

藻类中添加剂的应用研究进展

杨树萍 张琳 徐继林

(宁波大学海洋学院, 宁波 315211)

摘要: 藻类富含多种营养元素和活性物质, 具有重要的经济价值和广阔的应用前景。现阶段藻类培养多采用露天跑道池, 成本低, 但易受环境影响。不适宜的环境条件(温度、酸性、重金属、紫外、盐度和光强胁迫等)会造成藻类生产成本上升、产品产量及品质下降等后果, 严重制约藻类养殖业及相关产业的发展。添加剂不仅能有效促进藻类生长, 还能缓解环境胁迫对其带来的逆境伤害。将近年来添加剂在藻类生长及抗逆方面的应用进行系统汇总, 并对已阐明的几种添加剂的作用机理进行分析整理。添加剂在藻类中的应用研究大多停留在生长及生理指标的测定, 如藻细胞密度、光系统活性、渗透调节物质含量、脂质含量、过氧化氢酶和硝酸还原酶活力等, 仅有少部分研究是利用分子技术测定防御基因的表达情况, 尝试进一步探究藻类抗逆性分子机制。旨在为研究者进一步明确常用添加剂在藻类中的信号传导机制及改善非生物胁迫造成的产品产量及品质的问题提供理论依据, 具有重要现实意义。

关键词: 藻类; 添加剂; 作用机制; 生长; 抗逆性

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2019-0523

Research Advance on the Application of Additives in Algae

YANG Shu-ping ZHANG Lin XU Ji-lin

(School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211)

Abstract: Rich in various nutrients and active substances, algae have important economic value and application prospects. Nowadays, open runway pool is often used in algal cultivation, the cost of which is low, but easily affected by environmental conditions. Inappropriate environmental conditions (temperature, acidity, heavy metal, UV, salinity and light stress, etc.) could cause the increase of production cost and the decrease of production output and quality, thus this would severely hinder the development of algal farming and related industries. Additives can not only effectively promote the growth of algae and also alleviate the damage of adverse environmental conditions. In this paper, the application of additives in algae growth and stress resistance in recent years is summarized and the related mechanisms of various additives are sorted and clarified. The results showed that the application of additives in algae was mostly limited to the measurement of growth and physiological indexes, such as the cell density, the photosystem activity, the content of osmotic regulation substance and lipid content, the activity of catalase and nitrate reductase, etc. Only a few studies have extended the expressions of defense genes by molecular technology, trying to further explore the molecular mechanism of algae stress resistance. This paper is expected to provide theoretical basis for researchers to further clarify the signal transduction mechanism of common additives in algae and improve the yield and quality of algal products caused by abiotic stress, which is of great practical significance.

Key words: algae; additives; mechanisms; growth; resistance

藻类富含蛋白质、多不饱和脂肪酸及维生素等, 营养价值可观。一些大藻(如紫菜)可作为即食食

物被开发利用。微藻不仅营养丰富, 还兼具易消化、易摄食的特点, 是水产养殖中的优质活体饵料^[1]。

收稿日期: 2019-06-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(41606163), 浙江省自然科学基金项目(LQ16D060001), 宁波市自然科学基金项目(2017A610288)

作者简介: 杨树萍, 女, 硕士研究生, 研究方向: 应用微藻生物学; E-mail: 1064432818@qq.com

通讯作者: 张琳, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 微藻生化与分子生物学; E-mail: zhanglin2@nbu.edu.cn

藻类还含有多种活性物质,具有巨大的开发潜力。例如,雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)中的虾青素,具有着色、抗氧化和增强免疫力等作用,可有效提高水产动物的存活率和水产品的运输及保藏效果等^[2-3]。螺旋藻(*Spirulina* sp.)中的 γ -亚麻酸、螺旋藻多糖和藻蓝蛋白等被制备成药物,具有提高人体免疫力、消炎等功效^[4]。此外,藻类作为食物链的第一级生产者,其光合作用和呼吸作用可调节水体pH平衡,间接影响水质、水体透光度、藻菌关系等^[1, 5]。另有研究表明,藻类对生物毒性极其敏感,可用于监测水质^[6]。

现阶段藻类培养主要有封闭式和开放式两种方式。封闭式的光生物反应器培养过程可控,不易污染,但成本较高,进一步扩大养殖规模较难。开放式跑道池虽然易受环境影响,但其成本较低,故被广泛应用。随着市场需求的增大,藻类品质和产量都需要得到提升,而跑道池养殖中面临的温度胁迫、紫外线胁迫、重金属污染及盐度胁迫等问题都严重制约着藻类规模化养殖业的发展。因此,研究藻类的抗逆性以改善因非生物胁迫造成的藻类减产、损害及种质退化等问题,从而提高藻类的养殖成效是实现藻类规模化高密度养殖来获取更高经济效益的关键。

1 常用添加剂及其作用机制

近年来,研究者们通过使用添加剂以促进陆生植物生长及提高其抗逆性,已取得一定成效。现阶段,研究者们也尝试将这些添加剂运用到在藻类研究及生产中。尝试使用一种或多种添加剂,以期提高藻类生物量,降低非生物胁迫给藻类造成的损伤,提高藻类抗逆性,以获得更多的生物量及活性物质。下面就一些常用外源添加剂在陆生植物及藻类中的运输方式、代谢途径及作用机制进行总结。

1.1 水杨酸及其作用机制

水杨酸(Salicylic acid, SA),即邻羟基苯甲酸,是植物体内一种简单酚类物质。SA能影响植物体和藻体内蛋白质和光合色素的积累,以提高其生长速率、调节其生长发育^[7]。非生物胁迫易造成植物体内活性氧含量失衡及氧化胁迫。外源SA通过与SA受体(如NPR1)结合,激活免疫系统,或改善植物

体内抗氧化酶活性,甚至进入细胞内直接或间接诱导防御基因的表达,生成抗氧化化合物(如花青素),从而提高植物的抗逆性^[8-9]。SA提高非生物胁迫下藻类抗逆性的机制与陆生植物类似。SA通过与藻体内的信号物质(如NAC蛋白、MYB蛋白)结合,调控藻体内的抗氧化活性物质基因的表达,以生成抗氧化活性物质;还可调节藻体内的各种酶(过氧化氢酶、抗坏血酸过氧化物酶和超氧化物歧化酶等)活力、渗透调节物质(可溶性糖、可溶性蛋白)含量,抵御非生物胁迫条件下产生的过量活性氧(Reactive oxygen species, ROS)^[7, 10]。

1.2 油菜素内酯类及其作用机制

油菜素内酯类化合物(Brassinosteroids, BRs)在植物和藻类的生长、发育、繁殖过程中起着重要作用,包括24-表油菜素内酯(24-epibrassinolide, 24-EpiBL、EBR)、24-表油菜素甾酮(24-epicastasterone, 24-epiCS)、高油菜素内酯(Homobrassinolide, homoBL)等。外源BRs通过调控植物细胞内激素水平,激活抗氧化酶保护系统,降低相对电导率,控制叶绿素含量,促进光合产物运输、一氧化氮积累和多个胁迫相关基因(*RD29A*、*ERD10*、*RD22*)的表达,最终提高陆生植物的抗逆性^[11-12]。在藻类方面,BRs通过调控藻细胞体内激素水平,激活抗氧化酶保护系统,产生非酶抗氧化剂(抗坏血酸、谷胱甘肽等),促进细胞分裂,缓解胁迫带来的损伤,甚至可恢复到原来的水平^[13]。可见,BRs在陆生植物和藻类的作用机制很相似。

1.3 脱落酸及其作用机制

脱落酸(Abscissic acid, ABA)是植物体内普遍存在的一种激素,是参与植物信号传导的最为重要的一种信号分子。添加外源ABA可促进内源ABA的生成,使ABA受体接收和传递逆境信号,诱导ABA响应元件结合蛋白(AREB 1、AREB 2和AREB 3等)表达,高度磷酸化后激活下游相关基因的表达,同时降低细胞膜透性,调控气孔开闭,增加抗氧化酶活性,抑制ROS的积累,从而提高植物的抗逆性^[14-16]。ABA在藻类中也有发现。利用反相高效液相色谱(RP-HPLC)的方法,苗钧魁等^[17]第一次在海带中分离纯化出高活性的ABA。研究发

现,在藻类中,外源 ABA 不直接增加藻的光合活性,而是通过保护光系统免受 ROS 的破坏,促进藻体清除 ROS,或者促进脂质的积累,从而提高藻类的抗逆性植物^[18-19]。

1.4 赤霉素及其作用机制

赤霉素 (Gibberellin acid, GA) 作为一类内源性激素在藻类的生长发育中发挥着重要的作用^[20]。Reinecke 等^[21]表明,在已发现的 136 种天然赤霉素中,仅有 GA₁、GA₃、GA₄、GA₇ 四种具有生理活性^[22]。外源 GA 诱导降低 GA 合成代谢关键酶 (GA 3-oxidase 和 GA 20-oxidase) 和受体蛋白基因的表达,减少内源 GA 含量,或抑制信号传导途径中 DELLA 蛋白 (因其 N 端含有 D、E、L、L 和 A 这 5 种氨基酸的 DELLA 结构域而命名) 积累,提高活性氧解毒酶基因表达,降低活性氧水平,以提高植物的抗逆性^[23-24]。也有研究发现,GA 可与藻体内抗氧化活性物质的基因顺式作用原件结合,调控相应基因表达,消除过多的 ROS,还可通过增加光合色素、可溶性蛋白的积累,以提高藻体抗逆性^[25-26]。但总体看,GA 在藻体中调控机制的研究还不够完善,有待进一步挖掘。

1.5 钙及其作用机制

钙 (Ca²⁺) 是植物生长必需的营养元素,且作为偶联胞外信号与胞内生理生化反应的第二信使,参与调控植物的代谢和发育^[27]。当植物受到非生物胁迫时,外源 Ca²⁺ 与钙调蛋白结合,传递信号,激活 Ca²⁺ 通道,维持细胞内离子 (K⁺、Na⁺、Mg²⁺ 等) 的平衡以保护膜膜的完整性,并激活特定的保护酶系统。也可通过 Ca²⁺ 依赖蛋白激酶识别特定 Ca²⁺ 浓度信号,受体靶蛋白被激活,诱导抗性基因的表达,最终提高植物抗逆性^[28-30]。外源 Ca²⁺ 激活藻细胞内膜的 Ca²⁺ 通道,维持细胞内外离子 (Ca²⁺/Na⁺) 的平衡,降低膜透性,刺激钙调素基因的表达,促使生成钙调蛋白并与之结合,传递信号。当受到胁迫时, Ca²⁺ 诱导合成中性脂质,激活抗氧化酶系统,以缓解胁迫带来的损伤^[31-32]。

1.6 生长素及其作用机制

生长素 (Auxin, AUX) 是一类含有一个不饱和芳香族环和一个乙酸侧链的内源激素,在植物的生

长发育过程中起重要调节作用。天然 AUX 主要包括 3 种,即吲哚-3-乙酸 (Indole-3-acetic acid, IAA)、吲哚丁酸 (Indole butyric acid, IBA) 和萘乙酸 (Naphthylacetic acid, NAA)。此外,如 2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D) 等是 AUX 类似物,也具有广阔的应用前景。Gupta 等^[33]首次在藻类中发现了 IAA 和 IBA 同时存在。在陆生植物遭受非生物胁迫时,外源 AUX 或 AUX 类似物,与细胞中 AUX 受体结合,启动质子泵 (H⁺-ATPase) 形成电化学梯度,酸化细胞壁,诱导防御基因表达,并调控保护酶系统和积累保护物质 (脯氨酸或谷胱甘肽),或直接与气孔保卫细胞通道外表面结合,调节光合作用效率,最终提高植物的抗逆性^[34]。Sakata 等^[35]还发现,外源 AUX 可恢复 DNA 复制许可因子 (MCM5) 的表达,逆转高温胁迫引起的植物雄性植株的不育。在藻类中, AUX 可调控内源性植物激素的代谢平衡,促进藻细胞内色素、脂质积累,调控硝酸还原酶、谷氨酰胺合成酶、叶绿素荧光等活性,缓解胁迫条件对藻的损伤^[36-37]。

1.7 茉莉酸类及其作用机制

茉莉酸类 (Jasmonates, JAs) 物质,是一种新型内源植物生长调节物质,其中典型代表有茉莉酸甲酯 (Methyl jasmonate, MeJA) 和茉莉酸 (Jasmonic acid, JA)。JAs 在陆生植物和藻类中的作用类似,不仅参与生长调节,还诱导抗逆信号的产生及防御基因的表达。外源 JAs 通过调节保护性酶 (过氧化物酶、过氧化氢酶等) 的活性,促进次生代谢产物 (如藻黄素、虾青素) 相关基因的表达、渗透调节物质 (如脯氨酸、可溶性蛋白) 的积累,或通过影响启动子的活性、促进防御蛋白及次生活性物质的合成来提高植物和藻体的抗逆能力^[38-43]。

1.8 细胞分裂素及其作用机制

细胞分裂素 (Cytokinin, CTK) 是腺嘌呤的衍生物,包括玉米素 (Zeatin, ZT)、激动素 (Kinetin, KT) 和 6-苄基氨基嘌呤 (6-benzylaminopurine, 6-BA、BA、BAP) 等。外源 CTK 与受体 (AHKs) 结合,磷酸化后进入细胞,激活防御基因的表达^[44]。CTK 还可直接或间接清除氧自由基,减少脂质的过氧化程度,改变膜脂中脂肪酸比例,提高光合速率、气

孔导度和蒸腾速率,最终提高植物的抗逆性^[45-46]。在藻类中,外源CTK则是通过促进藻细胞分裂增殖,促进不饱和脂肪酸的积累,刺激抗氧化系统,提高光合作用效率和氮代谢循环来促进藻生长和提高藻的抗逆性^[37, 47]。

2 添加剂在藻类生长及抗逆方面的应用

2.1 生长方面的应用

研究者们尝试通过使用添加剂来获取更多的藻类生物量或活性物质,以取得更大的经济效益。研究发现,ABA(1.0 mg/L)、SA(10 mg/L)和JA(0.5 mg/L)可使小球藻(*Chlorella vulgaris* ZF strain)的脂质生产率分别提高123%、100%和127%^[48]。据报道,三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)中三酰甘油(TAG)合成基因上游存在植物激素的响应性顺式调节元件,外源植物激素(SA、ABA和MeJA等)可与该元件结合,进一步提高三角褐指藻的油脂含量^[49]。Park等^[50]研究发现,IAA、ABA和GA₃可促进细胞分裂,增加蛋白质积累,最终促进莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)生长;ABA还可大幅提高其淀粉含量(从2.2%增加至6%),而IAA和GA₃对淀粉含量无影响。低浓度的ABA能促进紫球藻(*Porphyridium* sp.)生物量(达3.463 g/L)、胞外多糖(达干重34.31%)和藻红素等积累,但当ABA浓度超过10 mg/L则呈抑制趋势^[51]。研究者尝试采用多种添加剂组合的方式,以期达到更好的促进效果。史成颖等^[52]分别探究6种植物激素(NAA、2,4-D、IBA、IAA、6-BA和GA)对钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)生长的影响,找到最适浓度之后,选择效果最佳的4种(NAA、2,4-D、6-BA和GA)进行交叉组合,只有NAA与6-BA的组合促进藻的生长。而Bajguz和Piotrowska-Niczyporuk等^[53]研究则表明IAA与BRs的组合能显著促进小球藻(*C. vulgaris*)的细胞增殖,且比单一作用显著,细胞数比对照组增加了321%。因此,可根据实际需求及藻种的不同,挑选适宜的一种或多种添加剂,施以适宜的浓度,以达到最佳的培养效果和最低的生产成本。

2.2 低温胁迫

适宜的温度是保证藻类正常生长的重要环境因子之一。温度过高或过低都会影响藻的生理生化

特性及代谢过程,进而影响其生长,即高温胁迫和低温胁迫。研究表明,低温胁迫可导致球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)细胞内活性氧过量积累,进而造成膜脂过氧化^[54]。温度越低,膜脂损伤程度越大。低温胁迫还会造成藻体净光合速率、叶绿素a(Chl a)及藻蓝蛋白含量下降^[55]。大量陆生植物的相关研究显示,添加剂可以提高植物的低温抗逆性^[56-58]。类似的尝试在藻类中较少。陈文笔等^[59]报道,添加15 mg/L的SA对低温胁迫下提高微拟球藻(*Nannochloropsis* sp.)低温抗逆性效果最显著,96 h时藻密度、可溶性糖和可溶性蛋白分别比对照组提高了21.97%、29.17%和27.40%,且不饱和脂肪酸含量也比对照组提高了6.27%;此时Δ5和Δ6去饱和酶基因转录水平为对照组的8.63、6.14倍。基于以上实验结果,后续可进行更多尝试,以期解决低温环境下藻类培养的难题。

2.3 高温胁迫

短时间的高温胁迫下,藻体可启动自身防御系统,增加光系统II和I的光子捕获能力和电子传递速率以降低损伤,还通过促进mRNA的生成、抑制tRNA的水解,增加拟核蛋白合成来保护和维持DNA的正常遗传信息传递过程^[60]。若持续高温超过藻体承受范围,藻体内生成的活性氧无法有效清除,膜结构受到严重损伤,Chl a含量显著降低,藻体则表现为生长减缓^[61]。研究发现,高温胁迫下,蛋白核小球藻(*C. pyrenoidosa*)生长受到抑制,新陈代谢活性降低,生长速率变缓;但添加10 mg/L SA之后,热激蛋白70和磷酸甘油酸激酶的表达量明显上升,SA作用12 h后可分别增加2.57和1.56倍,48 h时生长速率、可溶性糖、可溶性蛋白分别达到对照组的2.07、1.34和1.18倍,生长抑制明显得到缓解^[62]。探讨高温胁迫下龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)抗逆性的结果显示,添加外源SA和EBR都可以提高龙须菜的高温抗逆性^[63-64]。贺亮等^[65]研究显示,高温造成半叶马尾藻中国变种(*Sargassum hemiphyllum* var. *chinense*)抗氧化防御系统的损伤,添加Ca²⁺可得到有效的缓解;且藻体中渗透调节物质含量也明显增加,从而降低高温胁迫对细胞膜的伤害。基于这些研究,可以进行更多尝试,

以期解决高温天气藻类培养困难、种质降低等问题。

2.4 酸性胁迫

近年来,化石类燃料的大量使用、酸性气体(CO_2 、 SO_2 和 NO_x)的无节制排放和森林的过度砍伐等,引起水体pH下降,给藻类养殖造成了酸性胁迫,影响了藻类生物量积累。张倩^[66]发现,培养基pH降低之后,4株小球藻(2株蛋白核小球藻(*C. pyrenoidosa*)、1株普通小球藻(*C. vulgaris*)和1株海水小球藻(*C. pacifica*))的生长速率明显降低,当pH急剧下降为3.0时,降幅分别为91.52%、90.00%、88.03%和91.39%。史飞飞等^[67]将燃烧产生的气体通入培养液,培养液的pH急剧下降,导致斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)生长受到抑制,添加0–20 mg/L GA后,斜生栅藻的生长得到恢复,且培养液pH恢复至正常值。其中,添加10 mg/L GA效果最好,可使促进斜生栅藻的干重达到0.45 g/L。添加剂在藻类抗酸性胁迫中应用较少,后续研究中可进行更多尝试,以期利用酸性水质培养藻类生产更多高附加值产品提供更多的技术指导和理论支持。

2.5 重金属胁迫

随着人类活动范围的扩大,滥用乱排导致水体中重金属沉积,致使藻类遭受重金属(Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 等)胁迫,严重制约藻类生物量及活性物质的积累。李建宏等^[68]研究显示, Cd^{2+} 胁迫导致椭圆小球藻(*C. ellipsoidea*)叶绿素含量下降,氧自由基含量增加;且随着 Cd^{2+} 浓度的增大,叶绿素含量逐渐降低,光合速率也显著降低。全秋梅等^[69]报道,在 Cd^{2+} 胁迫下,半叶马尾藻中国变种(*S. hemiphyllum* var. *chinense*)细胞内丙二醛含量随着 Cd^{2+} 浓度的上升而上升,过氧化物酶和过氧化氢酶则呈先上升后下降的趋势,较对照组均存在极显著性差异($P<0.01$),抑制其生长及活性物质的积累。Kovacik等^[70]报道,10 $\mu\text{mol/L}$ Cu^{2+} 可使扁浒苔(*Ulva compressa*)的多不饱和脂肪酸在总脂肪酸中的比例从43%降至5.4%。因此,在水资源有限的情况下,研究者迫切需要寻找解决办法,以求克服重金属水质中藻类生长的难题。

研究者从陆生植物的抗逆性研究中得到启

发,尝试使用添加剂,缓解藻类的重金属胁迫。Piotrowska-Niczyporuk等^[26]报道,IAA、6-BA、 GA_3 和JA等可激活普通小球藻(*C. vulgaris*)抗氧化防御系统,减少活性氧积累,显著降低重金属(Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Cu^{2+})胁迫带来的生长抑制作用。Bajguz^[71]用EBR处理重金属胁迫下小球藻(*C. vulgaris*)后发现,重金属离子(Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cr^{2+} 和 Zn^{2+})对小球藻(*C. vulgaris*)的损伤得到抑制,藻细胞数明显增加,且可以恢复到正常培养水平。因此,利用添加剂在藻类抗重金属胁迫方面的优势,可在重金属污染区域培养藻类,同时利用藻类治理修复水质。但是添加剂在藻类抗重金属方面的研究还不够深入,添加剂在藻类细胞中的信号传导网络、分子机制尚不清楚,还有待进一步研究。

2.6 紫外(UV-B)胁迫

由于臭氧层遭到破坏和侵蚀,到达地表的紫外线辐射增强,影响了藻的生理生化特性。刘成圣和唐学玺^[72]报道,UV-B明显抑制三角褐指藻(*P. tricornutum*)的生长,并且导致藻细胞内活性氧增加,致使其受到膜脂脱脂化伤害。屠燕萍等^[73]也对三角褐指藻(*P. tricornutum*)进行了类似研究发现,紫外胁迫造成藻体内抗氧化酶的含量先上升后下降,超过藻细胞自身对活性氧的清除范围,从而造成损伤。Han等^[74]研究发现,较高的UV-B会抑制孔石莼(*U. pertusa*)的生长,且显著降低其孢子形成率。研究显示,KT、6-BA和ZT等细胞分裂素可促进UV-B胁迫下植物气孔的重新打开,而IAA、NAA和2,4-D等生长素会抑制UV-B胁迫下植物气孔的关闭,故细胞分裂素和生长素均利于植物抗紫外胁迫作用^[75]。目前,添加剂在藻类抗紫外胁迫中的应用研究还较少。卓品利等^[76]发现,添加适宜浓度SA显著提高UV胁迫下浒苔(*U. prolifera*)的Chl a含量(为UV组的188.30%)、叶绿素荧光速率(提高139.8%)、可溶性糖和可溶性蛋白(提高32.2%)含量。今后,研究者可在藻类抗紫外胁迫中尝试使用更多种的添加剂或添加剂组合。

2.7 盐度胁迫

室外天气多变,水分蒸发量与降水量达不到平衡,间接导致培养液的盐度不稳定,破坏渗透平衡,

影响微藻生长,因此寻找合适的解决方案具有重要的理论及经济价值。Liang等^[77]发现,在低盐浓度(<5 psu)和高盐浓度(>70 psu)下,球等鞭金藻(*I. galbana*)的光合作用受到抑制,细胞密度降低。赵萍等^[78]研究显示,三角褐指藻(*P. tricornutum*)在盐度大于35 psu时,藻细胞分裂受到抑制,生长速率与盐度呈负相关,多糖含量也随着盐度的升高而降低。可见,盐度超过一定的范围,会对藻的生长生理造成抑制。Yoshida等^[18]发现,处于盐胁迫下的莱茵衣藻在添加ABA后,抗氧化酶、过氧化氢酶和抗坏血酸过氧化物酶的基因表达显著上调,使得细胞内活性氧降低,胁迫得到缓解。目前,在藻类盐胁迫的研究中,研究者们多采用Ca²⁺缓解盐胁迫带来的损伤。魏显珍等^[79]尝试外施Ca²⁺缓解盐胁迫给喜钙念珠藻(*Nostoc calcicola* Breb.)带来的损伤,结果显示,Ca²⁺对其光系统II(PSII)各反应中心具有保护作用,且提高光能转化和电子传递速率(光系统性能指数提高率最大可达82%),最终使盐胁迫下的藻趋于正常生长。吴以平和董树刚^[80]发现,在Ca²⁺作用下,缘管浒苔(*Enteromorpha linza*)和孔石莼(*U. pertusa*)的Chl a和可溶性糖的含量都显著增加,且电解质外渗率显著降低,从而显著提高藻的抗盐性。在遭受盐胁迫时,可根据需求选择适宜的添加剂,提高产量和品质,降低生产成本,获得更多经济效益。

2.8 光强胁迫

藻类属于自养生物,光照强度对其光合作用具有重要的影响。强光胁迫下,钝顶螺旋藻(*S. platensis*)中丙二醛含量和电导率明显上升,引起膜脂过氧化作用^[81]。光胁迫引起坛紫菜(*P. haitanensis*)细胞内活性氧含量显著上升,自身的活性氧清除机制并不能将其完全清除,继而引起膜脂过氧化损伤^[82]。非洲乍得湖钝顶节旋藻(*Arthrospira platensis*)在遭受光强胁迫30 min后其净光合速率低于0,Chl a含量下降为初始值的95%^[83]。因此,如何有效缓解光强给藻类带来的损伤,成为亟待解决的问题。崔丹丹等^[84]发现,添加ZT和SA能显著促进光胁迫下雨生红球藻(*H. pluvialis*)细胞生长藻细胞密度分别能达到 3.4×10^5 cell/mL和 3.0×10^5

cell/mL,同时还能促进虾青素的积累,分别比对照组增加29.2%和25.6%。添加剂缓解光强胁迫方面的研究较少,还有待进一步探索,以更全面了解添加剂在藻类遭受光强胁迫时的应用优势。

3 展望

外源添加剂可通过多种方式缓解非生物胁迫给藻体带来的伤害,在藻类生长发育和抗逆调节中起重要作用。但目前,添加剂在藻类中的应用研究,尚停留在生长及生理指标的测定等,仅有少部分研究利用分子技术测定防御基因的表达情况,尝试进一步探究藻类抗逆性分子机制。添加剂在藻类中完整的信号传导途径及作用机制尚不清楚^[20, 47]。

目前,藻类的抗逆性研究多侧重于高温和重金属胁迫,而其他非生物胁迫研究的深度和广度都较低。由大量陆生植物抗逆性研究可预知,添加剂在提高藻类的抗逆性方面可能具有广阔前景。外源添加剂对不同藻类抗逆应用的施用浓度、时间及方式等还不明确,且其作为信号分子,是直接参与信号传递还是诱导内源物质生成进行信号转导,又有哪些基因表达得以促进或被抑制,还有待于深入研究。另外,许多藻类研究尚停留在实验阶段,还未进入实际生产中。而实际生产中,藻类培养面临的往往不是单一非生物胁迫挑战,故开展多组胁迫综合分析十分必要。系统化的研究手段已呈多元化发展,因此可根据实际情况开展多组分析研究,寻求更佳的解决方案。随着添加剂与非生物胁迫相关信号通路和基因诱导表达调控研究的深入,利用分子育种手段有望实现藻类选择性育种,从而为藻类的实际生产应用提供更有效的理论依据和技术指导。

参考文献

- [1] 陈艳梅,石阳,王明兹,等. 海产养殖饵料微藻开发利用进展[J]. 生物技术通报, 2015, 31(9): 60-65.
- [2] He B, Hou L, Dong M, et al. Transcriptome analysis in *Haematococcus pluvialis*: astaxanthin induction by high light with acetate and Fe²⁺[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(1): 175.
- [3] Sheikhzadeh N, Panchah IK, Asadpour R, et al. Effects of *Haematococcus pluvialis* in maternal diet on reproductive performance and

- egg quality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Animal Reproduction Science*, 2012, 130 (1-2): 119-123.
- [4] 陈忠伟, 邱洁, 李晓玉, 等. 螺旋藻抗炎和免疫增强作用的研究 [J]. *中国畜牧兽医*, 2019, 46 (7): 2135-2143.
- [5] Ammar SH, Khadim HJ, Mohamed AI. Cultivation of *Nannochloropsis oculata* and *Isochrysis galbana* microalgae in produced water for bioremediation and biomass production [J]. *Environmental Technology Innovation*, 2018, 10: 132-142.
- [6] Daneshvara E, Zarrinmehr MJ, Hashtjin AM, et al. Versatile applications of freshwater and marine water microalgae in dairy wastewater treatment, lipid extraction and tetracycline biosorption [J]. *Bioresource Technology*, 2018, 268: 523-530.
- [7] Gao ZQ, Meng CX, Zhang XW, et al. Induction of salicylic acid (SA) on transcriptional expression of eight carotenoid genes and astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* [J]. *Enzyme & Microbial Technology*, 2012, 51 (4): 225-230.
- [8] Shaki F, Maboud HE, Niknam V. Growth enhancement and salt tolerance of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.), by salicylic acid [J]. *Current Plant Biology*, 2018, 13: 16-22.
- [9] Wu Y, Zhang D, Chu JY, et al. The *Arabidopsis* NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid [J]. *Cell Reports*, 2012, 1: 639-647.
- [10] Mirshekari M, Einali A, Valizadeh J. Metabolic changes and activity pattern of antioxidant enzymes induced by salicylic acid treatment in green microalga *Dunaliella salina* under nitrogen deficiency [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2019 (31): 1709-1719.
- [11] Kagale S, Divi UK, Krochko JE, et al. Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses [J]. *Planta*, 2007, 225 (2): 353-364.
- [12] Zhang A, Zhang J, Zhang J, et al. Nitric oxide mediates brassinosteroid-induced ABA biosynthesis involved in oxidative stress tolerance in maize leaves [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2011, 52 (1): 181-192.
- [13] Bajguz A. An enhancing effect of exogenous brassinolide on the growth and antioxidant activity in *Chlorella vulgaris* cultures under heavy metals stress [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2010, 68 (2): 175-179.
- [14] Huang XZ, Hou LY, Meng JJ, et al. The antagonistic action of abscisic acid and cytokinin signaling mediates drought stress response in *Arabidopsis* [J]. *Molecular Plant*, 2018, 11 (7): 970-982.
- [15] 刘晓龙. 脱落酸 (ABA) 对水稻耐碱胁迫的诱抗效应及机理研究 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2019.
- [16] Shen JL, Li CL, Wang M. Mitochondrial pyruvate carrier mediates abscisic acid-regulated stomatal closure and the drought response by affecting cellular pyruvate content in *Arabidopsis thaliana* [J]. *BMC Plant Biology*, 2017, 17 (1): 217.
- [17] 苗钧魁, 李铁松, 王长海. 海带中脱落酸的分离纯化及高效液相色谱分析 [J]. *烟台大学学报: 自然科学与工程版*, 2009, 22 (4): 295-298.
- [18] Yoshida K, Igarashi E, Mukai M, et al. Induction of tolerance to oxidative stress in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, by abscisic acid [J]. *Plant Cell and Environment*, 2003, 26 (3): 451-457.
- [19] Liu JY, Wen Q, Song YM, et al. The growth and lipid productivity of *Chlorella pyrenoidosa* enhanced by plant hormones under ammonium stress [J]. *Environmental Progress Sustainable Energy*, 2017, 36: 1187-1193.
- [20] Stirk WA, Bálint P, Tarkowská D, et al. Hormone profiles in microalgae: Gibberellins and brassinosteroids [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013, 70 (1): 348-353.
- [21] Reinecke DM, Wickramaratna AD, Ozga JA, et al. Gibberellin 3-oxidase gene expression patterns influence gibberellin biosynthesis, growth, and development in pea [J]. *Plant Physiology*, 2013, 163 (2): 929-945.
- [22] Eriksson S. GA₄ is the active gibberellin in the regulation of LEAFY transcription and *Arabidopsis* floral initiation [J]. *The Plant Cell Online*, 2006, 18 (9): 2172-2181.
- [23] 李军, 周涛, 郑伟, 等. 外源 GA₃ 对太子参块根发育及赤霉素生物合成的调控 [J]. *分子植物育种*, 2018, 16 (20): 6867-6874.
- [24] Achard P, Renou JP, Berthomé R, et al. Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species [J]. *Current Biology*, 2008, 18 (9): 656-660.
- [25] Gao Z, Meng C, Gao H, et al. Carotenoid genes transcriptional regulation for astaxanthin accumulation in fresh water unicellular alga *Haematococcus pluvialis* by gibberellin A3 (GA₃) [J]. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 2013, 50 (6): 548-

- 553.
- [26] Piotrowska-Niczyporuk A, Bajguz A, Zambrzycka E, et al. Phytohormones as regulators of heavy metal biosorption and toxicity in green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae) [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2012, 52 : 52-65.
- [27] Hirschi KD. The Calcium Conundrum. Both versatile nutrient and specific signal [J]. Plant Physiology, 2004, 136 (1): 2438-2442.
- [28] 黄璐瑶, 李壮壮, 鞠龙泰, 等. 外源钙对盐胁迫下金银花离子含量及光合相关基因表达的影响 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44 (12): 2452-2458.
- [29] Dubiella U, Seybold H, Durian G, et al. Calcium-dependent protein kinase / NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013, 110 (21): 1-6.
- [30] Larbi A, Kechaou H, Gaaliche B, et al. Supplementary potassium and calcium improves salt tolerance in olive plants [J]. Scientia Horticulturae, 2020, 260 : 108912.
- [31] Chen H, Zhang Y, He C, et al. Ca^{2+} signal transduction related to neutral lipid synthesis in an oil-producing green alga *Chlorella* sp C2 [J]. Plant and cell Physiology, 2014, 55 (3): 634-644.
- [32] Zhao YT, Song XT, Yu L, et al. Influence of cadmium stress on the lipid production and cadmium bioresorption by *Monoraphidium* sp. QLY-1 [J]. Energy Conversion and Management, 2019, 188 : 76-85.
- [33] Gupta V, Kumar M, Brahmabhatt H, et al. Simultaneous determination of different endogenous plant growth regulators in common green seaweeds using dispersive liquid-liquid microextraction method [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2011, 49 (11): 1259-1263.
- [34] 陈晶, 庞思琪, 赵秀兰. 外源生长素对镉胁迫下玉米幼苗生长及抗氧化系统的影响 [J]. 植物生理学报, 2016 (8): 1191-1198.
- [35] Sakata T, Oshino T, Miura S, et al. Auxins reverse plant male sterility caused by high temperatures [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010, 107 (11): 8569-8574.
- [36] Liu T, Liu F, Wang C, et al. The boosted biomass and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*, by supplementation of synthetic phytohormone analogs [J]. Bioresource Technology, 2017, 232 : 44-52.
- [37] Zhao PC, Lin ZY, Wang IM, et al. Facilitating effects of plant hormones on biomass production and nutrients removal by *Tetraselmis cordiformis* for advanced sewage treatment and its mechanism [J]. Science of the Total Environment, 2019. doi : 10. 1016/j. scitotenv. 2019. 133650.
- [38] 崔伟婵, 李霜雯, 严善春. 不同光照下外源茉莉酸类物质对兴安落叶松防御蛋白的影响 [J]. 东北林业大学学报, 2016, 44 (9): 78-81.
- [39] 山雨思, 代欢欢, 何潇, 等. 外源茉莉酸甲酯和水杨酸对盐胁迫下颠茄生理特性和次生代谢的影响 [J]. 植物生理学报, 2019, 55 (9): 1335-1346.
- [40] 徐毅然. 番茄茉莉酸信号途径转录因子 MYC2 基因调控网络的构建及其增强子元件鉴定 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2019.
- [41] 王重彬, 邹同雷, 孙雪, 等. 水杨酸和茉莉酸甲酯对高温龙须菜 (*Gracilariopsis lemaneiformis*) 理化及基因表达的影响 [J]. 海洋与湖沼, 2015, 46 (5): 1132-1138.
- [42] 吕芳, 丁刚, 詹冬梅, 等. 茉莉酸甲酯对铜藻生长、抗氧化系统及岩藻黄素含量的影响 [J]. 植物生理学报, 2019, 55 (5): 667-675.
- [43] Lu Y, Jiang P, Liu S, et al. Methyl jasmonate- or gibberellins A3-induced astaxanthin accumulation is associated with up-regulation of transcription of β -carotene ketolase genes (bkt) in microalga *Haematococcus pluvialis* [J]. Bioresource Technology, 2010, 101 (16): 6468-6474.
- [44] 韩惠宾, 张国华, 王国栋. 细胞分裂素参与植物维管系统发育的信号转导研究进展 [J]. 植物生理学报, 2015, 51 (7): 996-1002.
- [45] Nimir NEA, Zhou GS, Guo WS, et al. Effect of foliar application of GA3, kinetin, and salicylic acid on ions content, membrane permeability and photosynthesis under salt stress of sweet sorghum [J]. Canadian Journal of Plant Science, 2017, 95 : 525-535.
- [46] 刘洋. 细胞分裂素和氮素共同作用对匍匐剪股颖 (*Agrostis stolonifera*) 抗旱性的影响研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2015.
- [47] Udayan A, Kathiresan S, Arumugam M. Kinetin and gibberellic acid (GA3) act synergistically to produce high value polyunsaturated fatty acids in *Nannochloropsis oceanica* CASA CC201 [J]. Algal Research, 2018, 32 : 182-192.

- [48] Wu G, Gao Z, Du H, et al, The effects of abscisic acid, salicylic acid and jasmonic acid on lipid accumulation in two freshwater *Chlorella* strains [J]. *Journal of General and Applied Microbiology*, 2018, 64 : 42-49.
- [49] Chu J, Li Y, Cui Y, et al, The influences of phytohormones on triacylglycerol accumulation in an oleaginous marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2019, 31 : 1009-1019.
- [50] Park WK, Yoo G, Moon M, et al. Phytohormone supplementation significantly increases growth of *chlamydomonas reinhardtii* cultivated for biodiesel production [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013, 171 (5) : 1128-1142.
- [51] 肖丹曦. 植物激素 ABA 和 GA 对紫球藻生长的影响 [D]. 广州: 暨南大学, 2009.
- [52] 史成颖, 蔡为荣, 甘旭华, 等. 6 种植物生长调节剂对钝顶螺旋藻生长的影响 [J]. *安徽农业大学学报*, 2004 (1) : 26-29.
- [53] Bajguz A, Piotrowska-Niczyporuk A. Synergistic effect of auxins and brassinosteroids on the growth and regulation of metabolite content in the green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae) [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013, 71 : 290-297.
- [54] 王婷, 赵培, 王雪青. 低温环境对球等鞭金藻 3011 抗氧化系统和二十二碳六烯酸产量的影响 [J]. *食品科学*, 2016, 37 (1) : 126-132.
- [55] 任晓咏. 低温胁迫对三角褐指藻生长和生理生化影响及其 LEA 基因的克隆 [D]. 大连: 辽宁师范大学, 2011.
- [56] 常博文, 钟鹏, 刘杰, 等. 低温胁迫和赤霉素对花生种子萌发和幼苗生理响应的影响 [J]. *作物学报*, 2019, 45 (1) : 118-130.
- [57] 刘思宇. 外源物质对低温胁迫下番茄幼苗生理指标的影响 [J]. *北方园艺*, 2010 (17) : 44-46.
- [58] 章锦涛, 王华, 王松, 等. 外施脱落酸对低温胁迫下山茶花生理生化指标的影响 [J]. *安徽农业大学学报*, 2017, 44 (1) : 142-145.
- [59] 陈文笔, 张琳, 徐继林, 等. 外源水杨酸提高微拟球藻低温抗逆性的应用 [J]. *农业生物技术学报*, 2017, 25 (2) : 240-249.
- [60] 吕冰心, 常蓉, 李博生. 基于蛋白质组学对螺旋藻在高温胁迫下响应机制的初步研究 [J]. *植物生理学报*, 2018, 54 (5) : 904-916.
- [61] 雷亚萍, 许丽红, 曾臻, 等. 共生与非共生爪哇伪枝藻对高温胁迫的响应 [J]. *水生生物学报*, 2017, 41 (3) : 671-676.
- [62] 丁聪聪, 徐年军, 张琳, 等. 水杨酸对蛋白核小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*) 生长及抗逆相关基因的影响 [J]. *海洋与湖沼*, 2015, 46 (6) : 1451-1460.
- [63] 李静, 王俏俏, 徐年军, 等. 24-表油菜素内酯对龙须菜抗高温胁迫的研究 [J]. *海洋学报*, 2014, 36 (8) : 82-90.
- [64] 朱招波, 孙雪, 徐年军, 等. 水杨酸对龙须菜抗高温生理的影响 [J]. *水产学报*, 2012, 36 (8) : 1304-1312.
- [65] 贺亮. 高温胁迫下半叶马尾藻中国变种生理生化响应及其耐热机制的初步研究 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2017.
- [66] 张倩. 酸性和高温条件下 4 株小球藻的生长及总脂含量研究 [C]. 2014 中国环境科学学会学术年会论文集, 2014.
- [67] 史飞飞, 程宇娇, 马浩天, 等. 利用赤霉素提高微藻耐酸性的研究 [J]. *山西农业大学学报: 自然科学版*, 2018, 38 (3) : 30-35.
- [68] 李建宏, 浩云涛, 翁永萍. Cd²⁺ 胁迫条件下椭圆小球藻的生理应答 [J]. *水生生物学报*, 2004 (6) : 659-663.
- [69] 全秋梅, 贺亮, 梁忠, 等. 镉离子胁迫下半叶马尾藻中国变种生理生化响应的研究 [J]. *海洋湖沼通报*, 2019 (2) : 139-146.
- [70] Kovacik J, Micalizzi G, Dresler S, et al. Metabolic responses of *Ulva compressa* to single and combined heavy metals [J]. *Chemosphere*, 2018, 213 : 384-394.
- [71] Bajguz A. Blockade of heavy metals accumulation in *Chlorella vulgaris* cells by 24-epibrassinolide [J]. *Plant Physiology and Biochemistry (Paris)*, 2000, 38 (10) : 797-801.
- [72] 刘成圣, 唐学玺. UV-B 辐射对三角褐指藻的膜脂脱酯化伤害 [J]. *海洋水产研究*, 2002 (3) : 37-40.
- [73] 屠燕萍, 俞泓伶, 谢志浩. 三角褐指藻和小角毛藻对 UV-B 辐射增强的生理生化响应 [J]. *生态科学*, 2013, 32 (4) : 474-479.
- [74] Han MM, Hu F, Wang K, et al. Effect of different kinds of exogenous auxin on the growth of rice roots under cadmium stress [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2010, 11 (7) : 45-48.
- [75] 韩燕. 细胞分裂素和生长素对 UV-B 诱导气孔关闭的效应及其机制研究 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2007.
- [76] 卓品利, 钟佳丽, 王东, 等. 不同光照条件下外源水杨酸对浒苔响应紫外辐射胁迫的影响 [J]. *应用生态学报*, 2017, 28 (6) : 1977-1983.
- [77] Liang Y, Cao CH, Tian CY, et al. Changes in cell density and

chlorophyll fluorescence with salinity stress in two *Isochrysis galbana* strains (Prymnesiophyceae) [J]. *Biocontrol Science and Technology*, 2014, 145 (1): 81-98.

[78] 赵萍, 邹宁, 孙东红, 等. 盐度对三角褐指藻生长及有机质积累的影响 [J]. *中国油料作物学报*, 2013, 35 (2): 217-220.

[79] 魏显珍, 王淑智, 潘响亮. 盐胁迫对喜钙念珠藻生理活性的影响及钙的胁迫缓解效应 [J]. *应用与环境生物学报*, 2013, 19 (4): 655-662.

[80] 吴以平, 董树刚. 钙对高盐胁迫下缘管浒苔和孔石莼生理生化过程的影响 [J]. *海洋科学*, 2000 (8): 11-14.

[81] 夏蕊琪, 查婧, 曹媛媛, 等. 螺旋藻在光胁迫时的抗逆性研究 [J]. *生物学杂志*, 2013, 30 (5): 45-48.

[82] 陈陆丹, 许凯, 徐燕, 等. 坛紫菜应答高光强胁迫的生理指标分析 [J]. *应用海洋学学报*, 2016, 35 (3): 399-404.

[83] 巩东辉, 王志忠, 季祥, 等. 低温、强光胁迫对鄂尔多斯钝顶节旋藻光合速率及光合色素含量的影响 [J]. *内蒙古农业大学学报: 自然科学版*, 2016, 37 (6): 65-69.

[84] 崔丹丹, 杨柳, 孙雪, 等. 玉米素和水杨酸对雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 生长及虾青素积累的影响 [J]. *海洋与湖沼*, 2018, 49 (3): 682-691.

(责任编辑 狄艳红)

通过目标启动子基因编辑及病原菌群体监控实现水稻白叶枯病持久广谱抗性

病害流行时严重影响作物产量和品质，威胁全球粮食安全。在农作物选育改良过程中，广谱抗病性（Broad-spectrum resistance, BSR）作为一种理想性状被广泛关注和应用，在近几十年中对减少农作物病害流行发挥了重要作用。具有 BSR 性状的农作物在生长过程中对多种病原物或一种病原物的不同小种具有抗性，然而，通过传统育种的方式获得具有 BSR 性状的农作物耗时较长。近些年，以 CRISPR/Cas9 技术为代表的基因编辑技术为快速创建具有 BSR 性状的农作物提供了可能。

近日，美国俄亥俄州立大学王国梁（Guo-Liang Wang）教授团队在 aBIOTECH 期刊发表题为“Achieving broad-spectrum resistance against rice bacterial blight through targeted promoter editing and pathogen population monitoring”的评论文章。文章基于近期美国密苏里大学哥伦比亚分校 Bing Yang 教授和德国杜塞尔多夫大学 Wolf B. Frommer 教授于 Nature Biotechnology 上发表的两篇背靠背论文，评述了通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术和病原菌变异实时监控技术对水稻获得并保持白叶枯病 BSR 性状的创新性。

同时，作者提出了展望和建议，一、基因编辑的白叶枯病 BSR 水稻品种应在多个水稻种植区测试并对农艺性状进行全面评估；二、要特别关注基因编辑品种中的脱靶突变及种植地区潜在超级病原菌的流行；三、应考虑将其他类型的抗病基因引入已编辑的种植品种中，以增加这些水稻品种的抗性持久性。

扫描二维码获取全文



作者简介

王国梁，美国俄亥俄州立大学教授，主要从事植物抗病分子生物学和植物功能基因组学研究，在水稻抗病基因克隆和水稻与病原菌互作分子机理方面成绩显著。现为 aBIOTECH 期刊编委。

更多文章请关注期刊网站：www.abiotech.net