

斑鳢、乌鳢及其杂种细胞核 DNA 流式含量分析

段爱丽^{①②} 陈昆慈^① 张新铖^① 李伟^{①②} 朱阿莉^{①③} 洪孝友^① 朱新平^{①②*}

① 中国水产科学研究院珠江水产研究所 农业部水产资源利用与养殖重点实验室 广州 510380;

② 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; ③ 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心 无锡 214081

摘要: 以斑鳢 (*Channa maculata*)、乌鳢 (*C. argus*) 及其正交杂种斑乌鳢 (斑鳢 ♀ × 乌鳢 ♂) 和反交杂种乌斑鳢 (乌鳢 ♀ × 斑鳢 ♂) 的红细胞为材料, 以鸡 (*Gallus gallus*) 血细胞为 DNA 标准 (2.5 pg/2c, 2c 指 2 倍体), 采用流式细胞仪测定了这 4 种鱼的细胞核 DNA 含量。斑鳢、乌鳢、斑乌鳢及乌斑鳢这 4 种鱼血细胞 DNA 的绝对含量分别为 (1.488 ± 0.035) pg/2c、(1.489 ± 0.034) pg/2c、(1.522 ± 0.077) pg/2c 和 (1.520 ± 0.033) pg/2c。斑鳢和乌鳢的细胞核 DNA 含量差异不显著 ($P > 0.05$), 斑鳢和乌鳢与两种杂交鳢的 DNA 含量差异显著 ($P < 0.05$), 两种杂交鳢之间的细胞核 DNA 含量差异不显著 ($P > 0.05$)。杂交鳢细胞核 DNA 含量显著高于亲本, 可以作为杂种鉴定的依据。

关键词: 斑鳢; 乌鳢; 杂种; 流式细胞术; DNA 含量

中图分类号: Q952 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2014)01-46-05

Cellular DNA Contents of *Channa maculata*, *C. argus* and Their Reciprocal Hybrids Determined by Flow Cytometry

DUAN Ai-Li^{①②} CHEN Kun-Ci^① ZHANG Xin-Cheng^① LI Wei^{①②}
ZHU A-Li^{①③} HONG Xiao-You^① ZHU Xin-Ping^{①②*}

① Key Laboratory of Tropical and Subtropical Fishery Resource Application and Cultivation of Ministry of Agriculture, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380;

② College of Life Science and Fisheries, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;

③ Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081

Abstract: The cellular DNA contents of *Channa maculata*, *C. argus* and their reciprocal hybrids (*C. maculata* ♀ × *C. argus* ♂, *C. argus* ♀ × *C. maculata* ♂) were assayed by using a flow cytometer with the DNA of chicken red blood cells (2.5 pg/2c, 2c; diploid) as a standard. The DNA contents of the 4 species of fish are 1.488 ± 0.035 pg/2c (*C. maculata* ♀), 1.489 ± 0.034 pg/2c (*C. argus* ♂), 1.522 ± 0.077 pg/2c (*C. maculata* ♀ × *C. argus* ♂), and 1.520 ± 0.033 pg/2c (*C. argus* ♀ × *C. maculata* ♂) respectively. Comparing the DNA contents of the 4 species of fish, it was showed that there was no significant difference between *C. maculata* and *C. argus* ($P > 0.05$), and the similar result was obtained between their reciprocal hybrids ($P > 0.05$), but there was significant difference between reciprocal hybrids and their parents ($P < 0.05$). The DNA contents of the reciprocal hybrids are more than those of their parents, which may be used for hybrid identification.

基金项目 国家科技支撑计划课题 (No. 2012BAD26B03), 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (No. 200903045);

* 通讯作者, E-mail: zhuxinping_1964@163.com;

第一作者介绍 段爱丽, 女, 硕士研究生; 研究方向: 鱼类遗传育种; E-mail: duanal0520@126.com.

收稿日期: 2013-06-06, **修回日期:** 2013-10-31

Key words: *Channa maculata*; *C. argus*; Reciprocal hybrids; Flow cytometry; DNA contents

斑鳢 (*Channa maculata*) 和乌鳢 (*C. argus*) 同属于鲈形目 (Perciformes) 鳢科 (Channidae) 鳢属 (陈湘彝等 1990), 斑鳢分布于珠江水系和海南省各水系, 而乌鳢主要分布于长江及长江以北各水系, 两者都具有适应性强、生长速度快、出水后不易死亡等特点, 且肉质细嫩、少刺、营养丰富 (刘苏等 2011a)。斑乌鳢 (斑鳢 ♀ × 乌鳢 ♂) 是以斑鳢为母本、乌鳢为父本杂交获得的子一代, 而乌斑鳢 (乌鳢 ♀ × 斑鳢 ♂) 则是以乌鳢为母本、斑鳢为父本杂交获得的子一代, 两种组合的杂交后代在生产上均表现出生长快、抗逆性强、产量高等特点, 具有明显的杂种优势。

斑鳢、乌鳢及其杂交种, 形态特征比较接近, 特别是在幼鱼期, 难以区别, 容易造成种质混杂, 对生产养殖造成不利影响。而对于同一物种来说, 细胞内 DNA 含量是一定的, 这可用于鉴定不同的物种。斑鳢、乌鳢及其正反交子代的细胞核 DNA 含量测定的研究尚未见报道, 我们通过流式细胞仪对这 4 种鱼的细胞核 DNA 含量进行了测定, 旨在了解和比较分析 4 种鱼的细胞核 DNA 含量, 以期为种质鉴定提供依据。流式细胞术可以快速准确地测量细胞的 DNA 含量, 在水生生物中多用于 DNA 含量以及倍性方面的研究。通过流式细胞术, 对黄喉拟水龟 (*Mauremys mutica*) (朱新平等 2004)、刀额新对虾 (*Metapenaeus ensis*) (张晓军等 2002)、太湖似刺鲃 (*Paracanthobrama guichenoti*) (顾若波等 2009) 的细胞核 DNA 含量做了相应的分析。本实验通过分析斑鳢、乌鳢、斑乌鳢与乌斑鳢细胞核 DNA 含量, 希望能为鳢科鱼类种质标准和杂种鉴定提供科学数据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料 斑鳢、乌鳢、斑乌鳢 (正交)、乌斑鳢 (反交) 于 2012 年 11 月取自广东省中山市三角镇裕荣水产苗种繁殖场, 4 种鱼各随机取样 15 尾, 体质量范围 321.6 ~ 675.4 g, 体

长范围 26.9 ~ 32.6 cm, 样本在珠江水产研究所分池暂养。

1.2 仪器与试剂 所用流式细胞仪为 Beckman Coulter Quanta SC (美国贝克曼库尔特公司), 检测试剂为 Coulter DNA Prep Reagent kit (美国贝克曼库尔特公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 样品制备 对 4 种鱼的每个样本进行尾静脉取血, 肝素抗凝。DNA Prep LPR 试剂 37℃ 恒温水浴 10 min 后, 取 30 μ l 置于 1.5 ml 离心管中, 迅速加 1 μ l 鱼血样, 摇匀, 室温裂解 1 min (裂解是让裂解液在细胞膜和核膜上穿孔, 以利于 PI 染料与 DNA 结合)。加入 300 μ l DNA Prep Stain 试剂室温避光染色 (PI 染色) 20 min, 参照系公鸡 (*Gallus gallus*) 血样取自健康公鸡翅膀下静脉, 其他处理方式同鱼血。

1.3.2 样品测定 用内标法测定。取染色后的参照系鸡血和鱼血样各取 150 μ l 放入同一样品杯中, 然后加入 800 μ l 鞘液稀释, 混匀后上机检测, 流速控制在 100 ~ 200 个细胞/s, 每次检测 10 000 个细胞, 每个样本检测 3 次。22 mw 激光, 激发波长 488 nm, 接收波长为 620 nm。比较 4 种鱼血红细胞与鸡血细胞的 2 倍体峰相对位置, 根据 PI 的平均荧光密度值, 以鸡血细胞的 DNA 含量 2.5 pg/2c (2c 指 2 倍体) 为标准, 则每尾鱼样本的细胞核 DNA 含量 = 2.5 × 样本平均 PI 荧光密度值 / 鸡血平均 PI 荧光密度值。实验过程控制实验室室温恒定 20℃。

1.3.3 数据分析 实验数据用 Excel 2003 进行处理, 利用 SPSS19.0 的单因素方差分析, 并采用 Turkeys 法多重比较分析, 比较斑鳢、乌鳢以及正反交杂种这 4 种鱼血细胞 DNA 含量差异, 差异显著性水平设置为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

斑鳢、乌鳢、斑乌鳢及乌斑鳢 4 种鱼血细胞与鸡血细胞 2 倍体峰的相对位置见图 1。以鸡

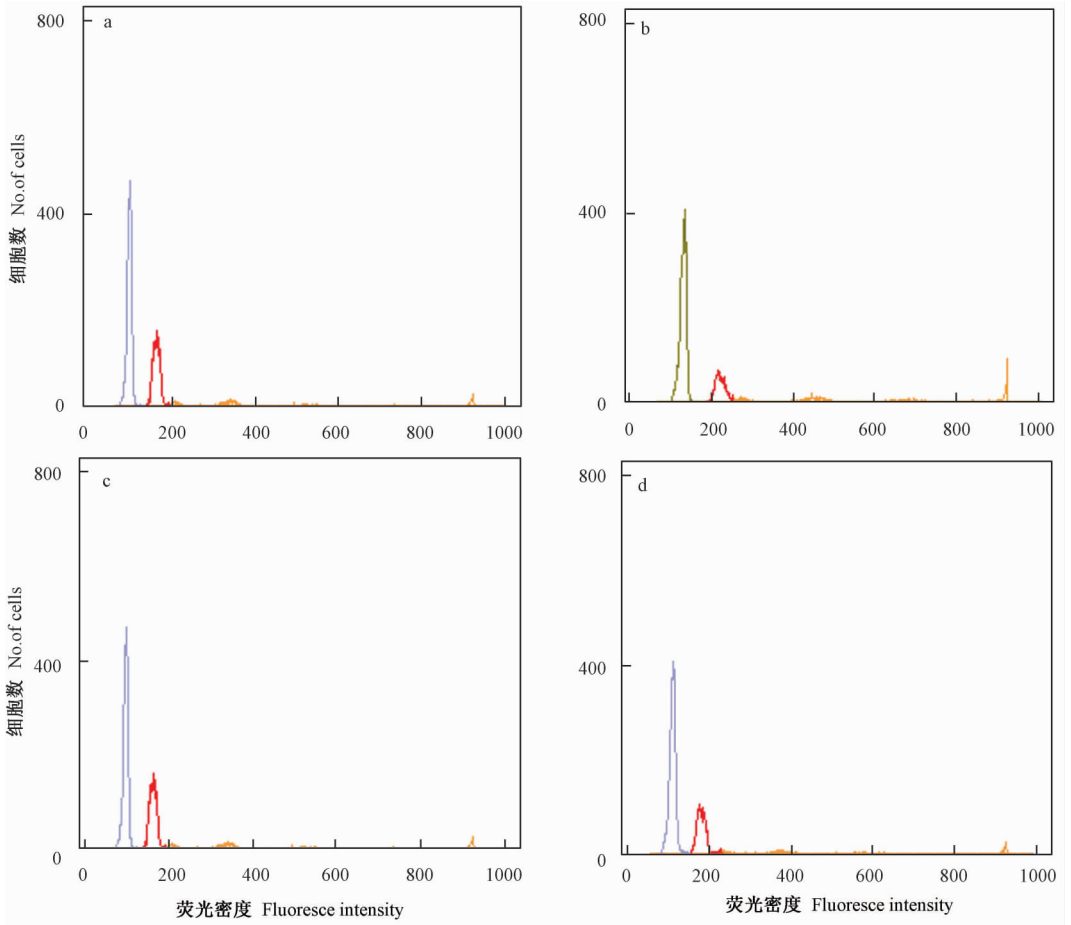


图 1 斑鳢 (a)、乌鳢 (b)、斑乌鳢 (c)、乌斑鳢 (d) 与鸡红细胞 DNA 直方图

Fig. 1 DNA histograms of red blood cells of *Channa maculata* (a), *C. argus* (b) and their reciprocal hybrids *C. maculata* ♀ × *C. argus* ♂ (c), *C. argus* ♀ × *C. maculata* ♂ (d) and Chicken

左: 鱼; 右: 鸡。Left: Fish; Right; Chicken.

血细胞的 DNA 含量 2.5 pg/2c 计算斑鳢、乌鳢、斑乌鳢及乌斑鳢 4 种鱼血细胞 DNA 的绝对含量。采用 Turkeys 法多重比较分析, 斑鳢和乌鳢的 DNA 含量差异不显著 ($P > 0.05$), 两种杂交鳢间的 DNA 含量差异也不显著 ($P > 0.05$)。斑鳢、乌鳢与两种杂交鳢的 DNA 含量差异显著 ($P < 0.05$)。结果显示, 通过流式细胞仪, 以细胞核 DNA 含量为指标, 可以将杂种与亲本进行鉴别, 但无法区别乌鳢与斑鳢, 杂交鳢间也无法区分。

表 1 斑鳢、乌鳢、斑乌鳢及乌斑鳢 DNA 含量

Table 1 DNA contents in *Channa maculata*, *C. argus*, and their reciprocal hybrids

物种 Species	样本量 No. of samples	染色体数目 No. of chromosomes	DNA 含量 (pg/2c) DNA value
斑鳢 <i>Channa maculata</i>	15	42	1.487 ± 0.035
乌鳢 <i>C. argus</i>	15	48	1.488 ± 0.034
斑乌鳢 <i>C. maculata</i> ♀ × <i>C. argus</i> ♂	15	45	1.522 ± 0.077
乌斑鳢 <i>C. argus</i> ♀ × <i>C. maculata</i> ♂	15	45	1.520 ± 0.033

3 讨 论

细胞核 DNA 含量反应了物种基因组的大小,而流式细胞仪的应用,大大提高了检测速度和精确性,其广泛应用于水产动物 DNA 含量的研究(刘少军等 2005,郑春静等 2006,方旅平等 2007,Pichungin et al. 2012)。不同物种基因组大小基本存在差别,所以 DNA 含量的准确测定可以用于种质鉴定。DNA 含量的多少会影响生物体的性状,如 Jimenez 等(2012)对 17 种鱼的 DNA 含量研究发现,细胞核 DNA 含量增多可能导致肌纤维增多,同时研究表明,核 DNA 含量与细胞体积正相关(Gregory 2001)。不同物种的细胞核 DNA 含量可能会有差别,仅在鱼类差别就很大,如石首鱼(*Sciaenops ocellatus*)为 0.78 pg/2c,小尾燕魮(*Gymnura micrura*)则为 5.65 pg/2c(Jimenez et al. 2012),且 DNA 含量与染色体条数不存在正相关关系。在对褐牙鲷(*Paralichthys olivaceus*)和犬齿牙鲷(*P. dentatus*)及其杂交子代的 DNA 含量研究发现,杂交子代的 DNA 含量更接近父本,同时杂交子代形态上更接近父本,两种结果表现出了一致性(关键等 2011),DNA 含量接近可能是形态学上接近父本的一个因素。

斑鳢和乌鳢分别有 42 和 48 条染色体(李康等 1985),斑乌鳢和乌斑鳢遗传父本及母本各一套染色体,即都为 45 条染色体(刘苏等 2011b)。在我们的研究中,斑鳢和乌鳢的细胞核 DNA 含量没有显著性差异,斑乌鳢和乌斑鳢的细胞核 DNA 含量也没有显著性差异。但与父母本相比,杂种细胞核 DNA 含量则明显增多,存在显著性差异。斑乌鳢和乌斑鳢染色体数目处于父母本染色体数之间,细胞核 DNA 含量却同时高于父母本,有别于我们原来的预期,这是一种有趣的现象。

这种杂交子代 DNA 含量高于亲本的现象可能是由下列因素造成的:一,来自不同亲本的染色体不兼容(Baker et al. 1991),在亲本中某些处于紧密折叠并被蛋白质包裹的 DNA 片段,在杂交子代中伸展开,有利于与荧光物质的结

合,导致了荧光信号增强,从而测得的杂交子代的 DNA 含量增多。二,亲缘关系较远的两个亲本杂交子代中,促使了染色体上的转座子自主复制,从而导致了 DNA 含量增多。这种杂种 DNA 含量高于亲本的现象在小鼠(*Mus musculus*)中出现过(Robert et al. 1991),在植物中则广泛存在(Biradr et al. 1993,刘小川等 1996)。

由于在水稻(*Oryza sativa*)的研究中,DNA 含量的增加与杂种优势相关(刘小川等 1996),在我们的研究中,两种杂交鳢在生长速度和适应性方面优于亲本(另文报道),DNA 含量的增加是否直接与杂种优势相关,值得我们关注。我们推测,亲缘关系较远的两个亲本杂交时,两个物种基因的互相作用,可能有利于基因的表达,进而促进杂种优势的表达。这种杂种优势与杂种细胞核 DNA 含量的增加是否有正相关性,还需要在多个物种中验证,但本研究可以作为杂交鳢和纯种亲本的鉴别方法。

参 考 文 献

- Baker R J, Potter C A, Hanks B G, et al. 1991. Increased variation in cellular DNA content at a hybrid zone: hybrid breakdown in *Peromyscus leucopus*. *Journal of Heredity*, 82 (1): 27 - 30.
- Biradr D P, Lane R A. 1993. Heterosis and nuclear DNA content in maize. *Heredity*, 71(3): 300 - 304.
- Gregory T R. 2001. Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size and the C-value enigma. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 76(1): 65 - 101.
- Jimenez A G, Kinsey S T. 2012. Nuclear DNA content variation associated with muscle fiber hypertrophic growth in fishes. *Journal of Comparative Physiology B*, 182(4): 531 - 540.
- Pichungin Y G, Semiyonov K A, Chernyshev A V, et al. 2012. Peculiarities of cytometrical methods of DNA content determination in the nucleus. *Cell and Tissue Biology*, 6 (3): 302 - 308.
- Robert D B, Scott K D, Samuel F L, et al. 1991. Hybrid breakdown and cellular-DNA content in contact zone between two species of Pocket Gophers (*Geomys*). *Journal of Clinical Acupuncture and Moxibustion*, 72(4): 697 - 705.
- 陈湘舜,潘炯华. 1990. 广东淡水鱼类志. 广州: 广东科技出版社, 511 - 514.

方旅平, 张馥厚, 曹文清, 等. 2007. 刀额新对虾和日本囊对虾细胞核 DNA 含量的测定与比较. 厦门大学学报, 46(1): 146-148.

顾若波, 徐钢春, 闻海波, 等. 2009. 太湖似刺鳊鮡染色体组型分析及细胞核 DNA 含量. 水产学报, 33(1): 9-14.

关键, 刘学周, 刘洪军, 等. 2011. 褐牙鲂(♀) × 犬齿牙鲂(♂) 杂交子代及亲本群体形态和外周血红细胞 DNA 含量. 渔业科学进展, 32(5): 17-23.

李康, 李渝成, 周曦, 等. 1985. 乌鳢、月鳢和斑鳢的染色体组型和 C-带带型的研究. 遗传学报, 12(6): 470-477.

刘少军, 赵如榕, 刘锦辉, 等. 2005. 不同倍性鱼的血细胞和精子 DNA 含量比较. 动物学报, 51(2): 360-364.

刘苏, 朱新平, 陈昆慈, 等. 2011a. 斑鳢、乌鳢及其杂交种形

态差异分析. 华中农业大学学报, 30(4): 488-493.

刘苏, 朱新平, 陈昆慈, 等. 2011b. 杂交鳢(斑鳢♀ × 乌鳢♂) 及其自交后代细胞核型初步分析. 动物学杂志, 46(1): 100-105.

刘小川, 吴建利, 唐绍清, 等. 1996. 水稻杂种细胞核行为和 DNA 含量与杂种优势的研究. 中国水稻科学, 10(2): 91-94.

张晓军, 周岭华, 相建海. 2002. 刀额新对虾染色体核型及细胞核 DNA 含量. 海洋与湖沼, 33(3): 225-231.

郑春静, 吴雄飞, 刘东海, 等. 2006. 用流式细胞仪检测大黄鱼三倍体. 细胞生物学杂志, 28(2): 253-256.

朱新平, 陈永乐, 张菁, 等. 2004. 黄喉拟水龟细胞核 DNA 含量的分析. 动物学研究, 25(2): 177-180.

内蒙古哈素海发现池鹭繁殖群

池鹭(*Ardeola bacchus*)在内蒙古夏季见于呼伦贝尔市、赤峰市克什克腾旗和敖汉旗、呼和浩特市哈素海、包头和鄂尔多斯市黄河沿岸、巴彦淖尔市乌梁素海,但未见繁殖记录的报道。

哈素海(E 110°56' ~ 111°01', N 40°34' ~ 40°38')位于大青山南部土默川平原北端,在呼和浩特市向西 70 km 处的土默特左旗境内,是黄河改道而遗留的椭圆形牛轭湖,属于大黑河水系的外流性淡水湖泊,主要水源来自黄河。湖泊周边除了鱼池外还有树林、沼泽地、农田、居民点等,为鸟类的迁徙、繁殖和觅食提供适宜栖息条件。

作者从 1996 年开始监测哈素海鸟类,2002 年 6 月 11 日,乘船调查湖泊芦苇塘生境鸟类时,在面积约 30 m × 15 m 的芦苇(*Phragmites australis*)丛中首次观察到 8 只池鹭,这是本种在呼和浩特市地区首次分布记录,但未见巢穴(赵格日乐图 2003)。后来的调查中在鱼池岸边、芦苇丛、浅水沼泽、渔业网具、树林等生境多次见到 1~3 只零散的池鹭个体。2010 年 7 月 26 日,在湖泊东侧(E 110°59', N 40°37')面积约 100 m × 40 m 的小片人工树林内发现 3 处池鹭巢穴。2011~2013 年在此片人工树林内发现的池鹭巢穴数量分别为 35 处、96 处和 78 处。据 2012 年对位于 85 棵树的 96 处巢位的观察发现,池鹭巢穴主要位于杨树(*Populus* sp.)上,少数选择旱柳(*Salix matsudana*);一棵树上一般有 1 处巢,少量有 2 处甚至 3 处巢的现象。用铝合金折叠梯、竹竿和卷尺测量,巢穴离地面最低为 6 m,最高为 16 m,平均高度为 10.27 m($n=96$)。对 8 处巢穴的观察,巢穴主要以干树枝和草茎构成,粗糙而简陋,卵呈蓝绿色,窝卵数 3~5 枚;树下草丛里可见到少数破碎的卵壳和掉地死亡的幼鸟。4 月中旬池鹭开始迁来,在鱼池周边零散活动,5 月下旬开始营巢产卵,7 月上旬幼鸟离巢后在巢穴及周围树枝上等候亲鸟喂养。2012 年 7 月 9 日,对巢区和巢区周边鱼池同步调查,在巢区树林中统计到 70 只成鸟、150 只幼鸟,巢区周边面积 1 500 m × 200 m 鱼池中统计到 40 只成鸟。

对哈素海池鹭种群动态和繁殖栖息地选择需长期深入研究,也应关注在内蒙古地区繁殖区域再北扩散现象。

赵格日乐图

内蒙古师范大学生命科学与技术学院 呼和浩特 010022

基金项目 内蒙古自治区高等学校科学研究项目(No. NJZY12033);

第一作者介绍 赵格日乐图,男,副教授;研究方向:鸟类生态学;E-mail: nmgrlt@imnu.edu.cn.

收稿日期:2013-09-03,修回日期:2013-11-19