

单细胞绿藻的 77 K 荧光特异性研究

刘健晖, 李爱芬, 刘太胜, 孙岁寒, 段舜山

(暨南大学 水生生物研究中心, 广东 广州 510632)

摘要: 实验测定了 10 种单细胞绿藻包括 5 种淡水藻: 雪衣藻(*Chlamydomonas nivalis* UTEX 2765)、椭圆小球藻(*Chlorella ellipsoidea* CH)、绿球藻(*Chlorococcum tatrense* UTEX 2227)、斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)、雨生红球藻(*Haematococcus* sp. CSIRO:CS-321)和 5 种海水藻: 杜氏盐藻(*Dunaliella salina*)、四片藻(*Tetraselmis* sp.)、蒜头藻(*Monodus subterraneus*)、小新月藻(*Closterium venus*)、亚心形扁藻(*Platymonas subcordiformis*)的 77k 荧光光谱, 并与大型海洋绿藻以及高等植物菠菜进行了比较。结果表明, 10 种单细胞绿藻都缺少作为高等植物 PS 主要表征的 730 nm 长波荧光峰。按荧光主峰的波长, 可以分为 2 种类型: 雪衣藻、绿球藻、杜氏盐藻、四片藻、蒜头藻、小新月藻、亚心形扁藻的荧光主峰位于 684 nm, 椭圆小球藻、斜生栅藻、雨生红球藻的荧光主峰位于 714 nm。这个结果与海洋管藻目绿藻和某些大型海洋绿藻的荧光特性一致。另外, 绿藻 PS 缺少 730 nm 长波荧光峰具有普遍性, 预示这些藻类在 PS 结构以及能量传递等方面与高等植物有很大的差异。

关键词: 单细胞绿藻; PS ; 77 K; 荧光特性;

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096 (2007) 07-0068-05

高等植物的 77K 荧光发射峰有 3 个, 分别是 685, 695 和 730 nm, 其中 730 nm 长波荧光峰来自光系统 (PS)的捕光复合物, 这个荧光峰是 PS 的重要表征^[1]。绿藻是进化程度较高的一群藻类, 是高等植物的祖先。以前的研究表明了某些较低等的绿藻, 如松藻^[2](*Codium* sp.)和刺松藻(*Codium fragile*)^[3,4]等的叶绿体没有 730 nm 的长波荧光峰, 莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)、小球藻(*Chlorella vulgaris*)等单细胞藻的 77k 荧光峰位于 705 ~ 720 nm 之间^[5,6], 最近陈敏等^[7]测定了 8 种大型海洋绿藻, 它们也都缺少 730 nm 长波荧光峰, 来自 PS 的荧光发射峰位于 710 ~ 720 nm 之间。这些现象说明某些绿藻的 PS 结构可能与高等植物不同。为了进一步了解绿藻光合系统缺少 730 nm 长波荧光峰是否具有普遍性, 作者在活体、叶绿体及类囊体膜不同水平上对 10 种单细胞绿藻的低温光谱特性进行了研究, 旨在为光合生物 PS 结构的多样性和光合作用进化研究提

供依据。

1 材料和方法

1.1 实验藻种

雪衣藻 (*Chlamydomonas nivalis* UTEX 2765)、椭圆小球藻 (*Chlorella ellipsoidea* CH)、绿球藻 (*Chlorococcum tatrense* UTEX 2227)、斜生栅藻 (*Scenedesmus obliquus*)、雨生红球藻 (*Haematococcus* sp. CSIRO:CS-321)、杜氏盐藻 (*Dunaliella salina*)、四片藻 (*Tetraselmis* sp.)、蒜

收稿日期: 2005-10-17; 修回日期: 2006-02-01

基金项目: 国家 973 计划前期研究专项 (2004CCA04300); 珠海市科技攻关重大项目 (PB20041018)

作者简介: 刘健晖 (1979-), 男, 湖南衡阳人, 硕士, 主要从事藻类生理生态学研究, E-mail:liujianhui@163.com; 李爱芬, 通讯作者, E-mail:tiger@jnu.edu.cn

头藻 (*Monodus subterraneus*)、小新月藻 (*Closterium venus*)、亚心形扁藻 (*Platymonas subcordiformis*)，暨南大学水生生物研究中心藻种室保藏。菠菜 (*Spinacia oleracea*) 购自市场。

1.2 叶绿体的分离与类囊体膜制备

叶绿体的分离按 Strbac 等^[8]的方法进行。

类囊体膜制备参考储钟稀等^[9]的方法并稍加修改，类囊体膜悬浮液为含 10% 甘油的 50 m mol/L 的 Tricine (pH8.0)。

1.3 叶绿素 a/b 值

绿藻叶绿素 a/b 值的测定依照 Jeffrey^[10]的方法。

1.4 常温吸收光谱测定

采用 TU-1900 型双光束紫外可见分光光度计测定绿藻藻体、叶绿体及类囊体膜的室温吸收光谱，狭缝宽度 2 nm。

1.5 低温荧光光谱测定

采用 F-4500 荧光分光光度计，在液氮温度(77 K)下，测定菠菜叶片、绿藻藻体、叶绿体、类囊体膜的低温荧光光谱，窄缝宽度为 5 nm。激发波长为

436 nm；发射波长分别为 684 nm 和 714 nm。

2 实验结果

2.1 叶绿体和类囊体膜的吸收光谱

雨生红球藻、蒜头藻、雪衣藻、椭圆小球藻、四片藻、亚心形扁藻绿球藻、斜生栅藻的叶绿体常温吸收光谱，雨生红球藻、蒜头藻、椭圆小球藻、亚心形扁藻、杜氏盐藻、小新月藻、雪衣藻的类囊体膜的吸收光谱见图 1。从图 1 中可以看出，10 种单细胞绿藻的吸收光谱相同，主要色素的吸收峰很明显。叶绿素 a 的蓝光和红光吸收峰分别位于 436 nm 和 678 ~ 682 nm。472 nm 和 652 nm 肩峰属于叶绿素 b 的吸收峰，10 种单细胞绿藻的叶绿素 b 含量都很高，叶绿体和类囊体膜的叶绿素 a/b 值为 1.02 ~ 1.15 (表 1)，同一种藻类的叶绿体和类囊体膜的 Chl a/b 比值相近，藻种间的 Chl a/b 比差异较小。10 种单细胞绿藻的 Chl a/b 比值明显低于已报道过的管藻目绿藻、软丝藻及其他绿藻和高等植物菠菜^[7]。

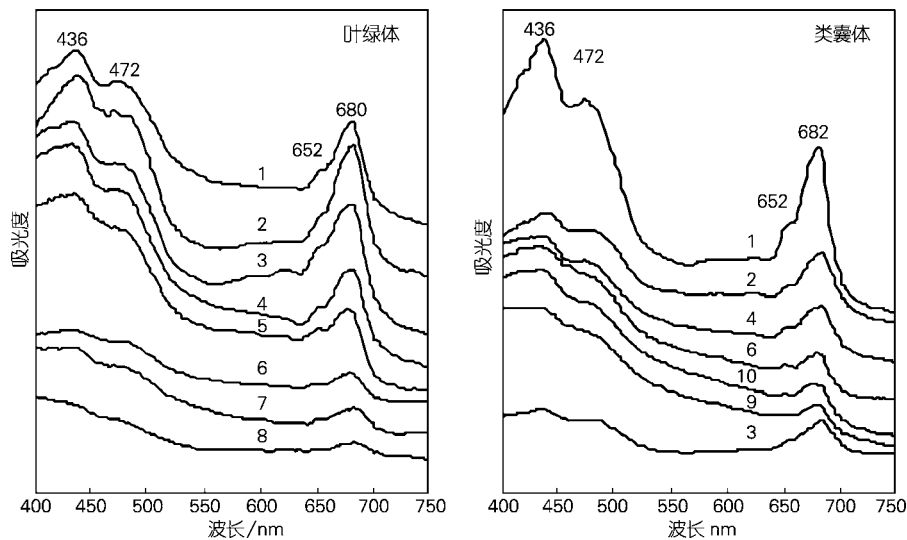


图 1 叶绿体和类囊体膜的吸收光谱

Fig. 1 The absorption spectra of chloroplast and thylakoids from unicellular green algae

1. 雨生红球藻; 2. 蒜头藻; 3. 雪衣藻; 4. 椭圆小球藻; 5. 四片藻; 6. 亚心形扁藻; 7. 绿球藻; 8. 斜生栅藻; 9. 小新月藻; 10. 杜氏盐藻
1. *Haematococcus* sp.; 2. *Monodus subterraneus*; 3. *Chlamydomonas nivalis*; 4. *Chlorella ellipsoidea*; 5. *Tetraselmis* sp.; 6. *Platymonas subcordiformis*; 7. *Chlorococcum tatrense*; 8. *Scenedesmus obliquus*; 9. *Closterium venus*

表 1 10 种单细胞绿藻的叶绿素 Chl a/b 值

中文名称	拉丁文名称	Tab. 1 Chl a/b ratios of ten unicellular green algae	
		叶绿体 Chl a/b	类囊体膜 Chl a/b
雪衣藻	<i>Chlamydomonas nivalis</i>	1.06	1.04
椭圆小球藻	<i>Chlorella ellipsoidea</i>	1.07	1.07
绿球藻	<i>Chlorococcum tatrense</i>	1.05	1.04
杜氏盐藻	<i>Dunaliella salina</i>	1.09	1.12
四片藻	<i>Tetraselmis</i> sp.	1.04	1.06
蒜头藻	<i>Monodus subterraneus</i>	1.04	1.04
小新月藻	<i>Closterium venus</i>	1.07	1.07
斜生栅藻	<i>Scenedesmus obliquus</i>	1.05	1.06
亚心形扁藻	<i>Platymonas subcordiformis</i>	1.02	1.06
雨生红球藻	<i>Haematococcus</i> sp.	1.09	1.15

2.2 藻体、叶绿体和类囊体膜的 77 K 荧光光谱

在 77 K 条件下,按活体藻吸收光谱测定的结果,用叶绿素 a 的吸收光 436 nm 激发,测定的单细胞绿藻活体、叶绿体和类囊体膜的荧光发射光谱(图 2)。测定的 10 种单细胞绿藻的活体 77 K 荧光发射光谱存在差异,按照荧光发射主峰的波长,可分为两种类型。第一种类型如雪衣藻、绿球藻、杜氏盐藻、四片藻、蒜头藻、小新月藻、亚心形扁藻的荧光主峰位于 684 nm,在 714 nm 处有一个明显的发射峰或肩峰;第二种类型如椭圆小球藻、斜生栅藻、雨生红球藻的荧光主峰在 714 nm,在 684 nm 处有一个小发射峰。

菠菜的叶片、叶绿体和类囊体膜有 685, 695 和 730 nm 3 个独立的荧光发射峰,其中 685 nm 和 695 nm

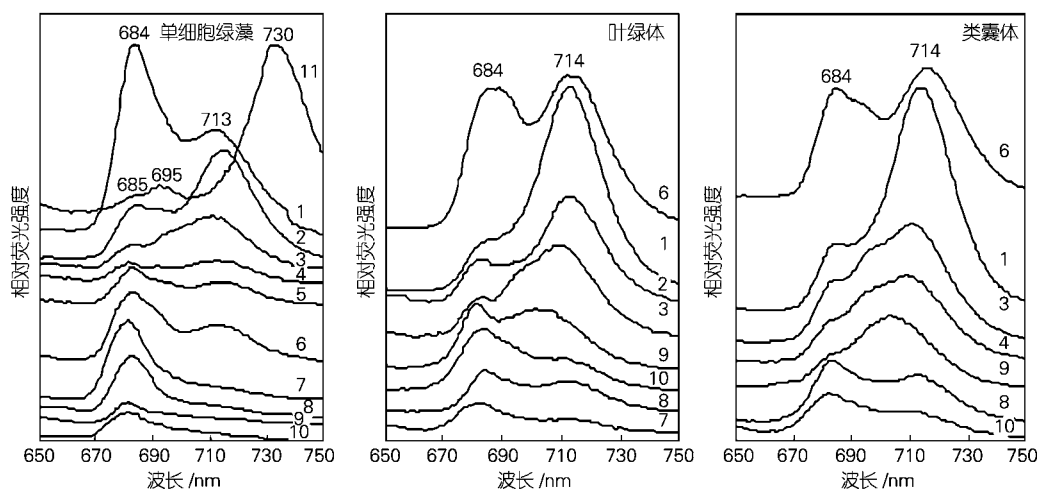


图 2 单细胞绿藻、叶绿体和类囊体的 77 K 荧光发射光谱

Fig. 2 Fluorescence emission spectra of unicellular green algae, chloroplasts and thylakoids at 77K

1. 雪衣藻; 2. 椭圆小球藻; 3. 斜生栅藻; 4. 雨生红球藻; 5. 绿球藻; 6. 蒜头藻; 7. 亚心形扁藻; 8. 四片藻; 9. 杜氏盐藻; 10. 小新月藻; 11. 菠菜
 1. *Chlamydomonas nivalis*; 2. *Chlorella ellipsoidea*; 3. *Scenedesmus obliquus*; 4. *Haematococcus* sp.; 5. *Chlorococcum tatrense*; 6. *Monodus subterraneus*;
 7. *Platymonas subcordiformis*; 8. *Tetraselmis* sp.; 9. *Dunaliella salina*; 10. *Closterium venus*; 11. *Spinacia oleracea*

的荧光发自 PS 的内周天线,而 730 nm 荧光则来自 PS 的捕光复合物 LHC。但这 10 种单细胞绿藻的叶绿体和类囊体膜的低温荧光发射峰都在 684 nm 和 714 nm 附近,没有菠菜 730 ~ 735 nm 长波荧光发射峰。这 10 种单细胞绿藻的情况与莱茵衣藻(*C. reinhardtii*)和小球藻(*Chlorella vulgaris*)是一致的^[5,6]。其中

杜氏盐藻、小新月藻、四片藻、亚心形扁藻 4 种海水单细胞绿藻叶绿体的主发射峰都在 682 ~ 684 nm 附近,710 ~ 715 nm 处表现为一个不明显的肩峰,也没有菠菜的 730 nm 长波荧光峰,这个结果与 Anderson^[2]和曾呈奎等^[3]在一种松藻和刺松藻叶绿体中得到的结果以及陈敏^[7]等对大型海洋绿藻的研究结果十分

3 讨论

相似。说明这些单细胞绿藻在 PS 的结构、组成及其蛋白及色素的排布等方面,可能都有不同于高等植物的特殊性。此外,有些单细胞绿藻叶绿体和类囊体膜荧光发射峰型较活体藻有所不同。如雪衣藻完整藻体在 684 nm 和 714 nm 处有两个明显的发射峰,主峰位于 684 nm,而叶绿体和类囊体膜的发射主峰位于 714 nm 处,在 684 nm 处有个发射肩峰。蒜头藻与其他 4 种海水单细胞绿藻也有明显的不同,完整藻体、叶绿体和类囊体膜在 684 nm 和 714 nm 处各有一个明显的发射峰。

以 684 nm 和 714 nm 为发射波长,测定了单细胞绿藻的激发光谱(图 3)。由光谱图可以看出,这些单细胞绿藻在 480 nm 处都有类胡萝卜素的吸收峰,说明类胡萝卜素吸收的光能传递给了两个光系统的反应中心叶绿素。436 nm 和 482 nm 处的吸收峰分别属于叶绿素 a 和 b。

在相同条件下,从活体、叶绿体和类囊体膜三个不同水平,对 10 种单细胞绿藻的低温荧光光谱进行了测定和比较,雪衣藻、绿球藻、杜氏盐藻、四片藻、蒜头藻、小新月藻、亚心形扁藻的荧光主峰位于 684 nm,椭圆小球藻、斜生栅藻、雨生红球藻的荧光主峰位于 714 nm,这些单细胞绿藻都没有位于 730 nm 的长波荧光发射峰。这与莱茵衣藻、小球藻^[5,6]以及管藻目绿藻和几种大型海洋绿藻^[7,11]的情况相同。另有报道,电泳法分离出的海洋绿藻软丝藻的 PS 复合物的长波荧光发射峰也都位于 713~715 nm^[7]。因此,作者认为绿藻没有作为 PS 特征的 730 nm 长波荧光峰具有普遍性。在这些藻类中,730 nm 荧光峰已经不能作为 PS 的表征。这些研究结果也说明绿色植物 PS 在结构和能量传递方面具有多样性,这种多样性是光合系统长期适应环境和在进化过程中演变形成的。

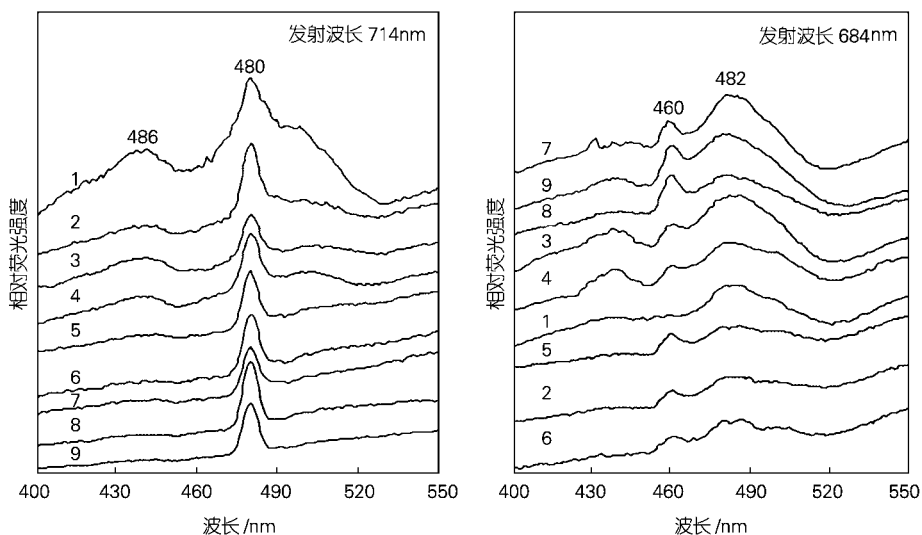


图 3 藻体低温激发光谱

Fig. 3 The 77K excitation spectra of unicellular green algae

1. 椭圆小球藻; 2. 斜生栅藻; 3. 蒜头藻; 4. 雪衣藻; 5. 雨生红球藻; 6. 绿球藻; 7. 杜氏盐藻; 8. 小新月藻; 9. 亚心形扁藻

1. *Chlorella ellipsoidea*; 2. *Scenedesmus obliquus*; 3. *Monodus subterraneus*; 4. *Chlamydomonas nivalis*; 5. *Haematococcus* sp.; 6. *Chlorococcum tatrense*; 7. *Dunaliella salina*; 8. *Closterium venus*; 9. *Platymonas subcordiformis*

高等植物的 730 nm 长波荧光峰来自光系统的捕光复合物,它除了捕获光能外,还具有能量陷阱的作用,以荧光的形式泄露多余的能量,保护反应中心

免受损伤。作者和前人的实验结果证明,多数绿藻与高等植物不同,PS 没有 F 730 nm 荧光,这与藻类适应绿光占优势的弱光环境有关。适应这样的水生环

境,与陆生植物相比,这些藻类细胞中都含有较高的叶绿素 b,以尽量多地吸收捕获光能为目的,无需能量陷阱泄露过多的能量。

参考文献:

- [1] Kuang Tingyun, Argyrouli-Akoyunoglou J H, Nakatani H Y, et al. The origin of the long wavelength fluorescence emission band (77K) from photosystem I [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1984, 235: 618-627.
- [2] Anderson J M. Chlorophyll protein complexes of a *Codium* species including a light-harvesting siphonaxanthin-chlorophyll a/b protein complex, an evolutionary relic of some Chlorophyta [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1983, 724: 370-380.
- [3] 曾呈奎, 周百成. 海藻光合作用和进化 [A]. 中国植物生理学会. 光合作用研究进展 (第 3 集) [C]. 北京: 科学出版社, 1984. 202-207.
- [4] 李良璧, 高振洋, 马红, 等. 刺松藻类囊体膜 23kDa 和 24kDa 多肽在阳离子调节激发能分配中的作用 [J]. 中国科学 B 辑, 1992, 7: 696-702.
- [5] Wollman F A, Bennoun P. A new chlorophyll-protein complex related to photosystem I in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1982, 680: 352-360.
- [6] Goedheer J C. Comparison of the long wave chlorophyll fluorescence in various green and blue-green algae and diatoms [J]. *Photosynthesis Res*, 1981, 2: 49-60.
- [7] 陈敏, 宫宝安. 海洋绿藻 77K 低温光谱特性的比较研究 [J]. 烟台大学学报, 2003, 16(2): 119-123.
- [8] Strbac D, Rodrigues M A, Santos C P, et al. Chloroplast isolation from *Laminaria digitata* (Phaeophyceae): A reproducible methodology yielding photosynthetically active chloroplasts [J]. *Planta*, 1994, 195: 138-141.
- [9] Chu Z X, Anderson J M. Modulation of the light-harvesting assemblies in chloroplast of a shade plant, *Alocasia macrorrhiza* [J]. *Photobiochem Photobiophys*, 1984, 8(1): 1-10.
- [10] Jeffrey S W, Humphrey G F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton [J]. *Biochem Physiol Pflanz*, 1975, 167: 191-194.
- [11] 陈敏, 李爱芬, 周百成. 管藻目绿藻叶绿素蛋白复合物特性及比较研究 [J]. 植物学报, 2000, 42(10): 1 019-1 025.

Studies on characteristics of fluorescence emission spectra of unicellular green algae at 77 K

LIU Jian-hui, LI Ai-fen, LIU Tai-sheng, SUN Sui-han, DUAN Shun-shan

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

Received: Oct., 17, 2005

Key words: unicellular green algae; PS I; 77K; fluorescence characterization

Abstract: Fluorescence emission spectra of ten species of unicellular green algae, including five species of freshwater algae *Chlamydomonas nivalis* UTEX 2765, *Chlorella ellipsoidea* CH, *Chlorococcum tatrense* UTEX 2227, *Scenedesmus obliquus*, *Haematococcus* sp. CSIRO:CS-321, five species of marine algae *Dunaliella salina*, *Tetraselmis* sp., *Monodus subterraneus*, *Closterium venus*, *Platymonas subcordiformis* were determined and compared to the higher plant *Spinacia oleracea* and large marine green algae at 77 K. The results showed that green algae were significantly different from higher plant, they had no fluorescence emission at 730 nm which is taken as the characteristic of PS I. The spectra were divided into two types according to the wavelength of major fluorescence emission. It was at 684 nm in *C. nivalis* UTEX 2765, *C. tatrense* UTEX 2227, *D. salina*, *Tetraselmis* sp., *M. subterraneus*, *C. venus*, *P. subcordiformis* and at 711 ~ 715 nm in *C. ellipsoidea* CH, *S. obliquus*, *Haematococcus* sp. CSIRO:CS-321. The characterizations of fluorescence at 77 K may foresee the differences of PS I structure and energy transfer between green algae and higher plant.

(本文编辑:张培新)