

黄喉拟水龟细胞核 DNA 含量的分析

朱新平^{1,2}, 陈永乐², 张 菁¹, 杜合军², 桂建芳^{1,*}

(1. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 湖北 武汉 430072;

2. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380)

摘要:以黄喉拟水龟 (*Mauremys mutica*) 的红血细胞为材料, 以鸡红血细胞为 DNA 标准 (2.5 pg/2c), 采用流式细胞仪测定了黄喉拟水龟及其两个种群的细胞核基因组 DNA 含量。黄喉拟水龟的细胞基因组 DNA 含量为 5.16 ± 0.29 pg/2c ($n = 60$); 南方种群的细胞核 DNA 含量为 5.19 ± 0.30 pg/2c ($n = 30$), 北方种群为 5.14 ± 0.30 pg/2c ($n = 30$), 两个种群的核 DNA 含量无显著差异 ($t = 0.6847$, $df = 58$, $P > 0.05$)。

关键词: 黄喉拟水龟; DNA 含量; 种群差异

中图分类号: Q959.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254-5853(2004)02-0177-04

Cellular DNA Contents of Asian Yellow Pond Turtles (*Mauremys mutica* Cantor)

ZHU Xin-ping^{1,2}, CHEN Yong-le², ZHANG Jin¹, DU He-jun², GUI Jian-fan¹

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, the Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China;

2. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy Fishery of Sciences, Guangzhou 510380, China)

Abstract: The cellular DNA contents of the yellow pond turtle (*Mauremys mutica*) and its two populations were studied by using a flow cytometer with the DNA of chicken red blood cells (2.5 pg/2c) as a standard. The DNA content of the turtle is 5.16 ± 0.29 pg/2c ($n = 60$). The DNA content of southern population is 5.19 ± 0.30 pg/2c ($n = 30$) and that of northern population is 5.14 ± 0.30 pg/2c ($n = 30$), and there is no difference between southern and northern populations of *M. mutica* ($t = 0.6847$, $df = 58$, $P > 0.05$).

Key words: *Mauremys mutica*; Genome DNA content; Population difference

黄喉拟水龟 (*Mauremys mutica* Cantor), 俗称石龟、香乌龟, 分类上隶属龟鳖目, 龟科, 拟水龟属, 国内主要分布于江苏、浙江、安徽、广东、广西、海南、福建及台湾, 国外分布于越南。黄喉拟水龟具有较高的食用、药用及观赏价值; 但其资源量有限 (Zhao, 1998), 在广东被列为受保护的水生动物。该种的人工繁殖及饲养已获成功 (Zhu et al, 2001a, b, c, d), 并显示出良好的经济前景。尽管对该种有一些遗传研究报道 (Guo et al, 1998;

Nie et al, 1997), 但其种质与遗传背景仍未完全明了。黄喉拟水龟分布范围较广, 由于地理隔离, 致使分布于北方和南方的种群在形态、繁殖生态以及生长特性方面均有所差异; 我们用 RAPD-SCAR 分子标记也证实了两个种群存在较大的遗传差异 (Zhu et al, unpublished); 因此, 两个种群的差异是否达到亚种水平, 是值得探讨的问题。DNA 含量可以反映基因组的大小, 并作为细胞倍性的一个指标, 因此对其测定是研究生物基因组的一个手

* 收稿日期: 2003-07-21; 接受日期: 2004-02-02

基金项目: 广东省海洋与渔业局重点项目资助 (2001A09); 中国科学院淡水生态与生物技术国家重点实验室开放课题基金项目资助 (KSCX2-SW-303)

* 通讯作者, E-mail: jfgui@ihb.ac.cn

第一作者 E-mail: xinpingshu@tom.com

段。Vinogradov (1998) 报道了多种龟的 DNA 含量的研究工作, 但有关黄喉拟水龟的细胞核 DNA 含量测定的研究尚未见报道。

流式细胞仪 (flow cytometry) 在 DNA 含量检测 (Birstein et al, 1993; Ciudad et al, 2002) DNA 与 RNA 含量比测定 (Schmid et al, 2000) 特异基因定位 (Kejnovsky et al, 2001; Vanderbyl et al, 2001), 以及染色体异常检测 (Ehemann et al, 1999; Clausen et al, 2001) 等研究中, 是一个强大而有效的工具。在本研究中, 我们利用流式细胞仪对黄喉拟水龟的两个种群进行了细胞核 DNA 含量的测定, 一是了解黄喉拟水龟细胞核 DNA 的含量, 二是探讨不同种群细胞核 DNA 含量与种群差异的关联性, 为该物种的保护和开发, 以及种群分类提供遗传背景资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

黄喉拟水龟具有二种不同遗传特征的种群。一种是分布在越南及与越南接壤的广西的种群, 我们称之为南方种群; 一种是分布在江苏、浙江、安徽等地的种群, 当地称为香乌龟, 我们称之为北方种群。实验龟取自珠江水产研究所龟场, 南方种群和北方种群各 30 只; 体重在 10 ~ 20 g, 因个体小, 未能分辨雌雄。另取 6 只龟 (4 雄 2 雌) 用于染色体制备。

1.2 实验方法

1.2.1 样品制备 按 Wei et al (2003) 的方法制备样品, 具体步骤如下: 分别取每只龟的血样, 肝素抗凝, 4 °C 放置 1 h; 每个样本取 2 μ L 血细胞 (约 1×10^6 个细胞, 由流式细胞仪计数), 稀释在 1 mL 预冷的 $1 \times$ PBS 中。对照标准使用鸡血 (Esteban et al, 1991; Jakobsen, 1983; Vindelov et al, 1983), 处理同龟血。取 700 μ L 稀释的样本与 300 μ L 稀释的标准鸡血细胞 (即样本细胞: 鸡血细胞 = 7:3) 混合, 混合细胞用预冷的 $1 \times$ PBS 洗 1 ~ 2 次, 800 ~ 1 000 r/min 离心 5 min。沉淀的细胞团用预冷的 70% 乙醇重悬, 在 4 °C 固定过夜。用预冷的 $1 \times$ PBS 洗 2 ~ 3 次, 800 ~ 1 000 r/min 离心 5 min, 去上清, 沉淀的细胞团用 0.5 mL 0.5% pepsin + 0.1 mol/L HCl 重悬, 室温下孵育 20 ~ 30 min, 并轻轻摇动。取 100 μ L 细胞悬液, 用含有 4 kU/mL DNase-free Rnase (Beckman & Coulter Co.) 的 PI

(propidium iodide) 溶液 (40 μ g PI/mL) 2 mL, 在室温、黑暗条件下, 染色 1 ~ 3 h, 每一管的细胞悬液的终浓度为每 mL 中含 7×10^4 个样本细胞和 3×10^4 个标准鸡血细胞。混合细胞悬液用 40 ~ 100 μ m 的尼龙网过滤后上机分析。

1.2.2 DNA 含量测定 DNA 含量采用美国 Beckman & Coulter 公司生产的 Epics Altra 流式细胞仪测定, 每个个体的样本至少测定 10 000 个细胞。5 W 水冷激光, 400 nm 激发, 610 nm BP 接收, 实验采用内定标, 即将标准鸡血与龟样本混样测定。流式细胞仪自动给出每一个样本和标准鸡血的平均 PI 荧光密度值。鸡血细胞的 DNA 含量为 2.5 pg/2c (Rasch et al, 1970), 则每一个个体样本的细胞核 DNA 含量 = $2.5 \times$ 样本平均 PI 荧光密度值 / 鸡血平均 PI 荧光密度值。

1.2.3 染色体制备 以每 g 体重 10 μ g 剂量给实验龟腹腔注射 PHA, 24 h 后再以每 g 体重 5 ~ 6 μ g 的剂量腹腔内注射秋水仙素, 3.5 h 后取脾脏。0.0375 mol/L KCl 低渗 15 ~ 20 min。Carnoy's 固定液 (甲醇: 冰醋酸 = 3:1) 固定。参照 Zhu et al (1990) 的空气干燥法制片。

2 结果

2.1 DNA 含量

黄喉拟水龟和鸡的红血细胞 2n 小峰的相对位置见图 1, DNA 含量测定结果见表 1。

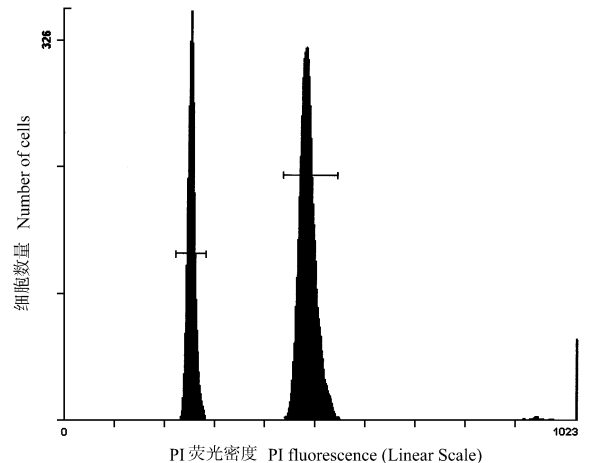


图 1 黄喉拟水龟 (左) 与鸡 (右) 红血细胞 DNA 直方图

Fig. 1 DNA histograms of red blood cells of *M. mutica* (right) and chicken, *Gallus domesticus* (left)

以鸡红血细胞 DNA 含量值为 2.5 pg/2c 计算，黄喉拟水龟红血细胞 DNA 的绝对含量为 5.16 ± 0.29 pg/2c，其中，南方种群为 5.19 ± 0.30 pg/2c，北方种群为 5.14 ± 0.30 pg/2c。两种群有微小不同，经统计分析检验差异不显著（ $t = 0.6847$ ， $df = 58$ ， $P > 0.05$ ）。

2.2 染色体数目

对黄喉拟水龟 100 个细胞的中期分裂相进行计数，染色体数目为 49 的有 1 个，50 的有 2 个，51 的有 3 个，52 的有 94 个。染色体数目为 52 的占细胞总数的 94%，因此可以确定黄喉拟水龟二倍体染色体数目为 $2n = 52$ 。

3 讨 论

在我们的研究中，黄喉拟水龟的 DNA 含量的种群差异较小，南方种群的平均 DNA 含量为 5.19 ± 0.30 pg/2c，北方种群为 5.14 ± 0.30 pg/2c，南方种群比北方种群稍高。为了与其他同类动物进行比较，表 2 列出 Vinogradov（1998）利用流式细胞仪测定的几种龟的红血细胞的 DNA 含量。从表 2 可以看出，染色体 $2n = 50$ 的彩龟（*Chrysemys picta*）、欧洲池龟（*Emys orbicularis*）和东方盒龟

（*Terrapene carolina*）的 DNA 含量分别为 5.14，5.20，5.18，它们之间的差异在 0.06 的范围内。黄喉拟水龟两个种群间的 DNA 含量的差异为 0.05，处于上述龟科三个物种间的差异范围内。这种 DNA 含量的差异难以说明黄喉拟水龟两个种群间的遗传差异。在预实验中，我们曾用人血淋巴细胞作对照，测定了黄喉拟水龟南方种群 6 只、北方种群 5 只的 DNA 含量，其中南方种群的 DNA 含量为 5.18 pg/2c，北方种群为 4.90 gp/2c；两个种群间的 DNA 含量亦有较小差异。与用鸡红血细胞作标准相比，虽然差异值不同，但均有一个现象，即南方种群的 DNA 含量高于北方种群。从表 2 还可以看出，所列的几种龟染色体数目 $2n = 50$ 或 52，其 DNA 含量在 5.02~5.30，表明龟的 DNA 含量还是比较相近的，变化范围不大，有一定的保守性。

每一个物种包括若干个体组成的若干种群，各种群由于突变、自然选择或其他原因，往往在遗传上不同，特别是龟类，由于地理隔离，遗传上的差异可能更大。我们曾在形态、繁殖生态方面以及用 RAPD、SCAR 分子标记分析比较南北种群，证明南方种群与北方种群在表型及遗传上存在差异（Zhu et al ,unpublishing）。虽然 DNA 含量的测定无法说

表 1 黄喉拟水龟南北两个种群红血细胞 DNA 含量
Table 1 DNA contents of red blood cells in two populations of *Mauremys mutica*

种群 Population	样本量 No. of samples	黄喉拟水龟 <i>Mauremys mutica</i>			鸡 <i>Gallus domesticus</i>
		Mean $\pm$ SD	Rang	CV	CV
北方 Northern	30	5.14 ± 0.30	4.59 – 5.51	4.74 ± 0.69	4.86 ± 1.68
南方 Southern	30	5.19 ± 0.30	4.74 – 5.79	4.13 ± 0.77	4.32 ± 1.04

CV：变异系数（Coefficient of variation）。

表 2 几种龟的细胞核 DNA 含量的比较*
Table 2 Compare of cellular DNA contents in some turtles*

物种 Species	DNA 含量 DNA value (pg/2c)	染色体数目 No. of chromosomes (2n)	对照标准 Standard used	资料来源 Resources
黄喉拟水龟 <i>Mauremys mutica</i>	5.16	52	GD	本文 This study
鳄龟 <i>Chelydra serpentina</i>	5.02	52	HS, RT	Vinogradov, 1998
彩龟 <i>Chrysemys picta</i>	5.14	50	HS, RT	Vinogradov, 1998
斑点龟 <i>Clemmys guttata</i>	5.14		HS, RT	Vinogradov, 1998
伯兰丁氏龟 <i>Emydoidea blandingii</i>	5.30		HS, RT	Vinogradov, 1998
欧洲池龟 <i>Emys orbicularis</i>	5.20	50	HS, RT	Vinogradov, 1998
东方盒龟 <i>Terrapene carolina</i>	5.18	50	HS, RT	Vinogradov, 1998

* 采用流式细胞仪测定动物红血细胞核 DNA 含量（Measuring the cellular DNA contents of red blood cells in turtles using flow cytometries）。

HS：人（*Homo sapiens*）；RT：蛙（*Rana temporaria*）；GD：鸡（*Gallus domesticus*）。

明两个种群的遗传差异。但我们认为南方种群与北方种群在遗传上是存在差异的。只是黄喉拟水龟二个种群的这些遗传差异在分类上能否达到亚种级水平,则还需要进一步的研究与探讨。此外,DNA含量测定具有不同的方法,可以使用不同的仪器,也具有不同的对照标准。对同一物种而言,用不同的方法或不同的对照标准将会得出不同的结果(Gregory, 2001)。在没有统一标准的情况下,一些结果

往往失去横向比较的意义。所以,用DNA含量作为种质的一个指标,需要建立统一的标准,才能使结果具有可比性。

对野生动物进行保护或开发利用,需要对该物种的种质及遗传背景有所了解,只有清楚了该物种的遗传结构以及种质状况,才能有效地保护和开发该物种。我们的工作,为了解黄喉拟水龟的种质状况提供了部分基础数据。

参考文献:

- Birstein VJ, Poletaev AI, Goncharov BF. 1993. DNA content in Eurasian sturgeon species determined by flow cytometry [J]. *Cytometry*, **14**: 377–383.
- Ciudad J, Cid E, Velasco A, Lara JM, Aijon J, Orfao A. 2002. Flow cytometry measurement of the DNA contents of G0/G1 diploid cells from three different teleost fish species [J]. *Cytometry*, **48**: 20–25.
- Clausen OP, Andersen SN, Stroomkjaer H, Nielsen V, Rognum TO, Bolund L, Koolvraa S. 2001. A strategy combining flow sorting and comparative genomic hybridization for studying genetic aberrations at different stages of colorectal tumorigenesis in ulcerative colitis [J]. *Cytometry*, **43**: 46–54.
- Ehemann V, Hashemi B, Lange A, Otto HF. 1999. Flow cytometric DNA analysis and chromosomal aberrations in malignant glioblastomas [J]. *Cancer Lett.*, **138**: 101–106.
- Esteban JM, Sheibani K, Owens M, Joyce J, Bailey A, Battifora H. 1991. Effects of various fixatives and fixation conditions on DNA ploidy analysis: A need for strict internal DNA standards [J]. *Am. J. Clin. Pathol.*, **95**: 460–466.
- Gregory TR. 2001. Animal Genome Size Database [DB]. <http://www.genome.size.com>.
- Guo CW, Nie LW, Wang M. 1998. Studies on the karyotype and NORs of three turtles in the *Sacalia* and *Mauremys* from China [J]. *Acta Hydrobiol. Sinica*, **22**(4): 314–318. [郭超文, 聂刘旺, 汪 鸣. 1998. 中国水龟类的核型与银带带型研究. 水生生物学报, **22**(4): 314–318.]
- Jakobsen A. 1983. The use of trout erythrocytes and human lymphocytes for standardization in flow cytometry [J]. *Cytometry*, **4**: 161–165.
- Kejnovsky E, Vrana J, Matsunaga S, Soucek P, Siroky J, Dolezel J, Vyskot B. 2001. Localization of male-specifically expressed MROS genes of *Silene latifolia* by PCR on flow-sorted sex chromosomes and autosomes [J]. *Genetics*, **158**: 1269–1277.
- Nie LW, Guo CW, Wang M. 1997. A comparative study on isozymes of three fresh-water turtle species in China [J]. *Sichan Journal of Zoology*, **15**(suppl.): 115–120. [聂刘旺, 郭超文, 汪 鸣. 1997. 我国三种龟的同工酶比较研究. 四川动物, **15**(增刊): 115–120.]
- Rasch EM, Prehn LM, Rasch RW. 1970. Cytogenetic studies of *Poecilia* (Pisces): II. Triploidy and DNA levels in naturally occurring populations associated with the gynogenetic teleost, *Poecilia* (Girard) [J]. *Chromosoma*, **31**: 18–40.
- Schmid I, Cole SW, Korin YD, Zack JA, Giorgi JV. 2000. Detection of cell cycle subcompartments by flow cytometric estimation of DNA-RNA content in combination with dual-color immunofluorescence [J]. *Cytometry*, **39**: 108–116.
- Vanderbyl S, MacDonald N, de Jong G. 2001. A flow cytometry technique for measuring chromosome-mediated gene transfer [J]. *Cytometry*, **44**: 100–105.
- Vindelov LL, Christensen IJ, Nissen NI. 1983. Standardization of high-resolution flow cytometric DNA analysis by the simultaneous use of chicken and trout red blood cells as internal reference standards [J]. *Cytometry*, **3**: 328–331.
- Vinogradov AE. 1998. Genome size and GC-percent in vertebrates as determined by flow cytometry: The triangular relationship [J]. *Cytometry*, **31**: 100–109.
- Wei WH, Zhang J, Zhang YB, Zhou Li, Gui JF. 2003. Genetic heterogeneity and ploidy level analysis among different gynogenetic clones of polyploid gibel carp [J]. *Cytometry*, **56A**: 46–52.
- Zhao EM. 1998. The Red Book about Severe Danger Animals in China: Amphibians and Reptiles [M]. Beijing: Science Press. 120–121. [赵尔宓. 1998. 中国濒危动物红皮书——两栖类和爬行类. 北京: 科学出版社. 120–121.]
- Zhu XP, Wu GM, Hu H, Luo JR. 1990. The karyotype of *Leptobarbus hoevenii* Bleeker [J]. *Heredity* (Beijing), **12**(3): 20–21. [朱新平, 邬国民, 胡 红, 罗建仁. 1990. 何氏细鲫染色体组型. 遗传, **12**(3): 20–21.]
- Zhu XP, Chen YL, Wei CQ, Liu YH, Lu XD, Zheng GM. 2001a. Reproduction of yellow pond turtle, *Mauremys mutica* [J]. *Acta Hydrobiol. Sinica*, **25**(5): 454–460. [朱新平, 陈永乐, 魏成清, 刘毅辉, 陆小茜, 郑光明. 2001a. 黄喉拟水龟的繁殖生物学研究. 水生生物学报, **25**(4): 454–460.]
- Zhu XP, Chen YL, Wei CQ, Liu YH, Huang SH, Chen YX. 2001b. Effects of artificial rearing on fecundity of *Mauremys mutica* Cantor [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, **8**(2): 52–54. [朱新平, 陈永乐, 魏成清, 刘毅辉, 黄善衡, 陈炎星. 2001b. 人工饲养对黄喉拟水龟繁殖力的影响. 中国水产科学, **8**(2): 52–54.]
- Zhu XP, Chen YL, Wei CQ, Liu YH, Lu XD. 2001c. Growth of one-year-old Asian yellow pond turtle (*Mauremys mutica* Cantor) [J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, **16**(1): 18–22. [朱新平, 陈永乐, 魏成清, 刘毅辉, 陆小茜. 2001c. 黄喉拟水龟一龄龟生长的研究. 大连水产学院学报, **16**(1): 18–22.]
- Zhu XP, Chen YL, Liu YH, Wei CQ, Lu XD. 2001d. Comparative study of the growth of *Mauremys mutica*, *Cuora trifasciata* and *Chelys serpentina* [J]. *Journal of Fisheries of China*, **25**(6): 507–511. [朱新平, 陈永乐, 刘毅辉, 魏成清, 陆小茜. 2001d. 黄喉拟水龟、三线闭壳龟、鳄龟的生长比较. 水产学报, **25**(6): 507–511.]
- Zhu XP, Zhou L, Chen YL, Gui JF. Comparative studies on main morphological and reproductive characters and RAPD, SCAR marker analysis between southern and northern populations in Asian yellow pond turtle (*Mauremys mutica* Cantor). (unpublishing).