

文章编号: 1000-0615(2019)12-2459-09

DOI: 10.11964/jfc.20181211591

## 四种鲍45S *rDNA*在染色体上的比较定位

张健鹏<sup>1</sup>, 王铜毅<sup>1</sup>, 骆轩<sup>2</sup>, 游伟伟<sup>2</sup>, 柯才焕<sup>2</sup>, 蔡明夷<sup>1\*</sup>

(1. 集美大学水产学院, 农业农村部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021;

2. 厦门大学海洋与地球学院, 福建省海洋生物资源开发利用协同创新中心, 福建 厦门 361102)

**摘要:** 为了研究皱纹盘鲍、西氏鲍、绿鲍和杂色鲍等4种鲍的核型特征, 实验利用荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)技术比较定位了上述4种鲍的45S *rDNA*位点。皱纹盘鲍中约83%的中期细胞均检出2对45S *rDNA*位点, 分别位于13号和16号染色体的长臂端部。西氏鲍中约75%的中期细胞均检出3对45S *rDNA*位点, 分别位于6号染色体短臂端部、14号和17号染色体长臂端部。绿鲍中约85%的中期细胞均检出3对45S *rDNA*位点, 分别位于4号、6号和8号染色体长臂的端部。杂色鲍中约65%的中期细胞均检出3对45S *rDNA*位点, 分别位于3号、4号和12号染色体短臂的端部。此外, 4种鲍均有少数中期相的45S *rDNA*位点数高于众数, 这提示, 除了明确的45S *rDNA*位点外, 4种鲍可能均有若干个不稳定的45S *rDNA*位点。实验结果丰富了鲍细胞遗传学研究资料, 同时为鲍的遗传育种研究提供了基础数据。

**关键词:** 鲍; 荧光原位杂交; 染色体; 45S *rDNA***中图分类号:** Q 343; S 966**文献标志码:** A

鲍(*Haliotis*), 在分类学上隶属于软体动物门(Mollusca)、腹足纲(Gastropoda)、前鳃亚纲(Prosobranchia)、原始腹足目(Archaeogastropoda)、鲍科(Haliotidae), 是我国传统的海珍品。迄今为止, 全世界已发现的现存种类有近百种, 已命名的约56种<sup>[1]</sup>, 已查明染色体核型的鲍约17种<sup>[2]</sup>。现有的核型数据显示, 鲍属的染色体数目与其地理分布具有明显相关性, 地中海地区的鲍种染色体数目为 $2n=28$ ; 印度-太平洋亚洲地区鲍种染色体数目为 $2n=32$ ; 北太平洋地区鲍种、南非-澳大利亚鲍种染色体数目均为 $2n=36$ <sup>[3]</sup>。可见, 染色体数目可能在鲍属的物种发生与进化中具有重要作用<sup>[4]</sup>。然而, 目前鲍属的染色体研究主要局限于核型分析, 以及少量带型与重复序列FISH定位等方面<sup>[4]</sup>。

荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)是一种将分子生物学方法与细胞遗传学方法相整合的技术<sup>[5]</sup>, 近30年内得到了长足发展,

为精细研究贝类染色体形态、结构提供了有力工具。鲍染色体的FISH研究尚处于起步阶段, 研究资料匮乏, 导致关于鲍属染色体进化机制研究进程较慢, 及无法支持鲍遗传育种研究的迅速发展<sup>[6-10]</sup>。因而, 本实验利用FISH技术比较定位了我国4种重要的养殖鲍类——皱纹盘鲍(*H. discus hannai*)、西氏鲍(*H. gigantea*)、绿鲍(*H. fulgens*)和杂色鲍(*H. diversicolor*)的45S *rDNA*, 为深入研究鲍的染色体进化与遗传育种提供必要的基础数据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 样品采集

皱纹盘鲍主要分布于太平洋西北区<sup>[1]</sup>, 实验用亲鲍为我国东北外海的底播养殖群体的多代繁殖后代; 西氏鲍主要分布于太平洋西北区<sup>[1]</sup>, 实验用亲鲍为引自日本野生群体的多代繁殖后

收稿日期: 2018-12-20 修回日期: 2019-04-01

资助项目: 国家自然科学基金(U1605213)

通信作者: 蔡明夷, E-mail: myicai@jmu.edu.cn

<http://www.scxuebao.cn>

代; 绿鲍主要分布于太平洋东北区<sup>[1]</sup>, 实验用亲鲍为引自美国野生群体的多代繁殖后代; 杂色鲍主要分布于印度洋—太平洋亚洲区<sup>[1]</sup>, 实验用亲鲍为捕自台湾海峡的多代繁殖后代。以上亲鲍均由中国福建晋江福大鲍鱼水产有限公司提供。

通过经紫外线照射的水刺激亲鲍催产, 精卵按一定比例混合进行人工授精。受精卵在室温下孵育, 采用300目筛绢网收集孵化出的担轮幼虫。同时取鲍肌肉于无水乙醇中固定, 备用。

## 1.2 DNA提取与染色体的制备

取鲍成体肌肉约30 mg, 使用DNA提取试剂盒(上海捷瑞生物工程有限公司)提取鲍全基因组DNA。按Arai等<sup>[11]</sup>的方法制备鲍染色体。

## 1.3 荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)

**探针制备** 实验以45S *rDNA*部分序列(18S *rDNA*编码区的一个保守区段)为模板制备探针。这一区段序列通过PCR获得, 引物为贝类18S *rDNA*通用引物18F(5'-AACCTGGTTGAT-CCTGCCAGT-3')、18R(5'-TGATCCTTCTG-CAGGTTCA-3')<sup>[12]</sup>。扩增产物采用缺口平移法标记上生物素, 具体操作参照试剂盒说明书(罗氏集团股份有限公司)。

**探针变性** 将已知浓度的探针加入到35  $\mu\text{L}$ 杂交缓冲液(50% 硫酸葡聚糖、去离子甲酰胺及体积分数分别为20%、50%和30%的20 $\times$ SSC缓冲液)中, 使探针终浓度约为2 ng/ $\mu\text{L}$ 。将混合液置于72  $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中变性8 min, 然后置于冰上10 min以上。

**染色体变性** 74  $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热变性缓冲液(去离子甲酰胺、20 $\times$ SSC缓冲液及体积分数分别为80%、10%和10%的蒸馏水)约5 min, 将经老化的染色体载玻片置于变性缓冲液中处理2~3 min, 经变性的染色体载玻片分别在梯度乙醇溶液(70%、80%、90%、100%和100%)中各脱水30 s, 最后将脱水后的玻片风干。

**分子杂交** 在风干后的玻片样本位置上滴加经变性的探针杂交混合液, 均匀平整的盖上封口膜后置于装有少量2 $\times$ SSC缓冲液的湿盒内, 于37  $^{\circ}\text{C}$ (恒温箱或杂交炉)杂交过夜(12~16 h)。

**洗涤及信号放大** 揭去封口膜, 将杂交后的玻片依次置于洗脱缓冲液(去离子甲酰胺、20 $\times$ SSC缓冲液及体积分数分别为10%、20%和70%的蒸馏水)(37  $^{\circ}\text{C}$ )、4 $\times$ SSC缓冲液(室温)、4 $\times$ SSC缓冲液(室温)中各处理5 min, 以便洗脱未杂交成功的残余探针。甩去玻片表面液体, 将100  $\mu\text{L}$ 探针的一抗溶液(Avidin-Alexa Fluor 488溶液)滴加在样品上, 盖上封口膜放于湿盒中, 于37  $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中温育30 min。黑暗条件下揭掉载玻片上的封口膜, 将玻片依次置于室温下的4 $\times$ SSC-Triton溶液、4 $\times$ SSC缓冲液、4 $\times$ SSC缓冲液中各洗涤5 min。最后用双蒸水轻轻冲洗, 置于避光处风干。

**负染、镜检及图像处理** 用10  $\mu\text{L}$ 的PI负染10 min, 使用Olympus BX53荧光显微镜完成观察与拍照。通过相应荧光滤片组观察FISH荧光信号。用带有DP73电荷耦合器件图像传感器(CCD)拍摄图像, 使用CellSens图像采集系统采集图像, 并进行图像的多通道组合及初步处理, 后期再用Image-pro plus 6.0生物学图像分析软件进行精确的染色体核型结构与信号位点等的分析与测量。参照Levan等<sup>[13]</sup>提出的分组标准进行染色体分类, 同一类染色体按相对长度递减顺序排列。

## 2 结果

利用FISH技术定位皱纹盘鲍、西氏鲍、绿鲍和杂色鲍中期染色体上45S *rDNA*的位置, 染色体被碘化丙啶(PI)染为红色, 45S *rDNA*位点呈现黄绿色荧光信号。每个物种取100个中期细胞进行观察、计数, 并获得45S *rDNA* 基因簇数目直方图。其中, 西氏鲍、绿鲍和杂色鲍等3种鲍的45S *rDNA* 基因簇数目的众数均为3对, 而皱纹盘鲍为2对(图1)。

取染色体数目和45S *rDNA*位点数都与其众数相符的中期相细胞进行核型分析(图版 I)。皱纹盘鲍核型公式为 $2n=36=20m+16sm$ , 约83%的中期细胞检出2对45S *rDNA*位点, 分别位于13号染色体(亚中部着丝粒染色体, sm)长臂和15号染色体(sm)长臂的端部(图版 I-1, 2)。西氏鲍的核型为 $2n=36=20m+16sm$ , 约75%的中期细胞检出3对45S *rDNA*位点, 其中2对位于14号染色体(sm)长臂和17号染色体(sm)长臂的端部, 1对位

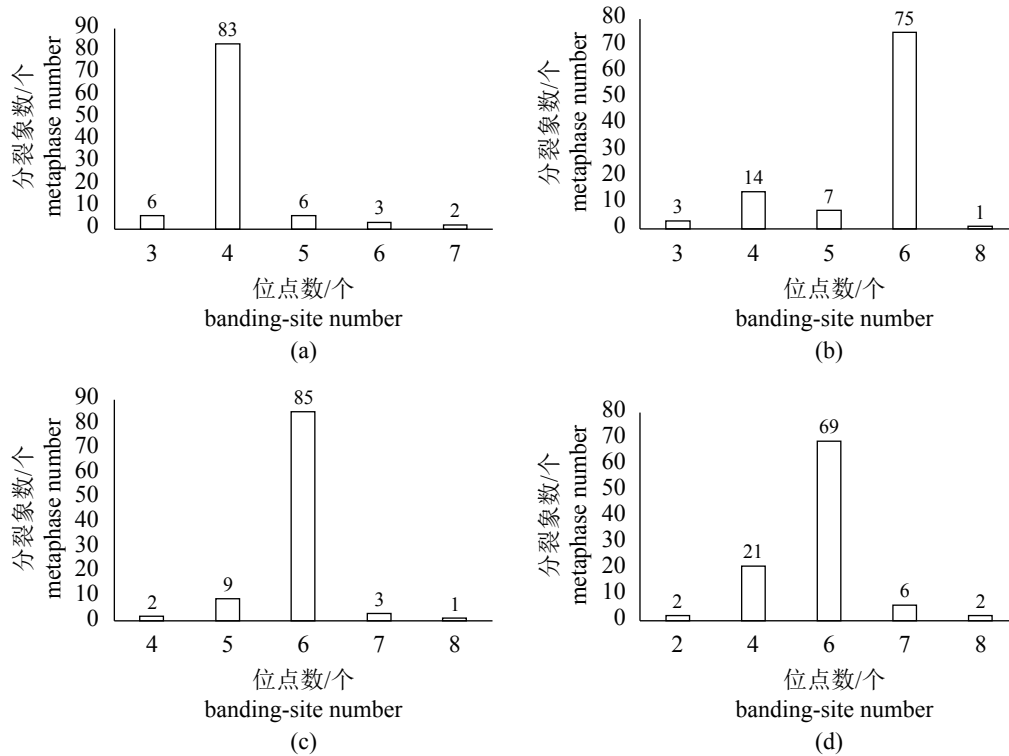


图 1 四种鲍的45S *rDNA*位点数直方图

(a)皱纹盘鲍45S *rDNA*位点分布; (b)西氏鲍45S *rDNA*位点分布; (c)绿鲍45S *rDNA*位点分布; (d)杂色鲍45S *rDNA*位点分布

Fig. 1 Histogram of 45S *rDNA* loci in 4 species of abalone

(a) 45S *rDNA* sites distribution in *H. discus hannai*; (b) 45S *rDNA* sites distribution in *H. gigantea*; (c) 45S *rDNA* sites distribution in *H. fulgens*; (d) 45S *rDNA* sites distribution in *H. diversicolor*

于5号染色体(中部着丝粒染色体, m)短臂端部(图版 I -3, 4)。绿鲍的核型公式为 $2n=36=16m+16sm+4st$ , 约85%的中期细胞检出3对45S *rDNA*位点, 全部位于m染色体(4号、6号和8号)长臂的端部(图版 I -5, 6)。杂色鲍的核型公式为 $2n=32=16m+14sm+2st$ , 约69%的中期细胞检出3对45S *rDNA*位点, 其中2对位于m染色体(3号和4号)短臂端部, 1对位于sm染色体(12号)短臂端部(图版 I -7, 8)。除了主要模式外, 4种鲍的45S *rDNA*信号还有其他出现频率较低的分布方式(图版 II)。

### 3 讨论

染色体核型指的是染色体组在有丝分裂中期的表型, 包括染色体数目、大小、形态特征<sup>[4]</sup>。在本研究中, 4种鲍核型均符合前人报道<sup>[4]</sup>, 所有种类均含有中部着丝粒染色体和亚中部着丝粒染色体, 绿鲍和杂色鲍还含有亚端部着丝粒染色体。虽然关于这4种鲍的核型已有多篇报道, 但是不同的报道结果之间略有不同<sup>[4]</sup>。同一物种

的染色体核型多态的现象在贝类中较为常见<sup>[4]</sup>, 此现象原因可能包括两方面: 染色体制备方法可能会影响染色体的形态; 低等动物种群内或种群之间由于染色体变异而导致染色体多态。由于这些不确定因素的存在, 我们需要开发更多的染色体标记提高这4种鲍的染色体辨识度。

真核生物中, 45S *rDNA*基因是编码核糖体RNA的串联重复序列, 由18S、5.8S和28S *rDNA*组成。45S *rDNA*通常在基因组中成簇排列<sup>[14]</sup>。45S *rDNA*编码序列在种间具有极高的保守性, 且不同重复单元序列高度一致, 是研究重复序列分子进化机制的模型<sup>[15]</sup>。在细胞遗传学研究中, 45S *rDNA*位点研究也是最多的细胞遗传标记, 在一些物种中还可能与性别决定区域相关联<sup>[16]</sup>。45S *rDNA*的染色体分布可以通过银染、CMA染色或DAPI染色等方法来显示, 更直接的方法是以45S *rDNA*或其中部分序列(如18S *rDNA*)为探针用作FISH定位<sup>[17]</sup>。

目前, 已利用FISH定位45S *rDNA*(或18S *rDNA*)的鲍共6种(表1), 结果发现, 鲍类45S

表 1 鲍类45S *rDNA* 位点定位研究概况Tab. 1 Summary of location of 45S *rDNA* in abalone

种类 species	核型 karyotype	45S <i>rDNA</i> (or 18S <i>rDNA</i> )		文献 reference
		对数 pair	位置 location	
皱纹盘鲍 <i>H. discus hannai</i>	14 m+6 m/sm+16 sm	4	2 th, TER; 7 th, TER; 12 th, TER; 18 th, TER	[3]
	20 m+16 sm	2	14 th, TER; 17 th, TER	[17]
	20 m+16 sm	2	13 th, TER; 15 th, TER	本实验
西氏鲍 <i>H. gigantea</i>	20 m+16 sm	3	9 th, TER; 12 th, TER; 14 th, TER	[9]
	20 m+16 sm	3	5 th, TER; 14 th, TER; 17 th, TER	本实验
绿鲍 <i>H. flugens</i>	16 m+16 sm+4 st	2	4 th, TER; 11 th, TER	[6]
	16 m+16 sm+4 st	3	4 th, TER; 6 th, TER; 8 th, TER	本实验
红鲍 <i>H. rufescens</i>	16 m+18 sm+2 st	2	4 th, TER; 5 th, TER	[8]
粉红鲍 <i>H. corrugata</i>	20 m+14 sm+2 st	2	2 nd, TER; 4 th, TER	[6]
杂色鲍 <i>H. diversicolor</i>	16 m+14 sm+2 t	3	3 rd, TER; 4 th, TER; 12 th, TER	本实验

注: 相对位置参考朱齐春(2017)<sup>[18]</sup>; TER=端部着丝粒染色体着丝粒末端或者亚端部着丝粒染色体的短臂端部

Notes: the relative locations refer to the Zhu (2017)<sup>[18]</sup>; TER=centromeric termini of acrocentric chromosomes or terminal on the p-arms

*rDNA*位点的数目和位置普遍存在较大的种内变化。以皱纹盘鲍为例, 现有的3篇报道结果互不相同。蔡明夷等<sup>[3]</sup>以2个质粒(含人类的18S *rDNA*、5.8S *rDNA*、28S *rDNA*和一段7.3 kb间隔序列片段)制备杂交探针作FISH, 共检出4对阳性信号。Wang等<sup>[17]</sup>以PCR扩增18S *rDNA*部分编码区制备杂交探针作FISH, 发现81%的细胞具有2对信号, 分别位于14号和17号染色体长臂端部; 同时, 还存在着其他低频率位点分布模式, 表现出较高的种内多态性。本实验中, 皱纹盘鲍45S *rDNA*位点染色体定位结果与Wang<sup>[3]</sup>的结果相近, 也检出2对阳性信号, 少于蔡明夷等<sup>[3]</sup>所报道的4对阳性信号。造成这些结果差异的主要原因可能是, 蔡明夷等<sup>[3]</sup>用以制备探针的DNA片段较长, 因而检出的灵敏度相应较高。综合现有研究结果可以推测, 皱纹盘鲍至少存在2对大的45S *rDNA*位点, FISH信号稳定; 同时可能还存在若干对小的45S *rDNA*位点, FISH信号不稳定。Gallardo-Escárate等<sup>[6, 8]</sup>在红鲍、绿鲍和粉红鲍中观察得到同样的结果, 3种鲍的中期染色体中均有2对信号明确的和若干对不稳定的45S *rDNA*信号。在现有动物细胞遗传学研究资料中, 约有12%的物种表现出*rDNA*数目和分布位置的种内变化<sup>[18]</sup>。基因组中, 低于FISH检测灵敏度下限的*rDNA*位点的扩增, 或者失去活性的*rDNA*逐渐被排除, 可能

是导致*rDNA*位点数目和位置多态的重要原因。此外, 不同实验室FISH程序的检测灵敏度差异也可能导致45S *rDNA*定位发生变动。

目前已报道的动物核型中, 约60%具有单对45S *rDNA*位点, 但几乎在所有类群中都存在多对位点的核型<sup>[19]</sup>。贝类核型中, 45S *rDNA*位点的众数为1对, 平均数为3.18对<sup>[19]</sup>。鲍一般具有2~3对明确的45S *rDNA*位点和若干对不稳定的小位点, 为多对位点模式(表1)。目前认为, 多倍化<sup>[20]</sup>、种间杂交<sup>[21]</sup>、非同源位点间重组<sup>[22]</sup>、转座子的作用<sup>[23]</sup>等原因可能导致45S *rDNA*位点数目增多。自然状态下, 鲍易发生种间杂交, 而且杂交子代常获得明显的杂种优势<sup>[24]</sup>。Cai等<sup>[4]</sup>在分析杂色鲍×皱纹盘鲍杂交子代核型时发现, 杂交F<sub>1</sub>复合染色体组很不稳定<sup>[4]</sup>。杂种染色体组不稳定是导致*rDNA*位点获得或丢失的重要原因<sup>[21]</sup>。然而, 在鲍属中究竟是什么因素导致其45S *rDNA*位点数目普遍高于贝类45S *rDNA*位点的众数, 以及45S *rDNA*位点的扩张的生物学意义是什么? 解答这些问题尚需更多的研究数据。

虽然鲍45S *rDNA*的位点数目扑朔迷离, 但其染色体分布区域非常稳定, 全部信号均分布于染色体端部(表1)。真核生物中, 45S *rDNA*位点分布于染色体端部是主流模式。Roa等<sup>[25]</sup>和Gor-nung<sup>[15]</sup>分别综述了植物和鱼类45S *rDNA*定位研

究资料, 研究表明, 超过50%的被子植物和约43%的鱼类具有染色体端部分布的45S *rDNA*位点。Sochorová等<sup>[19]</sup>统计了54种贝类的45S *rDNA*定位结果, 发现67%的位点为染色体端部分布<sup>[19]</sup>。研究人员认为, *rDNA*分布于染色体端部利于其发生同源重组, 而同源重组可能是*rDNA*协同进化的重要维持机制<sup>[26]</sup>; 染色体端部分布也便于*rDNA*位点在染色体间扩增与重排<sup>[27]</sup>; 此外, 端部分布串联重复*rDNA*可能还具有保护染色体的作用, 与端粒作用类似<sup>[28]</sup>。

综上所述, 皱纹盘鲍、西氏鲍、绿鲍和杂色鲍等4种鲍均具有多对45S *rDNA*位点, 其中2~3对位点信号明确, 全部位于染色体端部。鲍的45S *rDNA*位点的数目和分布位置普遍表现出较高水平的种内变化, 位点数目与物种的地理分布之间未发现明显的相关性。与鲍的经济价值及其遗传育种研究的发展状况相比, 现有鲍的细胞遗传学研究水平明显落后。在进行鲍染色体进化研究、以及杂交育种和多倍体育种, 有必要开展更多的分子细胞遗传学研究。

#### 参考文献:

- [1] Franchini P, Slabbert R, Van Der Merwe M, *et al.* Karyotype and genome size estimation of *Haliotis midae*: estimators to assist future studies on the evolutionary history of haliotidae[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2010, 29(4): 945-950.
- [2] 郭战胜, 侯旭光. 鲍科染色体研究进展[J]. *水产科学*, 2016, 35(5): 597-602.
- Guo Z S, Hou X G. Research progress on chromosome in family haliotidae[J]. *Fisheries Science*, 2016, 35(5): 597-602(in Chinese).
- [3] 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).
- [4] Cai M Y, Ke C H, Luo X, *et al.* Karyological studies of the hybrid larvae of *Haliotis diversicolor* supertexta female and *Haliotis discus* male[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2010, 29(3): 735-741.
- [5] 权洁霞, 戴继勋. 荧光原位杂交技术(FISH)在鱼类遗传学研究中的应用及前景[J]. *动物学研究*, 1999, 20(3): 225-229.
- Quan J X, Dai J X. Current and future application of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) techniques to FISH genetics: a review[J]. *Zoological Research*, 1999, 20(3): 225-229(in Chinese).
- [6] Gallardo-Escárate C, Álvarez-Borrego J, Del Río-Portilla M A, *et al.* Karyotype analysis and chromosomal localization by FISH of ribosomal DNA, telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> and (GATA)<sub>n</sub> repeats in *Haliotis fulgens* and *H. corrugata* (Archeogastropoda: Haliotidae)[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2005, 24(4): 1153-1160.
- [7] Hernández-Ibarra N K, Ibarra A M, Cruz P, *et al.* FISH mapping of 5S *rRNA* genes in chromosomes of North American abalone species, *Haliotis rufescens* and *H. fulgens*[J]. *Aquaculture*, 2007, 272(Suppl 1): S268.
- [8] Gallardo-Escárate C, Álvarez-Borrego J, Ángel Del Río-Portilla M, *et al.* Fluorescence in situ hybridization of rDNA, telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> and (GATA)<sub>n</sub> repeats in the red abalone *Haliotis rufescens* (Archeogastropoda: Haliotidae)[J]. *Hereditas*, 2005, 142(2005): 73-79.
- [9] 王海山. 三种鲍种间杂交的细胞遗传学研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2014.
- Wang H S. Cytogenetic characterization of interspecies hybrids in three species of abalone[D]. Xiamen: Xiamen University, 2014 (in Chinese).
- [10] 刘圆圆. 杂色鲍与皱纹盘鲍及其杂交子代的分子细胞遗传学研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2016.
- Liu Y Y. Molecular Cytogenetic Studies on *Haliotis diversicolor*, *H. discus hannai* and the interspecific hybrid[D]. Xiamen: Xiamen University, 2016 (in Chinese).
- [11] Arai K, Tsubaki H, Ishitani Y, *et al.* Chromosomes of *Haliotis discus hannai* INO and *H. discus* REEVE[J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1982, 48(12): 1689-1692.
- [12] 杨文杰, 黄勃, 王仁恩, 等. 海南不同地理群体羊鲍18S *rDNA*的克隆与序列分析[J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(20): 10370-10373.
- Yang W J, Huang B, Wang R E, *et al.* Cloning and sequence analysis of *Haliotis ovina* 18S *rDNA* in the different geographical populations of Hainan[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2012, 40(20): 10370-10373(in Chinese).
- [13] Levan A, Fredga K, Sandberg A A. Nomenclature for

- centromeric position on chromosomes[J]. *Hereditas*, 1964, 52(2): 201-220.
- [14] Martins C, Wasko A P. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome[M]//Williams C R. Focus on Genome Research. New York: Nova Science Publishers, 2004: 335-363.
- [15] Gornung E. Twenty years of physical mapping of major ribosomal RNA genes across the teleosts: a review of research[J]. *Cytogenetic and Genome Research*, 2013, 141(2-3): 90-102.
- [16] Yano C F, Poltronieri J, Bertollo L A C, *et al.* Chromosomal mapping of repetitive DNAs in *Triplotheus trifurcatus* (Characidae, Characiformes): Insights into the differentiation of the Z and W chromosomes[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e90946.
- [17] Wang H S, Luo X, You W W, *et al.* Cytogenetic analysis and chromosomal characteristics of the polymorphic 18S rDNA of *Haliotis discus hannai* from Fujian, China[J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0113816.
- [18] 朱齐春, 郑娇, 张静, 等. 眼斑拟石首鱼重复DNA序列的染色体定位[J]. *水生生物学报*, 2017, 41(6): 1218-1224.
- Zhu Q C, Zheng J, Zhang J, *et al.* Location of repetitive DNA sequences on the chromosome of *Sciaenops ocellatus*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, 41(6): 1218-1224(in Chinese).
- [19] Sochorová J, Garcia S, Gálvez F, *et al.* Evolutionary trends in animal ribosomal DNA loci: introduction to a new online database[J]. *Chromosoma*, 2018, 127(1): 141-150.
- [20] Gromicho M, Coelho M M, Alves M J, *et al.* Cytogenetic analysis of *Anaecypris hispanica* and its relationship with the paternal ancestor of the diploid-polyploid *Squalius alburnoides* complex[J]. *Genome*, 2006, 49(12): 1621-1628.
- [21] Książczyk T, Taciak M, Zwierzykowski Z. Variability of ribosomal DNA sites in *Festuca pratensis*, *Lolium perenne*, and their intergeneric hybrids, revealed by FISH and GISH[J]. *Journal of Applied Genetics*, 2010, 51(4): 449-460.
- [22] Cazaux B, Catalan J, Veyrunes F, *et al.* Are ribosomal DNA clusters rearrangement hotspots? A case study in the genus *Mus* (Rodentia, Muridae)[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2011, 11: 124.
- [23] Symonová R, Majtánová Z, Sember A, *et al.* Genome differentiation in a species pair of coregonine fishes: an extremely rapid speciation driven by stress-activated retrotransposons mediating extensive ribosomal DNA multiplications[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2013, 13: 42.
- [24] Leighton D L, Lewis C A. Experimental hybridization in abalones[J]. *International Journal of Invertebrate Reproduction*, 1982, 5(5): 273-282.
- [25] Roa F, Guerra M. Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: structural and evolutionary implications[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2012, 12: 225.
- [26] Kovarik A, Dadejova M, Lim Y K, *et al.* Evolution of rDNA in *Nicotiana allopolyploids*: a potential link between rDNA homogenization and epigenetics[J]. *Annals of Botany*, 2008, 101(6): 815-823.
- [27] Pedrosa-Harand A, De Almeida C C S, Mosiolek M, *et al.* Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2006, 112(5): 924-933.
- [28] Pich U, Fuchs J, Schubert I. How do Alliaceae stabilize their chromosome ends in the absence of TTTAGGG sequences?[J]. *Chromosome Research*, 1996, 4(3): 207-213.

## Comparative chromosome mapping of 45S *rDNA* in four species of abalone

ZHANG Jianpeng<sup>1</sup>, WANG Tongyi<sup>1</sup>, LUO Xuan<sup>2</sup>, YOU Weiwei<sup>2</sup>, KE Caihuan<sup>2</sup>, CAI Mingyi<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

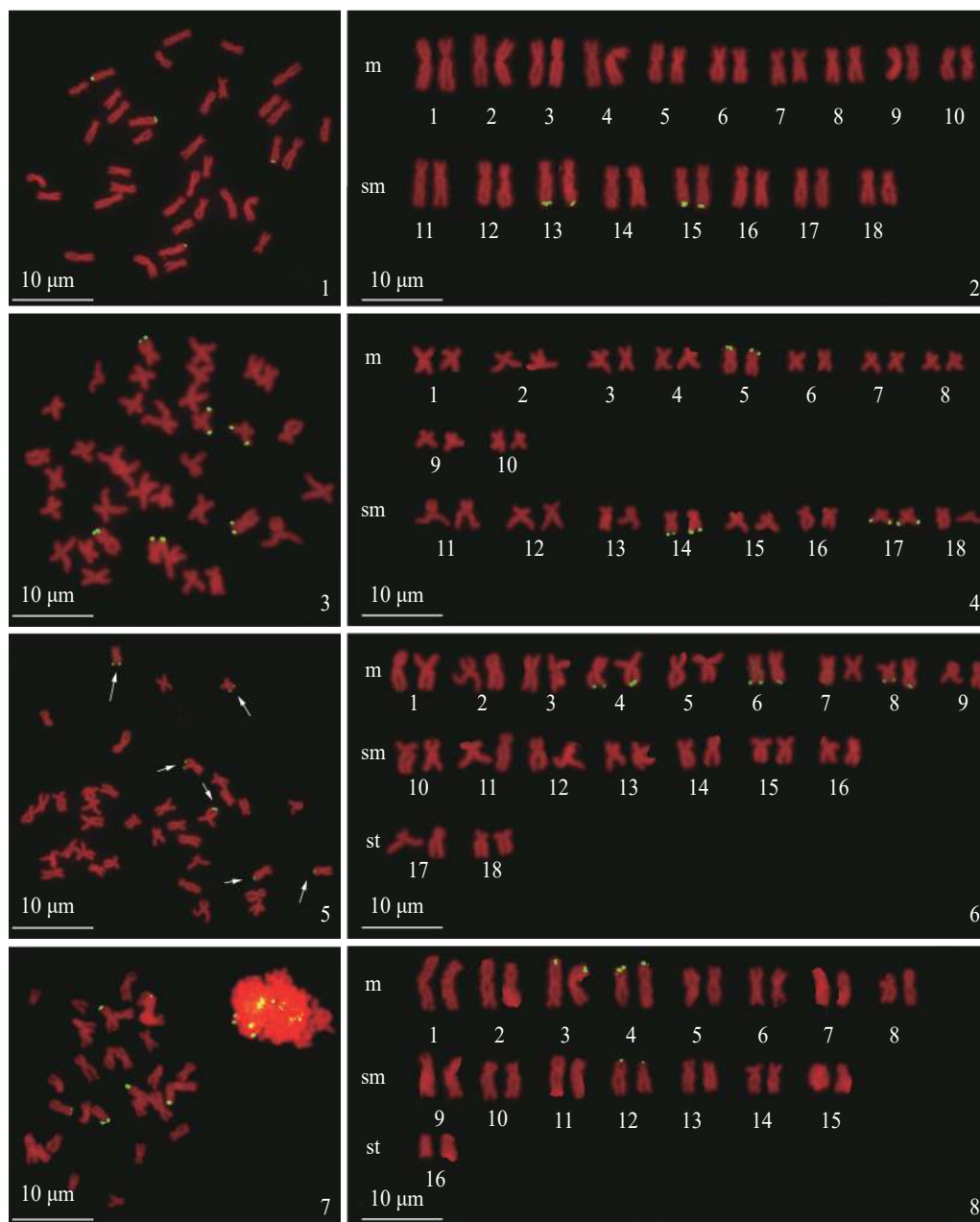
2. Fujian Collaborative Innovation Center for Exploitation and Utilization of Marine Biological Resources, College of Ocean and Earth Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

**Abstract:** Abalone is not only precious seafood in China, but also important mariculture shellfish. In recent years, the genetic breeding research of abalone has made rapid progress, but the research data of cytogenetic analysis are still lacking. Therefore, this study used the fluorescence *in situ* hybridization (FISH) to compare the distribution of 45S *rDNA* clusters in *Haliotis discus hannai*, *H. gigantea*, *H. fulgens*, and *H. diversicolor*. In *H. discus hannai*, 83% of the metaphase had 2 pairs of 45S *rDNA* sites, located at terminal of the long arm ends of chromosomes 13th and 16th, respectively. In *H. gigantea*, about 75% of the metaphase had 3 pairs of 45S *rDNA* sites, located at the terminal of the short arm of chromosome 6th, and at the terminal of the long arm of chromosomes 14th and 17th, respectively. In *H. fulgens*, about 85% of the metaphase cells detected three pairs of 45S *rDNA* sites, located at the terminal of the long arms of chromosomes 4th, 6th, and 8th. In *H. diversicolor*, about 65% of the metaphase had 3 pairs of 45S *rDNA* sites, located at the terminal of the short arms of chromosomes 3th, 4th, and 12th. In addition to the main mode, there were other low-frequency modes in all the 4 species of abalone, suggesting that these abalone may have several unstable 45S *rDNA* sites besides the unambiguous sites. The number and the location of 45S *rDNA* loci in abalone showed a high level of intraspecific variation in general. These findings may enrich the cytogenetic research data of abalone and provide basic data for the further studies of genetic breeding in abalone.

**Key words:** *Haliotis*; fluorescence *in situ* hybridization; chromosome; 45S *rDNA*

**Corresponding author:** CAI Mingyi. E-mail: myicai@jmu.edu.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China(U1605213)



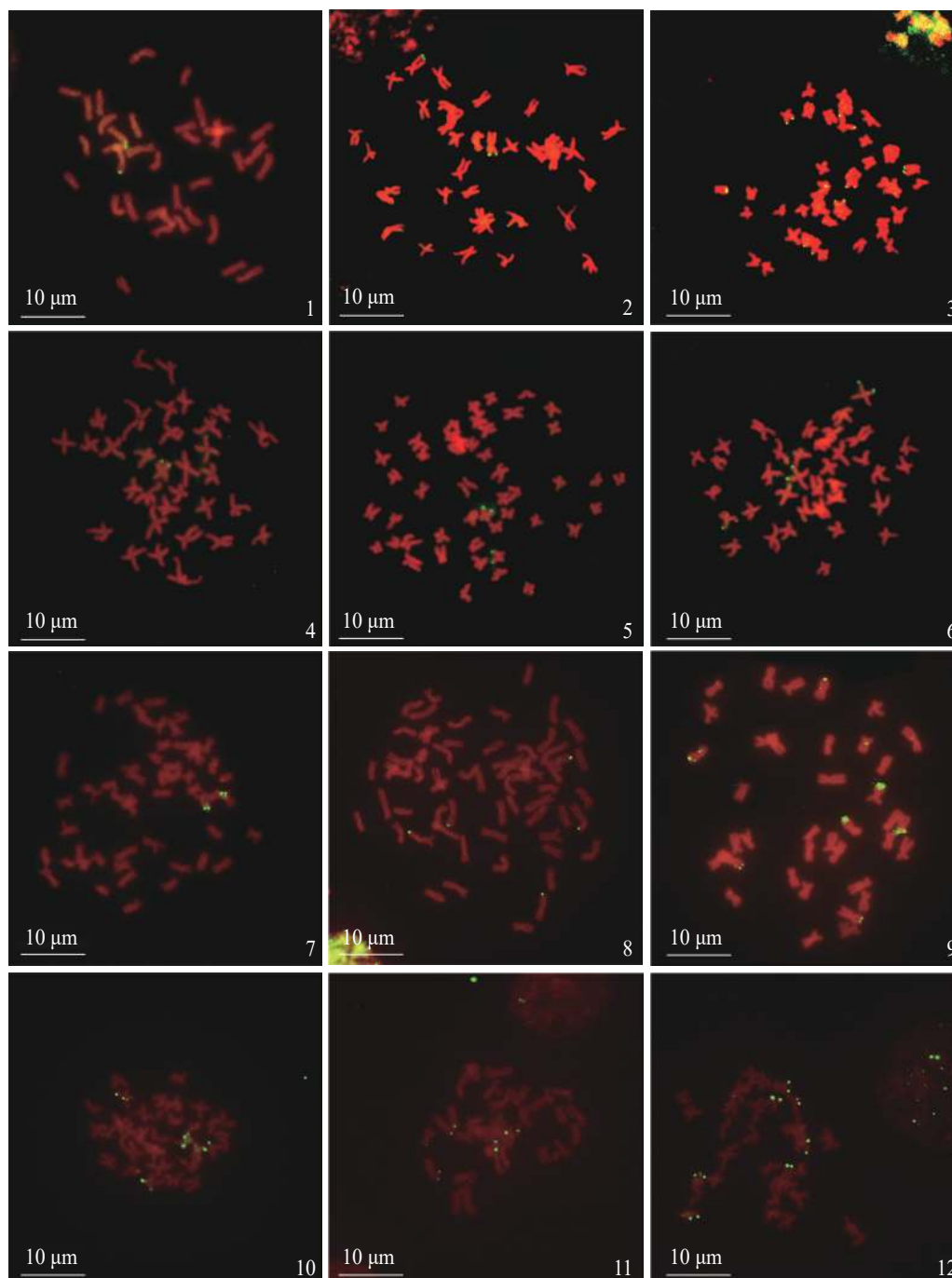
图版 1 4种鲍的45S *rDNA*的FISH及核型排列图

左侧四幅图(1、3、5、7)分别为皱纹盘鲍、西氏鲍、绿鲍和杂色鲍的45S *rDNA*中期分裂相图,右侧四幅图(2、4、6、8)为对应的染色体核型排列图; m. 中部着丝粒染色体, sm. 亚中部着丝粒染色体, st. 近端部着丝粒染色体; 绿色信号为45S *rDNA*

**Plate 1 FISH mapping of 45S *rDNA* and karyotype of 4 species of abalone**

The four left figures (1, 3, 5, 7) were FISH mapping of 45S *rDNA* gene in *H. discus hannai*, *H. gigantea*, *H. fulgens* and *H. diversicolor*, respectively; the four right figures (2, 4, 6, 8) were the corresponding karyotype arrangement of four species abalone; m. metacentric; sm. submetacentric, st. subtelocentric; the green signal was the 45S *rDNA* gene





图版 II 4种鲍中45S *rDNA*位点的其他模式

1、2、3三幅图为皱纹盘鲍45S *rDNA*中期分裂相图；4、5、6三幅图为西氏鲍45S *rDNA*中期分裂相图；7、8、9三幅图为绿鲍45S *rDNA*中期分裂相图；10、11、12三幅图为杂色鲍45S *rDNA*中期分裂相图；绿色信号为45S *rDNA*

**Plate II Other patterns of 45S *rDNA* loci in 4 species of abalone**

The 1, 2, 3 three figures were FISH mapping of 45S *rDNA* gene in *H. discus hannai*; the 4, 5, 6 three figures were FISH mapping of 45S *rDNA* gene in *H. gigantea*; the 7, 8, 9 three figures were FISH mapping of 45S *rDNA* gene in *H. fulgens*; the 10, 11, 12 three figures were FISH mapping of 45S *rDNA* gene in *H. diversicolor*; the green signal was the 45S *rDNA* gene