

4 种石斑鱼染色体核型研究

郑 莲，刘楚吾，李长玲

(湛江海洋大学 水产学院, 广东 湛江 524025)

摘要: 以蜂巢石斑鱼 (*Epinephelus merra*)、鲑点石斑鱼 (*Epinephelus fario*)、点带石斑鱼 (*Epinephelus malabaricus*) 及黑边石斑鱼 (*Epinephelus fasciatus*) 为材料, 胸腔注射 PHA 及秋水仙素溶液, 取头肾细胞经空气干燥法制片。经核型分析, 蜂巢石斑鱼与鲑点石斑鱼核型一样, $2n=48=4m+6sm+4st+34t, NF=62$; 点带石斑鱼与黑边石斑鱼的核型一样, $2n=48=48t, NF=48$ 。由染色体数目 $2n=48$ 可知, 4 种石斑鱼在鱼类系统中划分为高位类; 由核型组成不同, 可以将 4 种石斑鱼分为两大类: 蜂巢石斑鱼与鲑点石斑鱼属于一大类; 点带石斑鱼与黑边石斑鱼属于另一大类。此外, 按总臂数多少来分, 蜂巢石斑鱼与鲑点石斑鱼为特化类群; 点带石斑鱼与黑边石斑鱼为原始类群。

关键词: 石斑鱼 (*Epinephelus* Bloch); 植物血细胞凝集素 (PHA); 核型

中图分类号: Q11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2005)04-0051-05

石斑鱼属于鲈形目 (Perciformes)、鲈科 (Serranidae) 石斑鱼亚科 (Epinephelinae)、石斑鱼属 (*Epinephelus* Bloch) [1], 约 100 种, 具有分布广、生长快、个体大和肉质鲜美等特点。为分布于热带和亚热带海域的大型鱼类, 少数在温带水域也可遇见, 鱼类色泽斑纹为鉴别种类时的重要特征, 但这会随着鱼类的生长和栖息的深度而有变异, 单凭色泽斑纹来鉴别种群是不可靠的。因此, 研究鱼类的核型, 对于鱼类的分类地位及演化等有着极其重要的经济意义。有关石斑鱼核型最早报道是 1988 年由杨俊慧等 [2] 所做的青石斑, 接着陈毅恒等 [3-4] 分别对鲑点石斑鱼、六带石斑鱼, 李锡强等 [5] 分别对黑边石斑鱼、斑带石斑鱼进行了核型分析。对蜂巢、点带石斑鱼的核型分析并未见报道。为了使石斑鱼这些优良养殖种类得到很好的保护、利用和改造, 需要对石斑鱼的基因库进行分析, 研究其遗传背景。本研究目的是通过对石斑鱼核型分析, 掌握其细胞遗传学特征, 为今后鱼类育种提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

核型分析所用的蜂巢石斑鱼、鲑点石斑鱼、点带石斑鱼、黑边石斑鱼各 8 尾, 体质量为 50~150g, 分别由渔民在湛江沿海网捕, 经鉴定后放在水族箱内暂养待用 [1]。

1.2 方法

1.2.1 前处理

采用林义浩 [6] 植物血细胞凝集素 (PHA) 体内注射法, 向实验鱼胸腔内注射 PHA, 剂量为 $10 \mu\text{g/g}$, 经 24h 后注射秋水仙素, 剂量为 $4 \mu\text{g/g}$, 4~5h 后断尾及鳃部动脉在水中放血 20~30min。

收稿日期: 2003-06-27; 修回日期: 2004-10-12

基金项目: 广东省重大科技兴海项目 (A200099A01)

作者简介: 郑莲 (1967-), 女, 广东湛江人, 实验师, 硕士, 从事动物学教学和研究, 电话: 0759-2382180, E-mail: Li2382180@163.net

1.2.2 制备肾细胞悬液

取鱼头肾于 0.8%的生理盐水中清洗 2~3 遍，除去血块及其它组织，然后置于盛有少量生理盐水的培养皿中，用小剪刀充分剪碎，再移入刻度离心管中，加入适量生理盐水，用吸管吹打数分钟，静置片刻，制成细胞悬液。

1.2.3 低渗处理

取细胞悬液离心（1000r/min，离心 7min）收集细胞，打匀后加入预热的 0.075mol/L 的 KCl，37℃低渗 30~60min。

1.2.4 固定

低渗后的细胞，打匀后加固定液（甲醇 3：冰醋酸 1）固定 30min，离心 1000r/min,10min,重复固定两次。

1.2.5 滴片

将细胞悬液滴于预冷载玻片上，每片 1~2 滴，自然干燥。

1.2.6 染色

待片干后，用 10%Giemsa 液(pH=6.8,磷酸缓冲液配制)染色 60min,用水充分冲洗，自然干燥后封片。

1.2.7 染色体计数

选取来自不同个体的 100 个分散良好的的细胞，用 Olympus 显微镜进行观察统计，确定染色体 2n 数目。

1.2.8 组型分析

选取 10 个左右数目完整、分散良好、长度适中（正中期）、着丝点清楚、2 条单体适度分开、形态清晰的分裂相进行显微摄影，在相片上对每一条染色体确认着丝点位置，分别测量长臂和短臂。计算其相对长度和臂比值，并按 Levan^[7]提出的标准进行配对、分类排列组型。

2 结果

2.1 4 种石斑鱼体细胞染色体数

4 种石斑鱼在油镜下通过显微摄影观察，并对清晰且分散良好的中期分裂相 100 个进行计数，其结果见表 1。

2.2 4 种石斑鱼核型

通过对蜂巢、鲑点、点带、黑边石斑鱼细胞染色体进行测量及分析，根据 Levan^[7] 分类标准，可以得

出以下结果：蜂巢石斑鱼核型公式为 $2n=48$ ， $4m+6sm+4st+34t$ ， $NF=62$ ；鲑点石斑鱼核型公式为 $2n=48$ ， $4m+6sm+4st+34t$ ， $NF=62$ ；点带石斑鱼核型公式为 $2n=48$ ， $48t$ ， $NF=48$ ；黑边石斑鱼核型公式为 $2n=48$ ， $48t$ ， $NF=48$ 。其染色体核型参数见表 2，核型见图 1。

表 1 4 种石斑鱼染色体数目

Tab.1 The number of chromosomes of 4 grouper species				
石斑鱼种类	染色体	细胞数	2n=48 细	出现频率(%)
	数(2n)		胞数(2n)	
蜂巢石斑鱼	48	100	80	80
鲑点石斑鱼	48	100	85	85
点带石斑鱼	48	100	88	88
黑边石斑鱼	48	100	91	91

2.3 4 种石斑鱼在鱼类系统上的划分

根据小岛吉雄^[8]在研究鱼类染色体时对真骨鱼的划分的标准，由染色体数目 $2n=48$ 可知，4 种石斑鱼在鱼类系统中划分为高位类；由核型组成不同，可以将 4 种石斑鱼分为两大类：蜂巢石斑鱼与鲑点石斑鱼属于一大类；点带石斑鱼与黑边石斑鱼属于另一大类。此外，按总臂数多少来分，蜂巢石斑鱼与鲑点石斑鱼为特化类群；点带石斑鱼与黑边石斑鱼为原始类群。

3 讨论

3.1 植物血细胞凝集素（PHA）等对鱼类免疫系统的效应

PHA 是一种有丝分裂刺激剂，具有刺激白细胞包括淋巴细胞进入分裂周期的作用。林义浩^[6]首先采用 PHA 体内注射刺激鱼类肾细胞的迅速分裂增殖。在探索鱼类 PHA 体内效应的细胞周期的实验中，胡子鲶、罗非鱼、鲫鱼等对大剂量 PHA 有趋于速发型超敏反应的趋势^[6]。以胡子鲶为例，PHA 8~10 μ g/g 的剂量注射，淋巴细胞总数在 0.5，1，3 h 时显著增加，一般来说，体内注射 PHA 的细胞周期与体外短期培养的细胞周期不一样。体内注射 PHA 的量一般不能超过 20 μ g/g，一些鱼在此剂量注射下会身体

表 2 4 种石斑鱼的核型参数

Tab.2 Indices of karyotypes of 4 grouper species

编 号	蜂巢石斑鱼			鲑点石斑鱼			点带石斑鱼			黑边石斑鱼		
	相对长度	臂长	类型	相对长度	臂长	类型	相对长度	臂长	类型	相对长度	臂长	类型
1	5.24±0.34	1.54±0.14	m	5.34±0.20	1.53±0.09	m	5.49±0.21	∞	t	5.53±0.30	∞	T
2	4.45±0.16	1.51±0.11	m	4.84±0.29	1.58±0.05	m	5.26±0.23	∞	t	5.53±0.30	∞	t
3	6.12±0.17	2.17±0.14	sm	5.85±0.16	2.17±0.17	sm	5.06±0.17	∞	t	5.12±0.24	∞	t
4	5.42±0.23	2.24±0.19	sm	5.07±0.21	2.43±0.14	sm	4.90±0.15	∞	t	5.00±0.19	∞	t
5	4.80±0.40	2.47±0.20	sm	4.40±0.36	2.09±0.24	sm	4.75±0.05	∞	t	4.84±0.14	∞	t
6	5.43±0.32	3.85±0.40	st	5.15±0.46	3.64±0.43	st	4.65±0.08	∞	t	4.76±0.15	∞	t
7	4.55±0.31	4.36±0.45	st	4.57±0.40	3.86±0.32	st	4.59±0.05	∞	t	4.65±0.11	∞	t
8	5.11±0.17	∞	t	5.01±0.33	∞	t	4.49±0.02	∞	t	4.59±0.09	∞	t
9	4.74±0.21	∞	t	4.70±0.20	∞	t	4.40±0.05	∞	t	4.50±0.10	∞	t
10	4.58±0.27	∞	t	4.52±0.13	∞	t	4.34±0.01	∞	t	4.44±0.10	∞	t
11	4.41±0.14	∞	t	4.36±0.13	∞	t	4.27±0.06	∞	t	4.34±0.06	∞	t
12	4.25±0.06	∞	t	4.27±0.09	∞	t	4.19±0.07	∞	t	4.26±0.05	∞	t
13	4.19±0.04	∞	t	4.20±0.09	∞	t	4.12±0.06	∞	t	4.14±0.07	∞	t
14	3.94±0.11	∞	t	4.12±0.07	∞	t	4.08±0.07	∞	t	4.07±0.08	∞	t
15	3.84±0.08	∞	t	3.94±0.06	∞	t	4.05±0.05	∞	t	4.01±0.08	∞	t
16	3.79±0.08	∞	t	3.87±0.05	∞	t	3.98±0.07	∞	t	3.94±0.06	∞	t
17	3.73±0.07	∞	t	3.76±0.07	∞	t	3.87±0.09	∞	t	3.87±0.04	∞	t
18	3.62±0.07	∞	t	3.66±0.04	∞	t	3.75±0.10	∞	t	3.75±0.07	∞	t
19	3.48±0.08	∞	t	3.58±0.05	∞	t	3.69±0.07	∞	t	3.64±0.13	∞	t
20	3.35±0.08	∞	t	3.49±0.10	∞	t	3.61±0.06	∞	t	3.47±0.13	∞	t
21	3.11±0.18	∞	t	3.34±0.09	∞	t	3.52±0.13	∞	t	3.35±0.11	∞	t
22	2.82±0.24	∞	t	3.17±0.14	∞	t	3.44±0.17	∞	t	3.22±0.10	∞	t
23	2.49±0.36	∞	t	2.98±0.20	∞	t	3.13±0.13	∞	t	2.89±0.19	∞	t
24	2.04±0.20	∞	t	1.89±0.20	∞	t	2.40±0.40	∞	t	2.56±0.18	∞	t

僵直而死亡。虽然对鱼类免疫过程还未能彻底弄清楚，但实验鱼在注射 PHA 后淋巴细胞的总数与形态结构均有显著改变，表明了 在体内条件下，作为鱼类的头肾组织能够直接或间接地对 PHA 的刺激作出反应。为增加分裂指数，在个体生命力旺盛之时加用 PHA 可有明显的效果。通过对 4 种石斑鱼染色体的制作，可以证明这一点：PHA 作用 4h 或 1d 后，可获得大量的鱼肾细胞中期分裂相。在只注射秋水仙素的鱼肾组织中所获得的中期分裂相较少。当然，秋水仙素也是其中的一个影响因素。王琼等^[9]提出秋水仙素处理会造成贻贝染色体收缩，且长臂与短臂不成比例地缩短。但刘萍等^[10]指出秋水仙素和低渗对虾的染色体的长短和分散不起重要作用。本实验过程中观察到不少分裂相中染色体有不同程度的伸长或缩短，也观察到不同细胞染色体大小也确有不同，这表明处于不同时期的分裂细胞与来自不同组织的细胞对秋水仙素的敏感性不同。由此可以说明，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 4 种石斑鱼核型的比较

据施立明^[11]报道：“一个物种的核型特征，即染色体数目、形态及行为的稳定是相对的，种内染色体的多态是广泛存在的现象。遗传多样性越丰富，物种进化的潜力就越大；意味着物种自身的延续能力越强”。当然，染色体的数量和组型，可以作为生物的一种特征，但并非一成不变。作者所研究的黑边石斑鱼，其结果与李锡强等^[5]所报道的相一致，但鲑点石斑鱼与陈毅恒所报道的有所出入，陈毅恒的核型公式为 3m+11sm+34st；本研究的核型公式为 4m+6sm+4st+34t；这些差异可能是由于不同种群所表现出的染色体多态性，也可能是由于不同研究者所使用的方法不同，测量染色体的时相不一致，以及测量和配组误差所造成的。

同时，从表 1 可以看出，4 种石斑鱼的染色体数目（2n=48）出现频率均在 80%~95%之间。据尹洪宾等^[12]在对 4 种鲤鱼染色体核型比较研究中指出，每种

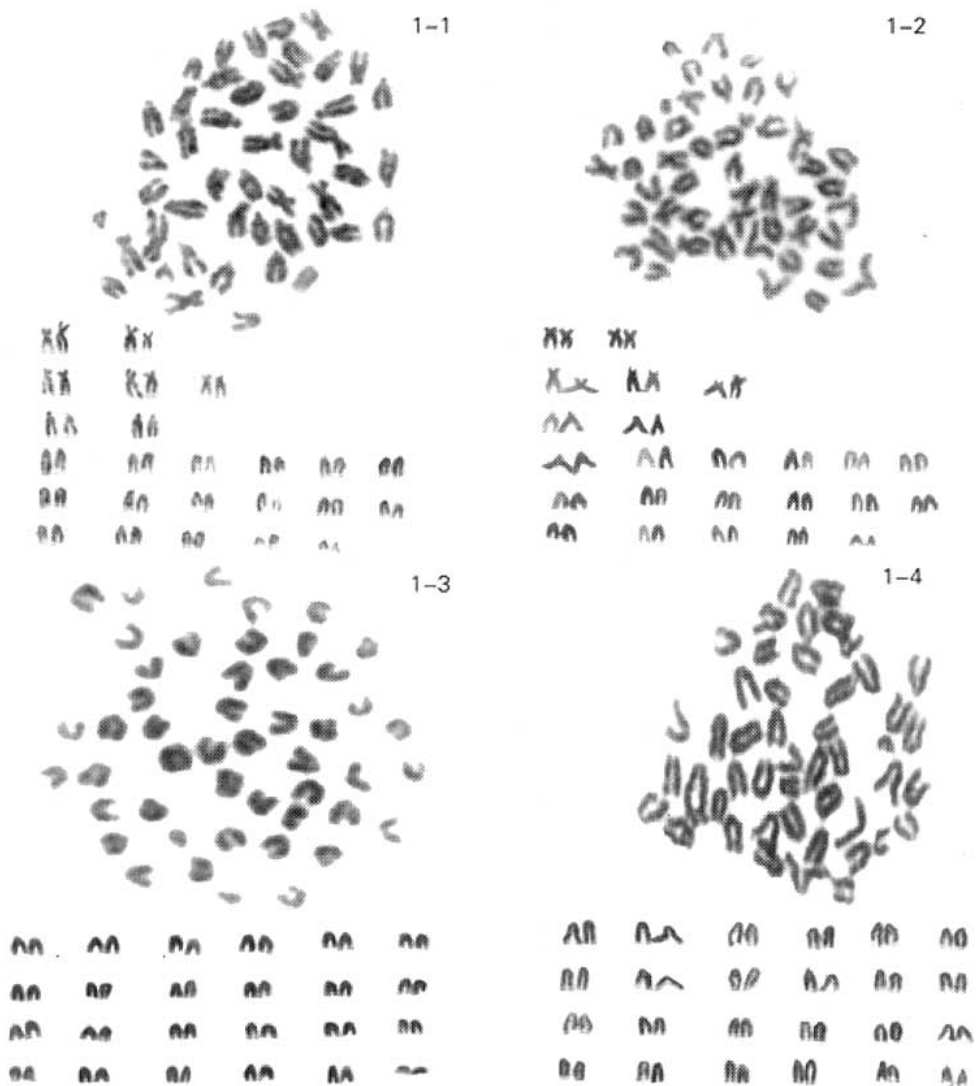


图 1 4 种石斑鱼的二倍染色体核型

Fig.1 Diploid karyotype of 4 Groupers

1-1, 1-2, 1-3, 1-4 分别为蜂巢、鲑点、点带、黑边石斑鱼的核型

1-1, 1-2, 1-3, 1-4 is diploid karyotype of *Epinephelus Merra*, *Epinephelu Fario*, *Epinephelus malabaricus* and *Epinephelus fasciatus* respectively

生物染色体数都是相对固定的,对于具非众数染色体细胞,很可能是由于低渗或制片操作中导致少数染色体丢失的结果,每一种实验鱼的个体差异不会造成染色体数目的变化。由此,可以确定,4 种石斑鱼的染色体数目 $2n=48$ 。

3.3 鱼类的进化与染色体的关系

鱼类的演化程度与鱼本身细胞的染色体类型是

一致的。小岛吉雄^[8]对 800 余种已作过核型研究的鱼类染色体统计研究结果表明,将真骨鱼类划分为低位类、中位类和高位类三个演化类群。探讨了鱼类的进化与染色体的关系,通过对大量资料的分析指出: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高位类。蜂巢等 4 种石斑鱼染色体数目 $2n=48$,为典型高位类群染色

体数目, 因此, 在鱼类系统上属于高位类。

王梅林等^[13]在我国海洋鱼类和贝类染色体组型研究进展一文中指出, 物种的核型演化主要通过染色体重组进行的, 核型为 $2n=48$, $48t$ 的这些鱼类, 表明其核型进化过程中的保守性和趋同性, 同时也表明细胞水平的核型结果反映不同的形态学物种。李树深^[14]研究指出, 在特定的分类阶元中, 具有较多端着丝粒染色体的是原始类群, 而具有较多中部或亚中部着丝粒染色体的是特化类群; 臂数少的为较特化类群, 臂数多的为特化类群。由此我们可以知道, 蜂巢石斑鱼和鲑点石斑鱼为特化类群, 点带石斑和黑边石斑鱼为原始类群。

石斑鱼属种类繁多, 某些物种在形态上极为相似, 而实际上是存在生殖隔离的不同的群体^[5]。尽管在自然状况下, 石斑鱼属鱼类可能也存在一定程度的杂交, 然而, 这些杂交组合以及杂交后代的成活率, 可育性如何, 目前研究较少。因此, 对石斑鱼的核型研究是很有必要的。

参考文献:

- [1] 成庆泰, 郑葆珊. 中国鱼类系统检索(上、下册)[M]. 北京: 科学出版社, 1987, 47-50.
- [2] 杨俊慧. 青石斑鱼染色体组初步研究[J]. 广州师院学报, 1998, 2: 62-68.
- [3] 陈毅恒. 六带石斑鱼的核型分析[J]. 湛江水产学院学报, 1985, 4(1): 73-75.
- [4] 陈毅恒. 鲑点石斑鱼的核型[J]. 福建水产, 1990, 1: 23-25.
- [5] 李锡强, 彭跃东. 斑带石斑鱼和黑边石斑鱼核型的研究[J]. 湛江水产学院学报, 1994, 14(2): 22-26.
- [6] 林义浩. 快速获得大量鱼肾细胞中期分裂相的 PHA 体内注射法[J]. 水产学报, 1982, 6(3): 201-204.
- [7] Levan A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes[J]. *Hereditas*, 1964, 52(2): 201-220.
- [8] 小岛吉雄. 水产生物及遗传育种[M]. 水交出版社, 1979, 46-62.
- [9] 王琼、童裳亮. 贻贝核型及染色体带型分析[J]. 动物学报, 1994, 40(3): 309-316.
- [10] 刘萍. 中国对虾染色体体制备及染色体形态的研究[J]. 海洋科学, 1994, 1: 33-37.
- [11] 施立明. 遗传多样性及保护[M]. 北京: 中国科学院生物科学与技术局, 1996, 73-82.
- [12] 尹洪宾. 四种鲤鱼染色体核型比较研究[J]. 水产学杂志, 2001, 14(1): 7-10.
- [13] 王梅林、郑家声、朱丽岩, 等. 我国海洋鱼类和贝类染色体组型研究进展[J]. 青岛海洋大学学报, 2000, 30(2): 277-284.
- [14] 李树深. 鱼类细胞分类学[J]. 生物科学动态, 1981, 2: 8-15.

Studies on the karyotype of 4 groupers

ZHENG Lian, LIU Chu-wu, LI Chang-ling

(Fisheries College, Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Received: Jun., 27, 2003

Key words: *Epinephelus* Bloch; PHA; karyotype

Abstract: The karyotypes of 4 wild groupers were examined in renal tissues by using PHA-injection air drying method. Their karyotype formulae are as follows: $2n=48=4m+6sm+4st+34t$, $NF=62$ for *Epinephelus merra* and *Epinephelus fario*; $2n=48=48t$, $NF=48$ for *Epinephelus malabaricus* and *Epinephelus fasciatus*. According to the diploid number of 48 chromosomes, these 4 wild grouper species belong to high level of system classification. According to karyotypes difference, the groupers can be divided into two groups: one is *E. merra* and *E. fario*, the other is *E. malabaricus* and *E. fasciatus*. In addition, according to fundamental arm number (NF), *E. merra* and *E. fario* belong to specialized classification, while *E. malabaricus* and *E. fasciatus* belong to primitive classification.

(本文编辑: 刘珊珊)