

十三种淡水养殖鱼类的 DNA 含量

范兆廷 尹洪滨 宋苏祥

(中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 哈尔滨 150070)

潘 峰

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 无锡 214081)

摘 要 通过流式细胞仪测定了青鱼等十三种我国主要淡水养殖鱼类外周血红细胞的 DNA 含量。其中青鱼、草鱼、鲢和鳙的 DNA 含量比较接近, 其 2C 值分别为 2.20、2.18、2.18、2.15pg, 四种鱼相比较, 差异不显著。兴国红鲤、镜鲤、荷包红鲤的 DNA 含量也比较接近, 其 2C 值分别为 3.80、3.73、3.76pg。相比较差异也不显著。银鲫的 DNA 含量为 6.09pg/N, 与鲤接近 3:2。尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼的 DNA 含量几乎相等, 分别为 2.27、2.20pg/N。虹鳟、鲟和团头鲂的 DNA 含量分别为 3.47、11.73、2.66pg/N。由 DNA 含量可见这些鱼类的血缘关系。最后讨论了测定鱼类体细胞 DNA 含量的方法等问题。

关键词 鱼类, DNA 含量, 流式细胞仪

脱氧核糖核酸(DNA)是绝大多数生物的遗传物质。染色体或染色质做为生物遗传物质的载体, 承担着对 DNA 的贮存、复制、传递及控制基因的活动, 调节基因的表达等一系列重大生物学功能。一般而言, 为了维持世代间的平衡, 大多数生物的体细胞中所包含的染色体数目和形态都是恒定的。因此, 每个细胞中所含 DNA 的量也基本上是恒定不变的, 所以染色体和 DNA 含量可做为一个物种种质的特征性参数。

早在六十年代, Ohno 和 Atkin[1966]等测定了数种鱼类体细胞的 DNA 含量。后来, 随着细胞显微分光光度技术的发展, 可以大量测定鱼类细胞的 DNA 含量。七十年代开始有人用流式细胞仪(flow cytometry)测定鱼类细胞的 DNA 含量[Kraemer 等, 1972; Tierch 等, 1989]。到目前为止, 用流式细胞仪测定鱼类细胞 DNA 含量的方法已比较完善, 这为鱼类细胞遗传学研究和种质鉴定提供了一个准确有效而又快速简捷的方法。

1 材料与方方法

所用材料的来源及统计资料见表 1。用外周血红细胞作为 DNA 含量的分析材料。

采血前供试鱼暂养于温度为 $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 的充气水族箱内一周以上, 不喂食。选择健康个体, 用加入抗凝剂的注射器采血 0.2—0.5ml, 用低速离心机离心 ($< 500\text{rpm}/\text{min}$), 分离白细胞和红细胞。然后将红细胞用生理盐水充分洗涤后, 经卡诺氏固定液固定送检。

表 1 实验材料的来源

Table 1 Source of materials for analysis DNA contents

种 名	取 样 地 点	体长(cm)
兴国红鲤	上海水产大学南汇试验场引于江西兴国红鲤原种场	18-25
镜 鲤	黑龙江水产研究所松浦试验场	19-30
荷包红鲤	上海水产大学南汇试验场引于江西婺源荷包红鲤原种场	16-20
银 鲫	黑龙江省方正县双风水库	10-18
团头鲂	上海水产大学南汇试验场引于湖北淤泥湖	11-15
青 鱼	长江江苏扬州江段	18-26
草 鱼	同 上	19-28
鲢	长江汉阳江段	17-22
鳙	同上	19-21
尼罗罗非鱼	上海水产大学南汇试验场引于长江水产研究所	12-18
奥利亚罗非鱼	南京水产良种场	11-13
史氏鲟	黑龙江江勤得力江段	18-28
虹 鳟	黑龙江水产研究所渤海水产试验站	28-32

用鸡红血细胞作对照。鸡血细胞是国际上公认的对照标准,但其 DNA 含量又与罗非鱼的含量接近。本实验采用内定标或外定标,内定标将鸡血样处理后按鸡:鱼约 1:3 比例混样待测,外定标则在机器开机稳定后首先测定一个对照鸡样品,每测 5-10 个鱼样品后再测一次鸡血样,如两次之间无误差则数据可靠,否则,重新测定。在测定中机器性能稳定,每次前后测定鸡血样得到的消光值无明显变化,因此对照值准确可信。

固定好的血样及碘化丙啶(propidium iodide)在 4℃避光条件下染色 20 分钟。用美国 Coulter 公司生产的 EPICS V 流式细胞仪(5W 氩离子激光、波长 488nm、检测功率 300mW)测定每一血样。

2 结果与讨论

所测 13 种鱼二倍体体细胞的 DNA 含量列于表 2。这 13 种鱼中的大部分种类国内过去曾有过报道。与本研究相比,大部分结果较接近(表 3),例如,青鱼、草鱼、鲢、鳙和尼罗罗非鱼等。只有个别种类的结果差异较大,造成这一差异的原因,可能是由于使用方法不同所致,尤其是使用显微分光光度计的扫描法,测定材料水解和染色时间、浓度、温度不同,均可造成测量数据的不同,而不同实验室所使用的方法又不同,因此造成的误差也较大。Cui 等[1991]曾报道 42 种中国淡水鱼类的 DNA 含量,其中草鱼与本研究基本一致,其它 41 种鱼与本研究没有交叉。据报道[Kendall 等,1992]鱼类外周血红血球中也存在着细胞周期现象。然而,扫描法无法区分处于不同时相的细胞,所测结果包含了 S 和 G₂ 期甚至 M 期细胞,这样测得的结果必然会存在较大的误差。而流式细胞仪可将测定结果中不同时相的细胞分开统计,并且测定细胞的量也较大,一般可达到扫描法的数百倍,因此,流式细胞仪测定的结果更为准确可靠。

表2 十三种淡水养殖鱼类体细胞的DNA含量

Table 2 The DNA contents of thirteen freshwater fishes

种名	样本数	消光值	对照(鸡)值	鱼鸡比	含量
兴国红鲤	8	223.38±7.66	135.38	1.65±0.07	3.80±0.09
镜鲤	11	218.83±6.17	135.08	1.62±0.05	3.73±0.12
荷包红鲤	3	225.00±11.31	138.04	1.63±0.05	3.76±0.12
银鲫	8	351.13±13.81	132.51	2.65±0.13	6.09±0.30
团头鲂	10	40.38±0.98	35.11	1.15±0.03	2.66±0.06
青鱼	10	34.69±2.92	36.14	0.96±0.03	2.20±0.07
草鱼	9	32.17±1.03	33.86	0.95±0.03	2.18±0.07
鲢	6	32.26±1.01	33.96	0.95±0.03	2.18±0.07
鳙	6	31.34±1.46	33.34	0.94±0.05	2.15±0.11
尼罗罗非鱼	10	37.54±1.23	37.92	0.99±0.03	2.27±0.08
奥利亚罗非鱼	9	34.71±1.39	36.16	0.96±0.04	2.22±0.09
史氏鲟	10	309.90±11.18	61.00	5.10±0.89	11.73±1.15
虹鳟	8	199.88±10.93	132.32	1.51±0.09	3.47±0.21

表3 与其他报道结果比较

Table 3 Comparison with other reports

种名	样本数	含量	鱼鸡比	采用方法	与本结果比	研究者
兴国红鲤	10	3.80	(2.80)	扫描	=	梁峰
镜鲤	28	4.57	1.9872(2.30)	扫描	+1.84	范兆廷等
银鲫	2	7.69	3.3400(2.30)	扫描	+1.60	范兆廷等
团头鲂	5	2.40	0.7447(3.22)	扫描	-0.22	余来宁等
青鱼	5	2.00	0.7125(2.30)	扫描	-0.18	周瞰
草鱼	7	2.06	0.7345(2.80)	扫描	-0.12	董元凯等
草鱼	1	2.18		扫描	=	Cui等
鲢		1.56		流式	-0.62	夏德全
鳙	5	2.07	0.7390(2.80)	扫描	-0.08	周瞰
尼罗罗非鱼	6	2.34	0.8356(2.80)	扫描	+0.07	董元凯等
奥利亚罗非鱼		1.73		流式	-0.49	夏德全

注:表中括号内的数据为鸡对照的标准值

这十三种鱼类分属鲤科、鲢科和鲟鱼科,其中鲤科中又分属鲤亚科、雅罗鱼亚科和鲢鳙亚科。从这些种类的染色体看,青鱼、草鱼、鲢、鳙属于二倍体类群,鲤鲫则属老多倍体;前者染色体数 ≈ 50 ,四种鱼均为 $2n=48$,且其DNA含量比较接近。统计结果表明差异不显著。团头鲂的 $2n=48$, $DNA=2.66pg/N$,略高于青鱼、草鱼、鲢、鳙,虽然同属一科,其染色体数也一致,但从DNA含量上看它们血缘关系是较远的。青鱼、草鱼、鲢、鳙分属二个亚科,但在染色体形态上[范兆廷等,1990;余先觉等,1989]无较大差异,在DNA含量上这种微小差异可能是种间差异的体现,但也不排除测量误差的可能性。各种鲤的染色体数比较稳定, $2n=100$,银鲫 $2n=150\pm$ [范兆廷等,1991]。鲤鲫鱼类所以称为老四倍体(银鲫可能为老六倍体,现有人称为三倍体)是因为他们发生多倍化的年代比较久远,且现已二倍化,他们的DNA含量与染色体数相一致,与二倍体种类比接近成倍增长,但又明显低于理论增长值 $2n=48$, $2C\ DNA=2.10$, $2n$

=100 则 DNA 应为 $2C \text{ DNA} = 4.20$,但实际上只有 3.8 左右, $2n = 160$ $2C \text{ DNA}$ 应为 6.30 左右,而实际为 6.10 左右。这种变异应视为鲤科鱼类经过长期进化多倍化后,原来的二倍体种类和多倍体二倍化过程又都经历了漫长的演化过程,因此,DNA 含量的变异较大。

两种罗非鱼血缘关系非常相近,无论它们的形态、生活习性以及染色体数,甚至染色体形态都非常相似,且它们之间是高度可杂交的。表现在 DNA 含量上,二者也表现出高度的一致,相差仅 0.05pg/N,差异不显著,而这种差异也不能排除是测量误差所致,由此也可证明它们的血缘关系是非常近的。

虹鳟是一种新四倍体鱼类,其 $2n = 56 - 62$ 。关于虹鳟的 DNA 含量国外曾有许多报道,其 DNA 含量为 6.0pg/N[Hinegardner 和 Rosen,1972],这个报道与本研究结果不十分一致,但国外的报道都比较早,测定方法都较原始,用流式细胞仪测定虹鳟的结果,目前还未见报道。

承蒙上海水产大学李思发教授、蔡完其副教授指导本项研究。本文是国家“八五”攻关课题(851501)的部分结果。

参 考 文 献

- [1] 余先觉等,1989. 中国淡水鱼类染色体,33—35. 科学出版社(京).
- [2] 余来宁等,1991. 淤泥湖团头鲂染色体组型和二倍体细胞核 DNA 含量分析. 主要淡水养殖鱼类种质研究,157—162. 中国科学技术出版社(京).
- [3] 范兆廷等,1990. 长江鲢、鳙、草鱼染色体组型. 长江、珠江、黑龙江鲢、鳙、草鱼种质资源研究,102—167. 上海科学技术出版社.
- [4] ——,1991. 银鲫和镜鲤的 DNA 含量及核型. 主要淡水养殖鱼类种质研究,150—156. 中国科学技术出版社.
- [5] 周 敏,1991. 青鱼和鳊鱼的核型及 DNA 含量分析. 主要淡水养殖鱼类种质研究,131—144. 中国科学技术出版社.
- [6] 夏德全,1991. 主要淡水养殖鱼类种质标准参数. 鲢鱼、奥利亚罗非鱼. 主要淡水养殖鱼类种质研究,7—10,31—34. 中国科学技术出版社.
- [7] 董元凯等,1991. 尼罗罗非鱼和草鱼染色体组型与 DNA 含量的研究. 主要淡水养殖鱼类种质研究,163—172. 中国科学技术出版社.
- [8] 梁 峰,1991. 兴国红鲤血细胞核的 DNA 含量测定. 主要淡水养殖鱼类种质研究,173—175. 中国科学技术出版社.
- [9] Cui, J. *et al.*, 1991. Nuclear DNA content variation in fishes. *cytologia*, 56: 425—429.
- [10] Hinegardner, R. and D. E. Rosen, 1972. Cellular DNA content and the evolution of teleostean fishes. *The American Naturalist*, 106: 621—644.
- [11] Kendall, C. *et al.*, 1992. Flow cytometric DNA analysis of nurse shark, *Ginglymostoma cirratum* (Bonaterre) and clearnose skate, *Raja eglanteria* (Bosc) peripheral red blood cells. *J. Fish Biol.*, 41: 123—129.
- [12] Kraemer, P. M. *et al.*, 1972. DNA constancy despite variability in chromosome number. In *Advances in Cells and Molecular Biology*, Vol. 2 (DuPraw, E. J. ed.) 47—108. New York: Academic press.
- [13] Ohno, S. and N. B. Atkin, 1966. Comparative DNA values and chromosome complements of eight species of fishes. *Chromosoma (Berl.)*, 18: 455—466.
- [14] Tierch, T. R. *et al.*, 1989. Reference standards for flow cytometry and application in comparative studies of nuclear DNA content. *Cytometry*, 10: 706—710.

DNA CONTENT FROM THIRTEEN SPECIES OF CULTURED FRESHWATER FISHES IN CHINA

Fan Zhaoting, Yin Hongbin and Song Suxiang

(Heilongjiang River Fishery Research Institute, CAFS, Haerbin 150070)

Pan Feng

(Freshwater Fishery Research Center, CAFS, Wuxi 214081)

ABSTRACT Flow cytometric DNA analysis of peripheral blood cells was used to determine the DNA contents from thirteen species of cultured freshwater fishes in China. The DNA contents of black carp (*Mylopharyngodon piceus*), glass carp (*Ctenopharyngodon idellus*), silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and bighead carp (*Aristichthys nobilis*) were 2.20, 2.18, 2.18 and 2.15pg/N respectively, which showed no significant difference between each two of them. Three common carps, Xinguo red carp (*Cyprinus carpio var singuonesis*), *C. carpio* with mirror carp and *C. carpio* with red colour, almost had the same content, 3.80, 3.73 and 3.76pg/N respectively and no significant difference was observed. Two tilapia (*Sarotherodon niloticus* and *S. aurea*) also had the similar DNA content of 2.27pg/N and 2.22pg/N. The DNA contents from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), amur sturgeon (*Acipenser schrensch*) and blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) were 3.47, 11.73 and 2.66pg/N, respectively. Finally, the determination of systematic relationship of fish species from the DNA contents was suggested.

KEYWORDS fish, DNA content, flow cytometry