

锥状斯氏藻休眠孢囊萌发调控因子的实验室研究

王朝晖, 张玉娟, 曹宇

(暨南大学水生生物研究所, 广东 广州, 510632)

摘要: 锥状斯氏藻 *Scrippsiella trochoidea* 是一种常见赤潮种类, 为了了解影响锥状斯氏藻孢囊萌发的内外在调控因子, 在实验室条件下研究了不同温度(15、20 和 25 $^{\circ}\text{C}$)、储存温度(4、15、20 和 25 $^{\circ}\text{C}$)、储存时间(30 和 60d)、营养盐含量(N: 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, P: 74—1.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; P: 74 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, N: 100—10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)以及缺氧对锥状斯氏藻休眠孢囊萌发的影响。锥状斯氏藻孢囊的强制性休眠期在 15—25d, 不同温度下孢囊最终萌发率差别不大, 为 75%—82%, 但低温可减缓孢囊的萌发速度。高温(25 $^{\circ}\text{C}$)和长时间保存(30d 以上), 可导致萌发率明显降低。N、P 营养盐对孢囊萌发影响不明显, 缺氧和黑暗能完全抑制锥状斯氏藻的孢囊萌发。结果表明: 锥状斯氏藻孢囊较短的强制性休眠期和高萌发率, 使其孢囊在广东沿海全年各季节均具有一定的萌发能力, 并造成该藻赤潮的循环发生; 同时, 当孢囊悬浮至溶氧丰富、光线合适的上层水体, 才能促进孢囊大量萌发, 从而引发赤潮。

关键词: 锥状斯氏藻; 休眠孢囊; 萌发; 环境条件

中图分类号: Q178.53 文献标识码: A 文章编号: 1009-5470(2010)03-0093-04

Laboratory studies on germination of *Scrippsiella trochoidea* resting cyst in different environmental conditions

WANG Zhao-hui, ZHANG Yu-juan, CAO Yu

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

Abstract: *Scrippsiella trochoidea* is a common bloom causative species and its blooms occur every year in the Daya Bay of the South China Sea. Excystment of *S. trochoidea* was studied under laboratory conditions at different temperatures (15, 20, 25 $^{\circ}\text{C}$), storage temperature (4, 15, 20, 25 $^{\circ}\text{C}$), storage period (30d, 60d), nutrients (N: 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, P: 74—1.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; P: 74 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, N: 100—10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and anoxia. The purpose is to understand factors controlling the germination of *S. trochoidea* resting cysts. Results showed that the dormancy period for *S. trochoidea* resting cysts in this study was about 15-25d. There were no obvious differences in germination rate in three temperatures of 15, 20 and 25 $^{\circ}\text{C}$, and the final germination rates were from 75% to 82%. However, low temperature (15 $^{\circ}\text{C}$) postponed the occurrence of germination. The germination rates decreased when cysts were stored under high temperature (25 $^{\circ}\text{C}$) and long durations (over 30d). Nutrient concentrations did not exert visible influences on germination. Anoxia and dark inhibited germination of *S. trochoidea* cyst completely. The results suggested that the short dormancy period and high germination rate of *S. trochoidea* cyst provided this species the ability to germinate in all seasons of the year in coastal areas of Guangdong province, and resulted in the repeated occurrence of its blooms in the given sea area. Meanwhile, only when the benthic cysts were suspended to the upper water column, could massive germination occur and initiate the bloom.

Key words: *Scrippsiella trochoidea*; resting cyst; excystment; environmental condition

甲藻孢囊是甲藻进行有性生殖的产物, 孢囊可在赤潮发生后期大量形成, 并沉降至底层沉积物中, 经过一段时间的强制性休眠期后, 孢囊又可萌发成营养细胞至上层水体, 并可导致赤潮的发生。因此,

收稿日期: 2008-05-13; 修订日期: 2008-08-19。刘学东编辑

基金项目: 国家自然科学基金项目(40773063); 国家自然科学基金委员会 - 广东省人民政府自然科学基金(U0633006); 广东省科技计划项目(2007B030200002)

作者简介: 王朝晖(1968—), 女, 湖南省长沙市人, 教授, 主要从事海洋生态学的研究。E-mail: twzh@jnu.edu.cn

孢囊被认为是赤潮发生的“种源”^[1],而赤潮后期孢囊的形成也被认为是赤潮消亡的重要原因^[2]。

锥状斯氏藻 *Scrippsiella trochoidea* 是世界广布性近岸赤潮生物种,同时也是一种极易形成孢囊的藻类。锥状斯氏藻赤潮自 2000 年在南海大亚湾发生以来,几乎每年夏秋季节都在该海域发生,并在该海域表层沉积物淤积了大量孢囊,成为该藻赤潮发生的“种源”^[3]。近年来有关锥状斯氏藻等斯氏藻孢囊的实验生态学和自然生态学研究受到国内外学者的普遍重视,已有研究报道了波罗的海、日本以及韩国海域斯氏藻孢囊形成和萌发^[4-9]; Wang et al^[2]和肖咏之等^[3]也对锥状斯氏藻孢囊形成及其与赤潮的关系进行了深入研究,揭示孢囊在大亚湾锥状斯氏藻种群动态及其在赤潮发生、消亡过程中的作用。

为了深入了解影响海域锥状斯氏藻孢囊萌发的调控因子,揭示孢囊萌发在赤潮形成过程中的作用,本文模拟我国锥状斯氏藻赤潮高发区大亚湾的常年 N、P 浓度条件,研究了不同 N、P 条件对锥状斯氏藻孢囊萌发的影响,同时,还研究了温度、缺氧等其他环境因子对其孢囊萌发的影响,为深入了解其赤潮形成机制提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 藻种来源及培养

锥状斯氏藻为南海大鹏湾采集的休眠孢囊萌发,按常规方法分离、纯化,培养于暨南大学水生生物研究所藻种室。实验的培养基为经调整的 f/2 去硅培养液,除 N、P 营养元素外,其余元素与 f/2 培养基中相同。如果没有特殊交待外,培养基中 N、P 浓度分别为 $500\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ N、 $74\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ P。培养基所用人工海水由 Red coral Sea 牌海盐配制, pH 值为 7.9 ± 0.1 ,盐度为 31—33,经孔径为 $0.25\mu\text{m}$ 的混合纤维滤膜过滤灭菌后,添加营养元素备用。所有实验器皿均经过 121℃、20min 高压灭菌,冷却后使用。培养温度为 $20\pm 1^\circ\text{C}$,光照强度为 5000 Lx,光暗比为 L:D=12:12。

1.2 实验方法

挑取新形成的孢囊于 96 孔细胞培养板中,每孔一个,每个试验组挑取 20 粒休眠孢囊,加入 130 μL 的培养液(除营养盐实验外,均采用 N 为 $500\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, P 为 $74\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的培养基)。封口后,根据具体实验设置的不同分别在不同条件下储存或萌发。每隔 3—5d 在 Leica DMIRB 显微镜下观察萌发情况,出现萌发后的空孢囊即认为该孢囊萌发。萌发率(%)

为已萌发的孢囊数量占试验总孢囊数量的百分比。

1.3 实验设置

1.3.1 培养温度对孢囊萌发的影响

挑取新鲜的孢囊于 96 孔细胞培养板中,分别在 15、20 和 25℃ 下培养,观察孢囊萌发情况。

1.3.2 储存温度和储存时间对孢囊萌发的影响

实验设置了 4 个储存温度(4、15、20 和 25℃)、两个储存时间(30 和 60d)以及 3 个萌发温度(15、20 和 25℃)。即将新形成的孢囊在 4℃ 下遮光储存 30 和 60d 后,分别在 15、20 和 25℃ 条件下进行萌发;孢囊在 15、20 和 25℃ 下遮光储存 30 和 60d 后,再分别在同样温度下进行萌发,观察孢囊的萌发率。

1.3.3 营养盐浓度对孢囊萌发的影响

将孢囊置于不同营养盐浓度的培养基中,在 20℃ 下进行萌发。试验组别以及各试验组培养基中营养盐浓度见表 1。

表 1 不同组别的 N、P 含量($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

Tab. 1 N and P contents in different tested groups ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

组别	N	P
(对照)	500	74
II(N 限制)	500	15
III(N 限制)	500	1.5
IV(P 限制)	100	74
V (P 限制)	10	74

1.3.4 缺氧对孢囊萌发的影响

在培养液中加入 $1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2S 使最终浓度达到 $30\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,用 CaCO_3 溶液调 pH 至 7.5,这样处理后,培养液中溶解氧可以降到 $0.01\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ ^[10]。挑取 20 粒孢囊于 96 孔培养板,每孔一个,加入上述培养液 130 μL ,密封,在 20℃ 下萌发。对照组的 20 粒休眠孢囊则加入未经处理的培养液,置于相同条件下孵化,并统计活体孢囊和空壳孢囊的数量。

2 结果

2.1 培养温度

孢囊在不同的温度下,起始萌发时间略有区别(图 1),高温下萌发开始的时间较早。25℃ 下于第 15d 即开始萌发,20℃ 下萌发始于第 23d。而 15℃ 条件下,在第 25d 孢囊才开始萌发,并且从 25d 至 75d 一直未有新的孢囊萌发;从第 84d 开始,孢囊不断缓慢萌发,最终萌发率为 75%。总的来说,低温能适当减缓孢囊的萌发速度,但在 15—25℃ 的这一温度范围内,最终萌发率相差不大(75%—82%),经统计分

析, 3 个温度组的最终萌发率相差不明显($p>0.05$)。

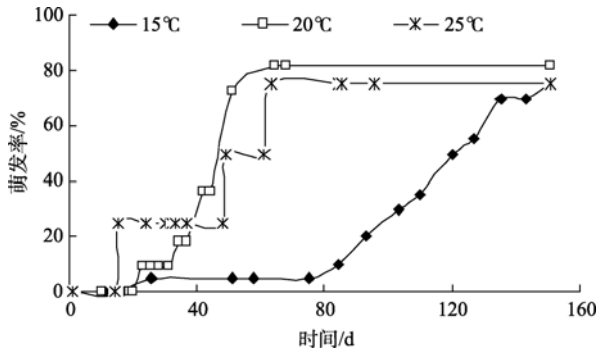


图 1 不同温度对锥状斯氏藻孢囊萌发的影响

Fig. 1 Effect of temperature on the germination of *S. trochoidea* cyst

2.2 储存温度和储存时间

储存温度和储存时间对孢囊的萌发具有一定的影响(图2)。在不同温度(4、15和20)下储存30d, 对孢囊的萌发影响较小, 最终萌发率与未储存的孢囊的最终萌发率没有明显差异($p>0.05$); 但储存时间延长至60d, 就影响了孢囊萌发($p<0.05$), 最终萌发率比储存30d的孢囊减少15—30%。此外, 20以下储存对萌发率影响较小, 相对来说, 在4下储存比在15和20下储存的萌发率略高。但是, 在25下储存, 明显影响孢囊的萌发($p<0.01$), 在25下储存30和60d后, 最终萌发率仅为4下储存的一半以下, 分别为25%和33.3%(图2C)。

2.3 营养盐

不同的 N、P 浓度对锥状斯氏藻孢囊萌发的影响不明显($p>0.05$), 孢囊累积萌发率在64%—82%之间, 但相对来说营养盐含量充足的试验组, 萌发率较高(图3)。实验结果同时显示, 不同营养盐浓度条件下, 孢囊的初始萌发时间在19—26d内。

2.4 缺氧和黑暗

经过处理的缺氧试验组, 在长100d的孵化培养过程中没有看到孢囊萌发, 而此时对照组的萌发率却高达82%(图1), 可见缺氧能抑制孢囊的萌发。

在实验过程中观察到, 在遮光条件下, 不论培养温度、营养条件如何, 没有发现孢囊萌发, 说明黑暗可完全抑制孢囊的萌发。

3 讨论

孢囊的萌发不但与外界环境因子有关, 而且与细胞内在生物节律密切相关^[11]。本实验结果显示锥状斯氏藻一般于15—25d左右开始萌发, 可见其强制性休眠期也在这个范围之内, 为20d左右, 与那不勒斯海峡(Gulf of Naples)的锥状斯氏藻相近^[12],

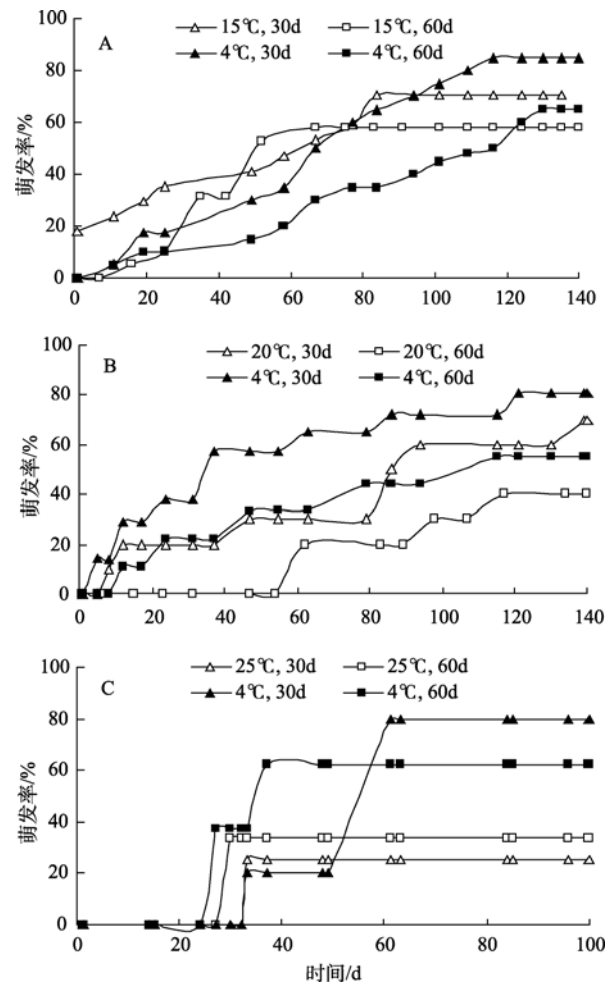


图 2 在不同温度不同时间储存后孢囊的萌发率

A: 4 和 15 下储存 30 和 60d 后, 在 15 下萌发; B: 4 和 20 储存 30 和 60d 后, 在 20 下萌发; C: 4 和 25 下储存 30 和 60d 后, 在 25 下萌发

Fig. 2 Germination rate of *S. trochoidea* cyst under different storage temperature and storage time

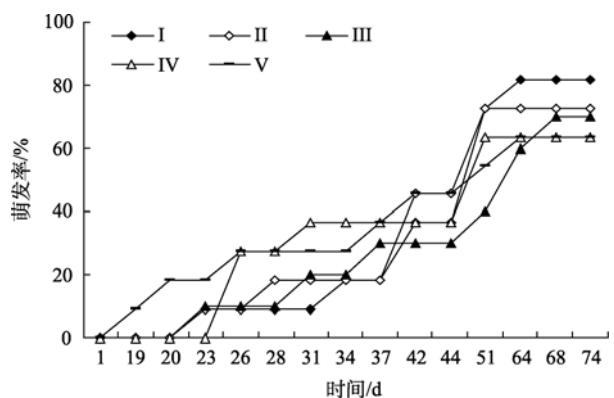


图 3 在不同营养盐浓度下的孢囊萌发率

Fig. 3 Germination rate of *S. trochoidea* cyst under various nutrient concentrations

而远远短于韩国海域^[9]。大亚湾海域锥状斯氏藻较短的休眠期可使孢囊迅速度过强制休眠期, 有潜力在一个季节内多次形成赤潮, 造成该赤潮易在某一

海域循环发生。

本研究结果显示, 锥状斯氏藻具有较高的萌发率, 且温度和营养盐含量并不影响孢囊的最终萌发率, 在不同温度和营养盐处理组, 孢囊的累计萌发率都在 75%以上。但是高温储存较长时间后(25 , 30d 以上), 会影响其萌发。大亚湾海域大部分月均水温在 20 以上, 而锥状斯氏藻赤潮发生的 8、9 月份水温高达 25 以上。如此高的水温, 一方面可促进孢囊的快速萌发, 另一方面如果孢囊不能迅速萌发, 在高温的海底保存较长时间后, 则会降低其萌发率。此外, 由于斯氏藻孢囊的易发性^[13-14], 在非赤潮时期, 其孢囊的形成率也较高^[3], 表层沉积物中时常有新形成的孢囊^[15]。因此可推断, 一般爆发于 8 月底至 9 月初的锥状斯氏藻赤潮, 可能并非前一年赤潮发生后所形成的孢囊萌发所致, 而是由刚度过休眠期的孢囊迅速萌发导致。研究结果还显

示, 低温(4)储存有利于孢囊的形成, 因此在温带海域, 孢囊萌发常常发生在经过冬季低温之后的春季, 而且孢囊的萌发给春季水体提供了营养细胞, 为春季水华的发生提供了种源。

除温度和储存期外, 诱导孢囊萌发的因子还有营养盐、溶氧条件、光照等^[16-18]。但本实验中, 营养盐含量未对孢囊萌发产生影响, 而溶解氧缺乏和黑暗则是抑制孢囊萌发的重要因子。因此, 已经度过强制性休眠期的孢囊, 在风、流等物理因素的作用下, 由于水体扰动从底部沉积物中上升至含有一定溶解氧和光照强度的上层水柱, 孢囊才能萌发形成营养细胞。夏秋季节为南海海域的台风季节, 风浪较大, 此外丰富的降雨也使水体扰动更为剧烈, 从而有利于孢囊悬浮进入水体中。这可能也是大亚湾锥状斯氏藻赤潮多发生在夏末秋初季节的重要原因之一。

参考文献

- [1] ANDERSON D M, STOCK C A, KEAFER B A, et al. *Alexandrium fundyense* cyst dynamics in the Gulf of Maine[J]. Deep-Sea Research II, 2005, 52: 2 522-2 542.
- [2] WANG Z H, QI Y Z, YANG Y F. Cyst formation: an important mechanism for the termination of *Scrippsiella trochoidea* (Dinophyceae) bloom[J]. Journal of Plankton Research, 2007, 29(2): 209-218.
- [3] 肖咏之, 王朝晖, 陈菊芳, 等. 广东大亚湾甲藻孢囊及其与锥状斯氏藻赤潮的关系[J]. 水生生物学报, 2003, 27(4): 372-377.
- [4] ISHIKAWA A, TANIGUCHI A. The role of cysts on population dynamics of *Scrippsiella* spp. (Dinophyceae) in Onagawa Bay, northeast Japan[J]. Marine Biology, 1994, 119: 39-44.
- [5] ISHIKAWA A, TANIGUCHI A. Contribution of benthic cyst to the population dynamics of *Scrippsiella* spp. (Dinophyceae) in Onagawa Bay, northeast Japan[J]. Marine Ecology Progress Series, 1996, 140: 169-178.
- [6] KREMP A, HEISKANEN S. Sexuality and cyst formation of the spring-bloom dinoflagellate *Scrippsiella hangoei* the coastal northern Baltic Sea[J]. Marine Biology, 1999, 134: 771-777.
- [7] KREMP A. Effects of cyst resuspension on germination and seeding of two bloom-forming dinoflagellates in the Baltic Sea[J]. Marine Ecology Progress Series, 2001, 216: 57-66.
- [8] KREMP A. Distribution, dynamics and in situ seeding potential of *Scrippsiella hangoei* (Dinophyceae) cyst populations from the Baltic Sea[J]. Journal of Plankton Research, 2000, 22(11): 2155-2169.
- [9] KIM Y O, HAN M S. Seasonal relationships between cyst germination and vegetative population of *Scrippsiella trochoidea* (Dinophyceae) [J]. Marine Ecology Progress Series, 2000, 204: 111-118.
- [10] GU H F, LAN D Z, FANG Q, et al. Cyst Formation, Development of *Alexandrium tamarense* from Yangtse River Estuary and Its Relation to Bloom Dynamics[J]. Acta Botanica Sinica, 2004, 46(9): 1025-1031.
- [11] MATRAI P, THOMPSON B, KELLER M. Circannual encystment of resting cysts of *Alexandrium* spp. from eastern Gulf of Maine populations[J]. Deep-Sea Research II, 2005, 52: 2560-2568.
- [12] NUZZO L, MONTRESOR M. Different encystment patterns in two calcareous cyst-producing species of the dinoflagellate genus *Scrippsiella*[J]. Journal of Plankton Research, 1999, 21: 2 009-2 018.
- [13] OLLI K, ANDERSON D M. High encystment success of the dinoflagellate *Scrippsiella* cf. *lachrymosa* in culture experiments[J]. Journal of Phycology, 2002, 38: 145-156.
- [14] 张玉娟, 曹宇, 王朝晖, 等. N 和 P 对锥状斯氏藻 (*Scrippsiella trochoidea*) 生长及孢囊形成的影响[J]. 海洋环境科学, 2006, 25(4): 7-10.
- [15] 王朝晖, 齐雨藻, 江天久, 等. 大亚湾近代沉积物中甲藻孢囊的垂直分布[J]. 水生生物学报, 2004, 28(5): 504-510.
- [16] ANDERSON D. M, TAYLOR C D, Armbrust E V. The effects of darkness and anaerobiosis on dinoflagellate cyst germination [J]. Limnology and Oceanography, 1987, 32(2): 340-351.
- [17] PEREZ C C, ROY S, Levasseur M, et al. Control of germination of *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae) cysts from the lower St. Lawrence estuary (Canada)[J]. Journal of Phycology, 1998, 34: 242-249.
- [18] SGROSSO S, ESPOSITO F, MONTRESOR M. Temperature and day length regulate encystment in calcareous cyst-forming dinoflagellates[J]. Marine Ecology Progress Series, 2001, 211: 77-87.