

日本沼虾染色体及其核型的研究*

邱高峰 堵南山 赖伟

(华东师范大学生物学系, 上海 200062)

提要 于1992年3月在上海青浦县采集日本沼虾,以改进的空气干燥法研究精巢细胞染色体及核型,特别较详细地研究了减数分裂前期I染色体的行为。结果表明,日本沼虾染色体数 $n = 52$, $2n = 104$, 共分为 A, B, C, D 4 个染色体组;核型组成是 $N = 37M + 4ST + 11T$; 初级精母细胞减数分裂前期I可分为细线期/偶线期、粗线期、双线期和终变期5个时期,双线期的二价体存在弥散阶段;减数分裂的同步率高,大多处于双线期,且双线期二价体着丝点清晰,给核型分析带来了方便。

关键词 日本沼虾 染色体 核型 减数分裂 双线期 二价体

近年来,随着水产经济动物遗传育种研究的进展,作为基础理论的染色体探讨越来越显示出它的重要性和迫切性。十足类甲壳动物染色体的研究至今有一百多年的历史,然而却仍未获得较大的发展,其主要原因是由于其细胞有丝分裂中期染色体形状太小,不超过 $4\mu\text{m}$, 且数目庞大,这给染色体标本制做和核型分析带来了极大的困难。尽管 Milligan (1976) 采用新的方法能获得染色体分散好的细胞分裂中期分裂相,但仍然仅限于染色体数目统计水平 (Chow et al., 1990), 迄今尚不见有关十足类甲壳动物核型分析方面的详细报道。本文系日本沼虾染色体及核型分析的研究结果。

1 材料和方法

1.1 材料 日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense* de Haan) 于1992年3月采自上海青浦县,暂养在实验室内通气良好的玻璃水族箱内。水温控制在 20°C , 不定期换水,每天投喂蚯蚓等食物,使虾体保持充分活力。

1.2 方法

1.2.1 预处理与低渗 选取活力强、不同性成熟度的雄虾,注射秋水仙素(相建海, 1988) 或不经秋水仙素预处理,迅速解剖取出精巢,置于含低渗液 (0.075mol/L 的 KCl 溶液) 的 10ml 小烧杯中,于 37°C 水浴中低渗 $20-30\text{min}$ 。

1.2.2 固定 小心移去低渗液,沿烧杯壁缓慢加入新鲜配制的 Carnoy 氏冷固定液(乙醇:冰醋酸 = 3:1), 在低温 (4°C) 下固定 1h 甚至更长时间,中间更换新鲜固定液 $2-3$ 次。

1.2.3 解离与制片 主要依改进的 Salemaa (1985) 的空气干燥法。取出固定材料置于洁净的载玻片上,滴上 45% 的醋酸 $1-2$ 滴,迅速用尖头镊子和解剖针将材料捣碎、解

* 国家教委高校博士点科研基金资助, 9326906 号。

收稿日期: 1993年7月23日, 接受日期: 1994年5月16日。

离,制备细胞悬液,然后将所制片子在酒精灯火焰上来回微烤,同时用嘴轻轻吹气,促使细胞散开。

1.2.4 染色与封片 以 10% Giemsa 染液 (0.1mol/L 磷酸缓冲液, pH = 7.2) 染色 15—30min, 用蒸馏水洗去多余染液, 在空气中自然干燥后, 中性树脂胶封片。

于 Olympus 显微镜下观察、计数和拍照, 照片放大后, 进行染色体测量和核型分析。

2 结果

2.1 染色体计数结果 镜检计数 28 只日本沼虾 131 个染色体分散良好的细胞, 统计结果如表 1。有丝分裂中期, 精原细胞染色体众数为 104, 占总数的 59.3%; 减数分裂双线期, 初级精母细胞二价体数目为 52, 占总数的 75%。由此可以确定日本沼虾染色体数目 $2n = 104, n = 52$ 。

表 1 日本沼虾精巢细胞染色体数和二价体数的出现频率

Tab. 1 Frequency of chromosomal and bivalent number of testis cells in *Macrobrachium nipponense*

体 数	精原细胞染色体数 (2n)								初级精母细胞二价体数 (n)								
	96	97	100	101	102	104	106	总计	47	48	49	50	51	52	53	54	总计
频率(次)	1	1	3	1	3	16	2	27	1	2	1	6	10	78	4	2	104
百分比(%)	3.7	3.7	11.1	3.7	11.1	59.3	7.4	100	1.0	1.9	1.0	5.8	9.6	75	3.8	1.9	100

2.2 减数分裂观察结果 以未经秋水仙素预处理的日本沼虾精巢为材料, 可以获得初级精母细胞减数分裂前期 I 各个主要时相(图版 I:3—7), 而精原细胞有丝分裂相比较少(图版 I:1)。从观察结果发现, 大多数分裂相处于减数分裂双线期(图版 I:2), 说明日本沼虾初级精母细胞的减数分裂具有较高的同步性。从注射过秋水仙素的材料中获得的分裂相大多处于减数分裂中期和终变期。

日本沼虾精子生成中减数分裂过程与其它动物细胞减数分裂过程基本一致。第一次减数分裂前期可分细线期、偶线期、粗线期、双线期和终变期 5 个时期, 双线期二价体存在弥散阶段(图版 I:3—7)。细线期和偶线期在光镜下难以被区分, 呈细长线状的染色体相互缠绕成团, 无法鉴别出同源染色体联会与否, 仅见染色体细线上分布有染色较深的粒状小结(图版 I:3), 即异染色质粒。进入粗线期后, 由于联会后的二价染色体(二价体)明显缩短变粗, 异染色质粒在二价体上的分布比细线期/偶线期更为明显, 而且分布位置通常是固定不变的(图版 I:4)。在早双线期存在一个染色体弥散阶段(diffuse stage), 在此阶段, 二价体趋于解旋, 在外形上变得模糊, 失去其原来的清晰状态, 这时核仁显而易见, 较大, 呈卵圆形, 染色很深, 并与一个二价体末端相连(图版 I:5): 这部分即为核仁组织者。到后双线期, 已趋解旋的二价体又重新超螺旋化, 进一步缩短变粗成短棒状, 二价体上的着丝点也显而易见, 核仁消失。在有些二价体, 同源染色体开始分离时可辨认出其中间的两条同源染色体, 两个着丝点平行排列, 靠得很近(图版 I:6, 图版 II), 而其它的一些二价体中间部分明显外凸膨大, 此处为同源染色体交叉的部位, 通常每条二价体交叉数目为一个。随着交叉的移动端, 二价体呈现出“O”形等形状, 这是进入终变期的主要标志(图版 I:7)。

2.3 核型分析结果 依双线期二价染色体着丝点位置、相对长度以及形态上等特点,

按 Leven 等(1964)的染色体分类标准,将二价体分组排列编号,可分为 A,B,C,D 4 个染色体组(图版 II, 表 2),核型组成为 $N = 37M + 4ST + 11T$ 。

表 2 日本沼虾减数分裂双线期二价体的测量值

Tab. 2 The measurements of bivalent at meiotic diplotene in *Macrobrachium nipponense*

组别	编号	相对长度(%)	臂率	着丝点位置
A	1	40.6±3.27	1.24±0.46	M
	2	36.1±1.85	1.18±0.41	
	3	33.8±1.50	1.29±0.47	
	4	25.4±2.01	1.13±0.13	
	5	24.4±0.83	1.26±0.03	
	6	23.8±0.89	1.13±0.20	
	7	23.6±0.76	1.17±0.43	
	8	23.1±0.95	1.42±0.97	
	9	22.0±0.84	1.22±0.46	
	10	21.5±0.73	1.23±0.80	
	11	20.6±1.22	1.31±0.22	
B	12	29.8±1.31	1.14±0.02	M
	13	28.4±1.05	1.20±0.18	
	14	27.3±1.04	1.11±0.10	
	15	23.7±0.89	1.13±0.14	
	16	23.6±0.81	1.12±0.05	
	17	23.5±0.98	1.12±0.16	
	18	23.1±0.94	1.24±0.53	
	19	22.7±0.87	1.17±0.10	
	20	22.3±2.12	1.23±0.08	
	21	21.4±2.01	1.28±0.41	
	22	20.3±1.72	1.19±0.06	
	23	19.0±1.42	1.09±0.05	
	24	17.7±2.41	1.30±0.06	
	25	16.9±1.11	1.21±0.33	
	26	16.2±0.98	1.24±0.29	
	27	15.8±2.25	1.13±0.11	
	28	15.4±0.88	1.15±0.16	
29	15.0±1.63	1.35±0.07		
30	14.2±1.54	1.17±0.05		
31	13.5±0.51	1.33±0.25		
32	13.2±0.17	1.29±0.09		
33	13.1±0.71	1.10±0.11		
34	12.3±0.86	1.21±0.14		
35	12.0±0.57	1.36±0.16		
36	11.3±0.29	1.22±0.14		
37	10.4±0.62	1.67±0.06		
C	38	17.3±1.98	3.34±0.51	ST
	39	16.4±1.04	4.52±0.54	
	40	13.6±0.96	6.44±0.42	
	41	12.3±0.78	5.57±0.75	

(续表 2)

组 别	编 号	相对长度(%)	臂 率	着丝点位置
D	42	23.9±2.91	∞	T
	43	20.3±2.21		
	44	19.2±0.22		
	45	19.0±0.73		
	46	18.9±0.68		
	47	18.6±0.70		
	48	18.4±0.81		
	49	18.4±0.75		
	50	16.2±0.87		
	51	16.0±1.10		
	52	12.2±2.01		

A组(1—11号): 包括11条二价体,为中部着丝点染色体,长臂中间有一凹痕,把长臂分为二部分,这是本组的主要特征。第1,2号二价体在着丝点处常发生弯曲,它们分别是最大和次大的二价体,后者臂率略小于前者,即着丝点更近中部;其余二价体除相对长度和臂率存在不同外,其它形态特征则相仿。

B组(12—37号): 本组包括的二价体最多,共26条,均为中部着丝点染色体。与A组不同之处在于,其两臂中任何一臂均无凹痕。第22和23号,第26—29号,第33—35号,其二价体常可辨出由二条同源染色体组成。第37号是最小的二价体,第36号次之,虽然二者相对长度相差较小,但彼此尚易于鉴别,因为后者臂率为1.67(接近于亚中部着丝点染色体),明显大于前者(1.22)。其余相邻二价体之间差别很不显著。

C组(38—41号): 共4条二价体,为亚端部着丝点染色体。第39号与第40号二价体形态相近,但第40号二价体臂率在组内最大,达6.44,接近端部着丝点染色体,所以易于鉴别。

D组(42—52号): 共包括11条二价体,均为端部着丝点染色体,二价体着色均匀,无任何凹痕,仅见第45—47号及51号二价体中部膨大,为同源染色体交叉部位。第50,52号二价体呈点状。

3 讨论与结语

3.1 核型分析 十足类甲壳动物有丝分裂中期的染色体大多呈点状,着丝点分辨不出,加之染色体数量庞大,从而难以鉴别对应的同源染色体,核型分析几乎不可能。然而日本沼虾减数分裂中双线期的二价染色体呈棒状,着丝点清晰可见,同时同源染色体在减数分裂过程中已配对形成二价体,核型分析时不再需要鉴别相互对应的同源染色体,因此利用以上这些特点进行核型分析具有很大的优越性和可行性

3.2 双线期中二价体的弥散现象 鱼类、两栖类等脊椎动物在卵子发生过程中,处于双线期的卵母细胞其二价体解旋变得模糊形成灯刷状,即所谓灯刷染色体。许多实验证明,灯刷染色体的侧畔是活跃合成RNA和蛋白质的地方,此阶段称为弥散阶段。近年来在哺乳类和昆虫精母细胞的双线期也报道过类似的现象(Takanari, 1982)。日本沼虾精母细胞在双线期虽未被观察到灯刷状二价体,但二价体部分解旋变成模糊状,而且

具有合成 RNA 和蛋白质功能的核仁染色很深, 并与其中一条二价体相连(图版 1:5)), 这种二价体的弥散现象在十足类甲壳动物精母细胞减数分裂过程中尚属首次发现。在此之前, Trentini 等(1987)在等足类甲壳动物卵子发生中也报道过这一现象。

3.3 精子发生的同步性 日本沼虾精子成熟过程中的同步现象, 与 Chow 等(1990)研究对虾染色体的结果基本相符; 不同的是, 日本沼虾精母细胞减数分裂大多处于双线期, 而对虾精子成熟中的减数分裂主要处在终变期。在等足类, Salemaa (1985) 则发现盖鳃水虱 (*Idotea* spp) 3 对精巢在精子发生中的同步性也不尽一致, 前端一对精巢由精原细胞组成, 中间一对主要是精母细胞, 而后端一对精巢则充满成熟的精子。在本研究中, 也注意到, 以同一个体的精巢为材料制做日本沼虾的染色体标本, 一部分可以获得大量细胞分裂相, 而另一部分仅观察到精原细胞核或精母细胞核。由此可知, 不同动物精子发生过程具有不同的同步率, 而且即使在同一动物个体, 这种同步性也具有一定的区域性。

3.4 性染色体 关于十足类性染色体方面目前仅在铠甲虾科 (Galatheididae) 和方蟹科 (Grapsidae) 报道过 8 种。本研究通过对日本沼虾精母细胞减数分裂前期染色体行为进行详细研究, 未发现有行为异常的性染色体存在; 在雌体是否存在, 因未进行卵巢细胞染色体研究, 对此尚无法定论。

参 考 文 献

- 相建海, 1988, 中国对虾染色体的研究, 海洋与湖沼, 19(3): 205—209。
堵南山等, 1986, 中华绒螯蟹染色体的研究, 动物学研究, 7(3): 293—296。
Chow, S. et al., 1990, Meiotic chromosome complements and nuclear DNA contents of four species of shrimps of the genus *Penaeus*, *J. Crust. Biol.*, 10(1): 29—36。
Leven, A. et al., 1964, Nomenclature for centromeric position on chromosomes, *Hereditas*, 52: 201—220。
Milligan, D.J., 1976, A method for obtaining metaphase [chromosome spreads from marine shrimp with notes on the karyotypes of *Penaeus aztecus*, *P. duorarum* and *P. setiferus*, Proc. VII. World Maricul. Soci. (San Diego, Calif.), pp. 327—332。
Salemaa, H., 1985, Karyological studies in *Idotea* spp. (Isopoda, Valvifera), *Crustaceana*, 48(1): 74—86。
Takanari, H., 1982, Dense bodies in silver-stained spermatocytes of the Chinese hamster: behaviour and cytochemical nature, *Ibid.*, 86: 359—373。
Trentini, M. et al., 1987, The chromosomes of *Idotea balthica basteri* Audouin (Isopoda, Valvifera), *Crustaceana*, 53(1): 78—82。

CHROMOSOMAL AND KARYOLOGICAL STUDIES ON THE FRESHWATER PRAWN *MACROBRACHIUM NIPPONENSE* (CRUSTACEA, DECAPODA)

Qiu Gaofeng, Du Nanshan, Lai Wei

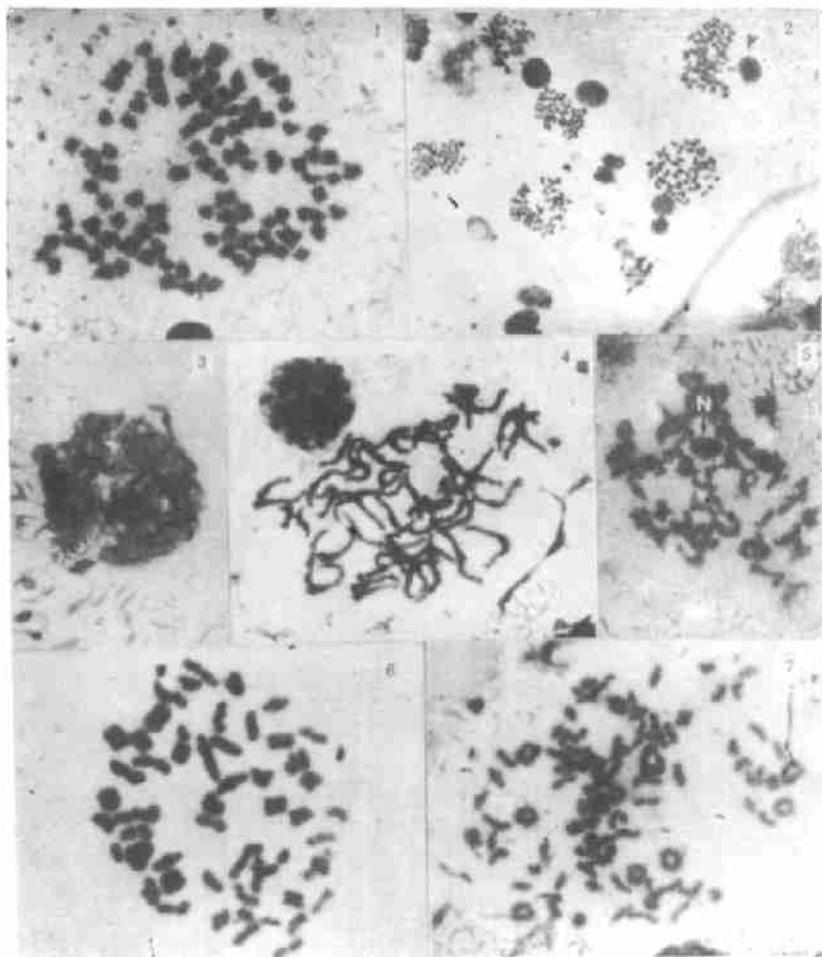
(Department of Biology, East China Normal University, Shanghai 200062)

ABSTRACT

The chromosomes and karyotype of the freshwater prawn *Macrobrachium nipponense* were studied by the modified air-dry method applied to the testis, focussing on the chromosome behaviour at the first meiotic prophase. The specimens used in this experiment were collected from Qingpu County, Shanghai, in March 1993, and reared in aerated well water in the laboratory.

131 dividing cells were observed in 28 prawns. The results indicated that diploid and the haploid chromosome number of the prawn were 104 and 52, respectively. Most of the dividing cells were found to be of meiosis I and few mitotic divisions were observed. The haploid set of chromosomes, which had a chromosome formula of $N = 37M + 4ST + 11T$, was divided into 4 genomes (A,B,C,D) according to the relative size, arm ratio and shape of the bivalents at meiotic diplotene. The first meiosis prophase consisted of leptotene/zygotema, pachytene, diplotene and diakinesis. The diplotene contained a diffuse stage, and was most frequently observed in a large number of spermatocytes due to the high synchrony in their meiotic division. Centromeres could be identified easily on the bivalents at diplotene, so it was convenient to analyse the karyotype.

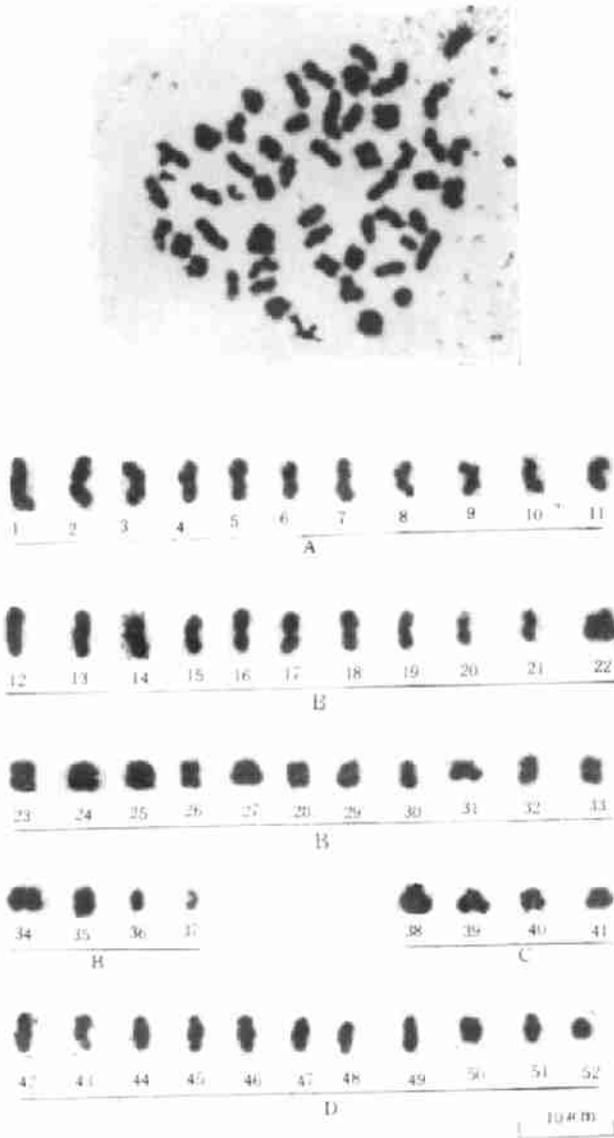
Key words *Macrobrachium nipponense* Chromosome Karyotype Meiotic division Diplotene Bivalent



图版 I 日本沼虾精巢细胞分裂相

Plate I Dividing cells of testis in *Macrobrachium nipponense*

1. 有丝分裂中期相, 1 000 \times 。2—7 减数分裂前期 I: 2. 双线期的同步性, 250 \times ; 3. 细线期/偶线期, 800 \times ; 4. 粗线期, 1000 \times ; 5. 弥散阶段, 示弥散的二价体及核仁(N), 800 \times ; 6. 双线期, 1 000 \times ; 7. 终点期, 1 000 \times 。



图版 II 日本沼虾减数分裂双线期核型图

Plate II Karyotype from meiotic diplotene in *M. nipponense*