

学校编码: 10384

分类号_____

学号: 21620111152379

密级___UDC__

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

人工培养条件下两种海洋硅藻的畸变形态与
机理初探

Valve Teratology of Two Marine Diatoms Under the Artificial
Culture: Forms and Potential Mechanism

刘春燕

指导教师姓名: 高亚辉教授

专 业 名 称: 水生生物学

论文提交日期: 2014 年 月

论文答辩时间: 2014 年 月

学位授予日期: 2014 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2014 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

摘要	I
Abstract	III
第一章 前言	1
1.1 硅藻的形态分类学研究	1
1.2 硅藻硅质壳的结构与形成	2
1.2.1 硅藻硅质壳的一般形态.....	2
1.2.2 硅藻细胞繁殖的方式.....	4
1.2.3 硅质壁形成的一般性过程.....	5
1.3 人工培养条件下硅藻硅质壳畸变研究进展	6
1.3.1 硅藻畸变概述.....	6
1.3.2 人工培养条件下硅藻形态畸变的类型.....	7
1.3.3 人工培养条件下硅藻畸变产生的原因.....	9
1.4 本研究的主要内容	10
第二章 材料和方法	11
2.1 实验材料.....	11
2.1.1 硅藻藻种.....	11
2.1.2 常用仪器.....	11
2.1.3 常用试剂.....	12
2.1.4 常用溶液配制.....	12
2.2 实验方法	13
2.2.2 藻种培养.....	13
2.2.3 生长曲线与细胞形态畸变率曲线.....	15
2.2.4 样品观察与拍照	15
2.2.5 蛋白质提取.....	15
2.2.6 蛋白质双向电泳	16
2.2.7 图象采集与分析.....	17

第三章 实验结果	18
3.1 牡蛎海氏藻 (<i>Haslea ostrearia</i>)	18
3.1.1 人工培养对牡蛎海氏藻细胞长度的影响	18
3.1.2 人工培养引起的牡蛎海氏藻畸变	23
3.1.3 牡蛎海氏藻畸变细胞的单克隆培养	31
3.1.4 牡蛎海氏藻马雷讷素 (marennine)的变化	35
3.1.5 牡蛎海氏藻全蛋白双向电泳图谱	36
3.2 奇异棍形藻 (<i>Bacillaria paradoxa</i>)	37
3.2.1 人工培养对奇异棍形藻大小的影响	37
3.2.2 人工培养引起的奇异棍形藻细胞畸变	38
3.2.3 奇异棍形藻群体组成方式的改变	44
3.2.4 培养容器对奇异棍形藻生长和畸变率的影响	44
3.2.5 温度对奇异棍形藻生长和畸变率的影响	45
3.2.6 光照对奇异棍形藻生长曲线及畸变率的影响	48
3.2.7 通气对奇异棍形藻生长和畸变的影响	48
第四章 讨论	51
4.1 人工培养对硅藻生长和硅质壳形态的影响	51
4.1.1 人工培养引起的两种硅藻畸变形态	51
4.1.2 人工培养条件下两种硅藻大小的改变	52
4.2 畸变细胞的单克隆培养研究	54
4.3 室内培养环境因子与硅藻畸变的研究	54
4.3.1 培养容器	54
4.3.2 温度	55
4.3.3 光照	55
4.3.4 通气	55
4.4 人工培养条件下硅藻畸变产生的原因初探	55
4.5 本研究的不足之处	56
第五章 总结和展望	58
5.1 总结	58

5.2 研究特色和创新点	58
5.3 展望	59
参考文献	60
图版 I-III	65
攻读硕士期间参与的科研课题及发表论文	68
致谢	69

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract	II
Abbreviations	IV
Chapter 1. Introduction	1
1.1 Overview of diatom taxonomic studies based morphology	1
1.2 Structure and formation of the diatom cell wall	2
1.2.1 General form of cell wall.....	2
1.2.2 Characteristics of the diatom cell proliferation	4
1.2.3 The general process of the formation of siliceous wall	5
1.3 Research Progress about diatom deformation under artificial conditons	6
1.3.1 Summary of diatom distortion.....	6
1.3.2 Teratological form of diatom under artificial cultivation	7
1.3.3 The reason causes deformation of diatom under artificial cultivation	9
1.4 Purpose and significance of the research	10
Chapter 2. Material and methods	11
2.1 Material	11
2.1.1 Alage strain.....	11
2.1.2 Instruments	11
2.1.3 Reagents.....	12
2.1.4 Solution preparation	12
2.2 Methods	13
2.2.2 Alage cultivation.....	13
2.2.3 The growth curve and deformation rate curve.....	15
2.2.4 Sample observation and photos	15
2.2.5 Protein extraction.....	16
2.2.6 2-D experiment.....	16
2.2.7 Image acquisition and analysis	17

Chapter 3. Results	18
3.1 <i>Haslea ostrearia</i>	18
3.1.1 Size reduction of <i>Haslea ostrearia</i>	18
3.1.2 Teratological forms of <i>Haslea ostrearia</i>	23
3.1.3 Monoclonal cultivation.....	31
3.1.4 The change of marennine.....	35
3.1.5 The 2-DE profile of the cell whole proteins of <i>H. ostrearia</i>	36
3.2 <i>Bacillaria paradoxa</i>	37
3.2.1 Size reduction of <i>Bacillaria paradoxa</i>	38
3.2.2 Teratological forms of <i>Bacillaria paradoxa</i>	38
3.2.3 Change the constitution of colony of <i>Bacillaria paradoxa</i>	44
3.2.4 The relationship between container and deformation rates	44
3.2.5 The relationship between temperature and deformation rates	45
3.2.6 The relationship between illumination and deformation rates.....	48
3.2.7 The relationship between ventilatory capacity and deformation rates	48
Chapter 4. Discussion	51
4.1 The influence of the artificial cultivation	51
4.1.1 Teratological forms caused by artificial cultivation	51
4.1.2 Size reduction caused by artificial cultivation.....	52
4.2 The research of monoclonal cultivation of deformed cell ..	54
4.3 Indoor cultivation environment factor and the distortion of the diatom study	54
4.3.1 Container	54
4.3.2 Temperature	55
4.3.3 Illumination	55
4.3.4 Ventilatory capacity	55
4.4 The reason causes deformation of diatom under artificial cultivation	55
4.5 The inadequacies	56
Chapter 5. Conclusions and prospectives	58

5.1 Conclusions	58
5.2 The feature of this study	58
5.3 The prospect	58
References	60
Platel-III	67
Published papers and participated research projects	70
Acknowledgements.....	71

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

硅藻的细胞壁由一层硅质组成,分为上下两个壳面,具有种间特异性的花纹,是硅藻分类学的重要依据。硅质壳的外形及花纹通常具有规则性的轮廓及排列方式。如果处于环境胁迫下,硅藻硅质壳的轮廓和花纹就可能发生改变,称之为硅藻的形态畸变。这些畸变有时很轻微,畸变增加了形态分类学的难度。一般的畸变形式表现在壳面的整体轮廓改变,也可能发生在壳面的孔纹、壳缝及各种附属结构上。导致硅质壳畸变的原因有多种,其中长期的人工培养可以造成高比例的硅藻畸变。

本文依托国家自然科学基金项目“海洋硅藻硅质壳变形的特征与生态学机制”,对人工培养条件下的牡蛎海氏藻 *Haslea ostrearia* 和奇异棍形藻 *Bacillaria paradoxa* 的畸变形态进行了初步的研究,取得了以下主要结果:

1.通过对两种硅藻实验室培养样品近两年半的观察和统计,将牡蛎海氏藻的畸变形态划分为以下四类:(1)单一壳面轮廓的改变,壳面单侧或两侧发生缢缩,隆起等,此类型约占所有畸变类型的 19%;(2)条纹、孔纹的畸变,缺失、方向改变、不规则分布、分支等,所占比例最高,约 63%;(3)壳缝的畸变,占 2%;(4)混合畸变占 17%。奇异棍形藻的主要畸变类型是壳面轮廓的畸变,偶尔有壳缝、点条纹和船骨点的畸变。长期培养的奇异棍形藻发生了严重的细胞扭曲,造成壳缝系统和船骨点的混合畸变。

2.对每一种畸变类型进行了具体、系统的文字描述,配以光镜和电镜下拍摄的正常及畸变形态的对比照片,对正常和畸变形态细胞的长、宽和孔纹密度进行了计算和统计,结果表明,随着培养时间延长,牡蛎海氏藻和奇异棍形藻的细胞都具有逐渐变小的趋势,长度缩短为近原来的二分之一,宽度变化不大,孔纹密度没有发生改变。本研究结果为这两种硅藻的形态分类学研究提供了重要的补充资料。同时,人工培养还造成了牡蛎海氏藻马雷讷素 (marennine)分泌减少,奇异棍形藻群体特征改变等。

3.获得了牡蛎海氏藻畸变细胞的单克隆培养,得到纯种畸变细胞,细胞生长最长时间可达 60 天。通过实验证明了硅藻细胞的畸变是可以在代与代之间进行传递的,并且发现畸变细胞的代谢活性较弱,分裂速度较低,种群衰败较快。

4.对培养容器、温度、光照、通气与奇异棍形藻畸变之间的相关性进行探索，发现平板培养相对于三角瓶培养，硅藻生长速率更快，但最大细胞密度降低，平均畸变率降低约 4%；在 18℃到 21℃，温度升高可以降低硅藻的畸变率，当温度升高到 24℃畸变率反而升高；通气和光照与硅藻的畸变率显著负相关，尤其是通气培养，其相对于静置培养的平均畸变率可降低达 10%。

关键词：牡蛎海氏藻，奇异棍形藻，形态畸变，人工培养

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

Diatom cell wall is composed of a layer of silicon, formed by the epitheca and hypotheca, the species-specific shape and ornamentation of the silicon cell wall is an important basis of diatom taxonomy. The outline of the shape and pattern of the striation have typical rules, but if exposed to different kinds of stress during reproductive processes, the cell outline and striation pattern of diatoms may change in different ways, producing teratological forms. These modifications can be slight, leading to difficulties in establishing a threshold between normal and teratological cells. Most frequently, diatoms present abnormal valve outline, distorted raphe system or abnormal striation pattern. The reason that cause teratological forms are more, artificial conditions often lead to high percentage of teratological valves.

This paper is a preliminary study on the deformed diatoms of *Haslea ostrearia* and *Bacillaria paradoxa* under artificial conditions as a part of a research project entitled Characteristics and ecological mechanism of marine diatom valve deformation, supported by the National Natural Science Foundation of China (41076079).

1. Morphological observation of deformed diatoms of *H.ostrearia* and *B.paradoxa* was made with the samples from artificial conditions. We summarized the abnormal forms of *H. ostrearia* into four types: Type 1: abnormal outline of valve and normal striation pattern; Type 2: regular valve shape with abnormal striae orientation; Type 3: raphe modifications. Type 4: mixed deformation. Type 2 is the most frequent type, about 63%. The most frequently teratological form of *B.paradoxa* is abnormal outline, sometimes abnormal raphe system, keel puncta, striation pattern happens.

2. Morphological description of teratological form of each taxon was made with LM and EM photographs and illustrated pictures. Compared the difference between normal forms and teratological forms and made statistical analysis of length,width, striae density. The two species all show extreme size (length) reduction,but striae density almost has no change.This study made important supplement to morphological taxonomy. Except for the morphology change, artificial conditions also causes the decrease of marennine production by *H.ostrearia* and changes constitution of colony of *B.paradoxa* changing.

3. Monoclonal cultured the single deformed cell of *H.ostrearia*, gained pure deformed cell, the longest time of survive could be more than 60 days, proved that the abnormal outline of the frustule, can be genetically transferred during vegetative reproduction, and found the activity of distortion cells is weak, the speed of cell division is low, and declines quickly.

4. Indoor culture experiment was designed to study the influence of container, temperature, illumination and ventilatory capacity conditions on *B.paradoxa* and their potential relationship with teratological forms of *B.paradoxa*. The study shows that compared with flask cultivation, the plate cultivation has higher growth rate, lower maximum cell density, average deformation rate reduce four percents; range from 18 degree to 21 degree, increase the temperature can reduce deformation rate, however once above 25 degree, the deformation rate rises; the illumination and ventilatory capacity has a negetative correlation with the deformation rate of *B.paradoxa*, ventilatory capacity can lead to the decrease of deformation rate for ten percents.

Key words: *Haslea ostrearia*, *Baciliaria paradoxa*, Teratological forms, artificial cultivation

第一章 前言

硅藻在海洋生态系统的物质循环和能量流动中发挥着极其重要的作用,是海洋生态系统中最主要的初级生产者之一。硅藻每年通过光合作用生产45至50亿吨的有机碳,约占海洋初级生产力的40%,全球初级生产力的20%,在全球碳循环中发挥的固定二氧化碳的作用与所有热带雨林作用的总和相当^[1]。因其具有种类多、数量大、繁殖快等特点,所以海洋硅藻的盛衰会直接或间接地影响整个海洋生态系统的生产力,并最终波及到渔业的产量。另外,海洋硅藻还与水产养殖,全球气候变化,海洋地质结构,环境保护等具有密切关系。由于海洋硅藻在海洋生态系统中的重要性,对海洋硅藻的生态学研究一直以来都是海洋生态学研究的基础^[2],海洋硅藻和环境的关系也越来越受到更多科学家的关注。

硅藻最显著的特征之一,就是它们形态各异,精美绝伦具有种间特异性的硅质壳,这一特点在代与代之间能够稳定忠实地保存下来。除少数例外,硅藻的细胞壁均是高度硅质化的坚硬的壳体,称为硅质壳(frustule)。在传统的硅藻分类学中,就是利用硅质壳特异性的形态以及孔纹进行分类^[3-4]。

1.1 硅藻的形态分类学研究

硅藻种类繁多,而且个体微小,因此,硅藻分类是一项艰巨且需要几代人倾注时间和精力共同努力完成的工作。最初的硅藻形态分类学研究方法主要是借助光学显微镜。随着科技的进步,光学显微镜分辨率的不断提高,人们能够得以观察到硅藻种类更加细微的形态学特征。尤其是在20世纪五六十年代以后,出现了电子显微镜(EM),人们对海洋硅藻的分类和细胞结构的认识向前迈进了一大步,新的种类不断被发现,特别是过去采集时往往被忽略的大量微型和超微型硅藻呈现在人们的视野下,使硅藻的分类学研究不断得到丰富和完善^[2,5,6]。

自从Leeuwenhoek发明了显微镜,并由一位英国人于1703年观察到了世界上第一个硅藻记录(现在的绒毛平板藻 *Tabellaria flocculosa*)以来,至今300多年,硅藻分类系统经历了漫长的发展历程,但是至今硅藻的分类系统尚存在较大的争议。

19世纪20年代,硅藻研究者通过显微形态观察,提出了第一个硅藻分类系统。如第一个把硅藻命名为Diatomeas的瑞典人Agardh,他根据细胞形态将硅藻分为3科9属^[5]。19世纪中期,Grunow和Cleve等研究者在世界范围内采集硅藻,发表了许多硅藻专著,为硅藻分类学及形态学的研究奠定了基础^[7]。Round等^[7]曾将海洋和淡水中的硅藻分为287个属,根据大量的硅藻电镜观察详细论述了分属的形态学依据。

Hustedt(1930)的分类系统将硅藻定为1个门,下设硅藻纲,分为2目7亚目。我国硅藻学家厦门大学已故教授金德祥先生对我国沿海的浮游硅藻(1978)及底栖硅藻(1982,1991)进行了系统的研究,在Hustedt分类系统的基础上,提出了独特的硅藻分类系统。他将硅藻分为2个纲,即:中心纲(Centricae)和羽纹纲(Pennatae),纲以下再分9个目^[5]。金教授团队大量描述了我国近海常见浮游和底栖硅藻的形态、生活习性和地理分布,极大丰富了我国硅藻学研究的内容,成为国内常见海洋硅藻鉴定方面的重要参考依据^[8]。

近年来,作为我国孢子植物志的系列工作之一,在海洋硅藻方面,郭玉洁和钱树本^[10]系统地总结和描述了中心纲硅藻的四个目:盘状硅藻目、管状硅藻目、盒形硅藻目和周辐硅藻目。程兆第和高亚辉^[11,12]对我国近海常见羽纹纲硅藻五个目:等片藻目、曲壳藻目、褐指藻目、短缝藻目和舟形藻目进行了系统的总结和描述。在淡水硅藻方面,齐雨藻和李家英^[13],胡鸿钧和魏印心^[14]等专家对中国淡水硅藻的形态特点,分布等方面进行了系统而详尽的描述。

1.2 硅藻硅质壳的结构与形成

1.2.1 硅藻硅质壳的一般形态

硅藻细胞硅质壳由上、下两壳相扣如盒状。套在外面,形状较大者如盒盖,称为上盖(epitheca);位于细胞下方,形状较小者如盒底,称为下壳(hypotheca)。上、下壳皆有壳面(vavle)、壳套(vavle mantle)和连接带(connecting band)组成。壳边称为相连带。上、下相连带总称为壳环或壳环带(girdle band),该面称为壳环面。从细胞壳面观察时,称为壳面观,从侧面观察时称为环面观^[5,15]。根据硅藻的形状不同,硅藻主要分为两个纲,中心纲和羽纹纲。中心纲硅藻细胞(图

1.1) 基本上是辐射对称, 呈圆盘形、圆球形至圆柱形, 也有扁形或舟形。壳面花纹放射对称, 少数呈不规则排列。没有壳缝或假壳缝, 不能运动。羽纹纲硅藻细胞的壳面为线形、披针形、椭圆形、卵形、菱形、舟形、新月形、弓形、S形或棒形等 (图1.3), 其形态基本上属于长形至椭圆形, 具壳缝 (raphe) 或假壳缝 (pseudoraphe) 或具管壳缝 (canal raphe), 见图1.2, 具壳缝者可以运动^[4,10]。

硅质壳表面常有各种形式多样的孔纹、真孔、拟孔、筛室、玫瑰纹、肋纹或网状纹等壳面修饰结构, 或有尖锐的小刺、突起等壳面结构。硅藻细胞上这些复杂的纹饰的形态、构造、大小和排列等都是硅藻分类的主要依据^[4]。

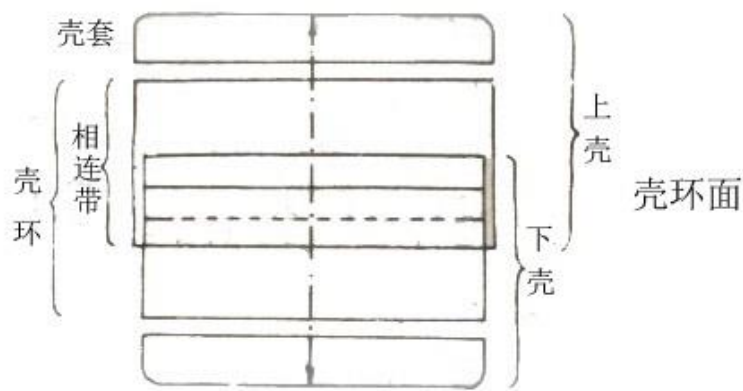


图 1.1 中心纲硅藻的环面观^[5]

Fig.1.1 The girdle view of the centric diatom^[5]

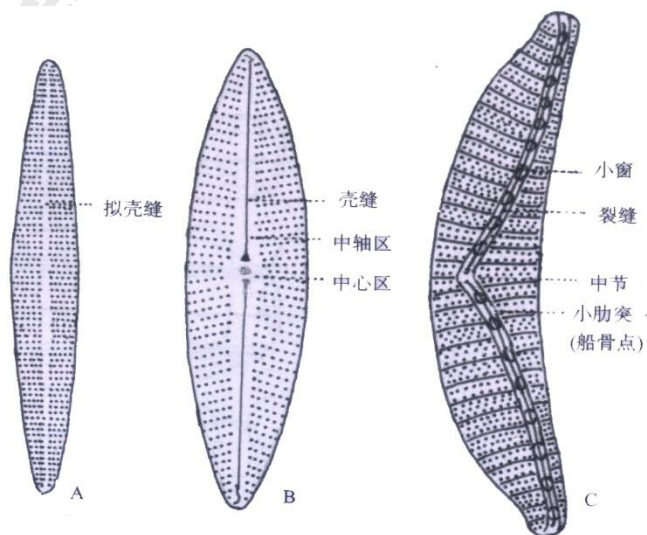


图 1.2 羽纹纲硅藻壳缝示意图^[11]

A: 拟壳缝; B: 壳缝; C: 管壳缝

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

廈門大學博碩士論文摘要庫