

# 珍稀鱼类——波纹唇鱼

## 染色体制备及核型的初步研究

周丽青<sup>1</sup>, 杨爱国<sup>1</sup>, 吴彪<sup>1</sup>, 程鹏<sup>1,2</sup>, 于宏<sup>1\*</sup>, 王华<sup>3</sup>, 雷霖霖<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东, 青岛, 266071)

(2. 大连水产学院, 辽宁, 大连, 116023)

(3. 中国检验认证集团山东有限公司, 山东, 青岛, 266071)

**摘要** 出于对波纹唇鱼这一濒危物种资源调查和保护的目的, 本文探讨了活体状况下波纹唇鱼染色体制备的方法, 并对其染色体进行分析。剪取一龄波纹唇鱼的微量尾部鳍条及对应部位的愈合增生组织为材料, 采用热滴片法制备染色体标本。核型分析结果表明, 波纹唇鱼二倍体染色体数目  $2n=48$ , 核型为  $2n=4M+10SM+32ST+2T$ , 因所取鱼的条数有限, 且均为雌性, 所以尚不能确定是否有异型性染色体的存在。

**关键词** 波纹唇鱼; 鳍条; 愈合增生组织; 核型

中图分类号

文献识别码

文章编号

### A preliminary study on chromosome preparation and karyotype of humphead wrasse *Cheilinus undulatus*

ZHOU Li-qing<sup>1</sup> YANG Ai-guo<sup>1</sup> WU Biao<sup>1</sup> CHENG peng<sup>1,2</sup> YU Hong<sup>1\*</sup> WANG Hua<sup>3</sup> LEI Ji-lin<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(<sup>2</sup> Dalian Fisheries University, 116023 )

(<sup>3</sup> China Certification & Inspection Group Shandong Co., Ltd., Qingdao 266071)

**ABSTRACT** In order to protect the humphead wrasse *Cheilinus undulatus* (Ruppell, 1835), an endangered species, the metaphase chromosome preparations of the live fish and its karyotype were studied in this research. The metaphase chromosome was obtained from the fin and its healing hyperplastic tissue of one-year old fish, by hot air drying methods. The karyotypes were examined. The results showed that there were 48 chromosomes in diploid and their karyotype formulae was  $2n=4M+10SM+32ST+2T$ . Heterotypic sex chromosome was not found since the number of the tested fish was limited and all the young fish were physiologically female.

**KEY WORDS** Humphead Wrasse *Cheilinus undulatus* Chromosome Fin Healing hyperplastic tissue Karyotype

收稿日期:

资助项目: 国家“863”计划项目(2006AA10A414)

作者简介: 周丽青(1974-), 女, 硕士, 助研, 主要从事水产动物增殖和遗传育种方面的研究。

Tel: 0532-5811982, E-mail: zhoulq@ysfri.ac.cn

\* 通讯作者: 于宏(1963-), 男, 副研究员, 主要从事海水鱼类种苗繁育技术的研究, Tel:0532-85844459, E-mail:yuhongqd@yahoo.com.cn

波纹唇鱼(*Cheilinus undulatus*)俗称苏眉鱼或珊瑚鱼,属隆头鱼科(Labridae),为暖水性鱼类,主要分布于印度洋至太平洋,在我国主要分布于南沙群岛和东南亚海域(成庆泰 1987)。波纹唇鱼是一种高级观赏鱼类,也是一种高级食用鱼类,其肉质细腻,特别鲜嫩。多年以来,它的鱼唇就一直是不少亚洲人盘中的美味。由于过度的捕捞,仅仅几年的时间,波纹唇鱼已经濒临绝种,世界自然基金会将其列为10种濒临灭绝的生物物种之一(百科知识 2005; Donaldson *et al.* 2001)。近年来,人们已经开始关注波纹唇鱼的人工繁、养殖(于宏等 2008; Kota *et al.* 1996);生物学特性(于宏等 2008; Sadovy *et al.* 2003; Sluka *et al.* 2000)遗传分析(区又君等 2009)等。染色体数及染色体核型是鱼种种质的重要参数,属于细胞遗传学内容,也是开展其遗传育种的基础,对生物学分类和系统演化及环境监测等也有重要的意义(朱东发等 2005)。霍蕊等(2009)采用植物血凝集素PHA、秋水仙素腹腔注射和空气干燥制片法以头肾组织为材料,对波纹唇鱼的染色体核型进行了研究,但这种传统的染色体制备方法需以牺牲鱼的生命为代价。本文通过一系列的实验,在保证鱼体健康存活的情况下,剪取一龄鱼微量尾鳍及对应部位愈合增生组织作为染色体制备材料,笔者摸索到利用鱼鳍组织制备波纹唇鱼染色体标本的方法,可获得较多良好的中期分裂相,并对波纹唇鱼的染色体的数目和核型进行了研究,以期对波纹唇鱼细胞遗传学和遗传育种研究提供基础资料,研究结果对其种质资源的保护亦有重要意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

2008年8~9月从海南海区取回1龄波纹唇鱼5尾,均为雌性鱼,体长20~25cm,实验室内暂养1月左右,活体剪取微量尾鳍或所剪部位愈合增生的组织作为制备中期分裂相染色体的材料。

### 1.2 制备染色体标本

沿尾鳍边界活体剪取0.1~0.2cm宽,0.5~1cm长的尾鳍或该部位愈合增生组织(愈合增生组织为2~3d前剪取微量尾鳍后愈合的部位),在过滤海水中漂洗后放入含0.04%秋水仙素的50%海水(蒸馏水:海水=1:1)中处理45分钟,用0.0375M的KCl溶液低渗50分钟,再用卡诺氏(Carnoy)液(甲醇:冰醋酸

=3 1) 充分固定。制片时先用 50%的冰醋酸溶液解离成细胞悬浊液，热滴片法制片，10%的 Giemsa 染色 30 分钟，自来水冲洗，晾干后镜检。

### 1.3 核型分析与比较

从每尾鱼的染色体制片上选出染色体轮廓清晰的中期分裂相进行染色体计数，再精选染色体收缩适中、分散较好的 10 个中期分裂相进行显微照相，将照片扫描输入计算机，经放大处理后，喷墨打印机输出，描绘出染色体轮廓，然后进行核型分析，采用下式计算相对长度和臂比（杨孝文等 2000）：

$$\text{相对长度} = (\text{实测染色体长度} / \text{全部染色体长度总和}) \times 100$$

$$\text{臂比} = \text{长臂长度} / \text{短臂长度}$$

用计算机求出它们的平均数和标准差，按 Levan 等（1964）确定的标准进行染色体分类，得出波纹唇鱼的染色体核型公式。

## 2 结果

### 2.1 波纹唇鱼染色体数目的确定

5 尾鱼均观察到清晰分裂相，共对 100 个中期分裂相进行染色体计数，结果列于表 1，确定染色体众数为 48。

表 1 波纹唇鱼二倍体染色体计数结果

Table 1 Chromosome counts in the diploid *C. undulatus*

染色体数目 Number of chromosome	≤46	47	48	≈96	总和 Sum
分裂相数目所占百分比 (%) Percentage of metaphase cells	27	17	54	2	100

### 2.3 染色体相对长度和臂比值分析结果

通过测量与分析，波纹唇鱼染色体相对长度和臂比值见表 2，波纹唇鱼的中期分裂相皆为二倍体，核型为  $2n=4M + 10SM + 32ST + 2T$ ，臂数  $NF=62$ （图 1）。

表 2 波纹唇鱼染色体类型、相对长度及臂比

Table 2 Relative length and arm ratio of metaphase chromosome in *C. undulatus*

染色体序号 Number of chromosome	平均相对长度±标准差 Average relative length±SD	平均臂比值±标准差 Average arm ratio±SD	染色体类型 Chromosome type
1	2.23±0.15	1.53±0.12	M
2	2.01±0.12	1.50±0.22	M

3	2.64±0.18	2.07±0.40	SM
4	2.40±0.16	2.15±0.37	SM
5	2.34±0.14	2.07±0.73	SM
6	2.23±0.09	2.19±0.56	SM
7	1.78±0.28	2.62±0.36	SM
8	2.63±0.16	4.98±1.10	ST
9	2.43±0.10	4.98±1.39	ST
10	2.29±0.07	4.85±1.14	ST
11	2.28±0.08	4.23±1.15	ST
12	2.21±0.09	5.07±0.74	ST
13	2.19±0.10	5.13±0.87	ST
14	2.10±0.09	5.47±1.61	ST
15	2.03±0.07	5.73±1.18	ST
16	1.96±0.10	5.49±0.71	ST
17	1.90±0.06	5.18±1.11	ST
18	1.85±0.07	5.38±1.15	ST
19	1.79±0.08	5.57±1.52	ST
20	1.73±0.09	4.97±1.25	ST
21	1.65±0.09	6.15±1.19	ST
22	1.52±0.09	4.71±0.96	ST
23	1.49±0.18	5.08±0.98	ST
24	2.32±0.10	7.59±1.06	T

注：M, 中部着丝粒染色体；SM: 亚中部着丝粒染色体；ST,亚端部着丝粒染色体；T,端部着丝粒染色体

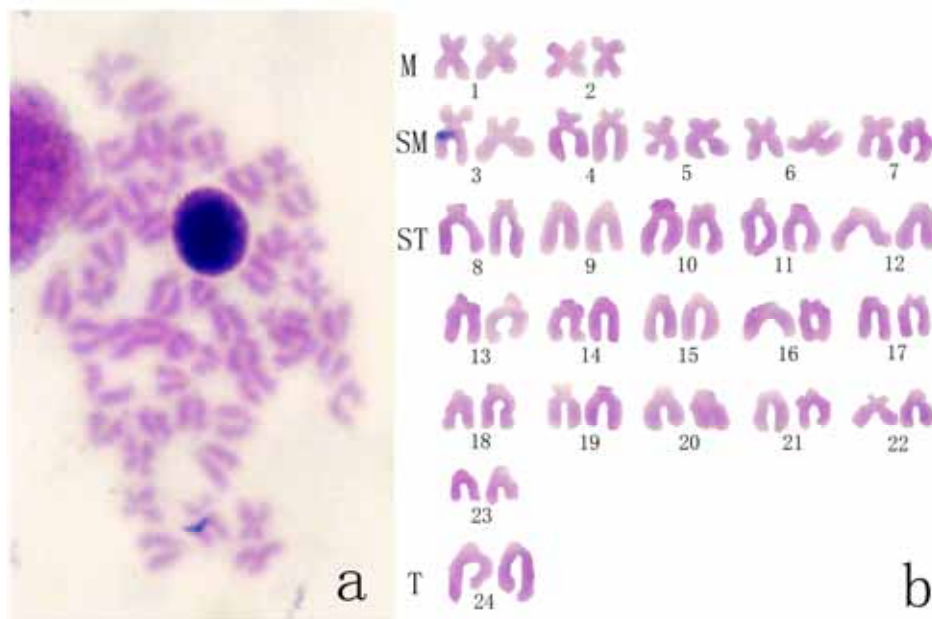


图1 波纹唇鱼中期分裂相染色体及核型

Fig. 1 The metaphase chromosome and karyotype of *C. undulatus*

a. 波纹唇鱼中期分裂相染色体； b. 波纹唇鱼染色体核型；

a. The metaphase chromosomes of the *C. undulatus*; b. The karyotype of the *C. undulatus*

### 3 讨论

取材部位的选择是鱼类染色体制备的关键因素。不同的物种，其染色体制备的方法及取材部位也不尽相同。目前对海水鱼类进行核型分析时的取材部位一般都是细胞分裂增生能力较强的器官组织，如肾脏、脾脏、鳃丝等，或取血液、再生鳍和受精卵胚胎等做短期培养（牛文涛等 2006）。M. C. Alvarez (1991) 提出通过取鱼类的尾鳍进行原代培养获得成纤维细胞制备染色体的方法，尽管该方法对鱼损伤很小，一个样品还可重复取样或进行其他研究，但细胞培养的操作要求严格，实验条件要求也较高，并不是每次或每个物种的细胞培养都能成功，且时间跨度较长，数天或者数周，不利于该项技术的推广。

本实验剪取波纹唇鱼的尾鳍，旨在保证鱼的正常存活，并使实验仍然能够进展顺利。但剪取新鲜的尾鳍为材料时中期分裂相并不多，且中期分裂相染色体分散效果不佳，不适合进行计数分析，说明尾鳍组织本身的分裂指数不高。剪鳍后的第 2 至第 3 天，所剪部位伤口愈合并增生出灰白色的组织，取增生组织再用同样的处理方法制备染色体滴片，则可获得足够多的分散良好的中期分裂相染色体，且染色体形态和轮廓清晰。本实验说明尾鳍伤口愈合增生组织的细胞分裂增生旺盛，适合用于染色体核型分析。但第 4 天后的愈合增生组织的增生速度明显下降，已不再适合用于制备染色体。本实验证明波纹唇鱼尾鳍的愈合增生组织是染色体制备的良好材料，但并不是所有的鱼类在采用鳍条制作染色体滴片时都需要愈合增生组织，作者 2005 年在制作半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis* Günther) 染色体滴片时发现，直接剪取的鳍条边缘本身就富含分裂增生旺盛的细胞，李鹏飞等 (2007) 借鉴半滑舌鳎染色体制备方法对漠斑牙鲆 (*Paralichthys lethostigma*) 染色体组型进行研究，也获得了充足的清晰可辨的中期分裂相染色体。而雷景涛 (2008) 在利用鱼鳍组织制备鱼类染色体标本时，需用剪刀将鱼鳍剪开一部分，形成较大创口，还需把鱼体放入含 0.01%秋水仙碱的 0.0375mol/L KCl 低渗液中游泳 4 h 左右，这些操作也很容易使实验鱼遭受死亡的威胁。本研究中，不论是直接剪取鳍条边缘还是剪鳍后的愈合增生组织，均对鱼体健康不会造成严重伤害，或者基本上不影响鱼体的健康状况，整个过程操作简便，可在实验基地或生

产单位随时开展。鳍条组织制备染色体的方法除应用到常见鱼类品种外,还可借鉴到鱼类品种不易获得或珍贵的濒危类物种的染色体制备及核型研究中。

霍蕊(2009)通过比较已知的隆头鱼科唇鱼亚科鱼类染色体数目及染色体类型,认为波纹唇鱼在隆头鱼科中属于较为特化的类群,但在唇鱼亚科中则属于较原始的类群。本文结果表明波纹唇鱼染色体有3对中部着丝粒染色体,5对亚中部着丝粒染色体,16对亚端部着丝粒染色体,1对端部着丝粒染色体,在唇鱼亚科中应属于中上等进化类群,与上述结论稍有出入。在臂比值的测量过程中,我们发现染色体类型介于亚端部和端部的不少,例如:9、11、12、14、15、16号,尤其是21号。在不同的中期分裂相中,大小相似的染色体形态差异较大,在一个分裂相中表现为端部着丝粒染色体,染色体臂细长,而在另一个分裂相中表现为亚端部着丝粒,染色体臂粗短,亦有相反的情况,即表现为亚端部着丝粒,但染色体臂细长,或表现为端部着丝粒,但染色体臂粗短,致使统计结果标准差离散大,这是一个非常有趣的现象,可能与不同操作批次中秋水仙素浓度或处理时间不同有关,还可能是鱼的个体间差异,但具体原因还需进一步实验论证。

本实验仅为一种方法的摸索及核型的初步分析,如需彻底了解波纹唇鱼的染色体组成及其性别逆转的原因,除了要进行大规模的染色体计算和统计分析外,还应该辅之于分子生物学研究,然而因为过度捕捞,波纹唇鱼已经濒临绝种。因为所取波纹唇鱼的尾数有限,且都是一龄鱼,均表现为生理上的雌性,本次分析结果实验尚不能确定波纹唇鱼是否有异型性染色体的存在。另外,我们对波纹唇鱼的许多生物学特征(如转变性别)了解甚少,在采取措施保护该物种的同时还应该抓紧时间对该物种的生物学特征、繁殖习性、生态特征等方面进行系统研究,以期将来能改变波纹唇鱼处于人工养殖实验阶段不具备供应市场能力的现状。

### 参 考 文 献

十大濒临灭绝生物名单,百科知识,2005(6):2,67

于宏,雷霖霖,陈超,高淳仁,刘新富.波纹唇体生物学特性及繁育保护初步研究.全国海水养殖学术研讨会论文摘要集,2008:68

于宏,陈超,雷霖霖,高淳仁,陈国华,陈宏.波纹唇体(苏眉)养殖技术的初步研究.全国海水养殖学术研讨会论文摘要集,2008:69

牛文涛,蔡泽平.中国海水鱼类核型研究概述,厦门大学学报(自然科学版),2006,45(增

刊 2), 125 ~ 131

区又君, 齐旭东, 李加儿. 波纹唇鱼不同组织 5 种同工酶表达的差异. 南方水产, 2009, 5(2): 51-55

成庆泰, 郑葆珊. 中国鱼类系统检索. 科学出版社. 1987

李鹏飞, 刘 萍, 柳学周. 漠斑牙鲆染色体组型研究, 海洋水产研究, 2007, 28(4): 26 ~ 30

杨效文, 张素芳, 张孝羲. 不同寄主植物上烟蚜的染色体组型研究. 应用与环境生物学报, 2000, 6(1): 56 ~ 60

朱东发, 王春林, 李志强. 三疣梭子蟹核型分析. 水产学报, 2005, 29(5): 649 ~ 653

周丽青, 杨爱国, 柳学周, 杜 伟, 庄志猛. 半滑舌鳎染色体的核型分析. 水产学报. 2005, 29(3): 417 ~ 419

雷景涛. 利用鱼鳍组织制备鱼类染色体标本, 河北渔业, 2008(12)(总第 180 期): 17, 59

霍 蕊, 张 本, 陈国华, 尹绍武, 王世锋, 齐兴柱. 波纹唇鱼染色体核型分析, 海洋科学, 2009, 33(4): 94 ~ 97

Donaldson TJ, Sadovy Y. Threatened fishes of the world: *Cheilinus undulatus* Ruppell, 1835 (Labridae). Environ. Biol. Fish. 2001, 62:428

Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia. Proceedings of the Workshop on Aquaculture of Coral Reef Fishes and Sustainable Reef Fisheries, Network of Aquaculture Centres in Asia, Bangkok, 1996: 53-59.

Levan A, Fredga K, Sandberg A A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes[J]. Hereditas, 1964, 52(2): 201 ~ 220

M . C . Alvarez, 尤锋. 海水和淡水鱼类细胞短期培养制备染色体的技术, 国外水产, 1994(3): 34 ~ 36 (尤锋译自《Journal of Fish Biology》, 1991, 39(6): 817 ~ 824)

Sadovy Y, Kulbicki M, Labrosse P, Letourneur Y, Lokani P, Donaldson TJ. The humphead wrasse, *Cheilinus undulatus*: synopsis of a threatened and poorly known giant coral reef fish. Rev. Fish. Biol. Fish., 2003a, 13: 327-364

Sluka RD. Grouper and Napoleon wrasse ecology in Laamu atoll, Republic of Maldives: Part 1. Habitat, behaviour and movement patterns. Atoll. Res. Bull. 2000, 491: 26