

锥状斯氏藻生活史及其生理生态调控

齐雨藻 郑磊 汪蓉

(暨南大学水生生物研究所, 广州 510632)

提要 锥状斯氏藻 STDP01 克隆品系于 1993 年 1 月分离自大鹏湾底泥中的单个锥状斯氏藻孢囊, 并经单细胞分离培养成藻株。在电子显微镜下, 对该藻的营养细胞和孢囊形态进行了观察, 该藻营养细胞与多甲藻目的其它甲藻不同, 没有非常明显的甲板; 孢囊球形或卵形, 直径 15—30 μm , 突起钙化长短大小不一, 从钝到尖。萌发孔为中间(theropylic)型。在实验室光、温及营养盐的人工调控下, 运用倒置显微镜, 对锥状斯氏藻生活史进行了追踪, 发现该藻属典型的甲藻生活史, 由营养生长、暂时性休眠和休眠孢囊三个阶段组成。孢囊形成通过有性生殖, 经两配子结合形成浮游合子并进一步形成孢囊。对孢囊形成和萌发的条件进行探讨的结果表明, 在营养盐充足的条件下锥状斯氏藻生长良好, 最大比生长率可达 0.42d^{-1} ; 氮盐缺乏是诱导其孢囊形成的关键因子, 当锥状斯氏藻生长在 f/2 缺氮(以 $25\mu\text{mol/L NH}_4^+$ 代替 NO_3^-) 条件下孢囊形成率可达 8.7%; 磷酸盐缺乏虽然使营养生长减缓, 但并不能诱导孢囊形成; 对孢囊形成率也无显著影响。新形成的孢囊必须在经过一段时间休眠后, 在氮源充足, 光照、温度合适时方可萌发。孢囊在冰箱中经三个月储存后, 在不同的温度(8, 15, 20 和 25°C)和光照(200, 600, 1 600, 2 800, 4 500, 6 000 和 7 500lx)下测试其萌发情况。萌发率与温度在 $8\text{--}20^\circ\text{C}$ 范围内呈正相关, 在 20°C 时达到最大, 为 90%; 15°C 时为 30%, 8°C 时仅 10%。而 25°C 时较 20°C 有所下降, 为 80%。光照实验 15d 后不同光照组(200lx 组除外)萌发率都在 80%—90% 之间, 200lx 组为 50%。表明微弱短暂的光照(200lx)即可启动萌发, 高光强(7 500lx)虽然可以缩短萌发时间, 对孢囊萌发率并无明显影响。结果显示, 锥状斯氏藻孢囊萌发和大量繁殖都和氮营养紧密相关, 富营养化特别是氮营养的富积是引发该藻赤潮发生的关键。

关键词 锥状斯氏藻 生活史 孢囊 环境调控

由于甲藻孢囊同甲藻赤潮发生存在着密切的联系, 对其生活史及诱导和控制的环境因子的研究已引起了科学家们的广泛关注。Qi 等(1996)对中国东南沿海底泥中甲藻孢囊的调查结果表明, 中国沿海沉积物中最常见孢囊丰度最大的甲藻即为锥状斯氏藻; 郑磊等(1997)¹⁾对大鹏湾水域锥状斯氏藻的空间分布进行了调查, 结果显示, 这一种类在大鹏湾底泥中占明显优势。虽然尚未见到该藻在大鹏湾引发赤潮的报道, 但其高频率、高密度出现于沿海水域, 引发赤潮的潜在可能极大。因此, 对锥状斯氏藻生活史, 尤其是孢囊阶

* 国家自然科学基金资助项目, 9389008号。齐雨藻, 男, 出生于1933年1月, 教授。

1) 郑磊等, 1997. 南海大鹏湾甲藻孢囊的分布特征. 热带与亚热带植物学报, (待刊)

收稿日期: 1996年2月15日, 接受日期: 1997年2月28日。

段生物学特性的研究,对于预测防治其赤潮的发生具有十分重要的意义。影响甲藻孢囊形成与萌发的因子,目前报道的有光、温和营养盐,尤其是氮磷营养。本研究报告这些因子对锥状斯氏藻生活史及生理调控的结果,探讨该藻大量繁殖内外因素,以期对该藻赤潮发生预报提供科学的依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

锥状斯氏藻(*Scrippsiella trochoidea*) STDP01 品系由郑磊于 1993 年 1 月分离自南海大鹏湾底泥中单个甲藻孢囊,并经单细胞分离培养成藻株。实验室保种采用 f / 2-Si (Guillard et al., 1962, 下同)培养液,配制培养液海水盐度在 30—32,培养温度在 20—22℃,光照度为 3 000lx,光周期为 L:D = 12:12。

1.2 孢囊形成诱导和萌发实验

以远洋海水(E110°, N5°48', 水深为 1 500m)为基液,按 f / 2-Si 配方,配制对照组、微氮组(以 25μmol / L NH₄⁺代替 NO₃⁻)、缺磷组(不加 PO₄³⁻)和双缺组(以 25μmol / L NH₄⁺代替 NO₃⁻, 且不加 PO₄³⁻)培养液,培养液盐度为 32。取指数生长期细胞(密度约 4 000cells / ml)1ml,接种于盛有 25ml 培养液的 50ml 试管中,每组设置两个重复,在 20℃ 培养箱中培养,观察孢囊形成情况。

将新形成的孢囊收集于 1.5ml 离心管,封口后在 4℃ 冰箱中黑暗保存,3 个月后取出;在 96 孔平面培养板中每孔加入 130μl f / 2 培养液,分离孢囊 20 个并分置于 20 个小孔内;做 4 个相同培养板,分别放置于 8, 15, 20 和 25℃ 培养箱,光照度为 6 000lx;在光照培养架上用 40W 日光灯管设置 200, 600, 1 600, 2 800, 4 500, 6 000 和 7 500lx 等 7 个光照度,温度为 20℃。实验光周期 D:L = 12:12。

以戊二醛固定样品后,按林永水等(1993)的方法脱水清洗,滴一滴于盖玻片,烘干,贴于铜台,喷金后在 JEM-T300 型扫描电子显微镜(SEM)下(10kV 高压)观察细胞形态;在 Olympus BH-2 型显微镜和重庆重光倒置显微镜下观察细胞计数和生活史过程。

2 结果

2.1 形态及生活史

扫描电子显微镜观察表明,锥状斯氏藻营养细胞大小(高×宽)为 18—30μm × 15—25μm,呈梨形,上端锥形,常具嘴状突起;下端半球形;横沟较宽,纵沟不到底部,壳表无明显花纹(图版 I: 1, 2)。孢囊大小不等,范围变化较大,最大长可达 55μm,小的仅 15—20μm;椭圆形,表面钙质化,具松果状刺(图版 I: 3, 4, 5);内含红色色素体,萌发孔圆形(图版 I: 4 箭头所示)。

锥状斯氏藻具较为典型的甲藻生活史。在正常状态下,以细胞纵分裂进行营养繁殖;在突然性暂时不利条件下,细胞发生脱壳,失去运动功能,形成圆球形的暂时性孢囊,这类孢囊在培养中经常可见;当这类孢囊被转移到适宜的环境中时,又可快速恢复成活动的营养细胞。在氮缺乏条件下,会诱导有性生殖的发生。雌雄配子由营养细胞分化而成,大小形态与营养细胞相似,但配子运动速度较快,颜色较浅,有时可见内含红色眼点。雌雄配子可在单细胞藻株诱导产生。雌雄配子以底侧部相结合,融合为较大的“浮游合子”(planozygote),具 4 鞭毛,然后逐渐沉降,分泌出钙质突起,最后形成含多个红色贮藏颗粒

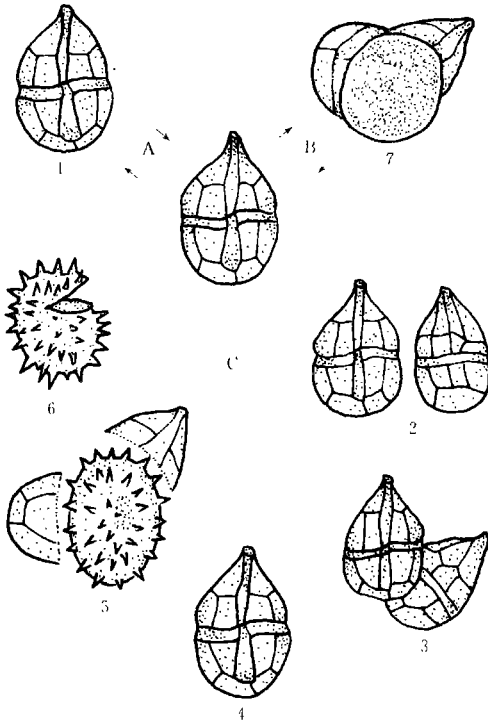


图1 锥状斯氏藻生活史简图

Fig.1 Diagram of life cycle of *S. trochoidea*

A. 营养繁殖 (vegetative reproduction). B. 暂时休眠 (temporary cyst formation). C. 有性生殖 (sexual cycle): 1. 营养细胞 (vegetative cell); 2. 配子 (gametes); 3. 配子结合 (gamete conjugation); 4. 浮游合子 (planozygote); 5. 孢囊 (mature cyst); 6. 萌发后的孢囊 (empty cyst); 7. 暂时性孢囊 (temporary cyst).

最大, 达 90%, 萌发从第 3 天开始第 8 天结束; 而 15℃ 条件下萌发自第 5 天开始, 到 20d 时萌发率为 30%; 8℃ 时萌发极缓, 20d 后仅 10% 萌发。25℃ 条件下与 20℃ 相比, 萌发率降低, 第 4 天开始萌发, 第 10 天结束, 最后萌发率为 80%; 不同光照度对孢囊萌发的影响结果见图 3b。黑暗条件下, 孢囊不萌发; 但只要经过短暂的光照, 孢囊即可萌发。光照 5d 后, 高光照度组 (4 500—7 500lx) 萌发率明

的休眠孢囊。浮游合子和孢囊为 2 倍体, 一般较正常营养细胞大, 且颜色较深。休眠孢囊经一定时期的休眠后, 又可重新萌发, 形成较大营养细胞, 再经减数分裂形成新的营养细胞 (图 1)。

2.2 氮素营养与生长、孢囊形成

在氮源充足和缺乏条件下, 锥状斯氏藻营养生长和孢囊形成情况见图 2。可以看出, 该藻在 f/2-Si 培养液中生长良好 (对照组), 最大比生长率可达 $0.42d^{-1}$; 而在缺氮培养液中 (微氮组), 虽然最初生长与对照组相差不大, 但指数生长的后期明显比对照组减缓, 在培养第 8 天即发现孢囊形成, 并随时间而增多。

2.3 孢囊形成率

计数 4 组诱导孢囊培养液达到稳定期后的营养细胞总数和培养末期孢囊总数, 孢囊形成率 (孢囊总数: 细胞总数, %) 结果如表 1。微氮组孢囊形成率为 8.7%, 双缺组为 8.8%。显然氮缺乏直接诱导孢囊形成, 而 PO_4^{3-} 缺乏虽然使营养生长减缓, 但并不能诱导孢囊形成。

2.4 孢囊萌发

实验表明, 锥状斯氏藻孢囊的萌发受温度和光照的影响。不同温度下孢囊萌发率见图 3a。在 8—20℃ 范围内, 萌发率与温度呈正相关, 20℃ 条件下萌发率

表1 在不同培养液中锥状斯氏藻孢囊的形成率 (%)

Tab.1 Cyst formation ratio of *S. trochoidea* in different media

培养液	细胞总数 (cell/ml)	孢囊总数 (个/ml)	形成率 (%)
微氮组	7.8×10^3	6.8×10^2	8.7
缺磷组	6.5×10^3	—	—
双缺组	4.2×10^3	3.7×10^2	8.8
对照组	4.2×10^4	—	—

显高于低光照组(200—2 800lx),最高可达 90%,而低光照度组最低仅 15%;10d 后,低光照度组萌发率明显增加,15d 后已与高光照组无显著差别(200lx 除外),都在 80% 与 90% 之间。可见锥状斯氏藻孢囊在生理成熟后,只需短暂的一定量的光照射,即可萌发,此后光照度对孢囊萌发再无决定性的影响。

3 讨论与结语

我们在对该藻生活史的追踪研究中发现了该种孢囊形成前性细胞融合和浮游合子游动过程,这与 Watanabe (1982)¹⁾锥状斯氏藻孢囊是有性生殖的结果是相同的,且即便是在氮源充足

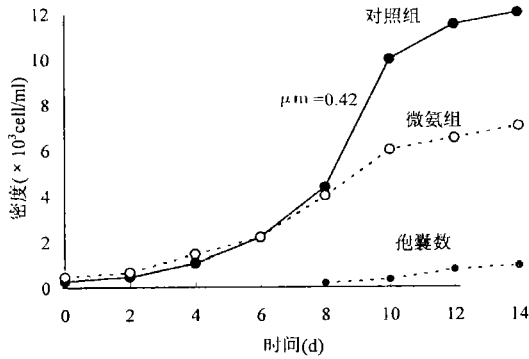


图2 不同培养基中锥状斯氏藻的营养生长及孢囊形成
Fig.2 Growth curves and cyst formation of *S. trochoidea* in different media

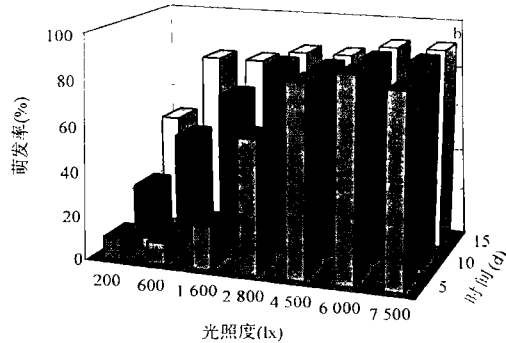
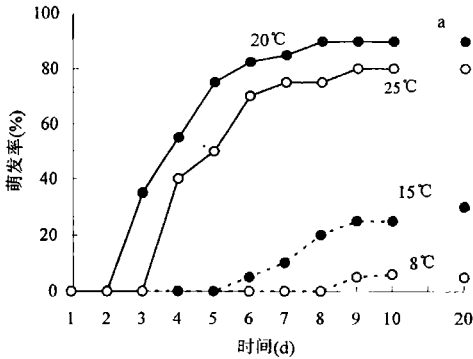


图3 锥状斯氏藻孢囊在不同温度下萌发率(a)和不同光照度下、不同时间内孢囊的萌发率(b)

Fig.3 Cyst germination ratio of *S. trochoidea* in different temperatures (a), and different light intensities and times (b)

的正常培养液中,培养后期仍发现有孢囊的形成。与亚历山大藻(Anderson, 1980)相比较,锥状斯氏藻的孢囊形成并不需要不同藻株的两两配合,而是由同一藻株即可诱导产生不同性别的性细胞。这种有性过程的易发性使锥状斯氏藻在正常条件下都可形成孢囊。Reid(1978)报道,这类孢囊形成可扩展至整个营养繁殖季节。这大概也是锥状斯氏藻在大鹏湾底泥中出现最为频繁的原因(郑磊等, 1996)。

从诱导锥状斯氏藻孢囊形成的因子来看,硝态氮显然是直接而有效的诱导因子,磷酸盐缺乏虽使藻类生长降低,但总孢囊形成率并未受到影响。在微氮组得到孢囊形成率为 8.7%,这与 Binder 等(1987)的结果(达 10%)相比,稍偏低。我们也曾将新形成的孢囊重新放入新鲜培养液,未能诱导孢囊萌发,而经 3 个月黑暗低温(4—5℃)休眠后,孢囊萌发能

1) Watanabe, 1982, Nat. (Japan) Inst. Environ. Stud., Res. Rep., No.30.

顺利进行,这一实验进一步验证了孢囊需经生理休眠阶段才能成熟萌发 (Anderson, 1980)。这一特征显然是孢囊在自然界长期适应的结果。

在与孢囊萌发有关的因子中,氮源显然是不可缺乏的。而光、温两因子所起的作用也各不相同。温度对孢囊萌发的影响具显著的效果,低温(8℃, 15℃)或高温(25℃)抑制萌发;而光照度对锥状斯氏藻萌发的影响是微妙的。实验表明,只要极低光照度的短暂照射,萌发即可发生。在给予了启动萌发所需的短暂照射后,光照度高低并不重要,弱光只能延缓萌发,而并不能抑制萌发,且经过一定时间后,强、弱光诱导孢囊萌发率是基本一致的,显然萌发只需要微弱强度的光照刺激即可进行。

参 考 文 献

- 林永水等, 1993, 南海甲藻, 科学出版社(北京), 2—5。
 郑 磊, 齐雨藻, 1996, 暨南大学学报, 16(1): 137—149。
 Anderson, D. M., 1980, *J. Phycol.*, 16: 166—172。
 Binder, B. J. & Anderson, D. M., 1987, *J. Phycol.*, 23: 99—107。
 Guillard, R. R. L & Ryther, J. H., 1962, *Can. J. Microbiol.*, 8: 229—239。
 Qi, Y. et al., 1996, Harmful and Toxic Algal Blooms, ed. by Yasumoto, T., UNESCO-IOC Press (Sendai, Japan), pp.33—36。
 Reid, P. C., 1978, *New Phytol.*, 80: 219—229。

THE LIFE CYCLE OF *SCRIPPSIELLA TROCHOIDEA* AND ITS PHYSIOL-ECOLOGICAL CONTROL

Qi Yuzao, Zheng Lei, Wang Rong

(*Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632*)

Abstract The culture of *Scrippsiella trochoidea* was established from germinated cyst isolated from Dapeng Bay (southern China) sediment samples in January 1993. The clonal strain STDP 01 was re-isolated from a single cell of this culture. The morphology of vegetative cells and cysts of *Scrippsiella trochoidea* were observed using a scanning electronic microscope. The vegetative cell shows no obvious plates, which is different from other Peridinales species. The cyst, spherical to ovoid, has a diameter from 15 to 30μm. The processes are calcareous and vary in length and in shape (from blunt to pointed). A theropylic archeropyte was observed. The different stages of life cycle were observed under the control of light, temperature and nutrient under lab conditions. The life cycle belongs to a typical dinoflagellate cycle which include a vegetative cycle (cell division), a temporary cyst cycle and a resting cyst cycle. Resting cyst cycle formation could be fulfilled by sexual reproduction and was formed from planozygote by fusion of two isogametes. In terms of the conditions for cyst formation and germination, when the nutrients were plenty, the vegetative cells of

Scrippsiella trochoidea grew well and could reach a maximum growth ratio of $0.42d^{-1}$. Nitrate depletion was a key factor to induce cyst formation. When the vegetative cells were grown in the f/40 ($25\mu\text{mol/L NH}_4^+$, no added NO_3^-) medium, the first cyst appeared at the stationary stage or the end of log phase (8th days) and cyst formation ratio reached 8.7%. Phosphate depletion can reduce the growth rate of vegetative cells but cannot induce cyst formation or affect the cyst formation ratio. Newly formed cysts can germinate only after a period of dormancy (3 months) and when nitrogen is repleted and light and temperature are suitable. Different temperatures (8, 15, 20, 25°C) and light intensities (200, 600, 1 600, 2 800, 4 500, 6 000 and 7 500lx) were adopted to test the germination ratio of cysts after being stored in dark refrigerator in $4-5^\circ\text{C}$ for three months. The results reveal that temperature has a positive relation with germination among 8, 15 and 20°C . The germination ratio can reach a maximum of 90% at 20°C , 30% at 15°C and 10% at 8°C . The germination ratio was 80% at 25°C , which was less than 20°C . Even weak light intensity (200lx) can initiate cyst germination. After repletion with a fresh f/2 medium for two weeks, cyst germination ratio in different light intensities (600—7 500lx) could reach the same (80%—90%). High light intensity (7 500lx) causes a decrease in the germination time, but has little effect on the germination ratio. The results also show that cyst formation and rapid vegetative reproduction have a close relationship with nitrate nutrient. Eutrophication is a key factor for bloom outbreak.

Key words *Scrippsiella trochoidea* Life cycle Cyst Environmental control