

双角多甲藻有性生殖及厚垣合子形成条件的研究*

张舒群 黎尚豪

(中国科学院水生生物研究所, 武汉)

提 要

双角多甲藻在 MCV 合成培养基中的最短加倍时间约 6 天, 其有性生殖可用缺氮培养基进行诱导。批量培养的迟滞期和指数生长期末细胞的诱导效率最高, 合子产率可达 70%。厚垣合子形成的最适温度为 19℃、pH 7.4、光强 5 200 lx。在鉴定的 70 个克隆藻株中, 有 2 株为同宗配合; 48 株为异宗配合, 其中“+”株 23 个, “-”株 25 个; 其余 20 株未能诱导出有性生殖。合子开始萌发时, 在中层壁和内层壁之间的空间出现 1 至多个“管状结构”, 协助原生质体将合子壁顶破, 外包一层薄壁的原生质体放出。

关键词 甲藻, 有性生殖, 交配型, 性别分布, 厚垣合子萌发

早在 1879 年, Joseph 就描述了 *Peridinium stygium* 的配子融合现象^[12]。之后的近 80 年中, 对甲藻生活史中有性生殖的有、无一直存在着争论。Fritsch (1948) 认为甲藻的配合是不正常的偶然现象^[7]。直至 von Stosch (1964, 1965) 报道了 *Ceratium horridum* 和 *C. cornutum* 有性生殖核配的详细过程^[17,18]后, 甲藻的有性生殖才得到公认。迄今, 至少已在 15 属 30 种甲藻的生活史中观察到有性阶段^[1,2,4,7,9,12-19]。

作者在报道双角多甲藻 (*Peridinium bipes* Stein) 有性生殖的基础上, 对其交配型 (mating type)、厚垣合子的萌发、有性生殖的诱导及合子形成条件进行了进一步的研究。

材 料 与 方 法

(一) 双角多甲藻的采集、分离及培养

双角多甲藻采自南京中山陵的小水池。采回后先用池水培养。在解剖镜下用微吸管吸取单个细胞, 在 1/2 MCV 培养液中洗涤 6 次, 接入 4 × 10 孔细胞培养板的小孔中, 每个小孔加有约 0.2 ml 的 1/2 MCV 培养液, 共分离了 400 个细胞。放入 LRH-150G 光照培养箱中培养, 16℃, 3 500 lx 光照 12 h: 黑暗 12 h。两个月后, 约 200 个孔内的细胞数增至 100 以上, 用吸管将其转入加有 3 ml 1/2 MCV 培养液的小玻璃碗中进行培养, 50 天

* 实验中得到本所俞敏娟研究员和其他同志的帮助, 由戴尚真、郑英同志帮助绘图, 在此表示衷心感谢。
1988 年 6 月 2 日收到。

后转入 50 ml 锥瓶中用全 MCV 进行培养。共得 96 个纯净的克隆培养。所有用具都经高压灭菌 (15 磅, 30 min), 细胞培养板用 75% 乙醇浸泡两天, 再用紫外灯照射 3 h。

(二) 双角多甲藻最适生长条件的确定

光强实验采用底面照光, 4 支 30 W 日光灯用绘图纸遮挡形成光照梯度。pH 梯度实验用 3.85 mmol/L Hepes 作为缓冲剂, 用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L HCl 调至各 pH, 测定用 Cole-Parmer 5985-50 型 pH 计, 接种浓度 2 000 cells/ml 左右。用 QYQ-200 取液器取 50 μ l 或 25 μ l 培养物, 戊二醛固定后计数, 确定细胞浓度。

(三) 交配试验及最适诱导条件的确定

将指数生长期末(生长约 40 天)的各克隆培养分别离心 (500 转/min, 3 min), 转入无氮、磷 MCV 培养基, 然后每两克隆之间进行组合, 30 天后在解剖镜下检查有无合子形成, 以确定各克隆的交配型。在进行定量研究时, “+”、“-”株要按 1:1 混合, 最终浓度约 2 000 cells/ml。除注明外, 诱导条件为: 18 $^{\circ}$ C, 3 500 lx 光照 12 h: 黑暗 12 h。30 天后, 用微量取样器取 100 μ l 藻液, 戊二醛固定后, 分别对营养细胞和合子计数, 按下面公式计算合子产率:

$$\text{合子产率(\%)} = \frac{2 \times (\text{合子数/ml})}{\text{营养细胞数/ml} + 2 \times (\text{合子数/ml})} \times 100$$

(四) 有性生殖及厚垣合子萌发过程的观察

将正在配合的细胞用微吸管转入盛有无氮、磷 MCV 培养液的凹玻片中, 每天观察, 需要时补加无氮、磷 MCV 或将细胞转入另 1 凹玻片。厚垣合子萌发的观察是用微吸管将正在萌发的合子或减数细胞 (meiocyte) 转入加有 MCV 培养液的凹玻片中, 每天观察。观察用 Olympus 解剖镜和 Zeiss Winkel 双筒显微镜。

结 果

(一) 双角多甲藻生长的最适条件

试验了改良 Chu 10、SE、Volvox^[11] 及 Carefoot^[3] 等培养液, 均未获得满意效果。经多次试验, 配制了适合双角多甲藻生长的 MCV 培养基。起初该培养基中每 1 000 ml 加有 0.3 ml 复合维生素, 经比较实验, 发现加与不加复合维生素无区别。说明双角多甲藻是完全的光合自养型生物。图 1A 是一个典型的双角多甲藻生长曲线, 培养温度 18 $^{\circ}$ C、光强 3 500 lx、光周期 12 h 黑暗: 12 h 光照。接种浓度 2 200 cells/ml, 经 40 多天的生长, 细胞浓度达 2.7×10^4 cells/ml, 加倍时间约 9 天。在实验条件下, 双角多甲藻生长最适温度为 18 $^{\circ}$ C (图 1B), 最适光照 5 000 lx 或更高 (图 1C), 最适 pH 为 7.2 (图 1D)。在此条件下, 细胞加倍时间约 6 天。

在强烈通气时, 细胞脱去鞭毛, 停止生长。而在缓慢通气条件下, 双角多甲藻能生长。不通气时生长较快。

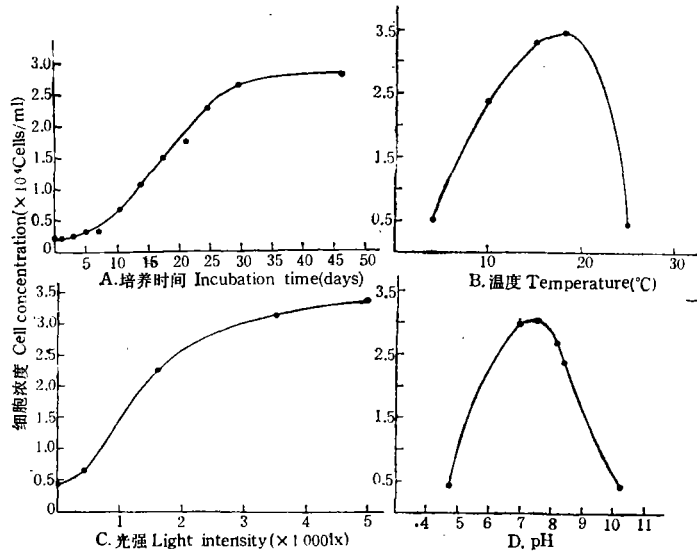


图1 双角多甲藻在 MCV 培养基中的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *Peridinium bipes* in MCV medium

A. 培养条件为 18°C, 3 500 lx 光照 12 h: 黑暗 12 h; B. 温度对生长的影响;

C. 光强对生长的影响; D. pH 对生长的影响

A. Culture was incubated at 18°C on a 12:12 h light:dark cycle under a light intensity of 3 500 lx; B. Temperature effect; C. Light intensity effect; D. pH effect

(二) 交配试验

用缺氮、磷 MCV 培养对指数生长期末的 70 个克隆藻株进行诱导。30 天后检查,发现在 PbC58 和 PbC66 两个克隆中有合子形成。将这两个藻株再次克隆,诱导后仍有合子形成。说明 PbC58 和 PbC66 为同宗配合。将剩下的 68 个克隆进行交配试验,发现有 48 个克隆为异宗配合,其中“+”株 23 个,“-”株 25 个,两者之比约为 1:1。还有 20 个克隆未观察到有合子形成,称之为“0”株。将“0”株细胞转入缺氮、磷 MCV 培养基后,细胞便不再分裂,而是不断长大,积累大量贮存物质,并保持游动状态。表 1 为重新排列的部分克隆配合情况。

(三) 有性生殖的诱导及批量培养不同生长时期的诱导效率

各种营养缺乏培养基对有性生殖的诱导效率如图 3A 所示。以不进行转接的“+”、“-”株 1:1 混合培养物(用离心上清液稀释到与实验组相近的浓度: 2 000 cells/ml)作为对照。3 500 lx 12 h 光照: 12 h 黑暗, 18°C 条件下培养 30 天。对照、MCV、1/2N、1/2P、MCV、1/5N、1/5P、MCV、无 N、P、MCV、无 N、MCV、无 P、MCV、无 Ca⁺⁺ MCV、无 Mg⁺⁺ MCV 无 Fe⁺⁺⁺ MCV 和无 K⁺ MCV 的合子产率分别为: 12.4%、0.9%、7.2%、42.9%、59.0%、54.4%、5.9%、0.8%、1.0%、5.9% 和 1.6%。可见缺氮对有性生殖的诱导效率最高。缺氮、磷 MCV 培养基中的合子产率虽高于 1/5 氮、1/5

表 1 重新排列的部分克隆配合试验结果

Tab. 1 Rearranged results of mating tests of some clones

PbC	1+	3+	4+	12+	6-	9-	16-	26-	270	340	360	590
1+	0	0	0	0	h	h	h	h	0	0	0	0
3+	0	0	0	0	h	h	h	h	0	0	0	0
4+	0	0	0	0	h	h	h	h	0	0	0	0
12+	0	0	0	0	h	h	h	h	0	0	0	0
6-	h	h	h	h	0	0	0	0	0	0	0	0
9-	h	h	h	h	0	0	0	0	0	0	0	0
16-	h	h	h	h	0	0	0	0	0	0	0	0
26-	h	h	h	h	0	0	0	0	0	0	0	0
270	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
340	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
360	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
590	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

注: 0 表示无合子产生; h 表示有合子产生; “+”或“-”交配型的指定是任意的

0 no hypnozygote; h hypnozygotes present; Designation of mating types as “+” or “-” was arbitrary

磷 MCV 培养液, 但其中合子较小, 所以培养液中存在少量氮、磷有利于合子的发育。

图 2 为缺氮、磷 MCV 对批量培养不同生长时期有性生殖的诱导效率。批量培养接

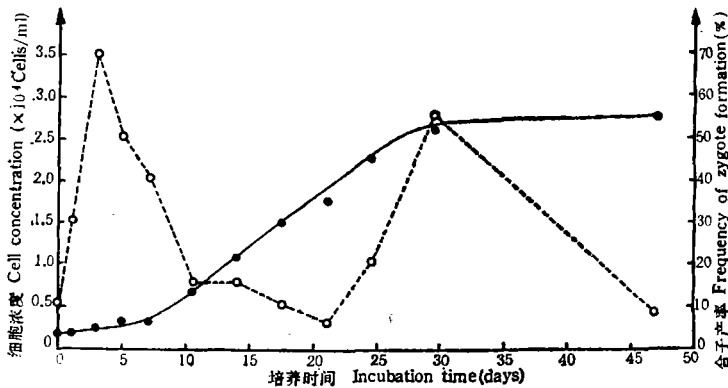


图 2 批量培养不同生长时期细胞的有性生殖潜力

Fig. 2 Potential for sexual reproduction in different growth stages of batch culture

●—● 生长曲线 Growth curve; ○····○ 合子产率 Frequency of zygote formation (%)

入的细胞为静止期, 培养条件为 18°C , 3 500 lx。每次取“+”、“-”株藻液各 4 ml, 计数, 然后将其按 1:1 混合, 离心 3 min (500 转/min), 接入缺氮、磷培养液中, 浓度约 2 000 cells/ml, 30 天后计数。从图中可以看出: 在迟滞期(接入后 3 天)和指数生长期末(接入后 30 天)有两个诱导高峰。说明这两个时期细胞分化形成配子的潜力最大。因此所有

的诱导实验都是用指数生长期末细胞。

(四) 有性生殖及厚垣合子形成的最适条件

最适温度为 19℃ 时的合子产率为 67% (图 3B)。在 4℃ 时, 由于细胞分裂受阻, 不能分化形成配子, 所以合子产率近零, 这说明诱导后的细胞分裂是配子分化的必须条件。30℃ 时, 细胞死亡, 更无合子形成。图 3C 为光强对合子产率的影响。光强在 5 200 lx 时仍未达到饱和。合子形成的最适 pH 为 7.4, 在 pH 4.3 或 10.8 时, 同样由于细胞不能分裂, 无配子产生, 所以合子产率为零。

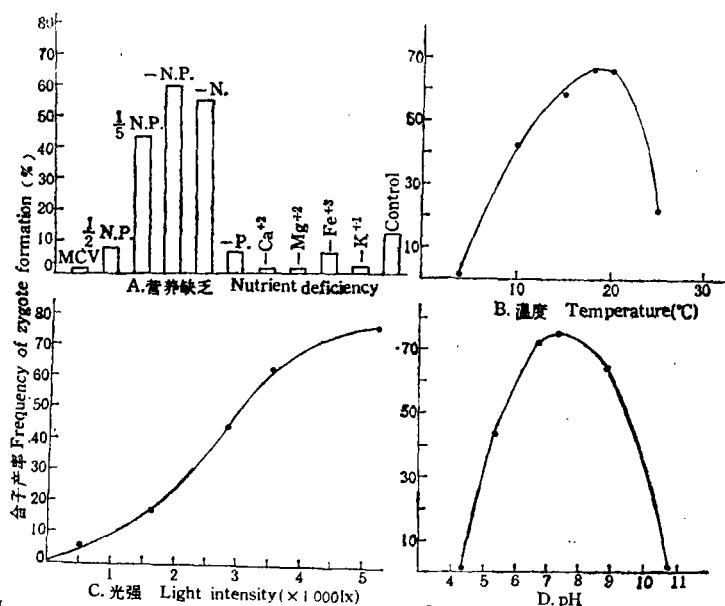


图 3 营养缺乏 (A)、温度 (B)、光强 (C)、pH (D) 对合子形成比率的影响
Fig. 3 Effects of nutrients deficiency (A), temperature (B), light intensity (C) and pH (D) on the frequency of zygote formation in *Peridinium bipes* Stein

有性生殖的最适条件与生长最适条件相近。缺氮诱导启动了有性生殖有关基因的表达, 但配子分化的完成还依赖于诱导后的一次细胞分裂。在最适生长条件下, 这次细胞分裂能得以顺利完成, 从而配子分化频率较高, 合子形成比例也相应增加。

(五) 双角多甲藻的有性生殖及厚垣合子的萌发

在双角多甲藻配子的配合过程中, 大多数核配是在质配完成后不久进行的。也观察到极少数融合细胞在质配尚未完成时即行核配的, 但未见有正常的厚垣合子形成。

在同宗配合的 PbC58, PbC66 两个克隆中, 配子较大, 有明显的板片层。配对后, 两细胞很快失去鞭毛, 停止游动。经十几天的缓慢变化, 形成无红色贮存体 (red accumulation body) 的合子。其壁无明显增厚, 仍保持很浓的色素, 呈棕色。细胞内有大量的贮存淀粉颗粒。在合子最外的板片层上可见有 4 个小缺口——两细胞融合的痕迹。其形若

层增厚形成的中层壁 (mesospore wall) 和紧靠原生质体的内层壁 (endospore wall)。在合子休眠过程中, 板片层从横沟处裂开、脱去, 这时的厚垣合子仅剩两层壁。在合子开始萌发时, 从细胞腹面伸出 1 至多个“管状结构”, 粗约 $2\ \mu\text{m}$, 其上可见横纹。开始该结构绕成 1—2 圈螺旋, 然后螺旋放开、伸长, 将原生质体连同一层薄壁挤出。此过程可见明显的机械作用, 但也不排除有酶参与这一过程。Morrill & Loeblich (1981) 的研究表明: 甲藻营养细胞的表膜层及合子中层壁为类孢粉素物质 (sporopollenin-like material) 构成^[10]。对强酸、强碱、高渗与机械作用有很强的抗性, 这也是该结构容易保留形成化石的重要原因。在厚垣合子萌发过程中, 突破坚实的中层壁是原生质体放出的先决条件, 而该“管状结构”的出现与破壁密切相关。其详细结构、发生及破壁机制有待进一步研究。

(三) 不同克隆的配合潜力和配子形成的诱导

在 48 个异宗配合的克隆中, 有 19 个(“+”株 9 个, “-”株 10 个) 生长较快, 缺氮诱导时, 配子分化效率很高。这些克隆在批量培养进入静止期后, 即使不经缺氮诱导, 也能形成大量配子。因而将这些“+”、“-”株混合后诱导, 能产生大量的厚垣合子, 称之为“高配合潜力克隆” (high mating potential clones)。其余 29 个克隆生长较慢, 进入静止期后, 如不经缺氮诱导, 配子分化比例极低, 即使经缺氮 MCV 诱导, 合子产率仍然较低, 称之为“低配合潜力克隆” (low mating potential clones)。另外, 还有 20 个克隆未能诱导出有性生殖。在缺氮条件下, 这些克隆便不再分裂, 积累大量贮存物质并保持游动状态, 称之为“零配合潜力克隆” (zero mating potential clones)。在这 3 种类型中, 零配合潜力克隆最易保种, 可长期不用转接。而高配合潜力克隆最难保种, 每 1 个半月就要转接一次。否则细胞不断分裂, 越分越小, 最终死亡。

在实验过程中还发现混合培养藻种的有性生殖能力会不断降低而最终消失。可能就是在这个“人工种群”中, 零配合潜力克隆逐渐取代了高配合潜力克隆, 成为优势成份。在自然水体中, 高配合潜力克隆能迅速对环境变化(如氮源的耗尽)作出反应, 形成合子, 渡过随之而来的高温环境, 形成竞争优势, 因而能在自然种群中保持一个较高的比例。以上所述为不同克隆之间配合潜力的变化。实际上, 即使同一克隆, 随着人工培养时间的增加, 配合潜力也有所下降。在 *Chlamydomonas reinhardtii* 中也有类似情况^[9]。这可能是由于长期的营养繁殖抑制了有性生殖有关基因的表达。

(四) 配子的配合类型及性别分布

双角多甲藻游动配子的大小可从 $20 \times 15\ \mu\text{m}$ 到 $45 \times 40\ \mu\text{m}$, 体积相差近 11 倍。在大多数情况下, 同一诱导物中的配子大小相近, 但在“+”、“-”株处于不同生长期时进行缺氮诱导, 可观察到大小相差很大的两个配子进行配合。可见在双角多甲藻的有性生殖中, 存在着同配、异配及中间的过渡情况。这种差别是由诱导时营养细胞所处状态及诱导条件不同造成的。

在同一池塘中分离得到的双角多甲藻克隆培养中, 既有同宗配合又有异宗配合。由于尚未找到合适的标记性状, 无法确定异宗配合克隆与同宗配合克隆之间是否有生殖隔离。

双角多甲藻的同宗配合克隆与异宗配合克隆在形态上没有区别。它们在演化上的关系是怎样的呢?异宗配合的品系中,配子的性别决定先于配子的分化,决定“+”、“-”配子的遗传信息载于不同的细胞中。同宗配合的品系有两种可能:配子没有性别分化,任何两个配子之间都能配合;配子有性别分化,“+”、“-”配子的性别决定源于基因的差异表达,其性别在配子分化时决定。很显然,异宗配合增加了遗传重组的有效性,是相对高级的性状。那么,是否可以说:双角多甲藻异宗配合克隆是由同宗配合克隆演化而来的呢?实际上情况并不这么简单。Hayhome & Whitten (1987) 诱导 *Peridinium volzii* 异宗配合藻株形成合子,然后克隆了 30 个萌发合子培养藻株,经鉴定:大多数克隆为“-”交配型;有些是“+”交配型;奇怪的是竟然有一个克隆是同宗配合^[8]。可见在甲藻中,性别分布并不象其它藻那样稳定。

总之,与其它藻类相比,双角多甲藻有性生殖表现出更大的多样性和特殊性。这与甲藻在系统演化中所处的特殊地位有一定关系。

参 考 文 献

- [1] 刘志礼、张舒群, 1987. 双角多甲藻有性生殖的初步观察. 植物学报, 29: 229—235.
- [2] Anderson, D. M., Coats, D. W. & Tyler, M. A., 1985. Encystment of the dinoflagellate *Gyrodinium uncatenum*: Temperature and nutrient effects. *J. Phycol.*, 21: 200—206.
- [3] Carefoot, J. R., 1968. Culture and heterotrophy of the freshwater dinoflagellate, *Peridinium cinctum* [a. *ovoplanum* Lindeman. *J. Phycol.*, 4: 129—131.
- [4] Chesnick, J. M. & Cox, E. R., 1987. Ultrastructure of sexual stages in the binucleate dinoflagellate *Peridinium balticum*. *J. Phycol.*, 23(suppl.): 77.
- [5] Chiang, K. S., Kates, J. R., Jones R. F. & Sueoka, N., 1970. On the formation of a homogeneous zygotic population in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Develop. Biol.*, 22: 655—669.
- [6] Dürr, G., 1979. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Panzer von Dinoflagellaten. III. Die Zyste von *Peridinium cinctum*. *Arch. Protistenkd.*, 122: 121—139.
- [7] Fritsch, F. E., 1948. The structure and reproduction of the algae. Vol. 1 pp. 703—704. Cambridge Univ. Press.
- [8] Hayhome, B. A. & Whitten, D. J., 1987. Recombination and uniparental transmission of genetic markers in the dinoflagellate *Peridinium volzii*. *J. Phycol.*, 23(suppl.): 91.
- [9] Kelley, I. V., 1987. The life cycle of “*Gloecodinium-Hemidinium*”. *J. Phycol.*, 23(suppl.): 22.
- [10] Morrill, L. C. & Loeblich, A. R., 1981. The dinoflagellate pellicular wall layer and its occurrence in the division Pyrrophyta. *J. Phycol.*, 17: 315—323.
- [11] Nichols, H. W., 1973. Growth media. In: Handbook of phycollogical methods. Vol. 1, ed. by J. R. Stein pp. 7—24. Cambridge Univ. Press.
- [12] Pfiester, L. A., 1984. Sexual reproduction. In: Dinoflagellates ed. by D. L. Spector pp. 181—199. Academic Press.
- [13] Pfiester, L. A., Timpano, P., Skvaria J. & Holt, J., 1984. Sexual reproduction and meiosis in *Peridinium inconspicuum* Hemmerman (Dinophyceae). *Am. J. Bot.*, 71: 1121—1127.
- [14] Sako, Y., Ishida, Y., Kadota, H. & Hata, Y., 1984. Sexual reproduction and cyst formation in the freshwater dinoflagellate *Peridinium cunningtonii*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 50: 743—750.
- [15] Sako, Y., Ishida, Y., Kadota, H. & Hata, Y., 1985. Excystment in the freshwater dinoflagellate *Peridinium cunningtonii*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 51: 267—272.
- [16] Sako, Y., Ishida, Y., Nishijima, T. & Hata, Y., 1987. Sexual reproduction and cyst formation in the freshwater dinoflagellate *Peridinium penardii*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53: 473—478.
- [17] von Stosch, H. A., 1964. Zum Problem der sexuellen Fortpflanzung in der Peridineegattung *Ceratium*. *Helgol. Wiss. Meeresunters.*, 10: 140—152.
- [18] von Stosch, H. A., 1965. Sexualität bei *Ceratium cornutum* (Dinophyta). *Naturwissenschaften*, 52: 112—113.
- [19] Watanabe, M. M., Watanabe M. & Fukugo, Y., 1982. Encystment and excystment of red tide flagellates.

I. Induction of encystment of *Scrippsiella trochoidea*. Nat. Inst. Environ. Stud., Res. Rep. No.30 pp. 27—42.

SEXUAL REPRODUCTION AND HYPNOZYGOTE FORMATION IN THE FRESHWATER DINOFLAGELLATE *PERIDINIUM BIPES* STEIN

Zhang Shuqun and Li Shanghao

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan)

Abstract

The optimum growth condition for *Peridinium bipes* in synthetic MCV medium was at 18°C, pH 7.4 and 5000 lx. Under this condition, the doubling time was about 6 days. Sexual reproduction was induced by transferring vegetative cells into nitrogen-free MCV medium. The maximum frequency of gamete induction was achieved at late lag stage and late exponential growth stage of batch culture, and the rate of hypnozygote formation was as high as 70%. The optimum condition for zygote formation was almost the same as that for growth.

Mating types of 70 clones were identified. Two of them were homothallic. Forty eight clones were heterothallic; among these, 23 were "plus" and 25 "minus". In the remaining 20 clones, sexual reproduction was not observed.

During the process of hypnozygote germination, one to several "tubular structure" appeared in the space between mesospore wall and endospore wall. Obviously, this structure could help the pre-meioocyte rupturing the thick mesospore wall by offering mechanical force.

Key words

Dinoflagellate, Sexual reproduction, Mating type, Sex distribution, Hypnozygote germination