

## NOTE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES CHROMOSOMES DE POISSONS

J. C. BARON

*Océanographe biologiste de l'O.R.S.T.O.M.*

### RÉSUMÉ

*De nombreuses références bibliographiques sont données pour permettre de faire le point des études traitant de la caryologie des poissons. Les principaux problèmes concernant le nombre des chromosomes et les processus évolutifs sont évoqués. Enfin quelques méthodes pratiques d'obtention des chromosomes sont décrites.*

### ABSTRACT

*An up to date review of the literature on karyology of fishes is presented. The main problems relating to chromosome number and the process of evolution are discussed. Some practical methods of obtaining chromosome preparations are described.*

### INTRODUCTION.

Nous avons eu l'occasion de nous pencher un certain temps sur les problèmes posés par la caryologie des poissons, et principalement des poissons marins. La présente note n'a d'autre but que de faciliter dans la mesure du possible un travail de recherche ultérieur sur ce sujet encore peu exploré. Nous renverrons tout d'abord le lecteur à la « Revue bibliographique sur la caryologie des Téléostéens. Étude critique des méthodes employées et des résultats obtenus » de M<sup>me</sup> GAS (1970) ainsi qu'au livre très récent de Thomas E. DENTON « Fish Chromosome methodology » publié chez Charles C. THOMAS (1973). Nous ne décrirons ici que les méthodes que nous avons expérimentées ou qui présentent un intérêt particulier, renvoyant au livre de T. C. DENTON pour les autres. Nous nous limiterons aussi à l'examen des mitoses, les méioses n'offrant pas les formes caractéristiques souhaitées pour établir des cartes chromosomiques. Une bibliographie concernant l'identification des chromosomes par la technique de fluorescence peut être trouvée dans l'article de B. NILSSON (1973). Enfin il nous

paraît souhaitable d'évoquer la relation entre le polymorphisme biochimique et les chromosomes et le lecteur pourra lire avec profit les travaux présentés au « Symposium on fish cytogenetics » (ANONYME, 1970).

### 1. GÉNÉRALITÉS.

L'étude des chromosomes de poissons présente certaines difficultés et les techniques mises au point sont récentes et perfectibles. Il en résulte que l'on a actuellement un nombre restreint de données concernant la caryologie des poissons et très peu d'informations sur les poissons marins. En 1970, M<sup>me</sup> GAS publie une « Revue Bibliographique sur la caryologie des Téléostéens » dans laquelle sont rapportées les formules chromosomiques d'environ 250 espèces de poissons, faisant état entre autres des travaux de NOGUSA (1960), de POST (1965) sur des Téléostéens d'eau douce, de SCHEEL (1966) sur les *Rivulinae* et de ROBERTS (1964) sur 20 espèces de Centrarchidae d'Amérique du Nord. En 1971,

GYLDENHOLM et SCHEEL publient une liste de 208 poissons d'eau douce des pays tempérés et tropicaux avec leurs nombres de chromosomes respectifs et se proposent d'étendre cette liste aux poissons d'eau douce des pays froids et aux poissons marins. Enfin DENTON (1973) dans son livre donne une « Check list » portant sur 481 espèces avec des précisions quant à la nature des chromosomes. Le nombre de chromosomes chez les poissons varie de  $2N = 16$  (certaines espèces tropicales) à  $2N > 100$  le nombre maximum de « bras chromosomiques » étant de 150 (HUBBS, 1970). La majorité des poissons a un nombre de chromosomes variant de 40 à 60, le caryotype moyen étant de 48 chromosomes acrocentriques représentant une valeur en DNA (acide désoxyribonucléique) 5 fois plus faible que celle des mammifères. La taille, à part quelques exceptions, est souvent petite. Par exemple pour *Carassius auratus* la dimension des chromosomes varie de  $0,8 \mu$  à  $2,0 \mu$  alors que chez l'homme elle varie de  $1,5 \mu$  à  $8 \mu$  (CHIARELLI *et al.*, 1968). Les techniques d'étude habituellement employées pour les autres vertébrés doivent subir certaines modifications pour être applicables aux poissons. L'usage du choc hypotonique et du « squash » ainsi que de la colchicine et produits similaires améliore considérablement les résultats. Nous verrons plus loin quelques techniques mises au point avec ces procédés.

Diverses méthodes ont été utilisées avec plus ou moins de succès. L'observation après section des testicules (NOGUSA, 1960 — OJIMA, 1963 — KAUR et SRIVASTAVA, 1965) donne des résultats médiocres; certains chercheurs ont utilisé des frottis de matériel embryonnaire (SWARP, 1959; SIMON, 1963) d'autres l'épithélium de la cornée (ROBERTS, 1967) et des bons résultats ont été obtenus avec l'épithélium recouvrant les écailles par DENTON *et al.* (1969); l'usage de la colchicine, bloquant les divisions en métaphase augmente les chances d'obtenir des

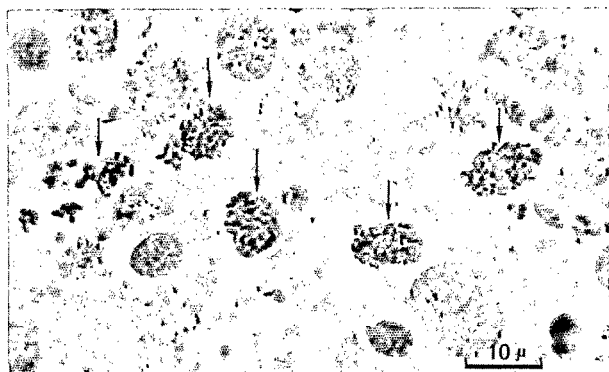


Photo 1. — Plaques métaphasiques dans les cellules de l'épithélium branchial de *Pagrus ehrenbergi* après injection intramusculaire de colchicine à 0,4 %. Fixation et coloration à l'orcéine acétique.

préparations riches en plaques métaphasiques et présentant des chromosomes bien individualisés. ROBERTS (1964) fait des injections intramusculaires de colchicine, puis prélève les testicules pour en faire des squashes. Mc. PHAIL et JONES (1966) préconisent pour les poissons marins une injection intramusculaire de colchicine suivie du maintien du poisson dans de l'eau de mer diluée de moitié puis dans de l'eau douce. L'arc branchial est ensuite prélevé pour l'étude des chromosomes des cellules de l'épithélium branchial. SCHEEL (1972) utilise le tissu régénéré par la nageoire caudale après section de celle-ci. Ce tissu est soumis *in vitro* à l'action de la colchicine puis coloré à l'orcéine acétique. Enfin des méthodes plus élaborées faisant appel à la culture de tissus donnent de bons résultats. ROBERTS (1964) utilise la culture de tissu des gonades (parfois de muscles, rein, rate ou foie) sur milieu de Eagle, avec digestion trypsique. FERRANTELLI *et al.* (1968) utilisent également la culture de tissus. La culture de leucocytes de *Tilapia* a donné de bons résultats mais nécessite des conditions délicates (JALABERT et CHEVASSUS, *communication personnelle*). BARKER (1972) cultive des leucocytes de *Pleuronectes platessa* et utilise du Colcemid.

Les diverses techniques employées ont généralement pour but de connaître le nombre de chromosomes mais aussi leur morphologie et parfois leur structure, ces renseignements ajoutés à la connaissance de la teneur en D.N.A. permettent d'élaborer des hypothèses sur l'évolution des groupes de poissons et les relations existant entre les différents genres d'une même famille ou les différentes espèces d'un même genre ainsi que sur les mécanismes impliqués au niveau des chromosomes. Il semble en effet y avoir une relation entre la réduction du nombre de chromosomes et la spécialisation de l'espèce ainsi qu'entre le nombre des chromosomes et leur morphologie. Les poissons primitifs ayant un nombre supérieur de chromosomes et plus de chromosomes acrocentriques que des poissons plus évolués.

En résumé l'étude des chromosomes d'une espèce doit porter sur plusieurs points :

1. LE NOMBRE DE CHROMOSOMES  $2N$  des cellules somatiques en mitose avec vérification du nombre  $N$  de chromosomes des cellules germinales en méiose.
2. LA MORPHOLOGIE DES CHROMOSOMES selon la place du centromère : chromosomes métacentriques et télocentriques ou acrocentriques.
3. LE NOMBRE DE BRAS de l'ensemble des chromosomes (nombre fondamental) ainsi que la longueur de chaque bras rapportée en pourcentage de la longueur totale de tous les bras.
4. LA TOPOGRAPHIE DES BANDES spécifiques des

bras des chromosomes après dénaturation à la chaleur ou digestion trypsique. Ceci est surtout valable pour les chromosomes de taille suffisante.

5. LA TENEUR EN ADN DES CELLULES.

2. NOMBRE ET CLASSIFICATION DES CHROMOSOMES.

Le nombre de chromosomes est généralement compté sur des photographies de préparations chromosomiques. Il faut utiliser plusieurs préparations pour obtenir le nombre exact de chromosomes certaines préparations montrant un nombre inférieur ou supérieur au nombre réel de chromosomes résultant d'erreurs imputables aux techniques employées. La majorité des chromosomes de poissons sont des autosomes mais on trouve aussi parfois des chromosomes sexuels et des paires hétéromorphes. C'est le cas de *Bathylagus wesethi* (CHEN et EBELING, 1966) et de *Gambusia affinis* chez qui CHEN et EBELING (1968) décrivent la femelle comme étant hétérogamétique (1 chromosome W, 1 chromosome Z) le mâle possédant 2 chromosomes Z. CHEN et RUDDLE (1969) mettent en évidence des chromosomes sexuels X et Y chez *Fundulus parvipinnis* et *F. diaphanus* (Cyprinodontidae). Il existe aussi des cas de chromosomes sexuels multiples démontrés chez un poisson combattant par UYENO et MILLER (1971) la femelle possédant les chromosomes X1 X1 X2 X2 et le mâle les chromosomes X1 X2 Y. On observe alors, au stade diakinèse de la méiose, 22 figures bivalentes et une trivalente, cette dernière étant interprétée comme l'attachement des chromosomes X1 et X2 à chaque extrémité du chromosome Y.

La classification des chromosomes dépend de leur morphologie et plus précisément de la place du centromère (LEVAN, 1964). Le centromère peut être médian, submédian ou subterminal et déterminer des chromosomes à 2 bras ou bien terminal et déterminer des chromosomes à un seul bras. Ces 4 types de chromosomes sont appelés : métacentriques, submétacentriques, subtélocentriques et télocentriques ou acrocentriques. En fait les auteurs ne sont pas toujours d'accord sur les termes à employer (MATTHEY, 1951) principalement entre acrocentrique et télocentrique. LEVAN *et al.* (1964) préconisent une nomenclature basée sur la place du centromère calculée par le rapport des longueurs des bras du

chromosome ( $r = \frac{l}{s}$ ). Selon la valeur de r la place du centromère sera médiane ( $r = 1$ ), terminale ( $r = \infty$ ) ou dans des régions intermédiaires appelées médiane ( $1 < r < 1,7$ ), submédiane ( $1,7 < r < 3$ ), subterminale ( $3 < r < 7$ ) et terminale ( $7 < r < \infty$ ). Les chromosomes correspondants étant alors désignés par les lettres M, m, sm, st, t et T. L'usage conservant l'ancien vocabulaire il convient de faire la correspondance telle qu'elle est indiquée dans le tableau 1 ci-dessous :

TABLEAU 1  
Nomenclature des chromosomes d'après le rapport des deux bras (d'après LEVAN *et al.*, 1964)

Nomenclature de LEVAN <i>et al.</i>	r	Ancienne nomenclature
M	1.0	métacentrique
m	1.7	submétacentrique
sm		
st	3.0	subtélocentrique
t	7.0	acrocentrique
T	$\infty$	télocentrique

On peut ensuite compter le nombre de bras pour déterminer le nombre fondamental (FN). MATTHEY obtient le nombre fondamental en comptant un seul bras par télocentrique ou acrocentrique et deux bras pour les autres chromosomes. SCHEEL utilise aussi les mesures des bras des chromosomes, d'une manière différente, en évaluant leur quantité relative d'ADN par rapport à la quantité totale d'ADN. Il mesure sur des photographies (grandissement final de 4000) tous les bras des chromosomes (exemple : la totalité des longueurs des bras égale 250 mm). Par une règle de trois il rapporte ensuite la mesure de chaque bras en pourcentage de la longueur totale (exemple : un bras de chromosome de 2,5 mm représente 1 % de la totalité).

3. TENEUR EN A.D.N. (ACIDE DÉSOXYRIBONUCLÉIQUE).

Grâce aux techniques de microspectrophotométrie il est possible d'évaluer la teneur en ADN de l'équipement chromosomique après coloration du noyau au Feulgen.

ATKIN *et al.* (1965) comparent la teneur en ADN entre divers mammifères, oiseaux et reptiles. Chez les mammifères étudiés, malgré un nombre très

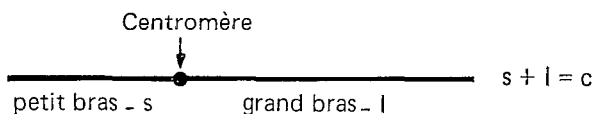


Fig. 1. — Représentation schématique d'un chromosome métacentrique à deux bras inégaux.

variable de chromosomes ( $2N = 78$  chez le chien et  $2N = 40$  chez la souris) les teneurs en ADN sont identiques. Cependant le rongeur *Microtus oregoni* ( $2N = 17/18$ ) qui a un des plus petits nombres de chromosomes pour un mammifère possède 10 % d'ADN en moins que les autres. Chez les oiseaux la teneur en ADN est la moitié de celle de l'homme : 44 à 59 % de la teneur des cellules polymorphes du sang humain. Cette différence entre deux classes de vertébrés à sang chaud suggère une évolution à partir de deux lignées reptiliennes différentes. Chez les reptiles deux groupes se distinguent quant à la teneur en ADN de leurs cellules par rapport aux cellules polymorphes du sang humain : les *Squamata* (sauriens et serpents) avec une teneur de 60 à 67 % et les *Chéloniens* avec une teneur de 80 à 89 %. Les batraciens (J. GALL, cité par OHNO et ATKIN, 1966) ont des teneurs en ADN très supérieures à celles des mammifères : 140 % chez les *Bufo* et 705 % pour *Plethodon cinereus* de l'ordre des *Caudata* dont les membres n'ont que 24 à 28 chromosomes.

Pour les poissons la teneur en ADN comparée à celle de l'homme est assez variable. Elle est très élevée chez les Dipneustes. *Lepidosiren paradoxa* présente 35 fois plus d'ADN que les mammifères (OHNO *et al.*, 1966); le protoptère possède  $100 \cdot 10^{-9}$  mg d'ADN par cellule contre  $7 \cdot 10^{-9}$  mg seulement pour une cellule humaine (AFFREY *et al.*, 1955). Elle est très faible chez les *Pleuronectidae* qui n'ont que 20 % de la teneur en ADN de l'homme. BEAMISH *et al.* (1971) donnent les teneurs en ADN suivantes par rapport aux cellules épithéliales de l'homme : 38 % pour le brochet (*Esox lucius*), 49 % pour le poisson rouge (*Carassius auratus*) et 72 % pour *Umbra limi* ce qui correspond respectivement à des teneurs absolues en ADN par cellule de  $2,72 \cdot 10^{-9}$  mg,  $3,43 \cdot 10^{-9}$  mg et  $5,03 \cdot 10^{-9}$  mg. Chez les chordés primitifs et les Cyclostomes les pourcentages relatifs en ADN par rapport à l'homme (leucocyte) sont de 6 % pour *Ciona intestinalis*, 17 % pour

*Amphioxus lanceolatus*, 38 % pour *Lampetra planeri* et 78 % pour *Eplatretus stouti* (Atkin et Ohno, 1967).

Chez les poissons d'après HINEGARDNER (1968), la teneur en ADN des cellules est plus faible chez les poissons hautement spécialisés que chez les poissons moins évolués. Au cours de l'évolution la teneur en ADN peut, soit rester constante, l'évolution bénéficiant de mutations et de recombinaisons, soit augmenter par duplication, soit diminuer et conduire à des spécialisations.

#### 4. OBTENTION DE CHROMOSOMES.

##### 4.1. Principe.

Le but recherché est d'obtenir une image de l'équipement chromosomique d'un individu. Nous ne nous intéresserons qu'aux divisions mitotiques au cours desquelles les chromosomes prennent leur forme caractéristique permettant de les classer et c'est, au cours de la division cellulaire, le stade de la métaphase qui est le plus intéressant. Le processus employé est le suivant.

4.1.1. BLOCAGE DES DIVISIONS EN MÉTAPHASE : Ce blocage est obtenu par traitement à la colchicine, le Colcémid (déacétylméthylcolchicine) ou le Velban (vinblastine sulfate), les deux derniers produits donnant de meilleurs résultats. Les concentrations employées varient de 0,01 % à 0,4 % et l'action du produit est utilisée de 1 à 6 heures. Pour les gros poissons de mer on peut se baser sur une dose de 0,5 ml de solution à 0,3 % pour 100 g de poids en injection intramusculaire. Pour les petits poissons ne pouvant recevoir d'injection on peut se baser sur une concentration de 0,01 à 0,10 % de produit dans l'eau où nage le poisson. Si l'usage de colchicine (ou Colcemid ou Velban) entraîne une accumulation des stades métaphasiques dans les cellules il provoque aussi, à forte concentration, la contraction des chromosomes. On peut alors utiliser du chlorure de calcium ( $\text{Ca Cl}_2$ ) pour lutter contre cette contraction (SUBRAHMANYAN, 1969).

4.1.2. CHOC HYPOTONIQUE : Le choc hypotonique a pour but d'obtenir le gonflement des cellules par osmose et de provoquer une bonne dispersion des chromosomes. Ce gonflement peut être accéléré par l'emploi de KCN (STEWART, 1968).

4.1.3. FIXATION : La fixation tue les cellules. On emploie couramment un mélange fraîchement préparé de méthanol (3 volumes) et d'acide acétique glacial (1 volume) ou des fixateurs plus élaborés

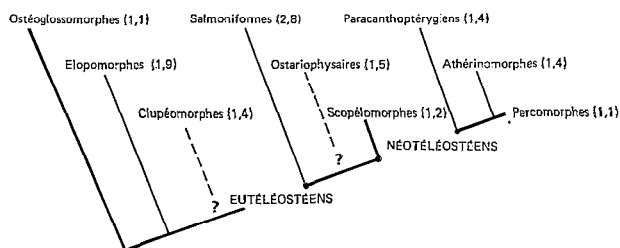


Fig. 2. — Représentation schématique des relations entre les grands groupes de poissons Téléostéens. La teneur moyenne en ADN est donnée entre parenthèses en picogrammes ( $10^{-12}$  grammes) (d'après HINEGARDNER et ROSEN, 1972).

comme celui de Carnoy décrit plus loin. Dans le cas où le matériel est constitué par des embryons de poissons, les graisses sont éliminées en utilisant de l'acétone (SIMON, 1964).

4.1.4. COLORATION : La coloration des chromosomes augmente le contraste au cours de l'observation microscopique. Un procédé rapide consiste à utiliser l'acéto-orcéine (Orcéine à 1 % dans de l'acide acétique à 45 %) qui fixe et colore à la fois. Un bon colorant souvent employé après la fixation est composé de Giemsa dans une solution tampon (décrit plus loin).

Enfin une coloration spécifique de l'ADN (acide désoxyribonucléique) par le Feulgen est utilisée principalement pour les évaluations microdensitométriques des teneurs en ADN des noyaux cellulaires.

4.1.5. MONTAGE SUR LAME : Le montage sur lame peut être fait avant ou après la coloration. Plusieurs procédés peuvent être employés selon qu'on utilise des frottis, des « squashes », des cultures de cellules et selon que l'on désire une préparation permanente ou non. Les préparations peuvent être séchées à l'air, ou montées dans un liquide d'inclusion (STEWART et LEVIN, 1968). CONGER et FAIRCHILD (1953) préconisent la congélation préalable de la préparation sur un bloc de carboglace.

## 4.2. Techniques.

Chez les poissons on observe généralement les chromosomes à partir de tissus épithéliaux soit bruts soit régénérés ou à partir de cultures soit de tissus soit de leucocytes.

4.2.1. TISSUS ÉPITHÉLIAUX BRUTS. Les tissus les plus employés ont la provenance suivante :

4.2.1.1. *Nageoires ou écailles* : Techniques décrites dans le livre de T. E. DENTON d'après DENTON et HOWELL (1969).

4.2.1.2. *Branchies* : Nous avons employé la méthode de Mc PHAIL et JONES (1956) adaptée aux poissons marins. Les expérimentations ont porté sur des poissons pêchés au Sénégal, principalement sur de jeunes individus de sardinelles de 8 à 10 cm (*Sardinella aurita* et *S. eba*) et sur une vingtaine d'autres espèces appartenant à 19 familles différentes. Certains poissons résistent très bien à l'ensemble du traitement : *Arius heudeloti* (Ariidae), *Dactylopterus volitans* (Dactylopteridae), *Chilomycterus orbicularis* (Diodontidae), *Pomatomus saltatrix* (Pomatomidae), *Lithognathus mormyrus* (Sparidae), *Rypticus saponaceus*, *Epinephelus aeneus*, *E. gorensis*

(Serranidae) et *Scorpaena angolensis* (Scorpaenidae). D'autres poissons résistent très mal au traitement : *Caranx rhonchus*, *Scyris alexandrinus* (Carangidae), *Sardinella aurita*, *S. eba* (Clupeidae), *Anchoa guineensis* (Engraulidae), *Pseudupeneus prayensis* (Mullidae), *Pagrus ehrenbergi*, *Pagellus coupei* (Sparidae), *Lagocephalus laevigatus* (Tetraodontidae).

Le traitement employé est le suivant :

— Anesthésie au MS 222 Sandoz (1 pointe de scalpel de poudre pour 10 l d'eau de mer). Cette anesthésie est bien tolérée par tous les poissons étudiés.

— Injection d'une solution de Colchicine à 0,4 % dans de l'eau physiologique (ou de l'eau de mer diluée au 1/4 filtrée et stérilisée sur filtre millipore) dans les muscles antérodorsaux. La dose de 0,1 ml pour une sardine de 10 cm est un maximum à ne pas dépasser.

— Maintien des poissons dans de l'eau de mer renouvelée pendant 2 à 8 heures (les sardinelles meurent au bout de quelques heures), puis dans de l'eau de mer diluée de moitié (1 heure pour les sardinelles et jusqu'à 8 heures pour les poissons résistants) et enfin dans de l'eau douce aérée par un bulleur (45 minutes pour les sardinelles et jusqu'à 2 heures pour les poissons résistants).

À l'issue de ce traitement l'arc branchial postérieur est prélevé, lavé et dialysé contre de l'eau distillée durant 1 à 3 heures (choc hypotonique). Il est ensuite conservé dans un tube contenant de l'orcéine acétique qui fixe et colore à la fois les tissus.

4.2.1.3. *Rate, foie, reins* : Techniques décrites dans le livre de T. E. DENTON d'après OHNO (1965) et BECAK (1966).

4.2.1.4. *Cornée* : Techniques décrites dans le livre de T. E. DENTON d'après DREWRY (1957).

4.2.1.5. *Embryon* : Techniques décrites dans le livre de T. E. DENTON d'après SIMON (1963 et 1964).

4.2.1.6. *Sang* : Les chromosomes sont observés sur des leucocytes directement à partir d'un prélèvement de sang. Cette méthode a été pratiquée avec succès par PRASAD *et al.* (1970) sur des souris.

4.2.2. TISSUS ÉPITHÉLIAUX RÉGÉNÉRÉS. Nous avons utilisé une technique mise au point par SCHEEL (1966) sur des poissons d'eau douce, technique intermédiaire entre l'utilisation de tissus bruts et la culture de tissus *in vitro* et utilisant la régénération tissulaire. Après ablation d'une partie des nageoires on observe une régénération cellulaire, donc de nombreuses cellules en division, accompagnée d'un phénomène connexe de cicatrisation.

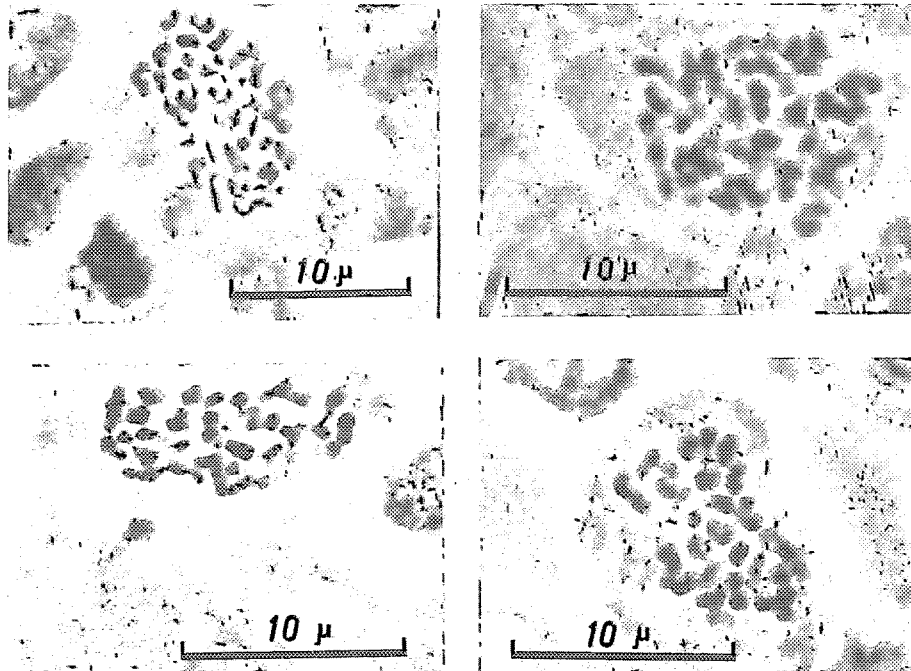


Photo 2. — Chromosomes des cellules épithéliales des arcs branchiaux de jeunes *Sardinella sba* (L<sub>f</sub> = 8 cm) obtenus par la méthode de Mc. PHAIL et JONES. Injection intramusculaire de colchicine à 0,4 %, maintien des poissons dans de l'eau de mer diluée de moitié (1 h ½) puis dans de l'eau douce (45 mn). Fixation et coloration à l'orcéine acétique. Les clichés correspondent à des individus ayant reçu 0,3 ml de colchicine (en haut) et 0,2 ml de colchicine (en bas).

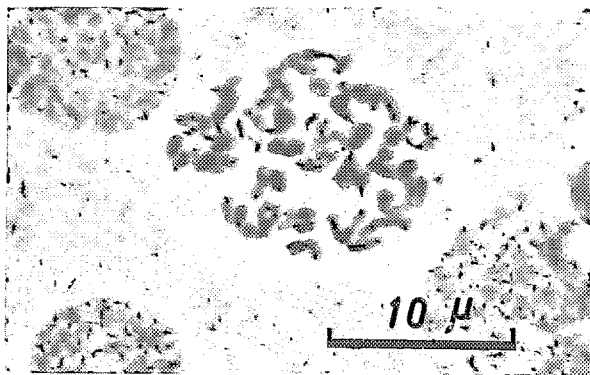


Photo 3. — Chromosomes des cellules de l'épithélium branchial d'un jeune *Pagrus ehrenbergi* obtenus d'après la méthode de Mc. PHAIL et JONES.

Nous avons expérimenté cette méthode principalement sur de jeunes individus de sardinelles pêchés au lamparo en baie de Gorée et maintenus vivants en viviers. La nageoire pectorale a été préférée à la nageoire caudale qui contient trop de mélanophores dont les débris gênent ensuite l'observation. Le traitement employé a été le suivant :

— Anesthésie au MS 222 Sandoz et ablation d'une partie de la nageoire pectorale.

Maintien des poissons en vivier de 30 à 48 heures pendant lesquelles s'effectue la régénération tissulaire (température de l'eau = 24 °C). Une durée de 24 heures est insuffisante et une durée de 54 heures trop grande, divers microorganismes se développant alors sur la nageoire coupée.

— Prélèvement du tissu régénéré à l'aide de ciseaux fins et incubation dans une solution de Colchicine à 0,4 % en eau physiologique hypotonique (4 g de Na Cl par litre) pendant 2 heures.

Choc hypotonique par incubation du tissu dans de l'eau distillée pendant une heure.

— Fixation et coloration du tissu par une solution d'orcéine à 1 % dans l'acide acétique à 45 %. SCHEEL (1966) préconise l'emploi d'orcéine à 0,4-0,5 %, la concentration de 1 % recommandée par KARBE (1961) provoquant un certain collage entre les chromosomes. Le tissu est conservé au réfrigérateur dans la solution d'orcéine acétique jusqu'au moment du montage.

Le montage est un point délicat pouvant assurer ou non un bon étalement des chromosomes. Dilacérer dans une sa lière le côté du tissu présentant la régéné-

ration cellulaire. Aspirer avec une seringue et une aiguille du liquide contenant les cellules et déposer une goutte sur une lame de verre. Oter les poussières autour de la goutte et recouvrir avec une lamelle convexe minutieusement sélectionnée au préalable. Faire sécher à la chaleur d'une lampe électrique. La lamelle écrase d'elle-même les cellules et provoque l'étalement des chromosomes.

4.2.3. CULTURE DE TISSUS : Cette technique bien connue pour les tissus de mammifères est peu employée avec les tissus de poissons. Une technique est décrite dans le livre de T. E. DENTON d'après CLEM (1961) et REGAN (1968).

4.2.4. CULTURE DE LEUCOCYTES : Cette technique qui donne de bons résultats chez l'homme est de plus en plus employée pour les poissons malgré les difficultés qu'elle présente. On utilise alors un agent mitogène qui est une phytohémmagglutinine extraite soit du haricot *Phaseolus vulgaris* (P.H.A.) soit de *Phytolacca americana* (P.W.M.). Nous décrivons ici le protocole employé au laboratoire du Professeur de GROUCHY (Paris) pour obtenir des préparations chromosomiques de leucocytes humains cultivés et la méthode de culture employée par BARKER (1972), sur la plie. On trouvera dans le livre de T. E. DENTON deux autres protocoles employés par LABAT (1967) sur *Cyprinus carpio*, et HECKMAN *et al.* (1970) sur *Carassius auratus*.

4.2.4.1. *Chromosomes humains* : Les préparations sont obtenues à partir d'une culture de leucocytes selon le procédé ci-dessous :

— Blocage en métaphase par une solution isotonique contenant de la Colchicine. En fait le produit employé est du Colchinos (Houdé, 15, rue Olivier-Metra, Paris 20<sup>e</sup>) en ampoules, la dilution étant de 3 ampoules dans 13,5 ml d'eau physiologique. Les cellules incubent 2 heures dans ce produit.

— Éclatement cellulaire : après le bain de colchicine, centrifuger (1000 t/mn, 5 mn), jeter le surnageant et le remplacer par de l'eau physiologique hypotonique. Laisser le choc hypotonique s'opérer pendant 30 mn.

— Fixation : Après le choc hypotonique, centrifuger, jeter le surnageant et le remplacer par le fixateur de Carnoy :

Fixateur de Carnoy	{	Chloroforme	3 volumes
		Acide acétique	1 volume
		Alcool éthylique- absolu	6 volumes

Laisser incuber 30 mn à la température du laboratoire, centrifuger 5 mn à 1000 t/mn et ôter le surnageant.

Le remplacer par un mélange d'acide acétique (1 volume) et d'alcool éthylique absolu (3 volumes) et incuber 10 minutes (les cellules peuvent être gardées plus longtemps dans ce mélange).

— Étalement : Centrifuger, garder un peu de surnageant, remettre en suspension et lâcher 1 goutte d'une hauteur de 20 cm environ sur une lame de verre qui a trempé dans de l'eau froide et n'a pas été essuyée.

— Conservation : Les lames sont conservées telles quelles et sans lamelles. A ce stade, intervient la possibilité de mettre en évidence des bandes caractéristiques sur les chromosomes par digestion trypsique ou dénaturation à la chaleur avant la coloration. Il est alors possible de connaître non seulement le nombre et la forme des chromosomes mais aussi la topographie spécifique des bandes.

a. *Digestion trypsique* : Elle est effectuée dans des tubes de Borel sur des lames préparées depuis plusieurs jours (au moins 8 jours), le temps d'immersion dans la solution trypsique variant avec l'âge de la préparation.

--- Immerger les lames dans la solution trypsique à la température du laboratoire pendant 30 s à 2 mn (chronomètre en main). Cette solution trypsique doit être préparée en petites quantités à partir de 500 ml de solution A et de 1 g de trypsine.

— Rincer dans 2 bains successifs de solution A (quelques secondes).

— Colorer 3 à 5 mn dans la solution de Giemsa fraîchement préparée (valable 1 heure).

--- Rincer à l'eau distillée.

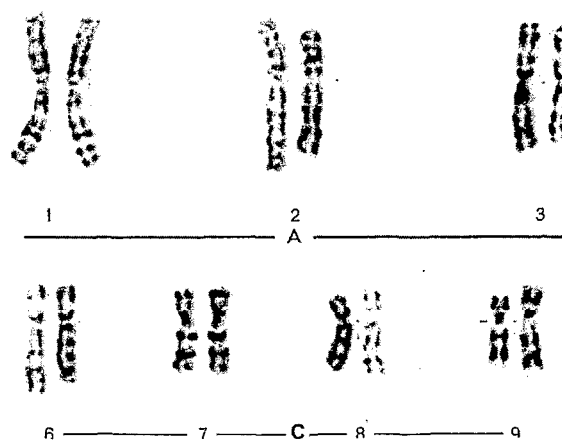


Photo 4. — Chromosomes humains (A<sub>1, 2, 3</sub> et C<sub>6, 7, 8, 9</sub>) après digestion enzymatique à la trypsine montrant des bandes G. Préparation obtenue au laboratoire de Cytogénétique du Docteur Jean de GROUCHY (cliché de GROUCHY).

Solution A		Solution de Giemsa 6,7 < pH < 6,8	
Na Cl	16 g	Giemsa (1)	1,5 ml
K Cl	0,4 g	Méthanol absolu	1,5 ml
PO <sub>4</sub> H Na <sub>2</sub>	2,3 g	Ac. citrique 0,1 M	2 ml
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K	0,4 g	Na <sub>2</sub> H PO <sub>4</sub> 0,2 M	4 ml
		Eau distillée q.s.p.f.	50 ml

b. *Dénaturation ménagée à la chaleur.* Cette méthode a été mise au point par DUTRILLAUX et LEJEUNE en 1971. Les lames utilisées ont été préalablement nettoyées au mélange sulfochromique. Quand la préparation chromosomique est terminée depuis plusieurs jours les lames sont mises dans une cuve pour histologie maintenue au bain marie à 87°C. Cette cuve contient soit du liquide de Earle (Milieu de culture vendu à l'Institut Pasteur; la boîte contient deux sortes d'ampoules, seules les ampoules non colorées diluées 10 fois et chauffées sont utilisées. Le pH est ajusté à 6,5 avec du bicarbonate à 14 %) soit un tampon phosphate 0,15 M de pH = 6,5.

Les lames incubent de 30 mn (préparations récentes de 2 à 3 jours) à 10 mn (préparations datant de 3 semaines) à une température de 87° mesurée au niveau des lames. Elles sont ensuite rincées à l'eau distillée et colorées pendant 15 mn dans la solution de Giemsa suivante :

Giemsa (2)	4 ml
Tampon phosphate pH = 6,5	4 ml
Eau distillée qspf	100 ml



Photo 5. — Chromosomes humains (A<sub>1, 2, 3</sub> et C<sub>6, 7, 8, 9</sub>) après dénaturation ménagée par la chaleur montrant des bandes R. Préparation obtenue au Laboratoire de Cytogénétique du Docteur Jean de Grouchy (cliché de Grouchy).

4.2.4.2. *Chromosomes de poissons* : BARKER (1972) utilise pour *Pleuronectes platessa* le protocole suivant pour la culture des leucocytes :

— prélever 1 ml de sang sur héparine par ponction intracardiaque, centrifuger 3 minutes à 90 g.;

— prélever le plasma riche en leucocytes et le transférer dans une bouteille contenant 7 ml de milieu de culture (2 ml de sérum fœtal de veau + 5 ml de milieu 199, la pression osmotique étant ajustée à celle du plasma à l'aide de Na Cl);

— ajouter 0,1 ml d'une solution de Colcemid 10<sup>-3</sup> M et laisser incuber 2 heures à 10 °C.

La suite de l'opération est une adaptation par le Dr. D. SCOTT de la technique de MOORHEAD *et al.* (1960).

(a) — Centrifuger à 225 g pendant 5 minutes et jeter le surnageant.

(b) — Remettre les cellules en suspension pendant 15 mn dans 5 ml d'une solution de citrate de sodium à 1 % et répéter l'opération (a).

(c) — Ajouter 5 ml d'un mélange fraîchement préparé d'acide acétique (25 %) et d'alcool (75 %), agiter légèrement et répéter immédiatement l'opération (a).

(d) — Répéter l'opération (c) mais laisser la suspension cellulaire 30 mn à 0° avant de centrifuger.

(e) — ajouter 5 ml de mélange acide acétique-méthanol (1 : 3) et répéter l'opération (a).

(f) — ajouter 5 ml d'acide acétique glacial et répéter l'opération (a).

(g) — Mettre les cellules en suspension avec 1 à 2 ml d'acide acétique glacial et déposer 4 gouttes de suspension sur une lame de microscope. Laisser sécher à 90 °C sur une platine chauffante puis colorer durant une nuit dans une solution lacto-acétique d'orcéine à 2 %. Déshydrater et monter dans un liquide d'inclusion (Euparal).

CHEVASSUS obtient de très bons résultats avec une méthode un peu plus élaborée de culture de leucocytes de *Tilapia macrochir* (*communication personnelle*). Le milieu de culture tient compte des concentrations du plasma en ions K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup> et Mg<sup>+</sup>, contient 40 % de Ringer, 40 % de milieu de Eagle, 20 % de sérum de veau, 10 % de sérum embryonnaire de bœuf ainsi que divers antibiotiques (Pénicilline G 100.000 unité/litre, Streptomycine 100.000 mcg/litre, Mycostatine 50.000 u/litre, Kanamycine 100 mg/litre). Le milieu est stérilisé sur filtre millipore 0,45 μ et les divisions cellulaires sont activées par la phytohémagglutinine PHA—M.

(1) Giemsa Blood Stain Original — Azur blend, item n° 620. Harleco — 60 th. Woodland Avenue — Philadelphia P. A. 19143 — USA.

(2) Giemsa Française des Matières Colorantes — Dept R.A.L., 25 bd de l'Amiral Briux, Paris 16<sup>e</sup>.





Photo 6. — Chromosomes de leucocytes de *Tilapia macrochir* femelle obtenus après culture de leucocytes au Laboratoire de Physiologie des Poissons de l'I.N.R.A. par B. CHEVASSUS (cliché CHEVASSUS).

## 5. OBSERVATION ET PRÉSENTATION DES CHROMOSOMES.

Les observations sont faites avec un microscope à contraste de phase, les plaques métaphasiques intéressantes sont photographiées et les images des chromosomes sont découpées pour être présentées en carte chromosomique.

Nos observations personnelles ainsi que les photographies ont été réalisées avec un microscope à contraste de phase Ultraphot II Zeiss (1). L'éclairage de la préparation est obtenu à partir soit d'une lampe à incandescence (température de couleur 3150° Kelvin) soit d'une lampe à arc (température de couleur 4000° K.). Le voltage de contrôle étant réglé sur 12 volts dans les deux cas. Un filtre vert est interposé sur le trajet des rayons lumineux. Le film utilisé est du Kodak Panatomic X de sensibilité 16 DIN. Les observations courantes sont faites en *contraste de phase* avec un oculaire X8

(1) Ce matériel a été aimablement mis à notre disposition au laboratoire de Zoologie de la Faculté des Sciences de Dakar par le professeur X. MATTEI que nous remercions vivement ici.

et des objectifs X40 ou X100, l'objectif X100 étant à immersion. De plus le système Optovar intercalé entre l'objectif et l'oculaire introduit un facteur de grossissement supplémentaire de 1,25, 1,6 ou 2. A la prise de vue l'oculaire est hors circuit et seuls l'objectif et l'Optovar participent au grossissement. L'observation est donc faite à des grossissements de 400 (oculaire X8, objectif 40, optovar 1,25) à 1600 (oculaire X8, objectif 100, optovar 2) et la prise de vue à des grossissements de 160 (objectif 40, optovar 1,25) à 630 (objectif 100, optovar 2) le plus couramment employé à la prise de vue étant le grossissement 500. Deux clichés sont pris à des temps d'exposition différents affichés par les chiffres 2 et 3 correspondant à la sensibilité du film utilisé. En pratique les lames sont observées au grossissement 400 (oculaire 8, optovar 1,25 objectif 40) puis les plages intéressantes au grossissement 1250 (oculaire 8, optovar 1,6 et objectif 100 à immersion). Les photos sont prises au grossissement 500 et les tirages effectués avec un objectif de 80 mm donnant un grandissement de facteur  $\times 5$  ou  $\times 8$  soit un grandissement final pour les chromosomes de 2500 ou 4000. Les images des chromosomes sont découpées et disposées par paires selon leurs types (métacentrique, télocentrique, acrocentrique, etc.) et leurs tailles décroissantes, les chromosomes sexuels ou non appariés étant disposés à la fin. L'ensemble forme le photocaryotype.

## 6. DISCUSSION.

Les mécanismes de l'évolution portant sur le nombre de chromosomes peuvent être des *inversions* péricentriques sans perte de matériel génétique (MATTHEY 1966; OHNO *et al.* 1966; SCHEEL 1972 avec *Aphyosemion bivittatum*), des translocations de type Robertsonien encore appelées *fusions centriques* dans lesquelles deux chromosomes non homologues s'unissent par leurs centromères (WHITE 1954; JOHN et LEWIS 1968; SCHEEL 1972 avec *A. camerounense*) et des *polyploïdisations*. L'isolement d'une espèce peut être immédiat par fusion centrique entre chromosomes homologues avec passage obligatoire par une espèce ayant un nombre impair de chromosomes, ou progressif par fusion entre acrocentriques non homologues et par inversion péricentrique. Chez les poissons le nombre de chromosomes peut varier selon le sexe et selon un polymorphisme individuel et dépend de l'action des divers réarrangements chromosomiques énumérés précédemment et qui se produisent au cours de l'interphase - prophase de la méiose. Des phénomènes d'hybridation, de gynogenèse, d'hermaphrodisme (synchronique chez *Serranus scriba*; consécutif chez *Pagellus erythrinus*) et d'unisexualité peuvent compliquer les

observations. Dans la plupart des cas la détermination du sexe serait polygénique, déterminée par une ou plusieurs hormones dépendant de gènes portés par le chromosome sexuel qui peut être ou non hétéromorphe. On a vu précédemment des exemples d'équipement chromosomique différent selon le sexe (chapitre 2).

De rares cas de polymorphisme chromosomique sont connus, par exemple chez le rongeur *Mastomys natalensis* où il est dû à une inversion péricentrique (MATTHEY, 1965) et chez le moineau *Zonotrichia albicollis* portant sur deux paires de macrochromosomes (THORNEYCROFT, 1966). Chez les poissons le cas le plus connu est celui de *Salmo salar* où les chromosomes sont instables. L'espèce européenne présente 60 chromosomes (12 méta-submétacentriques et 48 acrocentriques), celle d'Amérique du nord 56 chromosomes (16 méta-submétacentriques et 40 acrocentriques) et celle du Pays de Galles 58 chromosomes (16 et 42). Un tel cas de polymorphisme serait peut être moins rare qu'on le pense chez les Salmonidae où CAPANNA *et al.* (1973) attirent l'attention sur le cas de *Salmo trutta*. SCHEEL (1972) signale aussi chez *Aphyosemion bivittatum* un polymorphisme autosomal par inversion péricentrique transformant un chromosome à 2 bras en un chromosome télocentrique. Les réarrangements chromosomiques donnent parfois naissance à un polymorphisme chez un même individu; on trouve par exemple dans les testicules d'*Acheilognathus rhombea* (Cyprinidae) des cellules à  $2N = 44$ ,  $2N = 46$  et  $2N = 48$  chromosomes résultant de fusions centriques (NOGUSA, 1955). Chez *Salmo irideus* (OHNO *et al.*, 1965) un réarrangement post-zygotique donne des cellules à 59 chromosomes (reins, rate) ou 62 chromosomes (foie).

La spéciation par rapport à un ancêtre commun s'est sans doute effectuée par des mutations alléliques à des loci déjà existants mais ce phénomène ne suffit pas à expliquer l'évolution d'une classe de vertébrés à une autre et la duplication des gènes y joue un rôle important (OHNO, 1967). Cette duplication peut s'effectuer soit pour des segments de chromosomes entraînant par exemple une augmentation de la valeur en ADN sans modifier le nombre de chromosomes (48 acrocentriques chez beaucoup de Neoptérygiens dont la valeur en ADN est variable) soit par polyploïdisation, favorisée chez les poissons par le fait que les chromosomes sexuels sont souvent isomorphiques. La polyploïdisation expliquerait par exemple que les Salmonidae possèdent de 100 à 104 bras chromosomiques (104 chez *Salmo irideus*) et deux fois plus d'ADN que les Clupeidae qui ont en général 48 acrocentriques (48 chez *Engraulis mordax*). Pour tester l'hypothèse de la polyploïdie chez les Salmoniformes KLOSE *et al.* (1967) utilisent le système d'isoenzymes de la lactico-déshydrogénase (L.D.H.) et trouvent entre autre que la L.D.H.

dépend de 4 loci chez *Salmo irideus* et de 2 loci chez *Engraulis mordax*. Chez les Cyprinidae, *Carassius auratus* et *Cyprinus carpio* ont 100 et 104 chromosomes alors que d'autres membres de cette famille ont à peu près 50 chromosomes (50 pour *Barbus tetrazona* et 52 pour *B. fasciatus*); OHNO *et al.* (1967) montrent que les deux premières espèces seraient tétraploïdes par rapport à *Barbus tetrazona* et *B. fasciatus* avec deux fois plus d'ADN. De plus *Cyprinus carpio* possède 4 chromosomes punctiformes alors que *B. fasciatus* n'en a que deux. Enfin les Cyprinidae tétraploïdes ont deux fois plus de loci pour les gènes déterminant certaines enzymes telles que LDH, isocitrate deshydrogénase, 6-phosphogluconate deshydrogénase (BENDER et OHNO, 1968; KLOSE *et al.*, 1969).

Il existe en Yougoslavie parmi les espèces de Cyprinidae endémiques à  $2N = 50$  chromosomes une espèce, *Aulopyge hügeli*, possédant  $2N = 100$  chromosomes résultant probablement d'une telle polyploïdie (BERBEROVIC *et al.*, 1973). Ce serait aussi le cas pour *Barbus meridionalis petenyi* qui possède 100 chromosomes (SOFRADZIJA et BERBEROVIC, 1973). En plus des cas de tétraploïdie on trouve des cas de triploïdie. PREHN et RASCH (1969, 1973) mettent en évidence un équipement chromosomique triploïde ( $3N = 69$ ) chez des variants naturels, unisexués et féconds de *Poecilia formosa* ( $2N = 46$ ). Cet équipement proviendrait pour  $2N$  chromosomes de *P. formosa* (tous les individus sont des femelles gynogénétiques) et pour  $N$  chromosomes de *P. mexicana* (poissons bisexués). Ces variants sont donc des hybrides, unisexués (tous femelle) et féconds. Ils se distinguent de *P. formosa* et de *P. mexicana* par une teneur en ADN 1,5 fois plus élevée et par une différence biochimique portant sur l'albumine, mise en évidence par électrophorèse du sérum (BALSANO *et al.*, 1972). On constate que l'étude biochimique, des équipements enzymatiques par exemple, apporte souvent une confirmation génétique aux hypothèses cytotoxinomiques telles que la tétraploïdie. Mais elle peut faire beaucoup mieux : ainsi chez *Catostomus commersoni* les deux formes grande et naine possèdent le même équipement chromosomique (BEAMISH et TSUYUKI, 1971) et c'est l'étude du polymorphisme biochimique qui a permis de séparer génétiquement les deux formes par les différences constatées au niveau des transferrines sériques. Peut-être y aurait-il un problème analogue avec l'espèce *Sardina pilchardus* de Mauritanie où l'on signale l'existence d'une race naine à Port-Étienne.

## CONCLUSION.

L'étude de l'équipement chromosomique des poissons n'a porté jusqu'à présent que sur un très petit nombre d'espèces en regard des 15 000 poissons Téléostéens connus. La plupart des poissons

étudiés sont des poissons d'eau douce. C'est dire combien il reste de travail à effectuer sur les poissons marins pour venir en aide aux systématiseurs qui cherchent des relations existant entre les divers groupes de poissons ou familles (par exemple Elopidae, Anguillidae et Murenidae) ainsi qu'à l'intérieur d'un même genre. D'intéressants problèmes de classification et d'évolution ont besoin de données cytotoxicologiques pour être mieux compris. Des révisions de genres entiers seraient parfois utiles et c'est le cas des *Mugil* (CATAUDELLA et CAPANNA, 1973).

Les études biochimiques apportent dans tous ces problèmes des données décisives que ce soit au niveau du genre ou de l'espèce. Chez deux rongeurs du genre *Taterillus* par exemple les différences observées au niveau des albumines et des transferrines

confirment les différences observées dans le nombre de chromosomes et peuvent servir à l'identification des espèces (BARON *et al.*, 1974); chez l'anguille, l'hémoglobine départage les individus d'Europe et d'Amérique des individus du Japon alors que le nombre de chromosomes ( $2N = 38$ ) est identique (SICK, 1962).

Une méthode récente de recherche biochimique appliquée directement aux chromosomes et plus précisément à l'acide désoxyribonucléique (ADN) qui les compose semble être l'outil sophistiqué idéal d'investigation au niveau des espèces et des races intraspécifiques. Il s'agit de l'hybridation *in vitro* de l'ADN. Cette technique permettrait par exemple d'élucider le problème d'existence de plusieurs races de *Sardinella aurita* au Sénégal (MICHELSON, GABIM 1970, *communication personnelle*).

*Manuscrit reçu au S.C.D. le 8 mai 1974.*

## BIBLIOGRAPHIE

- ANONYME, 1970. — Abstracts of papers presented at the sixth meeting of the Scandinavian Association of Geneticists. *Hereditas*, 69 : 287-310.
- ABRAMOFF (P.), DARNELL (R. M.), BALSANO (J. S.), 1968. — Electrophoretic demonstration of the hybrid origin of the gynogenetic teleost *Poecilia formosa*. *Am. Nat.*, 102 : 555-558.
- AGHASADEH (H.), RITTER (H.), 1971. — Polyploidisierung in der Fischfamilie Cyprinidae, Ordnung Cypriniformes. Duplikation der Loci für NAD — abhängige Malatdehydrogenasen. *Humangenetik*, 11 : 91-94.
- ATKIN (N. B.), OHNO (S.), 1967. — DNA values of four primitive chordates. *Chromosoma* (Berl.), 23 : 10-13.
- ATKIN (N. B.), MATTINSON (G.), BEÇAK (W.), OHNO (S.), 1965. — The comparative DNA content of 19 species of placental mammals, reptiles, and birds. *Chromosoma* (Berl.), 17 : 1-10.
- AVISE (J. G.), SELANDER (R. K.), 1972. — Evolutionary genetics of cave dwelling fishes of the genus *Astyanax*. *Evolution* 26 : 1-19.
- BARKER (C. J.), 1972. — A method for the display of chromosomes of plaice, *Pleuronectes platessa*, and other marine fishes. *Copeia*, (2) : 365-67.
- BARON (J. C.), HUBERT (B.), LAMBIN (P.), FINE (J. M.), 1974. — Serological differentiation of two species of *Taterillus* (Rodentia, Gerbillidae) from Senegal : *T. gracilis* (Thomas, 1892) and *T. pygargus* (Cuvier, 1832). *Comp. Biochem. Physiol.* 47 A : 441-446.
- BEAMISH (R. J.), TSUYUKI (H.), 1971. — A biochemical and cytological study of the longnose sucker (*Catostomus calostomus*) and large and dwarf forms of the white sucker (*Catostomus commersoni*). *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 28 : 1745-1748.

- BEAMISH (R. J.), MERRILEES (M. J.), CROSSMAN (E. J.), 1971. — Karyotypes and DNA values for members of the suborder Esocoidei (Osteichthyes : Salmoniformes). *Chromosoma (Berl.)*, 34 : 436-447.
- BEÇAK (W.), BEÇAK (L.), OHNO (S.), 1966. — Intra individual chromosomal polymorphism in green sunfish (*Lepomis cyanellus*) as an evidence of somatic segregation. *Cytogenetics*, 5 : 313-320.
- BEHNKE (R. J.), 1970. — The application of cytogenetic and biochemical systematics to phylogenetic problems in the family Salmonidae. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 99 (1) : 237-48.
- BERBEROVIĆ (L.), HADŽISELIMOVIĆ (R.), PAVLOVIĆ (B.), SOFRADŽIJA (A.), 1973. — Chromosome set of the species *Aulopige hügelii* Heckel 1841. *Conseil des Ac. des Sc. et des Arts de la RSF de Yougoslavie, Bulletin Scientifique, Section A*, 18, 1-3 : 10-11.
- BOOTHROYD (E. R.), 1959. — Chromosomes studies on three canadian populations of Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Can. Jour. Genetics and Cytol.*, 1 : 161-172.
- BOOKE (H. E.), 1968. — Cytotaxonomic studies of the coregonine fishes of the Great Lakes, U.S.A. : DNA karyotype analysis. *Fish. Res. Bd. Canada*, 25 : 1667-87.
- CAPANNA (E.), CATAUDELLA (S.), GENTILE DE FRONZA (T.), 1973. — Some remarks on the karyotype an intergeneric hybrid, *Salmo trutta* × *Salvelinus fontinalis* (Pisces, Salmoniformes). *Genetica*, 44 : 194-206.
- CATAUDELLA (S.), CAPANNA (E.), 1973. — Chromosome complements of three species of Mugilidae (Pisces, Perciformes). *Experientia*, 29 : 489-491.
- CHEN (T. R.), EBELING (A. W.), 1968. — Karyological evidence of female heterogamety in the mosquito fish *Gambusia affinis*. *Copeia* : 70-75.
- CHEN (T. R.), RUDDLE (F. H.), 1970. — A chromosome study of four species and a hybrid of the killifish genus *Fundulus* (Cyprinodontidae). *Chromosoma (Berl.)*, 29 : 255-267.
- CHEN (T. R.), EBELING (A. W.), 1971. — Chromosomes of the goby fishes in the genus *Gillichthys*. *COPEIA*, 1 : 171-174.
- CHIARELLI (B.), FERRANTELLI (O.), CUCCHI (C.), 1969. — The karyotype of some teleostea fish obtained by tissue culture *in vitro*. *Experientia*, 25 : 426-27.
- CLEM (W. L.), MOEWUS (L.), SIGEL (M. M.), 1961. — Studies with cells from marine fish in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 108 : 762.
- CONGER (A. D.), FAIRCHILD (L. M.), 1953. — A quick-freeze method for making smear slides permanent. *Stain Technology*, 28, 6 : 281-283.
- DENTON (Thomas E.), 1973. — Fish Chromosome Methodology. Charles G. Thomas, Publisher 301-327 East Laurence Av<sup>e</sup>, Springfield, Illinois, U.S.A.
- DENTON (T. H.), HOWELL (W. M.), 1969. — A technique for obtaining chromosomes from the scale epithelium of teleost fishes. *Copeia*, 2 : 392-393.
- DUTRILLAUX (B.), LEJEUNE (J.), 1971. — Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 272 : 2638.
- EBELING (A. W.), CHEN (T. R.), 1970. — Heterogamety in teleostean fishes. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 99 : 131-138.
- EBELING (A. W.), ATKIN (N. B.), SETZER (P. Y.), 1971. — Genome sizes of teleostean fishes : increases in some deep sea species. *The American Naturalist*, 105, 946 : 549-562.
- ENDO (A.), INGALLS (T. H.), 1968. — Chromosomes of the zebra fish. A model for cytogenetic, embryologic and ecologic study. *J. Hered U.S.A.*, 59 : 382-384.
- ENGEL (W.), HOF (J. O.), WOLF (U.), 1970. — Genduplikation durch polyploide Evolution : die Isoenzyme der Sorbitdehydrogenase bei herings-und lachsartigen Fischen (Isospondyli). *Humangenetik*, 9 : 157-163.
- FECHHEIMER (N. S.), 1960. — Mammalian cell chromosome counts : a simple method for making preparations. *Nature*, 188 : 247.
- GAS (M<sup>me</sup>), 1970. — Revue bibliographique sur la caryologie des Téléostéens. Étude critique des méthodes employées et des résultats obtenus. *Biol. Med.*, 64 (1) : 54-81.
- GREGOR (Mc.) (J. F.), 1960. — The chromosomes of the maskinonge (*Esox masquinongy*) *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, XII, 2, : 224-229.
- GYLDENHOLM (A. O.), SCHEEL (J. J.), 1971. — Chromosome numbers of fishes I. *J. Fish. Biol.*, 3 : 479-486.
- HECKMAN (R. J.), BRUBAKER (P. E.), 1970. — Chromosome preparation from fish blood leucocytes. *The progressive fish culturist*, 32, 4 : 206.
- HECKMAN (J. R.), ALLENDORF (F. W.), WRIGHT (J. E.), 1971. — Trout leukocytes : growth in oxygenated cultures. *Science*, 173 : 246-247.
- HINEGARDNER (R.), ROSEN (D. E.), 1972. — Cellular DNA content and the evolution of teleostean fishes. *The American Naturalist*, 106, 951 : 621-644.
- HITOTSUMACHI (S.), SASAKI (M.), OJIMA (Y.), 1969. — A comparative karyotype study in several species of japanese loaches (Pisces, Cobitidae). *Japan J. genetics*, 44 (3) : 157-161.
- HUBBS (C.), 1970. — Symposium on fish cytogenetics. *Trans. of the Am. Fish. Soc.*, 99, 1 : 98-248.
- IRIKI (S.), 1932. — Preliminary notes on the chromosomes of Pisces. I. *Aplocheilus latipes* and *Lebistes reticulatus*, *Proc. Imp. Acad. (Tokyo)*, 8 : 262-263.
- ITOH (Y.), NIYAMA (H.), 1972. — Comparative chromosome studies in two cyprinid fishes, *Ugui*, *Tribolodon hakonensis* (Günther) and *Ezo ugui*, T. ezo Okada et Ikeda. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido University*, 23, N° 2 : 73-76.
- KAUR (D.), SRIVASTAVA (M. D. L.), 1965. — The structure and behaviour of chromosomes in five freshwater teleosts. *Caryologia. Ital.*, 18 : 181-191.
- KLOSE (J.) *et al.*, 1968. — Duplication of the LDH gene loci by polyploidization in the fish order Clupeiformes. *Humangenetik*, 5 : 190-196.
- KULIKOVA (N. I.), 1971. — Intraspecific variability of karyotypes of the chum salmon. *Oncorhynchus keta* (Walb.) I. *Ichthyol. (Vopr. Ikhtiol.)*, 11, (6) : 977-983.

- LABAT (R.), LARROUY (G.), MALASPINA (L.), 1967. — Technique de culture de leucocytes de *Cyprinus carpio* L. / *C. R. Acad. Sci. Paris*, 264 : 2473-75.
- LEVAN (A.), FREDGA (K.), SANDBERG (A. A.), 1964. — Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52 : 201-220.
- LIEDER (U.), 1956. — Chromosomenstudien und Knochen Fischen. 4. Die Chromosomenverhältnisse bei der Regenbogen- und Bachforelle und ihren Bastarden. *Z. Fisch.*, 4, (7/8) : 589-94.
- LIEPPMAN (M.), HUBBS (C.), 1969. — A karyological of two cyprinid fishes *Notemigonus crysoleucas* and *Notropis lutrensis*. *Texas Rep. Biol. Med.*, 27 : 427-435.
- LOISELLE (P. V.), BLAIR (D.), 1972. — A new species of *Aphyosemion* (*Teleostomi*, *Cyprinodontidae*, *Rivulinae*) from Ghana, and a redefinition of subgenus *Fundulopanchax*. Myers, 1924. *J. Amer. Killifish Ass.*, 8 : 1-11.
- LOWE (C. H.), WRIGHT (J. W.), GOLE (C. J.), BEZY (R. L.), 1970. — Chromosomes and evolution of the species groups of *Cnemidophorus* (*Reptilia*, *Teiidae*). *Syst. Zool.*, 19 : 128-141.
- LUEKEN (W.), FOERSTER (W.), 1969. — Chromosomenuntersuchungen bei Fischen mit einer vereinfachten Zellkulturtechnik. *Zool. Anz.*, 183 : 169-176.
- MAKINO (S.), 1939. — The chromosomes of the carp, *Cyprinus carpio*, including those of some related species of Cyprinidae for comparison. *Cytologia* (Tokyo), 2 : 430-440.
- WRIGHT (J. E.), ATHERTON (J. R. et L. M.), 1970. — Polymorphisms for LDH and transferrin loci in brook trout populations. Symposium on fish cytogenetics — *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 99, N° 1.
- MATSUZAWA (T.), HAMILTON (J. R.), 1973. — Polymorphism in lactate dehydrogenase of skeletal muscle associated with YY sex chromosomes in Medaka (*Oryzias latipes*). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 142, (1) : 232-236.
- MATTHEY (R.), 1966. — Une inversion péricentrique à l'origine d'un polymorphisme chromosomique non robertsonien dans une population de *Mastomys* (*Rodenlia*, *Murinae*). *Chromosoma* (Berl.), 18 : 188-200.
- MAYERS (L. J.), ROBERTS (F. L.), 1969. — Chromosomal homogeneity of five populations of alewives, *Alosa pseudoharengus*. *Copeia*, (2) : 313-317.
- MOOREHEAD (P. D.), NOWELL (P. C.), MELLMAN (W. J.), BATTIPS (D. M.), HUNGERFORD (D. A.), 1960. — Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Expl. Cell. Res.*, 20 : 613-616.
- MURAMOTO (J.), OHNO (S.), ATKIN (N. B.), 1968. — On the diploid state of the fish order Ostariophysi. *Chromosoma*, 24 : 59-66.
- NAYYAR (R. P.), 1966. — Karyotype studies in thirteen species of fishes. *Genetica*, 37 : 78-92.
- NILSSON (B.), 1973. — A bibliography of literature concerning chromosome identification — with special reference to fluorescence Giemsa staining techniques. *Hereditas*, 73 : 259-270.
- NOGUSA (S.), 1960. — A comparative study of the chromosomes in fishes with particular considerations on taxonomy and evolution. *Mem. Hyogo Univ. Agric. Biol.*, Ser. 3 : 1-68.
- NOGUSA (S.), 1955. — Chromosomes studies in Pisces. V. Variation of the chromosome number in *Acheilognathus rhombea* due to multiple chromosome formation. *Annotationes Zoologicae Japonenses*, 28, (4) : 249-255.
- NYGREN (A.), NILSSON (B.), JAHNKE (M.), 1971. — Cytological studies in the smelt (*Osmerus eperlanus* L.). *Hereditas*, 67 : 283-286.
- NYGREN (A.), JAHNKE (M.), 1972. — Microchromosomes in primitive fishes. *Swedish J. Agric. Res.*, 2, 4 : 229-238.
- OHNO (S.), FAISST (E.), ZENKES (M. T.), 1965. — Post zygotic chromosomal rearrangements in rainbow trout (*Salmo irideus* Gibbons). *Cytogenetics*, 4 : 117-129.
- OHNO (S.), ATKIN (N. B.), 1966. — Comparative DNA values and chromosome complements of eight species of fishes. *Chromosoma* (Berl.), 18 : 455-466.
- OHNO (S.), MURAMOTO (J. I.), CHRISTIAN (L.), ATKIN (N. B.), 1967. — Diploid tetraploid relationship among old world members of the fish family Cyprinidae. *Chromosoma* (Berl.), 23 : 1-9.
- OHNO (S.) et al., 1969. — Biploid-tetraploid relationship in Clupeoid and Salmonoid fish. *Chromosomes Today*, 2 : 139-47.
- OHNO (S.), 1970. — The enormous diversity of genome sizes of fish as a reflection of Nature's extensive experiments with gene duplications. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 99 : 120-130.
- OHNO (S.), 1970. — Evolution by gene duplication. Springer, ed., Berlin-Heidelberg-New York.
- OJIMA (Y.), HITOTSUMACHI (S.), HAYASHI (M.), 1970. — A blood culture method for fish chromosomes. *Japan. J. genetics*, 45, 2 : 161-162.
- PEGINGTON (C. J.) and REES (H.), 1967. — Chromosome size in salmon and trout. *Chromosoma*, Berl., 21, (4) : 475-7.
- MC PHAIL (J. D.), JONES (R. L.), 1966. — A simple technique for obtaining chromosomes from teleost fishes. *J. Fish. Res. Board. Canada*, 23 : 767-768.
- POST (A.), 1965. — Vergleichende Untersuchungen der Chromosomenzahlen bei Süßwasser Teleostern. *Z. Zool. Syst. Evol.*, 3 : 47-93.
- PRASAD (N.), BUSHONG (S. G.), 1970. — Direct preparation of chromosomes from mouse peripheral blood. *Acta Cytologica*, 14, 8 : 523-525.
- PREHN (L. M.), RASCH (E. M.), 1969. — Cytogenetic studies of Poecilia (Pisces). I. Chromosome numbers of naturally occurring poeciliid species and their hybrids from eastern Mexico. *Can. J. gen. Cytol.*, 11 : 880-895.
- QUIROZ-GUTIERREZ (A.), OHNO (S.), 1970. — The evidence of gene duplication for S — form of NADP — linked isocitrate dehydrogenase in carp and goldfish. *Biochem. Genet.*, 4 : 93-99.

- RASCH (E. M.), 1968. — Use of erythrocyte DNA — Feulgen levels as an index of triploidy in naturally occurring interspecific hybrids of Poeciliid fishes. 19 th. an. meet. of the Histochem. Society — April 8-9 New Orleans — Ip. ronéotée.
- RASCH (E. M.), PREHN (L. M.), 1969. — Cytotaxonomic analysis of six species of fishes of the subgenus *Poecilia* from eastern Mexico. *Journal of Cell Biology*, 43 : 112a.
- RASCH (E. M.), PREHN (L. M.), RASCH (R. W.), 1970. — Cytogenetic studies of *Poecilia* (Pisces). II. Triploidy and DNA levels in naturally occurring populations associated with the gynogenetic teleost, *Poecilia formosa* (Girard). *Chromosoma (Berl.)*, 31 : 18-40.
- RASCH (E. M.), 1973. — Cytogenetic studies of *Poecilia* (Pisces). III. Persistence of triploid genomes in the unisexual progeny of triploid females associated with *Poecilia formosa*. *Copeia (in press)*.
- REGAN (J. D.), SIEGEL (M. M.), LEE (W. H.), LLAMAS (K. A.), BEASLEY (A. R.), 1968. — Chromosomal alterations in marine fish cells *in vitro*. *Can. J. Genet. Cytol.*, 10 : 448.
- REES (H.), 1967. — The chromosomes of *Salmo salar*. *Chromosoma (Berl.)*, 21 (4) : 472-4.
- ROBERTS (F. L.), 1964. — A chromosome study of twenty species of *Centrarchidae*. *J. Morph.*, 115 : 401-418.
- ROBERTS (F. L.), 1966. — Cell culture of fibroblasts from *Clupea harengus* gonads. *Nature*, 212, (5070) : 1592-1593.
- ROBERTS (F. L.), 1967. — Chromosome cytology of the Osteichthyes. *Progr. Fish. Cult.*, 29, (2) : 75-83.
- ROBERTS (F. L.), 1970. — Atlantic salmon (*Salmo salar*) chromosomes and speciation. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 99, (1) : 105-11.
- SCHEEL (J. J.), 1966. — Notes on phenotypy, distribution, and systematics of *Aphyosemion bivittatum* (Lönnerberg), with remarks on the chromosome number in the Rivulinae. *Ichthyologica — The aquarium journal* : 261-278.
- SCHEEL (J. J.), 1966. — Taxonomic studies of african and asian tooth-carps (RIVULINAE) based on chromosome numbers, haemoglobin patterns, some morphological traits and crossing experiments. *Vidensk. Medd. fra Dansk naturh. Foren.*, 129 : 133-148.
- SCHEEL (J. J.), SIMONSEN (V.), GYLDENHOLM (A. O.), 1971. — The karyotypes and some electrophoretic patterns of fourteen species of the genus *Corydoras*. *Z. f. zool. Systematik u. Evolutionsforschung*, 10, 2 : 144-152.
- SCHEEL (J. J.), 1972. — Rivuline karyotypes and their evolution (Rivulinae, Cyprinodontidae, Pisces). *Z. f. Zool. Systematik u. Evolutionsforschung*, 10, 3 : 189-209.
- SCHELL (J. J.), 1972. — Cytotaxonomic studies : the *Aphyosemion elegans* group. *Z. f. Zool. Systematik u. Evolutionsforschung*, 10, 2 : 122-127.
- SETZER (P. Y.), 1970. — An analysis of a natural swarm by means of chromosome morphology. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 99, (1) : 139-146.
- SICK (K.), WESTERGAARD (M.), FRYDENBERG (O.), 1962. — Haemoglobin pattern and chromosome number of American, European and Japanese eels (*Anguilla*). *Nature*, 193 : 1001-1002.
- SIMON (R. C.), 1963. — Chromosome morphology and species evolution in the five North American species of Pacific salmon (*Onchorynchus*). *J. Morphol.*, 112 : 77-97.
- SIMON (R. C.), DOLLAR (A. M.), 1963. — Cytological aspects of speciation in two North American teleosts, *Salmo gairdneri* and *Salmo clarki lewisi*. *Canadian J. Genet. cytol.*, 5 : 43-49.
- SIMON (R. C.), 1964. — Fixation and fat extraction before staining and squashing for chromosomes of fish embryos. *Stain technol. U.S.A.*, 39 : 45-47.
- SOFRADZIJA (A.), BERBEROVIĆ (L.), 1973. — The chromosome number of *Barbus meridionalis petenyi* Heckel (Cyprinidae, Pisces). Conseil des Ac. des Sciences et des Arts de la RSF de Yougoslavie. *Bull. Sci., section A*, 18, 4-6 : 77-78.
- STEWART (K. W.), LEVIN (C. B.), 1968. — A method of obtaining permanent dry mounted chromosome preparations from teleost fish. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 25, 5 : 1091.
- SUBRAHMANYAM (K.), 1969. — A karyotype study of the estuarine fish *Boleophthalmus boddarti* (Pallas) with calcium treatment. *Curr. Sci.*, 38, 18 : 437.
- SZOLLÁR (J.), HOBOR (M.), 1972. — Studies on the somatic chromosome of the carp (*Cyprinus carpio*). *Acta morphol.*, 20, (3-4) : 185-189.
- TURLEAU (C.), de GROUCHY (J.), KLEIN (M.), 1972. — Phylogénie chromosomique de l'homme et des primates hominiens (*Pan troglodytes*, *Gorilla gorilla* et *Pongo pygmaeus*). Essai de Reconstitution du caryotype de l'ancêtre commun. *Annales de génétique*, 15, 4 : 225-240.
- UYENO (T.), MILLER (R. R.), 1972. — Second discovery of multiple sex chromosomes among fishes. *Experientia*, 28, : 223-225.
- UYENO (T.), SMITH (G. R.), 1972. — Tetraploid origin of the karyotype of Catostomid fishes. *Sciences*, 175 : 644-646.
- UYENO (T.), MILLER (R. R.), 1971. — Multiple sex chromosomes in a mexican cyprinodontid fish. *Nature*, 231, 5303 : 452-453.
- WHEAT (T. E.), WHITT (G. S.), CHILDERS (W. F.), 1972. — Heterosis in populations of interspecific sunfish hybrids. *American Zoologist*, 12, 3, : 205.
- WOLF (K.), QUIMBY (M. C.), 1969. — Fish cell and tissue culture *in Fish Physiology*, 3, N. Y. Academic Press.
- WOLF (U.), RITTER (H.), ATKIN (N. B.), OHNO (S.), 1969. — Polyploidization in the fish family *Cyprinidae*, order Cypriniformes. I. DNA content and chromosome sets in various species of *Cyprinidae*. *Humangenetik*, 7 : 240-244.
- WRIGHT (J. E.), Jr., 1955. — Chromosome number in trout. *Progr. Fish. Cult.*, 17, (4) : 172-176.