

锯缘青蟹染色体核型的分析研究*

STUDIES ON THE CHROMOSOMAL KARYOTYPE OF MUD CRAB, *Scylla serrata* (Forskål)

王桂忠¹ 陈雷洪¹ 李少菁¹ 李祺福² 管卫兵¹

(厦门大学¹海洋学系,²生物学系 361005)

关键词 染色体,核型,锯缘青蟹

十足目甲壳动物染色体的研究,从上个世纪 Carnoy 1885 年开始,至今已有 100 多年的历史。截止 1987 年,共报道了 26 科 68 种十足目动物的二倍体染色体数目,之后,又报道了 18 种,其中短尾类 37 种,占半数弱。这些种的二倍体染色体数目从 64 到 376 不等(平均 125),且每个染色体很小,一般不超过 4 μm 。染色体数目多且每个染色体小是十足目动物染色体的显著特点,这给十足目动物染色体的观察、计数和研究造成一定的困难,很难进行核型分析。至今,仅报道了对虾科 7 种和长臂虾科 9 种的染色体核型,未见蟹类染色体核型分析的报道。国内十足目动物染色体的研究起步较晚,有关蟹类染色体研究更少,仅见堵南山等 1986 年对中华绒螯蟹染色体进行的研究。

我国在锯缘青蟹 [*Scylla serrata* (Forskål)] 生殖生物学和养殖生物学方面进行了较深入系统的研究,并已取得了一系列重要的成果(见国家科委《科学技术研究成果公报》1995 年第 11 期),但其遗传学的研究几乎是空白。遗传学是生物育种的基础,通过细胞工程、染色体工程、基因工程等遗传学技术可以改良品种和构建新品种,对国民经济发展具有重要意义,因此遗传学研究是今后锯缘青蟹研究的主要发展方向之一。染色体研究是细胞工程、染色体工程的重要基础,而锯缘青蟹染色体的研究很少,仅见日本学者新山或 Niiyama 1942 年、1959 年及印度学者 Vishnoi 1972 年分别报道了当地青蟹的染色体数目,未有核型分析及染色体其他内容的研究。因此作者通过常规染色,对厦门海区锯缘青蟹的染色体进行了研究。本文首次报道了短尾类锯缘青蟹的核型分析研究,可为锯缘青蟹遗传育种研究提供细胞遗传学基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

实验在 1998 年 6 月~1999 年 6 月间进行,所用材料分 A、B 两组。

A 组:所用 25 只雄性青蟹均购于厦门菜市场,规格为 200~300 g/只。青蟹购回后暂养于 1 m³ 的水泥池,进行前处理。分别取青蟹的精巢、触角腺、中肠、肝胰腺、鳃、心脏、血淋巴等进行实验。

B 组:胚胎、第一期蚤状幼体(Z₁)取自本实验室人工育苗实验中的抱卵蟹及其孵出的幼体。

1.2 方法

1.2.1 染色体标本的制备

A 组材料:从青蟹第五步足基部注射植物凝血球素(PHA)(2.5×10^{-5} 体重),重复注射 3 次,每次间隔 24 h;为了便于比较,有的不注射 PHA。PHA 处理后,在同一部位注射秋水仙素(5×10^{-6} 体重),处理 2~4 h;有的不注射秋水仙素。B 组材料:将胚胎和幼体放入含秋水仙素的海水(终浓度为 500×10^{-6} g/ml)中培养 4 h。

低渗:A 组材料:迅速解剖青蟹,取出所需材料,剪成约 1 mm³ 的小块,用 0.7% 的 KCl 或 0.3% 的柠檬

* 福建省自然科学基金资助项目 C9810006 号和福建省重中之重项目(福建省海洋生物优良种质和生物活性物质的应用基础研究)。

第一作者:王桂忠,出生于 1951 年,硕士,教授。国家自然科学基金两个,福建省省长基金,福建省自然科学基金。
E-mail:gzwang@JING Xian xmu.edu.cn

收稿日期:2000-08-14;修回日期:2000-10-15

酸钠溶液于室温下低渗 20~30 min。
B 组材料：秋水仙素处理后，吸去海水，加入 0.7% 的 KCl 溶液于室温下低渗 20~30 min。

固定：缓慢移出低渗液，加入新鲜配制预冷的 3:1 的卡诺氏液（甲酸：冰醋酸 = 3:1）固定 15 min，更换固定液两次，使固定时间达 1.5 h；最后用 1:1 的卡诺氏液固定 30 min。

制片：(1) 火焰干燥法：参照相建海 1988 年的方法。(2) 改进的空气干燥法：在更换为 1:1 卡诺氏液固定前，将组织块移入研钵研碎，加入 1:1 的固定液，移入离心管，600 r/min 离心 5 min，取上清液，1 000 r/min 离心 5 min，弃上清液，加入 1:1 卡诺氏液固定，使 1:1 卡诺氏液固定的总时间达 30 min，用滴管吸取悬浮液在每一玻片上各滴一滴，自然空气干燥。

1.2.2 染色

将干燥的玻片标本用 2% 的 Giemsa 染色 15 min，自来水冲洗，自然干燥。

1.2.3 结果的处理

将染色体制片置于显微镜下观察，选择染色体分散良好的中期细胞拍照、冲洗、放大；将照片扫描输入计算机，经放大等处理后，喷墨打印机输出，描绘出染色体轮廓，然后进行核型分析。

2 结果

2.1 染色体的数目

表 1 锯缘青蟹初级精母细胞二价体数和精原细胞染色体数的出现频率

| 锯缘青蟹初级精母细胞 | | | 锯缘青蟹精原细胞 | | |
|------------|-------|--------|----------|-------|--------|
| 二价体数 | 频率(次) | 百分比(%) | 染色体数 | 频率(次) | 百分比(%) |
| 41 | 1 | 1.25 | 90 | 1 | 1.56 |
| 42 | 4 | 5.00 | 94 | 2 | 3.13 |
| 45 | 3 | 3.75 | 96 | 4 | 6.25 |
| 47 | 1 | 1.25 | 97 | 3 | 4.69 |
| 48 | 2 | 2.50 | 98 | 40 | 58.50 |
| 49 | 58 | 72.50 | 99 | 3 | 4.69 |
| 50 | 3 | 3.75 | 100 | 5 | 7.81 |
| 51 | 1 | 1.25 | 101 | 1 | 1.56 |
| 52 | 5 | 6.25 | 102 | 2 | 3.13 |
| 55 | 2 | 2.50 | 104 | 3 | 4.69 |
| 累计 | 80 | 100 | 累计 | 64 | 100 |

从精巢组织中获得较多的分散良好的中期分裂相染色体，分别镜检处于减数分裂中期的初级精母细胞和处于有丝分裂中期的精原细胞。计数 80 个初级精母细胞的二价体数目，众数为 49，出现百分率为 72.5% (表 1)。镜检有丝分裂中期的精原细胞 64 个，众数为 98，出现百分率为 58.5% (表 1)。由此可确定锯缘青蟹的染色体数目为： $2n = 98, n = 49$ 。

2.2 有丝分裂中期染色体核型

青蟹精原细胞有丝分裂中期染色体形状存在多态性。同一个体中一部分细胞的中期染色体为点状 (图 1-1)，一部分细胞的中期染色体为方块状 (图 1-2)，还有一部分细胞的中期染色体呈现出一定的形态 (图 1-3)，着丝点可辨，易于进行核型分析。因此，选取第三类细胞进行核型分析。根据测量计算的结果，将染色体分组排列编号，可分为 A, B, C 3 个染色体组

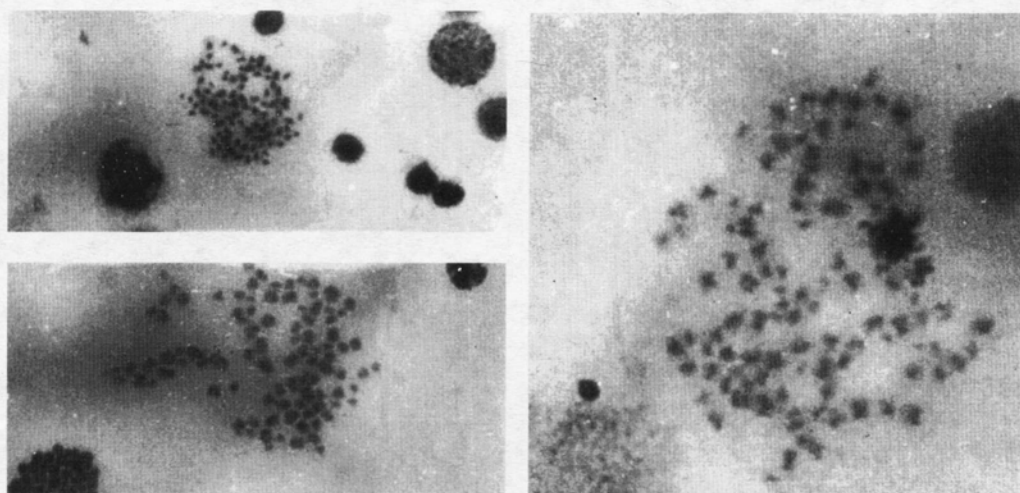


图 1 锯缘青蟹有丝分裂中期染色体的形态(1-1~1-2: $\times 1\ 320$; 1-3: $\times 2\ 640$)

表 2 锯缘青蟹有丝分裂中期染色体的测量值

| 组别 | 编号 | 相对长度(‰) | 臂比 | 着丝点位置 |
|----|---------|----------|-----------|-------|
| A | 1 | 24.4±0.6 | 1.25±0.18 | M |
| | 2 | 15.9±0.3 | 1.57±0.03 | |
| | 3 | 13.8±0.8 | 1.14±0.02 | |
| | 4 | 13.6±0.2 | 1.07±0.05 | |
| | 5 | 12.8±0.1 | 1.24±0.21 | |
| | 6 | 12.5±0.3 | 1.30±0.13 | |
| | 7 | 11.7±0.1 | 1.32±0.03 | |
| | 8 | 11.4±0.1 | 1.26±0.07 | |
| | 9 | 11.3±0.1 | 1.18±0.01 | |
| | 10 | 11.3±0.1 | 1.05±0.02 | |
| | 11 | 11.0±0.3 | 1.16±0.10 | |
| | 12 | 10.7±0.6 | 1.63±0.07 | |
| | 13 | 10.2±0.1 | 1.58±0.01 | |
| | 14 | 9.6±0.2 | 1.04±0.02 | |
| | 15 | 8.3±0.1 | 1.23±0.10 | |
| | 16 | 8.1±0.1 | 1.42±0.09 | |
| | 17 | 8.0±0.2 | 1.56±0.06 | |
| | 18 | 6.9±0.1 | 1.30±0.04 | |
| | 19 | 6.8±0.1 | 1.13±0.03 | |
| | 20 | 5.3±0.3 | 1.17±0.04 | |
| B | 21 | 13.1±0.2 | 2.03±0.21 | SM |
| | 22 | 13.0±0.1 | 1.84±0.02 | |
| | 23 | 12.9±0.2 | 3.33±0.21 | |
| | 24 | 12.3±0.7 | 2.60±0.05 | |
| | 25 | 11.2±0.5 | 2.53±0.06 | |
| | 26 | 10.1±0.2 | 1.96±0.10 | |
| | 27 | 10.1±0.3 | 2.18±0.02 | |
| | 28 | 9.8±0.2 | 2.02±0.25 | |
| | 29 | 9.7±0.1 | 2.30±0.03 | |
| | 30 | 8.5±0.2 | 2.82±0.11 | |
| | 31 | 6.8±0.1 | 1.77±0.04 | |
| C | 32 | 14.9±0.2 | ∞ | T |
| | 33 | 11.6±0.2 | | |
| | 34 | 10.5±0.1 | | |
| | 35 | 10.4±0.3 | | |
| | 36 | 10.1±0.3 | | |
| | 37 | 9.9±0.1 | | |
| | 38 | 9.7±0.1 | | |
| | 39 | 9.6±0.3 | | |
| | 40 | 9.6±0.3 | | |
| 41 | 8.2±0.1 | | | |
| 42 | 8.1±0.1 | | | |
| 43 | 8.0±0.2 | | | |
| 44 | 6.8±0.3 | | | |
| 45 | 6.7±0.2 | | | |
| 46 | 6.7±0.2 | | | |
| 47 | 6.6±0.1 | | | |
| 48 | 6.5±0.1 | | | |
| 49 | 6.3±0.1 | | | |

(表 2, 图 2), 青蟹的染色体核型为: $2N = 40M + 22SM + 36T, NF = 168$ 。

A 组 (1~20 对): 包括 40 条染色体, 均为中部着丝点染色体。除第 2, 15, 17 对染色体为“X”形外, 其余各对染色体基本为哑铃形。第 1 对染色体在所有染色体中最大, 明显大于其余各对染色体, 长臂中间有一凹痕; 其余各对染色体长度依次减小, 相邻两对染色体之间差距很小; 第 20 对染色体在所有染色体中最小, 约为第 1 对染色体的 1/5。

B 组 (21~31 对): 该组包括 22 条染色体, 均为亚中部着丝点染色体。相对长度从 13.1 依次递减至 6.8; 臂比变化范围为 1.77~3.33, 基本偏向中部着丝点。染色体形态除第 23 对为“人”形, 第 25 对为“X”形外, 其余各对均为哑铃形。

C 组 (32~49 对): 该组包括 36 条染色体, 均为端着丝点染色体。染色体形态基本为“Λ”和块状。第 34 对和 37 对、第 35 对和第 36 对、第 41 对和 42 对、第 44 对和 45 对、第 48 对和 49 对大小相近和形态相似, 难以区分。

3 讨论

3.1 染色体的制备

本研究尝试了用精巢、肝胰腺、触角腺、心、鳃、中肠、受精卵, 幼体为材料进行染色体制片。在这些材料中, 除了精巢外都无法获得染色体分散好、形态清楚、且数目多的中期分裂相。其原因可能是雄性成熟青蟹已基本停止生长, 各组织的有丝分裂不旺盛; 而此时生殖已成了最主要的任务, 精巢组织中不停地有丝分裂和减数分裂, 以满足生殖的需要, 所以用精巢制片可获得较好的效果。用受精卵为材料, 卵黄严重影响了制片, 即使是已消耗了大部分卵黄的复眼期胚胎也是如此。在脊椎动物中, 血液或血淋巴是染色体制片的好材料, 一般选用肝素或茶碱等抗凝剂抗凝。青蟹的血淋巴是非常丰富的, 但其凝集很快, 在实验中, 用 0.3% 的茶碱和 500 U/ml 的肝素都无法抗凝。其原因可能是青蟹是无脊椎动物, 与脊椎动物亲缘关系较远, 血淋巴的凝集机制有很大差异。

在实验中作者采用 3:1 的卡诺氏液固定 1.5 h, 中途更换固定液 3 次; 然后改用 1:1 的卡诺氏液固定 30 min, 使总的固定时间达到 2 h, 获得较好的效果。大比例的甲醇有利于染色体的收缩, 而醋酸会使染色体膨胀, 因此在 3:1 的固定液固定 1.5 h 后, 改用 1:1 的固定液固定 30 min, 目的是使染色体适度膨胀, 呈现出更好的形态。作者发现如果 3:1 的固定液固定 1.5 h 后改用 1:1 的固定液固定过夜,

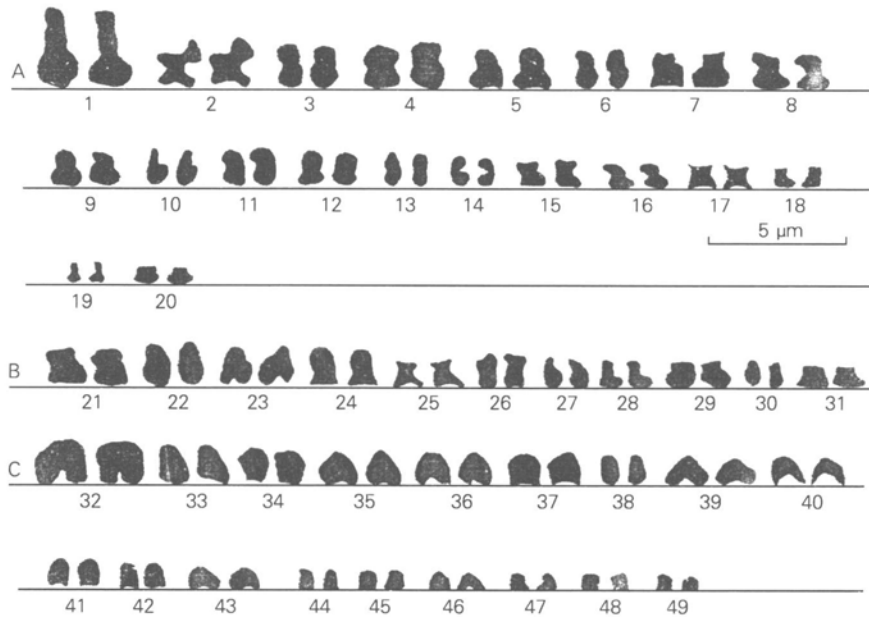


图2 锯缘青蟹精原细胞有丝分裂中期染色体核型

染色体会因过度膨胀而弥散,反而效果不好,这与人类染色体的固定是有所不同的。

3.2 染色体的数目

本实验对厦门海区青蟹染色体数目研究的结果为 $2n = 98, n = 49$ 。这个结果与 Niiyama 1942 年, 1959 年及 Vishnoi 1972 年的报道是不同的。Niiyama 先后对日本海区青蟹染色体进行了研究, 得出其染色体数目均为 $2n = 106, n = 53$; Vishnoi 1972 年对印度青蟹染色体研究的结果是其染色体数目为 $2n = 94, n = 47$ 。

根据早期的分类, 全世界的青蟹属 (*Scylla*) 只有 1 个种, 即: 锯缘青蟹 (*S. serrata*)。后来研究发现, 不同地区的青蟹, 甚至同一地区的青蟹在形态以及某些遗传学特征上有所不同, 因此有些学者认为青蟹属应该有几个种。如: Estampador 1949 年根据外部形态特征和配子发生的差异将在菲律宾采集的青蟹标本划分为 3 个种和 1 个变种, 即: *S. serrata*, *S. olivacea*, *S. tranquebarica* 和 *S. serrata* var. *paramamosain*。Serene 1952 年使用在越南采集的青蟹标本进行分析, 也认为有这 4 个种的存在。然而, Stephenson 和 Campbell 1960 年使用澳大利亚的标本进行分析后认为它们只是同一个种的 4 个不同形态, 而形态的差异是环境的变化所引起的。此外, 在马来西亚、印度和日本等地也先后发表了青蟹属不止 1 个种的报道^[3,4]。Keenan 1996 年根据同工酶电泳和线粒体 DNA 的资料提出青蟹属有 4 个种, 它们是即: *S. serrata*, *S. olivacea*, *S. tranque-*

barica 和 *S. serrata paramamosain*^[2]。不同地区青蟹染色体数目不同, 是否是这种种间差异所导致的, 这是值得进一步研究的。

3.3 染色体的形状和核型


3.3.1 染色体的形状

一般来说染色体的形状通常与研究材料, 研究者所使用的染色方法有关, 然而大多数的十足类动物有丝分裂染色体形状似乎与所采用的方法并无多大关系。堵南山等 1986 年, 相建海 1988 年, 邱高峰等 1994 年以精巢为材料获得的十足类动物有丝分裂染色体的形状均为点状, 核型分析极为困难。而周岭华等在鹰爪虾染色体的研究过程中发现用不同的方法处理不同的细胞, 其染色体呈现点状、X 状、哑铃状^[1]。在本研究中, 锯缘青蟹不同细胞的染色体呈现的是点状、块状和易于进行核型分析的形状。其原因可能是不同的细胞处于细胞周期的不同时期, 而且不同的细胞所处的“微环境”各有差异, 这种“微环境”的差异包括玻片不同点上的光滑、洁净程度不同, 各细胞之间相邻的细胞、组织密度不同, 以及染色体本身在铺展过程中的位置、角度等变化所引起的。青蟹有丝分裂中期染色体的大小变化范围为 $0.6 \sim 3.1 \mu\text{m}$, 可见青蟹染色体非常小, 这与以往十足类染色体的研究结果基本一致。

3.3.2 染色体的核型

核型分析是染色体研究的一个重要内容。在 26 科 68 种已研究过染色体的十足目动物中, 仅 2 科 16 种进行过核型分析。其中对虾

科 7 种,长臂虾亚科 9 种。造成这种现状的原因是十足类动物有丝分裂中期的染色体大多呈点状,着丝点难以分辨,加上染色体数目庞大,难以鉴别对应的同源染色体,从而使核型分析难以进行。有关短尾类的核型分析还未见报道。作者对青蟹的染色体进行了核型分析,其核型为 $2N = 40M + 22SM + 36T, NF = 168$ 。

3.3.3 性染色体 本研究未发现异形性染色体,这一结果与前人的研究报告相似。对于性染色体,如果能对性原细胞减数分裂过程中每一条联会复合体的形成加以详细的研究,则有可能发现性染色体。在青蟹要做到这一点尚需在方法上有较大的改进。

参考文献

- 1 周岭华、张晓军、相建海。海洋与湖沼, 1999, 30(3): 50~253
- 2 Keenan C.P. . The four species of *Scylla*. In: C. P. Keenan

- and A. Blackshaw. Mud Crab Aquaculture and Biology. Proceedings of an international scientific forum held in Darwin, Australia. Canberra of Australia: Australian Centre for International Agricultural Research Canberra. 1999. 48~58
 - 3 Overton J.L. . Morphometrics and ecology of the mud crab (*Scylla* spp.) from southeast Asia. In: C. P. Keenan and A. Blackshaw. Mud Crab Aquaculture and Biology. Proceedings of an international scientific forum held in Darwin, Australia. Canberra of Australia: Australian Centre for International Agricultural Research Canberra. 1999. 35~42
 - 4 Sugama K. and Hutapea J. H. . Genetic characterisation in the mud crab *Scylla* (*Brachyura: Portunidae*). In: C.P. Keenan and A. Blackshaw. Mud Crab Aquaculture and Biology. Proceedings of an international scientific forum held in Darwin, Australia. Canberra of Australia: Australian Centre for International Agricultural Research Canberra. 1999. 43~47
- (本文编辑:刘珊珊)