

# 夏牙鲆 ( ) 与牙鲆 ( ) 人工杂交的细胞遗传学初步研究

尤 锋<sup>1</sup>, 徐世宏<sup>1</sup>, 许建和<sup>1,2</sup>, 徐冬冬<sup>1</sup>, 马道远<sup>1</sup>, 张培军<sup>1</sup>, 李 军<sup>1</sup>

(1.中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 淮海工学院, 江苏 连云港 222005)

摘要: 于 2004 年 11 ~ 12 月在青岛薛家岛养鱼场采用夏牙鲆(*Paralichthys dentatus*)的精子与牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)的卵子实施了多次人工杂交实验, 并进行了父本母本鱼类个体、子代的染色体制片观察和细胞中 DNA 相对含量的流式细胞仪检测。结果表明, 夏牙鲆染色体数为 48, 核型为  $2n=48t$ 、臂数  $NF=48$ ; 子代的染色体数和核型与父母本的一样, 也为  $2n=48t$ ; 子代的细胞中 DNA 的相对含量也表明其为二倍体。因此, 可以明确其为杂交的后代, 而不是雌核发育。

关键词: 夏牙鲆 (*Paralichthys dentatus*); 牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*); 人工杂交; 细胞遗传  
中图分类号: Q321.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2006)03-0051-05

鲆鲽鱼类自 20 世纪 80 年代中期以来, 已经成为中国海水养殖业中重要的品种。其中的大多数种类都被成功地应用于工厂化养殖, 养殖范围也从北方发展到南方。但随着发展, 也像其他海水养殖生物一样, 由于种质的逐步退化和养殖环境的恶化, 使其病害频发、死亡严重, 养殖效益明显下降。所以, 迫切需要进行品种改良, 培育抗病性强和抗恶劣环境及生长快的新品种来替代目前养殖的野生种。

杂交育种是比较容易实施也能很快见效的一种方法, 它利用现有的品种或物种进行杂交, 从其后代选育出符合人们需要的基因组合。选择地理远缘的物种作为杂交亲本, 可以使它们的杂交后代出现多种多样类型, 比较容易从中获得符合要求的新类型<sup>[1]</sup>。海水鱼类的人工杂交研究不像淡水鱼类那样开展得很广泛, 仅限于少数几种鱼类, 而在中国开展研究的种类就更少, 主要有: 鮑状黄姑鱼和大黄鱼<sup>[2]</sup>、鲷科鱼类属内属间<sup>[3,4]</sup>、石鲽和牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)<sup>[5,6]</sup>, 因此非常有必要进行更多品种的杂交研究。

夏牙鲆(*Paralichthys dentatus*) 英文名为 summer flounder, 又称大西洋牙鲆、犬齿牙鲆, 隶属于鲽形目的牙鲆科(Paralichthidae) 牙鲆属(*Paralichthys*), 主要分布于美国的东部从罗德岛到南卡来罗娜州、佛罗里达州<sup>[7]</sup>, 是一种重要的经济鱼类。在美国, 20 世纪 70 年代开始进行了夏牙鲆的人工养殖实验, 真正的大规模生产则始于 20 世纪 90 年代<sup>[8]</sup>。中国是 2002

年开始由美国引进夏牙鲆进行养殖的, 夏牙鲆的适温范围和生长速度较本地牙鲆均具有明显优势, 在养殖中已经表现出这些特性<sup>[9,10]</sup>。为了改变中国养殖牙鲆品种单一和种质退化的局面, 作者利用引自美国的夏牙鲆雄鱼与产自中国的牙鲆雌鱼进行杂交获得了杂交子代。杂交鱼经近一年的养殖观察, 其成活率和生长状态都明显优于牙鲆, 极具开发利用前景。目前鲽形目鱼类的一些科间杂交如石鲽和牙鲆、牙鲆和星鲽等的研究都已有报道<sup>[5,6,11,12]</sup>, 但夏牙鲆牙鲆种间杂交尚未见报道。

作者对杂交获得的子一代及其夏牙鲆和牙鲆进行了染色体制片和流式细胞仪测定, 对其组型和细胞中 DNA 的相对含量进行了比较研究, 不仅可以明确其杂交子代的来源和倍性, 也为牙鲆夏牙鲆人工杂交后代研究和应用提供细胞遗传学背景资料。

## 1 材料与方法

于 2004 年 11 ~ 12 月, 由通过人工控温控光促

收稿日期: 2005-11-23; 修回日期: 2005-12-28

基金项目: 国家高技术研究发展(863)计划探索课题

(2002AA629160); 国家自然科学基金资助项目(30271036);

山东省自然科学基金资助项目

作者简介: 尤锋(1963-), 女, 山东青岛人, 副研究员, 博士, 研究方向: 鱼类遗传育种, E-mail: youfeng@ms.qdio.ac.cn

熟的亲本获得了夏牙鲆成熟精子和牙鲆成熟卵子,用半干湿法行人工授精,洗卵后,将受精卵置于水温 15.5~18 的海水中培育和孵化。

采取杂交鱼和牙鲆鱼的原肠期胚胎各 100~200 粒,进行秋水仙碱处理、0.075 mol/L KCl 低渗、卡诺氏液(甲醇:冰醋酸为 3:1)固定、滴片、空气干燥、15% Giemsa 染色等获得染色体制片;夏牙鲆,采取其苗种 3 尾经生物学测定后,腹腔注射秋水仙碱,约 3 h 后断尾放血,取头肾,用生理盐水清洗 2~3 遍,经上述的低渗、固定、滴片和染色等步骤获得其染色体制片。显微镜检查所获得的制片,每种鱼的染色体制片中选择 40 个以上染色体分散良好的中期分裂相进行计数。再各选择 10 个数目完整、分散良好、长度适中、形态清晰的分裂相,进行拍照、测量,按 Leven<sup>[13]</sup>标准对染色体进行分类和组型。

流式细胞仪检测 DNA 相对含量:采取 10 尾以上牙鲆、杂交鱼的初孵仔鱼和 3 尾夏牙鲆苗种的肌

肉,分别捣碎、过 260 目筛绢、DAPI 染色、PARTEC Cell Counter Analyser(CCA-II)细胞计数分析检测细胞中 DNA 相对含量。

## 2 结果

通过人工杂交,可以得到能正常发育的胚胎,并经孵化,获得外观正常的初孵仔鱼,在水温 15.5~18 下,时间约需要 68~78 h。初孵仔鱼 3~4 d 以后开口,用经富含高不饱和脂肪酸 EPA 和 DHA 的强化剂强化过的轮虫和卤虫无节幼体作为动物性饵料,至 20 d 左右加入从日本进口的人工配合微囊干饵料,饵料大小从 250 μm 逐渐增大至粒径为 1 mm 的湿颗粒饵料。育苗期间,仔鱼的死亡率很低。

### 2.1 亲本和杂交子一代的染色体数目

根据中期分裂相镜检结果统计,夏牙鲆、牙鲆及其杂交子一代染色体众数均为 48,即  $2n=48$ (表 1)。

表 1 夏牙鲆、牙鲆和杂交子一代的染色体数目统计结果

Tab.1 Chromosome count results in the *P. dentatus*, *P. olivaceus* and their hybrids

鱼别	染色体数目所占比例(%) (分裂相数)						众数
	<46	46	47	48	49	50	
夏牙鲆	5.0(2)	7.5(3)	12.5(5)	72.5(29)	2.5(1)	0.0(0)	48
牙 鲆	2.2(1)	6.7(3)	13.3(6)	71.2(32)	4.4(2)	2.2(1)	48
子一代	1.2(1)	7.0(6)	10.5(9)	74.4(64)	4.7(4)	2.2(2)	48

### 2.2 亲本和杂交子一代的染色体组型

通过对这三种鱼的染色体核型分析,夏牙鲆为 24 对端部着丝点染色体,其杂交子一代个体与它们的父母本一样,24 对染色体均为端部着丝点染色体,其核型公式均是  $2n=48t$ ,总臂数  $NF=48$ (表 2,图 1)。

### 2.3 亲本和杂交子一代的 DNA 相对含量的细胞流仪测定

牙鲆和杂交鱼的初孵仔鱼以及夏牙鲆苗种的肌肉组织 DNA 相对含量的流式细胞仪检测图分别见图 2,将牙鲆对照组(图 2a)的 DNA 相对含量设为 100 处的峰值,其在 200 处有一个分裂峰,夏牙鲆对照组二倍体苗种(图 2b)的 DNA 相对含量也于 100 处为最高峰,在 200 处有一小的分裂峰。以此检测,夏牙鲆和牙鲆杂交子代各个体的 DNA 相对含量也都在 100 处有一高峰,200 处有一小峰,故其应该为二倍

体。

表 2 夏牙鲆、牙鲆和杂交子一代染色体相对长度和类型

Tab.2 The relative length and type of chromosome in the *P. dentatus*, *P. olivaceus* and their hybrids

编号	相 对 长 度			类型
	夏牙鲆	牙 鲆	子一代	
1	5.05 ± 0.44	5.94 ± 0.09	5.33 ± 0.30	t
2	4.45 ± 0.21	5.74 ± 0.23	5.15 ± 0.05	t
3	4.39 ± 0.13	5.26 ± 0.15	5.01 ± 0.15	t
4	4.34 ± 0.15	5.06 ± 0.07	4.76 ± 0.09	t
5	4.28 ± 0.18	4.87 ± 0.08	4.36 ± 0.18	t
6	4.23 ± 0.18	4.77 ± 0.11	4.21 ± 0.09	t
7	4.17 ± 0.13	4.58 ± 0.18	4.15 ± 0.15	t
8	4.10 ± 0.17	4.48 ± 0.12	4.12 ± 0.22	t
9	4.02 ± 0.12	4.38 ± 0.27	4.10 ± 0.10	t
10	3.95 ± 0.16	4.28 ± 0.14	4.06 ± 0.10	t

(表续)

编号	相对长度			类型
	夏牙鲆	牙鲆	子一代	
11	3.90 ± 0.15	4.09 ± 0.06	3.93 ± 0.13	t
12	3.81 ± 0.14	4.09 ± 0.06	3.87 ± 0.27	t
13	3.75 ± 0.13	4.06 ± 0.07	3.82 ± 0.05	t
14	3.65 ± 0.10	3.99 ± 0.10	3.74 ± 0.07	t
15	3.59 ± 0.10	3.89 ± 0.07	3.61 ± 0.11	t
16	3.53 ± 0.13	3.86 ± 0.09	3.58 ± 0.24	t
17	3.44 ± 0.17	3.86 ± 0.09	3.55 ± 0.08	t
18	3.37 ± 0.20	3.80 ± 0.15	3.48 ± 0.15	t
19	3.32 ± 0.21	3.70 ± 0.20	3.45 ± 0.20	t
20	3.24 ± 0.26	3.41 ± 0.07	3.33 ± 0.16	t
21	3.15 ± 0.19	3.31 ± 0.08	3.26 ± 0.09	t
22	3.08 ± 0.20	3.12 ± 0.07	3.10 ± 0.13	t
23	2.83 ± 0.15	2.82 ± 0.07	2.92 ± 0.12	t
24	2.65 ± 0.13	2.47 ± 0.08	2.60 ± 0.10	t

### 3 讨论

分别对夏牙鲆和牙鲆杂交子代进行了染色体核型分析和细胞 DNA 相对含量的测定,其结果表明杂交子代均为二倍体,故从细胞学水平上确认了杂交鱼为夏牙鲆与牙鲆杂交的后代,而非由于异源精子的诱导产生的雌核发育的后代。这一点也可以从本文作者对杂交子代进行的冷休克处理实验结果得到证实:夏牙鲆精子与牙鲆卵子杂交后,将受精卵放入 4~5 的低温海水中处理,经流式细胞仪检测其初孵仔鱼,发现可以获得一定比例的三倍体,即在 150 处有一个峰,在 300 处有一个小峰(未发表资料),这是因

为夏牙鲆精子与牙鲆卵子人工授精获得了二倍的受精卵,通过冷休克可以抑制其第二极体的放出,获得了三倍体。很显然,如果夏牙鲆精子仅仅起激动牙鲆卵的作用,使其进行雌核发育,由于夏牙鲆精子的遗传物质没有参与到卵中,其卵的染色体倍性是单倍的,如果进行第二极体排放的抑制,获得的卵应该是二倍的,而不会是三倍的。本实验室还对杂交鱼的胚胎发育进行了初步观察,杂交鱼可以正常卵裂、发育和孵化,并发现这些杂交子代的发育特征在视囊出现时间、仔鱼孵化前在卵膜内环绕程度与母本相似,与父本不同;而孵化时间则与父本更相近,表明杂交鱼的胚胎发育介于父母本之间。夏牙鲆和牙鲆同属于鲽形目牙鲆科的牙鲆属鱼类,其分类地位很相近,它们的染色体也都为  $2n = 48$ ,其核型也都是端部着丝点染色体  $48t$ ,染色体臂数  $NF$  也皆为 48,这是它们能够杂交的基础。如果染色体数目或核型相差太大,精核与卵核融合后染色体不能配对进行细胞分裂,即使分类学上亲缘关系近也不能杂交。综合上述分析,可以确定夏牙鲆与牙鲆能够进行杂交并获得正常杂交子代。

牙鲆的染色体核型过去已经有很多报道,早期日本人的报道是  $2n = 46$  <sup>[14,15]</sup>,80 年代后,包括日本学者和中国学者都认为牙鲆的染色体核型为  $2n = 48$  <sup>[16,17]</sup>,作者的分析结果也再次证实了牙鲆的染色体数为 48 而不是 46 条。有关夏牙鲆的染色体研究的报道一直没有查阅到,作者确定其染色体核型与牙鲆相同均为 48 条端部着丝点染色体,这一点也可以从杂交鱼染色体的分析结果中得到证实,杂交子代的染色体核型也是  $2n = 48t$ 。同时,在牙鲆、夏牙鲆的染色体分裂相中都可以观察到具有次级缢痕的一对染色体,

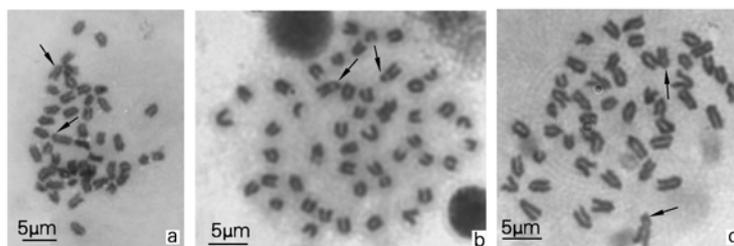


图1 牙鲆(a)、夏牙鲆(b)和杂交子一代(c)染色体分裂相

Fig.1 Metaphase plates from *P. olivaceus* (a), *P. dentatus* (b) and their hybrids (c)

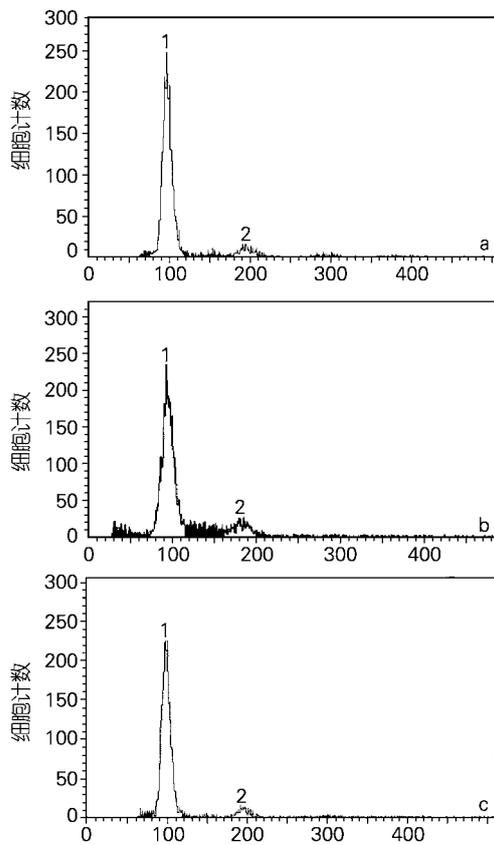


图2 牙鲆 (a)、夏牙鲆 (b) 和杂交子一代 (c) 细胞中 DNA 相对含量流仪检测图

Fig.2 Ploid identification by DNA relative content analysis, *P. olivaceus* (a), *P. dentatus* (b) and their hybrids (c)

其杂交子代的染色体分裂相中也可以观察到一对染色体具有次级缢痕。当然，作者只是进行了其核型的初步研究，尚需要采用显带或 FISH 技术进行深入研究，期望得到更加丰富的信息。

当前中国海水动物养殖正面临前所未有的挑战，突出的问题是种质退化和养殖环境恶化而引起病害频发、死亡加剧，养殖效益下滑，因此养殖品种改良已成当务之急。杂交育种是一种常用的快捷品种改良方法，在贝类中已经做出了许多的种内杂交(如鲍鱼、扇贝)<sup>[18,19]</sup>，属间杂交(如扇贝)<sup>[20]</sup>，皆显示出优良的性状，特别是成活率也有较大提高，即抗逆性和抗恶劣环境的能力增强。在鱼类中的杂交报道主要有鲷

科鱼类的属内属间杂交<sup>[3,4]</sup>、鮟状黄姑鱼和大黄鱼间的杂交<sup>[2]</sup>，而且其研究内容多局限在早期胚胎发育、孵化率、成活率和生长率等方面，并没有细胞遗传学和染色体方面的报道。北方海水鱼类在近两年也开始进行了种间杂交研究，报道的主要有石鲈和牙鲆的科间杂交研究<sup>[5,6]</sup>，获得了具有明显生长优势的杂交鲈鲆。鲈鲆类是中国北方、韩、日目前主要的海水养殖鱼类，其养殖规模都非常大，养殖品种通过近几年的引进也不断增加，进行杂交研究也已经成为可能。有关鲈鲆类的杂交除上述报道外，在国外还有有关黄盖鲈 (*Pleuronectes ferrugineus*) 和冬鲈 (*Pleuronectes americanus*)<sup>[11]</sup>、牙鲆和圆斑星鲈 (*Verasper variegates*)<sup>[12]</sup>、浦氏光鲈 (*Liopesetta putnami*) 和美洲黄盖鲈 (*Pseudopleuronectes americanus*)<sup>[21]</sup> 等的杂交报道。但在中国，有关属内种间杂交的报道尚未开展，事实上，从亲缘关系看，牙鲆与夏牙鲆同属牙鲆属的不同种，为种间杂交，在脊椎动物中，鱼类种间杂交成功率高于其它种类<sup>[3]</sup>，故很有必要进行更深入的研究，如本实验由于材料和技术的限制只进行了正交，今后还需要进行反交实验，看能否也获得杂交鱼和品质优良的鱼。本实验获得的杂交鱼经近一年的养殖观察，其育苗成活率、养成成活率和生长速度以及抗逆性等都具有明显的杂种优势。从正常开口摄食后一直到其后的养殖成活率都很高，远高于牙鲆。夏牙鲆刚刚引入中国，其人工繁殖尚未开始，故今后还需要将杂交鱼与夏牙鲆育苗成活率相比较。另外，杂交鱼还未达到成鱼，有些形态特征尚不能测定比较，如内部器官和性腺的发育、能否可育？性状遗传以及分子水平上的遗传差异等，均有待于今后进一步研究。如果可育并具有其良好养殖特性和品质，则可进一步扩大试验规模，使之早日形成规模化生产。

参考文献：

- [1] 楼允东. 鱼类育种学[M]. 北京：中国农业出版社，1999. 38-61.
- [2] 马梁, 王军, 陈武各, 等. 鮟状黄姑鱼与大黄鱼人工杂交子代的胚胎发育[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2002, 41(3): 378-382.
- [3] 林元烧, 李丙林, 崔雪森, 等. 黑鲷与灰鳍鲷杂交育种[J]. 海洋渔业, 2001, 23(2): 69-70.
- [4] 区又君, 李加儿, 周密团. 鲷科鱼类属间远缘杂交的发育和生长[J]. 中国水产科学, 2000, 7(2): 110-112.
- [5] 王新成, 尤锋, 倪高田, 等. 石鲈与牙鲆人工杂交的研究[J]. 海洋科学, 2003, 27(1): 1-4.

- [6] 季相山, 陈松林, 赵艳, 等. 石鲈、牙鲆精子冷冻保存研究及其在人工杂交中的应用[J]. 海洋水产研究, 2005, 26(2): 13–16.
- [7] Gilbert C R. Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (South Florida) – southern, gulf and summer flounders[R]. Gainesville Florida U S Florida State Museum, University of Florida, 1986.
- [8] Bengtson D A. Aquaculture of summer flounder *Paralichthys dentatus*: status of knowledge, current research and future research priorities[J]. *Aquaculture*, 1999, 176: 36–37.
- [9] 毛兴华. 北方沿海地区大西洋牙鲆养殖模式的探讨[J]. 科学养鱼, 2005, 1: 36–37.
- [10] 王波, 朱明远, 左言明. 大西洋牙鲆的苗种生产技术[J]. 齐鲁渔业, 2004, 21(4): 20–22.
- [11] Park I-S, Nam Y K, Douglas S E, *et al.* Genetic characterization, morphometrics and gonad developmental of induced interspecific hybrids between yellowtail flounder, *Pleuronectes ferrugineus* (Storer) and winter flounder, *Pleuronectes americanus* (Walbaum)[J]. *Aquaculture Research*, 2003, 34(5): 389–395.
- [12] Kim K-K, Bang I C, Kim Y, *et al.* Early survival and chromosomes of intergeneric hybrids between Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* and spotted halibut *Verasper variegatus*[J]. *Fisheries Sciences*, 1996, 62(3): 490–491.
- [13] Leven A, Fredga K, Sandburg A. Nomenclature for centromeric positions on chromosomes[J]. *Hereditas*, 1964, 52: 201–220.
- [14] Nogusa S. A comparative study of the chromosomes in fishes with particular considerations on taxonomy and evolution[J]. *Memoirs Hyogo University of Agriculture (Biological Series)*, 1960, 3: 1–62.
- [15] Sakamoto K, Nishikawa S. Chromosome of three flatfishes (Pleuronectiformes)[J]. *Japanese Journal of Ichthyology*, 1980, 27: 268–272.
- [16] Kikuno T, Ojima Y, Yamashita N. Chromosomes of flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. *Proceedings of the Japanese Academy*, 1986, 62: 194–196.
- [17] 王梅林, 戴继勋, 权洁霞. 中国海洋鱼类染色体数目和核型[A]. 相建海. 海洋动物细胞和种群生化遗传学[C]. 济南: 山东科学技术出版社, 1999. 30–36.
- [18] 张国范, 王继红, 赵洪恩, 等. 皱纹盘鲍中国种群和日本种群的自交与杂交 F1 的 RAPD 标记[J]. 海洋与湖沼, 2002, 33(5): 484–491.
- [19] 刘小林, 常亚青, 相建海, 等. 栉孔扇贝中国种群与日本种群杂交一代的中期生长发育[J]. 水产学报, 2003, 27(3): 193–199.
- [20] 杨爱国, 王清印, 刘志鸿, 等. 栉孔扇贝与虾夷扇贝杂交及子一代的遗传性状[J]. 海洋水产研究, 2004, 25(5): 1–5.
- [21] Hoornbeek F K, MacPhee G K, Moroz L, *et al.* Experimental hybridization between the smooth flounder (*Liopsetta putnami*) and winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*)[J]. *Genetics*, 1984, 107(3): 48.

## Cytogenetics study on hybridization between summer flounder and left-eyed flounder

YOU Feng<sup>1</sup>, XU Shi-hong<sup>1</sup>, XU Jian-he<sup>1,2</sup>, XU Dong-dong<sup>1</sup>, MA Dao-yuan<sup>1</sup>, ZHANG Pei-jun<sup>1</sup>, LI Jun<sup>1</sup>

(1. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China)

Received: Nov., 23, 2005

**Key words:** *Paralichthys dentatus*; *Paralichthys olivaceus*; artificial hybridization; cytogenetics

**Abstract:** Viable interspecific hybrids between summer flounder *Paralichthys dentatus* and left-eyed flounder, *Paralichthys olivaceus* were produced by artificial fertilization of left-eyed flounder eggs with summer flounder sperm. Karyotypes of summer flounder, left-eyed flounder and their hybrids were analyzed and are the same (2n = 48 t). The similar results in relative DNA contents tested by Flow Cytometry were also presented. After analyzing, it is confirmed that these hybrids are true filial generation of these two flounders but the gynogenesis of left-eyed flounder was induced by heterogeneous sperm of summer flounder.

(本文编辑: 刘珊珊)