

# 华北盐场孤雌生殖卤虫克隆及其染色体的研究

王壬学\* 蔡亚能 李嘉泳

(青岛海洋大学, 266003)

**提要** 本研究于1984—1986年完成。查了华北八个盐场卤虫卵的倍性组成,共建立不同盐场卤虫的五倍体克隆8个、二倍体克隆7个,并用银染技术对孤雌生殖二倍体卤虫的染色体进行了研究。通过实验得到以下结果: 1.发现华北孤雌生殖卤虫有五倍体存在; 2.将五倍体与二倍体卤虫两者相比,在许多方面有明显差异; 3.华北孤雌生殖二倍体卤虫染色体具有典型的减数分裂行为,与美国旧金山两性生殖二倍体卤虫的粗线期染色体有很大差别。

出于选育和增产小型动物性饵料生物的需要,卤虫研究越来越受到人们的重视。已知卤虫属内有许多姐妹种和不同倍性孤雌生殖类型。此不同类型的一些性状,如脂肪酸含量<sup>[13]</sup>、休眠卵直径<sup>[14]</sup>以及对温、盐度环境的综合反应<sup>[15]</sup>等都有很大差异。在染色体方面,不同类型的卤虫间不但存在着从三倍体到八倍体等不同倍性的多倍体,而且二倍体的染色体数目也有变化,大多数二倍体染色体数为42条( $N = 21$ ),但有少数为44条( $N = 22$ )<sup>[5]</sup>。此外还有人发现,不同地区二倍体卤虫细胞核的染色中心数目也有很大的差异<sup>[6]</sup>。

据 Barigozzi<sup>[7,8]</sup> 报道,在中国曾有四倍体卤虫的出现。他曾利用 C-带技术见到一些未完全分散的分裂相,可惜未能作组型分析。本文系对华北几个盐场孤雌生殖卤虫克隆及其染色体的研究报告。

## 一、材料和方法

研究用卤虫 *Artemia parthenogenetica* 卵一部分由辽宁营口,天津汉沽、大清河,河北黄骅等盐场提供;其它采自山东羊口、东风、南万和即墨大桥盐场。采集时间在1983—1985之间。作对比研究用的美国旧金山卤虫 *Artemia franciscana* 卵系商品卵。室内培养温度为22℃,盐度为60S,连续光照1000lx,饵料为盐藻 *Dunaliella* sp. 和啤酒酵母。

关于染色体研究,主要引用文献[6]的方法,并略作改进。具体步骤如下。

(1) 将刚孵化之幼虫置于低渗液(自来水或0.5%的柠檬酸钠溶液)中,其中所加秋水仙素的最终浓度为 $(5-10) \times 10^{-6}$ g。在低温(4℃)下低渗10h,或室温下低渗1.5—2h。对于成体卤虫,低渗液中不加秋水仙素,也不经低温处理。

\* 现在中国科学院海洋研究所。

收稿日期: 1988年11月26日。

(2) 将低渗后的幼虫体和生殖腺均置于甲醇:冰醋酸(1:1)混合液中,固定 3min 以上。不立即制片的材料置 4℃ 中保存。

(3) 于 40℃ 下经 60% 醋酸处理 30s, 然后以 Giemsa 染色。

(4) 在空气中阴干,用中性树胶封片。

银染:沿用文献[12]的方法。制片用的幼虫不经低温处理。制片后在室温下存放 2d 以上。取 50% 硝酸银及 2% 明胶显影液各两滴,混匀,在 70℃ 下将材料置此液中浸染 2—5min; 随后,水洗、Giemsa 复染、空气干燥、中性树胶封片。

倍性组成检查:将卤虫卵置于 22℃ 海水中孵化,光照 1 000lx。48h 后随机取一定数量幼虫并将之制成封片,在光镜下计数染色体数目以确定其组成倍数。

克隆建立:选单个成体进行培养,使之繁殖为具有相当数量个体的克隆。以幼虫的制片进行鉴定,在每个克隆中检查过的分裂相均在 20 个以上。

电泳:将单个卤虫置蒸馏水中处理 1h 后,去肠道,匀浆,高速离心(1 600r/min) 5min,作聚丙烯酰胺垂直平板电泳。分离胶浓度为 8.5%,其缓冲液: pH=8.9, 0.12mol/L Tris-HCl; 浓缩胶浓度为 3.1%, 其缓冲液: pH = 6.7, 0.05mol/L Tris-HCl; 电极缓冲液: pH = 8.5, 0.06mol/L Tris-EDTA-borate。电泳条件为 45mA, 200V, 2.5h。凝胶的染色按常规方法进行<sup>[4]</sup>。分别染出碱性磷酸酶 (AKP, 3.1.3.1)、四氮杂茂氧化酶和酯酶 (Esterase, 3.1)。

显色后的凝胶参照文献[2]的方法脱水干燥处理。

## 二、实验结果

### 1. 刚孵化幼虫的处理

经过低温、低渗处理过的幼虫,可得到大量中期分裂相(图版 I: 1), 染色体较少重叠,便于计数;而在室温下低渗处理的幼虫体制片中,则有大量前期和前中期分裂相。

### 2. 五倍体卤虫在华北盐场中的分布

在室内培养中,初时发现有些卤虫个体较大并有形态差异,后经染色体检查证实为五倍体,其染色体数目系 105 个(图版 I: 2)。五倍体卤虫在华北八个盐场中的分布见表 1, 可以看出,除汉沽盐场没有发现五倍体卤虫外,其余七个盐场都有五倍体存在。包括未列于表 1 的数据,检出的五倍体在 200 个以上,以羊口和黄骅两地比例较高。在检查营口和即墨大桥盐场卤虫卵所孵出的幼虫时,虽然所得到的分裂相数目少并且不是完全分开,但仍可大体辨出染色体数目,从而肯定该两地也有五倍体存在。

### 3. 华北孤雌生殖卤虫中不同倍性克隆的生物学特点

共建立了来源于四个盐场的 15 个卤虫克隆(表 2), 其中,五倍体克隆 8 个、二倍体克隆 7 个。在培养过程中发现,二倍体卤虫和五倍体卤虫的生活周期相接近,经约 15 天的培养,幼虫即达性成熟。这时二倍体体长为 7—8mm, 五倍体的为 11mm。未怀卵前卤虫体常呈鲜红色,五倍体较二倍体尤甚;但成熟卵进入卵囊后,体色迅速消退。卵囊内卵子经 5d 后可产出幼虫或成为休眠卵。

二倍体克隆有时产生个别雄体,这些雄体能产生精子但不能使两性生殖的旧金山卤虫卵受精。

表 1 不同盐场卤虫的倍性组成

Tab. 1 Ploidy-compositions of *Artemia* from different saltfields

| 盐场与日期            | 不同倍性卤虫的个体数与百分比 |          |                  | 总计<br>(个) |
|------------------|----------------|----------|------------------|-----------|
|                  | 2N             | 5N       | 5N? <sup>①</sup> |           |
| 东风<br>1983.9.28  | 60<br>(85.7)   | 7(10.0)  | 3(4.3)           | 70        |
|                  |                | 10(14.3) |                  |           |
| 南万<br>1983.9.28  | 59<br>(83.1)   | 10(14.1) | 2(2.8)           | 71        |
|                  |                | 12(16.9) |                  |           |
| 即墨<br>1985.10.31 | 70<br>(97.2)   | 0        | 2(2.8)           | 72        |
|                  |                | 2(2.8)   |                  |           |
| 羊口<br>1985.3     | 50<br>(69.4)   | 8(11.1)  | 14(19.4)         | 72        |
|                  |                | 22(30.6) |                  |           |
| 黄骅<br>1985.5     | 61<br>(78.2)   | 8(10.3)  | 9(11.5)          | 78        |
|                  |                | 17(21.8) |                  |           |
| 汉沽<br>1985.3     | 96<br>(100)    | 0        | 0                | 96        |
|                  |                | 0        |                  |           |
| 大清河<br>1985.3    | 62<br>(83.8)   | 3(4.1)   | 9(12.2)          | 74        |
|                  |                | 12(16.2) |                  |           |
| 营口<br>1985.3     | 72<br>(96.0)   | 0        | 5(6.5)           | 77        |
|                  |                | 5(6.5)   |                  |           |

① 不能准确计数,但从染色体大致数目判断为五倍体的个体。② 括号内数字为百分比。

在室内培养条件下,五倍体卤虫的生活能力较强,更能抗恶劣环境。在同样水质变坏或缺氧情况下,二倍体易死亡,而五倍体可以存活下来。

不同倍性卤虫的卵径有差别。由测定结果可见(表 2),五倍体卤虫的卵径(288.9 $\mu\text{m}$ )明显大于二倍体卤虫的,平均大 36 $\mu\text{m}$ 。统计学检验结果表明,不同倍性克隆的卵径差异显著( $p < 0.05$ )。据报道<sup>[4]</sup>,中国天津的商品卵的平均卵径为 267 $\mu\text{m}$ ,此数介于五倍体和二倍体的卵径之间。遗憾的是,该报道未及联系倍性问题,所以无法具体对比。

电泳法研究结果表明,不同倍性卤虫的碱性磷酸酶酶谱有明显不同。五倍体卤虫的碱性磷酸酶酶谱含有 3—4 条带,有 7 个克隆为 3 条带,可称之为 A 型酶谱;一个克隆的酶谱为 4 条带,为 B 型酶谱。而二倍体卤虫的碱性磷酸酶酶谱一般只有 2 条带。如将二倍体与五倍体卤虫克隆的碱性磷酸酶酶谱作对比,其最明显的差异出现在迁移率最低的一条带。五倍体的此带迁移率为 0.32,二倍体的为 0.40(图版 I: 3, 图 1: a)。

四氮杂茂氧化酶谱的情形较为复杂。五倍体卤虫除和二倍体卤虫同样有一条迁移率为 0.60 的酶带外,还多一条迁移率为 0.55 的酶带(图 1: b)。

酯酶,有两条迁移率最高、也最为稳定和染色深的带。Bowen 曾以世界范围内 15 个

表 2 各室内卤虫克隆的特性

Tab. 2 The character of *Artemia* clones in laboratory

| 克 隆    | 盐 场 | 倍 性 | 碱性磷酸酶类型 | 卵径 ( $\mu\text{m}$ )<br>( $n = 30, \bar{x} \pm \text{SD}$ ) |
|--------|-----|-----|---------|---|
| G5 I   | 羊 口 | 5N  | A       | 286.3 $\pm$ 28.5  |
| G5 III |     | 5N  | A       | 287.6 $\pm$ 12.1  |
| G5 IV  |     | 5N  | A       | 286.6 $\pm$ 11.5  |
| G2 I   |     | 2N  |         | 252.6 $\pm$ 5.8   |
| G2 III |     | 2N  |         | ?   |
| U5 I   | 黄   | 5N  | A       | 271.6 $\pm$ 14.8  |
| U5 II  |     | 5N  | B       | ?   |
| U5 III |     | 5N  | A       | ?   |
| U2 I   | 骅   | 2N  |         | 250.1 $\pm$ 13.2  |
| U2 IV  |     | 2N  |         | ?   |
| Q5 I   | 大清河 | 5N  | A       | ?   |
| Q5 II  |     | 5N  | A       | 288.9 $\pm$ 14.8  |
| Q2 III |     | 2N  |         | 248.8 $\pm$ 11.8  |
| Y2 I   | 营 口 | 2N  |         | ?   |
| Y2 II  |     | 2N  |         | ?   |

地区所产卤虫为材料作淀粉胶平板电泳,进行过酯酶同功酶谱研究,他将这两条带定名为 ES-1, ES-2<sup>[10]</sup>, 并以其迁移率的不同将各地卤虫划成三种类型。其中,印度、澳大利亚、法国和日本的孤雌生殖卤虫均属于 A 型,美国旧金山的属于 C 型。虽然本实验用的是聚丙烯酰胺凝胶电泳,但经与旧金山卤虫的比较,可以确认,华北孤雌生殖卤虫是属于 Bowen 所说的 A 型。此外,还表明五倍体卤虫和二倍体的具有相同的酯酶酶谱。

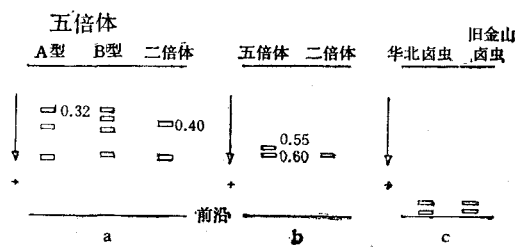


图 1 卤虫的同功酶谱

Fig. 1 Isozyme spectrum of *Artemia*

a. 碱性磷酸酶; b. 四氮杂茂氧化酶; c. 酯酶同功酶。

#### 4. 不同倍性卤虫的染色体及其特点

(1) 染色中心和随体 在孤雌生殖二倍体卤虫的间期细胞核中,有两个非常小的染色中心;而在常规染色的五倍体卤虫间期核中却通常见不到,而在旧金山五倍体卤虫的间期核中,其染色中心可达 20 个以上。

在银染后的间期细胞核中可见明显的核仁,着色适当时核仁呈金黄色。据观察,华北孤雌二倍体卤虫同旧金山的一样,在体细胞核中有 1—4 个核仁;而前者五倍体卤虫却有

5—7 个核仁。华北孤雌二倍体和五倍体的染色中心均位于核仁之中;而旧金山卤虫的大多数染色中心的分布与核仁无关。

华北卤虫的体细胞核仁在有丝分裂早、中期均附着在具有核仁组织者的各染色体上,并且这些染色体还常带有随体。随体呈圆形,大小略有不同。有时与染色体靠得太紧而不易辨认。在华北二倍体卤虫的 4 条染色体上,带有随体和核仁组织者。

(2) 生殖细胞染色体 在华北孤雌二倍体卤虫的雌性生殖腺制片中,发现大量前期 I 分裂相,且大多数处于粗线期,染色体数为 21 对;至于五倍体,只能见到有丝分裂相,未见染色体配对。这证明,在二倍体孤雌生殖卤虫的卵子发生中有减数分裂,而五倍体卤虫卵子的成熟只经有丝分裂。由此可见,在不同倍性的华北孤雌生殖卤虫卵子成熟过程中,染色体行为亦有重要不同。另外还发现,华北孤雌生殖二倍体的雄性卤虫的精子生成,亦行正常减数分裂。

(3) 精子发生中的染色体 通过对精子生成中细线期、偶线期和粗线期各分裂相的一系列仔细观察,发现华北孤雌生殖卤虫所产雄体的异染色质与旧金山两性生殖卤虫的有明显分布差异。华北孤雌生殖二倍体卤虫所产雄体同雌体一样只在两对粗线期染色体上各带一个异染色质团,而旧金山卤虫的异染色质团达 26 个(图版 I: 4)。再则,以上两种卤虫粗线期染色体总长度也不同,华北孤雌生殖的二倍体卤虫约为  $175 \pm 16.48 \mu\text{m}$ ,旧金山卤虫的约为  $118 \pm 12.7 \mu\text{m}$ 。

不论对华北卤虫来说,或是对旧金山卤虫来说,同一染色体组中的染色体间,染色体相对长度差别不大。其中,最长的染色体的相对长度为 70 左右,最短的一对约 30。

鉴于 21 对染色体的长度相互接近,不宜仅用染色体相对长度作为区分依据。在此情形下,结合粗线期染色体的异染色质团和染色粒分布,进行染色体的组型分析是较为有利的。如根据异染色质团的分布,美国卤虫的粗线期染色体被分成三组:其中两端均有异染色质团的染色体为 A 组,一端有异染色质团的为 B 组,两端均无异染色质团的为 C 组;在这三组染色体内,可依各个染色体长度的不同作有序排列,如 A1—A9, B1—B8, C1—C4(图版 I: 4)。中国卤虫染色体组中除两对染色体为 B 型外,其余均为 C 型,没有 A 型的。

### 三、讨 论

1. 本文对五倍体卤虫在华北盐场的存在作了首次报道,在检查过的八个盐场中,有七个盐场有这种多倍体。这与 Barigozzi<sup>[7,8]</sup> 的报道不一致,他曾报道:在天津商品卤虫卵孵化的 60 个幼虫中有 57 个二倍体,3 个四倍体,没有五倍体。鉴于作者所用的检查方法与之相同且略有改进,经验证可靠,所以上述差异的出现不应是方法上的问题,而有可能是,天津产商品卵的产地不准确,其中可能有来自本文作者未检查过的盐场。此外,Barigozzi 检查出的个例太少(仅 3 个多倍体个体),也使其说服力不强。

2. 室内建立克隆的成功,为进行卤虫成熟中卵子及其染色体的研究提供了新条件。众所周知,卤虫卵子直径大小不一,在养殖业上具有不同应用价值<sup>[4]</sup>,前人虽提到过卤虫卵径的遗传性问题,但无具体实例说明。本文中不同倍性个体所产卵子直径数据的记载恰好起到补证作用;同时说明过去文献中只笼统提到中国卤虫卵径平均值为  $276 \mu\text{m}$ ,显

然是不准确的。看来,不同倍体所产卵子的脂肪酸含量和孵化率等涉及卤虫养殖价值的一些问题,也应是今后克隆研究中的重要内容。

3. 在染色体组型分析方面, Barigozzi<sup>[4]</sup>是采用有丝分裂晚前期和早中期分裂的。其实这两个时期的染色体细长,彼此交迭,以致在常法制片中不易得到散开的分裂相。他未用染色体 C-带进行组型分析。作者选用生殖腺特别是精巢为材料,作染色体分析,获得理想效果。在制片中,有大量减数分裂相,粗线期染色体为 21 对,此数目当为体细胞染色体的一半。

4. Bowen 认为,卤虫雌性为异配性别<sup>[9]</sup>。在所有华北二倍体卤虫生殖细胞减数分裂的观察中,未发现染色体不等价配对现象,因之无从证实卤虫雌性为异配性别的说法。

5. 有关卤虫的同功酶分析, Bowen<sup>[10,11]</sup>和 Abreu-Grobois 等人<sup>[3]</sup>仅用此法所出现的差异以区别不同种类卤虫,而未用于区别不同倍性卤虫。

### 参 考 文 献

- [1] 北京大学生物系, 1983. 常用的同功酶的检测法. 遗传学实验方法和技术(附录八). 高等教育出版社 272—275 页。
- [2] 顾琪, 1981. 聚丙烯酰胺凝胶电泳胶板干燥保存法. 细胞生物学杂志 3(4): 36.
- [3] Abreu-Grobois, F. A. Bearmore, 1980. International study on *Artemia* II. Genetic characterization of *Artemia* population—An electrophoretic approach. In *The Brine Shrimp Artemia*, Vol. 1, ed. by Persoone, G. et al. Universa Press, pp. 133—146.
- [4] Barigozzi, C., 1980a. *Artemia*: A survey of its significance in genetic problems. *Evol. Biol.* 7: 221—252.
- [5] Barigozzi, C., 1980b. Genus *Artemia*: Problems of systematics. In *The Brine Shrimp Artemia*, Vol. 2, ed. by Persoone, G., et al. Universa Press, pp. 147—153.
- [6] Barigozzi, C. et al., 1981. Presence and absence of chromocenters in problems of *Artemia*. *Rend. Acc. Naz. Lincei.* 71: 122—125.
- [7] Barigozzi, C. et al., 1982. New data on the chromosome number of the genus *Artemia*. *Rend. Acc. Naz. Lincei.* 73: 139—143.
- [8] Barigozzi, C. et al., 1984. Heterochromatin in the genus *Artemia*. *Chromosoma (Berl.)* 90: 332—337.
- [9] Bowen, S. T., 1965. The genetics of *Artemia salina*. II. Crossing over between X and Y chromosomes. *Genetics* 52: 695—710.
- [10] Bowen, S. T. and G. Sterling, 1978. Esterase and malate dehydrogenase isozyme polymorphism in 15 *Artemia* populations. *Comp. Biochem. Physiol.* 61B: 593—595.
- [11] Bowen, S. T. et al., 1980. Sibling species of *Artemia*. In *The Brine Shrimp Artemia*, Vol. 2, ed. by Persoone, G. et al. Universa Press, pp. 155—167.
- [12] Howell, W. M. et al., 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: A 1-step method. *Experientia* 36: 1014—1015.
- [13] Leger, P. and P. Sorgeloos, 1984. International study on *Artemia* XXIX. Nutritional evaluation of *Artemia nauplii* different geographical origin for the marine crustacean *Mysidopsis bahia*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 15: 307—309.
- [14] Vanhaecke, P. and P. Sorgeloos, 1980. International study on *Artemia* IV. The biometrics of *Artemia* strains from different geographical origin. In *The Brine Shrimp Artemia*, Vol. 3, ed. by Persoone, G. et al. Universa Press, pp. 393—406.
- [15] Vanhaecke, P. et al., 1984. International study on *Artemia* XXXII. Combin effects of temperature and salinity on the survival of *Artemia* of various geographical origin. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 80: 259—275.

## CLONAL AND CHROMOSOME STUDY OF PARTHENOGENETIC BRINE SHRIMP (*ARTEMIA PARTHENOGENETICA*) FROM NORTH CHINA

Wang Renxue\*, Cai Yaneng and Li Jiayong

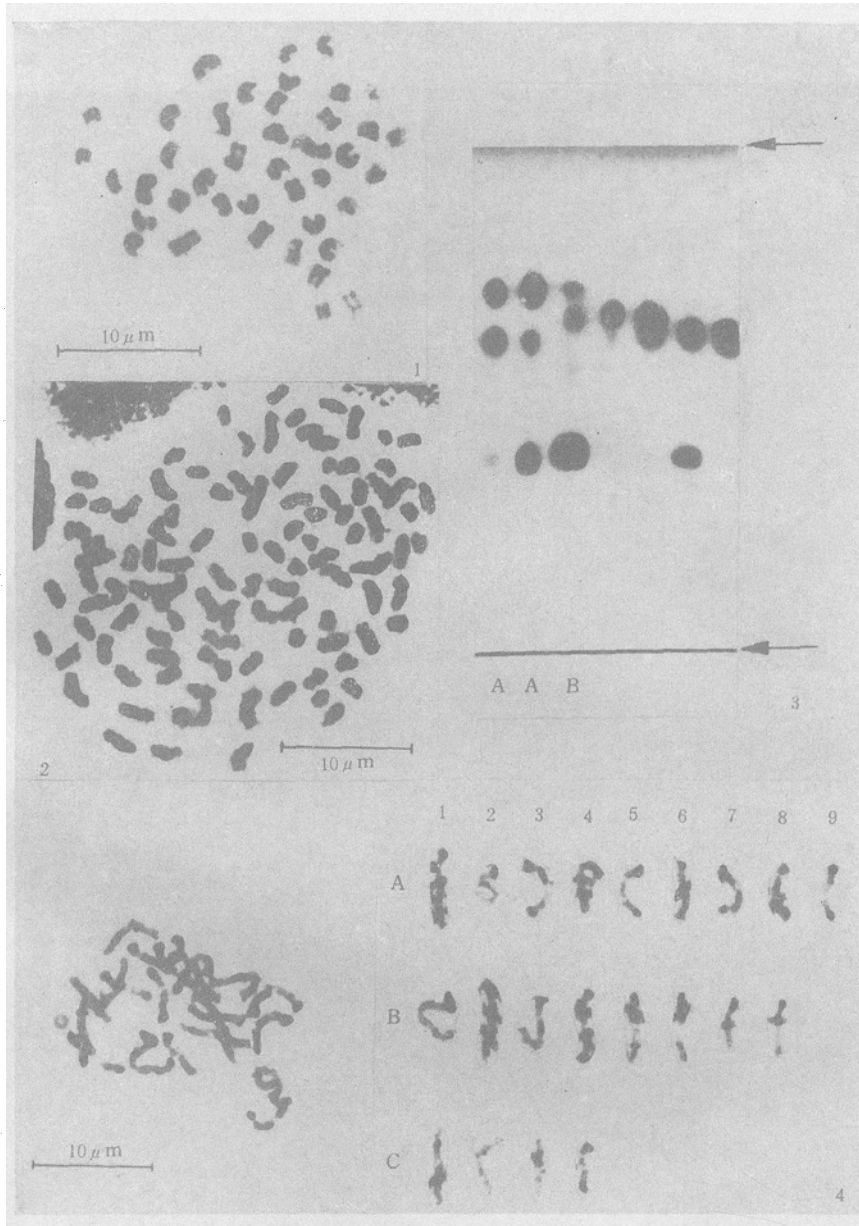
(Ocean University of Qingdao, 266003)

### ABSTRACT

The work was carried out in 1984—1986 on the ploidy composition of parthenogenetic *Artemia* (*A. parthenogenetica*) collected from eight saltfields of North China. Pentaploid *Artemia* has been found in seven of the eight saltfields, but we have not found tetraploid *Artemia* in these saltfields. Based on ploidy check, parthenogenetic *Artemia* clones, pentaploid 8 and diploid 7, were established. In these clones, the cyst diameter (averaging 286  $\mu\text{m}$ ) of the pentaploid is larger than that (250  $\mu\text{m}$ ) of the diploid. In diploid clones, a few of male individuals were born now and then. Isozyme analysis of AKP (3.1.3.1.) and TO by PAGE showed that there are obvious differences between the diploid and the pentaploid. The chromosomes of *Artemia parthenogenetica* differ from that of American's bisexual brine shrimp (*Artemia franciscana*) in having four satellites and nucleolus organizers in China diploid *Artemia's* complement. Studies of the gonad cells proved that the pachytene chromosomes of the diploid could be distinguished and characterized morphologically. In *A. franciscana*, every pachytene chromosome pair could be distinguished from each other by its heterochromatin mass and length. Chromosomes of China *Artemia* are obviously different from those of American's.

---

\* Present address: Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao.



卤虫的染色体碱性磷酸酶同工酶谱和染色体分组

AKP isozyme spectrum and the karyotypes of *Artemia* chromosome

1. 二倍体卤虫幼虫的有丝分裂相；
2. 五倍体卤虫的有丝分裂相；
3. 不同倍性华北孤雌生殖卤虫的碱性磷酸酶同工酶谱，A和B表示五倍体酶谱的不同类型，未标字母者为二倍体的碱性磷酸酶谱；
4. 旧金山二倍体卤虫的粗线期染色体分组。