

研究简报

缢蛭的染色体研究*

王金星 赵小凡

周岭华 相建海

(山东大学生命科学学院 济南 250100)

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 于1994年8月在山东省威海和青岛市沿海采集缢蛭,运用PHA(每克体重 8×10^{-6} g)和秋水仙素(每克体重 $2-3 \times 10^{-6}$ g)体内注射法,以其鳃组织为材料,对缢蛭的染色体进行分析研究。结果表明,缢蛭的二倍体数目为 $2n = 38$,核型为 $26m + 8sm + 2st + 2t$, $NF = 72$ 。C-带核型显示,有7对染色体恒定地出现C-带,均为端带。银染核型表明,有一对对着丝粒染色体具Ag-NOR带。银染带可以作为一种遗传标记。

关键词 核型 C-带 银染带 缢蛭

学科分类号 Q343

海产贝类的染色体研究,以及各种贝类之间的核型比较,对贝类遗传育种、环境检测、繁殖发育的规律和机理,贝类分类和系统演化研究均具有一定意义。缢蛭是重要的养殖贝类之一,为了更好地开展缢蛭的养殖,对其进行细胞遗传学的研究很有必要。关于缢蛭的染色体研究国内外尚未见报道。本文为PHA注射法应用于缢蛭染色体研究的结果,以期为贝类遗传学提供基础资料,并且为缢蛭养殖中的选种育种提供参考。

1 材料与方 法

缢蛭 [*Sinonovacula constricta* (Lamarck)]于1994年8月采自山东威海和青岛,活缢蛭在实验室水族箱内暂养。采用鱼类染色体研究中常用的植物血球凝集素(PHA)体内注射法,贝类每克体重(含壳重)注射PHA 8×10^{-6} g;作用18—24h后,再注射秋水仙素(每克体重 $2-3 \times 10^{-6}$ g),作用4—5h,取鳃组织匀浆,常规低渗、固定,以空气干燥法制片。

C-显带,染色体玻片标本在 0.2mol/L HCl 中孵育30min;浸入 37°C 的 $5\% \text{Ba}(\text{OH})_2$ 溶液中处理30—60s;然后放入 60°C 的 $2 \times \text{SSC}$ 溶液中温育2h;玻片在 $5\% \text{Giemsa}$ 中染色10min,镜检。银染色,按Howell等的方法,在制得的染色体片上滴3滴 2% 明胶(内含 1% 甲酸)、6滴 $50\% \text{AgNO}_3$ 溶液,放入 65°C 水浴的培养皿内,作用5min左右,视片子呈棕黑色,水洗,镜检。

选取较清晰、无丢失的分裂相进行显微拍照,按Levan等(1964)的标准进行核型分析。

* 国家攀登计划B项目,PD-B6-5-1号。王金星,男,出生于1955年5月,硕士,副教授, Fax: 0086-0531-8902167

收稿日期: 1995-08-21, 收修修改稿日期: 1997-05-27

2 结果

2.1 缙蛭的二倍体数目

从鳃组织制片中选取 100 个中期相,计数其染色体数目。结果表明,缙蛭的二倍体数目 $2n=38$ (表 1)。

表1 缙蛭二倍体染色体数目

Tab.1 Diploid chromosome number of *S.constricta*

二倍体数	36	37	38	39
细胞数(cell)	6	7	86	1
百分率(%)	6	7	86	1

I:1,2)。所有染色体可以分为 3 组。A 组(表 2,图版 I:2):1—13 号,为中着丝粒染色体;1—3 号相对长度较大,易鉴别,其余各对相对长度依次减小,难以区分。B 组(表 2,图版 I:2):14—17 号,亚中着丝粒染色体;第 14 号染色体较大,易鉴别,其余 3 对难以区分。C 组(表 2,图版 I:2):18—19 号染色体;18 号为亚端着丝粒染色体,19 号为端着丝粒染色体,这两对染色体在整个核型中易鉴别。因此,缙蛭的核型为 $2n = 26m + 8sm + 2st + 2t$,染色体臂数 $NF = 72$ 。

2.3 C-带核型

对 8 个 C-带核型的分析表明,缙蛭核型中共有 7 对染色体具异染色质带,均表现为末端 C-带。其中 6 对为中着丝粒染色体,1 对为亚中着丝粒染色体。另外,还有几对染色体不恒定地出现居间带(m_4, sm_{14})和端带(st_{18}),没有发现端着丝粒 C-带。(图版 I:3,4)

2.4 Ag-NORs 带

对 9 个分裂相的分析表明,只有 1 对中着丝粒染色体呈银染阳性。NORs 在缙蛭不同分裂相中表现出数目多态。同一个体的不同分裂相中显示的 NORs 数目从 0 到 2 个不等,但多数为 2 个(图版 I:6)。在有的分裂相中,银染带只出现在每条染色体的一个单臂上(图版 I:5)。与 Ag-NORs 数目多态相对应,间期核中银染核仁的数目也有不同,从 1 到 2

2.2 缙蛭的染色体组型

根据测量及统计结果,在缙蛭的 19 对染色体中,有 13 对为中着丝粒染色体(m),4 对亚中着丝粒染色体(sm),1 对亚端着丝粒染色体(st)和 1 对端着丝粒染色体(t),未发现异形性染色体(表 2,图版

表2 缙蛭染色体组型分析数据

Tab.2 The data of the chromosome karyotypic analysis in *S. constricta*

组别	序号	相对长度 (μm)	臂比	染色体形态
A	1	67.433 \pm 2.23	1.21 \pm 0.11	m
	2	62.82 \pm 1.09	1.20 \pm 0.12	m
	3	59.86 \pm 1.55	1.21 \pm 0.13	m
	4	56.96 \pm 1.55	1.30 \pm 0.16	m
	5	55.83 \pm 1.24	1.32 \pm 0.21	m
	6	54.33 \pm 1.66	1.11 \pm 0.06	m
	7	53.70 \pm 1.25	1.21 \pm 0.20	m
	8	52.51 \pm 0.63	1.30 \pm 0.21	m
	9	51.73 \pm 1.35	1.30 \pm 0.20	m
	10	49.97 \pm 1.88	1.30 \pm 0.18	m
	11	48.50 \pm 2.48	1.21 \pm 0.11	m
	12	48.40 \pm 2.04	1.40 \pm 0.10	m
	B	13	43.35 \pm 1.88	1.12 \pm 0.06
14		57.77 \pm 2.50	1.91 \pm 0.13	sm
15		52.22 \pm 1.51	2.04 \pm 0.20	sm
C	16	48.09 \pm 3.01	2.01 \pm 0.16	sm
	17	45.37 \pm 2.69	2.62 \pm 0.07	sm
	18	48.35 \pm 2.95	3.82 \pm 0.59	st
	19	50.67 \pm 2.09	>7	t

个不等(图版 I:7,8), 银染核仁的最高数目与 Ag-NORs 的数目是一致的。

3 讨论与结语

据 Nakamura (1985) 统计, 已报道的进行过染色体研究的双壳类有 125 种, 其中有核型报道的只有 55 种。我国王桂云等(1988)、相建海等(1991)、王琼等(1994)对海洋贝类染色体已进行研究。以往的报道, 贝类染色体研究所用的材料以生殖腺、早期胚胎或幼贝为多, 这类材料分裂指数高, 容易获得分裂相。但也有一个很大的缺点, 即时间上的局限性, 因为只有在繁殖季节才能进行取材研究。而本研究利用鳃组织则不受时间的限制, 常年可以开展研究。但是鳃组织分裂指数低, 不易得到分裂相, 为此将鱼类染色体研究中常用 PHA 注射法移植到缢蛏的染色体研究中, 取得了较好的结果。如果不用 PHA 处理, 在染色体玻片中几乎没有分裂相; 经过 PHA 刺激后, 根据本研究的统计, 其分裂指数最高可达到 1.3%。另外, 由鳃组织得到的分裂相染色体收缩程度适中, 分散也较好。

关于贝类染色体的带型研究, 国内外报道的还不多。根据本研究对缢蛏 C-带核型的观察, 发现其异染色质均位于染色体臂的末端, 称为端带。在个别分裂相中不恒定地出现居间带, 没有发现着丝粒带。这一点与脊椎动物的 C-带不同。在脊椎动物中, 常见的是着丝粒 C-带。Martinez-Lage 等(1994, 1995)对三种贻贝 (*M. edulis*, *M. galloprovincialis* 和 *M. trossulus*) 的核型、C-带及银染带进行了研究。他们对 C-带的研究结果表明, 三种贝类都只有少量异染色质, 主要位于端粒(端带)和染色体臂之间(居间带), 着丝粒带非常少见。为了解释这种异染色质区域的位置和分布, Macgregor 等(1986)指出, 着丝粒是 C-带的起始位置, 异染色质从这里向端粒迁移。因此, 具有较多端粒异染色质的核型在系统演化上要经历更长的时间。据此可以推断, 只具有端粒异染色质的缢蛏的核型在进化上经历了漫长的演化过程。

核糖体 RNA 基因(rDNA)通常是多拷贝并分布在不同的染色体上, 由它们形成核仁组织者。通过银染可见的核仁组织者被认为是具有转录活性的 rDNA 簇。根据 Hadjiolov (1985) 的观点, 银染的分子机制包括两个步骤: (1)特异性的酸性非组蛋白(称为 Ag-NOR 蛋白, 与 rDNA 转录有关)结合到非闭锁(有活性)的 r 非转录染色质上, 这种染色质位于核仁纤维中心。(2)银粒子结合到 Ag-NOR 蛋白上。如果两步银染模型正确的话, 银染阴性可以简单的解释为核糖体基因染色质在整个细胞分裂过程中(从前期到后斯)都是闭锁(无活性)的, 而被银染色的核糖体基因是有转录活性的 NORs。因此, 本文在缢蛏中观察到的 NORs 多态实际上是 rDNA 转录活性差异的表现。

综上所述, 将鱼类染色体研究中常用的 PHA 注射法应用于缢蛏的染色体研究, 可以提高缢蛏鳃组织的有丝分裂指数, 获得满意的中期分裂相; 缢蛏的异染色质几乎只分布于染色体端粒的位置(称为端带)。有 1 对对着丝粒染色体上具有 Ag-NORs 带, 且相对稳定, 因此可以作为遗传育种或其他研究的遗传标记。

参 考 文 献

- 王桂云 马庆惠 王先志, 1988. 皱纹盘鲍的染色体研究. 动物学研究, 9(2): 171—174
王 琼 童寰亮, 1994. 贻贝 (*Mytilus edulis*) 核型及染色体带型分析. 动物学报, 40(3): 309—316
相建海 陈 隽, 1991. 海湾扇贝、栉孔扇贝和虾夷扇贝杂交育种可行性研究. 实验海洋生物学开放研究实验室学术年报. 青岛: 青岛海洋大学出版社. 137—139

- Hadjiolov A A, 1985. The Nucleolus and Ribosome Biogenesis. Vien: Springer-Verlag. 1—35
- Howell W M, Black D A, 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experienta*, 36: 1 014
- Levan A, Fredga K, Sandberg A A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201—220
- Macgregor H C, Sessions S K, 1986. The biological significance of variation in satellite DNA and heterochromatin in newts of the genus *Triturus*: an evolutionary perspective. *Phil Trans R Soc B*, 312: 243—259
- Martinez-Lage A, Gonzalez-Tizon A, Mendez J, 1994. Characterization of different chromatin types in *Mytilus galloprovincialis* L. after C-handing, flurochrome and restriction endonuclease treatments. *Heredity*, 72: 242—249
- Martinez-Lage A, Gonzalez-Tizon A, Mendez J, 1995. Chromosomal markers in three species of the genus *Mytilus* (Mollusca: Bivalvia). *Heredity*, 74: 369—275
- Nakamura H K, 1985. A review of molluscan cytogenetic information based on the CISMOCH. *VENUS* (Jap J Malac), 44(3): 193—225

§ Research Note §

CHROMOSOME STUDY OF *SINONOVACULA* *CONSTRICTA* (BIVALVIA)

WANG Jin-xing, ZHAO Xiao-fan, ZHOU Ling-hua[†], XIANG Jian-hai[†]

(College of Life Sciences, Shandong University, Jinan, 250100)

(Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)[†]

Abstract Individuals of *Sinonovacula constricta* were collected from the coastal areas of Weihai and Qingdao, Shandong Province. The animals were injected *in vivo* with 8 μg of Phytohemagglutinin (PHA) per gram of body weight including shell weight. After being cultured for 18 to 24 hours, Colchicine was injected (2 to 3 μg per body weight). Four to five hours later, the gills were taken out and sectioned into pieces. The gill cells were treated with hypotonic solution (0.075 mol / L KCl) for around 40 minutes at room temperature, and fixed in fresh methanol: acetic acid (3:1) three times. Metaphase chromosome spreads were prepared using the conventional air-dry method. The diploid chromosome number was determined by observing 100 metaphase plates; of those ten well-spread plates were photographed with an Olympus microscope. Classification of chromosomes was based upon the study of Levan *et al* (1964).

The method for the staining of constitutive heterochromatin was according to Sumner (1972) with slight modifications. Slides were treated for 30 minutes in 0.2 mol / L HCl at room temperature and incubated in 5% Ba(OH)₂ for 30 to 60 seconds at 37°C. After washing with distilled water, slides were subsequently incubated in 2 × SSC solution for 2 hours at 60°C. Staining was done in 5% Giemsa (pH = 7.0) for 10 minutes. Silver-staining was performed according to Howell *et al* (1980). The results are as follow.

The distribution of chromosome counts obtained for *S. constricta* is shown in Tab.1. The measurements and classification of the ten selected metaphase plates were presented in Tab.2. Plate I shows the karyotype arranged by morphology and decreasing chromosome size. The diploid chromosome number is 38. All chromosomes were matched in 19 pairs; they were divided into 3 groups. Group A includes pairs 1 to 13 that are metacentrics. The relative lengths of pairs 1 to 3 are larger than the others; thus, they can be identified easily. The relative lengths of the others decrease gradually. Group B consists of pairs 14 to 17 which are submetacentrics. Pair 14 is larger than the others. The relative lengths of the others decrease gradually and they cannot be distinguished easily from each other. Group C includes chromosome Nos. 18 and 19. No. 18 is subtelocentric and No. 19 telocentric. They can be identified easily in all chromosomes of *S. constricta*.

Therefore, the karyotype of *S. constricta* is $2n = 38, 26m + 8sm + 2st + 2t, NF = 72$ (Plate II :1,2).

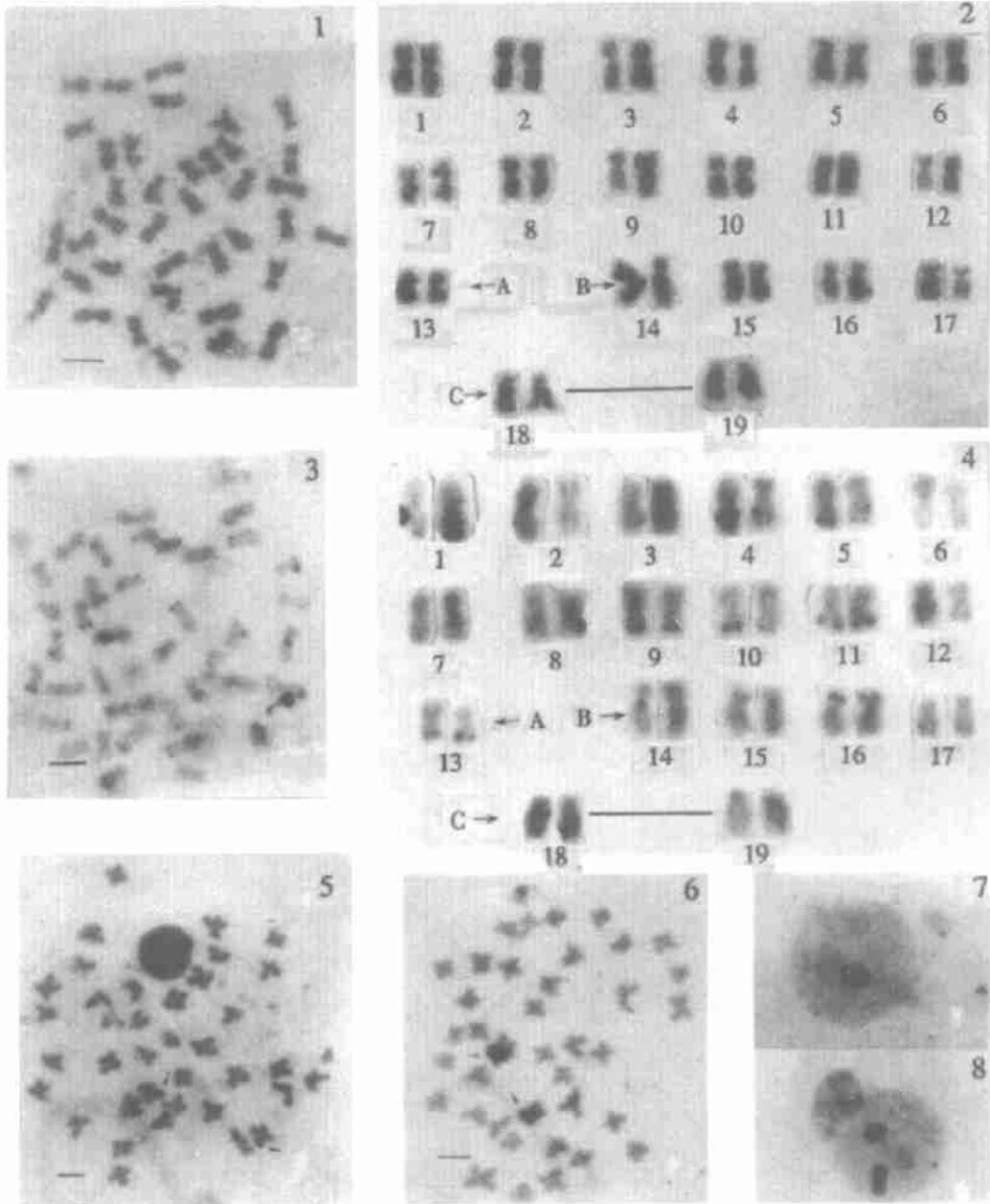
The C-banded chromosomes of *S. constricta* reveal constitutive heterochromatin in the telomeric region of 7 pairs of the chromosomes. Among them, 6 pairs (No. 1, 5, 9, 10, 11, and 13) are metacentrics and 1 pair (No.16) is submetacentric. In addition, Pairs 4 and 14 show interstitial C-bands and chromosome No.18 have telomeric C-band occasionally. No centromeric C-band was found in the karyotype of *S. constricta* (Plate I :3, 4).

Nine silver-stained metaphases of *S. constricta* were analyzed. A variable number of Ag-NORs was detected, which varied between 0 and 2 chromosomes in different metaphases of the species. The silver-stained karyotype of the species shows one chromosomal pair (metacentric) with telomeric NORs. The variation of NORs observed in the metaphase chromosomes is also expressed in interphase nuclei (Plate I :5 to 8).

In conclusion, the employment of PHA injection in the investigation of chromosomes in *S. constricta* can increase the index of mitosis in gill cells. The heterochromatin is located in the telomeric regions of seven pairs of chromosomes. The silver-stained bands are constantly located at one pair of metacentric chromosomes. Thus, the Ag-NORs can be regarded as chromosome markers of this species in the genetic breeding and other fields of studies.

Key words Karyotype C-banding Ag-NORs *Sinonovacula constricta*

Subject classification number Q343



图版 I 缙蛭的中期相与核型(1,2)、C-带中期相与核型(3,4)、银染中期相(5,6)和银染间期核(7,8)
(所有标尺均示 5 μ m)

Plate I Metaphase (1), karyotype (2), C-banded metaphase (3) and karyotype (4), silver-stained metaphases (5,6) and nuclei of interphases (7,8) of *Smanovacula constricta* (all scale bars show 5 μ m)