



海带配子体细胞核及胞质分裂的显微观察

郑倩¹, 乔亚明¹, 毕燕会¹, 周志刚^{1,2*}

(1. 上海海洋大学, 水产遗传资源开发利用教育部重点实验室, 上海 201306;

2. 上海海洋大学, 国家海洋生物科学国际联合研究中心, 上海 201306)

摘要: 在人工培养条件下, 海带配子体能够进行有丝分裂以形成无性繁殖系(克隆)。为分析海带配子体克隆有丝分裂的细胞学特征。本实验首先制备海带配子体石蜡切片, 利用免疫荧光技术, 结合 DAPI 染色, 获得其核分裂各期的细胞结构变化图像。结果显示, 通过 DAPI 染色, 清晰展示出不同分裂期核大小及形态的变化; 通过免疫荧光技术, 成功观察到由中心体发射出的纺锤丝及“钟罩”状纺锤体。随后, 制备海带配子体的超薄切片, 透射电镜下, 于细胞板的形成位置观察到由质膜内陷产生的向内生长的分裂沟。分裂沟的最前端呈现封闭的弯曲状, 其中无或仅少量细胞壁成分, 以促成向心式生长, 直至最后接触、融合和形成新的细胞壁, 完成胞质分裂。最后通过压片法制备染色体, 苏木素染色后利用 DAPI 进行复染, 获得配子体完整细胞的染色体图像, 从而进一步明确海带配子体具有 31 条染色体。研究表明, 本实验首次获得海带配子体有丝分裂完整过程(核分裂和胞质分裂)的图像和结构特征, 同时完成海带配子体完整细胞的核型分析。实验结果为海带细胞遗传学研究提供了更多准确数据, 也为褐藻胞质分裂方式及机制的探讨提供了新的材料和证据。

关键词: 海带; 配子体; 核分裂; 胞质分裂; 石蜡切片; 苏木素

中图分类号: S 917.3

文献标志码: A

海带 (*Saccharina japonica*) 是我国重要的海洋经济褐藻, 其养殖产量长期位居世界首位^[1-2], 这得益于其先进的育苗及养殖技术的建立和应用^[3]。海带配子体克隆即无性繁殖系的建立, 可用于种质保存、种苗扩繁及育种^[4-6], 为我国^[1,7] 及东亚国家^[8] 海带的育苗及育种提供了技术支撑。

配子体系海带异型世代交替生活史^[9] 中的单倍体。海带配子体克隆通过有丝分裂进行增殖, 不仅保证了遗传的稳定性^[4], 也极大地满足了海带育苗和育种对配子体质和量的需求^[5-6]。因此, 全面解析海带配子体细胞的有丝分裂过程, 对推

动海带配子体无性繁殖系育苗技术具有重要意义。对海带^[10-11] 及海带属相关物种^[12-13] 配子体有丝分裂过程虽已有一些报道, 但对其胞质分裂 (cytokinesis) 的细胞学特征却仍属未知; 另外, 利用荧光染料 4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI)^[14] 对海带染色体进行染色和观察, 虽已有染色体形态与数目的报道^[15], 但难以明确其为完整细胞的核型分析。

鉴于微管蛋白 (tubulin) 通过聚合和解聚行为参与有丝分裂过程^[16], 本研究采用商业抗 β -微管蛋白抗体对海带配子体总蛋白进行免疫印迹 (Western blot) 检测。在此基础上, 重点利用该抗

收稿日期: 2022-04-05 修回日期: 2022-04-16

资助项目: 国家自然科学基金 (32172963, 41376136); 国家“双一流”水产学科

第一作者: 郑倩 (照片), 从事藻类生物技术研究, E-mail: 17858804560@163.com

通信作者: 周志刚, 从事藻类学及生物技术研究, E-mail: zgzhou@shou.edu.cn



体及 DAPI 处理细胞周期不同阶段的海带雌、雄配子体, 以进行免疫荧光显微观察, 结合透射电镜观察结果, 获得核分裂和胞质分裂全过程的细胞学特征。对中期核进行苏木素和 DAPI 染色, 分析海带配子体中每个细胞的染色体数目和形态, 为海带细胞遗传学的研究提供数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与培养

实验材料取自本实验室扩增培养的海带配子体克隆品系 (901)。将配子体克隆接种于 PES 培养基^[17]中, 参照文献^[18], 在温度为 $(17\pm 1)^\circ\text{C}$ 、光周期为 12L : 12D (光/暗)、光照强度为 $30 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 的条件下培养。培养期间, 每天不定期摇晃。间隔 1 周更换 1 次新鲜培养基。

1.2 总蛋白的提取

使用 Radio Immunoprecipitation Assay (RIPA) 裂解液 (ThermoFisher Scientific, 美国) 按产品说明书的操作步骤, 自刚收集的海带配子体材料中提取其粗蛋白。

同时使用酚法^[19]提取海带配子体的总蛋白。即将刚收集的配子体材料在液氮中研磨至粉末, 加 15 mL 提取缓冲液 [1% 聚乙烯吡咯烷酮、0.7 mol/L 蔗糖、0.1 mol/L KCl、0.5 mol/L Tris-HCl (pH 7.5)、500 mmol/L 乙二醇四乙酸二钠、1 mmol/L 苯甲基磺酰氟和 2% 的 β -巯基乙醇], 冰浴中研磨 15~30 min 后加等体积的 Tris-HCl (pH 7.5) 饱和酚, 冰浴研磨 30 min; $10\ 000\times g$ 离心 30 min, 收集上清液; 用提取缓冲液对沉淀再提取 2~3 次, 收集上清液后加 5 倍饱和醋酸铵的甲醇溶液, -20°C 静置过夜后, $10\ 000\times g$ 离心 30 min 获得粗蛋白。

1.3 Western blot 分析

利用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测上述提取的蛋白样品。使用抗 β -微管蛋白商业抗体 (成都正能生物科技有限责任公司) 作为一抗, 孵育后, 使用带有辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG (H+L) (上海友科生物科技有限公司) 作为二抗, 按已报道的方法^[20]进行 Western blot, 以了解该商业抗体的特异性。

1.4 石蜡切片的制备

用缓冲液 (含 50 mmol/L 哌嗪-1, 4-二乙磺酸、

5 mmol/L 乙二醇双四乙酸、1 mmol/L MgSO_4 和 0.225 mmol/L 山梨醇) 配制 1.5% 多聚甲醛+0.5% 戊二醛的固定液, 对适量的海带配子体进行过夜固定; 离心去除残留的固定液, 加入甲醇溶液, -20°C 放置 10 min; 再用 $1\times\text{PBS}$ 缓冲液 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司] 清洗甲醇; 再用 1 mg/mL 的 NaBH_4 溶液 (溶于 $1\times\text{PBS}$) 处理配子体材料 20 min, 随后使用灭菌海水清洗配子体材料。

然后, 按照 Dong 等^[21]的方法经系列脱水、透明和浸蜡处理, 再将凝固的石蜡块用 RM2235 切片机 (德国徕卡公司) 切成 $7 \mu\text{m}$ 厚的切片, 使其黏附于多聚赖氨酸处理过的载玻片上。将玻片置于 25°C 的烘片机上烤片 1~2 h, 等载玻片上的水分完全蒸发, 再放入 40°C 烘箱中烤片 30 min 以加固切片, 室温避光保存备用。

1.5 用于核分裂观察的免疫荧光染色

将切片置于 60°C 烘箱处理 1 h, 先按已报道的方法^[21]进行抗原热修复; 再用 200 μL 的封闭液 (2% 的牛血清白蛋白) 将样品完全覆盖住; 室温孵育 1.5 h 后, 去除封闭液, 并在样品上滴加 200 μL 稀释过的抗 β -微管蛋白的抗体作为一抗, 4°C 过夜孵育。在避光的湿盒中, 于样品中滴加 200 μL 适当稀释的带有 Alexa Fluor[®] 488 标记的山羊抗小鼠 IgG H&L (Abcam, 英国) 作为二抗, 室温孵育 1 h 后, 清洗玻片; 滴加 20 μL 的 DAPI 溶液 (Vector Laboratories, 美国), 盖上盖玻片, 室温避光孵育 10 min。

1.6 中期核染色体的苏木素和 DAPI 染色

取新鲜的海带配子体, 经 0.02% 秋水仙素过夜处理并清洗后, 在处理的配子体中加入混合酶液 (纤维素酶: 果胶酶: 离析酶: 鲍鱼酶 = 2 : 1 : 1 : 1.5, 体积比), 于 37°C 摇床中, 以 180 r/min 振荡过夜^[15]。随后用 70% 乙醇终止酶解反应, 并用蒸馏水清洗 3 次, 加入冰醋酸振荡混匀, 4°C 保存。

将酶解产物滴加至载玻片上, 压片之前, 先用苏木素染液 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司] 覆盖酶解材料, 室温静置染色 8 min。清洗玻片并自然晾干, 在黑暗条件下, 滴加 20 μL DAPI 进行荧光染色。

1.7 荧光显微拍照与处理

利用 DM4000B 荧光显微镜 (德国徕卡公司)

在明场下观察被苏木素染色的染色体, 分别在 499 及 358 nm 的激发光下观察微管蛋白的荧光及被 DAPI 染色的染色体并拍照。根据染色体相对大小, 利用 Adobe Photoshop 软件按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。

1.8 胞质分裂的超微结构观察

取新鲜的海带配子体, 利用 8% 的多聚甲醛和 1% 的戊二醛混合溶液固定; 按照 Ouyang 等^[22]的方法, 对固定的细胞进行清洗、乙醇梯度脱水; 之后用环氧树脂 E51 包埋。切成 50 nm 厚的切片后, 用 3% 醋酸双氧铀-柠檬酸铅染色晾干, 再在 Tecnai™ G² Sprit BioTWIN 透射电镜 (FEI, 美国) 下观察并拍照。

2 结果

2.1 海带配子体微管蛋白的 Western blot

利用 RIPA 裂解液自新鲜的海带配子体中提取粗蛋白, 经 SDS-PAGE 分析, 结果显示, 在 55 ku 附近存在明显的蛋白条带 (图 1, 泳道 1), 其大小与海带 RuBisCO 大亚基 (53.97 ku) 的分子质量^[23]非常吻合, 这与陈晶等^[20]、Dong 等^[21]的结果相似。鉴于该条带的大小与海带 β -微管蛋白的推测分子质量 54.5 ku 相近 (图 1), 为了减轻高丰度的 RuBisCO 大亚基对蛋白免疫印迹产生的负面影响, 实验采用 Saravanan 和 Rose 报道的酚法提取粗蛋白^[19], 经 SDS-PAGE 检测, 结果显示, RuBisCO 大亚基处的染色较 RIPA 裂解液的结果明显变淡 (图 1)。随后, 再利用商业用抗 β -微管蛋白抗体对海带配子体的粗蛋白进行 Western blot 分析, 结果显示, 只出现单一免疫印迹信号 (图 1, 泳道 3), 这与海带 β -微管蛋白的推测分子质量也吻合, 说明所使用的抗 β -微管蛋白抗体具有良好的特异性, 可用于海带配子体细胞有丝分裂过程中微管蛋白动态变化的免疫荧光观察。

2.2 配子体有丝分裂过程中核相的动态变化

利用商用的抗 β -微管蛋白抗体, 结合 DAPI 荧光染料, 对海带配子体材料的石蜡切片进行染色, 观察其有丝分裂过程。

间期核的微管蛋白荧光染色结果显示, 除了细胞核, 绿色荧光几乎充斥于整个细胞中 (图版 I), 据此推测, 核外应具有核膜作为屏障; DAPI 染色

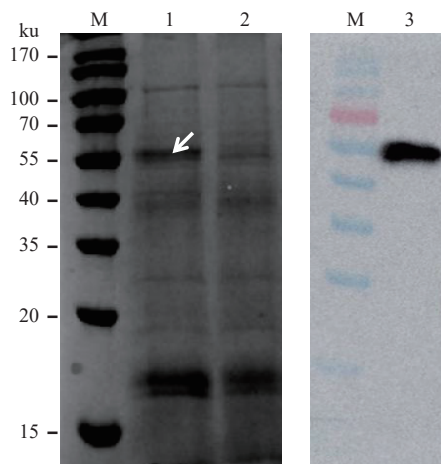


图 1 利用抗 β -微管蛋白的商业抗体对海带雌配子体总蛋白进行 Western blot 分析

M. 预染蛋白分子质量标准 (北京擎科生物科技有限公司); 1. 利用 RIPA 裂解液提取的总蛋白; 2. 利用酚法提取的总蛋白; 3. 利用抗 β -微管蛋白商业抗体对酚法提取的总蛋白进行的 Western blot; 箭头指示的是 RuBisCO 大亚基。

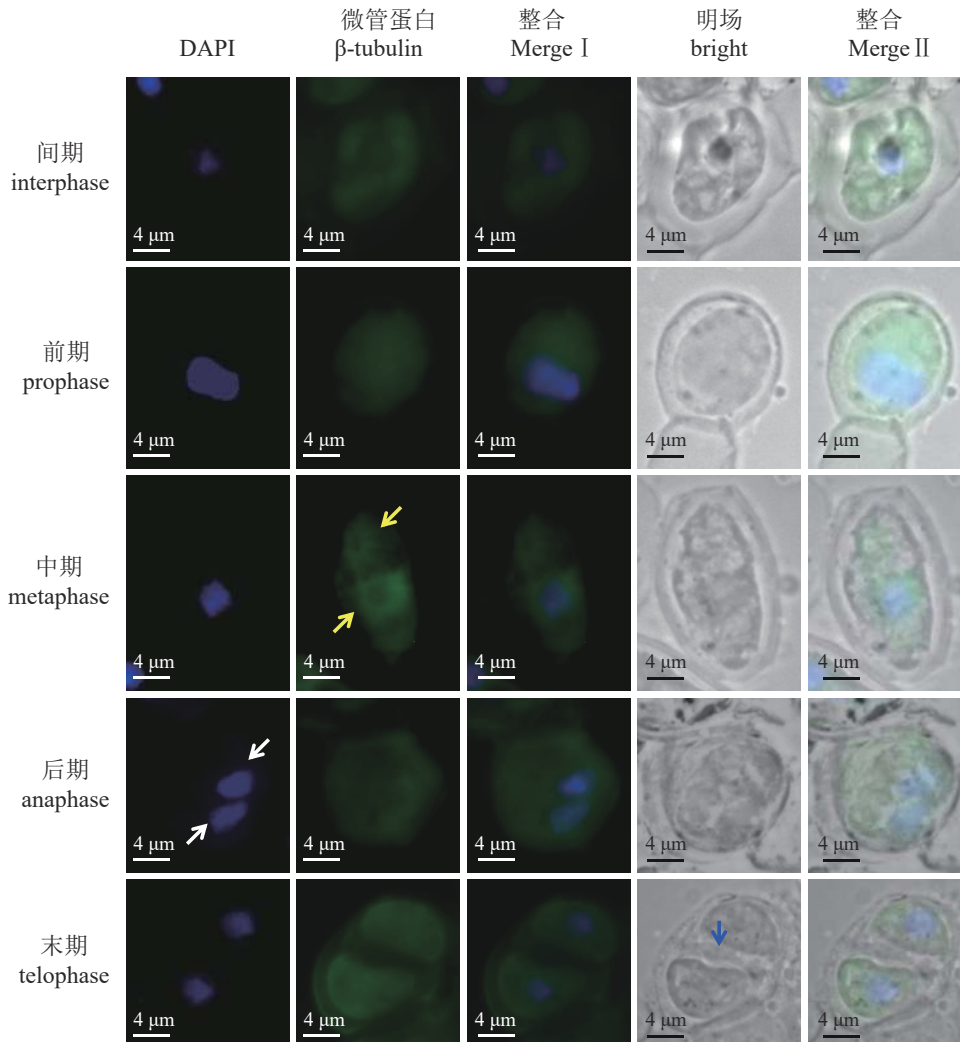
Fig. 1 Western blot analysis of the total proteins extracted from the female gametophytes of *S. japonica* using the commercially supplied anti- β -tubulin antibody

M. pre-stained protein ladder (Tsingke Biotechnology Co., Ltd.); 1. the extracted total proteins using RIPA protocol; 2. the extracted total proteins using phenol method; 3. Western blot analysis of the extracted crude proteins with phenol using the commercially supplied anti- β -tubulin antibody; the large subunit of RuBisCO was denoted by a white arrow.

的核所呈现的大小与中期、后期、末期基本一致, 但明显小于前期的, 说明此时核的遗传物质还没有完全经过复制而加倍。

在前期阶段的明场图片中未见核膜 (图版 I), 表明核膜已消失, 均匀分布的微管蛋白绿色荧光图片也说明这一点; DAPI 染色的核较间期的核显著增大, 可能因遗传物质复制加倍而致。

中期核阶段, 单个细胞中微管蛋白的绿色荧光汇聚到两处, 每个都呈现“钟罩”状, 从而组成纺锤体 (图版 I), 这与网地藻 (*Dictyota dichotoma*) 营养细胞有丝分裂^[24]及狭叶海带 (*Laminaria angustata*) 孢子形成^[25]过程中所观察到的微管结构一样。遗憾的是这两个“钟罩”可能因切片而遭受机械损伤或因切片的方向未与纺锤体平行, 致使在中期核阶段的细胞里, 没有呈现出标准的“纺锤”状^[26-27]。“钟罩”的下缘可见从中心体 (centrosome) 散发出“射线”状的纺锤丝结构, 以连接并牵引染色体。海带染色体的个体小^[15, 28-29],



图版 I 海带雌配子体有丝分裂过程的免疫荧光图像

黄色箭头. 纺锤体; 蓝色箭头. 新形成的细胞板; 白色箭头. 有丝分裂的子核。图版 II 同。

Plate I Immunofluorescence micrographs of *S. japonica* female gametophytes at different mitotic phases stained with DAPI and commercially supplied anti- β -tubulin antibody

Yellow arrow. spindle; blue arrow. the cell plate; white arrow. daughter nuclei. The same as Plate II.

因此在石蜡切片的中期核中, 难以展现其完整的形态, 后续将使用压片技术来达到此目的。

后期阶段细胞的明场中, 无法分辨胞质与核(图版 I)。但经 DAPI 染色后, 可呈现出 2 个独立的蓝色荧光团, 说明染色体经中期排队后, 在纺锤丝牵拉下已分离, 开始向母细胞的两极移动。两个分离的子核仍同处于一个母细胞中, 说明此时还未见明显的胞质分裂。

末期结果中, DAPI 染色显示, 两个细胞核均已位于母细胞的两极, 但核膜还未完全形成, 这从微管蛋白的免疫荧光充斥于整个子细胞的图片中得到印证(图版 I); 在两核之间出现新的细胞板, 表明胞质分裂正在进行; 微管蛋白的免疫

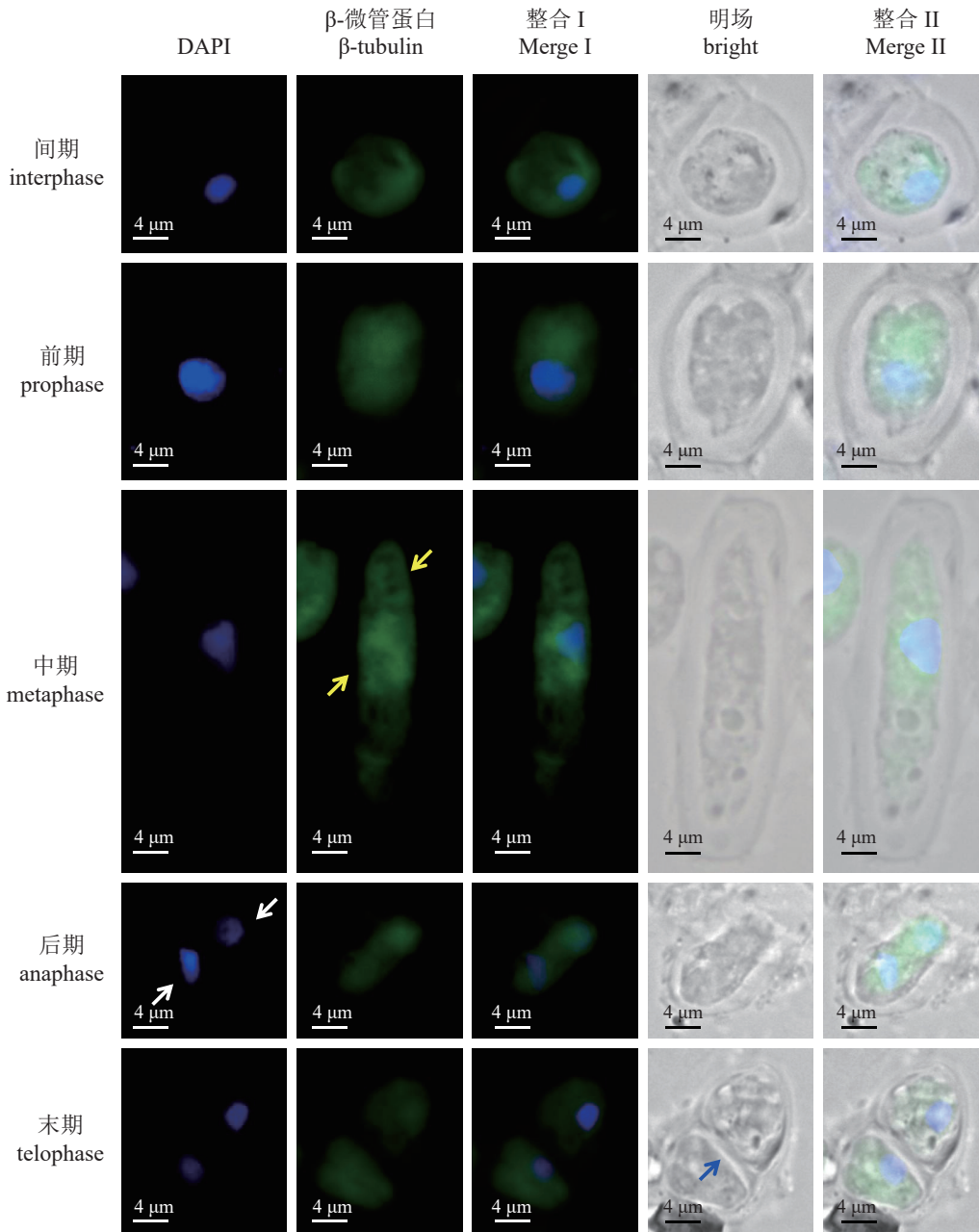
荧光染色结果显示, 这两个“棱镜”状子细胞呈现“镜面对称”, 而正在形成的细胞板类似“对称轴”, 表明该胞质分裂是均等的。

海带雄配子体细胞的有丝分裂也呈现同样的分裂方式(图版 II)。

2.3 配子体细胞胞质分裂的亚显微观察

胞质分裂是 2 个子核形成后产生新的细胞壁, 将 1 个母细胞分隔成 2 个子细胞的过程。图版 I 和图版 II 均显示了末期阶段的母细胞 2 个子核之间, 已经或正在形成新的细胞壁。

但海带配子体的新细胞壁是如何发生或胞质分裂的方式究竟如何, 至今未见相关的报道。实



图版 II 海带雄配子体有丝分裂过程的免疫荧光图像

Plate II Immunofluorescence micrographs of *S. japonica* male gametophytes at different mitotic phases stained with DAPI and commercially supplied anti- β -tubulin antibody

验使用了透射电镜进行观察。配子体细胞纵切的超微结构显示, 当子核移向母细胞两极时, 在未来新细胞板的形成位置且于母细胞壁垂直的地方因质膜内陷而产生向内生长的分裂沟(图 2, 黑色箭头指示的位置), 其最前端呈现封闭的弯曲状(图 2, 红色箭头指示的位置); 此时, 其电子密度比较深, 说明是向内生长的质膜, 无或仅有少量堆积的壁物质, 进行向心式生长, 最终实现融合,

将母细胞的胞质一分为二。由于细胞壁的存在, 海带配子体在形成分裂沟时, 未见母细胞的质膜上有明显的环形缢缩(图 2)。

2.4 配子体细胞的染色体形态与数目

实验运用压片法来制备染色体, 苏木素染色后再利用 DAPI 进行复染, 实现了优势互补。通过多张染色体片的观察, 发现单倍性的海带配子体细胞具有 31 条染色体(图版 III), 这与 Zhou 等^[30]

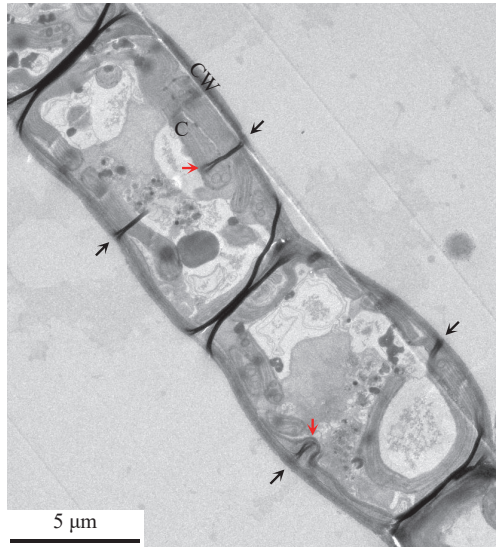


图2 海带配子体细胞纵切的超微结构图片

黑色箭头. 分裂沟发生的位置, 红色箭头. 分裂沟的最前端; CW. 细胞壁; C. 叶绿体。

Fig. 2 Ultrastructural micrograph of the longitudinally sectioned gametophyte of *S. japonica*

Black arrow. the position where the furrow initiated, the red arrow. the front of the furrow; CW. cell wall, C. chloroplast.

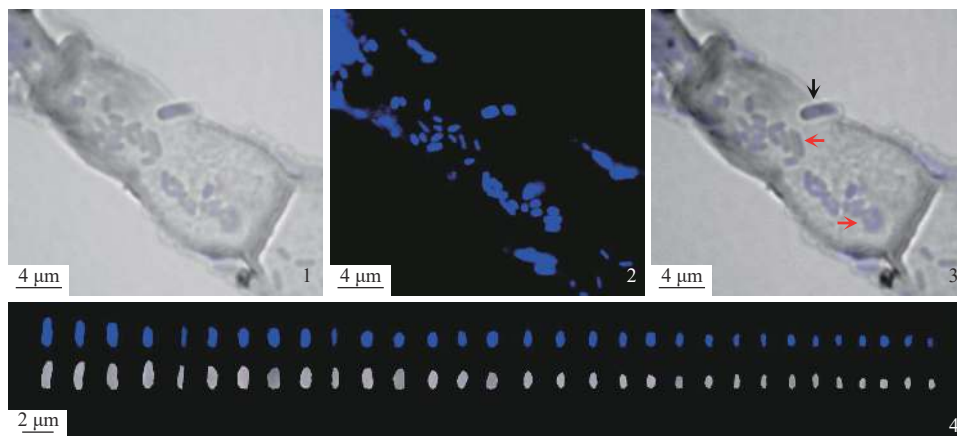
及刘宇等^[15]的结果相一致。利用 Adobe Photoshop 软件, 按照从大到小的顺序对海带配子体染色体的核型进行了初步分析, 得到染色体大小为 0.55~2.0 μm (图版 III), 与滴片法获得的结果(雄配子体为 0.57~2.16 μm; 雌配子体为 0.77~2.61 μm^[31]) 一致; 该结果与海带属其他几物种的染色体大小

也相近^[28-29]。

3 讨论

本研究采用切片替代常规压片法来观察海带配子体细胞有丝分裂过程, 其结果虽与戴继勋等^[11]对海带雌配子体核分裂的报道基本一致, 但因使用了抗 β-微管蛋白抗体及 DAPI 染色, 首次清晰地展示了不同分裂期核大小及形态的变化, 并成功地观察到由中心体发射出的纺锤丝及“钟罩”状纺锤体。这与狭叶海带孢子囊^[25]和网地藻^[24]中报道的“钟罩”状纺锤体一致。

目前, 褐藻胞质分裂主要有两种方式^[32-33]: 一种是类似动物细胞的向心式分裂, 如本研究报道的海带配子体的有丝分裂、网地藻体细胞有丝分裂^[34]、间囊藻 (*Pylaiella littoralis*) 多室配子囊形成^[35]、墨角藻 (*Fucus vesiculosus*) 多细胞胚发育^[36]、纤细马鞭藻 (*Cutleria hancockii*) 的雄配子形成^[37]、三角黑顶藻 (*Sphacelaria tribuloides*) 藻体末端细胞形成^[38]及巨藻 (*Macrocystis pyrifera*) 配子体原生质体分化^[39]; 另外一种为离心式分裂形成新壁, 如瘤状囊叶藻 (*Ascophyllum nodosum*) 藻体细胞分裂^[40]、二列墨角藻 (*F. distichus*) 合子萌发^[41]、萱藻 (*Scytosiphon lomentaria*) 合子萌发^[42]、扁鹿角菜 (*Silvetia compressa*) 合子不等分裂^[43]等。本研究观察到海带配子体分裂沟的质膜发生及向细胞中心延伸等胞质分裂过程, 为褐藻胞质离心式分裂方



图版 III 海带配子体苏木素和 DAPI 染色的显微图片及核型分析

1. 苏木素, 2. DAPI, 3. 图 1 与 2 的整合图, 4. 核型分析图。红色箭头指示分散性不太理想的染色体, 黑色箭头指示非染色体现象。

Plate III Microscopic images and karyotype analysis of *S. japonica* gametophyte sequentially stained with haematoxylin and DAPI

1. haematoxylin, 2. DAPI, 3. merged with images 1 and 2, 4. karyotype analysis; the red arrow indicates chromosomes that are less dispersive. The black arrow indicates non-chromosomal phenomena.

式提供了新的细胞学证据。但是, 海带配子体胞质向心性分裂机理仍需进一步探讨。

对于像海带等具有小染色体的褐藻^[44]来说, 准确的核型分析一直是该研究领域的难点。苏木素虽能特异地将染色体染上特殊的颜色^[45], 但若分散性不理想, 染色体就难以辨认(图版Ⅲ)。DAPI染色虽可更便于分辨染色体, 但DAPI能够结合一些核酸之外的物质^[46], 以致产生非染色体的染色现象(图版Ⅲ)。因此, 本研究选择将这两种染色方式相结合, 从而获得海带配子体完整细胞的染色体清晰图像及可靠的核型分析结果。本研究结果为解析褐藻体细胞分裂的过程和机制提供了证据。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Hu Z M, Shan T F, Zhang J, *et al.* Kelp aquaculture in China: a retrospective and future prospects[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2021, 13(3): 1324-1351.
- [2] 国家藻类产业技术体系. 海带产业发展报告[J]. 中国水产, 2021(8): 23-41.
National Algal Industry Technology System. Reports on the industrial development of *Saccharina japonica* in China[J]. *China Fisheries*, 2021(8): 23-41 (in Chinese).
- [3] Tseng C K. Algal biotechnology industries and research activities in China[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2001, 13(4): 375-380.
- [4] 方宗熙, 欧毓麟, 崔竞进, 等. 海带配子体无性生殖系培育成功[J]. *科学通报*, 1978, 23(2): 115-116.
Fang Z X, Ou Y L, Cui J J, *et al.* Clones from *Laminaria* gametophytes[J]. *Chinese Science Bulletin*, 1978, 23(2): 115-116 (in Chinese).
- [5] 杨官品, 李晓捷, 丛义周, 等. 海带配子体无性繁殖(克隆)技术研究与应用进展[J]. 中国海洋大学学报, 2007, 37(4): 569-572.
Yang G P, Li X J, Cong Y Z, *et al.* Trends in the cloning methodology of *Laminaria* gametophytes: research and application[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2007, 37(4): 569-572 (in Chinese).
- [6] Zhang Q S, Qu S C, Cong Y Z, *et al.* High throughput culture and gametogenesis induction of *Laminaria japonica* gametophyte clones[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2008, 20(2): 205-211.
- [7] Wang X L, Yao J T, Zhang J, *et al.* Status of genetic studies and breeding of *Saccharina japonica* in China[J]. *Journal of Oceanology and Limnology*, 2020, 38(4): 1064-1079.
- [8] Hwang E K, Yotsukura N, Pang S J, *et al.* Seaweed breeding programs and progress in eastern Asian countries[J]. *Phycologia*, 2019, 58(5): 484-495.
- [9] 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.
Wu C Y, Suo R Y. Morphology, reproduction and life history[M]//Zeng C K, Wu C Y. Manual of haidai cultivation. Beijing: Science Press, 1962: 14-33 (in Chinese).
- [10] Yabu H. Early development of several species of Laminariales in Hokkaido[J]. *Memoirs of the Faculty of Fisheries Hokkaido University*, 1964, 12(1): 1-72.
- [11] 戴继勋, 方宗熙. 海带雌配子体和幼雌孢子体的细胞分裂[J]. 山东海洋学院学报, 1979(1): 123-127.
Dai J X, Fang Z X. Mitosis in the female gametophyte and juvenile sporophyte of *Laminaria japonica*[J]. *Journal of Shandong College of Oceanology*, 1979(1): 123-127 (in Chinese).
- [12] Yabu H, Sanbonsuga Y. Mitosis in the female gametophytes and young sporophytes of *Laminaria diabolica* f. *longipes* Miyabe et Tokida[J]. *Bulletin of the Faculty of Fisheries Hokkaido University*, 1990, 41(1): 8-12.
- [13] 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): 219-222.
- [14] 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.
- [15] 刘宇, 毕燕会, 周志刚. 海带染色体的DAPI染色及核型初步分析[J]. 水产学报, 2012, 36(1): 50-54.
Liu Y, Bi Y H, Zhou Z G. Karyological observation on *Saccharina japonica* chromosomes stained with DAPI[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(1): 50-54 (in Chinese).
- [16] Brouhard G J, Rice L M. Microtubule dynamics: an interplay of biochemistry and mechanics[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2018, 19(7): 451-463.
- [17] Starr R C, Zeikus J A. UTEX-The culture collection of algae at the University of Texas at Austin 1993 list of cultures[J]. *Journal of Phycology*, 1993, 29(S2): 1-106.

- [18] 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.
Zhou Z G, Wu C Y. Clone culture of *Laminaria japonica* and induction of its sporophytes[J]. Chinese Journal of Bioengineering, 1998, 14(1): 109-111 (in Chinese).
- [19] Saravanan R S, Rose J K C. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues[J]. *Proteomics*, 2004, 4(9): 2522-2532.
- [20] 陈晶, 王丽丽, 石微微, 等. 海带配子体中孢子形成相关蛋白(SRP)基因的克隆及其原核表达[J]. 水产学报, 2010, 34(8): 1165-1173.
Chen J, Wang L L, Shi W W, *et al.* Cloning of *srp* gene from the gametophytes of *Laminaria japonica* and its expression in *Escherichia coli*[J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(8): 1165-1173 (in Chinese).
- [21] Dong W S, Liu P F, Liu Y, *et al.* Immunocytochemical localization of the kinetochore protein Nuf2p on the gametophyte chromosomes of a cultivar of *Saccharina* (Phaeophyta)[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2020, 7: 539260.
- [22] Ouyang L L, Du D H, Yu S Y, *et al.* Expressed sequence tags analysis revealing the taxonomic position and fatty acid biosynthesis in an oleaginous green microalga, *Myrmecia incisa* Reisingl (Trebouxiophyceae, Chlorophyta)[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2012, 57(25): 3342-3352.
- [23] Shao Z R, Liu F L, Li Q Y, *et al.* Characterization of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and transcriptional analysis of its related genes in *Saccharina japonica* (Laminariales, Phaeophyta)[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2014, 32(2): 377-389.
- [24] Katsaros C, Galatis B. Immunofluorescence and electron microscopic studies of microtubule organization during the cell cycle of *Dictyota dichotoma* (Phaeophyta, Dictyotales)[J]. *Protoplasma*, 1992, 169(1-2): 75-84.
- [25] Motomura T. Ultrastructural and immunofluorescence studies of zoosporogenesis in *Laminaria angustata*[J]. Scientific Papers of the Institute of Algological Research, Faculty of Science, Hokkaido University, 1993, 9(1): 1-32.
- [26] Nagasato C. Behavior and function of paternally inherited centrioles in brown algal zygotes[J]. *Journal of Plant Research*, 2005, 118(6): 361-369.
- [27] Katsaros C, Karyophyllis D, Galatis B. Cytoskeleton and morphogenesis in brown algae[J]. *Annals of Botany*, 2006, 97(5): 679-693.
- [28] Evans L V. A large chromosome in the Laminarian nucleus[J]. *Nature*, 1963, 198(4876): 215.
- [29] Evans L V. Cytological studies in the Laminariales[J]. *Annals of Botany*, 1965, 29(116): 541-562.
- [30] 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.
- [31] Liu Y, Bi Y H, Gu J G, *et al.* Localization of a female-specific marker on the chromosomes of the brown seaweed *Saccharina japonica* using fluorescence *in situ* hybridization[J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e48784.
- [32] Katsaros C, Nagasato C, Terauchi M, *et al.* Cytokinesis of brown algae[M]//Heimann K, Katsaros C. Advances in algal cell biology, Walter de Gruyter GmbH, Berlin, Germany. 2013: 143-160.
- [33] Nagasato C, Inoue A, Mizuno M, *et al.* Membrane fusion process and assembly of cell wall during cytokinesis in the brown alga, *Silvetia babingtonii* (Fucales, Phaeophyceae)[J]. *Planta*, 2010, 232(2): 287-298.
- [34] Mottier D M. Nuclear and cell division in *Dictyota dichotoma*[J]. *Annals of Botany*, 1900, 14(54): 163-192.
- [35] Markey D R, Wilce R T. The ultrastructure of reproduction in the brown alga *Pylaiella littoralis*. I. Mitosis and cytokinesis in the plurilocular gametangia[J]. *Protoplasma*, 1975, 85(2-4): 219-241.
- [36] Brawley S H, Quatrano R S, Wetherbee R. Fine-structural studies of the gametes and embryo of *Fucus vesiculosus* L. (Phaeophyta). III Cytokinesis and the multicellular embryo[J]. *Journal of Cell Science*, 1977, 24: 275-294.
- [37] La Claire J W II, West J A. Light- and electron-microscopic studies of growth and reproduction in *Cutleria* (Phaeophyta). II. Gametogenesis in the male plant of *C. hancockii*[J]. *Protoplasma*, 1979, 101(4): 247-267.
- [38] Katsaros C, Galatis B, Mitros K. Fine structural studies on the interphase and dividing apical cells of *Sphacelaria tribuloides* (Phaeophyta)[J]. *Journal of Phycology*, 1983, 19(1): 16-30.
- [39] Varvarigos V, Galatis B, Katsaros C. A unique pattern of F-actin organization supports cytokinesis in vacuolated cells of *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyceae) gameto-

- phytes[J]. *Protoplasma*, 2005, 226(3-4): 241-245.
- [40] Rawlence D J. Some aspects of the ultrastructure of *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis (Phaeophyceae, Fucales) including observations on cell plate formation[J]. *Phycologia*, 1973, 12(1-2): 17-28.
- [41] Belanger K D, Quatrano R S. Membrane recycling occurs during asymmetric tip growth and cell plate formation in *Fucus distichus* zygotes[J]. *Protoplasma*, 2000, 212(1-2): 24-37.
- [42] Nagasato C, Motomura T. Ultrastructural study on mitosis and cytokinesis in *Scytosiphon lomentaria* zygotes (Scytosiphonales, Phaeophyceae) by freeze-substitution[J]. *Protoplasma*, 2002, 219(3-4): 140-149.
- [43] Bisgrove S R, Kropf D L. Cytokinesis in brown algae: studies of asymmetric division in fucoid zygotes[J]. *Protoplasma*, 2004, 223(2-4): 163-173.
- [44] Lewis R J. Chromosomes of the brown algae[J]. *Phycologia*, 1996, 35(1): 19-40.
- [45] Fujii M T, Guerra M. Improved hematoxylin staining for algal cytogenetics[J]. *Biotechnic & Histochemistry*, 1998, 73(2): 78-81.
- [46] Kapuscinski J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe[J]. *Biotechnic & Histochemistry*, 1995, 70(5): 220-233.

Microscopic observations on karyokinesis and cytokinesis in the gametophytes of *Saccharina japonica*

ZHENG Qian¹, QIAO Yaming¹, BI Yanhui¹, ZHOU Zhigang^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources Conferred by Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. International Research Center for Marine Biosciences Conferred by Ministry of Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Gametophyte clones of *Saccharina japonica* can be established through the induction of mitosis in gametophytes under artificial culture conditions. However, there have been few reports on the cytological characteristics of mitosis in these clones. This study presents the first observation of the cellular structure during the mitosis phases of kelp gametophytes using paraffin sections, immunofluorescence technique coupled with DAPI staining. Changes in the size and morphology of the gametophyte nucleus during the phases of mitosis were clearly illustrated by DAPI staining. The spindle fibers, originating from the centrosome, and cage-shaped spindle were successfully visualized. Ultrathin sections revealed cleavage furrows at the positions of cell plates under a transmission electron microscope. These furrows, with closed curved front ends formed by invagination of the plasma-lemma, grew centripetally until they contacted and fused, leading to the construction of a new cell wall and completion of cytokinesis. The chromosomes of the gametophyte cell were prepared by pressing method, stained with hematoxylin and counterstained with DAPI. It was confirmed that there were 31 chromosomes in the gametophyte of *S. japonica*. The characterizations of mitosis of *S. japonica* gametophytes including karyokinesis and cytokinesis were firstly observed in the study, and chromosomes in the intact cell of gametophyte were also illustrated. It provided accurate data for the cytogenetic study of *S. japonica*, and provided new evidence for the study of cytoplasmic division of brown algae.

Key words: *Saccharina japonica*; gametophyte; karyokinesis; cytokinesis; paraffin section; hematoxylin

Corresponding author: ZHOU Zhigang. E-mail: zgzhou@shou.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (32172963, 41376136); National "Double First-class" Aquatic Science