

日本鲟核型分析

阎斌伦, 许星鸿, 徐家涛, 徐国成

(淮海工学院 江苏省海洋生物技术重点建设实验室, 江苏 连云港 222005)

摘要:以鳃、肝胰腺、心脏、精巢、成熟卵、各期胚胎及蚤状幼体等为材料,采用空气干燥法对日本鲟(*Charybdis japonica*)的染色体数目和核型进行了研究。结果表明,发育期的精巢最适宜进行日本鲟染色体计数,用眼点期之后的胚胎和蚤状幼体制片,适宜做核型分析。日本鲟染色体的数目是 $2n=114$, $n=57$ 。核型分析显示,日本鲟有中部着丝粒染色体(m)共计 17 对(第 1~17 号),亚中部着丝粒染色体(sm) 7 对(第 18~24 号),亚端部着丝粒染色体(st)仅 1 对(第 25 号),端部着丝粒染色体(t)共计 32 对(第 26~57 号)。日本鲟的核型公式为: $2n=114=34m+14sm+2st+64t$, 染色体臂数 $NF=164$, 未能发现异形性染色体的存在。

关键词: 日本鲟(*Charybdis japonica*); 染色体; 核型

中图分类号: Q917.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2009)02-0041-05

由于十足目甲壳动物二倍体染色体数目较多(64~376)、每个染色体又很小(一般不超过 $4\ \mu\text{m}$),所以十足目甲壳动物的染色体计数和核型分析都有一定的难度,相关的研究报道也相对较少^[1]。迄今,十足目动物中已知染色体数目的有 100 余种,不足十足目动物总数的 1%,其中仅有 20 余种进行过核型分析^[2,3]。在现有的十足目甲壳动物染色体核型研究资料中以虾类居多,如对虾属的中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)^[4,5]和斑节对虾(*Penaeus monodon*)^[6],沼虾属的日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)^[7]、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)^[8,9]和细螯沼虾(*Macrobrachium superbum*)^[10]等的核型分析已有报道,短尾类核型研究仅涉及到锯缘青蟹(*Scylla serrata*)^[11]和三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)^[3] 2 种。

日本鲟(*Charybdis japonica*)隶属于节肢动物门甲壳纲十足目梭子蟹科,俗称靠山红、石蛸仔和石蟹等,广泛分布于中国各海区。其肉味鲜美、营养丰富,为经济价值较高的大型海产蟹类,是海中八珍之一^[12]。目前,有关日本鲟的研究报道大多涉及其生态分布^[13,14]、食性^[15,16]和发育^[17]等方面,在细胞遗传学方面特别是染色体核型研究尚未见报道。本研究对日本鲟的染色体数目与核型进行了研究,以期对甲壳类染色体资料的积累及今后的日本鲟育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

鲜活日本鲟于 2007 年 9 月~2008 年 6 月购自

连云港市新浦区直销农贸市场,共 80 只,体质量 36~139 g。染色体标本制备以鳃、肝胰腺、心脏、精巢、成熟卵、各期胚胎及蚤状幼体等为材料。其中精巢取自 40 只发育不同时期的雄蟹;成熟卵取自繁殖期雌蟹卵巢;各期胚胎和蚤状幼体取自本课题组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

为探明植物血球凝集素(PHA)和秋水仙素对日本鲟染色体制片的影响效果,实验组设置如下:

实验组 I:从日本鲟第五步足基部注射 PHA(注射量为蟹体质量的 2.5×10^{-5})^[11],重复注射 3 次、每次间隔 24 h。在同一部位注射秋水仙素(注射量为蟹体质量的 5×10^{-5}),处理 2~4 h。

实验组 II:只注射 1 次 PHA,24 h 后注射秋水仙素,剂量和处理时间同上。

实验组 III:不注射 PHA,直接注射秋水仙素,剂量和处理时间同上。

对照组:PHA 和秋水仙素均不注射。

分别取各组日本鲟,解剖取出鳃、肝胰腺、心脏、精巢或成熟卵等材料,放入 5 mL 0.075 mol/L KCl 中,将组织充分剪碎(时间控制在 15 min 内),200 目筛绢过滤至离心管中,添加少量 KCl 配平,室温下继

收稿日期:2008-09-25; 修回日期:2008-11-05

基金项目:江苏省海洋生物技术重点建设实验室开放项目(Z2007HS006);连云港市科技发展计划项目(SF0705)

作者简介:阎斌伦(1962-),男,江苏赣榆人,教授,主要从事海水养殖研究,电话:0518-85895253, E-mail: yanbinlun@yahoo.com.cn

续低渗 10 min。加入预冷的 Carnoy's 液(甲醇:冰醋酸为 3:1)4 mL,4℃ 预固定 10 min,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清。更换新固定液 2 次,使固定时间达 1.5 h,最后用 1:1 Carnoy's 液固定 30 min。采用冷滴片、空气干燥和 10%Giemsa 染色。

胚胎和幼体在含秋水仙素(浓度为 500 mg/L)的海水中浸泡处理 2~4 h,研磨后制片,方法同上。

1.2.2 染色体计数和核型分析

利用 Olympus BX51 显微镜对染色体标本进行观察,选择染色体分散良好的中期分裂相,统计染色体数目,并进行显微摄影。照片放大后,进行染色体测量,核型分析依据 Levan 等^[18]的分类标准。

2 实验结果

2.1 实验材料和方法的比较

实验组 I、II、III 的制片效果无明显差异,表明植物血球凝集素(PHA)对日本鲷染色体制片效果影响不大。对照组则无法得到成功的染色体标本,表明秋水仙素的处理对于日本鲷染色体制片是必要的,处理时间以不超过 4 h 为宜。胚胎和幼体在含秋水仙素的海水中浸泡时间以 2.5 h 成活率最高。

各实验组中,用日本鲷的鳃、肝胰腺、心脏制片均难以获得细胞的中期分裂相,而用成熟卵和胚胎早期(包括卵裂期、囊胚期和原肠期)制片由于大量卵黄的干扰而无法看到染色体组全貌。利用发育期的精巢可以获得较多的中期分裂相,包括处于减数分裂中期 I 的初级精母细胞和少量处于有丝分裂中期的精原细胞;用成熟期的精巢制片不成功。用日本鲷的眼点期、心跳期、卵内蚤状幼体期胚胎和各期蚤状幼体制片均可获得染色体分散良好的体细胞有丝分裂中期相。

2.2 染色体数目

用处于发育期的精巢制片可获得大量染色体分散良好的细胞分裂中期相,其中大多数为处于减数分裂中期 I 的初级精母细胞(图 1-1),少数为处于有丝分裂中期的精原细胞(图 1-2)。计数处于减数分裂中期 I 初级精母细胞 116 个,二价体众数为 57,出现百分率为 50.86%(表 1);计数处于有丝分裂中期的精原细胞 22 个,染色体众数为 114,出现百分率为 54.55%(表 2)。用眼点期、心跳期、卵内蚤状幼体期胚胎和各期蚤状幼体制片可获得染色体分散良好的体细胞有丝分裂中期相(图 1-3),计数 35 个细胞,染色体众数为 114,出现百分率为 51.43%(表 3)。由表 1~表 3 可以确定日本鲷染色体数目: $2n=114, n=57$ 。

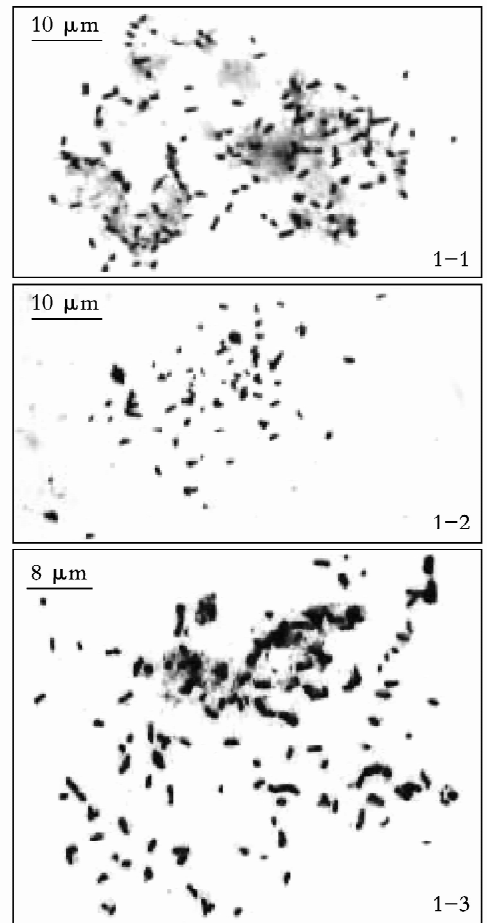


图 1 日本鲷细胞分裂中期染色体显微照相
Fig. 1 The micrograph of metaphase chromosomes in *Cha-rybdis japonica*

1-1. 初级精母细胞减数分裂中期相;1-2. 精原细胞有丝分裂中期相;1-3. 眼点期胚胎细胞有丝分裂中期相

1-1. The meiotic metaphase of primary spermatocyte;1-2. The mitotic metaphase of spermatogonium;1-3. The somatic cell mitotic metaphase of embryos at the stigmatic stage

2.3 核型分析

精原细胞和初级精母细胞的染色体多呈点状或短棒状,相比较而言,利用眼点期之后的胚胎和幼体制片看到的染色体形态较清晰、着丝粒可辨,易于进行核型分析。经过测量,计算出日本鲷染色体相对长度和着丝粒指数的变化范围分别为:0.41%~3.85%和 0~49.34(表 4)。依据 Levan 等^[18]的染色体分类标准进行核型分析,结果如图 2 所示,共分为 4 组:中部着丝粒染色体(m)共计 17 对(第 1~17 号),亚中部着丝粒染色体(sm)7 对(第 18~24 号),亚端部着丝粒染色体(st)仅 1 对(第 25 号),端部着丝粒染色体(t)共计 32 对(第 26~57 号)。日本鲷的核型公式为: $2n=114=34m+14sm+2st+64t$,染色体臂数 NF=164,未能发现异形性染色体的存在。核型图中染色体对按 m、sm、st、t 的顺序分类排列,同一类型的染色体对按相对长度递减的顺序排列。

表 1 日本鲷初级精母细胞二价体数的出现频率

Tab. 1 Frequency of bivalent number of primary spermatocyte in *Charybdis japonica*

二价体数	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	总计
频率(次)	2	3	8	15	13	59	9	4	2	1	116
比例(%)	1.72	2.58	6.90	12.93	11.21	50.86	7.76	3.45	1.73	0.86	100

表 2 日本鲷精原细胞分裂中期染色体数的出现频率

Tab. 2 Frequency of chromosomal number of spermatogonium in *Charybdis japonica*

染色体数	111	112	113	114	115	116	总计
频率(次)	1	3	2	12	2	2	22
比例(%)	4.54	13.64	9.09	54.55	9.09	9.09	100

表 3 日本鲷胚胎和溞状幼体体细胞分裂中期染色体数的出现频率

Tab. 3 Frequency of chromosomal number of somatic cells from embryo and zoea larvae in *Charybdis japonica*

染色体数	110	111	112	113	114	115	116	117	总计
频率(次)	1	2	4	5	18	3	1	1	35
比例(%)	2.86	5.71	11.42	14.29	51.43	8.57	2.86	2.86	100

表 4 日本鲷核型指数

Tab. 4 Indices of karyotype in *Charybdis japonica*

染色体对编号	相对长度(%)	着丝粒指数	类型	染色体对编号	相对长度(%)	着丝粒指数	类型
1	3.59±0.27	39.53±1.49	m	30	1.89±0.14	0	t
2	3.52±0.23	47.53±2.85	m	31	1.79±0.23	0	t
3	3.37±0.16	39.72±2.19	m	32	1.71±0.15	0	t
4	3.19±0.44	37.78±3.14	m	33	1.59±0.22	0	t
5	3.02±0.28	44.35±1.29	m	34	1.55±0.18	0	t
6	2.93±0.34	45.71±2.43	m	35	1.53±0.07	0	t
7	2.37±0.15	42.43±1.28	m	36	1.50±0.09	0	t
8	2.69±0.29	47.95±1.13	m	37	1.45±0.11	0	t
9	2.03±0.14	9.34±2.21	m	38	1.42±0.26	0	t
10	1.93±0.28	43.40±1.24	m	39	1.39±0.17	0	t
11	1.92±0.24	47.83±2.39	m	40	1.20±0.18	0	t
12	1.85±0.37	39.86±2.51	m	41	1.19±0.12	0	t
13	1.71±0.23	39.29±1.27	m	42	1.17±0.14	0	t
14	1.42±0.19	47.06±1.88	m	43	1.15±0.17	0	t
15	1.38±0.15	48.66±2.18	m	44	1.08±0.16	0	t
16	1.36±0.29	42.99±1.75	m	45	1.03±0.13	0	t
17	1.19±0.16	42.13±1.48	m	46	1.02±0.18	0	t
18	3.43±0.28	34.15±3.23	sm	47	1.01±0.09	0	t
19	2.59±0.37	32.26±2.81	sm	48	1.00±0.15	0	t
20	2.37±0.15	28.25±1.86	sm	49	0.99±0.09	0	t
21	2.19±0.07	30.53±2.44	sm	50	0.96±0.12	0	t
22	2.18±0.22	30.63±2.27	sm	51	0.95±0.08	0	t
23	1.43±0.16	29.34±1.79	sm	52	0.92±0.06	0	t
24	1.34±0.19	29.93±2.52	sm	53	0.85±0.11	0	t
25	3.85±0.34	15.19±1.92	st	54	0.84±0.09	0	t
26	2.59±0.32	0	t	55	0.79±0.07	0	t
27	2.36±0.15	0	t	56	0.45±0.06	0	t
28	2.02±0.28	0	t	57	0.41±0.07	0	t
29	1.92±0.09	0	t				

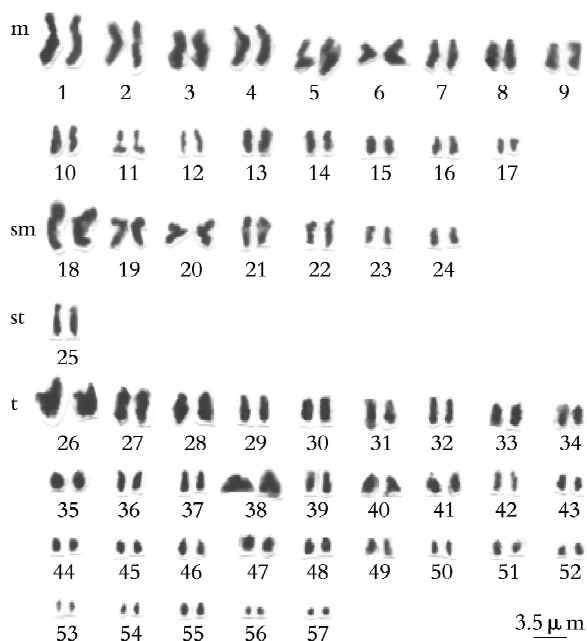


图2 日本鲟核型

Fig. 2 Karyotype of *Charybdis japonica*

3 讨论

3.1 染色体标本的制备

本研究尝试了用日本鲟的鳃、肝胰腺、心脏、精巢、成熟卵、各期胚胎及蚤状幼体等多种材料进行染色体制片。和以往的报道一样^[3,4],利用发育期的精巢可以获得较多的中期分裂相,包括处于减数分裂中期 I 的初级精母细胞和少量处于有丝分裂中期的精原细胞,因其染色体多呈点状或短棒状,所以只适用于染色体计数。成熟期的精巢中主要是已完成了变态期的精子,不适于用作染色体制片材料。用日本鲟的鳃、肝胰腺、心脏制片难以获得细胞的中期分裂相,可能与其分裂指数不高有关。朱冬发^[3]报道用三疣梭子蟹卵内蚤状幼体为材料进行了核型分析,本研究发现用日本鲟的眼点期、心跳期、卵内蚤状幼体期胚胎和各期蚤状幼体制片均可获得染色体分散良好的体细胞有丝分裂中期相,但缺点是得率较低。而成熟卵和胚胎早期(包括卵裂期、囊胚期和原肠期)的卵黄多,严重影响了制片质量。到了眼点期之后的胚胎已消耗了大部分卵黄,所以制片能够成功。由于甲壳动物有繁殖季节,其胚胎和幼体的获得受到很大的取材限制,所以还是要建立甲壳动物细胞培养的成熟体系,以提供染色体标本制备的材料来源。

植物血球凝集素(PHA)常用于鱼类染色体研究中,可以促进细胞分裂,在锯缘青蟹中也获得了较好

的结果^[11]。而在本研究中,PHA 没有明显的效果,但秋水仙素的处理是必要的,成体注射秋水仙素不超过 4 h,胚胎和幼体在含秋水仙素的海水中浸泡时间以 2.5 h 为宜,时间过长则会造成死亡。

3.2 梭子蟹科物种染色体的比较

在梭子蟹科中,已报道了 4 个物种的染色体数目:环纹鲟(*Charybdis annulata*) (80)^[19]、细点圆趾蟹(*Ovalipes punctatus*) (103)^[2]、锯缘青蟹 (94~106)^[11,19] 和三疣梭子蟹 (106)^[3],后两种进行过核型分析:锯缘青蟹 ($2n = 98 = 40m + 22sm + 36t$, $NF = 168$)^[11]、三疣梭子蟹 ($2n = 106 = 40m + 6sm + 60t$, $NF = 152$)^[3]。本研究表明日本鲟的核型公式为 $2n = 114 = 34m + 14sm + 2st + 64t$, $NF = 164$,其染色体数量(114)与同属的环纹鲟(80)相差较远,而与三疣梭子蟹(106)较接近。环纹鲟的染色体数量是 Vishnoi^[19] 于 1972 年报道的,在早期研究染色体主要采用传统石蜡切片法,获得的染色体数量误差较大,需要再运用现在的技术手段重新研究、证实。

日本鲟染色体长度变化为 0.427~4.032 μm ,与三疣梭子蟹(0.456~3.339 μm)和锯缘青蟹(0.6~3.1 μm)接近。从图 2 可看到日本鲟的染色体形态多样,呈长棒状、S 形、哑铃形、块状以及较小的点状,与锯缘青蟹类似。点状染色体又称为超数染色体或小染色体,其确切功能还不清楚,一般认为是进化欠发达的象征,也是造成甲壳动物染色体计数困难、报道存在差异的原因之一^[6]。

由于目前有关甲壳动物的核型研究资料仍较匮乏,很难从属、科甚至目的层次上探讨它们的系统演化关系,尚需进一步积累更多的核型及带型研究资料。同时,利用生化遗传手段(同工酶技术)以及分子标记(RAPD, RFLP, AFLP)等方法,将分子水平同染色体水平有机地结合起来,可以深入地进行甲壳动物的系统分类和进化研究。

参考文献:

- [1] Tan X, Qin J G, Chen B, *et al.* Karyological analyses on redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae) [J]. *Aquaculture*, 2004, 34: 65-76.
- [2] 王青, 孔晓瑜, 于珊珊, 等. 十足目染色体研究进展[J]. 海洋科学, 2005, 29(6): 60-65.
- [3] 朱冬发, 王春琳, 李志强. 三疣梭子蟹核型分析[J]. 水产学报, 2005, 29(5): 649-653.
- [4] 相建海. 中国对虾染色体的研究[J]. 海洋与湖沼, 1988, 19(3): 205-209.
- [5] 戴继勋, 张全启, 包振民. 中国对虾的核型研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1989, 9(4): 99-104.

- [6] 孔凡骏,张东.斑节对虾的染色体组型分析[J].水产学报,1993,**17**(1):83-84.
- [7] 邱高峰,堵南山,赖伟.日本沼虾染色体及其核型的研究[J].海洋与湖沼,1994,**25**(5):493-498.
- [8] 邱高峰.罗氏沼虾核型及长臂虾亚科核型演化关系的探讨[J].水产学报,1996,**20**(4):294-300.
- [9] Chavez S R. Karyological studies on the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Aquaculture*, 1991, 97:327-334.
- [10] 邱高峰.细螯沼虾染色体的研究[J].中国水产科学,1997,**4**(1):1-5.
- [11] 王桂忠,陈雷洪,李少菁,等.锯缘青蟹染色体核型的分析研究[J].海洋科学,2002,**26**(1):9-13.
- [12] 梁象秋,方纪祖,杨和荃.水生生物学[M].北京:中国农业出版社,1996.360.
- [13] 吴常文,王志铮,王伟洪,等.舟山近海日本(*Charybdis japonica*)生物学,资源分布以及开发利用[J].浙江水产学院学报,1998,**17**(1):13-18.
- [14] 俞存根,宋海棠,姚光展.东海大陆架海域蟹类资源量的评估[J].水产学报,2004,**28**(1):41-46.
- [15] 蒋霞敏,王春琳.食物条件对日本蜆幼体存活与变态的影响[J].应用生态学报,2004,**15**(1):173-175.
- [16] 王春琳,薛良义,刘凤燕,等.日本蜆实验生态及摄食习性的初步研究[J].齐鲁渔业,1998,**15**(1):18-20.
- [17] 阎愚,孙颖民,宋志乐,等.日本蜆幼体发育的研究[J].水产学报,1989,**13**(1):74-79.
- [18] Levan A, Fredga K, Sandberg A A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes [J]. *Hereditas*, 1964,**52**(2):201-220.
- [19] 中村宏,刘萍.十足目(甲壳纲)染色体检索[J].国外水产,1991,1:13-19.

Karyotype analysis on *Charybdis japonica*

YAN Bin-lun, XU Xing-hong, XU Jia-tao, XU Guo-cheng

(Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China)

Received: Sep. 25, 2008

Key words: *Charybdis japonica*; chromosome; karyotype

Abstract: The chromosomal number and karyotype of *Charybdis japonica* have been investigated by air-drying method examining metaphase chromosomes spreads obtained from gill, hepatopancreas, heart, testes, ovium, embryos and zoea. The chromosomes pairing was processed according to the relative lengths and the centromeric indexes. The chromosome pair were classified following the method of Levan et al (1964). The results indicate that the testes in growing stage are the best materials to be used in chromosome count and the embryos after stigmatic stage and zoea are the best materials to be used in karyotype analysis. The diploid chromosomal numbers of *C. japonica* are $2n=114$. All chromosomes were matched in 57 pair. They were divided into 4 groups. Group I contains 17 pairs (1st-17th) that are metacentric chromosomes (m). Group II includes 7 pairs (18th-24th) of submetacentric chromosomes (sm). Group III has only 1 pair (25th) of subtelocentric chromosomes (st), and group IV contains 32 pairs (26th-57th) which are telocentric chromosomes (t). Therefore, the karyotype formula of *C. japonica* is $2n=114=34m+14sm+2st+64t$, and $NF=164$. No sex-chromosome of heteromorphism was observed.

(本文编辑:谭雪静)