

# 雨生红球藻的细胞周期初探\*

刘建国 殷明焱 张京浦 孟昭才 W F Bourne<sup>†</sup>

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

<sup>†</sup>(Division of Biological Sciences, Coventry University, Coventry CV1 5FB, UK)

**提要** 于 1997 年在青岛利用显微镜连续观察技术研究了雨生红球藻的细胞繁殖方式和动力学。结果表明,该藻细胞周期分为游动和不动 2 个阶段。每一阶段主要以无性生殖产生孢子的方式完成增殖。正常条件下游动细胞主要产生 2、4 个,偶尔产生 8 个游动孢子,孢子从孢子囊释放后成为游动细胞。环境不适时游动细胞以及游动孢子失去鞭毛转入不动阶段。不动细胞主要形成 4、8 个,偶尔也能形成 20 多个不动孢子,该过程不一定是等速的。不动孢子发育为不动细胞。环境条件适宜时不动细胞形成 8 或 16 个游动孢子,通常个体较大的产生 16 个,而较小的产生 8 个。红球藻偶尔进行营养繁殖,游动细胞以纵裂方式而不动细胞以出芽方式产生 2 个相同的细胞。

**关键词** 红球藻 细胞周期 游动细胞 不动细胞 游孢子 不动孢子

**学科分类号** Q28

虾青素呈鲜红色具有很好开发前景 (Benemann, 1992; Foss *et al*, 1984; Kranzfelder, 1994; Sommer *et al*, 1991, 1992; Storebakken *et al*, 1987; Torrisen *et al*, 1989)。目前该色素产量远远低于市场需求,尚不能满足西欧鲑鱼养殖需求。

研究表明,虾青素在雨生红球藻中累积,可占干重 1% 以上 (Grung *et al*, 1990),有望成为新的资源,受到国际微藻学者的普遍关注。然而规模化养殖开发尚未进行,重要原因之一是没有很好地掌握其细胞周期。该藻虽为单细胞,但有复杂的演变过程,如果不了解其细胞周期,就不能更深入地探讨环境因子对其细胞繁殖动力学的影响,更难以进行人工调控、实现工业化养殖。尽管 Elliot(1934)对该藻形态和生活史作了较为全面的阐述,但限于当时条件,有些问题并没有完全弄清楚。本文对该藻的细胞周期进行研究报道,以期从基础研究方面推动该藻的开发。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验藻种

雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*), 1994 年取自中国科学院武汉水生生物研究所。

### 1.2 培养和观察方法

实验于 1997 年在中国科学院海洋研究所进行。室内人工光照和自然温度条件下培养

\* 国家自然科学基金资助项目,39500114号;国际科学基金(IFS)资助项目,AA/11043号;山东省科学技术委员会资助项目,9565号。刘建国,男,出生于1964年6月,博士,研究员,E-mail:jgliu@ms.qdio.ac.cn

收稿日期:1998-01-19,收修改稿日期:1998-08-29

红球藻,培养液的配制按张京浦等(1994)方法。在一定培养时间内取样,制作玻璃片或悬滴培养,显微镜下连续观察、摄像和自动录像。

## 2 结果和讨论

### 2.1 红球藻细胞周期中各阶段和名称界定

尽管红球藻是单细胞生物,但却是生活史复杂的微藻。通常公认其生活史中存在游动和不动二个阶段。鉴于不同文献中出现的名称较多(如游孢子、动孢子、鞭毛细胞、游动细胞、红细胞、绿细胞、胶群体、不动细胞、不动孢子、静孢子和厚壁孢子等),同时在使用上也相当混乱,多数文献在名词使用中存在不同程度的错误。因此有必要首先对名称及概念进行分类和限定。

**2.1.1 游动细胞 (motile cell)** 指游动阶段除游孢子以外的细胞形式。细胞呈卵形或椭圆形,大小从 $5\mu\text{m}$ 左右到 $20\text{--}30\mu\text{m}$ 不等,有时甚至更大些。原生质体和细胞壁之间存在较大的空间,二者通过很多分叉或不分枝的细胞质连丝相连,但是在细胞前端没有细胞连丝。原生质体前端常常呈乳头状突起。在原生质体和细胞壁之间的空隙内充满透明胶样物质。细胞具有两条等长鞭毛。鞭毛通过前端的叉状胶质管伸出细胞壁,在体外长度约等于细胞体长。能够摆动的鞭毛推动细胞自由游动。细胞核位于中央位置,核附近的一侧有眼点一个。叶绿体呈杯状、复杂的网状或颗粒状,具有典型的绿藻蛋白核。游动阶段细胞多呈绿色,有时也成红色。

**2.1.2 动孢子、游孢子 (zoospore)** 二者概念相同,含二种来源,其一由游动细胞发生无性繁殖产生的,另一类由不动孢子在适宜条件下无性生殖产生的。无论哪种途径,母细胞分裂产生子细胞,细胞壁也逐渐演化为孢子囊 (sporangium)。孢子囊逐渐膨胀,从一端破裂释放出能够游动的子细胞。将这些从在母细胞内产生起,到释放出孢子囊为止的具有游动能力的子细胞称为游孢子。严格的讲,游孢子形状和游动细胞相似属拟亲动孢子,对产生四个孢子的还可具体称为四分孢子,但为方便起见,都简称为动孢子或游孢子。

通常,游孢子(以及刚刚脱离孢子囊的游动细胞)原生质体与细胞壁靠的较近,没有很大的空间。就大小而言游孢子通常比游动细胞要小些,但是二者并没有明显的界限,这是由于游动细胞(以及不动细胞的体积)本身变化幅度很大、每个母细胞生成的子细胞多少也不一致造成的。值得指出的是,刚形成的游孢子颜色取决于母细胞(游动细胞或不动细胞)的色泽。一般来说,动孢子和原来的游动细胞颜色差不多,但较不动细胞颜色绿。该藻的颜色主要与虾青素累积量及叶绿素含量的多寡有关。

**2.1.3 鞭毛细胞 (flagellated cell)** 指红球藻所有具有鞭毛、能够游动的细胞形式、为游动细胞和游孢子的总称。该名字在文献中常出现,为一些研究人员广泛采用,但是这一概念却混淆了游动细胞和游孢子的界线,不宜在生活周期划分上采用。

**2.1.4 不动细胞 (non-motile cell)** 指不动阶段除不动孢子(或静孢子)以外的细胞形式。在名称上与游动阶段的游动细胞相呼应。不动细胞总的特征为:细胞形态呈圆形,无鞭毛,不会游动。细胞大小变化幅度较大,一般直径为 $20\text{--}30\mu\text{m}$ ,小的为 $10\mu\text{m}$ ,大的达 $50\mu\text{m}$ 。因此就细胞体积而言相差达100多倍。细胞体积变化如此大的具体原因目前尚不十分清楚,可能与其来源不同和生长发育时间不一致有关。通常,刚刚形成的不动细胞多为绿色,经过一段时间后,中央开始变成红色而外围仍然绿色,最后整个细胞呈鲜红色,故

名红球藻。

**2.1.5 不动孢子或称静孢子 (aplanospore)** 不动阶段细胞表面上不游动呈静止状态, 这并不意味着细胞不分裂, 处于“静止”的休眠状态。事实上, 该期细胞仍然能进行细胞分裂, 在母细胞内产生没有鞭毛的子细胞(孢子), 经发育后冲破胞壁释放后也不能游动。这种由不动细胞无性生殖方式产生, 到从孢子囊内释放时期的子细胞称为不动孢子或静孢子。

**2.1.6 胶群体 (palmella)** 指某些个体较小, 外被许多胶质, 胶粘成数量不定的群体 (Elliot, 1934)。事实上, 该藻每个细胞常常外被胶状外壁, 很难发现母细胞壁胶化形成带共同胶鞘的群体。即使有, 也应是含多个孢子的孢子囊。因此“胶群体”这一概念并不确切, 不宜采用。

**2.1.7 厚壁孢子 (akinete)** 指该藻有些细胞壁相对较厚的不动孢子(有的也指细胞壁较厚的不动细胞)。因为不动孢子和不动细胞的壁厚薄也是相对的, 并没有明确差别, 且从概念上讲后者含意广本身就包含了厚壁孢子, 故不适宜再增加该名称。

另外, “红细胞”和“绿细胞”等非专业名词也不宜使用。总之, 红球藻生活周期不同阶段比较规范的是游动细胞、不动细胞、动(游)孢子和不动(静)孢子 4 种形式, 以及生殖过程中形成的孢子囊。4 种形式的细胞相互演化, 构成该藻复杂的生活周期。

## 2.2 红球藻各阶段细胞的繁殖和发育趋向

正常条件下游动细胞生长发育, 以有丝分裂方式 (Mesquita *et al*, 1982) 无性生殖, 多产生并释放 2 个子细胞(或孢子), 有时为 4 个子细胞(孢子), 而产生 8 个子细胞的机会较少。无论母细胞内有 2 个还是 4 个孢子, 都能观察到鞭毛的存在, 并能自由游动, 属游孢子。经一定时间的发育, 游孢子突破孢子囊壁释放出来, 成为新的游动细胞。

环境不适时, 游动细胞或刚释放的游孢子退去鞭毛, 直接转入不动细胞阶段, 形成不动细胞。不动细胞表面上呈不游动的静止状态, 并不意味着细胞处于不分裂的休眠期。不动细胞仍然能以无性生殖方式进行细胞增殖, 形成数量不定的子细胞。不动细胞分裂的概率明显低于游动细胞。不动细胞主要内生形成 4 或 8 个子细胞(或孢子), 偶尔也能看到一个孢子囊内含有 20—32 个孢子。不动细胞的产生孢子的分裂过程并非完全是等速的, 常常观察到一个孢子囊内含 3、5、6、7 等个子细胞的情况, 并且该类型的孢子也能释放。上述孢子没有鞭毛, 从孢子囊一端冲破胞壁释放出来后也不能游动, 属不动孢子, 进一步发育为不动细胞。

当环境条件适宜时, 不动细胞发育为孢子母细胞和孢子囊, 最终孢子冲破膨大的孢子囊壁从端部逐一释放出来, 并且残留下透明外壳 (theca)。释放出的孢子具有鞭毛, 属游孢子。短暂休整后成为能够自由运动的游动细胞。通常不动细胞较大的个体产生 16 个游孢子, 而个体较小的则产生 8 个。

有的资料中介绍红球藻进行营养繁殖, 产生 2、4、8 个子细胞。这种说法存在偏差, 值得商榷, 其作者可能混淆了营养繁殖和无性繁殖的概念。在通常培养条件下, 无论该藻细胞处于游动阶段还是不动阶段, 主要是通过形成孢子囊进行无性生殖完成细胞增殖的, 即营养繁殖不是主要形式。实际上, 只有在极其个别情况下, 游动细胞(或不动细胞)才进行营养繁殖。游动细胞以直接二分裂的方式产生游动细胞; 不动细胞通过出芽方式进行营

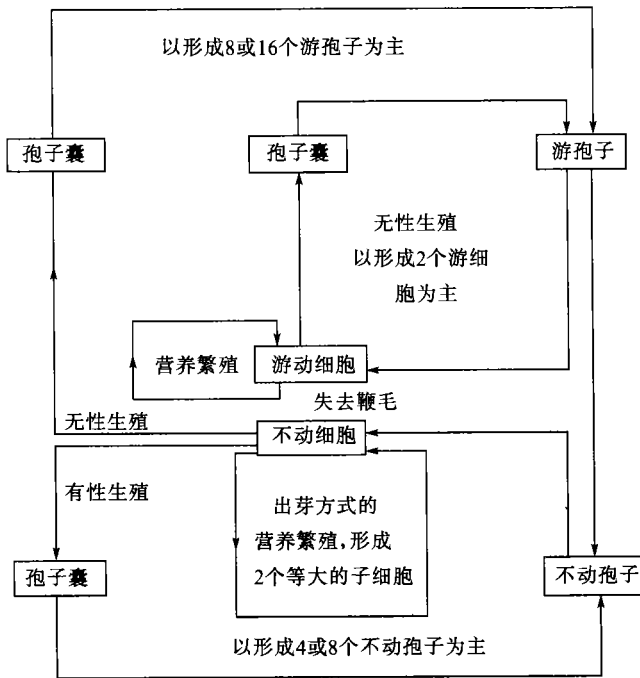
养繁殖,产生二个相同的不动细胞。至于什么样的细胞进行营养繁殖目前尚不能确定。推测是由于细胞分裂过程非等速性造成孢子囊内产生出非  $2^n$  个游孢子(或不动孢子),那些尚未完成全部分裂过程就随其它孢子释放出来的子细胞(游动细胞或不动细胞)进一步完成分裂的行为。

至于红球藻是否存在有性生殖过程目前还没见报道和直接证据。虽然 Lee 等(1994)认为不动细胞(原文误称为不动孢子)是由游动细胞(原文误认为是游动孢子)通过细胞融合产生的。这一过程发生在游动细胞 5 次分裂后进行,并可能受基因控制。因为游动细胞在 5 次加倍后开始减少的,同时不动细胞数量增加,且细胞内 DNA 含量加倍了。但是 DNA 加倍并非一定是细胞融合的结果,还存在其它多种可能性。故该证据尚不足以说明存在有性过程。

作者仅在一次实验过程中观察到数对二个游动细胞(称配子可能更为确切)以头碰头的方式配对。但是并没能完整观察和记录到整个有性生殖过程。因此红球藻是否存在有性生殖过程,配子是如何产生和演化的,合子的发育等问题都是模糊的,需进一步研究确定。

无论红球藻处于生活周期的任何阶段,都存在自溶死亡的现象。在自溶过程中,细胞因内部色素逐渐消失而呈无色,内含物释放分解,最后残存一外壳。

综上所述,可初步归纳出红球藻的细胞周期或生活史如下:



### 3 结语

从采集动植物天然野生资源过渡到规模化养殖,是人类更好地开发利用生物资源的一次飞跃。历史经验证明,生活史的研究是实现这一飞跃必需进行的第一步基础性理论工作。无论是小麦、玉米、水稻,还是猪、牛、羊、鸡、鸭等家畜和家禽,以及海带、紫菜、虾、蟹和扇贝等水产品的养殖过程都证明了这一点。

自红球藻定名起, 尽管已逐渐认识到它存在着巨大的生产虾青素的潜力, 遗憾的是人们大多将注意力放在虾青素累积机制和细胞繁殖速度问题上, 只有 Elliot(1934)、Lee 等(1994)涉及红球藻的细胞周期问题。然而如前所述, 前者的某些概念本身存在偏差, 混淆了游动细胞和游孢子、不动细胞和不动孢子, 以及孢子囊和胶群体之间的差别; 后者并没有真正探讨细胞周期问题, 只是通过生理和生化数据推测生活史中有细胞融合现象发生。红球藻的细胞生长发育和演化的来胧去脉没能确定, 很难达到更详细的探讨环境因子对细胞繁殖动力学的影响, 更谈不上人工有控调节细胞周期。规模化养殖就不可避免地受到限制。这也是许多人得出红球藻难以连续培养的一个重要原因。本文报道红球藻细胞周期, 目的是奠定此基础问题, 推动该养殖业的健康发展。应当指出, 红球藻生活史比较复杂, 受许多环境条件的诱导而改变, 因此需要继续研究完善。

### 参 考 文 献

- 张京浦, 刘建国, 1994. 温度对雨生红球藻光合作用的影响. 植物生物学学报, 4(1): 6—10
- Benemann J R, 1992. Microalgae aquaculture feeds. J Appl Phycol, 4:233—245
- Elliot A M, 1934. Morphology and life history of *Haematococcus pluvialis*. Arkiv Fur Protistenkunde, 82: 250—272
- Foss P, Storebakken T, Schiedt K *et al*, 1984. Carotenoids for salmonids. I. Pigmentation of rainbow trout with the individual optical isomers of astaxanthin in comparison with canthaxanthin. Aquaculture, 41:213—226
- Grung M, Bjerkgong B, Borowitzka M A *et al*, 1990. Alternative sources of astaxanthin, including secondary carotenoids of microalgae. Process of 9th International IUPAC Carotenoids Symposium. Kyoto, 116
- Kranzfelder J A, 1994. Carotenoids from microalgal. J Phycology, 27(3):11
- Lee Y K, Ding S Y, 1994. Cell cycle and accumulation of astaxanthin in *H. lacustris* (Chlorophyta). J Phycol, 30:445—449
- Mesquita J F, Santo M F, 1982. Ultrastructural study of *Haematococcus lacustris* (Griod) Rostafinski (Volvocales) II. Mitosis and tytokinesis. Cytologia, 49:229—241
- Sommer T R, Potts W T, Morrissy N M, 1991. Utilization of microalgal astaxanthin by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 94:79—88
- Sommer T R, D'Souza F M L, Morrissy L, 1992. Pigmentation of adlut rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, using the green alga *Haematococcus pluvialis*. Aquaculture, 106:63—74
- Storebakken T, Foss P, Schiedt K *et al*, 1987. Carotenoids diets in samonids. IV. Pigmentation of Altantic salmon with astaxanthin, astanthin dipalmitate and canthaxanthin. Aquaculture, 65:279—292
- Torrison O J, Hardy R W, Shearer K D, 1989. Pigmentation of salmonids. Carotenoids deposition and metabolism. Aquatic Sci, 1:209—225

## STUDIES OF CELL CYCLE IN *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*

LIU Jian-guo, YIN Ming-yan, ZHANG Jing-pu, MENG Zhao-cai, W F Bourne<sup>†</sup>

(Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

<sup>†</sup>(Division of Biological Sciences, Coventry University, Coventry CV1 5FB, UK)

**Abstract** The cell cycle of *Haematococcus pluvialis*, a biflagellated unicellular green alga and a potential source of natural astaxanthin, was studied out microscopically using camera, CCD color-TV video camera and recorder system.

The cell cycle can be divided into two stages (motile and non-motile stage), and all the algae can be classified into four forms of cells: motile cell, non-motile cell, aplanospore and zoospore, while the terms as flagellated cell, palmella, akinete, red cell and green cell often appeared in many papers are excluded with different reasons.

The main proliferation of cells is accomplished by asexual reproduction both at the motile stage and non-motile stage under normal culture conditions. The motile cells mainly produce 2 zoospores, sometime 4, and occasionally 8 by asexual reproduction. The motile cells and zoospores lose their flagella, stop moving, turn into non-motile cells when exposed to stress environmental conditions. The non-motile cells can produce new cells by asexual reproduction at the non-motile stage even if they are exposed to unfavorable growth conditions. The non-motile cells usually produce 4 or 8 aplanospores, occasionally more than 20 aplanospores were checked in one sporangium. When the culture condition is suitable for *Haematococcus pluvialis* growth, nonmotile cells with large volume produce 16 zoospores and the small ones produce 8 with unequal cell division speeds as 3, 5, 6, 7.....; zoospores are often checked in one sporangium.

Vegetative reproduction was observed occasionally both in motile cells by direct division and some small non-motile cells by budding. However, sexual reproduction may exist as initial part of isogamy process was monitored once under the laboratory culture condition.

Based on the above observation, a primary cell cycle of *Haematococcus pluvialis* is suggested.

**Key words** *Haematococcus pluvialis* Cell cycle Motile cell Non-motile cell Zoospore Aplanospore

**Subject classification number** Q28