

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16324

盐胁迫对雨生红球藻虾青素累积、虾青素合成相关酶基因表达和抗氧化指标的影响

江红霞¹, 林雄平², 轩文娟³

1. 河南师范大学 水产学院, 河南 新乡 453007;
2. 宁德师范学院 生物系, 福建 宁德 352100;
3. 河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007

摘要: 为探讨盐胁迫对雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)虾青素合成的影响与机理, 以及雨生红球藻各抗氧化机制之间的关系, 本研究采用生化和分子生物学方法研究了不同浓度(0.04 mol/L、0.08 mol/L、0.12 mol/L 和 0.16 mol/L)和不同时间(3 d、6 d 和 9 d)的盐(NaCl)胁迫对雨生红球藻生长、虾青素积累、番茄红素 β -环化酶(Lcy)、 β -胡萝卜素羟化酶(CrtR-B)和 β -胡萝卜素酮化酶(Bkt)基因表达、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性以及丙二醛(MDA)含量的影响。结果表明, 各胁迫时间的雨生红球藻的密度均随着盐胁迫浓度的增加而不断下降, 在盐胁迫的第 9 天, 雨生红球藻的死亡率和孢子比例均随着盐胁迫浓度的增加而不断升高; 雨生红球藻虾青素含量、Lcy、CrtR-B 和 Bkt 基因表达量均随着盐胁迫浓度和时间的增加而不断提高; 雨生红球藻 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性以及 MDA 含量在不同浓度和不同时间的盐胁迫下与对照组(0.00 mol/L NaCl)相比均升高, 且在不同时间的 0.12 mol/L NaCl 胁迫下与对照组相比均显著升高($P < 0.05$); 雨生红球藻虾青素含量、Lcy、CrtR-B 和 Bkt 基因表达量在盐胁迫的早期(第 3 天)和中期(第 6 天)阶段较低, 在盐胁迫的后期(第 9 天)阶段较高, 而 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性以及 MDA 含量在盐胁迫的早期和中期阶段较高, 在盐胁迫的后期阶段较低。实验结果说明了适当浓度和时间的盐胁迫能促进雨生红球藻累积虾青素, 雨生红球藻在盐胁迫下主要是通过提高虾青素合成相关酶基因的转录水平来促进虾青素的合成, 其虾青素和抗氧化酶的抗氧化活性可能互为补充, 共同保护雨生红球藻免受盐胁迫的氧化损伤。

关键词: 雨生红球藻; 盐胁迫; 虾青素; Lcy; CrtR-B; Bkt; 抗氧化酶; MDA

中图分类号: S96

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)06-1342-12

雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)是绿藻门、团藻目、红球藻科、红球藻属的一种淡水单细胞微藻。该藻在不利的环境条件下能产生大量的虾青素, 含量可高达其干重的 5.0%^[1]。虾青素(astaxanthin, 3-3',二羟基- β - β' 胡萝卜素-4-4',二酮)是一种氧化型类胡萝卜素, 是一种近年来进入国际研发领域的高价值的生物活性物质, 它具有极强的抗氧化活性, 被誉为是“超级维生素 E”, 并具有抗癌、增强机体免疫力、着色、安全性高等特点, 因而在食品、保健品、药品、化妆品以及

饲料领域都有很好的应用前景^[2]。

研究表明, 通过人为的设置高光照、高温、高盐或营养饥饿等胁迫手段, 可以促使雨生红球藻在恶劣的生存环境下由游动细胞转变为不动孢子, 并大量合成和积累虾青素^[3-8]。雨生红球藻中的虾青素的合成是在一系列酶的作用下完成的, 其中番茄红素 β -环化酶(Lcy)、 β -胡萝卜素羟化酶(CrtR-B)和 β -胡萝卜素酮化酶(Bkt)是合成过程中的 3 个重要酶, Lcy 催化番茄红素环化成 β -胡萝卜素, CrtR-B 和 Bkt 分别催化 β -胡萝卜素的羟基

收稿日期: 2016-10-30; 修订日期: 2017-04-19.

基金项目: 河南省重点科技攻关项目(102102210181); 河南省水产学重点学科基金项目(2012).

作者简介: 江红霞(1974-), 女, 副教授, 研究方向为水生生物资源与环境. E-mail: jianghongxia2007@126.com

化和酮基化反应,并最终形成虾青素^[9-10],因而这些酶基因表达量的增加可以有效提高雨生红球藻虾青素的合成效率。另外,各种胁迫作用在促进雨生红球藻合成虾青素的同时,还会激发其抗氧化系统释放更多的抗氧化酶来提高它的抗氧化能力。实验表明盐胁迫是诱导雨生红球藻合成虾青素的手段之一^[3, 11-13],但盐胁迫对雨生红球藻虾青素合成的关键酶基因表达和抗氧化酶活性的影响的研究尚未见报道。本实验在借鉴前人研究的基础上,探究了不同浓度的盐胁迫对雨生红球藻生长、虾青素积累、*Lcy*、*CrtR-B*和*Bkt*基因表达、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性以及丙二醛(MDA)含量的影响,以期为阐明雨生红球藻高效合成虾青素的条件和机理以及雨生红球藻体内各抗氧化机制之间的关系提供一定的理论基础。

1 材料与方 法

1.1 雨生红球藻的培养

雨生红球藻(FACHB-874)原藻种购于中国科学院水生生物研究所淡水藻种库。将处于对数生长期的藻种以适当的浓度转接入 MVA 培养基中静置培养,培养温度 25℃、光强 2000 lx、光照周期 12 h : 12 h (光 : 暗)、每天摇动 1~2 次。

1.2 雨生红球藻的盐胁迫处理

将培养至对数生长期的雨生红球藻(密度约 5×10^5 cell/mL) 3800 g 离心 5 min, 沉淀的藻细胞在 250 mL 的锥形瓶中重悬于 150 mL 新鲜的含有不同浓度氯化钠(NaCl)的培养基中,使接种密度调整为 1.5×10^5 cell/mL, 然后进行盐胁迫实验。胁迫实验设置 1 个对照组和 4 个实验组,实验组的培养基中分别加入 NaCl,使其终浓度分别为 0.04 mol/L、0.08 mol/L、0.12 mol/L 和 0.16 mol/L,对照组中不加 NaCl,盐浓度为 0 mol/L,每组各设 3 个重复。雨生红球藻的培养周期为 9 d,培养期间每日摇瓶 1~2 次,防止细胞贴壁,分别在培养的第 3 天、第 6 天和第 9 天检测藻密度、孢子比例、死亡率、虾青素含量、番茄红素 β -环化酶(*Lcy*)、 β -胡萝卜素羟化酶(*CrtR-B*)和 β -胡萝卜素酮化酶(*Bkt*)基因的相对表达量、超氧化物歧化酶(SOD)、

过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性以及丙二醛(MDA)的含量。

1.3 藻密度、孢子比例和死亡率的测定

用血球计数板进行显微计数测定藻密度。将雨生红球藻培养物充分摇匀后取 5 mL 放入试管中,用 4%戊二醛固定藻样后摇散,在奥林巴斯 BX61 双筒显微镜下计数,藻数目多时,可稀释后计数,每个重复计数 3 次,取平均值。同时在显微镜下观察藻细胞的形态变化,计算孢子比例和死亡率。

1.4 虾青素含量测定

参照 Boussiba 等^[14]以及韦韬等^[15-16]的方法测定虾青素含量。取 20 mL 藻液,3000 r/min 离心 10 min,弃上清液。藻沉淀中加入 5% KOH 和 30% 甲醇(体积比)破坏叶绿素,离心收集沉淀。向离心管中加入约 3 mL 含有少量醋酸的二甲基亚砜(DMSO),摇匀,70℃保温 5 min,保温过程不断摇匀离心管,然后离心并将上清液移入 10 mL 容量瓶中。沉淀中再加入 DMSO 反复抽提多次至藻体发白,然后高速离心,收集上清液。红色上清液用二甲基亚砜精确定容后,放入 1 cm 光径比色皿中,在 492 nm 波长下测定吸光度值 A_{492} ,DMSO 做空白对照。虾青素的含量计算公式为: $C = (A_{492} \times 1000) / (A_{1\text{cm}}^{1\%} \times 100)$; 其中, C 表示单位体积内的虾青素含量(mg/mL); 消光系数 $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 2220$; A_{492} 为 492 nm 处 1 cm 液层混合物的吸光值。另取 20 mL 藻液,离心,弃上清,藻沉淀于 80℃烘干至恒重,称重后计算每毫升藻液中雨生红球藻的干重。最后将虾青素含量换算成每克干重所含虾青素的毫克数(mg/g 干重)。

1.5 雨生红球藻虾青素合成相关酶基因的表达分析

基因表达分析采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法。用 primer 5.0 软件进行 qRT-PCR 引物设计,引物序列见表 1,引物由南京金斯瑞生物工程公司合成。用 Trizol 法提取不同浓度盐胁迫处理的雨生红球藻 RNA,用逆转录试剂盒 Prime-Script[®] RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa, Dalian, China)进行 cDNA 第一链的合成。以 cDNA

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列
Tab. 1 The sequences of primers for real-time quantitative PCR

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	退火温度/°C T_m	NCBI 登录号 GenBank ID	产物长度/bp product length
Lcy-F	TGGAGCTGCTGCTGTCCCT	61	AY182008	146
Lcy-R	GAAGAAGAGCGTGATGCCGA			
CrtR-B-F	ACACCTCGCACTGGACCCT	62	AF162276	147
CrtR-B-R	GTATAGCGTGATGCCAGCC			
Bkt-F	CAATCTTGTCAGCATTCGCGC	61	AY603347	140
Bkt-R	CAGGAAGCTCATCACATCAGAT			
18s-F	CAAAGCAAGCCTACGCTCT	60	AF159369.1	119
18s-R	ATACGAATGCCCCGACT			

为模板, 利用 SYBR Premix Ex TaqTM (TaKaRa, Japan)试剂盒在 CFX96TM 实时荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad, USA)上进行扩增, 反应条件为: 95°C 预变性 30 s; 95°C 5 s, 60°C 30 s, 40 个循环; 95°C 10 s; 熔解曲线: 以 0.5°C/s 从 65°C 缓慢增加到 95°C。以 18S 基因为内参, 每个样品设置 3 个平行。基因的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法^[17]计算。

1.6 粗酶液的提取和总蛋白的测定

将藻液以 5000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 藻沉淀中加入预冷的 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(PBS, pH 7.8), 冰浴条件下超声波破碎藻细胞和孢子, 12000 r/min 离心 10 min, 上清液为粗酶提取液, 4°C 保存待用。提取液的总蛋白含量根据考马斯亮蓝 G-250 法^[18]进行测定, 标准蛋白为牛血清白蛋白(BAS, 购于 BBI 公司)。

1.7 抗氧化酶活性和 MDA 含量的测定

SOD 活性按照氮蓝四唑光化学还原反应法^[19]进行测定, 以每毫克蛋白能引起反应初速度半抑制时的酶用量为 1 个 SOD 活力单位(U/mg 蛋白)。CAT 活性采用紫外分光光度法^[20]进行测定, 以每毫克蛋白每分钟使 A_{240} 下降 0.01 为 1 个 CAT 活力单位(U/mg 蛋白)。GSH-Px 活性采用南京建成生物工程研究所试剂盒进行测定, 方法参照产品说明书, 以每分钟每毫克蛋白扣除非酶反应作用、使反应体系中 GSH 浓度降低 1 $\mu\text{mol/L}$ 为 1 个 GSH-Px 活力单位(U/mg 蛋白)。MDA 含量测定采用硫代巴比妥酸法^[21], 测定原理是基于膜脂过氧化产物 MDA 可与硫代巴比妥酸反应生成红色产物, 在 532 nm 处有最大吸收峰($\mu\text{mol/mg}$ 蛋白)。

1.8 数据处理

实验数据以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm \text{SD}$)表示, 采用单因素方差分析(ANOVA)进行统计学检验, 利用 SPSS20.0 软件进行数据的统计分析和计算各指标之间的皮尔逊(Pearson)相关系数。统计学显著性水平设定 $P < 0.05$ 为显著性差异。

2 结果与分析

2.1 盐胁迫对雨生红球藻生长的影响

不同浓度盐胁迫对雨生红球藻生长的影响见表 2。最低浓度盐胁迫组(0.04 mol/L NaCl)的藻密度的变化与对照组(0.00 mol/L NaCl)相似, 随着生长时间的延长, 藻密度迅速增加。而 0.08 mol/L、0.12 mol/L 和 0.16 mol/L NaCl 胁迫组的藻密度增长缓慢, 且第 9 天时的藻密度与第 6 天时相比都下降了。各胁迫时间的藻密度均随着盐胁迫浓度的增加而逐渐下降。藻的死亡率均随着盐胁迫浓度的增加和胁迫时间的延长而逐渐升高。0.04 mol/L NaCl 胁迫组和对照组在 9 天的时间内均未出现不动孢子, 而 0.08 mol/L、0.12 mol/L 和 0.16 mol/L NaCl 胁迫组在第 6 天和第 9 天时出现大量的不动孢子, 尤其是 0.12 mol/L 和 0.16 mol/L NaCl 胁迫组的藻细胞在第 9 天时完全转变成不动孢子。

2.2 盐胁迫对雨生红球藻虾青素累积的影响

由图 1 可知, 在盐胁迫的第 3 天和第 6 天, 对照组中均未检测到虾青素, 但雨生红球藻虾青素含量随着盐胁迫浓度的增加而逐渐升高, 在 0.16 mol/L NaCl 胁迫组达到最大值, 并显著高于两个低浓度盐胁迫组(0.04 mol/L 和 0.08 mol/L

表 2 不同浓度盐胁迫对雨生红球藻生长的影响
Tab. 2 Effects of different concentrations of salt stress on the growth of *H. pluvialis*

$n=3; \bar{x} \pm SD$

生长指标 growth index	胁迫时间/d stress days	NaCl 浓度/(mol·L ⁻¹) salt concentrations				
		0.00	0.04	0.08	0.12	0.16
藻密度/($\times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$) algal cell density	3	6.53±0.85	6.22±0.91	3.46±0.46	3.52±0.21	3.49±0.38
	6	10.52±1.05	9.87±0.83	5.29±0.37	4.23±0.39	3.38±0.54
	9	12.91±0.94	12.03±0.92	4.58±0.24	3.23±0.28	3.06±0.19
死亡率/% mortality rate	3	0.00±0.00	0.00±0.00	0.24±0.03	0.27±0.06	1.83±0.08
	6	0.00±0.00	0.00±0.00	5.25±0.09	10.63±0.15	25.36±0.19
	9	0.55±0.05	1.08±0.05	28.53±0.21	30.75±0.46	42.36±0.74
孢子比例/% aplanospore proportion	3	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	6	0.00±0.00	0.00±0.00	45.25±0.15	48.98±0.47	53.54±0.93
	9	0.00±0.00	25.32±0.58	90.62±0.32	100.00±0.00	100.00±0.00

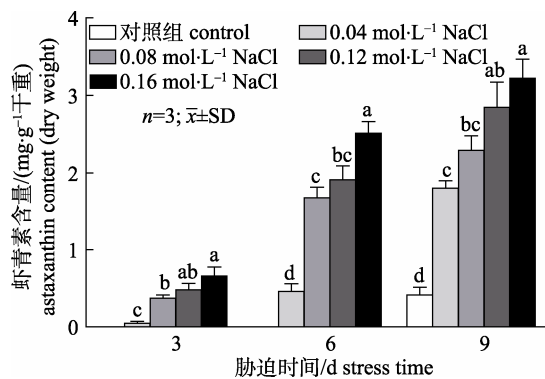


图 1 盐胁迫下雨生红球藻虾青素含量的变化
不同字母代表同一胁迫时间的不同处理组间差异显著, $P < 0.05$.

Fig. 1 Changes of the astaxanthin content in *H. pluvialis* under salt stress

Different letters mean significant difference among treatments at the same stress time, $P < 0.05$.

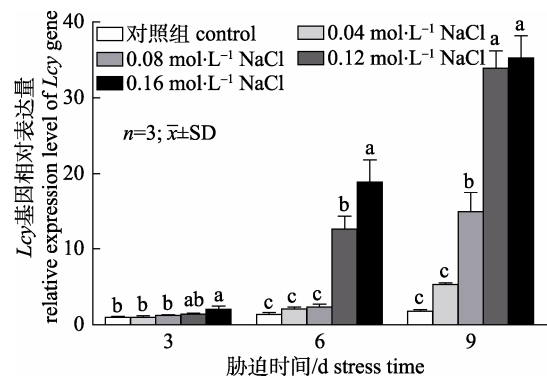


图 2 盐胁迫对雨生红球藻 *Lcy* 基因表达量的影响
不同字母代表同一胁迫时间的不同处理组间差异显著, $P < 0.05$.

Fig. 2 Effect of salt stress on the expression level of *Lcy* gene in *H. pluvialis*

Different letters mean significant difference among treatments at the same stress time, $P < 0.05$.

NaCl, $P < 0.05$)。在盐胁迫的第 9 天, 雨生红球藻虾青素含量也随着盐胁迫浓度的增加而逐渐升高, 在 0.16 mol/L NaCl 胁迫组达到最大值, 并显著高于 2 个低浓度盐胁迫组(0.04 mol/L 和 0.08 mol/L NaCl)和对照组($P < 0.05$)。各浓度盐胁迫组的虾青素含量均在第 9 天最高, 第 6 天次之, 第 3 天最低。

2.3 盐胁迫下雨生红球藻虾青素合成相关酶基因表达量的变化

用 qRT-PCR 的方法测定了盐胁迫下雨生红球藻 *Lcy*、*CrtR-B* 和 *Bkt* 基因表达量的变化(图 2~图 4)。*Lcy* 基因的表达量在盐胁迫的第 3 天, 0.16 mol/L NaCl 胁迫组显著高于对照组($P < 0.05$); 在盐胁迫的第 6 天, 0.12 mol/L 和 0.16 mol/L NaCl 胁迫组显

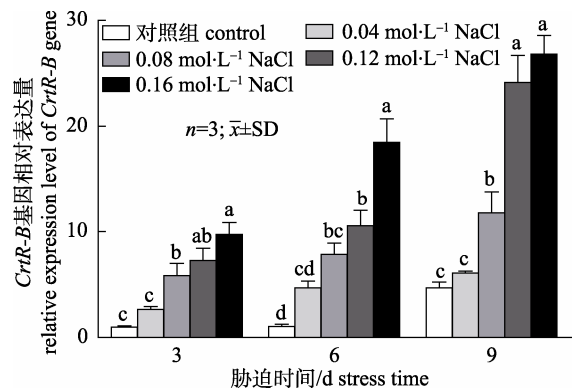


图 3 盐胁迫对雨生红球藻 *CrtR-B* 基因表达量的影响
不同字母代表同一胁迫时间的不同处理组间差异显著, $P < 0.05$.

Fig. 3 Effect of salt stress on the expression level of *CrtR-B* gene in *H. pluvialis*

Different letters mean significant difference among treatments at the same stress time, $P < 0.05$.

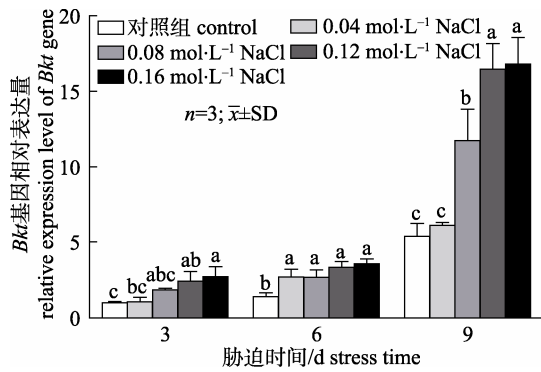


图 4 盐胁迫对雨生红球藻 *Bkt* 基因表达量的影响
不同字母代表同一胁迫时间的不同处理组间差异显著, $P<0.05$ 。

Fig. 4 Effect of salt stress on the expression level of *Bkt* gene in *H. pluvialis*

Different letters mean significant difference among treatments at the same stress time, $P<0.05$.

著高于对照组 ($P<0.05$); 在盐胁迫的第 9 天, 0.08 mol/L、0.12 mol/L 和 0.16 mol/L NaCl 胁迫组显著高于对照组 ($P<0.05$)。 *CrtR-B* 基因的表达量在盐胁迫的第 3 天、第 6 天和第 9 天, 0.08 mol/L、0.12 mol/L 和 0.16 mol/L NaCl 胁迫组均显著高于对照组 ($P<0.05$)。 *Bkt* 基因的表达量在盐胁迫的第 3 天, 0.12 mol/L 和 0.16 mol/L NaCl 胁迫组显著高于对照组 ($P<0.05$); 在盐胁迫的第 6 天, 0.04 mol/L、0.08 mol/L、0.12 mol/L 和 0.16 mol/L NaCl 胁迫组均显著高于对照组 ($P<0.05$); 在盐胁迫的第 9 天, 0.08 mol/L、0.12 mol/L 和 0.16 mol/L NaCl 胁迫组显著高于对照组 ($P<0.05$)。然而, 不同胁迫时间的雨生红球藻 *Lcy*、*CrtR-B* 和 *Bkt* 基因表达水平均随着盐胁迫浓度的增加而逐渐升高, 在 0.16 mol/L NaCl 胁迫组达到最大值, 并显著高于对照组 ($P<0.05$)。各浓度盐胁迫的雨生红球藻 *Lcy*、*CrtR-B* 和 *Bkt* 基因表达量均都在第 9 天最高, 第 6 天次之, 第 3 天最低。

2.4 雨生红球藻抗氧化酶活性对盐胁迫的响应

由图 5、图 7 可知, 在盐胁迫的第 3 天, 雨生红球藻 SOD 和 GSH-Px 酶活力均随着盐胁迫浓度的增加而逐渐升高, 在 0.16 mol/L NaCl 胁迫组达到最大值, 并显著高于最低浓度盐胁迫组 (0.04 mol/L NaCl) 和对照组 ($P<0.05$), 0.08 mol/L、0.12 mol/L 和 0.16 mol/L NaCl 胁迫组的雨生红球藻 SOD 和 GSH-Px 酶活力均无显著差异 ($P>0.05$)。在盐胁迫

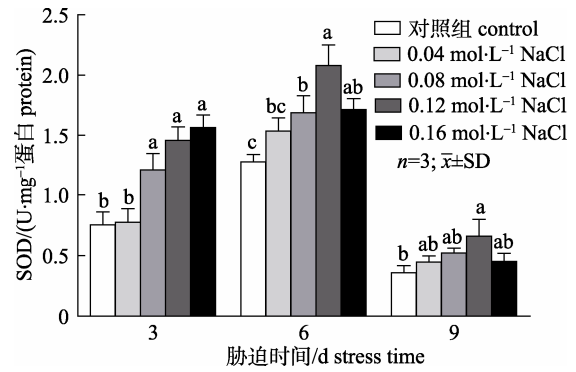


图 5 盐胁迫下雨生红球藻 SOD 酶活力的变化
不同字母代表同一胁迫时间的不同处理组间差异显著, $P<0.05$ 。
Fig. 5 Changes of SOD activity in *H. pluvialis* under salt stress
Different letters mean significant difference among treatments at the same stress time, $P<0.05$.

的第 6 天和第 9 天, SOD 和 GSH-Px 酶活力随着盐胁迫浓度的增加先升高后下降, 在 0.12 mol/L NaCl 胁迫组达到最大值, 并显著高于对照组 ($P<0.05$)。各浓度盐胁迫组的雨生红球藻 SOD 酶活力均为在第 6 天时最高, 第 3 天次之, 第 9 天最低, 而 GSH-Px 酶活力均为在第 3 天时最高, 第 6 天次之, 第 9 天最低。雨生红球藻 CAT 酶活力在盐胁迫下的变化见图 6, 各胁迫时间的雨生红球藻 CAT 酶活力均随着盐胁迫浓度的增加先升高后下降, 在 0.12 mol/L NaCl 胁迫组达到最大值, 并均显著高于两个低浓度盐胁迫组 (0.04 mol/L 和 0.08 mol/L NaCl) 和对照组 ($P<0.05$)。各浓度盐胁迫组的雨生红球藻 CAT 酶活力均为在第 6 天时最高, 第 3 天次之, 第 9 天最低。

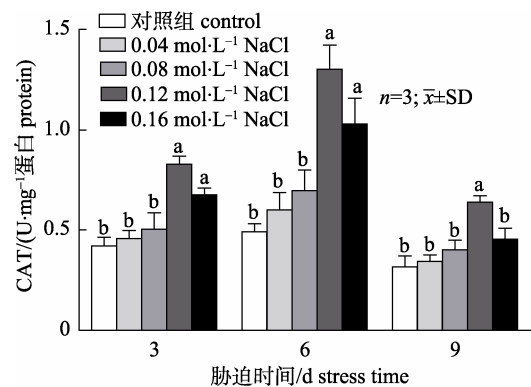


图 6 盐胁迫下雨生红球藻 CAT 酶活力的变化
不同字母代表同一胁迫时间的不同处理组间差异显著, $P<0.05$ 。
Fig. 6 Changes of CAT activity in *H. pluvialis* under salt stress
Different letters mean significant difference among treatments at the same stress time, $P<0.05$.

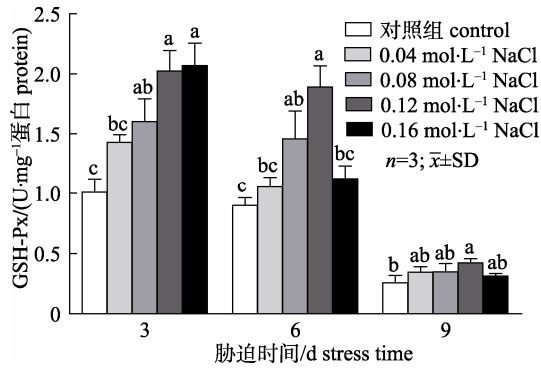


图 7 盐胁迫下雨生红球藻 GSH-Px 酶活力的变化
不同字母代表同一胁迫时间的不同处理组间差异显著, $P<0.05$.

Fig. 7 Changes of GSH-Px activity in *H. pluvialis* under salt stress

Different letters mean significant difference among treatments at the same stress time, $P<0.05$.

2.5 盐胁迫对雨生红球藻 MDA 含量的影响

由图 8 可知, 在盐胁迫的第 3 天, 雨生红球藻 MDA 含量随着盐胁迫浓度的增加不断升高, 在 0.16 mol/L NaCl 胁迫组达到最大值, 并显著高于 2 个低浓度盐胁迫组(0.04 mol/L 和 0.08 mol/L NaCl)和对照组($P<0.05$), 两个高浓度盐胁迫组(0.12 mol/L 和 0.16 mol/L NaCl)的雨生红球藻 MDA 含量无显著差异($P>0.05$)。在盐胁迫的第 6 天, 雨生红球藻 MDA 含量随着盐胁迫浓度的增加先升高后下降, 在 0.12 mol/L NaCl 胁迫组达到最大值, 并显著高于其他各盐浓度胁迫组和对照组($P<0.05$)。在盐胁迫的第 9 天, 雨生红球藻 MDA 含量也随着盐胁迫浓度的增加先升高后下降, 在

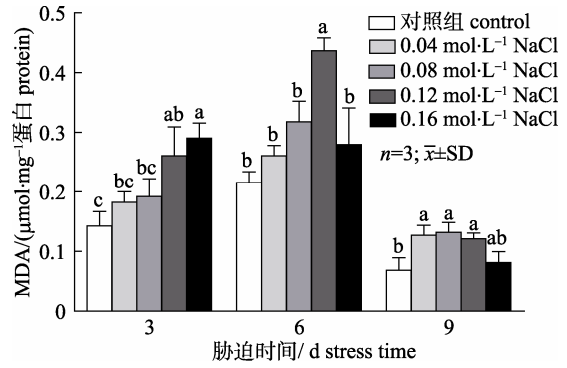


图 8 盐胁迫对雨生红球藻 MDA 含量的影响
不同字母代表同一胁迫时间的不同处理组间差异显著, $P<0.05$.

Fig. 8 Effect of salt stress on the MDA content in *H. pluvialis*. Different letters mean significant difference among treatments at the same stress time, $P<0.05$.

0.08 mol/L NaCl 胁迫组达到最大值, 并显著高于对照组($P<0.05$), 0.04 mol/L、0.08 mol/L、0.12 mol/L 和 0.16 mol/L NaCl 胁迫组的雨生红球藻 MDA 含量均无显著差异($P>0.05$)。各浓度盐胁迫组的雨生红球藻 MDA 含量均为在第 6 天时最高, 第 3 天次之, 第 9 天最低。

2.6 盐胁迫下与雨生红球藻生长、虾青素合成和抗氧化相关的各指标间的相关性和可能的关系分析

由表 3 可知, 在各个胁迫时间点, 盐胁迫的浓度与藻的生长(藻密度)均呈负相关的关系, 而与虾青素含量以及虾青素合成相关酶基因(*Lcy*、*CrtR-B* 和 *Bkt* 基因)的表达均呈正相关的关系, 同时盐胁迫下藻的生长(藻密度)和虾青素含量以及

表 3 与雨生红球藻生长和虾青素合成相关的各指标之间的 Pearson 相关系数

Tab. 3 Pearson correlation coefficients among the indexes which related to the growth of *H. pluvialis* and astaxanthin synthesis

指标 index	胁迫时间/d stress time	藻密度 algae density	虾青素含量 astaxanthin content	基因表达量 gene expression level		
				<i>Lcy</i>	<i>CrtR-B</i>	<i>Bkt</i>
盐浓度 salt concentration	3	-0.876	0.988**	0.922*	0.994**	0.975**
	6	-0.952*	0.983**	0.913*	0.975**	0.936*
	9	-0.921*	0.917*	0.963**	0.963**	0.962**
藻密度 algae density	3	1	-0.856	-0.724	-0.912*	-0.915*
	6	1	-0.959**	-0.802	-0.891*	-0.979**
	9	1	-0.905*	-0.913*	-0.891*	-0.968**
虾青素含量 astaxanthin content	3	-0.856	1	0.890*	0.979**	0.934*
	6	-0.959**	1	0.823	0.947*	0.946*
	9	-0.905*	1	0.913*	0.883*	0.920*

注: **表示在 0.01 水平(双侧)上显著相关, * 表示在 0.05 水平(双侧)上显著性相关。

Note: ** indicates a significant correlation at 0.01 level (2-tailed), * indicates a significant correlation at 0.05 level (2-tailed).

虾青素合成相关酶基因表达之间均呈负相关的关系,而虾青素含量和虾青素合成相关酶基因表达之间则呈正相关的关系。另外,由图 1 和图 5~图 7 则可以看出,在盐胁迫的早期(第 3 天)和中期(第 6 天)阶段虾青素含量较低,而抗氧化酶 SOD、CAT 和 GSH-Px 的活性较高,而在盐胁迫的晚期(第 9 天)阶段虾青素含量较高,而抗氧化酶的活性较低,说明在盐胁迫下,雨生红球藻虾青素的抗氧化活性和抗氧化酶的抗氧化活性之间有一定的此消彼长、互为补充的关系。

3 讨论

研究表明各种环境胁迫都可以直接或间接在生物体内形成活性氧(ROS),包括超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)、过氧化氢(H_2O_2)、羟自由基(OH^{\cdot})、脂质过氧化物(ROOH)和单线态氧(1O_2)等,过量的 ROS 会引发细胞大分子的氧化损伤,从而阻碍生物体的生长和发育^[22-24]。盐胁迫也会影响雨生红球藻的生长和发育,如使雨生红球藻的光合作用下降,生长减慢,因而培养基盐度的增加不利于雨生红球藻的生长^[3, 11, 25]。在本研究中,与对照组相比,盐胁迫也同样抑制了雨生红球藻的生长,造成了藻密度的下降,死亡率的升高。这是因为在正常情况下,藻类同其他植物一样,细胞内 ROS 的产生与清除处于动态平衡状态,然而当受到盐胁迫时,细胞中产生的 ROS 会大于被清除的 ROS,从而打破了这种动态平衡,引发体内氧化胁迫,甚至引起代谢紊乱,最终抑制了藻的生长和发育,甚至造成藻的死亡^[26]。

尽管盐胁迫不利于雨生红球藻的生长,却可以促进藻细胞快速转变为不动孢子和累积虾青素。本研究中,长期(9 d)的高浓度盐(0.12 mol/L 和 0.16 mol/L NaCl)胁迫使藻细胞全部转变为不动孢子,而对照组仍全部为游动细胞,这与黄水英等^[25]和 Gao 等^[27]的研究一致。另外,董庆霖等^[3]的研究表明雨生红球藻在添加了 0.15 mol/L NaCl 的 BBM 培养基中,在培养的第 4 天开始合成虾青素,第 5 天时虾青素含量达到 0.75 mg/g,而在基础培养基中的雨生红球藻没有虾青素积累。黄水英等^[25]的研究发现在 BBM 培养基中添加低于

10 g/L 的 NaCl 能诱导雨生红球藻快速积累虾青素。Boussiba 等^[28]的研究也表明将培养雨生红球藻的 BG₁₁ 培养基中的 NaCl 浓度提高 3 倍时,会促进雨生红球藻大量产生虾青素。Gao 等^[27]在培养雨生红球藻的 BBM 培养基中添加了 0.17 mol/L NaCl,经过 10 d 的培养后发现 3 种不同藻株的雨生红球藻的虾青素含量都大幅度的提高了。在本实验所设定的小于 10 g/L 的各浓度盐胁迫下,雨生红球藻在 9 d 的胁迫时间内,虾青素的含量随着盐胁迫浓度和时间的增加而不断提高,这一结果进一步证实了适当浓度(<10 g/L)和时间(<10 d)的盐胁迫能够诱导雨生红球藻产生虾青素。然而,盐胁迫促使雨生红球藻合成虾青素的分子调控机制目前尚不十分清楚,盐胁迫过程中虾青素合成相关酶基因表达变化的研究将有助于我们进一步了解盐胁迫使雨生红球藻虾青素含量提高的原因。

许多学者研究了各种逆境胁迫或诱导条件下雨生红球藻虾青素合成途径中相关酶基因表达的变化,如 Steinbrenner 等^[29]研究发现,在光照胁迫下,伴随着雨生红球藻虾青素的积累,虾青素合成相关酶包括八氢番茄红素合成酶基因(*Psy*)、八氢番茄红素去饱和酶基因(*Pds*)、番茄红素 β -环化酶基因(*Lcy*)和 *CrtR-B* 基因的转录水平都大大提高了。Gao 等^[30]在雨生红球藻的培养基中加入 25 mg/L 和 50 mg/L 的水杨酸(SA),雨生红球藻 *Psy*、*Pds*、*Lcy*、*CrtR-B* 和 *Bkt* 的基因的转录水平也大为提高。尚敏敏等^[31]的研究表明,在 5 mg/L 和 10 mg/L 的黄腐酸(FA)的诱导下,雨生红球藻 *CrtR-B* 基因的表达量分别提高了 18.1 倍和 7.3 倍。本研究中,雨生红球藻 *Lcy*、*CrtR-B* 和 *Bkt* 基因的表达水平均随着盐胁迫浓度和时间的增加而不断提高,这与 Steinbrenner 等^[29]、Gao 等^[30]和尚敏敏等^[31]的研究结果基本一致。另外,在本研究中,在盐胁迫的早期(第 3 天)阶段, *Lcy* 基因的表达量在最高浓度盐(0.16 mol/L NaCl)胁迫下才显著高于对照组($P < 0.05$),而 *CrtR-B* 和 *Bkt* 基因的表达量分别在 0.08 mol/L 和 0.12 mol/L NaCl 胁迫下与对照组相比已有了显著的升高;在盐胁迫的中期(第 6 天)阶段, *Lcy* 基因的表达量在 0.12 mol/L NaCl 胁迫下与对照组相比开始有了显著的升高

($P < 0.05$), 而 *CrtR-B* 和 *Bkt* 基因的表达量均在 0.08 mol/L NaCl 胁迫下与对照组相比就开始有了显著的升高($P < 0.05$); 在盐胁迫的晚期(第 9 天)阶段, 这 3 种基因的表达量均在 0.08 mol/L NaCl 胁迫下与对照组相比就开始有了显著的升高($P < 0.05$)。这一结果说明了当盐胁迫的时间较短时, 与 β -胡萝卜素的生成有关的 *Lcy* 基因对盐胁迫浓度的敏感性低于直接与虾青素的生成有关的 *CrtR-B* 和 *Bkt* 基因, 但在长期的盐胁迫下, 这 3 种基因对盐胁迫浓度的敏感性是一致的。梁成伟等^[32]分别用脱落酸(ABA)和氮饥饿加高光诱导雨生红球藻一段时间后, *Psy*、*Pds*、*CrtR-B* 和 *Bkt* 基因的 mRNA 水平都会明显的升高, 而 *Lcy* mRNA 水平则一直变化不大。这也说明了 *Lcy* 基因对外界诱导条件的敏感性较低。梁成伟等^[32]认为 *Lcy* 基因是组成型的基因, 因而不受这些诱导条件的调控。但本研究以及 Steinbrenner 等^[29]和 Gao 等^[6, 30]的研究却表明在一定时间和剂量的环境胁迫或诱导条件下, *Lcy* 基因的表达水平是会显著提高的。这说明 *Lcy* 基因并非组成型的基因, 梁成伟等^[32]的研究结果可能与胁迫或诱导的物质本身的性质有关, 其次也可能和胁迫或诱导的剂量或时间不足有关。此外, 本研究中盐胁迫所导致的雨生红球藻虾青素合成相关酶基因的表达变化与虾青素含量的变化基本是一致的, 二者呈正相关的关系, 这说明在盐胁迫下雨生红球藻中过量产生的 ROS 有可能作为一种分子信号启动了虾青素合成相关酶基因的转录, 雨生红球藻通过提高这些酶基因的转录水平, 并提高这些酶蛋白的产量从而来促进虾青素的合成。然而, 这一结论还需要从蛋白水平的研究上进一步加以确认。

研究认为, 在环境胁迫下, 雨生红球藻细胞中的 β -胡萝卜素由叶绿体转运到细胞质中合成虾青素^[33-34], 而虾青素的合成是为了淬灭环境胁迫下藻细胞内过量产生的 ROS^[35-36]。例如, Li 等^[37]的研究认为虾青素的合成是一个过量的氧依赖性的过程, 并在虾青素合成过程中消耗细胞内的分子氧, 从而减少了细胞 ROS 的生成; Tjahjono 等^[38]以及王劲等^[39]的研究发现, ROS 胁迫能够促进雨生红球藻中虾青素含量的增加; 肖媛等^[40]的

研究发现, 雨生红球藻中的 ROS 含量与虾青素含量存在一定的相关性, 雨生红球藻可能主要利用虾青素来清除由 UV-B 辐射诱导产生的 ROS。另外, 在环境胁迫条件下, 藻细胞内 ROS 的增加还可以上调各种抗氧化酶基因的表达, 而各种抗氧化酶同样起着清除细胞内多余的 ROS, 对藻细胞起抗氧化保护的功能^[41]。SOD、CAT 和 GSH-Px 是生物体抗氧化防御体系中最主要 3 种抗氧化酶。SOD 是抗氧化防御系统的第一道防线, 能催化超氧化物自由基(O_2^-)与 H^+ 结合, 将 O_2^- 还原成过氧化氢(H_2O_2), CAT 则催化 H_2O_2 分解为 H_2O 和 O_2 , 而 GSH-Px 则催化 H_2O_2 与还原性谷胱甘肽(GSH)反应生成 H_2O 及氧化型谷胱甘肽(GSSG), 从而保护机体免受 ROS 的损害^[42-44]。本研究中, 各胁迫时间的各浓度盐胁迫组的雨生红球藻 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性与对照组(0.00 mol/L NaCl)相比都提高了, 这说明了盐胁迫不但能提高雨生红球藻虾青素的含量, 另一方面也提高了各种抗氧化酶的活性, 二者可能共同作用来清除细胞内多余的 ROS, 保护雨生红球藻免受氧化损伤。本研究中, 在盐胁迫的第 3 天和第 6 天, 雨生红球藻虾青素含量较低, 但 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性则较高, 而在盐胁迫处理的第 9 天, 雨生红球藻虾青素大量合成, 但 SOD、CAT 和 GSH-Px 酶活力降至最低。这些结果进一步说明雨生红球藻的虾青素和抗氧化酶的抗氧化作用可能是互为补充、协调作用的, 盐胁迫的早期抗氧化防御机制主要是依靠各种抗氧化酶, 而长期抗氧化防御机制则主要是依靠虾青素, 这一结果与王潮岗等^[45]和杨瑾等^[4]的研究结果一致, 其原因可能是抗氧化酶对环境胁迫的响应时间比较短, 因而在环境胁迫的早期阶段, 雨生红球藻主要依靠各种抗氧化酶来清除多余的 ROS, 而虾青素是一种次级代谢产物, 需要经过一系列的酶促反应才能生成, 因而对胁迫的响应时间较长, 在长时间的环境胁迫下, 藻细胞内蛋白质会被损伤、降解, 各种抗氧化酶活力会下降, 这时雨生红球藻 ROS 的清除机制则可能主要依靠大量产生的虾青素^[41]。

MDA 是自由基攻击生物膜中多不饱和脂肪

酸引发脂质过氧化作用而形成的脂质过氧化物, MDA 含量越高, 则说明生物膜的氧化损伤程度越大^[46]。同时 MDA 还可与蛋白质的游离氨基作用, 引起蛋白质分子内与分子间的交联, 进一步导致细胞的损伤^[47]。本研究中, 各浓度盐胁迫组的雨生红球藻 MDA 含量在各处理时间与对照组(0.00 mol/L NaCl)相比都提高了, 这说明盐胁迫所产生的 ROS 已经造成了生物膜的氧化损伤, 这种氧化损伤必将会进一步造成雨生红球藻的一些代谢和功能的紊乱, 甚至死亡, 这也是盐胁迫造成藻密度下降的一个重要原因。另外, 雨生红球藻 MDA 含量在盐胁迫的早期(第 3 天)和中期(第 6 天)阶段较高, 而在盐胁迫的晚期(第 9 天)阶段较低, 这可能是因为在盐胁迫的早期和中期阶段, 尽管各种抗氧化酶的活性较高, 但由于虾青素的含量较低, 雨生红球藻的总抗氧化能力尚不足于抵抗大量产生的 ROS, 从而造成了生物膜的脂质过氧化物, 丙二醛含量升高。而在盐胁迫的晚期阶段, 尽管各种抗氧化酶的活性下降, 但这一时期大量产生的虾青素使藻细胞的总抗氧化能力大大增强, 从而降低了 ROS 对膜脂的过氧化作用, 丙二醛含量也大大降低。由此可见, 尽管在盐胁迫下, 雨生红球藻的虾青素和各种抗氧化酶的抗氧化作用是互为补充, 共同作用的, 但相较而言, 虾青素在清除雨生红球藻体内 ROS 的抗氧化机制中可能起着更为重要的作用。这一结果也与王潮岗等^[45]的研究结果一致。但由于虾青素累积在雨生红球藻细胞质的脂质体内, 而 ROS 主要由叶绿体和线粒体产生, 二者在空间上是分离的, ROS 是否能够跨过生物膜释放到细胞质中, 然后再由虾青素淬灭, 目前还没有直接的实验证明。尽管 Li 等^[37]的研究仍表明虾青素可能作为中间媒介物质在清除细胞内多余的 ROS 中起着重要的作用, 但由于缺乏直接的证据, 以上结论仍需要进一步的研究确认。

4 结论

盐胁迫抑制了雨生红球藻的生长、促进了虾青素的累积和 *Lcy*、*CrtR-B* 和 *Bkt* 基因的表达、以及 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性和 MDA 含量的

升高。雨生红球藻虾青素含量、*Lcy*、*CrtR-B* 和 *Bkt* 基因表达量在短期盐胁迫下较低, 而在长期盐胁迫下较高。雨生红球藻 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性以及 MDA 含量则在短期盐胁迫下较高, 而在长期盐胁迫下较低。盐胁迫下雨生红球藻主要通过提高虾青素合成相关酶基因的转录水平来促进虾青素的合成。雨生红球藻的抗氧化酶和虾青素的抗氧化防御机制分工合作、互为补充、协调作用, 共同保护雨生红球藻免受环境胁迫条件下的氧化损伤。但虾青素在雨生红球藻体内的抗氧化机制仍需进一步的研究确认。本研究为利用雨生红球藻生产虾青素的盐胁迫条件进行了探讨, 同时为人们了解盐胁迫条件下雨生红球藻虾青素的合成机理以及虾青素的合成与几种抗氧化指标的关系提供了基础资料。

参考文献:

- [1] Borowitzka M A, Huisman J M, Osborn A. Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis* 1. Effects of nutrients on growth and cell type[J]. J Appl Phycol, 1991, 3(4): 295-304.
- [2] Chen Y, Li D, Lu W, et al. Screening and characterization of astaxanthin-hyperproducing mutants of *Haematococcus pluvialis*[J]. Biotechnol Lett, 2003, 25(7): 527-529.
- [3] Dong Q L, Zhao X M, Xing X Y, et al. Mechanism of salt stress inducing astaxanthin synthesis in *Haematococcus pluvialis*[J]. Chemical Engineering (China), 2007, 35(1): 45-47. [董庆霖, 赵学明, 邢向英, 等. 盐胁迫诱导雨生红球藻合成虾青素的机理[J]. 化学工程, 2007, 35(1): 45-47.]
- [4] Yang J, Wang M, Li T, et al. Effects of nitrate-nitrogen stress on pigment content and antioxidant systems in *Haematococcus pluvialis*[J]. Plant Physiology Journal, 2011, 47(2): 147-152. [杨瑾, 王铭, 李涛, 李爱芬, 等. 氮胁迫对雨生红球藻色素积累与抗氧化系统的影响[J]. 植物生理学报, 2011, 47(2): 147-152.]
- [5] Wang X W, Wang L L, Gong Y F, et al. The effects of methyl jasmonate (MeJA) on the astaxanthin production and *dxs* gene expression of *Haematococcus pluvialis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(12): 1822-1828. [王鑫威, 王丽丽, 龚一富, 等. 茉莉酸甲酯对雨生红球藻虾青素含量和 *dxs* 基因表达的影响[J]. 水产学报, 2011, 35(12): 1822-1828.]
- [6] Gao Z, Meng C, Zhang X, et al. Differential expression of carotenogenic genes, associated changes on astaxanthin production and photosynthesis features induced by JA in *H. plu-*

- vialis*[J]. PLoS ONE, 2012, 7(8): e42243.
- [7] Liao X H, Wang M Z, Li X M, et al. Research on the stress induced conditions and pilot test of astaxanthin-rich *Haematococcus pluvialis*[J]. Food and Fermentation Industries, 2015, 41(6): 29–34. [廖兴辉, 王明兹, 李小妹, 等. 高产虾青素的雨生红球藻胁迫条件和中试研究[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(6): 29–34.]
- [8] Li Z N, Chen X Q, Ren J W, et al. The effect of sodium nitrate and salicylic acid on Astaxanthin accumulation of alga *Haematococcus pluvialis*[J]. China Food Additives, 2016, (8): 131–134. [李梓楠, 陈绪清, 任建武, 等. 硝酸钠和水杨酸对雨生红球藻累积虾青素的影响[J]. 中国食品添加剂, 2016, (8): 131–134.]
- [9] Glende E A J, Recknagel R O. An indirect method demonstrating that CCl₄-dependent hepatocyte injury is linked to a rise in intracellular calcium ion concentration[J]. Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 1991, 73(1): 41–52.
- [10] Linden H. Carotenoid hydroxylase from *Haematococcus pluvialis*: cDNA sequence, regulation and functional complementation[J]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1446(3): 203–212.
- [11] Zhuang H R, Shi Q Q, Lu H S, et al. The effect of nutritional stresses on accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2000, 24(3): 208–212. [庄惠如, 施巧琴, 卢海声, 等. 营养胁迫对雨生红球藻虾青素累积的影响[J]. 水生生物学报, 2000, 24(3): 208–212.]
- [12] Jiang M X, Liu M H, Shen Z Y. Effects of temperature, illumination and salinity on astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* aberrant species[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2005, 12(6): 714–719. [蒋霞敏, 柳敏海, 沈芝叶. 温度、光照与盐度对雨生红球藻诱变株虾青素累积的调控[J]. 中国水产科学, 2005, 12(6): 714–719.]
- [13] Harker M, Tsavalos A J, Young A J. Factors responsible for astaxanthin formation in the chlorophyte *Haematococcus pluvialis*[J]. Bioresource Technol, 1996, 55 (3): 207–214.
- [14] Boussiba S, Fan L, Vonshak A. Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in green alga *Haematococcus pluvialis*[J]. Methods Enzymol, 1992: 386–391.
- [15] Wei T, Gu W H, Li J, et al. Effects of carbon and nitrogen on the growth and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis*[J]. Marine Sciences, 2012, 36(11): 55–61. [韦韬, 顾文辉, 李健, 等. 不同碳氮浓度对雨生红球藻生长及虾青素累积的影响[J]. 海洋科学, 2012, 36(11): 55–61.]
- [16] Wei T, Gu W H, Li J, et al. Effect of Photoperiod on Microalgae *Haematococcus pluvialis*[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2013, 48(2): 168–173. [韦韬, 顾文辉, 李健, 等. 雨生红球藻的光周期效应[J]. 植物学报, 2013, 48(2): 168–173.]
- [17] 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.
- [18] Wang X K. The Experiment Principle and Technique on Plant Physiology and Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 2006. [王学奎. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006.]
- [19] Bewley T D. Physiological aspects of desiccation tolerance[J]. Annu Rev Plant Physiol, 1979, 30: 195–238.
- [20] Chance B, Maehly A C. Assay of catalases and peroxidases[J]. Method Enzymol, 1955: 764–775.
- [21] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animals tissues by thiobarbituric acid reaction[J]. Anal Biochem, 1979, 95 (2): 351–358.
- [22] Terao J. Antioxidant activity of beta-carotene-related carotenoids in solution[J]. Lipids, 1989, 24(7): 659–661.
- [23] Asada K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons[J]. Annu Rev Plant Biol, 1999, 50: 601–639.
- [24] Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases[J]. Annu Rev Biochem, 1995, 64: 97–112.
- [25] Huang S Y, Qi A X, Li Z, et al. Initial studies on the effects of stress conditions on astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis*[J]. Studia Marina Sinica, 2009, 49: 144–151. [黄水英, 齐安翔, 李哲, 等. 几种胁迫方式对雨生红球藻累积虾青素影响的初步研究[J]. 海洋科学集刊, 2009, 49: 144–151.]
- [26] Liu X L, Teng T, Li S F. Advance of the research on the generation mechanisms of reactive oxygen species induced by algae[J]. Journal of Huangshi Institute of Technology, 2007, 23(6): 44–48. [刘先利, 滕雷, 李胜方. 藻产生活性氧机制研究进展[J]. 黄石理工学院学报, 2007, 23(6): 44–48.]
- [27] Gao Z, Meng C, Chen Y, et al. Comparison of astaxanthin accumulation and biosynthesis gene expression of three *Haematococcus pluvialis* strains upon salinity stress[J]. J Appl Phycol, 2014, 27(5): 1853–1860.
- [28] Boussiba S, Vovshak A. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*[J]. Plant Cell Physiol, 1991, 32(7): 1077–1082.
- [29] Steinbrenner J, Linden H. Light induction of carotenoid biosynthesis genes in the green alga *Haematococcus pluvialis*: regulation by photosynthetic redox control[J]. Plant Mol Biol, 2003, 52(2): 343–356.
- [30] Gao Z, Meng C, Zhang X, et al. Induction of salicylic acid (SA) on transcriptional expression of eight carotenoid genes and astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*[J].

- Enzyme Microb Technol, 2012, 51(4): 225–230.
- [31] Shang M M, Zhao Y T, Zhao P, et al. Effects of FA on astaxanthin accumulation and the expression of *CHY* of *Haematococcus pluvialis*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2016, 40(3): 488–492. [尚敏敏, 赵永腾, 赵鹏, 等. 黄腐酸对雨生红球藻虾青素的积累和 *CHY* 基因表达量影响[J]. 水生生物学报, 2016, 40(3): 488–492.]
- [32] Liang C W, Tian L, Su Z L, et al. Expression characterization of astaxanthin biosynthetic gene of *Haematococcus Pluvialis* under stress conditions[J]. Journal of Qingdao University of Science and Technology: Natural Science Edition, 2009, 30(3): 221–225. [梁成伟, 田李, 苏忠亮, 等. 诱导条件下雨生红球藻虾青素合成相关基因的表达特征分析[J]. 青岛科技大学学报: 自然科学版, 2009, 30(3): 221–225.]
- [33] Collins A M, Jones H D, Han D, et al. Carotenoid distribution in living cells of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae)[J]. PLoS ONE, 2011, 6(9): e24302.
- [34] Liu J H, Huang Q. Astaxanthin Metabolic process in unicellular green alga *Haematococcus pluvialis* observed through infrared microspectroscopy and imaging[J]. The Journal of Light Scattering, 2014, 26(3): 321–325. [刘京华, 黄青. 应用红外光谱显微成像技术观测单细胞雨生红球藻虾青素代谢过程[J]. 光散射学报, 2014, 26(3): 321–325.]
- [35] Kobayashi M, Kakizono T, Nagai S. Astaxanthin production by a green alga, *Haematococcus pluvialis* accompanied with morphological changes in acetate media[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1991, 71: 335–339.
- [36] Kobayashi M, Kakizono T, Nagai S. Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis*[J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(3): 867–873.
- [37] Li Y, Sommerfeld M, Chen F, et al. Consumption of oxygen by astaxanthin biosynthesis: a protective mechanism against oxidative stress in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae)[J]. J Plant Physiol, 2008, 165(17): 1783–1797.
- [38] Tjahjono A E, Kakizono T, Hayama Y, et al. Isolation of resistant mutants against carotenoid biosynthesis inhibitors for a green alga *Haematococcus pluvialis*, and their hybrid formation by protoplast fusion for breeding of higher astaxanthin producers[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1994, 77(4): 352–357.
- [39] Wang J, Duan S S. Impact of active oxygen reagents on growth and astaxanthin content in *Haematococcus pluvialis*[J]. Ecologic Science, 2006, 25(3): 213–215. [王劲, 段舜山. 活性氧对雨生红球藻生长及虾青素含量的影响[J]. 生态科学, 2006, 25(3): 213–215.]
- [40] Xiao Y, Wang G H, Liu Y D. UV-B effects on the photosynthetic features and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* and its responses[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2010, 34(6): 1077–1082. [肖媛, 王高鸿, 刘永定. UV-B 辐射对雨生红球藻光合特性和虾青素含量的影响及其响应[J]. 水生生物学报, 2010, 34(6): 1077–1082.]
- [41] Su Z L, Cheng J F, Liang C W, et al. Molecular defense mechanism of *Haematococcus pluvialis* against environment stress[J]. Biotechnology Bulletin, 2009, 3: 42–45. [苏忠亮, 程江峰, 梁成伟, 等. 雨生红球藻对环境胁迫的分子防御机制[J]. 生物技术通报, 2009, 3: 42–45.]
- [42] Ken C F, Hsiung T M, Huang Z X, et al. Characterization of Fe/Mn-superoxide dismutase from diatom *Thalassiosira weissflogii*: cloning, expression, and property[J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(5): 1470–1474.
- [43] Pan Y, Xiao X, Wu L J, et al. The effect of N^+ ion implantation on the MDA content and the activities of Superoxide dismutase and catalase of liquorice seedlings under PEG-induced drought stress[J]. Acta Laser Biology Sinica, 2005, 14 (6): 442–446. [潘燕, 肖翔, 吴李君, 等. N^+ 离子注入对于干旱胁迫条件下甘草幼苗的 SOD 酶和 CAT 酶活性及丙二醛含量的影响[J]. 激光生物学报, 2005, 14 (6): 442–446.]
- [44] Berczi A, Moller I M. Redox enzymes in the plant plasma membrane and their possible roles[J]. Plant Cell and Environ, 2000, 23: 1287–1302.
- [45] Wang C G, Han S, Cheng Z Q, et al. The scavenging of reactive oxygen species with antioxidant systems in *Haematococcus pluvialis*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2012, 36(4): 804–808. [王潮岗, 韩桑, 陈甄倩, 等. 雨生红球藻抗氧化系统对活性氧的清除机制[J]. 水生生物学, 2012, 36(4): 804–808.]
- [46] Zhang Z A, Zhang M S, Wei R H. Experimental Instruction of Plant Physiology[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2004: 138–141. [张志安, 张美善, 蔚荣海. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业技术出版社, 2004: 138–141.]
- [47] Papadimitriou E, Loumbourdis N S. Exposure of the frog *Rana ridibunda* to copper: impact on two biomarkers, lipid peroxidation, and glutathione[J]. B Environ Contam Tox, 2002, 69(6): 885–891.

Effects of salt stress on astaxanthin accumulation, gene expression of astaxanthin synthesis-related enzymes, and antioxidant indices in *Haematococcus pluvialis*

JIANG Hongxia¹, LIN Xiongping², XUAN Wenjuan³

1. College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;

2. Department of Biology, Ningde Normal University, Ningde 352100, China;

3. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China

Abstract: *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Order Volvocales), a freshwater green microalgal species, has commercial value owing to its ability to accumulate high concentrations of astaxanthin (up to 5% of dry weight). Astaxanthin (3,3'-dihydroxy- β , β -carotene-4,4'-dione) is a red ketocarotenoid which has many important biological functions, including antioxidant activity, regulation of immune responses, and disease resistance, and has the potential for application in the aquacultural, nutraceutical, pharmaceutical, and cosmetic industries. *H. pluvialis* has a distinctive lifecycle as it exhibits a green motile stage and a red non-motile resting stage called an aplanospore. In general, astaxanthin accumulation in *H. pluvialis* is restricted to the aplanospore stage. Astaxanthin is accumulated in extra-plastidic lipid vesicles as a secondary carotenoid, and it is believed to be synthesized in response to oxidative stress in the red aplanospore stage under unfavorable environmental conditions such as high light, temperature, and salinity, or low nutrient availability. Several enzymes such as lycopene β -cyclase (*Lcy*), β -carotenoid hydroxylase (*CrtR-B*) and β -carotene ketolase (*Bkt*) are involved in the astaxanthin biosynthesis pathway in *H. pluvialis*. *Lcy* catalyzes the formation of β -carotene from lycopene, and *CrtR-B* and *Bkt* catalyze further steps leading to astaxanthin synthesis. Changes in expression of the genes encoding these three enzymes can critically affect the biosynthesis and accumulation of astaxanthin in *H. pluvialis*. In addition, various antioxidant enzymes including superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GSH-Px) also have important protective effects for combating oxidative stress under unfavourable environmental conditions.

We aimed to explore the effect of salt stress on astaxanthin accumulation in *H. pluvialis*, by examining the mechanism of astaxanthin synthesis and the relationship between the different antioxidant mechanisms in *H. pluvialis* at high salinity. We examined its growth rate; astaxanthin content; *Lcy*, *CrtR-B*, and *Bkt* gene expression levels; SOD, CAT, and GSH-Px activities; and malondialdehyde (MDA) content at four salinity levels (0.04 mol/L, 0.08 mol/L, 0.12 mol/L, and 0.16 mol/L) over three timescales (3 days, 6 days, and 9 days). Our results showed that the density of *H. pluvialis* decreased under increasing salinity over different periods of time, while its mortality rate and aplanospore proportion increased with increasing salt stress concentration by the ninth day of stress. Astaxanthin content, *Lcy*, *CrtR-B*, and *Bkt* gene expressions increased over time with increasing salinity. SOD, CAT, and GSH-Px activities and MDA content also increased in comparison to *H. pluvialis* grown at the control level of 0 mol/L NaCl, and significantly increased at the 0.12 mol/L NaCl level ($P < 0.05$). Astaxanthin content and *Lcy*, *CrtR-B*, and *Bkt* gene expressions were lower during the early and mid-stages of salt stress (e.g., on the third and sixth days of observation), and increased by the ninth day. Meanwhile, SOD, CAT, and GSH-Px activities and MDA content were higher during early and mid-stage stress, but were lower by the ninth day. These results suggest that salt stress can improve astaxanthin accumulation over time in *H. pluvialis* at the appropriate level of salt stress, despite its negative effects on growth. Astaxanthin synthesis in *H. pluvialis* is promoted mainly through an increase in the transcription level of astaxanthin synthesis-related enzyme genes under salt stress, and the antioxidant activities of astaxanthin and antioxidant enzymes complement one other to protect from oxidative damage under salt stress. This study provides a new insight into the astaxanthin synthesis and antioxidant mechanisms in *H. pluvialis*.

Key words: *Haematococcus pluvialis*; salt stress; astaxanthin; *Lcy*; *CrtR-B*; *Bkt*; antioxidant enzyme; MDA

Corresponding author: JIANG Hongxia. E-mail: jianghongxia2007@126.com