

杜氏藻属四个种的核型分析

曹毅¹ 蒋彦² 乔代蓉¹ 陈英³ 杨滔⁴

(1. 四川大学生命科学学院草原生物工程国家实验室, 四川 成都 610064; 2. 四川农业大学, 四川 雅安 625014;
3. 成都华神集团股份有限公司, 四川 成都 610070; 4. 四川川大光耀生物工程有限公司, 四川 成都 610064)

摘要: 采用染色体分带方法对杜氏藻属(*Dunaliella*) 4个种的核型进行分析。经过 25℃ 12 h d⁻¹ 的光周期诱导, 杜氏藻属 4个种出现同步化生长。用 0.05%秋水仙素处理, 再经低渗、固定和高位(60 cm)滴片, 获得杜氏藻属 4个种的核型。结果表明: 杜氏藻属 4个种都是单倍体, 其染色体大多为短杆状、极小。染色体数分别是: *D. salina* n=13, *D. primolecta* n=20, *D. bardawil* n=10, *D. parva* n=16。它们大都可见较明显的初级缢痕, 且都在染色体的中部。

关键词: 杜氏藻属; 核型; 染色体数目; 藻类

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-3395(2002)03-0229-06

The Karyotypes of Four *Dunaliella* Species (Algae)

CAO Yi¹ JIANG Yan^{1,2} QIAO Dai-rong¹ CHEN Ying³ YANG Tao⁴

(1. National Lab. for Grassland Biotechnology, Sichuan University, Chengdu 610064, China; 2. Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China; 3. Chengdu Hoist Inc., LTD., Chengdu 610070, China;
4. Kaiya Biotechnological Corporation of Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: The karyotypes of four species of *Dunaliella* were analyzed using Giemsa staining method. The organisms were cultured in Ben-Amotz medium with 1.5 mol/L NaCl at 25℃ in a 12/12 h light-dark cycle for three days to induce synchronous growth of the algae. The karyotypes were observed after a series of treatments including pretreatment with 0.05% colchicine for 12-16 h, hypoosmotic shock, fixation, and dropping from 60 cm high to glass slide for breaking the surface coat of *Dunaliella* cells. All species observed are haploid with short and bacilliform chromosomes. The chromosome numbers of *Dunaliella* species are n=13 in *D. salina*, n=20 in *D. primolecta*, n=10 *D. bardawil*, and n=16 *D. parva*. All the chromosomes are with median centromere, and the primary constrictions were obvious.

Key words: *Dunaliella*; Karyotype; Chromosome number; Alga

杜氏藻属属于绿藻门、绿藻纲、团藻目、多毛藻科^[1,2]。美国国立卫生研究院生物技术信息中心(NCBI)的数据库^[3]将杜氏藻单列为一科—杜氏藻科(*Dunaliellaceae*), 其中

收稿日期: 2001-10-12 接受日期: 2002-01-28

基金项目: 国家转基因植物及产业化专项(J00-A-008-09); 国家自然科学基金(39780018); 四川省重点项目的资助

Dunaliella salina, *D. sp.*, *D. bardawil*, *D. parva*, *D. bioculata* 5 种均归于杜氏藻属, 但 *D. primolecta* 并未被收录。杜氏藻属的细胞形态像衣藻 (*Chlamydomonas*), 通常为卵圆形, 当外界渗透压发生改变时, 可变为球形至纺锤形, 具有两条等长的鞭毛和一个杯状叶绿体^[4-6]。在盐生杜氏盐藻 (*D. salina*)、双杜氏盐藻 (*D. bioculata*) 等种类中, 叶绿体的外缘可累积大量的 β -胡萝卜素, 使细胞呈红色, 而不是绿色^[7,8]。杜氏藻属的繁殖有营养繁殖和有性生殖两种。营养繁殖为纵裂, 一定条件下也可形成胶群体。由于杜氏藻属细胞外有一层坚韧的以糖蛋白为主的弹性外被, 使得细胞不易破碎, 也成为对该物种进行核型分析的一个难点。目前, 关于杜氏藻属核型的研究报道较少, 游兰英等对杜氏藻的同步化生长及核型进行过分析^[9]。本文选择了杜氏藻属的 4 个种进行核型分析, 为下一步进行基因定位做准备。

1 材料和方法

藻种 杜氏藻属 4 个种为 *D. salina*, *D. bardawil*, *D. primolecta*, *D. parva*, 由本试验室保存。

藻体培养 采用 Ben-Amotz^[8] 的 1.5 mol/L NaCl 培养基, pH 为 7.5, 温度 25℃, 光强 2 000 lx, 光/暗周期 12 h/12 h。采用血球计数板每隔 8 h 取样统计藻细胞个数, 每次每个样品 6 个重复, 取其平均值。

处理和制备 当出现同步化生长且浓度达到一定值 (2×10^6 个 ml^{-1}) 后, 再光照 10 h, 离心浓缩一次, 加入秋水仙素母液至终浓度 0.05%, 处理 12-16 h, 离心得藻沉淀。以 1% 柠檬酸钠制成藻悬液, 室温下低渗 3 h, 滴加少许固定液 (甲醇:冰乙酸 = 3:1), 摇匀, 静置片刻后离心。以新鲜固定液处理 2-3 次 (每次 6 h)。取已固定藻液从 60 cm 高度滴在预冷载玻片上, 火焰干燥, Giemsa 染色, 晾干后在日产 Olympus 显微镜下观察, 拍照并进行放大、测量, 分别计算各藻种染色体的相对长度。

染色体计数 对每个藻种随机计数 50-100 个染色体组, 以确定杜氏藻属各个种的染色体数目。

核型分析 染色体按从大到小的顺序排列, 相同长度的染色体, 以短臂长的在前, 各染色体短臂向上, 端部着丝点染色体的着丝点向上。依据臂率将染色体分为: 端部着丝点染色体 (ot), 次端部着丝点染色体 (st), 中部着丝点染色体 (M), 次中部着丝点染色体 (sm), 染色体编号按 1, 2, 3……顺序进行。

2 结果和讨论

2.1 细胞浓度

每隔 8 h 对杜氏藻属 4 个种的细胞进行计数, 细胞浓度变化见图 1。从图中可以看出: 杜氏藻属 4 个种细胞的生长呈“S”形曲线, 其中 *D. salina*、*D. primolecta* 和 *D. parva* 在接种的第 3 天进入对数生长期, 第 6 天进入稳定期, 细胞量分别达到 3.73×10^6 个 ml^{-1} 、 3.01×10^6 个 ml^{-1} 、 2.55×10^6 个 ml^{-1} 。而 *D. bardawil* 的生长相对较弱, 在接种的第 4 天才进

入对数期,细胞量为 1.72×10^6 个 ml^{-1} 。4种盐藻的细胞浓度均达到进行核型分析的要求。

2.2 藻种生长的同步化处理

细胞同步化是指在自然过程中发生的,或经人为处理造成的细胞周期同步化。为了深入研究细胞周期各时相发生的变化及调控机理,常需对细胞周期的不同时期进行生化、形态或其他生物学的分析研究。对藻类的核型分析必须获得大量有丝分裂中期的细胞。因为杜氏藻是光能自养生物,需要光合作用合成葡萄糖,用以生长和繁殖。本试验采用光周期诱导的方法使杜氏藻的生长实现同步化,当进入暗周期时,细胞由于不能进行光合作用,缺乏足够的能量,致使有丝分裂停止,但进入光周期时,细胞重新恢复分裂。如此反复多次,可使杜氏藻属4个种的生长实现同步化。

从图1可见,在细胞生长进入对数生长期前的缓慢生长阶段,光周期对于细胞生长的影响不大,而在进入对数生长期后,在光照阶段的前8h中,生长曲线迅速上升。在光照阶段的后4h和黑暗阶段的头4h中,生长继续上升,但到了黑暗阶段的后8h,细胞生长则缓慢下来,亦即,细胞经过12h光照和12h暗处理的光周期诱导,在第3天进入同步生长。说明杜氏藻属的4个种已被成功地诱导了同步化生长。由于在生长的延滞期就开始了光周期调控,对细胞进行同步化诱导,因此在进入指数生长期,表现出了“Z”形的同步化生长特征,达到了核型分析需要大量有丝分裂中期的同步化细胞的要求。

2.3 关于预处理

秋水仙素处理时间 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影响^[10,11]。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;处理时间过长,造成染色体缩得过短,成为极小的圆点状,体现不出各染色体之间的差异,无法进行核型分析。实验表明,这4种藻虽然同为一属,但所需的秋水仙素处理时间有所差异。*D. primolecta* 需要处理15-16h才能见到短杆状的染色体,而其余3种处理15-16h时,染色体已成为无法分辨的圆点状,合适的处理时间为12-13h。

低渗时间 低渗的目的是使染色体分离,而且让细胞处于破裂的临界点。低渗得好的材料是细胞不破,但一滴到玻片上就破,可使染色体散开。低渗的好坏取决于低渗时间,过长会造成染色体的丢失,过短则染色体分不开。试验表明,在25℃下,3h的低渗

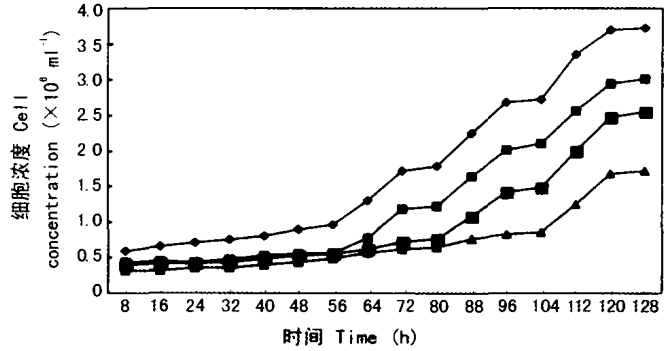


图1 杜氏藻属4个种的细胞浓度变化
Fig. 1 Cell concentration of four *Dunaliella* species at growth duration

◆ *D. salina*; ■ *D. primolecta*; ▲ *D. bardawil*; ● *D. parva*

时间是最理想的。

滴片 虽然杜氏藻缺乏细胞壁,但由于对高盐等极端环境的长期适应,其细胞上有一层坚韧的由糖蛋白构成的外被^[12]。采用 0、20、40 cm 的低中位滴片都不能产生大量的分散良好的染色体组,而采用 60 cm 的高位滴片,则能有效地打破其细胞外被和核膜,获得分散良好的染色体组。

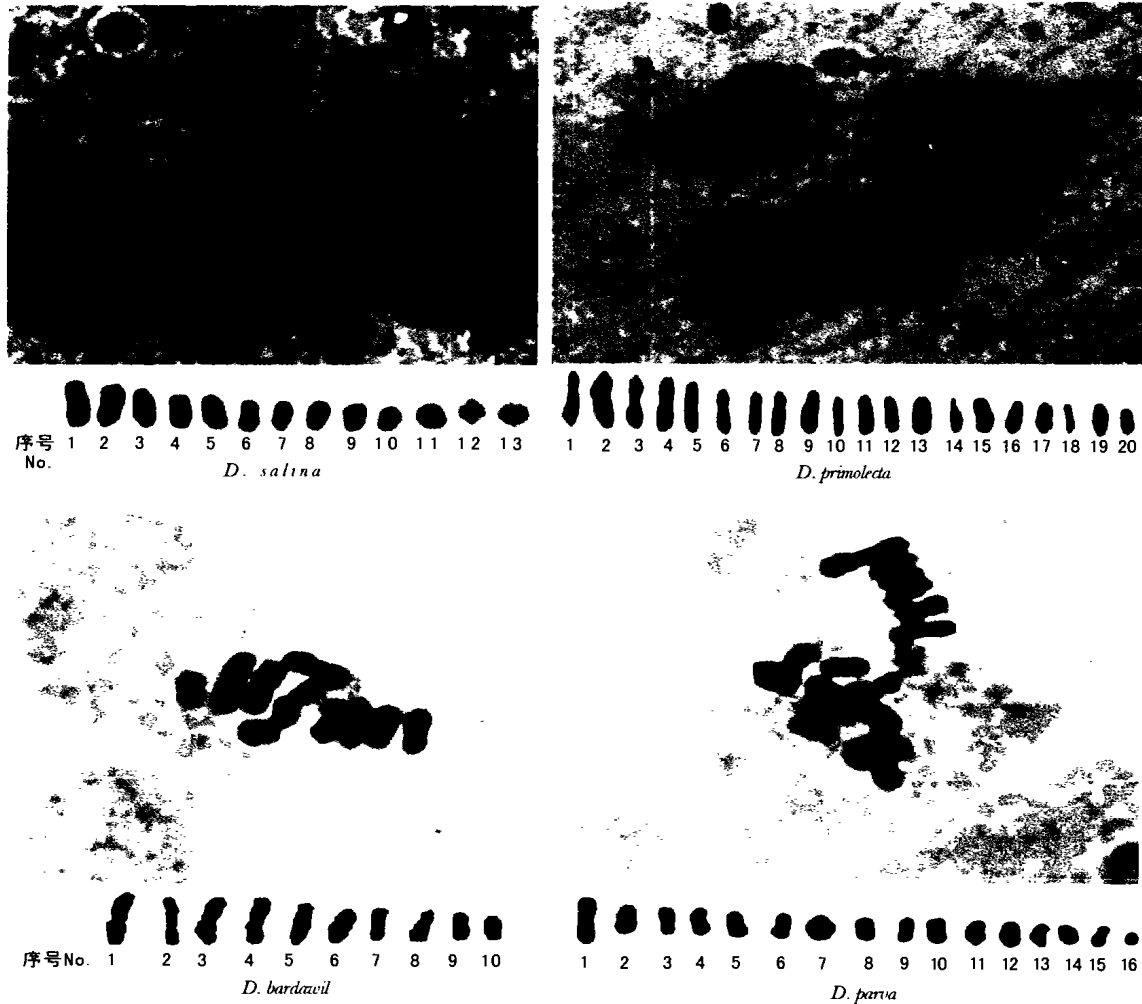


图 2 杜氏藻属 4 个种的染色体和排序($\times 2\ 500$)

Fig.2 Chromosomes of *Dunaliella* ($\times 2\ 500$)

2.4 核型分析

对杜氏藻属 4 个种的染色体核型分析发现,每个藻种的染色体数目都以某个数字占绝对优势,因而以此作为该藻的染色体数目。对每个藻种 50–100 个染色体组进行统计分析,得出它们均为单倍体,染色体数分别为: *D. salina* $n=13$, *D. primolecta* $n=20$, *D.*

bardawil n=10, *D. parva* n=16。游兰英等^[9]发现 *D. parva*, *D. bioculata*, *D. peircei* 和 *D. minuta* 的染色体数目分别为 n=16, n=22, n=26 和 n=28, 其中 *D. parva* 的研究结果是一致的。说明杜氏藻属种间的染色体数目有较大差异。

由于染色体标本制备过程中, 普遍应用药物进行预处理, 处理条件不同, 染色体缩短程度也不同^[13]。因此所测得的同一物种的染色体绝对长度往往差异较大, 但是根据绝对长度计算出的相对长度则比较接近, 即同种个体间染色体的相对长度保持稳定。4个种的有丝分裂中期各染色体的相对长度见表1。最大与最小染色体相对长度的比值分别是: *D. salina* 2.00, *D. primolecta* 2.12, *D. bardawil* 2.10, *D. parva* 4.13, 都比较小。这说明每一种藻的每一条染色体长

表1 杜氏藻属4个种的染色体相对长度

Table 1 Relative length of chromosomes of *Dunaliella* species

染色体序号 No.	染色体相对长度 Relative length (%)			
	<i>D. salina</i>	<i>D. primolecta</i>	<i>D. bardawil</i>	<i>D. parva</i>
1	11.11	6.82	14.22	11.70
2	10.00	6.55	13.05	6.94
3	9.62	6.55	12.35	6.68
4	8.89	6.42	11.19	6.68
5	8.52	6.28	9.79	6.43
6	7.40	5.48	9.32	6.42
7	7.40	5.48	7.92	6.30
8	7.04	5.35	7.92	6.30
9	6.66	5.21	7.46	6.17
10	6.30	4.81	6.76	6.17
11	5.92	4.68		5.91
12	5.56	4.68		5.78
13	5.56	4.54		5.66
14		4.41		5.14
15		4.28		4.88
16		4.01		2.83
17		3.88		
18		3.74		
19		3.61		
20		3.21		

度差别不大。许多染色体的长度相当接近, 如 *D. salina* 的第6、7号、第12、13号染色体, *D. primolecta* 的第2、3号、第6、7号、第11、12号染色体, *D. bardawil* 的第7、8号染色体, *D. parva* 的第3、4号、第5、6号、第7、8号、第9、10号染色体等, 由此增加了排序的难度。也许利用染色体分带技术能够更好地进行核型分析。

除 *D. salina* 的11、12、13号染色体, *D. parva* 的7、16号染色体为圆点状, 无法辨认出着丝点外, 其余染色体都为短杆状, 可见清晰的初级缢痕, 且都为中部着丝点染色体。所有染色体都不具随体(图2)。

参考文献:

- [1] 陈峰, 姜悦. 微藻生物技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [2] Bold H C, Wynne M J. Introduction to Algae [M]. 2nd ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1985.
- [3] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html> [DB/OL].
- [4] Ginzburg M. *Dunaliella*: a green alga adapted to salt [J]. Adv Bot Res, 1987, 14:93-183.
- [5] 刘广发, 楼士林. 杜氏盐藻超微结构研究 [J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1993, 32(3):351-355.
- [6] Schaechter M, Delamaler E D. Mitosis of *Chlamydomonas* [J]. Amer J Bot, 1955, 42(5):417-422.
- [7] 赵学武. 养殖盐藻生产β-胡萝卜素的研究概况 [J]. 海洋药物, 1986, 3:48-83.
- [8] Ben-Amotz A, Avron M. Accumulation of metabolites by halotolerant algae and its industrial potential [J]. Annu Rev Microbiol, 1983, 37:95-119.
- [9] 游兰英, 刘广发, 林建明. 杜氏盐藻同步化生长及核型分析 [J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1997, 36(2):276-281.
- [10] Olivera L, Bisalpultra N N, Antia N J. Ultrastructural observation of the surface coat of *Dunaliella tertiolecta* from

- staining with cationic dyes and enzyme treatments [J]. *New Phytol*, 1980, 85:385-392.
- [11] Peterfi L S, Manton I. Observations with the electron microscope on *Asteromonas gracilis* Atari emend. [*Stephanoptera gradilis* (Atari) Wisl.] with some comparative observations on *Dunaliella* sp. [J]. *British Phycol Bull*, 1968, 3:423-440.
- [12] Melkonian M, Preisig H R. An ultrastructural comparison between *Spermatozopsis* and *Dunaliella* (Chlorophyceae) [J]. *Plant Syst Evol*, 1984, 146:31-46.
- [13] Borowitzka M A, Borowitzka L J. *Dunaliella* [A]. In: *Microalgae Biotechnology* [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1988.

《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》(CDMD)总体介绍

学位论文与期刊、图书、报纸等文献资料一样,是记载人类创造的知识信息的一种重要文献类型。世界各国的文献信息机构都很重视对它的收藏与开发利用。我国在博硕士学位论文的收集、整理、开发方面已取得了积极的成果,但远不能满足国家信息化建设的要求。CDMD由中国学术期刊(光盘版)电子杂志社与清华同方光盘股份有限公司共同研制,得到了国务院学位办与全国近 300 家博士培养单位的大力支持与协助。CDMD 具有覆盖学科广(理工、农林、医卫、社会科学各学科)、文献量大(2000-2001 年的论文全文近 30 000 册,其中“211 工程”高校的收录率达 80%)、收录质量高、全文收录、每日更新、使用方式灵活等特点,是我国最具权威的优秀博硕士学位论文全文数据库。CDMD 按学科划分为 9 大专辑出版(见下表),今后,每年增加论文全文 20 000 册。

代码	专辑名称	专辑光盘	学科范围
M-A	理工辑 A (数理科学)	半年刊	数学 力学 物理 生物 天文 地理 测绘 资源 气象 水文 海洋 地质 地球物理学
M-B	理工辑 B (化学化工能源与材料学)	半年刊	化学 化工 矿冶 石油 天然气 金属及金属工艺 煤炭 轻工 劳动保护 环境 材料
M-C	理工辑 C (工业技术)	半年刊	工业通用技术设备 机械 仪表 航空 航天 交通运输 水利工程 农业工程 建筑 动力 原子能技术 电工技术
M-D	农业辑	半年刊	农业基础科学 农艺学 植保 农作物 园艺 林业 畜牧 动物医学 狩猎 蚕蜂 水产 渔业
M-E	医药卫生辑	半年刊	预防医学与卫生学 基础医学 临床医学 中医 中药 药学 生物医学工程
M-F	文史哲辑	半年刊	文学 艺术 旅游 历史 哲学 宗教 体育 人物传记
M-G	经济政治与法律专辑	半年刊	经济学 商贸 金融 保险 政论 党建 外交 军事 法律
M-H	教育与社会学综合辑	半年刊	社会科学研究方法 社会学 民族学 人口学 人才学 各级各类教育
J-I	电子技术与信息科学辑	半年刊	无线电 计算机 自动化 新闻与传媒 图书情报 档案

检索系统:

- 1) 提供 CNKI 知识库分类导航与学科专业导航两套导航检索系统;
- 2) 提供关键词、中文题名、副题名、中文摘要、作者姓名、导师、全文、引文等基本检索功能;
- 3) 提供初级检索与高级检索两套检索界面,支持二次检索、多种逻辑组合检索等专业检索功能;
- 4) 提供中文简体、中文繁体 and 英文检索三种检索界面,支持中英文对照和中文简繁对照检索;
- 5) 提供论文全文的在线浏览、全文下载、保存、打印等功能,提供摘录功能。

使用方式:

1. 网上包库服务(WEB 方式): 读者直接登录 CNKI 数据库交换服务中心网站(全国共有 10 个)进行检索;
2. 镜像站点方式: 将 CDMD 数据库系统安装到用户单位的内部网络服务器上,读者在内部网上进行检索;
3. 全文光盘方式: 将 CDMD 全文光盘(DVD 格式)安装在本单位的计算机或局域网上使用。

更新周期: CNKI 数据库交换服务中心网站数据每日更新,镜像站点通过互联网或卫星每日更新,光盘每半年出版一期。

软件环境: 用户端: Window 95/98/ME/2000/NT/XP 服务器端: Window 2000/NT/XP

愿 CDMD 成为您科研和教学的好帮手。希望社会各界共同关心中国知识基础设施工程(简称 CNKI 工程),对我们的产品和服务提出宝贵的意见和建议。全国免费咨询热线: 8008100946 地址: 北京清华大学毕业大厦 1300 室 通信地址: 北京清华大学 84-48 信箱 邮编: 100084 联系人: 张莉 联系电话: 010-62791829/30/31 E-mail: qklw@cnki.net 详情请访问: CNKI 电信全国中心 <http://www.cnki.net> CNKI 教育全国中心 <http://www.edu.cnki.net>

中国学术期刊(光盘版)电子杂志社 清华同方光盘股份有限公司 光盘国家工程研究中心