

文章编号:1000 - 0615(2002)01 - 0015 - 06

CB 抑制合浦珠母贝受精卵第一极体释放的染色体分离

何毛贤, 姜卫国, 潘金培

(中国科学院南海海洋研究所应用生物研究室, 广东 广州 510301)

摘要:对 CB 抑制合浦珠母贝受精卵($3n \times 2n \text{♂}$, $2n \times 2n$)第一极体释放的染色体分离行为进行了细胞学观察。结果表明, CB 抑制第一极体改变了正常的染色体分离行为, 在第二次减数分裂过程中出现了多极分离, 主要有二极分离(28.67%)、三极分离(40.56%)及四极分离(23.78%)三种模式, 不能确定的占 6.99%。均等的二极分离可能导致四倍体的产生, 而部分四极分离也能产生四倍体, 三极分离主要产生非整倍体。未处理组的染色体仍按正常的二极形式进行分离, 释放两个极体, 但两极的染色体数目通常存在极大差异, 导致大量的非整倍体产生。二倍体组(抑制第一极体)也存在同样的多极分离模式, 二极分离占 25.00%, 三极分离占 21.51%, 四极分离占 34.30%, 不能确定的占 19.19%。另外, 对各种染色体分离模式形成的机制进行了讨论。
关键词:合浦珠母贝; 染色体分离; 三倍体; 极体; 细胞松弛素 B

中图分类号: S917; Q954.43 文献标识码: A

Chromosome segregation in fertilized eggs from pearl oyster *Pinctada martensii* Dunker following the first polar body inhibition with cytochalasin B

HE Mao-xian, JIANG Wei-guo, PAN Jin-pei

(Laboratory of Applied Biology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China)

Abstract: Chromosome segregation in fertilized eggs of pearl oyster, *Pinctada martensii* Dunker, following the first polar body (PB1) inhibition with cytochalasin B (CB) was observed. Cytological observation indicated that the inhibition of PB1 with CB changed the normal chromosome segregation pattern. Polypolar segregation patterns were detected in the second meiosis (M_{II}). There were three typical patterns, namely dipolar segregation (28.67%), tripolar segregation (40.56%) and tetrapolar segregation (23.78%) in $3n \times 2n \text{♂}$ group. There were 6.99% of treated eggs that could not be classified. When chromosomes divided and segregated equally to each pole in dipolar segregation, tetraploids would be produced, and part of tetrapolar segregation also could produce tetraploid embryos. Aneuploids mainly resulted from triploid segregation. In the untreated group, chromosomes went through normal dipolar segregation, and two polar bodies were released, but the chromosome number in each polar was highly variable, which gave rise to a variety of aneuploid embryos. The similar chromosome segregation patterns were observed in the group of diploids crossing diploids by blocking PB1, including dipolar segregation (25.00%), tripolar segregation (21.50%) and tetrapolar segregation (34.30%).

收稿日期: 2001-03-08

基金项目: 广东省自然科学基金项目(990315); 国家“863”重大项目(863-819-01-03)。

作者简介: 何毛贤(1969-), 男, 四川西充人, 副研究员, 博士, 主要从事贝类遗传育种研究。E-mail: hmx@scsio.ac.cn.

The remaining 19.19% could not be classified. The possible mechanisms for the various types of chromosome segregation are discussed.

Key words: *Pinctada martensii* Dunker; chromosome segregation; triploid; polar body; cytochalasin B

通过二倍体直接诱导三倍体已在许多贝类获得成功。虽然抑制第二极体释放能产生较高的三倍体率,甚至达到100%^[1],然而同样的方法处理第一极体所产生的三倍体率却很低。姜卫国等^[2]用细胞松弛素B(CB)抑制第二极体,胚胎三倍体率达77%,而处理第一极体,三倍体率只有40%,在产生三倍体的同时,还产生二倍体、四倍体、五倍体及大量的非整倍体。三倍体与二倍体交配,抑制第一极体诱导多倍体,其胚胎倍性与通过二倍体抑制第一极体释放诱导多倍体一样^[3],并且在成贝中也检查到二倍体、三倍体、四倍体和非整倍体^[4]。Que等^[5]对通过三倍体的卵抑制第一极体诱导太平洋牡蛎多倍体的细胞学过程进行了观察,发现CB阻止第一极体的排放,改变了正常的第二次减数分裂过程中染色体的分离方式。几种分离方式并存,主要有联合三极分离、二极分离、不完全联合二极及独立二极分离,这些分离方式将使胚胎的倍性复杂化,除了产生整倍体外,还将产生大量的非整倍体。二倍体与二倍体交配,抑制受精卵第一极体释放,其染色体分离方式与其基本相同,主要有三极分离、非混合的三极分离、联合二极分离和独立二极分离^[6]。

本文将对CB抑制第一极体释放过程中受精卵的染色体的分离行为进行连续的细胞学观察,以期阐明各种倍性的产生机制。

1 材料与方法

1.1 材料

合浦珠母贝二倍体为两龄贝,三倍体于1996年用 $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CB抑制第一极体和 $75\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-DMAP抑制第二极体产生,活体鳃细胞法^[4]鉴定出三倍体。

1.2 实验方法

挑选性腺发育较好的贝作亲贝,剖取精巢,筛绢过滤,除去杂质及碎片,0.006%氨海水处理卵10min,加入精子受精。用显微镜观察受精卵的发育速度,当有极体出现时即加CB处理受精卵,并持续15min,CB终浓度为 $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。处理结束后,用含0.1%DMSO的海水浸洗卵两次,每次15min,然后置受精卵于过滤海水中发育。

为了检查染色体的分离行为,从受精开始,每隔3min取卵一次,用Carnoy固定液固定两次,每次15min,直到出现两细胞结束。醋酸—地衣红压片法制片^[4],显微镜观察胚胎发育过程中染色体的分离行为,并显微照相。

实验分3组。TDCB组为1个雌性三倍体与1个雄性二倍体交配,CB抑制其第一极体释放,TD组为其对照组,即不加CB处理。DDCB组为1个雌性二倍体与1个雄性二倍体交配,CB抑制其第一极体释放。实验水温为 $27.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

2 结果

三倍体的联会形式较复杂,联会染色体数目一般在13~16个(图版-1),大部分以三价体存在,也有二价体和单价体。在TD组,受精后约33min开始形成两组二分体,每组约20个,48min时,大部分受精卵开始形成第一极体,在分离过程中有部分染色体滞留或丢失,52min时,大部分开始第二次减数分裂,形成第二极体,其分离形式与正常二倍体相同,以二极形式分离,但两极的染色体数目常存在差异。在TDCB组,CB处理期间,未发现极体排放。受精后37min,染色体以二分体的形式存在,约40个(图版-2),有的已开始分为两组,受精后42min,大部分已形成两组二分体,受精后55min,细胞已开始第二次减数分裂,其分离方式主要有三极分离、二极分离和四极分离。“三极分离”是指在第二次减数分裂(M

)中期,二分体随机排列到三极纺锤体的三个分裂赤道面上,到后期 时,各极将会聚来自相邻两个赤道面上的子染色体,并各自凝缩,形成三组染色体;“二极分离”指染色体二分体共同排列到二极纺锤体的单一赤道面上,染色单体分开,向两极移动,形成两组染色体;“四极分离”指来自第一次减数分裂(M_I)的两组二分体在 M_I 不发生混合,各位于一个二极纺锤体的赤道面上,进入后期 时,染色单体各自向两极移动,形成四组子染色体。

2.1 三极分离

处理结束后,第一次减数分裂正常进行,产生两组二分体,每组的 21 个二分体。进入 M_I 后,42 个二分体随机地分成三组,排列在 3 个分裂面上,每组的 14 个。在后期 ,二价体分开,各自向相邻两极移动。每一极接受来自相邻两极的 28 个染色体(单)体,实际上三极的染色体数目很难完全相同,其变化较大。到末期 ,三极中的 3 组染色体各自凝缩,其中最靠近卵子边缘一极的那组作为第二极体被排出(图版 - 3,4)。

2.2 二极分离

在 M_I 形成的两组二分体进入 M_I 后,在 M_I 仍然为两组(图版 - 5,6)。在末期 ,靠近卵子边缘一极将作为第二极体被排出(图版 - 7),在分离过程中,发现某染色体被滞留(图版 - 8)。如果出现均等的分离,将导致每一极有 42 个染色体(单)体。

2.3 四极分离

在 M_I 形成的两组二分体在进入 M_I 后,不发生混合,且在后期 时,每组再被分为两组,排列在 4 个分裂面上,形成四组子染色体(图版 - 9),由于作为第二极体排出的染色体数目不同,将分别导致四倍体、三倍体或二倍体的产生。图版 - 10 示一极的染色体作为第二极体被排出。图版 - 11 示两极的染色体作为第二极体被排出。除了以上三种主要的分离模式外,还有一些难以划分。各种染色体分离模式的频率见表 1。

DDCB 组的染色体分离模式与 TDCB 组相同,也检查到二极分离、三极分离和四极分离(表 2)。

表 1 TDCB 组染色体分离模式的频率

Tab.1 Percentage of chromosome segregation patterns observed in TDCB group

组别(观察数) groups (number of observations)	染色体分离模式(%) chromosome segregation patterns			
	二极分离 dipolar	三极分离 tripolar	四极分离 tetrapolar	未知 unclassified
1(99)	30.30	4.43	18.18	8.08
2(44)	25.00	34.09	36.36	4.55
均值 average	28.67	40.56	23.78	6.99

表 2 DDCB 组染色体分离模式的频率

Tab.2 Percentage of chromosome segregation patterns observed in DDCB group

组别(观察数) group (number of observations)	染色体分离模式(%) chromosome segregation patterns			
	二极分离 bipolar	三极分离 tripolar	四极分离 tetrapolar	未知 unclassified
172	25.00	21.51	34.30	19.19

3 讨论

3.1 TDCB 组的染色体分离

三倍体染色体在减数分裂时很难完全联会。观察表明,在第一次减数分裂中期,染色体除了三价体外,还有二价体及单价体。联合期染色体数目约 13~15 个。太平洋牡蛎三倍体卵细胞染色体基本上完全联会,但联会不完全。在一个核中也发现三价体、二价体和单价体存在,但主要为三价体,有些卵子可经历完全联会,形成 10 个三价体,但大部分卵以 11~13 个三价体、二价体和单价体的形成混合存在^[5],人类三倍体也存在同样的联会形式^[7,8]。在 M₁,二分体染色体数目约 40 个,观察表明同一个体的卵的分裂过程不同步,在同一玻片上可观察到有的卵的二分体聚集在一起,而有的卵的二分体已分为两组,而且在同一卵中,有的已经形成二价体,有的还以联会形式存在。未处理组染色体的分离没有受联会形式的影响,向两极分离,未联会的染色体随机地进入某一极,也可能在移动过程中丢失,其染色体分离过程与二倍体无异,也有两个极体排出。在日本珠母贝和太平洋牡蛎也观察到同样的现象^[9-11]。

CB 处理不但抑制了第一极体的释放,而且使第二次减数分裂的方式发生了改变,除了二极分离外,还出现了三极分离和四极分离。其中二极分离的一部分使 42 个染色单体保留于卵中,与来自父本的 14 个染色单体结合,形成四倍体($n=56$),而在四极分离中,如果某两极的染色体(单)体作为第二极体被排出,也将形成四倍体,而三极分离将主要形成非整倍体,由于三极分离所占的比例较高,加上其它分离方式也将产生大量的非整倍体,导致了胚胎期非整倍体比例极高,这与胚胎染色体检查的结果一致^[3]。分离方式的划分主要根据 M₁ 中后期染色体在分裂面上的排列方式,但每种分离方式本身也可能存在差别,即在分裂过程中发生某种改变。Que 等^[5]认为太平洋牡蛎处理组的 M₁ 染色体分离方式主要有四种模式:三极分离(54.5%)、联合二极分离(12%)、不完全联合二极分离(4.0%)、独立二极分离(2.5%),另外还有一些不能确定的类型(27%)。其三极分离与合浦珠母贝的一样,而独立二极分离相当于合浦珠母贝的四极分离,我们把联合二极分离和不完全联合二极分离统一划分为二极分离。合浦珠母贝四极分离(24.24%)的比例高于太平洋牡蛎(2.5%)。Guo、Allen^[10]和 Que 等^[5]都认为四倍体是联合二极分离的结果,我们的研究结果也与其类似,由于染色体分离形式的多样化,决定了通过这种方法不可能产生很高的四倍性胚胎。而且由于大量的非整倍体存在,其中只有极少部分能存活,因而通过该方法诱导四倍体,幼虫的存活率必然很低,以前的研究结果证实了这点^[3]。

3.2 DDCB 组的染色体分离

在 DDCB 组,染色体在第二次减数分裂中分离模式与 TDCB 组类似。太平洋牡蛎也存在同样的情况^[6],除此之外,李霞等^[12]用 CB、6-DMAP 处理皱纹盘鲍的受精卵,对抑制第一极体后染色体的分离模式也进行了研究,发现存在“随机三极分离”、“非混合三极分离”、“联合二极分离”和“独立二极分离”,但“非混合三极分离”比较少见。在栉孔扇贝, Yang 等^[13]用 CB 抑制受精第一极体释放,在第二次减数分裂也出现了二极分离(11.4%)、三极分离(40.9%)和四极分离(15.7%)。

3.3 多极分离的机制

是什么因素导致了通过抑制第一极体诱导多倍体的过程出现了多极纺锤体,使染色体正常分离方式发生了改变呢?中心体(Centriole)可能在该过程中起着不可忽视的作用。中心体在数目上的变化将直接影响到细胞的分裂及同源染色体的分离^[14],在多倍体操作过程中,当抑制第一极体排放时,由于多个中心体同时被滞留在次级卵母细胞中,这样,在第二次减数分裂中期将形成二极、三极或四极纺锤体^[15],因此,除了产生二倍性的雌原核外,还将形成其它倍性的雌原核^[6,16]。Longo 等^[11]也认为中心体在形成多极纺锤体中起的作用。可以这样认为,保留在卵中的中心体分离,形成两个纺锤体,而本应随第一极体排出的一个中心体去引导形成另一极纺锤体,从而产生三极纺锤体,发生“三极分离”;而二极分离是由于某一中心体失去功能或不分离产生;当两个中心体都分离复制,将产生四极纺锤体,发生“四极分离”,不过,这只是一种推测,还有待实验证明。

参考文献:

- [1] Allen S K Jr, Gagnon P S, Hidu H. Induced triploidy in the soft-shell clam (*Mya arenaria*): cytogenetic and allozymic confirmation [J]. *J Heredity*, 1982, 73:421 - 428.
- [2] Jiang W G, Li G, Lin Y G, et al. Induced polyploidization in pearl oyster, *Pinctada martensii* (D.) [J]. *Tropic Oceanology*, 1987, 6(4): 37 - 45. [姜卫国, 李刚, 林岳光, 等. 人工诱导合浦珠母贝三倍体的发生[J]. 热带海洋, 1987, 6(4): 37 - 45.]
- [3] He M X, Shen Q, Lin Y G et al. Inducation of tetraploid *Pinctada martensii* in eggs from triploid [J]. *J Fish China*, 2000, 24(1): 22 - 27. [何毛贤, 沈琪, 林岳光, 等. 合浦珠母贝三倍体的卵诱导四倍体[J]. 水产学报, 2000, 24(1): 22 - 27.]
- [4] He M X, Lin Y G, Shen Q, et al. Production of tetraploid pearl oyster (*Pinctada martensii* Dunker) by inhibiting the first polar body in eggs from triploids [J]. *J Shellfish Res*, 2000, 19(1): 147 - 151.
- [5] Que H, Guo X, Zhang G F, et al. Chromosome segregation in fertilized eggs from triploid oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), following inhibition of polar body I [J]. *Biol Bull*, 1997, 193:14 - 19.
- [6] Guo X, Cooper K, Hershberger W K, et al. Genetic consequence of blocking polar body I with cytochalasin B in fertilized eggs of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Segregation of chromosomes [J]. *Biol Bull*, 1992, 183:387 - 393.
- [7] Gosden C M, Wright M O, Paterson W G, et al. Clinical details, cytogenetic studies and cellular physiology of a 69,XXX fetus with comments on the biological effect of triploidy in man [J]. *J Med Genet*, 1976, 13:371 - 380.
- [8] Luciani J M, Devitor M, Bour J, et al. The meiotic behavior of triploidy in a human 69,XXX fetus, [J]. *Cytogenet Cell Genet*, 1978, 20:226 - 231.
- [9] Komaru A, Wada K T. Meiotic maturation and progeny of oocytes from triploid Japanese pearl oysters (*Pinctada fucata martensii*) fertilized with spermatozoa from diploids [J]. *Aquac*, 1994, 120:61 - 70.
- [10] Guo X, Allen S K Jr. Viable tetraploids in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), produced by inhibiting polar body I in eggs from triploids [J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1994, 3(1):42 - 50.
- [11] Longo F J, Mathews L, Hedgecock D. Morphogenesis of maternal and paternal genomes in fertilized oyster eggs (*Crassostrea gigas*): effects of cytochalasin B at different periods during meiotic maturation [J]. *Biol Bull*, 1993, 185:197 - 214.
- [12] Li X, Wang Z C, Zhang G F, et al. Studies on the mechanism of effects of medicines on inducing triploid abalone [J]. *J Dalian Fish Univ*, 1999, 14(3): 7 - 12. [李霞, 王子臣, 张国范, 等. 药物诱导皱纹盘鲍三倍体作用机理研究. 大连水产学院学报, 1999, 14(3): 7 - 12.]
- [13] Yang H P, Que H Y, He Y H, et al. Chromosome segregation in fertilization eggs from Zhikong scallop *Chlamys farreri* (Jones & Preston) following polar body I inhibition with cytochalasin B [J]. *J Shellfish Res*, 2000, 19(1): 101 - 105.
- [14] Shuder G, Rieder C L. Centriole number and the reproductive capacity of spindle poles [J]. *J Cell Biol*, 1985, 100:887 - 896.
- [15] Li X X. Influence of the centriole on the cell cleavage and ploidy of marine invertebrate during chromosome manipulation [J]. *Oceanol et Limnol Sin*, 1995, 26(4): 439 - 443. [李孝绪. 论海洋无脊椎动物染色体操作过程中中心体对细胞分裂和倍性的影响. 海洋与湖沼, 1995, 26(4): 439 - 443.]
- [16] Komaru A, Matsuda H, Yamakawa T, et al. Chromosome behavior of meiosis inhibited eggs with cytochalasin B in Japanese pearl oyster [J]. *Bull Jap Soc Sci Fish*, 1990, 56:1419 - 1422.

下期论文摘要

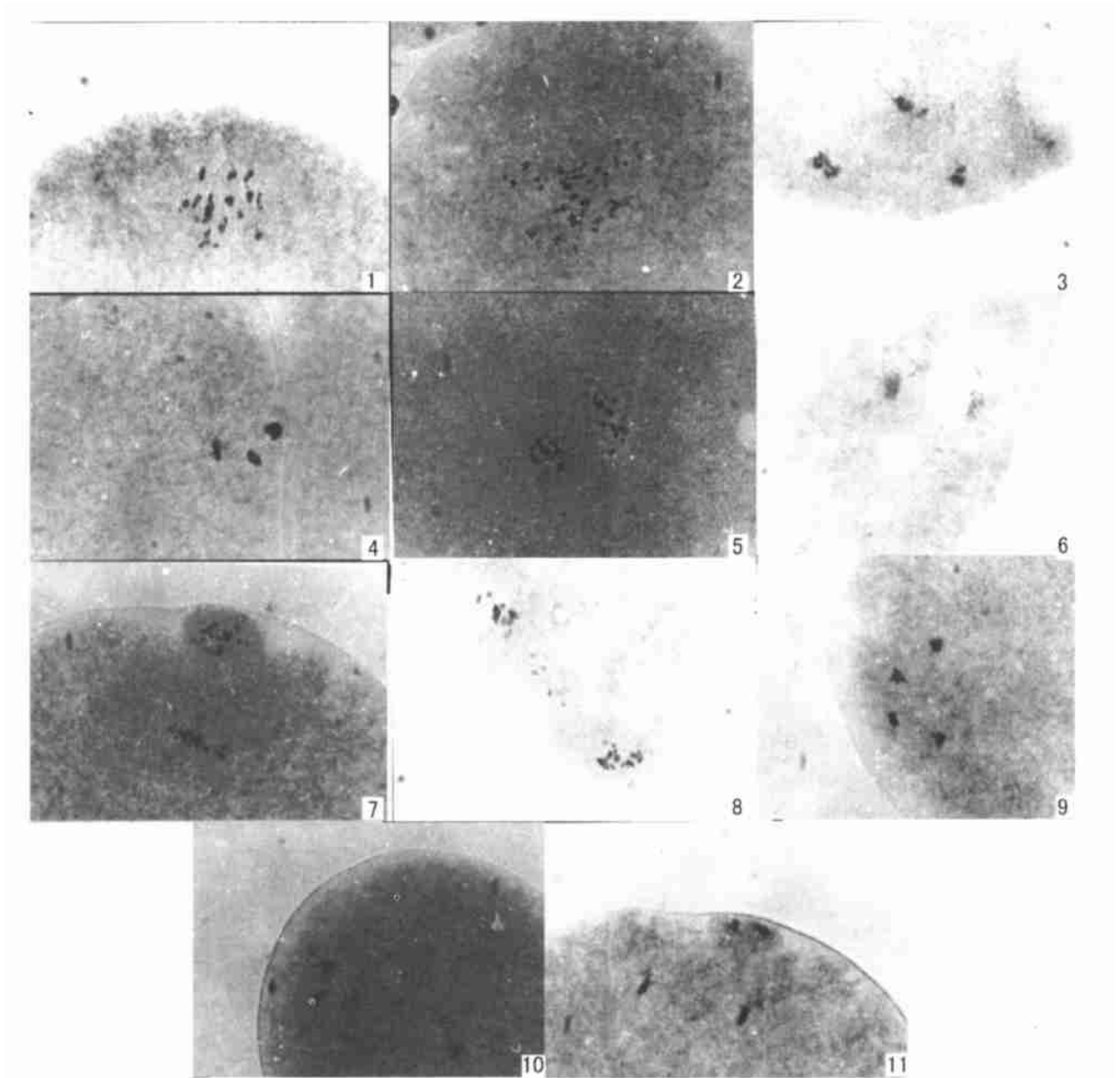
 人工授精和孵化
万瑞景¹, 蒙子宁²

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 2. 厦门大学海洋系, 福建 厦门 361005)

摘要: 利用海州湾西南部一站的底层拖网渔获物中性成熟的鳎鱼雌、雄个体进行人工授精, 获得了鳎鱼受精卵。在培养水温为 21.6~24.0 条件下, 受精卵经 40min 细胞开始分裂, 1h30min 为十六胞期; 2h50min 为多细胞期; 5h 为囊胚期; 17h10min 原口关闭; 37h50min 仔鱼开始孵化; 鳎鱼受精卵的发育全程大约需要 38 h。

关键词: 鳎鱼; 授精; 孵化; 胚胎发育

何毛贤等:CB 抑制合浦珠母贝受精卵第一极体释放的染色体分离



图版 TDCB 组染色体分离的细胞学观察

Plate Chromosome segregation observed in TDCB

1. 联会染色体, 2. 二分体, 3. 三极分离, 4. 三极中的一极作为极体被排出, 5-6. 二极分离, 7. 二极分离中的一极作为第二极体被排出, 8. 示染色体丢失, 9. 四极分离, 10. 四极分离中的一极作为第二极体被排出, 11. 四极分离中的两极作为第二极体被排出
1. Synapsis, 2. Dyads, 3. Tripolar segregation, 4. One group released as polar body in tripolar segregation, 5-6. Bipolar segregation, 7. One group released as polar body in dipolar segregation, 8. Chromosomes losing in dipolar segregation, 9. Tetrapolar segregation, 10. One group released as the second polar body in tetrapolar segregation, 11. Two group released as the second polar body in tetrapolar segregation