

2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)对雨生红球藻中 虾青素积累的影响

孟春晓^{1*} 高政权¹ 叶乃好²

(1. 山东理工大学生命科学院 淄博 255049)

(2. 中国水产科学院黄海水产研究所 青岛 266071)

摘要: 本文初步研究了一定浓度范围内的 2,4-D 对雨生红球藻积累虾青素的影响。在对数生长期的藻液中分别加入一系列不同浓度的 2,4-D 溶液, 然后进行胁迫培养(25°C、24 h、5000 Lx 连续光照+营养盐饥饿), 诱导细胞内虾青素的合成积累。在诱导过程中, 显微观察不同浓度 2,4-D 处理后细胞形态和虾青素积累的动态变化, 并定期取样测定虾青素含量。结果表明, 20.0 mg/L 的 2,4-D 能够明显促进雨生红球藻中积累虾青素。它不仅加快虾青素积累进程(比对照提前 15 d), 而且比对照能提高 13.4% 的虾青素产量。

关键词: 雨生红球藻, 虾青素积累, 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)

The Impact of Extraneous Salicylic Acid (SA) to Astaxanthin Accumulation of *Haematococcus pluvialis*

MENG Chun-Xiao^{1*} GAO Zheng-Quan¹ YE Nai-Hao²

(1. School of Life Sciences, Shandong University of Technology, Zibo 255049)

(2. Yellow Sea Fishery Research Institute, Qingdao 266071)

Abstract: Effect of extraneous 2,4-D on astaxanthin accumulation in *H. pluvialis* was studied in this paper. After different concentration grades of 2,4-D were added into the vegetative green cells respectively, then *H. pluvialis* were cultivated under unfavorable growth conditions (24 h light cycle, 5000 Lx, 25°C, nutrition deficiency) to promote astaxanthin accumulation. In this stage, morphological changes of cells treated by different grades of 2,4-D concentration were observed with optical microscopy. Moreover, astaxanthin content was determined with absorption spectral (OD_{490}). Results showed that astaxanthin accumulation might be promoted at 20 mg/L 2,4-D treatment which could quicken astaxanthin accumulation 15 days compared with blank controls. Moreover, the increasing production extents of astaxanthin reached 13.4% than blank controls.

Keywords: *Haematococcus pluvialis*, Astaxanthin, 2,4-D

基金项目: 国家自然科学基金(No. 40706050, No. 40706048); 国家支撑项目(No. 11200602); 中央级公益性研究所专项资金(No. 2060402/2); 山东理工大学自然科学基金(No. 4040-306017); 山东理工大学博士启动基金项目(No. 4041-405016, 4041-405017)

* 通讯作者: Tel: 0533-8378236; ✉: mengchunxiao@126.com

收稿日期: 2008-05-04; 接受日期: 2008-09-05

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

虾青素是一种具有极强着色和抗氧化作用的红色类胡萝卜素。它在药物、化妆品、食品及养殖工业中有广泛应用^[1]。雨生红球藻在逆境胁迫下能合成和迅速积累达细胞干重的 4% 虾青素, 因此利用雨生红球藻生产天然虾青素具有诱人的前景^[2]。近来, 雨生红球藻研究取得的进展主要集中于培养、诱导其合成和积累虾青素的各种外界条件^[3,4]。如 Jaime Fábregas 采用半连续培养基, 利用两步法进行虾青素的生产, 即先在短时间内扩大绿色游动细胞的生物量, 再诱导绿色游动细胞转变成红色不动藻细胞积累虾青素, 其虾青素产量已达到 5.8 mg/L~9.6 mg/L^[5]。Claude Aflalo 等同样利用两步法使雨生红球藻生产虾青素的产量在户外提高到每天 11.5 mg/L^[6]。2,4-D 类似于生长素, 低浓度的 2,4-D 能促进插枝生根, 阻止器官脱落, 形成无子果实; 高浓度可作为单子叶植物小麦、玉米、高粱等田间的除草剂^[7]。近年来, 我们对雨生红球藻中虾青素合成几个关键酶基因的转录调控机制也进行了初步探讨^[8-10]。结果表明, β -胡萝卜素酮化酶(bkt)和 β -胡萝卜素羟化酶(crtR-B)基因的 5'上游侧翼序列中可能存在某些生长素反应元件(如TGA-element), 由此推测 2,4-D 对雨生红球藻中虾青素的积累可能具有一定影响。

1 材料与方 法

1.1 雨生红球藻的培养

雨生红球藻 712 株材料购自中国科学院海洋研究所, MCM 培养基培养^[11]。1000 Lx 光强, 20°C, 12 h/12 h 的光/暗周期进行静止培养直至培养到生长对数期。

1.2 脱落酸的配制

设置了一组 2,4-D 浓度梯度, 每组设 3 个空白对照, 每个浓度设 3 个重复, 浓度分别如下 0.1 mg/L、0.5 mg/L、1.0 mg/L、5.0 mg/L、10.0 mg/L 和 20.0 mg/L。

1.3 显微观察

逆境胁迫条件下同时培养上述添加了不同浓度 2,4-D 的藻液。每天取少量不同处理的藻细胞在光学显微镜下观察。

1.4 虾青素含量测定

从不同诱导阶段中的样品中定期依次收集不同浓度 2,4-D 诱导的样品, 按文献^[12]测定其虾青素

含量。

2 结 果

2.1 显微观察

显微观察结果发现, 添加一定浓度的 2,4-D 进行诱导胁迫培养 3 d 后, 均出现了明显的色素积累, 且各处理组与对照组相比虾青素积累程度相差不大; 诱导 7 d 后, 各处理组的藻细胞色素积累开始出现细微差别, 其中 0.1 mg/L 和 20 mg/L 2,4-D 处理组的藻细胞中, 色素颗粒稍微多于对照组, 且有较明显的色素融合现象, 而其它浓度的 2,4-D 处理组藻细胞内出现的色素颗粒与对照组相差不大; 诱导 18 d 后, 各处理组色素积累趋势与上述诱导 7 d 的类似, 只是色素积累范围增大了, 其中 20 mg/L 处理组的藻液颜色与其它处理组和对照组相比明显变红、变深; 诱导 29 d 后, 20 mg/L 2,4-D 处理组的藻细胞完全变红(对照组藻细胞在诱导后 44 d 左右才完全变红), 而其它处理组的藻细胞还未完全变红(图 1a~1g)。在诱导后期, 各处理组及对照组的藻细胞都不同程度地出现了细胞自溶、色素颗粒外排和白化现象。

2.2 虾青素含量测定

从图 2 可以看出, 随着诱导时间的延长, 不同浓度 2,4-D 处理组样品中的虾青素含量(OD_{490} 表示)与空白对照组相比呈现不同的变化趋势。其中在一定诱导时期内, 0.1 mg/L 和 20 mg/L 2,4-D 处理组样品的虾青素含量与对照相比呈现明显的增长趋势; 20 mg/L 2,4-D 处理组样品的虾青素含量则始终高于对照组, 峰值出现在诱导 29 d 时。10 mg/L 2,4-D 处理组样品在诱导初期呈现出动荡的变化趋势, 在诱导后 17 d 则呈现低于对照组的变化趋势; 其它浓度组(0.5 mg/L、1.0 mg/L 和 5.0 mg/L)样品的虾青素含量在整个诱导期内均明显低于对照组。诱导 29 d 后, 20 mg/L 2,4-D 处理组藻细胞完全变红, 此时该样品中的虾青素含量也最高, 达到 4.73 mg/L 藻液, 与对照相比, 其增产幅度达到 13.4%(空白对照组藻细胞直到诱导后 44 d 才完全变红, 这时样品虾青素含量为 4.17 mg/L 藻液)。图 3 显示各浓度 2,4-D 处理组和对照组样品的叶绿素含量(OD_{673} 表示)并无规律性的上升或下降趋势。说明虾青素的积累并不是以叶绿素的消耗为基础的^[13]。

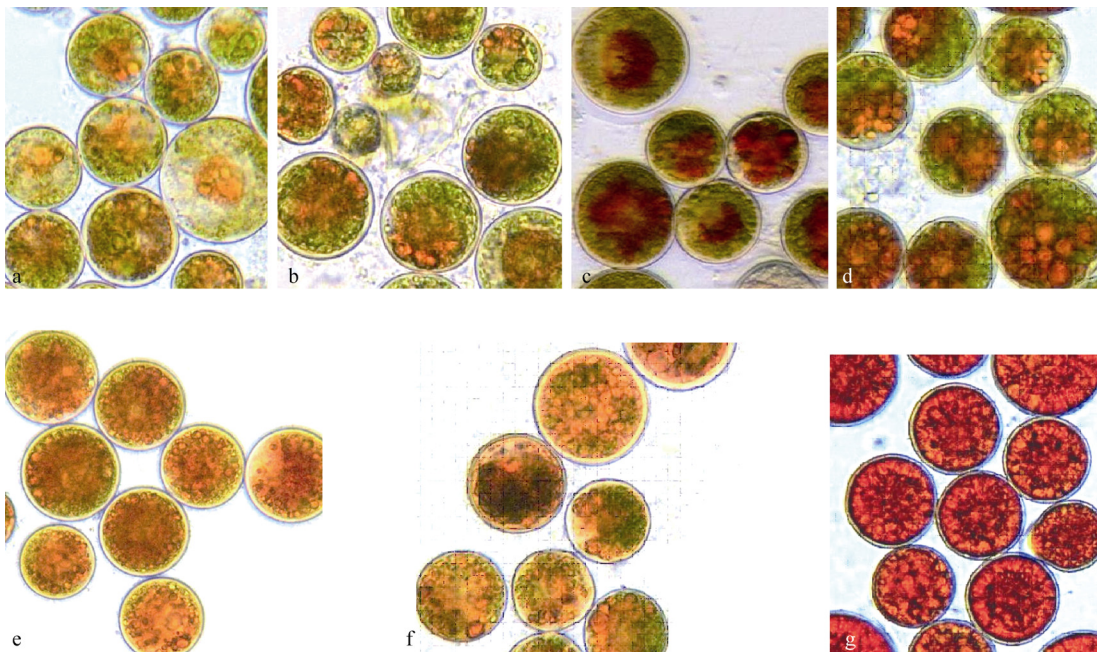


图 1 诱导 29 d 后藻细胞显微图谱(放大倍数: 400×)

Fig. 1 Micrographs of samples treated for 29 d (400×)

注: 从左到右依次为空白对照组、0.1 mg/L、0.5 mg/L、1.0 mg/L、5.0 mg/L、10.0 mg/L、20.0 mg/L 2,4-D 处理组细胞

Note: The samples are blank, 0.1 mg/L, 0.5 mg/L, 1.0 mg/L, 5.0 mg/L, 10.0 mg/L, 20.0 mg/L 2,4-D treated samples from left to right

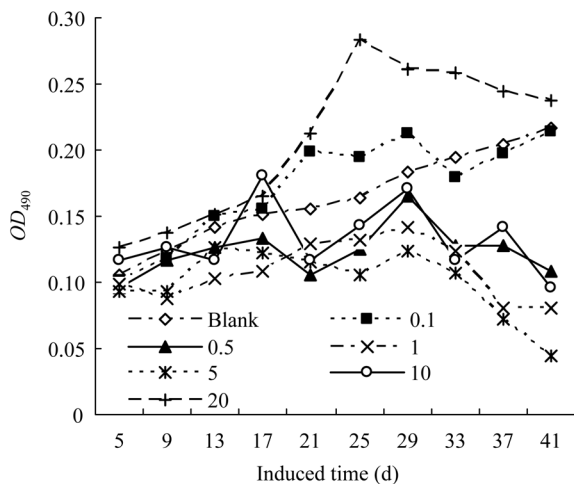


图 2 诱导后各样品中虾青素含量的变化趋势

Fig. 2 Change trends of astaxanthin content in the samples during the course of induction

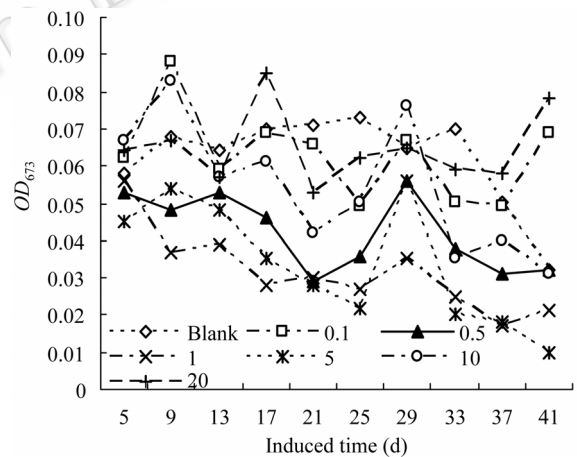


图 3 诱导后各样品中叶绿素含量的变化趋势

Fig. 3 Change trends of chlorophyll content in the samples during the course of induction

3 讨论

2,4-D 是一种苯氧类植物生长调节剂, 是一种人工合成的具有与生长素类似生理效应的有机物, 合成过程简单, 可以大量生产, 在农业及园艺生产上已广泛应用。本研究研究表明, 20 mg/L 2,4-D 处理对雨生红球藻积累虾青素最显著促进作用, 使藻

细胞完全变红的周期比对照缩短了 34.1%, 且虾青素产量比对照提高了 13.4%, 增产效果明显。植物激素普遍存在双重性, 2,4-D 也不例外, 即只有适宜浓度才可以促进激素发挥生物学效应, 这种性质在我们的研究中得到了证实, 2,4-D 浓度在 20 mg/L 时, 对雨生红球藻积累虾青素有促进作用, 低于这个浓度范围就可能有抑制作用。

一定浓度的 2,4-D 可能对雨生红球藻细胞积累虾青素存在影响, 低浓度 2,4-D 可能促进雨生红球藻细胞分裂而抑制虾青素积累; 而高浓度 2,4-D 却可能通过抑制雨生红球藻细胞分裂而促进虾青素积累, 因为在雨生红球藻中藻细胞生物量的积累和虾青素的积累总是一对矛盾体。同时我们也推测, 高浓度的 2,4-D 也可能作为一种逆境诱导因子, 促进雨生红球藻在逆境胁迫条件下积累虾青素从而缓解生存压力, 因此, 加入合适浓度的 2,4-D 可能促进雨生红球藻细胞积累虾青素。在本研究中, 添加 20.0 mg/L 的 2,4-D 对雨生红球藻积累虾青素具有明显的促进作用, 至于更高浓度的 2,4-D 是否更有助于雨生红球藻对虾青素的积累, 则需要进一步的研究。我们认为即使还有更高激素浓度的处理能更快更大量的促进雨生红球藻积累虾青素, 也是不可取的, 因为生产虾青素的最终目的是为人类服务, 如果产品中含有过高含量的激素, 肯定对人类的身心健康会在成潜在危害。

参 考 文 献

- [1] Guerin M, Huntley ME, Olaizola M, *et al.* *Haematococcus astaxanthin*: applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology*, 2003, **21**(5): 210–216.
- [2] Boussiba S. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response. *Physiologia Plantarum*, 2000, **108**: 111–117.
- [3] Wang B, Zarka A, Trebst A, *et al.* Astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) as an active photoprotective process under high irradiance. *J Phycol*, 2003, **39**: 1116–1124.
- [4] Zhang XW, Gong XD, Chen F. Kinetic models for astaxanthin production by high cell density mixotrophic culture of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *J Industrial Microbiology Biotechnology*, 1999, **23**: 691–696.
- [5] Fábregas J, Otero A, Maseda A, *et al.* Two-stage cultures for the production of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *J Biotech*, 2001, **89**: 65–71.
- [6] Aflalo C, Meshulam Y, Zarka A, *et al.* On the relative efficiency of two-vs. one-stage production of astaxanthin by the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotech and Bioengin*, 2007, **98**: 300–305.
- [7] 刘 蕊, 李德红, 李 玲. 2,4-二氯苯氧乙酸的研究进展. *生命科学研究*, 2004, **8**(S2): 72–75.
- [8] Meng CX, Teng CY, Jiang P, *et al.* Cloning and characterization of beta-carotene ketolase gene promoter in *Haematococcus pluvialis*. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2005, **37**: 270–275.
- [9] Meng CX, Liang CW, Jiang P, *et al.* There are two 5'-flanking regions of *bkt* encoding beta-carotene ketolase in the *Haematococcus pluvialis*. *Phycologia*, 2006, **45**: 218–224.
- [10] Meng CX, Wei W, Su ZL, *et al.* Cloning and characterization of beta-carotene ketolase gene promoter in *Haematococcus pluvialis*. *Indian J Biochem Biophys*, 2006, **43**: 284–288.
- [11] Kobayashi M, Kurimura Y, Tsuji Y. Light-independent, astaxanthin production by the green microalga *Haematococcus pluvialis* under salt stress. *Biotechnol Lett*, 1997, **19**: 507–509.
- [12] Boussiba S, Vonshak A. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Cell Physiol*, 1991, **32**: 1077–1082.
- [13] 曹平华, 李晓霞, 禹学礼, 等. 雨生红球藻的初步探讨. *江西饲料*, 2004, **3**: 20–22.

稿件书写规范

论文中有关正、斜体的约定

物种的学名: 菌株的属名、种名(包括亚种、变种)用拉丁文斜体。属的首字母大写, 其余小写, 属以上用拉丁文正体。病毒一律用正体, 首字母大写。

限制性内切酶: 前 3 个字母用斜体, 后面的字母和编码正体平排, 例如: *Bam*H、*Msp*、*Sau*3A 等。

氨基酸和碱基的缩写: 氨基酸缩写用 3 个字母表示时, 仅第一个字母大写, 其余小写, 正体。碱基缩写为大写正体。

基因符号用小写斜体, 蛋白质符号首字母大写, 用正体。