

蔡惠萍¹，林茂德²，趙乃賢¹

¹ 台灣省水產試驗所 水產養殖系

² 東海大學 生物系

(1996 年 6 月 23 日接受)



四種水產動物（泥鰍、斑馬魚、牡蠣及文蛤）核型之探討

摘要

本文旨在探討泥鰍 *Misgurnus anguillicaudatus*、斑馬魚 *Brachydanio rerio*、牡蠣 *Crassostrea gigas* 與文蛤 *Meretrix lusoria* 核型的製作與分析。試驗係以胚體為材料，取其細胞分裂旺盛，容易取得分裂中期 Metaphase 細胞的優點。研究結果發現，泥鰍的染色體數 $2n=48$ ，包含二對 Metacentric，八對 Submetacentric，一對 Subtelocentric，其餘十三對是 Telocentric。斑馬魚的染色體數也是 $2n=48$ ，包含三對 Metacentric，十七對 Submetacentric 與四對 Subtelocentric。至於牡蠣其染色體數目 $2n=20$ ，包括十對 Metacentric。而文蛤染色體數 $2n=50$ ，分別為十對 Metacentric，十四對 Submetacentric 與一對的 Subtelocentric 者。

關鍵詞：核型，染色體，泥鰍，斑馬魚，牡蠣，文蛤

染色體製作是檢驗生物染色體數量及特性變異的簡便方法。藉著適當的秋水仙素 Colchicine 或秋水仙胺 Colcemid 處理以及 Giemsa 染劑染色，可以獲得細胞分裂中期 (Metaphase) 的短棒狀染色二分體，再依其大小、形狀，可排列出各生物種特有的核型 (Karyotype)。

Giemsa 染劑染色配合染色體之特殊處理（如 Trypsin 處理）可使染色體呈現寬窄深淺有別的染色條紋，各代表不同的染色體分段，載有不同基因。檢驗比較染色體核型及 Giemsa 染色條紋，即可初步診斷大片的染色體的構造變異。該種檢驗技術在遺傳學及醫學界早已行之有年，對篩檢新生兒以早期發現遺傳性疾病，貢獻卓著^(1,2)。水產研究方面，染色體製作以往主要應用在分類，如魚類之種別鑑定上⁽³⁻⁸⁾，或貝類之種別性⁽⁹⁻¹¹⁾，或甲殼類者^(12,13)，或在雌雄鑑別上^(14,15)，以及在多倍體檢定上⁽¹⁶⁻¹⁹⁾。前者主要在比較各生物間核型的差異；後者則以計算染色體數目為主。本試驗是利用實驗室經常使用之試驗魚種，如泥鰍 *Misgurnus anguillicaudatus*、斑馬魚 *Brachydanio rerio* 以及本省主要之二種經濟貝類牡蠣 *Crassostrea gigas*、文蛤 *Meretrix lusoria* 進行染色

體製作，計算其二倍體之染色體數目及分析其核型，期建立未來本省常見魚貝介類之染色體製作與核型分析之基礎。

材料與方法

可以用來製作魚貝介類染色體的組織很多⁽²⁰⁾，但仍以分裂旺盛的細胞群如鰾、腎、胚、腸及孵化不久的稚魚為佳。由於泥鰍、斑馬魚、牡蠣及文蛤皆容易藉人工繁殖取得胚體，因此，本試驗均以其胚體作為材料。

一、泥鰍

將雄泥鰍及雌泥鰍分別注射大頭鰱腦下垂體，於八～十二小時後，進行擠卵；另外，解剖並取出雄泥鰍的精巢於淡水魚生理食鹽水中研磨後與卵充分混合受精。約受精後二十小時，當受精卵發育至胚體初具魚形時，即將受精卵置於淡水魚生理食鹽水中，在解剖顯微鏡下除去卵膜，將胚體取出置於 0.02% 之秋水仙素溶液中六小時，使細胞停留在分裂中期。然後，將胚體除去卵黃，以 0.075 M 之 KCl 低張溶液

浸泡四十分鐘，再取出胚體以固定液 (Carnoy solution，甲醇：冰醋酸=3：1) 固定一小時。其中每十分鐘更換一次固定液，至少換二次。浸泡在固定液中的組織，可在低溫下長期保存，或於固定後將胚體夾出置於備好之載玻片上，待固定液稍乾，加 50 % 醋酸溶液，並注意隨時添加勿使其乾燥。以解剖刀剝碎魚體至肉眼看不見之細胞懸浮液。另外，以載玻片加熱器 (Slide warmer) 加熱載玻片 (30 ~ 50°C)，用滴管吸取細胞懸浮液，由高處滴下在加熱的載玻片上，讓其自行乾燥，自然形成細胞環。待烘乾後，以 5 % Giemsa 染劑染色四十分鐘後取出，用水稍加沖洗，置於室溫下自然風乾後，即可置於光學顯微鏡下鏡檢。核型分析是參用 Levan et al.⁽²¹⁾ 的方法，將鏡檢中有絲分裂中期的染色體，進行照像及測量其長短臂的臂比。經由大小配對排列和分析而得，其分類定義如 Table 1 所示。

二、斑馬魚

斑馬魚之人工繁殖可將雌魚與雄魚分開飼育，待雌魚腹部明顯膨大時，即可與雄魚放在一起，使其自然排卵受精。收集受精卵後之處理流程與分析皆與上述之泥鰱相同。

三、牡蠣、文蛤

自雌、雄牡蠣個體分別吸取卵、精，在海水中直接

進行受精、洗卵。而文蛤之人工繁殖則採乾出法，將文蛤拿出水面一段時間後，再浸泡回水中，即可誘發其排卵、排精，將之適量混合受精。兩者皆在取得受精卵後，待其發育至擔輪子期 (Trochophore)，即將其置於海水無脊椎生理食鹽水配製之 0.02% 秋水仙素溶液中四十分鐘，再以 25% 海水進行低張處理二十五分鐘，即可以固定液進行細胞的固定及染色體的製作，其後續處理流程與分析皆與泥鰱、斑馬魚相同。

結 果

一、泥鰱

以泥鰱胚體所得之染色體，經由觀察一百一十二個分裂中期的胚體細胞，得其染色體數 $2n=48$ (二十四對) (Fig. 1)。並由其染色體測定，得其核型包含二對 Metacentric，八對 Submetacentric；一對 Subtelocentric；其餘十三對是 Telocentric 型染色體。其核型如 Table 2 及 Figs. 2 & 3 所示。

二、斑馬魚

以斑馬魚胚體所得之染色體，經由觀察七十一個達染色體分裂中期的胚體細胞，得其染色體數 $2n=48$ (二十四對) (Fig. 1)。並由其染色體測定，得其核型包含三對 Metacentric，十七對 Submetacentric；四對 Subtelocentric 型染色體。其核型如 Table 3 及 Figs. 4 & 5 所示。

Table 1. The classification of chromosome.

Type	Long arm : Short arm
Telocentric (T) = Acrocentric	7.0 - ∞
Subtelocentric = Subterminal (ST)	3.0 - 7.0
Submetacentric (SM)	1.7 - 3.0
Metacentric (M)	1.0 - 1.7

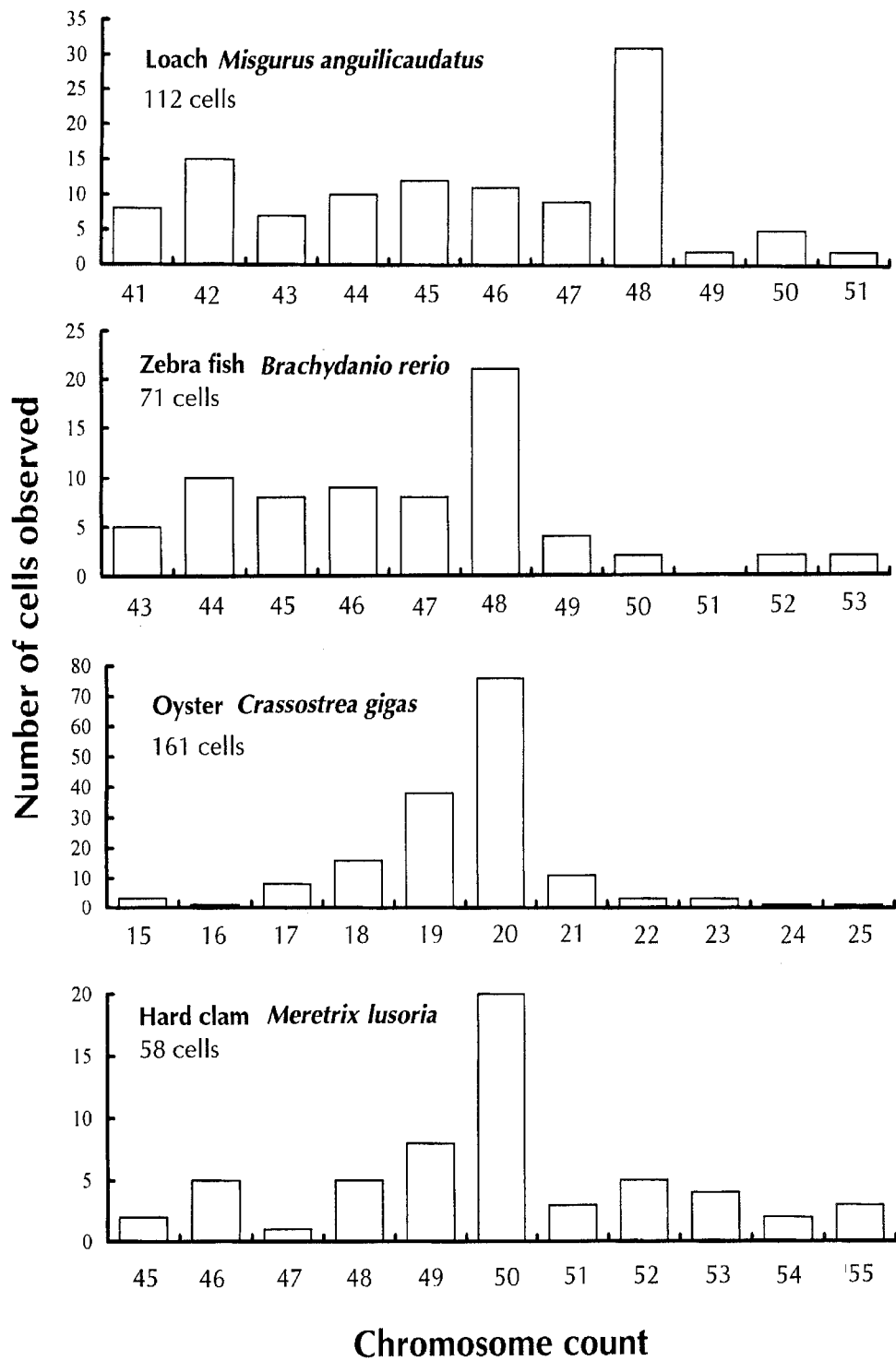


Fig. 1. Distribution of the diploid chromosome numbers counted in cells of loach *Misgurnus anguilicaudatus*, zebra fish *Brachydanio rerio*, oyster *Crassostrea gigas* and hard clam *Meretrix lusoria*.

Table 2. Mean length and arm ratio of metaphase chromosomes in the cells from larvae of loach *Misgurnus anguillicaudatus*.

Single space	Length(μ m)		Arm ratio		Type
	Mean	S.D.	Mean	S.D.	
1	4.56	0.61	1.24	0.16	M
2	3.74	0.46	2.35	0.35	SM
3	3.31	0.47	1.84	0.74	SM
4	3.10	0.43	1.99	0.77	SM
5	2.95	0.32	1.33	0.22	M
6	2.94	0.62	--	--	T
7	2.76	0.39	1.97	0.91	SM
8	2.65	0.56	--	--	T
9	2.65	0.38	1.75	0.97	SM
10	2.56	0.51	2.45	0.60	SM
11	2.52	0.41	2.69	0.81	SM
12	2.42	0.44	--	--	T
13	2.35	0.39	--	--	T
14	2.31	0.47	2.12	0.68	SM
15	2.22	0.34	--	--	T
16	2.17	0.32	--	--	T
17	2.10	0.34	--	--	T
18	2.00	0.33	--	--	T
19	2.00	0.48	3.27	1.52	ST
20	1.95	0.34	--	--	T
21	1.88	0.32	--	--	T
22	1.81	0.29	--	--	T
23	1.74	0.26	--	--	T
24	1.44	0.22	--	--	T

三、牡蠣

以牡蠣胚體所得之染色體，經由觀察一百六十一個達染色體分裂中期的胚體細胞，得其染色體數 $2n=20$ (十對) (Fig. 1)。並由其染色體測定，得其核型包含十對 Metacentric 型染色體。其核型如 Table 4 及 Figs. 6 & 7 所示。

四、文蛤

以文蛤胚體所得之染色體，經由觀察五十八個達染色體分裂中期的胚體細胞，得其染色體數 $2n=50$ (二十五對) (Fig. 1) 並由其染色體測定，得其核型包含十對 Metacentric，十四對 Submetacentric；與一對 Subtelocentric 型染色體。其核型如 Table 5 及 Figs. 8 & 9 所示。

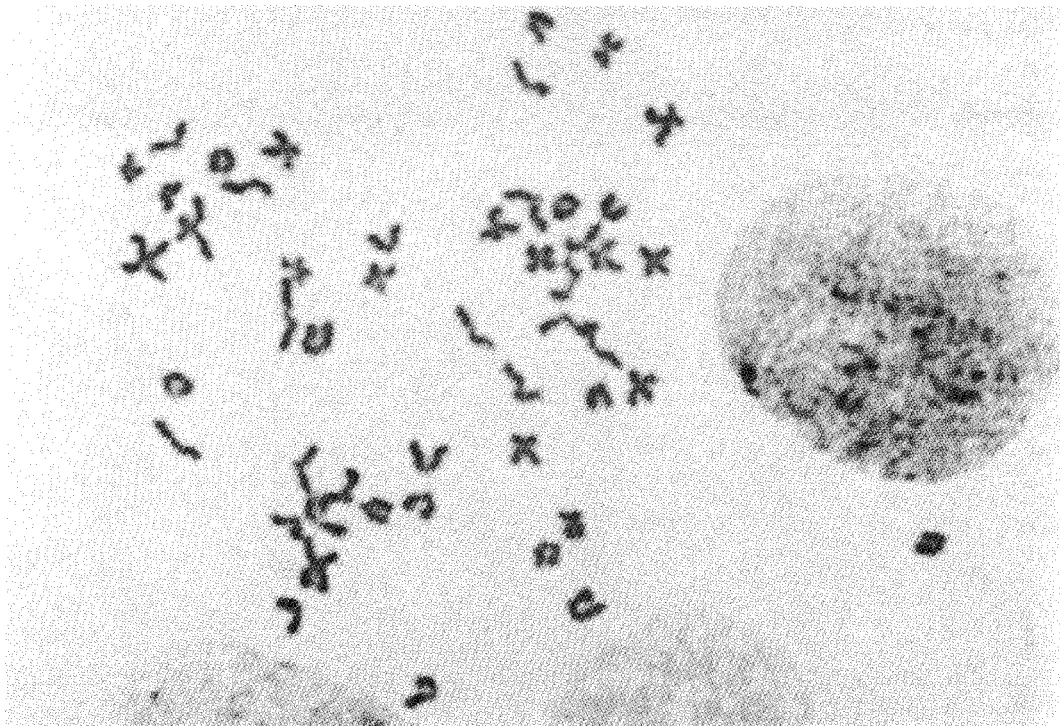


Fig. 2. Mitotic metaphase chromosomes of loach *Misgurnus anguilicaudatus* larvae.

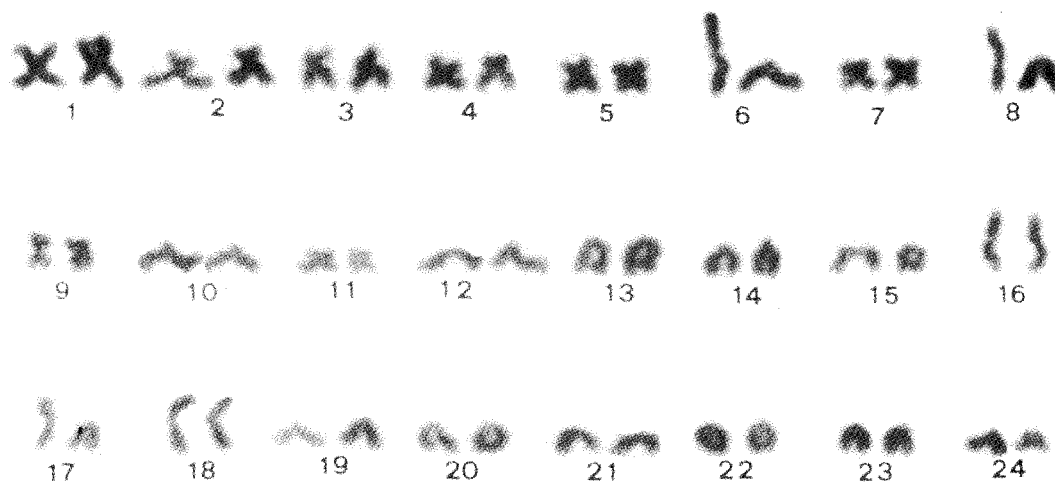


Fig. 3. The diploid karyotype of loach *Misgurnus anguilicaudatus* (Scale : 5 μ m).

Table 3. Mean length and arm ratio of metaphase chromosomes in the cells from larvae of zebra fish *Brachydanio rerio*.

<i>Chromosome pair</i>	<i>Length (μm)</i>		<i>Arm ratio</i>		<i>Type</i>
	<i>Mean</i>	<i>S.D.</i>	<i>Mean</i>	<i>S.D.</i>	
1	4.44	0.75	2.22	0.18	SM
2	4.25	0.65	1.68	0.19	M
3	4.21	0.74	3.24	0.19	ST
4	3.78	0.44	2.98	0.16	SM
5	3.77	0.50	2.32	0.21	SM
6	3.62	0.55	3.89	0.45	ST
7	3.62	0.63	1.75	0.05	SM
8	3.61	0.64	1.40	0.27	M
9	3.60	0.71	2.51	0.48	SM
10	3.45	0.49	2.15	0.28	SM
11	3.29	0.38	1.88	0.10	SM
12	3.30	0.45	2.46	0.24	SM
13	3.18	0.31	1.74	0.33	SM
14	3.22	0.43	3.19	0.08	ST
15	3.12	0.45	2.28	0.20	SM
16	3.11	0.42	2.52	0.34	SM
17	2.97	0.42	2.89	1.07	SM
18	2.95	0.55	1.83	0.33	SM
19	2.73	0.39	2.50	0.18	SM
20	2.71	0.38	2.41	0.12	SM
21	2.71	0.39	1.52	0.27	M
22	2.56	0.36	3.01	0.22	ST
23	2.55	0.43	1.98	0.30	SM
24	2.44	0.36	2.02	0.22	SM

討 論

近年來，水產生物遺傳工程的發展非常快速，不論在細胞融合、基因轉殖及基因序列的探討等各方面都有長足的進展。而其中各種生物染色體核型的製作與分析，可說是探討遺傳奧秘最基礎的研究。瞭解了一種生物染色體的套數與配對的情形，對該生物遺傳物

質的研究很有幫助。

由 Table 6 可以看出泥鰱、斑馬魚、牡蠣、文蛤這四種不同的生物，其染色體除數目不同外，不同染色體臂比種類所佔的比例也不盡相同。同時，由此所發育出的個體也大不相同，各具種別性。這佐證了控制生物形態、發育與生理的遺傳物質是存在細胞核中的染色體上。

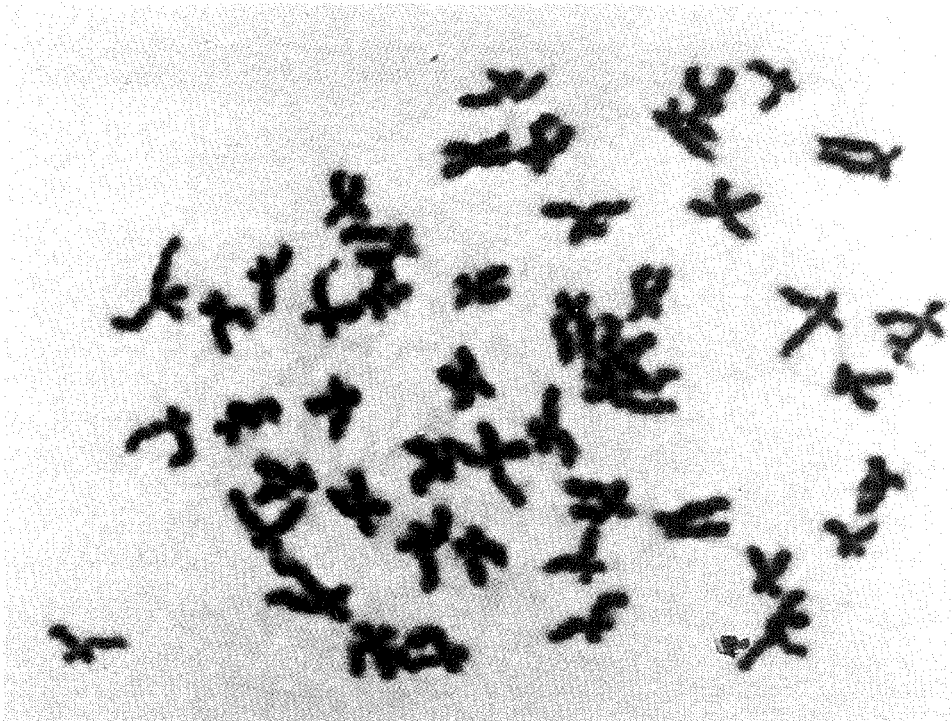


Fig. 4. Mitotic metaphase chromosomes of zebra fish *Brachydanio rerio* larvae.

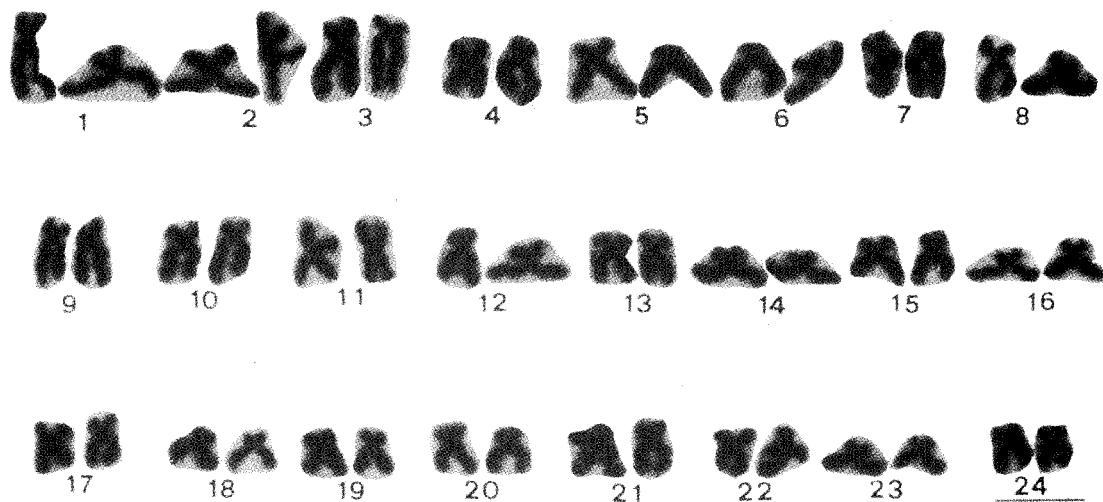


Fig. 5. The diploid karyotype of zebra fish *Brachydanio rerio* (Scale : 5 μ m).

Table 4. Mean length and arm ratio of metaphase chromosomes in the cells from trochophore of oyster *Crassostrea gigas*.

Chromosome pair	Length(μ m)		Arm ratio		Type
	Mean	S.D.	Mean	S.D.	
1	4.49	0.71	1.30	0.15	M
2	3.90	0.39	1.46	0.27	M
3	3.88	0.37	1.41	0.54	M
4	3.78	0.42	1.27	0.17	M
5	3.62	0.35	1.43	0.25	M
6	3.49	0.33	1.45	0.34	M
7	3.35	0.34	1.29	0.17	M
8	3.23	0.32	1.39	0.31	M
9	3.06	0.30	1.37	0.16	M
10	2.76	0.31	1.36	0.22	M

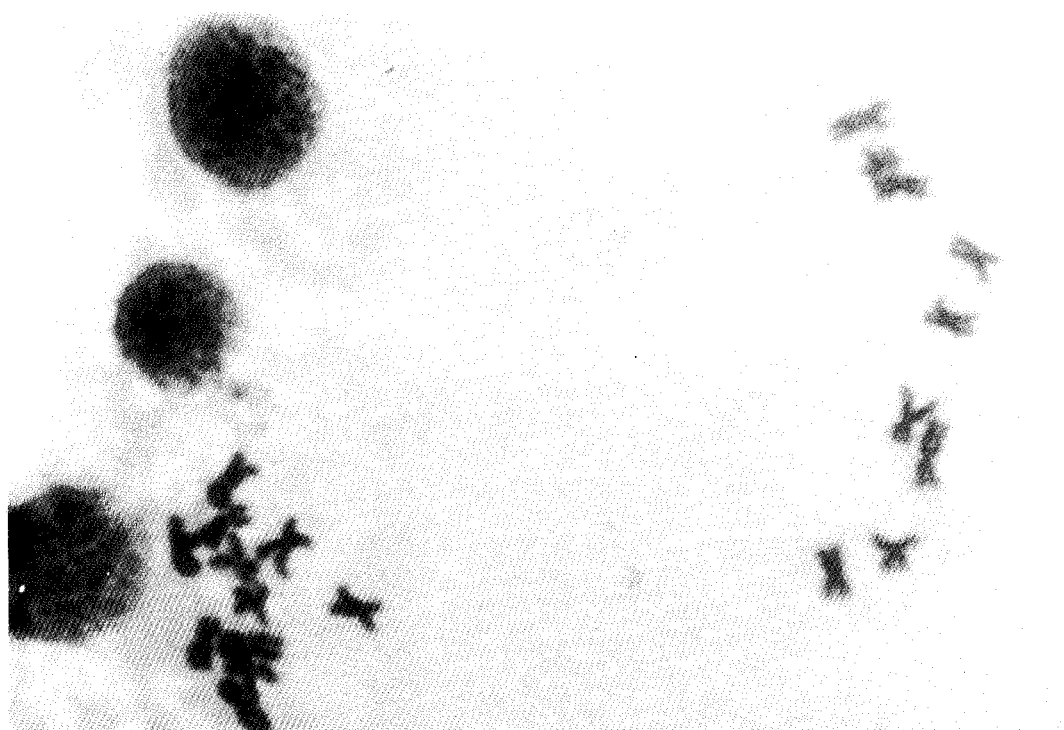


Fig. 6. Mitotic metaphase chromosomes of oyster *Crassostrea gigas* trochophore larvae.

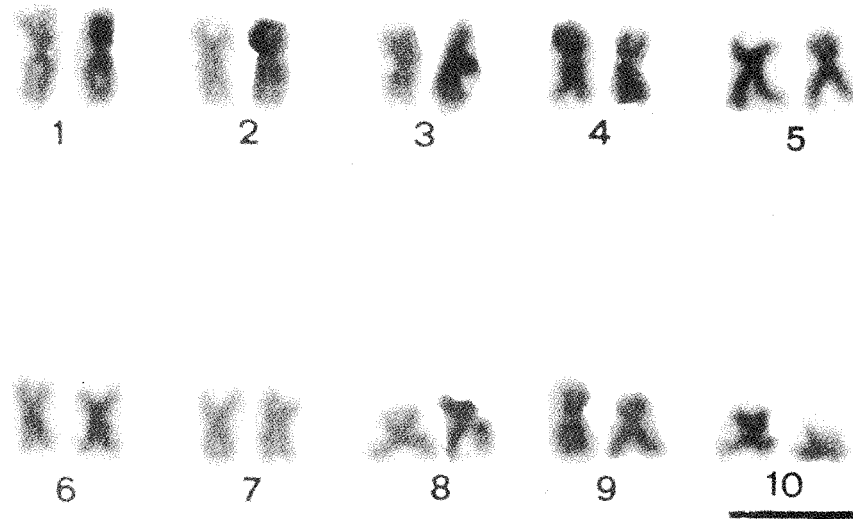


Fig. 7. The diploid karyotype of oyster *Crassostrea gigas* (Scale : 5 μ m).

在染色體的製作上，魚類的細胞比哺乳類為小，而且染色體的形體小、數目多，研究上之困難因而增多。在製作過程中，低張溶液處理得宜與否，影響染色體展開情形至鉅。另外，固定時經多次處理且一再更新固定液與單一次處理之比較結果發現，雖累計時間一樣，前者顯然較佳，而且每次以使用新鮮配製之固定液為宜。醋酸溶液有助細胞的分離及染色體的收縮，但濃度過高則會使染色體收縮過度而變形⁽²²⁾，有礙形狀觀察。

通常染色體製作出來後，有些略嫌擁擠，有些收縮過度，有些流散太開，有些則二、三組作部份重疊，未盡人意者不少，所以判定一生物種的染色體數量及核型時，必須製作甚多樣本方可確認。本實驗中即對供試之四種魚貝，在顯微鏡觀察下分別檢視了一百一十二、七十一、一百六十一及五十八個適當展開染色

體的胚體細胞後，才給予確認。

水產生物染色體的製作，除以鰓、胚、腎、腸、稚魚等活體為材料外，具再生能力之低等水產生物亦可利用其再生組織作為供試材料。此外，更可利用體外細胞培養的方式來獲得大量分裂旺盛的細胞^(20,22,23)其效果頗佳，值得嘗試。原本以胚體、稚魚作為材料時，都會造成個體的死亡，倘若改採體外細胞培養，因只取個體的部份組織（如鰓），個體則尚可繼續生存下去，不致造成某些試驗的中斷，這是以體外細胞培養為材料的特點之一。

本試驗試依染色體形狀與長度的差異排列出染色體的核型，並計算染色體平均長度與臂比。但因某些染色體的形狀、長度非常相似，在比較上頗為困難，所以，排列出之核型仍有待進一步以更進階之處理方式所獲得染色體明暗帶（Band）的分析結果來確定。

Table 5. Mean length and arm ratio of metaphase chromosomes in the cells from trochophore of hard clam *Meretrix lusoria*.

<i>Chromosome pair</i>	<i>Length (μ m)</i>		<i>Arm ratio</i>		<i>Type</i>
	<i>Mean</i>	<i>S.D.</i>	<i>Mean</i>	<i>S.D.</i>	
1	3.58	1.12	1.23	0.15	M
2	3.46	0.98	1.40	0.20	M
3	3.28	1.00	2.28	0.56	SM
4	3.23	0.92	1.47	0.40	M
5	3.10	0.85	3.97	0.81	ST
6	3.08	0.91	1.19	0.19	M
7	2.94	1.00	2.57	0.49	SM
8	2.93	0.94	1.53	0.25	M
9	2.93	0.89	2.05	0.24	SM
10	2.88	0.84	2.23	0.46	SM
11	2.87	0.88	2.89	0.49	SM
12	2.78	0.83	1.20	0.17	M
13	2.74	0.84	2.43	0.32	SM
14	2.67	0.83	2.84	0.48	SM
15	2.67	0.81	1.77	0.37	SM
16	2.61	0.77	1.27	0.20	M
17	2.59	0.84	2.09	0.28	SM
18	2.53	0.79	2.37	0.25	SM
19	2.50	0.79	1.89	0.21	SM
20	2.47	0.73	1.31	0.18	M
21	2.39	0.75	1.84	0.12	SM
22	2.38	0.70	2.31	0.24	SM
23	2.25	0.62	1.67	0.41	M
24	2.19	0.57	1.91	0.28	SM
25	2.03	0.55	1.62	0.26	M

關於染色體的平均長度，由於染色體的長度受到藥品（主要是秋水仙素）的影響很大，處理時間愈久，長度愈短，而且細胞開始分裂的時間不一，所以受到秋水仙素影響的時間也不一樣。因此，不同的細胞產生出長度差異很大的染色體。另外，也可能受到藥

品濃度影響⁽²⁴⁾ 或是因來自不同組織所產生的差異⁽¹⁰⁾，顯示出來的染色體長度變異非常大，因此，本文中之數據僅係提供基本參考資料。總之，今後若能加上明暗帶之分析資料加以佐証，必能獲得更正確的核型。

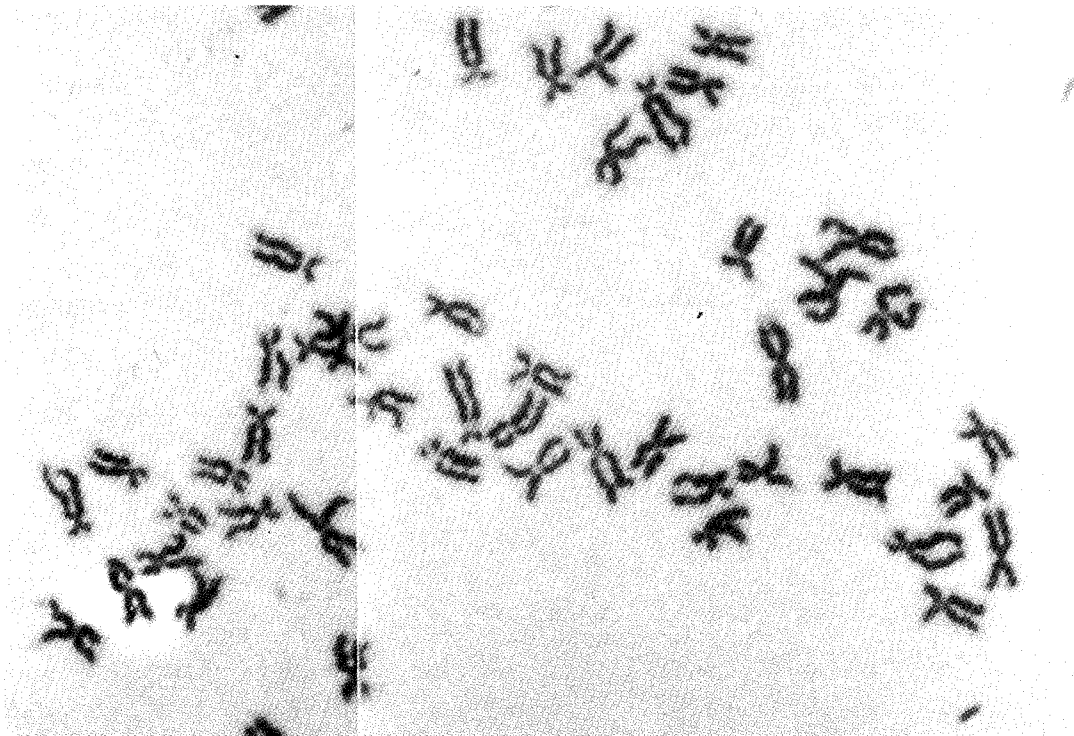


Fig. 8. Mitotic metaphase chromosomes of hard clam *Meretrix lusoria* trochophore larvae.

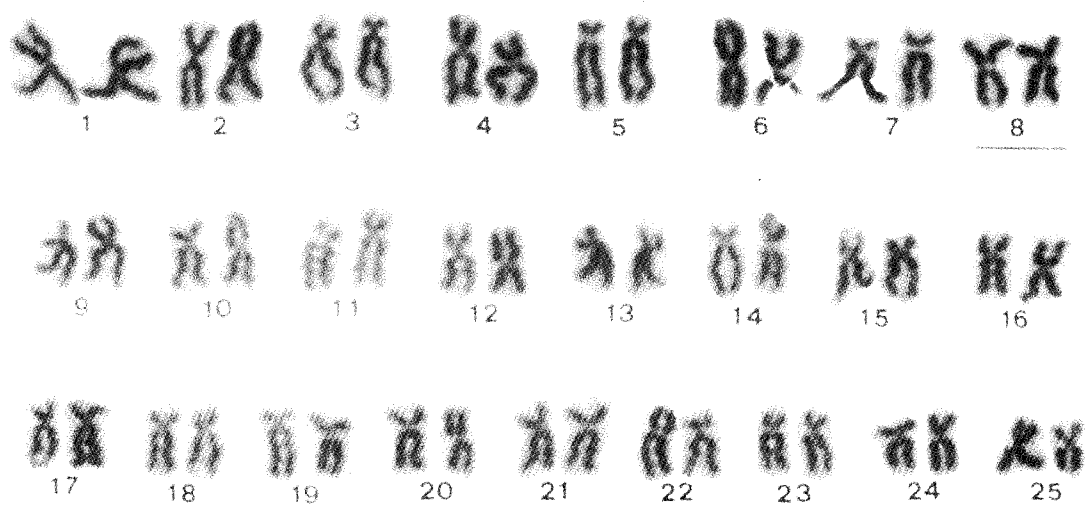


Fig. 9. The diploid karyotype of hard clam *Meretrix lusoria* (Scale : 5 μ m).

Table 6. Karyotypes in four species of aquatic organisms in this study.

Species	N	Karyotype			
		M	SM	ST	T
<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	24	2	8	1	13
<i>Brachydanio rerio</i>	24	3	17	4	--
<i>Crassostrea gigas</i>	10	10	--	--	--
<i>Meretrix lusoria</i>	25	10	14	1	--

謝辭

本報告得以順利完成承蒙所長廖一久博士的鼓勵與支持暨系主任徐崇仁博士之鼎力協助，謹此一併敬致謝忱。

參考文獻

- 黃仲嘉 (1984) 人類染色體疾病. 科學月刊, 15(11): 863-866.
- 武光東 (1984) 遺傳疾病簡介—兼談新生兒篩檢的意義. 科學月刊, 15(11): 867-869.
- Marian, T. and Z. Krasznai (1978) Kariological investigations on *Ctenopharyngodon idella* and *Hypophthalmochthy nobilis* and their cross-breeding. Aquacult. Hung., 1: 44-50.
- Murofushi, M. and T. H. Yosida (1979) Cytogenetical studies on fishes, II. Karyotypes of four carangid fishes. Japan. J. Genet., 54(5): 367-370.
- Ida, H. and K. Yunokawa (1980) Karyotypic variation found among five species of the family Platycephalidae. Japan. J. Ichthyol., 27(2): 122-128.
- Murofushi, M., S. Nishikawa and T. H. Yosida (1984) Cytogenetical studies on fishes, IX. Karyological comparison of two species in snipefishes. Japan. J. Genet., 59: 155-158.
- Ida, H. and T. Asahida (1986) Karyotypes of two sharks, *Chlamydoselachus anguineus* and *Heterodontus japonicus*, and their systematic implications. In Indo-Pacific Fish Biology: Proceedings of the Second International Conference on Indo-Pacific Fishes. Ichthy. Soc. Japan, Tokyo, 158-163.
- Yamazaki, F., K. Arai and T. Terao (1987) Chromosomes of the hybrids between Masu salmon and Chinook salmon. Bull. Fac. Hokkaido Univ., 38(1): 34-37.
- 和田克彦, 古丸明 (1985) ウグイスガイ科5種の核型. 貝類 VENUS, 44(3): 183-192.
- Komaru, A. and K. T. Wada (1985) Karyotype of the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata* Martensii, observed in the trochophore larvae. Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult., 7: 105-107.
- 古丸明, 和田克彦 (1985) イタヤガイ科4種の核型. 貝類 VENUS, 44(4): 249-259.
- Murofushi, M., Y. Deguchi and T. H. Yosida (1984) Karyological study of the red swamp crayfish and the Japanese lobster by air-drying method. Proc. Japan Acad., 60(B): 306-309.
- 室伏誠, 小田垣寧, 井上辰彦, 出口吉昭 (1989) カニ類11種の染色體. 日大生活科研報, 12: 25-34.
- Murofushi, M., S. Oikawa, S. Nishikawa and T. H. Yosida (1980) Cytogenetical studies on fishes. III. Multiple sex chromosome mechanism in the filefish, *Stephanolepis cirrifer*. Japan. J. Genet., 55(2): 127-132.
- Murofushi, M., S. Nishikawa and T. H. Yosida (1983) Cytogenetical studies on fishes. V. Multiple sex chromosome mechanism (XX-Y) found in two dragonet fishes. Proc. Japan Acad., 59(B): 58-61.
- Stanley, J. G., S. K. Allen Jr. and H. Hida (1981) Polyploidy induced in the American oyster, *Crassostrea virginica*, with cytochalasin B. Aquaculture, 23: 1-10.
- Chaiton, J. A. and S. K. Allen Jr. (1985) Early detection of triploidy in the larvae of Pacific oyster, *Crassostrea*

- gigas*, by flow cytometry. *Aquaculture*, **48**: 35-43.
18. Arai, K., F. Naito and K. Fujino (1986) Triploidization of the Pacific abalone with temperature and pressure treatments. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **52**(3): 417-422.
19. Kudo, M., K. Arai, and K. Fujino (1991) Triploidization of *Haliotis diversicolor* by cold shock. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**(7) : 1263-1267.
20. Blexhall. P. C. (1975) Fish chromosome techniques - a review of selected literature. *J. Fish. Biol.*, **7**: 315-320.
21. Levan, A., K. Fredga and A. A. Sandberg (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, **52** : 201-220.
22. Kligerman, A. D. and S. T. Bloom (1977) Rapid chromosome preparations from solid tissues of fish. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **34**: 266-269.
23. Li, S. Y., T. C. Jou and M. C. Chow (1983) A chromosomal study on mentally retarded children in the Taichung area. *Proc. Natl. Sci. Counc. B. ROC*, **7**(4): 474-480.
24. Moynihan, E. P. and G. A. T. Mahon (1983) Quantitative karyotype analysis in the mussel, *Mytilus edulis* L. *Aquaculture*, **33**: 301-309.

Hui-Ping Tsai¹, Mao-Der Lin² and Nai-Hsien Chao¹

¹Department of Aquaculture, Taiwan Fisheries Research
Institute, 199 Hou-lh Rd., Keelung 202, Taiwan.

²Department of Biology, Tunghai University
Taichung 407, Taiwan.

(Accepted 23 June 1996)



Karyotypes of Four Species of Aquaculture Animals, Loach *Misgurnus anguilicaudatus*, Zebra Fish *Brachydanio rerio*, Oyster *Crassostrea gigas* and Hard Clam *Meretrix lusoria*

Abstract

The karyotypes of loach *Misgurnus anguilicaudatus*, zebra fish *Brachydanio rerio*, oyster *Crassostrea gigas* and hard clam *Meretrix lusoria* were obtained using embryo chopping method.

The diploid chromosome numbers of each species are as follows, (a) loach: 48, including 2 pairs of metacentric, 8 pairs of sub-metacentric, 1 pair of subtelocentric, and the other 13 pairs are telocentric chromosomes; (b) zebra fish: 48, including 3 pairs of metacentric, 17 pairs of submetacentric, 4 pairs of subtelocentric ones; (c) oyster: 20, including 10 pairs of metacentric ones; (d) hard clam: 50, including 10 pairs of metacentric, 14 pairs of submetacentric and 1 pair of subtelocentric ones.

Keywords: Karyotype, Chromosome, Loach, Zebra fish, Oyster, Hard clam