

美国红鱼(*Sciaenops ocellata*)的核型、Ag-NORs 和 C-带分析*

王晓艳¹ 王世锋² 张建设¹ 吴常文¹

(1. 浙江海洋学院海洋科学学院 国家海洋设施养殖工程技术研究中心 舟山 316004;

2. 海南大学 热带生物资源教育部重点实验室 海口 570228)

提要 采用常规核型分析、Ag-NORs 及 C-带技术对美国红鱼的核型特征进行了研究。结果表明,美国红鱼二倍体染色体数目为 48, 48 条染色体均为端部着丝粒染色体,核型公式为 $2n=48t$, $NF=48$;核仁组织区位于第 1 对同源染色体靠近着丝粒的位置;美国红鱼所有染色体的着丝粒位置显示为 C-带阳性,同时发现核仁组织区也表现为异染色质;第 1 对染色体表现为长度多态性,与核仁组织区多态性相关,而非性染色体。

关键词 美国红鱼,核型,Ag-NORs,C-带

中图分类号 Q23

目前对于美国红鱼的研究主要集中在养殖技术及营养成分分析方面,对其耐流性也有所研究(王萍等,2010),而在细胞遗传学研究方面,仅见尤锋等(1998)对美国红鱼的染色体核型分析。

随着染色体分带技术(如 NOR 带、C-带、Q-带、G-带、R-带和荧光带)的出现,使得对于染色体数和各对染色体的鉴定更加准确和方便,由于所呈现出来的带纹是染色体固有结构的反映,因此对遗传育种有重要意义;同时,便于追踪某一特定染色体在遗传或杂交中的去向,也为进一步认识染色体的结构和功能提供了一种有利的分析手段(李梅,1991)。

由于鱼类染色体相对于植物、昆虫和哺乳动物的要小,以及无法得到稳定的 G 带、R 带等技术难题的限制,对于绝大多数鱼类染色体的研究局限于核型的分析,且描述过染色体核型的鱼类尚不足鱼类总数的 10% (邹记兴等,2005)。在石首鱼科已报道过染色体核型的鱼类中(尤锋等,1998;王德祥等,2002,2006;王金星等,1994;王世锋等,2003),除岱衢族大黄鱼外,其它鱼类均为端部着丝粒染色体,可见石首

鱼科鱼类组型具有很高的保守性。那么,鱼类如何既保持高稳定性的染色体组型又分化出繁多的生物类群,这已经无法在染色体核型上得到体现,很可能会体现在染色体结构的细微差异上。目前对于石首鱼科鱼类染色体的研究尚局限于核型分析,故本研究拟从染色体核型、Ag-NORs (银染核仁组织区, Silver-Stained Nucleolar Organizer Regions)及 C-带对美国红鱼进行多方面研究,以期对石首鱼科鱼类的染色体进化提供数据资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

美国红鱼(*Sciaenops ocellata*) 10 尾(6♂, 4♀),购自浙江省舟山市普陀东方水产养殖开发有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 染色体标本制备 参照王德祥等(2002)的方法并稍作修改。样品个体按 1ml/100g 鱼体重抽血和 20×10^{-6} g/g 鱼体重胸鳍基部注射植物血凝素(PHA), 3.5h 后以 3×10^{-6} g/g 鱼体重注射秋水仙碱, 15min 后剪

* 国家科技支撑计划项目, 2011BAD13B08 号; 国家自然科学基金项目, 31060355 号; 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 号。王晓艳, E-mail: wxy3937@163.com

通讯作者: 吴常文, 教授, E-mail: wucw08@126.com

收稿日期: 2010-10-19, 收修改稿日期: 2010-12-26

鳃放血取头肾。在生理盐水中将头肾剪碎, 静置, 取上层细胞悬液 1000r/min 离心, 收集的头肾细胞重悬于 0.075mol/L 的 KCl 溶液中, 37℃ 低渗 30min。离心收集细胞后利用卡诺氏固定液(甲醇 : 冰乙酸 = 3 : 1, V/V)进行固定, 连续固定 3 次, 空气干燥法制片。

1.2.2 核型分析 制备的染色体标本经 10% Giemsa 染色 20min, 蒸馏水冲洗, 自然晾干后进行显微观察和拍照。选择分散良好、形态清晰、两条臂适当分开且数目完整的中期分裂相约 100 个进行拍照。进行染色体计数、测量, 并根据 Levan 等(1964)的分类标准进行染色体配对、分组, 制作核型图。

1.2.3 Ag-NORs 按照 Howell 等(1980)的方法略加修改。50%硝酸银与 20%明胶显影液按 2 : 1 (V/V) 混匀后加于新制备的标本上, 加盖盖玻片, 60℃ 温浴至标本呈金黄色时移除盖玻片并迅速用蒸馏水冲洗, 晾干后即可用于观察, 拍照。

1.2.4 C-带 参照 Sumner(1972)的方法略作修改。将老化 1—2 周的染色体标本, 在 0.2mol/L HCl 中处理 30min, 漂洗晾干, 置 1%氢氧化钡溶液(50℃)中处理 10—16s 后漂洗晾干, 然后在 2×SSC (62℃)中温浴 2h 后漂洗晾干, 最后用 10% Giemsa 染色 20min, 双蒸水漂洗, 晾干后即可用于观察和拍照。

2 试验结果

2.1 美国红鱼的核型

对 120 个分散良好的中期分裂相进行计数, 美国红鱼二倍体染色体数为 48 的约占所统计中期分裂相数目的 87%, 占绝对优势, 由此可以判定美国红鱼的

二倍体染色体数目为 48。在观察的中期分裂相中, 各染色体均未发现随体和次缢痕, 第 1 对染色体呈现长度多态性。选取 10 个分散良好, 形态清晰的中期分裂相进行测量和统计分析, 获得美国红鱼染色体的相对长度[染色体相对长度=(染色体长度/染色体组总长度)×100%], 臂比及其核型, 如图 1 和表 1 所示。由图 1 和表 1 可见, 24 对染色体均为端部着丝粒染色体, 美国红鱼的核型公式为 $2n = 48t$, 臂数(NF)为 48。

2.2 美国红鱼的 Ag-NORs

美国红鱼染色体标本经银染后, 利用显微镜对 96 个中期分裂相进行观察与分析, 中期分裂相最多具有 2 个银染位点, 且所观察的中期分裂相绝大多数具有 2 个银染位点, 故判定美国红鱼的 Ag-NORs 的数目为 2, 位于第 1 对染色体靠近着丝点位置。在间期核中, 银染核仁的数目以 1 个或 2 个居多, 最多达 11 个。在第 1 对染色体的 1 条同源染色体上, 核仁组织区呈串联形式排列(图 2A)或非串联形式排列, 表现为形态多态性。

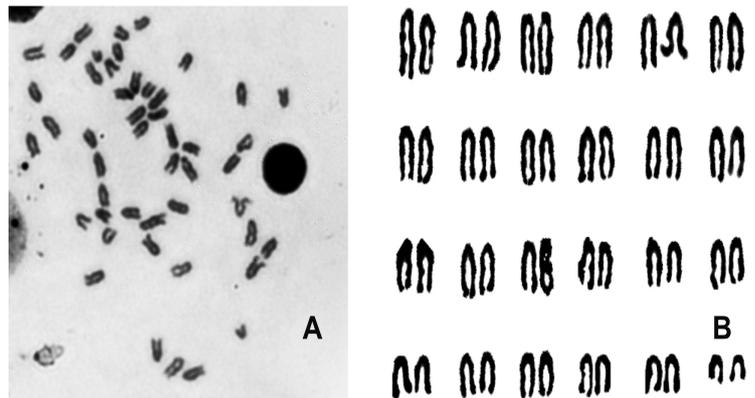


图 1 美国红鱼染色体中期分裂相(A)及核型(B)

Fig.1 The chromosome metaphase (A) and karyotype (B) of *S. ocellata*

表 1 美国红鱼染色体相对长度及臂比

Tab.1 The relative length and ratio of chromosome in *S. ocellata*

| 编号 | 染色体相对长度 | 臂比 | 分组 | 编号 | 染色体相对长度 | 臂比 | 分组 |
|----|-----------|----|----|----|-----------|----|----|
| 1 | 5.31±0.21 | | t | 13 | 4.17±0.04 | | t |
| 2 | 5.04±0.11 | | t | 14 | 4.10±0.06 | | t |
| 3 | 4.92±0.06 | | t | 15 | 4.02±0.09 | | t |
| 4 | 4.82±0.05 | | t | 16 | 3.94±0.08 | | t |
| 5 | 4.71±0.06 | | t | 17 | 3.86±0.07 | | t |
| 6 | 4.66±0.06 | | t | 18 | 3.75±0.06 | | t |
| 7 | 4.59±0.05 | | t | 19 | 3.67±0.05 | | t |
| 8 | 4.54±0.07 | | t | 20 | 3.63±0.08 | | t |
| 9 | 4.47±0.06 | | t | 21 | 3.55±0.09 | | t |
| 10 | 4.39±0.06 | | t | 22 | 3.46±0.08 | | t |
| 11 | 4.35±0.06 | | t | 23 | 3.28±0.15 | | t |
| 12 | 4.24±0.04 | | t | 24 | 2.53±0.34 | | t |

2.3 美国红鱼的 C-带

染色体上异染色质处不易被碱性溶液抽提掉, 呈现 C-带阳性。美国红鱼染色体标本经 C-带处理后, 48 条染色体上均具有着丝粒带, 同源染色体 C-带的大小、位置及着色强度基本相同, 非同源染色体 C-带着色强度有一定差异。在第 1 对染色体上具有居间带, 其位置与银染带相对应, 随核仁组织区大小变化而出现同源染色体上异染色质带大小差异(图 2B)。

3 讨论

迄今为止, 国内已进行过染色体核型分析的石首鱼科(Sciaenidae)鱼类, 有皮氏叫姑鱼(王金星等, 1994)、黄姑鱼(王金星等, 1994)、小黄鱼(王金星等, 1994)、美国红鱼(尤锋等, 1998)、双棘黄姑鱼(王世锋等, 2003)、鲩状黄姑鱼(王德祥等, 2002)和大黄鱼(王德祥等, 2006)共 7 种, 这 7 种鱼类二倍体染色体数目均为 48, 其染色体臂数存在一定差异。其中, 除岱衢族大黄鱼(王德祥等, 2006)染色体组中具有 12 条双臂染色体, 染色体臂数为 60, 其它 6 种石首鱼科鱼类染色体组均由 48 条端部着丝粒染色体构成, 染色体臂数为 48。Ohno(1970)认为, 海水鱼类的原始核型是由 48 条端着丝粒染色体构成的。由此可见, 石首鱼在其核型演化过程中具有较高的保守性。

NORs 的重要特征是多态性, 其多态性主要分为两类: 数目多态性和形态多态性。本研究中发现 NORs 具有形态多态性, 表现为 Ag-NORs 的重复, 即在同一条染色体上出现两个呈串联形式排列的 Ag-NORs, 重复后的 Ag-NORs 相当于未重复的两倍左右, 而其 NORs 在数目上具有较强的保守性。位于染色体端部位置的 NORs 被认为是包括鱼类在内的

所有生物的 NORs 原始类型, 而位于染色体臂内的 NORs 可能是进化中特化的表现。美国红鱼染色体 Ag-NORs 处于臂内位置, 可能是美国红鱼进化中的特化标志。

鱼类染色体上的 NORs 区域常常表现为异染色质带。如 Fujiwara 等(2007)对日本比目鱼(*Paralichthys olivaceus*)进行 Ag-NORs 和 C-带研究结果显示, 其 C-带与核仁组织区大小和位置相对应, 相同的情况也在 *Astronotus ocellatus* (Mazzuchelli *et al*, 2009)、*Baryancistrus aff. niveatus* (Augusto *et al*, 2004)、鲶鱼(*Wertheimeria maculata*, Hassar *wilderi*, *Rineloricaria pentamaculata*) (Porto *et al*, 2011)、*Canthigaster figueiredoi* (Martinez *et al*, 2010)中发现。本研究对美国红鱼 C-带和 Ag-NORs 带进行了大量观察, 比较分析后认为, 美国红鱼核仁组织区与上述鱼类一样, 也表现为异染色质带。

Swarça 等(2006)曾对 *S. melanodermatum* 的染色体进行研究, 发现在雄性个体染色体中, 其 9 号染色体和 14 号染色体无法配对, 而雌性个体染色体所有同源染色体大小相同, 因此, 认为该种鱼类决定性别的染色体类型为 XX/XY。不过, Matoso 等(2011)通过对 55 条 *S. melanodermatum* 进行了大量研究, 结果发现在 Swarça 等(2006)研究中所指出的性染色体, 与性别并没有对应关系, 仅仅是该鱼染色体存在的一种染色体长度多态性现象, 而非性染色体。这种同源染色体表现为大小异形, 但非性染色体的现象在鱼类染色体研究中经常被报道, 如 Ocalewicz 等(2008)在对大西洋鳊的研究以及 Mazzuchelli 等(2009)对星丽鱼(*Astronotus ocellatus*)研究均发现, 这两种鱼类的第 1 对同源染色体显示为长度多态性, 此多态性随核仁组织区的大小而变化, 而与性别无关。同样, Fujiwara 等(2007)对 16 尾日本比目鱼研究发现, 其中有 14 尾个体染色体 Ag-NORs 异形, 长度差异明显, 较长染色体伴有 Ag-NORs 串联排列现象, 并且与异染色质大小相一致, 表现为多态性, 但与性别没有任何关系。在本研究中发现, 美国红鱼第 1 对染色体, 其大小、银染带和异染色质带的大小均存在差异。通过对 10 条鱼进行研究发现, 美国红鱼第 1 对染色体

的大小差异与核仁组织区多态性相关, 随核仁组织区加倍出现长度差异, 属染色体多态性

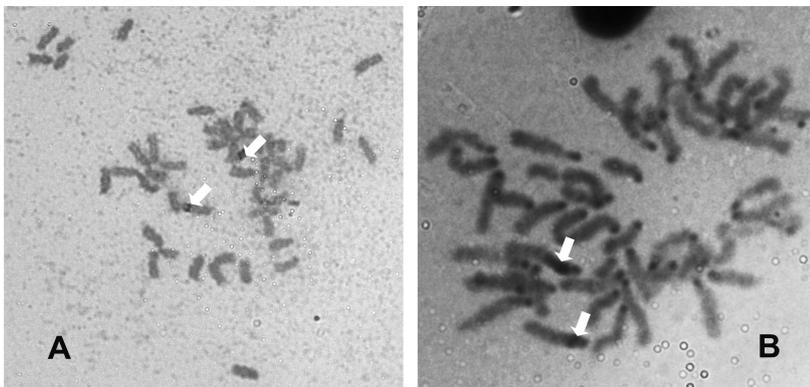


图 2 美国红鱼的银染中期分裂相(A)和 C-带中期分裂相(B)

Fig.2 The silver-staining metaphase (A) and C-banding metaphase (B) of *S. ocellatus*
注: 箭头所示为第 1 对染色体

现象, 而非性别相关染色体。

参 考 文 献

- 王 萍, 桂福坤, 吴常文, 2010. 美国红鱼(*Sciaenops ocellatus*)、鲈鱼(*Lateolabrax maculatus*)、斜带髭鲷(*Haplogenys nitens*)耐流性试验研究. 海洋与湖沼, 41(6): 923—929
- 王世锋, 王德祥, 苏永全等, 2003. 双棘黄姑鱼染色体组型分析. 厦门大学学报(自然科学版), 42(5): 682—684
- 王金星, 赵小凡, 王相民等, 1994. 鲱形目和鲈形目七种鱼的核型分析. 动物学研究, 15(2): 76—79
- 王德祥, 王 军, 郭 丰等, 2002. 鲩状黄姑鱼染色体核型的研究. 海洋科学, 26(11): 68—70
- 王德祥, 苏永全, 王世锋等, 2006. 不同地理种群大黄鱼染色体核型的比较研究. 海洋学报, 28(6): 176—178
- 尤 锋, 刘 静, 徐 成, 1998. 美国红鱼(*Sciaenops ocellatus*)的核型研究. 海洋科学, 22(2): 51—53
- 李 桐, 1991. 染色体遗传学. 长沙: 湖南科学技术出版社, 55—81
- 邹记兴, 余其兴, 周 菲, 2005. 点带石斑鱼的核型、C 带、Ag-NORs. 水产学报, 29(1): 33—37
- Augusto C, Paes de Souza, Aline L N *et al*, 2004. Karyotypic analysis of *Baryancistrus* aff. *niveatus* (ancistrinae, loricariidae) by C-banding, Ag-NOR, CMA₃, DAPI and FISH. Caryologia, 57(3): 219—223
- Fujiwara A, Fujiwara M, Nishida-Umehara C *et al*, 2007. Characterization of Japanese flounder karyotype by chromosome bandings and fluorescence *in situ* hybridization with DNA markers. Genetica, 131(3): 267—274
- Howell W M, Black D A, 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. Cell Mol Life Sci, 36(8): 1014—1015
- Levan A, Fredga K, Sandberg A A, 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas, 52(2): 201—220
- Martinez P A, Candeia de Araujo W, Molina W F, 2010. Derived cytogenetic traits, multiple NORs and B chromosomes in the compact karyotype of *Canthigaster figueiredoi* (Tetraodontiformes). Marine Genomics, 3(2): 85—89
- Matoso D A, Vera Maria Fonseca de Almeida Val, Maelin da Silva *et al*, 2011. Chromosomal polymorphism in *Steindachneridion melanodermatum* Garavello, 2005 (Siluriformes, Pimelodidae): a reappraisal the existence of sex chromosome system in the species. Rev Fish Biol Fisheries, 21(3): 497—508
- Mazzuchelli J, Martins C, 2009. Genomic organization of repetitive DNAs in the cichlid fish *Astronotus ocellatus*. Genetica, 136(3): 461—469
- Ocalewicz K, Penman D J, Babiak I, 2008. Variation in size and location of the Ag-NOR in the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Genetica, 133(3): 261—267
- Ohno S, 1970. The Enormous Diversity in Genome Sizes of Fish as a Reflection of Nature's Extensive with Gene Duplication. T Am Fish Soc, 99(1): 120—130
- Porto F E, Portela-Castro A L B, Martins-Santos I C, 2011. Chromosome polymorphism in *Rineloricaria pentamaculata* (Loricariidae, Siluriformes) of the Paraná River basin. Ichthyol Res, 58(3): 225—231
- Sumner A T, 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exp Cell Res, 75: 304—306
- Swarça A C, Fenocchio A S, Cestari M M *et al*, 2006. Heteromorphic sex chromosome system with an exceptionally large Y chromosome in a catfish *Steindachneridion* sp. (Pimelodidae). Cytogenet Genome Res, 112(3—4): 325—328

THE KARYOTYPE, Ag-NORs AND C-BANDING OF *SCIAENOPS OCELLATA*

WANG Xiao-Yan¹, WANG Shi-Feng², ZHANG Jian-She¹, WU Chang-Wen¹

(1. Marine Science College of Zhejiang Ocean University, National Engineering Research Center of Marine Facilities Aquaculture, Zhoushan, 316004; 2. Hainan University, Key Laboratory of Tropical Aquatic Biotechnology of Education Ministry, Haikou, 570228)

Abstract The karyotype characteristics of *Sciaenops ocellata* was investigated using conventional staining, Ag-NORs and C-banding. The results are as follows: *S. ocellata* had a diploid chromosome number of 48 and its karyotype formula was 48t, NF=48; The Ag-NORs appeared in chromosome 1; The centromere of all chromosomes and the Ag-NORs presented positive C-banding; The length polymorphism of Chromosome 1 was not sex related but co-occurred with the Ag-NORs.

Key words *Sciaenops ocellata*, Karyotype, Ag-NORs, C-banding