

DOI: 10.12264/JFSCJFSC2020-0539

青石斑鱼(♀)×蓝身大斑石斑鱼(♂)杂交后代及其父母本群体的染色体核型分析

陈帅^{1,2,3}, 田永胜^{1,2}, 成美玲¹, 李振通^{1,3}, 李子奇^{1,3}, 黎琳琳^{1,4}, 王林娜^{1,2}, 王晓梅⁵

1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071;
2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071;
3. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;
4. 中国农业科学院, 北京 100081;
5. 莱州明波水产有限公司, 山东 莱州 261400

摘要: 为了探究杂交后代与双亲染色体组型的差异, 证明青石斑鱼(*Epinephelus awoara*)和蓝身大斑石斑鱼(*Epinephelus tukula*)杂交在染色体水平上的可行性, 以及建立石斑鱼外周血淋巴细胞培养制备染色体制片技术, 本研究以 4 月龄和 16 月龄青石斑鱼(♀)×蓝身大斑石斑鱼(♂)杂交后代、4 月龄母本后代和父本为实验材料, 通过头肾-秋水仙素法和外周血细胞培养法制备染色体制片, 经油镜观察和分裂相统计, 结果表明青石斑鱼的染色体数目为 $2n=48$, 占比 91.00%, 核型公式为 $2n=48t$, $NF=48$; 蓝身大斑石斑鱼具两个亚中部着丝粒染色体, 染色体数目为 $2n=48$, 占比 82%, 核型公式为 $2n=2sm+46t$, $NF=50$, 臂比为 1.76 ± 0.11 ; 杂交后代(*E. AT*)具一个亚中部着丝粒染色体, 染色体数目为 $2n=48$, 占比 78%, 核型公式为 $2n=1sm+47t$, $NF=49$, 臂比为 1.75 ± 0.29 。同时, 本研究对 4 尾 16 月龄杂交后代鱼的性腺进行组织切片, 观察发现所有个体性腺中具有大量卵母细胞, 杂交后代均为雌性, 初步说明杂交后代所具有的异形染色体与性别无关, 推断异形染色体形成的原因是父本提供了 23 条端部着丝粒染色体和 1 条亚中部着丝粒染色体, 母本提供了 24 条端部着丝粒染色体。研究结果为石斑鱼杂交后代异形染色体发生、遗传变异, 以及杂交后代性状选育和种质改良提供了丰富的资料。

关键词: 青石斑鱼; 蓝身大斑石斑鱼; 杂交后代; 染色体核型; 异形染色体; 性腺切片

中图分类号: S961

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2021)08-0988-13

青石斑鱼(*Epinephelus awoara*)俗名土斑, 在分类学上隶属于鲈形目(Perciformes)、鲷科(Serranidae)、石斑鱼属, 是一种栖息在海洋暖水性中下层的名贵鱼类, 当年生长可达到 120 g 以上, 在市场上养殖总量相对较少^[1]。蓝身大斑石斑鱼(*Epinephelus tukula*)俗名为金钱斑, 也属石斑鱼

属, 是已知最大的石斑鱼之一, 生长速度快, 成年鱼体长可达 150 cm, 体重可达 90 kg^[2]。青石斑鱼味道鲜美, 市场价格和利润较高; 蓝身大斑石斑鱼生长速度较快, 第一年体重可增至 2 kg, 两年后体重超过 4 kg^[1,3]。本研究通过精子冷冻和人工授精技术, 实现了二者的杂交育种, 获得了正常发

收稿日期: 2020-11-26; **修订日期:** 2021-01-15.

基金项目: 山东省重点研发计划项目(2019GHY112063); 山东省良种工程项目(2019LZGC020); 山东省泰山产业领军人才工程, 烟台市高端人才引进“双百计划”项目; 中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2020XT0601); 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费项目(20603022019002; 20603022018019).

作者简介: 陈帅(1997-), 男, 硕士研究生, 主要从事水产遗传育种与繁殖研究. E-mail: fisherman923@163.com

通信作者: 田永胜, 博士, 研究员, 研究方向为鱼类种质冷冻保存及遗传育种. E-mail: tianys@ysfri.ac.cn

育的杂交种(*E. AT*), 杂交种在存活率和生长速度上具有明显的杂种优势, 在 13 月龄时 *E. AT* 的体重为 (408.72 ± 71.46) g, 而纯种仅为 (129.25 ± 41.11) g, 杂交种体色、体型也与母本相似^[4], 具有较好的养殖前景。但目前仅见此杂交种骨骼发育的报道^[4], 未见其他相关研究。

染色体研究对于研究鱼类的杂交育种、遗传变异以及性别决定等都具有重要意义。对杂交后代的染色体进行研究还可以为杂交育种提供基本资料, 明确杂交种的进化地位^[5-6]。同时, 杂交鱼具有生长快、抗逆强等杂种优势, 对杂交后代的染色体研究也是探究杂种优势遗传学基础的关键途径之一。目前对棕点石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交子代(*E. fuscoguttatus*♀×*E. lanceolatus*♂)^[7]、云纹石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交子代(*E. moara*♀×*E. lanceolatus*♂)^[8]和棕点石斑鱼♀×蓝身大斑石斑鱼♂杂交子代(*E. fuscoguttatus*♀×*E. tukula*♂)^[9]均开展了染色体研究, 而 *E. AT* 为新杂交种, 对其染色体核型的研究还未有报道。此外, 虽然青石斑鱼及蓝身大斑石斑鱼的核型已有报道^[10-12], 但在鱼类中存在较多的染色体多态现象^[13], 因此仍需制备 *E. AT* 父母本群体的染色体核型进行分析。

国内外已通过头肾-秋水仙素法对赤点石斑鱼(*E. akaara*)^[10,14]、鲑点石斑鱼(*E. fario*)^[15-16]、鞍带石斑鱼(*E. lanceolatus*)^[17-18]、云纹石斑鱼(*E. moara*)^[19-21]等 28 种石斑鱼进行了染色体标本的制作, 该方法虽然较为成熟简单, 但需要解剖鱼获取头肾, 在种鱼和珍稀鱼类上实施代价高。而通过外周血淋巴细胞培养法制备染色体可将鱼体的伤害程度降至最低, 但是难度较高。采用此方法制备鱼类染色体的研究并不普遍, 目前仅在半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)^[22]、鲤(*Cyprinus carpio*)^[23]、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[24]、花鲈(*Lateolabrax saponicus*)^[25]、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[26]等鱼类中成功制备染色体制片。通过外周血淋巴细胞培养法制备染色体, 不同的鱼种所需的植物血细胞凝集素(PHA)浓度、秋水仙素浓度、低渗温度等条件不同, 这些条件都会影响中期分裂相的最终形态。

本研究通过头肾-秋水仙素方法制备了 *E. AT*、

青石斑鱼和蓝身大斑石斑鱼的染色体核型, 旨在探究杂交后代与双亲染色体组型的差异, 证明青石斑鱼和蓝身大斑石斑鱼杂交在染色体水平上的可行性, 以及为进一步研究石斑鱼杂交育种的遗传变异机理提供基本资料。此外, 本研究通过摸索蓝身大斑石斑鱼外周血淋巴细胞培养制备染色体的条件, 旨在建立较为成熟的石斑鱼外周血细胞培养制备染色体制片技术, 为石斑鱼核型研究提供方法。

1 材料与方法

1.1 亲鱼精子、卵子的获取和人工授精

选择在工厂化养殖环境中培育的体长 50~70 cm, 体重 20~30 kg 的雄性蓝身大斑石斑鱼, 在水温达到 25~26 °C 时, 挤压腹部采集精液, 之后将精液与冷冻稀释液 ELs-3 以 1:1 比例稀释, 摇晃混匀。ELs-3 的配方为: 1 L 蒸馏水中含葡萄糖 10 g, NaCl 10 g, NaHCO₃ 0.5 g, 小牛血清 100 mL(北京索莱宝科技有限公司)。之后将装有精子的冷冻管在 4 °C 冰箱中平衡 5 min, 然后放入 10 cm×10 cm 的布袋中, 将布袋放在离液氮表面约 10 cm 的液氮罐蒸汽中平衡 10 min; 最后将布袋投入液氮(-196 °C)中冷冻保存^[27]。青石斑鱼卵子从福建省漳浦市某水产养殖场采集, 亲鱼体长 20~25 cm, 体重 0.5~1.0 kg。当水温达 23~26 °C 时, 用 MS-222 (百灵威科技有限公司)麻醉选定的雌鱼, 将绒毛膜促性腺激素(HCG, 200~300 IU/kg)和促性腺激素释放激素类似物(LHRH-A, 35 µg/kg)注入胸鳍基部。注射 48~60 h 后挤压鱼的腹部获得卵子。青石斑鱼的精子也从此养殖场获得, 用 MS-222 麻醉, 然后挤压腹部获得精液。

卵子挤出后, 分别将新鲜的青石斑鱼精子和解冻后的蓝身大斑石斑鱼冷冻精子倒入装有卵子的塑料盆中, 加入高盐度海水(盐度 33~35)收集上浮卵, 15 h 后, 再次收集上浮受精卵并打包空运至所在公司, 到达后将纯种和杂交种的受精卵转移到 7 m³ 的养殖池中培育, 每池约 40 g, 二者培育条件相同, 盐度 29~30, 温度 25~27 °C, 溶解氧 6~10 mg/L。

1.2 实验鱼的获得

实验鱼取自山东省莱州明波水产有限公司。

随机选取青石斑鱼和 *E. AT* 各 10 尾通过头肾-秋水仙素法制作染色体制片, 体重分别为每尾 10~19 g 和 10~13 g; 选取 4 条 16 月龄的 *E. AT* (体重 400~510 g) 通过头肾-秋水仙素法制备染色体制片和性腺切片, 分析核型。此外, 选择 6 尾蓝身大斑石斑鱼, 体重 20~25 kg, 体长 50~70 cm, 通过外周血细胞培养法制备染色体制片, 分析核型。

1.3 头肾-秋水仙素法制备染色体

1.3.1 注射植物血细胞凝集素(PHA)和秋水仙素 实验采用对 PHA 体内注射法修改后的步骤^[28]。向实验鱼胸腔内注射 PHA 溶液(北京索莱宝科技有限公司), 剂量为 6 $\mu\text{g/g}$ 。12 h 后, 向其胸腔同一位置内注射秋水仙素溶液(上海吉至生化科技有限公司), 剂量为 10 $\mu\text{g/g}$ 。

1.3.2 制备肾细胞悬液 3 h 后, 利用 MS-222 (180 mg/L) 将实验鱼麻醉, 用剪刀从臀鳍基部斜向上剪至出血, 放血 10 min 后取出头肾, 并用生理盐水洗涤。用剪刀将头肾完全剪碎, 通过 260 目筛绢过滤, 收集等量过滤液于两个离心管中。4 月龄的青石斑鱼和 *E. AT* 为分别混合制备肾细胞悬液, 16 月龄的 *E. AT* 为每尾单独制备肾细胞悬液。

1.3.3 低渗处理 向细胞悬液各加入 3 mL 0.075 mol/L 的 KCl 溶液, 34 $^{\circ}\text{C}$ 低渗处理 30 min, 并用吸管轻轻吹打沉淀细胞。

1.3.4 预固定 向细胞悬液中加入新配制的卡诺氏固定液($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{冰醋酸}}=3:1$), 补充至 4.5 mL, 并放置在 0 $^{\circ}\text{C}$ 冰盒内, 预固定 10 min。

1.3.5 固定 将预固定后的细胞悬液离心 10 min (4000 r/min)。倒去上清液, 加卡诺氏固定液至 4.5 mL, 并用吸管轻轻吹打沉淀细胞, 室温下固定 45 min; 再次离心后, 进行第 2 次固定, 室温下固定 30 min; 再次离心后, 进行第 3 次固定, 室温下固定 30 min, 固定过程中用吸管轻轻吹打沉淀细胞。第 4 次离心后, 向细胞沉淀中加入 1 mL 左右卡诺氏固定液, 放入冰盒中待用。

1.3.6 滴片及染色 采用冷片法滴片, 取干净载玻片(已在盛有无水乙醇的烧杯中预冷 30 min), 吸取细胞悬液并从 15~20 cm 的高度在载玻片上滴 1~2 滴, 使细胞铺展开, 用酒精灯使载玻片燃起火焰使细胞固定在玻片上, 室温下自然晾干,

晾干后用 10% 吉姆萨染液染色 45 min, 之后用蒸馏水冲洗, 在室温下自然干燥。

1.4 外周血细胞培养法制备染色体

1.4.1 分装培养基 预先将 RPMI 1640 完全培养基(武汉普诺赛生命科技有限公司)在无菌操作台上分装到 3 个密封细胞培养瓶中, 每瓶加 3 mL 完全培养基和 0.1 mL 质量浓度为 0.1 mg/mL 的 PHA, 在实验前放 26.5 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中预热。

1.4.2 取血 用 75% 乙醇消毒抽血处, 用 0.2 mL 的 500 U/mL 肝素钠溶液润湿针管, 从尾部抽取约 1 mL 血液, 摇匀避免凝血。之后将针管和针头用 75% 乙醇消毒, 盖上针管。

1.4.3 培养细胞 在无菌操作台中, 弃去针管内先滴出的 1~2 滴血液, 然后向 3 mL 细胞培养瓶中加入 0.2 mL 的血液, 盖好瓶盖并摇匀。装有血液和培养基的细胞培养瓶置于 26.5 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中培养 72 h (每 12 h 摇动一次培养瓶)。在收获前 3 h 加入 0.1 mL 浓度为 0.12 mg/mL 的秋水仙素。

1.4.4 收集细胞 摇动培养瓶使所有细胞悬浮在培养瓶中, 将所有细胞悬液倒入 50 mL 离心管中, 轻轻吹打均匀, 1000 r/min 离心 10 min, 轻轻吸出上清, 仅留 0.5 mL 上清液及细胞沉淀。

1.4.5 低渗 加入预热 34 $^{\circ}\text{C}$ 的低渗液(0.075 mol/L) 7 mL, 轻轻吹打沉淀使其形成细胞悬液, 在 34 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中低渗 30 min。

1.4.6 预固定 向细胞液中加入新配制的 3.5 mL 卡诺氏固定液($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{冰醋酸}}=3:1$), 并放置在 0 $^{\circ}\text{C}$ 的冰盒内, 预固定 10 min, 4000 r/min 离心 10 min。

1.4.7 固定 将预固定后的细胞悬液离心 10 min (4000 r/min)。倒去上清液, 加卡诺氏固定液至 4 mL, 并用吸管轻轻吹打沉淀细胞, 室温下固定 15 min; 再次离心后, 进行第 2 次固定, 室温下固定 30 min; 再次离心后, 进行第 3 次固定, 室温下固定 30 min, 固定过程中用吸管轻轻吹打沉淀细胞。第 4 次离心后, 向细胞沉淀中加入 2~3 mL 卡诺氏固定液, 放入冰盒中待用。

1.4.8 滴片及染色 滴片及染色与 1.3.6 相同。

1.5 核型分析

在显微镜下对青石斑鱼、蓝身大斑石斑鱼和 *E. AT* 各选取 100 个分散良好、图像清晰的中期分

裂相,并统计染色体数目(图 1)。用 Nikon80i 显微镜油镜观察并拍照。对青石斑鱼、蓝身大斑石斑鱼和 *E. AT* 的核型各选取 5 个形态清晰、着丝点清楚、分散效果良好的中期分裂相。利用 AJ-VERT 和 Photoshop 软件的测量以及处理图片功能,分别测量染色体相对长度、长臂和短臂相对长度,对相对长度相近、着丝点类型相同的染色体进行配对,再将配对好的染色体进行分类、排列组型,用 Excel 软件对青石斑鱼、蓝身大斑石斑鱼和 *E. AT* 的染色体核型的各参数进行统计整理。染色体相对长度=(每条染色体长度/染色体组总长)×100,臂指数=长臂长度/短臂长度。根据着丝点所在位置以及臂指数进行染色体类型划分^[29]。

1.6 性腺切片的制备和观察

杂交后代个体经称重、测量体长后解剖获得性腺,立即放入波恩氏液中固定,经 24 h 固定后取出经 75%、85%、95%乙醇和无水乙醇梯度脱水、二甲苯透明后用石蜡包埋,用切片机连续切片,然后用苏木精-伊红(HE)染色,最后用中性树胶封片。用 Nikon80i 正置显微镜进行观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 染色体数目

选取 100 个分散良好、形态清晰的青石斑鱼细胞的染色体中期分裂相,经观察统计,染色体数目为 43~48 条,其中 48 条染色体出现的频率最高,占比为 91%(表 1),表明青石斑鱼二倍体染色体众数是 48,即 $2n=48$ 。选取 100 个不同个体的分散良好、形态清晰、数目完整的蓝身大斑石斑鱼细胞的染色体中期分裂相,经观察统计,染色体数目为 44~49 条,其中 48 条染色体出现的频率最高,其所占比例为 82%(表 1),表明蓝身大斑石斑鱼细胞的二倍体染色体众数是 48,即 $2n=48$ 。选取 100 个不同个体的分散良好、形态清晰、数目完整的 *E. AT* 细胞的染色体中期分裂相,经观察统计,染色体数目为 44~49 条,其中 48 条染色体出现的频率最高,其所占比例为 78%(表 1),表明杂交后代 *E. AT* 的二倍体染色体众数是 48,即 $2n=48$ 。

2.2 染色体组组成

分别对青石斑鱼、蓝身大斑石斑鱼和杂交后

表 1 青石斑鱼、蓝身大斑石斑鱼和杂交后代 (*E. AT*)的染色体数目统计

Tab. 1 Counts of the chromosomes in *Epinephelus awoara*, *Epinephelus tukula* and hybrid *Epinephelus awoara* (♀) × *Epinephelus tukula* (♂) (*E. AT*)

物种 species	染色体数目 number of chromosome						
	43	44	45	46	47	48	49
青石斑鱼 <i>E. awoara</i>	1	1	0	2	5	91	0
蓝身大斑石斑鱼 <i>E. tukula</i>	0	1	2	7	6	82	2
杂交后代 <i>E. AT</i>	0	3	2	6	8	78	3

代的 5 个中期分裂相进行镜检,并统计染色体的相对长度、臂比以及染色体类型(图 1,表 2)。在青石斑鱼、蓝身大斑石斑鱼和杂交后代细胞中没有观察到多倍体的存在。根据染色体的相对长度、着丝点位置,青石斑鱼的核型公式为 $2n=48, 48t, NF=48$; 蓝身大斑石斑鱼的核型公式为 $2n=48, 2sm+46t, NF=50$; 杂交后代 48 条染色体中有一条为亚中部着丝粒染色体(sm),其余全为端部着丝粒染色体(t),核型公式为 $2n=48, 1sm+47t, NF=49$ 。

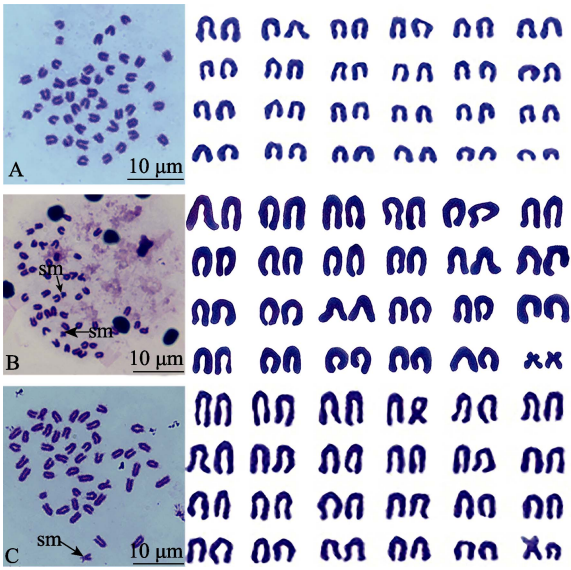


图 1 青石斑鱼、蓝身大斑石斑鱼和杂交后代(*E. AT*)中期分裂相及核型

A. 青石斑鱼; B. 蓝身大斑石斑鱼; C. 杂交后代(*E. AT*).

Fig. 1 The chromosomal metaphase and karyotypes of *Epinephelus awoara*, *Epinephelus tukula* and hybrid *Epinephelus awoara* (♀) × *Epinephelus tukula* (♂) (*E. AT*)
A. *E. awoara*; B. *E. tukula*; C. *E. AT*.

2.3 性腺切片

结果显示 4 尾杂交个体全为雌性(图 2),大部

表 2 青石斑鱼、蓝身大斑石斑鱼和杂交后代的染色体相对长度和臂比
Tab. 2 The relative length and arm ratio of chromosomes of *Epinephelus awoara*, *Epinephelus tukula* and hybrid *Epinephelus awoara* (♀) × *Epinephelus tukula* (♂) (*E. AT*)

编号 No.	青石斑鱼 <i>E. awoara</i>			蓝身大斑石斑鱼 <i>E. tukula</i>			杂交后代 <i>E. AT</i>		
	相对长度 relative length	臂比 arm ratio	类型 type	相对长度 relative length	臂比 arm ratio	类型 type	相对长度 relative length	臂比 arm ratio	类型 type
1	5.14±0.18	∞	t	5.20±0.12	∞	t	5.32±0.02	∞	t
2	4.91±0.05	∞	t	5.04±0.04	∞	t	5.01±0.10	∞	t
3	4.80±0.07	∞	t	4.89±0.06	∞	t	4.90±0.12	∞	t
4	4.68±0.05	∞	t	4.77±0.05	∞	t	4.77±0.07	∞	t
5	4.62±0.06	∞	t	4.69±0.03	∞	t	4.64±0.05	∞	t
6	4.57±0.04	∞	t	4.64±0.07	∞	t	4.54±0.03	∞	t
7	4.52±0.05	∞	t	4.51±0.06	∞	t	4.47±0.02	∞	t
8	4.44±0.07	∞	t	4.44±0.03	∞	t	4.43±0.02	∞	t
9	4.41±0.09	∞	t	4.36±0.04	∞	t	4.36±0.02	∞	t
10	4.35±0.07	∞	t	4.28±0.05	∞	t	4.31±0.02	∞	t
11	4.28±0.05	∞	t	4.22±0.03	∞	t	4.27±0.02	∞	t
12	4.24±0.05	∞	t	4.15±0.04	∞	t	4.23±0.03	∞	t
13	4.20±0.04	∞	t	4.10±0.05	∞	t	4.16±0.06	∞	t
14	4.15±0.05	∞	t	4.07±0.09	∞	t	4.12±0.07	∞	t
15	4.10±0.06	∞	t	4.04±0.07	∞	t	4.06±0.07	∞	t
16	4.06±0.06	∞	t	3.96±0.02	∞	t	4.01±0.05	∞	t
17	3.97±0.11	∞	t	3.90±0.12	∞	t	3.94±0.05	∞	t
18	3.88±0.08	∞	t	3.86±0.03	∞	t	3.89±0.05	∞	t
9	3.84±0.09	∞	t	3.82±0.04	∞	t	3.80±0.04	∞	t
20	3.76±0.08	∞	t	3.72±0.07	∞	t	3.71±0.08	∞	t
21	3.57±0.12	∞	t	3.63±0.09	∞	t	3.61±0.08	∞	t
22	3.44±0.08	∞	t	3.50±0.09	∞	t	3.46±0.06	∞	t
23	3.22±0.14	∞	t	3.27±0.08	∞	t	3.26±0.08	∞	t
24	2.86±0.17	∞	t	2.94±0.08	1.76±0.11	sm	3.58±0.33	1.75±0.29	sm
							2.51±0.11	∞	t

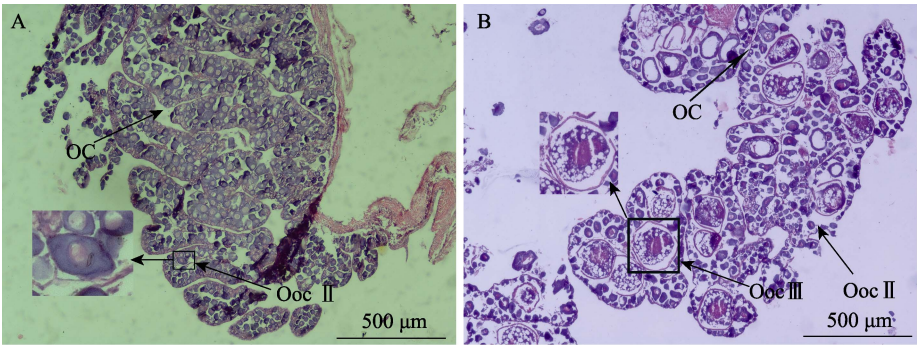


图 2 16 月龄青石斑鱼(♀)×蓝身大斑石斑鱼(♂)杂交后代(*E. AT*)性腺发育状态
A. 卵母细胞全部处于第Ⅱ时相; B. 卵母细胞部分处于第Ⅲ时相; OC: 卵巢腔; Ooc Ⅱ: 第Ⅱ时相卵母细胞; Ooc Ⅲ: 第Ⅲ时相卵母细胞。
Fig. 2 Gonadal development of 16 months old hybrid *Epinephelus awoara* (♀) × *Epinephelus tukula* (♂) (*E. AT*)
A. All oocytes are in phase Ⅱ; B. Some oocytes are in phase Ⅲ; OC: ovarian cavity; Ooc Ⅱ: phase Ⅱ oocyte; Ooc Ⅲ: phase Ⅲ oocyte.

分发育至初级卵母细胞的第Ⅱ和第Ⅲ时相,第Ⅱ时相时卵原细胞略呈多角椭圆形或长椭圆形,处于小生长期,胞质含量多,为紫红色,在细胞质中出现卵黄核;第Ⅲ时相时卵母细胞明显增大,大致呈圆形,正在向大生长期过渡,胞质颜色变浅,出现较大脂肪滴。这符合石斑鱼雌雄同体、先雌后雄的生理特征,因此异形染色体与性别无关。

3 讨论

3.1 杂交后代染色体多态性

目前国内外已经对 28 种石斑鱼的染色体核型做了研究,石斑鱼的二倍体染色体数目都为 48,即 $2n=48$,因此可认为石斑鱼属基本二倍体染色体数目为 48^[13]。其中 $2n=48t$ 的原始类群有 15 种,

占比 53.57%。这与其他海水鱼类的染色体特征相似,即端部、亚端部着丝粒较多,而中部、亚中部着丝粒相对较少^[30]。石斑鱼染色体中的核仁组织区或者目测观察到具次缢痕的几乎全在第 24 对染色体上,这也是石斑鱼属鱼类的一个细胞遗传学特征。现有研究已发现 7 种石斑鱼具有染色体多态性(表 3),染色体多态现象在其他鱼类上也经常出现,1989 年统计的中国淡水鱼类在染色体组型上存在差异的种类有 47 种^[13],2007 年统计的中国海水鱼类在染色体组型上存在差异的种类共有 9 种^[30]。随着人们对越来越多的鱼类染色体核型进行研究,具有染色体多态性的鱼类会被逐渐发现。表 3 对部分具此现象的鱼类进行了统计。

目前对于染色体多态现象的解释为地理隔

表 3 鱼类染色体多态现象
Tab. 3 Chromosome polymorphism in fish

种名 species name	核型(染色体个数) karyotype (number of chromosome)	取样地点 sampling location	参考文献 reference
赤点石斑鱼 <i>Epinephelus akaara</i>	$2n=4st+44t$ (48)	广东大亚湾水产试验中心 厦门第八市场	[14]
	$2n=2sm+8st+38t$ (48)		[10]
鲑点石斑鱼 <i>E. fario</i>	$2n=3m+11sm+34t$ (48)	湛江水产学院 湛江沿海	[15]
	$2n=4m+6sm+4st+34t$ (48)		[16]
拟青石斑鱼 <i>E. fasciatus</i>	$2n=48t$ (48)	厦门第八市场 湛江硇洲	[31]
	$2n=1st+47t$ (48)		[10]
鞍带石斑鱼 <i>E. lanceolatus</i>	$2n=4st+44t$ (48)	厦门 广东省大亚湾 水产试验中心附近海域	[17]
	$2n=2sm+6st+40t$ (48)		[18]
云纹石斑鱼 <i>E. moara</i>	$2n=2st+46t$ (48)	厦门市渔市场	[19]
	$2n=4sm+44t$ (48)	厦门第八农贸市场	[20]
	$2n=6sm+42t$ (48)	日本东京湾海域	[21]
蓝身大斑石斑鱼 <i>E. tukula</i>	$2n=48t$ (48)	广东省海洋渔业试验中心 海南	[12]
	$2n=2sm+46t$ (48)		本研究 this study
棕点石斑鱼 <i>E. fuscoguttatus</i>	$2n=48t$ (48)	广东大亚湾水产试验中心 海南省海口市东门市场	[18]
	$2n=2sm+46t$ (48)		[32]
斜带髯鲷 <i>Haplogerys nitens</i>	$2n=2m+8sm+2s+36t$ (48)	青岛近海	[33]
	$2n=4m+8sm+6st+28t$ (46)	厦门第八菜市场	[34]
大泷六线鱼 <i>Hexagrammus otakii</i>	$2n=6m+8sm+12st+22t$ (48)	大连獐子岛	[35]
	$2n=6m+20sm+16st+6t$ (48)	青岛近海	[36]
	$2n=6m+16sm+20st+6t$ (48)	青岛近海	[33]
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	$2n=48t$ (48)	厦门火烧屿	[37]
	$2n=24st+24t$ (48))	宁波	[38]
	$2n=48t$ (48)	福建省官井洋海区	[39]
	$2n=6st+42t$ (48)	连江县	[40]
	$2n=6m+6sm+ 36t$ (48)	舟山市	[40]
	$2n= 2sm+46t$ (48)	舟山市	[40]
		厦门火烧屿	[41]

(待续 to be continued)

(续表 3 Tab. 3 continued)

种名 species name	核型(染色体个数) karyotype (number of chromosome)	取样地点 sampling location	参考文献 reference
许氏平鲷 <i>Sebastes schlegeli</i>	2n=2m+2sm+44t (48)	大连獐子岛	[35]
	2n=2m+46t (48)	青岛近海	[36]
	2n=2m+46t (48)	青岛近海	[33]
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	2n=20m+24sm+4st(92)	湖南浏阳乌龙渔场	[42]
	2n=22m+24sm+2st (94)	珠江大学城江段	[43]
	2n=18m+22sm+8st (88)	贵州省平塘县	[44]
纹缟虾虎鱼 <i>Tridentiger trigonocephalus</i>	2n=10m+28sm+st+4t (44)	浙江水产学院近滩	[45]
	2n=20m+12sm+12t (44)	大连黑石礁海滩	[46]
银白鱼 <i>Anabarilius alburnops</i>	2n=12m+24sm+12st (48)	滇池	[47]
	2n=14m+20sm+14st (48)	杞麓湖	
团头鲂 <i>Megalobrama amblycephala</i>	2n=46m+20sm+12st (48)	北京市鱼场	[48]
	2n=26m+18sm+4s (48)	南京市水产良种场	[49]
	2n=18m+26sm+4st (48)	鄱阳湖	[50]
	2n=10m+30sm+8st (48)	河南省嵩县陆浑水库	[51]

离、实验方法不同及观测误差等原因^[21,40,45,47,52-53]。核型存在多样性的鱼类大多取自不同的地点,如云纹石斑鱼^[19-21]、大黄鱼^[38-45]、纹缟虾虎鱼^[45-46]、银白鱼^[47]等,可能不同地区物种为了适应不同的自然环境,在染色体层面发生了改变,继而将性状遗传给下一代。但是在对鲢点石斑鱼^[15-16]、鞍带石斑鱼^[17-18]、大黄鱼^[37,41]等的核型研究中,发现取自同一地点附近的样本也会出现染色体多态现象,本研究的蓝身大斑石斑鱼的染色体核型结果与已有报道^[12]不同(2n=48t, NF=48),但是取样地点相似,出现这种现象的原因多为研究人员未选择分散较好的中期分裂相,主观误差较大。综合分析认为,染色体多态现象产生的主要原因为同种自然隔离、亲缘相近物种之间的遗传物质交换、近缘种和远缘种间杂交等;同时,研究人员的观测误差也会导致最终染色体核型差异。

本研究开始时用 10 尾 4 月龄鱼的头肾混合制备染色体制片,结果发现杂交青石斑鱼有两种染色体核型:第一种核型不具异形染色体,占比 28.89%,核型公式为 2n=48t, NF=48;第二种具异形染色体,占比 71.11%;核型公式为 2n=1sm+47t, NF=49(未报道)。在后续的验证实验中,对每尾 16 月龄的 *E. AT* 单独制备染色体制片,发现对于同一尾鱼的中期分裂相,有时能观察到异形染色体,有时观察不到,而未观察到异形染色体的原因为

异形染色很小观察不清,核型分散不清晰。4 月龄 *E. AT* 的中期分裂相中观测到异形染色体的情况也是由于观察误差导致。因此,今后在核型研究中应尽可能明确实验鱼所在的原始水域,详细记录实验步骤,选择分散非常好及形态清晰的中期分裂相,以及每尾鱼单独制备,从而减少对染色体多态性分析的干扰,获得严谨准确的结果。

3.2 杂交后代异形染色体形成原因探究

本研究中作为母本的青石斑鱼的染色体核型为 2n=48, 48t, NF=48;作为父本的蓝身大斑石斑鱼的染色体核型为 2n=48, 2sm+46t, NF=50; *E. AT* 的染色体核型为 2n=48, 1sm+47t, NF=49。这与其他杂交后代染色体核型具有相似的特点,即杂交后代的染色体核型大多介于父母本核型之间或与父母本相似,如棕点石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交后代(*E. fuscoguttatus*♀×*E. lanceolatus*♂)^[7]、云纹石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交后代(*E. moara*♀×*E. lanceolatus*♂)^[8]、彩鲷(♂)×美洲虎鲷(♀)杂交后代(*Heros managuense*♀×*Cichlasoma trimaculatum*♂)^[54]、大口鲶(♀)×怀头鲶(♂)杂交后代(*Silurus meridionalis*♀×*S. soldatovi*♂)^[55]、小黄鱼(♀)×大黄鱼(♂)杂交后代(*Larimichthys polyactis*♀×*L. crocea*♂)^[56]、红鳍笛鲷(♀)与千年笛鲷(♂)杂交后代(*Lutjanus erythropterus*♀×*L. sebae*♂)^[57]等;也有较多杂交后代出现染色体缺失或三倍体现象,如马苏大麻哈鱼(♀)×虹鳟(♂)杂交后代(*Oncorhynchus*

masou♀×*O. mykiss*♂)^[58]、夏鲆(♀)×褐牙鲆(♂)杂交后代(*Paralichthys dentatus*♀×*P. olivaceus*♂)^[59]、赤眼鲮(♀)×鳙(♂)杂交子代(*Squaliobarbus curriculus*♀×*Aristichthys nobilis*♂)^[60]等。

目前在国内外报道的 28 种石斑鱼的染色体核型的研究中, 仅在拟青石斑鱼中发现异形染色体, 其核型为 $2n=1st+47t$ ^[10], 除此之外其余石斑鱼的染色体都为成对存在。本研究中青石斑鱼的染色体核型与前人的研究结果一致^[10-11], 而蓝身大斑石斑鱼的染色体核型与前人的结果不同^[12], 但 *E. AT* 的染色体核型以及其与父本相似的臂比从侧面验证了其父本核型应为 $2n=2sm+46t$ 。从杂交后代 *E. AT* 染色体核型推测, 父本提供了 23 条端部着丝粒染色体和 1 条亚中部着丝粒染色体, 母本提供了 24 条端部着丝粒染色体, 从而形成了异形染色体。这与王世锋^[10]对拟青石斑鱼异形染色体的成因推测相似, 即拟青石斑鱼可能是青石斑鱼和赤点石斑鱼在早期分化过程中杂交而形成的一个种, 保留了一条赤点石斑鱼的亚中部着丝粒染色体。但赤点石斑鱼的臂比与拟青石斑鱼相差较大, 且王云新等^[14]得到的赤点石斑鱼的核型无亚中部着丝粒染色体, 因此拟青石斑鱼异形染色体的形成原因仍待探究。

在国内外对鱼类的核型研究中, 异形染色体大多都与性别相关, 只在 10%左右的鱼类中发现性染色体^[61]。性别为 XX/XY 决定的鱼类较为常见, 如胡子鲇属(*Clarias*)^[62-64]、斑头鱼(*Agrammus agrammus*)^[65-66]; 性别由 ZZ/ZW 决定的鱼类有星康吉鳗(*Conger myriaster*)^[67]、大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)^[68]等; 性别由 ZO/ZZ 决定的鱼类有短颌鲚(*Coilia brachygnathus*)^[69]、刀鲚(*Coilia nasus*)^[70]等; 性别为 X1X1X2X2/X1X2Y 决定的鱼类有棘头梅童鱼(*Collichthys lucidus*)^[71]、五线笛鲷(*Lutjanus quinquelineatus*)^[72]、丝背细鳞鲷(*Stephanolepis cirrhifer*)^[73]等。而石斑鱼为雌雄同体, 雌性先熟, 并在达到一定年龄及大小时发生性逆转现象, 由雌性变为雄性^[74-76], 如浙江北部沿海青石斑鱼体长 250~340 mm 时, 雄鱼仅占总个体数的 6%~23%, 350 mm 时, 雄鱼占 50%左右, 370 mm 时, 雄鱼占 85%以上, 420 mm 以上几乎全是雄鱼^[77]。Ruiz^[78]在对雌

性、雄性以及间性细斑石斑鱼(*E. guttatus*)的染色体核型进行研究中发现, 不同性别的细斑石斑鱼染色体核型相同, 没有异形性染色体, 性别分化属基因水平, 还未达到染色体水平。本研究中 4 尾 *E. AT* 的性腺切片结果初步说明 *E. AT* 在性分化前全为雌性, 所以 *E. AT* 的异形染色体仅仅是因为父本为其提供了一个亚中部着丝粒染色体, 与性别无关。杂交种拥有与亲本不同的性状, 如珍珠龙胆石斑鱼和云龙石斑鱼都具有生长快等杂种优势^[79-80], 本研究中 *E. AT* 也在成活率和生长速度上具有杂种优势^[4]。虽然 *E. AT* 的异形染色体与性别无关, 但是其杂种优势与染色体之间存在何种关系仍需要继续探究, 从而为杂交石斑鱼优良性状选育, 新种质培育和遗传性状分析提供生物学基础。

参考文献:

- [1] Chen B, Luo H Z, Fu R B. Biological characteristics and artificial breeding techniques of *Epinephelus awoara*[J]. Shandong Fisheries, 2007, 24(2): 36-38. [陈波, 罗海忠, 付荣兵. 青石斑鱼生物学特性及其人工繁育技术[J]. 齐鲁渔业, 2007, 24(2): 36-38.]
- [2] Yeh S L, Dai Q C, Chu Y T, et al. Induced sex change, spawning and larviculture of potato grouper, *Epinephelus tukula*[J]. Aquaculture, 2003, 228(1-4): 371-381.
- [3] Zheng F, Han L N, Wang Y B, et al. Breeding techniques of broodstock in *Epinephelus argenteus*[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2016(14): 261, 270. [郑飞, 韩丽娜, 王永波, 等. 金钱斑亲鱼培育技术[J]. 现代农业科技, 2016(14): 261, 270.]
- [4] Chen S, Tian Y S, Li Z Q, et al. Metamorphosis and skeletal development of hybrid *Epinephelus awoara* (♀) and *Epinephelus tukula* (♂) progenies[J]. Aquaculture, 2021, 530: 735727.
- [5] Lou Y D. Progress of fish karyotype studies in China[J]. Journal of Fisheries of China, 1997, 21(S1): 82-96. [楼允东. 中国鱼类染色体组型研究的进展[J]. 水产学报, 1997, 21(S1): 82-96.]
- [6] Wang M L, Zheng J S, Zhu L Y, et al. Advances on karyotype study of marine fish and shellfish in China[J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 2000, 30(2): 277-284. [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(自然科学版), 2000, 30(2): 277-284.]
- [7] Liu L, Zhang Y, Chen C, et al. Preparation of chromosomes

- and analysis of karyotypes of hybrid F_1 (*Epinephelus fuscoguttatus*♀ × *Epinephelus lanceolatus*♂) groupers[J]. Progress in Fishery Sciences, 2016, 37(2): 33-40. [刘莉, 张岩, 陈超, 等. 棕点石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*♀)×鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*♂) F_1 染色体制备方法及其核型分析[J]. 渔业科学进展, 2016, 37(2): 33-40.]
- [8] Cheng M L, Tian Y S, Wu Y P, et al. Chromosome karyotype analysis of hybrids of *Epinephelus moara*♀ × *Epinephelus lanceolatus*♂[J]. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(2): 67-75. [成美玲, 田永胜, 吴玉萍, 等. 云纹石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交后代染色体核型分析[J]. 渔业科学进展, 2018, 39(2): 67-75.]
- [9] Wu Y P, Tian Y S, Li Z T, et al. Karyotype analysis of hybrids of *Epinephelus fuscoguttatus* (♀) × *Epinephelus tukula* (♂)[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2021, 41(1): 119-123. [吴玉萍, 田永胜, 李振通, 等. 棕点石斑鱼(♀)与蓝身大斑石斑鱼(♂)杂交子代核型分析[J]. 广东海洋大学学报, 2021, 41(1): 119-123.]
- [10] Wang S F. Comparative karyotype characterization and chromosomal evolution of six groupers[D]. Xiamen: Xiamen University, 2007. [王世锋. 六种石斑鱼核型特征比较和染色体进化研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2007.]
- [11] Hong M X, Yang J H. Studies on the karyotype of *Epinephelus awoara*[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 1988, 27(6): 714-715. [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.]
- [12] Liu S, Yang Y Q, Zhang H F, et al. The karyotype of *Epinephelus tukula*[J]. Marine Sciences, 2017, 41(12): 46-50. [刘苏, 杨宇晴, 张海发, 等. 蓝身大斑石斑鱼染色体核型分析[J]. 海洋科学, 2017, 41(12): 46-50.]
- [13] Yu X J, Zhou T, Li Y C, et al. Chromosomes of Freshwater Fishes in China[M]. Beijing: Science Press, 1989: 4-166. [余先觉, 周曦, 李渝成, 等. 中国淡水鱼类染色体[M]. 北京: 科学出版社, 1989: 4-166.]
- [14] Wang Y X, Wang H D, Zhang H F, et al. Karyotypes of *Epinephelus coioides* and *Epinephelus akaara*[J]. Journal of Zhanjiang Ocean University, 2004, 24(3): 4-8. [王云新, 王宏东, 张海发, 等. 斜带石斑鱼与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] Chen Y H, Rong S B, Liu S Q. Karyotype of *Epinephelus trimaculatus*[J]. Journal of Fujian Fisheries, 1990, 12(1): 23-25. [陈毅恒, 容寿柏, 刘绍琼. 鲑点石斑鱼的核型[J]. 福建水产, 1990, 12(1): 23-25.]
- [16] Zheng L, Liu C W, Li C L. Studies on the karyotype of 4 groupers[J]. Marine Sciences, 2005, 29(4): 51-55. [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(4): 51-55.]
- [17] Wang D X, Su Y Q, Wang S F, et al. Study on the karyotype of *Promicrops lanceolatus*[J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2003, 22(4): 465-468, 550. [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, 550.]
- [18] Shu H, Wei Q L, Luo L J, et al. Karyotypes analysis of four grouper fishes from coastal waters of Guangdong[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2012, 39(8): 124-127. [舒琥, 魏秋兰, 罗丽娟, 等. 广东沿海 4 种石斑鱼的染色体组型分析[J]. 广东农业科学, 2012, 39(8): 124-127.]
- [19] Guo F, Wang J, Su Y Q, et al. Study on the karyotype of *Epinephelus moara*[J]. Marine Sciences, 2006, 30(8): 1-3. [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.]
- [20] Guo M L. Comparative studies of *Epinephelus moara* and *Epinephelus bruneus*[D]. Xiamen: Xiamen University, 2009. [郭明兰. 云纹石斑鱼与褐石斑鱼的比较研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2009.]
- [21] Zhong S P, Chen C, Zhuang Z M. Chromosome karyotype of *Epinephelus moara* (Temminck & Schlegel 1842) of Tokyo Bay population[J]. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(5): 44-49. [钟声平, 陈超, 庄志猛. 日本东京湾云纹石斑鱼染色体核型研究[J]. 渔业科学进展, 2018, 39(5): 44-49.]
- [22] Zhang B, Wang X L, Yang C G, et al. Identification of the genetic sex of tonguefish (*Cynoglossus semilaevis*) by the method of peripheral blood lymphocytic cell cultivation and chromosome preparation[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2011, 35(3): 430-435. [张博, 王贤丽, 杨长庚, 等. 半滑舌鳎血淋巴细胞体外培养及其染色体制备在性别鉴定中的应用[J]. 水生生物学报, 2011, 35(3): 430-435.]
- [23] Geng B, Liang L Q, Sun X W. The search for the blood lymphocytic cell cultivation of the common carp and the preparation of chromosomes[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2003, 16(2): 32-34. [耿波, 梁利群, 孙效文. 鲤鱼血淋巴细胞培养及染色体制备条件探索[J]. 水产学杂志, 2003, 16(2): 32-34.]
- [24] Zhu X P, Lin M M, Li Z, et al. Search for peripheral blood lymphocytic cell cultivation and chromosome preparation in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Journal of Qingdao Agricultural University (Natural Science), 2007, 24(4): 253-256. [朱香萍, 林明敏, 李桢, 等. 牙鲆外周血淋巴细胞的培养及染色体制备条件的探讨[J]. 青岛农业大学学报(自然科学版), 2007, 24(4): 253-256.]
- [25] Sha Z X, Chen S L, Ye H Q, et al. Comparison of several chromosome preparation methods in sea perch *Lateolabrax saponicus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2003, 10(6): 469-473. [沙珍霞, 陈松林, 叶寒青, 等. 适合花鲈的几种染色体制备方法的比较[J]. 中国水产科学, 2003,

- 10(6): 469-473.]
- [26] Hartley S E, Horne M T. A method for obtaining mitotic figures from blood leucocyte cultures of rainbow trout, *Salmo gairdneri*[J]. Journal of Fish Biology, 1983, 22(1): 77-82.
- [27] Tian Y S, Jiang J, Wang N, et al. Sperm of the giant grouper: Cryopreservation, physiological and morphological analysis and application in hybridizations with red-spotted grouper[J]. The Journal of Reproduction and Development, 2015, 61(4): 333-339.
- [28] Lin Y H. A PHA injection method in vivo for the rapid obtainment of large numbers of metaphase figures from kidney cells of teleosts[J]. Journal of Fisheries of China, 1982, 6(3): 201-208. [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.]
- [29] Levan A, Fredga K, Sandberg A A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes[J]. Hereditas, 2009, 52(2): 201-220.
- [30] Zhuo X L, Zou J X. Advances in karyotype and chromosome banding studies of marine fish in China[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2007, 26(5): 73-80. [卓孝磊, 邹记兴. 我国海水鱼类核型及染色体显带研究进展[J]. 热带海洋学报, 2007, 26(5): 73-80.]
- [31] Li X Q, Peng Y D. Studies on karyotype of *Epinephelus fasciatomaculatus* and *Epinephelus fasciatus*[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 1994, 14(2): 22-26. [李锡强, 彭跃东. 斑带石斑鱼与黑边石斑鱼核型的研究[J]. 湛江水产学院学报, 1994, 14(2): 22-26.]
- [32] Liao J Q, Yin S W, Chen G H, et al. The karyotype of grouper *Epinephelus fuscoguttatus*[J]. Fisheries Science, 2006, 25(11): 567-569. [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.]
- [33] Yu Z N, Kong X Y, Xie Z Y. Studies on karyotypes of fishes of economic importance in coastal water of Shandong Peninsula [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 1995, 2(2): 1-6. [喻子牛, 孔晓瑜, 谢宗墉. 山东近海 21 种经济鱼类的核型研究[J]. 中国水产科学, 1995, 2(2): 1-6.]
- [34] Chen X F, Wang S F, Wang J, et al. Karyotypes of cultured *Haploerythrinus nitens* from Xiamen stock[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2005, 44(S1): 200-202. [陈晓峰, 王世锋, 王军, 等. 斜带髯鲷(*Haploerythrinus nitens*) 厦门养殖群体的染色体核型分析[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2005, 44(S1): 200-202.]
- [35] Zhang H Q, Li Q W. A preliminary report on chromosomes of five marine fishes[J]. Journal of Liaoning Normal University (Natural Science Edition), 1991, 14(3): 263-264. [张恒庆, 李庆伟. 五种海水鱼的染色体初报[J]. 辽宁师范大学学报(自然科学版), 1991, 14(3): 263-264.]
- [36] Wang J X, Zhao X F, Fan C L, et al. Study on the karyotype of two species of Scorpaeniformes[J]. Chinese Journal of Zoology, 1994, 29(4): 14-17. [王金星, 赵小凡, 范春雷, 等. 鲈形目两种鱼的染色体组型研究[J]. 动物学杂志, 1994, 29(4): 14-17.]
- [37] Quan C G, Wang J, Ding S X, et al. The karyotypes of *Pseudosciaena crocea* (Richardson)[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2000, 39(1): 107-110. [全成干, 王军, 丁少雄, 等. 大黄鱼染色体核型研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2000, 39(1): 107-110.]
- [38] Wu J S, Lin Q, Zeng Z N. The chromosome study of *Pseudosciaena crocea*[J]. Journal of Fujian Fisheries, 2001, 23(4): 60-63. [吴建绍, 林琪, 曾志南. 大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)的染色体研究[J]. 福建水产, 2001, 23(4): 60-63.]
- [39] Zou S M, Li S F, Zhao J L, et al. Karyotype of *Pseudosciaena crocea* in Guanjiangyang of Fujian[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2003, 12(2): 179-181. [邹曙明, 李思发, 赵金良, 等. 福建官井洋海区大黄鱼的染色体核型分析[J]. 上海水产大学学报, 2003, 12(2): 179-181.]
- [40] Wang D X, Su Y Q, Wang S F, et al. The karyotypes and their polymorphisms of the *Pseudosciaena crocea* from different populations[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2006, 28(6): 176-178. [王德祥, 苏永全, 王世锋, 等. 不同地理种群大黄鱼染色体核型的比较研究[J]. 海洋学报(中文版), 2006, 28(6): 176-178.]
- [41] Lou J F, Lei S Y, Zhu J Q, et al. Chromosome karyotype of *Pseudosciaena crocea* Daiqu population[J]. Chinese Journal of Zoology, 2015, 50(1): 148-152. [娄剑锋, 雷世勇, 竺俊全, 等. 岱衢洋大黄鱼染色体核型分析[J]. 动物学杂志, 2015, 50(1): 148-152.]
- [42] Li Y Y. Comparison of karyotypes of *Ctenopharyngodon idellus* and *Squaliobarbus curriculus* and the F₁ hybrid[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2014. [黎玉元. 草鱼、赤眼鳟及其杂交 F₁ 染色体核型比较分析[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2014.]
- [43] Shu H, Liu Y B, Wei Q L, et al. Studies on chromosome karyotype, Ag-NORs and C-banding patterns of wild *Ctenopharyngodon idellus* and *Squaliobarbus curriculus* in the Pearl River[J]. Journal of Guangzhou University (Natural Science Edition), 2014, 13(2): 53-59. [舒晓, 刘远波, 魏秋兰, 等. 珠江野生草鱼、赤眼鳟的核型、银染和 C 带比较研究[J]. 广州大学学报(自然科学版), 2014, 13(2): 53-59.]
- [44] Yang X F. The study of karyotype and esterase isozyme of several wild fishes in Guizhou[D]. Guiyang: Guizhou University, 2007. [杨晓芬. 贵州几种野生鱼类染色体组型与酯酶同工酶研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2007.]
- [45] Fei Z Q, Tao R Q. Studies on the karyotypes of four species in gobioides and compared with other fishes in ther[J]. Journal of Zhejiang College of Fisheries, 1987, 6(2): 127-131.

- [费志清, 陶荣庆. 鰕虎鱼亚目四种鱼的染色体组型的初步研究[J]. 浙江水产学院学报, 1987, 6(2): 127-131.]
- [46] Mao L J, Yang L B, Qin K J. A comparative study on karyotypes of two species of gobioid fishes[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 1993, 8(1): 1-7. [毛连菊, 杨良滨, 秦克静. 两种鰕虎鱼染色体核型的比较研究[J]. 大连水产学院学报, 1993, 8(1): 1-7.]
- [47] Zan R G, Song Z. Studies of the karyotypes of eight species of fishes in *Cyprinus* and *Anabarrilius*[J]. Zoological Research, 1980, 1(2): 141-150. [胥瑞光, 宋峥. 八种鱼类(鲤属和白鱼属)的染色体组型研究[J]. 动物学研究, 1980, 1(2): 141-150.]
- [48] Yang H Y. Studies on the karyotypes and C-banding patterns of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. Journal of University of Science and Technology of China, 1990, 20(4): 478-485. [杨慧一. 草鱼和团头鲂的核型及其 C 带带型的研究[J]. 中国科学技术大学学报, 1990, 20(4): 478-485.]
- [49] Yin H B, Fan Z T, Sun Z W, et al. The karyotypes and DNA content analysis of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. Chinese Journal of Fisheries, 1995, 8(1): 22-26. [尹洪滨, 范兆廷, 孙中武, 等. 团头鲂核型与 DNA 含量分析研究[J]. 水产学杂志, 1995, 8(1): 22-26.]
- [50] Ouyang M. Study on the karyotype of *Megalobrama amblycephala* from Poyang lake[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2000, 12(2): 61-64. [欧阳敏. 鄱阳湖团头鲂染色体组型研究[J]. 江西农业学报, 2000, 12(2): 61-64.]
- [51] Zhang Q, Song W, Qu C Y. Karyotype of *Megalobrama amblycephala* in Yihe[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2014, 42(2): 188-189. [张芹, 宋威, 屈长义. 伊河团头鲂染色体的组型[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(2): 188-189.]
- [52] Zhang K J. Studies on the karyotypes of three freshwater fishes (*Coreosiniperca roulei*, *Sarcocheilichthys nigripinnis nigripinnis* and *Odontobutis obscurus*)[J]. Journal of Fisheries of China, 1989, 13(1): 52-58. [张克俭. 长体鳊、黑鳍鳊及塘鳢的染色体组型研究[J]. 水产学报, 1989, 13(1): 52-58.]
- [53] Liu S, Zhu X P, Chen K C, et al. Karyotype analysis of the hybrid snakehead (*Channa maculata* ♀ × *C. argus* ♂) and its inbred progeny (F2)[J]. Chinese Journal of Zoology, 2011, 46(1): 100-105. [刘苏, 朱新平, 陈昆慈, 等. 杂交鳢(斑鳢♀×乌鳢♂)及其自交后代细胞核型初步分析[J]. 动物学杂志, 2011, 46(1): 100-105.]
- [54] Chen Y L, Zhang Q J, Wang Y Y, et al. Chromosomes of *Cichlasoma trimaculatum* (♂), *Heros managuense* (♀) and their hybridization offspring (F₁)[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2009, 17(3): 469-475. [陈友铃, 张秋金, 汪彦愷, 等. 彩鲷(♂)×美洲虎鲷(♀)杂交后代及其双亲的染色体研究[J]. 农业生物技术学报, 2009, 17(3): 469-475.]
- [55] He G, Fang C L, Wang W P, et al. Study on the morphology and genetics of F₁ hybrids of *Silurus meridionalis* and *Silurus soldatovi*[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2011, 50(23): 4916-4919. [贺刚, 方春林, 王伟萍, 等. 大口鲶(♀)×怀头鲶(♂)杂种 F₁ 的形态学及遗传学研究[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(23): 4916-4919.]
- [56] Cheng X X, Liu F, Song H B, et al. Analysis on the genetic characteristics of *Larimichthys polyactis* (♀) × *Larimichthys crocea* (♂)[J]. Marine Science Bulletin, 2019, 38(3): 327-333. [程兴兴, 刘峰, 宋红彬, 等. 小黄鱼(♀)×大黄鱼(♂)杂交子代遗传特征分析[J]. 海洋通报, 2019, 38(3): 327-333.]
- [57] Yin S W, Liao J Q, Deng Q, et al. Karyotype of the hybrid F₁ of snapper (*Lutjanus erythropterus* ♀ × *L. sebae* ♂) and their parents[J]. Fisheries Science, 2008, 27(4): 171-174. [尹绍武, 廖经球, 邓勤, 等. 红鳍笛鲷(♀)与千年笛鲷(♂)杂交 F₁ 代及其亲本的核型研究[J]. 水产科学, 2008, 27(4): 171-174.]
- [58] Fujiwara A, Abe S, Yamaha E, et al. Uniparental chromosome elimination in the early embryogenesis of the inviable salmonid hybrids between Masu salmon female and rainbow trout male[J]. Chromosoma, 1997, 106(1): 44-52.
- [59] Sui J, Ma D Y, Xiao Z Z, et al. Karyotypes and DAPI staining of *Paralichthys olivaceus*, *Paralichthys dentatus* and their hybrids[J]. Marine Sciences, 2014, 38(3): 69-74. [隋娟, 马道远, 肖志忠, 等. 褐牙鲆、夏鲆及其杂交子代核型与 DAPI 带型分析[J]. 海洋科学, 2014, 38(3): 69-74.]
- [60] Jin W K, Yu L, Yang J X, et al. Biological characteristics of F1 hybrid generations from *Squaliobarbus curriculus* (♀) × *Aristichthys nobilis* (♂)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(4): 611-619. [金万昆, 俞丽, 杨建新, 等. 赤眼鳟(♀)与鲮(♂)杂交子代生物学特性[J]. 中国水产科学, 2012, 19(4): 611-619.]
- [61] Nagahama Y. Molecular mechanisms of sex determination and gonadal sex differentiation in fish[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2005, 31(2-3): 105-109.
- [62] Wu G M, Xian C B, Chen Y L, et al. A comparative study on the karyotypes of four species of catfish[J]. Acta Genetica Sinica, 1986, 13(3): 213-220, 245. [邬国民, 洗焱彬, 陈永乐, 等. 四种胡子鲶核型的比较研究[J]. 遗传学报, 1986, 13(3): 213-220, 245.]
- [63] Luo J L, Wang Z X, Lin Z P, et al. Studies on the karyotype of *Claris fuscus*[J]. Journal of Fisheries of China, 1986, 10(4): 440-446. [罗俊烈, 王正询, 林兆平, 等. 胡子鲶染色体组型的研究[J]. 水产学报, 1986, 10(4): 440-446.]
- [64] Luo J L, Wang Z X, Lin Z P. Studies on the karyotypes of *Clarias macrocephalus* and *Clarias fuscus*[J]. Chinese Journal of Zoology, 1987, 22(1): 10-13. [罗俊烈, 王正询, 林兆平. 斑点胡子鲶和胡子鲶染色体组型的研究[J]. 动物学杂

- 志, 1987, 22(1): 10-13.]
- [65] Zheng J S, Wang M L, Dai J X. Studies on the karyotype and sex chromosome in *Agrammus agrammus* (Temmincket Schlegel)[J]. Hereditas (Beijing), 1997, 19(S1): 61-62. [郑家声, 王梅林, 戴继勋. 斑头鱼的核型及性染色体研究[J]. 遗传, 1997, 19(S1): 61-62.]
- [66] Zheng J S, Wang M L, Zhu L Y, et al. Studies on the karyotypes of *Agrammus agrammus* (Temminck et Schlegel) and *Sebastes hubbsi* (Matsubara)[J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 1997, 27(3): 67-72. [郑家声, 王梅林, 朱丽岩, 等. 斑头鱼 *Agrammus agrammus* (Temminck et Schlegel) 和 鲆平鱼由 *Sebastes hubbsi* (Matsubara) 核型研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1997, 27(3): 67-72.]
- [67] Wang J X, Zhao X F, Fan C L, et al. Study on the karyotype of *Conger myriaster*[J]. Sichuan Journal of Zoology, 1993, 12(2): 14-15. [王金星, 赵小凡, 范春雷, 等. 星康吉鳗染色体组型研究[J]. 四川动物, 1993, 12(2): 14-15.]
- [68] Chang C J, Yu Q X. The cytogenetic evidences of ZZ/ZW sex determination in *Paramisgurnus dabryanus*[J]. Hereditas (Beijing), 1997, 19(3): 17-19. [常重杰, 余其兴. 大鳞副泥鳅 ZZ/ZW 型性别决定的细胞遗传学证据[J]. 遗传, 1997, 19(3): 17-19.]
- [69] Hong Y H, Zhou T. Karyotype and its ZZ-ZO sex chromosome of *Coilia brachygnathus*[J]. Hereditas, 1984, 6(4): 12-14, 49. [洪云汉, 周瞰. 短颌鲚的核型及其 ZZ-ZO 性染色体[J]. 遗传, 1984, 6(4): 12-14, 49.]
- [70] Xu S J, Li Y Y, Fu G B, et al. Chromosome karyotype analysis of *Coilia nasus*[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2014, 41(7): 155-157. [许世杰, 李园园, 付官宝, 等. 刀鲚染色体核型分析[J]. 广东农业科学, 2014, 41(7): 155-157.]
- [71] Zhang S K, Zheng J, Zhang J, et al. Cytogenetic characterization and description of an $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ sex chromosome system in *Collichthys lucidus* (Richardson, 1844)[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2018, 37: 34-39.
- [72] Ueno K, Takai A. Multiple sex chromosome system of $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ type in lutjanid fish, *Lutjanus quinque-lineatus* (Perciformes)[J]. Genetica, 2008, 132: 35-41.
- [73] Murofushi M, Oikawa S, Nishikawa S, et al. Cytogenetical studies on fishes, III. Multiple sex chromosome mechanism in the filefish, *Stephanolepis cirrhifer*[J]. The Japanese Journal of Genetics, 1980, 55(2): 127-131.
- [74] Lei C G, Yin S W, Chen G H. Reproductive biology of grouper and its current research situation in artificial breeding technology[J]. Natural Science Journal of Hainan University, 2005, 23(3): 288-292. [雷从改, 尹绍武, 陈国华. 石斑鱼繁殖生物学和人工繁殖技术研究现状[J]. 海南大学学报(自然科学版), 2005, 23(3): 288-292.]
- [75] He Y L, Ou Y J, Li J E, et al. Advance in research on artificial breeding technique of groupers[J]. South China Fisheries Science, 2008, 4(3): 75-79. [何永亮, 区又君, 李加儿, 等. 石斑鱼人工繁育技术研究进展[J]. 南方水产, 2008, 4(3): 75-79.]
- [76] Ding S X, Liu Q H, Wu H H, et al. A review of research advances on the biology and artificial breeding of groupers[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2018, 25(4): 737-752. [丁少雄, 刘巧红, 吴昊昊, 等. 石斑鱼生物学及人工繁育研究进展[J]. 中国水产科学, 2018, 25(4): 737-752.]
- [77] Gui Y, Hu J, Zhou W X, et al. A study on the ovarium annual variation and sex transformation of *Epinephelus awoara* in north sea waters of Zhejiang Province[J]. Journal of Zhejiang College of Fisheries, 1984, 3(1): 11-19, 4. [蒯彦, 胡杰, 周婉霞, 等. 浙江北部水域青石斑鱼 *Epinephelus awoara* 卵巢周年变化及性转变的研究[J]. 浙江水产学院学报, 1984, 3(1): 11-19, 4.]
- [78] Ruiz C R. Chromosome analysis of the sexual phases of the protogynous hermaphrodites *Epinephelus guttatus* and *Thalassoma bifasciatum* (Serranidae and Labridae; Teleostei)[J]. Caribbean Journal of Science, 2002, 38(1-2): 44-51.
- [79] Zhang H F, Liu X C, Zhang Y, et al. The hybrid progeny of *Epinephelus fuscoguttatus* (♀) × *Epinephelus lanceolatus* (♂)[J]. China Fisheries, 2018(2): 75-78. [张海发, 刘晓春, 张勇, 等. 虎龙杂交斑[J]. 中国水产, 2018(2): 75-78.]
- [80] Wang J B, Gao Y, Han F. Guidelines for the Promotion of New Aquatic Products in 2019[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2018: 143-161. [王建波, 高勇, 韩风. 2019 水产新品种推广指南[M]. 北京: 中国农业出版社, 2018: 143-161.]

Karyotype analysis of hybrid *Epinephelus awoara* (♀) and *Epinephelus tukula* (♂) progenies and their parents

CHEN Shuai^{1,2,3}, TIAN Yongsheng^{1,2}, CHENG Meiling¹, LI Zhentong^{1,3}, LI Ziqi^{1,3}, LI Linlin^{1,4},
WANG Linna^{1,2}, WANG Xiaomei⁵

1. Key Laboratory for Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China;
3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
4. Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;
5. Mingbo Aquatic Co. Ltd., Laizhou 261400, China

Abstract: The observation of fish chromosomes is of great significance not only in taxonomy and phylogeny, but also in the study of fish breeding, genetic variation, and sex determination. The traditional method of colchicine injection *in vivo* requires the dissection of fish to obtain the head kidney, which means high costs for parents and rare fish. In contrast, the method of peripheral blood lymphocyte culture can be used to prepare chromosome specimens with minimal damage to the fish. However, the chromosome specimen of grouper has not been prepared by this method owing to its difficulty. In this study, we prepared the chromosome specimen of grouper successfully by optimizing the experimental conditions: the concentration of colchicine was 0.12 mg/mL, the concentration of PHA was 0.1 mg/mL, the rotational speed was 4000 r/h, and the hypotonic temperature is 34 °C. In addition, hybrid grouper showed heterosis in terms of faster growth and stronger stress resistance, and chromosome research of hybrid offspring is one of the key methods to explore heterosis. To explore the difference in karyotypes between hybrid progeny and parents, we prepared chromosome specimens of the hybrid progeny (*E. AT*) and maternal progeny by colchicine injection *in vivo*. The results showed that the chromosome number of *E. tukula* was $2n=48$, the karyotype formula was $2n=2sm+46t$, $NF=50$, and the arm ratio was 1.76 ± 0.11 ; the chromosome number of *E. awoara* was $2n=48$, the karyotype formula was $2n=48t$, $NF=48$; the chromosome number of *E. AT* was $2n=48$, the karyotype formula was $2n=1sm+47t$, $NF=49$, and the arm ratio was 1.75 ± 0.29 . Furthermore, we prepared gonadal sections of 16-month-old *E. AT* to investigate whether the heterochromosome of *E. AT* was related to sex. The results showed that there were a large number of oocytes in the gonads, which indicated that the heterochromosomes of *E. AT* had no relationship with sex. Based on the above results, it is speculated that the cause of heterochromosomes in hybrid progenies is that the male parent provided 23 telocentric chromosomes and one submetacentric chromosome, whereas the female parent provided 24 telocentric chromosomes. These results not only provide a method for the preparation of chromosome specimens of grouper, but also provide abundant data for chromosome polymorphism, genetic variation, hybrid breeding, and the germplasm improvement of hybrid progenies.

Key words: *Epinephelus awoara*; *Epinephelus tukula*; hybrid offspring; karyotype; heterochromosome; gonad section

Corresponding author: TIAN Yongsheng. E-mail: tianys@ysfri.ac.cn