

三倍体牙鲆的核型证明*

尤 锋 刘 静

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

提要 于1990, 1993—1994年以捕自青岛近海的牙鲆亲鱼, 采用冷休克法(0—4℃)进行多倍体的人工诱导实验, 以期掌握牙鲆细胞遗传学特征和研究遗传育种方法。通过实验得到了三倍体牙鲆并进行培育。在原肠胚期采用空气干燥法、Giemsa染色获得正常二倍体、三倍体的染色体制片。镜检得, 牙鲆二倍体染色体 $2n = 48$, 均为端着丝点染色体, 核型为 $24t$, 其臂数 $NF = 48$; 三倍体的染色体 $3n = 72$, 也都为端着丝点染色体, 其臂数 $NF = 72$, 并依据二倍体的核型得出了三倍体的核型图。

关键词 牙鲆 二倍体 三倍体 核型

由于多倍体生物通常比二倍体生物具有许多经济上的优良性状, 如生长快、个体大、寿命长、抗逆性强等, 因此对其研究自40年代就开始, 70年代以来发展很快。在鱼类中亦以不同的方法开展了这项研究 (Purdom, 1972; 苏泽古等, 1983; 吴清江等, 1986; 谷口顺彦, 1986; Sugama et al., 1988; 桂建芳等, 1990), 并取得了一定进展。但是, 在我国海水鱼类方面三倍体的人工诱导研究尚处于起步阶段, 所见报道不多 (尤锋等, 1991, 1993)。有关牙鲆三倍体的诱导研究, 特别是其三倍体核型证明研究国内尚未见到报道。本文报告牙鲆二倍体、三倍体核型的研究, 以期掌握牙鲆的细胞遗传学特征, 为进一步进行牙鲆的三倍体诱导及其它遗传育种方法研究提供依据。

1 材料和方法

实验于1990, 1993, 1994年进行。牙鲆 (*Paralichthys olivaceus* (T. & S.)) 亲鱼捕自青岛近海, 分别在本所实验室和本市山东头蛤蜊场做半干湿法人工授精, 获得牙鲆受精卵。

1.1 冷休克处理 牙鲆卵在正常水温(14—18℃)中授精, 受精后5min放于水温为0—4℃的海水中处理40—50min, 取出放入正常海水中继续培育。对照组的牙鲆受精卵直接放入正常海水中培育。

1.2 染色体制片和计数 分别取处理组和对照组的中期原肠胚约200粒, 按常规进行气干制片, Giemsa染色(尤锋等, 1991)。每组选出100个左右清晰的染色体中期分裂相进行染色体个数统计, 同时获得处理组的三倍体诱导率。

1.3 核型分析 选牙鲆二倍体中期分裂相10个, 照相、放大、测量和计算, 由此编制牙鲆二倍体的核型图。再对照相、放大的人工诱导的三倍体中期分裂相进行分析, 参照二倍

* 山东省科委资助项目, 983120—1号。尤锋, 女, 出生于1963年4月, 助理研究员。

沙学坤、阮洪超先生给予指导, 黄瑞东、田凤琴同志帮助实验, 谨致谢忱。

收稿日期: 1995年1月25日, 接受日期: 1995年4月17日。

体的核型获得三倍体的核型图。

2 结果

表 1 牙鲆二倍体和三倍体的染色体计数

Tab. 1 Chromosome counts for diploid and triploid *Paralichthys olivaceus* (T. & S.)

二倍体	染色体数目	<46	46	47	48	49	50	>50
	分裂相数	3	28	66	482	6	2	1
	出现频率(%)	0.5	4.8	11.2	82.0	1.0	0.3	0.2
三倍体	染色体数目	<70	70	71	72	73	74	>74
	分裂相数	1	18	56	243	4	1	1
	出现频率(%)	0.3	5.6	17.3	75.0	1.2	0.3	0.3

2.1 三倍体的诱导率 先后所做的数批牙鲆三倍体冷休克诱导实验的诱导率,平均为 40%,最高达 50% 以上。

2.2 核型分析 牙鲆二倍体染色体 $2n = 48$ (表 1)。按照 Levan 等(1964)的命名和分类标准以及测量、计算结果,得出牙鲆染色体的相对长度和臂比(表 2),其臂数 $NF = 48$,染色体核型为 $24t$,即 24 对染色体均为端部着丝点染色体。牙鲆三倍体的染色体众数为 72 (表 1),也均为端部着丝点染色体,根据表 2 将这 72 个染色体配成 3 套,获得牙鲆三倍体的核型图,其臂数 $NF = 72$ (见图版 I)。

3 讨论与结语

本研究得到的牙鲆二倍体的核型是 48 条端部着丝点染色体。这与刘静(1989)¹⁾的结果是相同的,但与 Nogusa(1960)和 Sakamoto 等(1980)曾报道过的牙鲆核型为 46 条端部着丝点染色体的结果明显不同。推测这可能是牙鲆种内不同地理种群核型的多态现象。因为 Nogusa 和 Sakamoto 所用的牙鲆是捕自日本近海,而本研究所用的牙鲆则捕自青岛近海,由于地理上的隔离,形成了不同的种群,其染色体数目发生变化而产生了牙鲆核型的

多态现象。这种多态现象在其它许多种鱼的染色体中也存在。如大西洋鲑 *Atlantic*

表 2 牙鲆染色体相对长度和臂比

Tab. 2 Relative length and arm ratio of chromosome of *Paralichthys olivaceus* (T. & S.)

染色体编号	相对长度	臂比	着丝点位置
1	5.66±0.23	∞	t
2	5.40±0.27	∞	t
3	5.17±0.18	∞	t
4	4.99±0.10	∞	t
5	4.86±0.08	∞	t
6	4.77±0.09	∞	t
7	4.71±0.11	∞	t
8	4.59±0.10	∞	t
9	4.53±0.09	∞	t
10	4.45±0.07	∞	t
11	4.37±0.07	∞	t
12	4.28±0.07	∞	t
13	4.19±0.08	∞	t
14	4.10±0.07	∞	t
15	4.02±0.11	∞	t
16	3.89±0.12	∞	t
17	3.82±0.14	∞	t
18	3.71±0.10	∞	t
19	3.59±0.06	∞	t
20	3.43±0.08	∞	t
21	3.23±0.16	∞	t
22	2.95±0.15	∞	t
23	2.77±0.20	∞	t
24	2.50±0.27	∞	t

1) 刘静,1989,青岛近海六种海产鱼染色体组型的研究。

salmon 的威尔士, 斯堪的纳维亚种群的染色体 $2n = 58, NF = 74$; 其美国、加拿大各种群的染色体众数则波动在 53—60 之间, $NF = 72$; 大西洋鲑的前苏联各种群的染色体众数也不尽相同(Hartley et al., 1984)。又如鰕虎鱼类中的 *Gobius paganellus* 的染色体数目也是因取样的海域不同而不同, 有的是 45, 有的是 46, 有的则是 50 (Vitturi et al., 1984)。当然, 染色体的多态现象往往也是由不同的染色体重排引起的。由此, 本研究结果与日本学者的研究结果相异是可以理解的。

本研究通过对牙鲆受精卵进行冷休克处理以抑制第二极体的排出, 即它们没有完成第二次减数分裂而形成具有牙鲆二倍体全套染色体的卵, 然后二倍的卵原核与含有一组由父本来的染色体的正常精原核结合就可以获得牙鲆三倍体。由于均为同源, 在有丝分裂时每一个染色体都可以找到和它们相应的亲和力强的染色体匹配在一起, 故本研究把相应的 3 个染色体并列在一起编制出三倍体的核型图。

本研究经过大量实验可以证明, 对原肠期的胚胎亦能够采用常规空气干燥法、Giemsa 染色获得染色体片。其染色体分裂相清晰、理想, 染色体计数直接而精确。进行鱼类三倍体的诱导研究需要及时了解诱导的效果, 在原肠胚期即进行倍性鉴定是很必要的。倍性鉴定的方法很多, 诸如红血球体积测量法、DNA 含量测定法和生化分析法等。本文采用的方法是中期原肠胚染色体片法, 可以获得较可靠的结果。另外, 该法简单易行且时间短, 在实验现场即可操作。故采用原肠胚染色体片直接计数染色体, 获得二倍体染色体组型和三倍体的诱导率既简单又可靠。

参 考 文 献

- 尤锋等, 1991, 黑鲷三倍体人工诱导的初步研究, 海洋与湖沼, 22(5): 489—491。
 尤锋, 1993, 黑鲷三倍体的人工诱导研究, 海洋与湖沼, 24(3): 248—255。
 苏泽古、许克圣和白国栋, 1983, 草鱼三倍体及其核型的研究, 鱼类学论文集(第三辑), 科学出版社(北京), 54—60。
 吴清江、叶玉珍和陈荣德, 1986, 鲤鱼染色体组人工调控的核型证明, 水生生物学报, 10(3): 265—270。
 桂建芳等, 1990, 鱼类染色体组操作的研究 I. 静水压休克诱导三倍体水晶彩鲫, 水生生物学报, 14(4): 336—343。
 谷口顺彦, 1986, 染色体倍化技術と鱼类育種(上), 水产の研究, 5(5): 86—90。
 Hartley, S. E. and Horne, M. T., 1984, Chromosome polymorphism and constitutive heterochromatin in the Atlantic salmon, *Salmo salar*, *Chromosoma* (Berl.), 89: 377—380。
 Levan, A. et al., 1964, Nomenclature for centromeric position on chromosomes, *Hereditas*, 52: 201—220。
 Nogusa, S., 1960, A comparative study of the chromosomes in fish with particular consideration on taxonomy and evolution, *Mem. Hyogo. Univ. Agric.*, 3(1): 1—62。
 Purdom, C. E., 1972, Induced polyploidy in plaice (*Pleuronectes platessa*) and its hybrid with the flounder (*Parichthys flesus*), *Heredity*, 29: 11—24。
 Sakamoto, K. and Nishikawa, S., 1980, Chromosomes of three flatfishes (Pleuronectiformes), *Jap. Jour. Ichthy.*, 27(3): 268—272。
 Sugama, K. and Taniguchi, N., 1988, Isozyme expression of artificially induced ploidy in red sea bream, black sea bream and their hybrid, *Rep. Usa. Mar. Biol. Inst., Kochi Univ.*, 10: 75—81。
 Vitturi, R. et al., 1984, Chromosome polymorphism in *Gobius paganellus*, Linneo 1758 (Pisces, Gobiidae), *Biol. Bull.*, 167(3): 658—668。

KARYOTYPE EVIDENCES OF TRIPLOIDY IN THE LEFT-EYED FLOUNDER, *PARALICHTHYS OLIVACEUS* (T. & S.)

You Feng, Liu Jing

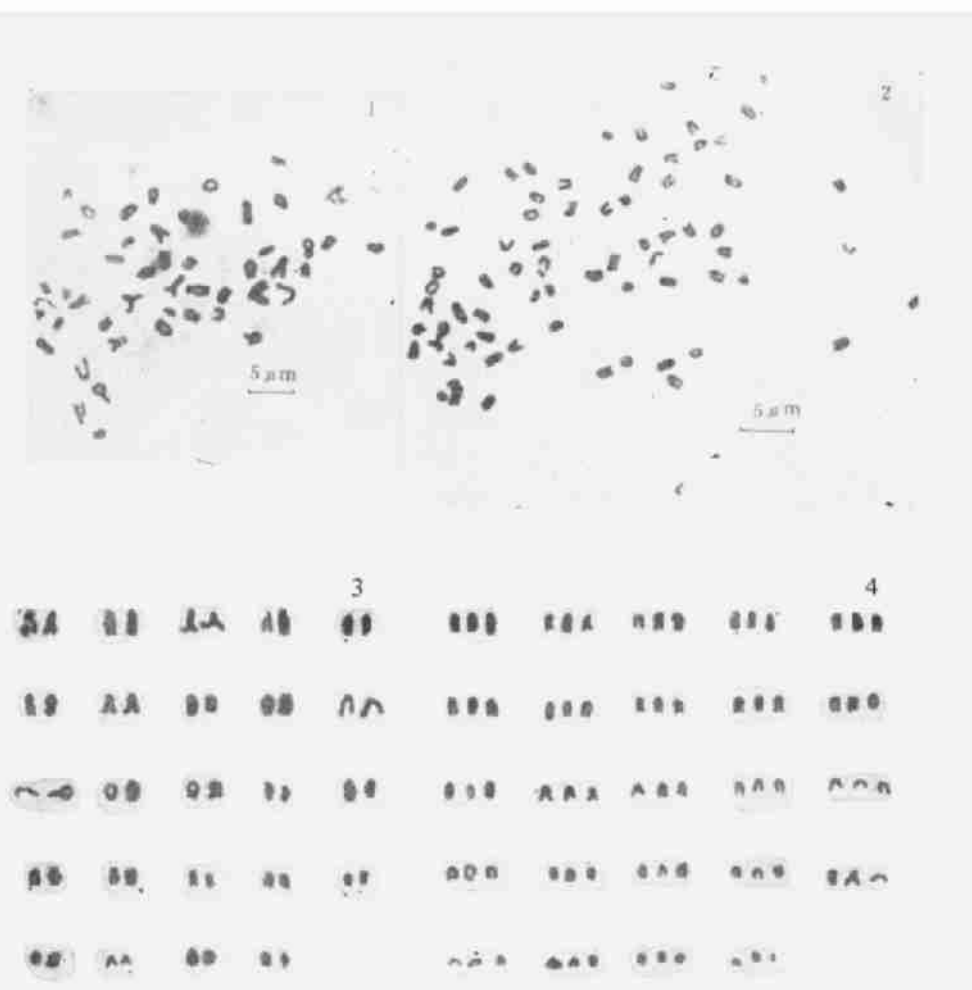
(*Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao 266071*)

ABSTRACT

Studies on triploidy induction in the left-eyed flounder, *Paralichthys olivaceus* (T. & S.) from the coast of Qingdao were carried out using cold-shock technique (0—4°C) in 1990, 1993 and 1994 in Qingdao. The triploid left-eyed flounder were obtained and cultured under normal conditions. This paper presents karyotype evidences of induced triploidy and diploid left-eyed flounder. Samples for chromosome studies of diploidy and induced triploidy were prepared according to the routine air-dried method and stained with a Giemsa solution. Observation under microscope reveals that there are 48 chromosomes in diploidy which are acrocentric chromosomes and its karyotype formula is $24t, NF = 48$, while in triploidy there are 72 chromosomes which are also acrocentric chromosomes and its arm number $NF = 72$.

The different chromosome numbers of diploidy in the left-eyed flounder obtained in this study were different from those of Nogosu (1960) and Sakamoto et al. (1980). We consider that there might be polymorphism in karyotypes of the left-eyed flounder due to the different geological populations. This study also showed that the early stage of triploidy in the left-eyed flounder could be identified very well in the gastrula stage and that its triploid karyotype is made on the basis of the diploid karyotype and the resources of chromosomes.

Key words *Paralichthys olivaceus* (T. & S.) Diploidy Triploidy Karyotype



图版 I 牙鲆二倍体、三倍体的中期分裂相及其核型

Plate I The metaphase chromosomes and karyotypes of diploidy induced triploidy in *Paralichthys olivaceus* (1 & 2.)

1. 二倍体的中期分裂相; 2. 三倍体的中期分裂相; 3. 二倍体的核型; 4. 三倍体的核型。