文章编号:1000-0615(2012)01-0050-05

DOI:10.3724/SP. J.1231.2012.27540

海带染色体的 DAPI 染色及核型初步分析

刘 宇, 毕燕会, 周志刚*

(上海海洋大学农业部水产种质资源与利用重点开放实验室,上海市高校水产养殖 E-研究院,上海 201306)

摘要:鉴于海带染色体比较小且数目存在分歧等原因,利用 0.2% 秋水仙素对海带配子体及孢 子体处理 10 h 左右,经过卡诺试剂固定、多种酶组合处理及 30 cm 的高位滴片,可以获得质量 比较高的海带染色体;使用灵敏度高、特异性强的 DNA 荧光染料 DAPI 进行染色,结果显示, 海带雌、雄配子体的染色体各为 31 条,孢子体染色体为 62 条,大多为短杆状或者点状;雌配子 体染色体的大小为 0.78~2.61 μm,稍大于雄配子体(大小为 0.57~2.17 μm)。根据染色体 的大小,对海带配子体的染色体核型进行了初步分析。这些结果为分子标记的染色体定位等 细胞学研究奠定了技术基础。

关键词:海带;配子体;DAPI;染色体;核型;孢子体

中图分类号:Q 343.2; S 917 文献标志码:A

染色体数目和大小是鉴别物种、判断亲缘关 系的重要依据之一。海带属(Saccharina 或 Laminaria)等褐藻染色体的数目,不同物种的报 道结果也不尽相同^[1]。对于海带 [Saccharina japonica (Aresch.) C. E. Lane, C. Mayes et G. W. Saunders)或 Laminaria japonica Aresch.] 而言,不 同时期的报道结果也不一致。Yabu^[2]以及戴继 勋等[3-4]对海带配子体细胞通过压片观察,认为 只有 22 条。Yabu 等^[5]认为海带配子体细胞约有 32 条染色体,与皱海带(L. religiosa Miyabe)^[6]、 远滕海带(L. vendoana Miyabe)^[7]以及掌状海带 [L. digitata (Huds.) Lamour]、糖海带「L. saccharina (L) Lamour], L. ochroleuca de la Pylaie^[8]的比较接近。通过方法改进, Zhou 等^[9] 观察到海带配子体细胞具有31条染色体,与掌状 海带、糖海带、L. hyperborean (Gunn) Fosl 及 L. ochroleuca 等单倍体的染色体数目一致^[10-12]。 这些不同的结果可能与海带染色体大小以及所运 用的制备技术或方法有关。据 Evans^[10-11]报道 s,海带属染色体的大小为 0.4~1.7 μm, Yabu 等^[5]所提供的海带染色体图片也说明其染色体

较小、呈点状。看来海带染色体小是无法改变的 事实,因此,要想获得比较理想的海带染色体结果 必须借助新的技术或方法。

4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2phenylindole,DAPI)是一种灵敏度高、特异性强的 DNA 荧光染料,已广泛运用于植物染色体的研 究^[13]。为此,本研究将借助 DAPI 这种荧光染料 对海带配子体与孢子体细胞的染色体进行细胞学 观察,为分子标记的染色体定位及染色体行为分 析等细胞学研究奠定技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料

海带及培养 本实验中所用的海带雌、雄配 子体无性繁殖系为"荣福"品系,按已报道的方 法^[14]分离和保藏。在温度(17±1)℃、光周期 16 L:8 D(光/暗)、光照强度 40 μmol photons/ (m²・s)等条件下,于 PES 培养基中^[15]培养,每两 个星期换一次培养基。将海带雌、雄配子体无性繁 殖系混合按照已报道的方法^[14,16]诱导孢子体的形 成并在海上养殖,次年4月份采集孢子体样品。

收稿日期:2011-05-22 修回日期:2011-06-15

资助项目:国家自然科学基金项目(30471328,30671627);国家"八六三"高技术研究发展计划(2012AA100806);上海市自然科学基金项目(10ZR1413900);上海市教育委员会海洋生物学重点学科资助项目(J50701)

通讯作者:周志刚,E-mail:zgzhou@shou.edu.cn

主要试剂 秋水仙素粉末购自生工生物工程(上海)有限公司,纤维素酶、果胶酶均来自美国 Sigma 公司,离析酶来自日本 Yakult 公司, DAPI 染剂来自美国 VECTOR 公司。

1.2 方法

染色体的制备 取适量培养状态良好的海带配子体离心除去多余水分,用灭菌海水清洗2~3次,加入0.2%的秋水仙素振荡摇匀,4℃处理6~ 12h,离心得配子体沉淀。加入卡诺固定液(冰醋酸:乙醇=1:3)振荡摇匀之后,4℃处理24h以上, 蒸馏水清洗3~5次,每次2min,离心取沉淀藻体, 放入2mL离心管并加入适量混合酶液(纤维素酶:果胶酶:离析酶:鲍鱼酶=2:1:1:1.5,鲍鱼酶按 照文献[17-18]制备),在37℃摇床上于200r/ min 酶解18h,用70%的乙醇终止酶解反应并用蒸 馏水清洗酶解产物3~4次以去除乙醇,加入适量4 ℃保存的冰醋酸,振荡混匀,观察酶解产物是否均 匀,取少量酶解产物滴片,自然晾干。孢子体的染 色体制备与配子体的基本一致。

DAPI 染色与观察 取携带有染色体的自然晾干载玻片,在相差显微镜下进行镜检。然后选取具有分散较好的染色体分裂相,加入 15 μL DAPI 以染色,15 min 后,在 Olympus BX61 荧光显微镜(日本)下观察,拍照并进行放大、测量,以计算雌、雄配子体染色体的相对长度。

核型初步分析 根据染色体相对大小,利 用 Adobe Photoshop 软件依由大到小顺序进行海 带配子体细胞染色体核型的初步分析。

2 结果与讨论

2.1 海带配子体高质量染色体的制备

秋水仙素的作用是使染色体缩短变粗,阻止 有丝分裂时纺锤体的形成,让尽可能多的细胞处 于有丝分裂中期。秋水仙素的处理时间对实验结 果有很大的影响^[19-20]。处理时间过短,染色体大 部分还处于染色质状态,得不到清晰可见的染色 体,再加上海带染色体本身就很小,从而增加了对 染色体的观察难度;处理时间过长,造成染色体缩 得过短,成为极小的圆点状,显示不出染色体之间 的差异,难以进行核型分析。对海带配子体细胞 而言,8~10 h 的秋水仙素处理时间比较适宜;对 于孢子体细胞来说,适当延长 1~2 h 的处理 时间。 滴片的作用主要是打破细胞外被和核膜,使 染色体较好地分散在载玻片上以便于观察。我们 采用0、10、30、50 cm 等不同高度进行滴片,发现 当滴片高度为 30 cm 时,则能有效地获得分散性 良好的海带配子体细胞染色体。

2.2 海带雌、雄配子体的染色体观察

经过8~10 h 的秋水仙素处理及纤维素酶、 果胶酶、离析酶、鲍鱼酶等多种酶的预处理,30 cm 的高位滴片可以获得质量较高的海带配子体染色 体,这从利用荧光染料 DAPI 染色后获得的染色 体图片(图1-a,b)得到体现。本实验结果证实海 带单倍性雌、雄配子体的染色体数均为31条,图 2 清楚地显示了海带二倍性孢子体的染色体数为 62条,与Yabu等^[5]以及Zhou等^[9]的结果一致, 但不同于Yabu^[2]及戴继勋等^[4]那些早期观察到 22条(单倍体)和44条(二倍体)染色体的报道。 本研究结果显示,海带与掌状海带、糖海带、L. hyperborean(Gunn)Fosl及L. ochroleuca等几个 物种单倍体的染色体数目一致^[10-12]。

DAPI 是一种灵敏度高、特异性强的 DNA 荧 光染料,无论对细胞核的染色体,还是对细胞质 DNA 都有极好的荧光染色效果,DAPI 复合物发 出的荧光为浅蓝色,荧光显微镜观察细胞标记的 效率高,发出的荧光更加稳定,便于显微照相^[21]。 将图 1-a,b、图 2 与已报道的图片^[2,4-5,9]相比较, 可以发现 DAPI 染色方法使染色体更为清晰,为 海带等那些染色体小的藻类的染色体数目确定及 分子标记的染色体定位等细胞学研究奠定了技术 基础。经过多张分裂相的染色体片子观察,发现 海带雌配子体的染色体均大于雄配子体的,这是 否与雌配子体细胞大而雄配子体细胞小^[22]有关, 有待进一步探索。

2.3 核型初步分析

在获得清晰的海带染色体图片后,利用 Adobe Photoshop软件,按照染色体由大到小的次 序进行配子体染色体核型的初步分析(图 1-c, d)。其中,雌配子体染色体大小为 0.78~2.61 μ m,而雄配子体染色体大小为 0.38~1.57 μ m, 雌配子体的染色体大小明显大于雄配子体的。该 结果与海带属其他几个物种的染色体大小相近 (0.4~1.7 μ m)^[10-12]。本研究结果也表明,海带 染色体虽然很小,但并非像以前报道的那样完全 呈点状^[2,4-5,9]。经过多张染色体片子的制备和分 析,发现部分染色体存在相邻成对的现象(图1b),究其原因需进一步探究。由于没有进行G带 或C带染色以及染色体长、短臂比的分析,从而 无法对同源染色体进行配对,因此对孢子体的染 色体(图2)没有进行类似的核型分析。



图 1 海带雄(a)、雌(b)配子体的染色体及它们(c和d)的核型分析 Fig. 1 Chromosome images of the male(a) and female(b) gametophytes of *S. japonica* and the analysis of the karyotypes of male(c) and female(d) gametophytes



图 2 海带孢子体的染色体 Fig. 2 Chromosome image of S. japonica sporophytes

总而言之,对海带配子体经过秋水仙素及多种酶组合的处理,高位滴片后,DAPI染色结果显示,可以获得较为理想的染色体分裂相。海带雌、雄配子体的染色体均为31条,孢子体的染色体为62条,呈短杆状或点状,并依大小顺序对配子体染色体的核型进行了初步分析,这为海带分子标记的染色体定位等细胞学研究奠定了良好的技术基础。

主要实验工作是在中国科学院遗传与发育研 究所韩方普研究员的实验室内完成,特此致谢。

参考文献:

- [1] 张学成,秦松,马家海,等.海藻遗传学[M].北京:
 中国农业出版社,2005:128-165.
- [2] Yabu H. Alternation of chromosomes in the life history of *Laminaria japonica* Aresch. [J]. Bulletin of the Faculty of Fisheries, Hokkaido University,

http://www.scxuebao.cn

1973,23(4):171-176.

1期

- [3] 戴继勋,方宗熙.海带孤雌生殖的初步观察[J].遗 传学报,1976,3(1):32-38.
- $\begin{bmatrix} 4 \end{bmatrix}$ 戴继勋,方宗熙.海带的染色体[J].遗传学报, 1977, 4(4): 325 - 328.
- [5] Yabu H. Yasui H. Chromosome number in four species of *Laminaria* (Phaeophyta) [J]. Japanese Journal of Phycology, 1991, 39(2):185-187.
- [6] Yabu H, Yotsukura N. Notes to nuclear division in the gametophytes and young sporophytes of Laminaria religiosa Miyabe [J]. Japanese Journal of Phycology, 1995, 43(3):221 - 224.
- [7] Yasui H. Chromosome numbers and a sex chromosome of Laminaria yendoana Miyabe (Phaeophyta) [J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1992, 58(7):1385.
- [8] Naylor M. Cytological observations on three British species of Laminaria: a preliminary report [J]. Annals of Botany, 1956, 20(79): 431-437.
- [9] Zhou L R, Dai J X, Shen S D. An improved chromosome preparation from male gametophyte of Laminaria japonica (Heterokontophyta) [J]. Hydrobiologia, 2004, 512(1-3): 141 - 144.
- [10] Evans L V. A large chromosome in the laminarian nucleus[J]. Nature, 1963, 198(4876): 215.
- [11] Evans L V. Cytological studies in the Laminariales [J]. Annals of Botany, 1965, 29(116):541 – 562.
- $\lceil\,12\,\rceil$ $\;$ Evans L V. The Phaeophyceae (Part $\;I$) [M] $/\!/$ Godward M B E (ed.). The Chromosomes of the Algae, London: Edward Arnold (Publisher) Ltd., 1966:122 - 148.
- [13] Zhang P, Friebe B. FISH on plant chromosomes [M] // Liehr T (ed.) Fluorescence in situ Hybridization (FISH)-Application Guide, Berlin: Springer-Verlag, 2009:365-394.

- [14] 周志刚,吴超元.海带无性繁殖系的形成及孢子体 诱导[J]. 生物工程学报,1998,14(1):109-111.
- [15] Starr R C, Zeikus J A. UTEX-The culture collection of algae at the University of Texas at Austin [J]. Journal of Phycology, 1993, 29(suppl.): 1 - 106.
- [16] Li D P, Zhou Z G, Liu H H, et al. A new method of Laminaria japonica strain selection and sporeling raising by the use of gametophyte clones [J]. Hydrobiologia, 1999, 398/399(1): 473-476.
- [17] Liu W S, Tang Y L, Liu X W, et al. Studies on the preparation and on the properties of sea snail enzymes [J]. Hydrobiologia, 1984, 116/117 (1): 319 - 320
- [18] Hu Y J, Zhou Z G. Extraction of RAPD-friendly DNA from Laminaria japonica (Phaeophyta) after enzymatic dissociation of the frozen sporophyte tissues [J]. Journal of Applied Phycology, 2001, 13 $(5) \cdot 415 - 422.$
- [19] Olivera L, Bisalputra T, Antia N J. Ultrastructural observation of the surface coat of Dunaliella tertiolecta from staining with cationic dyes and enzyme treatments [J]. New Phytologist, 1980, 85 (3):385 - 392.
- [20] Peterfi L S, Manton I. Observations with the electron microscope on Asteromonas gracilis Atariemend. (Stephanoptera gracilis (Artari) Wisl.) with some comparative observations on *Dunaliella* sp. [J]. British Phycological Bulletin, 1986, 3(3):423-440.
- [21] Lin M S, Comings D E, Alfi O S. Optical studies of the interaction of 4', 6-diamidino-2-phenylindole with DNA and metaphase chromosomes [J]. Chromosoma, 1977, 60(1):15-25.
- [22] 吴超元,索如瑛. 形态、生殖和生活史[M]//曾呈 奎,吴超元.海带养殖学.北京:科学出版社,1962: 14 - 33.

Karyological observation on *Saccharina japonica* chromosomes stained with DAPI

LIU Yu, BI Yan-hui, ZHOU Zhi-gang*

(Key Laboratory of Genetic Resources and their Applications in Aquaculture, Aquaculture E-Institute of Shanghai Municipal Education Commission, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: *Saccharina japonica* (Aresch.) C. E. Lane, C. Mayes et G. W. Saunders (= *Laminaria japonica* Aresch.) (Phaeophyta) is an important economic seaweed in China. There is a distinct outcome about the chromosome number in this kelp due to the tiny size of these chromosomes. The karyotypes and chromosomes of *S. japonica* were observed after a series of treatments including pretreatment with 0. 2% colchicines for about 10 h, Carnoy's fixative, and mixture of enzymes prior to dropping from 30 cm height overhead glass slides for spreading the surface coat. The prepared chromosomes were stained with 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), a fluorescent probe sensitive and specific to DNA. The chromosome numbers of the haploid male and female gametophytes were 31, respectively, and there were 62 in diploid sporophytes. Most of the chromosomes were either droplet or short bacilliform. In the meantime, the female gametophyte chromosomes were between 0. 78 μ m and 2. 61 μ m in size, larger than the males that were between 0. 57 μ m and 2. 17 μ m. Based upon the relative size of chromosome, the karyotypes of the female or male gametophyte chromosomes were primarily analyzed. All the results laid a solid foundation for a basic technique for localization of molecular markers on kelp chromosomes.

Key words: *Saccharina japonica*; gametophyte; DAPI; chromosome; karyotype; sporophyte **Corresponding author**: ZHOU Zhi-gang. E-mail;zgzhou@shou. edu. cn