

黄姑鱼染色体识别与重复序列定位

郑 娇, 曹 款, 杨安冉, 张 静, 王志勇, 蔡明夷*

(集美大学水产学院, 农业部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021)

摘要: 黄姑鱼是我国重要的海水经济鱼类。然而, 由于细胞遗传标记匮乏, 黄姑鱼染色体仍然难以辨识。为了提高黄姑鱼染色体的配对识别水平, 本研究利用荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)、吉姆萨染色和荧光染色技术分析了黄姑鱼染色体的特征。以总DNA为探针进行基因组DNA荧光原位杂交(genomic fluorescence *in situ* hybridization, GISH), 从而获得黄姑鱼染色体图谱, 可使每对染色体呈现特定的荧光信号。依据GISH荧光信号分布模式, 可以辨识黄姑鱼的24对染色体。18S rDNA FISH结果显示, 18S rDNA只有一对信号, 分布于1号染色体臂间, 并与吉姆萨染色呈现的次缢痕、DAPI阴性带和DPI染色高亮区域同位。5S rDNA有一强一弱两对信号, 信号强的一对分布于1号染色体着丝粒端, 信号弱的一对分布于4号染色体的远端。端粒信号在所有染色体的端部显示, 但个别染色体一端信号微弱。本研究结果丰富了黄姑鱼的细胞遗传标记, 为解决黄姑鱼染色体辨识问题提供参考依据, 也为进一步研究石首鱼科染色体进化提供了资料。

关键词: 黄姑鱼; 染色体识别; 荧光原位杂交; 核糖体RNA; 端粒

中图分类号: Q 784; S 917.4

文献标志码: A

染色体核型是真核生物的基本遗传特征之一。染色体核型资料对于物种分类、系统发生、生物进化、基因组结构和育种等方面的研究均具有重要作用。鱼类作为低等脊椎动物, 物种丰富, 是研究脊椎动物染色体进化的重要模式生物群体。此外, 对于经济鱼种, 染色体核型数据也是物种鉴定和遗传育种的必要资料。20世纪70年代开始, 鱼类染色体核型数据不断积累^[1]。此后, 荧光原位杂交技术(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)、分子克隆和PCR等技术的发展为染色体分析提供了新手段。鱼类染色体研究的深度和广度得到拓展, 研究内容涉及基因定位、性染色体鉴别、种间杂交、染色体进化等^[2-3]。

黄姑鱼(*Nibea albiflora*)属硬骨鱼纲(Osteichthyes)、鲈形目(Perciformes)、石首鱼科(Sciaenidae)、

黄姑鱼属(*Nibea*), 主要分布在我国沿海、朝鲜半岛及日本南部海域^[4]。黄姑鱼营养丰富, 是我国传统渔业的主要捕捞对象。近年, 随着人工育苗技术的突破, 黄姑鱼养殖业逐渐在福建、浙江沿海发展起来。关于黄姑鱼的核型研究, 目前已有多篇报道, 王金星等^[5]和喻子牛等^[6]先后利用吉姆萨染色的方法分析了黄姑鱼的核型, 发现二倍体黄姑鱼包含48条端着丝粒染色体, 其中一对染色体具有次缢痕。陈紫莹等^[7]开发了热甲酰胺变性/碘化丙啶染色法(DPI)用于显示黄姑鱼染色体核仁组织区域。曹款等^[8]利用PI染色法估测了黄姑鱼24对染色体的物理长度。然而, 由于黄姑鱼染色体形态相似, 长度分布连续, 染色体及其区段的辨识仍然困难, 阻碍了黄姑鱼细胞遗传学研究的深入开展。因此, 本研究尝试提出一种利用自身基因组荧光原位杂交(self

收稿日期: 2015-11-20 修回日期: 2016-05-09

资助项目: 国家自然科学基金(31272653); “全球变化与海气相互作用”专项(GASI-02-SCS-YSWaut, GASI-02-SCS-YSWspr); 集美大学2015年度国家级大学生创新创业训练计划项目

通信作者: 蔡明夷, E-mail: myicai@jmu.edu.cn

genomic *in situ* hybridization, self-GISH)增加染色体识别标记的方法, 同时利用FISH定位黄姑鱼的18S rDNA、5S rDNA和端粒序列。研究结果将丰富黄姑鱼的细胞遗传标记技术, 为解决黄姑鱼染色体辨识困难提供参考依据, 也为研究石首鱼科染色体进化提供资料。

1 材料与方法

1.1 样品和染色体制备

用于制备染色体的黄姑鱼雌雄各5尾, 取自宁德横屿岛水产有限公司。按陈紫莹^[9]所描述的方法制备黄姑鱼染色体, 同时取鳍条固定于无水乙醇中备用。

1.2 染色体制片的染色

染色体制片风干后分别用吉姆萨染液、4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)和DPI染色。吉姆萨染色: 蒸汽法滴片后, 用10%吉姆萨溶液染色25 min, 流水冲洗。DAPI染色: 1 $\mu\text{g/mL}$ 的DAPI(溶于PBS, pH 7.0)染色10 min。DPI显带: 先用热甲酰胺变性, 再用PI染色, 具体同陈紫莹等^[7]方法。

1.3 荧光原位杂交

用DNA提取试剂盒(上海锐捷生物)从乙醇固定的鳍条中提取总DNA。18S rDNA 部分编码序列用PCR 扩增获得。引物(F: 5'-CGCGCAAA TTACCCACTCCC-3'; R: 5'-CTGAACGCC ACTTGTCCT-3')的设计基于几种鱼的18S rDNA 保守区域。PCR扩增体系(20 μL): 10 $\times$ PCR 缓冲液2 μL , 2.5 mmol/L的dNTPs 1.6 μL , 5 U/ μL 的酶EsayTaq polymerase 0.2 μL (均购自北京全氏金生物技术有限公司), 10 mmol/L的上下游引物各1 μL , 50 ng 基因组DNA共1 μL , 用灭菌水补充至20 μL 。扩增条件为94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 退火60 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸60 s, 循环30次; 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。5S rDNA 的全部编码序列和间隔序列用PCR 扩增获得。引物根据几种鱼5S rDNA 编辑区保守序列设计(F: 5'-GTCAGGCCTGGTTAGTACTTGGAT-3'; R: 5'-GGGCGCATTCAGGGTGGTAT-3')。将大小为500 bp左右的产物克隆到pEASY-T1载体(北京全式金生物技术有限公司), 克隆后回收质粒, 并测序验证。端粒重复序列(TTAGGG)_n用引

物(TTAGGG)₅和(TAACCC)₅进行无模板扩增获得^[10]。

FISH鉴定操作程序按Fujiwara等^[11]和蔡明夷等^[12]的方法。18S rDNA、5S rDNA和端粒重复序列等探针采用缺口平移法标记生物素-11-dUTP (Roche)或地高辛-11-dUTP (Roche)。探针标记后加入杂交缓冲液, 加热变性。制片老化、变性后, 加入变性后的探针溶液, 杂交过夜。经洗涤后, 生物素探针用亲和素-Alexa fluor-488 (Introgen)检测, 地高辛探针用抗地高辛—诺丹明 (Roche)进行检测。染色体用PI或DAPI复染。

1.4 基因组荧光原位杂交

即以基因组DNA为探针的荧光原位杂交。取黄姑鱼总DNA采用缺口平移法制备生物素标记探针, 探针长度控制在200~500 bp。其余步骤(杂交、洗涤、信号放大、复染)的操作方法同“荧光原位杂交”。

1.5 图像获取与分析

用奥林巴斯 BX 53 荧光显微镜观察拍照。按曹款等^[8]描述的方法处理图像, 测量染色体的长度、面积和 IOD, 获得 3D 光强度图, 综合各方面的特征与数据进行染色体配对, 按染色体相对长度降序排列得到核型图。

2 结果

本研究所分析的样品均包括48条端着丝粒染色体。染色体GISH鉴定以黄姑鱼基因组DNA为探针, 结果显示, 在染色体端粒和臂间呈现阳性信号(图版I-1, I-2)。进一步分析发现, GISH阳性信号的分布模式在同源染色体间相似, 而在非同源染色体间则差异较大, 可以作为辅助染色体配对的标志(图版I-3, I-4)。利用IPP6.0软件, 将图版I-3和I-4染色体上的阳性信号荧光强度差异转化为色彩差异, 更方便通过肉眼识别(图版I-5, I-6)。图版I-3和I-5分别是基于GISH信号和3D荧光强度图排列的雌性黄姑鱼核型图; 图版I-4和I-6分别是基于GISH信号和3D荧光强度图排列的雄性黄姑鱼核型图。图像显示, 2个中期相均可借助GISH信号或3D荧光强度分布实现染色体配对, 但中期相间相应染色体信号的荧光分布仍有差异。将配对染色体按相对长度降序排列, 统计5个中期相中同源染色体相对长

度、相对面积和PI负染累积荧光强度(IOD)的平均值(表1)。数据显示,黄姑鱼染色体相对长度、相对面积和相对IOD的分布连续。

图版II 显示了不同方法染色及不同探针杂交后的黄姑鱼染色体中期相图。吉姆萨和DAPI染色后均可见,1号染色体臂间有明显的次缢痕(图版II-1, II-2)。DPI染色在次缢痕显示出高亮的阳性信号(图版II-3)。FISH鉴定以18S rDNA和5S rDNA为探针(图版II-4, II-5)。18S rDNA位点

呈绿色荧光,位于1号染色体臂间,同源染色体上的两个信号点一明一暗。5S rDNA呈红色荧光,共有一强一弱 2 对信号。强阳信号分布于1号染色体着丝粒端部,且同源染色体上的两个信号强度相当。比较染色体相对长度可知,弱阳信号分布于4号染色体的远着丝粒端部。此外,综合各种染色和FISH分析结果发现,18S rDNA位于1号染色体次缢痕处,与DAPI阴性带和DPI高亮带重叠(图1)。端粒FISH信号出现在所有染色体的端部区域(图版II-6),个别染色体端粒信号较微弱,未发现明显的臂间端粒信号。

表 1 黄姑鱼染色体的相对长度、相对面积和相对IOD
Tab. 1 The relative length, the relative area and the relative IOD of chromosomes of *N. albiflora* %

序号 no.	相对长度 relative length	相对面积 relative area	相对IOD relative IOD
1	4.91±0.26	5.06±0.51	6.28±0.38
2	4.87±0.20	4.61±0.33	4.67±0.59
3	4.69±0.12	4.74±0.49	5.19±1.25
4	4.67±0.21	4.80±0.38	5.41±0.52
5	4.62±0.14	4.70±0.28	4.82±0.29
6	4.50±0.23	4.44±0.36	3.99±0.57
7	4.45±0.23	4.47±0.40	5.32±0.78
8	4.45±0.09	4.55±0.04	4.66±0.78
9	4.41±0.03	4.56±0.37	3.97±0.79
10	4.35±0.15	4.42±0.17	4.84±0.42
11	4.31±0.21	4.38±0.46	4.15±0.66
12	4.25±0.29	4.27±0.31	3.85±0.59
13	4.12±0.10	3.95±0.18	3.52±1.14
14	4.01±0.19	4.01±0.30	3.91±0.94
15	4.01±0.12	3.88±0.09	3.65±0.41
16	3.97±0.26	4.06±0.27	3.90±0.16
17	3.95±0.33	4.01±0.71	3.80±0.16
18	3.94±0.16	3.97±0.15	4.07±0.65
19	3.80±0.07	3.66±0.30	3.69±1.05
20	3.77±0.03	3.79±0.11	3.93±0.57
21	3.76±0.08	3.64±0.24	3.30±1.08
22	3.50±0.12	3.64±0.16	3.33±0.84
23	3.48±0.18	3.41±0.34	3.19±0.52
24	3.19±0.41	2.99±0.70	2.57±1.40

注: IOD 为染色体荧光强度的累积总和
Notes: IOD is the cumulative sum of fluorescence intensity of the chromosome

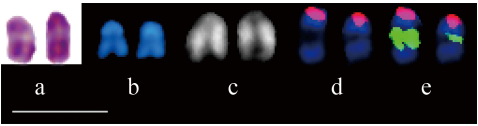


图 1 黄姑鱼1号染色体比较
a. 吉姆萨染色; b. DAPI染色; c. DPI染色; d. 5S rDNA探针FISH; e. 5S和18S rDNA探针二色FISH。标尺=5 μm

Fig. 1 The comparison 1 of chromosome of *N. albiflora*
a. Giemsa staining; b. DAPI staining; c. DPI staining; d. FISH with 5S rDNA probe; e. dual-FISH with 5S (red) and 18S rDNA probes (green). Bar represents 5 μm

3 讨论

3.1 基于GISH技术的染色体辨识

染色体及其区段的识别是深入开展染色体研究的基础。传统核型分析主要依靠染色体的臂比和相对长度来辨识染色体。20世纪70年代发展起来的各种带型分析方法增加了染色体辨识所需要的细胞遗传标志。特别是G带、Q带及复制带等多重带技术可使染色体呈现明暗相间的条纹,方便了染色体的辨识。然而,由于鱼类基因组结构特殊性,适用于哺乳动物的G带和Q带技术在鱼类中成功的案例很少。目前染色体识别标志的匮乏仍然是阻碍鱼类细胞遗传学进行深入研究的瓶颈^[13]。黄姑鱼染色体短小,且全部是端着丝粒染色体,常规的染色方法无法显示明显的形态特征,仅依据长度及臂比很难将全部染色体准确区分(表1)。本研究利用同种基因组DNA荧光原位杂交,可以使同源染色体显示独特的荧光信号分布模式,辅以IPP6.0软件分析,可以明确地将黄姑鱼24对染色体区别开,准确配对(图版I)。

GISH鉴定以同一物种总DNA为探针, 理论上应该在染色体上显示出较为均一的阳性信号, 然而, 实际GISH实验结果常常得到不均一的涂绘图像。例如, Hu等^[14]对紫扇贝(*Argopecten purpuratus*)与海湾扇贝(*A. irradians*)杂交后代的GISH分析结果发现, 紫扇贝染色体在着丝粒区域呈强阳性信号, 而海湾扇贝在端粒和部分臂间呈现强阳性信号。染色体的结构和序列的异质性可能是造成染色体涂绘信号不均一的主要原因。虽然GISH信号不均一的原因目前尚待查明, 但同源染色体特异分布的荧光信号可以作为辅助识别染色体的标记。本研究获得的24对同源染色体的GISH核型图, 可为构建黄姑鱼的染色体模式图奠定基础, 也为其他鱼类的染色体识别提供借鉴。

3.2 rDNA的分布特征

rDNA是分子细胞遗传学中研究最多的细胞遗传标记^[15-16]。真核生物rRNA基因在细胞核中组成2个独立的基因家族, 串联重复单元分别为45S rDNA和5S rDNA。其中, 45S rDNA编码18S rRNA、5.8S rRNA和28S rRNA, 5S rDNA编码5S rRNA^[15]。2n=48t及单对45S rDNA信号是鱼类核型的主流模式, 也是比较原始的特征^[16-17]。黄姑鱼核型具有48条端着丝粒染色体, 仅有一对18S rDNA(45S rDNA的部分序列)信号, 分布于1号染色体臂间。石首鱼科中, 报道过的核型有30余种, 其中19种的核型公式为2n=48t(约70%); 定位过45S rDNA或核仁组织区域(NOR)的有7种, 其中5种具有单对45S rDNA或NOR^[13], 仅斑点蛇鲷(*Ophioscion punctatissimus*)和巴西异鳞石首鱼(*Plagioscion squamosissimus*)2个物种存在主要rDNA簇数目变异^[18-19]。此外, 比较各种染色结果发现, 黄姑鱼18S rDNA的位置与次缢痕、DAPI阴性带和DPI高亮带的位置相吻合(图版II)。这些结果体现了18S rDNA的序列和结构特点。吉姆萨染色出现次缢痕与该区域转录活性高、染色体浓缩程度较低有关^[16]。DAPI染色阴性, 表明该区域富集GC碱基^[20-21]。DPI染色高亮, 可能和该区域C0t高于其他区域有关^[22-23], 类似的结果也同样见于其他鱼类^[24-25]。

黄姑鱼核型中5S rDNA FISH信号有两对, 一对强一对弱(图版II-4)。信号强的5S rDNA与45S rDNA分布于同一条染色体上, 分别位于着

丝粒端部与臂间。5S rDNA与45S rDNA的同线分布有别于鱼类rDNA分布的主流模式。多数鱼类的45S rDNA和5S rDNA分布于不同染色体, 高等动物和植物的45S rDNA和5S rDNA也多分布于不同的染色体上^[15]。但也有一些鱼类和黄姑鱼一样, 2种rDNA位点位于同一染色体, 甚至位于相邻位置, 如大西洋鲑(*Salmo salar*)^[23], 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[26]、杂斑盔鱼(*Coris julis*)^[27]和4种鲟鱼^[28]等。鱼类染色体组中, 45S rDNA和5S rDNA非同线分布是主流模式, 但在不同的分类单元中均有同线分布的例子, 提示45S rDNA和5S rDNA非同线与同线分布的转换可能在鱼类进化过程中多次出现。此外, 多数鱼类45S rDNA分布于双臂染色体的短臂或短臂端部, 分布于臂间的仅约13%^[16], 5S rDNA则多数分布于臂间^[15-16]。而黄姑鱼5S rDNA与45S rDNA分布在染色体上的位置正好与多数鱼类相反。提示黄姑鱼在进化过程中可能发生过1号染色体的臂间倒位。

3.3 端粒序列分布特征

定位过端粒序列的80余种鱼类中, 约42%存在臂间的端粒序列FISH信号^[29]。然而, 在黄姑鱼中期相染色体中, 未见明显的臂间端粒信号。臂间端粒与染色体倒位、融合有关。黄姑鱼没有明显的非端部染色体, 可能是进化历程中没有发生涉及端粒的染色体倒位或融合事件, 也可能相关端粒序列信号太弱未被检测出来。

综上, 本研究提出了一种基于GISH识别染色体的方法, 使每对黄姑鱼染色体呈现特定的信号分布模式, 解决了黄姑鱼细胞遗传学标记匮乏的问题, 也为其他鱼类的染色体辨识提供了借鉴。本研究还获得了黄姑鱼染色体5S rDNA/18S rDNA双色FISH以及端粒FISH图谱, 丰富了黄姑鱼染色体识别标记技术, 也为进一步研究石首鱼科的染色体进化提供了资料。

参考文献:

- [1] Galetti Jr P M, Aguilar C T, Molina W F. An overview of marine fish cytogenetics[M]//Antonio M, Solé-Cava, Claudia A M R, et al. Marine Genetics. Berlin: Springer Netherlands, 2000: 55-62.
- [2] Nirchio M, Rossi A R, Foresti F, et al. Chromosome evolution in fishes: a new challenging proposal from Neotropical species[J]. Neotropical Ichthyology, 2014, 12(4): 761-770.

- [3] 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).
- [4] 朱元鼎, 罗云林, 伍汉霖, 等. 中国石首鱼类分类系统的研究和新属新种的叙述[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1963.
- Zhu Y D, Luo Y L, Wu H L, *et al.* The study of classification system of family Sciaenidae and the description of new genus and new species[M]. Shanghai: Scientific and Technical Publishers, Shanghai, 1963(in Chinese).
- [5] 王金星, 赵小凡, 王相民, 等. 鲱形目和鲈形目七种鱼的核型分析[J]. 动物学研究, 1994, 15(2): 76-79.
- Wang J X, Zhao X F, Wang X M, *et al.* Karyotype analysis for seven species of clupeiform and perciform fishes[J]. Zoological Research, 1994, 15(2): 76-79(in Chinese).
- [6] 喻子牛, 孔晓瑜, 谢宗墉, 等. 山东近海21种经济鱼类的核型研究[J]. 中国水产科学, 1995, 2(2): 1-6.
- Yu Z N, Kong X Y, Xie Z Y, *et al.* The karyotype of 21 species commercial fishes in Shandong coast[J]. Journal of Fishery Science of China, 1995, 2(2): 1-6(in Chinese).
- [7] 陈紫莹, 王浩华, 王凯武, 等. DPI染色显示黄姑鱼 NOR的方法研究[J]. 集美大学学报: 自然科学版, 2014, 19(3): 161-167.
- Chen Z Y, Wang H H, Wang K W, *et al.* The procedure of DPI staining to display nucleolar organizer regions in yellow croaker (*Nibea albiglora*)[J]. Journal of Jimei University (Natural Science), 2014, 19(3): 161-167(in Chinese).
- [8] 曹款, 郑娇, 王志勇, 等. 黄姑鱼基因组大小和染色体物理长度的测定[J]. 南方水产科学, 2015, 11(4): 65-70.
- Cao K, Zheng J, Wang Z Y, *et al.* Genome size and physical length of chromosomes in *Nibea albiglora*[J]. South China Fisheries Science, 2015, 11(4): 65-70(in Chinese).
- [9] 陈紫莹. 大黄鱼与黄姑鱼细胞遗传学初步研究[D]. 厦门: 集美大学, 2013.
- Chen Z Y. Cytogenetic study on *Larimichthys crocea* and *Nibea albiglora*[D]. Xiamen: Fisheries college of Jimei University, 2013(in Chinese).
- [10] Ijdo J W, Wells R A, Baldini A, *et al.* Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG) n generated by PCR[J]. Nucleic Acids Research, 1991, 19(17): 4780.
- [11] Fujiwara A, Abe S, Yamaha E, *et al.* Uniparental chromosome elimination in the early embryogenesis of the inviable salmonid hybrids between masu salmon female and rainbow trout male[J]. Chromosoma, 1997, 106(1): 44-52.
- [12] 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(7): 1002-1008.
- Cai M Y, Liu X D, Cheng 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(7): 1002-1008(in Chinese).
- [13] 任修海, 余其兴. 鱼类基因组结构研究——I. 染色体的限制性内切酶显带[J]. 遗传学报, 1991, 18(1): 17-22.
- Ren X H, Yu Q X. Genome structure of fishes——I. restriction endonuclease banding in fish chromosomes[J]. Journal of Genetics and Genomics, 1991, 18(1): 17-22(in Chinese).
- [14] Hu L, Huang X, Mao J, *et al.* Genomic characterization of interspecific hybrids between the scallops *Argopecten purpuratus* and *A. irradians irradians*[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e62432.
- [15] Martins C, Wasko A P. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome[M]. Focus on genome research. Nova Science Publishers, 2004: 335-363.
- [16] 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.
- [17] Amemiya C T, Gold J R. Chromosomal NORs as taxonomic and systematic characters in North cyprinid fishes[J]. Genetica 76: 81-90(1988).
- [18] Accioly I V, Molina W F. Cytogenetic studies in Brazilian marine Sciaenidae and Sparidae fishes (Perciformes)[J]. Genetics and Molecular Research, 2008, 7(2): 358-370.
- [19] Feldberg E, Porto J I R, Santos E B P, *et al.* Cytogenetic studies of two freshwater sciaenids of the genus *Plagioscion* (Perciformes, Sciaenidae) from the central Amazon[J]. Genetics and Molecular Research, 1999, 22(3): 351-356.
- [20] Wilson W D, Tanious F A, Barton H J, *et al.* Binding of 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) to GC and mixed sequences in DNA: intercalation of a classical groove-binding molecule[J]. Journal of the American Chemical Society, 1989, 111(13): 5008-5010.
- [21] Schweizer D. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI[J]. Chromosoma, 1976, 58(4): 307-324.

- [22] Vicari M R, Artoni R F, Moreira-Filho O, *et al.* Colocalization of repetitive DNAs and silencing of major rRNA genes. A case report of the fish *Astyanax janeiroensis*[J]. Cytogenetic and Genome Research, 2008, 122(1): 67-72.
- [23] Pendás A M, Morán P, Garcia-Vazquez E. Ribosomal RNA genes are interspersed throughout a heterochromatic chromosome arm in Atlantic salmon[J]. Cytogenetic and Genome Research, 1993, 63(2): 128-130.
- [24] Alvarenga E M, Mondin M, Martins JA, *et al.* Spatial distribution of AT- and GC-rich DNA within interphase cell nuclei of *Triatoma infestans* Klug[J]. Micron, 2011, 42(6):568-578.
- [25] Fontana F, Tagliavini J, Congiu L, *et al.* Karyotypic characterization of the great sturgeon, *Huso huso*, by multiple staining techniques and fluorescent *in situ* hybridization[J]. Marine Biology, 1998, 132(3): 495-501.
- [26] Fujiwara A, Fujiwara M, Nishida-Umehara C, *et al.* Characterization of Japanese flounder karyotype by chromosome bandings and fluorescence *in situ* hybridization with DNA markers[J]. Genetica, 2007, 131(3): 267-274.
- [27] Mandrioli M, Colomba M S, Vitturi R. Chromosomal analysis of repeated DNAs in the rainbow wrasse *Coris julis* (Pisces, Labridae)[J]. Genetica, 2000, 108(2): 191-195.
- [28] Fontana F, Lanfredi M, Congiu L, *et al.* Chromosomal mapping of 18S-28S and 5S rRNA genes by two-colour fluorescent *in situ* hybridization in six sturgeon species[J]. Genome, 2003, 46(3): 473-477.
- [29] Ocalewicz K. Telomeres in fishes[J]. Cytogenetic and genome research, 2013, 141(2-3): 114-125.

Chromosome mapping using genomic DNA and repetitive DNA sequences as probes for somatic chromosome identification in *Nibea albiflora*

ZHENG Jiao, CAO Kuan, YANG Anran, ZHANG Jing, WANG Zhiyong, CAI Mingyi*

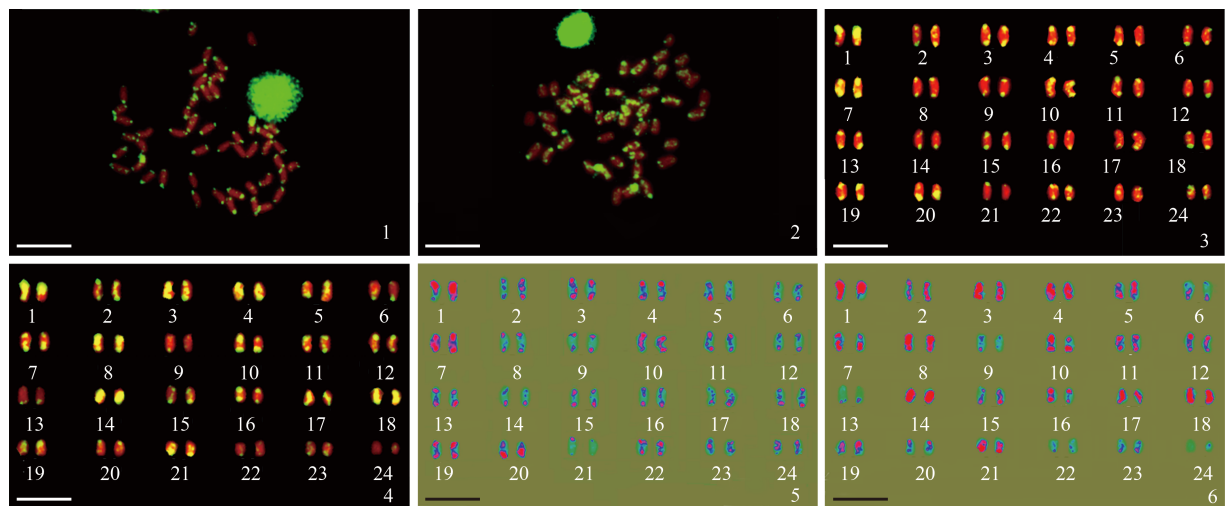
(Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture,
Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Yellow croaker *Nibea albiflora* is a species of commercial important fish. However, chromosome identification is still difficult in yellow croaker for lack of cytogenetic markers. Hence, we analyzed the characteristics of chromosome in yellow croaker by using Giemsa staining, fluorescence staining, genomic *in situ* hybridization(GISH), and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with repetitive DNA sequences to assist chromosome identification. According to the distribution mode of fluorescent signal of self-GISH, 24 pairs of chromosomes could be distinguished and paired. FISH with 18S rDNA resulted in one pair of 18S rDNA signals distributing at the interstitial region of chromosome 1, which collocated with the secondary constriction after Giemsa staining, the negative band after DAPI staining, and the highlighted area after DPI staining. Whereas 5S rDNA FISH resulted in two pairs of signal with different intensity. The strong one was located on the centromere of chromosome 1, and the weak one was located on the distal position of chromosome 4. The signals of telomeric sequence were located on both termini of all chromosomes, although the signals of some chromosomes were weak. These results enriched the cytological genetic markers for chromosome identification in *N. albiflora*, and provided basic data for studying the chromosome evolution of Sciaenidae.

Key words: *Nibea albiflora*; chromosome identification; fluorescence *in situ* hybridization; ribosome RNA; telomere

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

Funding projects: National Natural Science Foundation of China(31272653); Global Change and Air Sea Interaction(GASI-02-SCS-YSWaut, GASI-02-SCS-YSWspr); Jimei University 2015 Annual National College Students Innovation and Entrepreneurship Training Program

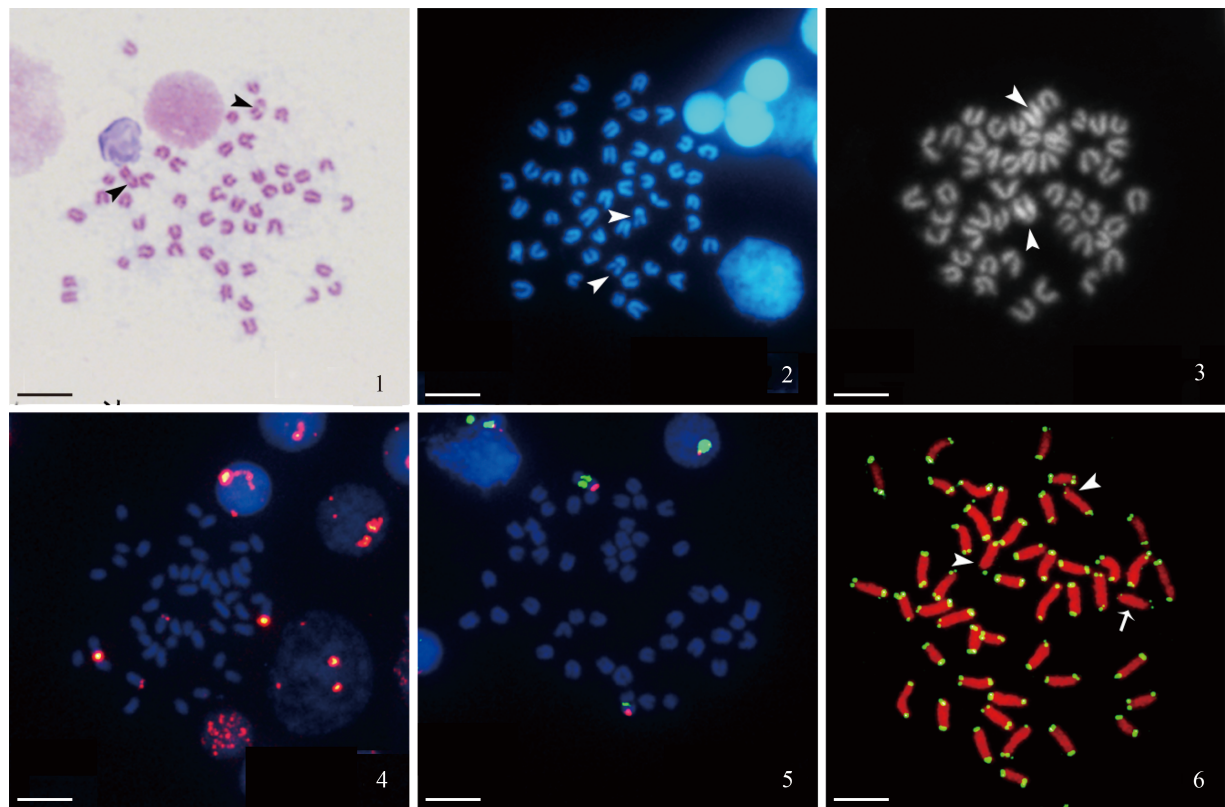


图版 I 基于GISH的黄姑鱼染色体核型图

1. 雌性的中期； 2. 雄性的中期； 3. 雌性的核型图； 4. 雄性的核型图； 5. 雌性的染色体荧光信号3D光密度图； 6. 雄性的染色体荧光信号3D光密度图； 标尺=5 μm

Plate I Karyotypes of *N. albiflora* based on GISH

1. metaphase of the female; 2. metaphase of the male; 3. karyotype of the female; 4. karyotype of the male; 5. 3D optical density histogram of chromosomes in the female; 6. 3D optical density histogram of chromosomes in the male; bars represent 5 μm



图版 II 黄姑鱼的中期相

1. 吉姆萨染色, 箭号所指染色体有臂间次缢痕; 2. DAPI染色, 箭号所指染色体有臂间阴性带; 3. DPI染色, 箭号所指染色体臂间高亮; 4. 5S rDNA 单色FISH; 5. 黄姑鱼18S rDNA和5S rDNA 双色FISH; 6. 端粒序列FISH, 箭号所指为一端信号弱及两端信号均弱的染色体; 标尺=5 μm

Plate II Metaphase of *N. albiflora*

1. Giemsa staining, the arrows indicate the secondary constriction; 2. DAPI staining, the arrows indicate the negative band; 3. DPI staining, the arrows indicate high lighted area; 4. FISH with 5S rDNA probe; 5. dual-color FISH with 5S rDNA and 18S rDNA probes; 6. FISH with telomeric sequence, the arrows indicate chromosomes with weak signal; bars represent 5 μm