

胶州湾有毒藻华形成种里氏金色藻 (*Chrysochromulina leadbeateri*)的 分类学研究*

殷明焱 胡晓燕 曾呈奎

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

摘要 利用光学显微镜和透射电镜对从青岛胶州湾海水样品中分离的一种微型鞭毛藻进行了超微结构和分类学研究。结果表明,该藻为里氏金色藻(*Chrysochromulina leadbeateri* Estep, Davis, Hargraves et Sieburth)。其特征为:细胞呈球形,直径4—6 μm ,两条鞭毛略不等长,分别为8—10 μm 和12—16 μm 。一条定鞭能够卷曲,完全伸展后约20—30 μm 。细胞外被两层不同类型的圆形鳞片,都具十字形中央。外层鳞片表面有放射状细纹,内层鳞片在周边环上有25—30个穿孔。细胞一般有两个色素体,每个色素体内有一个包埋的蛋白核。里氏金色藻曾在挪威沿岸形成大规模有毒藻华,并引起养殖鱼类大量死亡。该种为我国的新记录种。

关键词 里氏金色藻,有毒藻华,分类学

中图分类号 S932.7

2002年10月在青岛胶州湾采集的海水样品中分离得到一种微型鞭毛藻,分别在光学显微镜和电子显微镜下对培养细胞的超微结构进行了观察,鉴定该种为里氏金色藻(*Chrysochromulina leadbeateri* Estep, Davis, Hargraves et Sieburth)。里氏金色藻曾在挪威沿岸形成大规模有毒藻华,并引起鱼类大量死亡(Johnsen *et al.*, 1999)。这是在我国沿海首次发现该有毒藻华形成种,作者对其分类学及生态学进行了研究和评述,以期了解该藻类的形态和超微结构,为进一步研究和预防有毒藻华奠定基础。

1 材料与方法

1.1 单藻克隆的获得和培养

2002年10月从青岛沿岸采集海水样品,采用显微操作技术反复挑取单个细胞,用EMS培养基富集培养,然后在光学显微镜下挑选无杂藻污染的株系,在20, 50 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 12:12h的光暗循环条件下

培养。

1.2 负染色样品制备

细胞滴在铜网上,1%锇酸固定后干燥,用蒸馏水洗去盐结晶,然后用醋酸双氧铀染色15min,干燥后用蒸馏水冲洗,再干燥后在JEM-1200EX透射电镜下观察。

1.3 整体投影制作

培养的细胞滴在电镜铜网上,1%锇酸蒸汽固定后干燥,用蒸馏水洗去盐结晶,干燥后喷金,在JEM-1200EX透射电镜下观察。

1.4 超薄切片制作

细胞用2.5%戊二醛前固定4h,离心后经0.2mol/L磷酸缓冲液(pH 7.2)冲洗,用1%锇酸后固定,再次用0.2mol/L磷酸缓冲液(pH 7.2)冲洗,然后按常规方法采用系列浓度丙酮脱水,Epon-812树脂包埋,聚合后切片,醋酸铀和柠檬酸铅双染后,在JEM-1200EX透射电镜下观察。

* 中国科学院知识创新工程项目, KSCX2-3-04-09号。殷明焱, E-mail: yinmy@yahoo.com.cn

通讯作者: E-mail: xyhu@ms.qdio.ac.cn

收稿日期: 2008-01-25, 收修改稿日期: 2008-03-19

2 形态描述

里氏金色藻 *Chrysochromulina leadbeateri* Estep, Davis, Hargraves et Sieburth in *Protistologica* 20: 618, figs.6—7, 1984; Hoepffner et Haas in *J. Phycol.* 26:424, fig. 9—10, 1990

光学显微镜下观察, 细胞呈球形, 直径 4—6 μm , 两条鞭毛略不等长, 分别为 8—10 μm 和 12—16 μm 。一条定鞭能够卷曲, 完全伸展后约 20—30 μm 。两个金棕色色素体侧生, 占据细胞的大部分。游动时鞭毛在细胞两侧并指向后方, 定鞭在前方卷曲。细胞有时会脱落完整的鳞片外被, 鳞片外被在光镜下可见。电镜下观察鞭毛和定鞭着生在细胞顶端, 两条鞭毛有变细的末端约长 1 μm , 固定后定鞭一般卷曲为多个螺旋(图 1a), 但一般极易脱落。

脱落的鳞片外被由两种鳞片组成, 形成两层(图 1b)。外层的鳞片圆形, 直径 0.35—0.40 μm ; 在鳞片表面具有许多规则的由中央向边缘发散的放射纹饰。这些放射纹在整体投影图中不能分辨(图 1c), 而在负染色的图中可以辨别(图 1d)。外层鳞片的中央有一圆孔, 直径约 0.15—0.18 μm , 有一个十字结构覆盖在孔的上面, 放射纹围绕着中央十字。内层鳞片圆形, 扁平, 直径 0.30—0.35 μm , 与外层鳞片一样在中央有一圆孔, 但较大, 直径 0.20—0.24 μm ; 自中央十字向外有放射纹, 放射纹的数量少于外层鳞片, 并且放射纹没有延伸到鳞片的边缘。有两条同心脊环绕中央十字, 鳞片的周缘有环带, 环上约有 25—30 个穿孔。鳞片在边缘处没有向上的直立边。

超薄切片表明细胞一般有两个色素体, 在将要分裂的细胞中会有 3—4 个, 色素体侧周生; 色素体的片层由三层类囊体组成, 纵向平行排列; 每个色素体内有一个包埋的蛋白核, 蛋白核中有单根微管穿过(图 1e)。细胞核较大, 位于细胞的后部, 核膜和核孔明显, 分裂前染色质清晰。色素体内质网包裹细胞核和两个色素体。一个高尔基复合体位于细胞的前部, 囊泡的一端与鞭毛基体相邻, 另一端邻近细胞核; 每个囊泡在邻近细胞核的一端有不同程度的膨胀, 因此整个高尔基体呈扇形。高尔基体面和面之间高度极

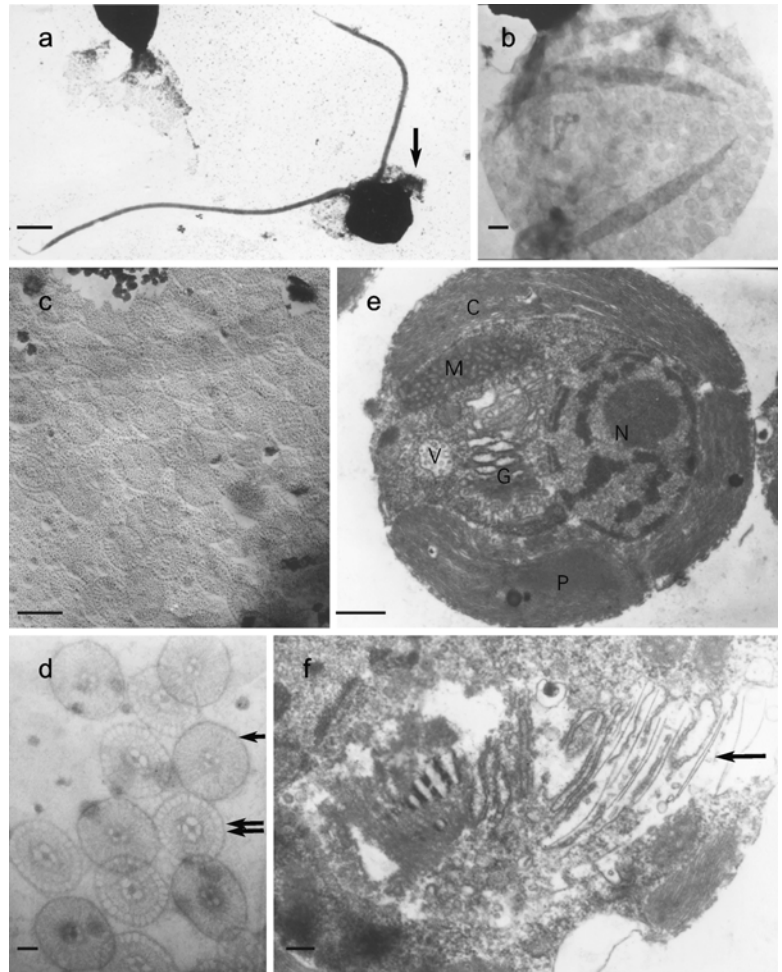


图 1 里氏金色藻细胞的电镜超微结构

Fig.1 The electron microscopic ultrastructures of *C. leadbeateri*
 a. 细胞外观, 示不等长鞭毛和卷曲定鞭(箭头); b. 细胞脱落的鳞片外被;
 c. 鳞片结构的整体投影; d. 正染后的鳞片, 示外层鳞片(箭头)和内层鳞片(双箭头)的超微结构; e. 细胞的横切面, 示色素体(C)、高尔基体(G)、线粒体(M)、细胞核(N)和蛋白核(P); f. 细胞的放大图, 示高尔基体内形成鳞片(箭头)。

比例尺: a. 2 μm ; b, c. 200nm; d. 50nm; e, f. 500nm

化, 鳞片的产生是逐步从与内质网相连的形成面到成熟面, 并通过囊泡的传递排出到细胞表面。高尔基体的一个独特的特征是部分囊泡在某一阶段发生膨胀, 并在囊泡的表面出现染色深的加厚(图 1f)。线粒体一般只有一个, 内部为管状嵴形成的网状结构。常有一个大的液泡, 一般在高尔基体附近, 液泡内有不定形物, 这一点与 Eikrem 等(1998)描述的液泡内经常出现一个纤维网不同。

3 讨论

金色藻属的细胞一般小于 20 μm , 仅依据光镜下的特征很难鉴定, 必须借助电镜才能区分种的不同。主要的分类依据有: 细胞的大小和形状, 有机质鳞片

纹饰, 鞭毛和定鞭长度以及蛋白核的定位等, 其中鳞片的纹饰是种类鉴定的重要依据。里氏金色藻是在北大西洋东部采集的样品中发现, 并得到正式描述 (Estep *et al.*, 1984), 以英国藻类学家 B. S. C. Leadbeater 命名。与 Estep 等(1984)描述的模式种相比, 自青岛沿岸分离的里氏金色藻细胞大小和形态基本一致, 但在鳞片的超微结构方面有所差别。模式种的外层鳞片有一个稍有角的直立边, 没有其它纹饰, 而胶州湾的里氏金色藻的外层鳞片扁平, 没有直立边, 并且有放射状的纹饰。Estep 等(1984)对模式种的鉴定是对现场采集的样品固定后采用整体投影的方法观察得到, 而没有超薄切片的观察; 作者在实验中也发现这一问题, 如前所述, 外层鳞片的放射纹饰在整体投影图中不能分辨, 而在负染色图中可以观察到, 但由于 Estep 等(1984)的研究工作是基于野外调查, 没有标本保存下来, 因此对于胶州湾种的外层鳞片与模式种的差异, 作者推测可能是样品制备方法的不同引起的。内层鳞片与模式种的基本一致, 都在一面邻近边缘处有凸起的环, 并有 25—30 条放射线。已报道的里氏金色藻在鳞片的大小, 穿孔以及纹饰方面与模式种的有差别。例如在 Leadbeater(1972)的图中外层鳞片的中央孔的周围环绕有一圈小孔, 并在鳞片周缘有向上的折边; 内层鳞片有四条同心脊, 在模式种中只有三条。而 Hallegraef(1983)报道的在澳大利亚发现的细胞外层鳞片在周缘有一圈穿孔, 与内层鳞片的周缘穿孔类似。从挪威 Vestfjorden 分离的细胞内层鳞片有四条同心脊, 外层鳞片周缘有一圈穿孔, 并且有直立的折边(Eikrem *et al.*, 1998)。不同的鳞片超微结构是否表明在里氏金色藻种群中存在不同的生态型或亚种, 要解决这一问题仅依据形态分类是不充分的, 还需要借助分子生物学手段进行系统发育研究, 而开展这一研究的前提是有活体的纯培养细胞。

金色藻属 (*Chrysochromulina*) 是普林藻纲 (Prymnesiophyceae) 含有种最多的一个属, 至 2003 年共描述了 56 种, 绝大多数种生活在海洋中。金色藻属的种类是海洋微型浮游植物的重要组成, 例如对北波罗的海浮游植物的研究发现金色藻属的种类是浮游植物群落的常有种, 并且在夏季和初秋占微型浮游植物的大部分(达 65%), 偶尔会占到浮游植物生物量的一半(Hajdu *et al.*, 1996)。另一方面, 有些种如多鳞金色藻(*C. polylepis*)、里氏金色藻、小金色藻(*C. parvum*)等能够产生毒素(Simonsen *et al.*, 1997), 并且

在一定条件下可以形成有毒的藻华, 对水产养殖造成危害。但是我国对金色藻属的研究还很有限, 只有高玉等(1992)曾报道了胶州湾的三种金色藻。

作者在对山东沿海的普林藻纲种类的研究中, 发现了多个金色藻属的种类, 其中里氏金色藻属于山东沿海常见种类。此种分布广泛, Leadbeater(1972)最早报道了在挪威沿岸水域中存在有相似的细胞鳞片, 但未命名, 随后 Hallegraef(1983)在澳大利亚海域中也发现了此种, Hoepffner 等(1990)报道了在北太平洋发现里氏金色藻。

1991 年 5 月中旬至 6 月末, 在北挪威 Ofotfjord-Tysfjord 海区内里氏金色藻形成有毒的藻华, 细胞的最高密度超过 2×10^6 个/L, 最终引起了 600t 网箱养殖鲑鱼死亡。对于引起 1991 年挪威 Ofotfjord 地区爆发水华原因, Johnsen 等(1999)认为由于过量的鲑鱼养殖使水域富营养化, 而里氏金色藻混合营养的生活方式使得细胞能够充分的利用光照条件从而大量积累净生物量。里氏金色藻引起网箱鲑鱼死亡的原因除了产生鱼毒素外, 死亡的鱼腐烂产生的多胺(如组胺、尸胺)也起了协同作用。我国的网箱养殖鱼类刚开始, 目前还未发现有里氏金色藻的藻华导致鱼类死亡报道, 但是由于我国沿海普遍存在富营养化的问题, 有毒藻华的产生就有了一定的条件, 因此应加强此方面的研究, 对于里氏金色藻的生理学的详细研究将有助于预防有毒藻华的产生。

参 考 文 献

- 高 玉, 曾呈奎, 郭玉杰, 1992. 微型浮游生物. 见: 刘瑞玉主编. 胶州湾生态学和生物资源. 北京: 科学出版社, 203—219
- Eikrem W, Thronerson J, 1998. Morphology of *Chrysochromulina leadbeateri* (Prymnesiophyceae) from northern Norway. *Phycologia*, 37(4): 292—299
- Estep K W, Davis P G, Hargraves P E *et al.*, 1984. Chloroplast containing microflagellates in natural populations of North Atlantic nanoplankton, their identification and distribution; including a description of five new species of *Chrysochromulina* (Prymnesiophyceae). *Protistologica*, 20: 613—634
- Hajdu S, Larsson U, Moestrup Ø, 1996. Seasonal dynamics of *Chrysochromulina* species (Prymnesiophyceae) in a coastal area and a nutrient-enriched inlet of northern Baltic proper. *Bot Mar*, 39: 281—295
- Hallegraef, G M, 1983. Scale-bearing and loricate nanoplankton from the East Australian Current. *Bot Mar*, 26: 493—515
- Hoepffner N, Haas L W, 1990. Electron microscopy of nanoplankton from the North Pacific Central Gyre. *J Phycol*, 26:

421—439

Johnsen G, Dalløkken R, Eikrem W *et al*, 1999. Eco-physiology, bio-optics and toxicity of the ichthyotoxic *Chrysochromulina leadbeateri* (Prymnesiophyceae). *J Phycol*, 35: 1465—1476

Leadbeater B S C, 1972. Identification, by means of electron microscopy, of flagellate nanoplankton from the coast of Norway. *Sasias*, 49: 265—272

Simonsen S, Moestrup O, 1997. Toxicity tests in eight species of *Chrysochromulina* (Haptophyta). *Can J Bot*, 74: 129—136

TAXONOMY OF *CHRYSOCHROMULINA LEADBEATERI* (PRYMNESIOPHYCEAE), A TOXIC BLOOM-FORMING SPECIES ISOLATED FROM JIAOZHOU BAY, CHINA

YIN Ming-Yan, HU Xiao-Yan, ZENG Cheng-Kui

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

Abstract The cells of *Chrysochromulina leadbeateri* from coast area of Qingdao were isolated. A unialgal culture was set up and the structural characteristics were observed under a light and electron microscopes. The cells are spherical in overall, measuring 4—6 μ m, with two flagella of slightly unequal length (8—10 and 12—16 μ m) and a haptonema (20—30 μ m) that often coils up. The cell surfaces are covered by two distinct types of scales arranged in two layers. Both scale types are circular and have a central pore with a crisscross. The outer layer comprises of morphologically simple scales in radiating ribs pattern; the inner layer scales are more complex and have one peripheral ring of 25—30 holes. The cells contain two golden-brown chloroplasts with a pyrenoid each. *C. leadbeateri* was once considered responsible for a toxic bloom in Norway that killed tons of caged salmon. This is the first report in China.

Key words *Chrysochromulina leadbeateri*, Toxic algal-bloom-forming, Taxonomy