

## 中华半管藻繁殖生物学研究

## I. 细胞分裂与环境因子\*

郑磊\*\* 林均民 金德祥

(厦门大学生物系, 厦门, 361005)

Q949.208

A

**摘要** 中华半管藻以频繁的细胞分裂进行繁殖。实验结果表明, 该藻每天的细胞分裂和叶绿素合成呈现一定的节律性, 在光暗各 12h 条件下, 每天光照 8h 后形成最大的分裂高峰, 黑暗后 2h 出现分裂次高峰。进入光照期, 叶绿素合成开始, 随之增长率急剧上升, 8h 后达到最高值。黑暗期细胞增殖率和叶绿素增长率迅速下降, 并降至全日最低值。适温范围为 8—32℃, 生长的最适温度在 25—30℃ 之间, 适盐范围为 7—50, 最适盐度为 28 左右, 最适光照强度为  $75\mu\text{Ein} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。同时根据实验结果, 建立了中华半管藻种群生长与环境因子关系的多元回归动态模型。

**关键词:** 中华半管藻, 昼夜节律, 增殖率, 环境因子。

藻类

人们在藻类培养过程中发现, 浮游植物具有光合作用和细胞分裂的双重节律性<sup>[1-3]</sup>, 这种节律性受光暗周期的调节。在外界调节机制发生改变后, 藻体内在的生物钟仍可使原来的节律性持续一段时间。

过去, 研究环境因子对海洋浮游植物生长繁殖的影响已取得一些很有价值的成果<sup>[4]</sup>。从某种浮游植物在自然界的分布情况可以了解该种藻类的一般生态特征; 也可以从实验生态研究中了解该种藻类的生理特征, 并预测该种在自然界的适应规律。光照、温度和盐度是藻类生长的主要环境因子。近十年来, 国外进行了许多藻类生态生理的实验工作, 期望通过建立藻类对环境因子反应的数学模型, 估测藻类在自然环境中的一些适应情况。

中华半管藻是我国东南和南部沿海常见的浮游硅藻<sup>[4]</sup>, 它的繁殖情况(细胞分裂、休眠孢子和有性生殖)至今未见报道。本文仅以该藻细胞分裂为研究内容, 通过比较该藻在各种光照、温度和盐度条件下的细胞增殖情况, 探索其细胞分裂的昼夜节律变化模式和最适生长条件, 为硅藻繁殖生物学研究提供有益资料。

## 1 材料与方法

实验材料中华半管藻(*Hemiaulus sinensis* Greville)是由林均民 1988 年 9 月分离自厦门近岸海区。用 Guillard's (1968) f/2 改良培养液<sup>[5]</sup>培养。配制培养液用的海水取自厦门大学近岸的满潮水。所有实验均在恒温培养室中进行, 用白色日光灯作为光源。一般培养条件为 25℃ (±1℃),  $75\mu\text{Ein} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 盐度 32 和光暗周期 12h : 12h。

\* 本文在数据分析过程中得到厦门大学海洋系彭兴跃同志帮助, 在此致谢。

\*\* 现在暨南大学水生生物研究所工作。

收稿日期 1993 05 10, 修改稿收到日期, 1993 10 04。

光照实验分 5 个梯度,光强度分别为 4, 5, 18, 45, 75 和  $100 \mu\text{Ein} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 用 Li-185B 型量子计量仪测量; 温度实验以水浴隔室, 用 WMZK-01 温度指示控制仪分别调控, 温度分为 10, 15, 20, 25 和  $30^\circ\text{C}$  5 个梯度, 各组误差为  $\pm 0.5^\circ\text{C}$ ; 盐度实验分为 12, 20, 28, 36 和 44 等 5 个梯度, 配制各种盐度是以消毒海水为基液, 高盐度组按比例加入浓缩海水, 低盐度组加入消毒自来水稀释, 再按 f/2 培养液配方配制。盐度用日本 New-S-100 型盐度折光仪测定。每组实验设置 2 个重复。

叶绿素提取采用联合国教科文组织统一方法<sup>[6]</sup>, 用日本 Shimadzu UV-240 型紫外一可见分光光度计测定光密度, 叶绿素含量计算公式采用 Jeffery (1975) 公式<sup>[7]</sup>:

$$[\text{Chla}] = 11.47(E_{664} - E_{750}) - 0.40(E_{630} - E_{750})$$

$$[\text{Chlc}] = 24.36(E_{630} - E_{750}) - 3.73(E_{664} - E_{750})$$

式中,  $[\text{Chla}]$ 、 $[\text{Chlc}]$  分别为叶绿素 a、c 的浓度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ),  $E_{664}$ 、 $E_{630}$ 、 $E_{750}$  分别为校对后相应波长下的吸光值。叶绿素增长率用  $\mu = 1/t \ln[(C_0 + \Delta C)/C_0]$  表示, 其中  $C_0$  为起始叶绿素浓度,  $\Delta C$  为单位时间内叶绿素浓度变化,  $t$  为时间。

细胞增殖率采用  $\mu = 1/t \log_2(N_t + N_0)$  公式计算, 其中  $N_0$  为起始细胞数,  $N_t$  为终止细胞数。

昼夜节律实验每 2h 取样一次, 进行 2 天, 取平均值; 日均增殖率计算每天取样一次, 取指数期连续 3 天最大值平均。以上实验均重复 2 次以上。

## 2 试验结果

### 2.1 细胞分裂和叶绿素变化的昼夜节律

图 1 是中华半管藻在指数生长期中 24h 的细胞增殖率和叶绿素增长率的昼夜变化模式。在温度  $25^\circ\text{C}$ 、盐度 32, 光强度  $75 \mu\text{Ein} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  和每天光暗周期各 12h 的条件下, 每天细胞分裂出现 2 次高峰(图 1a), 最大分裂峰是在光照 8h 形成, 次高峰出现在黑暗后的 2h 中, 两次

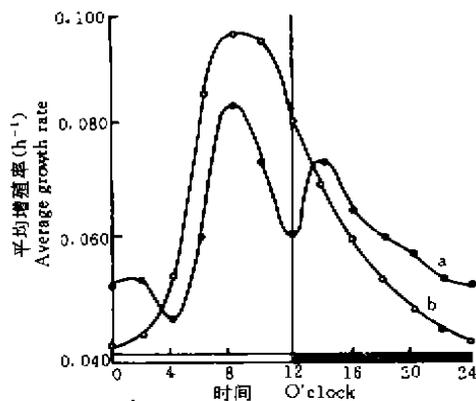


图 1 中华半管藻在  $25^\circ\text{C}$ 、光暗 12h : 12h 条件下以时间为函数的平均特定增殖率(a)和叶绿素增长率(b)

Fig. 1 Average specific growth rate and chlorophyll increase rate as a function of time for *Hemiaulus sinensis* grown at  $25^\circ\text{C}$  on L : D = 12 : 12

分裂频率相隔 6h, 两次高峰后出现增殖率的明显下降。在昼夜变化中, 最高增殖率为 0.084 次/h, 即 2.0 次/d, 日均增殖率为 1.30 次/d, 最低增殖率大于零值。

叶绿素增长率的昼夜变化则呈单峰形曲线(图 1b)。光照一开始, 该藻的光合作用机制就启动, 此时叶绿素增长较慢; 2h 后叶绿素增长率迅速提高, 到光照 8h 后达最高峰, 为 0.097 次/h; 光照 8—10h 内叶绿素合成形成稳定值。进入暗周期后, 叶绿素合成迅速降低, 到暗周期末  $\mu$  值达最低值, 在昼夜变化中叶绿素增长率高峰与细胞增殖率的最大高峰同步于光照后 8h 形成。

### 2.2 环境因子对增殖率的影响

2.2.1 光照和温度效应 用盐度为 32 的培养液进行不同温度和光照强度组合实验, 中华半管藻在指数生长期的细胞增殖率的 25 组实验结果表

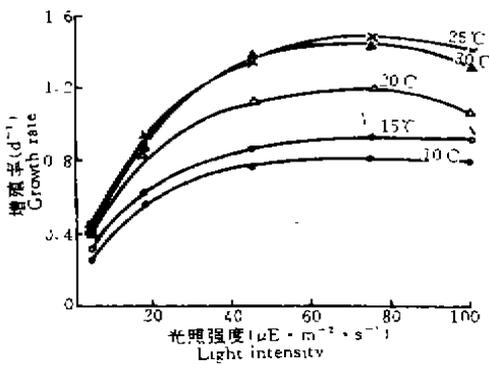


图2 中华半管藻在不同光强度和温度下培养的增殖率曲线

Fig. 2 Growth rate curves of *H. sinensis* cultured at various light intensities and temperatures

示于图2中。

从图2可以看出,各种光温变化条件下该藻细胞呈现不同的增殖率,在 $4.5-45\mu\text{Ein}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光强度范围内,细胞增殖率随着光强度的增强而增大,高温组细胞的增殖明显快于低温组,在 $45-75\mu\text{Ein}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 范围内,各组处于较平缓的增殖,到 $75\mu\text{Ein}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时各组 $\mu$ 值均达到最大,超过 $75\mu\text{Ein}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时增殖率呈降低趋势。图中显示,5个温度组中25°C组最大增殖率1.47次/d,在5组中最高;其次是30°C组,最大增殖率为1.40次/d,但在光强度为 $45\mu\text{Ein}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时,30°C组的增殖率却高于25°C组;25°C以下的20°C、15°C和10°C 3组,在各种光强度条件下的最大增殖率随着温度的降低而减少,分别为1.18次/d,0.9次/d和0.79次/d。从上述结果可以看出,该藻生长的最适光强度为 $75\mu\text{Ein}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,最适温度在25—30°C之间。

为了更直观地表示 $\mu$ 值与实验条件之间的相关性,利用多元回归法,建立表面响应模型,表示它们之间的整体关系,见图3。

为了更直观地表示 $\mu$ 值与实验条件之间的相关性,利用多元回归法,建立表面响应模型,表示它们之间的整体关系,见图3。

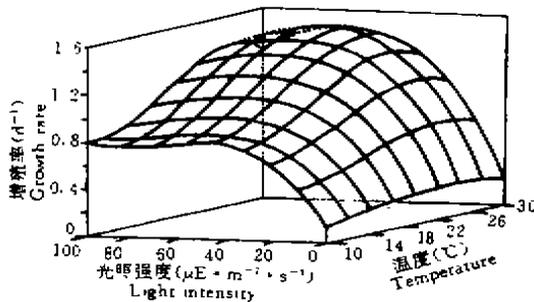


图3 以温度(°C)和光强度( $\mu\text{Ein}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )为函数的增殖率多元响应面

Fig. 3 Multivariate response surface of specific growth rates, ( $\text{d}^{-1}$ ), as a function of temperature,  $T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ), and light intensity,  $L$  ( $\mu\text{Ein}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

模型由以下方程给出:

$$\mu = A + B \times T + C \times T^2 + D \times T^3$$

$$(\gamma = 0.996)$$

$$A = 6.8660 \times 10^{-2} + 7.8941 \times 10^{-2} \times L - 1.2360 \times 10^{-3} \times L^2 + 6.7652 \times 10^{-6} \times L^3$$

$$B = 1.9441 \times 10^{-3} - 9.6181 \times 10^{-3} \times L + 1.4920 \times 10^{-4} \times L^2 - 8.4835 \times 10^{-7} \times L^3$$

$$C = 1.2502 \times 10^{-3} + 5.6208 \times 10^{-4} \times L - 8.3247 \times 10^{-6} \times L^2 + 4.5490 \times 10^{-8} \times L^3$$

$$D = -3.4279 \times 10^{-5} - 9.3635 \times 10^{-6} \times L + 1.4071 \times 10^{-7} \times L^2 - 7.7898 \times 10^{-10} \times L^3$$

其中 $\mu$ 为种群增殖率( $\text{d}^{-1}$ ), $T$ 为温度( $^{\circ}\text{C}$ ), $L$ 为光强度( $\mu\text{Ein}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )。这一模型的回归系数为0.996,与实验结果极为相似。从这一模型上可以找出在盐度32条件下,温度10—30°C之

间,光强度  $4.5\text{--}100\mu\text{Ein}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  之间任何一点上中华半管藻增殖率变化情况。

实验中发现,光照强度高于  $100\mu\text{Ein}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  时,该藻指数生长期缩短,许多细胞原生质变为空球状,甚至死亡;光强度过低,则停滞期延长。另外,该藻在  $8\text{--}32^\circ\text{C}$  温度范围内均能正常生长,但在  $5^\circ\text{C}$  或  $35^\circ\text{C}$  下藻细胞死亡,体现该藻耐温范围在  $5\text{--}35^\circ\text{C}$  之间。

**2.2.2 光照和盐度效应** 在  $25^\circ\text{C}$  温度条件下进行各种光强度和培养液盐度实验,结果如图 4,各盐度组的细胞增殖率随着光强度增高而增大,在光强度为  $75\mu\text{Ein}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  时达最高值,超过  $75\mu\text{Ein}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,增殖率趋于降低。在各种光照条件下,随着培养液盐度的增高,各组细胞增殖率提高,盐度为 28 时,细胞增殖率达最大值  $1.72$  次/d;盐度继续提高时,细胞增殖率随之而降低。盐度为 12、20、36 和 44 四组的最大增殖率分别为  $0.58$  次/d,  $1.43$  次/d,  $1.26$  次/d 和  $0.66$  次/d。

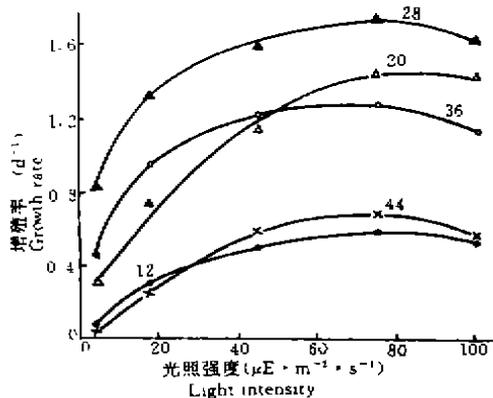


图 4 中华半管藻在不同光强度和盐度下培养的增殖率曲线

Fig. 4 Growth rate curves of *H. sinensis* cultured at various light intensities and salinities

图 5 的表面模型用多元回归法表现了  $\mu$  值与光、盐范围之间的整体关系。模型由以下方程给出:

$$\mu = a + bL + c \times L^2 + d \times L^3$$

$$(Y = 0.955)$$

$$a = -6.1685 \times 10^{-1} + 3.5712$$

$$\times 10^{-2} \times S + 1.6551$$

$$\times 10^{-3} \times S^2 - 5.5371$$

$$\times 10^{-5} \times S^3$$

$$b = 4.7635 \times 10^{-2} + 4.8649$$

$$\times 10^{-3} \times S + 2.5148$$

$$\times 10^{-4} \times S^2 - 2.7350$$

$$\times 10^{-6} \times S^3$$

$$c = -1.6956 \times 10^{-3} + 2.2290 \times 10^{-4} \times$$

$$S - 9.6267 \times 10^{-6} \times S^2 + 1.0801$$

$$\times 10^{-7} \times S^3$$

$$d = 9.6840 \times 10^{-5} - 1.3374 \times 10^{-6} \times S + 5.68494$$

$$\times 10^{-8} \times S^2 - 6.4997 \times 10^{-10} \times S^3$$

其中  $\mu$  为种群增殖率 ( $\text{d}^{-1}$ ),  $L$  是光强度 ( $\mu\text{Ein}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ),  $S$  为盐度。该模型回归系数为 0.955,基本上能真实反映实验情况。从图 5 可以找出  $25^\circ\text{C}$  温度条件下,光照  $4.5\text{--}100\mu\text{Ein}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,盐度 12—44 范围内任何一点上中华半管藻增殖率的近似值。

实验中发现光强度超过  $100\mu\text{Ein}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  时,低盐度组(12,20)要比高盐度组(36,40)生长好。实验中也观察到,突然增高或降低培养液浓度,将导致细胞发生严重的质壁分离或解体直至死亡。采取逐级增加或降低盐度,可以使藻细胞生长在 7—50 的盐度范围内,而放入盐度为 4 或 52 的培养液中,该藻不能存活。

### 3 讨论

自养性浮游植物以光为能量,它们的生长和增殖在不同程度上都依赖光暗周期而变化,60 年代人们就发现, *Gonyaulax polyedra* 和 *Euglena gracilis* 等种类的细胞分裂严格控制在光周

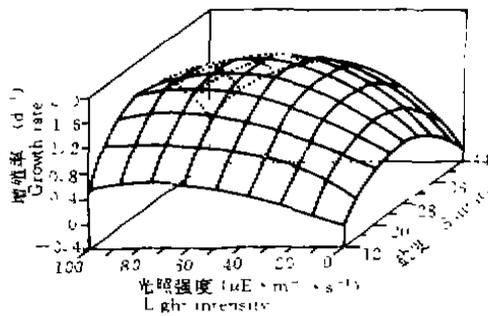


图 5 以光强度和盐度为函数的增殖率多元响应面

Fig. 5 Multivariate response surface of specific growth rates ( $d^{-1}$ ), as a function of light intensity,  $L$  ( $\mu Ein \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ ), and Salinity,  $S$

期的某一时刻,以后更多的研究证实,大多数浮游植物光合作用和细胞周期都由一个内在的生物钟通过光暗周期控制<sup>(8)</sup>。

中华半管藻细胞增殖和叶绿素增长也存在一定的节律性。如图 1a 所示,该藻在光暗周期 12h : 12h 的情况下的细胞分裂情况,一天中分别在光照后 8h 和进入暗周期 2h 出现 2 次分裂高峰,日均增殖率 1.3 次/d。但 *Thalassiosira fluviatilis* 在光照后 8h 和黑暗 6h 后出现 2 次高峰,日均增殖率为 1.28 次/d<sup>(9)</sup>,而 *T. weissflogii* 在 8h : 16h 光暗周期中分裂高峰在黑暗中 12h 后形成<sup>(3)</sup>,这显示不同种类在不同条件下细胞分裂节律互不相同。

因此 Chisholm 等认为,浮游植物不同的分裂与同化节律可以使它们减少种间竞争,也是它们适应环境,以利生存的一种内在调节机制<sup>(8)</sup>。

该藻种群叶绿素昼夜增长情况显示(图 1b),在光周期中叶绿素合成不断加快,进入暗周期叶绿素增长率减缓。许多事例证实了浮游植物的这一共同特征。Brand 研究 8 种浮游植物叶绿素荧光的光周期变化时发现,它们在光周期里细胞叶绿素荧光和 DCMV 增强叶绿素荧光的生长率较高,而在暗周期较低<sup>(9)</sup>,*Skeletonema costatum* 在整个光周期都进行叶绿素 a 的合成,光周期中期光合能力最高,暗周期中期最低<sup>(10)</sup>。Owens 认为 *S. costatum* 细胞内叶绿素 a 和 c 含量变化的周期性并非细胞分裂的结果,而是由光暗周期控制<sup>(11)</sup>。这些实验显示了叶绿素合成在光暗周期控制下的变化规律,反应了浮游植物对光反应的共同特征。

Darley(1982)指出,在限定的光强度范围内,光合速率与光强度成正比,光饱和时,光合速率趋于平稳,而过高的光强度对光合作用产生抑制<sup>(12)</sup>。对于整个浮游植物群落而言,光合速率与细胞增殖率基本上是一致的。图 2 和图 4 的各条曲线都符合这个规律。

温度和饱和光强度关系在不同藻类中也各不相同。冷水性的 *T. nodenskiodii* 培养在 5—15℃ 范围内显示,随着温度升高最适生长的光强度则降低<sup>(13)</sup>。对 *S. costatum* 的研究表明,在 5—18℃ 下饱和光强度为 12000—16000lx,若超过 18℃ 就降到 4000—6000lx,同时,温度升高最适光强度范围也缩小<sup>(13)</sup>。中华半管藻中未发现温度对最适光强度的明显影响,但在 10—25℃ 范围内,温度升高时饱和光强度范围也随之缩小。Yoder 对 *S. costatum* 的研究也得到了同样的结果<sup>(14)</sup>。

生态类型不同反映各种硅藻有不同的适盐范围,一般沿岸性浮游植物培养时所要求的最适盐度可能在 20—25 之间,略低于自然状态的盐度,而外海性种类在盐度 35 中生长最好<sup>(1,15,16)</sup>。冰川硅藻, *S. costatum* 和 *Detonula confervacea* 等都有不同的适盐范围<sup>(1,15—17)</sup>。中华半管藻可生长在 7—50 的盐度范围内,最适盐度为 28,显示广盐性的沿岸种类特征。

用多元回归分析法进行数学模拟基本概括了中华半管藻对环境因子响应特征(图 3,5)。这两个模型的复合相关系数分别达 0.996 和 0.955,拟合值与实验值的相对误差极小,这种模型更加直观地表现了增殖率与环境因子的关系。根据模型预测,零增长时温度接近 4℃,盐度为 4 左右,这与实验中 5℃ 或盐度为 4 时藻类不能生长相吻合的。Miller 描述过 *Nitzschia amer-*

*icana* 的生长率与环境因子模型,发现在低盐范围内,细胞增殖率急剧降至零<sup>[18]</sup>。中华半管藻以温度或盐度为函数的生长模型,是随着温度或盐度的增加,生长增长到最大值,随后增长率降低并突然降至接近零的最低点。

### 参 考 文 献

- 1 Darley W M. *Algal Biology, a physiological approach*. Blackwell scientific publication, Oxford Lonton Edinburgh Boston Melbourne, 1982, 25—31
- 2 Harding L W. *et al.* Diel periodicity of photosynthesis in marine phytoplankton. *Marine Biology*, 1981, 61, 95—105
- 3 Putt M and Barbara B P. Diel periodicity of photosynthesis and cell division compared in *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, 1988, 24, 315—324
- 4 金德祥等. 中国海洋浮游硅藻类. 上海, 上海科技出版社, 1965, 164—165
- 5 华汝成编著. 单细胞藻类的培养与利用. 北京, 农业出版社, 1986, 305
- 6 联合国教科文组织编著. 海水中光合色素的测定. 北京, 国家海洋局, 1982
- 7 Jeffrey S W and Humphrey G E. New spectrophotometric equations for determining chlorophyll a, b, c<sub>1</sub>, and c<sub>2</sub> in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. pflanzen (BPP)*, Bd. 1975, 167(5), 191—194
- 8 Chisholm S W and Costello J C. Influence of environmental factors and population composition on the timing of cell division in *Thalassiosira fluviatilis* (Bacillariophyceae) grown on light/dark cycle. *J. Phycol.*, 1980, 16, 375—383
- 9 Brand L E. Persistent diel rhythms in the chlorophyll fluorescence of marine phytoplankton species. *Marine Biology*, 1982, 69, 253—262
- 10 Stagaad K and Jensen A. Diurnal and Circadian rhythms in the turbidity of growing *Skeletonema costatum* culture. *Marine Biology*, 1982, 66, 261—268
- 11 Owens T G *et al.* Diel periodicity in cellular chlorophyll content in marine diatom. *Marine Biology*, 1980, 59, 71—77
- 12 Durbin E G. Studies on the autecology of the marine diatom *Thalassiosira nordenskioldii* Cleve. 1. The influence of daylength, light intensity and temperature on growth, 1974, 10, 220—225
- 13 Curl H Jr and Guy C W. The physiological ecology of a marine diatoms. *Skeletonema costatum* (Grev) Cleve. *J. Mar. Res.* 1961, 19(2), 70—88
- 14 Yoder J A. Effect of temperature on light-limited growth and chemical composition of *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *J. Phycol.* 1969, 5, 150—157
- 15 Loban C S *et al.* The physiological of seaweeds. Cambridge University Press, London New York New Rochelle, 1985, 49—55
- 16 Smayda T J. Experimental observations on the influence of temperature, light and salinity on cell division of the marine diatom, *Detonula confervacea* (Cleve) Gran, 1969, 5, 150—157
- 17 Grant W S and Horner R A. Growth responses to salinity variation in four arctic ice diatoms. *J. Phycol.*, 1976, 12, 180—185
- 18 Miller R L and Daniel L K. Effects of temperature, Salinity, irradiance and diurnal periodicity of growth and photosynthesis in the diatom *Nitzschia americana*; light-saturated growth. *J. Phycol.*, 1986, 22, 339—348

STUDY ON THE REPRODUCTIVE BIOLOGY OF  
*HEMIAULUS SINENSIS* GREVILLE: I. CELL  
DIVISION AND ENVIRONMENTAL FACTORS

Zheng Lei Lin Junmin Jin Dexiang  
(Dept. of Biology, Xiamen University, Xiamen, 361005)

Cell division was found to be the major reproductive manner of *Hemiaulus sinensis*, an estuarine diatom. The experimental results revealed that this species present a diurnal periodicity in cell division and chlorophyll synthesis. Under a 12hL, 12hD condition, the highest peak of cell division appeared after 8 hour illumination, and the second peak appeared after 2 hour darkness, while chlorophyll synthesis had also got the highest peak after 8 hour illumination and then decreased gradually to the lowest value at the end of the dark. *H. sinensis* had an optimal salinity of 28, a suitable salinity in the range of 7—50, an optimal temperature in the range of 25—30°C, and a saturated light intensity of 75  $\mu\text{Ein. m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , for its growth. Dynamic surface models based on multiple regression were developed to represent the overall relationship between the reproductive rate ( $\mu$ ) of this diatom species and the environmental conditions. It was thus concluded that *H. sinensis* was a subtropical and wide-range-of-salinity adapted species of algae.

**Key words:** *Hemiaulus sinensis* Greville, diurnal periodicity, growth rate, environmental factors.