

六株球形棕囊藻的色素组成特征研究*

王锦秀^{1,3} 孔凡洲^{1,2,4} 陈振帆^{1,3} 张清春^{1,2,4} 于仁成^{1,2,3,4} 周名江¹

(1. 中国科学院海洋研究所 中国科学院海洋生态与环境科学重点实验室 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室 海洋生态与环境科学功能实验室 青岛 266237; 3. 中国科学院大学 北京 100049; 4. 中国科学院海洋大科学研究中心 青岛 266071)

摘要 球形棕囊藻(*Phaeocystis globosa*)是我国南方沿海近年来主要的赤潮原因种之一,由球形棕囊藻形成的赤潮对海水养殖业发展和海域生态环境构成了严重威胁。棕囊藻通常以囊状群体形式形成赤潮,很难获取其丰度数据,以往研究中多以 19'-己酰氧基岩藻黄素(Hex-fuco)或 19'-丁酰氧基岩藻黄素(But-fuco)作为其特征色素,利用化学分类软件 CHEMTAX 计算其生物量。为了解我国近海球形棕囊藻的色素组成特征,本文采用高效液相色谱方法,分析了 6 株球形棕囊藻的色素组成与含量状况,其中 5 株分离自我国近海。结果表明,6 株球形棕囊藻均以岩藻黄素和叶绿素 *a* 为主要色素,但其特征色素 Hex-fuco 却存在显著的株系间差异,即便是分离自相同海域的不同球形棕囊藻藻株也存在差别。对比棕囊藻游离细胞和囊状群体的色素组成,可以看出两者在色素组成上基本一致,但囊状群体中捕光色素(Light-harvesting pigment)含量低于游离细胞,而光保护色素(Photoprotective pigment)则高于游离细胞,可能与不同存在形态的棕囊藻对光照的适应特征差异有关。以上研究表明,在以 CHEMTAX 方法计算球形棕囊藻生物量时,需要充分调查海域棕囊藻的特征色素组成情况,获取其特征色素信息,构建合理色素比例初始矩阵,为球形棕囊藻赤潮监测奠定基础。

关键词 球形棕囊藻; 色素; 高效液相色谱; 19'-丁酰氧基岩藻黄素; 19'-己酰氧基岩藻黄素

中图分类号 Q948.885.3; X55 **doi:** 10.11693/hyh20180700182

棕囊藻是一类广温广盐性的浮游植物,从极地至热带海域均有分布,是海洋中重要的初级生产者(Smith *et al.*, 1991; Baumann *et al.*, 1994)。它能够产生挥发性的二甲硫醚(DMS),对云核形成和气候变化有重要调控作用(Charlson *et al.*, 1987)。棕囊藻中的球形棕囊藻(*Phaeocystis globosa*)、波切棕囊藻(*P. pouchetii*)和南极棕囊藻(*P. antarctica*)能够形成囊状群体(以下简称囊体),曾在全球许多海域引发大规模赤潮(Schoemann *et al.*, 2005)。在我国近海,球形棕囊藻是主要的赤潮原因种。自 1997 年我国东南沿海首次暴发球形棕囊藻赤潮以来(王朝晖等, 1998),从渤海至南海海域都有棕囊藻赤潮发生(梁玉波, 2012)。棕囊

藻的胶质群体能够堵塞鱼鳃,影响其呼吸和摄食,造成鱼类窒息死亡;棕囊藻产生的溶血毒素具有生物毒性,会对海洋动物产生毒害效应,严重时会导致鱼类大面积死亡(何家苑等, 1999)。因此,棕囊藻赤潮对我国海水养殖业发展和海洋生态系统健康构成了严重威胁。

球形棕囊藻生活史复杂,具有游离细胞和囊体两种存在形态。在球形棕囊藻赤潮中,囊体是其主要存在形态,但水体中也同时存在游离细胞。由于棕囊藻游离细胞个体微小,而囊体在采样和固定过程中易受破坏,使得对球形棕囊藻丰度和生物量的观测受到许多制约。因此,在对棕囊藻的研究中,常用特征色素来反映浮游植物群落组成情况(Wright *et al.*, 1996),并通过化学分类软件 CHEMTAX 来计算

*科技部重点研发项目, 2017YFC1404304 号; 国家自然科学基金项目, 41776127 号; 青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新计划项目, 2016ASKJ02 号; 国家自然科学基金委-山东省联合基金项目, U1606404 号; 中国科学院战略性先导科技专项, XDA11020304 号。王锦秀, 硕士研究生, E-mail: wangjinxiu19940109@163.com

通信作者: 孔凡洲, 博士, 副研究员, E-mail: fzkong@qdio.ac.cn

收稿日期: 2018-07-24, 收修改稿日期: 2018-10-04

棕囊藻所属定鞭藻类的生物量(Mackey *et al*, 1996)。通常认为, 19'-己酰氧基岩藻黄素(19'-hexanoyloxyfucoxanthin, 简称为 Hex-fuco)是棕囊藻的特征色素, 此外, 19'-丁酰氧基岩藻黄素(19'-Butanoyloxyfucoxanthin, 简称为 But-fuco)也是棕囊藻的代表色素, 但其含量相对较低(Wright *et al*, 1987; Zapata *et al*, 2004)。因此, 在以 CHEMTAX 计算棕囊藻生物量时, 许多研究仅以 Hex-fuco 与叶绿素 *a*(chl *a*)的比值进行计算, 也有部分研究将 But-fuco 的贡献考虑在内(Mackey *et al*, 1996; Wright *et al*, 2010; Gibberd *et al*, 2013)。

2015 年, 广西北部湾海域暴发大规模球形棕囊藻赤潮。通过对赤潮过程中浮游植物样品的色素分析发现, 在球形棕囊藻囊体出现之前, 浮游植物样品中能够检测到 Hex-fuco, 在棕囊藻赤潮暴发之后, 样品中却只能检测到 But-fuco, 几乎检测不到 Hex-fuco, 这明显有悖于以往对棕囊藻特征色素的认识。为了解我

国近海球形棕囊藻的色素组成特征, 构建准确的棕囊藻生物量计算方法, 我们采用高效液相色谱方法, 对实验室培养的 6 株球形棕囊藻所产色素进行了分析, 以探讨不同株系棕囊藻和不同状态棕囊藻色素组成特征的差异, 为球形棕囊藻赤潮的监测提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验藻株

实验中分析的 6 株球形棕囊藻相关信息列于表 1。经 28S rDNA 测序分析遗传多样性(胡晓坤等, 2019), 所有藻株均为球形棕囊藻。所有藻株采用 L1 培养基进行培养, 所用海水经 0.22μm 醋酸纤维膜过滤, 煮沸两次后使用。光照为白色 LED 光源, 藻类培养光照强度约 40μmol photons/(m²·s), 光暗比为 14h : 10h, 培养温度(20±1)°C, 培养至指数生长期进行样品采集和色素分析。

表 1 实验中采用的 6 株球形棕囊藻藻株信息
Tab.1 Information of the six strains of *P. globosa*

藻株名称	形态	分离地点	藻种来源
PG2016	囊体与游离细胞共存	广西北部湾	中国科学院海洋研究所
PG2017	囊体与游离细胞共存	广西北部湾	厦门大学
PGDH	囊体与游离细胞共存	福建沿海	中国科学院海洋研究所
PGDAB	仅游离细胞	广东大亚湾	自然资源部第三海洋研究所
GY-H37	囊体与游离细胞共存	广东珠江口	上海光语生物科技有限公司
CCMP628	囊体与游离细胞共存	美国加勒比海	NCMA 藻种库

1.2 化学试剂

分析所用色素标准品(表 2)购自 DHI 公司。采用购自 Sigma 公司的 8'-阿朴-β, ψ-胡萝卜素醛(Apocarotenal)作为内标(Internal Standard, IS)。甲醇、乙腈、吡啶、乙酸和丙酮等有机溶剂均为色谱纯; 实验所用超纯水采用 Millipore 系统纯化制备。

1.3 棕囊藻样品采集

6 株球形棕囊藻半连续培养至指数生长期后的培养液, 分别采集游离细胞、囊体和混合样品进行计数和色素分析, 每类色素样品设置三个平行。采用显微镜进行棕囊藻细胞计数, 其中游离细胞直接以血球计数板计数, 囊体则记录其直径, 并按照 1.4 中所述方法计算棕囊藻细胞数。用于色素分析的棕囊藻样品以直径 25mm 的 GF/F 玻璃纤维滤膜过滤, 其中混合样品是将培养液中游离藻细胞和囊体全部过滤到滤膜上。采集游离细胞时, 先采用 10μm 筛绢过滤培养液, 将滤液中的棕囊藻细胞过滤至 GF/F 玻璃纤维滤

膜上进行分析; 筛绢上截留的棕囊藻作为囊体样品进行分析。对于能形成较大囊体的藻株, 则直接挑取囊体进行计数和色素分析。所有过滤后的滤膜经铝箔包被, 液氮冷冻后, 置于-80°C 冰箱存放直至分析。

1.4 棕囊藻细胞计数

在棕囊藻培养液中, 既存在游离细胞, 也存在囊体。游离细胞密度通过血球计数法获得, 而培养液中棕囊藻囊体的藻细胞密度, 则需要建立棕囊藻囊体中藻细胞的计数方法。在将棕囊藻培养至指数期后, 挑取一定数量不同直径的完整囊体, 直径超过 1cm 的囊体用刻度尺测量直径, 较小囊体在光学显微镜下进行直径测量。由于囊体中的棕囊藻细胞均匀包裹于多糖胶质外被中, 因此可通过显微镜变换焦距计数囊体表面的细胞数, 建立棕囊藻囊体直径与囊体总细胞数的标准曲线。在对棕囊藻培养液藻细胞计数时, 可以通过测量培养液中囊体的数量和直径, 并利用构建的标准曲线计算囊体中藻细胞总数。

表 2 实验中用到的标准色素列表
Tab.2 List of pigment standards used in the experiment

英文名称	中文名称	简称
19'-Hexanoyloxy-4-ketofucoanthin	4-酮基-19'-己酰氧基岩藻黄素	4k-hex-fuco
19'-Butanoyloxyfucoxanthin	19'-丁酰氧基岩藻黄素	But-fuco
19'-Hexanoyloxyfucoxanthin	19'-己酰氧基岩藻黄素	Hex-fuco
β,ε-Carotene	α-胡萝卜素	βε-Car
β,β-Carotene	β-胡萝卜素	ββ-Car
Chlorophyll <i>a</i>	叶绿素 <i>a</i>	Chl <i>a</i>
Chlorophyll <i>c</i> ₂	叶绿素 <i>c</i> ₂	Chl <i>c</i> ₂
Chlorophyll <i>c</i> ₃	叶绿素 <i>c</i> ₃	Chl <i>c</i> ₃
Diadinoxanthin	硅甲藻黄素	Diad
Diatoxanthin	硅藻黄素	Diat
Divinyl-Protochlorophyllide	Mg-2,4-二乙烯基脱镁卟啉 a5 单甲基酯	MGDVP
Fucoanthin	岩藻黄素	Fuco
Methy-chlorophyllide <i>a</i>	甲基脱植基叶绿素 <i>a</i>	Me-chlide <i>a</i>

1.5 色素分析

1.5.1 色素提取 色素提取参照 Zapata 等(2000)的方法,以 95%甲醇作为萃取剂,萃取体积有所不同。滤膜样品室温下解冻后,剪成宽约 1mm 的细条,放入 1.5mL 棕色样品瓶中,加入 1400μL 95%的甲醇水溶液提取色素,同时加入 100μL Apocarotenal (750μg/L)作为内标,混匀,冰浴超声处理 5min 后用玻璃注射器吸取提取液,以孔径 0.22μm 有机相针头滤器过滤,用微量进样针吸取 800μL 滤液至 1.5mL 棕色样品瓶中,加入 160μL 超纯水,震荡混匀,立即上机检测。

1.5.2 HPLC分析方法 采用 Waters E2695 高效液相色谱系统进行色素分析,所用方法为 Zapata 等(2000)建立,略有修订。分析所用色谱柱为 Waters Symmetry C8 色谱柱,采用二元梯度洗脱(表 3),流动相 A 为甲醇:乙腈:吡啶水(50:25:25, *V:V:V*),流动相 B 为甲醇:乙腈:丙酮(20:60:20, *V:V:V*)。进样量为 100μL,洗脱时间 45min。使用 Waters 2998 二极管阵列检测器检测,检测波长为 440nm,同时记录 300—750nm 吸收光谱。

1.5.3 色素定性与定量分析 检出色素通过比对色素标准品的保留时间和吸收光谱特征进行定性确认。

色素定量采用内标定量法,将内标 Apocarotenal 与各种标准色素配制成不同浓度的混合标准溶液,依次将各浓度的混合标准溶液上机检测,绘制工作曲线,得出各种标准色素相对于内标的响应因子。根据响应因子和内标回收率计算得出各类色素的含量。

各种标准色素相对于内标的响应因子(f_p^{is})用公式(1)计算:

表 3 浮游植物色素高效液相色谱分析中采用的二元梯度洗脱程序

Tab.3 The gradient elution program used in the HPLC method for pigment analysis

时间(min)	洗脱液 A(%)	洗脱液 B(%)
0	100	0
22	50	50
28	20	80
40	5	95
43	5	95
43.1	100	0
45	100	0

$$f_p^{is} = \frac{A_{is} \cdot W_p}{A_p \cdot W_{is}} \tag{1}$$

各种色素浓度(C_p , 单位为 μg/L)用公式(2)计算:

$$C_p = \frac{A_p \cdot W_{is} \cdot f_p^{is}}{A_{is} \cdot V_{filt}} \bigg/ \frac{A_{is}}{A_{blank}} \tag{2}$$

其中, A_{is} 为内标面积, W_{is} 为内标质量, A_p 为待测色素面积, W_p 为待测色素质量, V_{filt} 为色素样品过滤体积, A_{blank} 为用于计算回收率的空白内标面积。

1.6 数据处理和统计分析

采用 Waters 公司 Empower 2 软件进行色素数据收集与分析。通过独立样本 *t* 检验进行差异显著性比较,显著性水平为 $P<0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 球形棕囊藻囊体中藻细胞计数结果

棕囊藻具有囊体和游离细胞两种生活形态,难以直接计数藻细胞总数。为方便获得棕囊藻囊体的细

胞数量, 分别针对 5 株能够形成囊体的球形棕囊藻, 建立了囊体细胞总数与囊体直径之间的回归曲线(图 1a)。结果表明, 自中国近海分离的 4 株球形棕囊藻囊体细胞总数与囊体直径的回归曲线相近, 而分离自美国加勒比海的藻株 CCMP628 回归曲线与其他 4 株差异较大。在囊体直径相同的情况下, 根据 CCMP628

回归曲线换算出的细胞数高于其他藻株, 但未达到数量级上的差异。总体来说, 5 株球形棕囊藻获得的回归曲线较为接近, 说明不同株系球形棕囊藻单位表面积囊体上细胞数差异较小, 可以拟合出一条适用于球形棕囊藻囊体细胞数量换算的曲线(图 1b), 各藻株回归曲线及总体曲线方程见表 4。

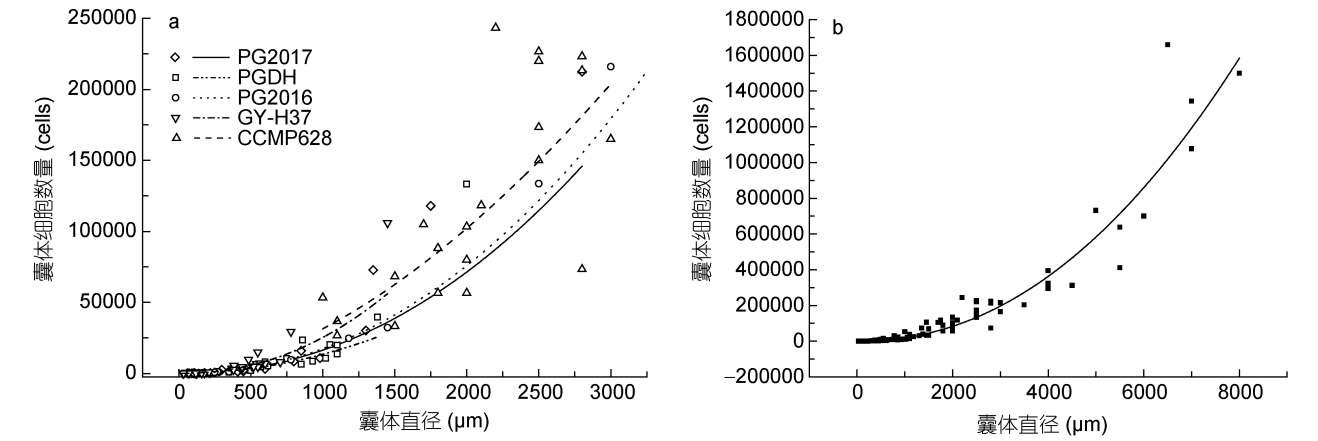


图 1 球形棕囊藻囊体细胞总数与囊体直径的关系
Fig.1 Relationship between total cell number and the size of colony for *P. globosa*
注: a. 5 株球形棕囊藻囊体细胞总数与囊体直径的回归曲线; b. 球形棕囊藻囊体细胞总数与囊体直径的总体回归曲线

表 4 球形棕囊藻囊体细胞总数与囊体直径的回归曲线方程
Tab.4 Regression curves established between total cell number (Y) and the diameter (μm) of colony (X) for 5 strains of *P. globosa*

藻株名称	回归曲线方程	R^2
PG2016	$Y=0.0076X^{2.1204}$	0.9931
PG2017	$Y=0.007X^{2.1232}$	0.9480
PGDH	$Y=0.0144X^{1.9908}$	0.9579
GY-H37	$Y=0.0093X^{2.145}$	0.9287
CCMP628	$Y=0.2477X^{1.7012}$	0.6491
总体曲线	$Y=0.0079X^{2.1271}$	0.9710

2.2 六株球形棕囊藻中色素组成与含量分析

对 6 株实验室培养的球形棕囊藻色素组成和含量进行了分析, 共检测到以下色素组分(图 2): 叶绿素 c_3 (chl c_3)、Mg-2,4-二乙烯基脱镁卟啉 a5 单甲基酯(MgDVP)、叶绿素 c_2 (chl c_2)、甲基脱植基叶绿素 a (Me-chlide a)、19'-丁酰氧基岩藻黄素(But-fuco)、岩藻黄素(Fuco)、4-酮基-19'-己酰氧基岩藻黄素(4k-hex-fuco)、19'-己酰氧基岩藻黄素(Hex-fuco)、硅甲藻黄素(Diad)、硅藻黄素(Diat)、叶绿素 a (chl a)、

α -胡萝卜素(β ϵ -Car)和 β -胡萝卜素(β -Car)。在所检测到的色素中, Fuco 和 chl a 是主要的色素组分。此外, 还有少数色素组分未能确定。

6 株球形棕囊藻的色素组成基本一致, 均以 Fuco 和 chl a 为主要色素组分, 且都含有 But-fuco, 但通常被认为是棕囊藻特征色素的 Hex-fuco 反而存在较大株系间差异。在 4 株棕囊藻中检测到 Hex-fuco, 其中 3 株分离自广西北部湾、广东沿海和美国加勒比海的藻株 PG2017、GY-H37 和 CCMP628 中的 Hex-fuco 色素含量高于 But-fuco, 另外一株分离自东海的 PGDH 藻株 But-fuco 色素含量略高于 Hex-fuco。而 2 株分离自广西北部湾和广东大亚湾的球形棕囊藻 PG2016 和 PGDAB 则未检测到 Hex-fuco。4k-hex-fuco 与 Hex-fuco 往往相伴出现, 在含有 Hex-fuco 的 4 株球形棕囊藻中都检测到了较高含量的 4k-hex-fuco, 而在另外 2 株球形棕囊藻中, 两种色素均未检测到。

根据棕囊藻细胞计数结果, 计算了 6 株球形棕囊藻细胞中的色素含量(表 5)。其中, 藻株 PG2016 囊体较大, 部分直径超过 1cm, 分布不均匀, 容易对棕囊藻细胞计数造成误差, 因此分别分析计算了囊体和游离细胞中的色素含量。结果表明, 各藻株中色素含量以 PG2016、PGDH 和 PG2017 略高, 另外 3 株稍

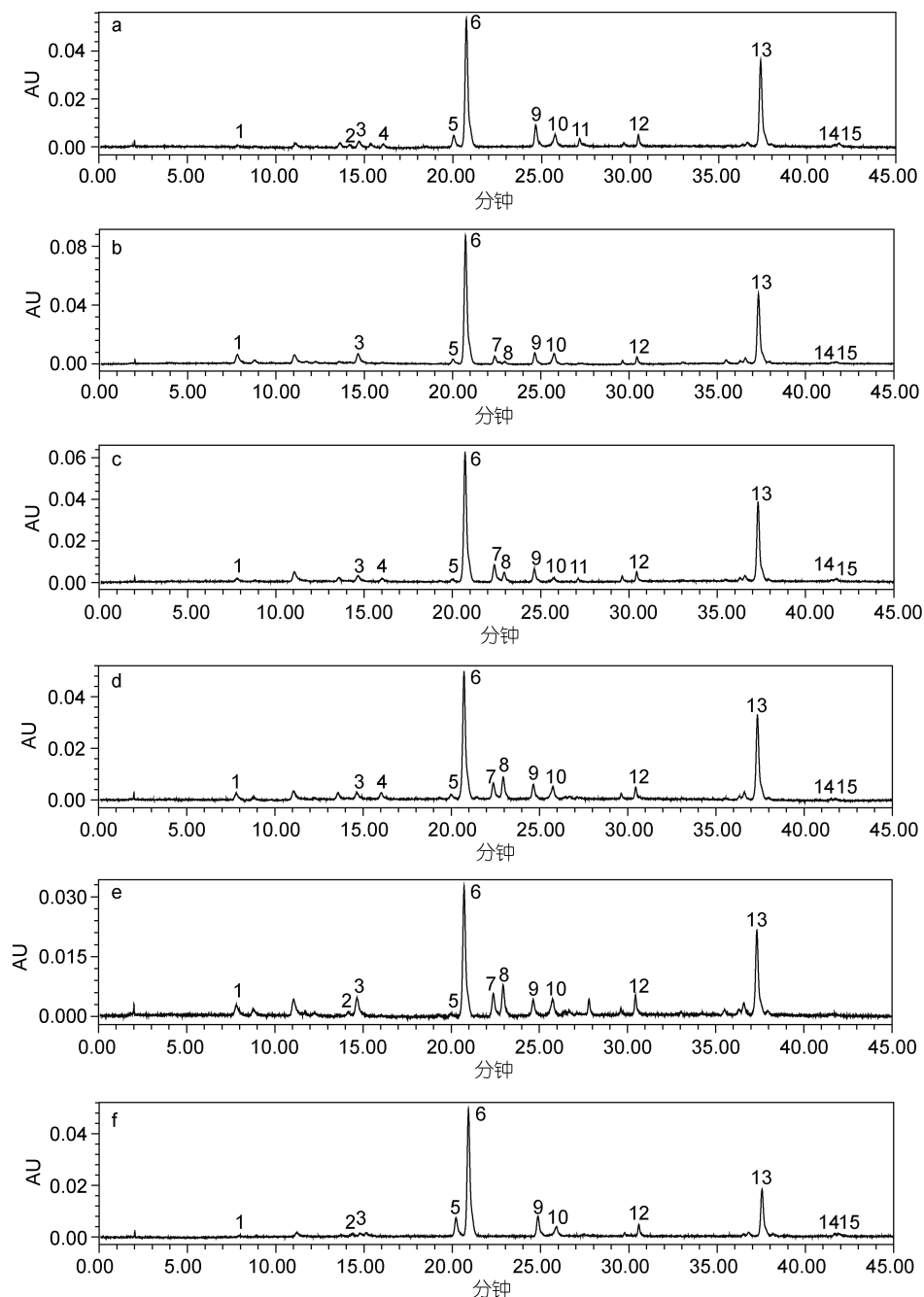


图2 六株球形棕囊藻色素分析色谱图(440nm)

Fig.2 Chromatograms of six *P. globosa* strains (absorbance detected at 440nm)

注: a. PG2016; b. PGDH; c. PG2017; d. GY-H37; e. CCMP628; f. PGDAB

1. chl c_3 ; 2. MgDVP; 3. chl c_2 ; 4. Me-chlide a ; 5. But-fuco; 6. Fuco; 7. 4k-hex-fuco; 8. Hex-fuco; 9. Diad; 10. Unknown carotenoid; 11. Diad; 12. IS; 13. chl a ; 14. $\beta\epsilon$ -Car; 15. $\beta\beta$ -Car

低, 但没有明显差别。所检测到的各种色素中, chl a 含量 (0.0585—0.236pg/cell) 最高, Fuco (0.0478—0.205pg/cell) 次之, 之后依次为 Diad (0.0031—0.0155pg/cell)、But-fuco (0.001—0.015pg/cell)、4k-hex-fuco (0.005—0.012pg/cell)、Hex-fuco (0.002—0.01pg/cell)、Me-chlide a (0.0036—0.0087pg/cell)、

$\beta\beta$ -Car (0.0007—0.0067pg/cell)、chl c_2 (0.0009—0.0092pg/cell)、chl c_3 (0.0008—0.0107pg/cell)、Diad (0.0002—0.0023pg/cell)、MGDVP (0.0006—0.0013pg/cell) 和 $\beta\epsilon$ -Car (0.0002—0.0012pg/cell)。在能够产生 Hex-fuco 的4株球形棕囊藻中, CCMP628的Hex-fuco 含量最高, PGDH 最低。But-fuco 的单细胞色素含量

在 PG2016 中最高, CCMP628 中最低。

2.3 棕囊藻囊体和游离细胞中色素组成与含量对比

针对 5 株能够形成囊体的球形棕囊藻藻株, 对比分析了其囊体和游离细胞中色素组成与含量状况的差异。结果表明, 游离细胞中检测到的色素种类明显多于囊体, 大部分叶绿素 *c* 类色素(如: chl *c*₃、chl *c*₂ 和 MgDVP)仅在游离细胞中检测到, 而在囊体细胞中极少检测到。考虑到在两类样品采集过程中, 囊体上的部分藻细胞可能脱落并进入游离细胞样品, 因此, 未对两类样品中色素的绝对含量进

行对比, 而是分别针对各种色素计算了其 与 chl *a* 含量的比值(表 6), 并对比了游离细胞和囊体之间色素比值的差异。大部分藻株游离细胞中的 Fuco 及其衍生色素(Hex-fuco, But-fuco, 4k-hex-fuco)与 chl *a* 的比值明显高于囊体, 在 PGDH、PG2017 和 CCMP628 等藻株中其差异达到显著水平。Diad/chl *a* 的比值也在游离细胞中较高, 而囊体中 Diat 与 chl *a* 的比值则略高于游离细胞, 但差异不显著。而囊体中胡萝卜素(βε-Car, ββ-Car)与 chl *a* 的比值明显高于游离细胞。

表 5 六株球形棕囊藻细胞内色素组成与含量状况
Tab.5 Cellular pigment composition and content in the six strains of *P. globosa*

藻株名称	单细胞色素含量(pg/cell)												
	chl <i>c</i> ₃	MgDVP	chl <i>c</i> ₂	Me-chlide <i>a</i>	But-fuco	Fuco	4k-hex-fuco	Hex-fuco	Diad	Diat	chl <i>a</i>	βε-Car	ββ-Car
PG2016-游离	0.0019	0.0013	0.0054	0.0087	0.0158	0.1720	—	—	0.0155	0.0023	0.2360	0.0012	0.0067
PG2016-囊体	—	0.0009	0.0009	0.0058	0.0104	0.1140	—	—	0.0094	0.0018	0.1550	0.0011	0.0046
PGDH	0.0107	0.0006	0.0092	0.0027	0.0065	0.2050	0.0093	0.0020	0.0099	0.0005	0.2050	0.0008	0.0036
PG2017	0.0018	—	0.0012	0.0040	0.0021	0.1060	0.0125	0.0065	0.0059	0.0009	0.1260	0.0006	0.0028
GY-H37	0.0026	—	0.0010	0.0036	0.0014	0.0478	0.0052	0.0071	0.0031	0.0003	0.0703	0.0003	0.0012
CCMP628	0.0024	0.0007	0.0019	—	0.0012	0.0485	0.0074	0.0095	0.0032	0.0003	0.0622	0.0002	0.0007
PGDAB	0.0008	0.0007	0.0100	—	0.0105	0.0772	—	—	0.0071	0.0002	0.0585	0.0008	0.0019

表 6 六株球形棕囊藻囊体和游离细胞中辅助色素/叶绿素 *a* 比值(质量比)
Tab.6 Ratios of pigment-to-chl *a* for colonies and free-living cells of the six strains of *P. globosa* (mass ratio)

色素比值(×10 ⁻³)	形态	PG2016	PGDH	PG2017	GY-H37	CCMP628	PGDAB
chl <i>c</i> ₃ /chl <i>a</i>	囊体	—	—	—	—	—	—
	游离	81.0±0.69	49.4±10.7	60.2±15.9	103.0±40.4	19.6±4.41	13.8±1.53
MgDVP/chl <i>a</i>	囊体	5.92±1.63	—	—	—	—	—
	游离	5.66±1.23	2.64±0.39	—	—	11.4±3.00	11.4±0.52
chl <i>c</i> ₂ /chl <i>a</i>	囊体	5.93±2.82	—	—	—	—	—
	游离	22.8±16.6	31.0±21.1	17.8±18.5	33.1±24.9	26.5±21.2	6.06±6.09
Me-chlide <i>a</i> /chl <i>a</i>	囊体	37.3±8.10	—	—	—	—	—
	游离	37.5±9.83	26.7±2.03	80.6±31.6	94.4±86.3	40.2±3.32	—
But-fuco/chl <i>a</i>	囊体	67.3±6.89	19.7±1.93*	16.6±6.48	17.42±5.77	—	—
	游离	67.0±1.83	36.7±4.67*	21.5±5.44	45.0±34.7	29.1±4.89	180±11.3
Fuco/chl <i>a</i>	囊体	733±33.4	538±15.6*	531±6.59*	590±22.3	526±108*	—
	游离	733.±37.3	835±91.6*	1081±242*	1403±973	1257±311*	1321±97.9
4k-hex-fuco/chl <i>a</i>	囊体	—	23.0±1.87*	67.1±7.53*	84.7±5.47	—	—
	游离	—	44.3±5.47*	139.8±35.7*	214±145	113±27.4	—
Hex-fuco/Chl <i>a</i>	囊体	—	11.4±1.26	47.8±5.30	40.2±2.54	98.3±38.4	—

续表

色素比值($\times 10^{-3}$)	形态	PG2016	PGDH	PG2017	GY-H37	CCMP628	PGDAB
Diad/chl <i>a</i>	游离	—	12.3 $\pm$ 3.63	67.4 $\pm$ 16.6	104 $\pm$ 73.8	96.3 $\pm$ 20.9	—
	囊体	60.8 $\pm$ 3.58	41.4 $\pm$ 2.12	27.4 $\pm$ 1.86*	38.5 $\pm$ 6.91	—	—
Diat/chl <i>a</i>	游离	65.7 $\pm$ 0.99	50.9 $\pm$ 6.52	76.5 $\pm$ 171*	123 $\pm$ 7.92	60.9 $\pm$ 14.2	122 $\pm$ 8.35
	囊体	11.5 $\pm$ 1.49	4.02 $\pm$ 1.20	12.2 $\pm$ 4.77	15.9 $\pm$ 3.95	—	—
β e-Car/chl <i>a</i>	游离	9.94 $\pm$ 0.25	3.24 $\pm$ 0.13	10.6 $\pm$ 2.55	16.2 $\pm$ 10.3	4.53 $\pm$ 0.72	3.08 $\pm$ 0.68
	囊体	6.93 $\pm$ 1.76	4.35 $\pm$ 1.55	—	—	—	—
β β -Car/chl <i>a</i>	游离	5.28 $\pm$ 0.35	3.81 $\pm$ 0.16	3.97 $\pm$ 0.93	1.87 $\pm$ 1.05	5.98 $\pm$ 0.48	13.2 $\pm$ 1.10
	囊体	29.6 $\pm$ 2.50	24.1 $\pm$ 6.46	31.0 $\pm$ 6.84	—	—	—
	游离	28.6 $\pm$ 3.84	17.4 $\pm$ 0.69	25.2 $\pm$ 6.44	28.7 $\pm$ 16.5	20.7 $\pm$ 6.84	31.8 $\pm$ 3.73

注: * $P < 0.05$

3 讨论

3.1 球形棕囊藻色素组成特征及其株系间差异

海洋中不同浮游植物类群在色素组成上具有一定差异,因此,可以基于特征色素对不同类群浮游植物进行区分,并通过化学分类软件 CHEMTAX 等计算其生物量。Zapata 等(2004)根据 9 种叶绿素 *c* 类色素和 5 种岩藻黄素的衍生物,将定鞭藻类分成 8 个色素型,其中棕囊藻被归类于同时含有 Hex-fuco 和 But-fuco 的第 VIII 类色素型。以往国际上对棕囊藻色素的研究多集中于南极棕囊藻和波切棕囊藻,在这两种棕囊藻中,Hex-fuco 含量明显高于 But-fuco。因此,常以 Hex-fuco 作为棕囊藻生物量计算的主要特征色素。相对于南极棕囊藻和波切棕囊藻,球形棕囊藻的 Hex-fuco 含量明显较低(Van Leeuwe *et al.*, 2014),本文对球形棕囊藻的研究结果也支持这一观点。另外, Vaulot 等(1994)通过对 16 株棕囊藻的色素分析发现,在不同藻株中 chl *c*₂、chl *c*₃ 和 chl *a* 等常见色素的含量差异较小,而 Fuco 和 Hex-fuco 的含量差异反而较大。由于棕囊藻中 Hex-fuco 含量不稳定,已有研究开始尝试寻找新的棕囊藻特征色素指标。研究发现,在拉布拉多海域的棕囊藻中 Hex-fuco 和 But-fuco 含量很低,而 chl *c*₃ 色素含量较高,因此在 CHEMTAX 计算中以 chl *c*₃ 和 Fuco 作为指示棕囊藻的特征色素(Stuart *et al.*, 2000; Muyllaert *et al.*, 2006; Fragoso *et al.*, 2017)。但在本文研究的 6 株球形棕囊藻中, chl *c*₃ 含量均较低,可能并不适于对球形棕囊藻生物量的评估;而且一些硅藻、甲藻和金藻也能够产生 chl *c*₃(Zapata, 2005),有可能对结果造成干扰。

本文研究结果表明,棕囊藻的特征色素不仅具有明显的种间差别,在不同株系之间也有差异。在所分析的 6 株球形棕囊藻中,有 2 株球形棕囊藻没有检

测到 Hex-fuco。类似结果以往也有报道,在 3 株分别分离自澳大利亚东部海域、英吉利海峡和比利时沿岸的球形棕囊藻中, Hex-fuco 和 But-fuco 均未检出(Jeffrey *et al.*, 1994; Breton *et al.*, 2000; Antajan *et al.*, 2004);而自西班牙沿岸海域和墨西哥湾分离的球形棕囊藻中则只含有 Hex-fuco,不含 But-fuco (Seoane *et al.*, 2009; Zapata *et al.*, 2004)。一株自澳大利亚近海分离的球形棕囊藻中则只有高含量的 But-fuco (Vaulot *et al.*, 1994)。由此可见,不同株系的球形棕囊藻可能具有其独特的色素组成特征。本研究的结果显示,球形棕囊藻藻株的色素组成特征与其采集海域似乎没有明显关联,同样采自广西北部湾的 PG2016 和 PG2017 藻株,其特征色素组成明显不同;采自广东沿海的 GY-H37 和 PGDAB 藻株特征色素组成也有明显差别。在同一海域分离的球形棕囊藻藻株具有不同的色素特征,是否反映了棕囊藻来源地差异(胡晓坤等, 2019),值得深入探讨。另外,在运用 CHEMTAX 评估球形棕囊藻的生物量时,也应充分调查海域棕囊藻的种类与特征色素组成情况,采用合适的色素比例构建初始矩阵,否则会影响结果的准确性。本研究中来自我国近海的五株球形棕囊藻,其 Hex-fuco 与叶绿素 *a* 的比值存在较大差异,根据特征色素与叶绿素 *a* 的比值可大致将五株球形棕囊藻分为三类(表 7): 类型 I, PG2016 和 PGDAB, 不含 Hex-fuco 和 4k-hex-fuco, 而具有较高的 But-fuco/chl *a* 比例; 类型 II 与类型 III 都含有 Hex-fuco, 但在比例上有明显差异, 4k-hex-fuco 的变化规律与 Hex-fuco 一致。类型 II 中 PGDH 藻株 Hex-fuco/chl *a* 比值较低,约为 0.01; 类型 III 中具有较高含量的 Hex-fuco 和 4k-hex-fuco, Hex-fuco/chl *a* 约为 0.04—0.1。因此,在计算我国近岸海域球形棕囊藻的生物量时,可参考此比值选择初始色素比例。

表 7 我国近海五株球形棕囊藻特征色素/叶绿素 *a* 比值(质量比)
Tab.7 The mass ratios of pigment-to-Chl *a* for five strains of *P. Globosa* in China

类型	色素比例			
	Hex-fuco/chl <i>a</i>	4k-hex-fuco/chl <i>a</i>	But-fuco/chl <i>a</i>	chl <i>c</i> ₃ /chl <i>a</i>
I PG2016, PGDAB	0	0	0.07—0.18	0.01—0.08
II PGDH	0.01	0.02—0.04	0.02—0.04	0.05
III PG2017, GY-H37	0.04—0.1	0.07—0.2	0.02—0.05	0.06—0.1

以往研究结果表明,棕囊藻的色素组成会受到光照和盐度等环境因子影响(Seoane *et al*, 2009; Liu *et al*, 2011; Van Leeuwe *et al*, 2014),在特定条件下 Fuco 会向 Hex-fuco 或 But-fuco 转变(Stefels *et al*, 1998)。因此,球形棕囊藻各藻株的特征色素组成是固有的,还是会随环境条件变化转变,还需继续研究。

3.2 球形棕囊藻色素组成特征与其存在形态的关系

前期研究表明,棕囊藻的游离细胞和囊体细胞之间在色素组成上有可能存在差异(Jeffrey *et al*, 1994; Vaultot *et al*, 1994)。本研究发现,5 株球形棕囊藻的游离细胞和囊体细胞在色素组成上存在一定差别。在游离细胞中普遍存在叶绿素 *c* 类色素, Fuco 及其衍生物与 chl *a* 的比值相对较高;而囊体中很少检测到叶绿素 *c* 类色素, Diat 和胡萝卜素(β -Car, β -Car)与 chl *a* 的比值相对较高。在以往研究中也类似报道,如 Buma 等(1991)研究发现,南极棕囊藻囊体细胞中的 Fuco/chl *a* 的比值明显低于游离细胞。

在上述色素中,叶绿素 *c* 类和 Fuco 都具有光捕获功能。Hex-fuco、4k-hex-fuco 和 But-fuco 都是 Fuco 的衍生物,具有相似的化学结构和吸收光谱特征,Hex-fuco 也具有光捕获功能,而 But-fuco 和 4k-hex-fuco 可能兼具光捕获和光保护色素功能(Van Leeuwe *et al*, 2014)。Diat、Diat 和胡萝卜素则是常见的光保护色素(Gibb *et al*, 2000; Zapata *et al*, 2004)。在高光照条件下,藻类通过叶黄素循环产生 Diad 和 Diat,来保护细胞免受光损伤。以往研究发现,在高光照条件下,叶绿素 *c* 类和 Fuco 等捕光色素与 chl *a* 的比值明显下降,而 Diad、Diat 和 β -Car 等光保护色素的比例则会上升(Seoane *et al*, 2009; Van Leeuwe *et al*, 2014)。球形棕囊藻囊体细胞和游离细胞中色素组成的差异很可能反映了两种存在状态的棕囊藻对光照适应特征的差异。棕囊藻游离细胞散布于海水中,接受的光照相对较弱,需要叶绿素 *c* 类等光捕获色素辅助 chl *a* 获取光能,进行光合作用。而棕囊藻囊体大部分漂浮于水体表层,可以获得充足光照,因此,捕光色素含量降低,而光保护色素含量上升。囊体细

胞中捕光色素含量下降的另外一个原因可能是囊体形成后藻细胞营养方式改变,可以依靠有机胶质膜为其异养生长提供能量和营养物质(Schoemann *et al*, 2001)。

在自然环境中,以游离细胞和囊体两种形态存在的球形棕囊藻,是其不同生活史阶段的代表,通过生活史阶段的转换来适应环境条件的变化。在游离细胞和囊体的转换中,可能存在有性生殖过程(杨和福, 2004; 沈萍萍等, 2000; 胡晓坤等, 2019)。本研究中所针对的球形棕囊藻游离细胞和囊体,只是在同一培养阶段人为将囊体细胞和游离细胞分开,可能难以完全反映自然海域中球形棕囊藻游离细胞和囊体在色素组成上的差别,有必要通过对球形棕囊藻生活史阶段的控制实验,进一步分析两种生活史状态棕囊藻在色素组成特征方面的差异。

4 结论

本文针对在我国东南沿海连年暴发大规模赤潮的球形棕囊藻,选择 6 株球形棕囊藻藻株,对其色素组成与含量进行了分析和对比,并通过分级过滤方法获得球形棕囊藻囊体和游离细胞样品,对其色素组成情况进行了对比。得到主要结论如下:

(1) 不同株系球形棕囊藻色素组成相似,但其特征色素存在明显株系间差异。在测试的 6 株球形棕囊藻中都可以检测到 But-fuco,但 Hex-fuco 仅在 4 株球形棕囊藻中检出。球形棕囊藻各藻株中 Hex-fuco 存在与否与其分离地没有明显关联,即便是分离自同一海域的球形棕囊藻藻株也具有不同的特征色素组成。

(2) 球形棕囊藻囊体和游离细胞在色素组成上存在差异。游离细胞中叶绿素 *c* 类、Fuco 和 Hex-fuco 等捕光色素与叶绿素 *a* 的比值较高,而囊体细胞中 Diat 和胡萝卜素等光保护色素与叶绿素 *a* 的比值更高,这一差异可能与不同生活史状态棕囊藻对光照的适应特征有关。

(3) 研究结果表明,仅以 Hex-fuco 作为球形棕囊藻的特征色素并不合适。因此,在以 CHEMTAX 方法

计算球形棕囊藻生物量时, 应充分调查目标海域球形棕囊藻特征色素组成情况, 获取其特征色素信息, 构建合理色素比例初始矩阵, 为球形棕囊藻赤潮监测奠定基础。

致谢 承蒙厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室王大志教授提供从北部湾海域分离的球形棕囊藻 PG2017 藻株, 自然资源部第三海洋研究所顾海峰研究员提供从广东大亚湾分离的球形棕囊藻 PGDAB 藻株, 谨致谢忱。

参 考 文 献

- 王朝晖, 吕颂辉, 陈菊芳等, 1998. 广东沿海几种赤潮生物的分类学研究. 武汉植物学研究, 16(4): 310—314
- 杨和福, 2004. 棕囊藻的生物学概述 I. 形态分类和生理生态学. 东海海洋, 22(1): 49—63
- 何家苑, 施之新, 张银华等, 1999. 一种棕囊藻的形态特征与毒素分析. 海洋与湖沼, 30(2): 172—179
- 沈萍萍, 王 艳, 齐雨藻等, 2000. 球形棕囊藻的生长特性及生活史研究. 水生生物学报, 24(6): 635—643
- 胡晓坤, 张青春, 陈振帆等, 2019. 北部湾海域球形棕囊藻遗传多样性分析. 海洋与湖沼, 50(3): 601—610
- 梁玉波, 2012. 中国赤潮灾害调查与评价(1933—2009). 北京: 海洋出版社, 112—115
- Antajan E, Chrétiennot-Dinet M J, Leblanc C *et al*, 2004. 19'-Hexanoyloxy fucoxanthin may not be the appropriate pigment to trace occurrence and fate of *Phaeocystis*: the case of *P. globosa* in Belgian coastal waters. Journal of Sea Research, 52(3): 165—177
- Baumann M E M, Lancelot C, Brandini F P *et al*, 1994. The taxonomic identity of the cosmopolitan prymnesiophyte *Phaeocystis*: a morphological and ecophysiological approach. Journal of Marine Systems, 5(1): 5—22
- Breton E, Brunet C, Sautour B *et al*, 2000. Annual variations of phytoplankton biomass in the Eastern English Channel: comparison by pigment signatures and microscopic counts. Journal of Plankton Research, 22(8): 1423—1440
- Buma A G J, Bano N, Veldhuis M J W *et al*, 1991. Comparison of the pigmentation of 2 strains of the Prymnesiophyte *Phaeocystis* sp. Netherlands Journal of Sea Research, 27(2): 173—182
- Charlson R J, Lovelock J E, Andreae M O *et al*, 1987. Oceanic phytoplankton, atmospheric sulphur, cloud albedo and climate. Nature, 326(6114): 655—661
- Fragoso G M, Poulton A J, Yashayaev I M *et al*, 2017. Spring phytoplankton communities of the Labrador Sea (2005—2014): pigment signatures, photophysiology and elemental ratios. Biogeosciences, 14(5): 1235—1259
- Gibb S W, Barlow R G, Cummings D G *et al*, 2000. Surface phytoplankton pigment distributions in the Atlantic Ocean: an assessment of basin scale variability between 50°N and 50°S. Progress in Oceanography, 45(3—4): 339—368
- Gibberd M J, Kean E, Barlow R *et al*, 2013. Phytoplankton chemotaxonomy in the Atlantic sector of the Southern Ocean during late summer 2009. Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers, 78: 70—78
- Jeffrey S W, Wright S W, 1994. Photosynthetic pigments in the Haptophyta. In: Green J C, Leadbeater B S C eds. The Haptophyte Algae. Oxford, UK: Clarendon Press, 111—132
- Liu S X, Yu Z G, Yao P *et al*, 2011. Effects of irradiance on pigment signatures of harmful algae during growth process. Acta Oceanologica Sinica, 30(6): 46—57
- Mackey M D, Mackey D J, Higgins H W *et al*, 1996. CHEMTAX—a program for estimating class abundances from chemical markers: application to HPLC measurements of phytoplankton. Marine Ecology Progress Series, 144: 265—283
- Muylaert K, Gonzales R, Franck M *et al*, 2006. Spatial variation in phytoplankton dynamics in the Belgian coastal zone of the North Sea studied by microscopy, HPLC-CHEMTAX and underway fluorescence recordings. Journal of Sea Research, 55(4): 253—265
- Schoemann V, Wollast R, Chou L *et al*, 2001. Effects of photosynthesis on the accumulation of Mn and Fe by *Phaeocystis* colonies. Limnology and Oceanography, 46(5): 1065—1076
- Schoemann V, Becquevort S, Stefels J *et al*, 2005. *Phaeocystis* blooms in the global ocean and their controlling mechanisms: a review. Journal of Sea Research, 53(1—2): 43—66
- Seoane S, Zapata M, Orive E, 2009. Growth rates and pigment patterns of haptophytes isolated from estuarine waters. Journal of Sea Research, 62(4): 286—294
- Smith W O Jr, Codispoti L A, Nelson D M *et al*, 1991. Importance of *Phaeocystis* blooms in the high-latitude ocean carbon cycle. Nature, 352(6335): 514—516
- Stefels J, Van Leeuwe M A, 1998. Effects of iron and light stress on the biochemical composition of Antarctic *Phaeocystis* sp. (Prymnesiophyceae). I. Intracellular DMSP concentrations. Journal of Phycology, 34(3): 486—495
- Stuart V, Sathyendranath S, Head E J H *et al*, 2000. Bio-optical characteristics of diatom and prymnesiophyte populations in the Labrador Sea. Marine Ecology Progress Series, 201: 91—106
- Van Leeuwe M A, Visser R J W, Stefels J, 2014. The pigment composition of *Phaeocystis antarctica* (Haptophyceae) under various conditions of light, temperature, salinity, and iron. Journal of Phycology, 50(6): 1070—1080
- Vaulot D, Birrien J L, Marie D *et al*, 1994. Morphology, ploidy, pigment composition, and genome size of cultured strains of *Phaeocystis* (Prymnesiophyceae). Journal of Phycology, 30(6): 1022—1035
- Wright S W, Jeffrey S W, 1987. Fucoxanthin pigment markers of marine phytoplankton analysed by HPLC and HPTLC. Marine Ecology Progress Series, 38: 259—266
- Wright S W, Thomas D P, Marchant H J *et al*, 1996. Analysis of phytoplankton of the Australian sector of the Southern Ocean: Comparisons of microscopy and size-frequency data with interpretations of pigment HPLC data using the CHEMTAX matrix factorisation program. Marine Ecology Progress Series, 144: 285—298

- Wright S W, Van Den Enden R L, Pearce I *et al*, 2010. Phytoplankton community structure and stocks in the Southern Ocean (30°—80°E) determined by CHEMTAX analysis of HPLC pigment signatures. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 57(9—10): 758—778
- Zapata M, Rodríguez F, Garrido J L, 2000. Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C₈ column and pyridine-containing mobile phases. *Marine Ecology Progress Series*, 195: 29—45
- Zapata M, Jeffrey S W, Wright S W *et al*, 2004. Photosynthetic pigments in 37 species (65 strains) of Haptophyta: implications for oceanography and chemotaxonomy. *Marine Ecology Progress Series*, 270: 83—102
- Zapata M, 2005. Recent advances in pigment analysis as applied to picophytoplankton. *Vie et Milieu*, 55(3—4): 233—248

CHARACTERIZATION OF PIGMENT COMPOSITION OF SIX STRAINS OF *PHAEOCYSTIS GLOBOSA*

WANG Jin-Xiu^{1,3}, KONG Fan-Zhou^{1,2,4}, CHEN Zhen-Fan^{1,3}, ZHANG Qing-Chun^{1,2,4},
YU Ren-Cheng^{1,2,3,4}, ZHOU Ming-Jiang¹

(1. CAS Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266237, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 4. Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract *Phaeocystis globosa*, a major red-tide causative species in the South China Sea, posed big threats to the local aquaculture and ecosystems. Due to the co-existence of both free-swimming cells and big colonies of *P. globosa*, it is often difficult to obtain the accurate abundance of *P. globosa* during red tides. Therefore, the CHEMTAX method is often adopted to calculate the biomass of *P. globosa* using 19'-hexanoyloxyfucoxanthin (Hex-fuco) or 19'-butanoyloxyfucoxanthin (But-fuco) as its representative pigments. To find out the representative pigment of *P. globosa*, we analyzed the pigment composition and content of six strains of *P. globosa* with high performance liquid chromatography, of which five strains were isolated from Chinese coastal waters. The results show that the pigment compositions of the six strains are largely the same, the major pigment components are fucoxanthin and chlorophyll *a*. However, each representative pigment, especially Hex-fuco, features own strain-specific variation pattern, and even the strains isolated from the same sea area had different pigment profiles. In addition, we compared the pigment compositions of the free-swimming cells and colonies of *P. globosa* in the ratio of each pigment to chlorophyll *a*, and found that the free-swimming cells contain more light-harvesting pigments such as chl *c*, fucoxanthin, and Hex-fuco, while the colonies contain more photo-protection pigments such as diatoxanthin and carotenes. This difference in pigment profile reflected their own unique light adaptive strategy. Therefore, the pigment composition of *P. globosa* in the selected region of red tide monitoring should be examined carefully to determine their most representative pigments to help monitoring *P. globosa* red tides using the CHEMTAX method.

Key words *Phaeocystis globosa*; pigment; HPLC; 19'-hexanoyloxyfucoxanthin; 19'-butanoyloxyfucoxanthin