

采用分裂阻断法研究黄鳝的 核型和减数分裂

徐晋麟

(浙江大学生物科学与技术系, 杭州 310027)

潘红春* 李光敏

(安徽大学实验中心, 合肥 230039)

提 要

本实验采用在黄鳝腹腔内注入秋水仙素, 然后取未成熟性腺进行空气干燥法制片, Giemsa 染色, 获得了较好的性原细胞有丝分裂中期相, 同时还观察到减数分裂阻断后的各期分裂相。并发现黄鳝的第九对染色体在后期 I 提前分离; 在减数分裂过程中出现多倍性终变期和二倍性不减数细胞, 后者为鱼类多倍体育种提出了新的思路。

本实验用性原细胞有丝分裂中期相和联会复合体进行了核型分析, 结果与前人研究结果相符。

关键词 黄鳝, 秋水仙素, 减数分裂, 有丝分裂, 联会复合体, 核型

有关鱼类核型分析的研究, 最初采用的方法是先在鱼腹腔内注入秋水仙素, 4—5h 后取肾脏或精巢进行压片观察染色体, 但未能获得较好的分裂相^[1], 直到鱼类淋巴细胞和肾细胞培养法建立后才有所突破^[2, 3, 4]。用细胞培养法虽能获得较好的分裂相, 但因鱼类的染色体一般较小, 且数目多, 所以长度的度量仍存在较大的误差。近年来采用联会复合体 (SC) 来进行黄鳝核型的研究^[5], 不仅量度准确, 而且和有丝分裂核型有很好的吻合性。可是用电镜观察不易普及, 同时 SC 的制备常用界面铺展法^[6], 多用硝酸银染色, 虽然有的动物的着丝粒部位略显膨大 (如鸟类)^[7], 但鱼类等动物的着丝粒一般不易显现, 这样就必需同时用培养法制备有丝分裂中期相, 用其臂比为参照来推测 SC 的着丝粒部位。

为了建立一种既简便易行, 且效果较好的方法, 作者将哺乳动物减数分裂标本的简易制作法^[8]移植到鱼类, 稍加改变, 取得了十分良好的效果。在同一张玻片上既获得了分散较好的有丝分裂中期相 (图版 I: 2), 同时又可观察到减数分裂的各个时期 (图版 1: 3—9)。通过光镜观察拍摄的粗线期 SC 照片, 就可以较准确地量度, 进行核型分析, 并可

* 现为安徽师范大学生物系研究生。
李革生曾参加了部分工作, 谨此致谢!
1991 年 1 月 10 日收到。

同时对减数分裂加以研究。

1 材料和方法

黄鳝(*Monopterus albus* Zuiew)来源于合肥市场。

将饲养在水族箱中的黄鳝取出,用纱布包住鱼体,先用碘酒和 70%的酒精消毒腹部皮肤,再用无菌干棉球擦去多余的酒精,然后将 0.2%秋水仙素(表 1)^[9]注入腹腔,2—4h 后取出解剖,用镊子取出性腺,选择未完全成熟的性腺,放入一个盛有 0.075mol / L KCl 溶液的平皿中,用手术刀细细切碎,在室温中低渗 30min 左右,用甲醇-冰醋酸(3:1)固定 15min,以 1000r / min 离心 5min,除去上清液,再向离心管内加入 0.5ml 固定液,轻轻打匀,制成悬液。在每张冷冻过的清洁玻片上滴加 3 滴悬液,吹干后用 Giemsa(pH 为 7.0)染色 20min,再用蒸馏水轻轻冲洗,晾干后即可镜检。这种方法简称为“减数分裂阻断法”。

表 1 秋水仙素用量表

Tab. 1 Quantity of colchicine used

鱼 体 重 Weight of fish (g)	150—200	200—250	250—300	300—350	350—400	400—500
秋水仙素量 Volume of colchicine (ml)	0.12—0.16	0.16—0.20	0.20—0.26	0.26—0.33	0.33—0.40	0.40—0.50

2 结果和讨论

经光镜观察,可见到分裂阻断后出现的染色体变化情况(图版 I: 7、8、9)。

2.1 性细胞的不同步发育

在黄鳝性腺中,生殖细胞的发育是不同步的,这和其它鱼类减数分裂不同步的情况是相似的^[1]。在一张片子上几乎可以观察到各个分裂期(图版 I: 3—10),甚至在同一视野中也能观察到几个不同的分裂相(图版 I: 1)。正是由于存在这样的先决条件,采用减数分裂阻断法,才能获得不同分裂期的图象,从而可以得到较多的性原细胞有丝分裂中期相和清晰的 SC,以供核型分析。

2.2 性原细胞有丝分裂的阻断

在动物生殖细胞形成的过程中,性原细胞通过有丝分裂进行增殖。从理论上说,若以适当浓度的秋水仙素注入动物体内是可以部分阻断性原细胞有丝分裂的进行,使其停止在中期。本实验证实了这种推测是正确的。作者观察到多个类似于细胞培养法所获得的中期分裂相^[10,11],染色单体清晰,收缩适中,分布均匀,形态较好(图版 I: 2),完全可供核型分析之用。经观察统计,黄鳝 2n = 24,皆为端着丝粒染色体,长度为 3.4—2.3μm,和前人的结果一致^[5,11]。

2.3 联会复合体

经光镜观察粗线期的 12 对同源染色体完全联会(图版 I: 14),未发现不配对的异形染色体,与报道的研究结果一致^[5,11]。但如果染色体的非同源节段较短,则在 SC 上也很难观察到,即使用电镜观察,若非同源 DNA 少于 50bp 也观察不到“泡”状结构。由于采用 Giemsa 染色,光镜观察,所以看不到配对的两条线,但着丝粒部位应显示淡染,由于黄

鳢染色体皆为端着丝粒,所以淡染区不明显。在一般情况下,本方法制备的 SC 比银染的更便于核型分析。本实验用粗线期的 SC 进行了核型分析(图版 I: 11),结果和性原细胞有丝分裂中期相所获得的结果比较吻合。将这两组染色体长度做相关性检验,相关系数 $r=0.956$,说明二者有较好的吻合性。这与不同作者,不同方法所得到的相对长度也比较一致(表 2)。

表 2 不同方法制备的黄鳢染色体相对长度值的比较

Tab.2 Comparison of relative chromosome lengths in *Monopterus albus* Zuiew measured with different methods

类 型		中期染色体核型			SC 核型	
Type		Karyotype of metaphase chromosome			SC Karyotype	
方 法		减数分裂阻断法	肾细胞短期培养法		减数分裂阻断法	界面铺展法
Method		Arrested meiosis	Renal cell culture		Arrested meiosis	Surface spread
作 者		本 文 作 者	李渝成等[11]	马昆等[5] * *	本 文 作 者	马昆等[5] * *
Source		This paper	Li et al.	Ma et al.	This paper	Ma et al.
相对长度	No.1	11.10±0.24	11.21±0.41	11.8±0.5	10.99±0.50	11.5±0.3
	No.2	9.82±0.35	10.80±0.38	10.4±0.2	10.04±0.31	10.4±0.3
	No.3	9.48±0.41	10.12±0.20	9.4±0.3	9.54±0.27	9.6±0.5
	No.4	9.28±0.23	9.38±0.25	9.0±0.2	9.34±0.30	9.2±0.3
	No.5	8.90±0.25	9.12±0.25	8.7±0.3	8.85±0.25	8.6±0.3
	No.6	8.51±0.36	8.68±0.31	8.3±0.2	8.40±0.40	8.2±0.2
	No.7	8.24±0.20	8.08±0.25	7.9±0.2	8.22±0.41	7.9±0.3
	No.8	7.75±0.33	7.49±0.30	7.6±0.1	7.72±0.25	7.8±0.3
	No.9	7.26±0.27	6.88±0.30	7.2±0.2	7.31±0.33	7.2±0.4
	No.10	6.90±0.37	6.49±0.37	7.1±0.1	6.86±0.21	7.0±0.2
	No.11	6.45±0.45	5.99±0.45	6.7±0.2	6.51±0.31	6.9±0.2
	No.12	6.20±0.37	5.41±0.46	5.7±0.2	6.22±0.25	6.0±0.7

* * 原文数据总数为 1, 为便于比较, 本表将此数据总数换算为 100。

2.4 交叉与端化

从终变期(图版 I: 6)可以观察到黄鳢的染色体多为单交叉,但不同的染色体端化是不同步的,其中有 1 对染色体(可能为第九对染色体)首先完成端化,到中期 I 时,其他 11 对染色体仍端端相联,而这对染色体已经完全分离(图版 I: 3、4、9)。此可能由于这对染色体联会松散而造成。至于是否和性别的分化有关尚待进一步研究。

2.5 性别分化

黄鳢的性别决定机理目前尚不清楚,在其发育的过程中存在着性转变的现象,此给黄鳢性别分化的研究带来了困难。对于黄鳢是否有性染色体存在有不同的报道。刘凌云通过 G 带研究发现有异形染色体存在,认为此即是性染色体,但不能确定是 XY 型还是 ZW 型^[10]; Kitada, 李渝成等通过黄鳢的核型研究未发现异型染色体^[11], 马昆等通过 SC

的电镜观察,认为无异形染色体存在^[5]。本实验也未观察到异形染色体。在其它鱼类中如鲫鱼也存在类似的争议^[12, 13, 14]。

鱼类中性染色体的分化可分为三种类型^[1]: (1)性别由多基因控制,这些基因分散在多条染色体上,无分化的性染色体,个体性别的发育取决于这些基因的平衡以及内外环境条件,是性别分化较原始的类型; (2)有性染色体的分化,但属同型; (3)有异形的性染色体,此是性染色体分化更为完善的一类。低等脊椎动物性染色体的演化是从同形逐步向异形转化的^[15],所以无异形染色体的存在并不能表明无性染色体。同形的性染色体虽形态相同难以区分,但在某些区段上,两性所具有的遗传信息互不相同,雄性个体常带有与性别分化有关的基因^[15]。黄鳝无异形染色体存在,所以其性别决定可能不属于第(3)种类型,上述第9对染色体是否是作为同形性染色体,因有较短的非同源区段而导致联会松散。提前分离,有待进一步研究确定。

2.6 染色单体旋转

黄鳝减数分裂粗线期的同源染色体精确配对,平行联会(图版 I: 14),而中期 I 图象显示同源染色体皆是末端相联,呈“+”字型(图版 I: 3, 4, 9)。从平行联会到末端相联,可能经历了以下的过程:同源染色体联会→交换→交叉→端化→单体旋转^[16]。其中最关键的是单体旋转,否则就不能解释“+”字型的出现。很有趣的是单体旋转模型和 Holliday 的 DNA 重组模型中 X 结构两臂旋转十分相似^[15],所不同的是后者发生在两条 DNA 双链上。以上的交换和交叉只能在一对染色体的同源区段,对黄鳝的 No.9 染色体来说,有可能存在非同源区段,这样交叉只能在同源区段出现,相对而言端化也就先完成,从而产生提前分离的现象。

2.7 中期 I 的阻断

当细胞分裂进行到中期 I 时,由于秋水仙素的作用,阻断了纺锤丝的形成,使得细胞内同源染色体虽彼此分开,但细胞分裂受阻,结果形成了二倍性次级性母细胞,细胞内含 12 对同源染色体(图版 I: 8),每条染色体含有 1 对姐妹染色单体,通过着丝粒相联,呈哑铃状,染色体形态和正常的次级性母细胞(图版 I: 5, 6)相同,但数目却增加了 1 倍。

2.8 中期 II 的阻断

由于分裂不同步,有部分细胞在阻断前已进入中期 II,可观察到两个对称的子细胞——次级性母细胞(图版 I: 5),每个细胞有 12 条染色体,每条染色体中的姐妹染色单体通过端部的着丝粒端端相联,呈哑铃状(图版 I: 6),由于秋水仙素的阻断,两条姐妹染色单体虽然分开,收缩为点状,但细胞不分裂,也形成了二倍体不减数的性细胞(图版 I: 7)。

2.9 多倍体终变期

在本实验中曾多次观察到具有 24 个二价体组成的终变期(图版 I: 9),分裂相外围有明显的圆形轮廓,说明来源于一个细胞,这种情况是否自发产生有待研究确定。很有趣的是在多倍性终变期未观察到配对紊乱,形成单价体和多价体的现象。在植物中少数物种的同源四倍体可以正常繁殖,如四倍体曼陀罗(*Datura stramonium*) ($4n=48$),第一次减数分裂时形成 12 个四价体,每个四价体又两两各向一极,形成可育配子。又如四倍体蕃茄($4n=48$),每个花粉细胞中几乎全是双价体,只有少数四价体,所以形成的配子也是可育的。本实验观察到的多倍性终变期,24 对染色体全部能形成 2 价体,这就意味着黄鳝

如能产生四倍体,就可能产生可育的性细胞。

2.10 鱼类多倍体育种的新思路

诱导产生多倍体在鱼类育种中一直是一个重要的途径,因为多倍体鱼类具有生长快,个体大,适应强等优点^[1],并可提高成活率,延长成鱼寿命,控制过量繁殖,以维持生态平衡^[17]。目前一般都是采取低温,热休克以及化学诱导等方法来处理卵细胞(一般鱼类产出的成熟卵粒仍处于次级卵母细胞阶段),使第二次减数分裂在体外受阻,染色体获得加倍,从而得到二倍性配子、再与单倍体精子结合产生三倍体。或者用冷处理阻断受精卵第一次卵裂来获得四倍体^[1]。但这样直接处理卵细胞对卵子会造成较大的损伤,从而影响孵化率及鱼苗的生长。若采用活体注射适当浓度的分裂阻断剂,则有可能产生二倍体不减数配子,受精后获得四倍体后代。根据本实验观察到的多倍性终变期染色体配对并然的现象,揭示黄鳝的四倍体有可能是可育的,那么就有可能培育出可育性四倍体新品系。由于分裂阻断剂不直接处理生殖细胞,可能有利于提高孵化率和成活率。

参 考 文 献

- [1] 张兴忠等编译。鱼类遗传与育种。北京:农业出版社。1.20.213—220页。
- [2] Ojima Y, Hitotsumachi S, Hayashi M. A blood culture method for fish chromosome. *Jap. J. Genet.*, 1970. **45**(2): 161—162.
- [3] Ojima Y, Hayashi M, Ueno K. Cytogenetic studies in lower vertebrates. X. Karyotype and DNA studies. *Jap. J. Genet.*, 1972. **47**(6): 431—441.
- [4] Yamamoto T, Ojima Y. A PHA-culture method for cells from the renal tissue of teleosts. *Jap. J. Genet.*, 1973. **48**(3): 235—238.
- [5] 马 昆、施立明。黄鳝减数分裂和联会复合体组型分析。动物学研究, 1987, **8**(2): 195—163.
- [6] Moses M J. Synaptonemal complex Karyotyping: I, II and III. *Chromosoma*, 1977. **60**: 651—653.
- [7] 刘冬梅、张传善。家鸡联会复合体的制备。细胞生物学杂志, 1989, **11**(4): 180—182.
- [8] 蔡有余、吴旻。哺乳类动物减数分裂标本的简易制作方法。科学通报, 1979, **24**(6): 286—288.
- [9] 王绳琦。鱼类外周血染色体的简易制备法。细胞生物学杂志, 1985, **7**(1): 36—37.
- [10] 刘凌云。黄鳝染色体G带带型的研究。遗传学报, 1983, **10**(3): 230—234.
- [11] 李渝成, 李康, 周曦。黄鳝的染色体组型研究。武汉大学学报(自然科学版), 1982, **1**: 55—58.
- [12] 王春元, 李延龄。金鱼染色体组型的研究I。鲫鱼和红龙睛金鱼染色体组型的比较。1982, **19**(3): 238—242.
- [13] 咎瑞光, 宋峥。鲤、鲫、鲢、鳙染色体组型的分析比较。遗传学报, 1980, **7**(1): 72—76.
- [14] Yamamoto T, Kajishima T. Sex hormone induction of sex reversal in the goldfish and evidence for male heterogamety. *J. Exp. Zool.*, 1968. **168**: 215—222.
- [15] Lyon M F. Evolution of X-chromosome inactivation in mammals. *Nature*, 1974. **250**: 651—653.
- [16] De Robertis E D P, De Robertis E M F. Cell and Molecular Biology. 7 th. Ed. pp. 408—409. Saunders College Philadelphia 1980.
- [17] 洪云汉。热休克诱导鳙鱼四倍体的研究。动物学报, 1990, **36**(1): 70—75.

STUDIES OF KARYOTYPE AND MEIOSIS IN *MONOPTERUS ALBUS* ZUIEW USING THE METHOD OF DIVISION INHIBITION

Xu Jinlin

(Department of Biological Science & Technology of Zhejiang University, Hangzhou 310027)

Pan Hongchun and Li Guangmin

(The Central Laboratory of Anhui University, Hefei 230039)

Abstract

Immature gonads were taken from the abdominal cavity of *M. albus* treated with colchicine solution. Observations were made on the metaphase of gonial mitosis, as well as various phases of meiosis had been inhibited. In anaphase I, No. 9 chromosome separated in advance. Formations of polyploid diakinesis and diploid nonreductive gamete were also observed.

Karyotype of the fish was analyzed by studying the metaphase of mitosis and synaptonemal complex. The results were in agreement with those of published studies.

Key words *Monopterus albus* Zuiew, Colchicine, Meiosis, Mitosis, Synaptonemal Complex (SC), Karyotype