第9卷第2期
2002年6月
中国水产科学
Journal of Fishery Sciences of China
Vol.9 No.2
Jun., 2002

# 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 scutellate* 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。本研究旨为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[1]。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[2]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[3]。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[1,3,4]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(*Acaretia 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)[5]和硬鳞暴猛水蚤(*Clytemnestra scutellate* Dana)[6]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,旨为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。

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.

## 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 scutellate*)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

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.com.cn

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[7]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 polyploid | <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.

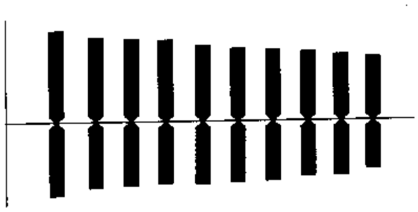


图1 挪威小毛猛水蚤染色体组型模式图

Fig.1 Karyotype pattern of *Microsetella norvegica*

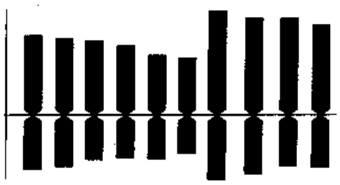


图2 硬鳞暴猛水蚤染色体组型模式图

Fig.2 Karyotype pattern of *Clytemnestra scutellate*

### 2.2 染色体组型

根据Levan[7]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[3]，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，

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.com.cn

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 scutellate***

| 染色体序号 Chromosome No. | 挪威小毛猛水蚤 *Microsetella norvegica* | | | 硬鳞暴猛水蚤 *Clytemnestra scutellate* | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 相对长度 $X \pm SD$ Relative length | 臂比 $X \pm SD$ Arm ratio | 染色体类型 Classification | 相对长度 $X \pm SD$ Relative length | 臂比 $X \pm SD$ Arm ratio | 染色体类型 Classification |
| 1 | 12.20±1.42 | 1.25±0.14 | M | 10.20±0.59 | 1.56±0.34 | M |
| 2 | 11.10±0.79 | 1.27±0.25 | M | 9.75±0.41 | 1.58±0.15 | M |
| 3 | 10.77±0.67 | 1.33±0.22 | M | 9.04±0.68 | 1.69±0.33 | M |
| 4 | 10.53±0.54 | 1.39±0.25 | M | 8.45±0.79 | 1.65±0.41 | M |
| 5 | 10.21±0.60 | 1.20±0.26 | M | 7.70±0.50 | 1.43±0.25 | M |
| 6 | 9.81±0.37 | 1.26±0.17 | M | 7.13±0.86 | 1.61±0.34 | M |
| 7 | 9.53±0.65 | 1.25±0.24 | M | 13.10±1.14 | 1.77±0.58 | SM |
| 8 | 9.09±0.67 | 1.31±0.20 | M | 12.10±0.72 | 1.76±0.32 | SM |
| 9 | 8.57±0.72 | 1.25±0.19 | M | 11.50±0.74 | 2.02±0.36 | SM |
| 10 | 7.95±0.74 | 1.35±0.23 | M | 10.80±0.55 | 1.85±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[8]。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[9],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[1]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[10]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[10]。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 μm,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 μm。而皱纹盘鲍的染色体平均绝对长度为 5~6 μm。造成这样大的差异,有可能是种间差异所致。

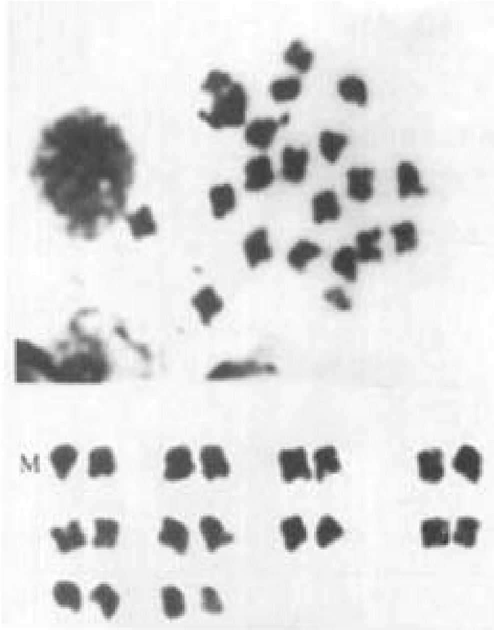
## 参考文献:


[1] 曹文清,林元烧,林加涵.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, Ispods and Amphipods, with some remarks on cytotaxonomy and sexdetermination in the Crustacean[J]. Mem Fac Fish Hokkaido Univ, 1957, 7:1-60.

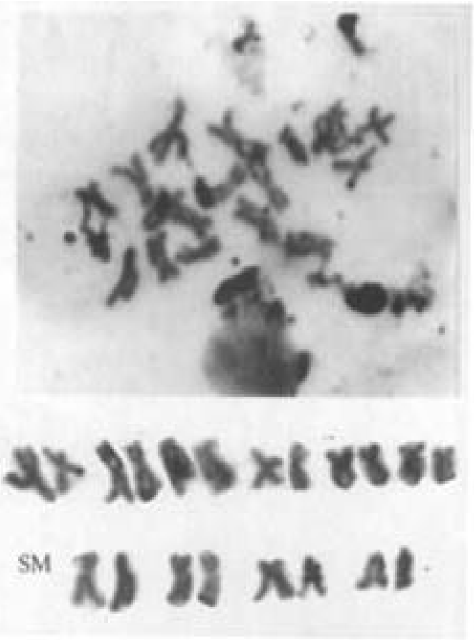
[3] 曹文清,林元烧,张跃军.火腿许水蚤染色体组型的初步研究[J].厦门大学学报(自然科学版),1994,33(6):853-856.


PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.com.cn




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 scutellate***

[4] 曹文清, 林元烧, 郭东辉, 等. 蒙古裸腹溞染色体组型研究[J]. 台湾海峡, 1999, 18(1):71－75.

[5] 郑 重, 张松踪, 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, 章淑珍, 朱长寿. 黄海和东海的浮游桡足类Ⅱ. 剑水蚤目和猛水蚤目[J]. 海洋科学集刊, 1974, 9:70－71.

[7] Levan A, Fredga K, Sandbergm A A. Nomenclature for centrometric 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]. 动物学杂志, 1991, 26(4):34－35.

[9] 毛连菊, 邱 萍. 鸡冠鳚的染色体组型分析[J]. 大连水产学院学报, 1996, 11(3):37－42.

[10] 张国生, 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 scutellate*

MAO Lian-ju, ZHANG Cong-yao, ZHAO Wen

(Dalian Fisheries College, Dalian 116023, China)

**Abstract**: The *Microsetella norvegica* and *Clytemnestra scutellate* were collected from Heishijiao, Dalian sea area. The Daphniae samples were immersed in colchicines solution(0.05%－0.10%) for 60－80 min in whole 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. morvegica* 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. scutellate* 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 scutellate*; chromosome; karyotype

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.com.cn