

文章编号: 1000-0615(2005)05-0649-05

三疣梭子蟹核型分析

朱冬发, 王春琳, 李志强

(宁波大学生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 实验用三疣梭子蟹于 2003 年 3 月-2004 年 6 月购自浙江象山石浦港。以成熟卵、精巢、胚胎及 1 龄幼体等为材料进行三疣梭子蟹染色体数目和核型的研究。染色体制片采用组织切片法和气干法, 用 Olympus 显微镜进行观测、摄影, 依据 Levan 等的染色体分类标准进行核型分析。结果表明, 精巢最适宜进行三疣梭子蟹染色体计数, 卵内 1 龄幼体最适宜做核型分析。三疣梭子蟹染色体的数目是 $2n=106$, $n=53$ 。核型分析显示, 三疣梭子蟹有 20 对(第 1~20 号)中部着丝粒染色体(m)、3 对(第 21~23 号)亚中部着丝粒染色体(sm)和 30 对(第 24~53 号)端着丝粒染色体(t)。因此, 三疣梭子蟹核型为 $2n=106=40m+6sm+60t$, 染色体臂数 $NF=152$; 没有检查出异形性染色体的存在。

关键词: 三疣梭子蟹; 染色体; 核型

中图分类号: S917 文献标识码: A

Karyotype analysis on *Portunus trituberculatus*

ZHU Dong fa, WANG Chun lin, LI Zhi qiang

(Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Individuals of *Portunus trituberculatus* were collected from Shipu Port, Xiangshan, Zhejiang Province from March 2003 to June 2004. The chromosomal number and karyotype of the swimming crab were studied by the tissue slice techniques applied to the mature oocytes and the air drying method applied to the testes, embryos and zoeae. The spread plates were examined and the chromosomes at the mitotic or meiotic metaphase were photographed under an Olympus microscope. The chromosome pairing were processed according to the relative lengths and the centromeric indexes. The chromosome pairs was classified following the method of Levan *et al* (1964). The results indicate that the testes are the best materials to be used in chromosome count and the egg zoeae are the best materials to be used in karyotype analysis. The chromosomal numbers for *P. trituberculatus* are $2n=106$, $n=53$. All chromosomes ($2n=106$) were matched in 53 pairs. They were divided into 3 groups. Group I contains 20 pairs (1st-20th) that are metacentric chromosomes(m). Group II has only 3 pairs (21st-23rd) of submetacentric chromosomes(sm). And group III includes 30 pairs (24th-53rd) which are telocentric chromosomes(t). Therefore, the karyotype formula of *P. trituberculatus* is $2n=106=40m+6sm+60t$, $NF=152$. No sex chromosome of heteromorphism was observed.

Key words: *Portunus trituberculatus*; chromosome; karyotype

核型是一个物种体细胞内染色体数目、形态和长度等情况的总和, 是细胞遗传学的基本内容。核型分析是开展杂交育种、多倍体诱导和雌核发育等遗传育种操作的基础, 对生物分类和系统演化研究及环境监测等也具有较重要的意义。与昆虫和脊椎动物相比, 由于十足目甲壳动物二倍体

染色体数目较多(64~376)且每个染色体又很小(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^[1,2]。就梭子蟹科而言, 染色体研究迄今仅涉及环纹 (*Charybdis annulata*, $2n=80$)^[3]、善泳 (*C. natator*, $2n=84$)^[3]和锯缘青蟹

收稿日期: 2004 10 14

资助项目: 浙江省自然科学基金资助项目(301213); 宁波市科技计划项目(01N40107-2); 宁波市青年基金项目(2004A620014)

作者简介: 朱冬发(1968-), 男, 江西临川人, 副教授, 博士, 主要从事甲壳动物生殖生物学与细胞遗传学研究。Tel: 0574-87600878,

E-mail: zhudongfa@nbu.edu.cn

(*Scylla serrata*)^[3-5] 这 2 属 3 种。三疣梭子蟹 (*Portunus triuberculatus*) 是梭子蟹科的代表物种,也是梭子蟹科中最具经济价值的一个物种,其染色体数目与核型的研究尚未见报道。本文以精巢、成熟卵、胚胎及 状幼体等为材料对三疣梭子蟹染色体数目与核型进行了研究,以期对三疣梭子蟹细胞遗传学和遗传育种研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用蟹于 2003 年 3 月-2004 年 6 月购自浙江象山石浦港。染色体标本制备以精巢、成熟卵、胚胎及 状幼体等为材料。其中精巢取自 30 只雄蟹(每只 80~280 g);新产出的成熟卵取自雌蟹生殖孔处,已被证实系处于第一次减数分裂中期的初级卵母细胞^[6];卵内 状幼体期胚胎和第一、二期 状幼体取自课题组人工育苗实验中的抱卵蟹及其孵出的幼体。

1.2 染色体标本的制备

精巢细胞染色体标本的制备 参考文献 [7] 的方法。

成熟卵染色体标本的制备 成熟卵用

Bouin 氏液固定,石蜡包埋,连续切片,H.E 染色。

胚胎和 状幼体染色体标本的制备 胚胎

和幼体在含秋水仙素(浓度为 $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的海水中浸泡处理 2.5 h 后,分为平行的两组,一组材料参照相建海^[7]的方法制片;另一组材料研磨、离心制备细胞悬液后,依次进行低渗、固定、冷片滴片、自然干燥和 Giemsa 染色。

1.3 染色体计数和核型分析

利用 Olympus BH 2 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显微摄影。底片经幻灯机投影到白纸上进行染色体计数。其中适于做核型分析的中期相用铅笔在白纸上勾画出染色体的形态,核型分析依据 Levan 等^[8]的分类标准。

2 结果

2.1 染色体数目

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-a),少数为处于有丝分裂中期的精原细胞(图 1-b)。计数处于有丝分裂中期的精原细胞 43 个,染色体众数为 106,出现百分率为 39.53% (表 1);计数处于减数分裂中期 I 的初级精母细胞 151 个,双价体众数为 53,出现百分率为 45.70% (表 2)。

卵内 状幼体期胚胎(图 1-e)和第一、二期 状幼体(图 1-d)的两种染色体标本制备方法共获得染色体分散良好的体细胞有丝分裂中期相 24 个,染色体众数为 106,出现百分率为 50.00% (表 3)。由表 1、表 2 和表 3 可以确定三疣梭子蟹染色体数目: $2n=106$, $n=53$ 。

表 1 精原细胞分裂中期染色体数的出现频率

染色体数 chromosome no.	103	104	105	106	107	108	总计 total
细胞数 cell number	5	10	6	17	3	2	43
百分率 percentage	11.63	23.26	13.95	39.53	6.98	4.65	100

2.2 核型分析

三疣梭子蟹体细胞染色体很小,长度变化为 $0.456\sim 3.339 \mu\text{m}$,平均长度为 $(1.238 \pm 0.543) \mu\text{m}$ 。对 5 个染色体形态较清晰、着丝粒可辨的体细胞有丝分裂中期相逐一投影、描绘和测量,计算出三疣梭子蟹染色体相对长度和着丝粒指数的变化范围分别为 $0.77\%\sim 4.71\%$ 和 $0\sim 47.61$ (表 4)。依据 Levan 等^[8]的染色体分类标准对三疣梭子蟹的染色体核型进行了初步的分析:中部着丝粒染色体(m) 共计 20 对(第 1~20 号),亚中部着丝粒染色体(sm) 仅 3 对(第 21~23 号),端部着丝粒染色体(t) 共计 30 对(第 24~53 号),故三疣梭子蟹的核型公式为: $2n=106=40m+6sm+60t$,染色体臂数 $NF=152$ 。核型图中染色体对按 m、sm、t 的顺序分类排列,同一类型内的染色体对按相对长度递减的顺序排列(图 2)。对三疣梭子蟹核型的分析,未能发现异形性染色体的存在。

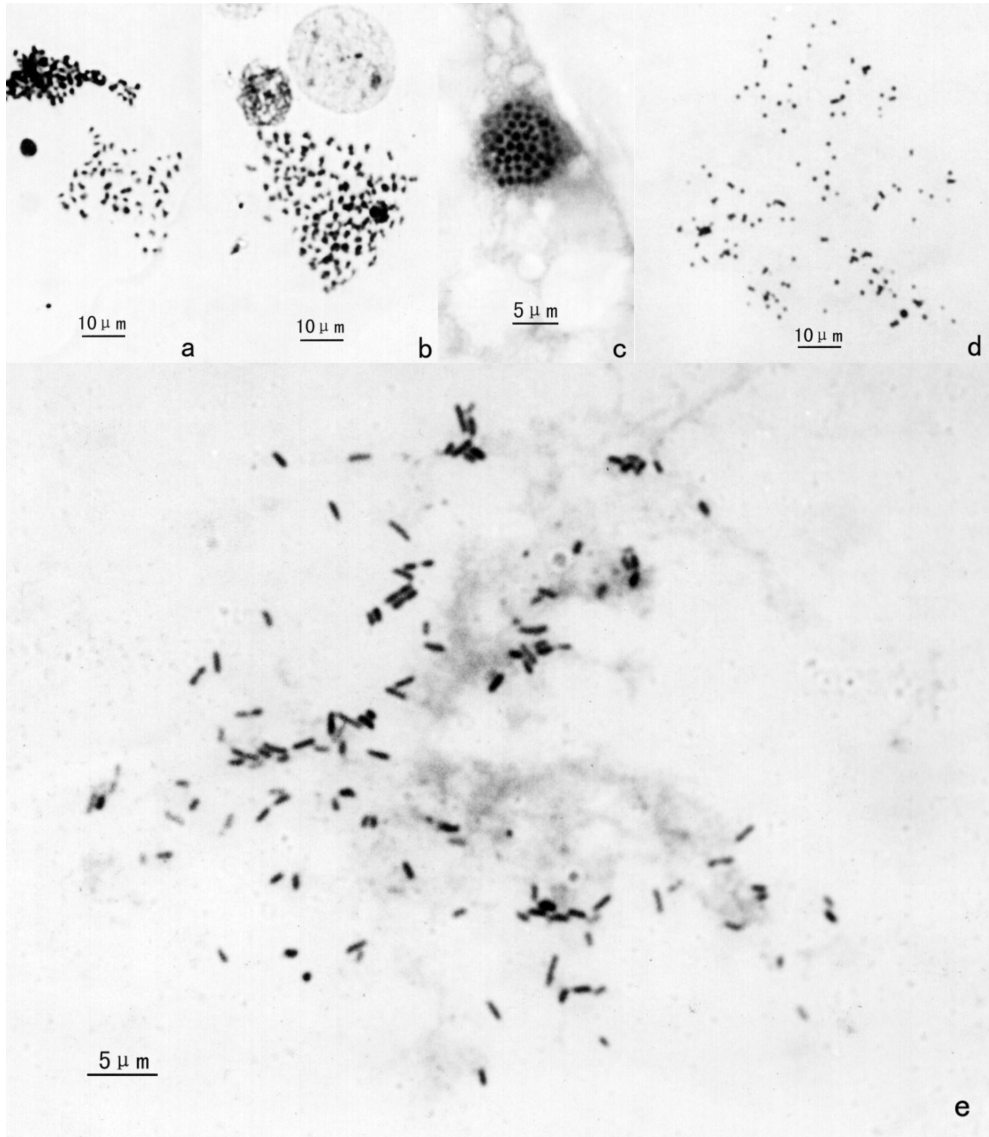


图 1 三疣梭子蟹细胞分裂中期染色体显微图相

Fig. 1 The micrograph of metaphase chromosomes in *P. trituberculatus*

(a) 初级精母细胞减数分裂中期相; (b) 精原细胞有丝分裂中期相; (c) 初级卵母细胞减数分裂中期相; (d) 状幼体细胞有丝分裂中期相; (e) 卵内 状幼体细胞有丝分裂中期相

(a) The meiotic metaphase of primary spermatocyte; (b) The mitotic metaphase of spermatogonium; (c) The meiotic metaphase of primary oocyte; (d) The somatic cell mitotic metaphase of zoea larvae; (e) The somatic cell mitotic metaphase of egg-zoea

表 2 初级精母细胞双价体数的出现频率

Tab. 2 Frequency of bivalent number of primary spermatocyte

双价体数 bivalent number	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	总计 total
细胞数 cell number	3	5	7	9	14	19	12	69	5	4	2	2	151
百分率 percentage	1.99	3.31	4.64	5.96	9.27	12.58	7.95	45.70	3.31	2.65	1.32	1.32	100

表3 胚胎和 状幼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 egg zoea and zoea larvae

染色体数 chromosome number	103	104	105	106	107	108	109	总计 total
细胞数 cell number	1	2	3	12	2	3	1	24
百分率 percentage	4.17	8.33	12.50	50.00	8.33	12.50	4.17	100

3 讨论

3.1 染色体标本的制备

材料是影响十足目甲壳动物染色体制片的一个重要因素。在预实验中,我们曾采用过成体雄蟹的心、鳃和肝胰脏等组织进行气干法制片,但效果不理想,难以获得染色体分散良好的分裂中期相用于计数,可能与这些组织细胞分裂指数不够高有关。我们也曾采用早、中期胚胎进行染色体制片,效果也不理想,主要是难以剔除的卵黄物质影响了染色体标本的制作、观察和摄影。精巢组织一直被认为是甲壳动物染色体制片的良好材料,其细胞分裂指数高,较易获得染色体分散良好的细胞分裂中期相,包括精原细胞有丝分裂中期

相和初级精母细胞减数分裂中期相^[2,5,7,9,10]。本次实验再一次表明精巢是甲壳动物染色体计数的良好材料。但遗憾的是,以精巢制备的染色体大多呈颗粒状和棒状(图 1-a, b),难以进行核型分析。相比较而言,卵内 状幼体更适合于做核型分析(图 1-e),而由相同浓度的秋水仙素海水溶液浸泡处理的 状幼体制备的染色体也大多呈颗粒状(图 1-d)。此外,本次实验还以成熟卵为材料,采用石蜡包埋、连续切片的方法研究了三疣梭子蟹初级卵母细胞的双价体数,获得的双价体数最大值仅为 49($< 1n = 53$)(图 1-c),且操作过程较复杂。我们认为,甲壳动物染色体标本制备方法改进的关键在于建立甲壳动物细胞培养方法。

表4 三疣梭子蟹核型指数

Tab.4 Indices of karyotype in *P. trituberculatus*

染色体对编号 chromosome pair no.	相对长度(%) relative length	着丝粒指数 centromeric index	类型 type	染色体对编号 chromosome pair no.	相对长度(%) relative length	着丝粒指数 centromeric index	类型 type
1	4.71±0.39	43.68±1.76	m	28	2.09±0.13	0	t
2	4.00±0.37	46.07±2.28	m	29	2.05±0.14	0	t
3	3.31±0.27	45.86±3.42	m	30	1.95±0.17	0	t
4	2.98±0.11	47.61±1.71	m	31	1.78±0.10	0	t
5	2.83±0.17	47.06±1.69	m	32	1.77±0.09	0	t
6	2.71±0.19	44.40±2.34	m	33	1.58±0.19	0	t
7	2.65±0.20	47.38±1.64	m	34	1.57±0.06	0	t
8	2.53±0.14	46.50±3.14	m	35	1.53±0.07	0	t
9	2.43±0.14	42.49±1.66	m	36	1.45±0.08	0	t
10	2.38±0.13	46.87±2.29	m	37	1.43±0.08	0	t
11	2.22±0.06	42.89±3.05	m	38	1.40±0.10	0	t
12	2.12±0.07	44.03±3.06	m	39	1.36±0.10	0	t
13	1.97±0.18	46.58±2.16	m	40	1.30±0.14	0	t
14	1.88±0.26	43.86±2.70	m	41	1.29±0.13	0	t
15	1.78±0.20	41.64±1.72	m	42	1.26±0.13	0	t
16	1.71±0.21	44.24±2.93	m	43	1.25±0.14	0	t
17	1.64±0.17	46.95±1.63	m	44	1.20±0.11	0	t
18	1.58±0.17	43.18±3.86	m	45	1.16±0.10	0	t
19	1.45±0.08	46.55±2.47	m	46	1.15±0.09	0	t
20	1.34±0.08	44.22±2.44	m	47	1.12±0.12	0	t
21	2.48±0.50	32.88±2.84	sm	48	1.06±0.10	0	t
22	2.09±0.36	33.69±3.53	sm	49	1.05±0.16	0	t
23	1.62±0.15	32.75±1.54	sm	50	1.02±0.10	0	t
24	2.89±0.16	0	t	51	0.93±0.06	0	t
25	2.45±0.16	0	t	52	0.83±0.07	0	t
26	2.31±0.15	0	t	53	0.77±0.07	0	t
27	2.21±0.15	0	t				

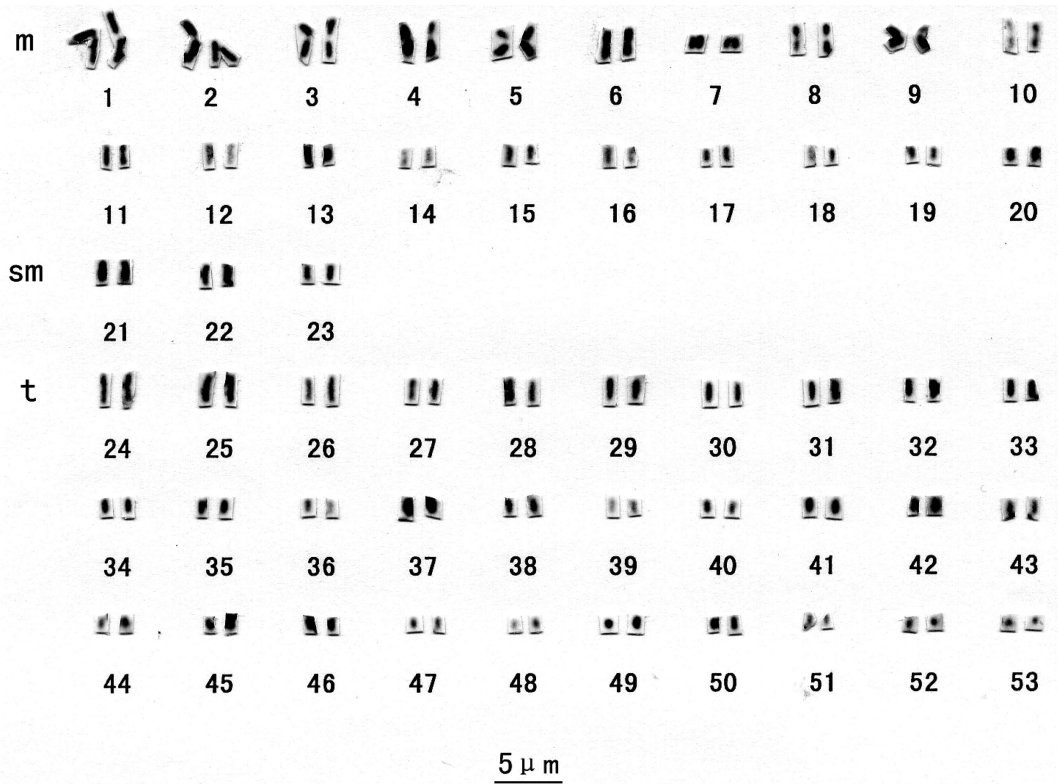


图 2 三疣梭子蟹核型

Fig. 2 Karyotype of *P. trituberculatus*

3.2 梭子蟹科物种染色体数目的比较

在梭子蟹科中,三疣梭子蟹染色体数($2n=106$)与锯缘青蟹染色体数($2n=94\sim 106$)更接近^[3-5],可能提示它们之间亲缘关系更近。

3.3 性染色体

尽管在十足目染色体的研究历史上, Nakamura 等^[1]曾报道过 8 个物种的性染色体,但近年来人们却没有在十足目的其它物种中发现异形性染色体。考虑到十足目染色体数目多且每个染色体又很小,我们认为,即使存在异形性染色体,如果不改进研究方法,要发现它也几乎是不可能的。在十足目甲壳动物上,寻找类似于哺乳动物 SRY 基因^[11]的性别特异性区段,然后制备相应的探针用于染色体原位杂交,可能有助于我们发现十足目甲壳动物的性染色体。

参考文献:

[1] Nakamura H K, Machii A, Wada T, *et al.* A check list of decapod chromosomes (Crustacea) [J]. Bull Natl Inst Aquac,

1988, 13: 1-9.

- [2] Tan X, Qin J G, Chen B, *et al.* Karyological analyses on redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae) [J]. Aquac, 2004, 234: 65-76.
- [3] Vishnoi D N. Studies on the chromosomes of some Indian Crustacea [J]. Cytologia, 1972, 37: 43-51.
- [4] Niiyama H. A comparative study of the chromosomes in decapods, isopods and amphipods, with some remarks on cytotaxonomy and sex determination in Crustacea [J]. Mem Fac Fish Hokkaido Univ, 1959, 7: 1-60.
- [5] 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.
- [6] 朱冬发,王春琳,余红卫,等. 三疣梭子蟹受精过程的初步观察[A]. 甲壳动物学论文集(4) [C]. 北京: 科学出版社, 2003. 432-435.
- [7] 相建海. 中国对虾染色体的研究[J]. 海洋与湖沼, 1988, 19(3): 205-209.
- [8] Levan A, Fredga K, Sandberg A A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes [J]. Hereditas, 1964, 52(2): 201-220.
- [9] 堵南山,赖伟,薛俊征. 中华绒螯蟹染色体的研究[J]. 动物学研究, 1986, 7(3): 293-296.
- [10] Chow S, Dougherty W J, Sandifer P A. Meiotic chromosome complements and nuclear DNA contents of four species of shrimps of the genus *Penaeus* [J]. J Crustac Biol, 1990, 10: 29-36.
- [11] Sinclair A H, Berta P, Palmer M S, *et al.* A gene from the human sex determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif [J]. Nature, 1990, 346: 240-244.