

鱼类染色体显带的研究进展

耿德贵 王景明 江山 王芳*

(徐州师范大学生物系 徐州 221009)

关键词 鱼类 染色体显带

全世界现存鱼类约有 20 000 种左右,分属 46 目, 450 科, 4 032 属^[1]。其中淡水鱼类占 41.2%, 是脊椎动物分布最广, 种类最多的类群, 具有多种多样的生物学特性和重大的经济价值^[1]。

在脊椎动物中, 鱼类的染色体较小, 数目偏多, 研究工作难度较大。早期对鱼类染色体的研究, 由于方法学上的限制, 进展缓慢。据不完全统计, 截至 1980 年, 已报道染色体的鱼类达 1 076 种, 到 1985 年就已增加到 1 600 余种^[1]。到目前为止, 已有染色体分析报道的鱼类达 2 000 种左右, 占总数的 10%^[2~8]。这些有染色体记录的鱼类在 46 个目中约涉及 30 个目, 主要集中在鲤形目和鲈形目, 每个目都有 140 种以上, 且大多数为淡水鱼类。

对鱼类染色体的研究, 虽然近年来发展很快, 但迄今大多数国内外的的工作, 仍偏重于常规的核型分析。70 年代以来, 许多作者试图将在哺乳类染色体研究中卓有成效的各种显带技术应用到鱼类。然而, 除 C-带、荧光带和 Ag-NORs 带能获得较稳定的结果外, Q-带、R-带和 G-带虽也偶有报道^[9~11], 但结果并不理想。复制带在某些鱼类已初步显示出优于 Q-带和 G-带的效果, 但是否适用于大多数鱼类, 尚待进一步试验。近年来, 有人对鱼类减数分裂, 尤其是联会复合体的结构、行为和组型进行了观察和分析, 并将其作为细胞遗传学的特征和确定异型性染色体的一种重要手段^[2]。各种染色体显带技术在鱼类染色体研究中为必不可少的手段, 而且越来越重要。目前国内外学者对鱼类染色体显带研究的重点, 放在对现有

方法的改进和探索新的显带方法。现将国内外的这方面的工作情况简介如下:

1 Ag-NORs

硝酸银特异地染色 NORs 结合的酸性蛋白, 使该区域呈黑色。Ag-NORs 法被广泛地应用于鱼类染色体研究中, 获得了可靠的结果, 并以此作为研究物种间的亲缘关系和染色体进化的一个指标^[2~6, 12~15]。

多态性是动物染色体 Ag-NORs 的一个重要特征, 动物 Ag-NORs 多态性表现为以下 4 个方面: (1) 每个基因组中所具有的 NORs 的绝对数目; (2) NORs 在染色体上的位置; (3) 每个 NORs 的相对大小; (4) 每个细胞中具转录活性 NORs 的数目^[12, 16]。前两者主要存在于种间, 后两者存在于种内^[17], 而动物(包括鱼类)物种内的 Ag-NORs 一般只呈现数目多态和形态多态两种表现形式, 有些研究认为鱼类的这两种多态现象无个体特异性。因此, 关于 Ag-NORs 的多态性发生曾一度被认为是 rDNA 转录活性差异的反映, 即有转录活性的 NORs 方能被银染, 失活的 NORs 则不能被银染^[18]。至于 rDNA 转录活性差异表现原因, 有人推测是存在剂量补偿效应, 也有人认为可能是 rDNA 表达的时序不同所致。然而, 近几年有些研究成果表明, 某些动物种内 Ag-NORs 多态性的表现可能是遗传变异的产物, 例如对人类体细胞活性

第一作者介绍: 耿德贵, 男, 30 岁, 讲师, 硕士;

* 王芳 江苏铜山县棠张中学生物教研室 221113;

收稿日期: 1997-08-18, 修回日期: 1998-03-09

NORs 的克隆研究、人类 NORs 的活性与甲基化程度的相关分析、不同地理位置的红点鲑交配群的 Ag-NORs 数目及分布多态的检测以及某些动物中 Ag-NORs 数目及形态的个体特异性研究等文献都证实, Ag-NORs 多态性是可以遗传的, 而且这种遗传是简单地按孟德尔法则进行的^[12]。任修海等^[12, 19]对黄鳍进行了 Ag-NORs 多态性及荧光显带的研究, 发现黄鳍的染色体 Ag-NORs 具有明显的个体特异性的数目多态(Ag-NORs 数目多少)、分布多态(Ag-NORs 位于哪些染色体上)和形态多态(同源染色体上 Ag-NORs 的大小)现象。已证实, 黄鳍 Ag-NORs 的位置变化实质上是由于 NORs 分布多态性, 而不是 Ag-NORs 的失活所致。Garrido-Ramos 等^[14]通过 CMA₃ 染色, rDNA 含量测定和原位杂交也证明鲷鱼某些个体只具有一个 NOR 的原因是由于另一个 NOR 已缺失, 并不是失活所致。至于真正的可能性还有待于进一步研究。

Ag-NORs 多态性可以作为核型进化的指标来探讨近缘物种间或物种内不同地理居群间关系^[20]。王蕊芳等^[21]通过对不同地理区域鲫鱼染色体银染核仁组织者的比较研究发现, 从日本, 中国的东北部到西南部, 三倍体鲫鱼的 NORs 数目从 1 对, 2 对增至 3 对。认为在鱼类进化中, 随着 NORs 增大和数目的增加, DNA 和 rDNA 数量也随之增加, 这种鱼类比 NORs 小而少的鱼类较为特化。从而推测: 很可能日本的 *C. a. langsdorfii* 发生于较早的地质年代, 在漫长的进化历程中已演化为二倍体类群, 可认为是三倍体鲫鱼的原始类型。中国西南部的云南滇池高背鲫是近期才出现的, 是比较特化的类群, 仍保留三倍体的一些特征。中国东北部的方正银鲫是介于滇池高背鲫与日本 *C. a. langsdorfii* 之间的中间类群。

2 C-带

鱼类染色体经碱性溶液处理后, 染色体上的常染色质被抽提掉, 而结构异染色质则大部分被保留下来而被深染。C-带染色可使鱼类

染色体上的三个区域呈阳性: 着丝粒区、端粒区和居间区(包括 NORs)^[2-8, 10, 13-15, 22-25]。就目前所做过的鱼染色体的 C-带来看, 每种鱼都只有部分染色体的居间区被染色, 其中深染居间区(即 NORs)除少数几种鱼外^[23], 几乎都 C-带深染, 而且染色面积大, 甚至占了整个臂。每种鱼的整套染色体中都只有部分染色体的端粒区被着色。而对于着丝粒区来说, 有些鱼的所有染色体着丝粒区都被染色^[2, 7, 13, 22, 24, 25], 有些鱼只有部分染色体着丝粒区着色^[10, 14, 23], 甚至于有的鱼所有染色体着丝粒区都不着色^[8]。这是由于各区域的异染色质化程度不同所造成的, 导致部分区域的异染色质化极低的 DNA 被抽提掉而不着色。由于 C-带可使鱼类染色体的 NORs 深染, 因此, C-带可用来研究鱼类染色体 NORs 的多态性。

3 荧光带

国内外已有的资料证明, CMA₃ (Chromomycin A₃) 是一种 GC 碱基特异性的荧光染料, 用 B 激发可激发出明亮荧光, 特异地显示鱼类染色体的 NORs^[3-6, 13-15, 19]。CMA₃ 与 NORs 处的 rDNA 结合, 而不是与 NORs 结合的酸性蛋白结合, 因而不论 NORs 失活与否, 用 CMA₃ 染色都可使其显示出来, 从而可用于研究 NORs 的多态性及活性, 鉴定实际 NORs 的数目。另外, CMA₃ 可用于鉴别性染色体。在核型分析中, 绝大多数鱼类未见到异型性染色体, 因此需要用量带技术来鉴别。任修海等^[19]采用 CMA₃ 染色发现, 大鳞副泥鳅的 NORs 分布具有性别特异性: 雄性个体中的 NORs 存在于一对中等大小的 m 染色体上; 雌性个体中的一个 NOR 存在于 m 染色体上, 另一个位于 8m 染色体上。从而初步推测, 大鳞副泥鳅可能具有 ZW 型性别决定机制。

鱼类的染色体用 AT-碱基特异性的荧光染料 DA 与 DAPI 染色, 用 U 激发, 所有染色体都呈现均匀的荧光, 无明显带纹分化现象。

4 复制带

BrdU-Hoechst-Giemsa 显带机制是建立在胸腺嘧啶脱氧核苷的类似物 BrdU 在 S 期能渗入到进行复制的 DNA 中的基础上的^[9]。BrdU 标记的染色体片断染成淡蓝色,为晚复制区;BrdU 没有标记的染色体片段染成暗红色,为早复制区。在哺乳动物中,早复制带同 R 带相当,晚复制带同 Q 或 G 带一致。洪云汉等^[9]发现鱼类染色体的复制带和哺乳动物的一样,早复制带对应 R-带,晚复制带对应 G-带。由于 DNA 复制是非同步的,早晚复制期在染色体上交替存在,当以 Hoechst 33258 和 Giemsa 染色时,染色体可显示出明显的复合带型,真实反映了染色体 DNA 的复制情况^[26]。

鉴于鱼类的 Q-带、G-带及 R-带的图象并不理想,国内外的许多学者将复制带技术用于鱼类染色体研究,获得成功^[9~11,26]。洪云汉等^[9]采用肾细胞培养的方法对鲢鱼等三种鱼进行了复制带研究,张任培等^[26]采用了外周血培养和肾细胞培养方法做了鲫鱼的复制带,都获得了令人满意的结果,复制带带纹清晰、稳定。Giles 等^[11]和 Almeida Toledo 等^[10]各自采用活体直接注射 BrdU 的方法对鱼类染色体的复制带进行研究,也获得了令人满意的结果。

获得清晰、稳定的复制带,对我们进一步深入细致地研究鱼类染色体有极大的帮助,同时可以用于鉴别性染色体,识别由于染色体重排而导致的核型变异和多态现象,区别相近物种之间的染色体等^[11]。

5 G-带、R-带、Q-带及其它带型

对 G-带、R-带和 Q-带许多学者都作过尝试^[15,25,27~29],发现在同一分裂相中,有的染色体显示出带纹,另一些染色体带纹很模糊或不显示,重复性很差,难以取得理想效果。

尽管绝大多数的鱼类采取目前的方法做出来的 G-带不理想,但仍然有少数的鱼类显示出可辨的 G-带。刘凌云^[27]采用加入大剂量的 BrdU 使染色体伸长的方法,获得了黄鳍的

高分辨 G-带,显示出清晰稳定的带纹。樊连春等^[28]采用高氯仿处理,获得了黄鳍精母细胞粗线期染色体的高分辨 G-带;Wiberg^[25]获得了欧洲鳗鲡清晰的 G-带;另外,Medrano 等^[29]在欧洲鳗鲡中成功获得了 Q-带和 R-带。对于鱼类染色体,有些学者还进行了限制性内切酶显带,减数分裂联会复合体及其它带型的研究^[2,5,6,13,30]。

有关鱼类染色体其他方面的研究,我们在这里就不加以赘述。尽管目前对于鱼类染色体的研究比较缓慢,研究过的鱼类种类也不多,但我们确信,由于鱼类和我们休戚相关,对其染色体的研究必将越来越重要。

参 考 文 献

- 1 余先觉,周曦,李渝成,李康,周密. 中国淡水鱼类染色体. 北京:科学出版社,1989. 1~171
- 2 王蕊芳,马昆,施立明,贺维顺. 尼罗罗非鱼染色体的 C 带、Ag 带和减数分裂联会复合体的研究. 动物学研究, 1990, 11(4): 349~354
- 3 Amores A., G., J. Martinez, Reina, M. C. Alvarez. Karyotype, C-banding and Ag-NOR analysis in *Diplodus bellottii* (Sparidae, Perciformes). Intra-individual polymorphism involving heterochromatic regions. *Genome*, 1993, 36: 672~675
- 4 Lopez J. R., M. C. Alvarez, G. Thode, G. Martinez. Karyotype divergence in *Symphodus melops* and *Symphodus roissali* (Labridae, Perciformes): C-banded and Silver-NOR karyotypes. *Genome*, 1989, 32: 35~39
- 5 Lozano R., C. Ruiz Rejon, M. Ruiz Rejon. An analysis of Coho salmon chromatin by means of C-banding, Ag- and fluorochrome staining, and in situ digestion with restriction endonucleases. *Heredity*, 1991, 66: 403~409
- 6 Sanchez L., P. Martinez, A. Vinas, C. Bouza. Analysis of the structure and variability of nucleolar organizer regions of *Salmo trutta* by C-, Ag- and restriction endonuclease banding. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1990, 54: 6~9
- 7 王蕊芳,贺维顺,吴世芳. 泉水唇鱼的核型和带型研究. 动物学研究, 1997, 18(4): 411~414
- 8 陈敏蓉,刘汉勤,官之梅,陈道权. 白暨豚的核型及其 C-带核型的研究. 水生生物学报, 1996, 20(2): 138~143
- 9 洪云汉,周曦. 鱼类染色体显带的研究 I. 鱼类染色体复制带显带的 BrdU-Hoechst-Giemsa 方法. 遗传学报, 1985, 12(1): 67~71
- 10 Almeida Toledo L. F., E. Viegas-Pequignot, F. Foresti, S.

- A. Toledo Filho, B. Dutrillaux. BrdU replication patterns demonstrating chromosome homologies in two fish species, genus *Eigenmannia*. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1988, **48**: 117~120
- 11 Giles V., G. Thode, M. C. Alvarez. Early replication bands in two scorpion fishes, *Scorpaena porcus* and *S. notata* (order Scorpaeniformes). *Cytogenet. Cell Genet.*, 1988, **47**: 80~83
- 12 任修海, 余其兴, 韦萍. 黄鳍染色体 Ag-NORs 多态性的研究. 遗传学报, 1991, **18**(4): 304~311
- 13 Cau A., S. Salvadori, A. M. Deiana, J. L. Bella, R. Mezzanotte. The characterization of *Muraena helena* L. mitotic chromosomes: Karyotype, C-banding, nucleolar organizer regions, and in situ digestion with restriction endonucleases. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1988, **47**: 223~226
- 14 Garrido-Ramos M. A., M. Jamilena, R. Lozano, S. Cardenas, C. Ruiz Rejon, M. Ruiz Rejon. Cytogenetic analysis of gilthead seabream *Sparus aurata* (Pisces, Perciformes), a deletion affecting the NOR in a hatchery stock. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1995, **68**: 3~7
- 15 Sola L., B. Camerini, S. Cataudella. Cytogenetics of Atlantic eels; C- and G-banding, nucleolus organizer regions, and DNA content. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1984, **38**: 206~210
- 16 常重杰, 余其兴. 七种鲇亚科鱼 Ag-NORs 的比较研究. 遗传, 1997, **19**(4): 22~25
- 17 Gold J. R. Silver-staining and heteromorphism of chromosomal nucleolar organizer regions in North American cyprinid fishes. *Copeia*, 1984, **1**: 133~139
- 18 周密, 康扬, 李渝成, 周曦. 鲤科七种鱼的银染核型研究. 动物学研究, 1988, **9**(3): 225~229
- 19 任修海, 余其兴, 崔建勋, 常重杰. 鱼类染色体的荧光显带研究. 遗传学报, 1993, **20**(2): 116~121
- 20 Ozouf-Costaz C. Fish cytogenetic research: advances, applications and perspectives. *Netherlands J. zool.*, 1992, **42**(2-3): 277~290
- 21 王蕊芳, 施立明, 贺维顺. 不同地理区域鲫鱼染色体银染核仁组织者的比较研究. 动物学研究, 1988, **9**(2): 165~169
- 22 李康, 李渝成, 周曦. 乌鳢、月鳢和斑鳢的染色体组型和 C-带带型的研究. 遗传学报, 1985, **12**(6): 470~477
- 23 Andreatta A. A., L. Foresti do Almeida-Toledo, C. Oliveira, S. de Almeida Toledo Filho. Chromosomes studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricaridae). II. ZZ/ZW sex-chromosome system, B chromosomes, and constitutive heterochromatin differentiation in *Microlepidogaster leucofrenatus*. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1993, **63**: 215~220
- 24 Park E. H., H. Grimm. Distribution of C-band heterochromatin in the ZW sex chromosomes of European and American eels (Anguillidae, Teleostomi). *Cytogenet. Cell Genet.*, 1981, **31**: 167~174
- 25 Wiberg U. H. Sex determination in the European eel (*Anguilla anguilla*, L.). *Cytogenet. cell Genet.*, 1983, **36**: 373~378
- 26 张任培, 吴鹤龄. 应用 BrdU-Hoechst33258-Giemsa 技术对鲫鱼性染色体的研究. 遗传学报, 1985, **12**(5): 373~378
- 27 刘凌云. BrdU 处理的鱼类染色体高分辨 G 带带型分析. 遗传学报, 1988, **15**(2): 117~212
- 28 樊连春, 余其兰, 崔建勋. 黄鳍染色体高分辨 G 带的制备方法. 遗传, 1995, **17**(1): 38~39
- 29 Medrano L., G. Bernardi, J. Couturier, B. Dutrillaux, G. Bernardi. Chromosome banding and genome compartmentalization in fishes. *Chromosoma*, 1988, **96**: 178~183
- 30 任修海. 三倍体草鱼染色体限制性内切酶带分析. 动物学研究, 1996, **17**(2): 187~192