

文章编号:1674-7054(2011)02-0097-04

海南野生三斑石斑鱼染色体核型分析

蔡岩^{1,2}, 周永灿¹, 张本¹, 谢珍玉¹, 王世锋¹

(1. 海南大学 热带生物资源教育部重点实验室 海南 海口 570228;

2. 海南大学 海洋生物实验教学示范中心 海南 海口 570228)

摘要:以头肾组织为材料,采用植物血球凝集素(phytohemagglutinin, PHA)、秋水仙素溶液腹腔注射和空气干燥制片法,对海南野生三斑石斑鱼(*Epinephelus trimaculatus*)的染色体组型进行研究,结果表明,海南野生三斑石斑鱼具有48条染色体,其核型公式为 $2n = 48, 48t$,臂数 $NF = 48$ 。未发现与性别相关的异型染色体。基于目前已研究过的23种石斑鱼核型进行统计,推测 $2n = 48, 48t, NF = 48$ 可能为石斑鱼属的基本原始核型。

关键词:三斑石斑鱼; 染色体; 核型

中图分类号: Q 343.22

文献标志码: A

石斑鱼为鲈形目(Perciformes) 鮨科(Serranidae) 石斑鱼亚科(Epinephelinae) 石斑鱼属(*Epinephelus*) 的统称。据FAO记载目前约有100种石斑鱼,因石斑鱼肉味鲜美,营养价值高等特点,在市场上具有较高的价值,是热带和亚热带重要的经济鱼类^[1]。近年来,随着斜带石斑鱼(*E. coioides*)、褐点石斑鱼(*E. fuscoguttatus*)、鞍带石斑鱼(*E. lanceolatus*)等品种的人工繁育技术得到突破,石斑鱼养殖业得到了快速发展,以上品种也成为我国及东南亚国家主要的名贵养殖品种^[2]。目前,尚有多种石斑鱼还不能进行人工繁育,同时由于受到海洋捕捞的影响,其自然资源日益衰退,因此有必要尽快对我国海域内的石斑鱼进行广泛的生物学研究,这对保护我国海域内的石斑鱼资源具有重要意义。

核型(Karyotype)是指生物染色体的数目、大小和形态特征的总和,是细胞遗传学的研究基础。对鱼类核型进行研究,不仅有助于了解生物染色体组的组成、鉴定近缘物种及构建物种间的系统进化关系,同时还对预测种间杂交和多倍体育种结果的鉴定等诸多问题都具有重要的意义^[3-5]。因此,对海南野生三斑石斑鱼[*E. trimaculatus* (Valenciennes, 1828)]进行核型研究,有助于补充石斑鱼细胞遗传学数据资料,同时也为今后海南野生三斑石斑鱼的人工繁育和遗传育种等工作提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料 于2010年7月至12月,在海口市东门市场购买4尾海南野生三斑石斑鱼(*E. trimaculatus* (Valenciennes, 1828)) 鉴定后暂养,海南野生三斑石斑鱼单尾体质量在200~600 g之间。

1.2 实验方法

1.2.1 染色体标本制备 染色体标本制备步骤:(1)选取体形匀称、健康、活力好的个体,按每100 g鱼体质量抽1 mL鱼血的标准进行尾静脉抽血;并按每100 g鱼体质量注射植物血凝素 PHA 2 mg 的标准进行注射处理。(2)暂养3~4 h后,按每1 g鱼体质量注射秋水仙素 1 μg 标准进行秋水仙素注射处理;(3)15

收稿日期:2011-03-20

基金项目:国家自然科学基金项目(31060355); 农业科技成果转化项目(2009GB2E200302); 海洋渔业科学与技术浙江省重中之重学科开放课题资助项目(20100115); 海南大学科研启动基金资助项目(kyqd1017); 海南大学“211工程”三期建设项目

作者简介:蔡岩(1978-),女,河北唐山人,海南大学海洋学院实验师。

通信作者:王世锋(1977-),男,河北沧州人,海南大学海洋学院副教授,博士,主要从事鱼类免疫和细胞遗传学研究。E-mail: sfwang1977@yahoo.com.cn

min 后剪鳃放血,取头肾置于生理盐水中进行组织破碎,制得细胞悬液,静置 10 min;(4)吸取细胞悬液上层悬液 5 mL,置于离心管中,以 $500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min;(5)弃上清液,轻轻弹散沉淀,缓慢加入低渗液, $32 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 20~40 min;(6) $500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,去上清液,打散沉淀,缓慢加入适量新配制的卡诺氏固定液,于室温下固定 30 min。按步骤(5)、(6)循环重复 2 次;离心取沉淀,加入适量新配制的卡诺氏固定液,用吸管吸取细胞悬液,滴在预冷的玻片上,自然凉干。

1.2.2 核型分析 用 $w = 10\%$ 的 Giemsa 染色液染色标本 20 min,蒸馏水冲洗,自然干燥,室温保存,用于核型分析。选取染色体分散均匀的中期分裂相计数,计数结果用于确定染色体众数;选取分散良好,长度适中,着丝粒清晰,2 条染色单体适度分开,染色体众数与上述统计结果相一致的中期分裂相拍照,依据照片进行测量和统计,按照相对大小编号,根据 Levan(1964)的标准将染色体分成 4 组,即(1)中部着丝粒染色体(metacentrics, M),臂比为 $1.0 \sim 1.7$;(2)亚中部着丝粒染色体(submetacentrics, SM),臂比为 $1.7 \sim 3.0$;(3)亚端部着丝粒染色体(subtelocentrics, ST),臂比为 $3.0 \sim 7.0$;(4)端部着丝粒染色体(telocentrics, T),臂比为 $7.0 \sim \infty$ 。

2 结果

在显微镜下对海南野生三斑石斑鱼分散良好的 134 个染色体中期分裂相进行观察计数,观察结果见表 1。由表 1 可见海南野生三斑石斑鱼的中期分裂相染色体总数为 48 的有 113 个,占分裂相总数的 84.33%,由此可以判断,海南野生三斑石斑鱼的二倍体染色体总数为 48。通过核型分析(见表 2)可知三斑石斑鱼染色体核型为 $2n = 48 = 48 \text{ t}$, $\text{NF} = 48$,不具有异型性染色体。海南野生三斑石斑鱼染色体的中期分裂相和核型图谱见图 1。

表 1 海南野生三斑石斑鱼染色体数目统计

次数/比例	染色体数(2n)						总计
	≤44	45	46	47	48	≥49	
出现次数	8	3	7	1	113	2	134
%	5.97	2.24	5.22	0.75	84.33	1.49	100

表 2 海南野生三斑石斑鱼的相对长度(RL)和臂比(AR)

编号	相对长度	臂比	类型	编号	相对长度	臂比	类型
1	6.06 ± 0.07	∞	t	13	3.94 ± 0.09	∞	t
2	5.86 ± 0.05	∞	t	14	3.89 ± 0.07	∞	t
3	5.63 ± 0.06	∞	t	15	3.85 ± 0.24	∞	t
4	5.36 ± 0.25	∞	t	16	3.78 ± 0.13	∞	t
5	4.80 ± 0.05	∞	t	17	3.68 ± 0.14	∞	t
6	4.66 ± 0.06	∞	t	18	3.59 ± 0.06	∞	t
7	4.49 ± 0.10	∞	t	19	3.50 ± 0.08	∞	t
8	4.40 ± 0.05	∞	t	20	3.46 ± 0.13	∞	t
9	4.37 ± 0.07	∞	t	21	3.45 ± 0.02	∞	t
10	4.33 ± 0.07	∞	t	22	3.38 ± 0.07	∞	t
11	4.27 ± 0.04	∞	t	23	3.04 ± 0.28	∞	t
12	4.10 ± 0.13	∞	t	24	2.10 ± 0.39	∞	t

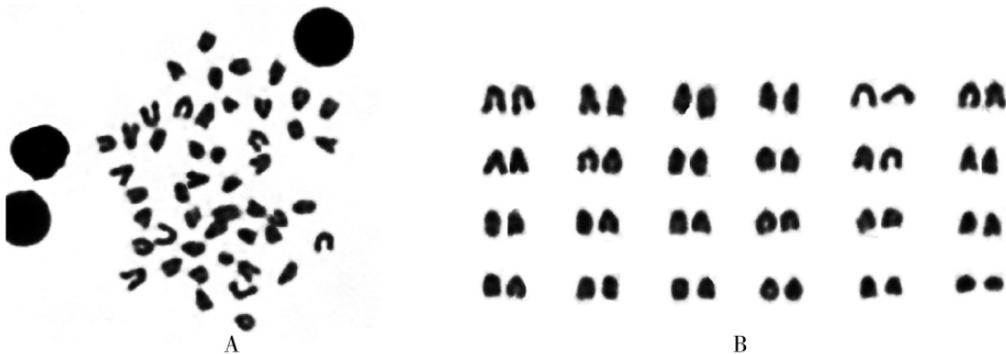


图 1 海南野生三斑石斑鱼中期分裂相(A)及染色体核型(B)

3 讨论

物种在进化过程中所发生的遗传物质的变化,常表现为染色体数目和结构的变化,因此,一个物种的染色体数目和形态结构具有物种的特征,而且还反映出生物进化的历史^[3]。在脊椎动物类群中,鱼类由于其种类繁多,生殖与行为方式迥异,栖息环境复杂,因而在动物进化史中占据了极其特殊而又重要的地位^[6]。鲈形目鱼类共有7000多个不同的种,世界上40%的鱼都属于鲈形目,也是脊椎动物中最大的目。由于鲈形目鱼类的分类仍存在很大争议,有很多学者尝试从细胞遗传学的角度对鲈形目几个最重要的科进行研究和阐述。到目前为止,在600多种做过核型分析的鲈形目鱼类中,以二倍体染色体数目为48的种类为最多^[7]。因此,核型公式 $2n=48, NF=48$ 被认为是现代硬骨鱼类,尤其是海水鱼类的原始核型^[8]。石斑鱼亚科中进行过染色体核型研究的鱼类有23种^[9-23],所有已报道的种类,其二倍体染色体数目均为48,不过它们的核型公式具有一定的差异。与大部分鲈形目种类的核型趋势一样,已报道的石斑鱼中以核型公式为 $2n=48, 48t, NF=48$ 的种类最多,占已知核型石斑鱼种数的58.3%,包括了三斑石斑鱼 *E. trimaculatus*、青石斑鱼 *E. awoara*、纵纹石斑鱼 *E. latifasciatus*、岩石斑鱼 *E. adscensionis*、亚历山大石斑鱼 *E. alexandrinus*、犬牙石斑鱼 *E. caninus*、黄腹石斑鱼 *E. guaza*、细斑石斑鱼 *E. guttatus*、斑带石斑鱼 *E. fasciatomaculatus*、黑边石斑鱼 *E. fasciatus*、东大西洋石斑鱼 *E. marginatus*、点带石斑鱼 *E. malabaricus*、云纹石斑鱼 *E. moara*、七带石斑鱼 *E. septemfasciatus* 等共14种;其次是核型公式为 $2n=48, 2sm+46A, NF=50$ 的石斑鱼类群,主要包括巨石斑鱼 *E. tauwina*、双棘石斑鱼 *E. diacanthus*、褐点石斑鱼 *E. fuscoguttatus*、斜带石斑鱼 *E. coioides*^[9-23]。在已研究过核型的石斑鱼属鱼类中,以蜂巢石斑鱼的染色体组组成最复杂,其核型公式为 $2n=48, 4m+6sm+4st+34a, NF=62$ 。李树深指出,在特定的分类类群中,具有较多端部着丝粒染色体的种类为原始类群,而具有较多中部或亚中部着丝粒染色体的是特化类群;染色体臂数多的类群体比染色体臂数少的类群特化^[24]。因此,就目前已研究的这23种石斑鱼来说, $2n=48, 48t, NF=48$ 可能为石斑鱼属的基本原始核型。

海水鱼类染色体在进化过程中体现保守性的原因常常被归结为明显的物理隔离的缺失,强烈的基因交换以及巨大的种群数量抑制了染色体重组和核型分化^[25]。尽管这个假说在个别鱼类中(由于产生大量浮游性卵和幼体并存在着大量个体间强烈的基因交换,因而这些鱼种的基因多样性低)得到证实^[26],但是由于大部分珊瑚礁鱼类幼鱼阶段的分布特征及其与周边环境地质、生物相互作用的机制还不清楚,因而以石斑鱼为代表的珊瑚礁鱼类的染色体进化机制还有待大量相关研究工作来作进一步的阐明^[27]。另外,珊瑚礁鱼类具有复杂的行为学特征(如领地保护、体色变化、发声等),这些行为学特征导致的交配前生殖隔离可能在一定程度上既保证了石斑鱼属鱼类遗传物质的稳定性,又促进了其新物种形成。由此可见,石斑鱼染色体进化代表了鱼类染色体进化的一个特殊类群,石斑鱼染色体进化研究将大大丰富现有的鱼类染色体进化理论。然而到目前为止,和绝大部分海洋鱼类相似(只有7%的种类进行了核型分析),石斑鱼的细胞遗传学数据也相当匮乏^[28]。石斑鱼亚科159种石斑鱼中只有23种进行了染色体核型研究。今后尚需利用多种细胞遗传学方法对更多种类的石斑鱼进行系统的染色体特征研究,从而为更好地阐明石斑鱼染色体的进化过程和趋势提供数据支持,也为石斑鱼物理图谱的构建和杂交育种等工作提供帮助。

参考文献:

- [1] NELSON J S. Fishes of the world [M]. 3rd edition. New York: John Wiley and Sons Inc, 1994: 244-245.
- [2] 余德光, 王广军, 谢俊. 石斑鱼池塘健康养殖技术[J]. 科学养鱼, 2010(1): 35-37.
- [3] 吴政安. 写在染色体上的生物史—介绍日本细胞遗传学家吉田俊秀的研究[J]. 动物学杂志, 1985(4): 49-54.
- [4] 余先觉, 周敏, 李康, 等. 中国淡水鱼类染色体[M]. 北京: 科学出版社, 1989: 1-27.
- [5] 王德祥, 王军, 苏永全, 等. 鮟鱇黄姑鱼染色体核型的研究[J]. 海洋科学, 2002, 26(11): 68-70.
- [6] OHNO S. Protochordata, Animal Cytogenetics [M]. Berlin: Gebruder-Borntraeger, 1974: 1-99.
- [7] KLINKHARDT M, TESCHE M, GREVEN H. Database of Fish Chromosomes [M]. Magdeburg: Westarp-Wissenschaften, 1995: 230-237.
- [8] BRUM M J I, GALETTI J P M. Teleostei ground plan karyotype [J]. J Comp Biol, 1997, 2: 91-102.
- [9] 王小丽, 郑元升, 戴云. 巨石斑鱼染色体核型分析[J]. 水利渔业, 2008, 28(3): 22-23.

- [10] 洪满贤, 杨俊慧. 青石斑鱼染色体组型的研究[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 1988, 27(6): 714-715.
- [11] 李锡强, 彭跃东. 斑带石斑鱼和黑边石斑鱼的研究[J]. 湛江水产学院学报, 1994, 14(2): 22-26.
- [12] SOLA S I, INNOCENTI S D, GOMANN G E et al. Cytogenetic analysis of *E. marginatus* (Pisces: Serranidae), with the chromosome localization of 18s and 5S rRNA genes and of the (TTAGGG)_n telemetric sequence [J]. Marine Biology 2000, 137(1): 47-51.
- [13] 王德祥, 苏永全, 王世锋, 等. 宽额鲈染色体核型研究及制作方法的比较[J]. 台湾海峡, 2003, 22(4): 465-468.
- [14] 王云新, 王宏东, 张海发, 等. 斜带石斑鱼和赤点石斑鱼的核型研究[J]. 湛江海洋大学学报, 2004, 24(3): 4-8.
- [15] 陈毅恒. 鲑点石斑鱼的核型[J]. 福建水产, 1990(1): 23-25.
- [16] 郑莲, 刘楚吾, 李长玲. 4种石斑鱼染色体核型研究[J]. 海洋科学, 2005, 29(1): 33-37.
- [17] 邹记兴, 余其兴, 周菲. 点带石斑鱼的核型 C-带 Ag-NORs [J]. 水产学报, 2005, 29(1): 33-37.
- [18] 郭丰, 王军, 苏永全, 等. 云纹石斑鱼染色体核型研究[J]. 海洋科学, 2006, 30(8): 1-3.
- [19] 廖经球, 尹绍武, 陈国华, 等. 褐点石斑鱼的核型研究[J]. 水产科学, 2006, 25(11): 567-569.
- [20] 丁少雄, 王世锋, 王德祥, 等. 斜带石斑鱼染色体核型分析[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2004, 43(3): 426-428.
- [21] 钟声平, 陈超, 王军, 等. 七带石斑鱼染色体核型研究[J]. 中国水产科学, 2010, 17(1): 12-15.
- [22] WANG S F, SU Y Q, DING S X, et al. Cytogenetic analysis of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, using chromosome banding and fluorescence in situ hybridization [J]. Hydrobiologia, 2010, 638(1): 1-10.
- [23] 陈毅恒, 容寿柏, 刘绍琼, 等. 六带石斑鱼核型分析[J]. 湛江海洋大学学报, 1990, 10(1): 43-45.
- [24] 李树深. 鱼类细胞分类学[J]. 生物科学动态, 1981(2): 8-15.
- [25] MOLINA W F, GALETTI J R. P M. Multiple pericentric inversions and chromosomal divergence in the reef fishes *Stegastes* (Perciformes, Pomacentridae) [J]. Genet Mol Biol 2004, 27: 543-548.
- [26] GROSBERG R K, CUNNINGHAM C W. Marine community ecology [M]. Sunderland: Sinauer Associates, 2001: 61-84.
- [27] SALE P F. The Ecology of Fishes on Coral Reefs [M]. California: Academic Press, 1991: 564-598.
- [28] GALETTI J P M, MOLINA W F, AFFONSO P R A M, et al. Assessing genetic diversity of Brazilian reef fishes by chromosomal and DNA markers [J]. Genetica, 2006, 126: 161-177.

Chromosome Karyotype Analysis of *E. trimaculatus* (Valenciennes, 1828)

CAI Yan^{1,2}, ZHOU Yong-can¹, ZHANG Ben¹, XIE Zhen-yu¹, WANG Shi-feng¹

(1. Key Laboratory of Tropical Biological Resources of Ministry of Education, Hainan University, Haikou 570228, China;

2. Experimental Teaching Demonstration Center of Marine Biology, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: In our study, the head kidney tissue were used as materials, and in vivo treatment by phytohemagglutinin (PHA) and colchicines and Giemsa staining were performed, and the cytogenetics of *E. trimaculatus* were analyzed. The results indicated that the karyotypic formula of *E. trimaculatus* was $2n = 48, 48t, NF = 48$, no heteromorphic chromosome was detected. Based on the karyotypes of 23 species of groupers, the conclusion that $2n = 48, 48t, NF = 48$ was the primitive cytogenetic characterization of genus *Epinephelus* were proposed.

Key words: *Epinephelus trimaculatus*; chromosome; karyotype