

刀额新对虾染色体核型及细胞核 DNA 含量^{*}

张晓军 周岭华 相建海¹⁾

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 以刀额新对虾胚胎、无节幼体、卵巢、精巢等为材料, 空气干燥法制备染色体, 并初步进行核型分析。结果表明, 刀额新对虾的染色体数目为 $2n = 78$, $n = 39$, 核型为 $2n = 78 = 40M + 10SM + 14ST + 14T$ 。以刀额新对虾血淋巴、卵巢、肌肉、鳃为材料, 以鸡血细胞为 DNA 标准($2.50\text{pg}/2c$), 使用 Partec CCAII 型流式细胞仪测定了刀额新对虾细胞的基因组 DNA 含量, 其值为鸡血细胞的 1.75 倍, 绝对含量为 $4.375\text{pg}/2c$ 。

关键词 刀额新对虾, 染色体, 核型, 基因组 DNA 含量

中图分类号 Q343

刀额新对虾 *Metapenaeus ensis* 属甲壳纲 Crustacea, 十足目 Decapoda, 对虾科 Penaeidae, 新对虾属 *Metapenaeus*。在我国产于广东、广西等南部沿海, 俗称中虾、沙虾、基围虾, 是新对虾属中个体较大的种, 资源丰富, 经济价值较高(刘瑞玉等, 1986)。因其具有生长快、病害少等特点, 近年来许多地区对其开展了人工养殖, 显示出良好的经济前景(黄勃等, 1998)。有关刀额新对虾的生理、生态学研究已经做过许多工作, 但尚未见到有关细胞遗传学研究的报道。

染色体研究是细胞遗传学的主要内容。由于海洋生物的特殊性, 其细胞遗传学研究与其他陆地生物相比要落后许多。近几年, 为适应多倍体育种的需要, 虾蟹类染色体研究进展很快, 目前虾类已有 44 种, 蟹类有 21 种报道了染色体数目(相建海, 1999)。新对虾属中研究很少, 刘萍等(1989)报道了周氏新对虾 *M. joyneri* 染色体 $2n = 78$; Lakra 等(1997)报道近缘新对虾 *M. affinis* 的染色体数目为 $2n = 88$ 。

对于某一物种, 细胞内 DNA 的含量是一定的, 即基因组大小是恒定的, 这是物种的代表特征之一。对虾科中有关此方面的报道很少, 仅有 5 个种进行过 DNA 含量研究(Chow *et al.*, 1990; Bachmann *et al.*, 1973; Rheinsmith *et al.*, 1974; Vaughn, 1976), 新对虾属未见报道。本文对刀额新对虾的染色体和 DNA 含量进行了初步研究, 作为研究刀额新对虾细胞遗传学的第一步, 以便对以后的遗传育种、遗传作图及病害防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 染色体制备

刀额新对虾捕自汕头、厦门沿海, 空运至青岛中国科学院海洋研究所培育楼, 1998、1999、2001 年共 4 批 116 尾, 其中雌虾 40 尾, 雄虾 76 尾。部分雌虾暂养后产卵, 培育幼体,

^{*} 国家重点基础研究(973)资助项目, G1999012007 号。张晓军, 男, 出生于 1971 年 3 月, 博士, E-mail: xbyc@ms.qdio.ac.cn

1) 通讯作者

收稿日期: 2001-03-06, 收修改稿日期: 2001-10-29

水温 28℃,取原肠期、肢芽期胚胎及膜内无节幼体、无节幼体,浸入含 0.04% 秋水仙素的海水中浸泡 1—2h,0.075mol/L KCl 低渗 40—60min, Carnoy's 固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)固定 2h,中间换固定液 2—3 次。取成体虾,以 1.5μg/g 虾体重注射秋水仙素,暂养 4—6h 后取卵巢或精巢,低渗、固定如前所述。气干法制片参照相建海(1988)有关报道。制好的玻片以 10% Giemsa 染色(磷酸缓冲液配制, pH=7.0), Zeiss Axioplan 显微镜下观察、拍照、计数。

1.2 核型分析

选择 5 个染色体分散好的分裂相,照相冲洗放大,测量并统计臂比,剪贴,依据 Levan 等(1964)的分类标准进行核型分析。

1.3 DNA 含量测定

取成体虾围心腔和附肢中的血淋巴,以 PBS 缓冲液稀释, -70℃保存,共取 10 尾。另取成虾肌肉、鳃、雌性卵巢各 10 个样品,制成细胞悬液-70℃保存。鸡血细胞标准样品的制备参考宋平根等(1992)方法,取鸡血后肝素抗凝, PBS 清洗 3 次,加入到含 5% 二甲基亚砷, 250mmol/L 葡萄糖, 40mmol/L 柠檬酸钠的缓冲液中混合, -70℃保存。DNA 含量的测定采用德国产的 Partec CCA II 型流式细胞仪(Flow Cytometer),按周岭华等(1999b)方法。测量时,取出-70℃保存的新对虾和鸡血细胞悬液,室温解冻, 2ng/ml DAPI 染色。每测 5 个新对虾样品测一次鸡血细胞。比较新对虾与鸡血 2n 峰的相对位置,计算新对虾的 DNA 含量。

2 结果

2.1 刀额新对虾染色体数目的统计

对 161 个体细胞(包括无节幼体、精巢、卵巢细胞)中期分裂相的染色体数目进行统计,结果见表 1,刀额新对虾染色体 2n=78 占 58.4%。统计精巢减数分裂二价体(图 1d)数目见表 2, n=39 占 56.5%。故可以认定,刀额新对虾染色体数目为 2n=78, n=39。

表 1 刀额新对虾体细胞分裂中期染色体数出现频率

Tab. 1 Frequency of somatic metaphase chromosome number of *M. ensis*

染色体数目	75	76	77	78	79	80
频率(次)	16	19	29	94	2	1
百分比(%)	10	11.8	18.0	58.4	1.2	0.6

表 2 刀额新对虾初级精母细胞双价体数出现频率

Tab. 2 Frequency of bivalent number of primary spermatocyte in *M. ensis*

双价体数目	35	36	37	38	39	40
频率(次)	1	5	1	9	26	4
百分比(%)	2.2	10.9	2.2	19.5	56.5	8.7

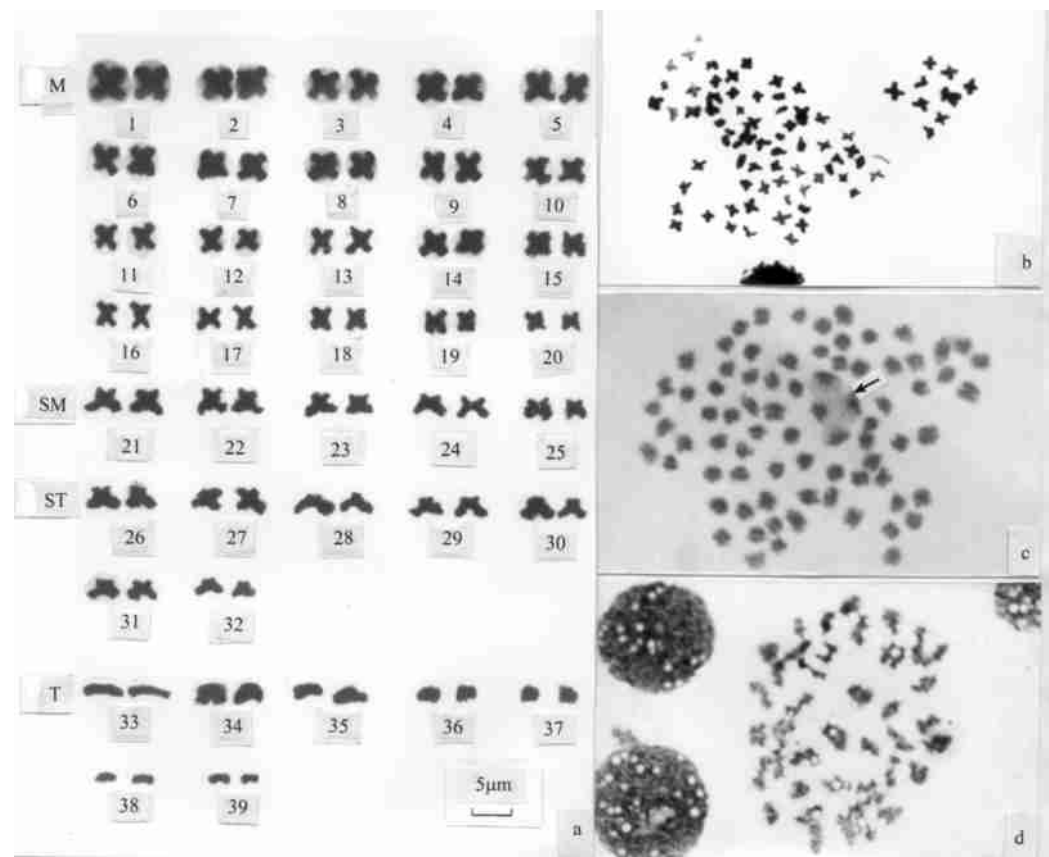


图 1 刀额新对虾核型及不同组织的染色体

Fig. 1 The karyotype and chromosomes in different tissue of *M. ensis*

a. 刀额新对虾的核型(Karyotype of *M. ensis*) ; b. 无节幼体的染色体中期分裂相(The metaphase chromosome in nauplius) ; c. 卵巢中的染色体中期分裂相(箭头示染色斑)(The metaphase chromosome in ovary) (arrow shows the dyed spot) ; d. 精巢中的减数分裂二价体(The meiotic bivalent in testis)

2.2 核型研究

用无节幼体制备的染色体中期分裂相较清晰(图 1b), 着丝点位置易于辨别, 测量结果见表 3。根据统计结果, 将刀额新对虾的染色体分为 4 组, 第 I 组 40 条, 为中部着丝点染色体(M), 第 II 组 10 条, 为亚中部着丝点染色体(SM), 第 III 组 14 条为亚端部着丝点染色体(ST); 第 IV 组 14 条为端部着丝点染色体(T)。故核型公式为 $2n = 78 = 40M + 10SM + 14ST + 14T$ (图 1a)。其中第 IV 组中有 2 对为点状染色体, 观察不到着丝点位置, 姑且认为是端部着丝点染色体。

表 3 刀额新对虾核型数据统计表

Tab. 3 The statistics of karyotype date of *M. ensis*

组别	编号	相对长度(%)	臂比	着丝点位置	组别	编号	相对长度(%)	臂比	着丝点位置
I	1	36.98±1.97	1.14±0.03	M	II	21	31.28±1.54	1.80±0.06	SM
	2	36.86±2.09	1.02±0.02			22	27.78±1.01	1.81±0.11	

					续表				
组别	编号	相对长度(‰)	臂比	着丝点位置	组别	编号	相对长度(‰)	臂比	着丝点位置
	3	36.50±1.22	1.07±0.06			23	27.37±3.20	2.04±0.04	
	4	36.18±3.47	1.08±0.06			24	27.11±3.03	1.91±0.06	
	5	35.97±2.57	1.20±0.19			25	23.56±1.40	1.93±0.05	
	6	35.53±0.49	1.18±0.09		III	26	30.27±0.96	3.00±0.08	ST
	7	33.30±1.15	1.14±0.08			27	29.07±1.60	3.56±0.92	
	8	32.38±1.23	1.09±0.10			28	26.95±1.93	4.07±0.05	
	9	30.67±0.41	1.09±0.07			29	26.84±2.38	3.52±0.18	
	10	30.43±2.05	1.09±0.02			30	24.96±1.01	3.43±0.07	
	11	30.43±1.28	1.18±0.07			31	24.91±1.37	3.03±0.08	
	12	28.64±1.48	1.13±0.08			32	22.53±0.84	3.07±0.05	
	13	28.63±0.71	1.35±0.08		IV	33	16.13±0.87	∞	T
	14	28.62±0.41	1.40±0.04			34	16.02±0.96		
	15	27.97±0.93	1.37±0.06			35	14.21±0.59		
	16	27.80±1.54	1.36±0.09			36	7.99±0.62		
	17	27.56±1.55	1.13±0.08			37	7.70±0.50		
	18	25.34±1.31	1.11±0.05			38	7.04±0.47		
	19	23.41±0.98	1.56±0.13			39	6.41±1.08		
	20	16.89±1.17	1.10±0.10						

2.3 DNA 含量测定

刀额新对虾血细胞与鸡血细胞 2n 峰的相对位置见图 2, 其他不同组织的 DNA 含量测定结果见表 4。

以鸡血细胞 DNA 含量值为 2.50pg/2c(Bachmann *et al* , 1972; Rasch, 1985; Tiersch *et al* , 1989; Vinogradov, 1998) 计算, 刀额新对虾体细胞的 DNA 含量与鸡血细胞的比值为 1.75, 其绝对含量为 4.375pg/2c。

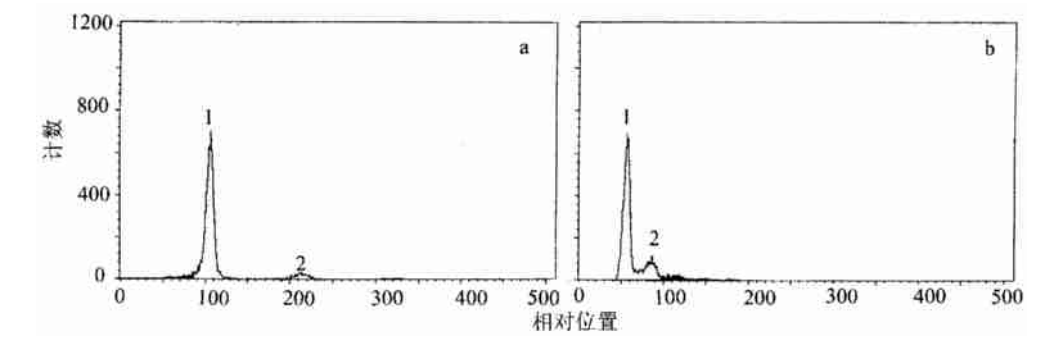


图 2 刀额新对虾血细胞 DNA 直方图(a) 和对照鸡血细胞 DNA 直方图(b)
Fig. 2 DNA histogram of hemocytes of *M. ensis* (a) and erythrocytes of chicken(b)

表 4 刀额新对虾各组织的 DNA 相对值
Tab. 4 Relative DNA contents of several tissue in *M. ensis*

序号	刀额新对虾				鸡血细胞
	血细胞	肌肉细胞	鳃细胞	卵巢细胞	
1	97.65	105.12	100.04	100.21	57.47
2	108.00	99.64	103.07	97.55	59.51
3	101.51	101.54	102.32	98.86	61.14
4	98.89	100.97	99.98	99.41	56.16
5	102.36	104.41	112.39	107.40	57.97
6	118.03	103.12	99.70	101.41	59.57
7	109.97	98.13	105.98	107.11	58.20
8	112.39	97.32	102.15	102.47	60.55
9	102.66	107.05	102.56	105.45	57.21
10	93.91	101.38	98.15	110.24	60.84
平均	104.537	101.868	102.635	103.011	58.862

3 讨论

由于对虾染色体小,所以在染色体计数上产生误差的可能性比其他动物大。实验中观察到一些染色体分裂相少于或多于 78 条,其原因是在制片过程中染色体丢失或与附近细胞的染色体部分混杂,也有可能是因为有丝分裂异常造成。据报道,蛤、牡蛎、珠母贝在有丝分裂时会出现单倍体、多倍体和非整倍体现象(王桂云等,1988),在虾类,这种现象也可能发生,但作者认为制片造成的误差是主要原因。

一般认为,由于卵黄的存在,以对虾卵巢为材料很难得到染色体中期分裂相,而作者在实验中从卵巢中获得了很好的分裂相。看来只要取样时机和处理方法得当,从卵巢可以得到清晰的染色体。由于未发生减数分裂,以卵巢为材料只能观察到二倍体染色体。卵巢与精巢标本的染色体相似,多为点状,可能是为了适应生殖细胞快速分裂的需要,染色体保持高度凝缩状态,而且由于一些特殊组蛋白的存在,使性腺细胞染色体比体细胞染色体凝缩程度更深。另外发现,在卵巢细胞染色体中大都存在一块染色斑(图 1c 箭头所示)将 2—4 个染色体连起来,它似乎是尚未凝集的染色质,作者认为很可能是核仁组织区(NOR)。这块染色斑的产生、组成以及作用,值得进一步探讨。

对虾科染色体数目有很大变异,锐脊单肢虾 *Sicyonia ingentis* $2n = 64$, 须赤虾 *Metapenaeopsis barbata* $2n = 80$, 鹰爪虾 *Trachysalambria curvirostris* $2n = 70$ (周岭华等,1999a), 周氏新对虾 *M. joyner* $2n = 78$, 中国对虾 *Fenneropenaeus chinensis* $2n = 88$ 。Hughes(1982)研究了海螯虾科 Nsphropidae, 认为染色体数目变异是由于超数染色体的结果。超数染色体也称点状染色体或小染色体,它的确切功能还不清楚,一般认为是进化欠发达的象征(余先觉等,1989)。本文作者在刀额新对虾幼体中发现了 4 条染色体为点状,个体较小,但在性腺染色体中却没有明显对应者。

十足类的性染色体一直是研究者所关心的问题,在本次实验中仍未发现有形态异常

的性染色体。但还不能由此认为性染色体不存在,因为虾类染色数目大,个体小且形态相似,要区分性染色体和常染色体并非易事,而且在与虾类同为十足目的蟹类和异尾类中已发现了性染色体(邱高峰,1996),因此刀额新对虾的性染色体的问题还有待于进一步的研究。

据刘萍等(1989)报道,周氏新对虾染色体核型是“X”型双臂染色体 64 条,“V”型单臂染色体 12 条,点状染色体 2 条。这一结果与刀额新对虾的核型有比较相似,可以看出双臂染色体占大多数(都为 64 条),单臂染色体较少,另外都有点状染色体存在。

测定 DNA 含量是研究生物基因组的一个手段,它可以反映出基因组大小、染色体数量和细胞倍性。然而,不同作者研究方法、仪器设备不尽相同,更重要的是对照标准不同,使不同研究结果往往失去横向比较的意义(宋苏祥等,1997)。DNA 含量测定一般以人淋巴细胞、鸡血、鳖血或鲑血细胞为对照,作者采用鸡血为对照,主要因为这种标准常被采用,材料也容易得到。

采用流式细胞仪测量,结果比用细胞分光光度计精确。考虑由于制样方法、仪器及对照标准不同造成的种种误差,这里所得到的还是比较初步的结果。在以后对 DNA 含量测定的研究中,以上几方面应该建立起统一标准,以便得到更精确和更具可比性的结果。

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
- 刘 萍,武振彬,1989. 周氏新对虾染色体观察. 海洋水产研究,10: 45—50
- 刘瑞玉,钟振如,1986. 南海对虾类. 北京: 农业出版社,166—172
- 余先觉,周 瞰,李渝成等著,1989. 中国淡水鱼类染色体. 北京: 科学出版社,4—9
- 宋平根,李素文,1992. 流式细胞术的原理和应用. 北京: 北京师范大学出版社,47—50
- 宋苏祥,刘洪柏,孙大江等,1997. 施氏鲟的核型及 DNA 含量研究. 遗传,3: 5—8
- 邱高峰,1996. 罗氏沼虾核型及长臂虾亚科演化关系的探讨. 水产学报,20(4): 294—300
- 周岭华,张晓军,相建海,1999a. 鹰爪虾染色体数目与核型的研究. 海洋与湖沼,30(3): 250—253
- 周岭华,邓 田,张晓军等,1999b. 利用流式细胞计进行虾类倍性检测的研究. 海洋科学,2: 42—45
- 相建海,1988. 中国对虾染色体的研究. 海洋与湖沼,19(3): 205—209
- 相建海主编,1999. 海洋动物细胞和种群生化遗传学. 济南: 山东科学技术出版社,37—44
- 黄 勃,盛德元,堵南山等,1998. 刀额新对虾人工繁殖技术研究. 海洋科学,6: 48—49
- Bachmann K, Harrington B A, Craig J P, 1972. Genome size in birds. Chromosoma, 37: 405—416
- Bachmann K, Rheimsmith E L, 1973. Nuclear DNA amounts in Pacific crustacea. Chromosoma, 43: 225—236
- Chow S, Dougherty W J, Sandifer P A, 1990. Meiotic chromosome complements and nuclear DNA contents of four species of shrimps of the genus *Penaeus*. J Crustacean Biol, 10(1): 29—36
- Hughes J B, 1982. Variability of chromosome numbers in the lobsters *Homarus americanus* and *Homarus gammarus*. Caryologia, 35(2): 79—289
- Lakra W S, Kumar P, Das M *et al* , 1997. Improved techniques of chromosome preparation from shrimp and prawns. Asian Fish Sci, 10(2): 117—121
- Levan A, Fredga K, Sandberg A, 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas, 52: 201—220
- Rasch E M, 1985. DNA “standards” and the range of accurate DNA estimates by Feulgen absorption microspectrophotometry. In: Cowden R R, Harrison S H ed. Advances in Microscopy. Alan R. Liss, New York, 137—166
- Rheimsmith E L, Hinegardner R, Bachmann K, 1974. Nuclear DNA amounts in Crustacea. Comp Biochem Physiol, 48: 343—349
- Tiersch T R, Chandler R W, Wachtel S S *et al* , 1989. Reference standards for flow cytometry and application in comparative studies of

nuclear DNA content. Cytometry, 10: 706—710

Vaughn J C, 1976. Chromosome structure and DNA association kinetics in the Crustacea. J Cell Biol, 70: 121

Vinogradov A E, 1998. Genome size and GC-percent in vertebrates as determined by flow cytometry: the triangular relationship. Cytometry, 31: 100—109

THE CHROMOSOME KARYOTYPE AND CELLULAR DNA CONTENTS OF *METAPENAEUS ENSIS*

ZHANG Xiao-Jun, ZHOU Ling-Hua, XIANG Jian-Hai

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

Abstract There has been relatively little research undertaken on the chromosome number, structure and composition in the Penaeidae. One reason for this is the relatively small size and large number of chromosomes. This paper reports techniques for obtaining high qualitative somatic and meiotic chromosome from embryo, larvae and adult of sand shrimp *Metapenaeus ensis*.

The somatic chromosomes were obtained from embryos, nauplius larvae and adult tissues including ovaries and testis. The embryos and larvae were treated in 0.04% colchicine for 1—2 hours and then placed in 0.075 mol/L KCl 40—60min and fixed with fresh Carnoy's solution (methanol:acetic acid= 3:1) for 2 hour, fixative was change twice in the course. Air-drying preparation stained with 10% Giemsa solution with a phosphate buffer (pH= 7.0) were microscopically observed. The living adult shrimps were injected with colchicine solution (1.5 μ g per body weight g), the ovaries and testis dissected out after 5—6 hours, dip in 0.075mol/L KCl for 40—60min then fixed, prepared and observed as embryo chromosome above. The testis lobes contained both meiotic and mitotic cell, so diploid and haploid chromosome can be obtained. Diploid chromosome can be observed in ovaries, the majority of the chromosomes in testis and ovaries were the “dot” shapes.

The chromosome number of *M. ensis* is $2n = 78$, $n = 39$. Preliminary results of karyotype is $40M + 10SM + 14ST + 14T$.

Using DNA of chicken erythrocyte (2.50pg/2c) as a standard, diploid nucleus DNA contents of *M. ensis* were measured from the blood, ovaries, muscle, gill by flow cytometer (Partec CCAII). DNA content of the shrimp is 4.375 pg/2c and the ratio to that of chicken is 1.75.

Key words *Metapenaeus ensis*, Chromosome, Karyotype, Genome DNA content