上图)、倍间三倍体(中图)和同源四倍体(下图)的红细胞核体积(左图)和红细胞形态(右图)
Fig. 1 Erythrocyte nuclear volume (μm^3) and erythrocyte morphology of 2n control (upper), interploidy 3n (middle) and auto-4n (lower) *Megalobrama amblycephala*

2.2 红细胞形态特征

在进行团头鲂四倍体红细胞形态参数测量时,观察到一定比例的异常红细胞,如红细胞外形形态不规则,不对称;胞质凹陷或中间凸起,细胞核偏离中心,存在弯曲变形等异常现象,并发现少量的哑铃状细胞核,如图 2 所示(箭头)。

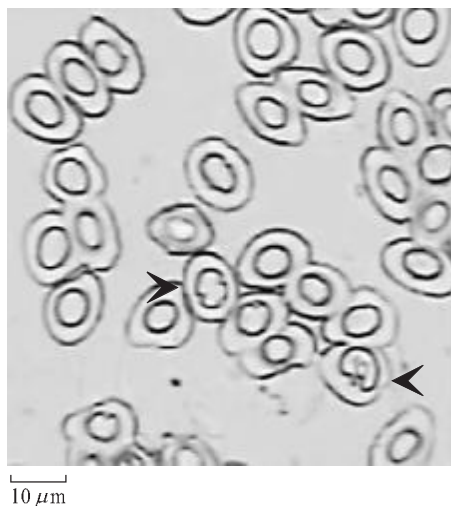


图 2 同源四倍体团头鲂红细胞显微结构(箭头显示哑铃状细胞核)

Fig. 2 Microscopic structure of erythrocyte of auto-tetraploid *Megalobrama amblycephala* (arrows show the dumbbell-abnormal erythrocyte nuclear)

3 讨论

3.1 核体积和红细胞体积

在不同的鱼种类中,二倍体与多倍体的核体积比值存在较大的差异。马涛等^[3]在热休克诱导产生的虹鳟(*Hypophthalmichthys molitrix*)四倍体中发现二倍体虹鳟细胞核体积与四倍体虹鳟细胞核体积的比值为 1: 2.42;朱蓝菲等^[13]在研究人工同源和异源三倍体鲢(*Sliver carp*)时,发现同源三倍体鲢红细胞核体积为二倍体鲢的 1.63 倍,鲢×鳊及鲢×团头鲂异源三倍体红细胞核体积则分别是二倍体的 2.04 倍和 1.85 倍;而俞小牧等^[11]则发现异源四倍体、新四倍体和倍间三倍体白鲫(*Carassius auratus*)的细胞核体积分别是二倍体的 1.83、1.98 和 1.43 倍,接近四倍体和三倍体鱼所期望的理论值 2.00 倍和 1.50 倍。本研究结果显示,团头鲂同源四倍体的核体积约为二倍体的 2 倍,表明通过测量红细胞核

体积能较准确反映出多倍体的倍性。

一般认为,细胞有维持较稳定核质比的趋势,随着染色体数目的增加,其细胞也会同比增大。然而,多倍体的红细胞大小随着种类的不同存在较大的差异^[14],例如在白刺盖太阳鱼(*Phoxinus annularis*)中,二倍体的红细胞体积为 125 μm^3 ,而三倍体的红细胞体积为 156 μm^3 ^[15];另外,二倍体、三倍体、四倍体和五倍体泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)的红细胞长径也分别为 11 μm 、12 μm 、13 μm 及 15 μm ^[16],并未成倍增加。本研究结果显示,团头鲂同源四倍体和倍间三倍体团头鲂的染色体数分别为 96 和 72,是二倍体的 2 倍和 1.5 倍,团头鲂同源四倍体的核体积也约为二倍体的 2 倍,然而,四倍体、倍间三倍体和二倍体的红细胞体积分别为 190.6、148.1 及 108.1,并未依倍性增加而同比例增大。

3.2 红细胞(核)体积的增大对其载氧量的影响

红细胞的总表面积是衡量红细胞携带氧及二氧化碳能力的重要参数之一^[4]。团头鲂同源四倍体、倍间三倍体和二倍体的血液中红细胞的总表面积分别为 131.4 $\mu\text{m}^2/\text{mL}$ 、154.5 $\mu\text{m}^2/\text{mL}$ 及 157.7 $\mu\text{m}^2/\text{mL}$ 。倍间三倍体每毫升血液中红细胞的总表面积与二倍体不存在显著差异,均显著($P < 0.05$)高于团头鲂同源四倍体。这表明,团头鲂倍间三倍体携带氧及二氧化碳能力也应与二倍体无差异。

在四倍体团头鲂中,由于红细胞数量降低幅度太大,其单个细胞血红蛋白含量的增加不足以弥补总量的减少。诱导产生的四倍体团头鲂的运氧能力可能会受到影响,因此,诱导的四倍体在其整个生命过程中,生存力可能会低于正常的二倍体和倍间三倍体。在正常情况下,四倍体团头鲂并不表现出缺氧现象,然而,其应急能力较低,在缺氧状况下的生存能力要低于二倍体。

3.3 红细胞(核)体积的增大对组织或器官的影响

有学者认为,核 DNA 含量的增加会使多倍体鱼类的相应组织或器官增大,如三倍体虹鳟的心脏、血红细胞及表皮都会相应的增大^[1]。也有人认为,多倍体鱼会通过减少细胞数量以保持组织和器官的正常大小。Cassani^[17]报道,在孵化 5 h 和 30 h 后的三倍体草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)仔鱼的细胞总数与二倍体相比分别降低了 27% 和 31%,孵化 5 h 的四倍体仔鱼的细胞总数则降低了 54%;Parsons^[15]测量了二倍体和人工三倍体白刺盖太阳鱼(*Phoxinus annularis*)的心脏质量,表明二倍体和三倍体的

心脏质量均为体质量的0.08%,而二倍体和三倍体鱼的体质量无显著差异,说明心脏细胞数量也减少了。还有学者认为,四倍体鱼类通过复等位基因沉寂,可实现细胞核变小,最终实现二倍化^[18-19]。如Schmidtke等^[20]发现,某些自然拟四倍体鱼类在经过长时间的进化后,尽管仍保留着四倍化的染色体组,但其核糖体基因的数量却成倍降低,最终核仁大小与二倍体接近,其红细胞大小也已与二倍体无差异。

通过红细胞观察,发现团头鲂四倍体和倍间三倍体血液组织中的红细胞数量显著减少,其中倍间三倍体团头鲂每毫升血液的红细胞数为二倍体的78.95%,而同源四倍体的红细胞数量下降幅度最大,仅为二倍体的56.87%。随着团头鲂同源四倍体和倍间三倍体细胞的增大,为保持组织和器官的大小合适,器官和组织中细胞的总量可能也呈减少趋势,至少在血液组织中是如此。

3.4 四倍体红细胞的变异

在鲤鲫异源四倍体^[10]、白鲫(♀)×红鲫(♂)四倍体^[11]及虹鳟^[3,12]中均能观察到一定比例的异常红细胞现象如哑铃状细胞核或双核现象。在测量团头鲂四倍体、倍间三倍体和二倍体鱼红细胞时,在四倍体红细胞中观察到一定比例的异常红细胞,如红细胞外形不规则,不对称;胞质凹陷或中间凸起,胞核偏离中心并弯曲变形等异常现象,并发现少量的哑铃状细胞核。团头鲂四倍体中产生异常红细胞的原因目前尚不能得到充分合理的解释,可能是由于四倍体红细胞存在一些异常有丝分裂,而使得部分红细胞停留在有丝分裂的不同阶段。

致谢:赵金良老师和王成辉老师在实验过程中提供了许多帮助,特此感谢。

参考文献:

- [1] Lou Y D, Purdom C E. Polyploidy induced by hydrostatic pressure in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson[J]. J Fish Biol, 1984, 25: 345-351.
- [2] Liu S, Liu Y, Zhou G, et al. The formation of tetraploid stocks of red crucian carp × common carp hybrids as an effect of interspecific hybridization[J]. Aquaculture, 2001, 192(2-4): 171-186.
- [3] 马涛, 朱才宝, 朱秉仁. 热休克诱导虹鳟四倍体[J]. 水生生物学报, 1987, 11(4): 329-335.
- [4] 施琼芳. 鱼类生理学[M]. 北京: 农业出版社, 1991. 15-25.
- [5] 邹曙明, 李思发, 蔡完其, 等. 团头鲂人工同源四倍体、自繁后代、倍间交配后代的染色体组型及形态遗传特征[J]. 动物学报, 2005, 51(3): 455-461.
- [6] Zou S, Li S, Cai W, Zhao J, et al. Establishment of fertile tetraploid population of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. Aquaculture, 2004, 238: 155-164.
- [7] 李思发, 蔡完其. 团头鲂双向选育研究[J]. 水产学报, 2000, 24(2): 201-205.
- [8] Li S F, Cai W Q. Genetic improvement of the herbivorous blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. NAGA, 2003, 26(1): 20-23.
- [9] Goudie C, Simco B, Davis K, et al. Production of gynogenetic and polyploid catfish by pressure-induced chromosome set manipulation[J]. Aquaculture, 1995, 133: 185-198.
- [10] 刘少军, 孙远东, 周工健. 异源四倍体鲫鲤成熟性腺和红细胞超微结构观察[J]. 自然科学进展, 2003, 13(2): 94-98.
- [11] 俞小牧, 陈敏容, 杨兴棋, 等. 人工诱导异源四倍体和倍间三倍体白鲫的红细胞观察及其相对DNA含量测定[J]. 水生生物学报, 1998, 22(2): 291-295.
- [12] Benfey T J, Sutterlin A M, Thompson R J. Use of erythrocyte measurements to identify triploid salmonids [J]. Can J Fish Aquat Sci, 1984, 41: 980-984.
- [13] 朱蓝菲, 桂建芳. 人工同源和异源三倍体鲢的红细胞观察[J]. 水生生物学报, 1992, 16(1): 84-86.
- [14] Thorgaard G H, Gall G A E. Adult triploids in a rainbow trout family[J]. Genetics, 1979, 93: 961-973.
- [15] Parsons G R. Comparison of diploid and triploid white crappies (*Phoxinus annularis*) [J]. Trans Am Fish Soc, 1993, 122: 237-243.
- [16] Arai K, Matsubara K, Suzuki R. Production of polyploids and viable gynogens using spontaneously occurring tetraploid loach, *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. Aquaculture, 1993, 117: 227-235.
- [17] Cassani J R, Maloney D R, Allaire H P, et al. Problems associated with tetraploid induction and survival in grass carp, *Ctenopharyngodon idella* [J]. Aquaculture, 1990, 88: 273-284.
- [18] Ferris S D, Whitt G S. Loss of duplicate gene expression after polyploidisation [J]. Nature, 1977, 265: 258-260.
- [19] Ludwig A, Belfiore N M, Pitra C, et al. Genome duplication events and functional reduction of ploidy levels in sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*) [J]. Genetics, 2001, 158: 1 203-1 215.
- [20] Schmidtke J, Zenzes M T, Dittes H, et al. Regulation of cell size in fish of tetraploid origin [J]. Nature, 1974, 254: 426-427.

Morphological differences of erythrocyte in autotetraploid, interploid 3n of blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*

ZOU Shu-ming, LI Si-fa, CAI Wan-qi, YANG Huai-yu

(Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecosystem, Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) is herbivorous and is widely favored in China as a delicacy. Since the 1960s, bream has been accepted as a principal species in Chinese freshwater fish polyculture systems. Based on the good breed "Pujiang No. 1" blunt snout bream (selected strain F6), fertile autotetraploid founders have been produced by precise suppression of the first mitotic cleavage of the embryo by thermal shock in 1999. Interploid triploids used in this study were produced by mating tetraploid females with diploid males or by mating diploid females with tetraploid males in 2002 and 2003. In this study, the morphological parameters of erythrocyte and nuclei were compared among autotetraploid, interploid 3n and 2n blunt snout bream. The results show as follows. (1) Polyploids has significantly lower erythrocyte number than 2n control ($P < 0.05$). The erythrocyte number per milliliter blood in interploid 3n and autotetraploid is 78.95% and 56.87% of that of 2n control, respectively, with a sharper decrease in autotetraploid. (2) The long and short diameter of erythrocytes and nuclei, the erythrocyte surface area, and the nuclear and erythrocyte volume in autotetraploid and interploid 3n increase significantly ($P < 0.05$) due to the polyploidy of chromosome sets. Among them, the erythrocyte nuclear volume in autotetraploid and interploid 3n increase extremely, which are as 1.97 and 1.39 times as that of diploids. (3) The values of total erythrocyte volume and total surface area per milliliter blood are significantly ($P < 0.05$) lower in autotetraploid than those in interploid 3n and 2n control. The total erythrocyte volume per milliliter blood in interploid 3n is significantly ($P < 0.05$) higher than that of 2n control, while the total erythrocyte surface area per milliliter blood is not significantly ($P > 0.05$) different between interploid 3n and 2n control. (4) Some abnormal erythrocytes were observed in autotetraploid. Morphological differences of erythrocyte in autotetraploid, interploid 3n may exert positive or negative effects on the survivals and aquacultural performances in these polyploidy fish. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(6): 891–896]

Key words: *Megalobrama amblycephala*; autotetraploid; interploid 3n; erythrocyte

Corresponding author: LI Si-fa. E-mail: lsf038@mail.online.sn.cn