

研究报告

## 三角褐指藻甘油酯对氮胁迫的响应

杨森<sup>1,2,3</sup> 王海涛<sup>1</sup> 薛松<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院大连化学物理研究所 海洋生物工程研究组 辽宁 大连 116023)

(2. 中国科学院大学 北京 100049)

(3. 大连理工大学生命科学与技术学院 辽宁 大连 116024)

**摘要:**【背景】三角褐指藻作为生物燃料潜在的生产者,在胁迫条件下能通过改变其甘油酯组成来适应外部环境的变化,同时伴随着生物燃料原料甘油三酯(TAG)的积累,研究三角褐指藻甘油酯对氮胁迫的响应机制有利于深入认识 TAG 的积累过程。【目的】通过分析三角褐指藻在正常和氮胁迫条件下各类脂质含量及其脂肪酸成分的变化,揭示氮胁迫诱导积累的 TAG 酰基主要来源,以及在胁迫前生成的各极性甘油酯脂肪酸的去向,从而为进一步认识三角褐指藻对氮胁迫的响应机制提供新信息。【方法】利用高效薄层色谱结合气相色谱法分析三角褐指藻在正常和氮胁迫条件下的脂肪酸及甘油酯组分的变化。【结果】三角褐指藻在氮胁迫条件下 TAG 含量增加至 57.8 mg/g 时,总甘油酯含量几乎不变,但各甘油酯含量变化差异很大,表现为各极性脂含量显著降低。在此期间,各类甘油酯脂肪酸组成含量的变化表明,三角褐指藻 TAG 主要积累饱和及单不饱和脂肪酸,即 16:0 和 16:1n7,分别以从头合成及原有极性脂转化为主,极性脂的部分二十碳五烯酸(EPA)作为酰基供体也向 TAG 发生了转化;此外组成极性脂的多不饱和脂肪酸 16:2n4、16:3n4 及 EPA 分解导致其含量显著下降。【结论】当氮胁迫诱导的三角褐指藻 TAG 含量为 57.8 mg/g 时,积累的 TAG 酰基中有 48%来自从头合成,52%来自极性脂转化;而氮胁迫诱导所减少的极性脂酰基中有 54%转化成 TAG,46%发生了分解。

**关键词:** 三角褐指藻, 氮胁迫, 甘油酯, 甘油三酯, 脂肪酸

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (21576253)

\***Corresponding author:** Tel: 86-411-84379069; E-mail: xuesong@dicp.ac.cn

**Received:** July 31, 2017; **Accepted:** November 24, 2017; **Published online** (www.cnki.net): December 27, 2017  
基金项目: 国家自然科学基金(21576253)

\***通信作者:** Tel: 86-411-84379069; E-mail: xuesong@dicp.ac.cn

**收稿日期:** 2017-07-31; **接受日期:** 2017-11-24; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2017-12-27

## Glycerolipid remodeling of *Phaeodactylum tricornutum* in response to nitrogen stress

YANG Miao<sup>1,2,3</sup> WANG Hai-Tao<sup>1</sup> XUE Song<sup>1\*</sup>

(1. Marine Bioengineering Group, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian, Liaoning 116023, China)

(2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

(3. School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian, Liaoning 116024, China)

**Abstract:** [Background] *Phaeodactylum tricornutum* has emerged as a potential producer for biofuel feedstocks. Under stress conditions, the glycerolipids of *P. tricornutum* could be reconstructed to adapt to alterations of external environmental factors, concomitant with accumulation of triacylglycerols (TAGs), which can be converted to biofuels. Thus, mechanistic studies of glycerolipid remodeling in *P. tricornutum* under nitrogen stress are essential for deciphering mechanism of TAG biosynthesis and accumulation. [Objective] In order to confirm the origin of the accumulated acyl groups of TAG and the fate of the decreased acyl groups of multiple polar lipids, the alterations of fatty acids and glycerolipid components were studied in detail for *P. tricornutum* under nitrogen repletion and depletion conditions, which could provide insights into the response mechanism of glycerolipid of this alga subjected to nitrogen stress. [Methods] The fatty acids and glycerolipid components were determined qualitatively and quantitatively for *P. tricornutum* using high performance thin layer chromatography coupled with gas chromatography. [Results] Although the total content of glycerolipids remained unaltered under both nitrogen repletion and depletion conditions in *P. tricornutum*, the content of the individual glycerolipid class and the respective fatty acyl compositions varied notably. A prominent decrease in content of each polar glycerolipid was observed, accompanied by an increase in TAG amount, up to 57.8 mg/g, in stress-induced *P. tricornutum*. Based on variations of the contents of the fatty acyl groups comprising those glycerolipids, it was concluded that the lipid remodeling took place in multiple pathways. First, the saturated and monounsaturated fatty acids of TAG were significantly produced. In particular, a majority of 16:0 was concentrated into TAG through the *de novo* synthesis pathway and most of 16:1n7 was assembled into TAG through turnover of polar glycerolipids. In addition, a portion of EPA derived from polar glycerolipids were recycled into TAG as an acyl donor. Second, the polyunsaturated fatty acids degraded at expense of notable reductions of polar lipid components, i.e., 16:2n4, 16:3n4 and EPA. [Conclusion] When the TAG of nitrogen-deprived *P. tricornutum* accumulated up to 57.8 mg/g, the accumulated acyl groups of TAG derived from both the *de novo* synthesis pathway and the polar lipid turnover pathway and the contributions of each pathway were 48% and 52%, respectively. In addition, there were 54% of the decreased acyl groups of polar lipids to be incorporated into TAG and the other 46% of those entered into degradation reactions in *P. tricornutum* under nitrogen stress.

**Keywords:** *Phaeodactylum tricornutum*, Nitrogen stress, Glycerolipid, Triacylglycerol (TAG), Fatty acid

硅藻广泛分布于各种海洋与淡水环境中, 包括 250 个以上的属, 种类多达 10 万种, 这使得硅藻成为继被子植物之后生物多样性最高的光合生物<sup>[1]</sup>。作为最重要的单细胞光合真核生物, 硅藻固碳能力高, 对自然环境适应能力强, 其生物量相当于 40%

的海洋初级生产力, 同时相当于 20% 的全球初级生产力, 具有重要的生态学作用<sup>[2]</sup>。硅藻起源于十亿年前发生于红藻及异养真核生物之间的二次内共生<sup>[3]</sup>。硅藻基因组表明其具有完整的尿素循环, 而尿素循环只存在于后生动物和硅藻这两类真核生物中<sup>[4-5]</sup>。

尿素循环参与氮的再利用并将细胞代谢产生的碳返回至中心代谢<sup>[6-7]</sup>。氮元素还能参与生物大分子如蛋白质、核酸及含氮脂质的合成,从而促进生物的生长发育<sup>[7]</sup>。研究氮代谢将有利于认识海洋硅藻碳代谢的调节过程,并为硅藻对海洋环境的适应机制研究提供理论基础<sup>[8]</sup>。

硅藻的模式生物三角褐指藻(*Phaeodactylum tricorutum* Bohlin)具有3种形态,包括梭形、卵圆形及三叉形<sup>[9]</sup>,其基因组已完成测序<sup>[5]</sup>。三角褐指藻富含二十碳五烯酸(EPA)<sup>[10]</sup>及岩藻黄素<sup>[11]</sup>,是重要的水产饵料<sup>[12]</sup>。在胁迫条件下三角褐指藻油脂含量高,是潜在的生物燃料原料生产者<sup>[13]</sup>,因此具有重要的研究价值。在适宜生长条件下,真核微藻光合固碳的40%用于合成蛋白质<sup>[14]</sup>,其碳骨架主要由TCA循环供应。氮有效性的降低会减少TCA循环的代谢物,从而使TCA循环的碳来源——乙酰辅酶A转向脂肪酸的合成<sup>[15]</sup>。氮胁迫能降低藻细胞蛋白质含量并促进以甘油三酯(TAG)为主的储存脂质的增加<sup>[16]</sup>。最近关于三角褐指藻的研究表明,氮胁迫<sup>[17]</sup>、碱性pH胁迫、碳酸氢盐添加<sup>[18]</sup>及有机酸添加<sup>[19]</sup>对其脂质代谢具有非常显著且复杂的影响,近些年来备受关注<sup>[20]</sup>。

微藻脂质组以甘油酯为主<sup>[21]</sup>,而在正常生长条件下微藻甘油酯以极性甘油酯为主,包括糖脂、磷脂及甜菜碱脂<sup>[22]</sup>。糖脂是叶绿体膜结构的主要组分,主要分布于叶绿体膜结构如类囊体及被膜上,包括单半乳糖甘油二酯(MGDG)、双半乳糖甘油二酯(DGDG)及硫代异鼠李糖甘油二酯(SQDG)。构成多种膜结构组分及作为脂质代谢中间产物的极性脂,主要分布于叶绿体外的膜结构如线粒体、微粒体(Microbody)、内质网上,包括磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)及甜菜碱脂[1,2-二酰基甘油-O-4'-(N,N,N-三甲基)高丝氨酸(DGTS)、二酰基甘油羟甲基三甲基-β-丙氨酸(DGTA)与1,2-二酰基甘油-3-O-羧羟甲基胆碱(DGCC)],此外磷脂酰甘油(PG)主要分布于光合膜结构中<sup>[23]</sup>。在正常富营养条

件下,微藻只含有微量中性脂,这些中性脂以TAG为主,TAG是能量及碳储存化合物<sup>[24]</sup>。

在胁迫诱导条件下,微藻脂质的主要特征通常表现为TAG的大量积累,同时伴随着极性脂的分解或转化,其酰基组成会发生很大的变化,这些特征表明微藻的甘油酯组发生了重组,从而适应其外部环境条件的变化<sup>[25-26]</sup>。目前关于微藻甘油酯组对胁迫条件尤其是营养盐胁迫的响应机制研究主要集中于莱茵衣藻、微拟球藻及小球藻等藻种<sup>[27-28]</sup>,而关于三角褐指藻对氮胁迫的响应多集中于转录组及蛋白质组水平上的TAG积累及其调控机制研究<sup>[7,29-31]</sup>,还包括TAG积累的动态变化研究<sup>[32-33]</sup>,但是目前关于三角褐指藻甘油酯尤其是极性脂对氮胁迫的响应研究报道还很少<sup>[9,34]</sup>。

高效薄层色谱作为高效分离脂质的经典方法能同时分离多种组分,分离后可结合质谱或气相色谱进行进一步定性定量分析<sup>[35-36]</sup>。本文利用高效薄层色谱结合气相色谱法比较分析了三角褐指藻在正常及氮胁迫条件下的脂肪酸及甘油酯组分的变化规律,阐明了三角褐指藻所积累TAG脂肪酸的主要来源及在胁迫前生成的各极性甘油酯脂肪酸的去向,从而为进一步认识三角褐指藻对氮胁迫的响应机制提供新信息。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 主要试剂和仪器

氯仿、甲醇(CH<sub>3</sub>OH)、磷酸(H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)、展开剂正己烷、乙醚、乙酸、丙酮和甲苯均为分析纯试剂,天津市科密欧化学试剂有限公司;萃取剂正己烷为色谱纯试剂,德国默克集团;十七烷酸甘油三酯(Glyceryl triheptadecanoate)和樱草黄(Primuline),美国西格玛奥德里奇公司;玻璃纤维滤膜(直径47 mm),Whatman GF/C公司;薄层色谱硅胶板(TLC, Silica gel 60 F254, Alumium sheets 0.20 mm),德国默克集团。照度计,德国Gigahertz Optik;分光光度计,日本Jasco公司;叶绿素荧光仪,德国WALZ公司;气相色谱,美国安捷伦

科技有限公司。

## 1.2 藻种及培养条件

三角褐指藻获赠于辽宁省海洋水产科学研究院刘卫东研究员, 培养基为 3×f/2<sup>[37]</sup>, 海水经 0.22 μm 滤膜过滤后高温高压灭菌(1×10<sup>5</sup> Pa, 15 min), 冷却至室温后待用。三角褐指藻在 3 L 摇瓶中静置培养, 每天手动摇瓶 3 次, 光周期设置为 14 h 光照:10 h 黑暗, 通过照度计测定光照强度为 100 μmol/(m<sup>2</sup>·s)。藻细胞经 3×f/2 富氮培养 4 d 至指数生长期, 4 000 r/min 离心 5 min 收集藻细胞, 并用无氮 3×f/2 培养基重悬清洗藻细胞, 重复离心(4 000 r/min, 5 min)后用无氮 3×f/2 培养基将藻细胞再次重悬, 利用分光光度计测定藻液在波长 680 nm 下的光密度值, 将初始接种光密度值调节为 0.245, 接种体积为 1.5 L, 在上述培养条件下继续缺氮培养 3 d 后收获。根据 Maxwell 等<sup>[38]</sup>方法, 通过叶绿素荧光仪测定藻细胞的最大 PS II 光量子产率  $F_v/F_m$  及实际 PS II 光量子产率  $\phi_{PSII}$ 。

在缺氮培养的第 0 天和第 3 天分别通过离心(4 000 r/min, 5 min)收集一定体积的新鲜藻细胞, 用液氮冷冻后保存于-80 °C 待用; 同时将 20 mL 藻液滤过预称重的玻璃纤维滤膜, 于 60 °C 下烘干至恒重, 根据该滤膜在抽滤藻细胞前后的质量差来计算上述一定体积藻细胞的干重。

## 1.3 脂质提取

将保存于-80 °C 的新鲜藻泥(细胞干重约 20 mg)取出后立即加入 400 μL 的氯仿:甲醇:甲酸(2:1:0.1, 体积比), 振荡 30 s, 加入 200 μL 0.2 mol/L H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 和 1 mol/L KCl, 再振荡 30 s 后离心(12 000 r/min, 2 min)分层<sup>[39]</sup>, 共提取 3 次。

## 1.4 高效薄层色谱分离脂质

将下层有机相中已溶解的脂质均匀点分布在 10 cm×10 cm 薄层色谱硅胶板上, 待氯仿挥干后在展析缸中展开, 中性脂(以 TAG 为主)展开剂为正己烷:乙醚:乙酸(85:15:1, 体积比), 极性脂(糖脂及磷脂)展开剂为丙酮:甲苯:水(91:30:7, 体积比), 待展

开至距离上端约 1 cm 时取出 TLC 板, 待 TLC 板溶剂挥干后进行显色。显色剂为 0.05% 樱草黄(溶剂为 20% 水和 80% 丙酮), 利用薄层色谱显色喷雾瓶喷板, 紫外灯 365 nm 下观察, 并将相应脂质条带刮下。

## 1.5 转酯化和气相色谱分析

将脂质转移至 10 mL 圆底烧瓶中, 加入 5 mL 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-CH<sub>3</sub>OH (体积百分数), 于 70 °C 油浴中混合磁力搅拌 1 h, 待冷却至室温后加入 2 mL 正己烷及 0.75 mL 去离子水, 混合 30 s 后将上层含有脂肪酸甲酯的正己烷转至 2 mL 色谱瓶中进行气相色谱分析, 其中十七烷酸甘油三酯为内标<sup>[40]</sup>, 此外可根据需要用高纯 N<sub>2</sub> 对正己烷萃取液进行浓缩。各类甘油酯或各种脂肪酸含量表示为每克藻细胞干重中所含脂酰基的毫克数。

## 2 结果与分析

### 2.1 氮胁迫对三角褐指藻生长及光合活性的影响

如表 1 所示, 氮胁迫 3 d 后三角褐指藻的光密度值  $OD_{680}$  较富氮条件降低 29%, 最大 PS II 光量子产率  $F_v/F_m$  降低 9%, 而实际 PS II 光量子产率  $\phi_{PSII}$  则降低 27%。由此表明, 三角褐指藻经氮胁迫诱导后细胞分裂速率显著降低, 其光合活性也显著下降。此外  $F_v/F_m$  的低幅度降低也表明了三角褐指藻仍处于早期氮胁迫阶段。

表 1 氮胁迫对三角褐指藻生长及光合活性的影响

Table 1 The growth performance and photosynthetic activity of *P. tricornutum* in response to nitrogen stress

Growth condition	$OD_{680}$	$F_v/F_m$	$\phi_{PSII}$
N <sup>+</sup>	0.637±0.047*	0.768±0.006*	0.465±0.010*
N <sup>-</sup>	0.451±0.008	0.697±0.004	0.341±0.007

注: N<sup>+</sup>: 富营养培养条件; N<sup>-</sup>: 缺氮培养条件。所有数值表示为 3 个生物学重复的平均值±标准偏差。\*: 同一列数据之间差异显著( $P<0.05$ )。

Note: N<sup>+</sup>: The nitrogen repletion condition; N<sup>-</sup>: The nitrogen depletion condition. Data were all expressed as average of 3 biological replicates±SD. \*: Statistical significant differences—one-way analysis of variance (ANOVA),  $P$ -value<0.05.

## 2.2 氮胁迫下三角褐指藻各甘油酯及其脂肪酸组成的变化

氮胁迫后总甘油酯含量不变,但各甘油酯的含量变化显著。糖脂含量减少 61%,其中 MGDG、DGDG 及 SQDG 含量分别减少 78%、28%、43%,磷脂(PL)含量减少 63%,TAG 含量增加 6 倍(图 1)。

氮胁迫后各类甘油酯的脂肪酸含量变化差异非常大。如图 2 所示, MGDG 的主要脂肪酸为 16:1n7、16:3n4 及 EPA,占 MGDG 总脂肪酸含量的 80% 以上,各脂肪酸在氮胁迫后变化差异显著。MGDG 的饱和脂肪酸(SFA)及单不饱和脂肪酸(MUFA)中 16:0 及 16:1n7 分别下降了 39% 及 84%,多不饱和脂肪酸(PUFA)中 16:2n4、16:3n4 及 EPA 分别下降了 91%、72%、78%。DGDG 的主要脂肪酸为 16:1n7 及 EPA,占 DGDG 总脂肪酸含量的 70% 以上。DGDG 中 16:2n4、EPA 及二十二碳六烯酸(DHA)含量变化差异显著,16:2n4 及 EPA 含量均下降 40% 以上, DHA 几乎下降 100%。SQDG 的脂肪酸以 SFA 及 MUFA 为主,包括 14:0、16:0 及 16:1n7,占 SQDG 总脂肪酸含量的 80% 以上,氮胁迫后 3 种

脂肪酸含量变化显著,分别下降 41%、33%、53%。PL 的主要脂肪酸为 16:0、16:1n7 及 EPA,占 PL 总脂肪酸含量的 65% 以上,氮胁迫后 3 种脂肪酸含量变化显著,分别下降 50%、82%、50%。如图 3 所示, TAG 的主要脂肪酸为 16:0 及 16:1n7,占 TAG 总脂肪酸比例由 57% 提高至 81%,氮胁迫后二者含量均增加了 9 倍。其中 TAG 的 PUFA 包括 16:2n4 及 EPA,16:2n4 含量几乎不变,而 EPA 的含量增加了 5 倍,但二者的组成比例之和却由 18% 下降至 6%。

## 2.3 氮胁迫下三角褐指藻各脂肪酸含量的变化

氮胁迫后总脂肪酸含量几乎不变,但各脂肪酸含量在氮胁迫前后变化差异很大,如图 4 所示,表现为 SFA 及 MUFA 含量的显著增加,而 PUFA 含量的显著降低。其中除 18:0 和 18:1n7 外, SFA 和 MUFA 包括 14:0、16:0、16:1n7 和 18:1n9 含量均显著增加,14:0 和 16:1n7 含量分别增加 44% 和 22%,16:0 和 18:1n9 含量分别增加 1.5 倍和 1.0 倍。此外, PUFA 中 16:2n4、16:3n4、18:2n6、EPA 和 DHA 含量均显著下降,分别下降 66%、67%、56%、49% 和 65%。

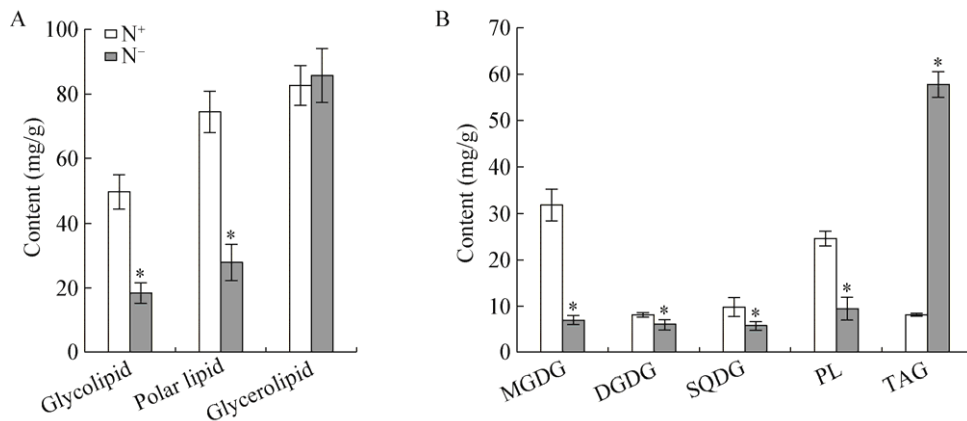


图 1 氮胁迫对三角褐指藻甘油酯含量的影响

### Figure 1 The glycerolipid phenotypes of *P. tricornutum* in response to nitrogen starvation

注: A: 氮胁迫对三角褐指藻糖脂、极性脂及甘油酯含量的影响; B: 氮胁迫对各种甘油酯含量的影响. N<sup>+</sup>: 富营养培养条件; N<sup>-</sup>: 缺氮培养条件. 所有数值表示为 3 个生物学重复的平均值±标准偏差. \*: 同一列数据之间差异显著(P<0.05). PL: 磷脂.

Note: A: Effects of nitrogen stress on contents of glycolipid, polar lipid and glycerolipid in *P. tricornutum*; B: Effects of nitrogen stress on contents of the individual glycerolipid in *P. tricornutum*. N<sup>+</sup>: Nitrogen repletion condition; N<sup>-</sup>: Nitrogen depletion condition. Data were all expressed as average of 3 biological replicates±SD. \*: Statistical significant differences—one-way analysis of variance (ANOVA), P-value<0.05. PL: Phospholipid.

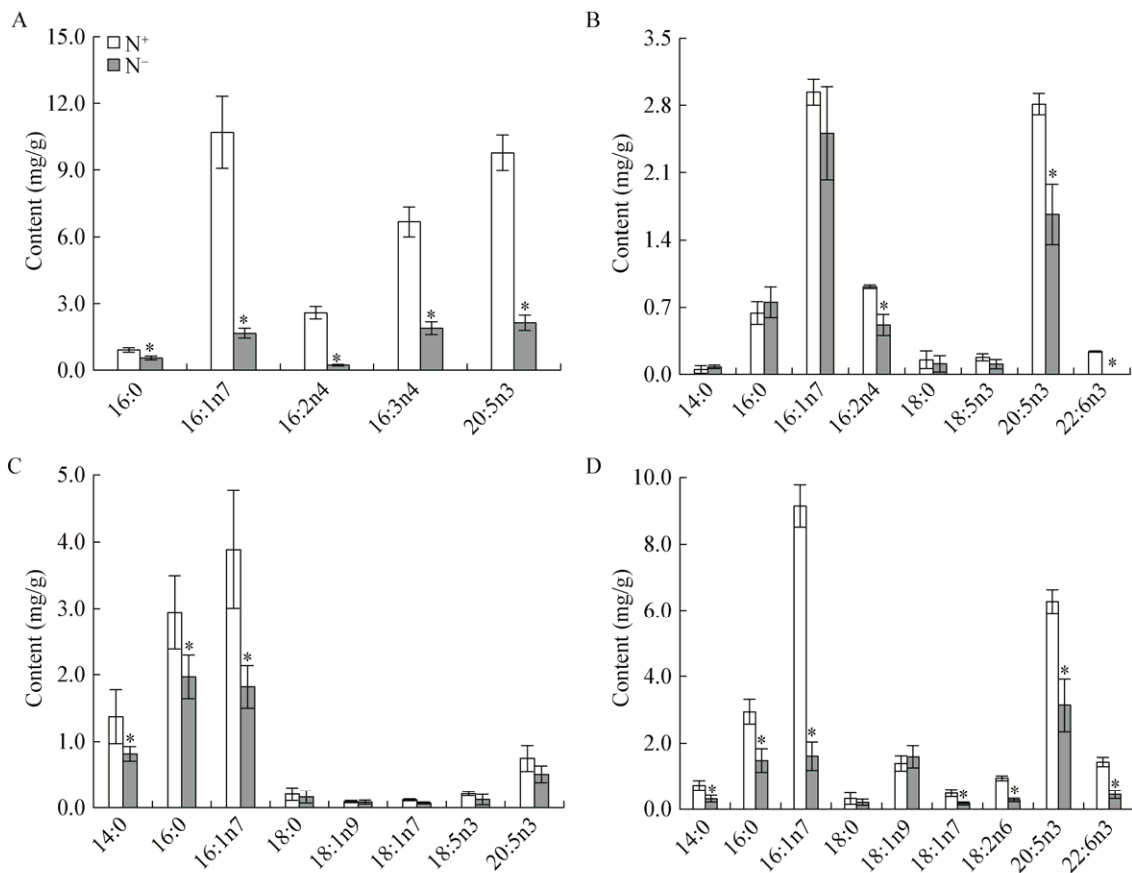


图 2 氮胁迫对三角褐指藻各极性脂脂肪酸含量的影响

Figure 2 The polar lipid phenotypes of *P. tricornutum* in response to nitrogen stress

注: A: 氮胁迫对三角褐指藻 MGDG 脂肪酸含量的影响; B: 氮胁迫对三角褐指藻 DGDG 脂肪酸含量的影响; C: 氮胁迫对三角褐指藻 SQDG 脂肪酸含量的影响; D: 氮胁迫对三角褐指藻 PL 脂肪酸含量的影响. N<sup>+</sup>: 富营养培养条件; N<sup>-</sup>: 缺氮培养条件. 所有数值表示为 3 个生物学重复的平均值±标准偏差. \*: 同一列数据之间差异显著(P<0.05).

Note: A: Effects of nitrogen starvation on the fatty acid contents of MGDG in *P. cornutum*; B: Effects of nitrogen stress on the fatty acid contents of DGDG in *P. cornutum*; C: Effects of nitrogen stress on the fatty acid contents of SQDG in *P. cornutum*; D: Effects of nitrogen stress on the fatty acid contents of phospholipid in *P. cornutum*. N<sup>+</sup>: Nitrogen repletion condition; N<sup>-</sup>: Nitrogen depletion condition. Data were all expressed as average of 3 biological replicates±SD. \*: Statistical significant differences— one-way analysis of variance (ANOVA), P-value<0.05.

氮胁迫后, 藻细胞中 16:0 总含量增加了 14.15 mg/g, 而 TAG 中 16:0 增加了 16.83 mg/g, 所有极性脂的 16:0 含量只减少了 2.68 mg/g, 其中除 DGDG 中 16:0 含量变化不显著外, MGDG、SQDG 和 PL 的 16:0 含量变化均显著, 分别减少 0.35、0.98 和 1.46 mg/g. 氮胁迫后, 藻细胞中 16:1n7 总含量增加了 6.4 mg/g, 而 TAG 中 16:1n7 增加了 25.47 mg/g, 所有极性脂的 16:1n7 含量减少了 19.07 mg/g, 其中除 DGDG 中 16:1n7 含量变化不显著外, MGDG、SQDG 和 PL 中 16:1n7 含量分别减少 9.03、2.07

和 7.54 mg/g, 这些结果与 16:0 类似. 氮胁迫后, 藻细胞中 EPA 总含量减少了 9.86 mg/g, 而 TAG 中 EPA 增加了 2.3 mg/g, 极性脂中 EPA 含量减少了 12.16 mg/g, 其中除 SQDG 中 EPA 含量变化不显著外, MGDG、DGDG 和 PL 中 EPA 含量均显著减少, 分别减少 7.63、1.15 和 3.14 mg/g, 这与上述 16:0 及 16:1n7 均不同. 氮胁迫后, 藻细胞中 DHA 总含量减少了 1.24 mg/g, 只有极性脂中 DGDG 和 PL 的 DHA 含量显著降低, 分别减少 0.24 mg/g 和 0.99 mg/g, 而 TAG 中并无 DHA 的积累.



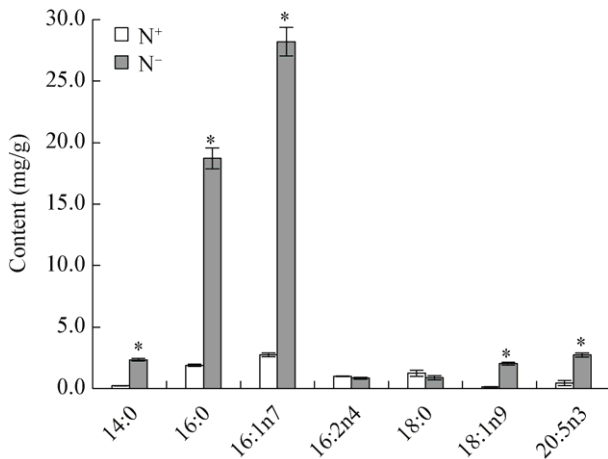


图3 氮胁迫对三角褐指藻 TAG 含量的影响

**Figure 3 The TAG phenotypes of *P. tricornutum* in response to nitrogen stress**

注: N<sup>+</sup>: 富营养培养条件; N<sup>-</sup>: 缺氮培养条件. 所有数值表示为 3 个生物学重复的平均值±标准偏差. \*: 同一列数据之间差异显著( $P < 0.05$ ).

Note: N<sup>+</sup>: Nitrogen repletion condition; N<sup>-</sup>: Nitrogen depletion condition. Data were all expressed as average of 3 biological replicates±SD. \*: Statistical significant differences—one-way analysis of variance (ANOVA),  $P$ -value<0.05.

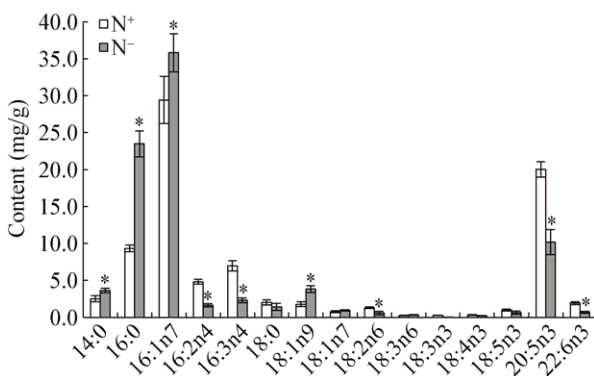


图4 氮胁迫对三角褐指藻各脂肪酸含量的影响

**Figure 4 The fatty acid phenotypes of *P. tricornutum* in response to nitrogen stress**

注: N<sup>+</sup>: 富营养培养条件; N<sup>-</sup>: 缺氮培养条件. 所有数值表示为 3 个生物学重复的平均值±标准偏差. \*: 同一列数据之间差异显著( $P < 0.05$ ).

Note: N<sup>+</sup>: Nitrogen repletion condition; N<sup>-</sup>: Nitrogen depletion condition. Data were all expressed as average of 3 biological replicates±SD. \*: Statistical significant differences—one-way analysis of variance (ANOVA),  $P$ -value<0.05.

### 3 讨论

藻类脂质代谢包括从头合成途径、转化途径和亚细胞区室之间的脂质运输途径, 这些途径在环境条件发生改变时需要进行严格调控才能达到脂质内稳态并保证亚细胞膜结构的稳定性<sup>[41]</sup>. 不同种类微藻的脂质代谢在很多方面都不同, 这也表明了藻类种属在进化上的高度多样性。

目前关于环境条件改变对微藻脂肪酸组成影响的研究已有大量报道, 这些研究表明氮、磷、硅、硫、温度、盐度、光照强度等条件发生改变时脂肪酸的组成会发生改变<sup>[9,25,27,42-44]</sup>. 研究表明环境条件改变也能使微藻每种脂质的含量发生改变, 通常极性脂含量会大幅下降, 同时伴随着储存脂质 TAG 的大量积累. 长期以来, TAG 被认为是藻类、植物、酵母及动物中主要的碳源及能源<sup>[45]</sup>. 但是最近酵母及哺乳动物细胞的研究表明, TAG 代谢可能在脂质内稳态中起重要作用, 能为细胞周期进程提供重要代谢产物<sup>[46]</sup>. 此外, 在莱茵衣藻中, 氮胁迫诱导的 TAG 强化积累来源包括糖脂的转化<sup>[47]</sup>和从头合成途径<sup>[43]</sup>, 但目前三角褐指藻甘油酯对氮胁迫的具体响应研究并不多。

Abida 等<sup>[9]</sup>的研究表明在氮胁迫条件下三角褐指藻的 MGDG 和 PG 含量显著下降, 其他极性脂含量保持不变, TAG 含量显著增加. 而本文中三角褐指藻的所有极性脂含量均显著下降, 与 Abida 等<sup>[9]</sup>研究结果不同, 可能是由于藻株自然特性及培养条件不同所致, 包括培养体积、培养方式、光照强度、培养基等, 可见三角褐指藻的甘油酯尤其是极性脂在不同的培养条件下对氮胁迫的响应是不同的. 在本文中, 氮胁迫诱导的三角褐指藻并无脂质净积累, 但其脂质组分之间已发生重组, 具体表现为 TAG 显著积累而极性脂水平显著降低. 极性膜脂对氮胁迫的响应主要表现为以 MGDG 为主的选择性分解, 使得 DGDG/MGDG 的比率从 0.3 增加至 0.8 (由图 1 计算得出), 这与莱茵衣藻的膜脂适应结果一致, 表现为非双层形成脂质 DGDG 与双层形成脂质 MGDG 的比率在胁迫诱导后增加<sup>[25]</sup>. 因此, 甘油酯头部基

团的交换是三角褐指藻适应氮胁迫的机制之一。

### 3.1 氮胁迫后三角褐指藻 TAG 的酰基来源——从头合成和极性脂转化

氮胁迫期间脂肪酸从头合成对 TAG 积累非常重要<sup>[48]</sup>, 研究表明将脂肪酸合成抑制剂浅蓝菌素(一种  $\beta$ -酮类-酰基-ACP 合成酶的特异性抑制剂), 添加至莱茵衣藻细胞培养液中能抑制 TAG 积累, TAG 含量较氮胁迫 2 d 的对照组细胞少合成 80%, 因此表明了脂肪酸从头合成对 TAG 合成的贡献<sup>[43]</sup>。外源供应的乙酸盐能进一步促进氮胁迫处理藻细胞的脂质积累, 这也证明了脂肪酸合成对 TAG 合成的重要作用<sup>[49]</sup>。从膜脂循环的酰基链也被认为对 TAG 合成有贡献, 因为主要膜脂组分减少与 TAG 积累同时发生<sup>[50]</sup>。酰基链从一种脂质转移至另一种脂质能通过两种方式实现: 通过酰基转移酶实现如 CrPDAT 和 CrDGAT, 或者是通过脂酶(如 PGD)水解一种脂质(如 MGDG)释放出游离脂肪酸后再活化成酰基-CoA 或酰基-ACP。转酰基途径对脂质合成的贡献作用已通过 CrPDAT 和 CrDGAT 的研究得到证实<sup>[51-52]</sup>。最近通过从莱茵衣藻中分离一株半乳糖脂酶合成缺陷诱变株 *pgd1* 证明了酯酶 PGD1 能特异性水解脂膜 MGDG 的 sn-1 位脂酰基 18:1n9, 同时释放的酰基以 18:1n9-CoA 或 18:1n9-ACP 形式进一步参与 TAG 的合成<sup>[49]</sup>。总之, 这些证据表明氮胁迫下合成的 TAG 大部分来源于从头合成途径, 部分来源于膜脂酰基链的转化。但是这两种途径各自的贡献率通常取决于培养条件(自养或兼养)或胁迫类型(光照、温度或营养盐等)。

在植物和微藻中, 脂肪酸的合成发生在叶绿体内, 新合成的脂肪酸大多是饱和或单不饱和的, 如 16:0、18:0、18:1 等<sup>[48]</sup>。这些脂肪酸能通过生成极性脂在去饱和酶作用下生成 PUFA, 而去饱和酶不会以 TAG 为底物, 说明 TAG 中积累的 PUFA 来自于极性脂的转化<sup>[44]</sup>, 因此可以通过 TAG 中积累的 SFA 和 MUFA 含量来估计氮胁迫后从头合成途径对 TAG 合成的贡献度, 而 TAG 中积累的 PUFA 含量则可以用来估计氮胁迫后各极性脂的酰基转化

作用对 TAG 合成所做的贡献。在本文中, 氮胁迫后藻细胞 TAG 增加的 16:0 大部分为从头合成, 还有部分来自原有极性脂(表 2), 通过原有各极性脂中 16:0 的减少量推算出其对 TAG 转化作用的贡献度大小为 PL>SQDG>MGDG。由图 4 计算出 TAG 积累的 16:0 从头合成比例为 84%, 只有 16% 为原有极性脂的转化作用。同样地, 原有各极性脂中 16:1n7 对 TAG 转化作用的贡献度大小为 MGDG>PL>SQDG, TAG 中积累的 16:1n7 只有 25% 来自从头合成作用, 而极性脂的转化贡献度则高达 75%。另外, TAG 中增加的 EPA 全部来自于极性脂的转化, 而藻细胞中所有极性脂减少的总 EPA 含量中只有 19% 用于转化成 TAG (由图 4 计算得出), 这部分 EPA 向 TAG 的流动可用于消耗藻细胞因氮胁迫诱导积累的多余电子、NAD(P)H 及 ATP, 从而保护细胞免受氧化损伤, 而原有极性脂中减少的其余 EPA 则发生了分解作用。TAG 中 EPA 占藻细胞总 EPA 的百分比由 2% 升高至 27%, 这也说明了极性脂中 EPA 向 TAG 的流动或转化作用。有趣的是, 藻细胞 TAG 中并无 DHA 积累, 这与 Popko 等<sup>[34]</sup>研究结果一致, 说明藻细胞中减少的 DHA 全部发生了分解。DHA 及 EPA 在应对环境胁迫因子氮胁迫时的响应结果不同, 说明这两种 PUFA 对胁迫条件的响应机制也不同, 而这也有待于进一步研究。

表 2 氮胁迫条件下从头合成及极性脂转化对三角褐指藻 TAG 合成的贡献作用

Table 2 The contribution of *de novo* synthesis pathway and polar lipid recycling pathway to TAG biosynthesis in *P. tricornutum* under nitrogen stress

脂肪酸 Fatty acid	从头合成		极性脂转化	
	<i>De novo</i> synthesis		Polar lipid recycling	
	含量 Content (mg/g)	合成贡献度 Contribution (%)	含量 Content (mg/g)	合成贡献度 Contribution (%)
14:0	1.11	52	1.01	48
16:0	14.15	84	2.68	16
16:1n7	6.40	25	19.07	75
18:1n9	1.90	100	0.00	0
EPA	0.00	0	2.30	100
Total	23.56	48	25.06	52



综上所述,氮胁迫后三角褐指藻的 SFA (主要是 16:0)在藻细胞总脂肪酸及 TAG 组成中显著增加,而在极性脂中保持不变或显著减少,这些结果支持了脂肪酸的从头合成及其向 TAG 合成的流动,这与莱茵衣藻和微拟球藻的情况类似<sup>[44,53]</sup>。此外, MUFA 16:1n7 在藻细胞总脂肪酸组成中的增加量要显著低于 TAG 中的显著增加量,与之对应的是极性脂中该脂肪酸含量的大幅下降,这说明了极性脂中 16:1n7 向 TAG 中的流动,即极性脂的酰基转化对 TAG 合成具有重要作用,这与莱茵衣藻中情况类似<sup>[49]</sup>。由此可见,氮胁迫后三角褐指藻 TAG 合成来源为从头合成及极性脂转化(表 2),其各自贡献度分别为 48%和 52%,约为 1:1,其中从头合成部分主要来自于 16:0,极性脂转化部分主要来自 MGDG 和 PL 的 16:1n7,还包括一部分来自极性脂的 EPA。

### 3.2 氮胁迫后极性脂中 PUFA 的去向

微藻在多种胁迫条件下的一个重要响应特征是极性脂含量降低,尤其是构成糖脂的 PUFA 水平大幅下降<sup>[28,54]</sup>。研究表明这些降低的 PUFA 在胁迫诱导下共有两个重要去向,一是作为酰基供体或是甘油二酯骨架用于合成 TAG,发生膜脂转化作用<sup>[25]</sup>;二是作为氧化作用的底物,发生了分解作用<sup>[28]</sup>。

本文中,氮胁迫 3 d 使极性脂含量减少了 46.5 mg/g (由图 1 计算得出),其中 54%转化成了 TAG, 46%进行了分解(由图 2 及图 3 计算得出)。其中极性脂的 PUFA 含量减少了 59%,除少量 EPA 作为酰基供体转化成 TAG 外,大部分极性脂尤其是糖脂 MGDG 中的 PUFA 如 16:2n4、16:3n4 及 EPA 在氮胁迫条件下都发生了分解作用。

Légeret 等<sup>[25]</sup>研究表明,莱茵衣藻在短期热胁迫内特异性多不饱和 MGDG sn1-18:3/sn2-16:4 能通过一种未经鉴定的酶直接转化成甘油二酯(DAG sn1-18:3/sn2-16:4),再转化成多不饱和 TAG sn1-18:3/sn2-16:4/sn3-18:3, TAG 的第 3 个脂肪酸来源于 PE 或 DGTS,这些研究结果为多不饱和极性脂通过甘油骨架或酰基向 TAG 的转化提供了证据。

本文中极性脂 MGDG、DGDG 和 PL 的酰基组分 EPA 也在氮胁迫诱导后通过这种酰基转化途径合成了 TAG,这与 Popko 等<sup>[34]</sup>研究结果一致。因此在氮胁迫下三角褐指藻中以 EPA 为主的 PUFA 从膜脂到 TAG 的流动也能成为其避免细胞自身发生脂质过氧化的一个策略。

此外本文中三角褐指藻以 16:2n4、16:3n4 和 EPA 为主的 PUFA 还发生了分解作用,三角褐指藻这种 PUFA 种类的选择性分解导致氮胁迫下 SFA 的组分增加,膜结构中 PUFA/SFA 的比率减小,说明膜脂组成变化的适应性能在新环境条件下维持正确的膜流动性,该现象称为内粘性适应(Homeoviscous adaptation)<sup>[25]</sup>,本研究结果表明这也是三角褐指藻甘油酯应对氮胁迫的一种保守机制。

微藻在氮胁迫下的甘油酯响应是一个动态变化过程<sup>[32-33]</sup>,TAG 在积累的同时伴随着极性脂的合成、分解与转化<sup>[9,33]</sup>,因此 TAG 的积累与极性脂的变化密切相关;依据藻细胞脂肪酸相对丰度的变化,TAG 的积累分为不同阶段<sup>[55]</sup>,表明极性脂对 TAG 积累的贡献度也逐渐变化。本文中三角褐指藻氮胁迫 2 d 后最大 PS II 光子产率  $F_v/F_m$  只降低了 9%,TAG 含量只有 57.8 mg/g,表明其处于早期氮胁迫阶段,本研究结果突出了原有极性脂在早期氮胁迫阶段中对 TAG 积累的重要贡献作用,其贡献度达 52%。本文通过三角褐指藻甘油酯及其脂肪酸含量的变化,定量研究了氮胁迫早期从头合成和原有极性脂转化途径对 TAG 积累的各自贡献度,还定量研究了氮胁迫早期大量减少的极性脂在 TAG 转化及分解途径中的分配去向,这些结果表明了氮胁迫早期极性脂对 TAG 积累的重要性以及甘油酯响应在维持脂质内稳态过程中所发挥的重要作用,而目前的研究大多集中于高含量 TAG 的氮胁迫阶段<sup>[31]</sup>或其积累的动态变化过程<sup>[32-33]</sup>,关于早期氮胁迫时期内 TAG 合成来源及极性脂的响应研究并不多,这将为氮胁迫不同时期内微藻甘油酯响应机制的研究奠定基础。

## 4 结论

综上所述, 当氮胁迫诱导的三角褐指藻 TAG 含量为 57.8 mg/g 时, 积累的 TAG 酰基中有 48% 来自从头合成, 52% 来自极性脂转化; 而氮胁迫诱导所减少的极性脂酰基中有 54% 转化成 TAG, 46% 发生了分解。三角褐指藻极性脂发生的重组作用, 一方面能促进 TAG 的合成, 另一方面可通过保持一定水平的 PUFA 来维持藻细胞的脂质内稳态, 这些对于生物柴油工业化生产及富含 PUFA 的营养食品开发具有重要的生物学启示作用。此外, 高效薄层色谱结合气相色谱技术能为微藻甘油酯对环境变化响应提供准确的定性定量信息, 从而促进微藻脂质代谢研究。

## REFERENCES

- [1] Nelson DM, Tréguer P, Brzezinski MA, et al. Production and dissolution of biogenic silica in the ocean: revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation[J]. *Global Biogeochemical Cycles*, 1995, 9(3): 359-372
- [2] van Den Hoek C, Mann D, Jahns HM. *Algae: An Introduction to Phycology*[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1996
- [3] Bhattacharya D, Archibald JM, Weber APM, et al. How do endosymbionts become organelles? Understanding early events in plastid evolution[J]. *Bioessays*, 2007, 29(12): 1239-1246
- [4] Armbrust EV, Berges JA, Bowler C, et al. The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism[J]. *Science*, 2004, 306(5693): 79-86
- [5] Bowler C, Allen AE, Badger JH, et al. The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes[J]. *Nature*, 2008, 456(7219): 239-244
- [6] Allen AE, Vardi A, Bowler C. An ecological and evolutionary context for integrated nitrogen metabolism and related signaling pathways in marine diatoms[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2006, 9(3): 264-273
- [7] Zhao PP, Gu WH, Wu SC, et al. Changes in central carbon metabolism of *Phaeodactylum tricorutum* are beneficial for lipid accumulation under nitrogen starvation conditions[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2015, 60(23): 2196-2208 (in Chinese)  
赵佩佩, 顾文辉, 伍松翠, 等. 氮限制有利于三角褐指藻脂质积累[J]. *科学通报*, 2015, 60(23): 2196-2208
- [8] Hockin NL, Mock T, Mulholland F, et al. The response of diatom central carbon metabolism to nitrogen starvation is different from that of green algae and higher plants[J]. *Plant Physiology*, 2012, 158(1): 299-312
- [9] Abida H, Dolch LJ, Mei C, et al. Membrane glycerolipid remodeling triggered by nitrogen and phosphorus starvation in *Phaeodactylum tricorutum*[J]. *Plant Physiology*, 2015, 167(1): 118-136
- [10] Shen PL, Wang HT, Pan YF, et al. Identification of characteristic fatty acids to quantify triacylglycerols in microalgae[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 162
- [11] 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
- [12] Patil V, Källqvist T, Olsen E, et al. Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed[J]. *Aquaculture International*, 2007, 15(1): 1-9
- [13] Xue J, Niu YF, Huang T, et al. Genetic improvement of the microalga *Phaeodactylum tricorutum* for boosting neutral lipid accumulation[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 27: 1-9
- [14] Berges JA, Harrison PJ. Nitrate reductase activity quantitatively predicts the rate of nitrate incorporation under steady state light limitation: a revised assay and characterization of the enzyme in three species of marine phytoplankton[J]. *Limnology and Oceanography*, 1995, 40(1): 82-93
- [15] Levitan O, Dinamarca J, Zelzion E, et al. Remodeling of intermediate metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricorutum* under nitrogen stress[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(2): 412-417
- [16] Guerra LT, Levitan O, Frada MJ, et al. Regulatory branch points affecting protein and lipid biosynthesis in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2013, 59: 306-315
- [17] Alipanah L, Rohloff J, Winge P, et al. Whole-cell response to nitrogen deprivation in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(20): 6281-6296
- [18] Mus F, Toussaint JP, Cooksey KE, et al. Physiological and molecular analysis of carbon source supplementation and pH stress-induced lipid accumulation in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(8): 3625-3642
- [19] Wu SC, Huang AY, Zhang BY, et al. Enzyme activity highlights the importance of the oxidative pentose phosphate pathway in lipid accumulation and growth of *Phaeodactylum tricorutum* under CO<sub>2</sub> concentration[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8: 78
- [20] Zienkiewicz K, Du ZY, Ma W, et al. Stress-induced neutral lipid biosynthesis in microalgae—Molecular, cellular and physiological insights[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2016, 1861(9): 1269-1281
- [21] Horn PJ, Benning C. The plant lipidome in human and environmental health[J]. *Science*, 2016, 353(6305): 1228-1232
- [22] Boudière L, Michaud M, Petroustos D, et al. Glycerolipids in photosynthesis: composition, synthesis and trafficking[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2014, 1837(4): 470-480
- [23] Li-Beisson Y, Nakamura Y, Harwood J. Lipids: from chemical structures, biosynthesis, and analyses to industrial applications[A]//Nakamura Y, Li-Beisson Y. *Lipids in Plant and Algae Development*[M]. Cham: Springer International Publishing, 2016: 1-18
- [24] Bréhélin C, Kessler F, van Wijk KJ. Plastoglobules: versatile lipoprotein particles in plastids[J]. *Trends in Plant Science*, 2007, 12(6): 260-266
- [25] Légeret B, Schulz-Raffelt M, Nguyen HM, et al. Lipidomic and transcriptomic analyses of *Chlamydomonas reinhardtii* under heat

- stress unveil a direct route for the conversion of membrane lipids into storage lipids[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2016, 39(4): 834-847
- [26] Alboresi A, Perin G, Vitulo N, et al. Light remodels lipid biosynthesis in *Nannochloropsis gaditana* by modulating carbon partitioning between organelles[J]. *Plant Physiology*, 2016, 171(4): 2468-2482
- [27] Yang DW, Song DH, Kind T, et al. Lipidomic analysis of *Chlamydomonas reinhardtii* under nitrogen and sulfur deprivation[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0137948
- [28] Martin GJO, Hill DRA, Olmstead ILD, et al. Lipid profile remodeling in response to nitrogen deprivation in the microalgae *Chlorella* sp. (Trebouxiophyceae) and *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae)[J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e103389
- [29] Longworth J, Wu DY, Huete-Ortega M, et al. Proteome response of *Phaeodactylum tricoratum*, during lipid accumulation induced by nitrogen depletion[J]. *Algal Research*, 2016, 18: 213-224
- [30] Ge F, Huang WC, Chen Z, et al. Methylcrotonyl-CoA carboxylase regulates triacylglycerol accumulation in the model diatom *Phaeodactylum tricoratum*[J]. *The Plant Cell*, 2014, 26(4): 1681-1697
- [31] Yang ZK, Niu YF, Ma YH, et al. Molecular and cellular mechanisms of neutral lipid accumulation in diatom following nitrogen deprivation[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6(1): 67
- [32] Remmers IM, Martens DE, Wijffels RH, et al. Dynamics of triacylglycerol and EPA production in *Phaeodactylum tricoratum* under nitrogen starvation at different light intensities[J]. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0175630
- [33] Natunen K, Seppälä J, Koivula RJ, et al. Monitoring cell-specific neutral lipid accumulation in *Phaeodactylum tricoratum* (Bacillariophyceae) with Nile Red staining—a new method for FlowCAM[J]. *Journal of Phycology*, 2017, 53(2): 396-404
- [34] Popko J, Herrfurth C, Feussner K, et al. Metabolome analysis reveals betaine lipids as major source for triglyceride formation, and the accumulation of sedoheptulose during nitrogen-starvation of *Phaeodactylum tricoratum*[J]. *PLoS One*, 2016, 11(10): e0164673
- [35] Wang Z, Benning C. *Arabidopsis thaliana* polar glycerolipid profiling by thin layer chromatography (TLC) coupled with gas-liquid chromatography (GLC)[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2011(49): e2518
- [36] Schröter J, Griesinger H, Reuÿ E, et al. Unexpected products of the hypochlorous acid-induced oxidation of oleic acid: a study using high performance thin-layer chromatography–electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2016, 1439: 89-96
- [37] Feng DN, Chen ZA, Xue S, et al. Increased lipid production of the marine oleaginous microalgae *Isochrysis zhangjiangensis* (Chrysophyta) by nitrogen supplement[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(12): 6710-6716
- [38] Maxwell K, Johnson GN. Chlorophyll fluorescence—a practical guide[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2000, 51(345): 659-668
- [39] Meng YY, Jiang JP, Wang HT, et al. The characteristics of TAG and EPA accumulation in *Nannochloropsis oceanica* IMET1 under different nitrogen supply regimes[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 179: 483-489
- [40] Liu J, Liu YN, Wang HT, et al. Direct transesterification of fresh microalgal cells[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 176: 284-287
- [41] Liu B, Benning C. Lipid metabolism in microalgae distinguishes itself[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2013, 24(2): 300-309
- [42] Yu ET, Zendejas FJ, Lane PD, et al. Triacylglycerol accumulation and profiling in the model diatoms *Thalassiosira pseudonana* and *Phaeodactylum tricoratum* (Bacillariophyceae) during starvation[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2009, 21(6): 669-681
- [43] Fan JL, Andre C, Xu CC. A chloroplast pathway for the *de novo* biosynthesis of triacylglycerol in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *FEBS Letters*, 2011, 585(12): 1985-1991
- [44] Goold HD, Cuiné S, Légeret B, et al. Saturating light induces sustained accumulation of oil in plastidal lipid droplets in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Plant Physiology*, 2016, 171(4): 2406-2417
- [45] Li YT, Han DX, Yoon K, et al. Molecular and cellular mechanisms for lipid synthesis and accumulation in microalgae: biotechnological implications[A]/Richmond A, Hu Q. *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*[M]. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd., 2013: 545-565
- [46] Kohlwein SD. Triacylglycerol homeostasis: insights from yeast[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(21): 15663-15667
- [47] Li XB, Moellering ER, Liu BS, et al. A galactoglycerolipid lipase is required for triacylglycerol accumulation and survival following nitrogen deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *The Plant Cell*, 2012, 24(11): 4670-4686
- [48] Moellering ER, Benning C. RNA interference silencing of a major lipid droplet protein affects lipid droplet size in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Eukaryotic Cell*, 2010, 9(1): 97-106
- [49] Goodson C, Roth R, Wang ZT, et al. Structural correlates of cytoplasmic and chloroplast lipid body synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* and stimulation of lipid body production with acetate boost[J]. *Eukaryotic Cell*, 2011, 10(12): 1592-1606
- [50] Siaux M, Cuiné S, Cagnon C, et al. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves[J]. *BMC Biotechnology*, 2011, 11: 7
- [51] Yoon K, Han DX, Li YT, et al. Phospholipid: diacylglycerol acyltransferase is a multifunctional enzyme involved in membrane lipid turnover and degradation while synthesizing triacylglycerol in the unicellular green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *The Plant Cell*, 2012, 24(9): 3708-3724
- [52] Liu J, Han DX, Yoon K, et al. Characterization of type 2 diacylglycerol acyltransferases in *Chlamydomonas reinhardtii* reveals their distinct substrate specificities and functions in triacylglycerol biosynthesis[J]. *The Plant Journal*, 2016, 86(1): 3-19
- [53] Dong HP, Williams E, Wang DZ, et al. Responses of *Nannochloropsis oceanica* IMET1 to long-term nitrogen starvation and recovery[J]. *Plant Physiology*, 2013, 162(2): 1110-1126
- [54] Ma XN, Liu J, Liu B, et al. Physiological and biochemical changes reveal stress-associated photosynthetic carbon partitioning into triacylglycerol in the oleaginous marine alga *Nannochloropsis oculata*[J]. *Algal Research*, 2016, 16: 28-35
- [55] Breuer G, Lamers PP, Martens DE, et al. The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgal strains[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 124: 217-226