

条斑星鲈染色体核型分析

王妍妍^{1,2} 柳学周^{2*} 徐永江² 吴莹莹²

(¹中国海洋大学生命科学与技术学部, 青岛 266003)

(²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, 青岛 266071)

摘要 采用体内注射植物血细胞凝集素(PHA)和秋水仙素法制备条斑星鲈染色体。实验鱼头肾细胞经体内短期培养, 取出体外经低渗处理、卡诺氏固定液固定后, 常规空气干燥法制作染色体标本。Giemsa 染液染色后获得中期分裂相进行核型分析。结果表明, 条斑星鲈有 46 条染色体, 其核型为 $2n=46=2sm+44t$, 即有 1 对亚中部着丝点染色体和 22 对端部着丝点染色体, 染色体臂数为 $NF=48$, 尚未发现有多倍体的现象, 也未发现异型性染色体和随体染色体。

关键词 条斑星鲈 染色体 核型 植物血细胞凝集素(PHA)

中图分类号 Q343.2; Q959.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2009)02-0008-06

Study on the karyotype of *Verasper moseri*

WANG Yan-yan^{1,2} LIU Xue-zhou^{2*} XU Yong-jiang² WU Ying-ying²

(¹ College of Life Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003)

(² Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resource, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

ABSTRACT The karyotype of *Verasper moseri* was studied through the chromosome preparations obtained from head kidney by the method of injecting PHA and colchicines. After low permeating and Carnoy's fixation, air drying method was used to make chromosome samples, which were dyed by Giemsa afterwards. The results showed that the diploid chromosome number of *Verasper moseri* was $2n=46$ and its karyotype formulae were $2n=46=2sm+44t$. Namely, there were one pair of submetacentric chromosome and 22 pairs of telocentric chromosome. $NF=48$. There was no visible evidence of polyploidy chromosome and sex chromosome.

KEY WORDS *Verasper moseri* Chromosome Karyotype PHA

条斑星鲈 *Verasper moseri* 隶属于鲈形目 Pleuronectiformes、鲈科 Pleuronectidae、星鲈属 *Verasper*, 为冷温性底层鱼类, 在我国黄、渤海有分布记录; 在日本海侧分布在北海道至若狭湾沿岸, 在太平洋侧分布在千岛至茨城县附近以及鄂霍次克海沿岸(李文姬等 2006)。条斑星鲈肉味鲜美, 口感滑嫩, 具有品质好、生长快、耐低温和抗逆性强的特点, 经济价值高, 是一种极具开发潜力和推广前景的优良养殖品种(杜佳垠 2003; 黄华伟 2007; 姜英俊 2006; 于大国等 2003)。

国家 863 计划项目(2006AA10A414)、公益性农业行业专项项目(nyhyzx07-046)和农业科技成果转化基金项目(2008GB23260382)共同资助

* 通讯作者。E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85811982

收稿日期: 2008-09-04; 接受日期: 2008-11-22

作者简介: 王妍妍(1983-), 女, 硕士研究生, 主要从事鱼类种质资源及遗传多样性研究。E-mail: wangyishch@163.com

我国自 2004 年从日本引进条斑星鲷苗种进行养殖和人工繁育技术研究。目前,人工繁育技术已获得突破,养殖业正在兴起(杜佳垠 2003;姜英俊 2006;李文姬等 2006;叶建生等 2007)。染色体存在于细胞核内,是主要的遗传物质载体。了解核型(染色体组型)对于研究鱼类的遗传、变异、分类、系统演化、性别决定和杂交育种等都具有重要意义(楼允东 1997)。国外有关条斑星鲷染色体核型的报道始见于 1970 年 Fukuoka 等发表的 10 种鲷类的体细胞染色体的记录一文,但未见具体方法介绍;2006 年,Okumura 等以仔鱼为试验材料进行了条斑星鲷染色体核型的分析。国内有关于条斑星鲷的染色体核型的研究尚未见报道。本文作者在进行国家十一五“863”计划课题“名贵海水鱼类规模化苗种繁育技术”研究过程中对人工养殖的条斑星鲷进行了染色体核型分析,以期对条斑星鲷种质鉴定和资源保护、遗传育种等方面的研究提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用条斑星鲷取自青岛忠海水产有限公司,试验共使用 2 龄鱼 6 尾,体重为 0.9~1.2 kg,体长为 31~36 cm,体高为 16~18 cm。试验鱼带回实验室后暂养于容积为 0.5 m³ 的圆形 FRP 水槽内,无投饵,养殖条件为:水温 16 ℃、盐度 30,2 d 后进行试验。

1.2 方法

1.2.1 注射 PHA 和秋水仙素

首先,在试验鱼腹腔部位(靠近胸鳍基部)注射 PHA(上海伊华医药科技有限公司)溶液(0.7%生理盐水配制),剂量 20 μg/g(鱼体湿重)。注射后将试验鱼置于 20 ℃±1 ℃(韩国产 401H 型控温仪控制温度)海水中暂养 24 h 后在同一部位注射秋水仙素(Sigma,美国)(0.7%生理盐水配制),剂量 2.5 μg/g(鱼体湿重)。注射针头以 30°角倾斜插入腹腔,不要插入过深,以免插到内脏器官造成注射不当。

1.2.2 制备细胞悬液

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他杂质,用 0.7%生理盐水冲洗两次。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。用生理盐水洗涤细胞两次后用 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。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,可放在常温或冰箱中过夜。

1.2.3 制片

采用冷滴片法滴片。将处理干净的载玻片(60 ℃洗衣粉液浸泡 18 h-自来水冲洗-蒸馏水冲洗-无水乙醇浸泡-酒精灯点燃使酒精蒸发)置于 4 ℃的冰箱中预冷 20 min 后取出用于滴片,滴片高度在 50~60 cm,用吸管吸取细胞悬液,每一玻片上滴约 3 滴。玻片在室温下空气自然干燥后用 10%吉姆萨染液(pH=6.8 的磷酸缓冲液配制)染色 40~60 min,自来水冲洗后在室温下自然干燥。

1.3 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 10 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(1964)提出的命名和分类标准,即按臂比将染色体分为 4 组:(1)中部着丝点染色体为 m 组,臂比为 1.00~1.70;(2)亚中部着丝点染色体为 sm 组,臂比为 1.71~3.00;(3)亚端部着丝点染色体为 st 组,臂比为 3.01~7.00;(4)端部着丝点染色体为 t 组,臂比≥7.01。m 和 sm 染色体臂数为 2,st 和 t 染色体臂数为 1。臂比=长臂/短臂,染色体相对长度=(每条染色体长度/单倍体组染色体总长度)×100%。

2 结果

2.1 条斑星鲷染色体数目的确定

在显微镜下对条斑星鲷分散良好的 100 个染色体中期分裂相进行计数。观察结果表明,条斑星鲷的中期分裂相均为二倍体,染色体众数为 46,占分裂相总数的 80%(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。通过核型分析知条斑星鲷染色体核型为 $2n=46=2\text{sm}+44\text{t}$,即有 1 对亚中部着丝点染色体(sm)和 22 对端部着丝点染色体(t),臂数 $NF=48$,不具有异型性染色体。条斑星鲷染色体的中期分裂相和核型图谱见图 1(图中箭头示 2 个亚中部着丝点染色体)。

表 1 条斑星鲷二倍体染色体计数结果
Table 1 Chromosome counts in the diploid of *Verasper moseri*

染色体数目 Number of chromosome	≤40	42	43	44	45	46	90	总和 Sum
分裂相数目 Number of metaphase	5	4	2	3	4	80	2	100
所占百分比(%) Percentage of metaphase	5	4	2	3	4	80	2	100

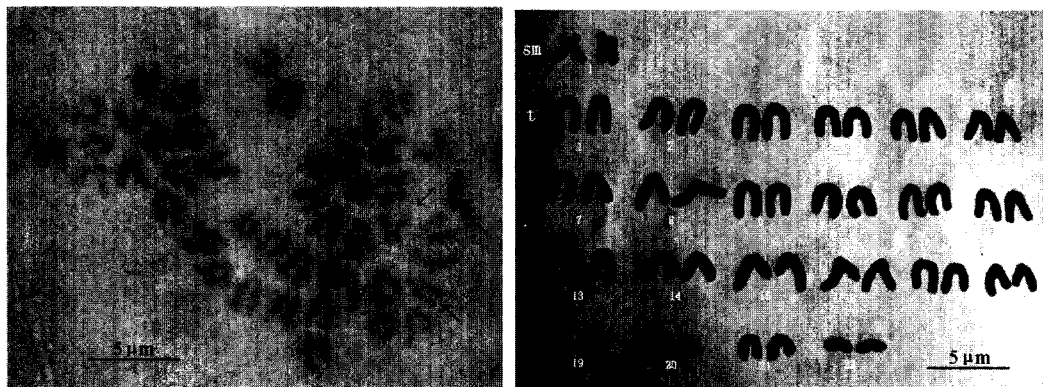


图 1 条斑星鲷中期染色体分裂相及其核型(箭头示两条亚中部着丝点染色体)

Fig. 1 The metaphase chromosomes and karyotype of *Verasper moseri*
(The arrows show the submetacentric chromosome)

2.2 染色体相对长度分析结果

通过测量与数据统计分析,条斑星鲷染色体相对长度、臂比及染色体类型如表 2 所示。条斑星鲷具有 23 对染色体,其中 1 对臂比为 $2.06(1.71 < 2.06 < 3.00)$,为亚中部着丝点染色体,其余 22 对臂比为 ∞ ,为端部着丝点染色体。相对长度最长为 5.83 ± 0.3 ,属于端部着丝点染色体;最短为 2.3 ± 0.42 ,也属于端部着丝点染色体。各对相邻染色体之间相对长度差异不明显。

3 讨论

3.1 染色体的制备方法

表 2 条斑星鲃染色体相对长度

Table 2 Metaphase chromosome relative length in *Verasper moseri*

编号 Chromosome Pair No.	相对长度 Relative length ($\bar{x} \pm sd$)	臂比 Arm ratio	类型 Type	编号 Chromosome Pair No.	相对长度 Relative length ($\bar{x} \pm sd$)	臂比 Arm ratio	类型 Type
1	5.39±0.59	2.06	sm	13	4.33±0.11	∞	t
2	5.83±0.30	∞	t	14	4.26±0.15	∞	t
3	5.39±0.17	∞	t	15	4.15±0.18	∞	t
4	5.24±0.12	∞	t	16	4.05±0.11	∞	t
5	5.08±0.11	∞	t	17	3.98±0.10	∞	t
6	4.93±0.09	∞	t	18	3.85±0.11	∞	t
7	4.86±0.09	∞	t	19	3.69±0.16	∞	t
8	4.77±0.06	∞	t	20	3.42±0.23	∞	t
9	4.67±0.10	∞	t	21	3.28±0.24	∞	t
10	4.56±0.11	∞	t	22	3.10±0.36	∞	t
11	4.48±0.06	∞	t	23	2.30±0.42	∞	t
12	4.41±0.11	∞	t				

采用林义浩(1982)提出的植物血细胞凝集素(PHA)体内注射法制备条斑星鲃染色体,此方法不需进行细胞体外培养和无菌操作,不受季节限制,实验设备简单,制片周期短,在1~2 d内便可获得大量的可供分析的中期分裂相,特别适用于实验室的染色体制备工作。采用此方法获得的有丝分裂指数较高。本研究制片得到的有丝分裂指数平均为0.1%~0.2%,高于Okumura等(2006)采用的仔鱼秋水仙素浸泡法得到的条斑星鲃有丝分裂指数0.048%。不同鱼类不同剂量和不同效应时间得到的分裂相数目不同,林义浩(1982)报道的用PHA体内注射法获得的不同种鱼的细胞有丝分裂指数见表3。通过表3可知,采用PHA体内注射法制备染色体在多数鱼类中都能获得较高的有丝分裂指数。沙珍霞等(2003)在研究花鲈的染色体制备方法中用PHA体内注射法获得的有丝分裂指数为1.1%,较其用的小鱼游泳法和组织浸泡法得到的分裂指数0.5%和0.3%高很多,但较其用的外周血培养法和胚胎干细胞培养法得到的分裂指数1.5%和6.3%低,后两种方法需在无菌条件下操作,对一般实验室要求较高。

PHA体内注射法会由于注射不当造成试验鱼死亡,致使试验无法继续,因此要求试验人员有较高的技术。另外,PHA及秋水仙素的使用剂量及作用时间上难以把握,林义浩(1982)报道PHA的剂量在8~10 $\mu\text{g/g}$ 体重及作用时间在4~36 h对鱼体是安全的,超过20 $\mu\text{g/g}$ 会导致某些鱼类死亡,注射次数1次或2~5次(海燕等 2001)都可显著起到增殖淋巴细胞的作用;秋水仙素的浓度和处理时间要适中,秋水

表 3 不同种鱼用 PHA 体内注射法获得的细胞有丝分裂指数(引自林义浩 1982)

Table 3 Mitosis index of different fishes obtained by PHA injection

序号 Number	鱼种 Species	有丝分裂指数 Mitosis index
1	北京鲃 <i>Parabramis pekinensis</i>	7.1%~11.4%
2	团头鲂 <i>Megalobrama amblycephala</i>	7.7%~12.3%
3	广东鲂 <i>Megalobrama hoffmanni</i>	8.6%~13.5%
4	倒刺鲃 <i>Barbodes(Spi.)denticulatus denticulatus</i>	7.0%~12.1%
5	鲮鱼 <i>Cirrhinus molitorella</i>	19.4%~14.6%
6	细鳞斜颌鲷 <i>Plagiognathops microlepis</i>	6.9%~9.8%
7	青鱼 <i>Mylopharyngodon piceus</i>	7.8%~11.2%
8	草鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	8.6%~13.8%
9	鲢鱼 <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	9.0%~14.8%
10	鳊鱼 <i>Aristichthys nobilis</i>	7.6%~13.2%
11	鲫鱼 <i>Carassius auratus auratus</i>	9.2%~13.8%
12	泥鳅 <i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	6.8%~10.9%
13	胡子鲇 <i>Clarias fuscus</i>	9.6%~14.2%
14	黄鳝 <i>Monopterus albus</i>	7.2%~9.8%
15	鳗鲡 <i>Anguilla japonica</i>	5.8%~8.4%
16	乌鳢 <i>Ophiocephalus argus</i>	6.3%~9.8%
17	圆尾斗鱼 <i>Macropodus chiensis</i>	8.6%~11.7%
18	莫桑比克罗非鱼 <i>Tilapia mossambica</i>	7.4%~10.6%

仙素浓度过低,难以获得较多的分裂相,秋水仙素的浓度过高或处理时间过长,会引起染色体收缩成粒状或短棒状,影响结果分析。处理时间过短,则中期分裂相的染色体较少(沙珍霞等 2003)。本试验根据参考文献(周丽青等 2005)采用 $20 \mu\text{g/g}$ (鱼体湿重)的 PHA 和 $2.5 \mu\text{g/g}$ (鱼体湿重)的秋水仙素处理试验鱼,得到的分裂相中染色体有不同程度的伸长或缩短,表明处于不同时期的分裂细胞对秋水仙素的敏感性不同。由此说明,只要正确掌握各种鱼类对 PHA、秋水仙素的效应时间和浓度,便可获得较多的肾细胞中期分裂相。

3.2 染色体核型比较

与淡水鱼类相比,有关海水鱼类染色体核型的研究开展得较晚,据卓孝磊等(2007)综述,我国已进行染色体研究的海水鱼类有 77 种,分属于 7 个目 26 科。其中以鲈形目种类最多,有 51 种;其次分别为鲉形目 8 种,鲷形目 6 种,鲑形目 5 种,鳗鲡目 3 种,鲱形目两种和鲭形目两种。染色体数目最少的是鲈形目锦鳃科的云鳃 *Enedrias nebulosus* 为 $2n=26$,其次是线鳃科的短颌小锦鳃 *Zoarchias microstomus* 为 $2n=28$,染色体数目最多的是鲈形目线鳃科的縠鳃 *Azumaemmnion* 为 $2n=56$,其次为鲱形目、鲉形目和鲈形目的多数种。核型 $2n=48$ 的共有 56 种,占总数的 72.7%, $2n=44$ 的共有 9 种,占总数的 11.7%, $2n=46$ 的共有 3 种,占总数的 3.9%。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。鲱形目鲱、鲷 2 科 6 种鱼核型报道中,只有角木叶鲷 *Pleuronichthys cornutus* (Temminck et Schlegel)的核型 $2n=48=12m+2sm+34t$ 比较特殊,其余 5 种(褐牙鲷 *Platycephalus indicus*、桂皮斑鲷 *Pseudorhombus cinnamomeus*、钝吻黄盖鲷 *Pseudopleuronectes yokohamae*、石鲷 *Karesus btcoloratus* 和亚洲油鲷 *Mscrastomus achne*)核型相同,均为 $2n=48t$ (王梅林等 2000)。2007 年,李鹏飞等报道了漠斑牙鲷 *Paralichthys lethostigma* 的染色体核型也是 $2n=48t$ 。大菱鲷 *Scophthalmus maximus* 染色体核型则是 $2n=44$, $NF=48$ (Bouza et al. 1994;Chen et al. 2004),半滑舌鳎 *Cynoglossus semilaevis* 染色体核型为 $2n=42t$, $NF=42$ (周丽青等 2005)。沙珍霞等(2007)报道了圆斑星鲷的染色体核型为 $2n=46t$,即有 23 对端部着丝点染色体,相对长度最长为 5.21 ± 0.16 ,最短为 2.9 ± 0.1 ;本研究得出条斑星鲷染色体核型为 $2n=46=2sm+44t$,即有 23 对染色体,包括 1 对亚中部着丝点染色体和 22 对端部着丝点染色体,与 Fukuoka 等(1970)和 Okumura 等(2006)的报道一致。实验得出条斑星鲷染色体相对长度最长为 5.83 ± 0.3 ,最短为 2.3 ± 0.42 ,与圆斑星鲷不同。条斑星鲷和圆斑星鲷染色体核型不同可能是种的差异造成的染色体发生了不同程度的变异(沙珍霞等 2007)。

3.3 染色体与鱼类进化的关系

一般认为,在鱼类的核型演化进程中有染色体加倍的倾向。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(李树深 1981)。小岛吉雄(1979)对 800 余种已做过核型研究的鱼类染色体统计结果表明,真骨鱼类划分为低位类、中位类和高位类 3 个演化类群。鱼类的进化程度与染色体有一定关系:进化上越是处于上位,染色体越收敛,端部着丝粒染色体多,臂数少,在鱼类系统进化上属于高位类。条斑星鲷染色体核型为 $2n=46=2sm+44t$, $NF=48$,未发现有多倍体的现象,也未发现异型性染色体和随体染色体,在鱼类系统上属于高位类,是比较原始的类群。

参 考 文 献

- 于大国,邱永成. 2003. 星鲷的养殖. 齐鲁渔业, 20(3):1~3
 王梅林,郑家声,朱丽岩,戴继勋. 2000. 我国海洋鱼类和贝类染色体组型研究进展. 青岛海洋大学学报, 30(2):277~284
 叶建生,王兴强,阎斌伦,马 蛙. 2007. 条斑星鲷的生物学特性及人工养殖技术. 水产科技情报, 34(2):66~68
 李文姬,李华琳. 2006. 日本条斑星鲷的生物学及增殖概况. 水产科学, 25(10):533~536
 李鹏飞,刘 萍,柳学周. 2007. 漠斑牙鲷染色体组型研究. 海洋水产研究, 28(4):26~30
 李树深. 1981. 鱼类细胞分类学. 生物科学动态, 2:8~1

- 杜佳垠. 2003. 日本条斑星鲷养殖. 渔业现代化, 2:21~22
- 沙珍霞, 陈松林, 田永胜. 2007. 圆斑星鲷染色体核型分析. 中国水产科学, 14(34):78~81
- 沙珍霞, 陈松林, 叶寒青, 徐美瑜, 刘洋, 季相山, 唐启升. 2003. 适合花鲈的几种染色体制备方法的比较. 中国水产科学, 10(6):469~473
- 林义浩. 1982. 快速获得大量鱼类肾细胞中期分裂相的 PHA 体内注射法. 水产学报, 6(3):201~204
- 卓孝磊, 邹记兴. 2007. 我国海水鱼类核型及染色体显带研究进展. 热带海洋学报, 26(5):73~80
- 周丽青, 杨爱国, 柳学周, 杜伟, 庄志猛. 2005. 半滑舌鳎染色体核型分析. 水产学报, 29(3):417~419
- 姜英俊. 2006. 条斑星鲷工厂化养殖技术. 齐鲁渔业, 23(7):8
- 海燕, 黄晓, 易梅生, 余其兴. 2001. 一种改良的鱼类染色体富集制片方法. 遗传, 23(2):151~152
- 黄华伟. 2007. 条斑星鲷的生物学性状与养殖. 内陆水产, 1:13~14
- 楼允东. 1997. 中国鱼类染色体组型研究进展. 水产学报, 21(增刊):82~96
- 小島吉雄. 1979. 水生生物及遗传育种. 水交出版社, 46~62
- Bouza, C., Sanchez, L., and Martinez, P. 1994. Karyotypic characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*) with conventional fluorochrome and restriction endonuclease-banding techniques. Mar. Biol. 120: 609~613
- Chen, S. L., Ren, G. C., Sha, Z. X. et al. 2004. Establishment of a continuous embryonic cell line from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* for virus isolation. Dis. Aqu. Org. 60:241~246
- Fukuoka, H., and Niiyama, H. 1970. Notes on the somatic chromosomes of ten species of pleuronectid fishes. Chrom. Inf. Serv. 11: 18~19
- Levan, A., Fredga, K., and Sandberg, A. A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas, 52(2):201~220
- Okumura Sei-ichi, Mizuho Sakai, and Kanami Onuma. 2006. A simple and efficient method of chromosome preparation using larvae of the barfin flounder *Verasper moseri* (Osteichthyes, Pleuronectiformes). Chromosome Science, 9:95~97

《海洋水产研究》期刊于 2009 年 1 月起更名为《渔业科学进展》

各有关单位、各位读者:

经国家新闻出版署 2008 年 11 月 13 日(新出报刊[2008]1324 号文)和山东省新闻出版局 2008 年 12 月 11 日(鲁新出批字[2008]325 号文)批准,从 2009 年 1 月起,《海洋水产研究》期刊更名为《渔业科学进展》(英文名:Progress in Fishery Sciences),ISSN 1000-7075,国内统一刊号:CN 37-1466/S,国内邮发代号:24-153,国外发行代号:4578Q。刊期仍为双月刊。

更名后,本刊栏目包括研究论文、研究综述和研究简报等,内容涵盖各类水域渔业科学研究最新成果,涉及与渔业科技有关的各学科门类的研究进展。本刊主要报道渔业生物学、渔业海洋学、水产增养殖学、水产种质资源与遗传育种、水生野生生物保护、渔业生物病害及其防治、渔业生态环境保护、渔业设施与捕捞技术、渔业装备制造技术、水产品综合利用与质量安全等领域的新发现、新技术和新成果。希望各位领导、各位专家,一如既往地关心和支持我们的工作,踊跃为《渔业科学进展》刊物投稿。

祝愿各位领导、各位专家工作顺利、万事如意!

中国水产科学研究院黄海水产研究所

《渔业科学进展》编辑部

2009 年 3 月 30 日