

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

徐润洁¹, 龚一富^{1*}, 陈文婷¹, 李申睿¹, 陈若莹¹, 郑小恽¹, 陈璇木子¹, 王何瑜²

¹ 宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315832;

² 宁波大学食品与药学院, 浙江 宁波 315832

摘要 研究了发光二极管(LED)单色光质对三角褐指藻细胞生长、岩藻黄素含量及岩藻黄素生物合成相关基因表达的影响。实验结果表明:红光、绿光、紫光可以促进三角褐指藻的生长,在红光处理下,第6天的藻细胞数与对照组相比极显著上升($P < 0.01$),增加了12.44%;黄光、蓝光对三角褐指藻的生长均有抑制作用;经绿光、紫光处理后,藻细胞的衰老速度比对照组快;用红光、紫光处理三角褐指藻,其岩藻黄素含量有所增加,与对照组相比分别增加了16.61%和26.78%;蓝光、绿光处理后的岩藻黄素含量与对照组相比极显著降低($P < 0.01$),这与光合作用相关的色素指标——叶绿素a的含量变化基本一致。岩藻黄素生物合成相关基因表达的结果表明:在玉米黄素环氧酶基因(zep)、八氢番茄红素合成酶基因(psy)、 ξ -胡萝卜素脱氢酶基因(zds)、番茄红素 β -环化酶基因(lcyb)、胡萝卜素异构酶基因(crtiso)和八氢番茄红素脱氢酶基因(pds)这6个基因中,关键基因psy的表达量与岩藻黄素含量的变化基本一致;在红光处理下,pds、lcyb的表达量显著上调。在不同光质处理下,三角褐指藻中岩藻黄素的生物合成可以由岩藻黄素生物合成相关基因表达来实现,而且还可能与光合作用有关。

关键词 生物光学; 光质; 三角褐指藻; 岩藻黄素; 基因表达; 生物合成

中图分类号 Q682

文献标识码 A

doi: 10.3788/AOS201939.0917001

Effects of LED Monochromatic Light Quality of Different Colors on Fucoxanthin Content and Expression Levels of Related Genes in *Phaeodactylum Tricornutum*

Xu Runjie¹, Gong Yifu^{1*}, Cheng Wenting¹, Li Shenrui¹, Chen Ruoying¹,
Zheng Xiaoyun¹, Cheng Xuanmuzi¹, Wang Heyu²

¹ School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo, Zhejiang 315832, China;

² Colleng of Food and Pharmaceutical Sciences, Ningbo University, Ningbo, Zhejiang 315832, China

Abstract The effects of LED monochromatic light quality of different colors on the growth of phaeodactylum tricornutum cells, their fucoxanthin content, and the expression levels of genes related to fucoxanthin biosynthesis are investigated. The results show that red light, green light, and purple light promote the growth of phaeodactylum tricornutum cells. In addition, the number of algal cells significantly increases by 12.44% on the 6th day under red light treatment ($P < 0.01$) compared with that in the control group. Yellow light and blue light inhibit the growth of phaeodactylum tricornutum cells, and the aging rate of algal cells under green light and purple light treatments is higher than that in the control group. Compared with the control group, the fucoxanthin content of phaeodactylum tricornutum treated with red light and purple light increases by 16.61% and 26.78%, respectively, and that of phaeodactylum tricornutum treated with blue light and green light significantly reduces ($P < 0.01$). The changes in chlorophyll and fucoxanthin content, which are related to photosynthesis, are basically the same under all treatments. Evaluation of the expression levels of genes related to fucoxanthin biosynthesis shows that among zeaxanthin cyclooxygenase gene (zep), phytoene synthase gene (psy), ξ -carotene dehydrogenase gene (zds), lycopene β -cyclase gene (lcyb), carotene isomerase gene (crtiso), and phytoene dehydrogenase gene (pds), the expression level of the key gene psy, is consistent with the change in the fucoxanthin content, whereas the

收稿日期: 2019-02-20; 修回日期: 2019-04-11; 录用日期: 2019-05-05

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

* E-mail: gongyifu@163.com

expression levels of *pds* and *lcyb* are significantly upregulated under red light treatment. Therefore, fucoxanthin biosynthesis in *phaeodactylum tricornutum* under treatments with light quality of different colors is indicated by the expression levels of genes related to fucoxanthin biosynthesis, and it is possibly related to photosynthesis.

Key words biotechnology; light quality; *phaeodactylum tricornutum*; fucoxanthin; gene expression; biosynthesis

OCIS codes 170.6280; 300.6550; 350.7420

1 引 言

岩藻黄素,也称岩藻黄质或褐藻素,是胡萝卜素的含氧衍生物,属于类胡萝卜素中的叶黄素类。天然的岩藻黄素主要存在于海洋无脊椎动物和具有光合作用的藻类中,尤其在褐藻和硅藻中含量丰富。除了胡萝卜素外,岩藻黄素是最丰富的藻类类胡萝卜素^[1]。岩藻黄素在药理活性方面具有一定的潜在价值,有报道称岩藻黄素具有抗炎、抗肿瘤、抗肥胖、降血脂、抗氧化等作用^[2-3],这些药用功能使其在食品、医疗、美容等领域具有广阔的应用前景。随着人们生活水平的不断提高和饮食结构的逐渐变化,肥胖、心脑血管病等重大疾病越来越趋于年轻化,导致人们对岩藻黄素的需求量剧增。

目前在自然界中只发现褐藻、金藻和硅藻中含有岩藻黄素。由于岩藻黄素资源稀缺,加之生产提取技术不成熟,导致其售价昂贵。目前,岩藻黄素的产量已不能满足日益增长的临床需要和保健需要。国内对岩藻黄素的研究主要在提取、分离纯化技术等方面,而国外则主要针对其生物活性功能等进行了研究。因此,通过多种途径来增加藻类中岩藻黄素的积累,并通过分子手段干预岩藻黄素的生物合成,可为今后岩藻黄素的增产提供研究基础。

三角褐指藻属硅藻门,羽纹藻纲,褐指藻目,褐指藻科,褐指藻属,是一种单细胞海洋硅藻,具有生长繁殖快、容易人工培养等特点,且富含较高的岩藻黄素^[4]。海洋藻类的生长和发育会受光照、营养、温度和盐度等因素的影响,其中光照对海藻生长发育的影响最为重要。光是植物进行光合作用的首要动力,而光具有光质、光强、光周期等3种重要属性。光线入水后,光照强度会随着水深的增加而降低,而且光波的组成也会发生变化,所以海水环境中的藻体分布主要受光质和光强的影响。常见的白色太阳光实际上是由红(R)、橙、黄(Y)、绿(G)、蓝(B)、靛、紫(P)这7种单色光组成的,该顺序是根据不同单色光波长的长短来排列的。光质作为光的重要属性也可以看作是光的波长,不同波长的单色光在植物生长发育过程中起着至关重要的作用,除了参与光合作用外,不同波长的单色光还可以作为一种触发

信号影响植物的生长。臧正蓉^[5]分别用红光(647~700 nm)、蓝光(470~475 nm)、绿光(491~574 nm)对三角褐指藻进行处理后发现:在红光条件下,三角褐指藻的生长状况最好,岩藻黄素的含量最高。负责收集硅藻中光合作用光能的色素主要包括叶绿素(Chl)a和c以及与岩藻黄素-叶绿素a/c天线蛋白(FCP)结合的类胡萝卜素岩藻黄素。虽然叶绿素可以吸收光合有效辐射(PAR)光谱的蓝色(400~500 nm)和红色(600~700 nm)波段的光,但其主要负责硅藻光合作用的色素——岩藻黄素在绿色区域(500~570 nm)内有吸收光的能力^[6]。

随着发光二极管(LED)制造技术的革新和生产成本的下降,LED凭借其体积小、效率高、寿命长、光谱可控等优点^[7]取代了传统光源成为植物照明的首选光源,且越来越多地被应用于植物组织的培养中。臧正蓉^[5]的研究表明,红光有利于植物叶片类胡萝卜素和花色素苷的生成。罗娅婷等^[8]利用不同的光质来萌发四方蒿种子,并发现四方蒿种子在红光条件下萌发率(84.7%)最高。此外,刘媛等^[9]在葡萄叶片愈伤组织增殖的研究中发现:在不添加肉桂酸时,黄光最利于愈伤组织的增殖;当肉桂酸与光质共同作用时,绿光最适合愈伤组织的增殖,黄光对愈伤组织的生长效应明显减弱。因此,合理的人工补光带来的经济效益也逐渐凸显出来,许多研究人员也纷纷利用人工补光这种便捷环保的方式来提高海洋藻类生物的合成产量。Zhao等^[10]利用红、黄、蓝LED单色光对微藻进行处理后发现,红光有利于微藻的生长,且在红光条件下微藻产生的沼气的量最多,消耗的营养物质最少。韩军军等^[11]利用白、红、绿、蓝光处理坛紫菜后发现,蓝光能提高坛紫菜的生长速率,且与对照组相比藻体增重1.1倍。本文利用红、黄、蓝、绿、紫5种LED单色光对三角褐指藻进行处理,以探究三角褐指藻中岩藻黄素含量及相关合成基因的变化,为提高海洋硅藻三角褐指藻的次生代谢产物以及拓展海洋药物的研究方向提供理论依据。

2 材料与方 法

2.1 三角褐指藻的培养及处理

所用三角褐指藻由宁波大学应用海洋生物技术

重点实验室提供,将细胞密度为 10^5 mL^{-1} 的三角褐指藻接种到 f/2 培养液中^[12],并置于光照强度为 $63 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、明暗周期为 12 h:12 h、培养温度为 $(25 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ 的光照培养箱内扩大培养^[13]。每日定时摇藻 3~4 次,不停地更换位置,以防止藻体光照不均。培养至第 5 天时,三角褐指藻细胞生长达到对数期,使用灯头型号为 T8、灯管长度为 1.2 m 的红 (620~660 nm)、黄 (560~590 nm)、蓝 (470~480 nm)、绿 (520~530 nm)、紫 (400~420 nm) LED 单色灯 (中山浦田照明电器有限公司) 对三角褐指藻进行光质处理,培养条件如下:光照强度为 $63 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,明暗周期为 12 h:12 h,培养温度为 $(25 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ 。以普通白光为对照 (CK) 组,每组 3 个平行试样。

2.2 三角褐指藻生长曲线的测定

取生长至对数期的三角褐指藻 5 mL,按倍数比稀释后用 UV-5200 型紫外分光光度计 (上海元析仪器有限公司) 测取其在 680 nm 处的吸光度 (A_{680}),同时用血球计数法计算各稀释组中三角褐指藻的细胞密度,绘制标准生长曲线。从实验处理开始,每日取藻液测定 680 nm 处的吸光度 (A_{680}),并根据标准曲线回归公式换算成细胞数,即

$$y = 124.14x - 9.5138, \quad (1)$$

式中: y 为细胞密度 (10^5 mL^{-1}); x 为吸光值; R 为相关系数, $R^2 = 0.9983$ 。

2.3 三角褐指藻中岩藻黄素的提取及含量测定

采用有机溶剂提取法,在三角褐指藻生长进入平台期后进行岩藻黄素的提取及含量测定,每组设 3 个生物学重复。准确量取 80 mL 三角褐指藻藻液,在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下以 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的转速离心 10 min,弃上清液,冷冻干燥 2 d,称重,研磨成粉约 0.1 g。

将藻粉加入无水乙醇中,使料液比为 1 g:40 mL, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 下避光浸提,浸提两次,每次 1 h。浸提后将藻液以 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的转速离心 10 min,取上清液,利用紫外分光光度计在 445 nm 处测定吸光度 (A_{445})。岩藻黄素的含量可以表示为

$$D = (1000 \times A_{445} \times N \times V) / (A' \times M \times 100), \quad (2)$$

式中: D 为岩藻黄素的含量,单位为 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$; A_{445} 为岩藻黄素在 445 nm 处的吸光度; N 为稀释倍数; V 为粗提取液的体积; A' 为在 1 cm 光程长的比色杯中体积分数为 1% 的溶质的理论吸收值,其值为 1600; M 为样品质量。

根据已测得的三角褐指藻细胞生长数和岩藻黄

素含量,可计算出在不同光质处理下三角褐指藻中单位细胞岩藻黄素含量 (6 d)。

2.4 三角褐指藻叶绿素含量的测定

取 10 mL 混合均匀的三角褐指藻藻液,在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下以 $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的转速离心 10 min,弃上清液,用双蒸水冲洗沉淀 2 次,然后加入 10 mL 无水乙醇,混匀,黑暗处理 24 h 后,再以 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的转速离心 10 min,取上清液,利用紫外分光光度计测定提取液在 A_{665} 、 A_{649} 处的吸光值,提取液中的叶绿素 a 的浓度可根据李合生^[14] 公式计算,即

$$C_a = 13.95 \times A_{665} - 6.88 \times A_{649}, \quad (3)$$

式中: C_a 为叶绿素 a 的质量浓度; A_{665} 为叶绿素在 665 nm 处的吸光度; A_{649} 为叶绿素在 649 nm 处的吸光度。

2.5 三角褐指藻中总核糖核酸 (RNA) 的提取及岩藻黄素相关合成通路基因表达的分析

取 80 mL 三角褐指藻藻液,在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下以 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的转速离心 10 min,弃上清液收集藻泥,而后利用试剂盒 (Plant RNA Kit, OMEGA) 分别提取经不同光质处理的三角褐指藻的总 RNA,并于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 下保存备用。

采用 Takara PrimeScript RT Reagent Kit (Prefactory Real Time) (Takara, China) 对总 RNA 进行反转录,并作为实时荧光定量多聚核苷酸链式反应 (RT-qPCR) 检测的模板。

根据美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 提供的三角褐指藻中岩藻黄素生物合成代谢通路相关的已知核心序列,找出玉米黄素环氧酶基因 (zep)、八氢番茄红素合成酶基因 (psy)、 ξ -胡萝卜素脱氢酶基因 (zds)、番茄红素 β -环化酶基因 (lcyb)、胡萝卜素异构酶基因 (crtiso) 和八氢番茄红素脱氢酶基因 (pds) 6 个基因,设计特异性引物,引物序列参考朱帅旗等^[13] 的研究结果。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。以 β -actin 基因作为管家基因。目的基因和参照基因的反应体系和反应程序相同。反应体系包括 $10 \mu\text{L}$ SYBR Premix Ex TaqTM (2 \times)、 $0.8 \mu\text{L}$ 上游引物、 $0.8 \mu\text{L}$ 下游引物、 $6.4 \mu\text{L}$ 超纯水、 $2 \mu\text{L}$ 模板,共计 $20 \mu\text{L}$ 。每组样品重复 3 次。反应程序如下: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 3 min,40 轮扩增循环 ($94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 30 s, $53 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 20 s), $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 10 min, $16 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。运用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[15] 对荧光定量结果进行分析。其中, C_t 为扩增曲线达到阈值时的循环圈数, ΔC_t 为组间管家基因 β -actin 的差值; $\Delta\Delta C_t$ 为在此基础上再进行两个处理

组之间的比值所形成的差异表达倍数。以 LED 灯的 6 种波长为变量,利用统计软件将 *zep*、*psy*、*zds*、*lcyb*、*crtiso* 和 *pds* 6 个基因转录数据对岩藻黄素含量做主成分分析。

2.6 数据处理

采用 Microsoft Excel 2013 软件进行数据处理;采用 SPSS 22.0 软件进行主成分分析和显著性分析。以 $P < 0.05$ 作为显著差异 (*), $P < 0.01$ 作为极显著差异 (**)

3 结果分析及讨论

3.1 不同光质对三角褐指藻生长的影响

每天定时测定三角褐指藻在 680 nm 处的吸光值 (A_{680}),根据(1)式可得到各组三角褐指藻细胞的生长曲线。光质对三角褐指藻细胞生长变化趋势的影响如图 1 所示。由图 1 可知:三角褐指藻生长的对数期为第 1~5 天,平台期为第 5~6 天,第 6~7 天开始进入衰亡期,第 6 天的藻细胞数达到最大。

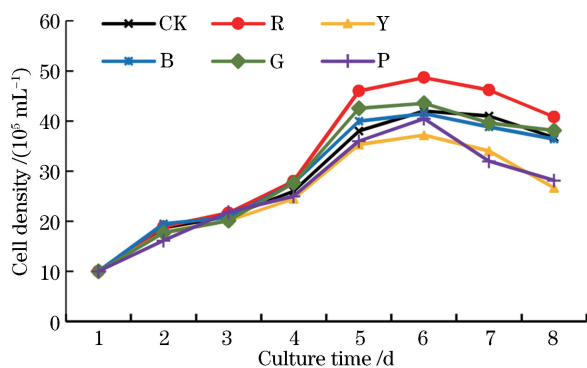


图 1 光质对三角褐指藻细胞生长变化趋势的影响

Fig. 1 Effects of different light qualities on cell growth trend of *phaeodactylum tricornutum*

图 2 给出了不同光质下第 6 天三角褐指藻的生长密度,可知:在红、绿、紫光处理下,三角褐指藻的细胞数相对于对照组呈上升趋势,在红光处理下的第 6 天,藻细胞数与对照组相比极显著上升 ($P < 0.01$),增加了 12.44%;在黄、蓝光处理下,三角褐指藻的藻细胞数相对于对照组呈下降趋势,藻细胞数分别减少了 14.11% 和 6.5%;当第 7 天进入衰老期后,绿、紫光处理下的藻细胞数减少的速度比对照组快。这说明不同的藻类存在着不同的光感受体, Takahashi 等^[16]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。庄树宏等^[17]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,属红光敏感

型,硅藻类群落总体生长对光照敏感度从高到低的顺序为红光、低光强、中光强、高光强、绿光、蓝光。此外,诸多研究表明,蓝光能抑制许多动植物和微生物的生长,并且会破坏细胞色素^[18]。其原因可能是较短波长的光子,即波长为 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,为光合成提供了大量的能量,从而不可避免地导致了光影响^[19]。另一方面,较长的波长,如红色和白色,可以避免光抑制,从而相对促进藻体生长^[20]。

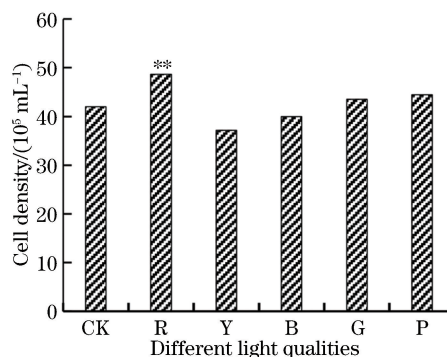


图 2 不同光质下第 6 天三角褐指藻的生长密度

Fig. 2 Growth density of *phaeodactylum tricornutum* on 6th day under different light qualities

3.2 不同光质对三角褐指藻中岩藻黄素含量的影响

光质对三角褐指藻中岩藻黄素含量的影响如图 3 所示,可知:红光、紫光处理下的三角褐指藻中岩藻黄素含量比对照组高,分别提高了 16.61% 和 26.78%,其中紫光下的岩藻黄素含量极显著升高 ($P < 0.01$),这表明红光和紫光的处理对岩藻黄素含量有提升作用;而在黄光处理下,岩藻黄素含量显著降低 ($P < 0.05$);在蓝光和绿光处理下,岩藻黄素含量极显著降低 ($P < 0.01$),较之对照组分别降低了 11.04%、52.37%、26.39%。不同光质处理下三角褐指藻的生物量在第 6 天达到最大值,根据已测得的三角褐指藻细胞生长数和岩藻黄素含量,可以计算出在不同光质处理下三角褐指藻中单位细胞岩藻黄素含量(6 d),如图 4 所示。由图 4 可知:在不同光质的处理下,三角褐指藻单位细胞产生的岩藻黄素含量变化与总岩藻黄素含量变化基本一致,在紫光处理下,岩藻黄素含量比对照组提升了 41.82% ($P < 0.01$);而蓝光、绿光处理会抑制岩藻黄素含量的提升 ($P < 0.01$)。这说明紫光能促进三角褐指藻细胞内岩藻黄素含量的积累,蓝光、绿光则会抑制三角褐指藻细胞内岩藻黄素含量的积累。

通过人工调节光源来提高藻类生物合成量的研究报道越来越多,光质对藻类的生长发育和形态变

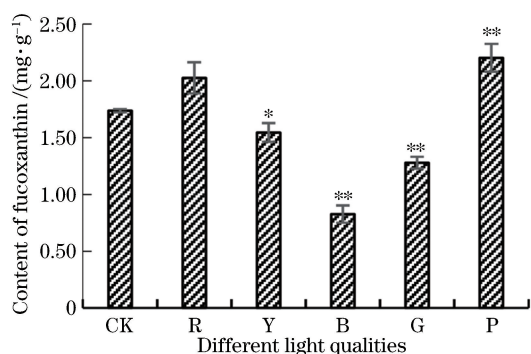


图3 光质对三角褐指藻中岩藻黄素含量的影响
Fig. 3 Effects of different light qualities on trend of fucoxanthin content in phaeodactylum tricoratum

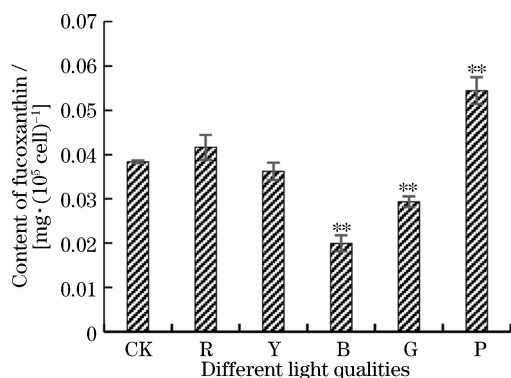


图4 不同光质下第6天三角褐指藻内单位细胞岩藻黄素的含量

Fig. 4 Unicellular fucoxanthin content of phaeodactylum tricoratum on 6th day under different light qualities

化等具有一定的调控作用,且多数生物合成过程都能通过改变光质来进行调节。其中,光质对藻体光合色素组成和结构的影响尤为明显,如斜生栅藻在红光下不仅生长快,且生长周期缩短,而且红光下细胞分裂和核分裂发生得较早^[21]。蓝光下条斑紫藻藻红蛋白和藻蓝蛋白的合成量明显高于其他光色^[22]。颜色环上任何两个对顶位置扇形中的颜色,互称为补色。当太阳光照射某物体时,某波长的光被物体吸取了,则物体显示的颜色(反射光)为该色光的补色。光谱中黄光(565~570 nm)的补色是紫光(380~440 nm),因此在紫光处理下岩藻黄素含量上升,而在黄光处理下岩藻黄素含量下降。天然岩藻黄素的吸收峰在450 nm附近^[23],接近绿光和蓝光波长,但岩藻黄素含量并没有在蓝光或绿光的处理下上升,而是在蓝绿色的补光——红光的处理下有所上升,该结果与补色效应相符。因此,通过本研究可认为单一的红光或紫光可提高三角褐指藻中岩藻黄素的含量,这与臧正蓉等^[24]的研究结果一致。

3.3 不同光质对三角褐指藻中叶绿素 a 含量的影响

光质对三角褐指藻中叶绿素 a 含量的影响如图5所示,可知:红、黄、蓝、紫光对三角褐指藻中叶绿素 a 的含量有促进作用,在这4种光质处理下,三角褐指藻中叶绿素 a 的含量比对照组高,在红、蓝、紫光处理下,叶绿素 a 的含量极显著上升($P < 0.01$),说明红、蓝或紫光可以有效促进三角褐指藻的光合作用,从而促进光合色素的积累;在绿光处理下,叶绿素 a 的含量与对照组相比降低了60.76% ($P < 0.01$),表明绿光对其有抑制作用。类胡萝卜素是光合作用的辅助色素,在光合作用中发挥着重要作用,其中岩藻黄素作为一种重要的类胡萝卜素^[25],参与到光合作用的光化学系统 II 中,并且能与叶绿素 a 组合形成一种重要的硅藻捕光天线——岩藻黄素-叶绿素 a 蛋白复合体(FCPs)^[26]。在光合作用中,绝大部分叶绿素的作用是吸收及传递光能,仅极少数叶绿素 a 起转换光能的作用^[27]。当岩藻黄素与类囊体膜结合将光质中的激发能通过叶绿素 a 传递给光合作用的电子传递链时^[26,28-29],光合效率就可以得到提升。

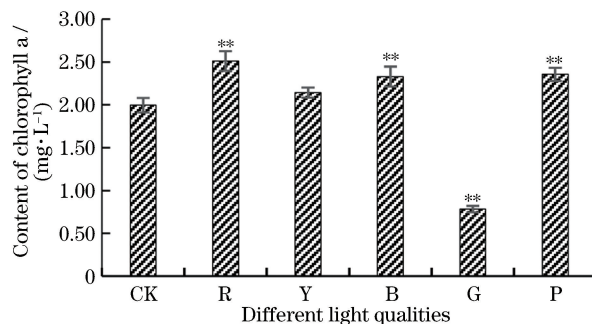


图5 光质对三角褐指藻中叶绿素 a 含量的影响
Fig. 5 Effects of different light qualities on content of chlorophyll a in phaeodactylum tricoratum

3.4 光质对三角褐指藻中岩藻黄素合成相关基因表达的影响及主成分分析

采用实时荧光定量多聚酶链式反应(RT-qPCR)技术研究不同光质处理下三角褐指藻中岩藻黄素生物合成代谢通路相关基因 *psy*、*pds*、*lcyb*、*zep*、*zds*、*crtiso* 的表达水平,结果如图6所示。 F 值表示模型中组间和组内的被解释变量与所有解释变量之间的线性关系在总体上的差异。

在红光处理下,*pds*、*lcyb* 基因的表达量显著上调,这与岩藻黄素含量在红光处理下的变化一致;在紫光处理下,*zep*、*zds*、*crtiso* 三个基因表达量有所上调,其中 *zds*、*crtiso* 表达量极显著上调($P < 0.01$),这与岩藻黄素在紫光处理下的变化一致;在蓝光处

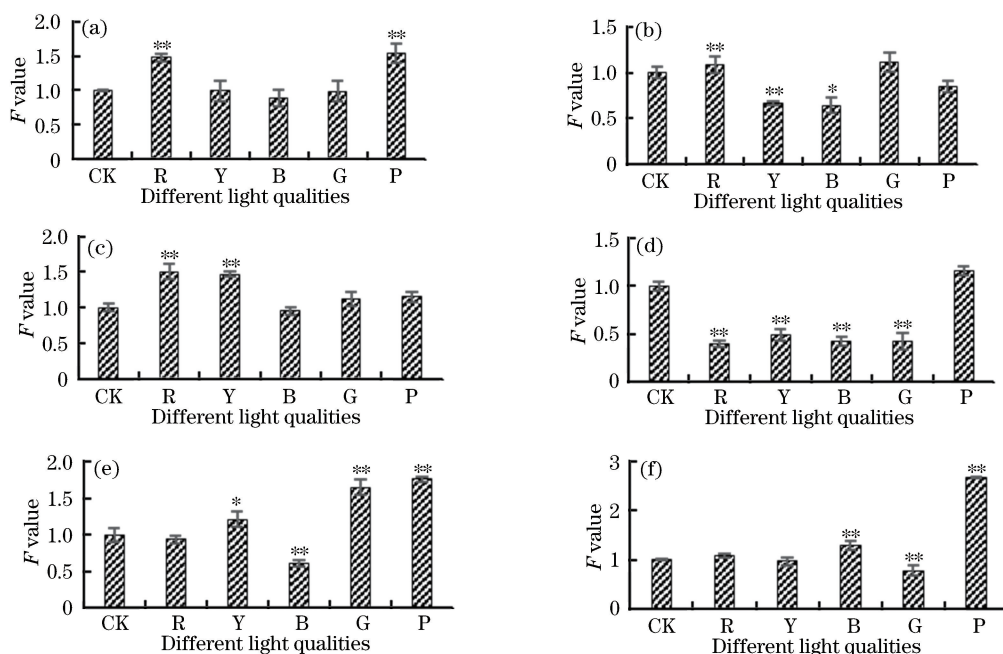


图 6 不同光质处理的三角褐指藻中各基因转录的差异。(a) psy; (b) pds; (c) lcyb; (d) zep; (e) zds; (f) crtiso

Fig. 6 Transcript differences of genes in phaeodactylum tricornutum treated with different light qualities.

(a) psy; (b) pds; (c) lcyb; (d) zep; (e) zds; (f) crtiso

理下, pds、zep、zds 三个基因表达量都有显著下调, 这与岩藻黄素含量在蓝光处理下的变化一致; 在黄光、绿光处理下, 6 个基因表达量都有不同的变化, 这表明在不同光质处理下, 与三角褐指藻中岩藻黄素合成相关的基因对不同波长的光有偏好性。其中, psy 基因的表达基本与岩藻黄素含量一致。表 1 所示的主成分(PC)分析结果表明, 与岩藻黄素合成相关的 6 个基因, 其表达量对岩藻黄素合成的贡献率不一, 但都呈显著相关。其中: PC1 为 psy 基因, 贡献率为 42.151%; PC2 为 psy、pds 基因, 累计贡献率为 68.505%; PC3 为 psy、pds 和 lcyb 基因, 累计贡献率为 86.258%; PC4 为 psy、pds、lcyb、zep 基因, 累计贡献率为 95.736%; PC5 为 psy、pds、lcyb、zep、zds 基因, 累计贡献率为 100%; PC6 为 psy、pds、lcyb、zep、zds、crtiso 基因, 累计贡献率为 100%。前 3 个主成分(psy 基因、pds 基因和 lcyb 基因转录水平)的累计贡献率为 86.258%, 这说明 psy 基因、pds 基因和 lcyb 基因对三角褐指藻细胞中岩藻黄素生物合成的贡献最大, 而 psy 基因的贡献率占 42.151%, 这也证明了 psy 是岩藻黄素合成通路中的关键基因^[30]。psy 普遍存在于植物体内, 被认为是植物中类胡萝卜素生物合成途径中的调节酶^[31]。Kaur 等^[32]通过微小核糖核酸(microRNA)来抑制 psy 信使核糖核酸(mRNA)水平, 从而降低了类胡萝卜素含量。Kadono 等^[33]的研究表明 psy

参与 2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸 (2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphate, MEP) 途径和类胡萝卜素生物合成途径, 因此在光环境下 psy 的转录水平有所上调^[34]。相关合成通路的基因表达在光合作用的协同下改变岩藻黄素的含量, 其中 psy 基因可以看作是调控岩藻黄素合成和光合作用相关生理的基因。

表 1 不同光质处理下三角褐指藻中岩藻黄素合成相关基因对岩藻黄素的累积贡献率

Table 1 Cumulative contribution rates of genes related to synthesis of fucoxanthin in phaeodactylum tricornutum under different light qualities

PC	Standard	Variance ratio / %	Accumulative proportion / %
1	2.529	42.151	42.151
2	1.581	26.354	68.505
3	1.065	17.753	86.258
4	0.569	9.478	95.736
5	0.256	4.264	100
6	1.933×10^{-16}	-3.222×10^{-15}	100

4 结 论

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, 而岩藻黄

素同时作为光保护色素和捕光色素,当叶绿素遭到破坏,会导致六氢蕃茄红素与八氢蕃茄红素的积累。因此,其含量的变化不仅受岩藻黄素生物合成相关基因的调控,也与光合能量代谢途径有关。

本研究发现红光能有效促进三角褐指藻细胞的生长,紫光和红光条件下三角褐指藻中岩藻黄素和叶绿素 a 的含量最高。同时,三角褐指藻中岩藻黄素合成的关键基因 *psy* 在紫光和红光条件下的表达量显著上调,说明三角褐指藻适合在 620~660 nm 和 400~420 nm 波长范围内生长,且具有较高的次生代谢产物的积累。不仅是岩藻黄素合成的相关基因在调控岩藻黄素含量的变化,光合作用也扮演着十分重要的角色。叶绿素吸收不同波长的光能再进行能量转换用于光合作用,通过光合作用促进三角褐指藻的生长,提高捕光天线的光捕效率,从而增加了岩藻黄素含量的积累。因此,岩藻黄素合成相关基因表达水平与生理水平不是简单的叠加效应,而是交叉效应。通过人工补光的方式来提高海洋药物岩藻黄素的含量,既便捷又环保,但不同的光质如何影响三角褐指藻光合作用的能量转换还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Dambek M, Eilers U, Breitenbach J, *et al.* Biosynthesis of fucoxanthin and diadinoxanthin and function of initial pathway genes in *Phaeodactylum tricorutum* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(15): 5607-5612.
- [2] Miyashita K, Nishikawa S, Beppu F, *et al.* The allenic carotenoid fucoxanthin, a novel marine nutraceutical from Brown seaweeds [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2011, 91(7): 1166-1174.
- [3] Peng J, Yuan J P, Wu C F, *et al.* Fucoxanthin, a marine carotenoid present in Brown seaweeds and diatoms: metabolism and bioactivities relevant to human health [J]. *Marine Drugs*, 2011, 9(10): 1806-1828.
- [4] 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.
- [5] Zang Z R. Screening and pilot scale cultivation of fucoxanthin-rich microalgae [D]. Beijing: Graduate School of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanography), 2014.
- [6] 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 tricorutum* [J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114211.
- [7] Chen H W, Wen S S, Ma B X, *et al.* Design of plant lighting LED lamp with freeform surface substrate based on light quantum theory [J]. *Acta Optica Sinica*, 2017, 37(2): 0222001.
陈浩伟, 文尚胜, 马丙戌, 等. 基于量子光学的植物照明用自由曲面底板 LED 光源设计 [J]. *光学学报*, 2017, 37(2): 0222001.
- [8] Luo Y T, Qiu Q W, Cui X L. Effects of light quality and seed size on seed germination of 14 species in Puer region [J/OL]. *Guihaia*. (2018-09-20) [2019-02-05]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1134.Q.20180918.1646.004.html>.
罗娅婷, 邱其伟, 崔现亮. 光质及种子大小对普洱地区 14 种植物种子萌发的影响 [J/OL]. *广西植物*. (2018-09-20) [2019-02-05]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1134.Q.20180918.1646.004.html>.
- [9] Liu Y, Li S, Ma S Y, *et al.* Effects of light quality on the growth and development of *in vitro* cultured grape plantlets [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2009, 36(8): 1105-1112.
刘媛, 李胜, 马绍英, 等. 不同光质对葡萄试管苗离体培养生长发育的影响 [J]. *园艺学报*, 2009, 36(8): 1105-1112.
- [10] Zhao Y J, Wang J, Zhang H, *et al.* Effects of various LED light wavelengths and intensities on microalgae-based simultaneous biogas upgrading and digestate nutrient reduction process [J]. *Bioresource Technology*, 2013, 136: 461-468.
- [11] Han J J, Zhong C H, He P M, *et al.* Effects of different light-qualities on growth and physiological characteristics of free living conchocelis of *Pyropia haitanensis* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(2): 230-239.
韩军军, 钟晨辉, 何培民, 等. 不同光质 LED 光源对坛紫菜自由丝状体生长和生理特性的影响 [J]. *水产学报*, 2017, 41(2): 230-239.
- [12] 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 Environment Sciences*, 2017, 26(2): 268-274.
宋雨晴, 靳翠丽, 胡文峰, 等. 氮源对盐藻生长及细胞物质组成的影响 [J]. *生态环境学报*, 2017, 26(2): 268-274.

- [13] Zhu S Q, Gong Y F, Liu H, *et al.* Effects of ammonium cerous sulfate on fucoxanthin content in *phaeodactylum tricornutum* 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.
- [14] Li H S. Principles and techniques of plant physiological biochemical experiment [M]. Beijing: Higher Education Press, 2000.
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.
- [15] 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.
- [16] Takahashi F, Yamagata D, Ishikawa M, *et al.* AUREOCHROME, a photoreceptor required for photomorphogenesis in stramenopiles [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007, 104(49): 19625-19630.
- [17] Zhuang S H, Sven H. The effects of light intensity and quality on benthic algae communities II the dynamics and adaptive modes of community and populations[J]. Acta Ecologica Sinica, 2001, 21(12): 2057-2066.
庄树宏. 光强和光质对底栖藻类群落影响 II. 群落和种群的动态和适应模式[J]. 生态学报, 2001, 21(12): 2057-2066.
- [18] Steel J A. Factors affecting algal blooms[M]//Sykes G, Skinner F A. Microbial aspects of pollution. Amsterdam: Elsevier, 1971: 201-213.
- [19] Zhang G, Zhang P, Wang B, *et al.* Ultrasonic frequency effects on the removal of microcystis aeruginosa[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2006, 13(5): 446-450.
- [20] Das P, Wang L, Aziz S S, *et al.* Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(4): 3883-3887.
- [21] Beel B, Prager K, Spexard M, *et al.* A flavin binding cryptochrome photoreceptor responds to both blue and red light in *chlamydomonas reinhardtii*[J]. The Plant Cell, 2012, 24(7): 2992-3008.
- [22] Nguyen P T, Ruangchuay R, Lueangthuwapanit C. Effect of shading colours on growth and pigment content of *gracilaria fisheri* (Xia & Abbott) Abbott, Zhang & Xia (Gracilariales, Rhodophyta) [J]. Aquaculture Research, 2017, 48(3): 1119-1130.
- [23] Wang G C, Wang W J, Wang F Z, *et al.* A method for separating fucoxanthin from seaweed: CN1706836 A[P]. 2007-07-11.
王广策, 汪文俊, 王发左, 等. 一种从海藻中分离岩藻黄素的方法: CN1706836 A[P]. 2007-07-11.
- [24] Zang Z R, Xie X J, Zhao P P, *et al.* Effect of different temperatures and light conditions on the growth and fucoxanthin content of *phaeodactylum tricornutum*[J]. Marine Sciences, 2015, 39(7): 1-6.
臧正蓉, 解修俊, 赵佩佩, 等. 温度和光照对三角褐指藻的生长及岩藻黄素含量的影响[J]. 海洋科学, 2015, 39(7): 1-6.
- [25] Yao P, Yu Z G, Deng C M. Pigment signatures of some diatoms isolated from China seas [J]. Acta Oceanologica Sinica, 2006, 25(1): 108-118.
- [26] Zhou L, Liu L. Regulation factors of carotenoid biosynthesis and their impacts on photosynthesis [J]. Tianjin Agricultural Sciences, 2011, 17(5): 5-8.
周莉, 刘莉. 类胡萝卜素生物合成的调控因素及其对光合作用的影响[J]. 天津农业科学, 2011, 17(5): 5-8.
- [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): 0630004.
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): 0630004.
- [28] Wang H, Zhang Y, Chen L, *et al.* Combined production of fucoxanthin and EPA from two diatom strains *phaeodactylum tricornutum* and *cylindrotheca fusiformis* cultures [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2018, 41(7): 1061-1071.
- [29] Jiang L, Ban Q L, Wang S L. Effects on tobacco carotenoid biosynthesis of expression of ZDS gene interference [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2017(20): 231-233, 235.
江露, 班秋丽, 汪善良. ZDS基因干扰表达对烟草类胡萝卜素生物合成的影响[J]. 现代农业科技, 2017(20): 231-233, 235.
- [30] Liu H, Hang Y Q, Zhu S Q, *et al.* Effects of glucose on the growth of *phaeodactylum tricornutum*, fucoxanthin content and related gene expression [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2016, 51(14): 1230-1234.
刘浩, 杭雨晴, 朱帅旗, 等. 葡萄糖对三角褐指藻生长、岩藻黄素含量及相关基因表达的影响[J]. 中国药学杂志, 2016, 51(14): 1230-1234.
- [31] Cazzonelli C I, Pogson B J. Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants [J]. Trends in Plant Science, 2010, 15(5): 266-274.

- [32] Kaur S, Spillane C. Reduction in carotenoid levels in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* by artificial microRNAs targeted against the endogenous phytoene synthase gene [J]. *Marine Biotechnology*, 2015, 17(1): 1-7.
- [33] Kadono T, Kira N, Suzuki K, *et al.* Effect of an introduced phytoene synthase gene expression on carotenoid biosynthesis in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* [J]. *Marine Drugs*, 2015, 13(8): 5334-5357.
- [34] Eilers U, Bikoulis A, Breitenbach J, *et al.* Limitations in the biosynthesis of fucoxanthin as targets for genetic engineering in *Phaeodactylum tricornutum* [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2016, 28(1): 123-129.