

# “降落伞”核的演变和大核原基的发育\*

金立培

(生物学系)

## 摘 要

应用DAPI荧光染色术对冠突伪尾柱虫有性生殖过程中两种结构演化最复杂的核现象进行了观察。在“降落伞”的形成并向第一次成熟分裂中期转变期间，“伞盖”和“重物”染色质团之间自始至终由DNA 荧光丝状物相联，“重物”染色质团随着“伞盖”部染色质丝缩短变粗而逐渐变小，并在中期染色体形成的同时消失。为解释上述演变过程，在讨论中提出了一个细胞学动态模型。在大核原基的发育过程中，于染色体多线化之前先由染色质丝转变为短杆状染色体，这些染色体移向核的一极，然后从一端开始解螺旋并向核的另一极伸展。在此期间，可以观察到某些染色体成双存在。

**关键词** 纤毛虫，成熟分裂，“降落伞”期，大核原基，染色体，多线染色体，有性生殖

在腹毛类纤毛虫有性生殖过程中，核器演化的程序基本上是大同小异的<sup>[1]</sup>。在此过程中，以“降落伞”核出现为标志的第一次成熟分裂和以多线染色体的形成及解体为标志的大核原基发育最为复杂。虽然许多学者对这些核现象作了大量的观察和描述，但限于某些染色方法的非专一性或灵敏度不高，致使对某些结构的本质及其演化难以作出准确的评价<sup>[2~6]</sup>。近年来，一种新型的与DNA结合的高度特化而又灵敏的荧光染料4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)被成功地用于线粒体DNA、支原体和病毒的检测<sup>[7,8]</sup>，并对日本赭虫(*Blepharisma japonicum*)减数分裂进行了快速鉴定<sup>[9]</sup>。本研究应用DAPI荧光染色法对冠突伪尾柱虫(*Pseudourostyla cristata*)接合生殖周期中的核器发生作了进一步的观察，并对某些基本的细胞学问题作了澄清和讨论。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞和培养

本实验所用的 *P. cristata* C<sub>5</sub> 和 C<sub>14</sub> 两个细胞系为两个不同交配组合的克隆后代，分属两个不同的交配型，是两个年青的能够相互接合的株系。培养方法与以前的报道相同<sup>[6]</sup>。

本文1989年2月23日收到

● 本研究用荧光染料DAPI为香港大学动物学系吴兆宽博士惠赠，特此致谢

## 1.2 诱导交配

当  $C_5$  和  $C_{14}$  两个细胞系培养至对数生长期时, 各取大致相等数量的虫体混合于盛有 Pringsheim 氏培养液的培养皿内, 置  $27^{\circ}\text{C}$  恒温培养, 约  $15\sim 20$  小时后可形成大量接合对。

## 1.3 细胞学观察

自接合对形成始, 每隔 1 小时取样一次, 用微吸管将虫体置于涂有蛋清的载玻片上, 吸去多余的培养液, 待标本将干未干时滴一滴 Carnoy's 液固定, 空气干燥保存。镜检前加一滴 DAPI 水溶液 ( $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 于干燥的虫体上, 盖上玻片, 吸去边缘多余的液体, 即可在 Olympus 荧光显微镜下观察, 发射波长  $430\text{nm}$ 。DAPI 水溶液可置于冰箱 ( $4^{\circ}\text{C}$ ) 保存 1 年以上而染色效果不变。

# 2 结 果

## 2.1 荧光反应强度

*P. cristata* 是一种多核的腹毛类纤毛虫, 常具大核 60 枚左右, 小核约 8 枚, 大、小核都有着强烈的荧光反应。在接合生殖过程中, 不同的核器于不同的发育时期, 其荧光反应强度有着很大的差异。当接合对形成后, 接合体内以老的大、小核荧光反应最强, 呈黄白色。这种状态一直可以持续到拟包囊时期, 其老的核器逐步被解体吸收。在新核器发生过程中, 膨大的小核及各次分裂前期, 其荧光反应较弱, 呈黄绿色; 但分裂中期由于染色质或染色体的浓缩和集中, 其荧光反应较强, 几乎可以达到老核器的程度。在大核原基发育过程中, 由染色质丝缩为染色体, 再由染色体伸长至多线染色体的形成, 其荧光强度逐步增加。随后多线染色体瓦解, 进入所谓 DNA 贫乏期, 荧光反应几乎消失, 大核原基呈浅灰色。当 DNA 再次开始合成, 染色质向大核原基中央聚集直至大核原基分裂, 其荧光反应强度再次回升并最终恢复到营养体的水平。

## 2.2 “降落伞”核的演变

在预备分裂完成之后, 每个接合体的前子核退化而后子核逐渐膨大。当核内出现染色质丝并向中央聚集时, 即进入第一次成熟分裂的前期。然后, 中央染色质团向核的一极辐射出许多丝状物, 标志着“降落伞”核早期的开始(图版 I—1; 2)。随着辐射丝状物不断向核的一极转移, 中央染色质团亦向核的另一极移动, 其体积逐步缩小。染色质在核内的分布及其所处的状态明显分成两部分, 一极呈疏松的新月形, 另一极为较密实的染色质团块, 形态恰似一个典型的降落伞, 在“伞盖”和下垂的“重物”之间有明显的荧光丝状物相联(图版 I—3, 4)。此后, “伞盖”部的染色质丝开始缩短变粗, 而另一极的染色质团仍保持着密实的状态(图版 I—5)。随着“伞盖”部染色质丝的不断收缩并向中期板位移, 跟踪观察表明, 相应一极的染色质团并不移动, 但体积越来越小, 二者之间仍由荧光丝状物相联系(图版 I—6)。当这些染色质丝收缩达到最大限度而形成许多短杆状或颗粒状染色体并停留在中期板上时, 另一极的染色质团亦随之消失(图版 I—7)。

上述结果表明, 在“降落伞”的发生、发展过程中, “伞盖”和“重物”两种形态结构不是绝然分开的, 其间自始至终由染色质丝(DNA)维系着。当“伞盖”染色丝不

断缩短变粗时，“重物”染色质团亦不断变小，并随着染色体的形成而消失，因此可以推断，这块密实的染色质团直接参与了染色体的形成。

### 2.3 大核原基的发育

当接合对分离成2个接合后体后，在大约24小时内，大核原基除了体积逐步膨大，其内有一些荧光反应很弱的丝状物外，没有发现明显的结构变化。拟包囊形成后，大核原基内的染色质丝开始缩短并逐渐转变成短杆状的染色体，并可清楚地看出某些染色体成双存在，和一般减数分裂时所见的终变期图象一样（图版Ⅱ—1，2）。接着，染色体移向核的一极，成双的染色体仍清晰可辨（图版Ⅱ—3）。然后，染色体从一端开始解旋并向核的另一极伸展，大核原基内再次充满荧光丝状物和正在解旋的染色体（图版Ⅱ—4）。跟踪观察表明，各染色体的解螺旋有先有后，不是完全同步进行的，也没有发现其中一部分染色体不参与这一结构变化。随着解旋后的染色质丝不断伸展、复制和加粗，就转变为多线染色体（图版Ⅱ—5）。多线化结束后，多线染色体便开始瓦解，核内留下许多大小不等的荧光颗粒（图版Ⅱ—6）。当这些荧光颗粒消失后，核内可见一些荧光反应很弱的类膜状物（图版Ⅱ—7）。其后大核原基完全失去荧光反应，呈暗灰色，进入DNA贫乏期（图版Ⅱ—8）。值得注意的是，在DNA贫乏期结束时，同样发现有一块相当大的核物质团从大核原基内排出，其上可见数个孔洞，荧光反应比周围残留的核器要弱得多（图版Ⅱ—9）。此后，大核原基内再次出现荧光反应并不断加强，染色质亦随之向核中央聚集（图版Ⅱ—10），表明新的DNA合成正在进行。当大核原基不断伸长并开始分裂、小核进入配后第一次有丝分裂前期时，二者的荧光强度就恢复到正常大、小核的水平（图版Ⅱ—11）。经过数次连续的核分裂，虫体进入下一个无性繁殖周期。

## 3 讨 论

在某些纤毛虫尤其是腹毛类纤毛虫中，第一次成熟分裂前期出现独特的“降落伞”图象，曾引起了许多研究者的兴趣，并作了大量的报道，如棘尾虫<sup>[2,5]</sup>、伪尾柱虫<sup>[4,6]</sup>、游仆虫<sup>[10]</sup>等等。这些研究都发现在“伞盖”和“重物”之间有丝状物相联，然而，由于一些传统染色方法的灵敏度或分辨力有限，均未能揭示这些丝状物的本质。利用DAPI这种专门显示DNA的荧光染色技术，观察到这些丝状物发出清晰的荧光，从而准确判明了它们的DNA属性。因此可以认为，所谓“降落伞”核，实际上是染色质丝（解旋的染色体）在第一次成熟分裂前期的一种特殊的结构变化形态，“伞盖”和“重物”不是孤立的两部分，而是由丝状物（DNA）联系在一起的整体。这一结论与Raikov的下述看法一致，他认为“降落伞”期相当于经典减数分裂的合线期（zygotene）或花束期（bouquet），与其它纤毛虫减数分裂时的新月期（crescent stage）类似<sup>[1]</sup>。

关于“重物”染色质团的归宿，除史新柏推测“可能原地消失，不参与染色体的形成”外<sup>[6]</sup>，其他研究者均未明确说明<sup>[2,4,10]</sup>，我们以前的观察亦未能查明其演变过程<sup>[6]</sup>。现在的结果显示，“伞盖”和“重物”之间不仅有染色质丝（DNA）维系，而且“重物”染色质团是随着“伞盖”染色质丝向染色体转变的过程中不断变小而最终消失

的。这可推测为“重物”染色质团不仅参与了染色体的形成,而且直接构成各条染色体的另一端。

为了说明“降落伞”的演化过程,根据实验观察结果,作者设想这样一个细胞学动态模型:在第一次成熟分裂早前期,所有的染色体处于高度解螺旋状态(染色质丝)。当染色质丝相互缠绕并向核中央聚集的时候,螺旋化亦伴随着进行。由于螺旋化是从各条染色质丝的一端开始的,所产生的旋转力使这一端解离中央染色质丝团并以辐射的方式不断伸向核的一极而成为“伞盖”,另一端则进一步相互缠绕成更密实的染色质团,即我们所说的“重物”。各条染色质丝的中间一段既没有螺旋化也没有相互缠绕(荧光丝状物),是“伞盖”和“重物”之间连续性的象征。随着各条染色质丝“伞盖”部一端不断螺旋化和超螺旋化,所产生的扭力和拉力通过中间段的不断收缩而逐渐将“重物”的一端回收,正如手执线球的线端不断拉扯一样,至使“重物”染色质团越来越小,同时其反作用力亦使“伞盖”部慢慢朝中期板位移。当螺旋化和超螺旋化达到最大限度时,“重物”一端回收完毕,核相由前期进入中期。这一模型同样适于解释其它纤毛虫“降落伞”核的演化。至于是否所有解旋染色体(染色质丝)的分布均跨越“伞盖”和“重物”两极则是不清楚的,这是因为该虫染色体小而数多,加之中段荧光丝状物纤细且相互重叠,很难准确计数。

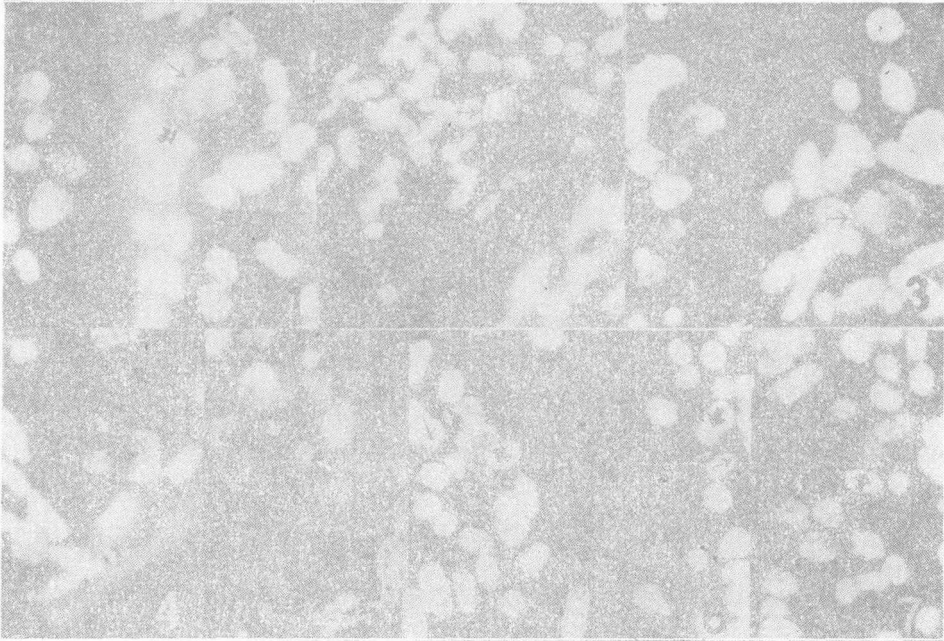
在 *P. cristata* 大核原基发育的早期,即24小时左右的接合后体内,一直是以染色质丝的状态存在,只是拟包囊形成后,这些染色质丝才转变成短杆状的染色体。这与 Ammermann 在棘尾虫上观察结果不同,他认为染色体在早期大核原基内就是以浓缩状态存在的<sup>[3]</sup>;而与孙玉森等在该虫上的观察结果一致<sup>1)</sup>。在棘尾虫大核原基发育过程中,他们发现大约只有1/3的染色体参与多线化<sup>[3]</sup>。在 *P. cristata* 却发现类似现象,我们的观察结果表明,染色体解螺旋化是不同步的,但最终都参与了多线化进程。

Jereno 提出棘尾虫大核原基内的多线染色体是同源染色体联会后多次加倍而成的<sup>[11]</sup>,孙玉森等亦发现多线染色体上存在不联会的区段,但没有在染色体解旋后跟踪到联会发生的过程<sup>1)</sup>。在 *P. cristata* 大核原基的发育早期,当染色质丝转变成染色体后,如果不是全部的话,至少有部分染色体是成双存在的。但因此就作出结论认为多线染色体是同源染色体联会后多次加倍的结果尚未有充足的证据,因为放射自显影观察表明,染色体出现之前的大核原基内已有 DNA 前体掺入,说明多线化之前的染色体(染色质丝)至少复制过一次。这就意味着成双存在的染色体或者是同源染色体联会的二价体(bivalent),或者是同一着丝点连接着的两条姊妹染色单体所组成的二联体(dyad)。但无论如何,这一发现是有启发性的,即将追索联会是否发生的时间提前到染色体出现之前,而不是解旋之后。

*P. cristata* 多线染色体的解体与棘尾虫和游仆虫的情况相似<sup>[12~14]</sup>,它们的横带先缩成圆形然后断裂成大小不等的颗粒。这些颗粒的荧光反应很强,说明 DNA 虽已断裂成许多节段但并未消失。当进入 DNA 贫乏期时,大核原基内充满了荧光反应微弱的类膜状物。这与棘尾虫和游仆虫多线染色体解体过程的电镜观察是一致的,即多线染

1) 孙玉森等,中国原生动物学会第四次学术讨论会论文摘要汇编,1987, pp,44~45

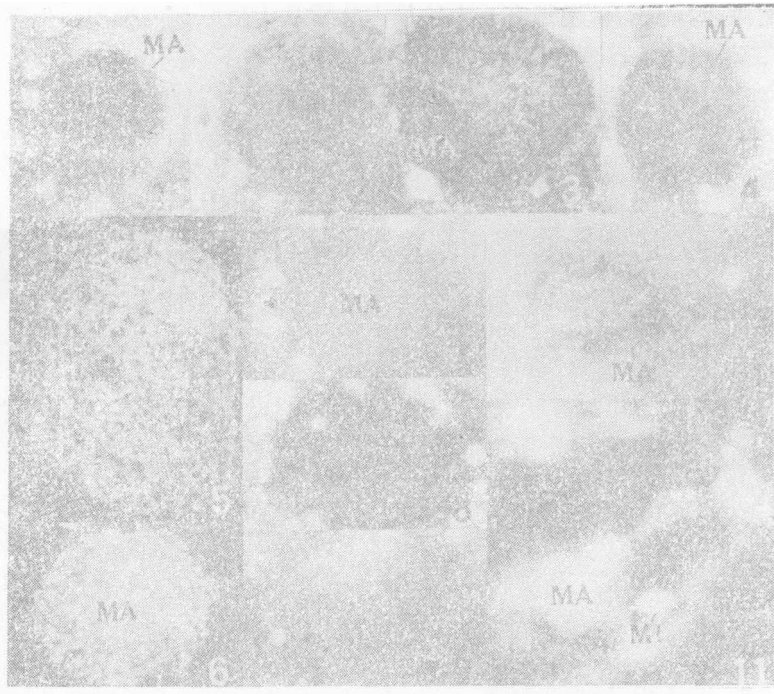
色体的各个带区先被类膜状物包围并分隔成一个个的膜囊而解体的<sup>[14]</sup>。一个有趣的现象是，用蛋白银染色，我们曾发现有一大块核内物质从大核原基内排出，但不了解它的性质<sup>[6]</sup>。荧光染色同样观察到了这块神秘的核物质团。鉴于它的荧光反应微弱，看来所含DNA成分极少，很可能是多线染色体解体后所留下的类膜状物在核内缩聚成一团而排出核外的。



图版 I 冠突伪尾柱虫“降落伞”核的演变

Plate I Cytological pattern of the parachute stage in *P. cristata*.

1. 接合对，示“降落伞”核早期。左虫为侧面观（空心箭头），小箭头和大箭头依次指右虫的中央染色质团和辐射荧光丝状物。×1000
- 2~3. 接合对，示“降落伞”核的进一步发展，小箭头指中央染色质团。×1000
- 4~5. 典型的“降落伞”图象，示“重物”染色质团（白色小箭头），“伞盖”（黑色大箭头），以及二者之间的荧光丝状物（白色大箭头）。×1000
6. “降落伞”核晚期，“伞盖”染色质丝进一步缩短变粗并向中期板位移（黑色大箭头），越来越小的“重物”染色质团（黑色小箭头），以及它们之间的荧光丝状物（白色小箭头）。×1000
7. 第一次成熟分裂中期，“重物”染色质团消失，染色体处于中期板上（黑色大箭头）。×1000



图版 II 大核原基的发育

Plate II Development of the macronuclear anlage in *P. cristata*.

1. 拟包裹, 示大核原基(MA)内染色体的形成, 箭头指某些染色质丝一端已缩短变粗, 而另一端仍保持丝状。×1000
2. 大核原基, 示某些染色体成双存在(箭头)。×1000
3. 大核原基, 示染色体向核的一极迁移, 及成双存在的染色体(箭头)。×1250
4. 大核原基, 示染色体解螺旋。箭头指某些染色体一端已经伸长而另一端仍保持紧缩状态。×1000
5. 大核原基, 示多线染色体。×1250
6. 多线染色体解体, 大核原基内充满大小不等的荧光颗粒。×1000
7. 大核原基内荧光颗粒几乎消失, 剩下一些荧光微弱的类膜状物(箭头)。×1000
8. 大核原基DNA贫乏期。×1000
9. 收缩期的大核原基, 及其内排出的物质团(箭头)。×1000
10. 大核原基, 示重新出现的染色质团(箭头)。×1000
11. 一新生幼体, 示大核原基开始分裂(箭头), 小核(MI)进入配后第一次有丝分裂前期。×1000

## 参 考 文 献

- [1] I B Raikov, In "*Research in Protozoology*", ed. by T T Chen, 4(1972), pp. 183~185
- [2] P Alonso et al., *J. Protozool.*, 12(1965), 233~238
- [3] D Ammermann et al., *Chromosoma*(Berl.), 45(1974), 401~429
- [4] T Takahashi, *J. Sci. Hiroshima Univ.*, 25(1974), 157~171
- [5] 史新柏, 动物学报, 21(1975), 4, 326~335
- [6] 张作人等, 动物学研究, 6(1985), 2, 159~167
- [7] D H Williamson et al., In "*Methods in Cell Biology*", ed. by D M Prescott, 1974
- [8] W C Russell et al., *Nature*, 253(1975), 461~462
- [9] A Miyake et al., *Protistologica*, 15(1979), 4, 473~486
- [10] M V N Rao, *J. Protozool.*, 11(1964), 3, 296~304
- [11] M A Jareno, *Protistologica*, 10(1974), 4, 527~532
- [12] D Ammermann, *Chromosoma*(Berl.), 33(1971), 209~238
- [13] J A Kloetzel, *J. Cell Biol.*, 47(1970), 395~407
- [14] D M Prescott et al., *Nature*, 242(1973), 576

## Cytological Pattern of the Parachute Stage and Development of the Macronuclear Anlage in *Pseudourostyla cristata*

Jin Lipci\*

### Abstract

During sexual reproduction of *Pseudourostyla cristata*, the development of both parachute (stage) and macronuclear anlage, which is considered as the most complex phenomena in the nucleogenesis, has been observed by DAPI fluorescent staining. When the parachute stage emerges and transforms into metaphase during the first maturation division, the two parts of parachute, an umbrella and a chromatin mass, are connected by DNA fluorescent threads from beginning to end. Moreover, the chromatin mass becomes smaller in size with the shortening and thickening of the chromatin threads in the umbrella, and it disappears as chromosomes form and stop on the metaphase plate. This could be demonstrated by a cytological developing pattern as follows: at early prophase of the first maturation division, all chromosomes exist as unwinding chromatin threads, and then they twine with each other to form a central chromatinal mass. **Spiralization**

begins first at one end of each chromatin thread, followed by twisting force that forms in the meantime, so that all coiling ends dissociate from the central chromatin mass and radiate to a pole of the nucleus to form an umbrella. As a result, each of some (or all) chromatin threads can be distinguished into three parts: one spiral end participates in the formation of the umbrella and the other end retains its twining state in the chromatin mass, and the middle part (DNA fluorescent thread) connects the two above-mentioned parts. As the ends in the umbrella condense further, the parts in the mass are gradually shrunken into the umbrella through the middle parts. When the spiralization reaches the maximum, the mass has been pulled back and the chromosomes have formed.

During the development of the macronuclear anlage (MA), chromatic threads appear first in the MA and then transform into short stick-like chromosomes which migrate to a pole. At least some chromosomes are found to be in pairs in this stage. After that the chromosomes become untwisted from one end to the other and change into chromatic threads again. The chromatic threads undergo repeated replications later to form polytene chromosomes. After polytenization, the chromosomes disintegrate, followed by the processes of DNA-poor stage, DNA replications and divisions of the MA.

**Keywords** Hypotrich ciliate, *Pseudourostyla*, sex, maturation division, parachute stage, chromosomes, macronuclear anlage, polytene chromosomes

---

\* Department of Biology