

5 种经济鱼类基因组大小的测定

邹远超 符鹏 李骞 吴田 王永明 谢碧文

长江上游鱼类资源保护与利用四川省重点实验室/内江师范学院生命科学学院, 内江 641112

摘要 采用流式细胞术,以鸡(*Gallus gallus*)血细胞 DNA 含量(2.3 pg/2C, C 指单倍体)为标准,对 5 种经济鱼类白甲鱼(*Onychostoma sima*)、三倍体兴国红鲤(triploid *Cyprinus carpio* var. *singunensis*)、胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus*)、中华沙鳅(*Sinibotia superciliaris*)和花鲢(*Hemibarbus maculatus*)的基因组大小(或称 C-值)和倍性进行测定。结果表明,5 种淡水鱼类的 C-值分别为:白甲鱼(1.18±0.01) pg,三倍体兴国红鲤(1.92±0.07) pg,胭脂鱼(2.62±0.28) pg,中华沙鳅(0.89±0.01) pg,花鲢(1.24±0.02) pg, C-值从大到小排列依次为:胭脂鱼>兴国红鲤>花鲢>白甲鱼>中华沙鳅。在 5 种经济鱼类中,除了亲缘关系很近的白甲鱼与花鲢(同一科)的 C-值大小差异不显著外($P>0.05$),其余的种间(不同科)的 C-值大小差异显著。倍性分析结果表明,白甲鱼、花鲢和中华沙鳅属于二倍体,兴国红鲤属于三倍体,胭脂鱼属于四倍体。

关键词 基因组大小; DNA 含量; 流式细胞术

中图分类号 S 917: Q 959.46⁺8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)03-0087-05

基因组大小(又称 C-值),指一个物种单倍体基因组中的 DNA,包含了物种全套染色体的 DNA 总量。在真核生物中,每种物种的单倍体基因组的 DNA 总量是恒定的,因此 C-值可作为每个物种的一个特性参数^[1]。研究 C-值对于物种的分类和系统演化具有十分重要的意义^[2]。DNA 含量和倍性测定的方法较多,主要有紫外吸收法、流式细胞术(flow cytometry, FCM)、二苯胺法等方法^[3]。其中 FCM 以其所需实验材料少、检测快速且结果准确等优点,已成为当前 DNA 含量测定的主要检测方法^[4-6]。目前流式细胞术已广泛运用于水产动物 DNA 含量和倍性检测^[7-11]。

白甲鱼(*Onychostoma sima*),属鲤形目、鲤科、鲃亚科,是长江上游及珠江流域的主要经济鱼类,其生长速度快,适应能力强,味道鲜美^[12]。三倍体兴国红鲤(triploid *Cyprinus carpio* var. *singunensis*)为人工育成品种,属鲤形目、鲤科、鲤属鱼类,其抗逆性强,生长快,已成为科学研究和生产养殖的重要品种^[13]。胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus*),属鲤形目、胭脂鱼科,因其独特的外形而享有“一帆风顺”的美称,为国家二级保护动物,其在生物地理学

和系统分类上具有很高的研究价值^[14]。中华沙鳅(*Sinibotia superciliaris*)为我国长江上游特有鱼类,属鲤形目、鳅科、沙鳅亚科,具有重要的科研价值和经济价值^[15-16]。花鲢(*Hemibarbus maculatus*),属鲤形目、鲤科、鲃亚科,是我国主要淡水水域中常见的一种中小型经济鱼类,也是池塘和水库养殖的一种优良品种^[17]。这 5 种鱼类均属于我国重要的淡水经济鱼类,以营养价值高、肉质鲜美等优点而深受消费者青睐。

本研究以鸡(*Gallus gallus*)红细胞 DNA 含量(2.3 pg/2C, C 指单倍体)为外定标,用流式细胞仪对白甲鱼、兴国红鲤、胭脂鱼、中华沙鳅和花鲢 5 种经济鱼类的基因组大小进行测定,以期鱼类基因组学研究、基因组文库的建立、种质鉴定和杂交育种提供科学资料。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用白甲鱼和胭脂鱼采自长江上游宜宾江段,中华沙鳅和花鲢采自沱江资中江段,三倍体兴国红鲤来自内江兴盛水产繁殖公司。采集的样本均

收稿日期: 2017-10-09

基金项目:四川省科技厅应用基础项目(2015JY0262);四川省教育厅重点项目(15ZA0285);四川省大学生创新项目(16NSD-47, 201710640023)

邹远超,博士,副教授。研究方向:鱼类遗传育种及种质资源保护。E-mail: zou3891@163.com

为健康状况良好的个体,每种鱼各采样 5 尾,5 种经济鱼类的体长与体质量等生物学数据见表 1。

1.2 方法

1) 红细胞的制备。用 1 mL 注射器(1%肝素钠浸润过)从试验鱼尾静脉采血 0.3~0.6 mL,随后加入到 1.5 mL 的离心管中(内含 1 mL 磷酸缓冲液, pH 7.4),低速(800 r/min)离心 5 min,0.05 mm 孔径的筛网过滤收集红细胞。

2) 细胞的固定和染色。迅速加入 3 mL 磷酸盐

缓冲液(PBS)洗涤 2 次,随后离心(800 r/min, 5 min)去除 PBS,缓慢加入预冷的乙醇固定,使乙醇终质量分数为 70%。4 °C 冰箱固定保存。离心去除固定液,3 mL PBS 重悬 5 min。加入 1 mL DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole,4',6-二脒基-2-苯基吡啶)染液,4 °C 避光染色 1 min,选择国际上公认的公鸡(*Gallus gallus*)红细胞 DNA 含量(2.3 pg/2C,C 指单倍体)作为外参,对 5 种鱼类的基因组大小进行测定。

表 1 5 种经济鱼类的体长与体质量

Table 1 Body length and body weight of five commercial fishes

种名 Species	样品数 Sample number	全长/mm Total length	体长/mm Body length	体质量/g Body weight
白甲鱼 <i>Onychostoma sima</i>	5	243.8±12.9	203.5±10.4	153.20±5.42
三倍体兴国红鲤 <i>Triploid Carpio var. singuonensis</i>	5	253.8±10.8	213.5±8.5	247.51±8.64
胭脂鱼 <i>Myxocyprinus asiaticus</i>	5	175.3±8.6	140.6±5.1	88.59±3.68
中华沙鳅 <i>Sinibotia superciliaris</i>	5	110.3±3.8	95.6±3.2	24.82±2.48
花鲢 <i>Hemibarbus maculatus</i>	5	128.4±4.2	95.3±3.6	32.59±3.74

3) 基因组大小测定和数据分析。使用 Beckman Coulter,CytoFlex(USA)流式细胞仪进行基因组大小的测定。样品用 0.05 mm 孔径的筛网过滤,每种鱼检测的细胞总数 > 10⁴ 个。测量所得的数据和图像由计算机进行处理分析。鱼类的基因组大小依照以下公式计算: $P_2 = P_1 \times E_2 / E_1$,式中: P_1 为标准鸡血细胞 DNA 含量(1.15 pg/C), P_2 表示待测鱼类 DNA 含量,单位为 pg/C, E_1 表示鸡红细胞荧光强度, E_2 表示待测鱼类红细胞荧光强度。

采用 Excel 2010 软件对所有实验数据进行统计、处理和分析。统计数值使用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示,采用 t 检验分析 5 种鱼血细胞 C-值含量差异,差异显著性水平设置为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 5 种经济鱼类基因组大小

以鸡的血细胞作为参照标准,采用流式细胞仪测定 5 种经济鱼类的基因组大小,所得的检测图像如图 1 所示。其测定的结果显示(表 2),胭脂鱼的 C-值最大,为(2.62±0.28) pg,中华沙鳅的 C-值最小,为(0.89±0.01) pg,而亲缘关系很近的白甲鱼与花鲢(同一科)的 C-值大小分别为(1.18±0.01) pg 和(1.24±0.02) pg, C-值大小差异不显著($P > 0.05$),其余的种间(不同科)的 C-值大小差异显著($P < 0.05$)。5 种经济鱼类的基因组从大到小排列依次为:胭脂鱼 > 三倍体兴国红鲤 > 花鲢 > 白

甲鱼 > 中华沙鳅。

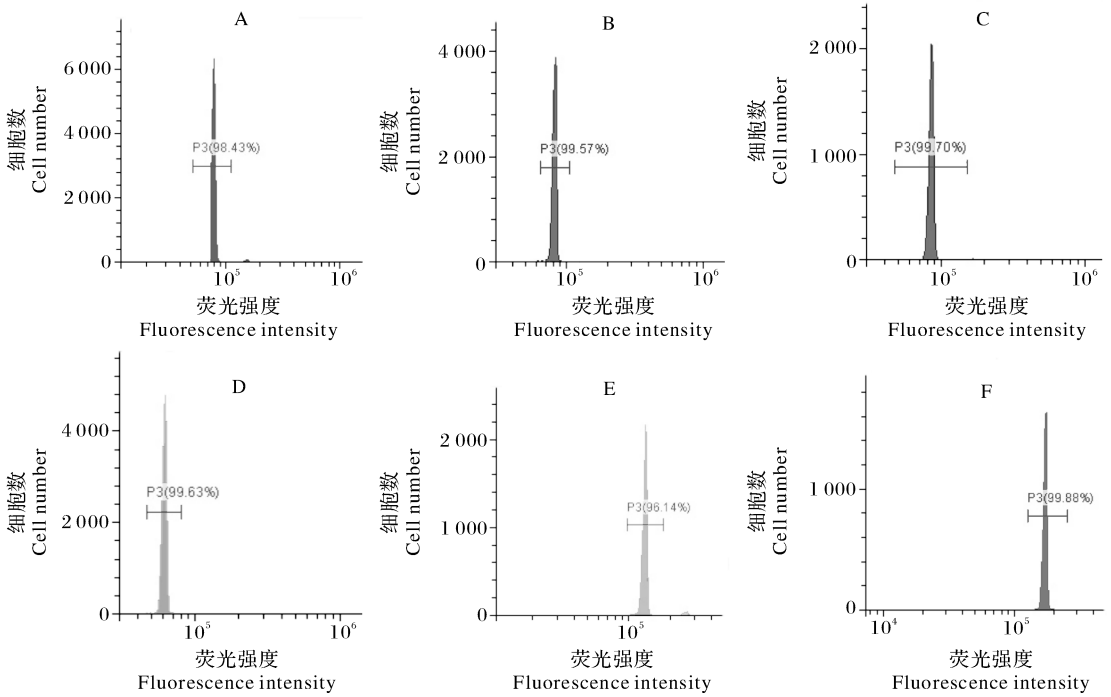
2.2 倍性分析

由表 3 可知,白甲鱼、三倍体兴国红鲤、胭脂鱼、中华沙鳅和花鲢与鸡红细胞的荧光强度比值分别为 1.03±0.01、1.67±0.03、2.28±0.11、0.77±0.07 和 1.08±0.01,可知白甲鱼、花鲢和中华沙鳅均为二倍体,兴国红鲤为三倍体,胭脂鱼为四倍体。

3 讨论

目前,已有 2 000 多种鱼类的基因组大小数据可供查阅^[20]。然而,在许多试验中采用的对照标准和测定方法不尽相同,用虹鳟红细胞(*Oncorhynchus mykiss*)^[1]及人的淋巴细胞(3.50 pg/C)^[9]作为参照,所得结果难于进行比较。本研究以国际通用的鸡血细胞作为对照标准,采用公认的流式细胞术,故本试验所得结果具有较好的可比性和参考价值。据此建议,今后在开展鱼类 DNA 含量测定时,最好采取统一的规范:以 DAPI 作为荧光染料,鸡血细胞作为对照,采用流式细胞术进行检测,以此规范鱼类基因组大小和倍性检测工作。

本研究采用流式细胞术测定了 5 种经济鱼类的单倍体 DNA 含量。在 5 种经济鱼类中,除了亲缘关系很近的白甲鱼与花鲢(同一科)的 C-值大小差异不显著外($P > 0.05$),其余的种间(不同科)的 C-值大小差异显著($P < 0.05$)。由此可见,DNA 含量与鱼类的亲缘关系有一定的相关性。由于每一种生



A:鸡; B:白甲鱼; C:花骨; D:中华沙鳅; E:三倍体兴国红鲤; F:胭脂鱼 A:*Gallusgallus*; B:*Onychostoma sima*; C:*Hemibarbus maculatus*; D:*Sinibotia superciliaris*; E:Triplod *Cyprinus carpio* var. *singuonensis*; F:*Myxocyprinus asiaticus*.

图1 鸡血细胞(A)和5种经济鱼类的DNA相对含量

Fig.1 DNA relative content of standard chicken erythrocytes(A)and five fishes samples

表2 5种重要经济鱼类的C-值测定结果

Table 2 Result of C-value of five commercial fishes

纲 Class	目 Order	科 Family	种名 Species	样品数 Sample number	染色体数 Chromosome number	C-值($\bar{x} \pm SD$)/pg C-value
硬骨鱼纲 Osteichthyes	鲤形目 Cypriniforme	鲤科、鲃亚科 Cyprinidae, Barbinae	白甲鱼 <i>Onychostoma sima</i>	5	2n=50 ^[18]	1.18±0.01
		鲤科 Cyprinidae	三倍体兴国红鲤 Triplod <i>Carpio</i> var. <i>singuonensis</i>	5	3n=150 ^[13]	1.92±0.07
		胭脂鱼科 Catostomidae	胭脂鱼 <i>Myxocyprinus asiaticus</i>	5	2n=100 ^[19]	2.62±0.28
		鳅科、沙鳅亚科 Cobitidae, Botiinae	中华沙鳅 <i>Sinibotia superciliaris</i>	5	2n=96 ^[16]	0.89±0.01
		鲤科、鲃亚科 Cyprinidae, Gobioninae	花骨 <i>Hemibarbus maculatus</i>	5	2n=50 ^[10,17]	1.24±0.02

表3 5种经济鱼类的荧光值比及倍性

Table 3 Fluorescence intensity and ploidy of five commercial fishes

物种名 Species	样本数 Sample number	荧光强度值($\bar{x} \pm SD$) Fluorescence intensity	荧光值比(鱼/鸡) Ratio of (fish/chicken)	倍性 Ploidy
鸡 <i>Gallusgallus</i>	5	78 540.35±579.90	—	2
白甲鱼 <i>Onychostoma sima</i>	5	81 289.46±685.48	1.03±0.01	2
三倍体兴国红鲤 Triplod <i>Carpio</i> var. <i>singuonensis</i>	5	132 418.38±2 883.72	1.67±0.03	3
胭脂鱼 <i>Myxocyprinus asiaticus</i>	5	179 224.65±7 971.21	2.28±0.11	4
中华沙鳅 <i>Simibotia superciliaris</i>	5	60 977.38±462.85	0.77±0.07	2
花骨 <i>Hemibarbus maculatus</i>	5	84 740.31±798.61	1.08±0.01	2

物体内的 DNA 含量一般是恒定的,因此,DNA 含量可作为物种种质鉴定和遗传变异研究时的一个重要参数。

有研究表明,鱼类基因组大小与相应的染色体数目之间存在着显著的正相关性^[21-23],即染色体数目越多,其基因组相对越大。本研究结果总体符合此趋势,如胭脂鱼染色体数目($2n=100$)和三倍体兴国红鲤的染色体数目($3n=150$)相对于其他 3 种鱼类的染色体数目大,所对应的 C-值也比较大,符合染色体数目与 C-值成正相关的总体趋势。但中华沙鳅则比较特殊,其染色体数目($2n=96$)虽多于花鲢($2n=50$)和白甲鱼($2n=50$),测定结果显示其基因组却反而更小,不存在正相关性。产生这一结果的原因可能由于物种 C-值的增加,往往体现在 DNA 复制过程中重复序列 DNA 比例的增加^[24],而染色体数目的变动则大都与细胞有丝分裂时的着丝点融合、倒位,大染色体的断裂,罗伯逊易位以及多倍体有关^[25]。因此可以认为,鱼类基因组大小差异存在着复杂性,并不完全与染色体数目相关,但能够认同的是 DNA 含量较大差异的变化趋势与染色体数目存在正相关性。

关于 DNA 含量与鱼类进化地位的关系,大量研究表明,鱼类进化地位越高的物种,其 DNA 含量越少,其 C-值越小^[2,26-27]。本研究所测的沙鳅亚科鱼类中华沙鳅的 DNA 含量最少,其 C-值也最小,进化地位最高,这与岳兴建等^[16]的研究结果一致。而同为鲤形目中的胭脂鱼的 DNA 含量和 C-值均最高,进化地位较为原始。这一研究结果与祝东梅等^[19]的研究结果一致。在动物中,这种关系在爬行类和鸟类的某些分类水平上也存在^[28]。高静等^[9]研究认为,产生这一现象的原因可能是,在动物进化过程中其进化地位越高,其生物体具有 DNA 含量就越多,它的基因组组成更加简约。

随着当前水产养殖业的不断发展,许多重要经济养殖鱼类基因组的研究得到重视。测定鱼类的基因组大小,不仅可以补充该物种的细胞遗传学资料,而且也有利于鱼类基因组学及基因组进化研究。本研究采用流式细胞术,测定了 5 种经济鱼类的基因组大小,不仅为养殖鱼类的杂交育种提供基础资料,也为即将开展的经济鱼类全基因组测序工作提供必要的技术支持。

参 考 文 献

[1] ALFEI L, CAVALLO D, ELEUTERI P, et al. Nuclear DNA

content in *Salmo fibreni* in Lake Posta Fibreno, Italy[J]. Journal of fish biology, 1996, 48(6): 1051-1058.

- [2] FILIPIAK M, TYLKO G, KILARSKI W. Flow cytometric determination of genome size in European sunbleak *Leuciscus dulineatus* (Heckel, 1843) [J]. Fish physiology and biochemistry, 2012, 38(2): 355-362.
- [3] 金秀国, 方国安, 刘波. 流式细胞术 DNA 分析影响因素探讨[J]. 检验医学, 2000, 15(3): 151, 148.
- [4] JOHNSON O W, UTTER F M, RABINOVITCH P S. Interspecies differences in salmonid cellular DNA content identified by flow cytometry[J]. Copeia, 1987(4): 1001-1009.
- [5] 刘少军, 赵如榕, 刘锦辉, 等. 不同倍性鱼的血细胞和精子 DNA 含量比较[J]. 动物学报, 2005, 5(2): 360-364.
- [6] 吴雅琴, 常瑞丰, 程和禾. 流式细胞术进行倍性分析的原理和方法[J]. 云南农业大学学报, 2006, 21(4): 407-409.
- [7] 赵书涛, 武晓东, 王策, 等. 流式细胞仪的原理、应用及最新进展[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(22): 4378-4381.
- [8] 许红霞, 杨学芬, 杨瑞斌. 梁子湖中华沙塘鳢染色体核型和核 DNA 含量[J]. 华中农业大学学报, 2017, 36(1): 93-97.
- [9] 高静, 黄晓红, 曾华嵩, 等. 中国 6 种经济鱼类的基因组大小测定[J]. 中国水产科学, 2010, 17(4): 689-694.
- [10] 顾若波, 徐钢春, 闻海波, 等. 花骨鱼染色体组型分析及细胞核 DNA 含量的测定[J]. 广东海洋大学学报, 2008, 28(1): 11-14.
- [11] 宋苏祥, 刘洪柏, 孙大江, 等. 施氏鲟的核型及 DNA 含量研究[J]. 遗传, 1997, 19(3): 5-8.
- [12] 周兴华, 郑曙明, 吴青, 等. 白甲鱼肌肉营养成分与品质的评价[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2007, 29(8): 123-128.
- [13] 洪一江, 胡成钰. 人工诱导兴国红鲤三倍体最佳诱导条件的研究[J]. 动物学杂志, 2000, 35(4): 2-4.
- [14] 张春光, 赵亚辉, 康景贵. 我国胭脂鱼资源现状及其资源恢复途径的探讨[J]. 自然资源学报, 2000, 15(2): 155-159.
- [15] 陈景星. 中国沙鳅亚科鱼类系统分类的研究[J]. 动物学研究, 1980, 1(1): 2-7.
- [16] 岳兴建, 邹远超, 刘佳佳, 等. 中华沙鳅染色体核型[J]. 四川动物, 2013, 32(3): 385-388.
- [17] 李均祥. 花骨鱼染色体核型的研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(31): 13658-13659.
- [18] 任修海, 崔建勋, 余其兴. 中国鲤科鱼类染色体核仁组织区研究[J]. 武汉大学学报(自然科学版), 1996, 42(4): 475-480.
- [19] 祝东梅, 杨坤, 王卫民, 等. 中国胭脂鱼的细胞遗传学分析[J]. 中国水产科学, 2013, 20(3): 682-688.
- [20] GREGORY T R. Animal genome sizedatabase[DB/OL]. [2019-10-09]. <http://www.genomesize.com>. 2012.
- [21] HICKEY A J R, CLEMENTS K D. Genome size evolution in New Zealand Triplefin fishes[J]. J Hered, 2005, 96(4): 356-362.
- [22] VENKATESH B. Evolution and diversity of fish genomes[J]. Current opinion in genetics & development, 2003, 13(6): 588-592.
- [23] 陈淑芬, 汤泽生. 脊椎动物染色体数目及其变化趋势[J]. 四川师范学院学报, 1997, 18(1): 18-23.
- [24] 吴清江, 桂建芳. 鱼类遗传育种工程[M]. 上海: 上海科学技术出

版社,1999:178-205.

[25] 邹远超,袁佳玲,符鹏,等.宽体沙鳅的染色体核型与 DNA 含量分析[J].动物学杂志,2017,52(3):441-448.

[26] HINEGARDNER R,ROSEN D E.Cellular DNA content and the evolution of teleostean fishes[J].American naturalis,1972,106:621-644.

[27] GRIFFITH O L,MOODIE G E,CIVETTA A.Genome size and longevity in fish[J].Experimental gerontology,2003,38(3):333-337.

[28] VINOGRADOV A E.Nucleotypic effect in homeotherm:body-mass corrected basal metabolic rate of mammals is related to genome size[J].Evolution,1995,49:1249-1259.

Genome size determination of five commercial fishes

ZOU Yuanchao FU Peng LI Qian WU Tian WANG Yongming XIE Biwen

Conservation and Utilization of Fishes Resources in the Upper Reaches of the Yangtze River Key Laboratory of Sichuan Province/College of Life Sciences, Neijiang Normal University, Neijiang 641112, China

Abstract In this paper, the genome size (*C*-value) and ploidy of 5 commercial fishes including *Onychostoma sima*, triploid *Cyprinus carpio* var. *singuonensis*, *Myxocyprinus asiaticus*, *Sinibotia superciliarisa* and *Hemibarbus maculatus* were determined by flow cytometry using chicken erythrocyte DNA content as a standard. The results showed that the *C*-values of *O. sima*, triploid *C. carpio* var. *singuonensis*, *M. asiaticus*, *S. superciliarisa* and *H. maculatus* were 1.18 ± 0.01 pg, 1.92 ± 0.07 pg, 2.62 ± 0.28 pg, 0.89 ± 0.01 pg and 1.24 ± 0.02 pg, respectively. The *C*-value of *M. asiaticus* was the largest, followed by triploid *C. carpio* var. *singuonensis*, *H. maculatus*, *O. sima* and *S. superciliarisa*. Among the 5 economic fishes, there is no difference in *C*-values between *O. sima* and *H. maculatus* (the same family) ($P > 0.05$), but the difference between the other species (different families) was significant ($P < 0.05$). Ploidy analysis showed that *O. sima*, *S. superciliarisa* and *H. maculatus* were diploid, *C. carpio* var. *singuonensis* was triploid and *M. asiaticus* was tetraploid.

Keywords genome size; DNA content; flow cytometry

(责任编辑:边书京)