

光质调控雨生红球藻虾青素合成及油脂积累的效应

朱琴, 张春辉*, 石颖, 刘哲, 宋亚楠, 薛金爱, 崔红利, 李润植*

山西农业大学农学院/分子农业与生物能源研究所, 山西晋中030801

*共同通信作者: 张春辉(chhzhzhang@sxau.edu.cn)、李润植(rli2001@126.com)

摘要: 为阐明光质对雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)虾青素合成和油脂积累的调控效应, 本文分析了4种不同光质(白光、红光、蓝光和绿光)对雨生红球藻色素组成、光合作用、总脂含量及脂肪酸组成的影响。结果表明, 蓝光处理的藻细胞虾青素含量、虾青素含量/总叶绿素含量比值及总脂含量均高于其他3种光质处理, 但实际光化学效率(Y_{II})、最大光化学效率(F_v/F_m)、光化学淬灭系数(q_p)和相对电子传递速率(r_{ET})均低于其他3种光质处理, 说明蓝光可能在促进虾青素积累的同时会抑制雨生红球藻的光合作用。实时荧光定量PCR检测结果显示, 与白光对照相比, 蓝光持续上调参与虾青素合成的 β -胡萝卜素酮化酶基因(*bkt*)和八氢番茄红素合成酶基因(*psy*)的表达, 红光处理能诱导参与油体合成的钙蛋白基因(*caleosin*)在培养4和6 d后高水平表达。根据以上结果推测蓝光下总脂含量的增加可能与其促进虾青素的积累紧密相关, 而红光下总脂含量的增加可能与其促进油体合成直接相关。本研究为进一步深入研究不同光质对虾青素和油脂合成的调控机制提供新思路, 并为雨生红球藻虾青素工厂化优质高效生产的光环境调控提供理论依据。

关键词: 雨生红球藻; 虾青素; 光质; 油脂; 实时荧光定量PCR

Effects of light quality on astaxanthin synthesis and lipid accumulation of *Haematococcus pluvialis*

ZHU Qin, ZHANG Chunhui*, SHI Ying, LIU Zhe, SONG Yanan, XUE Jin'ai, CUI Hongli, LI Runzhi*

College of Agriculture, Institute of Molecular Agriculture and Bioenergy, Shanxi Agricultural University, Jinzhong, Shanxi 030801, China

*Co-corresponding authors: Zhang CH (chhzhzhang@sxau.edu.cn), Li RZ (rli2001@126.com)

Abstract: In order to clarify the regulatory effect of light quality on astaxanthin synthesis and lipid accumulation of *Haematococcus pluvialis*, this study was conducted to analyze the effect of light quality (white, red, blue and green lights) on pigment composition, photosynthesis, total lipid content and fatty acid composition. The results show that blue light enhanced astaxanthin content, ratio of astaxanthin content to total chlorophyll content and total lipid content of *H. pluvialis*, which are significantly higher than those in algal cells treated by white, red and green lights. However, blue light inhibited actual photochemical efficiency (Y_{II}), maximum photochemical efficiency (F_v/F_m), photochemical quenching coefficient (q_p) and relative electron transfer rate (r_{ET}), indicating that blue light accelerated astaxanthin accumulation, accompanied by suppressing photosynthetic activity of *H. pluvialis*. Quantitative real-time PCR detection showed that

收稿 2021-01-27 修定 2021-06-12

资助 国家自然科学基金(31902394)、山西省高等学校科技创新项目(2020L0135)、山西农业大学科技创新基金(2020BQ17)和山西省优秀博士来晋工作奖励资金(SXYBKY2019037)。

blue light treatment induced up-regulation of the astaxanthin synthesis genes, β -carotene ketolase gene (*bkt*) and phytoene synthase gene (*psy*), compared to the control of white light treatment. After cultivation for 4 or 6 days, the red light treatment up-regulated the expression of *caleosin* gene, which was involved in oil body formation. These results suggest that the enhancement of total lipid content induced by blue light may be closely related to the promotion of astaxanthin accumulation, whereas the increased total lipid content induced by red light may be directly related to the oil body synthesis. This study sheds new insights into further study of regulation mechanism of astaxanthin and lipid synthesis under different light quality conditions, and provides a theoretical basis for light environment regulation of astaxanthin production in *H. pluvialis*.

Key words: *Haematococcus pluvialis*; astaxanthin; light quality; lipid; quantitative real-time PCR

虾青素是一种天然着色剂, 具有强抗氧化力(Kamath等2008a), 在水产养殖(吴晓娟等2015)、制药和化妆品(Wang等2017)等行业中应用广泛。雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)是一种淡水单细胞绿藻, 是目前已知天然虾青素含量最高的生物, 利用雨生红球藻制备天然虾青素产品的大规模工业化生产备受重视(Zhang 2019)。通常利用胁迫条件来诱导雨生红球藻虾青素的合成, 包括高光、高温、营养胁迫和高盐等(Kamath等2008b)。雨生红球藻是可以利用光能将二氧化碳和水等无机物转化为有机物的光自养生物(许大全和陈根云2018), 光照条件在雨生红球藻生长和虾青素积累过程中发挥重要作用。

光质是影响植物生长发育(Dou等2017)、基因表达(Jiao等2007)及光合作用(Pashkovskiy等2018)等生命活动的一个重要光环境因素, 且不同植物对不同光质的响应有较大的差异(高松等2020)。目前, 大部分对光质的研究都集中于红光和蓝光(红光的波长一般为620~625 nm, 蓝光的波长一般为460~465 nm)。红光可以促进叶片生长、加快植物生长速率、增加光合产物的积累(Nhut等2003), 蓝光可以减缓叶片的衰老、控制叶绿体的运动、抑制茎的伸长等(曹刚等2013)。由于绿光(波长一般为520~525 nm)比红光或蓝光更容易从叶片表面反射或透过叶片传播(Paradiso等2010), 对植物生长发育影响小, 因而对绿光的研究较少。但是, 也有研究发现绿光较红光或蓝光更易影响叶片组织(Claypool和Lieth 2020)。已有研究显示, 在雨生红球藻的规模化培养中, 使用红光可以促进雨生红

球藻生长, 使用蓝光能够诱导雨生红球藻积累虾青素(Katsuda等2004)。关于绿光对雨生红球藻生长及代谢调控的研究较少, 也未见绿光对虾青素合成相关基因表达影响的报道。

由于雨生红球藻中96%的虾青素以虾青素酯的形式储存在油体(oil body, OB)中(Holtin等2009), 因此, 油体合成必然影响虾青素合成积累。目前雨生红球藻中未见参与油体合成的油体钙蛋白基因(*caleosin*)的相关报道。为探讨雨生红球藻对不同光质的响应机制, 本试验选取稳定期的雨生红球藻(797藻株)细胞为实验材料, 分别设置白光(由红、绿、蓝三原色混合而成的复合光)、红光、蓝光及绿光处理, 研究4种不同光质处理对雨生红球藻素积累、光合性能、总脂含量及脂肪酸组成等的影响。此外, 应用实时荧光定量PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)检测虾青素合成的3个关键基因—— β -胡萝卜素酮化酶基因(β -caroteneketolase, *bkt*)、质体末端氧化酶基因(plastid terminal oxidase, *ptox*)、八氢番茄红素合成酶基因(phytoene synthase, *psy*)的表达谱, 并首次在雨生红球藻中检测参与油体合成的油体钙蛋白基因(*caleosin*)。研究可为雨生红球藻虾青素工厂化优质高效生产的光环境调控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料与试验设计

本试验所用藻株为雨生红球藻[*Haematococcus pluvialis* (Flotow, 1844)] 797藻株, 现存于山西农业大学分子农业与生物能源研究所。所用培养基为

MCM (modified Chalmers medium), 于温度(22.5 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 、光/暗周期(12 h)/(12 h)、 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光照条件下静置培养藻细胞, 且每8 h摇匀1次, 培养至藻细胞达到稳定期并转变为绿色不动细胞。光强测定所用的仪器为便携式光量子计(3415F型, Spectrum Technologies, Inc., 美国)。取4.8 L藻液于超净工作台上混匀, 分装到12个500 mL锥形瓶中(每瓶400 mL藻液), 分别置于白光(W)、红光(R)、蓝光(B)、绿光(G)四种不同光质下进行培养。不同光质来源为LED方形光源板(艾海迪照明科技有限公司, 中国): 白光是由红、绿、蓝三原色混合而成的复合光, 红光、蓝光、绿光的波长分别为620~625、460~465、520~525 nm; 每种光质的光照强度均设定为 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。培养时间为8 d, 且期间连续光照培养, 每天定时摇匀藻液2、3次。

1.2 藻细胞样品制备

培养期间每隔2 d (2、4、6、8 d)拍照记录藻液颜色, 在摇匀后取样测定色素组成和叶绿素荧光。同时, 收集样品经液氮速冻后提取RNA, 反转录成cDNA备用。培养结束(8 d)时, 收集藻液, 离心($2\ 390\times g$)去上清后冷冻干燥, 用于测定总脂含量和脂肪酸组成。

1.2.1 雨生红球藻细胞色素含量及叶绿素荧光参数的测定

叶绿素和虾青素的提取使用分析纯二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO; 范德生物科技有限公司, 北京)。取10 mL离心去上清后的藻泥, 加DMSO萃取至藻体发白, 收集上清液定容后, 用UV-1601紫外分光光度计(北京瑞利分析仪器公司)检测波长490和645 nm处的吸光值(分别用 A_{490} 和 A_{645} 表示)。总叶绿素浓度($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)= $(20.2\times A_{645} + 8.02\times A_{663})\times$ 稀释倍数; 虾青素浓度($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)= $4.5\times A_{490}\times$ 稀释倍数。按照Bai等(2015)的方法, 取3 mL藻液黑暗处理5 min后, 采用超便携式调制叶绿素荧光仪MINI-PAM-II (上海泽泉科技有限公司)测定实际光化学效率(actual photochemical efficiency, Y_{II})、最大光化学效率(maximum photochemical efficiency, F_v/F_m)、光化学淬灭系数(photochemical quenching coefficient, q_p)和相对电子传递速率(relative electron transfer rate, r_{ET})等叶绿素荧光参数。以上测定每

组均进行3次生物学重复。

1.2.2 相对电子传递速率的计算方法

按照MINI-PAM-II自动设置程序完成 r_{ET} 的测定, 程序中光合有效辐射(photosynthetically active radiation, R_{PA})设定为11个梯度, 经校正后依次为0、29、51、73、100、139、210、315、464、694、903 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。相对电子传递速率的计算公式参照崔静等(2014)的方法: $r_{ET}=Y_{II}\times R_{PA}\times 0.5\times 0.84$ 。

1.2.3 总脂及脂肪酸含量的测定

总脂及脂肪酸含量的测定参照邵雪梅(2016)的方法, 称取冷冻干燥后的藻粉50 mg, 每个处理设置3个生物学重复。藻粉中加入2.5 mL氯仿(天津市凯通化学试剂有限公司)、5 mL甲醇(天津市凯通化学试剂有限公司), 在37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床(上海博讯实业有限公司)中抽提24 h后离心收集上层有机相; 剩余藻液残渣重复抽提2次。合并3次所得的上层有机相, 加入5 mL氯仿和9 mL氯化钠(天津市凯通化学试剂有限公司)溶液($10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), 离心后收集下层有机相到玻璃管中。用氮吹仪(天津市恒奥科技发展有限公司)吹干样品至恒重, 即为总脂质量。总脂含量为所得总脂质量占藻粉质量的百分率(%)。脂肪酸测定: 称取冷冻干燥后的藻粉50 mg, 提取脂肪酸甲酯后进行气相色谱(gas chromatographic analysis, GC)分析, GC的结果与十七烷酸甘油三酯(triheptadecanoin, C17:0)标准品作比较, 根据峰面积大小来计算各脂肪酸成分的相对含量。

1.2.4 qRT-PCR分析

RNA提取使用RNAiso Plus试剂盒(TaKaRa, 北京), 操作步骤详见说明书。反转录参照PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒(TaKaRa, 北京)说明书。所得cDNA产物稀释后用作qRT-PCR的反应模板, qRT-PCR所用引物信息列于表1, 由上海生工生物工程公司合成。以白光作为对照, 18S RNA为内参, 对**bkt**、**ptox**、**psy**和**caleosin**基因进行qRT-PCR分析, 具体操作参照TB Green Premix Ex Taq II试剂盒(TaKaRa, 北京)说明书。qRT-PCR反应体系如表2所示, 反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s (40个循环)。每组设置3次生物学重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因的相对表达量。

表1 引物信息
Table 1 Primers information

引物名称	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')
<i>18S</i>	CAAAGCAAGCCTACGCTCT	ATACGAATGCCCCCGACT
<i>bkt</i>	CAATCTTGTCAGCATTCCGC	CAGGAAGCTCATCACATCAGAT
<i>ptox</i>	CTATTACCGCAACCAGGACC	ACGCACATTGATGAACACG
<i>psy</i>	CGATACCAGACCTTCGACG	TGCCTTATAGACCACATCCAT
<i>caleosin</i>	ATGGCTCTGACTCGGAGGT	ACAGGAGGTACAGCGTGAAC

表2 qRT-PCR反应体系
Table 2 qRT-PCR reaction system

试剂	用量/ μ L
TB Green <i>Premix Ex Taq</i> II (TliRNaseH Plus) (2 $\times$)	5.0
正向引物	0.4
反向引物	0.4
cDNA模板	0.8
双蒸水	3.4
反应总体系	10.0

1.3 数据处理

本试验数据用Excel 2007统计处理。所有实验均进行3次生物学重复,使用SPSS 19.0 (SPSS, 美国)通过单因素方差分析(analysis of variance, ANOVA)方法进行统计分析。使用GraphPad Prism 8软件(GraphPad公司, 美国)作图。

2 实验结果

2.1 不同光质对雨生红球藻色素含量的影响

不同光质处理下,藻液颜色随培养时间延长有明显变化(图1)。培养2 d后蓝光处理下藻液呈褐色,其他3种处理下藻液颜色无明显差异。培养4和6 d后,蓝光处理下藻液呈红褐色,红光处理下藻液略呈黄褐色,白光和绿光处理下藻液仍呈绿色。培养结束时(8 d后),蓝光处理下藻液变为红色,红光处理下藻液变为褐色(与蓝光处理下培养2 d后的颜色相似),白光处理下藻液颜色变为绿褐色,绿光处理下藻液颜色仍为绿色。以上结果表明蓝光较其他三种光质更有利于虾青素的积累,红光效果次之。

雨生红球藻细胞色素含量随培养时间的变化

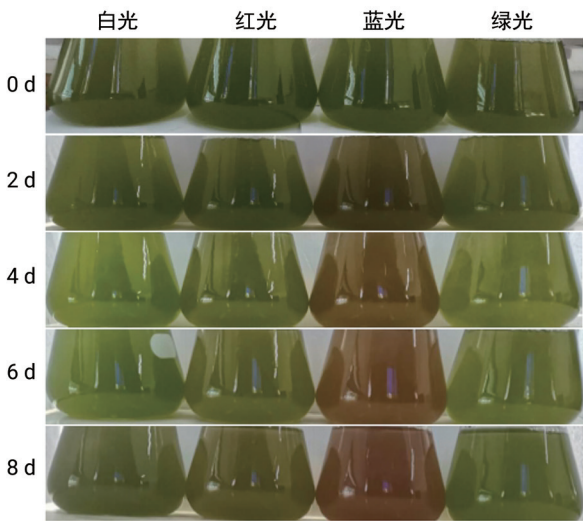


图1 不同光质对雨生红球藻藻液颜色的影响
Fig. 1 Effects of different light quality on the colors of *H. pluvialis* cultures

如图2所示。白光、红光、绿光三组的藻细胞总叶绿素含量随培养时间的延长呈增加趋势,而蓝光处理下总叶绿素含量随培养时间的延长呈减少趋势(图2-A)。不同光质下雨生红球藻中虾青素含量随培养时间的变化如图2-B所示。蓝光、红光、白光三组的虾青素含量随着培养时间的延长而逐渐增加,绿光处理下虾青素含量在培养过程中保持在相近的水平。在培养2~8 d期间,蓝光处理下虾青素含量均高于其他三组处理,红光与白光处理下虾青素含量略高于绿光处理。培养结束时(8 d后),蓝光处理下虾青素含量分别是白光、红光和绿光处理下的1.43倍、1.25倍和2.04倍。由图2-C可以看出,在整个培养过程中,蓝光处理下虾青素含量/总叶绿素含量比值均高于其他三组处理,红光处

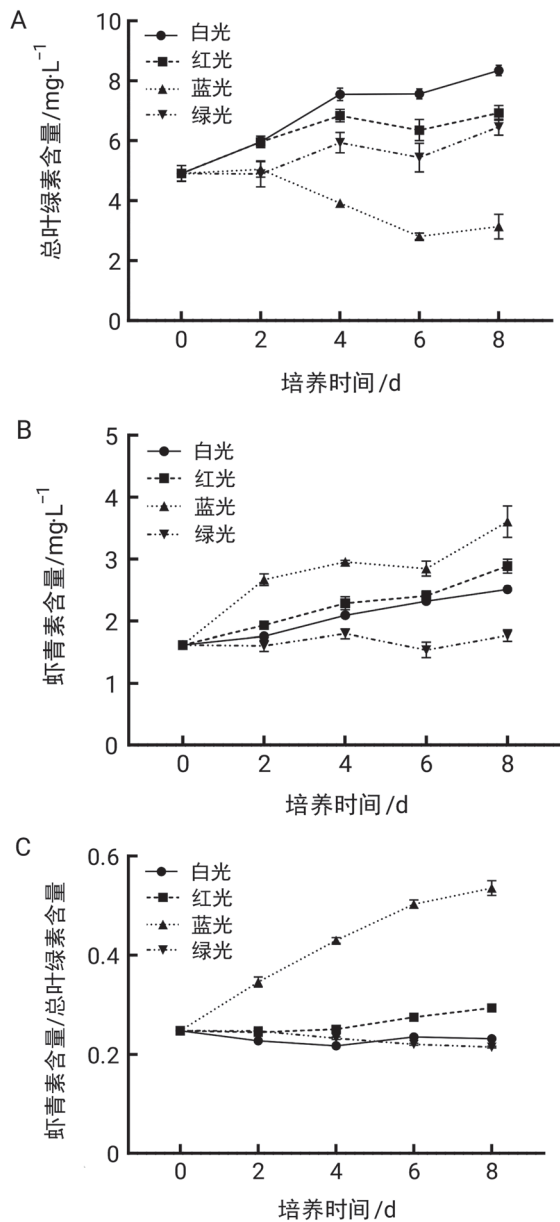


图2 不同光质对雨生红球藻色素积累的影响

Fig. 2 Effects of different light quality on pigment accumulation in *H. pluvialis*

A: 总叶绿素含量; B: 虾青素含量; C: 虾青素含量/总叶绿素含量。

理下虾青素含量/总叶绿素含量比值略高于白光和绿光处理, 白光和绿光两处理间差异不明显。培养结束时, 蓝光处理下虾青素含量/总叶绿素含量比值分别是白光、红光和绿光处理下的2.31倍、1.82倍和2.5倍。以上结果表明, 蓝光处理较其他三组

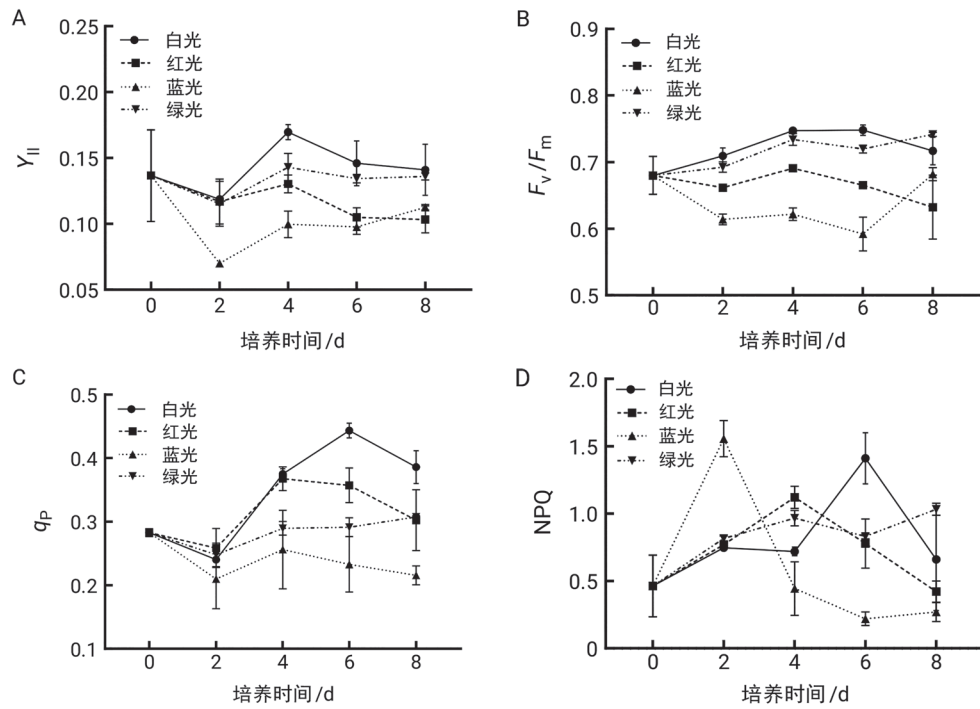
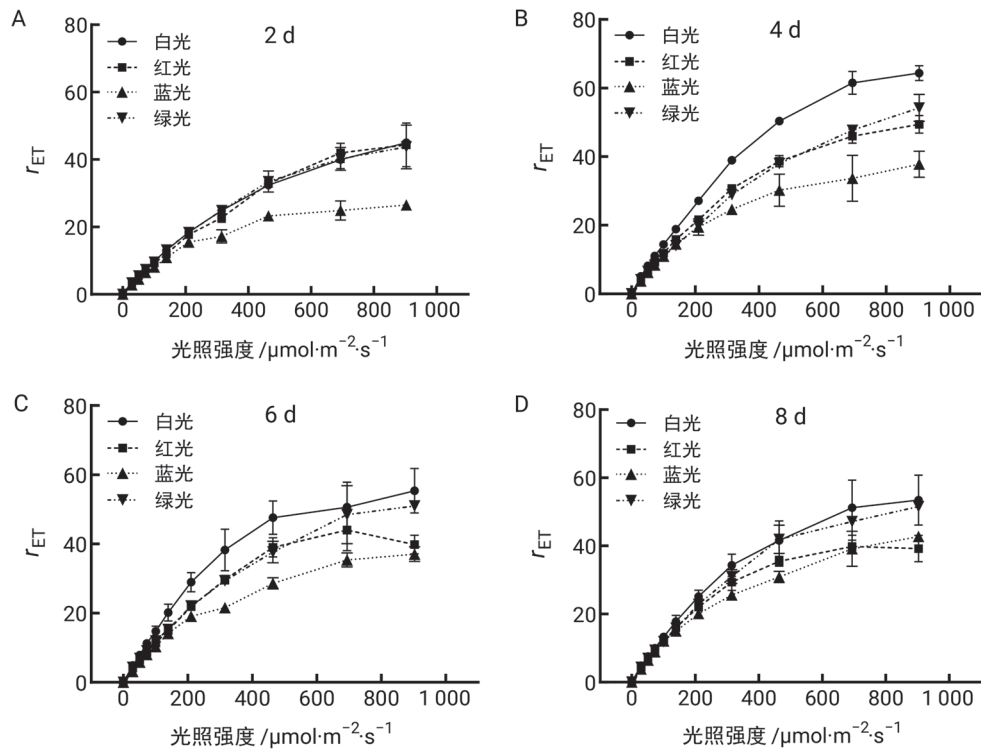
处理更有利于虾青素积累并能有效提高虾青素含量/总叶绿素含量比值, 因此蓝光处理的藻液颜色更红(图1)。

2.2 不同光质对雨生红球藻叶绿素荧光参数的影响

不同光质对雨生红球藻叶绿素荧光参数的影响如图3所示。光系统II (photosystem II, PSII) 实际光化学效率(Y_{II})表示用于光化学反应的能量(Zhang等2015)。培养2 d后, 蓝光处理组下 Y_{II} 值低于其他三组处理, 且白光、红光和绿光三处理间无明显差异; 培养2~6 d期间, Y_{II} 值从高到低依次为白光、绿光、红光、蓝光处理; 培养结束时, 白光和绿光处理组的 Y_{II} 值高于蓝光和红光处理组, 且白光和绿光两处理间差异较小, 蓝光和红光两处理间差异也较小(图3-A)。最大光化学效率(F_v/F_m)用来表示植物潜在的最大光合活性(Maxwell和Johnson 2000)。培养2~6 d期间, 蓝光处理下 F_v/F_m 值均低于其他三组处理($P<0.05$), F_v/F_m 值从高到低依次为白光、绿光、红光、蓝光处理(图3-B)。光化学淬灭系数(q_p)反映了PSII反应中心的开放程度(Maxwell和Johnson 2000)。培养2~4 d期间, q_p 值在白光与红光两处理间无明显差异, 且均高于绿光处理和蓝光处理; 培养4~6 d期间, q_p 值从高到低依次为白光、红光、绿光和蓝光处理; 培养结束时, q_p 值从高到低依次为白光、红光和绿光(两者无明显差异)、蓝光处理(图3-C)。非光化学淬灭系数(NPQ)表示将过剩的光能以热的形式耗散掉的能力(即光保护的能力)(Maxwell和Johnson 2000)。不同光质处理下NPQ值均随培养时间的延长呈先上升后下降的趋势: 蓝光处理的NPQ值在培养2 d后达到最大值, 随后迅速下降, 在培养4~8 d期间达到稳定且基本保持不变; 红光组的NPQ值在培养4 d后达到最大值, 后随培养时间的延长而逐渐下降(图3-D)。以上结果表明蓝光影响了PSII的光合性能。

2.3 不同光质对雨生红球藻相对电子传递速率的影响

相对电子传递速率(r_{ET})可以用来反映植物对光强的耐受能力。不同光质驯化后, 雨生红球藻 r_{ET} 随光照强度变化的趋势如图4所示。在培养2~6 d期间, 当光照强度高于 $210 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时蓝光处理下 r_{ET} 值低于白光、红光和绿光处理组(图4-A~C)。

图3 不同光质对雨生红球藻 Y_{II} (A)、 F_v/F_m (B)、 q_P (C)和NPQ (D)的影响Fig. 3 Effects of different light quality on Y_{II} (A), F_v/F_m (B), q_P (C) and NPQ (D) of *H. pluvialis*图4 不同光质对雨生红球藻 r_{ET} 的影响Fig. 4 Effects of different light quality on r_{ET} of *H. pluvialis*

A: 培养2 d后; B: 培养4 d后; C: 培养6 d后; D: 培养8 d后。

培养结束时,在光照强度为 $210\sim 694\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时 r_{ET} 值从高到低依次为白光、绿光、红光和蓝光处理;光照强度高于 $694\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时白光和绿光两处理组的 r_{ET} 值高于蓝光和红光处理(图4-D)。

2.4 不同光质对雨生红球藻总脂及脂肪酸含量的影响

培养结束时,检测不同光质处理下雨生红球藻的总脂含量(图5-A),发现从高到低依次为蓝光、红光、白光和绿光处理,且蓝光处理下总脂含量分别是白光、红光和绿光处理的1.20倍、1.10倍和1.39倍。总脂含量与培养结束时虾青素含量的变化趋势一致,拟合结果得出 $y=4.111\ 7x+11.971$,相关系数(R^2)=0.992 1,其中 y 代表总脂含量, x 代表虾青素含量。

培养结束时,不同光质下雨生红球藻的脂肪酸组成及含量如图5-B所示。含量最高的脂肪酸成分均为棕榈酸(palmitic acid, C16:0),白光、红光、蓝光和绿光处理下C16:0占总脂肪酸的比率分别为46.61%、36.55%、46.75%和46.76%,其中红光处理下C16:0占总脂肪酸的比率显著低于其他三组;红光处理下藻细胞中硬脂酸(stearic acid, C18:0)占总脂肪酸的比率显著高于其他三组处理;绿光处理下油酸(oleic acid, C18:1)占总脂肪酸的比率显著高于其他三组处理。红光和白光处理下亚油酸(linoleic acid, C18:2)占总脂肪酸的比率显著高于蓝光和绿光处理,且红光处理和白光处理两组间无显著差异,蓝光处理和绿光处理两组间无显著差异。

异,蓝光处理和绿光处理两组间无显著差异。

2.5 不同光质下雨生红球藻虾青素合成和油脂积累相关基因表达分析

已有研究显示,*bkt*、*psy*和*ptox*是控制虾青素生物合成的三个关键基因,*caleosin*参与油体形成(Huang 1996)。应用qRT-PCR检测这4个基因在不同处理和培养时间下的表达量。不同光质下雨生红球藻*bkt*、*psy*、*ptox*以及*caleosin*基因的表达情况如图6所示。将白光处理下各基因表达量分别设为1,用作对照。蓝光处理下*bkt*基因表达量在藻细胞培养期间显著高于红光处理,红光处理下*bkt*基因仅在培养6 d后有较高的表达量,而绿光处理下,*bkt*基因仅在培养8 d后表达量较高(图6-A)。*ptox*基因仅在蓝光下培养4 d后表达量较高,在其他光质处理和培养时间均较低(图6-B)。红、蓝光处理下*psy*基因表达量始终高于绿光处理,而绿光处理仅在培养6~8 d期间表达量较高(图6-C)。红光处理下培养4~6 d期间*caleosin*基因表达量较高,蓝、绿光处理下*caleosin*基因表达量仅在培养4 d后较高(图6-D)。对比分析不同光质处理下藻细胞虾青素和油脂积累特征(图2-B和图5),表明这四个基因的表达量与虾青素和油脂积累紧密相关。

3 讨论

植物叶绿体光系统作为光合机构的重要机构,主要与光能吸收、传递及转化有关(李涛和姜闯道

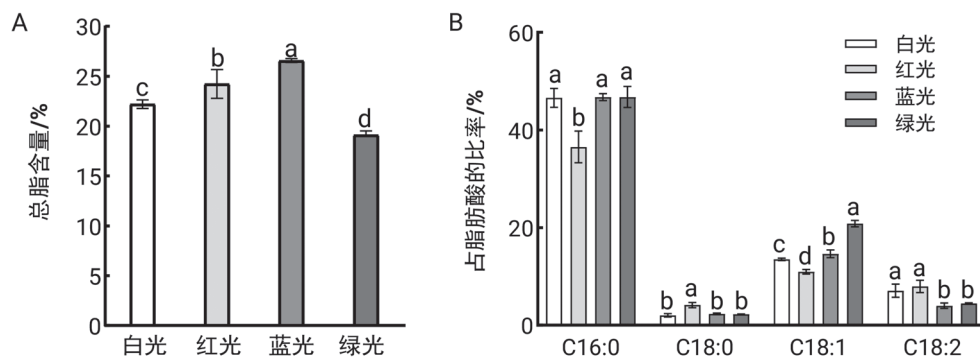


图5 不同光质对雨生红球藻总脂含量(A)和脂肪酸组成(B)的影响

Fig. 5 Effects of different light quality on total lipid content (A) and fatty acid composition (B) of *H. pluvialis*

C16:0: 棕榈酸; C18:0: 硬脂酸; C18:1: 油酸; C18:2: 亚油酸。不同小写字母表示同一成分的指标在不同处理间差异显著($P<0.05$)。

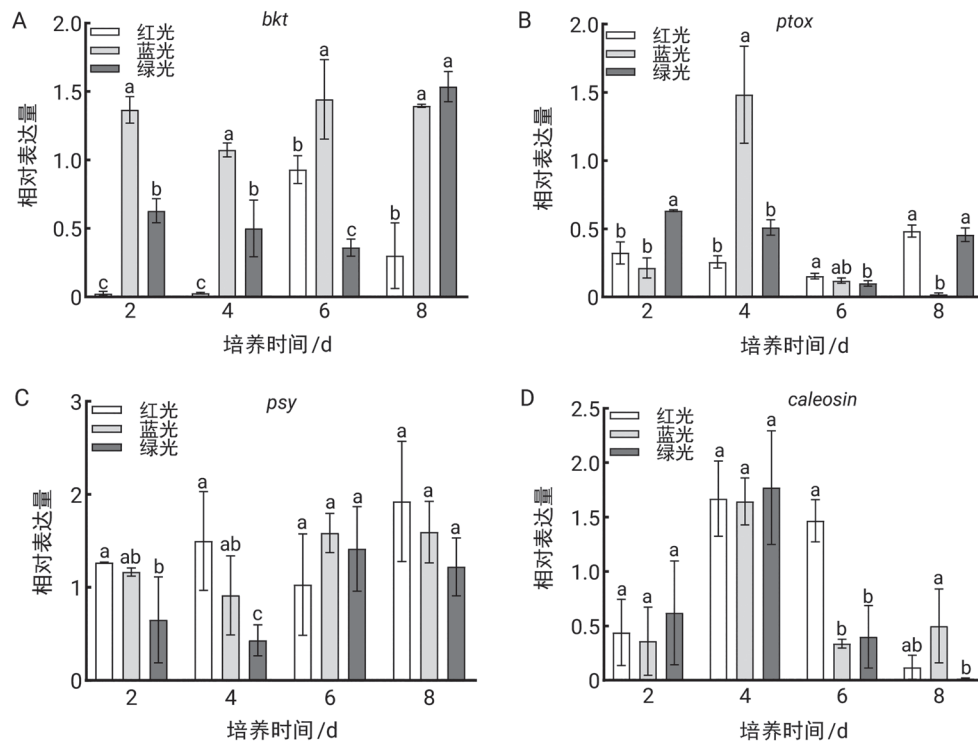


图6 不同光质对雨生红球藻虾青素合成和油脂积累相关基因的影响

Fig. 6 Effects of different light quality on genes related to astaxanthin synthesis and lipid accumulation in *H. pluvialis*

A: *bkt*基因; B: *ptox*基因; C: *psy*基因; D: *caleosin*基因。不同小写字母表示同一基因同一时间的指标在不同处理间差异显著($P < 0.05$)。

2017)。光质能够通过影响不同类型叶绿体蛋白的形成以及光系统间电子传递来调节光合作用(Shin等2008)。本研究通过叶绿素荧光参数来反映不同光质下雨生红球藻细胞的光合性能。蓝光下藻细胞 Y_{II} 、 F_v/F_m 、 q_p 和 r_{ET} 值均低于其他三组,表明蓝光使光系统的开放程度和电子传递效率降低,吸收、捕获及传递电子的能力减弱,光合作用受到抑制。此外,光合色素中的叶绿素能够吸收、传递和转换光能,是植物进行光合作用的物质基础,其含量与组成直接影响叶片的光合速率(郑洁等2008)。本研究中,蓝光处理降低叶绿素含量的同时提高了虾青素含量,推测蓝光抑制光合作用可能与藻细胞叶绿素含量降低而虾青素含量增多有关,且稳定期藻细胞积累虾青素的过程可能不直接依赖于光合作用的进行。这与Zhang等(2019)的研究结果相似:添加乙酸钠能显著促进雨生红球藻虾青

素的积累,同时藻细胞的光合活性受到抑制。

前人研究表明,虾青素含量的升高与油脂含量的升高呈正相关(马瑞娟2018)。本研究的结果与之一致:总脂含量的变化趋势与虾青素含量的变化趋势一致,且两者高度正相关;蓝光提高虾青素含量的同时总脂含量增高。本研究中所检测到的主要脂肪酸成分为棕榈酸(C16:0)、硬脂酸(C18:0)、油酸(C18:1)和亚油酸(C18:2),这些脂肪酸成分也是参与雨生红球藻虾青素酯化的主要脂肪酸(Weesepeel等2013)。

马瑞娟(2018)和Lee等(2018)的研究表明,蓝光能够通过上调*bkt*和*psy*基因的表达水平来促进虾青素的合成。本研究中,在蓝光诱导下,*bkt*基因持续上调表达,*ptox*和*psy*基因分别在培养4 d以及6~8 d期间高水平表达,推测蓝光通过诱导虾青素合成关键酶基因的高表达来促进虾青素的积累。此外,

参与油体合成的关键蛋白caleosin合成后与在内质网上合成的三酰甘油(triacylglycerol, TAG)结合形成油体,油体可以贮存脂肪(Huang 1996)。本研究发现,红光下caleosin基因在4~6 d期间明显上调表达,表明红光有利于雨生红球藻油体的合成,从而提高总脂含量。然而,蓝光下caleosin基因仅在培养4 d后高表达,但蓝光显著促进总脂积累,推测蓝光主要通过促进虾青素合成间接提高总脂含量。

基于已有研究和本研究结果,提出光质影响雨生红球藻光合作用、虾青素和油脂积累的调控模型(图7)。光主要通过光合作用影响雨生红球藻

生长发育,同时,不同的光质也对虾青素合成及油体合成相关基因的表达有影响,进而影响到色素的合成与积累,以及油脂的积累和脂肪酸成分的变化。目前,不同光质的信号如何被雨生红球藻细胞接收,并通过何种路径影响藻细胞虾青素和油脂等生理生化代谢,其详细机制有待进一步研究。

综上所述,在相同光照强度下,与其他单色光相比,蓝光下藻细胞总脂含量的增加可能与其促进虾青素的积累紧密相关,但其叶绿素含量最低,光合作用受到抑制。而红光下藻细胞总脂含量的增加可能与其促进油体合成直接相关。这些结果

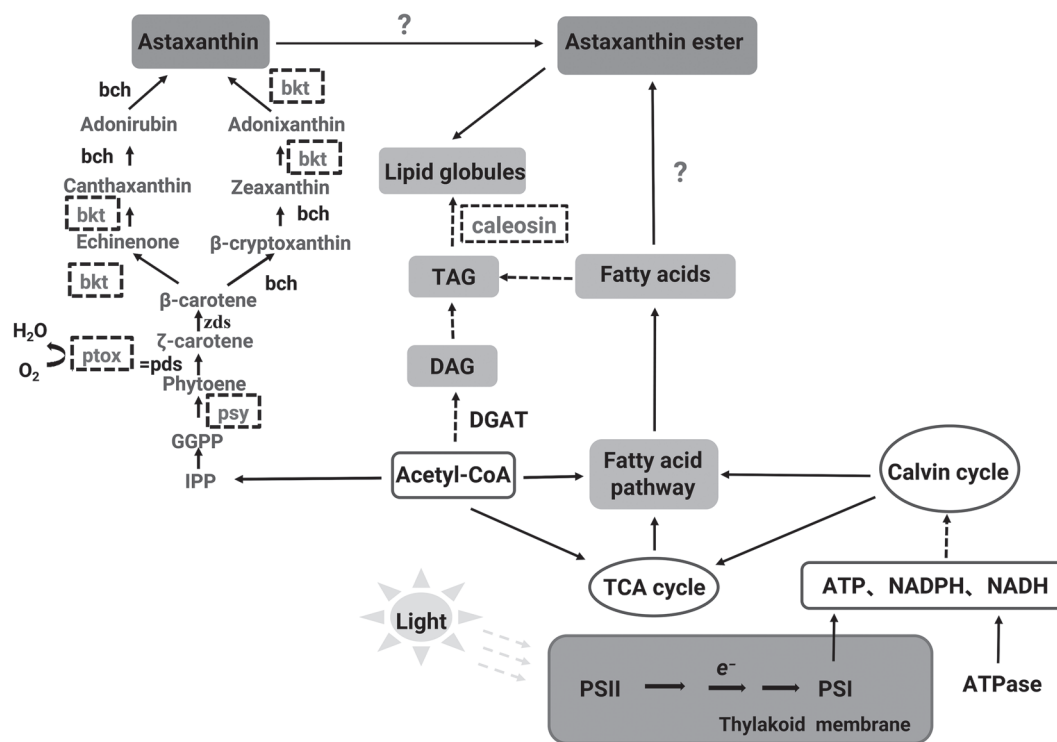


图7 光对雨生红球藻光合作用、虾青素合成及油脂积累的影响

Fig. 7 Effects of light on photosynthesis, astaxanthin synthesis and lipid accumulation of *H. pluvialis*

Acetyl-CoA: 乙酰辅酶A; Adonirubin: 金盏花红素; Adonixanthin: 金盏花黄质; Astaxanthin: 虾青素; Astaxanthin ester: 虾青素酯; ATP: 腺嘌呤核苷三磷酸; ATPase: 三磷酸腺苷酶; bch: β -胡萝卜素羟化酶; bkt: β -胡萝卜素酮化酶; caleosin: 钙蛋白; Calvin cycle: 卡尔文循环; Canthaxanthin: 隐黄质; DAG: 二酰基甘油; DGAT: 二酰甘油酰基转移酶; e^- : 电子; Echinenone: 海胆酮; Fatty acids: 脂肪酸; Fatty acid pathway: 脂肪酸途径; GGPP: 牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸; H_2O : 水; IPP: 异戊烯焦磷酸; Light: 光; Lipid globules: 脂质小球; NADH: 还原型辅酶I; NADPH: 还原型辅酶II; O_2 : 氧气; pds: 八氢番茄红素脱氢酶; Phytoene: 八氢番茄红素; PSI: 光系统I; PSII: 光系统II; psy: 八氢番茄红素合成酶; pto: 质体末端氧化酶; TAG: 三酰甘油; TCA cycle: 三羧酸循环; Thylakoid membrane: 类囊体膜; zds: ζ -胡萝卜素脱氢酶; Zeaxanthin: 玉米黄素; β -carotene: β -胡萝卜素; β -cryptoxanthin: β -隐黄质; ζ -carotene: ζ -胡萝卜素。虚线框内的基因是我们所验证的基因。实线箭头表示目前已被证实的途径,虚线箭头表示未被证实的途径。

可为我们深入研究不同光质对雨生红球藻光合作用、虾青素和油脂合成等差异性效应的机制以及优化雨生红球藻培养条件、提高虾青素产量提供科学参考。

参考文献(References)

- Cao G (2013). Effects of different LED light qualities on cucumber and head cabbage seedling growth, photosynthetic characteristics and endogenous hormones (dissertation). Lanzhou: Gansu Agricultural University (in Chinese with English abstract) [曹刚(2013). 不同LED光质对黄瓜和结球甘蓝苗期生长、光合特性及内源激素的影响(学位论文). 兰州: 甘肃农业大学]
- Claypool NB, Lieth JH (2020). Physiological responses of pepper seedlings to various ratios of blue, green, and red light using led lamps. *Sci Hortic*, 268 (27): 109371
- Cui J, Zhang LT, Liu JG, et al (2014). Comparison of the light adaptability among oil enriched chrysophyte and green algae. *Mar Sci*, 38 (3): 6–13 (in Chinese with English abstract) [崔静, 张立涛, 刘建国等(2014). 富油金藻与绿藻的耐光适应性比较. *海洋科学*, 38 (3): 6–13]
- Dou H, Niu G, Gu M, et al (2017). Effects of light quality on growth and phytonutrient accumulation of herbs under controlled environments. *Horticulturae*, 3 (2): 36
- Gao S, Liu Y, Liu XN, et al (2020). Effects of light quality on carbon and nitrogen metabolism in leaves of welsh onion (*Allium fistulosum*). *Plant Physiol J*, 56 (3): 565–572 (in Chinese with English abstract) [高松, 刘颖, 刘学娜等(2020). 光质对大葱叶片碳氮代谢的影响. *植物生理学报*, 56 (3): 565–572]
- Holtin K, Kuehnle M, Rehbein J, et al (2009). Determination of astaxanthin and astaxanthin esters in the microalgae *Haematococcus pluvialis* by LC-(APCI)MS and characterization of predominant carotenoid isomers by NMR spectroscopy. *Anal Bioanal Chem*, 395 (6): 1613–1622
- Huang AHC (1996). Oleosins and oil bodies in seeds and other organs. *Plant Physiol*, 110 (4): 1055–1061
- Jiao Y, Lau OS, Deng XW (2007). Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nat Rev Genet*, 8 (3): 217–230
- Kamath BS, Srikanta BM, Dharmesh SM, et al (2008). Ulcer preventive and antioxidative properties of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Eur J Pharmacol*, 590 (1–3): 387–395
- Kamath BS, Vidhyavathi R, Sarada R, et al (2008). Enhancement of carotenoids by mutation and stress induced carotenogenic genes in *Haematococcus pluvialis* mutants. *Bioresource Technol*, 99 (18): 8667–8673
- Katsuda T, Lababpour A, Shimahara K, et al (2004). Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under illumination with LEDs. *Enzyme Microb Tech*, 35 (1): 81–86
- Lee C, Ahn JW, Kim JB, et al (2018). Comparative transcriptome analysis of *Haematococcus pluvialis* on astaxanthin biosynthesis in response to irradiation with red or blue led wavelength. *World J Microb Biot*, 34 (7): 96
- Li T, Jiang CD (2017). Effects of close planting on photosystem II functions in *Mentha haplocalyx* leaves. *Plant Physiol J*, 53 (7): 1279–1286 (in Chinese with English abstract) [李涛, 姜闯道(2017). 密植对薄荷叶片光系统II功能的影响. *植物生理学报*, 53 (7): 1279–1286]
- Ma RJ (2018). Characterization of growth and metabolite biosynthesis in *Haematococcus pluvialis* and *Nannochloropsis* sp. BR2 under LED light and nitrogen starvation conditions (dissertation). Xiamen: Xiamen University (in Chinese with English abstract) [马瑞娟(2018). 雨生红球藻和微拟球藻在LED光照和氮源饥饿条件下生长与代谢产物合成特性(学位论文). 厦门: 厦门大学]
- Maxwell K, Johnson GN (2000). Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J Exp Bot*, 51 (345): 659–668
- Nhut DT, Takamura T, Watanabe H, et al (2003). Responses of strawberry plantlets cultured *in vitro* under super bright red and blue light-emitting diodes (LEDs). *Plant Cell Tiss Org*, 73 (1): 43–52
- Paradiso R, Meinen E, Snel JFH, et al (2010). Spectral dependence of photosynthesis and light absorbance in single leaves and canopy in rose. *Sci Hortic*, 127 (4): 548–554
- Pashkovskiy PP, Soshinkova TN, Korolkova DV, et al (2018). The effect of light quality on the pro-/antioxidant balance, activity of photosystem II, and expression of light-dependent genes in *Eutrema salsugineum* callus cells. *Photosynth Res*, 136 (2): 199–214
- Shao XM (2016). Effects of different nitrogen concentrations on growth and lipid accumulation of *Chlorella emersonii* (dissertation). Taigu, Shanxi: Shanxi Agricultural University (in Chinese with English abstract) [邵雪梅(2016). 不同氮浓度对埃氏小球藻生长及油脂积累的影响(学位论文). 山西太谷: 山西农业大学]
- Shin KS, Murthy HN, Heo JW, et al (2008). The effect of light quality on the growth and development of *in vitro* cultured *Doritaenopsis* plants. *Acta Physiol Plant*, 30 (3): 339–343
- Wang HMD, Li XC, Lee DJ, et al (2017). Potential biomedical applications of marine algae. *Bioresource Technol*, 244 (5): 1407–1415
- Weesepeol Y, Vincken JP, Pop RM, et al (2013). Sodiation as a tool for enhancing the diagnostic value of MALDI-TOF/TOF-MS spectra of complex astaxanthin ester mixtures from *Haematococcus pluvialis*. *J Mass Spectrom*, 48 (7): 862–874

- Wu XJ, Liu HY, Gu JR, et al (2015). Utilization of *Haematococcus pluvialis* in aquaculture. *China Feed*, (19): 27–29 (in Chinese with English abstract) [吴晓娟, 刘海燕, 顾继锐等(2015). 雨生红球藻在水产养殖中的应用. *中国饲料*, (19): 27–29]
- Xu DQ, Chen GY (2018). Perspectives of artificial photosynthesis. *Plant Physiol J*, 54 (7): 1145–1158 (in Chinese with English abstract) [许大全, 陈根云(2018). 展望人工光合作用. *植物生理学报*, 54 (7): 1145–1158]
- Zhang C, Zhang L, Liu J (2019). Exogenous sodium acetate enhances astaxanthin accumulation and photoprotection in *Haematococcus pluvialis* at the non-motile stage. *J Appl Phycol*, 31 (2): 1001–1008
- Zhang L, He M, Liu J, et al (2015). Role of the mitochondrial alternative oxidase pathway in hydrogen photoproduction in *Chlorella protothecoides*. *Planta*, 241 (4): 1005–1014
- Zheng J, Hu MJ, Guo YP (2008). Regulation of photosynthesis by light quality and its mechanism in plants. *Chin J Appl Ecol*, 19 (7): 1619–1624 (in Chinese with English abstract) [郑洁, 胡美君, 郭延平(2008). 光质对植物光合作用的调控及其机理. *应用生态学报*, 19 (7): 1619–1624]