

## 2 种桡足类的染色体组型分析

毛连菊, 张从尧, 赵文

(大连水产学院 养殖系, 辽宁 大连 116023)

**摘要:**采用秋水仙素溶液整体浸泡, KCl 低渗, 卡诺固定液固定, 空气干燥, Giemsa 染色等方法对挪威小毛猛水蚤 (*Microsetella norvegica* Boeck) 和硬鳞暴猛水蚤 (*Clytemnestra scutellata* Dana) 染色体的数目和组型进行了初步观察和分析。结果表明, 挪威小毛猛水蚤染色体数目为  $2n=20$ , 全部为中部着丝点染色体, 总臂数  $NF=40$ ; 硬鳞暴猛水蚤染色体的数目为  $2n=20$ , 其中 6 对为中部着丝点染色体, 4 对为亚中部着丝点染色体, 总臂数  $NF=40$ 。本研究旨在解决分类学中的某些疑难问题提供证据, 并为饵料生物的引种与驯化提供科学依据。

**关键词:** 挪威小毛猛水蚤; 硬鳞暴猛水蚤; 染色体; 组型

**中图分类号:** Q959.223

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8737(2002)02-0129-04

有关浮游动物染色体的研究, 20 世纪 70 年代后进展加快<sup>[1]</sup>。在已报道的近百种浮游动物染色体中, 以桡足类所占比例最大。Niiyama<sup>[2]</sup>对甲壳类的十足目、等足目和端足目中的部分种类进行了染色体分析、比较。据不完全统计, 在桡足类中仅哲水蚤目就有近 60 个种类的染色体被研究<sup>[3]</sup>。在我国, 桡足类浮游动物染色体研究开展不多。因为桡足类浮游动物体外包有几丁质外壳, 样品制备难度较大。曹文清等<sup>[1,3,4]</sup>报道了我国海洋浮游桡足类染色体的研究成果, 对生活于厦门河口水域的优势种类火腿许水蚤 (*Schmackeria poplesia* Shen) 和太平洋纺锤水蚤 (*Acartia pacifica*) 等桡足类、百陶箭虫 (*Sagitta bedoti*) 毛颚类等为数不多的浮游动物进行染色体组型的观察、分析和研究, 这是我国海洋浮游动物染色体研究的首次报道。本文对生活于大连黑石礁沿海的优势种挪威小毛猛水蚤 (*Microsetella norvegica* Boeck)<sup>[5]</sup> 和硬鳞暴猛水蚤 (*Clytemnestra scutellata* Dana)<sup>[6]</sup> 进行染色体组型的观察、分析, 并逐步建立了较为可靠的浮游动物染色体制备方法, 旨在解决分类学上的疑难问题提供更科学的依据, 并为细胞的融合、人工诱导多倍体及饵料生物的引

种、驯化等遗传育种工作和遗传多样性的研究提供基础资料。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

本试验所采用的挪威小毛猛水蚤 (*Microsetella norvegica*) 属于猛水蚤目 (Harpacticoida)、同相猛水蚤科 (Ectinosomidae)、小毛猛水蚤属 (*Microsetella*); 硬鳞暴猛水蚤 (*Clytemnestra scutellata*) 属于猛水蚤目 (Harpacticoida)、暴猛水蚤科 (Clytemnestridae)、暴猛水蚤属 (*Clytemnestra*), 是我国沿海习见的浮游种类。二者皆采自大连黑石礁海域, 退潮后, 在小水洼中用浮游动物网捞取。经实验室分离, 置于盛有过滤海水的培养容器中暂养, 并投喂小球藻 (*Chlorella* spp.)、扁藻 (*Platymonas* spp.) 等。

#### 1.2 方法

以整体处理法经秋水仙素溶液 (海水配制 0.05%~0.10%) 浸泡 60~80 min。低渗时用 0.075 mol/L 的 KCl 溶液静置 40~50 min。新配制的固定液 (甲醇: 冰醋酸 = 3:1), 反复固定 3 次后加上新的固定液, 加塞, 放入 -18℃ 的冰箱中冷冻过夜 (12 h 以上)。用 60% 的冰醋酸溶液解离, 热滴片法滴片 (约 50℃), 室温干燥。Giemsa 染液 1:10 (磷酸缓冲液 pH=6.4) 扣染 50~60 min, 自来水冲洗, 室温干燥。油镜下观察, 确定染色体数目, 选择染色

收稿日期: 2000-09-26。

基金项目: 辽宁省博士启动基金项目 (001052)。

作者简介: 毛连菊 (1947-), 女, 副教授, 从事水产生物遗传育种研究。

体分散较好,形态清晰,长度适中的10个细胞的中期分裂相,显微照像并以目微尺测量其绝对长度,根据 Levan<sup>[7]</sup>制定的方法归纳出染色体组型。

## 2 结果

### 2.1 染色体数目

检查挪威小毛猛水蚤的染色体分散较好的细胞70个,其中染色体数目为20的有36个,占总数的51.4%,少于或多于20的为34个,占总数的

48.6%。这样可以确定挪威小毛猛水蚤的二倍体染色体数目为 $2n=20$ 。检查硬鳞暴猛水蚤染色体分散较好的细胞62个(二倍体42个,多倍体和非整倍体20个),其中二倍体染色体数目为20的有19个,占二倍体总数的45%,少于或多于20的为23个,占总数的55%。多倍体和非整倍体染色体数目为40的有12个,占总数的60%;少于或多于40的为8个,占总数的40%。确定硬鳞暴猛水蚤的二倍体染色体数目为 $2n=20$ (见表1、2)。

表1 挪威小毛猛水蚤染色体计数结果

Table 1 Chromosome numbers of *Microsetella norvegica*

| 染色体数目 Chromosomes nos.    | 14  | 15  | 16 | 17  | 18   | 19  | 20   | 22  | 24  | 合计 Total |
|---------------------------|-----|-----|----|-----|------|-----|------|-----|-----|----------|
| 细胞数 Cell nos.             | 4   | 2   | 7  | 6   | 10   | 3   | 36   | 1   | 1   | 70       |
| 出现几率 Occurrence frequency | 5.7 | 2.9 | 10 | 8.6 | 14.3 | 4.3 | 51.4 | 1.4 | 1.4 | 100      |

注:细胞总数70个。The cell nos. are 70.

表2 硬鳞暴猛水蚤染色体计数结果

Table 2 Chromosome numbers of *Clytemnestra scutellate*

| 二倍体染色体数 Chromosomes nos. of diploid  | <18 | 18  | 19  | 20 | 21  | 22  | >22 | 合计 Total |
|--------------------------------------|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|----------|
| 细胞数 Cell nos.                        | 5   | 4   | 4   | 19 | 2   | 4   | 2   | 42       |
| 出现几率 Occurrence frequency            | 12  | 9.5 | 9.5 | 45 | 4.7 | 9.5 | 4.7 | 100      |
| 多倍体染色体数 Chromosomes nos. of polyplod | <38 | 38  | 39  | 40 | 41  | 42  | >42 |          |
| 细胞数 Cell nos.                        | 1   | 2   | 1   | 12 | 1   | 1   | 3   | 20       |
| 出现几率 Occurrence frequency            | 5   | 10  | 5   | 60 | 5   | 5   | 15  | 100      |

注:细胞总数62个。The cell nos. are 62.

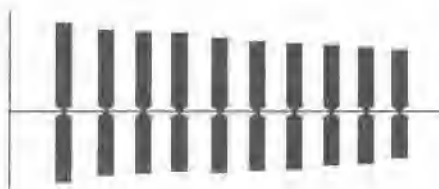


图1 挪威小毛猛水蚤染色体组型模式图

Fig.1 Karyotype pattern of *Microsetella norvegica*

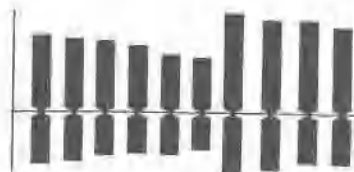


图2 硬鳞暴猛水蚤染色体组型模式图

Fig.2 Karyotype pattern of *Clytemnestra scutellate*

### 2.2 染色体组型

根据 Levan<sup>[7]</sup>的染色体分类标准,确定挪威小毛猛水蚤的染色体组型只有M组,即10对同源染色体全部为中部着丝点染色体(M),其染色体组型构成公式为 $2n=20=20M$ ,总臂数(NF)为40;确定硬鳞暴猛水蚤其染色体组型分为2组:第1组有6对中部着丝点染色体(M),第2组有4对亚中部着丝点染色体(SM)(见图版I、II),其染色体组型公

式为 $2n=20=12M+8SM$ (见图1、2),总臂数(NF)为40。染色体组型分析数据见表3。

## 3 讨论

(1)国外报道的近百种浮游动物染色体中,以桡足类所占比例最大<sup>[3]</sup>,其染色体数目大多为20~24,且大多为中部、亚中部着丝点染色体。本实验测得的挪威小毛猛水蚤其染色体数目 $2n=20=20M$ ,

全部为中部着丝点染色体,硬鳞暴猛水蚤的染色体数目  $2n=20=12M+8SM$ ,基本上与国外学者所研究的结果相似。

表3 2种猛水蚤的染色体组型数据统计表

Table 3 Indices of karyotype analysis of *Microsetella norvegica* and *Clytemnestra scutellata*

| 染色体序号<br>Chromosome No. | 挪威小毛猛水蚤 <i>Microsetella norvegica</i> |                            |                         | 硬鳞暴猛水蚤 <i>Clytemnestra scutellata</i> |                            |                         |
|-------------------------|---------------------------------------|----------------------------|-------------------------|---------------------------------------|----------------------------|-------------------------|
|                         | 相对长度 $X \pm SD$<br>Relative length    | 臂比 $X \pm SD$<br>Arm ratio | 染色体类型<br>Classification | 相对长度 $X \pm SD$<br>Relative length    | 臂比 $X \pm SD$<br>Arm ratio | 染色体类型<br>Classification |
| 1                       | 12.20 $\pm$ 1.42                      | 1.25 $\pm$ 0.14            | M                       | 10.20 $\pm$ 0.59                      | 1.56 $\pm$ 0.34            | M                       |
| 2                       | 11.10 $\pm$ 0.79                      | 1.27 $\pm$ 0.25            | M                       | 9.75 $\pm$ 0.41                       | 1.58 $\pm$ 0.15            | M                       |
| 3                       | 10.77 $\pm$ 0.67                      | 1.33 $\pm$ 0.22            | M                       | 9.04 $\pm$ 0.68                       | 1.69 $\pm$ 0.33            | M                       |
| 4                       | 10.53 $\pm$ 0.54                      | 1.39 $\pm$ 0.25            | M                       | 8.45 $\pm$ 0.79                       | 1.65 $\pm$ 0.41            | M                       |
| 5                       | 10.21 $\pm$ 0.60                      | 1.20 $\pm$ 0.26            | M                       | 7.70 $\pm$ 0.50                       | 1.43 $\pm$ 0.25            | M                       |
| 6                       | 9.81 $\pm$ 0.37                       | 1.26 $\pm$ 0.17            | M                       | 7.13 $\pm$ 0.86                       | 1.61 $\pm$ 0.34            | M                       |
| 7                       | 9.53 $\pm$ 0.65                       | 1.25 $\pm$ 0.24            | M                       | 13.10 $\pm$ 1.14                      | 1.77 $\pm$ 0.58            | SM                      |
| 8                       | 9.09 $\pm$ 0.67                       | 1.31 $\pm$ 0.20            | M                       | 12.10 $\pm$ 0.72                      | 1.76 $\pm$ 0.32            | SM                      |
| 9                       | 8.57 $\pm$ 0.72                       | 1.25 $\pm$ 0.19            | M                       | 11.50 $\pm$ 0.74                      | 2.02 $\pm$ 0.36            | SM                      |
| 10                      | 7.95 $\pm$ 0.74                       | 1.35 $\pm$ 0.23            | M                       | 10.80 $\pm$ 0.55                      | 1.85 $\pm$ 0.30            | SM                      |

(2)秋水仙素(colchicine,  $C_{22}H_{25}NO_6$ )溶液的浓度决定其作用效果。浓度过低难以获得较多的中期分裂相,浓度过高会引起染色体的过度收缩<sup>[8]</sup>。在实验中,加入一定浓度的秋水仙素后,虫体有较剧烈的反应,一段时间后,部分虫体死亡。经过秋水仙素溶液质量分数梯度处理(0.03%、0.05%、0.10%、0.20%)与处理持续时间梯度(40、60、80、100 min)组合实验,以0.05%~0.10%、60~80 min为最佳处理组合,可以观察到较多较好的中期分裂相。生物细胞具有分裂高峰周期,如植物和鱼类<sup>[9]</sup>,浮游动物的分裂高峰时间也有不同,因而固定的起始时间较为关键。本实验中采用不同的起始时间进行预处理、固定,发现傍晚(14~18时)进行预处理效果较好。

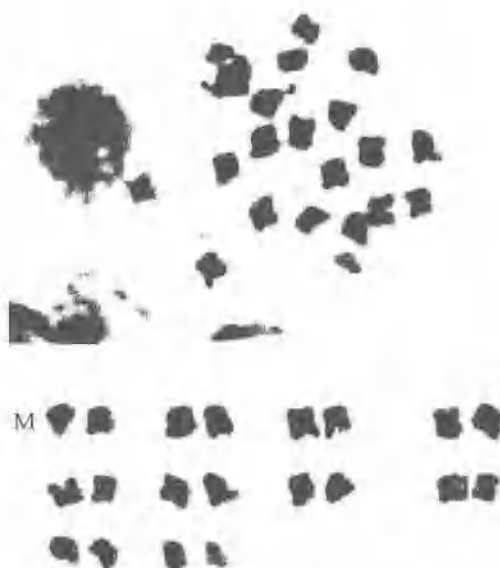
(3)制备染色体有几种方法,在秋水仙素溶液整体浸泡后,①在低渗前将虫体用剪刀剪碎,然后低渗、固定、解离、滴片;②整体低渗、固定处理后的样品解离30 min后滴片;③整体低渗、固定后,在载玻片上加入2~3只处理过的样品,在解剖镜下用镊子、解剖针等将其撕碎,去掉甲壳,滴上几滴固定液,经过酒精灯火焰轻微过火,再染色、镜检。相比之下方法①可能由于多次离心而丢失细胞的原因,镜下细胞较少,几乎看不到分散良好的中期分裂相;方法②是本实验最终采用的方法,细胞数量多,在视野中有较多分散良好的中期分裂相;方法③是参考曹文清<sup>[1]</sup>的方法,虽可看到较多的细胞,但细胞分散范围广,不易集中观察,染色体分散效果不理想。

(4)在实验中发现,硬鳞暴猛水蚤有近1/3细胞的染色体数明显多于一般细胞染色体数,可能是多倍体。但有关浮游动物多倍体报道不多,张闰生等<sup>[10]</sup>曾对卤虫染色体倍性组成进行研究,不但有二倍体、多倍体,而且,还广泛存在着非整倍体。由于大多数报道的桡足类二倍体染色体数为20左右,所以先将染色体数定于 $2n=20$ ,染色体数过多的细胞认为是多倍体或非整倍体。这个现象可能与生殖方式有关,因为两性生殖类型的为二倍体,孤雌生殖类型的有二倍体、三倍体、四倍体和五倍体<sup>[10]</sup>。因此桡足类的倍性组成的原因还有待进一步研究。

(5)实验中观察到的硬鳞暴猛水蚤染色体较大,通过测微尺的测量,其平均绝对长度约为8  $\mu m$ ,进行染色体图拍照时,甚至不能用油镜,只能用高倍镜。与条件、方法相似制备出的挪威小毛猛水蚤染色体平均绝对长度为2.0~2.5  $\mu m$ 。而皱纹盘鲍的染色体平均绝对长度为5~6  $\mu m$ 。造成这样大的差异,有可能是种间差异所致。

#### 参考文献:

- [1] 曹文清,林元尧,林加福.几种海洋浮游动物染色体组型的初步研究[J].台湾海峡,1994,13(3):275-278.
- [2] Niiyama H. A comparative study of the chromosomes in Decapods, Isopods and Amphipods, with some remarks on cytotaxonomy and sex determination in the Crustacean[J]. Mem Fac Fish Hokkaido Univ, 1957, 7: 1-60.
- [3] 曹文清,林元尧,张跃军.火腿许水蚤染色体组型的初步研究[J].厦门大学学报(自然科学版),1994,33(6):853-856



图版 I 挪威小毛猛水蚤的染色体组型

Plate I The karyotype of *Microsetella norvegica*

图版 II 硬鳞暴猛水蚤的染色体组型

Plate II The karyotype of *Clytemnestra scutellata*

- [4] 曹文清, 林元尧, 郭东辉, 等. 蒙古裸腹蚤染色体组型研究[J]. 台湾海峡, 1999, 18(1): 71-75.
- [5] 郑重, 张松隆, 李松, 等. 中国海洋浮游桡足类(上卷)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1965: 191.
- [6] 陈清潮, 章敬珍, 朱长寿, 黄海和东海的浮游桡足类 II. 刺水蚤目和猛水蚤目[J]. 海洋科学集刊, 1974, 9: 70-71.
- [7] Levins A, Fredga K, Sandberg A A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes[J]. Hereditas, 1964, 52(2): 201

-220.

- [8] 孙振兴. 一种观察贝类染色体的制片方法[J]. 动物, 1991, 26(4): 34-35.
- [9] 毛连菊, 邱萍. 鸡冠鲫的染色体组型分析[J]. 大连水产学报, 1996, 11(3): 37-42.
- [10] 张同生, 刘凤岐, 赵晓霞, 等. 卤虫染色体倍性组成的研究[J]. 动物学报, 1990, 36(4): 412-419.

## Analysis of chromosome karyotypes in *Microsetella norvegica* and *Clytemnestra scutellata*

MAO Lian-jū, ZHANG Cong-yao, ZHAO Wen  
(Dalian Fisheries College, Dalian 116023, China)

**Abstract:** The *Microsetella norvegica* and *Clytemnestra scutellata* were collected from Heishijiao, Dalian area. The Daphniae samples were immersed in colchicines solution (0.05% - 0.10%) for 60-80 min in body, treated in hypotonic solution of KCl 0.075 mol/L for 40-50 min, and then fixed by Carnoy's fluid after air-drying, Gimsa staining (1:10 diluted by phosphoric acid buffer solution), tap water washing and drying at room temperature again, the chromosome numbers of *M. norvegica* are observed to be  $2n=20$ , and all the chromosomes are metacentric (M) and the fundamental arm numbers (NF) are 40. The diploid chromosome numbers of *C. scutellata* are  $2n=20$  with 6 pairs of metacentric chromosomes (M) and 4 pairs of submetacentric chromosomes (SM) and the fundamental arm numbers (NF) are 40.

**Key words:** *Microsetella norvegica*; *Clytemnestra scutellata*; chromosome; karyotype