

正交设计的诱导子组合对三角褐指藻岩藻黄素含量和光合生理及基因表达的影响

吴欣^a, 龚一富^{a*}, 邴露群^a, 高小雯^a, 吕娇^a, 王何瑜^{b*} (宁波大学, a. 海洋学院, 浙江省海洋生物工程重点实验室; b. 食品与药学院, 浙江 宁波 315832)

摘要:目的 研究光合诱导因子(PIF)、茉莉酸甲酯(MeJA)、硫酸铈铵(ACS)和乙酰水杨酸(ASA)不同浓度组合对三角褐指藻岩藻黄素含量的影响,筛选促进岩藻黄素积累的最佳诱导子组合,并研究最佳诱导子组合处理下岩藻黄素含量积累的光合生理及基因表达变化。方法 采用4因素4水平正交试验法筛选出对三角褐指藻岩藻黄素含量促进效果最佳的诱导子组合,调制叶绿素荧光(PAM)检测最佳诱导子组合处理下三角褐指藻的叶绿素荧光参数,反转录-实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测 *zds*、*lcyb*、*rbcL* 及 *psbA* 基因的表达水平。结果 正交试验结果表明,MeJA 是影响三角褐指藻藻细胞岩藻黄素积累最显著的因素,其次是 ASA。促进三角褐指藻岩藻黄素积累的最佳诱导子组合为 $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PIF + $0.2 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ACS + $40 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ASA。该诱导子组合处理下三角褐指藻岩藻黄素含量达到 $21.77 \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,较对照组提高了 104%。光合生理研究结果表明,诱导子组合显著提高了三角褐指藻藻细胞的最大相对电子传递速率($r\text{ETR}_{\text{max}}$)值($P < 0.05$)。RT-qPCR 分析结果表明,诱导子组合促进三角褐指藻岩藻黄素合成相关基因 *zds*、*lcyb* 及光合作用 PS II 碳同化相关基因 *rbcL*、*psbA* 基因的表达,其中, *rbcL* 基因的表达量最高,是对照处理组的 2.0 倍($P < 0.01$)。结论 三角褐指藻岩藻黄素含量与 *zds* 基因呈显著正相关,与 $r\text{ETR}_{\text{max}}$ 、*chl a* 含量、*lcyb*、*rbcL*、*psbA* 基因表达量呈极显著正相关,三角褐指藻可通过促进光合作用基因表达和 PS II 相对电子传递速率来提高光合作用效率、促进岩藻黄素合成相关基因表达来促进岩藻黄素积累。

关键词:三角褐指藻;岩藻黄素;正交试验;光合生理指标;基因表达

doi:10.11669/epj.2024.10.004 中图分类号:Q945 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)10-0879-08

Effects of Orthogonal Design Optimized Elicitor Combinations on Fucoxanthin Content and Photosynthetic Physiology and Gene Expression of *Phaeodactylum Tricornutum*

WU Xin^a, GONG Yifu^{a*}, LI Luqun^a, GAO Xiaowen^a, LÜ Jiao^a, WANG Heyu^{b*} (a. Key Laboratory of Marine Biotechnology of Zhejiang Province, School of Marine Sciences; b. College of Food and Pharmaceutical Sciences, Ningbo University, Ningbo 315832, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effects of different concentrations of photosynthetic induction factor (PIF), methyl jasmonate (MeJA), ceric ammonium sulfate (ACS) and acetylsalicylic acid (ASA) on the accumulation of fucoxanthin in *Phaeodactylum tricornutum*, screen the best elicitor combination for fucoxanthin accumulation, and study the photosynthetic physiology and gene expression changes of fucoxanthin accumulation in *Phaeodactylum tricornutum* under the treatment of the best inducer combination. **METHODS** A four-factor, four-level orthogonal test was used to screen the best inducer combination to promote the accumulation of fucoxanthin in *Phaeodactylum tricornutum*, and the chlorophyll fluorescence parameters of *Phaeodactylum tricornutum* under the treatment of the best elicitor combination were detected by pulse-amplitude-modulation (PAM). The expressions of *zds*, *lcyb*, *rbcL* and *psbA* were detected by RT-qPCR. **RESULTS** The results of the orthogonal test showed that MeJA was the most significant factor affecting the accumulation of fucoxanthin in *Phaeodactylum tricornutum* cells, followed by ASA, and the best elicitor combination to promote the accumulation of fucoxanthin in *Phaeodactylum tricornutum* was $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PIF + $0.2 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ACS + $40 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ASA. The photosynthetic physiological study showed that the inducer treatment was able to increase the fucoxanthin content by 104% compared with the control group, which was $21.77 \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$. The results of photosynthetic physiological study showed that the inducer combination significantly increased the $r\text{ETR}_{\text{max}}$ value ($P < 0.05$) of *Phaeodactylum tricornutum*. The expression of *rbcL* gene was the highest, which was

基金项目:宁波市社发重大项目资助(2017C510002);宁波大学横向项目资助(HX2022000115)

作者简介:吴欣,女,硕士研究生 研究方向:藻类生物技术 * **通讯作者:**龚一富,男,博士,教授 研究方向:植物次生代谢产物及机理
Tel: (0574) 87600889; 王何瑜,女,硕士,实验师 研究方向:藻类次生代谢调控 Tel: (0574) 87600551

2.0 times higher than that of the control treatment ($P < 0.01$). **CONCLUSION** The expressions of $rETR_{max}$, chl a content, *lcyb*, *rbcl* and *psbA* genes are highly significantly correlated with *zds* gene, and the photosynthetic efficiency can be improved by promoting the expression of photosynthetic genes and the relative electron transfer rate of PS II, and the expression of genes related to the synthesis of lutein can promote the accumulation of fucoxanthin in *Phaeodactylum tricornutum*.

KEY WORDS: *Phaeodactylum tricornutum*; fucoxanthin; orthogonal experiment; photosynthetic physiological index; gene expression

三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)隶属于褐指藻属,是一类具有较高经济价值的模式硅藻,易于培养,可以在多种培养基中生长。同时由于其生化特性^[1],对于高 pH 值具有耐受性^[2],且在低光照下也能生长^[3],在室外大规模培养中的优越性已显著超越其他微藻。三角褐指藻中能产生一种天然的次生代谢产物——岩藻黄素(fucoxanthin),岩藻黄素是叶黄素类胡萝卜素,有许多药理作用,如抗癌^[4-5]、抗炎^[6]、抗肥胖^[7]等,是一种具有开发应用价值的海洋药物。随着对岩藻黄素的开发和利用不断取得进展,近年生物制药市场对于岩藻黄素的需求也在提升,但由于三角褐指藻中的岩藻黄素含量较低,因此基于岩藻黄素的药物生产成本普遍较高,那么如何以低成本的方式提高三角褐指藻岩藻黄素含量成为工业化生产岩藻黄素药物的最大挑战。

目前提高植物中药物含量的方法主要有通过转基因技术获得过表达药物合成关键基因的植株^[8-9]、诱变育种获得高产药物的突变株^[10]、优化培养条件或添加外源诱导子来促进药物的积累等^[11-12]。相较而言添加外源诱导子成本较低且耗时短,比较适用于工业化生产,因此本研究选用4种诱导子来处理三角褐指藻以提高岩藻黄素的含量,而岩藻黄素的积累与诱导子种类及浓度有关。有研究表明,10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酰水杨酸(acetylsalicylic acid, ASA)、50 ~ 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)、0.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 花生四烯酸(arachidonic acid, AA)和0.4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸铈铵(ammonium cerous sulfate, ACS)均显著促进三角褐指藻岩藻黄素含量^[13-16]。Zhu等^[17]用0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ACS处理三角褐指藻使岩藻黄素含量较对照组上升60%。Li等^[18]用1 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的光合作用促进剂(photosynthetic induction factor, PIF)处理三角褐指藻使岩藻黄素含量提高1.44倍。之前的研究均采用单因素研究诱导子对三角褐指藻岩藻黄素含量的影响,而不同诱导子组合是否能更进一步提高三角褐指藻岩藻黄素含量还未见相关报道。正交实验设计是一种能够处理多因素实验并筛选出最佳组合的有效方法。通过正交实验可以用最少的实验次数,从多种因素中

筛选影响岩藻黄素含量的最优组合。本研究采用4因素4水平,使用正交设计筛选促进三角褐指藻岩藻黄素含量的最佳诱导子组合,为三角褐指藻岩藻黄素的规模化生产提供基础。

岩藻黄素的合成与光合生理和基因表达相关,PIF处理可通过提高三角褐指藻光合作用效率和相关基因表达来促进岩藻黄素的积累,岩藻黄素含量与PS II实际光合产量呈极显著正相关,且与基因表达也有很强的相关性,其中*lcyb*与岩藻黄素含量相关性最高^[18]。MeJA、ASA和ACS可通过调控三角褐指藻的岩藻黄素合成相关基因的表达来促进三角褐指藻岩藻黄素的积累^[12-13,15]。本论文优化的诱导子组合是否对三角褐指藻光合生理、光合作用相关基因和岩藻黄素合成相关基因的表达有影响值得进一步研究,本研究为深入阐明岩藻黄素合成的生理生化和分子调控机理提供基础。

1 材料与方法

1.1 三角褐指藻的培养

三角褐指藻藻种由宁波大学海洋学院藻类生物工程重点实验室提供。以1:10的比例将藻细胞接种于改良版的f/2液体培养基中。所有藻均在光强为60 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、温度为(20 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$ 、光暗比为12 h:12 h的条件下培养,每天随机调换三角瓶的位置并定时充分摇动3次。

1.2 正交实验设计

以PIF、MeJA、ACS和ASA四种外源诱导子为考察因素,选择 $L_{16}(4^4)$ 正交表,设计了4因素4水平正交实验,表头设计见表1。正交表和16种组合处理及四因素的详细配比见表2。按照表2的试验条件,当三角瓶中的三角褐指藻生长至指数生长期时,即当藻液680 nm波长处的光密度(optical density at 680 nm, OD_{680})达到0.2时,加入不同因素配比的诱导子进行处理,每个处理至少3个重复。

1.3 细胞密度的测定

将生长至指数期的三角褐指藻用培养基按比例

稀释,在流式细胞仪的检测下计算藻细胞数量,再用紫外分光光度计测定相应的 OD₆₈₀ 值,绘制 OD 与藻细胞密度的标准曲线。开始处理后每 24 h 测定藻液的 OD₆₈₀ 值,根据标准曲线计算相应的细胞密度(公式 1)。

$$y = 8.6972x + 0.1204 \quad \text{公式(1)}$$

式中 y 为细胞密度 ($1.0 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$), x 为 680 nm 处的光密度值; r 为相关系数, $r^2 = 0.9991$ 。

表 1 四种诱导子处理三角褐指藻的 L16(4⁴) 正交试验表头设计表

Tab. 1 Tabular header design table for L16(4⁴) orthogonal test of four inducer treatments of *Phaeodactylum tricornutum*

| No. | A | B | C | D |
|-----|--|---|--------------------------------------|--------------------------------------|
| | PIF/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ | MeJA/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ | ACS/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ | ASA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0.1 | 100 | 0.1 | 10 |
| 3 | 1 | 200 | 0.2 | 20 |
| 4 | 10 | 400 | 0.4 | 40 |

注:PIF - 光合诱导因子;MeJA - 茉莉酸甲酯;ACS - 硫酸钾铵;ASA - 乙酰水杨酸。

Note:PIF - photosynthetic induction factor; MeJA - methyl jasmonic; ACS - ammonium cerous sulfate; ASA - acetosalicylic acid

1.4 三角褐指藻岩藻黄素及叶绿素 a 含量的测定

采用有机溶剂提取法^[19],收集 90 mL 指数生长末期的三角褐指藻藻液,在 4 °C 下以 5 000 r · min⁻¹ 的转速离心 10 min,弃上清,藻泥在 -80 °C 超低温冰箱中冷冻 2 d 后用冷冻干燥机干燥 48 h,按照 1 g:40 mL 的比例加入无水乙醇,并用冷冻研磨仪充分研磨破碎藻细胞,破碎后浸提 2 次。浸提液以 5 000 r · min⁻¹ 的转速离心 10 min,收集上清,利用紫外分光光度计测定 445 nm 处的光密度值 (OD₄₄₅)^[20]。按公式 2 计算岩藻黄素含量。

$$\text{岩藻黄素含量} (\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}) = 1\,000 \times \text{OD}_{445} \times N \times V / (\text{OD}' \times M \times 100) \quad \text{公式(2)}$$

式中:OD₄₄₅ 表示上清液在 445 nm 处的光密度; N 为稀释倍数; V 为粗提液的体积;OD' 为 1% 的岩藻黄素标准品在 1 cm 光程长的比色皿中的理论吸收值,即 1 600; M 为样品干质量。

取三角褐指藻藻液 10 mL,在 4 °C 条件下以 4 000 r · min⁻¹ 的转速离心 10 min,弃上清,双蒸水冲洗藻泥 2 次,加入体积分数 90% 丙酮溶液,4 °C 黑暗处理 24 h 后,再次以 5 000 r · min⁻¹ 的转速离心 10 min,收集上清液,利用紫外分光光度计测定上清液在 OD₆₆₄、OD₆₃₀、OD₆₄₇ 和 OD₇₅₀ 处的光密度

值^[21-22]。根据公式 3 计算叶绿素 a 含量:

$$\text{叶绿素 a 含量} (\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}) = [11.85 (\text{OD}_{664} - \text{OD}_{750}) - 1.54 (\text{OD}_{647} - \text{OD}_{750}) - 0.08 (\text{OD}_{630} - \text{OD}_{750})] \times V / (M \times L) \quad \text{公式(3)}$$

式中: V 为样品提取液体积 (mL); M 为样品质量 (g); L 为比色皿光程 (cm)。

1.5 三角褐指藻叶绿素荧光参数的测定

使用 AquaPen 手持式藻类荧光测量仪 FAQ 测定各荧光参数。取样后将待测藻液置于黑暗中 15 min,并在避光条件下倒入测量杯中。根据藻体密度将系统实时荧光值 (Ft 值) 调至 5 000 以下,光化学光设置为 600 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 以获得 PS II 最大光化学效率 (F_v/F_m)、PS II 实际光化学效率 [$Y(\text{II})$]、光化学淬灭系数 (photochemistry quenching, QP)、非光化学淬灭系数 (non-photochemistry quenching, NPQ)。再次取待测藻液暗适应 5 ~ 10 s 后进行快速光响应曲线 (RLC) 的测定,RLC 用公式 4 进行拟合,进一步计算 PS II 最大相对电子传递速率 ($r\text{ETR}_{\text{max}}$) 及表观光能利用效率 (α)^[23]。

$$r\text{ETR} = \text{PAR} / (a \times \text{PAR}2 + b \times \text{PAR} + c) \quad \text{公式(4)}$$

PAR 为光的光合有效辐射, a 、 b 、 c 均为软件 origin 拟合曲线计算出来的。

1.6 三角褐指藻总 RNA 提取及岩藻黄素合成、光合作用相关基因表达分析

取 100 mL 三角褐指藻藻液,收集藻泥,根据使用制造商提供的说明书,使用 RNA 提取试剂盒 (plant RNA Kit, OMEGA) 提取三角褐指藻总 RNA,使用 HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (南京诺维赞) 试剂盒反转录总 RNA 得到 cDNA。根据美国国立生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 数据库中已知的三角褐指藻岩藻黄素合成相关基因及光合作用相关基因的核心序列,选择 ζ -胡萝卜素脱氢酶基因 (zds)、番茄红素 β -环化酶基因 ($lcyb$)、光系统 II 蛋白 D1 基因 ($psbA$)、核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶大亚基基因 ($rbcL$),用 Oligo7 设计特定引物^[24],上海生工生物工程公司合成, β -actin 基因作为管家基因。反转录-实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-qPCR) 反应程序如下:95 °C 预变性 3 min,40 轮扩增循环 (95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 20 s), 72 °C 延伸 10 min, 16 °C 保存。运用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法处理 RT-qPCR 的数据。

1.7 数据统计与分析

IBM SPSS26 软件对岩藻黄素含量与光合生理

指标进行相关性分析,其中符合正态分布的数据选择 Pearson 相关性分析,不符合正态分布的数据选择 Spearman 相关性分析,显著性分析采用最小显著差异法(least significant difference, LSD),正交实验设计数据进行方差分析以及直观分析, $P < 0.05$ 为显著差异, $P < 0.01$ 为极显著差异,使用 Graphpad Prism 9 作图。所有实验独立重复 3 次,数据记录为平均值和标准偏差(SD)。

2 实验结果与分析

2.1 外源诱导子组合对三角褐指藻岩藻黄素含量的影响

采用 4 因素 4 水平正交实验研究不同外源诱导子组合对三角褐指藻岩藻黄素含量的影响,结果表明(表 2~3),在不同的诱导子组合下,培养至平台期的三角褐指藻岩藻黄素含量范围为 $5.858 \sim 22.16 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。直观分析和方差分析结果表明,MeJA 和 ASA 对三角褐指藻岩藻黄素含量有极显著差异,但 MeJA 抑制岩藻黄素的积累,而 ASA 促进岩藻黄素的积累。根据 F 值大小确定 4 种诱导子对岩藻黄素含量积累影响的主次因素,结果表明,影响三角褐指藻岩藻黄素含量积累的主次关系为 $B > D > C > A$,即参试的 4 个诱导子中 MeJA 的影响最大,其次是 ASA,然后是 ACS 和 PIF。根据各因素水平均值得出促进三角褐指藻岩藻黄素含量增加的最佳诱导子组合为 $A_3B_1C_3D_4$,即最优诱导子组合为 $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PIF + $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ACS + $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ASA。该组合与正交试验表中第 9 号培养基组合相同,在该诱导子组合下,三角褐指藻岩藻黄素含量最高,达到 $22.16 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

2.2 最优诱导子组合对三角褐指藻细胞生长和岩藻黄素含量的影响

研究最优诱导子组合对三角褐指藻藻细胞生长的影响,结果表明,三角褐指藻在接种的第 2 天至第 9 天生长迅速,藻细胞密度逐渐增加并在第 12 天达到最大值(图 1)。最优诱导子组合下培养的藻类细胞生长低于对照组,在第 9 天时,诱导子组合组三角褐指藻细胞生长量为 $8.789 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$,是对照组的 0.8 倍,说明最优诱导子组合抑制三角褐指藻藻细胞的生长。

研究最优诱导子组合对三角褐指藻岩藻黄素和叶绿素 a 含量的影响(图 1),结果表明,与对照组相比,诱导子组合能显著促进三角褐指藻岩藻黄素的积累,对照组的岩藻黄素含量为 $10.67 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 时,

表 2 4 种诱导子处理三角褐指藻的正交实验设计与直观分析。 $n = 3, \bar{x} \pm s$

Tab. 2 Orthogonal experimental design and intuitive analysis of four inducers for the treatment of *P. tricornutum*. $n = 3, \bar{x} \pm s$

| No. | Factors | | | | Fucoxanthin content / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ |
|-----|---------|-------|-------|-------|--|
| | A | B | C | D | |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | $11.03 \pm 0.865^{\text{cd}}$ |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | $13.20 \pm 0.323^{\text{de}}$ |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | $12.97 \pm 1.825^{\text{de}}$ |
| 4 | 1 | 4 | 4 | 4 | $8.252 \pm 1.015^{\text{b}}$ |
| 5 | 2 | 1 | 2 | 3 | $10.27 \pm 0.694^{\text{bc}}$ |
| 6 | 2 | 2 | 1 | 4 | $13.60 \pm 0.243^{\text{e}}$ |
| 7 | 2 | 3 | 4 | 1 | $9.50 \pm 0.360^{\text{bc}}$ |
| 8 | 2 | 4 | 3 | 2 | $9.332 \pm 1.080^{\text{bc}}$ |
| 9 | 3 | 1 | 3 | 4 | $22.16 \pm 1.831^{\text{g}}$ |
| 10 | 3 | 2 | 4 | 3 | $9.134 \pm 1.822^{\text{bc}}$ |
| 11 | 3 | 3 | 1 | 2 | $9.163 \pm 1.406^{\text{bc}}$ |
| 12 | 3 | 4 | 2 | 1 | $8.748 \pm 1.503^{\text{bc}}$ |
| 13 | 4 | 1 | 4 | 2 | $19.00 \pm 0.083^{\text{f}}$ |
| 14 | 4 | 2 | 3 | 1 | $5.858 \pm 0.545^{\text{a}}$ |
| 15 | 4 | 3 | 2 | 4 | $9.099 \pm 0.832^{\text{bc}}$ |
| 16 | 4 | 4 | 1 | 3 | $10.04 \pm 0.784^{\text{bc}}$ |
| k1 | 15.03 | 20.81 | 14.61 | 11.71 | — |
| k2 | 14.23 | 13.81 | 13.65 | 16.78 | — |
| k3 | 16.40 | 13.57 | 16.77 | 14.13 | — |
| k4 | 14.66 | 12.12 | 15.29 | 17.70 | — |
| R | 2.16 | 8.69 | 3.11 | 5.99 | — |

注:k1、k2、k3、k4—各因素在水平 1、2、3、4 处理条件下的平均值;R—各因素的极差;a、b、c、d、e、f—是否有显著差异,字母相同为无显著差异,字母不同表示有显著差异。

Note:k1, k2, k3, and k4—the mean of each factor under the treatment conditions of levels 1, 2, 3, and 4; R—the extreme difference of each factor; a, b, c, d, e, f—whether there is a significant difference or not, the same letter means there is no significant difference, different letters means there is a significant difference.

表 3 4 种诱导子处理三角褐指藻的正交实验结果方差分析

Tab. 3 Analysis of variance (ANOVA) of the results of an orthogonal test of four inducers for the treatment of *P. tricornutum*

| Source of variation | Square sum | Degrees of freedom | Mean square | F | P | Significance |
|---------------------|------------|--------------------|-------------|--------|-------|--------------|
| PIf(A) | 17.781 | 3 | 5.927 | 0.685 | 0.567 | — |
| MeJA(B) | 307.111 | 3 | 102.370 | 11.837 | 0.000 | 1) |
| ACS(C) | 34.750 | 3 | 11.583 | 1.339 | 0.277 | — |
| ASA(D) | 148.569 | 3 | 49.523 | 5.726 | 0.003 | 1) |
| Error | 302.689 | 35 | 8.648 | | | |

注:1) $P < 0.01$, 表明差异性极显著。

Note: 1) $P < 0.01$, indicating a highly significant difference.

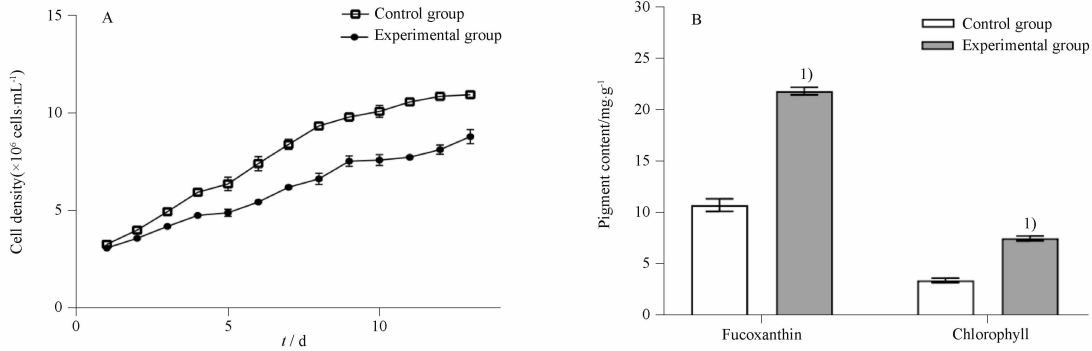
诱导子组合组处理的三角褐指藻岩藻黄素含量达到 $21.77 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,比对照组提高了 104%。诱导子组合组处理三角褐指藻,其叶绿素 a 含量的变化趋势与岩藻黄素一致,叶绿素 a 含量为对照组的 2.03

倍,说明诱导子在促进岩藻黄素含量的同时也促进了三角褐指藻叶绿素 a 的积累。

2.3 最优诱导子组合对三角褐指藻叶绿素荧光参数的影响

研究最优诱导子组合对三角褐指藻叶绿素荧光参数的影响,结果表明(表 4),诱导子组合组的三角褐指藻 F_v/F_m 并未发生明显变化,

NPQ、Y(II)、QP、 α 值有小幅度的增加,但不显著。而 $rETR_{max}$ 显著高于对照组。光相应曲线结果表明(图 2),实验组和对照组的三角褐指藻 RLC 在 $0 \sim 300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 之间随着光化光强度的增加,三角褐指藻 $rETR$ 快速上升,在 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 后达到相对稳定的状态,且实验组组的整体相对电子传递速率要高于对照组。



A - 三角褐指藻生长曲线; B - 三角褐指藻色素含量; 与对照组相比, ¹⁾ $P < 0.01$ 。

A - growth curve of *P. tricornutum*; B - pigment content of *P. tricornutum*, ¹⁾ $P < 0.01$, vs the control group.

图 1 诱导子最佳组合对三角褐指藻细胞生长和色素含量的影响. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 1 Effects of optimum combination of elicitors on the growth and the pigments content of *P. tricornutum*. $n = 3, \bar{x} \pm s$

表 4 最佳诱导子组合对三角褐指藻各叶绿素荧光参数的影响. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Tab. 4 Effects of optimum combination of elicitors on chlorophyll fluorescence parameter expression in *P. tricornutum*. $n = 3, \bar{x} \pm s$

| Group | F_v/F_m | NPQ | QP | Y(II) | $rETR_{max}$ | α |
|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------------|-------------------|
| Control group | 0.645 ± 0.010 | 0.073 ± 0.006 | 0.923 ± 0.306 | 0.520 ± 0.361 | 55.132 ± 0.839 | 0.311 ± 0.005 |
| Experimental group | 0.642 ± 0.008 | 0.087 ± 0.208 | 0.970 ± 0.000 | 0.573 ± 0.116 | $58.386 \pm 0.199^{1)}$ | 0.289 ± 0.138 |

注:与对照组相比, ¹⁾ $P < 0.05$ 。

Note: ¹⁾ $P < 0.05$, vs the control group.

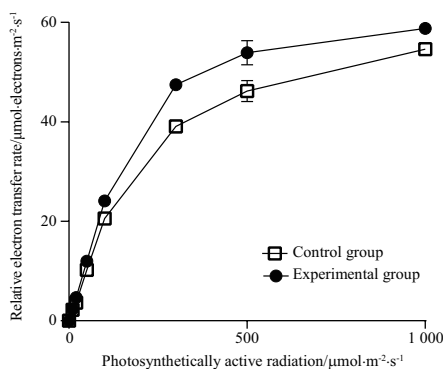


图 2 三角褐指藻的光响应曲线分析. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 2 Rapid light curves of *P. tricornutum*. $n = 3, \bar{x} \pm s$

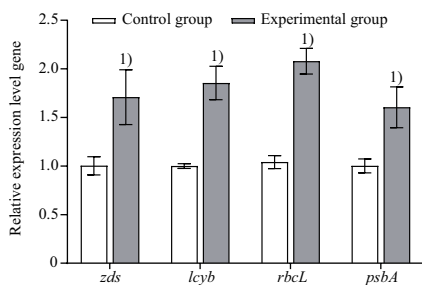
2.4 诱导子组合对三角褐指藻岩藻黄素生物合成及光合作用相关基因表达影响

研究诱导子组合对三角褐指藻岩藻黄素合成及光合作用相关基因表达的影响,结果表明(图 3),实

验组的岩藻黄素合成相关基因 *zds*、*lcyb* 以及光合作用相关基因 *rbcl*、*psbA* 的表达量较对照组极显著上调 ($P < 0.01$)。其中 *rbcl* 基因的表达量最高,为对照组的 2.0 倍,说明诱导子促进岩藻黄素合成与岩藻黄素合成途径以及光合作用相关通路基因的表达有关。

2.5 三角褐指藻叶绿素荧光参数与岩藻黄素及相关基因表达的相关性分析

岩藻黄素含量与 *zds*、*lcyb*、*rbcl* 和 *psbA* 基因表达水平、叶绿素荧光参数及叶绿素 a 含量的相关性分析结果表明(表 5),岩藻黄素含量与叶绿素含量、*lcyb* 基因、*psbA* 基因、 $rETR_{max}$ 呈极显著正相关 ($P < 0.01$),与 *zds* 基因、*rbcl* 基因均呈显著正相关 ($P < 0.05$)。其中,与岩藻黄素含量相关性最高的基因为 *lcyb* ($r = 0.967, P = 0.002$),相关性最高的叶绿素荧光参数为 $rETR_{max}$ ($r = 0.969, P = 0.001$)。 F_v/F_m 、NPQ、QP、Y(II) 及 α 与岩藻黄素含量则无显著相关性。



与对照组相比, ¹⁾ $P < 0.01$ 。

¹⁾ $P < 0.01$, *vs* the control group.

图3 诱导子最佳组合处理下三角褐指藻各基因转录差异。
 $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 3 Transcript levels induced by optimum combination of elicitors in *P. Tricornutum*. $n = 3, \bar{x} \pm s$

表5 三角褐指藻岩藻黄素含量与叶绿素荧光参数及相关基因的相关性分析

Tab. 5 Correlation analysis of fucoxanthin content with chlorophyll fluorescence parameters and expression of related genes in *P. tricornutum*

| Related parameters | Fucoxanthin content | <i>chl a</i> | <i>zds</i> | <i>lcyb</i> | <i>rbcL</i> | <i>psbA</i> | <i>Fv/Fm</i> | NPQ | QP | Y(II) | rETR _{max} | α |
|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|--------|----------------------|--------|---------------------|----------|
| Fucoxanthin | 1 | | | | | | | | | | | |
| <i>Chla</i> | 0.998 ²⁾ | 1 | | | | | | | | | | |
| <i>zds</i> | 0.883 ¹⁾ | 0.858 ¹⁾ | 1 | | | | | | | | | |
| <i>lcyb</i> | 0.967 ²⁾ | 0.952 ²⁾ | 0.973 ²⁾ | 1 | | | | | | | | |
| <i>rbcL</i> | 0.794 | 0.769 | 0.938 ²⁾ | 0.889 ²⁾ | 1 | | | | | | | |
| <i>psbA</i> | 0.919 ²⁾ | 0.896 ¹⁾ | 0.920 ²⁾ | 0.950 ²⁾ | 0.851 ¹⁾ | 1 | | | | | | |
| <i>Fv/Fm</i> | -0.153 | -0.108 | -0.514 | -0.344 | -0.704 | -0.413 | 1 | | | | | |
| NPQ | 0.123 | -0.031 | 0.772 | 0.783 | 0.772 | 0.679 | -0.833 ¹⁾ | 1 | | | | |
| QP | 0.757 | 0.761 | 0.789 | 0.791 | 0.825 ¹⁾ | 0.804 | -0.490 | 0.557 | 1 | | | |
| Y(II) | 0.752 | 0.749 | 0.692 | 0.730 | 0.845 ¹⁾ | 0.750 | -0.521 | 0.318 | 0.815 ¹⁾ | 1 | | |
| rETR _{max} | 0.969 ²⁾ | 0.966 ²⁾ | 0.842 ¹⁾ | 0.934 ²⁾ | 0.673 | 0.870 ¹⁾ | 0.006 | 0.463 | 0.633 | 0.567 | 1 | |
| α | -0.657 | -0.771 | -0.771 | -0.725 | -0.657 | -0.714 | 0.143 | -0.216 | -0.880 ¹⁾ | -0.647 | -0.657 | 1 |

注:显著相关, ¹⁾ $P < 0.05$;极显著相关, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Note: ¹⁾ $P < 0.05$, significant correlation; ²⁾ $P < 0.01$, highly significant correlation.

相较于单一的诱导子,利用不同诱导子之间的协同作用组合处理植物往往可以使得其次生代谢产物的含量得到更大的提升^[26]。Wang等^[27]发现2,4-D + Fe³⁺ + 光合细菌 + CO₂的添加剂组合可以促进小球藻生长和脂质的积累。MeJA与其他激素相互作用调节植物次生代谢产物的合成,在胡萝卜中SA与MeJA组合可显著促进花青素的合成^[28]。油酸与MeJA联合使用对粗毛纤孔菌三萜产量有协同作用,可有效促进粗毛纤孔菌的三萜富集^[29]。苯并噻二唑(benzothiadiazole, BTH)与SA组合促进发芽种子酚类物质、类胡萝卜素含量积累方面比单独使用BTH更加有效^[30]。这些研究均表明诱导子组合影响次生代谢产物积累是可行且有效的。本研究结果也表明,单独使用MeJA不利于三角褐指藻岩藻黄素的合成,而PIF、ASA、

3 讨论

三角褐指藻是优质的海洋经济微藻,可以积累岩藻黄素,并具有生长速度快、可从废弃资源如废水中回收养分等优点,从而提供更高的工艺周转率和经济可行的加工替代品,那么如何低成本高效率地提高其岩藻黄素的含量是现在的重要问题。而诱导子可以引起藻类快速、高度特异且有选择性的方式诱导特定基因的表达,从而激活次级代谢的目标途径,提高次生代谢产物的产量^[25],基于此,本研究选用了价格低廉的PIF、MeJA、ACS、ASA作为诱导子来促进三角褐指藻岩藻黄素的含量。

ACS组合可显著促进三角褐指藻岩藻黄素的合成与积累。

光合作用是藻类最基本的生理生化活动,光合作用的效率直接影响着藻类的生长速度和次生代谢产物的合成速率。*Fv/Fm*表示光化学系统的最大光化学量子产率,可以反映藻类光学系统反应中心捕获激发能量的效率^[28],一般来说只有当藻细胞受到环境因素的胁迫时才会发生显著变化,而在本研究中诱导子组合组的*Fv/Fm*较对照组并无区别,说明诱导子组合不会改变三角褐指藻的最大光合潜力,同时也不会对其光合系统造成严重损害。QP是PS II吸收的能量用于光化学反应的比例,反映了光合活性的高低,诱导子组合组的QP略高于对照组,诱导子的处理使得三角褐指藻对高光敏感度下降,在光源不那么充足的情况下也可以保证一定的光合

效率。rETR 代表 PS II 系统中的电子相对传递速率,反映了光合细胞器的光利用率^[29],而 Y(II) 是 PS II 实际光能转换效率,可以反映实时能量的捕获效率,本研究表明 rETR_{max} 与岩藻黄素含量 ($r = 0.969, P = 0.001$)、叶绿素 a 含量 ($r = 0.966, P = 0.002$) 成正相关,结合诱导子组合组的 QP 值的增加,可能是促进了藻细胞的卡尔文循环,提高了二氧化碳同化率,诱导 PS II 反应中心的开放,从而提高电子从 PS I 传递到 PS II 再到其他系统的电子传输速率^[30]。同时, *rbcL* 基因与叶绿素荧光中的 QP 和 Y(II) 呈显著正相关,进一步说明三角褐指藻可以通过提高藻细胞的光合作用效率达到促进岩藻黄素积累的目的。

植物的光合作用与核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶 (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, Rubisco) 大亚基基因 *rbcL* 和 PS II 反应中心蛋白 D1 基因 *psbA* 密切相关。*RbcL* 基因反应二氧化碳的固定效率从而决定植物的光合效率^[31-32], *psbA* 基因可以在一定程度上反映植物固碳两个过程的初始反应与状态,从而间接反映光合途径上下游的基因表达状态^[33]。本研究结果表明,诱导子组合显著促进了 *rbcL* 和 *psbA* 基因的表达,岩藻黄素含量与 *psbA* 基因 ($r = 0.919, P = 0.010$) 呈显著正相关,与 *rbcL* 基因呈中等正相关 ($r = 0.794, P = 0.059$),说明三角褐指藻岩藻黄素积累与光合作用相关基因表达相关。岩藻黄素属于光合作用的次生代谢产物,参与光合作用的 PS II,诱导子组合处理使藻细胞生长速度低于对照组,给藻细胞造成了非生物胁迫,藻内环境自我调节适应外界胁迫,加速电子传递链的速度,从而提高了光合作用效率,增加岩藻黄素的积累。Wei 等^[24] 在用雷帕霉素处理三角褐指藻时发现 *rbcS*、*psbA* 和 *rbcL* 基因对岩藻黄素合成贡献率最高,达到了 91.9%,这与本研究结果一致,说明, *psbA* 和 *rbcL* 基因的表达是影响三角褐指藻岩藻黄素合成的重要因子。岩藻黄素的合成除了与光合作用相关基因表达有关以外,还与岩藻黄素生物合成途径相关基因表达有关。本研究表明,诱导子组合可促进岩藻黄素合成途径中 *zds* 和 *lcyb* 基因的表达 ($P < 0.05$),且基因表达与岩藻黄素含量变化趋势一致,说明 *zds* 和 *lcyb* 基因也是调控岩藻黄素合成的关键基因。诱导子组合提高岩藻黄素积累的原因是因为诱导子组合通过调控合成相关基因及光合作用相关基因的表达,促进相对电子传递速率,提高二氧

化碳同化率,提高藻细胞光合作用效率,从而促进岩藻黄素的合成与积累。但本研究仅仅是对诱导子在特定光照、温度及接种密度下对三角褐指藻岩藻黄素含量影响的初步探讨,在实际的大规模培养中,还可以考虑最适合的接种密度以及环境因素的影响,以达到积累更多岩藻黄素的目的。

REFERENCES

- [1] ZHANG W, WANG F, GAO B, et al. An integrated biorefinery process: stepwise extraction of fucoxanthin, eicosapentaenoic acid and chrysolaminarin from the same *Phaeodactylum tricorutum* biomass [J]. *Algal Res*, 2018, 32: 193-200. DOI: 10.1016/j.algal.2018.04.002.
- [2] SPILLING K, BRYNJÓLFSDÓTTIRÁ, ENSS D, et al. The effect of high pH on structural lipids in diatoms [J]. *J Appl Phycol*, 2013, 25(5): 1435-1439.
- [3] REMMERS I M, MARTENS D E, WIJFFELS R H, et al. Dynamics of triacylglycerol and EPA production in *Phaeodactylum tricorutum* under nitrogen starvation at different light intensities [J]. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0175630. DOI:10.1371/journal.pone.0175630.
- [4] WANG Z, LI H, DONG M, et al. The anticancer effects and mechanisms of fucoxanthin combined with other drugs [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2019, 145(2): 293-301.
- [5] BAE M, KIM M B, PARK Y K, et al. Health benefits of fucoxanthin in the prevention of chronic diseases [J]. *BBA Mol Cell Biol Lipids*, 2020, 1865(11): 158618. DOI: 10.1016/j.bbalip.2020.158618.
- [6] CHEN W, ZHANG H, LIU Y. Anti-inflammatory and apoptotic signaling effect of fucoxanthin on benzo(A) pyrene-induced lung cancer in mice [J]. *J Environ Pathol*, 2019, 38(3): 239-251.
- [7] KOO S Y, HWANG J H, YANG S H, et al. Anti-obesity effect of standardized extract of microalga *Phaeodactylum tricorutum* containing fucoxanthin [J]. *Mar Drugs*, 2019, 17(5): 311. DOI: 10.3390/md17050311.
- [8] CEN S Y, LI D W, HUANG X L, et al. Crucial carotenogenic genes elevate hyperaccumulation of both fucoxanthin and β -carotene in *Phaeodactylum tricorutum* [J]. *Algal Res*, 2022, 64: 102691. DOI: 10.1016/j.algal.2022.102691.
- [9] GAIDARENKO O, MILLS D, VERNET M, et al. Overexpression of *Thalassiosira pseudonana* violaxanthin de-epoxidase-like 2 (VDL2) increases fucoxanthin while stoichiometrically reducing diadinoxanthin cycle pigment abundance [J]. *bioRxiv*, 2020. DOI:10.1101/2020.01.06.896316.
- [10] LIANG Y, XIN H C, YAN Y Y, et al. Mutating *Nitzschia closterium* f. minutissima with atmospheric and room temperature plasma and screening of high fucoxanthin yielding mutants [J]. *Period Ocean Univ China* (中国海洋大学学报 自然科学版), 2022, 52(7): 39-48.
- [11] DANAEI M, FARZINEBRAHIMI R, KADIR M A, et al. Effects of MeJA and SA elicitation on secondary metabolic activity, antioxidant content and callogenesis in *Phyllanthus pulcher* [J]. *Braz J Bot*, 2015, 38(2): 1-8.
- [12] BEGUNOVA A V, ROZHKOVA I V, SHIRSHOVA T I, et al. Optimization of cultivation conditions for the lactobacillus reuteri LR1 strain to improve the biosynthesis of bacteriocin-like substances [J]. *Appl Biochem Microbiol*, 2020, 56(9): 920-929.
- [13] YU K, GONG Y F, ZHU S Q, et al. Effects of different exoge-

- nous elicitors on lcyb gene transcription and fucoxanthin content in *Phaeodactylum tricornutum* [J]. *Chin J Agric Biotechnol* (农业生物技术学报), 2017, 25(12): 2009-2017.
- [14] CHEN J Y, GONG Y F, ZHU S Q, *et al.* Induced expression and bioinformatic analysis about phytoene desaturase gene (pds) from *Phaeodactylum tricornutum* [J]. *J Nucl Agric Sci* (核农学报), 2017, 31(12): 2306-2313.
- [15] ZHANG Y, GONG Y F, JING D D, *et al.* Effects of elicitors on fucoxanthin production and ZDS gene expression in *Phaeodactylum tricornutum* [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2017, 52(12): 1061-1068.
- [16] JIA Z M, GONG Y F, ZHANG L, *et al.* Bioinformatics, subcellular localization and expression analysis of *ZEP* family genes involved in fucoxanthin synthesis from *Phaeodactylum tricornutum* [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2022, 57(24): 2067-2076.
- [17] 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]. *J Chin Soc Rare Earths* (中国稀土学报), 2014, 32(6): 750-757.
- [18] LI S, ZHENG X, FANG Q, *et al.* Exploring the potential of photosynthetic induction factor for the commercial production of fucoxanthin in *Phaeodactylum tricornutum* [J]. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2021, 44(8): 1769-1779.
- [19] YAN X Y, LIU Y X, WU Y P, *et al.* Optimizing the processes of extracting and purifying fucoxanthin from *Laminaria japonica* [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol* (中国食品学报), 2014, 14(3): 115-121.
- [20] CHEN R S, ZHANG L, WEI F J, *et al.* Effects of Mn^{2+} on neutral lipid content, C4 pathway, and related gene expression in *Phaeodactylum tricornutum* [J]. *J Appl Phycol*, 2021, 33(4): 2123-2133.
- [21] YANG H L, DUAN S S. The ecological toxic effects of dibutyl phthalate on *Phaeodactylum tricornutum* [J]. *Ecol Environ* (生态环境学报), 2010, 19(9): 2155-2159.
- [22] CONG H B, HUANG Y L, ZHOU Z M, *et al.* A new measurement method for chlorophylls [J]. *Water Wastewater Eng* (给水排水), 2007(6): 28-32. DOI:10.13789/j.cnki.wwe1964.2007.06.007.
- [23] LI J A, WANG J Y, MEI Y H, *et al.* Effects of diurnal temperature difference on growth and chlorophyll fluorescence of *Phaeodactylum tricornutum* and *Heterosigma akashiwo* [J]. *Acta Hydrobiol Sin* (水生生物学报), 2022, 46(2): 194-202.
- [24] WEI F J, GONG Y F, ZHANG L, *et al.* Effects of rapamycin on the content of fucoxanthin in *Phaeodactylum tricornutum* and the expression of key enzyme genes [J]. *J Biol* (生物学杂志), 2022, 39(3): 72-77.
- [25] LIU R, WANG Z Y, CUI J, *et al.* Effects of precursors and elicitors on the synthesis polyphenols of *Pinus koraiensis* [J]. *J Beijing Forest Univ* (北京林业大学学报), 2013, 35(5): 22-27.
- [26] CHAYJARUNG P, PHONHERM M, INMANO O, *et al.* Influence of peanut hairy root cultivars on prenylated stilbenoid production and the response mechanism for combining the elicitors of chitosan, methyl jasmonate, and cyclodextrin [J]. *Planta*, 2022, 256(2): 32. DOI: 10.1007/s00425-022-03946-8. PMID: 35794498.
- [27] WANG Q, JIN W, ZHOU X, *et al.* Enhancement of biodiesel-promising microalgae *Chlorella pyrenoidosa* growth using stimulants in municipal sewage [J]. *Biomass Convers Biorefin*, 2021, 13: 813-820. DOI: 10.1007/s13399-020-01204-z.
- [28] SUDHA G, RAVISHANKAR G A. Elicitation of anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* and the involvement of methyl jasmonate and salicylic acid [J]. *Acta Physiol Plant*, 2003, 25(3): 249-256.
- [29] ZHOU J, LIN X, LIU S, *et al.* Effects of compound elicitors on the biosynthesis of triterpenoids and activity of defense enzymes from *Inonotus hispidus* (Basidiomycetes) [J]. *Mol Multidiscip Digit Publ Inst*, 2022, 27(9): 2618. DOI: 10.3390/molecules27092618.
- [30] SHARMA S, SOHAL B S. Insight into the biochemical changes induced in *Brassica juncea* (var. rlm619) on application of elicitors alone and in combinations [J]. *Indian J Agric Biochem*, 2017, 30(2): 121-128.
- [31] 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 Biosyst Eng*, 2018, 41(7): 1061-1071.
- [32] RALPH P J, GADEMANN R. Rapid light curves: a powerful tool to assess photosynthetic activity [J]. *Aquat Bot*, 2005, 82(3): 222-237.
- [33] CALATAYUD A, BARRENO E. Chlorophyll a fluorescence, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in tomato in response to ozone and benomyl [J]. *Environ Pollut*, 2001, 115(2): 283-289.

(收稿日期:2023-01-30)