

2,4-表油菜素内酯对三角褐指藻生长及有机质积累的影响

王小飞, 张问, 王何瑜, 龚一富*

宁波大学海洋学院, 浙江宁波315211

摘要: 本文以三角褐指藻为原料, 探究了不同浓度2,4-表油菜素内酯(2,4-epibrassinolide, EBR)对该藻生长及对多糖、蛋白质、总脂、岩藻黄素等有机质积累的影响。结果表明, EBR对三角褐指藻生长和有机质含量表现为低浓度促进、高浓度抑制。当外源EBR浓度为0~0.2 mg·L⁻¹时, 随着EBR浓度的升高, 三角褐指藻的生物量、有机质含量及产量均呈先增加后下降的趋势。生物量、多糖、蛋白质、岩藻黄素含量在EBR浓度为0.05 mg·L⁻¹达到最大值, 分别是1.36 g·L⁻¹、3.85%、17.45%、0.065%。总脂含量在EBR浓度为0.1 mg·L⁻¹时达到最大值33.33%, 是对照组的2.15倍, 且总脂单位体积产量极显著的高于其他组($P < 0.01$), 藻油产量高达52.69 mg·L⁻¹·d⁻¹。表明适宜浓度的EBR可以促进三角褐指藻生长和有机质的积累。

关键词: 三角褐指藻; 2,4-表油菜素内酯; 生长; 有机质

Effects of 2,4-Epibrassinolide on *Phaeodactylum tricornutum* Growth and Organics Accumulation

WANG Xiao-Fei, ZHANG Wen, WANG He-Yu, GONG Yi-Fu*

School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo, Zhejiang 315211, China

Abstract: Effects of 2,4-epibrassinolide (EBR) on the growth and accumulation of organics in *Phaeodactylum tricornutum* were investigated. The results showed low concentration of EBR promoted the growth and content of organic while high concentration inhibited it. When the concentration of exogenous EBR varied from 0 mg·L⁻¹ to 0.2 mg·L⁻¹, the biomass, organic matter content and productivity were increased firstly and then decreased with the increase of concentration. When the concentration of EBR was 0.05 mg·L⁻¹, the content of biomass, polysaccharide, protein and fucoxanthin got the maximum, respectively were 1.36 g·L⁻¹, 3.85%, 17.45% and 0.065%. The maximum total lipid content was 33.33% with 0.1 mg·L⁻¹ EBR, which was 2.15 times as much as the control group, and the highest volumetric productivity was significantly different, with the algal oil productivity was 52.69 mg·L⁻¹·d⁻¹. It indicated that the suitable concentration of EBR could promote the growth of *P. tricornutum* and the accumulation of organics.

Key words: *Phaeodactylum tricornutum*; 2,4-epibrassinolide; growth; organics

三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)为真核单细胞海洋硅藻(蔡卓平等2013), 生长速度快, 适应范围广(王溢等2012), 富含丰富的蛋白质、脂肪、多糖、岩藻黄素等生物活性物质, 可被制成药品、保健品、饲料等, 在医药、食品、水产养殖等领域具有重要开发应用价值。比如具有抗癌、抗心血管疾病、抗肥胖等作用的岩藻黄素, 5%粗品每公斤售价可高达450美元。如何提高三角褐指藻的生长水平和有机质的积累, 成为制约三角褐指藻深加工的一个重要因素。

油菜素内酯(brassinolide, BR)又称芸薹素内酯, 是一类多羟基甾醇类物质(Grove等1979), 广泛存在于植物的根、茎、叶、花粉和种子等器官中, 对植物的生长发育有重要的影响(Bajguz和Tretyn

2003), 被称为“第六大植物激素”(Bajguz 2000)。纳摩尔浓度的BR就能够影响植物的生长发育, 包括细胞的分裂和伸长、细胞膜超级化、核酸和蛋白质的合成、光合作用及内源激素(如乙烯)的合成(Bajguz和Czepak 1996; Bajguz 2000; Choudhary等2012)。目前已经分离或合成了超过70种油菜素内酯化合物(Bajguz 2009), 其中2,4-表油菜素内酯(2,4-epibrassinolide, EBR)是应用最为广泛的一种(Ozdemir等2004)。目前国内外对于EBR的研究多集中在番茄、甘薯、黄瓜等农作物上, 对单细胞

收稿 2015-06-19 修定 2015-08-28

资助 宁波科技攻关(2013C10018)和浙江省科技厅重点科技创新团队(2012R10029-07和2010R50029)。

* 通讯作者(E-mail: gongyifu@163.com; Tel: 13486673796)。

藻类研究较少, 仅有小球藻(Bajguz和Czerpak 1996b)、盐藻(袁琳和赵毓橘1999)、亚心形扁藻及球等鞭金藻(侯和胜和陈敏资1997)等被报道过, EBR对三角褐指藻生长发育、新陈代谢等方面的影响鲜有研究。

本实验研究了不同浓度EBR对三角褐指藻生长及对多糖、蛋白质、总脂、岩藻黄素等有机质积累的影响, 拟找出促进三角褐指藻生长和有机质积累的最适浓度, 缩短生长周期, 改善藻细胞品质, 为其大规模培养及精深加工提供理论依据。

材料与方 法

1 三角褐指藻的培养

三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)由宁波大学海洋生物工程重点实验室藻种室提供。天然海水经沉淀和脱脂棉过滤后, 高温灭菌。待冷却至室温后, 按1:1 000的比例加入宁波大学3#母液(表1), 摇晃均匀后备用。以1:10的比例接入对数期生长的藻种, 并置于光照培养箱中培养。培养温度为20 °C, 光照强度为90 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 光照周期为12 h/12 h(光/暗), 每天充分摇瓶3次, 并随机交换位置以减少光照差异, 共培养10 d。

表1 宁波大学3#母液配方
Table 1 Composition of culture fluid

营养盐成分	质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
KNO_3	100
KH_2PO_4	10
$\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.5
MnSO_4	0.25
EDTA- Na_2	10
V_{B1}	6×10^{-3}
V_{B12}	5×10^{-5}

2 EBR浓度设置

设置5个水平的EBR质量浓度, 分别为0、0.05、0.1、0.15和0.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 每个浓度梯度设3个平行。

3 三角褐指藻生长曲线及比生长速率测定

取5 mL对数生长期的三角褐指藻藻液, 倍比稀释, 采用分光光度法测定各组稀释液的光吸收值 OD_{680} , 同时用血球计数法计算各组样品中三角褐指藻的细胞密度。根据测定结果以光吸收值

OD_{680} 为X轴, 三角褐指藻细胞密度为Y轴, 绘制光密度-细胞密度标准曲线, 得到回归方程为 $y=18.063x+0.0047$, 直线方程的相关系数是0.9964, 说明 OD_{680} 可以表征细胞密度。

培养过程中每天定时从不同质量浓度EBR处理的培养液中取3 mL藻液, 测定 OD_{680} 值, 并根据上述光密度-细胞密度回归方程, 计算各样品中三角褐指藻的细胞密度, 绘出三角褐指藻生长曲线。

比生长速率计算公式为 $\mu=(\ln N_t-\ln N_0)/T$, N_0 是接种后初始的细胞数, N_t 是经过 t 天后达到对数生长期时的细胞数。

4 生物量的测定

取稳定期的藻液40、80、120、160、200 mL, 分别加入160、120、80、40、0 mL海水培养液, 测定其 OD_{680} 的值。然后将这5组样品5 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min, 收集藻泥, 冷冻干燥48 h, 称重, 每个样品设3个平行组。以 OD_{680} 为X轴, 生物量($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)为Y轴, 绘制 OD_{680} -生物量标准曲线, 其线性关系为 $y=1.5961x+0.031$, 相关系数为0.9955。根据不同浓度EBR处理下样品的吸光值, 通过该标准曲线, 计算稳定期时三角褐指藻细胞的生物量。

5 有机质含量的测定

5.1 多糖含量的测定

取一定体积的藻液, 测定 OD_{680} 后, 5 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min, 用去离子水洗涤2次后收集沉淀, 加入少量蒸馏水, 反复冻融3次破壁, 离心得上清液, 藻渣重复洗涤2次, 合并上清液。采用蒽酮法测定多糖含量, 每组设3个平行。

5.2 蛋白质含量的测定

取一定体积的藻液, 测定其 OD_{680} 的值后, 5 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min, 用去离子水洗涤2次后收集藻泥, 加入适量蒸馏水, 反复冻融3次破壁, 5 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min得上清液, 藻渣重复洗涤2次, 合并上清液。采用考马斯亮蓝法测定蛋白质含量, 每组设3个平行。

5.3 总脂含量的测定

取一定体积的藻液, 5 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min, 用去离子水洗涤2次后收集藻泥, 冷冻干燥48 h后称重。采用Bligh-Dyer法(Bligh和Dyer 1959)抽提总脂, 每组设3个平行。

总脂含量=(藻油质量/藻粉干重) $\times 100\%$

5.4 岩藻黄素含量的测定

取一定体积的藻液, $5\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min, 用去离子水洗涤2次后收集藻泥, 冷冻干燥后研磨得到藻粉。采用有机溶剂法提取岩藻黄素, 向藻粉中加入无水乙醇, 使其料液比为 $1:40\ (\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$, 在 $60\ ^\circ\text{C}$ 的条件下避光静置, 浸提2次, 每次1 h。 $5\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min, 得到上清液, 稀释后测定样品在 $445\ \text{nm}$ 处的吸光值, 按如下公式计算岩藻黄素含量(惠伯棣2005): 岩藻黄素含量($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)= $1\ 000A_{445}NV/(A_{1\text{cm}}^{1\%}M\times 100)$; 式中, A_{445} 为岩藻黄素最大吸收峰值; N 为稀释倍数; V 为粗提液总体积(mL); $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ 为在 $1\ \text{cm}$ 光程长的比色皿中 $1\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 岩藻黄素的理论吸收值, 即 $1\ 600$; M 为样品质量 g 。

实验结果

1 EBR对三角褐指藻生长及生物量的影响

不同质量浓度EBR诱导培养后, 三角褐指藻细胞生长结果见图1。由图1可见, 三角褐指藻在

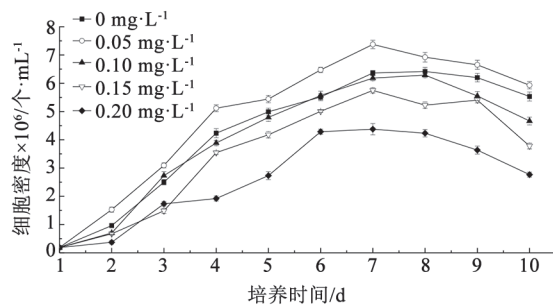


图1 EBR对三角褐指藻生长的影响

Fig.1 Effect of EBR on the growth of *P. tricornutum*

$0\sim 0.2\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的EBR浓度范围内均可生长, 在 $1\sim 6\ \text{d}$ 内整体均生长比较快, 处于对数生长期; $7\sim 8\ \text{d}$ 内藻细胞密度变化不大, 处于稳定期; 第8天之后, 藻细胞密度逐渐降低, 处于衰亡期。从各曲线可以看出, 在整个培养周期内, $0.05\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的EBR处理后, 细胞密度均高于对照组, 即此浓度促进细胞生长。 $0.1\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度处理后三角褐指藻的生长状况和对照组相比差异不大, 略低于对照组。 $0.15\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.2\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理条件下, 细胞密度明显低于对照组, 且 $0.2\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度影响作用最大, 即此浓度的EBR抑制三角褐指藻细胞生长, 浓度越高, 抑制作用越明显。各组实验条件下, 三角褐指藻细胞

密度均在稳定期时达到最大值, 最高细胞密度出现在 $0.05\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理7 d后, 为 $7.374\times 10^6\ \text{个}\cdot\text{mL}^{-1}$, 是对照组($0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)培养下的1.16倍, $0.1\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 培养的1.19倍, $0.15\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 培养的1.28倍, $0.2\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 培养的1.68倍。

由图2可以看出, 当EBR浓度小于 $0.05\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 三角褐指藻的生物量和比生长速与浓度成正相关, 处理浓度大于 $0.05\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 与EBR浓度呈负相关。经SPSS 19.0单因素方差分析, EBR浓度对三角褐指藻生物量有极显著影响($P<0.01$)。 $0.05\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 培养条件下的生物量最高, 达 $1.54\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 是对照组的1.29倍, $0.1\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 培养下的1.18倍, $0.15\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 培养下的1.27倍, $0.2\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 培养下的1.64倍。比生长速率也在 $0.05\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 条件下达到最大, 是对照组的1.04倍, 其他各组比生长速率均小于对照组。

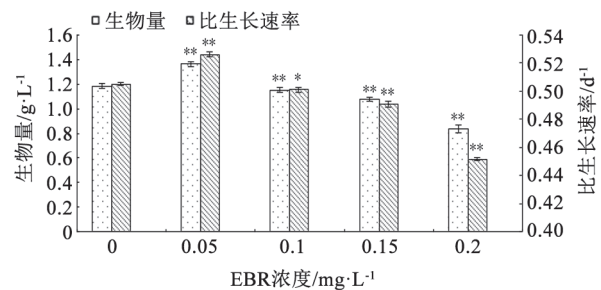


图2 EBR对三角褐指藻生物量及比生长速率的影响

Fig.2 Effect of EBR on the biomass and specific growth rate of *P. tricornutum*

**表示差异极显著($P<0.01$)。下图同此。

2 EBR对三角褐指藻多糖、蛋白质、总脂、岩藻黄素含量的影响

对图3数据经SPSS 19.0单因素方差分析可知, EBR对多糖、蛋白质、总脂均有极显著影响($P<0.01$)。随EBR浓度的增加, 三角褐指藻多糖含量呈先增加后下降的趋势, 在 $0.05\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时达到最大值, 为 3.84% , 是对照组(2.98%)的1.29倍。之后随浓度变大, 促进作用越来越弱, $0.2\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时表现为抑制作用, 多糖含量仅为 2.86% 。EBR对三角褐指藻蛋白质含量的促进作用不明显, 浓度为 $0.05\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 蛋白质含量达 17.46% , 仅为对照组(16.83%)的1.04倍。当EBR浓度超过 $0.05\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 抑制作用非常明显, 浓度增大到 $0.2\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 蛋白质含量比对照组下降了 49.2% 。EBR对总脂的含

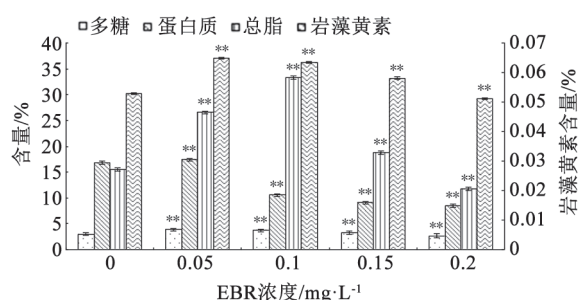


图3 EBR对三角褐指藻有机物含量的影响

Fig.3 Effects of EBR on organic matter contents of *P. tricornutum*

量影响也呈现先增加后下降的趋势,且差异非常显著,在0.1 mg·L⁻¹时到达最大值33.32%,为对照组(15.48%)的2.15倍。在0.05 mg·L⁻¹和0.15 mg·L⁻¹时总脂含量虽然低于最大值,但仍然起到促进作用,0.2 mg·L⁻¹时表现为抑制作用,仅为11.75%,比对照组下降了24.10%。如图3所示,EBR对岩藻黄素含量有极显著影响($P < 0.01$),表现为低浓度促进、高浓度抑制。浓度为0.05 mg·L⁻¹时,含量达到最大值(0.065%),为对照组(0.053%)的1.23倍。随EBR浓度增加,促进作用逐渐减弱,当达到0.2 mg·L⁻¹时表现为抑制作用,比对照组下降了3.77%。

3 EBR对三角褐指藻多糖、蛋白质、总脂及岩藻黄素产量的影响

EBR对三角褐指藻多糖、蛋白质、总脂、岩藻黄素产量的影响如图4所示,与各有机物含量积累趋势相同。多糖产量的最高值出现在0.05 mg·L⁻¹的处理组中,达4.00 mg·L⁻¹·d⁻¹,是未添加EBR的对照组的1.22倍。EBR浓度为0.2 mg·L⁻¹时,其对多糖产量的影响与对照组相比差异不显著($P > 0.05$)。EBR浓度对蛋白质产量有极显著影响($P <$

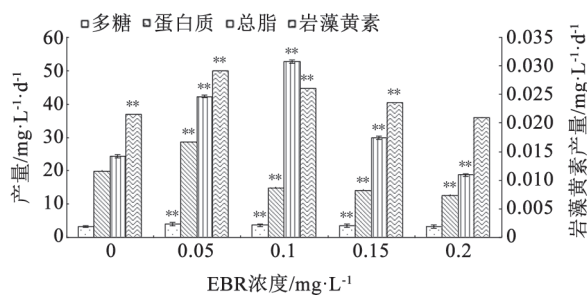


图4 EBR对三角褐指藻有机物产量的影响

Fig.4 Effects of EBR on organic matter productivity of *P. tricornutum*

0.01), 随EBR浓度增加呈先增加后下降的趋势,0.05 mg·L⁻¹时达到最大值,当浓度超过0.05 mg·L⁻¹时,蛋白质产量均低于对照组。总脂的产量随EBR浓度增加变化非常明显,在0.1 mg·L⁻¹时达到最大值,为52.69 mg·L⁻¹·d⁻¹,对照组仅为24.44 mg·L⁻¹·d⁻¹。浓度大于0.2 mg·L⁻¹时,表现为抑制作用,总脂产量比对照组下降了23.36%。在0.05 mg·L⁻¹浓度的EBR培养条件下,岩藻黄素产量达到最高0.029 mg·L⁻¹·d⁻¹,为对照组的1.38倍,之后随着EBR浓度的增加,促进作用逐渐减弱,当达到0.2 mg·L⁻¹时,岩藻黄素产量比对照组降低了2.37%。

讨论

作为绿色环保型植物生长调节剂,油菜素内酯是公认的活性最高的高效、广谱、无毒的植物生长激素,它最突出的生理作用就是促进植物细胞的伸长与分裂(张琳2011),然而其作用机制目前还未完全揭示。一些学者认为BR在植物体内单一或协同其他激素对细胞分裂等过程起作用(Adam和Marquardt 1986; Mandava 1988),它通过激活CycD3转录因子来调节细胞分裂素的水平,进而控制细胞分裂(Gaudinova等1995; Hu等2000)。袁琳和赵毓橘(1999)认为EBR对盐藻细胞分裂的促进作用可能是通过增加Ca²⁺通道的开放,从而以较高的细胞质Ca²⁺浓度经过钙调素的调控作用或Ca²⁺对其它生理过程的调节作用而达到的。而鲁旭东和刘华英(2005)认为油菜素内酯是促使细胞壁松弛、增加细胞渗透吸水以及调节微管分布的方向等方面来诱导细胞分裂和伸长。有研究证明,用10⁻¹²~10⁻⁸ mol·L⁻¹的BR处理小球藻36 h后,细胞数目明显增多,并且随着处理浓度的增加而增加,最高可以达到对照组的3.37倍(Bajguz 2000),其中EBR的作用效果非常显著。侯和胜和陈敏资(1997)用BR处理亚心形扁藻和球等鞭金藻,结果证明在0~0.05 mg·L⁻¹浓度下即可促进这两种单细胞藻的增值,使其生长延缓期缩短,迅速进入指数生长期,且可使细胞保持较长时间的旺盛生长。在对盐藻的研究中也证明,很低浓度(0.005 mg·L⁻¹)的EBR对盐藻细胞的分裂就具有促进作用,并且在0.5 mg·L⁻¹时其促进作用最为显著,超过0.5 mg·L⁻¹后,促进作用逐渐减弱(袁琳和赵毓橘1999)。本实验也得到了相

似结果, 这表明EBR可以显著影响三角褐指藻生长和生物量积累。

植物细胞中可溶性总糖可以作为一种渗透调节物质, 淀粉是植物主要的能量贮存物质, 蔗糖是植物碳水化合物运输的主要形式, 其含量受蔗糖合成酶、蔗糖磷酸合成酶、酸性转化酶调节。EBR能调节番茄叶片中相关酶在mRNA水平上的表达(李天来等2008), 来维持蔗糖的合成与分解平衡, 减少其在叶片中的积累, 使其更多地向相邻果实运输, 从而提高果实产量与品质(李宁等2014), 通过 C^{14} 标记, 也证实了BR可以加强蔗糖的运输(Vardhini和Rao 1998)。Mekhalfi等(2012)在对硅藻的研究中发现EBR可以通过刺激卡尔文循环的关键酶——3-磷酸甘油醛脱氢酶的活性, 从而加速卡尔文循环, 提高光合作用。用6种油菜素内酯和3种细胞分裂素、4种生长素互相作用于小球藻, 发现无论哪种组合都可以显著增加小球藻细胞中多糖的含量, 且均比单一激素处理时要高(Bajguz和Niczyporuk 2013, 2014), 这可能是因为BR可以和其他植物激素协同作用, 共同调节植物的生长代谢(Sasse 2003)。胡伟等(2014)对浒苔的研究结果也证实, EBR可以促进浒苔细胞中多糖含量的积累, 表现为低浓度促进、高浓度抑制。本实验结果也表明在低浓度范围内($0\sim 0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)内, EBR可以增加三角褐指藻细胞中多糖的含量, 超过 $0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 抑制作用非常显著($P<0.01$)。

细胞中可溶性蛋白质是植物代谢的主要调控和促进物质, 其含量变化反映了植物的合成和代谢能力(孙克香等2015)。可溶性蛋白含量的提高可以增加细胞的渗透势和功能蛋白(如热激蛋白)的数量, 有助于维持细胞正常的代谢, 提高植物的抗逆性(吴雪霞等2013)。BR主要从翻译(Altmann 1999)和转录(Xu等1995)两个水平对相关基因的表达进行调节, 它可以促进RNA聚合酶的活性, 抑制RNA、DNA水解酶的活性, 从而增加DNA、RNA的含量, 促进植物核酸、蛋白质的代谢(吴登如和赵毓橘1993)。一系列研究表明, 适宜浓度的BR处理可以显著增加花生(Vardhini和Rao 1998)、甜瓜(张永平等2011)、茄子(吴雪霞等2013)、木薯(李一萍等2013)等农作物中可溶性蛋白的含量。用 $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的BR处理亚心形扁藻, 藻细胞内的DNA、

RNA、蛋白质含量分别增加了26.3%、37.4%、14.3% (侯和胜和陈敏资1997)。 $10^{-8}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的BR处理小球藻36 h后, 藻细胞中蛋白质含量达到最高, 是未处理组的2.96倍(Bajguz 2000)。低浓度的EBR还可以提高浒苔可溶性蛋白的含量, 随处理浓度的增加, 浒苔中可溶性蛋白含量呈先升高后降低的趋势, 且 $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的效果最好(胡伟等2014)。本研究和其结果基本一致, 用系列浓度的EBR处理三角褐指藻, 可溶性蛋白含量在 $0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时达到最大值, 高浓度的EBR有一定的抑制作用。适宜浓度EBR处理三角褐指藻, 一方面可以提高细胞干物质含量, 另一方面也改善了藻细胞的品质, 提高了营养价值。

郝宗娣等(2012)研究了5种植物激素(IBA、NAA、6-BA、2,4-D、TDA)对小球藻油脂含量的影响, 结果表明添加2,4-D的培养液对小球藻油脂含量积累的促进作用最显著, 比空白对照高26.21%。不同浓度的吲哚-3-乙酸(IAA)对枝鞘藻总脂含量的影响也很显著, $0.5\sim 1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围内IAA均能不同程度的提高枝鞘藻总脂含量, 其中 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 达到最大值, 是对照组高的2.41倍(杨凯和史全良2009)。此外, 用 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的脱落酸处理三角褐指藻也证明了植物激素可以提高油脂产量, 静止期比未添加脱落酸培养时油脂产量提高了50%, 可能是因为脱落酸可以作为信号诱导油脂合成代谢途径中一些基因的表达(王晓青等2011)。植物激素造成油脂含量增加的原因可能是在培养前期植物激素提升了藻类的光合作用效率, 从而大量积累淀粉等储藏物质, 但植物激素对微藻来说是一种环境胁迫, 在培养后期它刺激微藻启动了抗逆生理反应, 即通过过量积累油脂来渡过不利环境(范新照等2013)。具体表现为在培养后期微藻中的多糖逐渐降解为葡萄糖单体, 葡萄糖进入EMP途径从而大量生成脂肪酸脂肪酸合成的前体——乙酰辅酶A转化, 再在乙酰辅酶A羧化酶作用下进行碳链延长进入脂肪酸合成途径, 进而生成油脂(杨凯和史全良2009; 郝宗娣等2012)。本研究中采用不同浓度梯度EBR处理三角褐指藻, 其总脂含量和产量均显著提高, 在 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时达到最大值, 表明适宜浓度的EBR可以提高三角褐指藻中油脂的积累。

植物激素对三角褐指藻中岩藻黄素代谢的影响少有报道。本实验室通过用不同浓度的硫酸钾铵、甲基茉莉酸、水杨酸等诱导子来培养三角褐指藻, 结果表明这些诱导子在低浓度时对岩藻黄素积累有促进作用, 高浓度有抑制作用, 较低浓度的诱导子可以显著提高岩藻黄素合成相关基因的转录水平, 特别是番茄红素 β -环化酶基因、八氢番茄红素脱氢酶基因的表达(朱帅旗等2014)。可以推测, EBR提高三角褐指藻岩藻黄素的作用机理可能和甲基茉莉酸等植物激素类似, 通过调节岩藻黄素合成关键基因的转录, 来控制岩藻黄素的积累。

2,4-表油菜素内酯对三角褐指藻的生长和有机质的积累表现为低浓度促进、高浓度抑制现象。 $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的EBR处理三角褐指藻, 可显著提高细胞密度、生物量及多糖、蛋白质、岩藻黄素的含量, 而 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的EBR更适合三角褐指藻中油脂的积累。

参考文献

- 蔡卓平, 段舜山, 朱红惠(2013). 氮和硅对三角褐指藻细胞增殖的交互作用研究. 水产科学, 32 (3): 125~129
- 范新照, 费晓雯, 吴小霞, 邓晓东(2013). 植物生长调节剂2,4-D和 GA_3 对微茫藻18A8 (*Micractinium* sp.)生长和油脂积累的影响. 热带农业科学, 33 (2): 4~8
- 郝宗娣, 刘平怀, 时杰, 杨勋, 张森(2012). 不同植物激素对原始小球藻生长及油脂含量的影响. 广东农业科学, (8): 104~107
- 侯和胜, 陈敏资(1997). 油菜素内酯对两种单细胞藻生长和某些生理活性的影响. 海洋与湖沼, 28 (4): 371~375
- 胡伟, 孙雪, 范美华, 高秀秀, 徐年军(2014). 2,4-表油菜素内酯对浒苔(*Ulva prolifera*)内源植物激素及相关生理影响. 海洋与湖沼, 45 (5): 1071~1077
- 惠伯棣(2005). 类胡萝卜素化学及生物化学. 北京: 中国轻工业出版社, 90~94
- 李宁, 苏晓琼, 孙锦, 束胜, 郭世荣(2014). 外源2,4-表油菜素内酯对弱光胁迫下番茄叶片内源激素和碳水化合物代谢及果实的影响. 南京农业大学学报, 37 (3): 51~56
- 李天来, 赵聚勇, 崔娜, 李国强(2008). 苗期喷施表油菜素内酯对番茄叶中蔗糖代谢的影响. 植物生理学通讯, 44 (3): 417~420
- 李一萍, 黄洁, 许瑞丽, 高秀云, 罗微(2013). 干旱胁迫下水杨酸和油菜素内酯对木薯苗生理特性的影响. 热带农业科学, 33 (10): 6~15
- 鲁旭东, 刘华英(2005). 油菜素内酯促进植物伸生长机理研究进展. 生物学教学, 6: 3~4
- 孙克香, 杨莎, 郭峰, 刘翠敏, 孟静静, 胡春梅, 李新国(2015). 高温强光胁迫下外源钙对甜椒(*Capsicum frutescens* L.)幼苗光合生理特性的影响. 植物生理学报, 51 (3): 280~286
- 王晓青, 王嫁, 江雪, 涂丽, 李湘, 兰利琼, 卿人韦(2011). 三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornerutum*)油脂富集培养的研究. 四川大学学报(自然科学版), 48 (3): 691~696
- 王溢, 符茹, 裴国凤, 王海英(2012). 不同氮源对三角褐指藻生长和脂类含量的影响. 湖北农业科学, 51 (23): 5311~5314
- 吴登如, 赵毓橘(1993). 表油菜素内酯对绿豆上胚轴核酸代谢的影响. 植物生理学报, 19 (1): 49~52
- 吴雪霞, 查丁石, 朱宗文, 许爽(2013). 外源2,4-表油菜素内酯对高温胁迫下茄子幼苗生长和抗氧化系统的影响. 植物生理学报, 49 (9): 929~934
- 杨凯, 史全良(2009). 不同浓度IAA对微藻TH6 (*Oedocladium* sp.)生长及脂肪酸含量的影响. 植物资源与环境学报, 18 (2): 80~83, 96
- 袁琳, 赵毓橘(1999). 2,4-表油菜素内酯对盐藻细胞分裂的促进作用及与 Ca^{2+} 和钙调素的关系. 植物生理学报, 25 (2): 145~150
- 张琳(2011). 油菜素内酯的生理效应及发展前景. 北方园艺, 20: 188~191
- 张永平, 杨少军, 陈幼源(2011). 2,4-表油菜素内酯对高温胁迫下甜瓜幼苗抗氧化酶活性和光合作用的影响. 西北植物学报, 31 (7): 1347~1354
- 朱帅旗, 龚一富, 刘浩, 张兵兵, 王何瑜(2014). 硫酸钾铵对三角褐指藻岩藻黄素含量的影响及转录差异研究. 中国稀土学报, 32 (6): 750~757
- Adam G, Marquardt V (1986). Brassinosteroids. *Phytochemistry*, 25 (8): 1787~1799
- Altmann T (1999). Molecular physiology of brassinosteroids revealed by the analysis of mutants. *Planta*, 208: 1~11
- Bajguz A (2000). Effect of brassinosteroids on nucleic acids and protein content in cultured cells of *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiol Biochem*, 38 (3): 209~215
- Bajguz A (2009). Isolation and characterization of brassinosteroids from algal cultures of *Chlorella vulgaris* Beijerinck (Trebouxiophyceae). *J Plant Physiol*, 166 (17): 1946~1949
- Bajguz A, Czerpak R (1996). Effect of brassinosteroids on growth and proton extrusion in the alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck (Chlorophyceae). *J Plant Growth Regul*, 15: 153~156
- Bajguz A, Niczyporuk AP (2013). Synergistic effect of auxins and brassinosteroids on the growth and regulation of metabolite content in the green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). *Plant Physiol Biochem*, 71: 290~297
- Bajguz A, Niczyporuk AP (2014). Interactive effect of brassinosteroids and cytokinins on growth, chlorophyll, monosaccharide and protein content in the green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). *Plant Physiol Biochem*, 80: 176~183
- Bajguz A, Tretyn A (2003). The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. *Phytochemistry*, 62: 1027~1046
- Bligh EG, Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 37: 911~917
- Choudhary SP, Yu JQ, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LSP (2012). Benefits of brassinosteroid crosstalk. *Trends Plant Sci*, 17: 594~605
- Gaudinova A, Sussenbekova H, Vojtechnova M, Kaminek M, Eder J, Kohout L (1995). Different effects of two brassinosteroids on growth, auxin and cytokinin concentrations in tobacco callus tissue. *Plant Growth Regul*, 17: 121~126

- Grove MD, Spencer GF, Rohwedder WK (1979). Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature*, 281: 216~217
- Hu YX, Bao F, Li JY (2000). Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in *Arabidopsis*. *Plant J*, 24 (5): 693~701
- Mandava NB (1988). Plant growth-promoting brassinosteroids. *Ann Rev Plant Physiol Mol Biol*, 39: 23~52
- Mekhalfi M, Avilan L, Lebrun R, Botebol H, Gontero B (2012). Consequences of the presence of 2,4-epibrassinolide, on cultures of a diatom, *Asterionella Formosa*. *Biochimie*, 94: 1213~1220
- Ozdemir F, Bor M, Demiral T, Turkan I (2004). Effects of 2,4-epibrassinolide on seed germination, seedling growth, lipid peroxidation, proline content and antioxidative system of rice (*Oryza sativa* L.) under salinity stress. *Plant Growth Regul*, 42 (3): 203~211
- Sasse JM (2003). Physiological actions of brassinosteroids: an update. *J Plant Growth Regul*, 22 (4): 276~288
- Vardhini BV, Rao SSR (1998). Effect of brassinosteroids on growth, metabolite content and yield of *Arachis hypogaea*. *Phytochemistry*, 48 (6): 927~930
- Xu W, Purugganan MM, Polisebsky DH (1995). *Arabidopsis* TCH4 regulated by hormone and environment encode a xyloglucan endotransglycase. *Plant Cell*, 7: 1555~1567