

文章编号:1000 - 0615(2005)01 - 0033 - 05

点带石斑鱼的核型、C 带、Ag-NORs

邹记兴¹, 余其兴², 周 菲²

(1. 宁波大学生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211;

2. 武汉大学生命科学学院, 湖北 武汉 430072)

摘要:采用 PHA 活体注射结合秋水仙素培养, 取点带石斑鱼全肾, 低渗处理, 空气干燥制片法制作染色体标本, 对染色体进行 Giemsa 染色、C 带及 Ag-NORs 等系列研究。结果表明: (1) 点带石斑鱼 $2n = 48$, 核型组成为 $48t, NF = 48$, 没有异型性染色体分化; (2) 在最小一对染色体的着丝粒与其染色体臂之间, 靠近着丝粒部位有明显的次缢痕; (3) 在间期核中, 通过银染表现出核仁的数目为 1~4 个, 1 个核仁的间期核数目最高, 多达 55%, 4 个核仁的间期核数目占 2%; (4) 50% 有丝分裂中期相能观察到 Ag-NORs, Ag-NORs 主要出现在第 24 对同源染色体上, 第 5 对同源染色体也可观察到, 但其它染色体上则没有; (5) Ag-NORs 的数目在不同的细胞中表现出多态性, 数目为 1~4 个, 出现 4 个 Ag-NORs 的频率最低 (6.8%), 出现 2 个 Ag-NORs 的频率最高 (58.1%); (6) 第 24 对同源染色体近着丝粒的臂内具次缢痕, 是 Ag-NORs 所在的区域, 该区域分布有大量的结构异染色质, 即 Ag-NORs 与 C 带强阳性呈现严格的同步对应; (7) 点带石斑鱼所有染色体着丝粒为阳性 C 带, 而且第 24 对染色体几乎整个染色体臂都呈 C 带阳性, 着色强度与该对染色体上的着丝粒 C 带相同。最后讨论了核型演化规律和 Ag-NORs、C 带的发生机制。

关键词:点带石斑鱼; 核型; C 带; Ag-NORs

中图分类号:S917 **文献标识码:**A

The karyotypes, C-bands patterns and Ag-NORs of *Epinephelus malabaricus*

ZOU Ji-xing¹, YU Qi-xing², ZHOU Fei²

(1. Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: The chromosome specimens of *Epinephelus malabaricus* (Bloch & Schneider) were obtained from metaphase of kidney cell by viv-injection of PHA and cultivation of colchicines, hypotonic-air drying technique, and then by studying their Giemsa stain, C-bands and Ag-NORs. The results were as follows: 1) *E. malabaricus* had a diploid chromosome number of 48 and its karyotype formula was $48t, NF = 48$, sex chromosome was not found; 2) There was a pair of chromosomes with secondary constriction close to the centromere of chromosome t 24; 3) 1 - 4 nucleoli appeared in the nucleus of interphase, 55% nuclei had 1 nucleolus and only 2% for 4 nucleoli; 4) Ag-NORs appeared in the chromosome t 24 of 50% metaphase, sometimes in the chromosome t5, but not in other chromosomes; 5) The Ag-NORs polymorphisms were individually specific, 1 - 4 pairs of the number, and the frequency of 4 Ag-NORs were lowest; 6) The secondary constrictions and positive C-bands were coincident, close to the centromere of the chromosome, and mass constrictive heterochromatins appeared in that region; 7) All the centromeres of chromosomes were darkly stained C-bands, and the whole arm of chromosome t 24 and its centromere were same positive C-bands. 8) The evolutive regulation of the karyotype and the developing mechanism of Ag-NORs and C-bands were discussed.

Key words: *Epinephelus malabaricus*; karyotype; C-bands; Ag-NORs

收稿日期:2003-09-04

资助项目:浙江省高校青年教师资助计划;宁波大学校内科研基金项目

作者简介:邹记兴(1966 -),男,湖北武汉人,博士,副研究员,主要从事水产经济动物种质资源与种苗工程研究。E-mail:ZJX6616@

关于鱼类染色体,国外在20世纪30年代就开始研究。但由于固定方法与制片技术不完善,判读方法主观性强,加之鱼类染色体比人类等哺乳动物、植物、昆虫等要小,所以早期的研究结果可信度较差。到20世纪50年代以后,人类染色体的制备、观察方法和技术不断改进和完善,20世纪70年代又建立了各种显带技术,对人类染色体组型、带型的研究逐步深入而详尽。于是,20世纪60、70年代以后,人类染色体组型和带型的技术方法逐步应用于各类动物,极大地促进了动物细胞遗传学的发展。1966年Ojima等^[1]发表了第一篇采用空气干燥法研究鱼类染色体组型的报道,此后鱼类染色体的研究得到一定程度的发展。迄今已考察了染色体数目的鱼类约占世界鱼类总数的10%,海水鱼类较少。

自Natarajan等^[2]报道双棘石斑鱼的核型以来,国内外进行过核型研究的石斑鱼仅6种。已研究的这6种石斑鱼仅对核型作了简单分析,部分作了银染的工作^[3-6],但不全面,对C带的工作也没有报道,所以对其端部着丝粒的确认有些勉强,而研究鱼类的染色体对于确定鱼类的分类地位及演化关系有直接的作用,也是杂交育种的基础。针对这一情况,我们开展了点带石斑鱼核型和带型方面的研究工作。

1 材料与方法

1.1 材料

点带石斑鱼(*Epinephelus malabaricus*)采自作者在福建东山岛的试验渔排。

1.2 方法

有丝分裂染色体制备 采用植物血球凝集素(PHA)活体注射法。每尾实验鱼按20g体重注射0.2mL PHA($2.5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)的量注射,每隔24h重复一次,共3~5次,最后一次注射6h后从泄殖孔后剪去鱼尾部,尽量排尽血液,取出肾组织,撕碎后加入10mL PRMI 1640无血清培养基,同时加入秋水仙素至终浓度 $0.2\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,于25~30℃温育1~1.5h。处理后的细胞悬液用淋巴细胞分离液分离出淋巴细胞,生理盐水冲洗2次后按常规方法低渗、固定,空气干燥法制备染色体标本。

核型分析 点带石斑鱼核型分析按余先觉等^[7]的方法进行。将有丝分裂染色体标本制片用1◇10 Giemsa(pH6.8)染色后在显微镜下观察,并

选出10~15个分散良好,形态清晰,数目完整,带纹清晰的中期完整分裂相进行显微摄像,应用核型分析软件Video Test-kary 3.1进行核型分析。

C带 参照文献^[8]的方法进行。取经适度老化的标本,置于0.2N HCl中,于室温处理30min,取出后用蒸馏水漂洗,于60℃用5% Ba(OH)₂处理5~15min,0.2N HCl中漂洗,蒸馏水漂洗,60℃2×SSC中处理1h。1◇10 Giemsa染色20min。干燥后镜检。

银染 参照文献^[9]的快速银染法进行。50%硝酸银与20%明胶(内含1%甲酸)以2◇1混匀后加于新制备的标本上,加盖片后,于65℃温箱内处理8~10min。当整张玻片呈棕黄色时取出,流水冲去盖片,干燥后镜检。若染色体着色不够,可用1◇50 Giemsa染液复染2min。

2 结果

2.1 点带石斑鱼的核型特征

点带石斑鱼染色体 $2n = 48$ (约占所统计的126个分裂相的85%)(图1)。从10个良好中期分裂相中所得的各条染色体的相对长度及臂比的平均值列于表1。最长染色体的相对长度为5.08,最短者为3.38,长度比为1.5。在48条染色体全部为端部着丝粒染色体(t),各染色体中也未发现随体,同时在所观察到的所有分裂相中,也未发现异型性染色体,最小一对染色体在着丝粒与染色体臂之间有明显的次缢痕。因此,据实验结果,点带石斑鱼的核型可定为 $2n = 48 = 48t$,臂数(NF)为48。

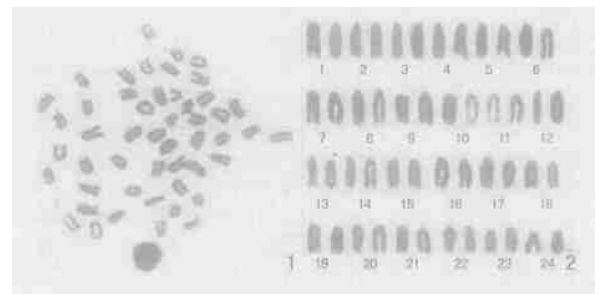


图1 点带石斑鱼有丝分裂中期相染色体和核型

Fig. 1 Metaphase chromosomes and karyotype of *E. malabaricus*

1. 一个好的中期分裂相,箭头示具次缢痕的染色体;
 2. 根据同一分裂相排出的核型
1. a good metaphase and the arrows indicating the chromosomes of secondary constrictions;
 2. karyotype according to the same metaphase

表 1 点带石斑鱼各染色体的臂比和相对长度

Tab. 1 The arm ratio and relative length of chromosome of *E. malabaricus*

染色体编号 chromosome no.	分组 group	臂比 arm ratio	相对长度 relative length	染色体编号 chromosome no.	分组 group	臂比 arm ratio	相对长度 relative length
1	t		5.08 ±0.14	13	t		4.13 ±0.28
2	t		5.00 ±0.19	14	t		4.10 ±0.21
3	t		4.84 ±0.06	15	t		4.03 ±0.22
4	t		4.60 ±0.21	16	t		3.99 ±0.14
5	t		4.50 ±0.27	17	t		3.94 ±0.17
6	t		4.43 ±0.23	18	t		3.86 ±0.16
7	t		4.41 ±0.19	19	t		3.80 ±0.10
8	t		4.37 ±0.13	20	t		3.77 ±0.16
9	t		4.30 ±0.12	21	t		3.70 ±0.16
10	t		4.28 ±0.11	22	t		3.63 ±0.14
11	t		4.22 ±0.17	23	t		3.47 ±0.13
12	t		4.17 ±0.18	24	t		3.38 ±0.31

2.2 点带石斑鱼的 C 带特征

点带石斑鱼的 48 条染色体均有端部着丝粒 C 带,同源染色体 C 带的大小、位置以及着色强度基本相同,不同染色体的 C 带强度有一定的差异(图 2)。在整个核型中,有最短的一对同源染色体(t24)除了着丝粒 C 带外,在几乎整个染色体臂都呈 C 带阳性,着色强度与该对染色体上的着丝粒 C 带相同。

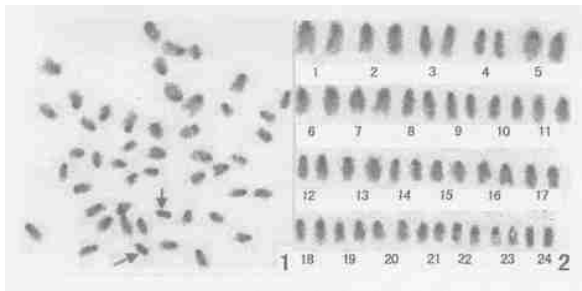


图 2 点带石斑鱼有丝分裂中期染色体的 C 带

Fig. 2 Metaphase chromosomes showing C-banding

1. C 带分裂相,箭头示染色体臂间深染的 C 带;

2. C 带分裂相核型

1. Metaphase figure showing C-bands, the arrows indicating the C-bands with darkening stained in arms;

2. Karyotype showing C-bands

2.3 点带石斑鱼的 Ag-NORs 带型

点带石斑鱼中期分裂相中,50% 显示出 Ag-NORs。Ag-NORs 出现的位置均在染色体臂末端,但 Ag-NORs 的数目在不同的细胞中表现出不同的多态性,其数目为 1~4 个。各种数目的 Ag-NORs 出现的频率相差较大,出现 2 个 Ag-NORs

的频率最高(图 3-1),达 58.1%;而出现 4 个 Ag-NORs 的频率最低(图 3-2),只有 6.8%。在所统计的分裂相中,也是表现为 2 个 Ag-NORs 的分裂相的比例最高,表现为 4 个最低,其中 t5 染色体有 1 条染色单体的银染点有部分重叠现象(图 3-3,4)。各种数目的 Ag-NORs 所出现的频率及位置见表 2。与此不同的是,在间期核中,通过银染表现出 1 个核仁的间期核数目的频率最高,多达 55%(图 3-5);2 个核仁的间期核数目 25%(图 3-6);3 个核仁的间期核数目 18%(图 3-7);4 个核仁的间期核数目 2%(图 3-8)。点带石斑鱼 Ag-NORs 的另一特点是,Ag-NORs 出现的大小与其数目成反比,这与间期核仁的大小与数目成反比的情况一致。

3 讨论

上世纪 70 年代以来,鱼类的染色体研究获得了很大的发展,通过核型分析,解决了一些鱼类的分类学问题,也揭示了起源与进化的一些关系。一般认为鱼类的演化程度与鱼本身细胞的染色体类型是一致的。文献[10]根据鱼类染色体研究的结果,将真骨鱼类划分为低位类、中位类和高位类 3 个演化类群,并在此基础上将鱼类划分为 8 个类型,探讨了鱼类的进行与染色体的关系。通过对大量资料的分析表明,进化上越是处于上位的鱼类染色体数就减少,端着丝粒染色体的数目相对较多,臂数较少。点带石斑鱼符合上述条件,2n = 48 = 48t,据此认为在鱼类系统进化中处于高位类,是真骨鱼类特化的类型。这一点也从 C 带的

表2 点带石斑鱼 117 个分裂相中各种数目的 Ag-NORs 出现的频率和位置

Tab. 2 The frequencies and positions of Ag-NORs appearance in *E. malabaricus*

类型 types	Ag-NORs 数目 no. of Ag-NORs	分布位置 distribution	观察分裂相数 no. of metaphase observed	频率 (%) frequency of Ag-NORs appeared
A	1	t24(1)	15	12.9
B	2	t24(2)	68	58.1
C	3	t24(2), t5(1)	26	22.2
D	4	t24(2), t5(2)	8	6.8

注: t24(1) 表示同源染色体 t24 上有 1 个 Ag-NORs; t24(2) 表示同源染色体 t24 上有 2 个 Ag-NORs。其它类同

Notes: t24(1) means there is one Ag-NORs in one of t24 isogenous chromosomes; t24(2) means there is two Ag-NORs in one of t24 isogenous chromosomes. The other is same with that

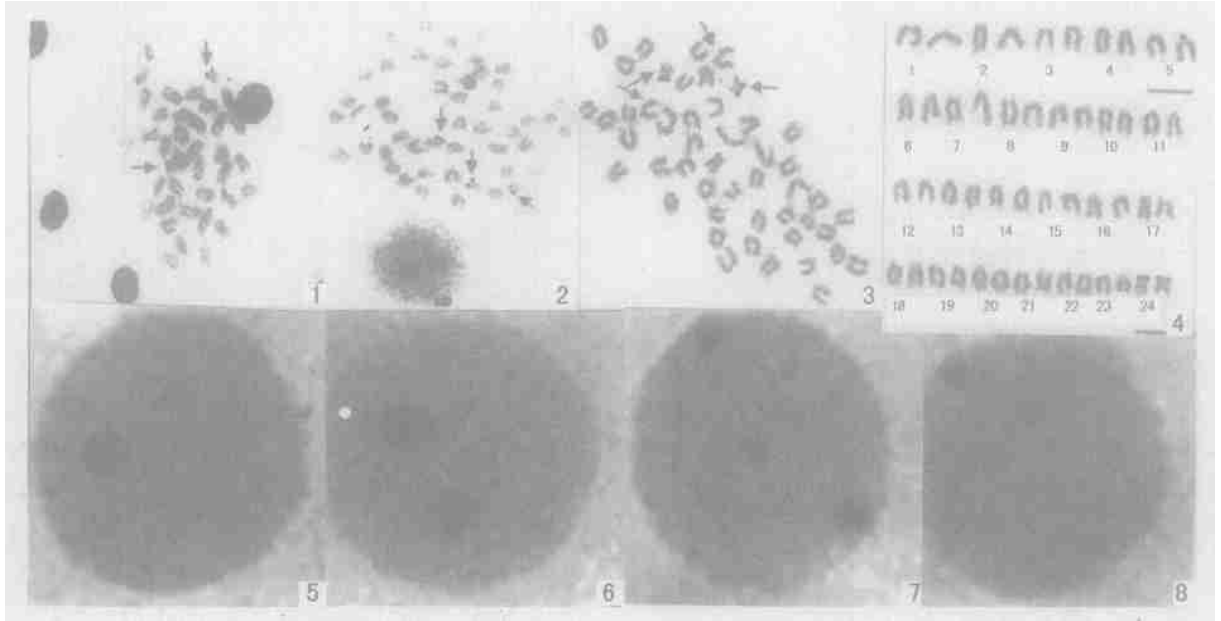


图3 点带石斑鱼中期分裂相染色体的 Ag-NORs 带

Fig. 3 The Ag-NORs from metaphase of *E. malabaricus*

1. 2 个 Ag-NORs 的银染分裂相; 2. 3 个 Ag-NORs 的银染分裂相; 3. 4 个 Ag-NORs 的银染分裂相; 4. 4 个 Ag-NORs 的银染分裂相核型; 5. 具 1 个核仁的间期核; 6. 具 2 个核仁的间期核; 7. 具 3 个核仁的间期核; 8. 具 4 个核仁的间期核。箭头示银染点

1. two Ag-NORs; 2. three Ag-NORs; 3. four Ag-NORs; 4. karyotype of metaphase with four Ag-NORs; 5. the nucleus with one nucleolus; 6. the nucleus with two nucleoli; 7. the nucleus with three nucleoli; 8. the nucleus with four nucleoli. the arrows indicating Ag-NORs

结果得到证实: 点带石斑鱼 t24 染色体几乎整条都为 C 带阳性, 与任修海等^[11]和易梅生等^[12]分别在黄鳍和斑马鱼上发现的臂内居间 C 带有些不同。余先觉等^[7]认为在核型进化中异染色质扩增会导致端着丝粒染色体的近着丝粒端部逐渐产生不同长度的异染色质臂, 并推测为 DNA 扩增的结果, 而呈现 C 带阳性, t24 染色体上的大量异染色质和 NORs 区段的结构异染色质对 NORs 的 rDNA 起到一定程度的保护作用, 在进化上是比较特化的一类。

t24 染色体靠近着丝粒的位置发现次缢痕, 这一结构与 NORs 呈对应关系。至于, t24 同源染色

体在中期分裂相中有少数只有 1 个 Ag-NORs 的现象, 这是由于 t24 同源染色体的异染色质凝聚时控不同, 对 NORs 区的 DNA 保护程度有差异, 致使两条染色体暴露于银染环境下的 rDNA 活性不一致。

异染色质可分为结构异染色质和功能异染色质, 两者都受发育的控制^[12]。在细胞分裂周期中, 随着发育的程序化进程, 异染色质往往在常染色质之后开始凝聚, 但异染色质的凝聚速度比常染色质快几倍, 而且螺旋化程度更高, 对 NORs 区的 rDNA 能起到很好的保护作用, 点带石斑鱼 t24 同源染色体上的异染色质就是这种类型。

奇数间期银染核仁和奇数中期 Ag-NORs 的出现说明点带石斑鱼的 rDNA 活性即使在同源染色体也不一致。在有丝分裂中期相中,t5 染色体有 Ag-NORs 分布,但出现频率较低,同源染色体上的 Ag-NORs 数目不成对应关系,而且有部分银染点重叠。由于 t5 同源染色体没有发现次缢痕,臂内 C 带阴性,这表明在中期它不存在臂异染色质区。所以可以肯定 t5 染色体 Ag-NORs 的变异现象不是异染色质对 rDNA 的保护程度不同所致,而更有可能是点带石斑鱼病变、基因突变的原因,或者就是点带石斑鱼存在的 Ag-NORs 多态现象。

石斑鱼细胞遗传学的研究资料很少,已研究的 6 种石斑鱼有 3 种核型为 $2n = 48 = 48t$,分别是青石斑鱼 (*E. awoara*)^[4]、斑带石斑鱼 (*E. fasciatomaculatus*)^[3] 和黑边石斑鱼 (*E. fasciatus*)^[3]。除 Natarajan 等^[2]可能人为观察误差未发现双棘石斑鱼的次缢痕以外,其它 5 种均在 t24 染色体上发现次缢痕,据此估计 t24 染色体的次缢痕可能是石斑鱼属染色体的共同特征。

参考文献:

- [1] Ojima Y, Hayashi M, Ueno K. Cytogenetic studies in lower vertebrates I. A preliminary report on the chromosomes of the funa (*Carassius auratus*) and goldfish (a revised study) [J]. Proc Japan Acad, 1966, 42(1): 62 - 66.
- [2] Natarajan R, Subrahmanyam K A. Karyotype study of some teleosts from Portonovo water [J]. Proc Indian Acad Sci, 1974, 79: 5.
- [3] 李锡强,彭跃东. 斑带石斑鱼与黑边石斑鱼核型的研究 [J]. 湛江水产学院学报, 1994, 14(2): 22 - 26.
- [4] 杨俊慧,钟扬伟. 青石斑鱼染色体组型初步研究 [J]. 广州师院学报, 1988, 2: 62 - 68.
- [5] 陈毅恒,容寿柏,刘绍琼,等. 六带石斑鱼的核型分析 [J]. 湛江水产学院学报, 1990, 2: 62 - 68.
- [6] 陈毅恒,容寿柏,刘绍琼,等. 鲑点石斑鱼的核型 [J]. 福建水产, 1990, 1: 23 - 25.
- [7] 余先觉,周 瞰,李渝成,等. 中国淡水鱼类染色体 [M]. 北京: 科学出版社, 1989.
- [8] 洪云汉,周 瞰. 无须魮的核型与 C 带带型的研究以及鳊鱼类核型演化的探讨 [J]. 遗传学报, 1985, 12(2): 143 - 149.
- [9] Howell W, Black M. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method [J]. Experientia, 1980, 36: 1014 - 1015.
- [10] 林义浩 (译). 鱼类细胞遗传学 [M]. 广州: 广东科技出版社, 1990. 8 - 33.
- [11] 任修海,余其兴,韦 萍. 黄鳍染色体 Ag-NORs 多态性的研究 [J]. 遗传学报, 1991, 18(4): 304 - 311.
- [12] 易梅生,余其兴,周荣家,等. 斑马鱼的核型、Ag-NORs 及 C 带带型研究 [J]. 遗传, 1997, 19(增刊): 59 - 60.