

圆斑星鲈染色体与多种显带的形态特征分析

王妍妍¹, 柳学周^{1*}, 刘新富¹, 徐永江¹, 孙中之¹, 兰功刚²

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所,农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室,山东 青岛 266071;
2. 青岛忠海水产有限公司,山东 青岛 266414)

摘要: 采用体内注射植物血细胞凝集素(PHA)和秋水仙素法制备圆斑星鲈染色体,研究其染色体C-带、Ag-NORs带及G-带的显带特征。结果发现,圆斑星鲈具有46条染色体,核型为 $2n=46t$,染色体臂数为 $NF=46$,所检个体全部为二倍体,未发现存在异型性染色体和随体染色体的现象。带型研究表明,C-带特征为46条染色体均有大小不一的C-带,其中第22对染色体整体呈阳性深染,第19对染色体具有端部C-带,其余均为着丝粒C-带;计算其异染色质含量为30%;Ag-NORs带型特征为具有1对Ag-NORs,位于2号染色体的长臂末端,为端部Ag-NORs;G-带特征为具有38条深染带,21条浅染带。研究结果为圆斑星鲈染色体组学和种质资源保护提供了基础资料。

关键词: 圆斑星鲈; 染色体; C-带; Ag-NORs带; G-带

中图分类号: Q 343.2; S 917

文献标志码: A

圆斑星鲈(*Verasper variegatus* Temminck et Schlegel)属于鲈形目(Pleuronectiformes)、鲈科(Pleuronectidae)、星鲈属(*Verasper*),为冷温性大型底栖鲈类和传统名贵鱼类。主要分布于我国的黄渤海、日本九州和朝鲜海域^[1]。圆斑星鲈自然资源越来越稀少,目前已基本形成不了捕捞产量,随着其市场价格的不断攀升,逐渐成为中、日、韩三国的增养殖的重点研究对象,与此相关的研究工作也逐年增多,主要包括亲鱼培育促熟^[2]、早期发育形态^[1]、精子超微结构和冷冻保存技术^[3]及人工育苗技术^[4]等。与染色体相关的研究,沙珍霞等^[5]和陈四清^[6]分别报道了其核型,但是两者的结果存在分歧,至于染色体显带方面尚未见研究报道。

染色体是一切生物遗传、变异、发育和进化的物质基础,研究染色体的行为、数目和核型不仅对了解生物的遗传组成、遗传变异规律和发育机制具有重要的意义,而且对于预测并鉴定种间杂交和多倍体育种的结果,了解性别遗传机制,确定生物的基因组数目,研究物种起源及相互间亲缘关

系、进化地位、分类和种族关系等也具有的重要的参考价值^[7]。本研究在获得高质量圆斑星鲈染色体核型的基础上,对其染色体及其多种显带(C-带、Ag-NORs带及G-带)的形态特征进行了系统研究和分析,旨在为圆斑星鲈的染色体组学、种质资源保护、杂交育种、全雌苗种生产、三倍体育种和增养殖研究等方面提供遗传背景资料和科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用圆斑星鲈取自青岛忠海水产有限公司,源于驯养的渤海野生亲鱼繁育的后代,为1龄鱼,合计12尾试验鱼,体质量为150~300 g,体长为18~26 cm,体高为10~15 cm,根据解剖观察性腺判定其中雌鱼为7尾,雄鱼为5尾。试验鱼取样前的养殖条件为室内养殖池流水培育,培育水温20~22℃、盐度28~30。

1.2 方法

染色体核型分析 注射PHA和秋水仙素:

收稿日期:2011-04-28 修回日期:2011-07-20

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA10A414,2010AA10A402);国家鲆鲽类产业技术体系建设专项资金(CARS-50);公益性农业行业专项项目(nyhyzx07-046)

通讯作者:柳学周,E-mail:liuxz@ysfri.ac.cn

首先,在试验鱼腹腔部位(靠近胸鳍基部)注射 PHA 溶液(0.7% 生理盐水配制),剂量 20 $\mu\text{g/g}$ (鱼体湿重)。注射后将试验鱼置于车间养殖池中暂养,温度 20~22 $^{\circ}\text{C}$,用小网箱与其他鱼隔开,24 h 后在同一部位注射秋水仙素(0.7% 生理盐水配制),剂量 2.5 $\mu\text{g/g}$ (鱼体湿重)。

断尾放血:注射秋水仙素 2~3 h 后将试验鱼断尾放血约 20 min,鱼死前解剖取头肾,用镊子小心去掉表面血丝及其它杂质,用 0.7% 生理盐水冲洗 2 次。将头肾组织块置于装有少许生理盐水的培养皿中,用小型眼科解剖剪反复剪碎后用 2~3 层纱布将细胞悬液过滤至离心管中,1 500 r/min 离心 5 min,收集细胞。

低渗:用生理盐水洗涤头肾细胞 2 次后,用 75 mmol/L KCl 溶液低渗处理 25~30 min,1 500 r/min 离心 5 min,弃去低渗液。

固定:用新鲜配制的预冷的卡诺氏固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)固定 4 次,用吸管吹打以充分固定,每次 20 min。最后一次制成细胞悬液,放在常温或 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中过夜。

滴片:采用冷滴片法制备染色体标本,将处理干净的载玻片(60 $^{\circ}\text{C}$ 洗衣粉液浸泡 18 h \rightarrow 自来水冲洗 \rightarrow 蒸馏水冲洗 \rightarrow 无水乙醇浸泡 \rightarrow 蒸馏水浸泡)置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中预冷 30 min 后取出,甩干蒸馏水后用于滴片,滴片高度 140~150 cm,用玻璃吸管吸取细胞悬液,每一玻片上约 3 滴。

染色:制备的玻片在室温下空气自然干燥后用 10% Giemsa 染液(pH 6.8 的磷酸缓冲液配制)染色 30~40 min,蒸馏水冲洗干净后在室温下自然干燥,用于显微镜观察。

核型分析:将染色体制片置于 Olympus MS800 型显微镜下观察,选取 100 个分散良好的分裂相,计算染色体数目,并从中选取 30 个分散良好且数目完整的分裂相在油镜下进行显微拍照。对染色体进行测量并按其特点进行同源染色体配对,方法按 LEVAN 等^[8]提出的命名和分类标准。

C-带带型 制片:采用文献[9]的方法并稍作修改。将未染色的标本在 60 $^{\circ}\text{C}$ 的 5% $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 水溶液中处理 9~12 min,然后在 0.4 mol/L HCl 中室温处理 11 min,再在 60 $^{\circ}\text{C}$ 的 2 \times SSC 溶液中孵育 1 h,最后用 10% Giemsa 染液染色 30 min,蒸馏水冲洗干净,自然干燥。

带型分析:鱼类染色体 C-带带型的重要参数有以下几个^[10]:

(1) C-带块位置

鱼类染色体 C-带位置大致有以下几种情况:

① 着丝粒带。带纹分布在着丝粒及其附近两侧;② 端带。带纹分布在染色体臂端;③ 居间带。带纹分布在着丝粒至臂端之间,表现比较复杂,不是所有染色体都有居间带。根据其所在位置又细分为近着丝粒带、中间带、亚中间带和亚端带等。

(2) C-带块长度

① 绝对长度(AL),即实测长度;② 相对长度(RL),即某染色体带纹实测长度占该染色体实测长度的比值。计算公式如下:

$$\text{带纹相对长度}(\%) = \frac{\text{某一染色体带纹长度}}{\text{该染色体长度}} \times 100 \quad (1)$$

③ C-带块着色程度,即着色的强、弱程度;④ C-带纹总数;⑤ 异染色质含量,即染色体上 C-带相对长度之和。计算公式如下:

$$\text{异染色质含量}(\%) = \frac{\text{染色体组中 C-带带纹总长度}}{\text{染色体组中染色体总长度}} \times 100 \quad (2)$$

在 100 倍油镜下检查标本,如着丝粒区域或异染色质部位、次缢痕部位深染,染色体其它部位基本上不上色,即为可取标本。若观察到染色体均呈白色,那么可能为碱处理或 2 \times SSC 温育过度。对于较好的制片,做好标记,以便进行拍照。利用测得的染色体 C-带的相对长度,绘制圆斑星鳃染色体 C-带模式图^[11]。

Ag-NORs 带型 制片:采用快速银染法^[12],50% AgNO_3 溶液与 2% 明胶溶液以 2:1 混合后,立即滴加到未染色的染色体制片上,覆以盖玻片后在 65 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中处理 3~5 min,当整张片子呈棕黄色时取出,流水冲洗干净,自然干燥。

带型分析:观察 100 个以上的分裂相和细胞核,仔细区分 Ag-NORs 位置和杂质,以确定 Ag-NORs 的数目,并观察 Ag-NORs 的大小、位置等。取 30 个典型的分裂相进行核型分析,确定 Ag-NORs 的位置。经测量、剪贴、重排等进行圆斑星鳃 Ag-NORs 带型分析,并利用 Excel 绘制其模式图。

G-带带型 制片:采用王昌留^[10]的方法稍作修改,将制备好未经染色的标本放在 66 $^{\circ}\text{C}$ 的干燥箱中老化 2 h。然后在新配制的 0.3% 胰酶与 0.02% EDTA 混合液中(1:1)33~37 $^{\circ}\text{C}$ 处理 5~7

min,蒸馏水冲洗干净后 Giemsa 染色。

G-带带型分析:选择 30 个染色体分散良好、带型清楚的分裂相,进行拍照。结合形态,根据带型分清每对同源染色体,使之配对并按长度、着丝点位置等指标排列起来,选择 1 张清晰而标准的相片,作成 G 带核型图。根据相片分析和显微镜确定染色体带的数量、相对位置,同时结合染色深浅、带纹宽窄等特征,利用 Excel 绘制其模式图。

2 结果

2.1 染色体核型

在显微镜下对圆斑星鲮分散良好的 100 个染色体中期分裂相进行计数。结果表明,其中期分裂相均为二倍体,染色体众数为 46,占分裂相总数的 77%,各种数目的分裂相所占比例见表 1。非众数部分的染色体数目可能是由于制片过程中染色体丢失或细胞重叠造成的。

表 1 圆斑星鲮二倍体染色体计数结果

Tab.1 Chromosome counts in the diploid of *V. variegatus*

染色体数目 number of chromosome	分裂相数目 number of metaphase	所占百分比/% percent of metaphase
≤40	3	3
42	4	4
43	3	3
44	2	2
45	10	10
46	77	77
88	1	1
合计 total	100	100

本实验所获得的圆斑星鲮头肾细胞染色体中期分裂相形态清晰,基本无重叠,着丝点清晰易辨。通过测量和计算,获得圆斑星鲮染色体的相对长度(RL)、实际长度(AL)和臂比(AR)(表 2)。

表 2 圆斑星鲮染色体相对长度与实际长度

Tab.2 Metaphase chromosome relative length and actual length in *V. variegatus*

					$\bar{X} \pm SD$				
编号 chromosome pair no.	相对长度 relative length	实际长度/ μm actual length	臂比 arm ratio	类型 type	编号 chromosome pair no.	相对长度 relative length	实际长度/ μm actual length	臂比 arm ratio	类型 type
1	5.98 ± 0.51	1.79 ± 0.49	∞	t	13	4.21 ± 0.10	1.26 ± 0.32	∞	t
2	5.50 ± 0.21	1.65 ± 0.48	∞	t	14	4.16 ± 0.09	1.24 ± 0.32	∞	t
3	5.36 ± 0.15	1.60 ± 0.44	∞	t	15	4.08 ± 0.09	1.22 ± 0.32	∞	t
4	5.14 ± 0.13	1.54 ± 0.42	∞	t	16	3.99 ± 0.04	1.19 ± 0.32	∞	t
5	4.97 ± 0.17	1.49 ± 0.39	∞	t	17	3.91 ± 0.11	1.17 ± 0.32	∞	t
6	4.87 ± 0.16	1.45 ± 0.36	∞	t	18	3.81 ± 0.14	1.14 ± 0.30	∞	t
7	4.77 ± 0.13	1.42 ± 0.35	∞	t	19	3.65 ± 0.20	1.09 ± 0.30	∞	t
8	4.68 ± 0.13	1.39 ± 0.34	∞	t	20	3.52 ± 0.22	1.06 ± 0.31	∞	t
9	4.60 ± 0.11	1.37 ± 0.34	∞	t	21	3.41 ± 0.20	1.02 ± 0.28	∞	t
10	4.46 ± 0.10	1.33 ± 0.33	∞	t	22	3.28 ± 0.22	0.98 ± 0.26	∞	t
11	4.41 ± 0.09	1.32 ± 0.33	∞	t	23	2.95 ± 0.31	0.89 ± 0.28	∞	t
12	4.31 ± 0.09	1.29 ± 0.32	∞	t					

从表 2 可以看出,圆斑星鲮具有 23 对染色体,全部为端部着丝点染色体。染色体相对长度最长为(5.98 ± 0.51),最短为(2.95 ± 0.31)。计算得出,染色体长度比即最长与最短染色体相对长度之比为 2.03;极差(L_e)即最长与最短染色体相对长度之差为 3.03;染色体相对长度平均值(L_a)为 4.35,各对相邻染色体之间相对长度差异不明显。染色体实际长度最长为(1.79 ± 0.49) μm ,最短为(0.89 ± 0.28) μm 。因此,圆斑星鲮

染色体核型公式为 $2n = 46t$,即有 23 对端部着丝点染色体(t),臂数 $NF = 46$,不具有异型性染色体。圆斑星鲮染色体的中期分裂相和核型图谱见图 1-a、b。

2.2 染色体 C-带带型分析

分析了 30 个清晰的圆斑星鲮 C 带染色体中期分裂相,挑选染色体基本无重叠,带型较为清晰的一组经拍照、测量、剪贴、重排制做 C 带核型图,其分裂相和核型见图 2-a、b。

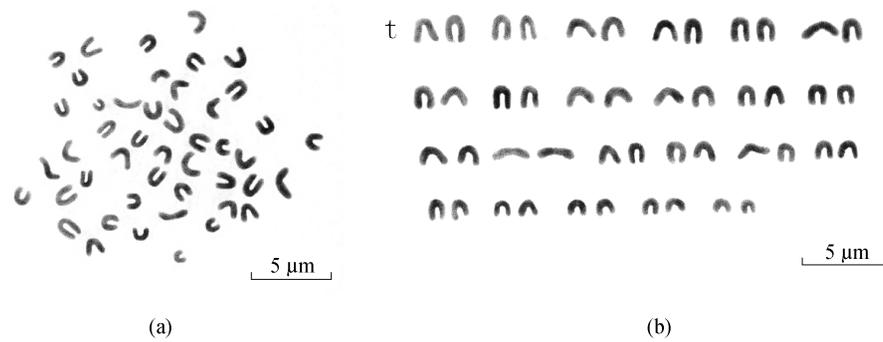


图1 圆斑星鲷中期染色体分裂相(a)及其核型(b)

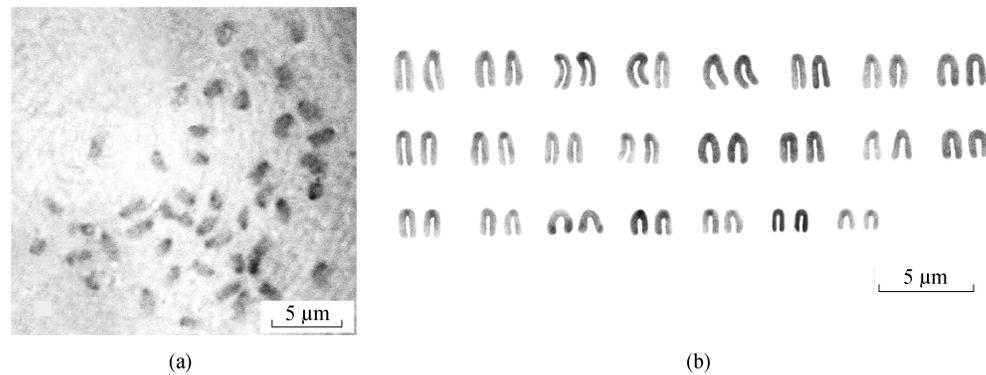
Fig.1 The metaphase chromosomes (a) and karyotype (b) of *V. variegatus*

图2 圆斑星鲷染色体C-带分裂相(a)及核型(b)

Fig.2 The C-banding metaphase chromosomes (a) and karyotype (b) of *V. variegatus*

圆斑星鲷 46 条染色体均有大小不一的 C 带深染, 其中第 22 对染色体整条呈阳性深染, 第 19 对染色体具有端部 C 带, 其余均为着丝粒 C 带, 未发现居间 C 带。同源染色体 C 带的大小、位置及着色强度基本相同, 不同染色体的 C 带有一定

的差异(图 2-a, b)。

通过测量和计算, 得出圆斑星鲷单倍体组每条染色体的 C-带相对长度(表 3), 按照公式(2), 得出其异染色质含量为 30%。根据计算结果绘制其 C-带带型模式图(图 3)。

表 3 圆斑星鲷染色体 C-带相对长度
Tab.3 Relative length of C-banding in *V. variegatus*

序号 chromosome pair no.	染色体 长度/ μm actual length	C-带带 宽/ μm width of C-banding	C-带相对长度/% (C-带带宽/染色体长度) relative length of C-banding	序号 chromosome pair no.	染色体 长度/ μm actual length	C-带带 宽/ μm width of C-banding	C-带相对长度/% (C-带带宽/染色体长度) relative length of C-banding
1	1.79	0.33	18.75	13	1.24	0.42	33.33
2	1.65	0.35	21.43	14	1.26	0.21	16.67
3	1.60	0.40	25.00	15	1.22	0.34	28.00
4	1.54	0.27	17.86	16	1.19	0.22	18.18
5	1.49	0.28	18.52	17	1.17	0.33	28.00
6	1.45	0.34	23.08	18	1.14	0.41	36.36
7	1.42	0.24	16.67	19	1.09	0.33	30.00
8	1.39	0.46	33.33	20	1.06	0.38	36.36
9	1.37	0.31	22.22	21	1.02	0.27	26.32
10	1.33	0.82	61.54	22	0.98	0.98	100.00
11	1.32	0.44	33.33	23	0.89	0.30	33.33
12	1.29	0.43	33.33				

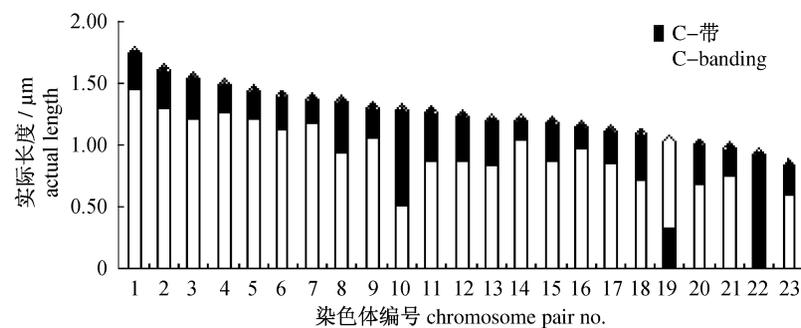


图3 圆斑星鲈染色体 C-带模式图

Fig.3 The schema chart of C-banding of *V. variegatus*

2.3 染色体 Ag-NORs 带型分析

Ag-NORs 位点的绝对数目 Ag-NORs 的数目在圆斑星鲈头肾细胞中表现出不同的多态性,其数目为 1~2 个。两种数目的 Ag-NORs 出现的频率相差很大,出现 2 个 Ag-NORs 的频率高,达 90%;出现 1 个 Ag-NORs 的频率为 10% (表 4)。与此相一致的是,在间期核中,通过银染表现出 2 个核仁的间期核的频率很高,多达 75%;出现 1 个核仁的间期核的频率为 25% (图 4)。故确定圆斑星鲈 Ag-NORs 的数目为 2 个。

Ag-NORs 位点在染色体上的位置 选择染色体数目完整、Ag-NORs 显示清晰的中期分裂相进行分析,圆斑星鲈仅显示 1 对 NORs,位于 2 号染色体的长臂末端,为端部 Ag-NORs (图 5),未发现 NORs 的联合现象。银染色的圆斑星鲈染色体分裂相和核型见图 5-a、b,通过测量和计算,用 Excel 绘制其模式图 (图 6)。

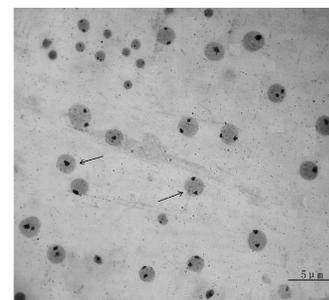


图4 圆斑星鲈的间期核

Fig.4 The nucleus of *V. variegatus*

表4 圆斑星鲈 30 个分裂相中各种数目的 Ag-NORs 出现的频率

Tab.4 The appearance frequency of Ag-NORs in *V. variegatus*

类型 types	Ag-NORs 数目 no. of Ag-NORs	观察分裂相数 no. of metaphase observed	频率/% appearance frequency of Ag-NORs
A	1	3	10
B	2	27	90

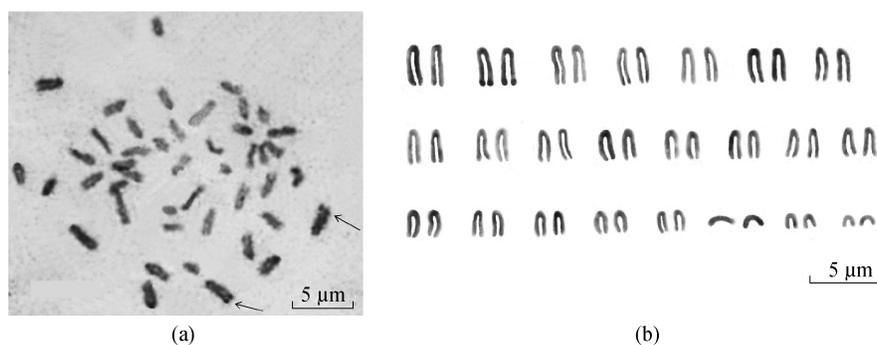


图5 圆斑星鲈染色体 Ag-NORs 分裂相(a)及核型(b)

箭头示一对 Ag-NORs。

Fig.5 The Ag-NORs metaphase chromosomes (a) and karyotype (b) of *V. variegatus*

The arrows show the Ag-NORs.

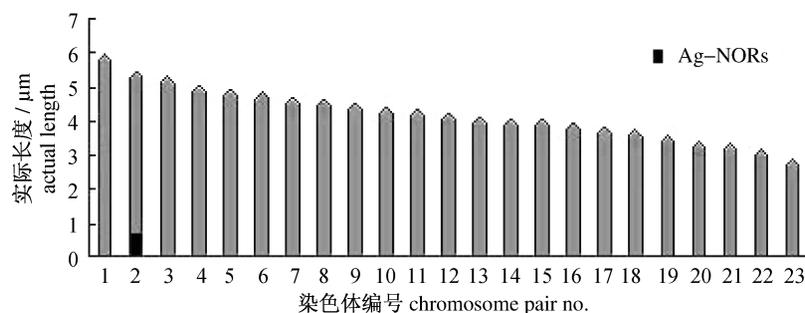


图6 圆斑星鲈染色体 Ag-NORs 模式图

Fig. 6 The schema chart of Ag-NORs of *V. variegatus*

2.4 圆斑星鲈染色体 G-带带型分析

选择 30 个染色体分散良好、带型清楚的分裂相进行拍照分析。选择 1 张清晰而标准的相片,结合形态,根据带型分清每对同源染色体。通过测量和计算,将同源染色体配对并按长度、着丝点

位置等指标排列起来,作成 G 带核型图(图 7-b)。根据相片分析和显微镜观察确定染色体带的数量、相对位置,同时结合染色深浅、带纹宽窄等特征,利用 Excel 测绘出它们的模式图(图 8)。

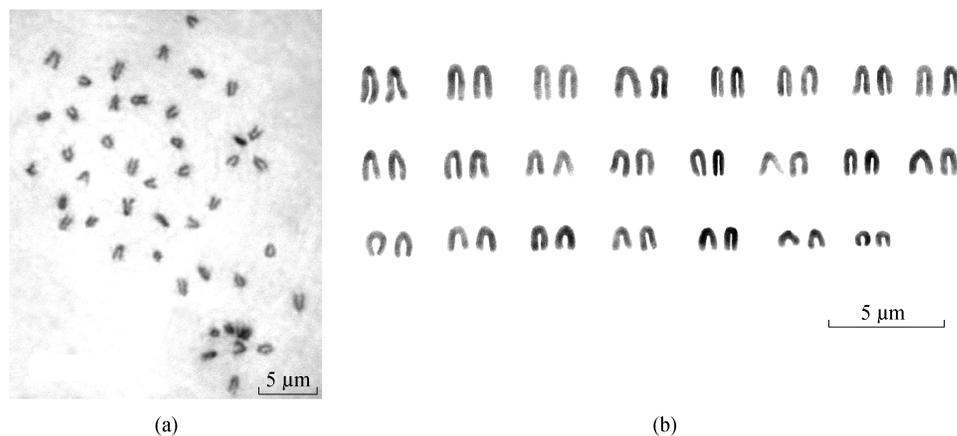


图7 圆斑星鲈染色体 G-带分裂相(a)及核型(b)

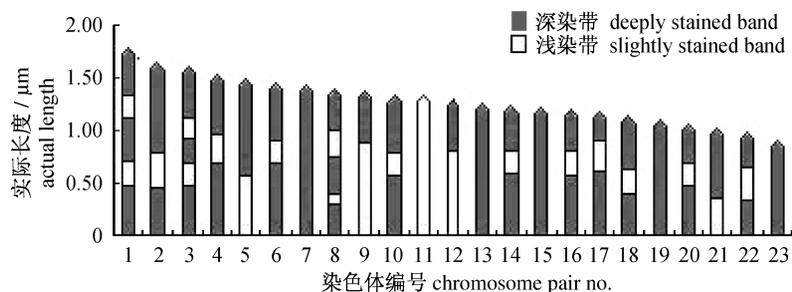
Fig. 7 The G-banding metaphase chromosomes (a) and karyotype (b) of *V. variegatus*

图8 圆斑星鲈染色体 G-带模式图

Fig. 8 The schema chart of G-banding of *V. variegatus*

从图 8 可以看出,圆斑星鲈共有 38 条深染带,21 条浅染带,其中有 5 对(第 7、13、15、19、23 号)染色体整条呈 G-带深染;1 对(11 号)染色体未显示 G 带深染,其余染色体显示出不同类型的 G-带。与 G 带型相比,圆斑星鲈的 C 带型重复性

好,染色体带型较清楚。

3 讨论

3.1 染色体核型

本研究在圆斑星鲈染色体核型和带型制片过

程中,通过对大量染色体中期分裂相进行统计与分析,得出其染色体核型公式为 $2n = 46t$,与沙珍霞等^[5]报道的圆斑星鲈染色体核型结果相同,但与陈四清^[6]报道的核型公式 $2n = 44t$ 有数目上的差异。通过测量计算,得出圆斑星鲈染色体相对长度为 $(5.98 \pm 0.51) \sim (2.95 \pm 0.31)$,与沙珍霞等^[5]报道的染色体相对长度 $(5.21 \pm 0.16) \sim (2.9 \pm 0.03)$ 相似。圆斑星鲈染色体的实际长度为 $(0.89 \pm 0.28) \sim (1.79 \pm 0.49) \mu\text{m}$,属于生物界中较小的染色体,符合鱼类染色体数目多且小的规律^[13]。

鱼类染色体核型结构及其演化情况比较复杂,同一科属近缘种的核型不一定类似,甚至很不相同。目前,关于鲈形目鱼类染色体核型的报道还比较少,统计了 12 种鲈形目鱼类的染色体核型(表 5),其中 7 种鱼的核型为 $2n = 48t$, VITTRRI

等^[21]学者研究认为,鲈形目鱼类原始的核型应该为 $2n = 48t$ 。大多数的鲈形目鱼类核型属于原始类型,有些则通过罗伯逊易位和染色体结构重排如臂间倒位等方式^[22]由原始类型变异为特异类型,圆斑星鲈和条斑星鲈应属于特异类型。有关学者 OKUMURA 等^[15]、王妍妍等^[16]对条斑星鲈染色体核型研究表明,其核型公式为 $2n = 46 = 2sm + 44t$,与圆斑星鲈染色体数目相同,但核型不同,其原因可能是种的差异造成染色体发生了不同程度的变异^[5]。圆斑星鲈和条斑星鲈染色体核型的差异可作为其种间鉴定的依据之一。

李树深^[23]指出,在一定的分类阶元中,具有较多 t 染色体的物种较为原始,而具有较多 m 和 sm 染色体的物种是特化种类,即染色体臂数较多的种类为进化类型。因此,从条斑星鲈和圆斑星鲈的染色体核型比较,条斑星鲈可能比圆斑星鲈较为进化。

表 5 12 种鲈形目鱼类的染色体特征

Tab. 5 Chromosome characteristics of 12 species in Pleuronectiformes

科 family	中文种名 Chinese name	拉丁学名 scientific name	二倍体染色体数 2n	核型 karyotype	染色体臂数 NF	参考文献 references
鲈科 Pleuronectidae	角木叶鲈	<i>Pleuronichthys cornutus</i>	48	12m + 2sm + 34t	62	[14]
	钝吻黄盖鲈	<i>Pseudopleuronectes yokohamae</i>	48	48t	48	[14]
	亚洲油鲈	<i>Microstomus achne</i>	48	48t	48	[14]
	石鲈	<i>Kareius bicoloratus</i>	48	48t	48	[14]
	条斑星鲈	<i>Verasper moseri</i>	46	2sm + 44t	48	[5]
	圆斑星鲈	<i>Verasper variegatus</i>	46	46t	46	[15-16]
			44	44t	44	[6]
	星突江鲈	<i>Platichthys stellatus</i>	48	48t	48	[17]
牙鲆科 Paralichthyidae	牙鲆	<i>Paralichthys olivaceus</i>	48	48t	48	[14]
	桂皮斑鲆	<i>Pseudorhombus cinnamomeus</i>	48	48t	48	[14]
鲆科 Bothidae	漠斑牙鲆	<i>Paralichthys lethostigma</i>	48	48t	48	[18]
	大菱鲆	<i>Scophthalmus maximus</i>	44	4m + 2sm + 10st + 28t	48	[19]
舌鳎科 Cynoglossidae	半滑舌鳎	<i>Cynoglossus semilaevis</i> Günther	42	42t	42	[20]

3.2 染色体带型

C 带对应染色体中异染色质化区域,此区域含有大量无转录活性的重复的 DNA 序列。在本研究中,圆斑星鲈的 C 带异染色质大多数出现在着丝粒端(23 对染色体有 21 对在着丝粒端),这与染色体中 C 带异染色质通常主要出现在着丝粒端^[24]相符合,统计分析表明,圆斑星鲈结构异染色质在染色体上所占的比率为 30%,与半滑舌鳎(30.03%)^[25]类似。本文作者还进行了条斑星鲈染色体 C 显带的研究,结果表明其结构异染色

质的含量为 54.91% (另文发表)。SHI 等^[26]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完全异染色质臂,这些都是物种进化的特征。因此从 C-带带型看条斑星鲈和圆斑星鲈的进化关系,条斑星鲈似乎比圆斑星鲈较为进化,这与其核型特征一致。

核仁组织者是由次缢痕部位延伸出来的 DNA 样组成,是 18S、5.8S 及 28S rRNA 合成的场所,在脊索动物中位于染色体的次缢痕部

位^[27]。每种生物的染色体组中一般至少有一条或一对染色体上有次缢痕,可以通过银染技术显现出来。AMEMIYA 等^[28]和 MARTINS 等^[29]根据不同鱼类 NORs 带的研究结果,提出 NORs 为 1 对并位于染色体端部的是原始类群。因此,从 NORs 带的特征来看,圆斑星鲈属于较原始的类群。本研究还进行了条斑星鲈染色体 Ag-NORs 带研究,其结果表明条斑星鲈仅显示 1 对 NORs,位于亚中部着丝点染色体的短臂上,为端部 Ag-NORs(另文发表)。条斑星鲈亚中部染色体按相对长度也属于 2 号染色体,这很可能说明条斑星鲈和圆斑星鲈的 2 号染色体具有很高的同源性,可能是经过染色体结构重排形成的。鲆鲽类中大菱鲆有 1 对 NORs 带,位于 3 号染色体的短臂^[18];半滑舌鳎也有 1 对 NORs 带,位于 2 号染色体的着丝粒区^[25]。

关于鱼类 G 带的研究报道很少,主要因为其重复性较差,带纹不稳定。显带技术最初源于哺乳动物的染色体研究,显带方法有很多种,有些已成功应用于变温脊椎动物,如鱼类^[10,25]、两栖类^[30]和爬行类^[31]。刘凌云^[32]在用 BrdU 处理鱼类染色体高分辨 G-带时,在同一实验条件下,所得不同长度的染色体具有不同数目的带纹,随染色体长度的增加,带纹数目也增加,但各有特征,说明染色体有规律地动态变化导致同一物种呈现不同 G-带特征;在染色体缩短时,带纹因融汇引起数目减少,而当染色体处于伸长状态时,原有的带纹会显示出来^[32]。本研究发现,制备 G 带的染色体标本片龄应在 10 d 左右,片龄太短,容易被胰酶消化过度而成“空泡状”,制片的时间不易掌握;片龄太长,又难以被消化。由于本实验所得的中期染色体收缩程度均较大,故显示出的带纹较少,没有进行 G 带的分区和命名,试验方法有待进一步改进。

参考文献:

- [1] 陈四清,高天翔,王琛,等. 圆斑星鲈早期发育特征的研究[J]. 中国海洋大学学报:自然科学版, 2006,36(2):281-286.
- [2] YAMAGUCHI S, YONEDA M, OTA K, *et al.* Reproductive biology of spotted halibut, *Verasper variegatus*, in Tachibana Bay, Nagasaki Prefecture [J]. Science Bulletin of the Faculty of Agriculture Kyushu University, 2001,55(2):179-184.
- [3] LIU X Z, ZHANG S C, ZHANG Y Z, *et al.* Cryopreservation of the spotted halibut (*Verasper variegatus*) sperm [J]. Indian Journal of Marine Sciences, 2006,35(1):24-28.
- [4] ARITAKI M, OTA K, HOTTA Y, *et al.* Temperature effects on larval development and occurrence of metamorphosis-related morphological abnormalities in hatchery-reared spotted halibut *Verasper variegatus* juveniles [J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 2004,70(1):8-15.
- [5] 沙珍霞,陈松林,田永胜. 圆斑星鲈染色体核型分析[J]. 中国水产科学, 2007,14(3):478-481.
- [6] 陈四清. 圆斑星鲈(*Verasper variegatus*) 人工繁育技术及遗传特性的研究[D]. 青岛:中国海洋大学, 2005.
- [7] GUI J F, ZHOU L. Genetic basis and breeding application on clonal diversity and dual reproduction modes in polyploid *Carassius auratus gibelio* [J]. Science China Life Science, 2010,53(4):409-415.
- [8] LEVAN A, FREDGA K, SANDBERG A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes [J]. Hereditas, 1964,52:201-220.
- [9] SUMMER A T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin [J]. Experimental Cell Research, 1972, 75(1):304-306.
- [10] 王昌留. 青岛文昌鱼染色体的核型及带型研究[D]. 青岛:中国海洋大学, 2003.
- [11] 乔永刚,宋芸. 利用 EXCEL 制作核型模式图[J]. 农业网络信息, 2006(10):97-98.
- [12] HOWELL W M, BLACK D A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method [J]. Cellular and Molecular Life Science, 1980,36(8):1014-1015.
- [13] 卓孝磊,邹记兴. 我国海水鱼类核型及染色体显带研究进展 [J]. 热带海洋学报, 2007, 26(5):73-80.
- [14] 王梅林,郑家声,朱丽岩,等. 我国海洋鱼类和贝类染色体组型研究进展 [J]. 青岛海洋大学学报, 2000,30(2):277-284.
- [15] OKUMURA S I, MIZUHO S, KANAMI O. A simple and efficient method of chromosome preparation using larvae of the barfin flounder *Verasper moseri* (Osteichthyes, Pleuronectiformes) [J]. Chromosome Science, 2006(9):95-97.
- [16] 王妍妍,柳学周,徐永江,等. 条斑星鲈染色体核型分析 [J]. 渔业科学进展, 2009,30(2):8-13.

- [17] 徐冬冬,尤锋,王波,等. 星斑川鲷染色体核型分析[J]. 海洋科学进展,2008,26(3):377-380.
- [18] 李鹏飞,刘萍,柳学周. 漠斑牙鲆染色体组型研究[J]. 海洋水产研究,2007,28(4):26-30.
- [19] BOUZA C, SANCHEZ L, MARTNEZ P. Karyotypic characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*) with conventional fluorochrome and restriction endonuclease-banding techniques [J]. Marine Biology,1994,120:609-613.
- [20] 周丽青,杨爱国,柳学周,等. 半滑舌鳎染色体核型分析[J]. 水产学报,2005,29(3):417-419.
- [21] VITTURI R, CATALANO E, COLOMBERA D. Chromosome analysis of Bothuspodas (Pisces, Pleuronectiformes) from the Mediter ranean Sea[J]. Journal of Fish Biology,1993,43:221-227.
- [22] SOLE-CAVA A M, RUSSO C A M, THORPE J P. An overview of marine fish cytogenetics [J]. Hydrobiologia,2000,420:55-62.
- [23] 李树深. 鱼类细胞分类学[J]. 生物科学动态,1981,2:8-15.
- [24] GOLD J R, LI Y C, SHIPLEY N S, *et al.* Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding [J]. Journal of Fish Biology,1990,37:563-575.
- [25] 庄志猛. 半滑舌鳎早期发育生物学与种质资源研究[D]. 青岛:中国科学院海洋研究所,2006.
- [26] SHI L, YE Y, DUAN X. Comparative cytogenetic studies on the red muntjac, Chinese muntjac and their F₁ hybrids [J]. Cytogenet Cell Genet, 1980, 26: 22-27.
- [27] SUMMERA T. Chromosome banding [M]. London: Unwin Hyman,1990.
- [28] AMEMIYA C T, GOLD J R. Cytogenetic studies in North American minnows (Cyprinidae). XVII. Chromosomal NOR phenotypes of 12 species with comments on cytosystematic relationships among 50 species[J]. Hereditas,1990,112:231-247.
- [29] MARTINS I C, PORTELLA-CASTRO A L B. Chromosome analysis of 5 species of the Cichlidae family (Pisces-Perciformes) from the Parana River [J]. Cytologia,1995,60:223-231.
- [30] SCHMID M. Chromosome banding in amphibia. IV. Differentiation of GC-and AT-rich chromosome regions in Anura [J]. Chromosoma, 1980, 77 (1): 83-103.
- [31] 胡启平,接燕荣. 南草蜥的核型和G带带型分析[J]. 广西医科大学学报,1999,16(2):137-139.
- [32] 刘凌云. BrdU处理的鱼类染色体高分辨G-带带型分析[J]. 遗传学报,1988,15(2):117-121.

Analysis of the karyotype and banding patterns of *Verasper variegatus*

WANG Yan-yan¹, LIU Xue-zhou^{1*}, LIU Xin-fu¹, XU Yong-jiang¹, SUN Zhong-zhi¹, LAN Gong-gang²

(1. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resource, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Zhonghai Fishery Limited Corporation of Qingdao, Qingdao 266414, China)

Abstract: The karyotype of *Verasper variegatus* was studied through the chromosome preparations obtained from head kidney by the method of injecting PHA and colchicines. Metaphase chromosomes were analyzed by means of C-banding, Ag-NORs and G-banding. Experiment results showed that the diploid chromosome number of *V. variegatus* was 46 ($2n=46t$, $NF=46$). There was no visible evidence of sex chromosome and satellite chromosome. C-bands of *V. variegatus* were located mainly in the centromere regions of chromosomes except the No. 19 and 22 chromosomes, and the 19th pair of chromosomes showed positive C-bands in the terminal region while the whole 22th pair of chromosomes bore positive C-band thoroughly. The C-banding heretochromatin accounts for 30% of the total chromosome surface in *V. variegatus*. Silver staining study showed that *V. variegatus* bore a pair of Ag-NORs which was located at the end of long arm of the 2nd chromosome. A total of 59 positive G-bands (38 dark, 21 light) were recorded in 23 pairs of chromosomes. These results would provide basic data for the genomic research and biodiversity conservation of *V. variegatus*.

Key words: *Verasper variegatus*; chromosome; C-banding; Ag-NORs; G-banding

Corresponding author: LIU Xue-zhou. E-mail: liuxz@ysfri. ac. cn