



灰海马染色体制备及核型分析

刘鑫¹, 张东^{1*}, 林听听¹, 周丽青²

(1. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 农业农村部东海渔业资源开发利用重点实验室, 上海 200090;
2. 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)

摘要: 为了解灰海马的细胞遗传学特征, 便于今后开展灰海马的种质评价与鉴定、规模化人工繁育、亲缘关系研究及人工选育等工作, 实验以雌雄灰海马的背鳍为材料, 采用秋水仙素浸泡和常规热滴片法制备染色体标本。借助Photoshop图像软件, 将同源染色体配对、拼贴, 做出染色体核型图。采用Image J软件的自定义曲线测量功能, 以着丝粒的中心位置为起点, 顺着染色体弯曲的形态, 到染色体臂末端为终点, 测量线段长度, 得出图片中染色体的臂长, 根据相同放大倍数下标尺的测量值, 换算出染色体的实际臂长。根据臂比值, 将染色体进行配对、分类后, 得出灰海马的染色体核型公式。结果显示, 灰海马的背鳍组织可作为其染色体制备的理想材料, 实验选用的染色体制备方法能获得图像清晰、形态良好的细胞分裂相。此法简单、效果好, 解决了海龙科鱼类染色体制备的难题; 灰海马具有22对染色体, 二倍体染色体数目 $2n=44$, 雄鱼的染色体核型公式为 $2n=2sm+20st+22t$, 雌鱼的染色体核型公式为 $2n=1m+2sm+20st+21t$, 雌鱼存在性染色体异型的现象, 因此灰海马的性染色体为ZW/ZZ型。

关键词: 灰海马; 染色体; 鳍; 核型

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

海马(*Hippocampus*)隶属于脊索动物门(Chordata), 硬骨鱼纲(Osteichthyes), 海龙目(Syngnathiformes), 海龙科(Syngnathidae), 海马属的海产鱼类^[1]。近代药理学的研究表明, 海马提取物具有抗癌^[2-3]、抗衰老^[4]和抗疲劳^[5]等功效。海马作为一种稀有名贵的海洋动物药材, 具有很高的药用价值。

由于过度捕捞, 加之海草、珊瑚礁、红树林等天然栖息地不断地衰减和退化, 河流入海口附近水域环境污染加剧等野外生存环境的恶化, 导致海马野生资源严重衰退。为保护野生海马的种质资源, 目前所有已知的海马种类已于2004年被世界自然保护联盟列为II类濒危物

种^[1,6]。为拯救海马, 除了建立海马自然保护区, 改善海马的生存环境外, 通过人工养殖海马满足市场需求是实现海马资源可持续利用的最有效途径。

灰海马(*Hippocampus erectus*)又名线纹海马, 相比于同属的其他种类, 如三斑海马(*Hippocampus trimaculatus*)等, 具有抗病力强, 生长速度快等特点, 是优良的养殖对象^[7]。自2009年以来, 以灰海马为养殖对象的海马人工养殖产业在我国沿海各地兴起^[8-14]。随着海马养殖业的发展, 需要对其种质进行评价与鉴定, 为进行规模化人工繁育、亲缘关系研究及人工选育提供基础资料。生物的染色体核型^[15]具有种属特异性, 与种

收稿日期: 2019-09-09 修回日期: 2020-03-15

资助项目: 农业农村部农业行业标准制订专项(2428-L-2019); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项(2017HY-ZD04, 2019ZY12); 中国水产科学研究院东海水产研究所基本科研业务费专项(2019M05); 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费专项(206030222018004)

通信作者: 张东, E-mail: zdfit63@163.com

质直接相关,研究物种的染色体不仅可作为探讨其分类地位和系统演化的基础,还有助于种质鉴定和群落分析等工作的开展。目前关于灰海马的染色体核型分析尚无报道。

海龙科的其他种类,如欧洲海马(*H. hippocampus*)、裸胸海龙(*Nerophis ophidion*)等种类的染色体核型分析均借助细胞培养的技术手段,以体外培养的表皮细胞为实验材料开展研究,但是对于同一物种的染色体众数结果存在争议^[16-17]。本实验以人工繁育的灰海马为研究对象,取鳍组织为实验材料,采用秋水仙素浸泡法和Giemsa染色法,开展雌雄鱼的染色体制备和核型分析的初步研究,以期为灰海马的细胞遗传学、遗传育种研究以及种质资源的保护,提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用鱼来自于中国水产科学研究院东海水产研究所海马研究中心人工繁殖的灰海马子二代共11尾,5雌6雄,雄海马体高为(11.61±0.17) cm,雌海马体高为(10.54±0.22) cm。实验用鱼从养殖池中捞出后,以海水浸湿的医用纱布包裹鱼体,快速剪取鳍组织后,将鱼放回到事先准备好的玻璃缸中恢复数日后,再移回原先的养殖系统中。水温为26~27℃。

1.2 实验方法

染色体的制备 将质量体积比为0.4%的秋水仙素母液用煮沸过滤的海水稀释至终浓度为0.04%的秋水仙素工作液,取少量鳍组织置于秋水仙素工作液中处理30 min,然后用0.075 mol/L的溶液低渗50 min,再用预冷的新鲜配制的卡诺氏固定液(甲醇与冰醋酸的体积比为3:1)混合充分固定,然后更换固定液3次,每次固定15 min。制片前先用预冷的50%冰醋酸水溶液(4℃),将鳍组织解离成细胞悬液,通过轻弹管壁或吸管吹打的方式,使细胞从组织团块中解离出来。

热滴片法制片 载玻片放在平整光滑的石板上或金属面上预热,石板或金属面可用电炉加热至60℃。用滴管吸取解离的细胞悬液,从70 cm的高处滴1滴细胞悬液至预热的载玻片上,然后用滤纸碎片的尖角快速吸干液滴,并把玻片移至旁边晾干。制备好的染色体标本以Giemsa工作液(索莱宝)染色40 min后,用自来水冲洗表

面多余的染色液,将玻片的一端对准水流,玻片的另一端稍向下倾斜,与水平面成15°左右,以细流水正面冲洗约30 s,洗去多余的染色液。晾干后即可镜检观察染色体的形态。

染色体众数的确定 选取来自不同个体的100个分散良好的中期分裂相,在油镜下观察并拍照,对染色体众数进行统计分析,确定二倍体染色体的数目。

核型分析 从雌雄海马的中期分裂相中,分别挑选10个染色体收缩适中、分散较好、形态清晰的分裂相进行显微摄影。本研究借助Photoshop图像软件,通过调节染色体图片的亮度和对比度,确定着丝粒的位置,按Levan标准进行分类,将同源染色体配对、拼贴,做出染色体核型图。采用Image J软件的自定义曲线测量功能,以着丝粒的中心位置为起点,顺着染色体弯曲的形态,到染色体臂末端为终点,测量线段长度,得出图片中染色体的臂长,根据相同放大倍数下标尺的测量值,换算出染色体的实际臂长。将染色体进行配对、分类后,得出灰海马的染色体核型公式。

数据处理 染色体的相对长度(%)=(实测染色体长度/全部染色体长度总和)×100%,臂比=长臂长度/短臂长度,相对长度和臂比以均值±标准差来表示。

2 结果

2.1 灰海马二倍体染色体数目

对雌雄灰海马的100个分裂相进行计数的结果表明,灰海马的中期分裂相均为二倍体(图1,图2),染色体众数为44(表1)。

表1 灰海马二倍体染色体计数

染色体数目 number of chromosome	≤40	43	44	45	≥46	总和 sum
分裂相数目 number of metaphase	21	19	54	4	2	100
所占百分比/% percentage of metaphase	21	19	54	4	2	100

2.2 染色核型分析

通过对染色体相对长度和臂比的测量与分析得知,灰海马的染色体可配成22对,其中21对为常染色体,7号染色体为性染色体(表2)。在雄

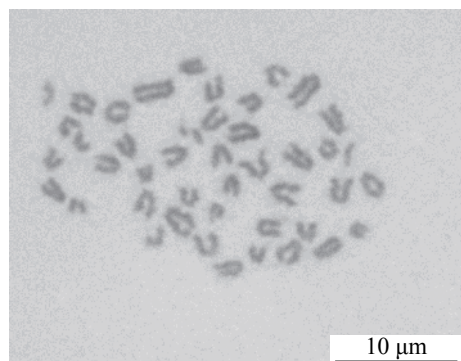


图1 雄海马染色体中期的分裂相

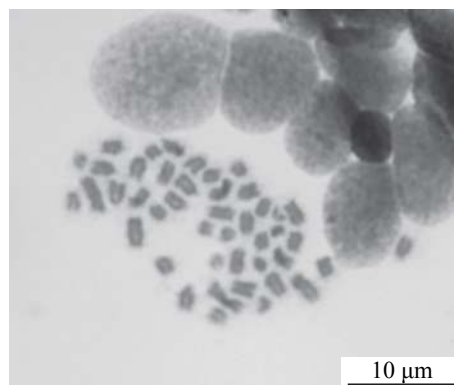
Fig. 1 Metaphase chromosomes of male *H. erectus*

图2 雌海马染色体中期的分裂相

Fig. 2 Metaphase chromosomes of female *H. erectus*

表2 雌雄灰海马染色体核型分析的数据

Tab. 2 Data of karyotype analyses in male and female *H. erectus*

染色体编号 no. of chromosome	雌性 female			雄性 male		
	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	3.86±0.42	8.30±1.40	t	3.89±0.47	9.65±3.05	t
2	3.27±0.28	9.22±2.18	t	3.24±0.35	9.25±1.63	t
3	3.17±0.33	5.32±1.11	st	3.06±0.24	5.45±1.14	st
4	2.87±0.17	9.45±2.57	t	2.79±0.16	9.07±2.31	t
5	2.65±0.46	2.48±0.37	sm	2.74±0.39	2.42±0.35	sm
6	2.69±0.13	5.21±1.05	st	2.68±0.17	5.35±0.97	st
7	2.65±0.15	9.21±2.65	t	2.63±0.17	8.77±1.52	t
7	2.64±0.51	1.33±0.19	m	2.54±0.16	9.13±1.85	t
8	2.49±0.11	5.28±1.09	st	2.48±0.14	5.37±1.29	st
9	2.49±0.13	9.01±2.09	t	2.41±0.12	8.42±1.18	t
10	2.33±0.11	4.90±0.86	st	2.30±0.11	5.37±1.19	st
11	2.30±0.13	9.75±2.38	t	2.29±0.14	8.99±1.32	t
12	2.14±0.14	8.83±1.52	t	2.16±0.12	8.63±1.88	t
13	2.17±0.12	5.40±1.16	st	2.12±0.11	5.43±1.06	st
14	2.00±0.15	5.18±0.90	st	1.97±0.13	5.45±1.06	st
15	1.95±0.16	9.67±2.40	t	1.99±0.14	8.74±1.82	t
16	1.85±0.16	5.44±0.83	st	1.82±0.15	5.51±0.87	st
17	1.74±0.15	9.07±1.83	t	1.81±0.14	8.70±1.45	t
18	1.70±0.14	5.15±1.11	st	1.68±0.12	5.53±0.94	st
19	1.53±0.11	8.98±1.80	t	1.66±0.17	8.91±2.06	t
20	1.54±0.15	5.47±0.92	st	1.53±0.13	5.82±0.77	st
21	1.32±0.18	9.39±1.96	t	1.48±0.16	9.01±1.54	t
22	1.28±0.21	5.71±0.88	st	1.33±0.15	6.31±0.62	st

鱼的分裂相中未见有异型性染色体,而在雌鱼中可观察到异型性染色体。雄鱼的2条性染色体均为端部着丝点染色体(图3),雌鱼的2条性染色体分别为端部着丝点染色体和中部着丝点染色体(图4)。雌雄鱼的核型公式为 $2n=1m+2sm+20st+21t$ 和 $2n=2sm+20st+22t$ 。

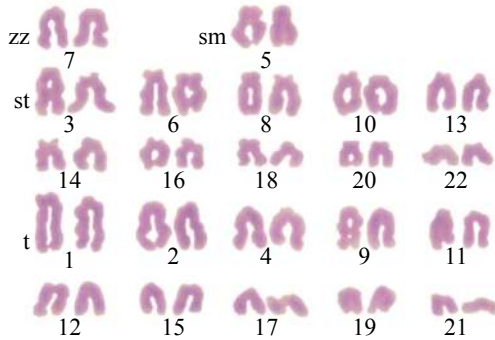


图3 具有同型性染色体的雄性灰海马的染色体核型
zz. 性染色体; sm. 亚中部着丝点染色体; st. 亚端部着丝点染色体; t. 端部着丝点染色体

Fig. 3 Karyotype of male *H. erectus* with homotypic sex chromosome

zz. sex chromosome; sm. submetacentric chromosome; st. acrocentric chromosome; t. telocentric chromosome

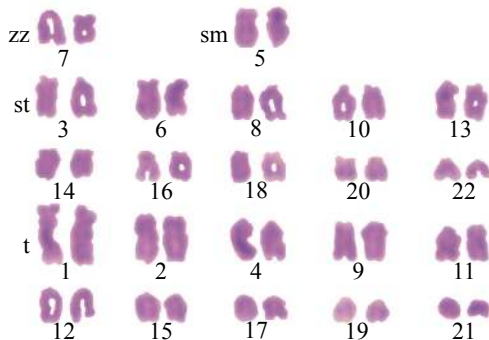


图4 具有异型性染色体的雌性灰海马的染色体核型
zw. 性染色体; sm. 亚中部着丝点染色体; st. 亚端部着丝点染色体; t. 端部着丝点染色体

Fig. 4 Karyotype of female *H. erectus* with heterotypic sex chromosome

zw. sex chromosome; sm. submetacentric chromosome; st. acrocentric chromosome; t. telocentric chromosome

3 讨论

实验采用剪取灰海马的背鳍作为染色体制备的材料,在保证实验鱼存活的同时,获得合适的实验材料。在已报道的鱼类染色体核型研究中,多采用细胞分裂素注射、秋水仙素浸泡

和头肾组织培养法制备标本^[18-20]。海龙科的种类不具备头肾组织,因此无法采用常规的头肾组织培养法开展其染色体的分析实验。参考谭杰等^[21]的研究结果,采用机械方法去除灰海马受精卵的卵膜后,并未获得分裂相,推测是由于灰海马的卵黄囊较难吹打,使之均匀分散,造成低渗的效果不佳,加之灰海马受精卵的脂质含量较高,在用Giemsa染色时着色较浅甚至无色,难以观察到分裂相,影响实验效果。

以鳍作为染色体材料的实例虽不多见,但是鱼类的鳍或鳍条的确具有旺盛的分裂增生能力^[22-24]。以尾鳍作为细胞培养材料,获得成纤维细胞以制备染色体,目前采用细胞培养法制备染色体标本的种类多是非人工养殖的品种^[24-25],在实际操作中,尤其是工厂化养殖条件下,染色体的制备实验往往需在养殖车间完成取样和前期处理工作,而养殖车间很难达到细胞培养的实验条件,因此细胞培养法制备养殖品种染色体标本的报道并不多见。周丽青等^[26]发现半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)稚鱼的鳍条富含分裂增生旺盛的细胞,适于作为染色体制备的材料,该法在漠斑牙鲆(*Paralichthys lethostigma*)中也适用^[27]。周丽青等^[28]采用尾鳍和尾鳍的愈伤组织作为染色体制备的材料,成功得到波纹唇鱼(*Cheilinus undulatus*)的染色体标本。结合幼年灰海马鳍条生长迅速的特点,本研究以刚刚性成熟的灰海马背鳍为实验材料,不注射细胞分裂素,直接以秋水仙素浸泡离体的组织来制备染色体,得到了分散度好、清晰完整的分裂相图片。然而,并非所有的鱼类都适合以鱼鳍作为染色体制备的材料,如银鲳(*Pampus argenteus*)的鳍为致密的革质,很难从鳍条中解离出细胞,因此适合采用肾细胞直接制片法,开展其染色体的核型分析^[29]。

灰海马染色体众数为44,与地中海海马(*H. ramulosus*)的染色体众数相同^[17]。欧洲海马的染色体众数存在争议,Vitturi等^[16-17]采用Giemsa染色法,得出欧洲海马的染色体众数为44,而在其另一项以体外培养的细胞作为实验材料,采用Giemsa染色和Ag-NOR显带技术为实验手段的研究中,发现欧洲海马的染色体众数为48。有研究借助Ag-NOR显带技术对欧洲海马的染色体进行观察,该技术中银染的步骤使核仁生成区的嗜银蛋白着色,增大染色体与背景的反差,使染色体便于观察,但是由于嗜银蛋白的数目与细胞

基因的转录活性有关,同一种动物NOR的分布位置、大小和数目均可能随个体、细胞类型的不同而发生变化,导致不同的研究者对同一物种的染色体得出不同的观测结果^[23,30]。因此笔者推测导致欧洲海马染色体众数差异的原因可能在于两项研究的染色方法不同。

关于海水鱼类染色体组型的报道则不多见,不足现存海洋鱼类种类的5%^[31]。在已有核型报道的海洋鱼类中,2n=48的种类占多数。目前已知海龙科鱼类的染色体众数从44~58不等^[16-17],裸胸海龙的染色体众数为58,其中4对为亚端部着丝粒染色体,其他均为近亚中部着丝粒染色体,染色体臂数为108。宽吻海龙(*Syngnathus typhle*)和短吻海龙(*Syngnathus abaster*)的染色体众数均为44,22对染色体全为近端部着丝粒染色体,1号与22号染色体的臂长差别不大。长吻海马(*H. guttulatus*)的染色体众数也为44,其中21对为近端部着丝粒染色体,1对近亚中部着丝粒染色体,这对近亚中部着丝粒染色体有异型现象,是由于不同个体的次缢痕的位置不固定所致。最新的研究结果显示,欧洲海马具有5对亚端部着丝粒染色体和19对近端部着丝粒染色体。长吻海马、短吻海龙、宽吻海龙和灰海马的染色体众数分别为48、44、44和44,呈递减趋势,这与刺鱼科(Gasterosteidae)染色体众数逐渐递减的进化趋势相类似,而海龙科与刺鱼科在进化上同源^[31]。对刺鱼科的种类而言,随着分类地位的提升,染色体众数呈现减少趋势,而染色体臂数均多于48,呈现增加趋势,推测海龙科种类的染色体也有类似的进化规律。今后仍需对更多的海龙科鱼类进行全面的染色体分析和细胞遗传学的论证,以明确海龙科种类染色体的进化方向。

目前已报道的鱼类性染色体类型,有雄性配子异型的有XX/XY、XX/XO、X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y、X₁X₁X₂X₂/X₁X₁X₂、XX/XY₁Y₂,雌性配子异型的有ZW/ZZ、ZO/ZZ、ZW₁W₂/ZZ等^[32]。雌性灰海马的中期分裂相中有异型性染色体存在,而雄性灰海马的性染色体同型,说明灰海马的性染色体为ZW型。本研究首次发现海龙科雌雄鱼具有异型性染色体,今后可针对海龙科其他属的种类,尤其是具有性别转变习性的种类,开展染色体核型及其相关研究,探讨染色体异型的现象与海龙科性别决定机制的关系。

参考文献:

- [1] Lourie S A, Vincent A C J, Hall H J. Seahorses: an identification guide to the world's species and their conservation[M]. London: Project Seahorse, 1999.
- [2] 闫珍珍,郭全友,林听听,等.海马的功用机理及开发应用研究进展[J].海洋渔业,2018,40(6):752-762.
Yan Z Z, Guo Q Y, Lin T T, et al. Research on applications of *Hippocampus*: progress and prospect[J]. Marine Fisheries, 2018, 40(6): 752-762(in Chinese).
- [3] 陈成波,袁学会,陈政,等.三斑海马液化蛋白的提取及抗氧化研究[J].中国热带医学,2011,11(3):329-331.
Chen C B, Yuan X H, Chen Z, et al. Study on extraction and antioxidant activities of liquefied protein of three-spot *Hippocampus*[J]. China Tropical Medicine, 2011, 11(3): 329-331(in Chinese).
- [4] 林芳花,郑爱娥,李燕秋,等.海马等8种海洋中药体外抗氧化活性的比较[J].安徽农业科学,2015,43(29):73-74.
Lin F H, Zheng A E, Li Y Q, et al. Comparison of eight kinds of marine drugs in vitro antioxidant activity such as *Hippocampus*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2015, 43(29): 73-74(in Chinese).
- [5] 唐海婷,张才,张永平,等.雌、雄海马抗疲劳和改善记忆障碍比较[J].广东海洋大学学报,2019,39(3):103-108.
Tang H T, Zhang C, Zhang Y P, et al. Comparison between male and female sea horse in the anti-fatigue and memory improvement[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2019, 39(3): 103-108(in Chinese).
- [6] Koldewey H J, Martin-Smith K M. A global review of seahorse aquaculture[J]. Aquaculture, 2010, 302(3-4): 131-152.
- [7] Boehm J T, Waldman J, Robinson J D, et al. Population genomics reveals seahorses (*Hippocampus erectus*) of the western Mid-Atlantic Coast to be residents rather than vagrants[J]. PLoS One, 2015, 10(1): e0116219.
- [8] 徐永健,陆慧贤,卢光明.三斑海马的人工生态养殖[J].渔业科学进展,2011,32(5):38-43.
Xu Y J, Lu H X, Lu G M. Study on the artificial eco-aquaculture of the three-spot seahorse, *Hippocampus trimaculatus* Leach[J]. Progress in Fishery Sciences, 2011, 32(5): 38-43(in Chinese).
- [9] Zhang D, Lin T T, Liu X. A comparison of growth, sur-

- vival, and fatty acid composition of the lined seahorse, *Hippocampus erectus*, juveniles fed enriched artemia and a calanoid copepod, *Schmackeria dubia*[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2015, 46(6): 608-616.
- [10] Zhang D, Zhang Y H, Lin J D, *et al.* Growth and survival of juvenile lined seahorse, *Hippocampus erectus* (Perry), at different stocking densities[J]. *Aquaculture Research*, 2010, 42(1): 9-13.
- [11] 杨琳, 林听听, 刘鑫, 等. 盐度变化对灰海马仔鱼存活及生长的影响[J]. *海洋渔业*, 2017, 39(6): 657-664.
- Yang L, Lin T T, Liu X, *et al.* Effects of low salinity stress on survival and growth of the lined seahorse, *Hippocampus erectus*[J]. *Marine Fisheries*, 2017, 39(6): 657-664(in Chinese).
- [12] Zhang D, Yin F, Lin J D. Criteria for assessing juvenile quality of the lined seahorse, *Hippocampus erectus*[J]. *Aquaculture*, 2011, 322-323: 255-258.
- [13] 尹飞, 唐保军, 张东, 等. 投喂不同密度卤虫无节幼体对灰海马幼体生长和存活的影响[J]. *应用与环境生物学报*, 2012, 18(4): 617-622.
- Yin F, Tang B J, Zhang D, *et al.* Growth and survival of juvenile lined seahorse (*Hippocampus erectus*) at different food densities[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2012, 18(4): 617-622(in Chinese).
- [14] 尹飞, 唐保军, 张东. 营养强化对灰海马幼体氨基酸组成的影响及品质的评价[J]. *海洋渔业*, 2011, 33(3): 310-318.
- Yin F, Tang B J, Zhang D. Amino acid composition and nutritional evaluation of the lined seahorse (*Hippocampus erectus*) juveniles fed with enriched *Artemia*[J]. *Marine Fisheries*, 2011, 33(3): 310-318(in Chinese).
- [15] Levan A, Fredga K, Sandberg A A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes[J]. *Hereditas*, 1964, 52(2): 201-220.
- [16] Vitturi R, Catalano E. Karyotypes in two species of the genus *Hippocampus* (Pisces: Syngnathiformes)[J]. *Marine Biology*, 1988, 99(1): 119-121.
- [17] Vitturi R, Libertini A, Campolmi M, *et al.* Conventional karyotype, nucleolar organizer regions and genome size in five Mediterranean species of Syngnathidae (Pisces, Syngnathiformes)[J]. *Journal of Fish Biology*, 1998, 52(4): 677-687.
- [18] Tan X Q, Qin J G, Chen B N, *et al.* Karyological analyses on redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae)[J]. *Aquaculture*, 2004, 234(1-4): 65-76.
- [19] Kasiroek W, Indananda C, Luangoon N, *et al.* First chromosome analysis of the humpback cardinalfish, *Fibramia lateralis* (Perciformes, Apogonidae)[J]. *Cytologia*, 2017, 82(1): 9-15.
- [20] 耿龙武, 姜海峰, 徐伟. 两种方法分析大鳞鲃染色体核型的比较研究[J]. *水产学报*, 2018, 42(3): 334-344.
- Geng L H, Jiang H F, Xu W. Comparative study on the karyotype of chromosome of *Barbus capito* with two methods[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(3): 334-344(in Chinese).
- [21] 谭杰, 孙慧玲, 高菲, 等. 刺参染色体制备的初步研究[J]. *海洋科学*, 2011, 35(3): 8-11.
- Tan J, Sun H L, Gao F, *et al.* A preliminary study on chromosome preparation of sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. *Marine Sciences*, 2011, 35(3): 8-11(in Chinese).
- [22] De Cáscia Barreto Netto M R, Pauls E, de Mello Affonso P R A. A standard protocol for obtaining fish chromosomes under post-mortem conditions[J]. *Micron*, 2007, 38(3): 214-217.
- [23] Vitturi R, Libertini A, Mazzola A, *et al.* Characterization of mitotic chromosomes of four species of the genus *Diplodus*: karyotypes and chromosomal nucleolar organizer region phenotypes[J]. *Journal of Fish Biology*, 1996, 49(6): 1128-1137.
- [24] 雷景涛. 利用鱼鳍组织制备鱼类染色体标本[J]. *河北渔业*, 2008(12): 17, 59.
- Lei J T. The preparation of chromosome specimen from fish fin tissue[J]. *Hebei Fisheries*, 2008(12): 17, 59(in Chinese).
- [25] Alvarez M C, Otis J, Amores A, *et al.* Short-term cell culture technique for obtaining chromosomes in marine and freshwater fish[J]. *Journal of Fish Biology*, 1991, 39(6): 817-824.
- [26] 周丽青, 杨爱国, 柳学周, 等. 半滑舌鳎染色体核型分析[J]. *水产学报*, 2005, 29(3): 417-419.
- Zhou L Q, Yang A G, Liu X Z, *et al.* The karyotype of the tonguefish *Cynoglossus semilaevis*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(3): 417-419(in Chinese).

- [27] 李鹏飞, 刘萍, 柳学周. 漠斑牙鲆染色体组型研究[J]. 海洋水产研究, 2007, 28(4): 26-30.
Li P F, Liu P, Liu X Z. Study on the karyotype of *Paralichthys lethostigma*[J]. Marine Fisheries Research, 2007, 28(4): 26-30(in Chinese).
- [28] 周丽青, 杨爱国, 吴彪, 等. 波纹唇鱼染色体制备及核型的初步研究[J]. 渔业科学进展, 2010, 31(1): 54-58.
Zhou L Q, Yang A G, Wu B, *et al.* A preliminary study on chromosome preparation and karyotype of humphead wrasse *Cheilinus undulatus*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2010, 31(1): 54-58(in Chinese).
- [29] 周剑光, 张林, 张晨捷, 等. 银鲳染色体核型研究[J]. 海洋渔业, 2018, 40(1): 97-101.
Zhou J G, Zhang L, Zhang C J, *et al.* On the karyotype in *Pampus argenteus*[J]. Marine Fisheries, 2018, 40(1): 97-101(in Chinese).
- [30] 蔡有余, 李胜利, 须昌隆. 马(*Equus caballus*)外周血淋巴细胞染色体的三种带型(G带、C带和Ag-NOR_s带)[J]. 动物学研究, 1984, 5(4): 305-310.
Cai Y Y, Li S L, Xu C L. The banding patterns of domestic horse (*Equus caballus*) chromosomes[J]. Zoological Research, 1984, 5(4): 305-310(in Chinese).
- [31] Casey S P, Hall H J, Stanley H F, *et al.* The origin and evolution of seahorses (genus *Hippocampus*): a phylogenetic study using the cytochrome b gene of mitochondrial DNA[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2004, 30(2): 261-272.
- [32] 楼允东. 鱼类育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999.
Lou Y D. Fish breeding[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1999(in Chinese).

Chromosome preparation and karyotype of the lined seahorse (*Hippocampus erectus*)

LIU Xin¹, ZHANG Dong^{1*}, LIN Tingting¹, ZHOU Liqing²

(1. Key Laboratory of East China Sea Fishery Resources Exploitation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;

2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: Since the lined seahorse *Hippocampus erectus* was introduced into China in 2009, it has become the major aquacultured seahorse species in China. With the development of its aquaculture, the genetic quality of the species should be evaluated to provide fundament for artificial breeding study. The karyotype is varied among species, and is directly related to the genetic quality. Thus karyotype is the basis for identifying taxonomic status and study on phylogeny of a certain species. Study on karyotype would contribute to the studies on the genetic identification and community analysis. In order to explore the cytogenetical characters of the lined seahorse *H. erectus*, the metaphase chromosome was obtained from the dorsal fin of six-month old fish by colchicine incubation and hot air drying methods. Clear images of the chromosomes indicate the dorsal fin is an appropriate tissue for chromosomal investigation in seahorses. There were 22 pairs of chromosomes in diploid (i.e. $n=22$, and $2n=44$). The karyotypes of both sexes were examined separately. There were significant differences in karyotype between males and females, male karyotype formula is $2n=2sm+20st+22t$, and female karyotype formula is $2n=1m+2sm+20st+21t$. Heterotypic sex chromosome was found in female *H. erectus*, so its sex chromosome belongs to ZW/ZZ type. The preparation of chromosome, karyotype and heterotypic sex chromosome in the lined seahorse were reported for the first time. The present study lays a good foundation for studies on cytogenetics, genetic breeding and protection of genetic resources of the lined seahorse.

Key words: *Hippocampus erectus*; chromosome; fin; karyotype

Corresponding author: ZHANG Dong. E-mail: zdfit63@163.com

Funding projects: Agricultural Industry Standard Development Project of Ministry of Agriculture and Rural Affairs (2428-L-2019); Fundamental Research Fund of the Chinese Academy of Fishery Sciences (2017HY-ZD04, 2019ZY12); Fundamental Research Fund of the East China Sea Fisheries Research Institute (2019M05); Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund of Yellow Sea Fisheries Research Institute (20063022018004)