

双斑东方鲀染色体核型分析

刘巧红¹, 尤颖哲², 陈武各³, 陈 军¹

(1. 厦门大学海洋与地球学院, 福建 厦门 361102; 2. 漳州市水产技术推广站, 福建 漳州 363000;

3. 厦门海洋职业技术学院, 福建 厦门 361012)

摘要:鱼类的染色体核型分析是鱼类遗传学研究的基础, 作为我国重要养殖品种的双斑东方鲀 (*Takifugu bimaculatus*) 尚未发现有染色体核型的相关报道. 采用体内注射植物血球凝集素 (PHA) 及秋水仙素法制备了双斑东方鲀头肾组织染色体标本并分析其核型. 结果表明, 双斑东方鲀二倍体染色体数为 $2n=44$, 其染色体臂数为 $NF=62$, 核型公式为 $12m+6sm+26t$. 通过比较分析推测 $2n=44$ 应该是东方鲀属的染色体基础核型, 而其染色体核型的高度保守可能是东方鲀属鱼类易于发生种间杂交的主要原因之一.

关键词:海洋生物学; 双斑东方鲀; 染色体; 核型; 遗传; 杂交

DOI: 10.3969/J. ISSN. 2095-4972. 2018. 02. 015

中图分类号: P735

文献标识码: A

文章编号: 2095-4972(2018)02-0274-05

东方鲀属 (*Takifugu*) 鱼类隶属于鲀形目、鲀科^[1], 俗称河豚, 常见种类包括红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*)、菊黄东方鲀 (*T. flavidus*)、暗纹东方鲀 (*T. obscurus*)、黄鳍东方鲀 (*T. xanthopterus*)、假睛东方鲀 (*T. pseudommus*)、虫纹东方鲀 (*T. vermicularis*) 及双斑东方鲀 (*T. bimaculatus*)。东方鲀因其味极鲜美, 自古以来即有“拼死吃河豚”的说法, 1990 年被禁止流入国内市场, 因此我国东南沿海的东方鲀养殖业发展受到了一定限制. 2016 年农业部办公厅、国家食品药品监督管理总局联合发布了《关于有条件放开养殖红鳍东方鲀和养殖暗纹东方鲀加工经营的通知》, 两种东方鲀可以有条件“合法化”食用, 这也意味着与东方鲀相关的行业将迎来新的机遇和调整. 随着东方鲀的人工繁育^[2]、杂交育种^[3]及 3 倍体育种^[4]等相关研究的相继开展, 东方鲀属鱼类遗传背景的研究也应得到相应的加强, 以便更好地保护东方鲀属的种质资源, 避免原种基因受到污染, 提高养殖东方鲀的鱼苗质量, 使东方鲀的养殖健康有序发展.

染色体作为遗传物质的载体^[5], 是生物进化的档案库^[6]. 鱼类的染色体核型, 是研究鱼类遗传背景的重要参考资料, 目前已有 9 种东方鲀属鱼类完成染色体核型研究^[7-12], 包括红鳍东方鲀、菊黄东方

鲀、暗纹东方鲀等. 而作为我国重要养殖品种之一的双斑东方鲀尚未发现有染色体核型的相关报道. 本研究分析了福建省双斑东方鲀染色体核型, 旨在为将来进一步开展东方鲀种质鉴定及指导杂交育种提供必要的遗传背景资料.

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用的双斑东方鲀取自福建漳浦前亭兴水产养殖场, 共 10 尾, 1 龄.

1.2 染色体制备

参照林义浩 (1982)^[13]、舒琥等 (2010)^[8]的方法并做修改. 实验鱼于实验室暂养 24 h 后, 体腔注射植物血凝素 (PHA, 上海疾控生物科技有限公司), 剂量按每尾鱼体质量 $10\ \mu\text{g/g}$ 1 次注射; 4 h 后注射秋水仙素 (Solarbio), 剂量为每尾鱼体质量 $4\ \mu\text{g/g}$; 30 min 后每尾鱼按体质量 $1\ \text{cm}^3/100\ \text{g}$ 抽血. 然后取头肾于无菌生理盐水中清洗 2~3 遍, 用宽头镊子拉扯分散头肾组织, 静置 5 min 后收集上清液到新的离心管中. $1\ 000\ \text{r/min}$ 离心 10 min, 弃上清液, 收集细胞缓慢加入 $0.075\ \text{mol/dm}^3\ \text{KCl}$ 低渗液适量, 并轻柔、充分摇匀. 离心管置于 $37\ ^\circ\text{C}$ 水浴低渗 30 min, $1\ 000\ \text{r/min}$ 离心 10 min, 弃上清液, 收集细

收稿日期: 2017-04-11

基金项目: 厦门南方海洋研究中心资助项目 (13GYY002NF07); 海洋经济创新发展区域示范专项资助项目 (12PYY001SF08-XMDX-2)

作者简介: 刘巧红 (1988~), 女, 工程师, 硕士; E-mail: liuqh@xmu.edu.cn

胞缓慢加入预冷的卡诺氏固定液(甲醇与冰醋酸的体积比为 3:1 配制,现用现配)适量,轻柔摇匀后室温固定 90 min,每 30 min 更换 1 次固定液.第 3 次固定离心后,沉淀细胞加入新配置的固定液 1 cm³ 左右,轻柔摇匀,用吸管在干净预冷的玻片上方滴片,滴片后过酒精灯 5~6 次,自然干燥.玻片干燥后用体积分数为 10 % 的 Giemsa 染液(pH 值为 6.8,磷酸缓冲液配制)染色 30 min,用蒸馏水充分冲洗,自然干燥后封片待显微镜观察.

1.3 核型计数与分析

选取来自双斑东方鲀不同个体的 85 个分散均匀的中期分裂相进行统计,根据众数确定染色体 2*n* 数目.选取 10 个中期染色体分散较好、长度适中(正中期)、着丝点清晰的分裂相用显微镜拍照,按 Levan 等(1964)的标准进行分类分析^[14],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 1.0~1.7;②亚中部着丝点染色体为 sm 组,臂比为 1.7~3.0;③亚端部着丝点染色体为 st 组,臂比为 3.0~7.0;④端部着丝点染色体为 t 组,臂比大于 7.0.

2 结果与分析

2.1 染色体数目

在显微镜下选取了双斑东方鲀 85 个分散良好的分裂相进行观察计数,二倍体染色体数目为 44 的

有 72 个,占比为 84.7%(表 1).据此认为,双斑东方鲀二倍体染色体众数为 44,2*n* = 44.

表 1 双斑东方鲀中期分裂相染色体的统计结果

Tab.1 Chromosome counts in metaphase of <i>T. bimaculatus</i>		
染色体数/个	分裂相数	出现数目占比/%
≤40	2	2.35
41	3	3.53
42	4	4.71
43	1	1.18
44	72	84.70
≥45	3	3.53
总和	85	100.00

2.2 染色体核型

根据 Levan 等(1964)的分类标准^[14],对双斑东方鲀的中期分裂相染色体进行测量及分析,其中第 1 对亚中着丝粒染色体相对长度最大(图 1、表 2).双斑东方鲀 44 条染色体中,有 6 对为中部着丝点染色体(m),3 对为亚中部着丝点染色体(sm),13 对为端部着丝点染色体(t),核型公式为 12m + 6sm + 26t,2*n* = 44,臂数 *NF* = 62.

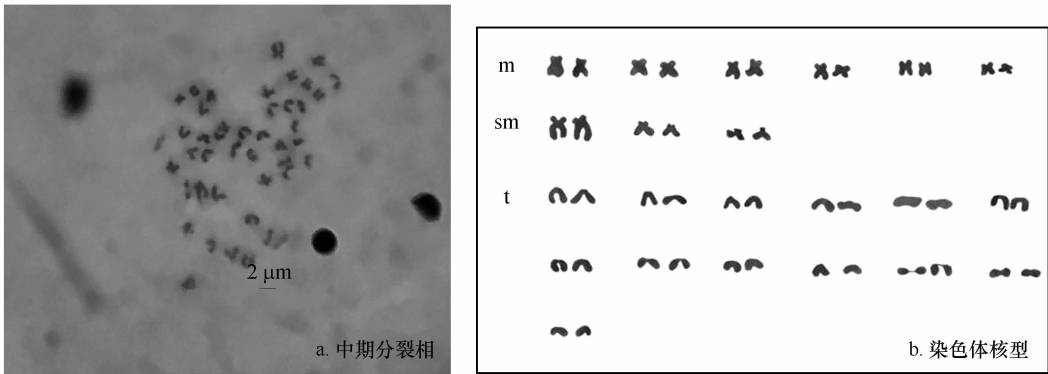


图 1 双斑东方鲀中期分裂相和染色体核型
Fig.1 Metaphase and karyotype of *T. bimaculatus*
a 中为 100 × 油镜

表 2 双斑东方鲀染色体相对长度和臂比

Tab.2 Relative length and arm ratio of chromosomes of <i>T. bimaculatus</i>		
相对长度/%	臂比	类型
6.49 ± 0.18	1.47 ± 0.03	m
6.16 ± 0.06	1.13 ± 0.07	m
5.81 ± 0.07	1.21 ± 0.07	m
5.45 ± 0.02	1.18 ± 0.06	m
5.12 ± 0.20	1.05 ± 0.03	m

		续表 2
相对长度/%	臂比	类型
3.99 ± 0.11	1.08 ± 0.03	m
7.73 ± 0.24	2.11 ± 0.05	sm
5.13 ± 0.11	2.31 ± 0.23	sm
4.52 ± 0.24	2.41 ± 0.21	sm
5.12 ± 0.12	∞	t
4.24 ± 0.13	∞	t

续表 2		
相对长度/%	臂比	类型
3. 91 ±0. 17	∞	t
3. 90 ±0. 17	∞	t
3. 78 ±0. 11	∞	t
3. 86 ±0. 14	∞	t
3. 98 ±0. 16	∞	t
3. 95 ±0. 16	∞	t
3. 79 ±0. 18	∞	t
3. 58 ±0. 21	∞	t
3. 53 ±0. 21	∞	t
3. 00 ±0. 25	∞	t
2. 97 ±0. 23	∞	t

注:“∞”表示臂比大于 7.0

2.3 讨论

染色体是遗传物质的主要载体,染色体组型在很大程度上具有物种的特异性,特定的生物体具有特定数目、形态特征的染色体^[2]. 在已报道的海水鱼类核型研究中,大多数鱼类的染色体二倍体数为 48^[15],如鲳科、鲷科、石首鱼科等. 染色体组由 48 条端部着丝粒染色体组成被认为是现代硬骨鱼类,尤其是海水鱼类的原始组型^[16]. 东方鲀属目前已报道的 9 种鱼类染色体核型(表 3),染色体数目均为 2*n* = 44,与本研究获得的双斑东方鲀染色体数目 2*n* = 44 相同. 比较后发现本属鱼类的染色体组型不存在明显差异,可以推断 2*n* = 44 为东方鲀属的染色体基本类型,该结果与鲀形目鱼类作为现存硬骨鱼中最特化的类群之一^[1]的观点一致. 同时本研究也发现一对相对长度最大的亚中部着丝粒染色体,支持 Miyaki 等(1995)认为这可能是东方鲀属特化的 1 对异性标志染色体的推测^[17].

表 3 已完成染色体核型分析的东方鲀属鱼类
Tab. 3 Species of *Takifugu* that have completed the karyotype analysis

种名	2 <i>n</i>	核型公式	<i>NF</i>	m + sm 数/条	参考文献
斑点东方鲀(<i>Takifugu poecilonotus</i>)	44	12m + 10sm + 22t	66	22	[7]
辐斑东方鲀(<i>T. radiatus</i>)	44	8m + 14sm + 22t	66	22	[7]
豹纹东方鲀(<i>T. pardalis</i>)	44	6m + 16sm + 22t	66	22	[7]
黄鳍东方鲀(<i>T. xanthopterus</i>)	44	12m + 8sm + 24t	64	20	[8]
星点东方鲀(<i>T. niphobles</i>)	44	4m + 16sm + 24t	64	20	[9]
菊黄东方鲀(<i>T. flavidus</i>)	44	14m + 6sm + 24t	64	20	[10]
假睛东方鲀(<i>T. pseudommus</i>)	44	12m + 8sm + 24t	64	20	[11]
暗纹东方鲀(<i>T. obscurus</i>)	44	14m + 4sm + 26t	62	18	[10]
红鳍东方鲀(<i>T. rubripes</i>)	44	12m + 6sm + 26t	62	18	[12]
双斑东方鲀(<i>T. bimaculatus</i>)	44	12m + 6sm + 26t	62	18	本研究

李树深(1986)提到在特定的分类阶元中,染色体数目多的(多倍体除外)和具有较多端部着丝粒染色体的鱼类可能是原始类群,而染色体数目少和具有较多中部或亚中部着丝粒染色体的是特化类群^[18]. 从染色体核型中可知,相比较于外部形态的分化,东方鲀属染色体核型的进化相对保守,如本研究中的双斑东方鲀与红鳍东方鲀、黄鳍东方鲀与假睛东方鲀的染色体核型基本一致,根据鱼类杂交育种中核型越相近,杂交越能成功的原则^[19],这可能是东方鲀属种间可以自然杂交^[20-21]和人工杂交^[22-23]的原因之一. 因此,染色体核型研究结果可以为杂交育种的亲本选择提供指导,但为了防止人

工杂交体逃逸到自然水体中引起遗传污染,在杂交育种和人工放流不断增加的今天,也应及早加强对东方鲀属种质和鱼类物种多样性的保护.

3 结论

本研究制备了重要海水鱼类养殖种类——双斑东方鲀(*T. bimaculatus*)的染色体标本并分析了其核型,获得双斑东方鲀二倍体染色体数 2*n* = 44,染色体臂数 *NF* = 62,核型公式 12m + 6sm + 26t. 通过比较分析推测 2*n* = 44 应该是东方鲀属的染色体基础核型,而其染色体核型的高度保守可能是东方鲀属鱼类易于发生种间杂交的主要原因之一,研究结

果进一步丰富了东方鲀种质鉴定及指导杂交育种相关的遗传背景资料。

参考文献:

- [1] 苏锦祥,李春生. 中国动物志:硬骨鱼纲、鲀形目、海蛾鱼目、喉盘鱼目、鲀目[M]. 北京:科学出版社,2002:221-274.
- [2] 钟建兴,刘波,郑惠东,等. 黄鳍东方鲀人工育苗技术及胚胎、仔稚幼鱼发育特征研究[J]. 海洋科学,2015,39(7):43-51.
- [3] 钟建兴,钟然,杨盛昌. 菊黄东方鲀和双斑东方鲀及其种间杂交子代的 ISSR 分析[J]. 台湾海峡,2008,27(2):152-155.
- [4] 王茂林,姜志强,李荣. 红鳍东方鲀三倍体诱导的初步研究[J]. 水产科学,2006,25(7):349-352.
- [5] 新津恒良,佐藤正一,福田重夫,等. 图解现代生物学[M]. 赵敏,译. 北京:科学出版社,1982:31.
- [6] 余先觉,周敦,李渝成,等. 中国淡水鱼类染色体[M]. 北京:科学出版社,1989:1-9.
- [7] Arai R. Karyological and osteological approach to phylogenetic systematics of tetraodontiform fishes[J]. Bulletin of the National Science Museum; Series A: Zoology, 1983,9(4):175-210.
- [8] 舒璇,蔡晓阅,刘锋,等. 鲀形目 3 种鱼的染色体组型分析[J]. 动物学杂志,2010,45(2):101-106.
- [9] Arai R, Nagaiwa K. Chromosomes of tetraodontiform fishes from Japan[J]. Bulletin of the National Science Museum; Series A: Zoology, 1976,2(1):59-72.
- [10] 陈家长,胡庚东,尤洋,等. 三种东方鲀核型的研究[J]. 中国畜禽种业,2005(7):46-48.
- [11] 赵小凡,王金星,杨青,等. 五种海产鱼类的核型分析[J]. 动物学研究,1994,15(s1):103-106.
- [12] 王金星,赵小凡. 鲀形目三种鱼的染色体研究[J]. 动物学研究,1993,14(4):345-346.
- [13] 林义浩. 快速获得大量鱼类肾细胞中期分裂相的 PHA 体内注射法[J]. 水产学报,1982,6(3):201-208.
- [14] Levan A, Fredga K, Sandberg A A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes[J]. Hereditas, 1964,52(2):201-220.
- [15] Klinkhardt M, Tesche M, Greven H. Database of Fish Chromosomes[M]. Magdeburg: Westarp-Wissenschaften, 1995:230-237.
- [16] Brum M, Galetti M. Teleostei ground plan karyotype[J]. Journal of Comparative Biology, 1997,2:91-102.
- [17] Miyakik K, Tabeta O, Kayano H. Karyotypes in six species of puffer fishes genus *Takifugu*[J]. Fisheries Science, 1995,61(4):594-598.
- [18] 李树深. 细胞水平的分类学—细胞分类学[J]. 生物学通报,1986,21(8):1-4.
- [19] 王祖熊,张锦霞. 鱼类杂交不亲和性的研究[J]. 水生生物学报,1986,10(2):171-179.
- [20] 马爱军,陆丽君,陈超,等. 东方鲀属主要经济鱼种繁育养殖、育种和基因研究现状[J]. 海洋科学,2011,35(11):128-133.
- [21] 孙铁鸥,焦燕,曾晓起. 渤海莱州湾红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*) × 假睛东方鲀(*Takifugu pseudommmus*) 天然杂交种一例[J]. 青岛海洋大学学报:自然科学版,1999,29(2):239-242.
- [22] 钟建兴,钟然,杨盛昌. 菊黄东方鲀和双斑东方鲀及其种间杂交子代的 ISSR 分析[J]. 台湾海峡,2008,27(2):152-155.
- [23] 钟建兴,李雷斌,刘波,等. 双斑东方鲀与红鳍东方鲀杂交育种研究初报[J]. 渔业研究,2016,38(4):263-272.

Analysis of the karyotype of *Takifugu bimaculatus*

LIU Qiao-hong¹, YOU Ying-zhe², CHEN Wu-ge³, CHEN Jun¹

(1. College of Ocean and Earth Science, Xiamen University, Xiamen 361102, China; 2. Zhangzhou Aquaculture Technique Popularizing Department, Zhangzhou 363000, China; 3. Oceanic Technology College of Xiamen, Xiamen 361012, China)

Abstract: Karyotype is the foundation of fish genetics. As one of the important species for aquaculture, the karyotype study of *Takifugu bimaculatus* has little been reported. In this study, the metaphase chromosomes of *T. bimaculatus* was obtained from head kidney tissue by the method of phytohemagglutinin (PHA) and colchicine injection, and then the karyotype was analyzed. The results show that there was of 44 chromosomes in the diploid and the karyotype formula was $12m + 6sm + 26t$, $NF = 62$. With results of comparison and analysis, it is suggested that $2n = 44$ is the chromosome karyotype of *Takifugu*. The highly conservative of chromosome karyotype may be the one main reason of easily interspecific hybridization in genus *Takifugu*.

Key words:marine biology;*Takifugu bimaculatus*; chromosome; karyotype; genetics; hybridization

DOI:10. 3969/J. ISSN. 2095-4972. 2018. 02. 015

(责任编辑:肖 静、王 静)