

川纹笛鲷染色体核型、银染和 C-带

郭明兰¹, 游欣欣², 苏永全², 丁少雄², 王军²

(1. 中国科学院南海海洋研究所海洋生物资源可持续利用重点实验室, 广东 广州 510301; 2. 厦门大学海洋与环境学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 实验采用植物血凝素、秋水仙碱腹腔注射, 肾细胞直接制片法分析了川纹笛鲷 *Lutjanus sebae* 染色体核型、Ag-NORs 和 C-带。结果表明: 1) 川纹笛鲷二倍体染色体数 $2n=48$, 核型公式为: $2n=48t$, $NF=48$; 在第 1 对染色体靠近着丝粒部位有明显的次缢痕。2) 染色体经快速银染后, Ag-NORs 的数目在不同细胞中表现出多态性, 数目 1—4 个, 2 个 Ag-NORs 的频率最高(占 79%)。在分裂相中, 第 1 对 t 染色体近着丝粒的次缢痕区均出现 2 个银染位点 (Ag-NORs 阳性), 且未见 Ag-NORs 的联合现象。3) 大多数染色体的着丝粒区显示出 1 个深浅不同的 C-带, 在第 1 对染色体的随体区域分布有大量的结构异染色质, 表现 C-带强阳性。讨论了鱼类核型演化规律和 Ag-NORs、C-带的发生机制, 以及川纹笛鲷的进化地位。

关键词: 川纹笛鲷 *Lutjanus sebae*; 核型; Ag-NORs; C-带

中图分类号: Q959.483 文献标识码: A 文章编号: 1009-5470(2011)01-0091-05

Studies on chromosome karyotype, Ag-NORs and C-banding patterns of *Lutjanus sebae*

GUO Ming-lan¹, YOU Xin-xin², SU Yong-quan², DING Shao-xiong², WANG Jun²

(1. Key Laboratory of Marine Bio-resources Sustainable Utilization, South China Sea Institute of Oceanology, CAS, Guangzhou 510301, China; 2. Department of Oceanography and Institute of Subtropical Oceanography, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Studies on karyotype, Ag-NORs, and C-banding of *Lutjanus sebae* were performed. The chromosomes were received from the head kidney by using a method of injecting with PHA and colchicines, air drying, and Giemsa staining. The results were as follows. 1) The karyotypic formula of *L. sebae* was $2n=48t$, $NF=48$. Meanwhile, a pair of chromosomes, with secondary constriction near the centromere, was found on chromosome 1. 2) The Ag-NORs polymorphisms were individually specific in this fish. The silver staining pots were 1-4, and the number of Ag-NORs was mainly 2 (79%). A pair of nucleolar organizer regions was observed on the secondary constriction of chromosome 1, and no Ag-NORs combination was found. 3) Centromeres of most chromosomes were C-bandings positive, and heterochromatin was detected at the satellite zone of chromosome 1. Thus, we discussed the evolution of karyotype, the developing mechanism of Ag-NORs, and C-bandings for fish. The phylogenetic condition of *L. sebae* was evaluated as well.

Key words: *Lutjanus sebae*; karyotype; Ag-NORs; C-banding

川纹笛鲷 *Lutjanus sebae* 又称千年笛鲷, 俗称打铁婆(闽南)。川纹笛鲷隶属鲈形目(Perciformes)笛鲷科(Lutjanidae)笛鲷属(*Lutjanus*), 分布于印度洋北部沿海、红海至澳大利亚以及中国的南海和台湾海峡南部^[1]。川纹笛鲷体赤红色, 腹部色淡, 体侧具 3 条

深赤色带, 似中文“川”字, 故而得名。川纹笛鲷体色艳丽, 肉质细嫩, 既可食用也可供观赏, 营养及经济价值高。迄今, 有关川纹笛鲷的研究报道主要集中在苗种培育^[2-3]、生理特性^[4-5]、遗传多样性^[6]、分子系统进化^[7-8]和自然种群生态学^[9-11]等方面, 有

收稿日期: 2009-05-12; 修订日期: 2010-06-22。刘学东编辑

基金项目: 国家自然科学基金项目(30070595); 国家“863”计划项目(2006AA10A414)

作者简介: 郭明兰(1980-), 女, 江西省吉安市人, 博士, 主要从事海洋动物生化遗传研究。E-mail: guominglan03@yahoo.com.cn

通信作者: 王军。E-mail: junw@xmu.edu.cn

关川纹笛鲷细胞遗传学方面的研究目前尚未见报道。本文对川纹笛鲷染色体核型的研究旨在为川纹笛鲷的基础研究及笛鲷科鱼类染色体研究提供更多的重要资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

川纹笛鲷 5 尾于 2007 年 7 月至 2007 年 9 月购自厦门市渔市场, 体重 420—650g·尾⁻¹。

1.2 核型分析

活鱼充气暂养, 按 2—3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 鱼体重剂量向鱼胸腔注射植物血凝素, 3.5h 后按 2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 鱼体重注射秋水仙素溶液, 30min 后取出头肾; 在生理盐水中将头肾剪碎并静置, 取上层细胞悬液, 1000r·min⁻¹ 离心收集细胞, 用 0.075mol·L⁻¹ KCl 于 37℃ 低渗处理细胞 30min; 离心收集细胞, 再用预冷的卡诺氏固定液(甲醇:冰乙酸=3:1)固定 3 次, 空气干燥法制片。核型分析按 Levan^[12] 的分类标准进行。

1.3 Ag-NORs(核仁组织区银染)

银染方法参照 Howell^[13] 的快速银染法稍加修改。将 50%AgNO₃ 溶液与 2%明胶(内含 1%甲酸)以 2:1 混合后, 立即加到染色体标本上, 覆以盖玻片。于 60℃ 水浴锅中温浴 5—10min 至标本呈金黄色时取出, 流水冲去盖玻片, 干燥后镜检。

1.4 C-带

按 Sumner^[14] 的方法稍加修改。将染色体制片放入 0.2mol·L⁻¹ HCl 染缸中, 室温处理 1h, 蒸馏水冲洗, 空气干燥; 然后放入新配制的 5% Ba(OH)₂ 液在 60℃ 处理 15min, 用 0.2 mol·L⁻¹ HCl 中和后, 蒸馏水冲洗, 空气中干燥; 再转入 60℃ 的 2×SSC 液中处理 2h, 蒸馏水冲洗, 空气中干燥。用 10%的 Giemsa 染色 25min, 蒸馏水冲洗, 空气中干燥后镜检。

表 2 川纹笛鲷各染色体的臂比和相对长度

Tab. 2 Arm ratio and relative length of chromosome of *L. sebae*

染色体编号	臂比	分组	相对长度	染色体编号	臂比	分组	相对长度
1	∞	t	5.44±0.11	13	∞	t	4.21±0.05
2	∞	t	5.39±0.12	14	∞	t	4.09±0.06
3	∞	t	5.15±0.09	15	∞	t	4.05±0.10
4	∞	t	4.90±0.08	16	∞	t	4.01±0.09
5	∞	t	4.85±0.12	17	∞	t	3.81±0.05
6	∞	t	4.70±0.06	18	∞	t	3.77±0.07
7	∞	t	4.56±0.05	19	∞	t	3.72±0.07
8	∞	t	4.46±0.06	20	∞	t	3.68±0.10
9	∞	t	4.44±0.07	21	∞	t	3.31±0.13
10	∞	t	4.42±0.04	22	∞	t	3.02±0.11
11	∞	t	4.41±0.03	23	∞	t	2.77±0.19
12	∞	t	4.33±0.02	24	∞	t	2.29±0.24

2 结果与分析

2.1 染色体核型

在显微镜下对川纹笛鲷 100 个分散良好的染色体中期分裂相进行计数(表 1), 二倍体染色体数目为 48 的占 62.0%, 其余中期分裂相的染色体二倍体数均小于 48, 表明川纹笛鲷二倍体染色体众数 $2n=48$ 。

表 1 川纹笛鲷染色体数目统计

Tab. 1 Statistics of the diploid chromosome number of *L. sebae*

染色体数目/条	分类相数/个	出现频率/%
44	9	9.0
45	10	10.0
46	11	11.0
47	8	8.0
48	62	62.0
49	0	0

选 10 个较好的中期分裂相显微摄影、测量并计算每条染色体的有关参数(表 2)。川纹笛鲷的核型公式为 $2n=48t$, 即 24 对染色体均为端部着丝点染色体, 其臂数 $NF=48$, 各对相邻染色体之间长度差异不明显, 第 1 对染色体上近着丝粒区有明显的次缢痕和中间随体(图 1)。

2.2 Ag-NORs

川纹笛鲷的银染明显。中期分裂相(62 个)及间期核(70 个)中 Ag-NORs 数目 1—4 个, 在不同细胞中表现出多态性, 2 个银染点占总数的 79%, 1 个银染点占 15%, 其他占 6%。分裂相中具有 2 个银染点占 85%, 故其 Ag-NORs 数目为 2。在大部分分裂相中, 第 1 对染色体近着丝粒的次缢痕区具 1 对 Ag-NORs, 且未见其有 Ag-NORs 联合现象(图 2)。

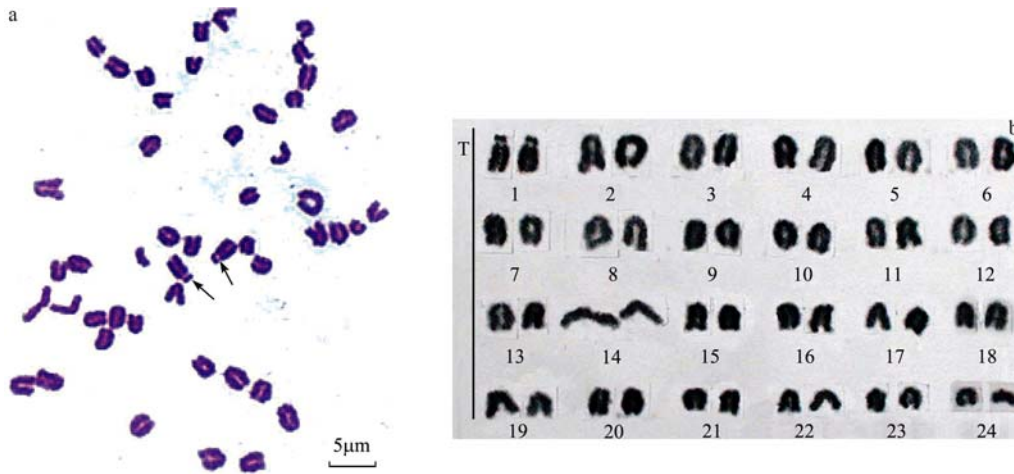


图 1 川纹笛鲷染色体中期分裂相(a)和染色体核型(b) (Giemsa 染色)

注: 箭头所指为第 1 对染色体; T 代表端部着丝粒染色体(即 t 型染色体)

Fig. 1 Chromosome metaphase (a) and karyotype (b) of *L.sebae*(Giemsa staining)

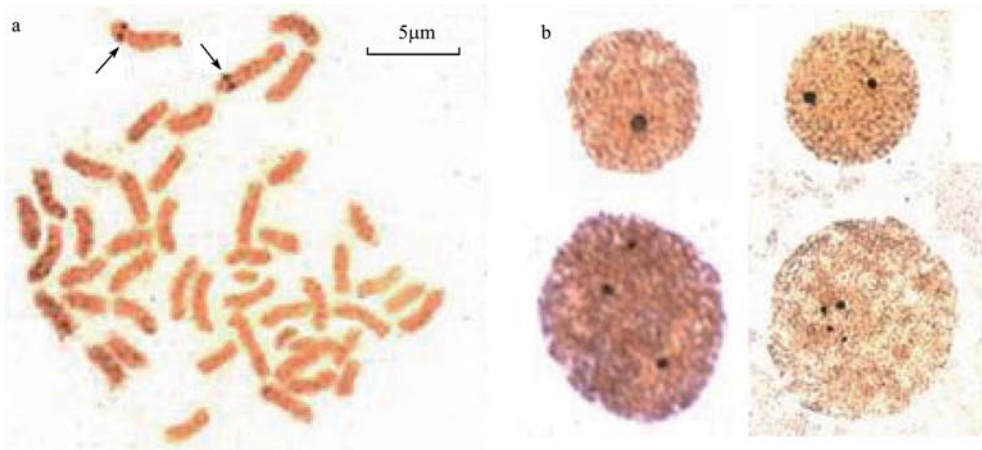


图 2 川纹笛鲷染色体银染: 中期分裂相(a)和间期核(b)

注: 箭头所指为次缢痕区的银染位点

Fig. 2 Metaphase chromosome (a) and nucleus (b) of *L.sebae* with silver staining

2.3 C-带

经 C-带处理后, 获得 50 个具有明显异染色质带的分裂相。川纹笛鲷 24 对染色体中绝大多数染色体均具有大小不一的着丝粒异染色质带, 同源染色体的 C-带大小、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, 且第 1 对染色体近着丝粒端与次缢痕相连的随体整个呈现 C-带阳性。有个别染色体既有着丝粒 C-带又有端粒 C-带, 或是出现居间 C-带(图 3)。

3 讨论与结果

统计已研究的鱼类染色体核型, 将真骨鱼类分为低位类、中位类和高位类 3 个演化类群; 进化上越是处于上位, 染色体越收敛, 端部着丝粒染色体多, 臂数少, 在鱼类系统进化上属高位类^[15]。在特定分类阶元中, 染色体数目多的(多倍体除外)和具



图 3 川纹笛鲷染色体 C-带

注: 箭头所指为随体区具异染色质 C-带的第 1 对染色体

Fig. 3 Metaphase chromosomes of *L.sebae* with C-banding

有较多端着丝粒染色体的鱼类应是较原始的类型, 而染色体数目少的应视为特化类型^[16]。在笛鲷属, 已报道的约氏笛鲷 *L. johni*, 画眉笛鲷 *L. vitta*, 勒氏

笛鲷 *L. bleeker*^[17], 红鳍笛鲷 *L. erythropterus*^[18], 紫红笛鲷 *L. argentimaculatus* 和白斑笛鲷 *L. bohar*^[19] 的核型与本文川纹笛鲷一样, 均为 $2n=48t$ 。该核型在笛鲷属中具有普遍性, 并可认为拥有 48 条 A 型染色体(即 t 型和 st 型)是笛鲷属鱼类染色体的基本特征。笛鲷属鱼类在进化上属较为原始的类型。具有 48 条 A 型染色体的核型也是鲱形目(Clupeiformes)、灯笼鱼目(Myetophiformes)、鲈形目(Perciformes)及鲻形目(Mugiliformes)等许多鱼类所共有的。鱼类在核型演化中具有较大的保守性和趋同性, 这可能与水环境的稳定性及鱼类的表现型与染色体的演化速度较基因演化速度慢有关。

Ag-NORs 的数目、分布及形态特征是物种亲缘关系和染色体进化的一个指标。Ag-NORs 通常分布在染色体的次缢痕和随体区域。与笛鲷属其他鱼类^[17-19]不同, 川纹笛鲷的第 1 对染色体近着丝粒区发现呈 Ag-NORs 银染阳性的次缢痕, 川纹笛鲷次缢痕的位置、大小及形态与 Ag-NORs 一致, 故次缢痕为其核仁组织区所在位置。Ag-NORs 通常具有数目和结构的多态性, 鱼类染色体也具有这种特性^[20-25]。川纹笛鲷的 Ag-NORs 在细胞的中期分裂相及间期核中具数目多态性, 且所有中期分裂相当第 1 对同源染色体上均有 1 对信号强度基本相同的 Ag-NORs。Ag-NORs 多态性可能是 rDNA 转录活性的一种反映。由于 NORs 是 18S+28S rRNA 基因的分布区, AgNO₃ 能反映间期核中的转录活性, 所以 Ag-NORs 不仅表达了 rRNA 基因的染色体定位, 而且 Ag-NORs 的变化可表达 rRNA 基因数目的不同或活性差异^[26]。鲈形目不同科里多数已研究的种类都出现 Ag-NORs 多态现象, 而且基本上不出现

Ag-NORs 联合现象^[20-23], 本文川纹笛鲷也未见这种现象, 这可能是鲈形目鱼类的一个共同特征; Ag-NORs 联合现象在鲤形目中较为常见^[25]。Hsu^[27]和 Schmid^[28]认为, 对于大多数脊椎动物来说, 单对的 NORs 是一种原始特征, 鱼类为最原始的脊椎动物, 川纹笛鲷的 Ag-NORs 结果支持了 Hsu 和 Schmid 的观点。

C-带染色技术是特异地显示异染色质的方法。近年来, 分子生物学研究手段证实 C-带主要是 AT 与 GC 高度重复序列, 包括卫星 DNA 序列; 从遗传机制上讲, 由于该区由高度重复 DNA 序列构成, 所以具有惰性并较为恒定。一般认为, 真核生物尤其高等真核生物的异染色质分为结构异染色质和功能异染色质两类。结构异染色质一般只分布在各条染色体的着丝点及附近区域、核仁组织区及附近区域、端粒区及 Y 染色体长臂的一部分或大部分; 而功能异染色质的典型代表是 X 染色体^[29]。本文川纹笛鲷 C-带主要是着丝点附近和随体部位的结构异染色质带, 这与鲈形目中多数鱼类相似^[20-23], 都属于一般的分布模式; 在第 1 对染色体的随体区域表现 C-带强阳性, 该区域位于着丝粒与次缢痕(Ag-NORs 所在区域)之间, 即 Ag-NORs 与 C-带强阳性呈现一定的同步对应。Hsu 等^[30]及 Shi^[31]认为: 染色体间不对称易位和臂间倒位可导致异染色质的增加或分布位置的改变, 如插入异染色质增加或完全异染色质臂, 这些都是物种进化的特征。从川纹笛鲷的 C-带特征来看, 主要是着丝粒 C-带, 偶尔有个别的染色体具端粒 C-带、居间 C-带, 属于比较原始的类群, 与核型及 Ag-NORs 结果基本一致, 可见川纹笛鲷属高位类群鲈形目中较为原始的种类。

参考文献

- [1] 朱元鼎, 成庆泰, 孟庆闻, 等. 南海诸岛海域鱼类志[M]. 北京: 科学出版社, 1979.
- [2] 钟建兴, 郑惠东, 陈有铭. 川纹笛鲷人工育苗及生长的初步观察[J]. 福建水产, 2004, 4: 44-46.
- [3] 尹绍武, 陈国华, 张本, 等. 千年笛鲷池塘人工育苗技术[J]. 中国水产, 2005, 8: 22-23.
- [4] 区又君, 刘泽伟. 饥饿和再投喂对千年笛鲷幼鱼消化酶活性的影响[J]. 海洋学报, 2007, 29 (1): 86-91.
- [5] NEWMAN S J, SKEPPER C L, WAKEFIELD C B. Age estimation and otolith characteristics of an unusually old, red emperor snapper (*Lutjanus sebae*) captured off the Kimberley coast of north-western Australia[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2010, 26 (1): 120-122.
- [6] VAN HERWERDEN L, ASPDEN W J, NEWMAN S J, et al. A comparison of the population genetics of *Lethrinus miniatulus* and *Lutjanus sebae* from the east and west coasts of Australia: Evidence for panmixia and isolation[J]. Fisheries Research, 2009, 100 (2): 148-155.
- [7] GUO Y S, WANG Z D, LIU C W, et al. Phylogenetic relationships of south china sea snappers (Genus *Lutjanus*; family lutjanidae) based on mitochondrial DNA sequences[J]. Marine Biotechnology, 2007, 9 (6): 682-688.
- [8] 朱世华, 杨迎春, 沈锡权, 等. 从细胞色素 b 基因序列探讨笛鲷属的分子系统发生关系[J]. 动物学报, 2006, 52 (3): 514-524.
- [9] NEWMAN S J, WILLIAMS D M. Spatial and temporal

- variation in assemblages of Lutjanidae, Lethrinidae and associated fish species among mid-continental shelf reefs in the central Great Barrier Reef[J]. Marine and Freshwater Research, 2001, 25 (6): 843–851.
- [10] STEPHEN J N, MICHAEL C, DAVID M W. Age, growth, mortality rates and corresponding yield estimates using otoliths of the tropical red snappers, *Lutjanus erythropterus*, *L. malabaricus* and *L. sebae*, from the central Great Barrier Reef [J]. Fisheries Research, 2000, 48: 1–14.
- [11] NEWMAN S J, DUNK I J. Growth, age validation, mortality and other population characteristics of the red emperor snapper, *Lutjanus sebae* (Cuvier, 1828), off the Kimberley Coast of North-Western Australia [J]. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 2002, 55: 67–80.
- [12] LEVAN A, FREDGA K, SANDBERGA A. Nomenclature for centromeric position on chromosome [J]. Hereditas, 1964, 52 (2): 201–220.
- [13] HOWELL M W, BLACK D A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method [J]. Experientia, 1980, 36: 1014–1015.
- [14] SUMMER A T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin [J]. Experimental Cell Research, 1972, 75 (1): 304–306.
- [15] 小岛吉雄. 鱼类细胞遗传学[M]. 林义浩编译. 广州: 广东科技出版社, 1990: 8–33.
- [16] 李树深. 鱼类细胞分类学[J]. 生物科学动态, 1981, 2: 8–15.
- [17] 李长玲, 曹伏君, 刘楚吾, 等. 笛鲷属三种鱼类染色体组型的研究[J]. 海洋通报, 2005, 24 (5): 23–26.
- [18] 舒虎, 顾仲坚, 王云新. 红鳍笛鲷 (*Lutjanus erythropterus*) 的核型研究[J]. 广州大学学报: 自然科学版, 2003, 2 (1): 27–29.
- [19] 曹伏君, 李长玲, 刘楚吾. 红鳍笛鲷、紫红笛鲷和白斑笛鲷的核型研究[J]. 海洋科学, 2002, 26 (11): 43–46.
- [20] ZOU J X, HU C Q, XIANG W Z, et al. The karyotypes, C-banding patterns and AgNORs of *Epiplatys malabaricus*[J]. High Technology Letters, 2004, 10 (2): 1–4.
- [21] 曹伏君, 刘楚吾. 花尾胡椒鲷、胡椒鲷的染色体核型与 Ag-NORs 带研究[J]. 台湾海峡, 2008, 27(1): 83–95.
- [22] 陈友铃, 汪彦情, 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.
- [23] 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.
- [24] 耿德贵, 张大生, 程伟, 等. 黄颡鱼染色体的 C-带、Ag-NORs、荧光带和复制带的研究[J]. 遗传, 1999, 21(2): 21–23.
- [25] 常重杰, 余其兴. 七种鲷亚科鱼 Ag-NORs 的比较研究[J]. 遗传, 1997, 19(4): 22–25.
- [26] SCHMID M. Chromosome banding in Amphibia . Differentiation of GC- and AT-rich chromosome regions in Anura [J]. Chromosoma, 1980, 77(1): 83–103.
- [27] HSU T C. A possible function of constitutive heterochromatin: the bodyguard hypothesis [J]. Genetics, 1975, 79 (Suppl): 137–150.
- [28] SCHMID M. Chromosome banding in Amphibia II. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in Ranidae, Microhylidae and Rhacophoridae[J]. Chromosoma, 1978, 68: 131–148.
- [29] 咎瑞光, 滇池两种类型鲫鱼的性染色体和 C - 带核型研究 [J]. 遗传学报, 1982, 9(1): 32–39.
- [30] HSU T C, ARRIGHI F. Distribution of constitutive heterochromatin in mammalian chromosome [J]. Chromosoma (Berl), 1971, 34: 243–253.
- [31] SHI L M, Ye Y Y, DUAN X S. Comparative cytogenetic studies on the red muntjac, Chinese muntjac and their F1 hybrids[J]. Cytogenetics and Cell Genetics, 1980, 26: 22–27.