

鹰爪虾染色体数目与核型的研究*

周岭华 张晓军 相建海

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

摘要 于1990年、1994年、1997年每年4—7月,在青岛石老人沿海采集鹰爪虾样品,以精巢、胚胎及无节幼体为材料进行染色体的数目及核型的研究。染色体的制备均采用气干法,用Olympus显微镜进行观察,依据Levan等(1964)的分类标准进行核型分析。结果表明,鹰爪虾染色体的数目为 $2n = 70, n = 35$ 。染色体的核型为 $2n = 70 = 42M + 10SM + 12ST + 6T$,染色体总臂数为 $NF = 122$ 。根据染色体形态分析的结果,没有发现性染色体的存在。

关键词 鹰爪虾 染色体数目 染色体核型

学科分类号 Q343

鹰爪虾是对虾科鹰爪虾属的一种,广泛分布于印度-西太平洋海区,在中国沿海各海域均有分布,具有重要的经济价值(刘瑞玉,1955;刘瑞玉等,1990)。在对虾科染色体的研究中,已见报道的有对虾属的11种和赤虾属的1种,分别为日本对虾(*Penaeus japonicus*)、褐对虾(*P. aztecus*)、白对虾(*P. setiferus*)、桃红对虾(*P. duorarum*)、凡纳对虾(*P. vannamei*)、中国对虾(*P. chinensis*)、斑节对虾(*P. monodon*)、长毛对虾(*P. penicillatus*)、短沟对虾(*P. semisulcatus*)、墨吉对虾(*P. merguensis*)、澳大利亚食用虾(*P. esculentus*)和须赤虾(*Metapenaeopsis barbata*) (相建海,1988;相建海等,1990,1991;Hayashi *et al*,1988;Miligan,1976;Xiang *et al*,1994,1996),而鹰爪虾属染色体核型的研究尚未见报道。本文报道鹰爪虾杂染色体的数目与核型研究结果,以期对虾类的细胞遗传学和遗传改良研究提供理论依据。

1 材料与方 法

实验用鹰爪虾(*Trachypenaeus curvirostris*)分别于1990年、1994年、1997年4—7月取自青岛石老人沿海。将活虾运回后,蓄养在中国科学院海洋研究所水族楼的水池中。于6—7月,在人工饲养条件下,已交配的成熟雌虾产卵,孵出无节幼体。

染色体的制备均采用气干法,所用材料和具体步骤如下:

胚胎:取原肠期至肢芽期胚胎,放入含秋水仙素(终浓度为0.02%)的海水中处理1—1.5h后,除去海水,缓慢加入0.3%的柠檬酸钠溶液,低渗20—30min;或者先用50%海水低渗20min后,再用0.075mol/L的KCl低渗10—20min。低渗后的材料相继用3:1和1:1新配制的卡诺氏液固定2—3次。

* 国家攀登计划B资助项目,PD B-6-5-1号;国家自然科学基金资助项目,39670579号。周岭华,女,出生于1945年6月,副研究员,Fax: 0086-0532-2879235

收稿日期:1998-03-26,收修改稿日期:1998-11-18

无节幼体: 收集无节幼体, 放入含秋水仙素(终浓度为 0.02%)的海水中暂养 2—2.5h 后, 除去海水, 再用 0.075mol / L 的 KCl 溶液低渗 20—30min, 固定方法同上。

精巢: 从雄虾腹部第 1—2 节间体侧部注入适量 2mg / ml 的秋水仙素水溶液(按体重: 秋水仙素 = 1g:1.5 μ g 的比例控制注射量)。将虾暂养 4—6h 后, 取出精巢, 剪成 2—3mm 小块, 用 0.075mol / L KCl 溶液低渗 20—30min 后, 再用卡诺氏液固定。

气干法制片参照相建海(1988)。将胚胎和无节幼体置于玻片上, 可用镊子尖端轻轻挤压, 使细胞随滴加的固定液扩散到玻片上。干后的玻片用 5%Giemsa 染色(磷酸缓冲液配制, pH = 7.0)20min, 用清水冲去多余的染液, 静置干燥。

利用显微镜对染色体制片进行观察, 选择染色体分散良好的细胞进行计数, 在达到一定数目后, 统计出染色体数目的众数值。用 Olympus 显微摄影仪拍照。照片冲洗放大后, 剪贴、测量、计算其长短臂比, 依据 Levan 等(1964)的分类标准进行核型分析。

2 结果

2.1 染色体的数目

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(图 1a)和处于有丝分裂中期的精原细胞, 计数 108 个初级精母细胞的双价体, 众数为 35, 出现百分率为 78.7%; 镜检有丝分裂中期的精原细胞 51 个, 众数为 70, 出现百分率为 62.7%; 计数 82 个无节幼体染色体的中期分裂相(图 1b), 众数为 70, 出现百分率为 52.4%。由此可确定鹰爪虾染色体数目: $2n = 70, n = 35$ 。

表1 鹰爪虾细胞分裂中期染色体数出现频率

Tab.1 The frequency of counting number of metaphase chromosome in shrimp *T. curvirostris*

细胞类型	染色体数	双价体数	出现频率	百分率(%)
初级精母 细胞		32	4	3.7
		33		
		34	15	13.9
		35	85	78.7
		36	4	3.7
精原细胞	68		7	13.7
	69		8	15.7
	70		32	62.7
	71		4	7.9
	67		6	7.3
无节幼体 体细胞	68		10	12.2
	69		14	17.1
	70		43	52.4
	71		9	11.0

2.2 染色体的核型

在用胚胎细胞制备的染色体标本中, 染色体的中期分裂相形态清晰, 着丝点位置易辨, 根据测量计算的结果, 采用 Levan 等(1964)确定的臂比值的方法, 将鹰爪虾的染色体分为 4 组(图 2)。

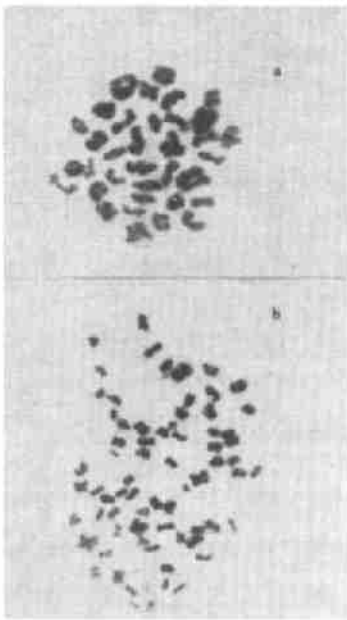


图1 处于初级精母细胞减数分裂终变期的染色体中相(a)和无节幼体体细胞的染色体中相(b)

Fig.1 Metaphase of a primary spermatocyte at diakinesis of meiosis (a) and a somatic cell of a nauplius (b)



图2 鹰爪虾染色体的核型分组

Fig.2 Karyotype of *T. curvirostris*

第 I 组 21 对, 为中部着丝点的染色体 (M), 其中有 3 对较大的染色体; 第 II 组 5 对, 为亚中部着丝点的染色体 (SM); 第 III 组 6 对, 为亚端部着丝点的染色体 (ST); 第 IV 组 3 对, 为端部着丝点的染色体 (T)。由此可确定, 鹰爪虾染色体的核型为 $2n = 70 = 42M + 10SM + 12ST + 6T$, 染色体总臂数为 $NF = 122$ 。

3 讨论与结论

3.1 染色体的制备方法

本实验在鹰爪虾染色体的制备过程中, 先后以精巢、胚胎和无节幼体为材料, 并对低渗的方法进行了一些改进。

以精巢制备的染色体, 有大量分散较好的精母细胞双价体和染色体的中期分裂相, 比较容易确定染色体的数目, 但由于染色体的形状大多为点状, 收缩较大, 难以进行核型分析。而以胚胎细胞制备的染色体, 经常出现染色体分散差或丢失的现象, 因此, 本文在低渗方法上进行了一些改进, 取得了较好的效果。先用 50% 的海水低渗 15—20min, 再用 0.075mol / L 的 KCl 溶液继续低渗 10—20min, 细胞的膨胀状态好, 制片时染色体分散好, 且不易丢失。由于对虾类的染色体数目多, 外形小, 进行核型分析较困难, 因此本文采用 0.3% 的柠檬酸钠溶液作为低渗液, 可使染色体适当延长, 便于核型分析。

3.2 染色体的形态

在 35 对染色体中, 有 3 对较大的中部着丝点的染色体, 在核型分析的中期相上, 其长度超过 10µm, 与以前的虾类染色体相比, 也显得较大。

用不同方法处理的不同细胞,其染色体的形态差异较大,有点状、哑铃状、X状,即使采用同一种方法将同一批组织处理在同一张制片上,染色体形状和大小也有一定的差异。这主要是因为同一块组织的不同细胞处于细胞周期的不同时期,加上不同细胞所处的“微环境”各有差异,如玻片不同点上的光滑、洁净程度不一,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,造成观察到的染色体形态有所不同。采用 Levan 等(1964)的核型分析方法,将染色体长、短臂相对比值作为标准来分类,可以部分克服染色体制备不等性造成的困难。据刘凌云(1988)报道,采用 BrdU 法进行预处理,可以使鱼的淋巴细胞染色体增长 74% 和 53%,本文在采用 0.3% 柠檬酸钠溶液低渗时,也发现对染色体有一定的加长作用。

对鹰爪虾染色体的形态分析,没有发现性染色体的存在。

参 考 文 献

- 刘凌云, 1988. BrdU 处理的鱼类染色体高分辨率 G-带带型分析. 遗传学报, 15(2): 117—121
- 刘瑞玉, 1955. 中国北部的经济虾类. 北京: 科学出版社, 73
- 刘瑞玉, 钟振如, 1990. 南海对虾类. 北京: 农业出版社, 278
- 相建海, 1988. 中国对虾染色体的研究. 海洋与湖沼, 19(3): 205—209
- 相建海, 刘瑞玉, 周岭华等, 1990. 斑节对虾染色体的初步研究. 见: 中国科学院实验海洋生物学开放研究实验室研究年报(第 1 期). 青岛: 青岛海洋大学出版社, 115—121
- 相建海, 周岭华, 刘瑞玉等, 1991. 长毛对虾、短沟对虾和日本对虾的染色体研究. 海洋科学, 4: 72—73
- Hayashi K, Fujiwara Y, 1988. A new method for obtaining metaphase chromosomes from the regeneration blastema of *Penaeus japonicus*. Nippon Suisan Gakkaishi, 54: 1 563—1 565
- Levan A, Fredge K, Sanders A A, 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas, 52(2): 201—220
- Milligan D J, 1976. A method for obtaining metaphase spreads from marine shrimp with notes on the karyotypes of *Penaeus aztecus*, *P. setiferus* and *P. duorarum*. Proceedings VIII World Mariculture Society, San Diego, California, 7: 327—332
- Xiang J H, Liu R Y, Zhou L H, 1994. Chromosomes of marine shrimps with special reference to different techniques. Aquaculture, 111: 321
- Xiang J H, Courtney A J, Zhou L H, 1996. Chromosome complements in the spermatogenesis of two Penaeid prawns, *Penaeus merquiensis* and *P. esculentus*. Cytologia, 61:317—320

STUDY ON NUMBER AND KARYOTYPE OF A MARINE SHRIMP *TRACHYPENAEUS CURVIROSTRIS*

ZHOU Ling-hua, ZHANG Xiao-jun, XIANG Jian-hai

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

Abstract The chromosomal number and karyotype in a marine shrimp *Trachypenaeus curvirostris* which is an important commercial species for the Chinese fisheries were studied using the materials of testicular tubules, embryos and nauplius larvae. The shrimps were collected from the coastal areas of Shilaoren, Qingdao, Shandong Province in April to July, 1990, 1994 and 1997.

The tissue treatment process is as follows.

Embryos: They were collected in a beaker and immersed with colchicine solution. 1—1.5 hours later, the embryos were treated by hypotonic lysis firstly with seawater (50%) for 20min and then with KCl solution (0.075mol / L) for 10—20min.

Another method is to undertake the hypotonic treatment with sodium citrate solution (0.3%) for 20—30min.

Nauplius: They were placed in a beaker and immersed with colchicine solution. 2—2.5 hours later, the larvae were hypotonized with KCl solution for 20—30min.

Adult shrimp: Colchicine was injected (1.5 μ g per body weight g) into the muscle of the first or the second abdominal segment, and kept alive in seawater for 4—6 hours. Individual shrimps were then sacrificed, the testis dissected out and cut into 2—3mm pieces. They were hypotonic with KCl solution (0.075mol / L) for 20—30min.

All tissues were fixed with fresh Carnoy's solution (methanol: acetic acid = 3:1) three times.

Chromosome preparation and observation: Embryo, larvae or pieces of testicular tubules were placed on a clean slide and spread using a forcep. The samples were stained with 5% Giemsa solution (pH = 7.0). The spread plates were observed and photographed with an Olympus microscope.

Classification of chromosome was based upon the method of Levan *et al* (1964).

The testicular tubules from the shrimp were used as the experimental materials for determining chromosome complements of meiotic bivalents. The somatic cells from the embryos and nauplius larvae were applied for both of karyotypes and the number of diploidy chromosome was determined. The results indicate that the chromosomal number of shrimp *Trachypenaeus curvirostris* is: $n = 35(2n = 70)$. According to Levan's standard, the chromosomal karyotype of *Trachypenaeus curvirostris* is $2n = 42M + 10SM + 12ST + 6T$. No sex-chromosome in the complements was observed.

Key words *Trachypenaeus curvirostris* Chromosome number Karyotype

Subject classification number Q343