

## 杂交三倍体泥鳅染色体C带及rDNA序列的FISH定位

周贺<sup>1</sup>, 徐其征<sup>1</sup>, 高养春<sup>2</sup>, 张蕊<sup>1</sup>, 李霞<sup>1</sup>,  
庄子昕<sup>1</sup>, 梁雨婷<sup>1</sup>, 李雅娟<sup>1\*</sup>

(1. 大连海洋大学农业部北方海水增养殖重点实验室, 辽宁大连 116023;

2. 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085)

**摘要:** 对杂交三倍体泥鳅( $4n_{\text{♀}} \times 2n_{\text{♂}}$ )的胚胎染色体进行了C带及染色体荧光原位杂交(FISH)分析, 首次探讨了杂交三倍体泥鳅C带特征, 为准确鉴别染色体提供依据, 研究了核糖体5.8S+28S rDNA在杂交三倍体泥鳅胚胎中期染色体上的数目和位置。C带结果表明, 杂交三倍体泥鳅的染色体C带包括臂端C带和着丝粒C带, 没有发现臂间C带。M染色体只有1号染色体既有臂端C带又有着丝粒C带, 但臂端C带均比着丝粒C带大, 信号也比着丝粒的强; 而其他M染色体及SM染色体、T染色体只有着丝粒C带。FISH分析显示, 核糖体5.8S+28S rDNA清楚地定位在杂交三倍体泥鳅中期染色体中部着丝粒染色体(M)的端部区域, 在杂交三倍体泥鳅中期染色体上可以检测到三簇杂交信号。该结果从分子细胞遗传学层面进一步证实了杂交三倍体泥鳅是含有三套染色体组的遗传三倍体。

**关键词:** 泥鳅; 杂交三倍体; C带; rDNA; FISH

**中图分类号:** Q 343.2; S 965.1

**文献标志码:** A

染色体是遗传物质的载体, 染色体核型分析指经过染色显微观察等方法将生物体细胞内一整套染色体进行分类排列, 是生物细胞遗传学的研究基础。不同物种的染色体核型及带型也不同, 通过对染色体核型研究可为生物分类和系统演化提供科学依据, 同时也可作为研究基因组结构和功能基因组提供基本框架。目前对于鱼类染色体核型分析研究方法的命名和分类标准是由Levan等<sup>[1]</sup>确定的。鱼类染色体具有多且小的特点, 不易分析染色体形态和大小, 但随着近年来生物技术分析水平的不断发展, 鱼类染色体的研究也得到了很大发展。对染色体进行C带处理, 可提高对染色体的辨识水平, 为染色体的分析提供方法。荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)技术作为一种分子细胞学方法, 利用显微镜的高度精确性和抗原抗体反应的高度灵敏性, 将DNA片断与特

定的真核生物细胞的染色体区带联系起来, 并将这些DNA片断予以排列, 这是研究DNA顺序在染色体上相关位置的最直接方法。

泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)隶属于鲤形目(Cypriniformes)、鳅科(Cobitidae)、花鳅亚科(Cobitinae)、泥鳅属(*Misgurnus*), 是一种分布广泛的小型经济鱼类。泥鳅肉质鲜美、营养丰富, 富含蛋白质及多种维生素, 并具有兴阳、补脾益气、祛湿、滋阴清热等药用价值, 被人们称为“水中人参”<sup>[2-3]</sup>。由于泥鳅具有生长快、繁殖周期短、环境适应力强等特点, 还是一种很好的细胞学、遗传学等方面的研究材料。已有的研究报道表明, 除了二倍体之外, 还存在着自然三倍体、自然四倍体<sup>[4-10]</sup>。目前, 我国关于自然多倍体泥鳅的研究, 主要是在核型<sup>[8]</sup>、多倍体鉴定方法<sup>[11]</sup>、细胞色素*b*基因序列分析<sup>[12]</sup>、食性<sup>[5]</sup>等方面。由于泥鳅染色体组中存在形态相

收稿日期: 2017-05-15 修回日期: 2017-06-09

资助项目: 国家自然科学基金(31272650); 辽宁省科学技术基金(201102019)

通信作者: 李雅娟, E-mail: liyajuan@dlou.edu.cn

近、长度分布连续的染色体, 仅凭臂比和相对长度2个参数很难准确辨别。另外关于杂交三倍体泥鳅的染色体组构成尚不清楚。因此, 本研究利用Ba(OH)<sub>2</sub>处理显示杂交三倍体泥鳅C带, 并利用染色体荧光原位杂交技术分析rDNA在杂交三倍体泥鳅中期染色体上的位点数目与分布, 为精确鉴别染色体提供依据, 为杂交三倍体泥鳅染色体组构成提供分子细胞遗传学证据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用天然二倍体泥鳅(2n=50)取自于大连市农贸市场, 自然四倍体泥鳅(4n=100)取自于湖北武汉。所有亲本均通过流式细胞仪确定完倍性, 暂养于细胞遗传与工程实验室水族箱中, 暂养温度为(25±1)°C。

### 1.2 泥鳅催产及杂交

选择性腺发育良好的自然四倍体泥鳅4尾(雌雄各2尾)与大连当地的二倍体泥鳅2尾(雄2尾)进行杂交, 于前一晚注射HCG(雌鱼: 每10 g注射0.1 mL HCG; 雄鱼剂量减半), 12 h后轻压雌泥鳅腹部即有卵排出, 收集于9 cm培养皿中, 雄鱼按生殖孔下边两侧, 用毛细管收集精液于塑料离心管中(用淡水生理盐水稀释100倍), 进行干法受精。设置4♀×2♂和2♀×2♂杂交组合, 2个重复。

### 1.3 幼鱼培育和胚胎染色体的制备

水温控制在(25±1)°C, 经常更换曝气水, 并及时挑出死卵记录数据。待胚胎发育至眼泡期时, 取30~50个胚胎, 在解剖镜下用镊子去卵膜和卵黄后, 放入盛有0.0025%的秋水仙素中处理45 min, 0.8%的柠檬酸钠低渗20 min, 卡诺固定液(甲醇: 冰醋酸=3: 1, 现用现配)固定3次, 每次15 min, 然后放入-20°C中冷冻过夜。使用冷滴片方法滴片, 晾干后阴凉处保存。

### 1.4 染色体C带

将染色体标本放于65°C的干燥箱中老化6 h; 再放入预热至60°C的5% Ba(OH)<sub>2</sub>饱和溶液中, 处理5 min; 并用预热的蒸馏水冲洗, 务必去除沉淀物质, 避免影响后续观察; 冲洗干净后用洗耳球将载玻片吹干, 并将标本放于0.2 mol/L HCl中室温处理11 min; 然后用蒸馏水冲洗3次并

吹干, 再放入预热至60°C的2×SSC溶液中90 min; 蒸馏水冲洗去除2×SSC溶液后自然干燥。完全干燥的染色体载玻片于10%的Giemsa(磷酸缓冲液配制, pH=7.0)染色60 min, 用蒸馏水冲洗, 干燥。将干燥后的载玻片放于Leica DM 2000显微镜下观察, 选取分散状态良好, 染色清晰的胚胎染色体分裂相, 于Leica DF 450 C CCD装置中捕获图像, 并用Leica及Photoshop CS5软件进行图像处理。

### 1.5 荧光原位杂交(FISH)

选取人的5.8S+28S rDNA作为探针, 探针模板由日本北海道大学提供。染色体标本的前处理: 取染色体玻片65°C老化2~3 h; 4×SSC洗脱5 min, 取RNase溶液(0.5 mg/mL)100 μL置于玻片上, 用封口膜盖上, 将玻片放入2×SSC的湿盒中37°C处理30 min; 用尖细镊子小心地移去封口膜, 立即将玻片放入4×SSC溶液浸泡5 min, 再转入装有卡诺固定液(甲醇: 冰醋酸=3: 1)的染色缸中浸泡5 min后取出晾干; 浸入70°C的70%甲酰胺/2×SSC的变性液中, 变性2 min后立即将标本移入-20°C预冷70%酒精中10 min、100%酒精脱水5 min, 然后空气干燥。探针DNA的处理: 按缺口平移试剂盒(Roche 11745824910)用生物素(Biotin-16-dUTP)进行标记; 标记后的探针用纯化混合液(鲑精子DNA和*E.coli*混合液 2 μL, 4 mol/L CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> 2.5 μL, 100%酒精 66 μL)进行纯化; 将探针在75°C恒温水浴10 min, 立即置入0°C中10 min, 使双链DNA探针变性。杂交: 变性后的探针加入杂交混合液(20 mg/mL BSA 10 μL, 20×SSC 10 μL, 灭菌蒸馏水 10 μL, 50%硫酸葡聚糖 20 μL)中涡流振荡混合轻离心, 37°C预杂交30 min; 在已变性并脱水的玻片标本上加50 μL探针—杂交混合液; 盖上封口膜置于2×SSC湿盒中, 37°C杂交18 h以上。杂交后的洗脱: 将标本从37°C恒温箱中取出, 小心揭掉封口膜, 将染色体标本放入50%甲酰胺/2×SSC溶液中, 42°C洗脱20 min; 2×SSC室温下洗脱20 min; 1×SSC室温下洗脱20 min; 4×SSC室温下洗脱5 min。杂交信号检测和放大: 取出玻片标本, 用纸巾将没有染色体的部分擦干, 在有染色体的范围内加入100 μL混合液(500 μL 1%BSA/4×SSC中加入1 μL Avidin-FITC), 盖上封口膜, 置于2×SSC湿盒中, 37°C避光温育1 h; 小心揭掉封口膜, 在水

平往复摇床上经以下液体洗脱(避光),  $4\times\text{SSC}$  50 mL+Triton 50  $\mu\text{L}$  20 min $\rightarrow 4\times\text{SSC}$ 溶液5 min $\rightarrow$ 新的 $4\times\text{SSC}$ 溶液5 min; 在有染色体的范围内加入100  $\mu\text{L}$ 混合液(500  $\mu\text{L}$  1%BSA/ $4\times\text{SSC}$ 中加入10  $\mu\text{L}$  Biotin/anti-avidin D), 盖上新的封口膜, 放入 $2\times\text{SSC}$ 湿盒中,  $37^\circ\text{C}$ 避光温育1 h; 小心揭掉封口膜, 在水平往复摇床上经以下液体洗脱(避光), Triton/ $4\times\text{SSC}$ 溶液20 min $\rightarrow 4\times\text{SSC}$ 溶液5 min $\rightarrow$ 新的 $4\times\text{SSC}$ 溶液5 min。复染和封片: 将杂交后的染色体玻片标本放入 $2\times\text{SSC}$ 溶液中5 min轻洗; 取出后尽力甩去玻片标本表面多余的SSC, 在有染色体处滴入50  $\mu\text{L}$  2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的DAPI/antifade溶液, 指甲油封片, 平放在载玻片夹中冷藏, 3~7 d内观察。用Leica DM 2000荧光显微镜观察杂交信号, Leica DF 450 C CCD装置捕获图像, 利用Leica和Photoshop CS5软件进行图像处理。

## 2 结果

### 2.1 二倍体泥鳅胚胎C带及核型

二倍体泥鳅的染色体包含25对染色体, 按照着丝粒位于染色体上的位置可将这些染色体分为中部着丝粒染色体(M), 亚中部着丝粒染色体(SM)及端部着丝粒染色体(T); 其中M染色体有5对共10条染色体(臂比为1~1.7), SM染色体有2对共4条染色体(臂比大于1.7), T染色体有18对共36条染色体(图1), 即核型公式为 $2n=50=10M+4SM+36T$ 。

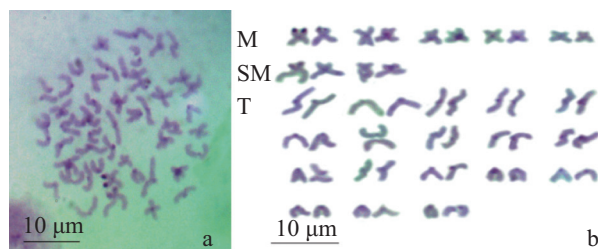


图1 二倍体泥鳅胚胎染色体中期分裂相C带及其核型  
a. C带; b. 核型

Fig. 1 C banding and karyotype of embryo chromosome in diploid loach

a. C-banding; b. karyotype

二倍体泥鳅染色体经酸碱处理并经Giemsa染色后能显示出C带, 按照染色体相对长度的递减顺序并综合考虑染色体分类进行排序(图1-b)。

结果表明, 二倍体泥鳅的染色体C带包括臂端C带、着丝粒C带; M染色体只有1号染色体既有臂端C带又有着丝粒C带, 而且臂端C带均比着丝粒C带大, 信号也比着丝粒位置的强; 其他4对M染色体及SM染色体只有着丝粒C带, T染色体只有着丝粒C带(图1)。

### 2.2 杂交三倍体泥鳅胚胎C带及核型

杂交三倍体泥鳅的染色体分类与二倍体类似, 只是每个染色体有3个同源染色体(图2), 其核型公式为 $3n=75=15M+6SM+54T$ , 染色体组型分析数据如表1所示, 通过对杂交三倍体泥鳅的染色体进行C带处理, 结果表明, 杂交三倍体泥鳅的染色体C带也包括臂端C带、着丝粒C带; M染色体只有1号染色体既有臂端C带又有着丝粒C带, 但臂端C带均比着丝粒C带大, 信号也比着丝粒的强; 其他M染色体及SM染色体只有着丝粒C带, T染色体只有着丝粒C带(图2, 3)。

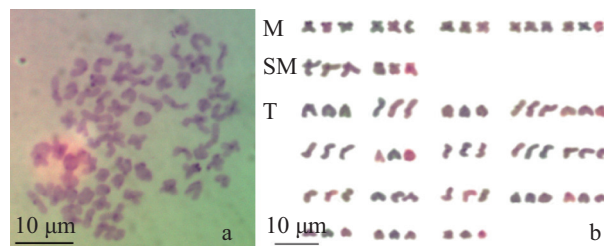


图2 杂交三倍体泥鳅胚胎染色体中期分裂相C带及其核型

a. C带; b. 核型

Fig. 2 C banding and karyotype of embryo chromosome in hybrid triploid loach

a. C banding; b. karyotype

### 2.3 rDNA的FISH分析

利用人的5.8S+28S rDNA为探针, 对杂交后代有丝分裂中期染色体进行荧光原位杂交研究, 染色体经染色后, 在U激发下发出蓝光, 用以杂交检测的FITC在B激发下呈明亮的黄绿色, 黄绿色区域即为5.8S+28S rDNA杂交信号(图4-a)。在泥鳅杂交后代有丝分裂中期染色体中同时发现3个主要的荧光信号清晰地定位于中部着丝粒染色体短臂的端部区域, 根据核型分析分别位于第1对中部着丝粒染色体(M<sub>1</sub>)的端部(图4-b)。信号强度在同源染色体之间有差异, 表现为在两条染色体上的信号强, 在一条染色体上的信号弱。

表 1 杂交三倍体泥鳅染色体核型分析

Tab. 1 The data of the chromosome karyotypical analysis in hybrid triploid loach (mean±SD)

染色体编号 no.	相对长度 relative length	臂比 arm ratio	染色体的 类型 type
1	5.698±0.577	1.14.57±0.174	M
2	5.057±0.243	1.322±0.217	M
3	4.650±0.14.57	1.341±0.187	M
4	4.127±0.312	1.300±0.146	M
5	3.580±0.636	1.241±0.155	M
6	6.627±0.687	2.260±0.435	SM
7	4.954±0.626	2.14.52±0.436	SM
8	5.245±0.302	∞	T
9	4.717±0.261	∞	T
10	4.447±0.173	∞	T
11	4.148±0.146	∞	T
12	4.009±0.139	∞	T
13	3.881±0.117	∞	T
14	3.815±0.130	∞	T
15	3.740±0.127	∞	T
16	3.654±0.147	∞	T
17	3.561±0.156	∞	T
18	3.454±0.140	∞	T
19	3.358±0.107	∞	T
14.5	3.262±0.122	∞	T
21	3.127±0.104	∞	T
22	3.037±0.114	∞	T
23	2.842±0.133	∞	T
24	2.710±0.219	∞	T
14.5	2.299±0.505	∞	T

### 3 讨论

泥鳅的倍性一直受国内外学者所关注。Arai 等<sup>[7]</sup>对日本产自然三倍体泥鳅的分布进行了详细报道,但没有发现自然四倍体。关于我国多倍体泥鳅的分布曾报道存在二倍体(2n=50)、四倍体(4n=100)2个种群<sup>[8-9]</sup>。2006年笔者所在的课题组对我国黑龙江、辽河及长江三大水系的泥鳅倍性的分布情况进行了详细调研,首次发现在

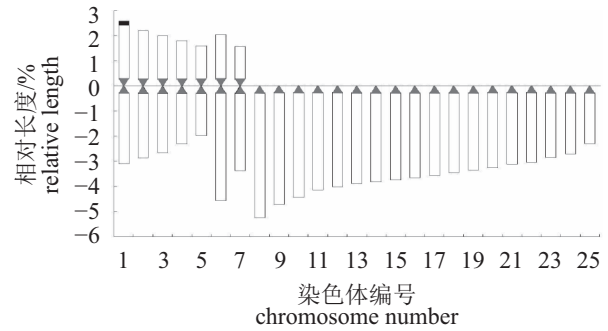


图 3 杂交三倍体泥鳅C显带的染色体组型模式图

Fig. 3 Diagram of C-banding on chromosomes in triploid loach

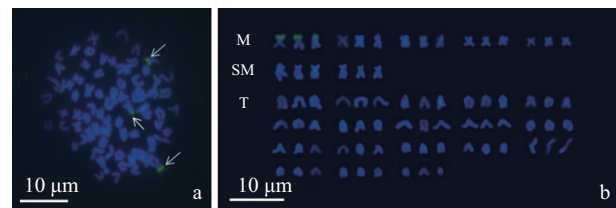


图 4 杂交后代三倍体泥鳅胚胎染色体分裂相FISH及核型

箭头示信号点; a. 杂交三倍体泥鳅胚胎染色体有丝分裂中期分裂相; b. 核型

Fig. 4 FISH in metaphase spread and karyotype of progenies from the triploid mated of loaches

Arrows indicate signal points; a. FISH in metaphase spread of progenies from the triploid mated of loaches; b. karyotype

湖北省的洪湖、赤壁、沙市等3个地方同一栖息场所既有二倍体也有三倍体和四倍体泥鳅<sup>[4]</sup>。自然四倍体泥鳅具有生长快、耗氧率低、营养价值高等特点<sup>[5]</sup>,在遗传育种上有着重要的种质价值,是我国特有的、非常珍贵的种质资源。本研究室通过对自然四倍体泥鳅的染色体数目<sup>[10]</sup>、带型和染色体荧光原位杂交(FISH)<sup>[13]</sup>、生殖细胞(雌、雄)减数分裂行为<sup>[14]</sup>及生殖特性等<sup>[15]</sup>进行了详细研究,从细胞及分子水平上阐明了我国天然四倍体泥鳅含有4套染色体组的遗传四倍体(4n=100)、能产生正常的2n卵子和2n精子、是同源四倍体、正在二倍化途中等重要的遗传学特性。同时利用天然四倍体泥鳅与二倍体泥鳅正、反杂交制备了1种新型的杂交三倍体泥鳅<sup>[16]</sup>。并对染色体数目进行了研究,结果发现大多数染色体数目为75条,说明四倍体产生2n配子,二倍体产生n配子,二者结合产生3n后代<sup>[17]</sup>。本研究所用的亲本是经过流式细胞仪检测确认的

二倍体和四倍体泥鳅, 二倍体泥鳅产生单倍体配子( $n=25$ ), 四倍体泥鳅产生二倍体配子( $2n=50$ ), 二者杂交应获得三倍体( $3n=75$ ), 研究结果显示, 无论C带还是FISH染色体中期分裂相的染色体数目均为75条, 可认为是真杂种。

近半个世纪以来, C带技术已经在多种鱼类染色体分析研究中得到了应用<sup>[18-21]</sup>。但国内外有关于泥鳅C带的研究却鲜有报道, 有关杂交三倍体泥鳅的研究更少。例如, 常重杰等<sup>[22]</sup>利用高盐高碱溶液对桂林雁山的二倍体泥鳅进行C带处理, 结果表明桂林雁山的二倍体泥鳅的核型公式为 $2n=50=8M+6SM+36T$ , 染色体中具有臂端C带和着丝粒C带, 而且2对臂端C带分别位于SM3和T3 2对染色体的长臂端部。本研究利用杂交三倍体泥鳅为实验材料, 研究结果显示杂交三倍体泥鳅的核型公式为 $3n=75=15M+6SM+54T$ 。与常重杰等<sup>[22]</sup>的研究结果类似, 染色体中同样具有臂端C带及着丝粒C带, 并没有发现臂间C带。但与之不同的是, 本研究结果显示杂交三倍体的臂端C带位于M1短臂端部, 并且三倍体有3对臂端C带。分析出现此差异的原因可能有以下三点: 一是地域隔离, 不同地域的二倍体泥鳅可能出现了分化或变异, 从而导致结果上有所差异; 二是由于泥鳅染色体很多, 显得密集但却很小, 因此不易于观察、计数和处理; 三是具体实验操作方法不同所导致, 例如在染色体制备时药品处理时间和药品浓度都会有所影响。李新江等<sup>[23]</sup>对中国产的2种癩蝗染色体进行了C带研究, 结果表明这2种癩蝗的着丝粒C带的染色强度有较大的差异; 邹记兴等<sup>[18]</sup>的研究表明, 点带石斑鱼(*Epinephelus malabaricus*)核型中最短的一对同源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。

rDNA在染色体上分布的数目和具体定位可作为标记来识别染色体以及分析多倍体物种的进化过程, 同时rDNA在染色体上的定位可以对传统核型的分析进行校正, 尤其对于染色体较小且形态特征不明显的材料, 可以提高同源染色体配对的准确性。利用FISH技术, 通过定位rDNA研究核仁组织区(NORs), 从而为鱼类染色体结构和功能分析提供理论基础。与其他方法不同的是, FISH技术不依赖物种的核仁组织区是否有转录活性, 而是直接针对rDNA。Sola

等<sup>[24]</sup>以18S rDNA为探针对杜氏鲷(*Seriola dumerili*)进行了FISH分析, 结果显示所有的NORs都有转录活性; 而Pendás等<sup>[25]</sup>以rDNA为探针, 在对鳟的FISH分析中得到了没有转录活性的NORs位点。Li等<sup>[13]</sup>对我国自然二倍体和四倍体泥鳅进行了核糖体5.8S+28S rDNA的FISH定位研究, 结果表明, 在二倍体泥鳅中期分裂相中有2簇杂交信号、四倍体泥鳅中期分裂相中有4簇杂交信号, 均位于第1对中部着丝粒染色体( $M_1$ )的端部区域, 即核仁组织区(NORs), 进而可推测自然四倍体是同源四倍体。本研究利用FISH技术对杂交三倍体泥鳅rDNA序列进行定位分析, 结果显示在正反杂交后代泥鳅有丝分裂中期染色体中同时发现3个主要的荧光信号, 清晰地定位于第一对中部着丝粒染色体( $M_1$ )的端部区域。

本实验通过对杂交三倍体泥鳅染色体进行C带处理和rDNA的FISH分析, 研究表明杂交三倍体泥鳅的核型公式为 $3n=75=15M+6SM+54T$ , 杂交三倍体泥鳅的染色体C带也包括臂端C带、着丝粒C带; M染色体只有1号染色体既有臂端C带又有着丝粒C带, 但臂端C带均比着丝粒C带大, 信号也比着丝粒的强; 而其他M染色体及SM染色体只有着丝粒C带, T染色体只有着丝粒C带。并发现在杂交三倍体泥鳅染色体的第一对中部着丝粒染色体( $M_1$ )上出现了3个荧光信号点, 为杂交三倍体泥鳅染色体的分辨提供了新的特征与标记, 同时为以后的研究奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] Levan A, Fredga K, Sandberg A A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes[J]. Hereditas, 1964, 52(2): 201-220.
- [2] Speicher M R, Ballard S G, Ward D C. Computer image analysis of combinatorial multi-fluor FISH[J]. Bioimaging, 1996, 4(2): 52-64.
- [3] 刘孝华. 泥鳅的生物学特性及养殖技术[J]. 湖北农业科学, 2008, 47(1): 93-95.  
Liu X H. Biological characteristics and cultivation of loach[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2008, 47(1): 93-95(in Chinese).
- [4] 李雅娟, 印傑, 王嘉博, 等. 中国におけるドジョウ倍数体の分布に関する研究[J]. 日本水産学会誌, 2008, 74(2): 177-182.  
Li Y J, Yin J, Wang J B, et al. A study on the distribu-

- tion of polyploid loaches in China[J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 2008, 74(2): 177-182.
- [ 5 ] 印杰, 赵振山, 陈小奇, 等. 二倍体和四倍体泥鳅染色体组型比较[J]. *水生生物学报*, 2005, 29(4): 469-472.
- Yin J, Zhao Z S, Chen X Q, *et al.* Karyotype comparison of diploid and tetraploid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, 29(4): 469-472(in Chinese).
- [ 6 ] 周小云. 湖北省多倍体泥鳅分布格局及泥鳅育种基础研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
- Zhou X Y. Biogeographic patterns of polyploid *Misgurnus anguillicaudatus* in Hubei Province and basic studies on its breeding[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2009 (in Chinese).
- [ 7 ] Arai K, Matsubara K, Suzuki R. Karyotype and erythrocyte size of spontaneous tetraploidy and triploidy in the loach *Misgurnus anguillicaudatus*[J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1991, 57(12): 2167-2172.
- [ 8 ] 李渝成, 李康. 马口鱼和泥鳅的核型研究, 兼论鱼类染色体数目多态与分类的关系[J]. *武汉大学学报(自然科学版)*, 1987(1): 107-112+132.
- Li Y C, Li K. Karyotypes of *Opsariichthys bidens* and *Misgurnus anguillicaudatus* (Pisces), with a consideration of the relationship between polymorphism of chromosome number and taxonomy of fish[J]. *Journal of Wuhan University (Natural Science Edition)*, 1987(1): 107-112+132(in Chinese).
- [ 9 ] 李康, 李渝成, 周瞰. 两种泥鳅染色体组型的比较研究[J]. *动物学研究*, 1983, 4(1): 75-81, 112.
- Li K, Li Y C, Zhou T. A comparative study of the karyotypes in two species of mud loaches[J]. *Zoological Research*, 1983, 4(1): 75-81, 112(in Chinese).
- [10] 李雅娟, 田萍萍, 李莹, 等. 中国洪湖不同倍性泥鳅的染色体组型及形态特征比较分析[J]. *大连水产学院学报*, 2009, 24(3): 236-241.
- Li Y J, Tian P P, Li Y, *et al.* Comparison of karyotypes and morphological characteristics in oriental weather fish with different ploidy from Honghu Lake[J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2009, 24(3): 236-241(in Chinese).
- [11] 高泽霞, 王卫民, 周小云. 2种鉴定泥鳅多倍体方法的比较[J]. *华中农业大学学报*, 2007, 26(4): 524-527.
- Gao Z X, Wang W M, Zhou X Y. Comparison of two identification methods on ploidy of weather Loach, *Misgurnus anguillicaudatus*[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2007, 26(4): 524-527(in Chinese).
- [12] 杨承泰, 王卫民, 曹玲, 等. 二倍体泥鳅线粒体细胞色素b基因的序列分析[J]. *水产科学*, 2007, 26(12): 652-655.
- Yang C T, Wang W M, Cao L, *et al.* Sequence analysis of coding region in mitochondrial cytochrome b gene from diploid oriental weather fish *Misgurnus anguillicaudatus*[J]. *Fisheries Science*, 2007, 26(12): 652-655(in Chinese).
- [13] Li Y J, Tian Y, Zhang M Z, *et al.* Chromosome banding and FISH with rDNA probe in the diploid and tetraploid Loach *Misgurnus anguillicaudatus*[J]. *Ichthyological Research*, 2010, 57(4): 358-366.
- [14] Li Y J, Yu Z, Zhang M Z, *et al.* The origin of natural tetraploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae) inferred from meiotic chromosome configurations[J]. *Genetica*, 2011, 139(6): 805-811.
- [15] Li Y J, Zhang M Z, Qian C, *et al.* Fertility and ploidy of gametes of diploid, triploid and tetraploid loaches, *Misgurnus anguillicaudatus*, in China[J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2012, 28(6): 900-905.
- [16] 李雅娟, 庞义猛, 于卓, 等. 利用天然四倍体泥鳅生产全三倍体泥鳅的初步研究[J]. *东北农业大学学报*, 2010, 41(11): 92-96.
- Li Y J, Pang Y M, Yu Z, *et al.* Study on all-triploid production by crossing *Misgurnus anguillicaudatus* tetraploids and diploids[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2010, 41(11): 92-96(in Chinese).
- [17] 李雅娟, 钱聪, 印杰, 等. 不同倍性泥鳅杂交后代染色体数目组成的研究[J]. *大连海洋大学学报*, 2012, 27(4): 326-332.
- Li Y J, Qian C, Yin J, *et al.* The chromosome sets stability of hybrid progeny in different ploidy loach[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2012, 27(4): 326-332(in Chinese).
- [18] 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.
- Zou J X, Yu Q X, Zhou F. The karyotypes, C-bands patterns and Ag-NORs of *Epinephelus malabaricus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(1): 33-37(in Chinese).
- [19] 张德华. 琴鱼的核型、C带和银染分析[J]. *淡水渔业*, 2007, 37(2): 16-19.

- Zhang D H. The karyotypes, C-bands and Ag-NORs of *Ctenogobius giurinus*[J]. Freshwater Fisheries, 2007, 37(2): 16-19(in Chinese).
- [20] 陈友铃, 汪彦悛, 吴文珊, 等. 星丽鱼和天使鱼的核型及银染和C带[J]. 动物学杂志, 2005, 40(6): 84-90.
- Chen Y L, Wang Y Y, Wu W S, *et al.* Analysis of chromosome complement C-banding and Ag-NORs of *Astrototus ocellatus* and *Pterophyllum scalare*[J]. Chinese Journal of Zoology, 2005, 40(6): 84-90(in Chinese).
- [21] 蔡明夷, 刘贤德, 陈紫莹, 等. 皱纹盘鲍染色体C带和rDNA定位[J]. 水产学报, 2013, 37(7): 1002-1008.
- Cai M Y, Liu X D, Chen Z Y, *et al.* Characterization of Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*) karyotype by C-banding and fluorescence in situ hybridization with rDNA[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(7): 1002-1008(in Chinese).
- [22] 常重杰, 杜启艳, 余其兴. 泥鳅的Ag-NORs带和C带研究[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2000, 28(2): 71-73.
- Chang C J, Du Q Y, Yu Q X. Studies on the Ag-NORs and C-banding of *Misgurnus anguillicaudatus*[J]. Journal of Henan Normal University (Natural Science), 2000, 28(2): 71-73(in Chinese).
- [23] 李新江, 张道川, 王文强, 等. 中国二种癩蝗染色体C带核型[J]. 昆虫知识, 2008, 45(4): 549-553.
- Li X J, Zhang D C, Wang W Q, *et al.* The chromosomal C-banding karyotypes of two pamphagid species from China[J]. Chinese Bulletin of Entomology, 2008, 45(4): 549-553(in Chinese).
- [24] Sola L, Cipelli O, Gornung E, *et al.* Cytogenetic characterization of the greater amberjack, *Seriola dumerili* (Pisces: Carangidae), by different staining techniques and fluorescence in situ hybridization[J]. Marine Biology, 1997, 128(4): 573-577.
- [25] Pendás A M, Morán P, García-Vázquez E. Multi-chromosomal location of ribosomal RNA genes and heterochromatin association in brown trout[J]. Chromosome Research, 1993, 1(1): 63-67.

## Characterization of hybrid triploid loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) karyotype by C-banding and fluorescence in situ hybridization with rDNA

ZHOU He<sup>1</sup>, XU Qizheng<sup>1</sup>, GAO Yangchun<sup>2</sup>, ZHANG Rui<sup>1</sup>,  
LI Xia<sup>1</sup>, ZHUANG Zixin<sup>1</sup>, LIANG Yuting<sup>1</sup>, LI Yajuan<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Mariculture & Stock Enhancement in North China's Sea, Ministry of Agriculture,  
Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

2. Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

**Abstract:** The embryonic chromosomes of hybrid triploid loach ( $4n_{\text{♀}} \times 2n_{\text{♂}}$ ), *Misgurnus anguillicaudatus*, were examined by C-banding and fluorescence in situ hybridization (FISH). The characteristics of C-band of hybrid triploid loach were discussed for the first time, so as to provide the basis for identifying chromosomes accurately. Meanwhile, the number and position of ribosomal 5.8S+28S rDNA in the metaphase chromosomes of hybrid triploid loach embryos were studied. The results of C-banding in embryonic chromosomes of hybrid triploid loach show that, C-bands were classified into types of terminals and centromeres, but no middle type of arm was observed. The type of terminals were located on terminal of short arm of M1, whereas, compared with the type of centromeres, bigger and more obvious C-band was found on terminal of short arm of M1. While the other M chromosomes and SM chromosomes and T chromosomes only have centromeric C-band. The results of FISH show that, ribosomal 5.8S+28S rDNA was clearly localized in the region of terminal of middle centromere (M) of the metaphase chromosome of the hybrid triploid loach. Three hybrid signals could be detected in metaphase chromosomes of hybrid triploid loach. The results further confirmed that the hybrid triploid loach is a genetic triploid with three sets of chromosomes from the aspect of molecular cytogenetics.

**Key words:** *Misgurnus anguillicaudatus*; hybrid triploid; chromosome banding; rDNA; fluorescence in situ hybridization (FISH)

**Corresponding author:** LI Yajuan. E-mail: liyajuan@dlou.edu.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31272650); Natural Science Foundation of Liaoning Province (201102019)