

综 述

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*

李 孝 绪

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

提 要 根据对中心体研究的最新进展,着重论述了染色体组操作过程中中心体对细胞分裂和倍性的影响。在海洋无脊椎动物多倍体育种中,其染色体组的加倍多是通过抑制细胞分裂实现的,然而正是在此操作的同时也改变了细胞中中心体的数目。在双中心粒中心体细胞中,由于中心体数目的变化将直接影响到下一次细胞分裂中期纺锤体的极性(单极、双极或多极),进而影响到姊妹染色体的分离及细胞的分裂和倍性。深入仔细地开展有关这方面的研究,不仅可以揭示细胞分裂的许多奥秘,而且可以为海洋无脊椎动物染色体组工程的研究提供细胞学基础,达到事半功倍的效果。

关键词 海洋无脊椎动物 中心体 细胞分裂 多倍体

运用染色体组工程技术可以诱导动物的雌核发育(Gynogenesis)、雄核发育(Androgenesis)和多倍体(Polyploid)等,并在具有重要经济价值的海水养殖生物育种方面取得了明显的进展,已获得了雌核发育、雄核发育及可育的四倍体鱼类等(Thorgaard, 1992; Mair, 1993),三倍体牡蛎育种已达商业规模(Allen et al., 1992)。

一般说,动物染色体组工程包括两方面的技术,精子或卵子染色体的失活和染色体组的加倍。诱导雌核发育、雄核发育时使配子染色体失活除了用 γ 射线外,还有X射线、紫外线和一些化学药物如:甲苯胺兰(Toluidine blue)、二甲基硫酸盐(Dimethylsulfata)等。常用的染色体组加倍的方法有温度休克法、静水压法和化学药物法等,通过控制极体排放或抑制第一次有丝分裂达到加倍的目的。理论上讲,只要处理的方法得当,即可得到相应的倍性。但在实际操作过程中并非如此,某些情况下根本达不到理想的目的,例如:在贝类三倍体育种中,控制第一极体排放比抑制第二极体排放所产生的三倍体具有更高的杂合性(Beaumont et al., 1991)。这样高的染色体组整体杂合性被期望能产生杂种优势,即生长快、成活率高或适应性强的特点。虽然三倍体牡蛎的养殖已达商业规模,CB抑制第二极体的排放能产生高达百分之百的三倍体率(Allen et al., 1992)。然而用同样的方法处理第一极体所产生的三倍体率却很低,根本达不到商用的要求,为什么?用四倍体做亲本,由他产生的二倍体配子与二倍体亲本产生的一倍体配子结合可产

* 国家自然科学基金资助项目,39070137号。李孝绪,男,出生于1960年3月,研究员、博士。

收稿日期:1995年1月25日,接受日期:1995年3月11日。

生百分之百的三倍体后代,这是三倍体育种中最理想的方法之一。然而获得四倍体所用的方法动物与植物有所不同,即使在动物中也有很大差异,用处理鱼、虾获得四倍体的方法 (Mair, 1993; Thorgaard, 1992; 相建海等, 1992) 在贝类四倍体操作中尚无成功的范例 (Diter et al., 1990; Guo et al., 1993), 又是为什么? 这些问题的出现很难从操作方法本身得到合理的解答。种类遗传上的差异是一方面,但中心体在染色体操作过程中的影响也不容忽视,因为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 (Sluder et al., 1985), 有些问题可以从中得到答复。

多数动物细胞的中心体内有两个相互垂直的中心粒,他们在中心体中的数目变化与中心体的分离、复制 (中心体的繁殖)密切相关,是这些过程的明显标记 (Sluder et al., 1985)。本文以海胆 (*Lytechinus pictus*)、海星 (*Pisaster ocraceus*) 的胚胎细胞和牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 的受精卵为例,简论细胞分裂过程中中心粒的数目变化以及染色体组操作过程中中心体对细胞分裂及倍性的影响。

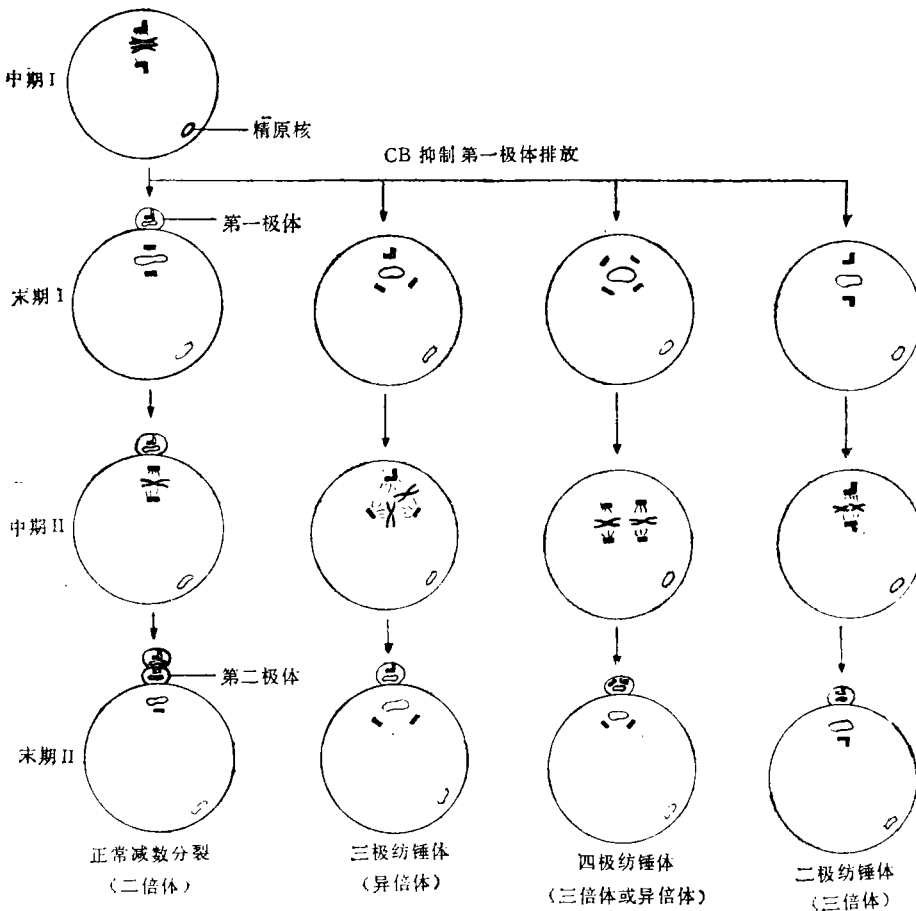


图1 牡蛎卵细胞在正常或 CB 抑制第一极体排放后减数分裂中中心粒的分离过程

Fig. 1 The splitting patterns of centriole pairs in normal oyster eggs or eggs treated with CB during meiosis I

1 细胞分裂过程中中心粒数目的变化

1.1 减数分裂(图 1) 各种动物排出的卵子所处的成熟期很不一致,与精子结合(受精)的时期也不尽相同,然而,不论何时受精,精子所带的中心体都不参与卵子的成熟分裂(Sluder et al., 1993)。以海星、牡蛎为例说明减数分裂过程中中心体中中心粒的数目变化。

牡蛎、海星排出的卵子一般是处于初级卵母细胞时期或第一次成熟分裂前中期。第一次成熟分裂中期形成的纺锤体,其纺锤极(中心体)与有丝分裂的中心体一样,每一个纺锤极中都有两个相互垂直的中心粒,第一次成熟分裂末期,两个纺锤极分别进入第一极体和次级卵母细胞中。第二次成熟分裂前期,留在卵母细胞中的两个中心粒彼此分开,但不复制;中期时形成第二次成熟分裂纺锤体,其大小仅为第一次成熟分裂纺锤体的 $1/2$ 左右,每个纺锤极中只有一个中心粒;这样,在第二次减数分裂后形成的第二极体和卵细胞中,各自仅具一个中心粒。对于父性中心体遗传的生物来说,如:牡蛎、海胆等,此中心体(仅具一个中心粒的中心体)在第一次有丝分裂之前失去功能,由来自父性的双中心粒中心体在第一次有丝分裂中期形成纺锤体(Sluder et al., 1989; Li et al.)¹⁾。有些动物的第一极体中的两个中心粒在卵母细胞第二次成熟分裂期间也相互分离,形成纺锤体,进而使第一极体分裂为两个新极体,这样的成熟卵细胞上一般能看到三个极体。

1.2 有丝分裂(图 2) 从图 2 可以看出,有丝分裂中中心粒数目的变化与减数分裂的主要区别为:有丝分裂时中心体中的两个中心粒在细胞分裂末期先分离,再复制,始终保持着中心体中中心粒数目的相对稳定,进而保持了中心体的繁殖特性(Sluder et al., 1985)。

2 染色体组操作过程中中心体对细胞分裂和倍性的影响

在动物三倍体和雌核发育的操作过程中,都需要抑制第一极体或第二极体的排放,所用的方法是破坏细胞中的微管和微丝系统,使细胞不能正常分裂,从而达到染色体组加倍的目的。不论是抑制哪一个极体的排放,实质上都是对母性纺锤体的操作。对于父性中心体遗传的生物来说,这种操作对有丝分裂毫无影响。但操作不同极体产生的各种倍性的比率差异很大。其主要原因是,抑制第二极体排放时,被滞留的两个单中心粒中心体在第一次有丝分裂之前失去功能,不参与有丝分裂纺锤体的形成,理论上讲可以获得百分之百的三倍体率,而抑制第一极体的排放则不然,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(图 1),因此,除了产生二倍体的雌原核外,还将形成其他倍性的雌原核(Komaru et al., 1990; Guo et al., 1992)(图 1)。从这个角度来说,尽管控制第一极体的排放可以提高杂合度,但在提高三倍体率方面很难达到商业的要求。

海洋无脊椎动物的四倍体多是通过抑制第一次有丝分裂或在两细胞时期或成熟受精卵时期通过细胞融合获得的(Beaumont et al., 1991; 相建海等, 1992),在此操作过程中中心体的变化要比抑制极体的排放复杂得多(图 2)。当进行分裂球融合或成熟卵融

1) Li, X.X. & Havenhand, J.N. 1995, Influence of some chemicals on oocyte maturation in *Crassostrea gigas*, Marine Biology.

合时,细胞一般是在有丝分裂间期,从图 2 中可以看到,此时来自母细胞的中心粒已经分离,平均分配在两个子细胞中,中心粒的复制正在进行或已经完成。无论处于哪个时期,每个子细胞中都已具有两个中心体,将此二细胞融合,融合后的一个细胞将具四个中心体,如果这些中心体不能相互协调,那么,在融合后的第一次有丝分裂的中期将会形成多极纺锤体(一般为三极或四极),然后形成多个子细胞(最多四个)。尽管多极纺锤体可能具有主极,然而其它极即使带出很少一部分染色体也会影响到子细胞的倍性。如果中心粒的分离发生在细胞分裂的末后期,那么,抑制第一次有丝分裂将与细胞融合一样,在下

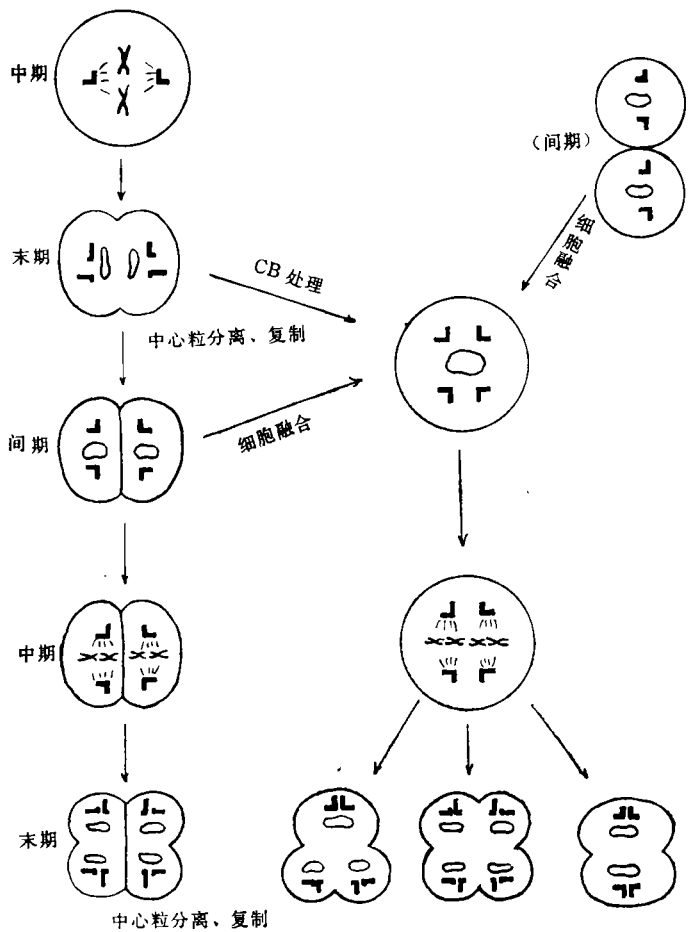


图 2 正常、CB 处理或融合后有丝分裂中中心粒的分离和复制过程
Fig. 2 The splitting and duplication patterns of centriole pairs in normal, fused, or CB-treated cells

次有丝分裂中期出现多极纺锤体。如果中心粒的分离发生在细胞分裂间期,而且有丝分裂被抑制后中心粒在下次有丝分裂前不再分离、复制,这样形成的四倍体细胞便可以正常分裂。这也许是目前能用操作极体而不能用操作第一次有丝分裂获得四倍体牡蛎稚贝的原因之一。尽管已经证实中心粒的数目变化在细胞分裂中受到严格的控制,过多、过少都

会影响到细胞的分裂和中心体的繁殖能力 (Sluder et al., 1985; Kimble et al., 1992), 但各种生物的中心体的类型差异很大 (Kimble et al., 1992), 只用一种模式来讨论染色体组操作过程中中心体的影响还远远不够。遗憾的是, 有关这方面的研究很少, 涉及的种类更有限。深入细致地开展这方面的研究, 不仅可以揭开染色体分离和位移的奥秘, 而且可以为染色体操作提供细胞学基础, 达到事半功倍的效果。

参 考 文 献

- 相建海、周令华、刘瑞玉等, 1992, 中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 四倍体诱导研究, 海洋科学, 4: 55—60。
- Allen, S. K. & Bushek, D., 1992, Large-scale production of triploid oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin) using “stripped” gametes, *Aquaculture*, 103: 241—251.
- Beaumont, A. R. & Fairbrother, J. E., 1991, Ploidy manipulation in molluscan shellfish: A review, *J. Shellfish Res.*, 10: 1—18.
- Diter, A. & Dufy, C., 1990, Polyploidy in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum* II. Chemical induction of tetraploid embryos, *Aquat. Living Resour.*, 3: 107—112.
- Guo, X., Hershberger, W. K., Cooper, K. et al., 1992, Genetic consequences of blocking polar body I. with cytochalasin B in fertilized eggs of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, II. Segregation of chromosomes, *Biol. Bull.*, 183: 387—393.
- Guo, X., Hershberger, W. K., Cooper, K. et al., 1993, Artificial gynogenesis with ultraviolet light-irradiated sperm in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* I. Induction and survival, *Aquaculture*, 113: 201—214.
- Kimble, M. & Kuriyama, R., 1992, Functional components of microtubule-organizing centers, *International Review of Cytology*, 136: 1—50.
- Komaru, A., Matsuda, H., Yamakawa, T. et al., 1990, Chromosome behavior of meiosis-inhibited eggs with cytochalasin B in Japanese pearl oyster, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56: 1419—1422.
- Mair, G. C., 1993, Chromosome-set manipulation in tilapia—techniques, problems and prospects, *Aquaculture*, 111: 227—244.
- Sluder, G. & Rieder, C. L., 1985, Centriole number and the reproductive capacity of spindle poles, *J. Cell Biol.*, 100: 887—896.
- Sluder, G., Miller, F. J., Lewis, K. et al., 1989, Centrosome inheritance in starfish zygotes: selective loss of the maternal centrosome after fertilization, *Dev. Biol.*, 131: 567—579.
- Sluder, G., Miller, F. J. & Lewis, K., 1993, Centrosome inheritance in starfish zygotes II: Selective suppression of the maternal centrosome during meiosis, *Dev. Biol.*, 155: 58—67.
- Thorgaard, G. H., 1992, Application of genetic technologies to rainbow trout, *Aquaculture*, 100: 85—97.

EFFECTS OF CENTROSOME ON CELL DIVISION AND PLOIDY DURING THE CHROMOSOME MANIPULATION IN MARINE INVERTEBRATES

Li Xiaoxu

(*Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao 266071*)

ABSTRACT

Centrosome behavior during the chromosome manipulation in marine invertebrates and its effects on cell division and states of ploidy are discussed using the data from observations on sea urchin, starfish and oyster. In theory, when production of the first or second polar bodies is inhibited in fertilized eggs, or first mitotic cell division is suppressed by chemicals, pressure, or temperature, triploid or tetraploid would be induced. But the concomitant change in the centrosome number in the forming cell will effect the efficacy of ploidy manipulations since the wrong number of centrosomes would inevitably lead to various states of spindle polarity (bipolarity, tripolarity and multipolarity), and therefore, lead to aneuploidy and a consequent loss of viability for the progeny of the cells. So detailed analysis of the centrosome activity, spindle organization and distribution of chromosomes during the meiotic and mitotic events may provide not only a better understanding of cellular and developmental processes in general but also new insights into methods for increasing the efficacy of chromosome manipulation in marine invertebrates.

Key words Marine invertebrates Centrosome Cell division Ploidy