

青蛤的染色体研究

王立新¹, 相建海², 周令华²

(1 西北农林科技大学 畜牧兽医学院, 陕西 杨陵 712100; 2 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071)

[摘要] 以青蛤(*Cyclina sinensis* Gmelin)的鳃、外套膜、精巢为材料, 用细胞培养法对青蛤进行了染色体研究。结果表明, 青蛤的鳃、外套膜、精巢在培养液为L-15+ 160 g/kg的小牛血清+ 400 mg/L PHA + 双抗, 盐度32.2~33.8 g/kg, pH=7.1~7.3, 温度26℃的培养条件下有较强的分裂能力; 青蛤的二倍体染色体数目为 $2n=36$, 核型为 $6n+1sm+11t$ 。

[关键词] 组织培养; 染色体; 核型

[中图分类号] S961.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2001)01-0094-04

贝类是动物界中的第二大门类, 大多数与人类关系密切, 很多种类具有很高的经济价值, 是目前人工养殖的主要种类。进行贝类染色体研究对贝类遗传育种、繁殖发育机理、贝类分类和系统演化以及环境监测均具有重要意义^[1]。长期以来, 贝类的染色体研究由于很难获得理想的染色体制备材料而进展缓慢, 其主要原因是成体组织分裂相很少, 而幼体和胚胎虽能获得较多的分裂相, 但常受季节和取材的限制^[2]。利用细胞培养进行染色体研究是一种非常普遍和先进的方法。国外在扇贝和珍珠牡蛎的细胞原代培养中获得了部分贴壁生长的单层细胞^[3,4]。本试验以青蛤为材料, 用细胞培养法进行青蛤的染色体核型分析, 以期对贝类的染色体研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本实验所用贝类为青蛤, 购自青岛水产品市场, 采集于青岛沿海, 经鉴定后饲养于实验室水族箱中, 饲养水温25~26℃, 盐度34 g/kg, 为使实验贝保持正常生理状态, 每日喂螺旋藻1~2次, 并换水1次。

1.2 PHA的注射

实验贝在进行组织培养前约20 h, 参照王金星等^[5]的方法, 给活动力较好的20个青蛤按每克体重8~10 μg注射植物血凝素(PHA), 以增加青蛤体内细胞的分裂能力。

1.3 组织处理及接种

将已注射PHA的实验贝在超净工作台中剖开

贝壳, 用高温灭菌的眼科镊、眼科剪剪取少量外套膜、鳃、精巢、闭壳肌等组织, 立即放入700 mL/L的乙醇中浸洗消毒约15 s, 取出后用盐度为22.8 g/kg的过滤消毒海水冲洗3~4次, 放入500 μmol/(L·min)制菌霉素B、500 μmol/(L·min)新霉素、40 μmol/(L·min)硫酸阿米卡星的盐度为22.8 g/kg的灭菌海水中浸泡消毒1~2 h。然后用手术剪剪成约1 mm³的组织碎块, 再用盐度为22.8 g/kg灭菌海水冲洗3~4次, 用吸管移入25 mL培养瓶或35 mm培养皿中, 每瓶(皿)接种约30块组织碎块, 置于无菌室中阴干3~4 h后, 再加入预先配制好的培养液, 放入26℃生化培养箱中培养。

1.4 细胞培养

参照童裳亮^[6]培养中国对虾的方法, 以及Marrec-Croq等^[3]培养扇贝心脏细胞的方法, 并加以修改。用过滤消毒海水配制L-15培养基, 使培养液最终组成为: L-15+ 16 g/kg小牛血清+ 400 mg/L PHA + 双抗, 盐度32.2~33.8 g/kg, pH=7.1~7.3。最后放入26℃生化培养箱中培养48 h, 培养结束前6 h, 各培养皿加秋水仙素20 mg/mL, 以终止细胞分裂。

1.5 染色体制备

经培养的青蛤组织取出后, 先用75 mmol/L的KCl溶液室温下低渗30 min。然后用3:1的甲醇:冰醋酸固定3次, 每次30 min, 40℃过夜。将固定好的组织块用压片法制片, 空气干燥后再用100 mL/L的吉姆萨染色10 min, 凉干后于显微镜下观察, 选

〔收稿日期〕 2000-10-19

〔作者简介〕 王立新(1968-), 男, 陕西南郑县人, 讲师, 主要从事动物遗传育种研究工作。

取分散良好且无丢失的中期分裂相进行显微拍照, 并按 Levan 等^[7]的标准进行核型分析。

2 结 果

2.1 细胞培养结果

本试验对青蛤的鳃、外套膜、精巢以及闭壳肌等组织均进行了培养。从染色体中期分裂相看, 在本试验条件下, 青蛤的鳃和外套膜有较强的分裂能力, 培养后在染色体片中能观察到较多的中期分裂相; 精巢虽也有较强的分裂能力, 但制片效果差, 而闭壳肌的分类能力则很差, 未观察到中期分裂相。

2.2 青蛤的二倍体数目

从鳃和外套膜染色体制片中共选取了 83 个分散良好的中期分裂相, 计数青蛤的染色体数目。结果表明, 青蛤的二倍体数目 $2n=36$ (表 1)。图 1 是青蛤细胞有丝前期分裂相, 其染色体数目也为 36。

表 1 青蛤的二倍体染色体数目统计表

Table 1 Diploid chromosome number of *Cyclina sinensis* Gmelin

二倍体数 Diploid	34	35	36	37	38
细胞数 Cell	11	7	62	2	1
百分率/% Percentage	13.3	8.4	74.7	2.4	1.2

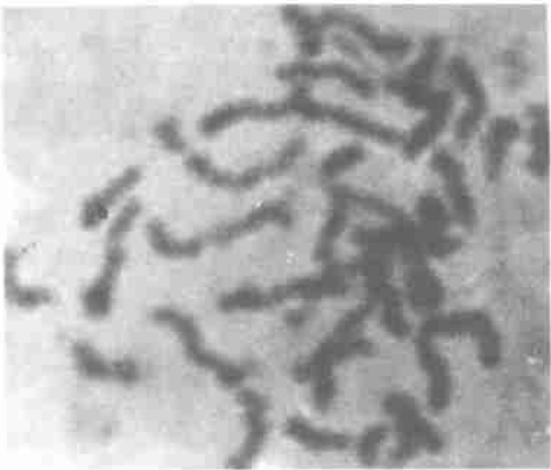


图 1 青蛤的细胞前期分裂相

Fig 1 The prophases of *Cyclina sinensis* Gmelin

2.3 青蛤的核型分析

通过对 8 个分散良好的中期分裂相的测量和统计, 在青蛤的 18 对染色体中, 有 6 对为中着丝粒染色体 (m), 1 对为近中着丝粒染色体 (sm), 11 对为端着丝粒染色体 (t), 未发现异形染色体 (表 2, 图 2)。在所有染色体中, 5 对端着丝粒染色体和 1 对亚端着丝粒染色体相对长度较大, 着丝粒清楚, 容易鉴别, 而 17 号染色体着丝粒不清楚, 较难鉴别。因此, 青蛤的染色体核型为 $6m+1sm+11t$ 。

表 2 青蛤染色体核型分析结果

Table 2 The result of the chromosome karyotype in *Cyclina sinensis* Gmelin

组别 Group	序号 Chromosome pairs	相对长度 Relative length	臂比指数 Arm ratio	染色体形态 Type	组别 Group	序号 Chromosome pairs	相对长度 Relative length	臂比指数 Arm ratio	染色体形态 Type
A	1	9.012 ± 0.24	1.19 ± 0.15	m	C	10	4.980 ± 0.13		t
	2	8.504 ± 0.11	1.13 ± 0.11	m		11	4.934 ± 0.18		t
	3	7.822 ± 0.08	1.33 ± 0.18	m		12	4.656 ± 0.37		t
	4	7.510 ± 0.21	1.48 ± 0.04	m		13	4.622 ± 0.27		t
	5	6.378 ± 0.42	1.11 ± 0.04	m		14	4.229 ± 0.16		t
	6	3.073 ± 0.10	1.43 ± 0.12	m		15	4.090 ± 0.20		t
B	7	6.897 ± 0.23	2.08 ± 0.08	sm		16	4.067 ± 0.41		t
C	8	6.852 ± 0.15		t		17	3.281 ± 0.37		t
	9	6.193 ± 0.21		t		18	2.854 ± 0.05		t

3 讨论与分析

1) 对青蛤的鳃、外套膜、精巢以及闭壳肌等组织的培养, 在培养液为 L-15+160 g/kg 小牛血清+400 mg/L PHA+双抗, 温度为 26℃, pH=7.1~7.3, 盐度为 32~33.8 g/kg 的条件下, 取得了较好的培养效果。这和童裳亮等^[6]培养中国对虾细胞的条件相近, 说明海产贝类在细胞培养上可借鉴海产虾类的细胞培养方法; 另外, 本试验结果表明, 贝类的体细胞在离体条件下仍具有较强的分裂能力,

特别是外套膜和鳃组织。目前贝类细胞培养难以成功的主要原因可能是培养基不符合贝类细胞的代谢需要, 以及一些特殊添加因子如贝血清难以获得。

2) 青蛤是雌雄异体动物, 但本试验对近 20 个青蛤染色体的研究, 均未发现性染色体, 这和已有的关于软体动物的染色体研究的报道相同^[8]。说明贝类控制性别的基因较原始, 尚处于初始进化阶段。

3) 关于贝类染色体的研究在国内外报道的并不多, 中国海产贝类已报道染色体数目及核型的种类

只有近 30 种^[2]。国内姜卫国等^[9]、王桂云^[10]、相建海等^[11]、王琼等^[12]对海产贝类的染色体进行过较多研究。这些研究都是以贝类成体组织、早期胚胎或幼体为材料进行的。本试验运用细胞培养法进行青蛤的

染色体研究,不受季节和材料的限制,且较易获得分散良好的中期分裂相。结果表明,青蛤的二倍体染色体数为 $2n = 36$, 染色体核型为 $6m + 1sm + 11t$ 。

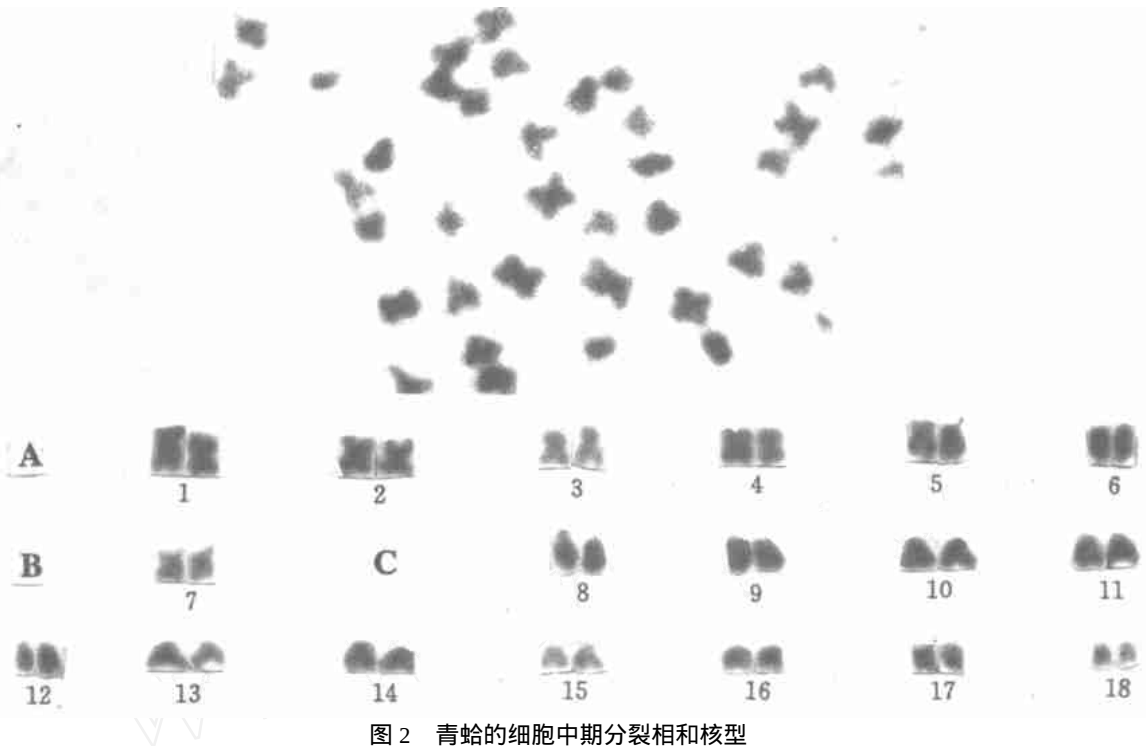


图 2 青蛤的细胞中期分裂相和核型

Fig 2 The metaphase and karyotype of *Cyclina sinensis* Gmelin

[参考文献]

- [1] 王金星, 赵小凡, 周令华, 等. 缢蛏的染色体研究[J]. 海洋与湖沼, 1998, 29(2): 191- 196
- [2] 相建海主编. 海洋动物细胞和种群生化遗传学[M]. 济南: 山东科技出版社, 1999
- [3] Marrec-Croq F L. Primary cultures of heart cells from the scallop *Pecten maximus* (Mollusca-Bivalvia) [J]. In Vitro Cell Developmental Biology Animal, 1999, 35(5): 289- 295
- [4] Awaji M, Suzuki T. Monolayer formation and DNA synthesis of the outer epithelial cells from pearl oyster mantle in coculture with amebocytes [J]. In Vitro Cell Developmental Biology Animal, 1998, 34(6): 486- 491
- [5] 王金星, 赵小凡, 周令华, 等. 缢蛏的染色体研究[J]. 海洋与湖沼, 1998, 29(2): 191- 196
- [6] Tong Shang-liang, Miao Hong-zhi. Attempts to initiate cell cultures from *Penaeus chinensis* tissues [J]. Aquaculture, 1996, (147): 151- 157.
- [7] Levan A, Fredga K, Sandberg A A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes [J]. Hereditas, 1964, (52): 201- 220
- [8] 王永明. 低等脊椎动物的性别[J]. 遗传, 1988, 10(4): 45- 46
- [9] 姜卫国, 魏贻尧. 珍珠贝科珠母贝属 6 种珠母贝染色体组型的研究[A]. 见: 贝类学论文集[C]. 北京: 科学出版社, 1986: 58- 63
- [10] 王桂云. 玉螺科 4 种螺类核型的观察[A]. 见: 贝类学论文集(第 5~ 6 辑)[C]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1995: 5- 6, 77- 80
- [11] 相建海, 陈 依. 海湾扇贝、栉孔扇贝和虾夷扇贝杂交育种可行性研究[A]. 实验海洋生物学开放研究室学术年报[C]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991: 137- 139
- [12] 王 琼, 董袁亮. 贻贝 (*Mytilus edulis*) 核型及染色体带型分析[J]. 动物学报, 1994, 40(3): 309-316

Chromosome study of *Cyclina sinensis* Gmelin

WANG Li-xin¹, XIANG Jian-hai², ZHOU Ling-hua²

(1 College of Animal Science and Veterinary Medicine, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shanxi, 712100, China; 2 Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, Shandong 266071, China)

Abstract The chromosomes of *Cyclina sinensis* Gmelin were studied in this paper. The gill, out-velar and spermary of *Cyclina sinensis* Gmelin were cultured to study the chromosomes of *Cyclina sinensis* Gmelin. The karyotype of *Cyclina sinensis* Gmelin is $2n = 36$, $6m + 1sm + 11t$

Key words cell-culture; chromosome; karyotype