

麦穗鱼鳍条组织培养及染色体 Ag-NORs 和 C-带研究

杨 坤, 祝东梅, 王卫民

(华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 采用组织块贴壁培养法探索麦穗鱼 (*Pseudorasbora parva*) 鳍组织细胞的短期培养, 同时对其染色体 Ag-NORs 和 C-带进行了初步研究。结果显示: 1) 麦穗鱼鳍组织培养的最适培养基为 MEM 培养基, 细胞在组织块贴壁后第6天迁出, 经传代后细胞形态呈成纤维状; 2) 其染色体具有1对 Ag-NORs, 位于第23对染色体短臂末端, 其 NORs 具多态性, 未见 Ag-NORs 联合现象; 3) 其染色体 C-带主要为端粒和着丝点 C-带, 少数为居间 C-带, 其中第23对染色体的短臂大部分呈现 C-带强阳性, 与 Ag-NORs 区域对应。

关键词: 麦穗鱼; 细胞培养; 染色体; Ag-NORs; C-带

中图分类号: S 917

文献标志码: A

文章编号: 2095-0780-(2013)03-0020-06

Studies on fin tissues cultivation, Ag-NORs and C-banding patterns of *Pseudorasbora parva*

YANG Kun, ZHU Dongmei, WANG Weimin

(College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: We investigated short-term fin tissues cultivation of *Pseudorasbora parva* by explant technique, and studied its Ag-NORs, and C-banding patterns at the same time. Results are as follows: 1) Cells from the fin tissues of *P. parva* migrate out around tissues at 6th day through MEM medium, the most suitable one, and are fibroblast-like during cultivation; 2) A pair of Ag-NORs is found on the end of No. 23 chromosome short arm, and the NORs are polymorphic, while no Ag-NORs combination has happened in this fish; 3) C-bands are located mainly in the terminal and centromere regions of chromosomes, and a few in the interstitial regions. In particular, most of the short arm on chromosome No. 23 shows strong positive C-bands, which is corresponded with Ag-NORs region.

Key words: *Pseudorasbora parva*; cell culture; chromosome; Ag-NORs; C-banding

麦穗鱼 (*Pseudorasbora parva*), 又名小草鱼、麻姑嫩子等, 为江河淡水中广泛分布的一种中下层小型鱼类, 属鲤科, 鲃亚科, 麦穗鱼属, 最初只分布于亚洲(中国、日本等), 后来随经济鱼类的引种无意被带入欧洲地区, 现广泛分布于亚洲、欧洲、非洲等地^[1-3]。麦穗鱼个体小, 数量多, 在中国传统鱼类养殖中属于野杂鱼, 有时也作为经济鱼类的饵料鱼。麦穗鱼生长快, 容易养殖, 1龄便可达性成熟, 且对化学物质较敏感, 极具开发为一种

新的模式鱼种的潜能。

细胞培养作为细胞生物学乃至生物学研究的重要技术, 在生物领域中占有重要地位。鱼类细胞培养技术作为一种重要的研究和应用技术方法, 于20世纪60年代兴起, 此后研究进展十分迅速。鱼类细胞系是研究鱼类病毒性疾病的病原分离鉴定、致病机理、诊断与检测技术及疫苗制备与防控技术等的重要材料, 也是进行污染物毒性早期监测的模型之一^[4-5]。因此, 鱼类细胞系的建立具有重要的

收稿日期: 2012-11-15; 修回日期: 2012-12-19

资助项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项(水专项)“水环境监测的新技术、新方法研发与应用示范”(2009ZX07527-005)

作者简介: 杨 坤(1987-), 男, 硕士研究生, 从事鱼类遗传育种等研究。E-mail: ykwxdl@163.com

通信作者: 王卫民(1959-), 男, 教授, 从事鱼类遗传育种研究。E-mail: wangwm@mail.hzau.edu.cn

理论和实践意义。染色体是生物遗传物质的主要载体,其数目和形态既具有种的特征,也能反映出生物进化的历史,研究鱼类染色体对了解其遗传组成、变异及系统演化等具有重要意义^[6];而染色体显带技术对深入了解染色体的精细结构起着重要作用,但由于鱼类染色体较小,数目偏多,碱基分布不如高等动物显著,难以得到满意的显带,且一些显带技术并不十分成熟,这对鱼类染色体的深入研究以及对遗传工程的进展均有一定影响^[7]。因此,鱼类染色体显带技术的探索依然具有十分重要的意义。文章探讨了麦穗鱼鳍条组织培养条件,并对其染色体 Ag-NORs 和 C-带进行了初步研究,旨在为麦穗鱼鳍条细胞系建立提供技术参数,更深入了解麦穗鱼染色体特征,丰富其细胞遗传学内容,为开发麦穗鱼作为新的模式鱼种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验鱼

麦穗鱼 3 尾(体质量 4.6 ~ 7.8 g, 体长 65 ~ 79 mm), 试验前在室内水族箱暂养 1 周以上。

1.2 主要试剂

M199 培养基、MEM 培养基、DMEM/F-12 培养基、RPMI-1640 培养基、L-15 培养基、EDTA-胰蛋白酶和胎牛血清(FBS)购自 Gibico 公司;表皮生长因子(EGF)、成纤维生长因子(FGF)、两性霉素 B 和秋水仙素购自 Sigma 公司;硫酸庆大霉素购自 Aniresco 公司;其他试剂为国产分析纯。

1.3 主要仪器

二氧化碳(CO₂)培养箱、高压灭菌锅、倒置荧光显微镜及拍照系统、生化培养箱、超净工作台、离心机、干燥箱、水浴锅等。

1.4 最适培养基选择及组织细胞培养

采用组织块固定法,将组织块均匀分布在含有 AIM 培养基(含有 500 U·mL⁻¹青霉素、500 μg·mL⁻¹链霉素、12.5 μg·mL⁻¹两性霉素 B 和 250 μg·mL⁻¹庆大霉素的 2 × MEM 培养基)的培养瓶底部,再将培养瓶置于 25 °C 生化培养箱中放置 2 ~ 3 h,吸出残余培养液,然后向其中添加含有 20% FBS、0.2 μg·mL⁻¹ EGF、25 ng·mL⁻¹ FGF、200 U·mL⁻¹青霉素、200 μg·mL⁻¹链霉素、5 μg·mL⁻¹两性霉素 B 和 100 μg·mL⁻¹庆大霉素的 M199、MEM、DMEM-F12、RPMI-1640 和 L-15 5

种原代培养液,继续置于 25 °C 生化培养箱中培养,每种原代培养液均设置 3 个平行试验组。每日观察细胞迁出及生长情况,并拍照记录。原代培养 3 d 后将培养瓶中的旧培养基用移液管吸出,离心换液,此后每 3 d 更换 1 次培养基。根据每种试验培养液中细胞迁出及生长情况,分析比较,选出最适培养基。选用最适培养基进行细胞培养,待细胞从组织块长出来至均匀铺满培养瓶底时,采用酶消化法,离心收集细胞,进行传代培养。

1.5 染色体制备

按 EARLEY^[8]的方法对传代细胞进行染色体分析。

1.6 染色体 Ag-NORs 标本制备

参照 HOWELL 和 BLACK^[9]的方法并略作修改,把洁净培养皿置于 60 ~ 70 °C 水浴中,将标本平放在培养皿中,然后在玻片上滴加 50% 硝酸银(AgNO₃)与 2% 明胶(含 1% 甲酸)以 2 : 1 混合的混合液,盖上擦镜纸,观察反应液由无色透明变至棕褐色后,立即取出玻片,用预热的蒸馏水彻底冲洗,晾干后显微镜观察和拍照。

1.7 染色体 C-显带标本制备

参照 SUMNER^[10]的方法并稍作修改,用 0.2 mol·L⁻¹ 盐酸(HCl)室温处理染色体玻片 30 min,然后用新配制的 5% 氢氧化钡[Ba(OH)₂]处理 12 ~ 15 min,再用 0.2 mol·L⁻¹ HCl 漂洗数秒,蒸馏水漂洗;将玻片置于 60 °C 2 × SSC 溶液中温育 2 h,最后蒸馏水漂洗后用 1/10 Giemsa 染液染色 20 min,自来水冲洗,晾干镜检。

2 结果

2.1 最适培养基的选择

25 °C 下用 5 种培养液进行原代培养,结果发现在 MEM 培养基中,组织块贴壁的第 6 天即有细胞从组织边缘迁出,其他 4 种培养基中未见有此现象。而至第 15 天,除 RPMI-1640 培养基中组织块周围仍未见细胞迁出外,其余培养基中均有不同程度的细胞迁出(表 1)。5 种试验培养基中 MEM 培养基的细胞生长最旺盛,M199 和 DMEM-F12 培养基次之,而 RPMI-1640 培养基中未发现有细胞迁出现象,由此可知,麦穗鱼鳍条组织细胞的最适培养基为 MEM。

表 1 培养于不同培养基中的麦穗鱼鳍组织迁出细胞比较

Tab. 1 Comparison of cell migrated proportion from fin tissues of <i>P. parva</i> when cultured in different media				
M199	MEM	DMEM-F12	L-15	RPIM-1640
+++	+++++	+++	++	无

注：+. 14 d 后组织块周围迁出的细胞占培养瓶底面面积的 2%
Note: +. the area of cells around the tissue accounted for 2% of the bottle base area 14 days later.

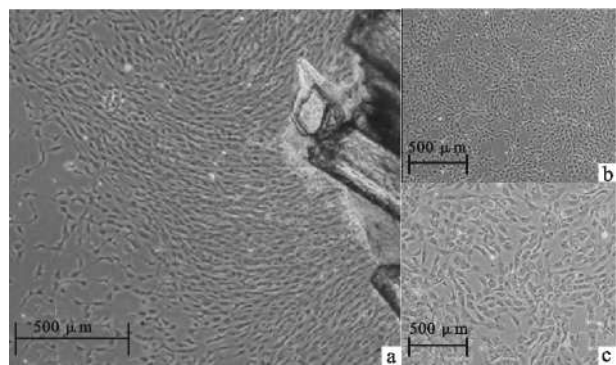


图 1 麦穗鱼鳍组织原代及传代细胞

a. 原代培养第 15 天迁出的细胞; b ~ c. 传代培养第 2 代细胞
Fig. 1 Primary and subculture cells of fin tissues of *P. parva*
a. primary cells of *P. parva* fin at 15th day; b ~ c. subculture cells of *P. parva* fin at the 2nd passage

2.2 组织细胞培养

麦穗鱼鳍条组织细胞原代启动 15 d 后，其长势旺盛，细胞形态为成纤维状，并呈现放射状向四周生长(图 1 - a)。原代细胞经过约 30 d 的生长后便形成单层细胞，即可传代。整个传代过程中细胞都是以 1 : 2 的比率进行传代，传代后 5 ~ 7 d 细胞又可形成致密单层。图 1 - b ~ c 为麦穗鱼鳍条组织传代第 2 代细胞，其形态呈现成纤维状。

2.3 组织细胞培养制备染色体

用第 6 ~ 第 10 代麦穗鱼鳍条组织传代培养细胞制备染色体，并进行染色体分析。结果显示，麦穗鱼鳍条组织传代培养细胞的染色体数目 $2n = 50$ (图 2)，经分析其核型与杨坤等^[11]报道的麦穗鱼染色体核型一致。

2.4 染色体 Ag-NORs

麦穗鱼染色体的银染明显，中期分裂相及间期核中 Ag-NORs 数目在不同细胞中表现出多态性，数目为 1 ~ 2 个(图 3 - a ~ b)。经统计，在所观察的分裂相中出现 1 个 Ag-NORs 的频率为 43%，出现 2 个 Ag-NORs 的频率为 57%，故可判定其染色体的 Ag-NORs 的数目为 2。麦穗鱼染色体的 Ag-NORs 位于 st3(第 23 对染色体)短臂末端，分布在

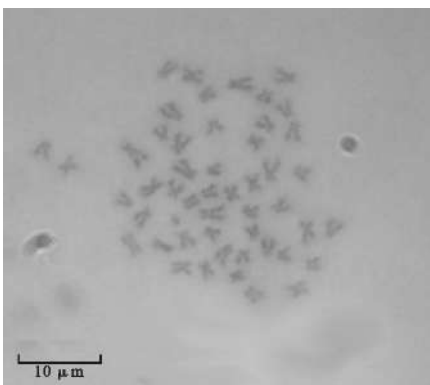


图 2 麦穗鱼鳍条组织细胞染色体中期分裂相
Fig. 2 Chromosomes of *P. parva* fin cells at metaphase

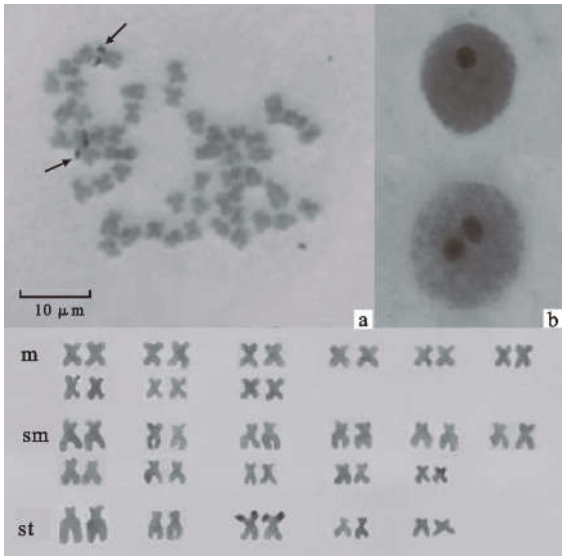


图 3 麦穗鱼染色体 Ag-NORs 分裂相及核型(箭头示银染点)

a. 中期染色体 Ag-NORs; b. 间期核 Ag-NORs
Fig. 3 The Ag-NORs metaphase chromosomes and karyotype of *P. parva* (arrow indicates silver dying sites)
a. Ag-NORs of metaphase chromosomes; b. Ag-NORs of interphase nucleus

1 对同源染色体上(图 3 - a)，未发现有 Ag-NORs 联合现象。

2.5 染色体 C-带

经 C-带处理，麦穗鱼的 50 条染色体均有大小

不一的 C-带深染, 其中 m1 (第 1 对染色体)、m3、m4、m6、m9、sm2 (第 11 对染色体)、sm5、sm8、sm10 和 st5 为端粒 C-带; m2 为着丝粒 C-带, m5 为居间 C-带; m7、m8、sm3、sm4、sm6、sm7、sm9、sm11、st1、st2 和 st4 为端粒和着丝粒 C-带; sm1、sm3、st2 为着丝粒和居间 C-带, st3 为端粒和居间 C-带; sm3 和 st2 同时表现出端粒、着丝粒和居间 C-带。其中 st3 (第 23 对) 染色体的短臂大部分呈现强阳性深染 (图 4)。同源染色体 C-带的大小、位置及显色强度大致相同, 而不同染色体的 C-带强度则有一定的差异, 类型也有所不同。



图 4 麦穗鱼染色体 C-带分裂相及核型 (箭头示第 23 号染色体)

Fig. 4 The C-banding metaphase chromosomes and karyotype of *P. parva* (arrow indicates chromosome No. 23)

3 讨论

3.1 麦穗鱼鳍条组织细胞培养

鱼类细胞培养始于 20 世纪 60 年代, 世界上第一个鱼类细胞系是由 WOLF 和 QUIMBY^[12] 在 1976 年建立的虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 生殖腺细胞系 RTG-2。此后, 鱼类细胞培养研究的进展十分迅速。据统计, 至 1994 年世界上至少已建立了 159 株鱼类细胞系^[13]。中国鱼类细胞培养开始于 20 世纪 80 年代, 最早的鱼类细胞系为张念慈和杨广智^[14] 于 1981 年建立的草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 吻端组织细胞系。鱼类细胞的培养方法包括原代培养和传代培养。原代培养的启动方法主要有组织块固定法、机械分散法、络合剂分散法和酶消化法等^[12,15]。其中组织块固定法又称“母培养”^[14], 因其培养环境与试验动物的生理环境相近, 有利于离体细胞的生存和增殖, 该法适用于组织量较少的细胞培养。笔者研究以麦穗鱼鳍条组织作为培养对象, 因其组织量少, 故选取了组织块固定法作为原代培养的启动方法。

培养基既是细胞培养和促进增殖的基础物质, 也是细胞生长繁殖的直接环境, 因此, 最适培养基的选择非常重要。一般来说, 不同的鱼其细胞培养

所需的条件不同。如匙吻鲟 (*Polyodon spathula*) 鳍组织细胞系最适培养基为 M199^[4], 而大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 鳍组织细胞系的最适培养基为 DMEM-F-12^[16]。笔者研究通过对 M199、MEM、DMEM-F12、RPIM-1640 和 L-15 5 种培养基进行细胞培养试验发现, MEM 培养基中 6 d 便有细胞从组织块中迁出, 30 d 长成单层, 细胞长势最好, 而 RPIM-1640 培养基中几乎没有细胞生长。因此, 在培养麦穗鱼鳍条组织细胞时可以选择 MEM 作为最适培养基。麦穗鱼鳍条组织原代细胞经过约 30 d 的生长, 形成单层细胞, 便可进行第 1 次传代。由于细胞量少, 且早期传代细胞对消化酶较敏感, 极易消化过度而出现大量死亡, 故第 1 次传代不采用分瓶扩大培养方法, 仅接种于 1 个培养瓶中, 传代以后 2~3 h 细胞即可贴壁生长。再经过多次传代细胞状态稳定下来后, 便可开展相关的试验研究。

3.2 麦穗鱼染色体 Ag-NORs

核仁组织者 (NORs) 位于染色体上次缢痕部位, 是 5.8S、18S 及 28S rRNA 合成的场所, 其数目、分布及形态特征可作为研究物种间亲缘关系和染色体进化的一个指标^[17]。NORs 具有多态性, 包括数目多态和结构多态, 这已在很多鱼类中被发现^[18-20]。笔者研究发现麦穗鱼的 Ag-NORs 出现在 st3 染色体上, st3 同源染色体上的 NORs 相对大小有一定差异, 而且在不同分裂相中, NORs 显示的数目为 1~2 个。因此, 麦穗鱼染色体的 NORs 也具有多态性。此结果与任修海等^[21] 报道的一致。Ag-NORs 可以准确显示染色体上 rDNA 的位置, 而 NORs 银染与否及银染强度与 rDNA 转录活性密切相关, rDNA 转录活性越大, NORs 银染越强, 面积也越宽。因此, NORs 的多态性实质上可能是 rDNA 转录活性的一种反映。NORs 通常分布在染色体上的次缢痕和随体区域^[21-23], 且有些鱼类的 NORs 与次缢痕之间具有一定的对应关系^[18,24-25]。一般来说, 每种生物染色体组中至少有 1 条或 1 对染色体上有次缢痕。根据采用常规染色方法对麦穗鱼染色体组型的研究, 并未发现其染色体具有次缢痕或随体存在^[11], 而笔者研究却发现其染色体具有 Ag-NORs, 依据 NORs 与次缢痕的关系, 可以推测麦穗鱼染色体中次缢痕的结构可能已然存在, 只是还没进化到从细胞学上可辨别的程度。AMEMIYA 和 GOLD^[26] 曾提出具有 1 对 NORs 染色体的类型为鲤科鱼类的原始类型; 任修海等^[24] 则

进一步指出, 位于染色体端部的 NORs 为所有生物 NORs 的原始类型, 而位于染色体臂内的则是生物进化的一种表现。笔者研究发现麦穗鱼的 NORs 为 1 对, 且 NORs 位于染色体末端, 因此可以判断其在鲤科鱼类中属于较原始的类群。

3.3 麦穗鱼染色体 C-带

C-带对应染色体上含有大量无转录活性且高度重复 DNA 序列的异染色质区域, 高等真核生物的异染色质可分为结构和功能异染色质。结构异染色质一般只分布在染色体着丝点及附近区域、核仁组织区及附近区域、端粒区及 Y 染色体长臂上, 而功能异染色质主要分布在 X 染色体上^[27]。染色体 C-带可分为着丝点、端部和居间 C-带(包括 NORs)等^[28-29]。笔者研究中麦穗鱼的染色体同时存在端部、着丝粒和居间 C-带, 以端粒和着丝粒 C-带为主。SHI 等^[30]指出, 染色体间若发生不对称易位和臂间倒位可导致异染色质区域增多或分布位置发生改变, 如居间异染色质(即居间 C-带区域)增加甚至整个染色体臂完全异染色质化, 这些都是物种进化的特征。因此, 从麦穗鱼染色体 C-带类型看, 以端部 C-带和着丝粒 C-带为主, 只有极少数为居间 C-带, 属于较原始的类群, 此结果与 Ag-NORs 结果相吻合。

在试验中笔者发现, 第 23 对染色体的短臂大部分区域表现出 C-带强阳性, 而该区域也是 Ag-NORs 所在区域, 即 C-带强阳性与 Ag-NORs 呈现出一定的同步对应。这种现象在其他鱼类中也有发现^[20,24,31]。对此, 任修海等^[24]认为 NORs 区域分布有大量的结构异染色质, 对 C-带中碱处理的抗性为 NORs 提供了一定程度的保护作用。另外, 笔者在制备麦穗鱼 C-带时也发现, 碱溶液处理染色体的时间及浓度不同, 所得结果也不同。当碱液浓度过大或者处理时间过长时, 所有染色体都浅染无分化; 而碱液浓度过低或者处理时间过短时, 则所有的染色体都深染也无分化; 只有碱溶液浓度及处理时间在一定范围时, NORs 才会被深染。由此说明 NORs 区域确有丰富的结构异染色质, 可以保护其受碱液的抽提。由于 C-带可以使染色体的 NORs 深染, 故染色体 C-带也可以用来探讨鱼类染色体 NORs 的多态性。

参考文献:

[1] 解玉浩. 东北地区淡水鱼类[M]. 沈阳: 科学技术出版社,

2007: 160-162.

- [2] BRITTON J R, DAVIES G D, BRAZIER M. Towards the successful control of the invasive *Pseudorasbora parva* in the UK[J]. Biol Invas, 2010, 12(1): 125-131.
- [3] BOLTACHEV A R, DANILYUK O N, PAKHORUKOV N P, et al. Distribution and certain features of the morphology and biology of the stone moroco *Pseudorasbora parva* (cypriniformes, cyprinidae) in the waters of Crimea[J]. Ichthyology, 2006, 46(1): 58-63.
- [4] 肖艺. 匙吻鲟鳍条组织细胞系的建立及其生物学特征[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- [5] FENT K. Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology. Assessment of cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples[J]. Toxicol In Vitro, 2001, 15(4/5): 477-488.
- [6] 牛文涛, 蔡泽平. 中国海水鱼类核型研究概述[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2006, 45(2): 125-131.
- [7] 余先觉, 周敏, 李渝成, 等. 中国淡水鱼类染色体[M]. 北京: 科学出版社, 1989: 4-9.
- [8] EARLEY E M. Chromosome preparations from monolayer cell cultures[J]. TCA Manual, 1975, 1(1): 31-35.
- [9] HOWELL W, BLACK M. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method [J]. Experientia, 1980, 36(8): 1014-1015.
- [10] SUMNER A T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin[J]. Exp Cell Res, 1972, 75(1): 304-306.
- [11] 杨坤, 王子健, 祝东梅, 等. 麦穗鱼的组型分析和 DNA 含量测定[J]. 华中农业大学学报: 自然科学版, 2012, 31(3): 371-375.
- [12] WOLF K, QUIMBY M C. Established eurythermic line of fish cells *in vitro*[J]. Science, 1962, 135(23): 1065-1066.
- [13] FRYER J L, LANNAN C N. Three decades of fish cell culture: a current listing of cell lines derived from fishes[J]. Tissue Culture Methods, 1994, 16(2): 87-94.
- [14] 张念慈, 杨广智. 草鱼吻端组织细胞株 ZC-7901 及其亚株 ZC-7901S₁ 的建立和特性观察[J]. 水产学报, 1981, 5(2): 111-119.
- [15] 艾庆辉, 李庆飞, 麦康森. 鱼类细胞培养技术研究进展[J]. 渔业科学进展, 2012, 33(3): 122-128.
- [16] 孙爱. 大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)三种组织细胞系的建立、鉴定及其应用的初步研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.
- [17] 常重杰, 杜启艳, 余其兴. 泥鳅的 Ag-NORs 带和 C-带研究[J]. 河南师范大学学报: 自然科学版, 2000, 28(2): 71-73.
- [18] 耿德贵, 朱玉山, 刘贤德. 鲶鱼染色体的显带研究[J]. 动物学杂志, 1999, 34(2): 54-57.
- [19] 陈友铃, 吴文珊, 汪彦情. 言密鲈(*Colisa ladia*)的核型和 Ag-NORs 带型的研究[J]. 福建师范大学学报: 自然科学版, 2006, 22(1): 87-90.
- [20] 王佳君. 准格尔雅罗鱼的核型和带型研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2011.

- [21] 任修海, 崔建勋, 余其兴. 六种鲤科鱼类核仁组织者区的研究[J]. 遗传, 1993, 15(4): 11–13.
- [22] HENDERSON A S, WARBURTON D, ATWOOD K C. Localization of rDNA in the chromosome complement of the Rhesus (*Macaca mulatta*) [J]. Chromosoma, 1974, 44(4): 367–370.
- [23] HSU T C, SPITTO S E, PARDUE M L. Distribution of 18 + 28S ribosomal genes in mammalian genomes[J]. Chromosoma, 1975, 53(1): 25–36.
- [24] 任修海, 余其兴, 韦萍. 黄鳝染色体 Ag-NORs 多态性的研究[J]. 遗传学报, 1991, 18(4): 304–311.
- [25] TAKAI A, OJIMA Y. Some features on the nucleolus organizer regions in the chromosomes of the cyprinid fishes [J]. Proc Jpn Acad, Ser. B; Phys Biol Sci, 1984, 60(10): 410–413.
- [26] AMEMIYA C T, GOLD J R. Cytogenetic studies in North American minnows (Cyprinidae) X VII. chromosomal NOR phenotypes of 12 species, with comments on cytosystematic relationships among 50 species[J]. Hereditas, 1990, 112(3): 231–247.
- [27] 咎瑞光. 滇池两种类型鲫鱼的性染色体和 C-带核型研究[J]. 遗传学报, 1982, 9(1): 32–39.
- [28] CUELLAR O, UYENO T. Triploidy in rainbow trout[J]. Cytogenetics, 1972, 11(6): 508–515.
- [29] GARRIDO-RAMOS M A, JAMILENA M, LOZANO R, et al. Cytogenetic analysis of gilthead seabream *Sparus aurata* (Pisces, Perciformes), a deletion affecting the NOR in a hatchery stock[J]. Cytogenet Cell Genet, 1995, 68(1/2): 3–7.
- [30] SHI L M, YE Y Y, DUAN X S. Comparative cytogenetic studies on the red muntjac, Chinese muntjac and their F1 hybrids[J]. Cytogenet Cell Genet, 1980, 26(1): 22–27.
- [31] 郭明兰, 游欣欣, 苏永全, 等. 川纹笛鲷染色体核型、银染和 C-带[J]. 热带海洋学报, 2011, 30(1): 91–95.