

布氏石斑鱼的染色体核型、银染和 C-带

蔡 岩^{1,2}, 周永灿^{1,2}, 谢瑞敏¹, 谢珍玉¹, 冯永勤¹, 王世锋^{1*}

(1. 海南大学热带生物资源可持续利用省部共建国家重点实验室培育基地, 海南 海口 570228;

2. 海南大学海洋生物实验教学示范中心, 海南 海口 570228)

摘要: 为了补充布氏石斑鱼细胞遗传学数据, 并为石斑鱼染色体进化研究以及石斑鱼遗传育种等工作奠定基础, 实验利用 Giemsa 染色、C-带和 Ag-NORs 方法对布氏石斑鱼的染色体核型以及异染色质和具有转录活性的核仁组织区在染色体上的分布位置和数量进行了研究。结果表明, 布氏石斑鱼二倍体染色体数目为 48, 其染色体组由 48 条端部着丝粒染色体组成, 绝大多数染色体的着丝粒位置呈异染色质带, 仅在第 24 对染色体靠近着丝粒的位置检测到银染带, 以上结果均表明, 布氏石斑鱼属于较为原始的类群。

关键词: 布氏石斑鱼; 染色体; 核型; 银染; C-带

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

染色体是基因的载体, 除 DNA 外, 染色体中还含有大量的蛋白质和有限的 RNA, 它们与 DNA 共同构成复杂的结构。染色体的数目、形态、减数分裂过程的行为状态以及染色体带型特点都具有种的特异性。开展鱼类染色体研究不仅能了解生物的遗传组成、遗传变异规律和发育机制, 而且对研究种间杂交和鉴定多倍体育种结果等具有重要意义^[1]。

布氏石斑鱼(*Epinephelus bleekeri*)属鲈形目(Perciformes)、鲈亚目(Percoidae)、鲈总科(Percoidae)、鲈科(Serranidae)、石斑鱼属(*Epinephelus*), 俗称芝麻斑, 主要分布于非洲、印度、印度尼西亚、菲律宾、日本和中国南海等海域^[2]。近年在日本、中国、越南和马来西亚等国家均有养殖, 是一种较为重要的经济鱼类。目前, 对布氏石斑鱼的研究主要集中于养殖方面^[3-4], 尚未见对布氏石斑鱼细胞遗传学的研究报道。为此, 本实验采用核型分析、Ag-NORs 和 C-带对布氏石斑鱼的染色体核型特征进行较全面的研究, 旨在为布氏石斑鱼细胞遗传学、自然资源保护、石斑鱼染色体进化研究以及石

斑鱼遗传育种等工作奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用布氏石斑鱼于 2011 年 5 月购自海南省海口市东门市场, 为钓捕的野生活石斑鱼, 共 6 尾, 体质量约 200 g。实验前暂养于海南大学海洋生物实验教学示范中心养殖实验室的玻璃缸中。

1.2 实验方法

染色体标本的制备 参考文献[5]的试验方法, 具体操作如下: 按照 10 μ L/g 尾静脉抽血, 再以 10 μ g/g 鱼体从胸鳍基部注射植物血凝素(PHA)。3.5 h 后, 按照 1 μ g/g 胸鳍基部注射秋水仙素, 15 min 后剪鳃放血, 取头肾制备细胞悬液, 经 500 r/min 离心收集细胞, 加入 0.075 mol/L KCl 溶液 37 $^{\circ}$ C 水浴低渗 30 min, 离心后加入新配制的卡诺氏固定液室温固定 20 min, 之后重复固定 2 次。再次离心后取沉淀, 加入适量新配制的卡诺氏固定液重悬细胞, 用吸管吸取细胞悬液滴在玻片上, 过

收稿日期: 2011-09-16 修回日期: 2011-12-19

资助项目: 国家自然科学基金项目(31060355); 农业科技成果转化项目(2009GB2E200302); 海洋渔业科学与技术浙江省重中之重学科开放课题资助项目(20100115); 海南大学科研启动基金资助项目(kyqd1017); 海南大学“211 工程”研究生科技创新平台建设项目

通讯作者: 王世锋, E-mail: sfwang1977@yahoo.com.cn

酒精灯火焰3次,自然凉干备用。

核型分析 染色体标本经Giemsa染液染色后,置于显微镜下进行观察和拍照。选取来自不同个体的100个分散良好的中期分裂相,在显微镜下进行计数,经统计分析后确定布氏石斑鱼二倍体的染色体数目。选取多个数目完整、形态清晰、分散良好、长度适中、着丝点清楚、两条单体适度分开的分裂相进行显微摄影和测量。计算其相对长度和臂比等,并按Levan^[6]提出的标准进行分类、配对和核型分析。

Ag-NORs 显带 参考文献[7]的方法略作修改,具体步骤如下:将滤纸铺于培养皿底部,用蒸馏水润湿,上面放2根牙签,置于60℃水浴锅中保温;将制备好的新鲜玻片标本样品面朝上平放在培养皿中,在玻片上加20 μL明胶显影液,再加40 μL 50%硝酸银溶液,盖上盖玻片,在水浴锅中温浴至标本呈金褐色为止;用蒸馏水快速冲洗,去除盖玻片,干燥后显微镜观察和拍照。

C-带显带 参考文献[8]的方法略作修改,具体步骤如下:将制备好的标本室温放置1~2周后,以0.2 mol/L HCl处理30 min,50℃1%氢氧化钡溶

液处理12 s,将玻片于62℃ 2×SSC中处理2 h后,再以10% Giemsa染液染色30 min,用双蒸水将玻片冲洗干净,自然晾干后,置显微镜下观察和拍照。

2 结果

2.1 布氏石斑鱼染色体核型

二倍体染色体数目 对布氏石斑鱼100个分散良好的中期分裂进行观察和计数,结果表明,布氏石斑鱼中75%的中期分裂相的二倍体染色体为48条,由此可以判定布氏石斑鱼二倍体染色体数目为48(表1)。

染色体核型 选取形态清晰,着丝点易辨的中期分裂相进行观察、测量和统计分析,获得布氏石斑鱼染色体相对长度和臂比,结果表明,布氏石斑鱼染色体组全部由端部着丝粒染色体构成,其核型公式为 $2n=48t$,染色体臂数(NF)为48(表2)。根据测量结果并结合形态相似性分析,构建了布氏石斑鱼的染色体核型(图1)。由表2和图1可见,在布氏石斑鱼染色体组中,染色体长度从大到小逐渐减小,相邻大小染色体之间大小差异不明显。

Ag-NORs 带型 布氏石斑鱼中期分裂相银

表1 布氏石斑鱼二倍体染色体计数结果
Tab. 1 The diploid chromosome number of *E. bleekeri*

染色体数目(2n) no. of chromosomes	<43	43	44	45	46	47	48	49	50	>50	合计 total
分裂相数目 no. of metaphases	1	1	2	2	9	4	75	3	2	1	100
所占百分比/% percentage	1	1	2	2	9	4	75	3	2	1	100

表2 布氏石斑鱼染色体相对长度(RL)和臂比(AR)
Tab. 2 The arm ratio and relative length of chromosome of *E. bleekeri*

编号 chromosome no.	相对长度 relative length	臂比 arm ratio	类型 type	编号 chromosome no.	相对长度 relative length	臂比 arm ratio	类型 type
1	5.27±0.09	∞	t	13	4.13±0.04	∞	t
2	5.15±0.09	∞	t	14	4.03±0.03	∞	t
3	4.88±0.07	∞	t	15	3.93±0.06	∞	t
4	4.81±0.06	∞	t	16	3.90±0.06	∞	t
5	4.75±0.06	∞	t	17	3.87±0.06	∞	t
6	4.66±0.05	∞	t	18	3.83±0.07	∞	t
7	4.59±0.05	∞	t	19	3.79±0.06	∞	t
8	4.47±0.06	∞	t	20	3.73±0.08	∞	t
9	4.43±0.06	∞	t	21	3.64±0.09	∞	t
10	4.36±0.06	∞	t	22	3.47±0.06	∞	t
11	4.23±0.06	∞	t	23	3.22±0.09	∞	t
12	4.16±0.04	∞	t	24	2.63±0.08	∞	t

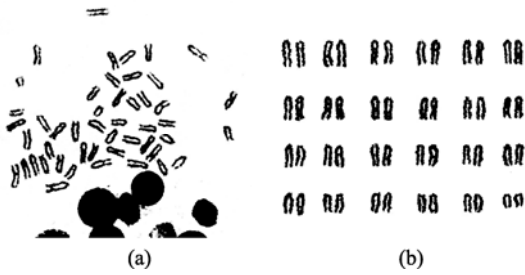


图 1 布氏石斑鱼中期分裂相(a)及染色体核型(b)
 Fig. 1 Metaphase chromosomes (a) and karyotype (b) of *E. bleekeri*

染位点清晰明显, 对 100 个中期分裂相进行观察和统计分析表明, 80% 的中期分裂相在第 24 对同源染色体靠近着丝粒位置可观察到银染位点(图 2); 其它中期分裂相仅能在同源染色体的一条染色体上观察到银染位点。

C-带带型 布氏石斑鱼染色体中期分裂相经 C-带方法处理后, 绝大多数染色体在着丝点位置均有大小不一的异染色带。在不同染色体之间, C-带的着色强度存在一定的差异(图 3)。

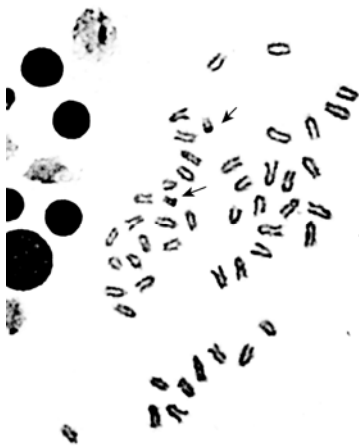


图 2 布氏石斑鱼中期分裂相 Ag-NORs
 箭头所示为第 24 对染色体的 NORs。
 Fig. 2 Metaphase chromosomes of *E. bleekeri* with Ag-NORs
 Arrows showing the NORs on chromosome No.24.

3 讨论

目前, 包括布氏石斑鱼在内, 已研究过染色体基本核型的 24 种石斑鱼的染色体臂数变动范围为 48~62^[9-28], 其中有 13 种保持了鲈形目的原始核型(2n=48t)臂数 48, 其它 11 种石斑鱼的染色体臂数的增加主要是因为这些石斑鱼的染色体组中出现了较多的中部着丝粒和亚中部着丝粒染色体, 如鲑点



图 3 布氏石斑鱼中期分裂相 C-带
 Fig. 3 Metaphase chromosomes of *E. bleekeri* with C-banding

石斑鱼(*E. fario*) (2n=4m+6sm+4st+34t, NF=62)和蜂巢石斑鱼(*E. merra*)(2n=4m+6sm+4st+34t, NF=62)^[20]。有研究指出, 这种染色体数目不变而染色体臂数增加是由染色体着丝粒位置颠倒所致^[29]。李树深^[30]认为, 在特定的分类类群中, 染色体臂数多的类群比染色体臂数少的类群特化。据此, 一般认为在石斑鱼属内, NF 值为 48 的类群属于较原始类群, 而 NF 值大于 48 的则属于较特化类群^[10]。因此, 从基本核型的染色体臂数来看, 布氏石斑鱼在石斑鱼属中应为较原始的类群。

不过, 比较石斑鱼染色体臂数的数据与石斑鱼系统进化研究成果发现, 在石斑鱼属中, 染色体臂数多的类群比染色体臂数少的类群更为特化这一推论似乎并不完全适用。将已进行过核型研究的石斑鱼置于已构建的石斑鱼分子系统进化树^[31-32]中进行分析发现, 尽管具有较大 NF 值的石斑鱼种类多处于石斑鱼系统进化树较为顶端的位置, 但也有部分 NF 值较小石斑鱼种类同样位于系统进化树顶端。如在石斑鱼亚科的 155 种鱼类构建的系统进化树中^[31], 具有较大 NF 值(62)的蜂巢石斑鱼处于进化树顶端, 但与蜂巢石斑鱼同处于一个分支末端的(即亲缘关系最近)黑边石斑鱼和 *E. tauvina*(NF=48)却有较小的 NF 值(48)^[16-17, 19, 31]。这种 NF 值与其进化地位不一致的现象说明仅凭 NF 值, 还不足以判断某物种进化地位的高低。Sola 等^[15]也认为, 除了染色体基础核型外, 核仁组织区和异染色质可能在鲈科染色体进化中起到了重要作用。

因此,判断某一鲷科鱼类的分类地位,除了染色体基础核型,还要结合核仁组织区(NORs)以及异染色质区(C-带)的特征来综合判断。从 NORs 的分布数量和位置上来看,布氏石斑鱼仅在第 24 对端着丝粒染色体靠近着丝粒的位置检测到 1 对 NORs, NORs 位于第 24 对染色体的亚着丝粒位置被认为是石斑鱼属较原始的 NORs 分布模式^[11, 13, 15],这种较原始的 NORs 分布模式占目前已进行过银染研究的 12 种石斑鱼的 58.3%^[12-18]。从异染色质带的分布位置来看,布氏石斑鱼的异染色质带分布于着丝粒位置。迄今已做过 C-带研究的石斑鱼共 8 种^[11-15],除 2 种[黄腹石斑鱼(*E. guaza*)和亚历山大石斑鱼(*E. alexandrinus*)]没有显示异染色质带外,其余 6 种石斑鱼均在绝大多数染色体的着丝粒位置显示出异染色质带,很少存在中间位置染色质带和末端位置染色质带。通常认为着丝粒位置异染色质带是较为原始的模式,而末端位置染色质带和中间位置染色质带是经过各种染色体重排出现的^[28],由此表明,布氏石斑鱼异染色质带具有较高的保守性。综上所述,不管是基础核型、NORs,还是异染色质带分布模式,布氏石斑鱼均维持了较原始的核型特征,应属于石斑鱼属中较为原始的类群。

参考文献:

- [1] 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: 1-3.
- [2] Heemstra P C, Randall J E. Groupers of the world [M]. Rome: FAO Species Catalogue, 1993: 69-101.
- [3] Vo D T, Murrell D, Dalsgaard A, et al. Prevalence of zoonotic metacercariae in two species of grouper, *Epinephelus coioides* and *Epinephelus bleekeri*, and flathead mullet, *Mugil cephalus*, in Vietnam[J]. The Korean Journal of Parasitology, 2008, 46(2): 77-82.
- [4] 黄进光. 橙点石斑鱼驯养与水泥池集约化养殖试验[J]. 水产养殖, 2010(10): 1-3.
- [5] 吉华松,周永灿,蔡岩,等. 六带石斑鱼染色体核型和银染研究 [J]. 水产科学, 2011, 30(8): 465-466.
- [6] Levan A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes [J]. Hereditas, 1964, 52(2): 201-220.
- [7] 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.
- [8] Summer A T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin [J]. Experimental Cell Research, 1972, 75(2): 304-306.
- [9] 郭丰,王军,苏永全,等. 云纹石斑鱼染色体核型研究[J]. 海洋科学, 2006, 30(8): 1-3.
- [10] 钟声平,陈超,王军,等. 七带石斑鱼染色体核型研究[J]. 中国水产科学, 2010, 17(1): 150-155.
- [11] Wang S F, Su Y Q, Ding S X, et al. Cytogenetic analysis of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, using chromosome banding and fluorescence in situ hybridization [J]. Hydrobiologia, 2010, 638(1): 1-10.
- [12] 邹记兴,余其兴,周菲. 点带石斑鱼的核型、C 带、Ag-NORs [J]. 水产学报, 2005, 29(1): 33-37.
- [13] Molina W F, Maja-Lima F A, Affonso P. Divergence between karyotypical pattern and speciation events in Serranidae fish (Perciformes) [J]. Caryologia, 2002, 55 (4): 299-305.
- [14] Martinez G, Thode G, Alvarez M C, et al. C-banding and Ag-NOR reveal heterogeneity among karyotypes of serranids (Perciformes) [J]. Cytobios, 1989, 58: 53-60.
- [15] Sola L, De Innocentiis S, Gornung E, et al. Cytogenetic analysis of *Epinephelus marginatus* (Pisces: Serranidae), with the chromosome localization of the 18S and 5S rRNA genes and of the (TTAGGG)_n telomeric sequence [J]. Marine Biology, 2000, 137(1): 47-51.
- [16] 彭跃东,李锡强. 斑带石斑鱼与黑点石斑鱼核型的研究[J]. 湛江海洋大学学报, 1994, 14(2): 22-26.
- [17] Rodriguez-Daga R, Amores A, Thode G. Karyotype and nucleolus organizer regiones in *Epinephelus caninus* (Pisces, Serranidae) [J]. Caryologia, 1993, 46(1): 71-76.
- [18] Medrano L, Bernardi G, Couturier J, et al. Chromosome banding and genome compartmentalization in fishes [J]. Chromosoma, 1988, 96(2): 178-183.
- [19] 洪满贤,杨俊慧. 青石斑鱼染色体组型的研究 [J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 1988, 6: 714-715.
- [20] 郑莲,刘楚吾,李长玲. 4 种石斑鱼染色体核型研究 [J]. 海洋科学, 2005, 29(4): 51-55.
- [21] Alvarez M C, Thode G, Cano J. Somatic karyotypes of two Mediterranean teleost species: *Phycis phycis* (Gadidae) and *Epinephelus alexandrinus* (Serranidae) [J]. Cytobios, 1983, 38: 91-95.
- [22] De Aguilar C T, Galetti P M. Chromosomal studies in south atlantic serranids (Pisces, Perciformes) [J]. Cytobios, 1997, 89: 105-114.
- [23] 王云新,王宏东,张海发,等. 斜带石斑鱼与赤点石斑鱼的核型研究[J]. 湛江海洋大学学报, 2004, 24(3): 4-8.
- [24] 王德祥,苏永全,王世锋,等. 宽额鲈染色体核型研究及制作方法的比较[J]. 台湾海峡, 2003, 22(4): 465-468.
- [25] 廖经球,尹绍武,陈国华,等. 褐点石斑鱼的核型研究[J]. 水产科学, 2006, 25(11): 567-569.
- [26] Natarajan R, Subrahmanyam K. A karyotype study of some teleost from Portonovo waters [J]. Proceedings: Plant Sciences, 1974, 79(5): 173-196.
- [27] 陈毅恒,容寿柏,刘绍琼. 鲑点石斑鱼的核型[J]. 福建水产, 1990(1): 23-25.

- [28] 王金星, 赵小凡. 斑尾复鰕虎鱼的染色体研究 [J]. 海洋科学, 1994, 4: 47-50.
- [29] Perazzo G, Noleto R B, Vicari M R, *et al.* Chromosomal studies in *Crenicichla lepidota* and *Australoheros facetus* (Cichlidae, Perciformes) from extreme Southern Brazil [J]. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 2011, 21(3): 509-515.
- [30] 李树深. 鱼类细胞分类学 [J]. 生物科学动态, 1981 (2): 8-15.
- [31] Craig M T, Hastings P A. A molecular phylogeny of the groupers of the subfamily Epinephelinae (Serranidae) with a revised classification of the Epinephelini [J]. Ichthyological Research, 2007, 54(1): 1-17.
- [32] Ding S X, Zhuang X, Guo F, *et al.* Molecular phylogenetic relationships of China Seas groupers based on cytochrome *b* gene fragment sequences [J]. Science in China: Series C Life Sciences, 2006, 49(3): 235-242.

A study on the karyotype, Ag-NORs and C-banding in *Epinephelus bleekeri*

CAI Yan^{1,2}, ZHOU Yong-can^{1,2}, XIE Rui-min¹, XIE Zhen-yu¹, FENG Yong-qin¹, WANG Shi-feng^{1*}

(1. Hainan University, State Key Laboratory Breeding Base for Sustainable Exploitation of Tropical Biotic Resources, Haikou 570228, China;

2. Experimental Teaching Demonstration Center of Marine Biology, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: *Epinephelus bleekeri* is important in commercial fisheries of tropical and subtropical seas. It has been broadly cultured in many Asian countries, such as China, Japan, Vietnam and Malaysia. Despite many studies on its culture techniques, the detailed cytogenetic data of this species is still lacking. To add *E. bleekeri* cytogenetic data and lay the foundation for grouper chromosome evolution and breeding studies, the karyotype of *E. bleekeri* was studied in this paper using multiple methods, including Giemsa staining, Ag-NORs and C-banding. The following results were obtained: *E. bleekeri* had a diploid chromosome number of 48 and its karyotype formula was 48t, NF=48, and sex chromosome was not observed; the constitutive heterochromatin was observed at the centromeric region on most chromosomes; but only a single pair of NORs was detected at the paracentromeric region of chromosome pair No.24. Based upon above results, it is concluded that *E. bleekeri* was relatively primitive among genus *Epinephelus*.

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

Corresponding author: WANG Shi-feng. E-mail: sfwang1977@yahoo.com.cn