

# 不同光质条件下三角褐指藻光合生理指标与岩藻黄素含量的相关性分析

徐润洁<sup>1</sup>, 龚一富<sup>1\*</sup>, 韦凤娟<sup>1</sup>, 李申睿<sup>1</sup>, 陈若莹<sup>1</sup>, 郑小恂<sup>1</sup>, 方清姝<sup>1</sup>, 陈文婷<sup>1</sup>, 王何瑜<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315832;

<sup>2</sup> 宁波大学食品与药学院, 浙江 宁波 315832

**摘要** 为研究三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)光合作用生理指标与岩藻黄素含量之间的相关性,采用不同的发光二极管单色光质对三角褐指藻进行处理,测定岩藻黄素含量、光合作用相关生理参数和相关基因表达,并研究测定指标之间的相关性。研究表明:紫光可极显著地提高三角褐指藻岩藻黄素和叶绿素 a 的含量( $P < 0.01$ )。光合生理指标结果表明,红光可极显著地促进三角褐指藻藻细胞的 Y(II)、rETR<sub>max</sub> 和  $\alpha$  值( $P < 0.01$ ),黄光处理后的三角褐指藻藻细胞的 NPQ 值最低,比对照组降低了 63.45% ( $P < 0.01$ )。RT-qPCR 分析结果表明:蓝光更利于光合作用碳反应相关基因 *rbcL* 的表达;红光、蓝光、绿光和紫光可极显著地促进捕光天线合成基因 *fcxB* 的表达( $P < 0.01$ ),其中红光促进 *fcxB* 基因表达的能力最强,比对照处理组提高了 5.4 倍。Pearson 相关性分析表明:三角褐指藻岩藻黄素含量与 rETR<sub>max</sub>、*fcxB* 基因表达呈显著正相关,与 *rbcL* 基因的表达呈极显著负相关,说明三角褐指藻可通过不同波长的光调控 rETR<sub>max</sub> 参数及 *fcxB* 基因表达来提高光合作用效率,进而促进岩藻黄素的合成与积累。

**关键词** 生物光学; 光质; 三角褐指藻; 岩藻黄素; 光合生理指标; 相关性分析

中图分类号 Q682

文献标志码 A

doi: 10.3788/CJL202047.0507001

## Correlation Analysis of Photosynthetic Physiological Indexes and Content of Fucoxanthin in *Phaeodactylum tricornutum* Under Different Light Quality Conditions

Xu Runjie<sup>1</sup>, Gong Yifu<sup>1\*</sup>, Wei Fengjuan<sup>1</sup>, Li Shenrui<sup>1</sup>, Chen Ruoying<sup>1</sup>,  
Zheng Xiaoyun<sup>1</sup>, Fang Qingshu<sup>1</sup>, Cheng Wenting<sup>1</sup>, Wang Heyu<sup>2</sup>

<sup>1</sup> School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo, Zhejiang 315832, China;

<sup>2</sup> College of Food and Pharmaceutical Sciences, Ningbo, Zhejiang 315832, China

**Abstract** In order to study the correlation between the fucoxanthin content of *Phaeodactylum tricornutum* and its photosynthetic physiological indexes, different monochromatic light-emitting diodes were used as light sources to treat *P. tricornutum*. The fucoxanthin content, photosynthetic physiological indexes, and the expressions of photosynthesis-related genes were detected, and the correlation among the indicators was examined. The results show that purple light can significantly promote fucoxanthin and chlorophyll a production of *P. tricornutum* ( $P < 0.01$ ). Under red light, the value of Y(II), maximum relative electron transfer rate (rETR<sub>max</sub>), and alpha readings of the algae cells were significantly higher than those of the control group ( $P < 0.01$ ). Under yellow light, the nonphotochemical quenching value of the algae cells is at its lowest, which was 63.45% lower than that of the control group ( $P < 0.01$ ). The results of the quantitative reverse transcription-PCR show that blue light is more conducive to the expression of the *rbcL* gene. Under red, blue, green, and purple light conditions, the expression level of *fcxB* is significantly increased compared to the control group ( $P < 0.01$ ), and the expression level is increased by 5.4 times under red light. Combined with Pearson analysis, the content of fucoxanthin was positively correlated with the rETR<sub>max</sub> and the expression of the *fcxB* gene, and negatively correlated with the expression of the *rbcL* gene. In conclusion, the synthesis and accumulation of fucoxanthin can be promoted by improving the photosynthetic efficiency of *P. tricornutum*, which can be done by regulating the parameters of rETR<sub>max</sub> and the

收稿日期: 2019-12-18; 修回日期: 2019-12-31; 录用日期: 2020-01-10

基金项目: 国家科技部星火计划(2015GA701001)、宁波市社发重大项目(2017C510002)

\* E-mail: gongyifu@163.com

expression of the *fcpB* gene at different wavelengths.

**Key words** biotechnology; light quality; *Phaeodactylum tricornutum*; fucoxanthin; photosynthetic physiological index; correlation analysis

**OCIS codes** 170.6280; 300.6550; 350.7420

## 1 引 言

微藻是海洋中的主要生产者,它们将大量的二氧化碳固定在有机碳中,构建了海洋初级生产力的基础,并承担着整个海洋约 25% 的初级生产力<sup>[1]</sup>。Cahoon 等<sup>[2]</sup>通过推演得知底栖微藻通过光合作用对近岸海洋生态系统固碳量的贡献达到了 0.5 Gt/a。其中,底栖微藻群落主要以硅藻为主<sup>[3]</sup>,因此硅藻的固碳潜力受到了广泛关注。三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)是一种单细胞海洋硅藻,因富含大量的多不饱和脂肪酸 EPA<sup>[4]</sup>和特殊类胡萝卜素岩藻黄素<sup>[4]</sup>而被视为极具开发前景的优质经济微藻。三角褐指藻能在 5~25 °C 温度下快速繁殖,易培养,且单位面积产量高,开发潜力很大<sup>[5]</sup>,已被视为硅藻研究中的模式生物。

三角褐指藻具有一种特殊的光捕获天线 FCPs (Fucoxanthin Chl a/c binding proteins),该捕光蛋白由大量岩藻黄素和叶绿素组成,天线通过这些光合色素来捕获海底的蓝绿光以适应弱光环境。同时,FCPs 上的岩藻黄素能与硅甲藻黄素一起建立硅藻的超级光保护机制。单细胞真核海洋微藻能适应海水中复杂多变的环境就是得益于该光保护机制<sup>[6]</sup>。Jeffrey 等<sup>[7]</sup>利用蓝绿光研究了 17 种单细胞海藻光合色素含量的变化,结果发现,5 种硅藻、1 种沟鞭藻中叶绿素的增加(55%~146%)主要与光系统 I 和 II 中相关基因的表达有关。根据 Kim 等<sup>[8]</sup>的研究可知三角褐指藻中岩藻黄素的干重可达 15.33 mg/g,在三角褐指藻光系统的天线色素中占有较大比重。因此,岩藻黄素也成为研究硅藻光合作用机理的热点。

国内外研究人员通常利用拉曼光谱、X 射线衍射来获取岩藻黄素的分子特征<sup>[9]</sup>,或通过测定单条岩藻黄素合成通路的基因表达来分析其合成机理。尽管这些方法能根据岩藻黄素的结构来推断其功能机理,或从基因表达来探究岩藻黄素的动力学和能量学<sup>[10]</sup>,但操作起来比较繁琐,无法在短时间内给出一个指标参数。叶绿素荧光技术能在不损伤植物的情况下检测环境改变对光合作用的影响,是一种快捷、便利、理想的植物内在性检测方法<sup>[11]</sup>。叶绿素荧光所检测的参数包括表示 PSII 的实际量子

产量 Y(II)、光化学淬灭系数 qP、非光化学淬灭系数 NPQ<sup>[11]</sup>等光合参数。如今,利用叶绿素荧光技术检测藻类生长发育已得到较为广泛的研究。Wu 等<sup>[12]</sup>利用蓝色、红色、绿色发光二极管及荧光灯管为光源来培养坛紫菜,结果发现坛紫菜的生长速度、细胞色素比例、荧光参数及各类抗氧化酶活性出现出一定差异,并得出了如下结论:1)蓝光和绿光可以有效提高坛紫菜的光合效率;2)在红光处理下,超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)的活性随着 NPQ 的增大而增加。另外,Sjollema 等<sup>[13]</sup>认为,蓝光不仅会抑制硅藻的生长,还会引起细胞色素,尤其是细胞色素 a3 的破坏。

本文采用叶绿素荧光技术和基因转录调控技术,通过分析光合生理指标、基因表达、岩藻黄素含量这三者之间的相关性,来探究不同光质下三角褐指藻次生代谢产物岩藻黄素的产生机制,为检测和提高岩藻黄素含量提供更加快速便捷的指标,也为今后深入研究海洋微藻的光合作用提供方向。

## 2 材料与方法

### 2.1 三角褐指藻的培养及处理

本研究所用三角褐指藻藻种由宁波大学教育部海洋生物工程重点实验室提供,以  $1 \times 10^5$  cells/mL 的初始浓度接种到 f/2 培养液中<sup>[14]</sup>,放置于光强为  $63 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、温度为  $(22 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$  的光照培养箱中培养,明暗周期为 12 h:12 h<sup>[15]</sup>。至第 5 天藻细胞生长达到指数期,使用红(620~660 nm)、黄(560~590 nm)、蓝(470~480 nm)、绿(520~530 nm)、紫(400~420 nm)LED 单色灯(灯头型号为 T8,灯管长度为 1.2 m)对三角褐指藻进行光质处理,以普通白光为对照组,每组 3 个平行样。

### 2.2 三角褐指藻细胞岩藻黄素含量的测定

准确量取平台期的藻液 100 mL,2800g 低温离心 10 min,将上清液丢弃,取藻泥冷冻干燥 2 d,称取约 0.1 g 研磨成粉。

取一定量藻粉,按 1:40 (1 g 藻粉溶于 1 mL 无水乙醇中)的料液比加入无水乙醇,然后置于 60 °C 水浴中避光浸提 1 h,2800g 离心 10 min,将上清液丢弃。重复上述步骤,取上清液备用。利用双光束紫外可见分光光度计(UV-4802 型)测定提取液在

445 nm 处的吸光度。根据公式  $(1000 \times A_{445} \times N \times V) / (A1\% \text{ cm} \times m \times 100)$  计算岩藻黄素的含量 (mg/g)<sup>[16]</sup>。其中,  $A_{445}$  为提取液在 445 nm 处的吸光度,  $N$  为稀释倍数,  $V$  为粗提取液的体积,  $A1\% \text{ cm}$  取 1600,  $m$  为样品质量。

### 2.3 三角褐指藻细胞叶绿素 a 含量的测定

准确量取混合均匀的平台期藻液 10 mL, 2800g 低温离心 10 min, 将上清液丢弃, 加入 10 mL 无水乙醇, 吹打混匀, 于暗处静置 24 h 后 2800g 离心 10 min, 取上清液备用。测定提取液在 665 nm 和 652 nm 处的吸光度。根据李合生<sup>[17]</sup>的公式  $\text{Chl a} = 13.95 \times A_{665} - 6.88 \times A_{652}$  计算叶绿素 a 的含量 ( $\mu\text{g/L}$ )。

### 2.4 三角褐指藻叶绿素荧光参数的测定

用藻类叶绿素荧光参数荧光仪 (PAM. WATER-ED) 测定各荧光参数, 用 PhytoWinsoftware1.45 (Walz) 记录数据。测量之前先对待测藻液进行暗适应 10~15 min, 然后在避光条件下将藻液尽快倒入测量杯中。根据藻体密度将系统的实时荧光值 (Ft 值) 调至 200~600, 然后分别以饱和和脉冲光 [ $2064 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s}), 0.4 \text{ s}$ ] 和光化光 [ $264 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s}), 120 \text{ s}$ ] 作为激发光, 获得暗适应下的基础荧光  $F_0$ 、 $F_m$  以及光适应下的基础荧光  $F_s$ 、最大荧光  $F_m'$ , 根据公式<sup>[11]</sup> 分别计算出  $Y(\text{II})$ 、 $qP$  和  $\text{NPQ}$ 。

在 13 个辐照度 (64, 164, 264, 364, 464, 564, 764, 964, 1164, 1364, 1564, 1864, 2064  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ) 下测定快速光曲线, 13 个辐照度依次递增, 每级持续时间为 60 s。快速光曲线可采用公式  $P = \text{PAR}/$

$(a \times \text{PAR}2 + b \times \text{PAR} + c)$ ,  $\alpha = 1/c$  和  $\text{rETR}_{\text{max}} = 1/(b + 2\sqrt{ac})$  建立, 其中:  $P$  表示光合速率;  $\text{PAR}$  表示光照强度;  $\text{PAR}2$  表示光合有效辐射;  $a$ 、 $b$ 、 $c$  均为计算参数;  $\alpha$  表示快速光曲线的初始斜率;  $\text{rETR}_{\text{max}}$  表示最大相对电子传递速率。根据拟合结果可求得  $\alpha$  和  $\text{rETR}_{\text{max}}$ 。

### 2.5 三角褐指藻光合作用相关基因的表达

取藻液 80 mL, 2800g 低温离心 10 min, 然后利用植物核酸提取试剂盒 (Plant RNA Kit) 提取总 RNA。用 Takara PrimeScript RT Reagent Kit 对总 RNA 进行反转录, 作为 RT-qPCR 的模板。

通过 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 找到三角褐指藻光合作用相关基因 Rubisco 合成酶基因 (*rbcL*)、岩藻黄素-叶绿素蛋白复合体合成基因 (*fcpB*)、光系统 II 反应中心蛋白 D1 合成基因 (*psaB*)、光系统 I P700 叶绿素载脂蛋白基因 (*psaB*), 使用 primer 5.0 设计 *rbcL*、*fcpB*、*psaB*、*psbA* 这四个光合作用相关基因的引物 (表 1), 以  $\beta\text{-actin}$  基因为参照基因 (上游引物 *actinF*: 5'-AGACCATTATGAAGTGCGAT-3', 下游引物 *actinR*: 5'-ACCCTCCAATCCAAACAG-3')。所有引物均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。RT-qPCR 反应体系为 SYBR Premix Ex Taq™ (2×) 10  $\mu\text{L}$ , 上下游引物各 0.8  $\mu\text{L}$ , 无菌双蒸水 6.4  $\mu\text{L}$ , 模板 2  $\mu\text{L}$ , 共 20  $\mu\text{L}$  溶液体系。然后轻吹打混匀, 每组样品重复 3 次。反应程序如下: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 25 s, 扩增 40 个循环; 72 °C 延伸 10 min; 16 °C 保存。运用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法<sup>[18]</sup> 对荧光定量结果进行分析。

表 1 目的基因引物

Table 1 Primers of target genes

Gene	Gene code	Primer sequences(5'-3')
<i>rbcL</i>	KY751726.1	TATTAACCTCACAACCTTCATGCG(F)
		TGAACCTTTAGTTTTACCTGTAGC(R)
<i>fcpB</i>	Z24768.1	ATGAAGTTTACCGTGTTCCT(F)
		TAACACCTGGGAGGATGTTGACTC(R)
<i>psaB</i>	KM009805.1	Caggtcgtgggtgactgtgat(F)
		Cgtagccagcccatgatgtaattg(R)
<i>psbA</i>	KY751725.1	Caggtgtattcggtggtctttattct(F)
		Cgagagttgttaaatgaagcgtattgg(R)

### 2.6 数据处理

利用 Microsoft Excel 2013 软件对数据进行处理; 采用 SPSS 22.0 软件进行数据的显著性分析和 Pearson 相关性分析, 将  $P < 0.05$  认定为显著差异 (\*),  $P < 0.01$  认定为极显著差异 (\*\*).

## 3 结果分析与讨论

### 3.1 光质对三角褐指藻细胞岩藻黄素含量及叶绿素 a 含量的影响

由图 1 可知: 红光和紫光均极显著地提高了三

角褐指藻岩藻黄素的含量( $P < 0.01$ ),红光、蓝光和紫光处理三角褐指藻可极显著地提高叶绿素 a 的含量( $P < 0.01$ ),绿光极显著地降低了三角褐指藻叶绿素 a 的含量( $P < 0.01$ )。

光质作为一种光传导信号分子,能刺激三角褐指藻光保护系统的启动,减少光氧化胁迫<sup>[19]</sup>。而岩藻黄素作为三角褐指藻的特殊类胡萝卜素,既可作为辅助捕光色素促进细胞的光合生产,又可在藻体进行光氧化时起到保护作用<sup>[20]</sup>。Takahashi 等<sup>[21]</sup>发现三角褐指藻中存在 aCRY(PtCPF1)受体,该受体不但可以感受蓝光信号,而且对红光信号也有响应。刘黎等<sup>[22]</sup>在研究底栖藻类群落总体的光适应模式时发现,包括三角褐指藻在内的 21 种硅藻在红光下生长得最快,这是由于红色光源可有效刺激硅藻中的光合系统,从而达到提高岩藻黄素含量的目的,这与 Valle 等<sup>[23]</sup>的研究结果一致。本研究小组

在实验中发现,蓝光处理组的岩藻黄素含量极显著降低,其原因可能是较短波长的光子(如波长为 460 nm 的蓝色)在其峰值电能下撞击光捕获复合物的概率要高得多,如此一来就为光合作用提供了过量的能量,但也不可避免地导致了光影响。藻类色素的合成受各种光感受器的调控,这些光感受器吸收不同波长的光<sup>[24]</sup>。对于藻类而言,叶绿素 a 是光合作用的物质基础,其含量会影响到藻细胞对光能的接收与转化,直接或间接参与三角褐指藻次生代谢产物(如岩藻黄素<sup>[25-26]</sup>)的生成。有研究表明,利用同化反演可由叶绿素 a 的浓度得到光合有效反应中心(RCs)的浓度,同时叶绿素 a 的浓度与藻类在 680 nm 处的光密度值具有良好的相关性<sup>[27]</sup>( $R^2 > 0.990$ ),因此三角褐指藻作为红光敏感型海洋微藻,在红光条件下藻细胞叶绿素分子被高效激活,从而加速了光合速率,促进藻细胞的繁殖,提高了岩藻黄素的积累量。

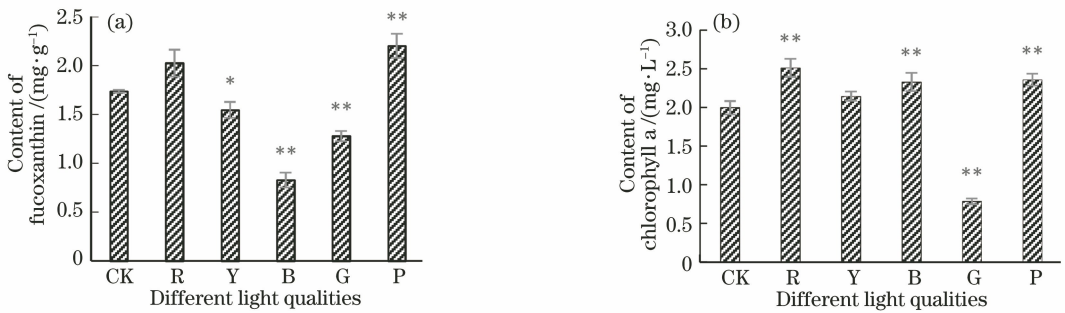


图 1 光质对三角褐指藻细胞岩藻黄素和叶绿素 a 含量的影响(CK 表示普通白光,R 表示红光,Y 表示黄光,B 表示蓝光,G 表示绿光,P 表示紫光,\* 表示显著性差异,\*\* 表示极显著差异)。(a)岩藻黄素;(b)叶绿素 a

Fig. 1 Effects of different monochromatic LED light qualities on the production of fucoxanthin and chlorophyll a in *Phaeodactylum tricornutum*. (CK: white light; R: red light; Y: yellow light; B: blue light; G: green light; P: purple light; \* indicates a significant difference,  $P < 0.05$ ; \*\* indicates an extremely significant difference,  $P < 0.01$ ). (a) Fucoxanthin; (b) chlorophyll a

### 3.2 光质对三角褐指藻叶绿素荧光参数的影响

本文研究了光质对三角褐指藻叶绿素荧光参数的影响,结果如表 2 所示。三角褐指藻藻细胞的 Y(II)、rETR<sub>max</sub>、 $\alpha$  在红光条件下都显著高于对照组( $P < 0.01$ ),表明三角褐指藻十分偏好红光,并且在红光作用下,三角褐指藻中的叶绿素可以有效地吸收红色,通过 RCs 提升 Y(II)、rETR<sub>max</sub>、光能利用效率等,最终有效促进 PSII 的光化学效率。在黄光、绿光、紫光条件下,三角褐指藻藻细胞的 Y(II)、qP、 $\alpha$  都显著高于对照组,其中黄光下藻细胞的 NPQ 值最低,比对照组降低了 63.45% ( $P < 0.01$ ),表明在黄光条件下,三角褐指藻藻细胞能很好地吸收黄光,且其产生的激子大部分被淬灭为光化学能而非热能,从而在很大程度上避免了光保护机制。

在蓝光处理下,三角褐指藻的 NPQ 值在所有处理组中是最高的,这是由于波长较短的蓝光是最具能量的光子,其产生的激子在 PSII 的 RCs 中已被淬灭成热能<sup>[28-29]</sup>,从而激发了三角褐指藻的光保护机制。

研究发现,由于红光比蓝光多 11 个光子数,因此等能量的红光引起的光化学反应效应大大高于蓝光<sup>[30]</sup>。在红光条件下,三角褐指藻藻细胞的 Y(II)、rETR<sub>max</sub>、 $\alpha$  为最佳,说明红光能很好地帮助三角褐指藻的叶绿素 a 完成对光能的吸收、传递与转换。此外,在红光、紫光条件下,三角褐指藻 PSII 的 RCs 开放程度显著提高,藻体中的天线色素岩藻黄素吸收的光能用于光化学反应电子传递的份额也增加<sup>[31-32]</sup>。由于红光在光合作用中激活了光系统的



表 2 不同 LED 单色光质对三角褐指藻各叶绿素荧光参数的影响

Table 2 Effects of different monochromatic LED light qualities on chlorophyll fluorescence parameter expression in *Phaeodactylum tricoratum*

Light quality	Y(II)	qP	NPQ	rETRmax	$\alpha$
CK	0.352±0.025 **	0.692±0.028	0.145±0.009	38.490±2.673	0.227±0.008
R	0.514±0.006 **	0.750±0.038	0.127±0.011	45.235±1.630 **	0.289±0.006 **
Y	0.503±0.013 **	0.555±0.025 *	0.053±0.005 **	34.083±1.210	0.259±0.007 **
B	0.393±0.006 **	0.713±0.016	0.152±0.004	37.566±1.291	0.265±0.004 **
G	0.511±0.011 **	0.669±0.024	0.082±0.018 **	35.083±1.765	0.237±0.004 *
P	0.485±0.007 **	0.593±0.051	0.063±0.010 **	39.138±1.840	0.245±0.005 **

Notes: \* represents  $P < 0.05$  and \*\* represents  $P < 0.01$

高效性,并加速了光合作用速率,因此导致叶绿素等细胞内含物合成代谢的增强和细胞分裂的加快。

### 3.3 光质对三角褐指藻光合作用相关基因表达的影响

采用 RT-qPCR 技术研究不同光质处理后三角褐指藻光合作用通路相关基因 *rbcL*、*fcpB*、*psaB*、*psbA* 的表达水平,结果如图 2 所示。可见,*rbcL* 基因在蓝光条件下的表达量极显著上升( $P < 0.01$ ),而在红、黄、绿、紫光条件下极显著下降( $P < 0.01$ ),其中红光条件下的表达量比之对照组下降了 81.83%,表明高能量的蓝光有助于三角褐指藻光合作用中的固碳反应,而红光则更有利于光合作用过程中将光能转换为光化能。

*fcpB* 基因参与合成的 Fcps 是三角褐指藻中重要的捕光天线。*fcpB* 基因在红、蓝、绿、紫光条件下的表达量极显著上升( $P < 0.01$ ),这与岩藻黄

素含量变化、叶绿素 a 含量变化有相似之处,其中红光条件下的表达量比之对照组提高了 5.4 倍,如图 2 (b)所示,这表明 *fcpB* 基因对红光条件敏感,并在其作用下能合成更多的细胞色素用于吸收传递光能。

*psbA* 基因和 *psaB* 基因分别与 PSII 反应中心蛋白 D1、PSI P700 叶绿素载脂蛋白的合成有关。图 2(c)、图 2(d)所示的 RT-qPCR 结果表明,PSII 和 PSI 相关基因表达趋势相反,在绿光条件下,*psaB* 基因的表达量极显著上升( $P < 0.01$ )。叶绿素 a 作为 PSII 中 RCs 的重要光合色素<sup>[28]</sup>,在绿光条件下的含量比之对照组下降了 60%,说明绿光在抑制叶绿素 a 合成的同时在一定程度上对 PSII 造成了光抑制。

Zhang 等<sup>[33]</sup>通过相关分析证实了植物中的 PSII 和 PSI 活性在日常变化和季节变化之间确实

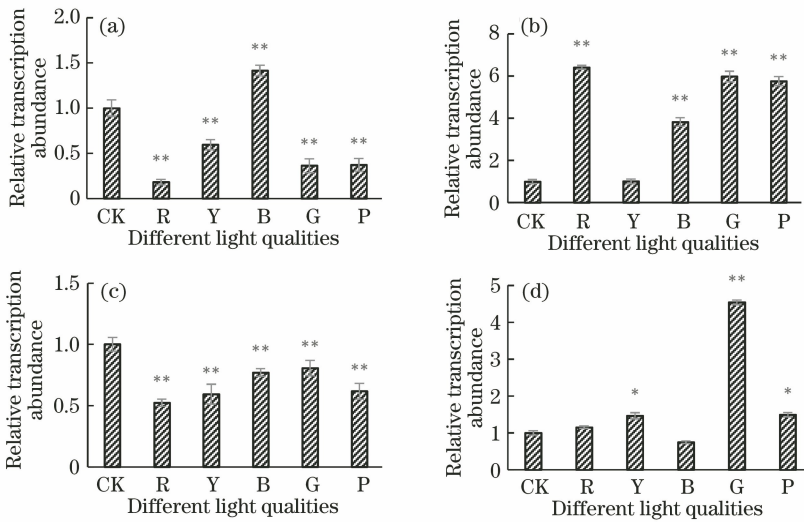


图 2 不同光质处理后三角褐指藻光合作用相关基因转录的差异(\*表示显著性差异,  $P < 0.05$ ; \*\*表示极显著差异,  $P < 0.01$ )。(a) *rbcL*; (b) *fcpB*; (c) *psbA*; (d) *psaB*

Fig. 2 Transcript levels induced by different light qualities in *Phaeodactylum tricoratum* (\* indicates a significant difference,  $P < 0.05$ ; \*\* indicates an extremely significant difference,  $P < 0.01$ ). (a) *rbcL*; (b) *fcpB*; (c) *psbA*; (d) *psaB*

存在显著的负线性相关。来自 PSII 的电子流对 PSI 的光抑制有着至关重要的作用<sup>[34]</sup>。为保护 PSI 免受光抑制作用可通过下调 PSII 的活性来限制从 PSII 到 PSI 的电子运输<sup>[35]</sup>,此外可通过促进围绕 PSI 的循环电子运输(CET)来增加 PSI 的活性并保护 PSII 免受光抑制<sup>[36]</sup>,因此 PSII 和 PSI 的相互作用强烈。在不同的光质条件下,*psbA* 基因表达水平都呈下调趋势,而 *psaB* 基因在绿光条件下的表达量极显著上升( $P < 0.01$ )。Johnson 等<sup>[37]</sup>通过研究发现小球藻 PSII 的 RCs 能量捕获与光合叶绿素的荧光产率呈反比关系。Cho 等<sup>[38]</sup>的研究结果表明,*psaB* 和 *psbA* 基因相互独立,且都可起到调控海洋微藻生长发育的作用,结合 *rbcL* 基因等其他分子数据将会更具分析依据。

### 3.4 三角褐指藻光合相关参数与岩藻黄素含量的相关性分析

本文通过 Pearson 分析研究了岩藻黄素含量与叶绿素荧光参数、光合作用基因表达的相关性,结果如表 3 所示。可见:岩藻黄素含量与 rETRmax(相关系数为 0.539,  $P < 0.05$ )、*fcpB* 基因(相关系数为 0.580,  $P < 0.05$ )呈显著正相关,说明相对电子传递速率与叶绿素-岩藻黄素复合体基因的调控对岩藻

黄素含量有直接影响;叶绿素 a、Y(II)系数大于 0.1<sup>[39]</sup>,表明它们与岩藻黄素含量的相关性为中等;岩藻黄素含量与 *rbcL* 基因表达(相关系数为 -0.650,  $P < 0.01$ )呈显著负相关,说明 *rbcL* 基因作为光合作用碳反应关键酶合成基因,对岩藻黄素的合成有负反馈作用;qP、NPQ、*psbA* 系数的绝对值大于 0.1<sup>[39]</sup>,与岩藻黄素含量的相关性呈中等负相关; $\alpha$  和 *psaB* 的相关系数小于 0.1,表明这两个参数与岩藻黄素含量无明显的相关性。

在生理水平上,当光作用于藻体类囊体膜上时,光能在放氧复合体、捕光复合体中通过裂解水分子产生的电子依次经过 PSII、Cyt b6f 和 PSI,最后传递给 NADP 形成 NADPH,促进光合产物的生成。在分子水平上,*fcpB* 基因调控叶绿素-岩藻黄素复合体的生成,在不同光质的刺激下合成更多的岩藻黄素并积累。

此外,岩藻黄素属于光合作用的次生代谢产物,参与光合作用的 PSII。结合相关性分析发现,不同光质条件下岩藻黄素含量的变化趋势与 *psbA* 基因表达水平不一致,且两者呈负相关性,说明岩藻黄素作为辅助天线,其激发能并不是直接通过电子传递链作用于 PSII 中的 RCs。

表 3 三角褐指藻岩藻黄素含量与叶绿素荧光参数、光合作用相关基因的相关性分析

Table 3 Correlation analysis of fucoxanthin content with chlorophyll fluorescence parameters and photosynthesis-related genes in *Phaeodactylum tricoratum*

Item	Fucoxanthin	Chlorophyll a	Y(II)	qP	NPQ	rETRmax	$\alpha$	<i>rbcL</i>	<i>fcpB</i>	<i>psbA</i>	<i>psaB</i>
Fucoxanthin	1										
Chlorophyll a	0.352	1									
Y(II)	0.310	-0.152	1								
qP	-0.188	0.007	-0.148	1							
NPQ	-0.257	0.293	-0.715**	0.677**	1						
rETRmax	0.539*	0.636**	0.047	0.444	0.377	1					
$\alpha$	0.004	0.502*	0.472*	0.396	0.097	0.511*	1				
<i>rbcL</i>	-0.650**	-0.650**	0.055	-0.147	0.406	-0.449	-0.397	1			
<i>fcpB</i>	0.580*	-0.145	0.050	-0.410	0.010	-0.410	-0.551*	-0.145	1		
<i>psbA</i>	-0.431	-0.431	-0.473*	0.096	0.438	-0.470*	-0.744**	0.675**	0.418	1	
<i>psaB</i>	0.007	0.007	-0.858**	-0.171	-0.598**	-0.431	-0.259	-0.462	-0.281	0.033	1

Notes: \* represents  $P < 0.05$  and \*\* represents  $P < 0.01$ ;  $n = 18$

## 4 结 论

在生理水平上,红光和紫光均能促进三角褐指藻细胞内岩藻黄素含量的提升,同时红、蓝、紫光对其叶绿素 a 的合成有着显著的促进作用。结合各荧光参数来看,三角褐指藻的 NPQ 值在蓝光作用下最高,不利于藻体的光保护色素岩藻黄素的合成;三

角褐指藻中的叶绿素 a、岩藻黄素可以有效地吸收红色,并通过光系统中的 RCs 提升电子传递速率、光合效率等。

在分子水平上,蓝光能促进光合作用碳反应相关基因 *rbcL* 的表达,红光能促进三角褐指藻重要捕光天线 FcpS 复合体 *fcpB* 基因的表达。不同光质条件下光系统 I、II 相关基因 *psaB* 和 *psbA* 的表达

无相关性,且作为光系统 II 辅助色素的岩藻黄素与两者无显著相关性,说明三角褐指藻岩藻黄素含量不仅受光合作用电子传递速率、实际光合效率的影响,还与个别光合相关基因(如 *fcpB*)的调控有关,部分光系统蛋白合成基因的表达则因受到各自启动子强弱或功能表达的差异,而与岩藻黄素含量的趋势呈不一致的上调或下调。

## 参 考 文 献

- [1] Falkowski P. The global carbon cycle: a test of our knowledge of earth as a system[J]. *Science*, 2000, 290(5490): 291-296.
- [2] Cahoon L B, Safi K A. Distribution and biomass of benthic microalgae in Manukau Harbour, New Zealand[J]. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 2002, 36(2): 257-266.
- [3] Fernández F G A, Pérez J A S, Sevilla J M F, et al. Modeling of eicosapentaenoic acid (EPA) production from *Phaeodactylum tricorutum* cultures in tubular photobioreactors. Effects of dilution rate, tube diameter, and solar irradiance[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2000, 68(2): 173-183.
- [4] Ye L, Jiang X M, Mao X X, et al. Effects of temperature, light intensity and salinity on the growth, total lipid and fatty acid of *Phaeodactylum tricorutum* mutant[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2015, 34(2): 454-462.  
叶丽, 蒋霞敏, 毛欣欣, 等. 温、光、盐对三角褐指藻紫外诱变株生长、总脂及脂肪酸的影响[J]. *生态学杂志*, 2015, 34(2): 454-462.
- [5] Alipanah L, Winge P, Rohloff J, et al. Molecular adaptations to phosphorus deprivation and comparison with nitrogen deprivation responses in the diatom *Phaeodactylum tricorutum* [J]. *PLoS One*, 2018, 13(2): e0193335.
- [6] Nagao R, Ueno Y, Yokono M, et al. Effects of excess light energy on excitation-energy dynamics in a pennate diatom *Phaeodactylum tricorutum* [J]. *Photosynthesis Research*, 2019, 141(3): 355-365.
- [7] Jeffrey S W, Vesik M. Effect of blue-green light on photosynthetic pigments and chloroplast structure in the marine diatom *Stephanopyxis turris* [J]. *Journal of Phycology*, 1977, 13(3): 271-279.
- [8] Kim S M, Jung Y J, Kwon O N, et al. A potential commercial source of fucoxanthin extracted from the microalga *Phaeodactylum tricorutum* [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 166 (7): 1843-1855.
- [9] Ghosh S, Roscioli J, Frank H, et al. Femtosecond heterodyne transient grating spectroscopy of nonradiative decay in  $\beta$ -carotene and peridinin: contributions of dark intermediates and double quantum coherences [C] // *Bulletin of the American Physical Society*. March 2015, Ann arbor, Michigan, USA. Boston: APSNews, 2015, 60: 1.
- [10] Frank H A, Cogdell R J. Carotenoids in photosynthesis [J]. *Photochemistry and Photobiology*, 1996, 63(3): 257-264.
- [11] Silsbe G M, Oxborough K, Suggett D J, et al. Toward autonomous measurements of photosynthetic electron transport rates: an evaluation of active fluorescence-based measurements of photochemistry [J]. *Limnology and Oceanography: Methods*, 2015, 13(3): e10014.
- [12] Wu X J, Niu J F, Huang A Y, et al. Selection of internal control gene for expression studies in *Porphyra haitanensis* (rhodophyta) at different life-history stages [J]. *Journal of Phycology*, 2012, 48 (4): 1040-1044.
- [13] Sjollem S B, van Beusekom S A M, van der Geest H G, et al. Laboratory algal bioassays using PAM fluorometry: effects of test conditions on the determination of herbicide and field sample toxicity [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2014, 33(5): 1017-1022.
- [14] Song Y Q, Jin C Y, Hu W F, et al. The effect of nitrogen supply on the growth and cell chemical composition of *Dunaliella salina* [J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2017, 26(2): 268-274.
- [15] Zhu S Q, Gong Y F, Liu H, et al. Effects of ammonium cerous sulfate on fucoxanthin content in *Phaeodactylum tricorutum* and research of transcriptional differences [J]. *Journal of the Chinese Society of Rare Earths*, 2014, 32(6): 750-757.  
朱帅旗, 龚一富, 刘浩, 等. 硫酸铈铵对三角褐指藻岩藻黄素含量的影响及转录差异研究 [J]. *中国稀土学报*, 2014, 32(6): 750-757.
- [16] Xu R J, Gong Y F, Chen W T, et al. Effects of LED monochromatic light quality of different colors on fucoxanthin content and expression levels of related genes in *Phaeodactylum tricorutum* [J]. *Acta Optica Sinica*, 2019, 39(9): 0917001.  
徐润洁, 龚一富, 陈文婷, 等. 不同发光二极管单色光质对三角褐指藻中岩藻黄素含量及相关基因表达的影响 [J]. *光学学报*, 2019, 39(9): 0917001.
- [17] Li H S. Principle and technology of plant physiological and biochemical experiments [M]. Beijing: Higher Education Press, 2000: 134-136.  
李合生. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 134-136.
- [18] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene

- expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [19] Han Z G, He L J, Gu J G, et al. Photosynthetic performance of *Cladophora fascicularis* during its dehydration and rehydration[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2005, 24(11): 1291-1294.  
韩志国, 贺立静, 顾继光, 等. 束生刚毛藻脱水 and 复水过程中光合作用的变化[J]. *生态学杂志*, 2005, 24(11): 1291-1294.
- [20] Wang S, Verma S K, Hakeem Said I, et al. Changes in the fucoxanthin production and protein profiles in *Cylindrotheca closterium* in response to blue light-emitting diode light[J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17: 110-122.
- [21] Takahashi F. Blue-light-regulated transcription factor, *Aureochrome*, in photosynthetic stramenopiles[J]. *Journal of Plant Research*, 2016, 129(2): 189-197.
- [22] Liu L, He X Y, Fu J K, et al. Benthic diatom communities in the main stream of Three Gorges reservoir area and its relationship with environmental factors[J]. *Environmental Science*, 2019, 40(8): 3577-3587.  
刘黎, 贺新宇, 付君珂, 等. 三峡水库干流底栖硅藻群落组成及其与环境因子的关系[J]. *环境科学*, 2019, 40(8): 3577-3587.
- [23] Valle K C, Nymark M, Aamot I, et al. System responses to equal doses of photosynthetically usable radiation of blue, green, and red light in the marine diatom *Phaeodactylum tricoratum* [J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114211.
- [24] Ma R, Lu F, Bi Y H, et al. Effects of light intensity and quality on phycobiliprotein accumulation in the *Cyanobacterium Nostoc sphaeroides Kützing* [J]. *Biotechnology Letters*, 2015, 37(8): 1663-1669.
- [25] Qiao H J, Cong C, Sun C X, et al. Effect of culture conditions on growth, fatty acid composition and DHA/EPA ratio of *Phaeodactylum tricoratum* [J]. *Aquaculture*, 2016, 452: 311-317.
- [26] Fabrowska J, Messyas B, Szyling J, et al. Isolation of chlorophylls and carotenoids from freshwater algae using different extraction methods[J]. *Phycological Research*, 2018, 66(1): 52-57.
- [27] Chen S, Yin G F, Zhao N J, et al. Analysis of phytoplankton concentration of functional reaction centers based on fluorescence dynamics parameters [J]. *Acta Optica Sinica*, 2018, 38(6): 368-374.  
陈双, 殷高方, 赵南京, 等. 基于荧光动力学参数的浮游植物有效光合反应中心浓度分析[J]. *光学学报*, 2018, 38(6): 368-374.
- [28] Jungandreas A, Schellenberger Costa B, Jakob T, et al. The acclimation of *Phaeodactylum tricoratum* to blue and red light does not influence the photosynthetic light reaction but strongly disturbs the carbon allocation pattern [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e99727.
- [29] Niizawa I, Heinrich J M, Irazoqui H A. Modeling of the influence of light quality on the growth of microalgae in a laboratory scale photo-bio-reactor irradiated by arrangements of blue and red LEDs [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2014, 90: 214-223.
- [30] Wu H Y. Effect of different light qualities on growth, pigment content, chlorophyll fluorescence, and antioxidant enzyme activity in the red alga *Pyropia haitanensis* (bangiales, rhodophyta) [J]. *BioMed Research International*, 2016, 2016: 1-8.
- [31] Kohzuma K, Froehlich J E, Davis G A, et al. The role of light-dark regulation of the chloroplast ATP synthase [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1248-1262.
- [32] Xie Y, Tilstone G H, Widdicombe C, et al. Effect of increases in temperature and nutrients on phytoplankton community structure and photosynthesis in the western English Channel [J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2015, 519: 61-73.
- [33] Zhang D, Zhang Q S, Yang X Q, et al. The alternation between PSII and PSI in ivy (*Hedera nepalensis*) demonstrated by *in vivo* chlorophyll a fluorescence and modulated 820 nm reflection [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, 108: 499-506.
- [34] Huang W, Yang Y J, Zhang J L, et al. PSI photoinhibition is more related to electron transfer from PSII to PSI rather than PSI redox state in *Psychotria rubra* [J]. *Photosynthesis Research*, 2016, 129(1): 85-92.
- [35] Nishiyama Y, Murata N. Revised scheme for the mechanism of photoinhibition and its application to enhance the abiotic stress tolerance of the photosynthetic machinery [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(21): 8777-8796.
- [36] Kuhlert S, Austic G, Zegarac R, et al. MultispeQ Beta: a tool for large-scale plant phenotyping connected to the open PhotosynQ network [J]. *Royal Society Open Science*, 2016, 3(10): 160592.
- [37] Johnson X, Steinbeck J, Dent R M, et al. Proton gradient regulation 5-mediated cyclic electron flow under ATP- or redox-limited conditions: a study of  $\Delta$ ATPase pgr5 and  $\Delta$ rbcL pgr5 mutants in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Plant*



- Physiology, 2014, 165(1): 438-452.
- [38] Cho G Y, Lee S H, Boo S M. A new brown algal order, *Ishigeales* (*Phaeophyceae*), established on the basis of plastid protein-coding *rbcL*, *psaA*, and *psbA* region comparisons[J]. Journal of Phycology, 2004, 40(5): 921-936.
- [39] Barrett K C, Morgan G A, Leech N L. IBM SPSS for intermediate statistics [M] // SPSS for introductory and intermediate statistics: IBM SPSS for intermediate statistics use and interpretation. New York: Routledge, 2011: 65-67.