

裸体方格星虫染色体组型分析

王庆恒 杜宇宏 林斯里 杜晓东* 邓岳文

(广东海洋大学水产学院 湛江 524025)

摘要: 将裸体方格星虫(*Sipunculus nudus*)置于0.04%秋水仙素溶液中暂养12 h,取其体腔液,用盐度6.50%的过滤海水低渗45 min,1 500 r/min离心8 min,卡诺氏液固定1 h,热滴片,5% Giemsa染色,显微镜观察、摄影,根据Levan等的分类标准进行染色体组型分析。结果表明,裸体方格星虫的染色体基数为 $x = 17$, $2n = 2x = 34$,染色体组型为 $2n = 2x = 26m + 8sm$, $NF = 68$ 。除第2、3、4、8对染色体为亚中部着丝粒染色体(sm)外,其余均为中部着丝粒染色体(m)。臂比值变化范围是1.211~2.617。未发现性染色体和随体。

关键词: 裸体方格星虫; 染色体; 组型分析

中图分类号: Q953 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2008)05-95-04

Karyotype Analysis of *Sipunculus nudus*

WANG Qing-Heng DU Yu-Hong LIN Si-Li DU Xiao-Dong* DENG Yue-Wen

(Fishery College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Abstract: The samples of *Sipunculus nudus* were treated with 0.04% colchicine solution for 12 h. The celomic liquid was extracted, treated with 6.5% seawater for 45 min, and then centrifuged at 1 500 r/min for 8 min. The sediment was fixed by Carnoy's solution. The suspension was dropped on heated slides. The slides were stained with Giemsa (5%, pH 6.8), rinsed in distilled water and air dried. Well spread metaphase chromosomes were examined and photographs were taken with a photomicroscope. The chromosome types were categorized according to Levan's report. It was found that the basic number of chromosomes of *S. nudus* was $x = 17$, $2n = 2x = 34$ and the karyotype formula was $2n = 2x = 26m + 8sm$, $NF = 68$. All chromosome pairs were metacentric, except that the chromosome pair numbers 2, 3, 4, 8 were submetacentric. Arm ratio was in range of 1.211 - 2.617. No sex chromosomes and satellites were observed in the present study.

Key words: *Sipunculus nudus*; Chromosome; Karyotype

目前对于星虫类动物的基础研究主要集中在系统分类^[1, 2]和繁殖生物学方面^[3-6],而有关染色体组型等细胞遗传学研究较少。迄今为止,仅见日本学者Silverstein^[7]对日本海域的太平洋革囊星虫(*Phascolosoma pacificum*)、斯氏盾管星虫(*Aspidosipho steenstrupii*)、黑色樱心星虫(*Thysanocardia nigra*)、裸体方格星虫(*Sipunculus nudus*)等13种星虫的染色体数目及组型的研究报道。

裸体方格星虫又名光裸星虫,为星虫动物

门习见种,隶属于方格星虫纲(Sipunculidea)方格星虫目(Sipunculiformes)方格星虫科(Sipunculidae)方格星虫属,世界性分布,我国沿海均有分布。已有的研究表明,日本海产裸体

基金项目 广东省自然科学基金资助项目(No. 06029125),广东海洋大学面上项目(No. 0812069);

* 通讯作者, E-mail: duxd@gdou.edu.cn;

第一作者介绍 王庆恒,男,讲师;从事海洋无脊椎动物研究; E-mail: wangqingheng@163.com。

收稿日期: 2007-12-09, 修回日期: 2008-06-26

方格星虫的染色体组型为: $2n = 2x = 30m + 2sm + 2st^{[7]}$ 。由于同一物种地理分布的不同, 长期生殖隔离可能导致染色体组型产生差异。本研究以湛江市遂溪县沿海的裸体方格星虫为材料分析了其染色体数目和组型, 并与日本海产裸体方格星虫及其他星虫的染色体组型进行了比较, 旨在为星虫类动物种间和种内关系探讨提供细胞学依据, 同时为裸体方格星虫细胞遗传学和育种研究提供基础资料。

1 材料与方 法

1.1 实验材料 2006 年 12 月~ 2007 年 1 月, 从湛江市遂溪县海域潮间带收集裸体方格星虫, 体重 12~ 20 g, 活体带回实验室。

1.2 实验方法 将样品在 18~ 20℃ 的 0.04% 秋水仙素溶液中暂养 12 h, 取其体腔液, 用盐度 6.50‰ 海水低渗 45 min, 加入新配制的卡诺氏液预固定, 1 500 r/min 离心 8 min, 弃上清液; 用固定液悬浮沉淀细胞, 固定 15 min, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液(重复 3 次); 加入 50% 乙酸悬浮沉淀物, 40℃ 热滴片, 待滴片干燥后用 5% Giemsa 染色液(pH 6.8) 染色 8 min, 双蒸水冲洗, 自然干燥后中性树脂封片。尼康 YS100 显微镜镜检, 蔡司 Axioskop 40 显微成像系统摄影并打印出照片。

1.3 核型分析 选取染色体分散良好的分裂相 100 个, 统计染色体数目。从中选择 20 个分

散较好的分裂相测定染色体长度, 计算染色体的相对长度和臂比值, 参照 Levan 等标准^[8] 进行染色体分类: 即臂比值为 1.0~ 1.7、1.7~ 3.0、3.0~ 7.0 及大于 7.0 的染色体分别称为中部着丝粒染色体、亚中部着丝粒染色体、亚端部着丝粒染色体及端部着丝粒染色体。

2 结 果

2.1 裸体方格星虫染色体二倍体数目 对 100 个分散良好的中期分裂相进行染色体数目统计, 具 34 条染色体的分裂相为 89 个, 占分裂相总数的 89%, 由此可以确定光裸星虫的染色体基数为 $x = 17, 2n = 2x = 34$ (表 1)。没有发现具有随体的染色体。

表 1 裸体方格星虫染色体二倍体计数

Table 1 Diploid chromosome number of *Sipunculus nudus*

染色体数 (2n) Chromosome number	29	30	32	33	34	35	66
细胞数 Cell number (个)	2	1	3	3	89	1	1
百分比 Percentage (%)	2	1	3	3	89	1	1

2.2 裸体方格星虫染色体组型 裸体方格星虫染色体组总长度为 65.51 μm, 染色体最长 2.53 μm、最短 1.51 μm, 平均长 1.93 μm, 臂比值变化范围 1.21~ 2.62。裸体方格星虫染色体中期分裂相及组型见图 1。裸体方格星虫染色体

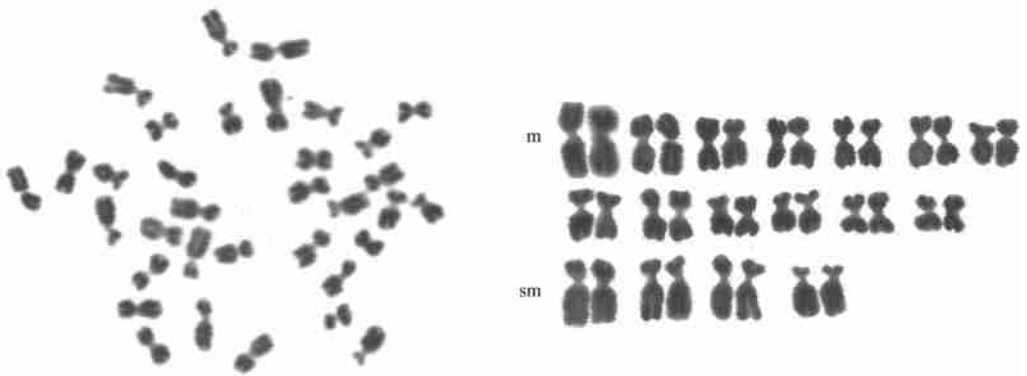


图 1 裸体方格星虫染色体分裂中期相及其组型

Fig. 1 The metaphase chromosomes and karyotype of *Sipunculus nudus*

m: 中部着丝粒染色体; sm: 亚中部着丝粒染色体。M: Metacentric chromosomes; sm: Submetacentric chromosomes.

组型公式为 $2n = 2x = 26m + 8sm$, $NF = 68$ 。按染色体由长到短的顺序分别命名, 除了第 2、3、4、8 对染色体为亚中部着丝粒染色体 (sm) 外, 其余的都为中部着丝粒染色体 (m)。没有发现性染色体 (表 2)。

表 2 裸体方格星虫染色体平均绝对长度、相对长度和臂比的统计结果及染色体分类

Table 2 Average chromosome length, relative length, arm ratio and chromosome classification of *Sipunculus nudus*

染色体对 Chromosome pair No.	染色体长度 Chromosome length (μm)	相对长度 Relative length (%)	臂比 Arm ratio	染色体 分类 Classifir cation
1	2.53 ± 0.46	7.71 ± 0.26	1.31 ± 0.14	m
2	2.38 ± 0.32	7.32 ± 0.34	2.62 ± 0.42	sm
3	2.29 ± 0.37	7.02 ± 0.30	2.29 ± 0.56	sm
4	2.17 ± 0.36	6.64 ± 0.17	2.05 ± 0.30	sm
5	2.11 ± 0.38	6.43 ± 0.12	1.35 ± 0.19	m
6	1.99 ± 0.37	6.07 ± 0.19	1.43 ± 0.25	m
7	1.95 ± 0.33	5.96 ± 0.16	1.33 ± 0.28	m
8	1.89 ± 0.29	5.79 ± 0.10	2.06 ± 0.27	sm
9	1.87 ± 0.31	5.71 ± 0.09	1.34 ± 0.20	m
10	1.84 ± 0.29	5.62 ± 0.14	1.26 ± 0.11	m
11	1.82 ± 0.30	5.56 ± 0.17	1.41 ± 0.19	m
12	1.79 ± 0.29	5.47 ± 0.13	1.42 ± 0.17	m
13	1.75 ± 0.31	5.34 ± 0.06	1.49 ± 0.13	m
14	1.66 ± 0.33	5.05 ± 0.19	1.35 ± 0.21	m
15	1.61 ± 0.31	4.91 ± 0.16	1.29 ± 0.19	m
16	1.58 ± 0.30	4.81 ± 0.13	1.21 ± 0.12	m
17	1.51 ± 0.34	4.58 ± 0.27	1.25 ± 0.25	m

m: 中部着丝粒染色体; sm: 亚中部着丝粒染色体。

m: Metacentric chromosomes; sm: Submetacentric chromosomes.

3 讨论

3.1 染色体制备材料与方法的探讨 在进行海洋无脊椎动物染色体研究时, 制备分裂相材料主要包括鳃组织^[9,10]、成熟精巢^[10,11]、早期胚胎^[12]和幼虫^[13]。裸体方格星虫的身体结构简单, 主要由肌肉质的体壁、细长的 U 型消化道和两条肾管组成, 无鳃组织, 解剖学上很难分辨精巢; 同时, 星虫人工繁殖技术尚不完善, 难以获得实验所需的胚胎或早期幼虫 (担轮幼虫或海球幼虫)。因此, 本研究选取裸体方格星虫的体腔液中具分裂增生能力的血细胞作为染色体

的制备材料。

我们利用秋水仙素比较了两种处理方法的效果: ①取体腔液后直接加秋水仙素溶液处理。通过这种方法得到中期分裂相较少, 其原因可能是在体腔液中进行分裂的细胞比例较小和离心换液过程中部分细胞丢失。②将裸体方格星虫先置于秋水仙素溶液中暂养, 然后再取其体腔液进行制片。这种方法容易得到相对较多的分裂相, 其原因是延长了处理时间, 将多个细胞阻断在细胞分裂中期。此种制片方式的关键是把握秋水仙素溶液处理裸体方格星虫的时间, 如处理时间过长, 部分过早被秋水仙素阻断的中期细胞, 其染色体会不同程度地收缩变短。经过多次实验确定秋水仙素溶液 (18~20℃) 处理时间应为 12 h。

3.2 星虫动物染色体组型比较 本研究结果表明裸体方格星虫染色体数目和染色体组型分别为 $2n = 34$ 和 $2n = 2x = 26m + 8sm$, 其中染色体数目与分布于日本海域的裸体方格星虫染色体数目一致, 但染色体组型与分布于日本海域的裸体方格星虫染色体组型 ($2n = 2x = 30m + 2sm + 2st$) 不一致。这可能是因为地理分布的不同、长期生殖隔离造成了一定的遗传分化。同种的不同地理群体染色体形态或数目的多态性已在多种生物的研究中得到证实。如黄荣莲等^[8]报道了合浦珠母贝 (*Pinctada fucata*) 北部湾种群和大亚湾种群染色体组型的多态性; 王琼^[9]报道了青岛海域贻贝 (*Mytilus edulis*) 的染色体核型与国外学者的研究结果有所差异。

与其他星虫比较, 裸体方格星虫具有较多的特征, 如它是星虫动物门中惟一仅通过内陷方式形成原肠胚的物种; 体腔液中具有自由运动的壶状细胞复合体 (the urn cell complex, UCC); 在腹神经索的端部具有一肿胀的泡状结构; 在体壁的肌肉组织中存在副肌球蛋白; 独特的神经分泌系统及其分泌物等。因此, 分类学家根据上述特征推测其在进化过程中经历了与其他星虫不同的途径, 是星虫动物门中比较特殊的物种^[14]。本研究及 Silverstein^[7]的研究表明, 裸体方格星虫的染色体数目明显多于其他

表 3 已知星虫动物的染色体数目和核型公式

Table 3 Chromosome number and karyotype formula of Sipunculans

星虫 Sipunculans	染色体数目 Chromosome number	核型 Karyotypes	数据来源 Source of data
太平洋革囊星虫 <i>Phascolosoma pacificum</i>	20	2n= 6sm+ 14st	
厥目革囊星虫 <i>P. scolops</i>	20	2n= 12st+ 8t	
斯氏盾管星虫 <i>Aspidosiphon steenstrupii</i>	20	2n= 8m+ 2sm+ 8st+ 2t	
珠光戈芬星虫 <i>Golfingia margaritacea</i>	20	2n= 14m+ 4sm+ 2st	
黑色樱心星虫 <i>Thysanoocardia nigra</i>	20	2n= 16m+ 4st	
<i>Theniste hennahi</i>	20	2n= 18m+ 2sm	
<i>T. dyscritta</i>	20	2n= 20m	[7]
<i>T. pyroides</i>	20	2n= 20m	
<i>Phascolopsis gouldii</i>	20	2n= 12m+ 6sm+ 2st	
澳洲管体星虫 <i>Siphonosoma australe</i>	22	2n= 14m+ 6sm+ 2st	
邱米管体星虫 <i>S. cumanense</i>	18	2n= 12m+ 6sm	
邱米管体星虫 <i>S. cumanense</i>	24	2n= 2m+ 4st+ 18t	
裸体方格星虫 <i>Sipunculus nudus</i>	34	2n= 30m+ 2sm+ 2st 2n= 26m+ 8sm	本文 This paper

星虫(表 3), 提示该物种在星虫门中可能处于较特殊的进化地位。

参 考 文 献

[1] Cutler E B, Gibbs P E. A phylogenetic analysis of higher taxa in the phylum Sipuncula. *Systematic Zoology*, 1985, **34**: 162 ~ 173.

[2] 李凤鲁, 周红, 王纬. 中国沿海星虫动物门名录. 青岛海洋大学学报, 1992, **22**(2): 72~ 88.

[3] Rice M E, Reichardt H F. Larval development and metamorphosis of *Siphonosoma cumanense*. *American Zoologist*, 1984, **24**: 47.

[4] Rice M E. Factors influencing larval metamorphosis in *Golfingia misakiana* (sipuncula). *Bulletin of Marine Science*, 1986, **39**(2): 362~ 376.

[5] 兰国宝, 阎冰. 方格星虫繁殖生物学研究. 水产学报, 2002, **26**(6): 503~ 509.

[6] 王庆恒, 杜晓东, 黄洪艳等. 湛江地区光裸星虫的生殖细胞发育和生殖周期. 湛江海洋大学学报, 2005, **25**

(1): 5~ 9.

[7] Silverstein J T. Karyotypes of some pacific sipunculans. *American Zoologist*, 1986, **26**: 103.

[8] Levan A, Fredga K, Sandberg A A. Nomenclature for centromeric position on chromosome. *Hereditas*, 1964, **52**: 201~ 201.

[9] 黄荣莲, 杜晓东, 叶富良. 合浦珠母贝两个种群染色体组型的分析. 湛江海洋大学学报, 2001, **21**(1): 1~ 5.

[10] 王琼, 董寰亮. 贻贝核型及染色体带型分析. 动物学报, 1994, **40**(3): 309~ 316.

[11] 王先志, 王桂云, 马庆惠等. 蛾螺科三种螺的核型观察. 动物学研究, 1990, **11**(3): 259~ 262.

[12] 常建波, 魏利平, 杨建敏等. 文蛤染色体核型及三倍体诱导的初步研究. 水产学报, 1996, **20**(3): 296~ 274.

[13] 余建贤, 熊志尧, 董旺东等. 近江牡蛎的染色体组型. 湛江水产学院学报, 1993, **13**(1): 27~ 29.

[14] Cutler E B. The Sipuncula: Their Systematics, Biology, and Evolution. New York: Cornell University Press, 1994, 233~ 235.