

# 多甲藻素在一种海生黄藻中的存在\*

胡晗华 戴玲芬 戴和平 张宪孔

(中国科学院水生生物研究所 武汉 430072)

**提要** 采用聚酰胺薄层层析分离、分光光度法,对一种海生超微型黄藻品系 PP983 的色素组成进行了研究测定。结果表明,该黄藻中只含有叶绿素 *a* 而不含叶绿素 *c*,检出 8 种类胡萝卜素,除作为黄藻特征色素的 Heteroxanthin 和 Vaucherixanthin 两种外,还发现该藻含有一个吸收峰在 471nm,呈现多甲藻素(peridinin)特征的色素。用高效液相色谱(HPLC),并以微小多甲藻(*Peridinium pusillum*)作对照,对其光合色素作进一步的分析,确证该黄藻中不含有叶绿素 *c* 而含多甲藻素。结果显示此种黄藻与甲藻有更近的亲缘关系。初步讨论了黄藻中多甲藻素的存在及其在藻类系统演化中的意义。

**关键词** 黄藻,多甲藻素,系统演化

**中图分类号** Q947

在藻类的光合色素系统中,叶绿素 *a* 是各门类所共有的,并构成光合作用的反应中心。藻类采收光能的天线色素计有三大类:叶绿素、类胡萝卜素和藻胆素。但因门类不同,藻类所具有的光合辅助色素却有很大的差别。从而,天线色素的不同自然就成为研究藻类分类和系统演化问题的重要依据之一(Larkum *et al.*, 1983; Rowan, 1989)。多甲藻素是一种类胡萝卜素,被认为是甲藻光合系统中的主要天线色素。此种色素在其他门类藻类中鲜有报道,即使有也含量甚微,因而多甲藻素对甲藻来说似乎是高度专一的,成为其特征色素(Rowan, 1989)。

含叶绿素 *a* 和 *c* 的藻类类群众多,包括隐藻门、甲藻门、硅藻门、金藻门、黄藻门和褐藻门等六类。这些藻类的系统演化问题,由于一直没有发现明确的中间类型,而引起许多学者不同的推测。其中,特别是含多甲藻素的甲藻与其他藻的亲缘关系不明显(Jeffrey *et al.*, 1975)。最近,作者得到一株来自太平洋海域的超微型黄藻,品系 PP983,并对其脂肪酸组成进行了研究,结果显示,与多数海洋微藻相比(李荷芳等,1999),其二十碳五烯酸(EPA)含量异常高,显示是 EPA 生产的潜在资源(胡晗华等,1999)。本文报道了该藻的光合色素分析结果,经薄层层析和光谱分析发现,并进一步经高效液相色谱证实,在这种黄藻中确实存在多甲藻素,这为深入探讨黄藻的起源及其与甲藻在系统演化中的关系提供了新的佐证。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

\* 国家自然科学基金资助项目,39770690 号;曾呈奎海洋科学基金(1999)资助项目。胡晗华,男,出生于 1971 年 11 月,博士生, E-mail: xkzhang@ms.whb.ac.cn

收稿日期: 2000-04-21, 收修稿日期: 2000-10-11.

实验藻种 PP983 由国家海洋局第一海洋研究所李瑞香先生馈赠。光学和电子显微镜观察显示, 该藻为单细胞、球形, 直径为 2—4 $\mu$ m, 属超微型藻; 细胞器明显, 含一个黄绿色叶绿体, 球状线粒体和数个液泡, 初步鉴定为黄藻门的种类<sup>1)</sup> (胡晗华等, 1999)。纯化后的 PP983 以具塞玻管 (30 × 3cm) 为容器, 内盛 100ml 改进的 *f/2* 培养基, 接种后, 置入恒温水槽并通空气, 悬浮培养; 以 4 × 20W 日光灯为光源, 水槽表面光强为 80 $\mu$ E/(m<sup>2</sup> · s), 水温保持在 (25 ± 1) °C, 培养 7—8d, 于对数生长期收集备用。对照用微小多甲藻 (*Peridinium pusillum*) 由本所藻种库提供, 培养基为 HB119, 培养方法同 PP983。

## 1.2 薄层层析和分光光度法

色素提取按照 Jeffrey 等 (1975) 的方法。色素的乙醚提取液充入氩气浓缩后, 用聚酰胺层析片 (浙江黄岩化学分析材料厂) 层析; 溶剂系统为 88% 石油醚 (60—90 °C) - 2% 正丙醇 - 7.5% 丙酮 - 2.5% 甲醇; 层析后分别用乙醇、正己烷和丙酮将各色素斑点洗脱, 用 UV - 1601 分光光度计 (UV - Visible Spectrophotometer Shimadzu, Japan) 在 400—700nm 扫描, 测定分离后各色素的吸收光谱。

## 1.3 色素的 HPLC 检测

用适量冰冷的 90% 丙酮提取色素, 离心取上清并加入少量醋酸铵即可用高效液相色谱 (LC - 10A, Shimadzu Liquid Chromatograph) 进行分离。色谱柱为反相 C<sub>18</sub> 柱 (Shimadzu Shim-pack CLC - ODS, 0.15 m × 6.0 mm $\phi$ ); 流动相选用甲醇/醋酸铵/乙酸乙酯, 二元梯度洗脱, 流速为 2.0ml/min, 洗脱流程见表 1 (溶剂 A: 70% absolute methanol + 30% 1mol/L 醋酸铵 (NH<sub>4</sub>Ac)、溶剂 B: 70% absolute methanol + 30% 乙酸乙酯)。用可见光 (436nm) 和荧光检测仪 (Shimadzu UV - Vis Detector and Shimadzu Fluorescence Detector) 检测。

表 1 HPLC 洗脱系统

Tab. 1 HPLC solvent system programs

时间 (min)	流速 (ml/min)	A (%)	B (%)	条件
0	2.0	100	0	进样
0.01	2.0	80	20	线形梯度
7.00	2.0	40	60	线形梯度
12.00	2.0	40	60	线形梯度
20.00	2.0	0	100	线形梯度
40.00	2.0	0	100	线形梯度

## 2 结果与讨论

聚酰胺薄层层析和吸收光谱测定显示, PP983 的光合色素主要有: 一种叶绿素——Chl- $\alpha$ , 和  $\beta$  carotene、Dinoxanthin、Heteroxanthin、Peridinin、Taraxanthin、Vaucherixanthin、Violaxanthin 及一种未鉴定的共 8 种类胡萝卜素 (图 1 和表 2)。显然, 其中的 Heteroxanthin

1) 据有关专家鉴定结果: 此种藻类属于黄藻门中的柄球藻目 (Mischococcales)、宽绿藻科 (Pleurochloridaceae)、小绿藻属 (*Chloriella*) 或椭圆藻属 (*Ellipsoidion*), 很可能是小绿藻属或椭圆藻属中的一个新种, 有关种类的问题仍在鉴定之中, 不久将发表专文进行讨论。

和 Vaucherixanthin 是黄藻的特征色素,从类胡萝卜素组成上也进一步验证了 PP983 系属于黄藻类;进而,未检出 Chl *c* 的存在则显示它属于无 Chl *c* 的黄藻类。测定结果还显示,PP983 色素抽提物中有一个单峰吸收最大位于 471nm,双峰吸收分别在 471nm 和 443nm 附近的两种胡萝卜素,而且并非微量。根据其光谱特点,这两种色素应该分别为 Peridinin 和 Dincoxanthin;但据以往报道,这两种色素特别是 Peridinin 通常仅存在于原始类型的甲藻中(Jeffrey *et al.*, 1975)。

为确认上述结果,作者用高效液相色谱仪对 PP983 的色素作了进一步的分析。从 HPLC 的结果可以看出,用荧光检测仪可以检测到微小多甲藻两个明显的峰,由于微小多甲藻含 Chl *a* 和 Chl *c*,根据叶绿素具有发射荧光的特性及 Chl *c* 极性远大于 Chl *a*,可以确定,峰 1 为 Chl *c*,峰 2 则为 Chl *a*(图 2,下);而在 PP983 的色谱图中,荧光只能检测到一个明显的峰,并与微小多甲藻 Chl *a* 的洗脱时间相同(图 2,上),因而该黄藻仅含一种叶绿素——叶绿素 *a*,使用可见光检测仪可以至少检测到 PP983 含有 14 种色素;通过与同样条件下微小多甲藻的色谱图(图 3)对比看出,对照藻——微小多甲藻最先被测出的色素是叶绿素 *c*(图 3,峰 3),而黄藻中则不含叶绿素 *c*,由于属类胡萝卜素的多甲藻素的极性仅次于叶绿素 *c* 的极性,所以在紧接于叶绿素 *c* 后被测出的色素应为多甲藻素(Wright *et al.*, 1991)。从图 3 可以看出,对应微小多甲藻 HPLC 图谱多甲藻素(图 3,峰 4)的黄藻 HPLC 图谱中,峰 1 显然是多甲藻素;还可以看出,多甲藻素是该黄藻的 5 种主要类胡萝卜素(峰 1、2、8、10、14)之一。此外,根据色素的极性及其洗脱时间还可以确定,图 3 中峰 14 为  $\beta$ -carotene 的洗脱峰,峰 12 为叶绿素 *a* 的洗脱峰(Wright *et al.*, 1991),含量最多的叶黄素是峰 2 洗脱下来的色素,其次分别为峰 8 和峰 10,结合聚酰胺薄层层析结果,这三种色素可能是黄藻类的特征色素。

表 2 聚酰胺薄层层析分离得到的 PP983 色素的最大吸收峰值

Tab. 2 Absorption maxima of PP983 pigment fractions separated by polyamide thin-layer chromatogram

层析点	色素	溶剂	最大吸收峰 (nm)	文献中最大吸收峰 (nm) (Rowan, 1989)
1	$\beta$ -carotene	n-hexane	476.0, 449.5	478, 450
2	Dinoxanthin	Ethanol	471.0, 443.0	470, 441
3	Chlorophyll- <i>a</i>	Acetone	662.0, 430.5	662.0, 430.2
4	Taraxanthin	Ethanol	473.0, 442.0	472, 443, 420
5	Vaucherixanthin	Ethanol	471.5, 442.5	470, 442, 419
6	Peridinin	Ethanol	471.0	472
7	Violaxanthin	Ethanol	471.0, 441.0, 418.0	470, 440, 419
8	Heteroxanthin	Ethanol	471.0, 443.5	474, 445
9	Unknown xanthophyll	Ethanol	471.0, 442.5, 419.5	

多甲藻素作为甲藻的特征色素,被发现存在于黄藻中,这为阐明黄藻与甲藻之间的关系提供了一个证据。众所周知,甲藻在真核藻类中属于较原始的间核类型,它在藻类系统

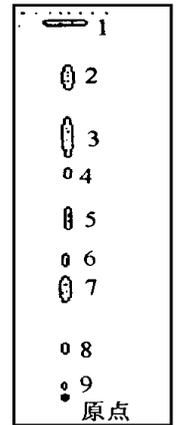


图 1 PP983 叶绿素和类胡萝卜素的单向聚酰胺薄层层析图谱  
Fig. 1 One dimensional polyamide thin-layer chromatogram of chlorophylls and carotenoids of PP983

演化中的作用和地位一直是许多藻类学家困惑的问题之一，特别是甲藻与同样含有叶绿素 *a* 和 *c* 类型的藻类的亲缘关系至今仍不清楚(曾呈奎等, 1983a)。近年来, 一些藻类学家根据甲藻的光合色素系统中天线色素的组成特点, 认为以叶绿素 *c*<sub>1</sub>、*c*<sub>2</sub> 和 *a* 以及岩藻黄素为集光色素的甲藻类与金藻或褐藻有较近的亲缘关系, 并认为是甲藻中进化程度较高的类群; 而以叶绿素 *c*<sub>2</sub> 和 *a* 以及多甲藻素为集光色素的甲藻是比较原始的类群, 与其他藻类的亲缘关系不明显 (Jeffrey *et al*, 1975); 也有人根据甲藻中藻胆素的存在及其特点, 认为甲藻与隐藻在系统演化上很可能有较密切的亲缘关系(胡鸿钧等, 1980)。

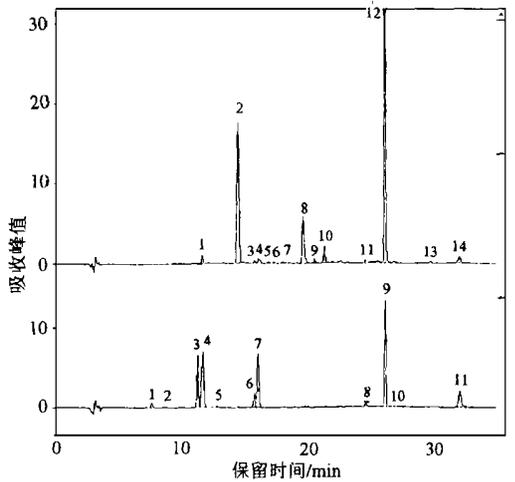
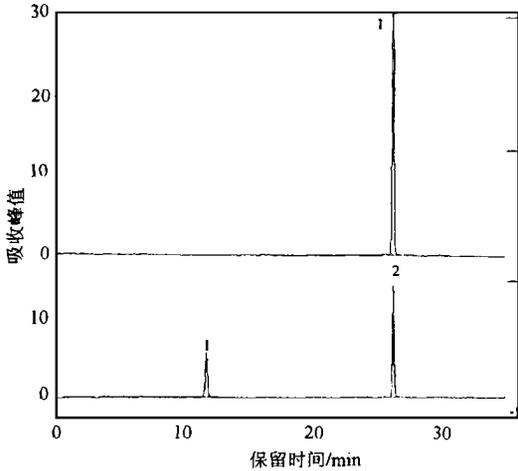


图 2 荧光检测 PP983(上)和 *Peridinium pusillum*(下)色素的HPLC 峰值

Fig.2 HPLC chromatogram of PP983 (up) and *Peridinium pusillum* (below) pigments detected by fluorescence

图 3 可见光(436nm)检测 PP983(上)和 *Peridinium pusillum*(下)色素的HPLC 峰值

Fig.3 HPLC chromatogram of PP983 (up) and *Peridinium pusillum* (below) pigments detected by visible light

黄藻门一直被认为是一个比较特化的生物类群, 在色素组成等方面与其他各门藻类存在较大的差异。许多研究表明, 黄藻含有叶绿素 *a*, 一部分种类中含有叶绿素 *c*<sub>1</sub> 和 *c*<sub>2</sub>, 没有岩藻黄素和多甲藻素, 与其他含有叶绿素 *c* 的类型相比较, 黄藻中叶绿素 *c* 的含量很低, 叶绿素 *a/c* 的比值多为 50—100, 而不是通常的 5 左右, Stransky 和 Hager 在黄藻的 8 个属中甚至未能检测到叶绿素 *c* (Rowan, 1989)。所以, 也有人认为黄藻中仅在无隔藻属 (*Vaucheria*) 中含叶绿素 *c*, 而其他属的黄藻则不含叶绿素 *c* (Lee, 1989)。由于黄藻门色素组成等方面的特殊性, 它们与其他各门藻类的亲缘关系一直不甚明确。本文在黄藻中发现了多甲藻素, 显示黄藻和原始类群的甲藻可能有较近的亲缘关系。作者认为, 在不含叶绿素 *c* 的黄藻中, 光系统 II 的捕光色素主要由叶绿素 *a* 和特殊的类胡萝卜素(包括多甲藻素)组成, 而这一类群可能由原始含多甲藻素的甲藻进化而来。蓝裸甲藻的发现使人们有理由认为, 很可能在叶绿素 *c* 产生之前, 特殊类型的类胡萝卜素就已经在光系统 II 的集光色素系统中起重要作用了。曾呈奎等(1983b)认为, 在生物进化初期, 色素和光合作用起着决定性的作用, 即色素决定论。至少, 光合色素的种类和光合器的结构及功能的演变是探讨光合生物进化规律的重要依据。此外, 作者的研究还表明, 黄藻 PP983 中的多甲

藻素与甲藻(Haidak *et al.*, 1966) 的一样,也是主要以多甲藻素-叶绿素 *a*-蛋白复合体(Peridinin-Chlorophyll *a*-Protein Complexes, PCP) 的形式存在,并高效地将光能传递给反应中心叶绿素 *a*,这一点对甲藻和黄藻之间有较近亲缘关系的观点也是一个进一步的支持。

### 参 考 文 献

- 李荷芳,周汉秋,1999. 海洋微藻脂肪酸组成的比较研究. 海洋与湖沼, 30(1):34—40
- 胡晗华,戴玲芬,戴和平等,1999. 一种海生黄藻的氨基酸和脂肪酸组成. 应用与环境生物学报, 5: 487—490
- 胡鸿钧,俞敏娟,张宪孔,1980. 蓝裸甲藻(新种)(*Gymnodinium cyanum* Hu sp. nov.) 藻胆素(Phycobilin)的发现及其意义. 科学通报, 14: 651—653
- 曾呈奎,周百成,1983a. 关于藻类植物进化的若干问题. 见:第一届中国藻类学术讨论会论文集. 北京:科学出版社, 1—7
- 曾呈奎,周百成,1983b. 光合生物的进化. 见:陈世骧主编. 进化论选集(纪念达尔文逝世一百周年学术讨论会论文集选编). 北京:科学出版社,34—43
- Haidak D J, Mathews C K, Sweeney B M, 1966. Pigment protein complex from *Gonyaulax*. Science, 156: 212—213
- Jeffrey S W, Sielicki M, Haco F T, 1975. Chloroplast pigment patterns in dinoflagellates. J Phycol, 11:374—384
- Larkum A W D, Barrett J, 1983. Light-harvesting processes in algae. Adv Bot Res, 10: 1—219
- Lee R E, 1989. Phycology. 2nd. Cambridge: Cambridge University Press, 516
- Rowan K S, 1989. Photosynthetic Pigments of Algae. Cambridge: Cambridge University Press, 214—224
- Wright S W, Jeffrey S W, Mantoura R F C *et al.*, 1991. Welschmeyer N. Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. Mar Ecol Prog Ser, 77: 183—196

## OCCURRENCE OF PERIDININ IN A MARINE SPECIES OF XANTHOPHYTA

HU Han-Hua, DAI Ling-Fen, DAI He-Ping, ZHANG Xian-Kong

(*Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan, 430072*)

**Abstract** The pigment composition of a marine picoalgae strain PP983 was analyzed to study the classification and evolution of Xanthophyta. The results of polyamide thin-layer chromatogram and spectrophotography showed that this species contained eight types of pigments besides Chl *a*, but no Chl *c*. Unexpectedly, in addition to the characteristic pigments of Xanthophyta (heteroxanthin and vaucheriaxanthin), we also found a pigment whose maximal absorption was at 471 nm. This pigment displays the characteristic of peridinin. In order to verify occurrence of peridinin in this species, extracted pigments from strain PP983 were separated and detected on HPLC with UV-Vis and fluorescence detectors by using *Peridinium pusillum* as a control. The results showed that the Xanthophyta strain PP983 contains peridinin and suggested that Xanthophyta have very close relation to Dinophyta. It provides a proof to the evolution and phylogeny of Xanthophyta.

**Key words** Xanthophyta, Peridinin, Evolution