

隆线蚤生殖细胞成熟分裂过程中染色体的组型观察

张明凤^{1,2}, 曾错², 陈寅山¹, 赵云龙²

(1. 福建师范大学 生命科学院, 福建 福州 350108; 2. 华东师范大学 生命科学院, 上海 200062)

摘要: 取隆线蚤 [*Daphnia* (*Ctenodaphnia*) *carinata*] 孤雌蚤的生殖腺细胞进行染色体数量和核型分析, 得到隆线蚤染色体数目为 $n=10$, $2n=20$, 其核型公式为 $2n=20=6M+4SM$ 。隆线蚤染色体的数目与栉蚤亚属 [*Daphnia* (*Ctenodaphnia*)] 中大多数种类一致, 进一步验证了隆线蚤的分类地位。在此基础上, 取隆线蚤孤雌蚤的卵子 (简称夏卵)、两性雌蚤的卵子 (简称冬卵) 及雄蚤的生殖腺, 利用节肢动物染色体压片的方法, 比较观察 3 种生殖状态的蚤体在生殖细胞成熟分裂过程中染色体的组型变化。结果表明: 隆线蚤孤雌蚤的卵子不需交配直接排入孵育囊, 只经历 1 次成熟分裂, 然后胚胎开始卵裂。两性雌蚤的卵子则在与雄蚤交配后排入孵育囊, 卵子经历 2 次正常的成熟分裂, 第一次为减数分裂, 第二次为有丝分裂, 姐妹染色单体分开, 形成单倍体的配子, 配子与精子结合形成受精卵, 然后开始卵裂。隆线蚤雄蚤生殖细胞同样经历了 2 次正常的成熟分裂, 第一次为减数分裂, 第二次为有丝分裂, 形成单倍体的精子。隆线蚤这种既具有低等生物的孤雌生殖方式, 又有高等动物的有性生殖方式, 可能是其在长期进化过程中对环境的适应性表现, 也可能是动物由低等向高等进化的一个中间过程。本研究通过对隆线蚤孤雌蚤、两性雌蚤及雄蚤生殖细胞发生过程中染色体的组型变化观察, 初步阐明了隆线蚤生殖发育的变化规律, 旨在为实现枝角类生殖发育的人为调控奠定基础。[中国水产科学, 2009, 16 (6): 868–877]

关键词: 隆线蚤; 生殖细胞; 染色体; 组型

中图分类号: Q953

文献标识码: A

文章编号: 1005–8737–(2009)06–0868–10

枝角类又称水蚤, 是水生浮游动物的重要种类之一, 隶属于节肢动物门、甲壳纲。枝角类, 具有 2 种生殖方式, 在环境良好的状态下行孤雌生殖 (无性生殖); 一旦环境条件改变, 如温度骤变、食物匮乏、种群密度过大等, 就行两性生殖。枝角类不但生殖方式特殊, 还是一类重要的水生经济动物, 具有较高的蛋白质含量 (占干重的 40%~60%), 含有经济类动物鱼、虾、蟹等生长发育所必需的氨基酸、维生素及钙质, 是水产养殖生产上十分理想的活体饵料。近年来, 随着中国鱼、虾、蟹养殖业的蓬勃兴起及苗种生产的不断发展, 对枝角类的需求量越来越大, 生产上要求对枝角类大规模人工培养, 并能在不同季节保障供给。因此深入研究枝角类生殖发育规律, 实现枝角类生长发

育的人为调控, 在生产上具有广阔的应用前景。

对枝角类的研究始于 18 世纪初, 迄今为止, 国内外学者已在形态学、种群生态学、种质遗传学、环境毒理学等方面对枝角类进行了大量的研究^[1–4]。但对枝角类生殖转化规律和机理研究较少, 尤其是不同生殖状态下生殖细胞染色体的组型分析报道很少, 已有的研究也仅限于枝角类染色体的数目及核型分析^[5–8]。过去使用常规切片法已证实枝角类雌性生殖细胞的成熟分裂均出现在卵排入孵育囊后, 即夏卵和冬卵出现以后^[9–11]。当生物学研究进入细胞、分子水平后, 尤其运用现代染色体制备技术对枝角类生殖细胞进行染色体组型分析成为研究枝角类生殖机制的重要方法。

收稿日期: 2009–04–09; 修订日期: 2009–06–18.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30670227); 福建省 2007 年青年科技人才创新项目 (2007F3024); 福建省自然科学基金项目 (2009J01123)。

作者简介: 张明凤 (1976–), 女, 副教授, 主要从事动物发育生物学研究. E-mail: biozmf@fjnu.edu.cn

通讯作者: 赵云龙, 教授. Tel: 021-62232153; E-mail: ylzhaol@bio.ecnu.edu.cn

本研究以淡水水域常见种—隆线蚤 [*Daphnia* (*Ctenodaphnia*) *carinata*] 为研究对象, 利用常规染色体制片及节肢动物染色体压片法^[12-14], 在分析隆线蚤孤雌蚤生殖腺染色体数量和核型的基础上, 比较研究隆线蚤不同生殖状态蚤体(孤雌蚤、两性雌蚤和雄蚤)生殖细胞发生过程中染色体的组型变化, 旨在阐明枝角类生殖发育的规律和机理, 为实现其生殖发育的人为调控奠定基础。

1 材料与方法

1.1 隆线蚤的培养

隆线蚤蚤种购于上海市大渡河路花鸟市场。鉴定后室温培养[(24±1)℃], 饲以枝角类培养液(土壤 10.0 g、兔子粪便 1.5 g 和青菜 2.0 g 混合, 加入 1 L 水煮沸过滤^[15])。根据水质状况定期更换培养液。

1.2 染色体的制备、观察及数量与核型分析

取单只生长状况良好未排卵的孤雌蚤, 洗净后, 在解剖镜下快速剖取生殖腺。先放入 0.05% 秋水仙素溶液中处理 1.5 h, 接着用 0.75% KCl 低渗处理 25 min, 再用 Carnoy's 液(乙醇与乙酸体积比 3:1)固定 3 次, 每次 15 min, 最后用 60% 冰醋酸处理 3 min。每次更换处理液时可 1 000~1 500 r/min 离心 5 min, 以防止细胞流失。在加入冰醋酸后, 用烧钝的吸头将组织捣碎, 制成细胞悬液, 然后取出放入冰箱中冷冻的玻片, 进行高空冷滴片。空气干燥后, 用 10% Giemsa 溶液(磷酸缓冲液配制, pH 6.8)扣染 30~45 min, 将玻片冲洗、晾干后, 树脂封片, 镜检、拍照。用同样的方法, 另取 3~5 只孤雌蚤进行重复实验。

选取处于细胞分裂中期且分散较好的染色体, 进行计数; 同时测定染色体长度, 区分着丝点位置, 并计算臂比值和着丝点指数, 计算方法是: 臂比值(臂率)=长臂长度/短臂长度, 着丝点指数=(短臂长度/染色体全长)×100, 并参考文献[12]的标准判定染色体的类型。同时取几个分散比较好的中期分裂相, 拍照放大, 然后剪贴配对。

1.3 雌蚤卵子(夏卵)染色体的制备和观察

取多只生长状况良好、卵巢膨大、即将排卵的孤雌蚤, 在解剖镜下连续观察卵巢排卵状态。自卵全部

排入孵育囊后开始计时, 每隔 5 min 将一只排卵的雌蚤放入 Carnoy's 液中固定, 连续取材直到 120 min。固定时间不超过 48 h。染色体制片时, 将固定好的隆线蚤放在载玻片上, 用滤纸吸去固定液, 滴上一滴改良的苯酚品红染液, 用解剖针将胚胎从孵育囊中剖出, 染色 5~10 min 后进行压片, 制片和压片方法参照文献[12-14]。将制好的染色体装片于显微镜下观察, 依次观察孤雌蚤卵母细胞成熟分裂过程中各个时期染色体的分裂相, 并用显微摄像仪(LEICA DC 300)进行拍照。用同样的方法, 实验重复进行 3~5 次。

另将孵育囊有白色增厚、卵巢膨大、未排卵的两性雌蚤分离培养, 同时放入数只已性成熟的雄蚤。在解剖镜下连续观察, 当雌蚤与雄蚤交配后, 冬卵开始排入孵育囊。自卵全部排入孵育囊后开始计时, 每隔 5 min 将一只排卵的两性雌蚤放入 Carnoy's 液中固定, 连续取材直到 120 min。染色、制片及观察方法同上。用同样的方法, 实验重复进行 3~5 次。

1.4 雄蚤生殖腺染色体的制备和观察

取生长状况良好的成熟孤雌蚤进行高密度培养, 其后代就会出现雄性幼蚤, 将雄性幼蚤挑出后单独培养。观察雄性幼蚤的蜕皮情况, 直至性成熟。取每龄期生长状况良好的雄体, 在解剖镜下快速剖取生殖腺放入 Carnoy's 液中固定, 固定时间不超过 48 h。染色体制片时, 将固定好的隆线蚤放在载玻片上, 用滤纸吸去固定液, 滴上一滴改良的苯酚品红染液, 用解剖针将生殖腺剖开, 染色 5~10 min 后进行压片, 制片和压片方法参照文献[12-14]。染色体装片观察、拍照方法同上。用同样的方法, 实验重复进行 3~5 次。

2 结果与分析

2.1 隆线蚤孤雌蚤生殖腺染色计数

在镜检计数的 220 个隆线蚤孤雌蚤生殖腺细胞中, 144 个为二倍体, 2n=20 的有 83 个, 占二倍体总数的 57.6%; 53 个为四倍体, 4n=40 的有 38 个, 占四倍体总数的 71.7%; 23 个为多倍体, 8n=80 的有 12 个, 占多倍体总数的 52.2%, 这说明隆线蚤染色体的数目为 n=10, 2n=20(表 1)。

表 1 隆线蚤染色体计数结果
Tab. 1 Chromosome numbers of *Daphnia carinata*

项目 Item	二倍体 Diploid					四倍体 Tetraploid				多倍体 Polyploid		
染色体条数 Chromosome number	16	18	20	22	24	34	36	40	44	72	80	88
出现次数 Frequency	8	9	83	13	31	3	6	38	6	5	12	6
百分率 /% Percentage	5.6	6.2	57.6	9.0	21.5	0.6	11.3	71.7	11.3	21.7	52.2	26.1

2.2 隆线蚤孤雌蚤染色体的核型分析

按 Leven 的染色体分类标准^[12],测定、分析了 10 个中期分裂相良好,且染色体分散程度好的细胞,确定全部染色体可配成 10 对同源染色体。其中 6 对为中部着丝点(M)染色体; 4 对为亚中部着丝点(SM),详见表 2; 核型公式为 $2n=20=6M+4SM$ (图 1、图 2,图 2 中的标号对应于表 2 中染色体的编号)。

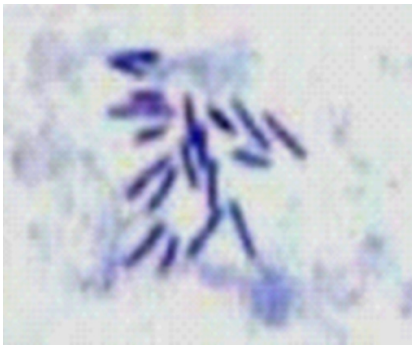


图 1 隆线蚤中期染色体 (×2 000)
Fig. 1 Chromosome of metaphase of *Daphnia carinata* (×2 000)

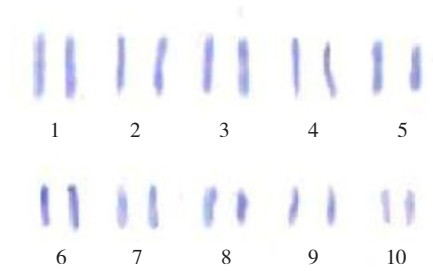


图 2 隆线蚤染色体组型模式 (×1 500)
Fig. 2 Karyotype pattern of *Daphnia carinata* (×1 500)

表 2 隆线蚤细胞中期染色体测量结果
Tab. 2 Measurement results of metaphase chromosome of *Daphnia carinata*

染色体编号 Chromosome number	相对长度 /nm Relative length	臂比值 Arm ratio	着丝点指数 Centromere index	类型 Type
1	14.48±0.21	1.20±0.04	45.45±1.45	M
2	14.32±0.32	1.01±0.06	49.76±2.75	M
3	14.22±0.26	1.64±0.05	38.00±1.92	M
4	13.92±0.45	1.10±0.18	47.84±0.86	M
5	11.94±0.31	1.71±0.34	31.12±3.21	SM
6	10.84±0.51	1.59±0.03	40.27±2.38	M
7	10.63±0.46	1.16±0.03	47.27±2.38	M
8	9.63±0.78	2.28±0.27	31.27±0.97	SM
9	9.52±0.21	2.95±0.09	25.10±1.82	SM
10	8.98±0.47	2.22±0.45	31.24±1.43	SM

注: 其中 M 为中部着丝点染色体; SM 为亚中部着丝点染色体。
Note: “M” for centromere of central section; “SM” for centromere of subcentral section.

2.3 孤雌蚤卵子(夏卵)成熟分裂过程中染色体的组型观察

经多组连续制片观察到孤雌蚤卵子(夏卵)成熟分裂过程中染色体的组型变化。即将排入孵育囊和刚排入孵育囊(0 min)的夏卵,其染色体均处于成熟分裂中期,卵内的纺锤体已形成,纺锤丝清晰可见,染色体呈浓缩状,整齐地排列在赤道板中央(图版I-1、2、3)。卵子排入孵育囊后5 min,染色体开始向两极移动,进入第一次分裂的后期(图版I-4)。卵子排入孵育囊后10 min,染色体已经移到纺锤体的两极,纺锤丝清晰可见,细胞两极的染色体均为20条左右,进入第一次分裂的末期(图版I-5)。卵子排入孵育囊后约20 min,染色体完成第一次分裂(图版I-6)。此后没有观察到染色体,直至卵子排入孵育囊后50 min,染色体才重新出现,此时的染色体较之前小,在纺锤丝的牵引下向纺锤体两极移动,纺锤丝纵向拉伸得很长(图版I-7)。在排卵后70 min,染色体继续向两极移动(图版I-8)。自夏卵排入孵育囊50 min后,染色体的形态和分裂行为与成熟分裂过程中差异较大,推测此时胚胎开始卵裂。以上结果说明隆线蚤孤雌蚤的夏卵只经历1次成熟分裂。

2.4 两性雌蚤卵子(冬卵)成熟分裂过程中染色体的组型观察

经多组连续制片观察到两性雌蚤卵子(冬卵)成熟分裂过程中染色体的组型变化。观察发现,性成熟的两性雌蚤只有与雄蚤交配后(即雄蚤将精子排入孵育囊内),才将卵子排入孵育囊。刚排入孵育囊的冬卵(0 min),其染色体整齐地排列在赤道板中央,处于第一次成熟分裂的中期,此期的染色体个体大,同源染色体配对状,染色体数目约为10组(图版II-1、2)。冬卵排入孵育囊后5 min左右,染色体向两极移动,即将进入后期(图版II-3)。10~15 min后染色体已基本移至细胞的两极,进入第一次分裂的后期(图版II-4)。至排卵后20 min左右完成第一次成熟分裂,进入第一次分裂的末期,并观察到类似于极体的细胞(图版II-5)。此后就一直观察到染色体。直至卵子排入孵育囊后40 min左右,又观

察到染色体整齐地排列在赤道板中央,染色体约为10条,此时已为第二次成熟分裂的中期(图版II-6)。排卵后55 min左右,可观察到染色体开始往细胞两极移动,进入第二次分裂的后期(图版II-7)。至排卵后第70分钟,染色体已移到了细胞的一端,从顶面观察可看到染色体呈放射状分布,可清晰地数出数目为10条,此时处于第二次成熟分裂的末期(图版II-8)。从两性雌蚤冬卵的连续分裂过程可以看出,冬卵经历2次正常的成熟分裂:第一次为减数分裂,同源染色体分开;第二次为有丝分裂,姐妹染色单体分开,形成单倍体的配子,配子再与孵育囊内的精子结合形成受精卵,行有性生殖。

2.5 隆线蚤雄性生殖细胞发生过程中染色体的组型观察

取各个龄期隆线蚤的雄性生殖腺进行染色体制片,观察隆线蚤雄性生殖细胞成熟分裂过程中染色体的组型变化。隆线蚤雄性生殖细胞经历了一个完整的成熟分裂过程:第一次为减数分裂,第二次为有丝分裂。第一次减数分裂前期,初级精母细胞的染色质经间I期复制后开始浓缩,变短变粗形成染色体,并发生同源染色体配对,形成四分体(图版III-1)。随后联会的同源染色体在纺锤丝的牵引下排列在赤道板中央,进入第一次减数分裂的中期(图版III-2),此期从细胞的顶面观可以清晰地观察到10组同源染色体整齐地排列在赤道板平面上(图版III-3)。接着,同源染色体开始分离(图版III-4),在纺锤丝的牵引下分别向两极移动,进入第一次减数分裂的后期(图版III-5),并在细胞的中央出现新的细胞膜(图版III-6),将原来精母细胞一分二为形成2个子细胞,即次级精母细胞,第一次减数分裂结束。在第二次减数分裂前期,染色质重新浓缩,变短变粗形成染色体(图版III-7),并逐渐排列在赤道板上(图版III-8)。然后姐妹染色单体分开,在纺锤丝的牵引下向细胞两极移动(图版III-9),并逐渐被拉至细胞的两端(图版III-10),接着新的细胞膜形成,将精母细胞分割形成2个精子细胞(图版III-11)。精子细胞逐渐变态、染色体解聚,形成精子分散在精巢管腔

的中央(图版 III-12),至此一个完整的减数分裂阶段结束。雄性生殖细胞经过 2 次成熟分裂过程,染色体数目减半,形成单倍体的精子,最后与单倍体的两性雌卵(冬卵)受精结合形成二倍体的受精卵。

3 讨论

3.1 隆线蚤不同生殖状态蚤体的取样时间

隆线蚤雌蚤生殖细胞的成熟分裂发生在卵子排入孵育囊以后^[9-11],故要从雌蚤即将排卵开始观察,待卵排入孵育囊后连续取材。观察发现,即将排卵的雌蚤卵巢膨大、墨绿色、呈长圆柱形,易与其他蚤体区分开。此外,孤雌蚤排卵前要蜕皮,一般蜕皮后 10 min 左右排卵,易掌握排卵的时间。两性雌蚤则要与雄体交配后才排卵,故在两性雌蚤的培养液内加入成熟的雄蚤,一般两性雌蚤与雄蚤交配之后马上排卵,最长不超过 10 min。

根据笔者对隆线蚤雄性生殖系统的组织结构研究^[10],得知隆线蚤雄蚤的生殖细胞发生与雄蚤蜕皮过程密切相关。刚出生的雄体,其精巢内充满了精原细胞,第一次蜕皮后观察到初级精母细胞,第二次蜕皮后为次级精母细胞,第三次蜕皮后观察到精子细胞,第四次蜕皮后雄体性成熟,精巢内充满了成熟的精子。根据这个研究结果,本实验取雄蚤的精巢进行染色体组型分析,从雄蚤出生开始取材直至性成熟,完整地观察到雄性生殖细胞经历了 2 次正常的成熟分裂,形成单倍体的精子。隆线蚤的精子发生过程与大型蚤(*D. magna*)相一致^[18],但目前还未见其他枝角类雄体生殖细胞发生过程中染色体组型变化的报道,雄体生殖细胞发生是否存在种类差异,有待于对其他更多物种进行研究。

3.2 隆线蚤染色体的制片处理

枝角类是一类小型的水生浮游动物,体内含水量高,且身体组织较为松散、轻柔,故在染色体制片时尤其要注意各种药品的浓度和处理时间。本次染色体核型实验中,要想制成良好的染色体装片,秋水仙素和 KCl 溶液的浓度和处理时间是关键。秋水仙素的浓度和处理时间决定能否将细胞分裂很好地控制在中期,

处理时间过长会使染色体收缩,时间不足则染色体呈丝状散乱分布,难以记数。KCl 溶液低渗处理主要是使细胞吸水膨胀,并将染色体尽量展开,利于观察、计数和核型分析,但时间过长易引起细胞破裂。本实验参考其他研究者的染色体制片技术^[7-8,16],对秋水仙素和 KCl 溶液的浓度和处理时间进行梯度比较,得出秋水仙素用低浓度(0.05%)处理 1.5~2 h,0.75% KCl 溶液低渗 25 min,这样制片的效果较好。另外,许多文献^[7,16-17]报道组织需要固定过夜,但本研究在做了多组对照实验后发现,用 Carnoy's 液 3 次固定后直接加冰醋酸滴片和固定过夜再加冰醋酸滴片,所得染色体装片的效果没有差别,因此固定后可直接滴片,这样大大缩短了实验的周期。另外,制片时最好使用冰冻玻片,从高空悬滴,这样可以使细胞充分打开,染色体分散较好。同时装片空气自然干燥、10% Giemsa 溶液扣染可以大大减少杂质的影响。

关于隆线蚤生殖细胞染色体组型的制片,苯酚品红的染色时间是关键和重要的环节,一般来说,染色时间应控制在 5~10 min 以内,染色时间过长或过短效果都不佳。另外,取雄体的生殖腺进行制片,要用外力才能将细胞打散,但用力过度易将盖玻片压破,故要控制好压片的力度。

3.3 隆线蚤染色体的数量和核型分析

本次实验取生长状况良好且未怀卵的隆线蚤孤雌蚤生殖腺进行染色体核型分析。通过对大量生殖细胞染色体进行统计,得知隆线蚤细胞染色体数目 $2n=20$, $4n=40$ 。本实验观察到隆线蚤细胞染色体的数目差异较大,明显呈二倍、四倍甚至多倍的关系。一般说来,在孤雌生殖状态,孤雌蚤产生的卵子不需要经过受精就能直接发育成为新的个体,因此其生殖腺内的细胞也主要为二倍体。本实验中观察到除了二倍体外,还有存在四倍体,甚至多倍体的情况,这在许多文献^[18, 20, 25]中也有相关报道。部分学者提出枝角类的体细胞能进行“核内有丝分裂”,即姐妹染色单体分开,但细胞不分裂,这样多次有丝分裂后,细胞内染色体的数量会成倍增加,因此在身体某些部位的体细胞会出现多倍体的情况,如上唇等^[19-20]。与此相

似的是,枝角类生殖腺内的细胞也不都只是二倍体,同样可能存在多倍体的情况。此外,本实验很少观察染色体为单倍性的细胞,而曹文清等^[8]取生长状况不良的蒙古裸腹蚤孤雌蚤进行染色体核型分析时出现了单倍体,认为是环境不良造成孤雌蚤的胚胎产生雄性分化。此次实验是取生长状态良好的孤雌蚤生殖腺进行染色体核型分析,因此观察到单倍体细胞的可能性较低。

目前对枝角类染色体数量的研究主要集中在蚤属(*Daphnia*)、网纹蚤属(*Ceriodaphnia*)、低额蚤属(*Simocephalus*)以及裸腹蚤属(*Moina*)的种类^[7-8,21-22]。Trentini 和 Beaton 等认为染色体数目的变化能反映构成该属主要世系间的差异,并确认栉蚤亚属 [*Daphnia* (*Ctenodaphnia*)] 的种类有 20 条染色体,蚤亚属 [*Daphnia* (*Daphnia*)] 的种类有 24 条染色体,网纹蚤属多数种类的染色体在 14~20 条之间,低额蚤属多数种类染色体为 20 条^[21-22]。近年来曹文清等报道多刺裸腹蚤(*Moina macrocopa*)和蒙古裸腹蚤(*Moina mongolica*)的染色体数分别为 22 条和 24 条,分析了染色体的核型^[7-8]。本实验首次报道隆线蚤染色体数目为 20 条,这与栉蚤亚属 *Daphnia* (*Ctenodaphnia*) 中大多数种类一致,进一步验证了隆线蚤在分类上归属于栉蚤亚属。

3.4 孤雌蚤和两性雌蚤生殖细胞发生过程中染色体的组型分析

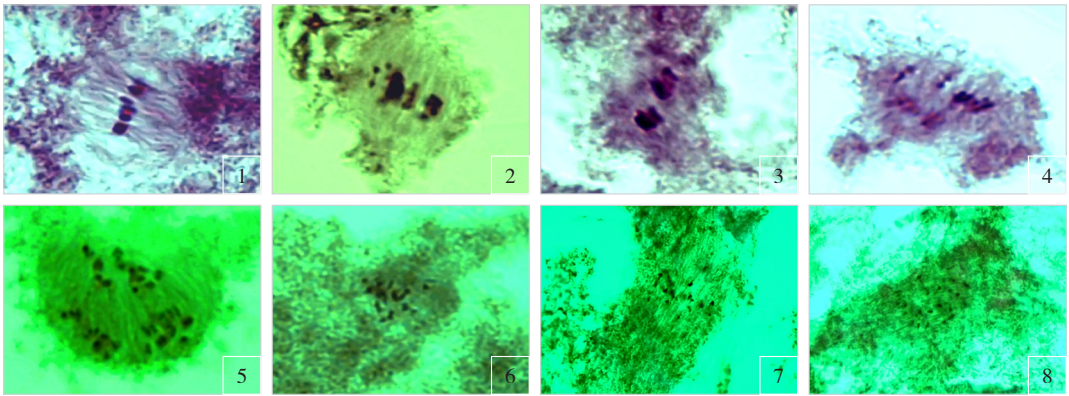
在早期许多学者对夏卵和冬卵的成熟分裂都使用切片的方法,并且已经证明夏卵只经历 1 次均等分裂;而冬卵则经历了 2 次正常的减数分裂,且只有在受精后才能发育^[23-25]。但后来也有研究者发现即使未受精的冬卵也能发育成正常的个体。Banta^[26]观察到一个长岛上的蚤状蚤(*D. pulex*)种群,在没有雄体出现的情况下,能够产生可见的冬卵,他称这些卵为“假性的”,相对于“两性的”卵而言,这些冬卵将来是以孤雌方式发育的。Schrader^[27]对这些冬卵的分裂进行研究后发现,它们并没有经历正常的减数分裂,而是和夏卵一样经历了一次成熟分裂。为了证实前人的研究结果,Zaffagnin 等^[14]取意大利

湖泊出现的 2 个种类:蚤状蚤(*D. pulex*)和 *Daphnia middendorffiana* 进行实验,他借鉴 Stefani's 制备节肢动物卵子染色体的方法^[13],得到了 2 种蚤的夏卵和冬卵的染色体行为变化过程。其中蚤状蚤(*D. pulex*)的夏卵只经历 1 次成熟分裂,释放出一个极体;冬卵则必须经过交配后才能排入孵育囊内,而后经历 2 次减数分裂,释放出 2 个极体,染色体数目减半。而 *Daphnia middendorffiana* 的夏卵和冬卵都经历 1 次成熟分裂,释放出一个极体,最后成熟的卵子均为二倍体,冬卵不需要受精也能正常发育。本次实验对隆线蚤胚胎染色体进行研究发现,孤雌蚤的卵子只经历 1 次成熟分裂,形成的卵子仍是二倍体。隆线蚤两性生殖雌蚤的卵子则必须交配后才能排入孵育囊,否则卵子会被母蚤吸收而不排出;冬卵经历 2 次成熟分裂,第一次为减数分裂,第二次为有丝分裂,因此形成的卵子是单倍体。这与蚤状蚤卵子成熟分裂过程相同。此外,关于雄蚤生殖腺染色体的数量和组型分析,目前报道较少,本实验观察到隆线蚤雄性生殖细胞经历了一个完整的成熟分裂过程:第一次为减数分裂,第二次为有丝分裂,最后染色体数目减半,形成单倍体的精子,与单倍体的两性雌卵(冬卵)受精结合形成二倍体的受精卵。研究表明雄蚤生殖细胞发生的规律还是与多数有性生殖的动物相似。总之,与其他具有 2 种生殖方式的低等无脊椎动物相比,枝角类的生殖方式更为特别,它没有一个明确的、普遍的生殖发育规律,其不同生殖状态下生殖细胞的发生过程都因种类而定。此外,笔者推测隆线蚤这种既具有低等生物的孤雌生殖,又有高等动物的有性生殖方式,可能是其在长期进化过程中对环境的适应性表现,也可能是动物由低等向高等进化的一个中间过程。

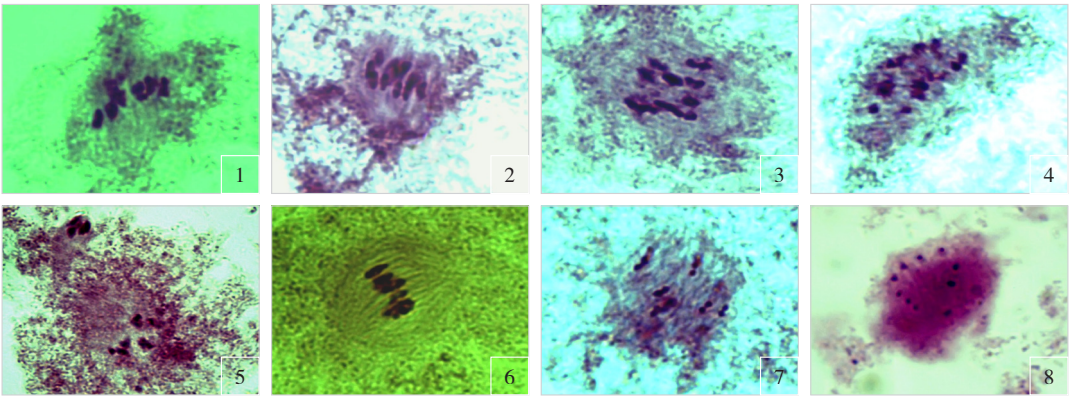
参考文献:

- [1] Hebert P D N. The population biology of *Daphnia* (Crustacea: Daphnidae) [J]. Biological Reviews, 1978, 53: 387-426.
- [2] Martinez-Jeronimo F, Villasenor R, Rios G, et al. Effect of food type and concentration on the survival, longevity and reproduction of

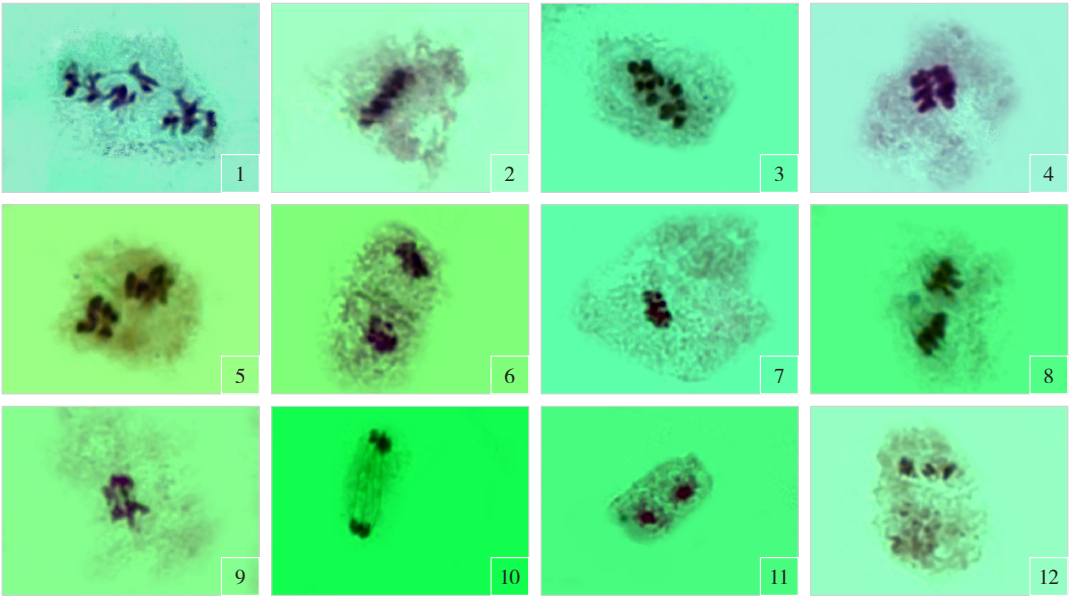
- Daphnia magna* [J]. *Hydrobiologia*, 1994, 287 (2): 207–214.
- [3] Khmeleva N N, Golubev A P, Kidava A. Growth and reproduction of *Daphnia magna* under changing photoperiod and temperature conditions [J]. *Doklady Akademii Nauk Belarusi*, 1995, 39 (3): 71–74.
- [4] Brown D, Croudace C P, Williams N J, et al. The effect of phthalate ester plasticisers tested as surfactant stabilised dispersions on the reproduction of *Daphnia magna* [J]. *Chemosphere*, 1998, 36 (6): 1 367–1 379.
- [5] Trentini M. Karyologic observations on some cladocera of lake trasimeno (Perugia) [J]. *Riv Ldrobiol*, 1979, 18 (3): 369–378.
- [6] Tanaka S, Tominaga H. *Daphnia currirostris* Eglman in Japanese high mountain waters (Cladocera: Daphniidae) [J]. *Hydrobiologia*, 1986, 137 (1): 33–43.
- [7] 曹文清, 王永聪, 林元烧. 多刺裸腹蚤染色体实验研究 [J]. 台湾海峡, 1995, 14 (3): 284–287.
- [8] 曹文清, 林元烧, 郭东晖, 等. 蒙古裸腹蚤染色体组型研究 [J]. 台湾海峡, 1999, 18 (1): 71–75.
- [9] 张明凤, 赵云龙, 杨志彪, 等. 隆线蚤孤雌生殖系统的组织学 [J]. 动物学杂志, 2004, 39 (4): 68–72.
- [10] 张明凤, 赵云龙, 曾错, 等. 隆线蚤雄性生殖系统的组织学研究 [J]. 华东师范大学学报: 自然科学版, 2004, 118 (4): 111–116.
- [11] 曾错, 赵云龙, 张明凤, 等. 多刺裸腹孤雌蚤的卵子发生 [J]. 中国水产科学, 2006, 13 (4): 547–554.
- [12] 李国珍主编. 染色体及其研究方法 [M]. 北京: 科学出版社, 1985: 173–176.
- [13] Stefani R. Un metodo per lo studio delle uova degli Artropodi [J]. *Riv Biol*, 1963, 56: 309–315.
- [14] Zaffagnini F, Sabelli B. Karyologic observations on the maturation of the summer and winter eggs of *Daphnia pulex* and *Daphnia middendorffiana* [J]. *Chromosoma*, 1972, 36 (2): 193–203.
- [15] 堵南山, 赖伟, 邓雪怀, 等. 隆线蚤生长与生殖力 [J]. 华东师范大学学报: 自然科学版, 1983, 1: 58–91.
- [16] 林元烧, 曹文清, 姚津津. 厦门港中华哲水蚤染色体组型 [J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2000, 39 (6): 825–830.
- [17] 宋平根, 李素文. 流式细胞术的原理和应用. 北京: 北京师范大学出版社, 1992: 47–50.
- [18] Zaffagnini F. Some cytological and cytochemical observations on the maturation of the testes in *Daphnia magna* [J]. *Caryologia*, 1965, 18 (1): 1–13.
- [19] Beaton M J, Hebert P D N. Geographical parthenogenesis and polyploidy in *Daphnia pulex* Leydig [J]. *Amer Nat*, 1988, 132: 837–845.
- [20] Beaton M J, Hebert P D N. Miniature genomes and endopolyploidy in cladoceran crustaceans [J]. *Genome*, 1989, 32: 1 048–1 053.
- [21] Beaton J J, Hebert P D N. Variation in chromosome numbers in *Daphnia* [J]. *Hereditas*, 1994, 120: 275–279.
- [22] Trentini M. Chromosome numbers of nine species of Daphniidae (Crustacea, Cladocera) [J]. *Genetica*, 1980, 54: 221–223.
- [23] Allen E, Banta A M. Growth and maturation in the parthenogenetic and sexual eggs of *Monia macrocopa* [J]. *J Morph*, 1929, 48: 123–151.
- [24] Dehn M von. Experimentelle Untersuchungen uber den Generationswechsel der Cladoceren [J]. *Chromosoma (Berl)*, 1948, 3: 167–193.
- [25] Ojima Y. A cytological study on the development and maturation of the parthenogenetic and sexual eggs of *Daphnia pulex* (Crustacea, Cladocera) [J]. *Kwansei Gakuin Univ Annual Studies*, 1958, 6: 123–176.
- [26] Banta A M. A thelytokous race of Cladocera in which pseudosexual reproduction occurs [J]. *Z Induct Abstamm-u Vererb-L*, 1925, 40: 28–41.
- [27] Schrader F. The cytology of pseudosexual eggs in a species of *Daphnia* [J]. *Z Indukt Abstamm-u Vererb-L*, 1925, 40: 1–36.



图版 I Plate I



图版 II Plate II



图版 III Plate III

张明凤等：隆线蚤生殖细胞成熟分裂过程中染色体的组型观察

ZHANG Ming-feng et al: Karyologic observation on maturation of germ cells of *Daphnia* (*Ctenodaphnia*) *carinata*

图版 I 说明 孤雌蚤夏卵成熟分裂过程中染色体的组型观察

1. 排卵之前卵巢中的染色体,处于第一次分裂的中期($\times 2\ 500$); 2-3. 卵子刚排入孵育囊内的染色体(0 min),处于第一次分裂的中期($\times 2\ 500$); 4. 排卵后 5 min 的染色体,进入第一次分裂的后期($\times 2\ 500$); 5. 排卵后 10 min 的染色体,进入第一次分裂的末期($\times 2\ 500$); 6. 排卵后 15 min,第一次分裂结束后所释放的极体($\times 2\ 500$); 7. 排卵后 50 min 的染色体,为胚胎发育过程中的染色体($\times 2\ 500$); 8. 排卵后 70 min 的染色体,为胚胎发育过程中的染色体($\times 2\ 500$).

Plate I Karyologic observations on the maturation of the summer eggs of *Daphnia carinata*

1: A short time before the female moults, the chromosomes in the oocytes within the ovary are found at metaphase I ($\times 2\ 500$); 2-3: The chromosomes remain in the stage of metaphase just after the eggs are laid into the brood chamber (0 min) ($\times 2\ 500$); 4: The anaphase I process occurs at 5 min after egg deposition ($\times 2\ 500$); 5: The telophase I process occurs at 10 min after egg deposition ($\times 2\ 500$); 6: At the end of telophase I (15 min after egg deposition), the emission of the polar body takes place ($\times 2\ 500$); 7: The embryonic chromosomes can be observed at 50 min after egg deposition ($\times 2\ 500$); 8: The embryonic chromosomes can be observed at 70 min after egg deposition ($\times 2\ 500$).

图版 II 说明 两性雌蚤冬卵成熟分裂过程中染色体的组型观察

1-2. 卵子刚排入孵育囊内的染色体(0 min),处于第一次分裂的中期($\times 2\ 500$); 3. 排卵后 5 min 的染色体,染色体开始向两极移动,即将进入后期($\times 2\ 500$); 4. 排卵后 10 min 的染色体,进入第一次分裂的后期($\times 2\ 500$); 5. 排卵后 20 min 的染色体,进入第一次分裂的末期,释放出第一极体($\times 2\ 500$); 6. 排卵后 40 min 的染色体,进入第二次分裂的中期($\times 2\ 500$); 7. 排卵后 55 min 的染色体,进入第二次分裂的后期($\times 2\ 500$); 8. 排卵后 70 min 的染色体,进入第二次分裂的末期($\times 2\ 500$).

Plate II Karyologic observations on the maturation of the winter eggs of *Daphnia carinata*

1-2: The eggs are found in metaphase I (I: the first maturation division) both at the time of fertilization and of deposition ($\times 2\ 500$); 3: Anaphase I starts at 5 min after egg laying, and after 5 min the separation into dyads with clearly visible chromatids takes place ($\times 2\ 500$); 4: Anaphase I occurs at 10 min after egg deposition ($\times 2\ 500$); 5: Telophase I and emission of the first polar body occur 20 min after egg deposition ($\times 2\ 500$); 6: Forty min after laying the eggs are in metaphase II (II: the second maturation division), in which 10 chromosomes are present ($\times 2\ 500$); 7: Anaphase II occurs at 55 min after laying ($\times 2\ 500$); 8: Telophase II occurs at 70 min after laying ($\times 2\ 500$).

图版 III 说明 雄蚤生殖细胞发生过程中染色体的组型观察

1. 处于第一次分裂前期的染色体($\times 2\ 500$); 2. 处于第一次分裂中期的染色体,侧面观($\times 2\ 500$); 3. 处于第一次分裂中期的染色体,顶面观($\times 2\ 500$); 4. 进入第一次分裂后期的染色体($\times 2\ 500$); 5. 处于第一次分裂后期的染色体(anaphase I, $\times 2\ 500$); 6. 处于第一次分裂末期的染色体,示新的细胞膜已经形成($\times 2\ 500$); 7. 处于第二次分裂前期的染色体($\times 2\ 500$); 8. 处于第二次分裂中期的染色体($\times 2\ 500$); 9. 处于第二次分裂后期的染色体($\times 2\ 500$); 10. 处于第二次分裂末期的染色体($\times 2\ 500$); 11. 处于第二次分裂末期的染色体,示新的细胞膜已经形成($\times 2\ 500$); 12. 成熟精子的染色体($\times 2\ 000$).

Plate III Karyologic observations on the maturation of male gonad of *Daphnia carinata*

1: Prophase I ($\times 2\ 500$); 2: Lateral view of metaphase I ($\times 2\ 500$); 3: Top view of metaphase I ($\times 2\ 500$); 4: Anaphase I ($\times 2\ 500$); 5: Anaphase I ($\times 2\ 500$); 6: Telophase I ($\times 2\ 500$); 7: Prophase II ($\times 2\ 500$); 8: Metaphase II ($\times 2\ 500$); 9: Anaphase I ($\times 2\ 500$); 10: Telophase II ($\times 2\ 500$); 11: Telophase II ($\times 2\ 500$); 12: The chromosomes of spermatozoon ($\times 2\ 000$).

Karyologic observation on maturation of germ cells of *Daphnia* (*Ctenodaphnia*) *carinata*

ZHANG Ming-feng^{1,2}, ZENG Cuo², CHEN Yin-shan¹, ZHAO Yun-long²

(1. School of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China; 2. School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: Cladoceras, a kind of small aquatic zooplankton, have two kinds of reproduction mode. When in good habitat condition, they have asexual reproduction; once the habitat condition worsens, have sexual reproduction. At present, the domestic and overseas scholars do some researches on aspects of population ecology, morphological genetics, environment toxicology about cladoceras, but the reproductive transformation mechanism for cladoceras is still unknown. In this study a fresh water common species-*Daphnia* (*Ctenodaphnia*) *carinata* was used as the research object. Using the processing of 0.05% colchicine, a low permeability of 0.75% KCl, fixation of Carnoy's liquid, treatment of Glacial acetic acid 60% and cold drop from high level, karyotype analysis and chromosome number of *D. carinata* were performed. The karyotype analysis of parthenogenetic and sexual reproduction eggs were compared by treatment with Carnoy's liquid fixation, phenol magenta, and direct compression method. Based on these analysis, we tried to clarify the reproductive development rules and mechanisms of cladoceras, for realizing the artificial regulation of reproductive development. Results showed that the chromosome number of this species was $n=10$, $2n=20$, and that of 6 of these group metacentric, 4 sub-metacentric. The karyotype formula of $2n=20=6M+4SM$ was suggested. The cytological study of the maturation of parthenogenetic and sexual reproduction eggs of *D. carinata* has shown that the parthenogenetic reproduction eggs undergo only one maturation division of equational type. But for a regular course of maturation, the sexual reproduction eggs must be fertilized. The sexual reproduction eggs undergo two maturation divisions. Anaphase I started some minutes after laying and emission of the first polar body occur 20 min after egg deposition into the ephippium. Anaphase II occurs about 40 min after laying. A brief telophase follows, we presumed the second polar body was expelled, but we did not observed it directly. The sexual reproduction eggs were therefore amphigonic and follow the general scheme of meiosis, with reduction from $2n$ to n . The spermatogenic process of the *D. carinata* also endured two cleavage division: meiosis and mitosis, resulting in reduction from $2n$ to n . Karyotype analysis showed *D. carinata* has 20 chromosomes, just like most of species of *Daphnia* (*Ctenodaphnia*), which further verified *D. carinata* belonged to the classification of *Daphnia* (*Ctenodaphnia*). Compared with the karyotype analysis of parthenogenetic and sexual reproduction eggs, parthenogenetic eggs only went through a mature division, which did not need fertilization and new individual could be developed. While in sexual reproduction conditions, the female and male must go through two mature divisions and expelled haploid sperm or eggs, then finally form diploid fertilized eggs. The modes of parthenogenetic and sexual reproduction of *D. carinata* might be the adaptable strategies to the changeable environment in the long-term evolution process, and also might be a transitional type from the lower animals to the higher animals in nature. [Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16 (6): 868–877]

Key words: *Daphnia* (*Ctenodaphnia*) *carinata*; germ cell; chromosome; karyotype

Corresponding author: ZHAO Yun-long. E-mail: ylzhaol@bio.ecnu.edu.cn