

## 坛紫菜色素突变体产生原因的初步研究

连跃斌, 许 凯, 王文磊, 徐 燕, 纪德华, 陈昌生, 谢潮添

(集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

**[摘要]** 以6种不同颜色的坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)品系为研究材料,通过生理指标测定和转录组测试分析,对坛紫菜色素突变体产生的原因进行初步研究。根据色度值将6个品系划分为红黄组和绿组,其中:红黄组包括3个色素突变品系(红色、橘色和紫色)和1个野生品系,绿组包括2个色素突变品系(棕绿色和翠绿色)。进一步研究发现:1)红黄组品系的平均藻红蛋白(PE)含量比绿组高1倍,但两组藻体在藻蓝蛋白(PC)和别藻蓝蛋白(APC)含量上没有显著差异。2)红黄组藻体的平均叶绿素(Chl *a*)含量比绿组低35%,这导致红黄组藻体的PE/Chl *a*含量比绿组高1.7倍。3)红黄组藻体藻胆蛋白合成关键基因血红素氧化酶(HMOX1)和铁氧还蛋白氧化还原酶(HY2)的表达水平高于绿组。4)两组内不同品系间在色素合成关键基因的表达上具有显著差异。其中,叶绿素和藻胆蛋白合成的关键基因 *hemA* 的表达水平上调,促进更多色素的合成;叶绿素合成关键基因 *Mg-螯合酶亚基*和 *CHLG* 表达水平上调,调控藻体合成更多Chl *a*,使得藻体呈绿色;而 *HMOX1*和 *HY2*明显上调,促进血红素合成胆绿素,最终提高PE含量,使藻体偏红色。以上结果说明,坛紫菜藻胆蛋白和叶绿素合成通路中关键基因的差异表达可能导致藻体PE/Chl *a*含量比的不同,进而产生不同颜色的突变体。

**[关键词]** 坛紫菜;藻胆蛋白;叶绿素 *a*;转录组;色素突变体

**[中图分类号]** S 963

### Preliminary Studies on the Formation of Pigment Mutants of *Pyropia haitanensis*

LIAN Yuebin, XU Kai, WANG Wenlei, XU Yan, JI Dehua, CHEN Changsheng, XIE Chaotian

(Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** In this study, to investigate the formation reason of pigment mutants of *Pyropia haitanensis*, six strains with different color were used as research materials through physiological and transcriptomic analysis. Based on the chroma values, six strains were divided into a red-yellow group and a green group. The former group included three pigment mutants (Red, Orange and Purple) and a wild strain, the latter group included two pigment mutant strains (Brown-Green and Olive-Drab). This study found that the average content of phycoerythrin (PE) in the red-yellow group was one time higher than the green group, but there was no significant difference in the content of phycocyanin (PC) and allophycocyanin (APC) between the two groups. In contrast, the average content of Chl *a* in the red-yellow group was 35% lower than that of the green group, which resulted in that the ratio of PE/Chl *a* in the red-yellow group was 1.7 times higher than the green group. In

**[收稿日期]** 2019-04-17

**[基金项目]** 福建省自然科学基金青年创新基金(2018J05069);福建省科技计划区域发展示范项目(2017N3016);现代农业产业技术体系专项资金资助项目(CARS-50)

**[作者简介]** 连跃斌(1993—),男,硕士生。通信作者:谢潮添(1977—),男,教授,从事海藻生物技术研究。E-mail:ctxie@jmu.edu.cn

<http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb>

addition, the expression levels of heme oxygenase 1 (HMOX1) and ferredoxin oxidoreductase (HY2), the key genes of phycobiliprotein synthesis, were higher in the red-yellow group than in the green group, different strains within the two groups showed significant differences in the expression of the key genes for pigments synthesis. Among them, the expression level of *hemA*, the key gene for chlorophyll and phycobilin synthesis, was up-regulated, which accelerated the synthesis of plant pigments; the expression levels of *CHLG* and magnesium chelatase were up-regulated, which accelerated the synthesis of chlorophyll; the expression of *HMOX1* and *HY2* were significantly up-regulated, which improved the synthesis of bilirubin from Heme, and then elevated the contents of PE and determined the chroma values. The above results indicated that the expressions of the key genes of the pigments synthesis pathways in the *P. haitanensis* resulted in different ratios of PE/Chl *a*, which thus determined the colors.

**Keywords:** *Pyropia haitanensis*; phycobiliprotein; chlorophyll *a*; transcriptome; pigment mutants

## 0 引言

全球紫菜的年总产值约为 20 亿美元,而我国的紫菜产量位居世界第一,2017 年全国的紫菜产量达  $17.3 \times 10^4 \text{t}^{[1]}$ ,其中,坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)的产量约占全国紫菜产量的 75%,产业规模巨大,经济效应可观<sup>[1]</sup>。然而,近年来随着坛紫菜养殖面积不断扩大,广大养殖户仍以传统方式进行生产,以未经选育的野生种为主要栽培品种,造成坛紫菜种质严重退化、产量降低、质量下降等问题<sup>[2]</sup>。因此,优良品种的选育势在必行。

坛紫菜叶片是四分子嵌合体,一株叶状体上最多可以有四种颜色。经过嵌合再纯化的色素突变体可作为体色标记性状,并广泛用于纯系选育。坛紫菜色素突变体在基础研究和生产实践中的应用价值日益体现。严兴洪和王素娟<sup>[3]</sup>使用秋水仙碱对坛紫菜的体细胞进行诱变处理,得到了形状细长、颜色深、生长较快的红色突变体。严兴洪<sup>[4]</sup>利用紫外线辐射,对条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)和坛紫菜的原生质体进行诱变处理,经照射后,产生的后代原生质体颜色呈红色,并出现一些生长速度更快、长宽比更小的纯红色突变体后代。有贺祐胜等<sup>[5]</sup>在条斑紫菜红色突变体的研究中表明,红色突变体与野生型比较,藻红蛋白含量高,藻蓝蛋白含量低,叶绿素 *a* 差异不大,所以藻体呈现红色。徐燕<sup>[6]</sup>通过<sup>60</sup>Co- $\gamma$ 射线辐射坛紫菜自由丝状体,从诱变丝状体子代中选育性状优良的色素突变体,将诱变品系和野生选育品系进行杂交,之后利用体细胞克隆技术将单一色块酶解,诱导产生丝状体进而发育为完整的紫菜叶状体,经过四代选育,最终获得了一个优良紫菜纯系新品种(闽丰 1 号),该品种藻体日均增重快、耐高温、藻体宽而薄且不易老化。梁艳<sup>[7]</sup>在对坛紫菜(闽丰 1 号)的研究中证明,叶状体的藻胆蛋白含量均极显著地高于对照组,藻胆蛋白含量是对照组的 2.14 倍,其中藻红蛋白含量占比较大,叶绿素 *a* 含量同样显著高于对照组。在生产中,紫菜藻体的色泽是衡量紫菜饼干制品品质高低的重要指标,而已有的研究表明紫菜的色泽主要是由其藻体中光合色素的含量和比例决定的<sup>[8]</sup>。由此可见,探究紫菜色素突变体的形成原因就显得尤为重要。

影响高等植物颜色形成的色素主要是花青素、类胡萝卜素、甜菜红素和叶绿素。然而,在藻类中影响颜色形成的色素主要是藻胆蛋白和叶绿素。光合色素(Chl *a*、PE、PC&APC)的含量和相互之间的比例决定了紫菜的质量和藻体的颜色<sup>[9-10]</sup>。谷氨酰-tRNA 还原酶(Glutamyl-tRNA reductase, *hemA*)是卟啉合成途径的第一个关键限速酶,能够催化谷氨酸合成 5-氨基酮戊酸(5-Aminolevulinic acid, ALA)<sup>[11]</sup>。ALA 可以调节 Chl *a* 的合成<sup>[12-14]</sup>,提高 Chl *a* 和捕光系统 II 的稳定性<sup>[15]</sup>。例如,添加 ALA 可以促进小球藻(*Chlorella vulgaris*)和雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)的色素合成与藻体生长<sup>[16]</sup>。姚嘉龙等<sup>[17]</sup>对拟南芥(*Arabidopsis*)的研究表明,*hemA* 基因在 Chl *a* 生物合成过程中表达量显著下降,说明相关酶合成减少,导致 Chl *a* 合成减少。在番茄色素合成中,过剩的血红素影响细胞内色素的含量和比例,会引起色素突

变<sup>[18]</sup>。在*Synechococcus* sp. PCC7002 藻蓝蛋白操纵子阅读框 *cpcF* 和 *cpcE* 中任意位点插入突变,都会产生相同表现型的突变株,相对于野生型来说这种突变株产生极少的藻蓝蛋白,而且所产生的藻蓝蛋白缺少  $\alpha$ -84 位上的藻蓝胆素<sup>[19]</sup>。小球藻的研究发现,由于突变体在叶绿素  $Mg^{2+}$  螯合酶基因表达缺陷,造成突变体 Chl *a* 合成缺陷,最终造成小球藻 Chl *a* 含量减少和藻体颜色黄化<sup>[20]</sup>。

然而,目前关于紫菜色素合成通路以及色素突变体产生的分子机理尚不清楚<sup>[21]</sup>。因此,本实验从色素合成通路出发,结合相关色素含量测定和色素合成关键基因转录水平分析,探究坛紫菜颜色形成的分子机制,为进一步理解紫菜等大型海藻的颜色形成机制提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验材料取自福建省坛紫菜种质资源库,为经杂交育种和诱变育种选育出的不同颜色的色素突变体。分别选取了橘红色藻体品系 NO. 8 II (Orange)、红色藻体品系 Z-26-R (Red)、紫色藻体品系 III<sub>3</sub> (Purple)、野生藻体品系 PX43 (Wild)、棕绿色藻体品系 Z-26-BG (Brown Green)、翠绿色藻体品系 NO. 9 IV (Olive Drab)。

正常培养条件:温度  $(21 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ ,光照强度  $50 \sim 60 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,光照周期 12L:12D,在新鲜海水中培育,每3天更换1次海水。每个样品均设置3个生物学重复。

### 1.2 色度值测量

从每个突变体中随机选取3株作为实验材料。藻体平摊于白色湿润瓷盘上,用 CM-700d 分光测色计(柯尼卡美能达, Konica Minolta 控股公司,日本)垂直于藻体,测量藻体的中部,取色度值 *a* 值和 *b* 值。*a* 值越大表示藻体颜色越偏红色,*a* 值越小表示藻体颜色越偏绿色;*b* 值越大表示藻体颜色越偏黄色,*b* 值越小表示藻体颜色越偏蓝色。

### 1.3 叶绿素和藻胆蛋白的测定

#### 1.3.1 叶状体藻胆蛋白含量的测定

藻胆蛋白含量测定,参照文献[22]:1)分别取6份在生长旺期冰冻保存的叶状体藻体,将其中3份藻体称取鲜重( $W_F$ )后置于  $105^\circ\text{C}$  烘箱中干燥2h,再称取干重( $W_D$ ),测定藻体的含水率( $W_C$ );2)取另3份藻体在避光环境中,在倒有液氮的研钵中充分研磨至粉末状,将粉末倒入50 mL 冻存管中,分别加入适量的  $0.05 \text{ mol/L}$  磷酸钠缓冲液( $\text{pH} = 6.8$ )浸泡数分钟后,用磷酸钠缓冲液冲洗研钵3次以上,将冻存管中液体总体积控制在25 mL左右,用铝箔包裹避光;3)将冻存管放入  $-20^\circ\text{C}$  冰箱中冷冻,待完全冰冻后,取出冻存管于室温下避光解冻,反复冻融6次以上,放入  $4^\circ\text{C}$  冰箱中过夜,彻底提取藻胆蛋白;4)用300目筛绢网将研磨液过滤至50 mL离心管中,用磷酸钠缓冲液冲洗冻存管,于  $4^\circ\text{C}$ 、 $10\,000 \text{ r/min}$  离心20 min。取上清液,在锡箔纸包裹的容量瓶中定容至50 mL( $V$ ),摇匀后静置至室温;5)用分光光度计测定其在565 nm、615 nm、650 nm和730 nm波长下的OD值( $A$ )。利用公式分别计算1 g藻体中藻红蛋白(PE)、藻蓝蛋白(PC)和别藻蓝蛋白(APC)的含量  $w$  (mg/g):

$$w(\text{PE}) = [0.123(A_{565} - A_{730}) - 0.068(A_{615} - A_{730}) + 0.015(A_{650} - A_{730})] \times V / [W_F(1 - W_C)],$$

$$w(\text{PC}) = [0.162(A_{615} - A_{730}) - 0.001(A_{565} - A_{730}) - 0.098(A_{650} - A_{730})] \times V / [W_F(1 - W_C)],$$

$$w(\text{APC}) = [0.171(A_{650} - A_{730}) - 0.006(A_{565} - A_{730}) - 0.004(A_{615} - A_{730})] \times V / [W_F(1 - W_C)].$$

#### 1.3.2 叶状体 Chl *a* 含量的测定

Chl *a* 含量测定,参照文献[23]:1)分别取6份在生长旺期冰冻保存的叶状体藻体,将其中3份藻体称取鲜重( $W_F$ )置于  $105^\circ\text{C}$  烘箱中干燥2h后再称取干重( $W_D$ ),测定藻体的含水率( $W_C$ );2)另取3份藻体在避光环境中,在倒有液氮的研钵中充分研磨至粉末状,将粉末倒入40 mL锡箔纸

包裹的冻存管中,加入适量 90% 的丙酮溶液浸泡 3 分钟,用 90% 的丙酮溶液冲洗研钵 3 次以上,盖上瓶盖;3) 在室温下,置于避光处 24 h,彻底提取 Chl *a*,用 300 目筛绢网将研磨液过滤至 50 mL 离心管中,于 4℃、10 000 r/min 离心 20 min;4) 取上清液,在锡箔纸包裹的容量瓶中定容至 50 mL (*V*),摇匀;5) 用分光光度计测定其在 666 nm、730 nm 波长下的 OD 值 (*A*),计算每克藻体中 Chl *a* 的含量 (mg/g),  $\omega(\text{Chl } a) = (A_{666} - A_{730}) \times 10V / (890 (W_F (1 - W_C)))$ 。

#### 1.4 RNA 提取与转录组测序

##### 1.4.1 RNA 提取

利用 E. Z. N. Z 植物提取试剂盒 (OMEGA, 德国) 提取不同颜色突变体样品 RNA。

##### 1.4.2 转录组测序

提取样品总 RNA 后,将完整性均好,无杂质污染的 RNA 样品,由深圳华大基因股份有限公司利用 BGISEQ-500 高通量测序平台检测,然后本研究完成后续的数据拼接组装与分析。

##### 1.4.3 RNA-Seq 测序数据的处理

测序得到的 reads,通过如下步骤处理获得 clean reads: 1) 去除含有测序接头的 reads; 2) 去除比例大于 10% 的 reads; 3) 去除低质量的 reads (质量  $Q \leq 5$  的碱基数占整个 reads 的 50% 以上); 4) 获得 clean reads。

##### 1.4.4 Clean reads

使用无参转录组组装软件 Trinity 对 clean reads 进行无参考组装,得到坛紫菜 Unigene。对组装出的 Unigene 进行长度分布、平均长度、N50、组装大小等测序指标的统计。

##### 1.4.5 Unigene 功能注释

将组装所获得的 Unigene 序列通过序列比对软件 Blast+ 在 7 大数据库 (Nr、Swissport、KEGG、GO、COG、KOG、Pfam) 中进行序列比对,进而得到该 Unigene 的功能注释信息。

##### 1.4.6 基因表达量的计算

根据组装结果,使用 Bowtie2 软件把每个样本的 clean reads 比对到 Unigene,之后使用 RSEM (reads per kb per million reads) 计算每个样品的基因表达水平。

##### 1.4.7 差异表达基因的筛选

对经过 RSEM 软件比对得到的 gene read count 数据,用差异表达分析软件 edgeR 进行分析。显著差异表达基因的筛选标准为  $FDR(\text{false discovery rate}) < 0.05$  且  $|\log_2 FC| \geq 1$ , *F* 为基因表达量, *C* 为唯一比对到基因的片段数。

##### 1.4.8 GO 和 Pathway 显著富集分析

首先把所有的差异基因向 KEGG 数据库 (<http://www.kegg.jp/>) 的各个 Pathway 映射,计算每个 Pathway 的基因数目,然后应用超几何检验,找出与整合基因组差异表达基因显著富集的 Pathway。FDR  $\leq 0.05$  的 Pathway 定义为差异基因中显著富集的 Pathway。

#### 1.5 聚类分析和热图分析

本研究中,在进行表达量计算时,采用计算 FPKM 值 (fragments per kb per million reads) 表示基因的相对表达量, FPKM 值的计算方法是:  $FPKM = 10^6 C / (NL10^3)$ , *N* 为唯一比对到参考基因的总片段数, *L* 为基因长度。

根据基因的功能注释信息,选取色素合成通路上的关键基因,利用 R 语言 gplots 包 (<http://cran.r-project.org/web/packages/gplots/index.html>) 中的 heatmap.2 模块对这些基因的表达水平进行聚类分析。对不同颜色的 6 组样品在关键基因的不同表达水平作热图分析,并通过样品之间两两对照比较各基因的表达水平。

#### 1.6 数据分析

采用 SPSS 软件比较数据均值,并进行单因素方差分析 (ANOVA),以  $P > 0.05$  为差异不显著,

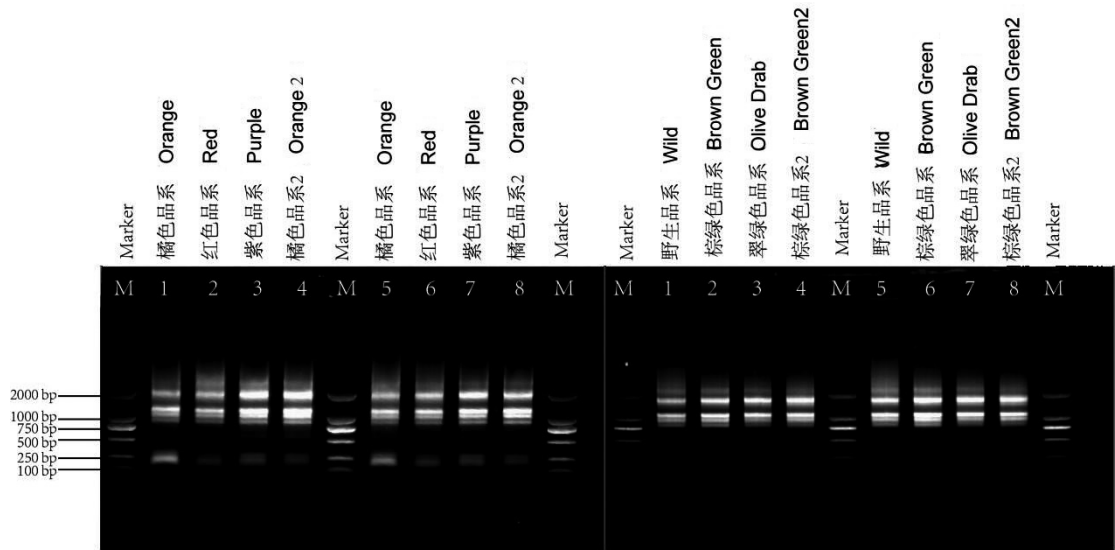


以  $P < 0.05$  为差异显著。

2 结果

2.1 实验样品 RNA 的提取及质量检测

用于送测的 RNA 样品浓度介于 500 ~ 1000 ng/μL 之间, 总量大于 50 μg,  $A_{260}/A_{280}$  值在 1.9 ~ 2.1 之间,  $A_{260}/A_{230}$  值大于 1.8。电泳结果 (见图 1) 显示, 所有样品条带完整、清晰、无拖尾, 都具有 2 条 28 S, 3 条 18 S, 以及 1 条 5 S 条带。



说明: M 为 DL2000 DNA Marker; 1~8 为样品。  
Note: M is DL2000 DNA Marker; 1~8 are samples.

图 1 坛紫菜总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图  
Fig.1 Agarose gel electrophoresis of total RNAs from *P. haitanensis*

2.2 坛紫菜不同色素突变体的色度值测定

不同色素突变体的表观颜色差异显著, 从色度值可以明显看出来, 不同颜色的品系的色度值区分明显。橘色品系的  $a$  值平均值最大 ( $21.95 \pm 0.29$ ), 翠绿色品系的  $a$  值平均值最小 ( $-6.90 \pm 0.24$ )。橘色品系与红色品系的  $a$  值差异不明显 ( $P > 0.05$ ), 但橘色品系明显高于紫色品系和野生品系 ( $P < 0.05$ ); 棕绿色品系明显比翠绿色品系的  $a$  值高 ( $P < 0.05$ )。因此, 本研究将色度值相近的几个品系归为一类, 分别为红黄组和绿组, 红黄组包括橘色品系、红色品系、紫色品系和野生品系, 绿组包括翠绿色品系和棕绿色品系 (见图 2A)。红黄组的  $a$  值平均为 ( $18.66 \pm 3.50$ ), 绿组的  $a$  值平均为 ( $-3.1 \pm 3.72$ ), 两组样的差异明显 (见表 1) ( $P < 0.05$ )。而在  $b$  值平均值上, 两组样品无明显差异 ( $P > 0.05$ )。

表 1 红黄组和绿组的色度值统计分析  
Tab. 1 Statistical analysis of value chroma between red-yellow group and green group

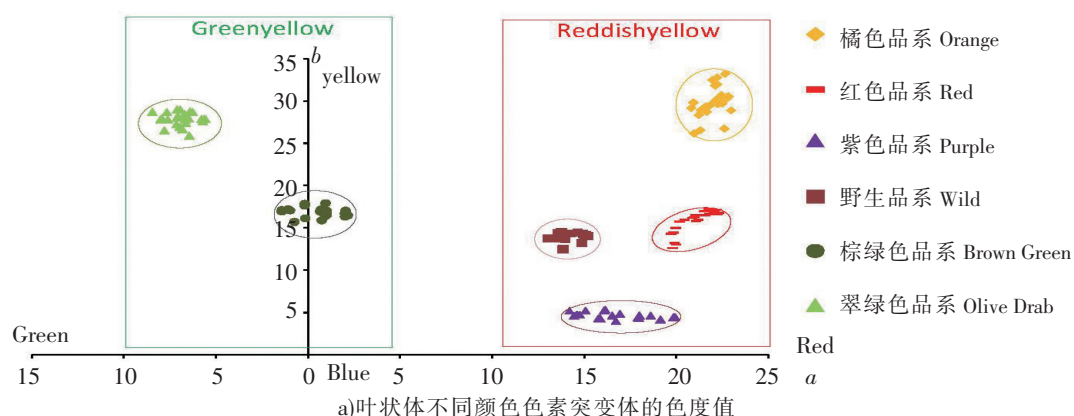
Group	$a$	$b$
红黄组 Red-yellow group	$18.66 \pm 3.50^a$	$16.36 \pm 9.05^a$
绿组 Green group	$-3.10 \pm 3.72^b$	$22.30 \pm 5.54^a$

说明: 上标字母不相同表示显著差异。  
Note: Superscripts represent significant difference among treatments.

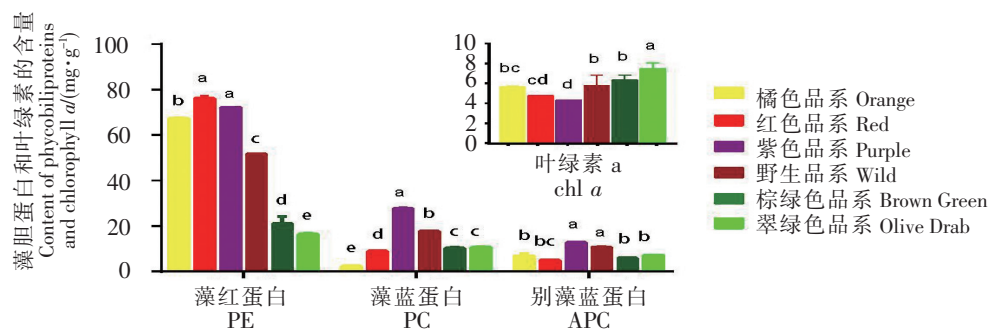
2.3 叶状体藻胆蛋白和 Chl  $a$  的含量

在 PE 含量方面, 红色品系含量最高, 约为 75 mg/g; 紫色品系约为 70 mg/g; 橘色品系约为

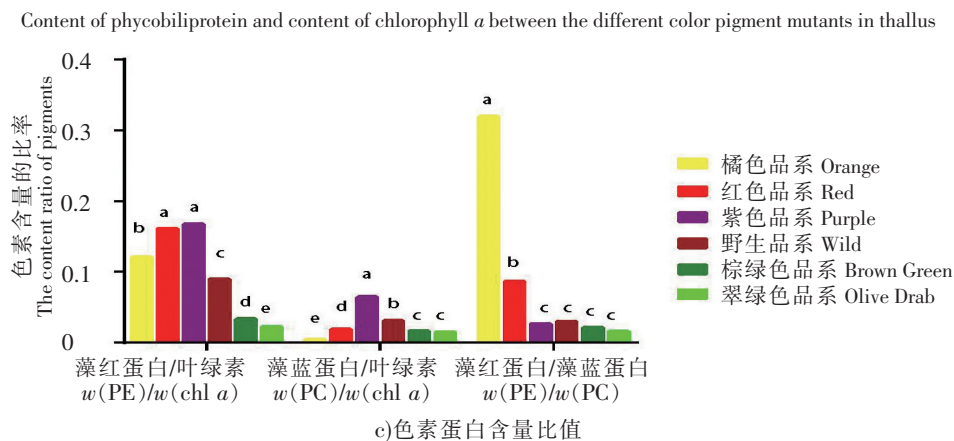
65 mg/g; 野生品系约为 50 mg/g; 棕绿色品系和翠绿色品系的含量最少, 分别为 20 mg/g 和 15 mg/g。在 PC 含量方面, 紫色品系最多, 约为 27 mg/g; 野生品系约为 17 mg/g; 棕绿色品系、翠绿色品系和红色品系约为 10 mg/g; 橘色品系约为 2 mg/g。而对于 APC 而言, 紫色品系和野生品系的含量最高, 之后依次是棕绿色品系、翠绿色品系、橘色品系和红色品系, 其含量均不超过 10 mg/g (见图 2a)。Chl *a* 含量测定结果显示, 翠绿色品系的 Chl *a* 含量约为 8 mg/g, 显著高于其他品系 ( $P < 0.05$ ), 其中, 棕绿色品系、橘色品系和野生品系约为 6 mg/g, 而红色品系和紫色品系含量约为 4 mg/g (见图 2b)。



a) 叶状体不同颜色色素突变体的色度值  
Value of chroma between the different color pigment mutants in thallus



b) 叶状体不同颜色色素突变体的藻胆蛋白和叶绿素 a 含量  
Content of phycobiliprotein and content of chlorophyll a between the different color pigment mutants in thallus



c) 色素蛋白含量比值  
The content ratio of pigment proteins

说明: 上标字母不相同表示显著差异。

Note: Superscripts represent significant difference among treatments.

图 2 叶状体不同颜色色素突变体的色度值, 色素含量和色素含量比率

Fig.2 Value of chroma, content of pigments and content ratio of pigments between the different pigment mutants in thallus

通过各品系色素蛋白含量的比值可以发现: 紫色和红色品系的  $w(\text{PE})/w(\text{Chl } a)$  约为 16, 橘色品系的  $w(\text{PE})/w(\text{Chl } a)$  约为 12, 野生品系的  $w(\text{PE})/w(\text{Chl } a)$  约为 9, 翠绿色品系和棕绿色品系的  $w(\text{PE})/w(\text{Chl } a)$  均小于 5。紫色品系的  $w(\text{PC})/w(\text{Chl } a)$  最高, 约为 6; 橘色品系的  $w(\text{PC})/w(\text{Chl } a)$  最低, 约为 0.3。橘色品系的  $w(\text{PE})/w(\text{PC})$  最高, 约为 30; 红色品系  $w(\text{PE})/w(\text{PC})$  约为 8.5; 紫色品系、野生品系、棕绿色品系和翠绿色品系没有显著差异,  $w(\text{PE})/w(\text{PC})$  都不高于 5 (见图 2c)。

#### 2.4 Chl *a* 和藻胆蛋白合成关键酶的表达分析

通过相关基因表达水平的聚类分析发现, 在橘色品系、紫色品系和棕绿色品系中 *hemA* 基因的表达水平较高 (见图 3)。在 Chl *a* 和藻胆蛋白的合成通路中, 谷氨酰-tRNA 经由 *hemA* 等催化反应生成 5-氨基酮戊酸 (ALA) (见图 4), 之后, 5-氨基酮戊酸经过催化合成原叶啉 IX, 再经过 Mg-螯合酶 (CHLI、CHLD 和 CHLH) 催化生成镁原叶啉 IX。在本实验中, Mg-螯合酶在橘色品系、紫色品系和野生品系中的表达水平较高。此外, 叶绿素合成酶 (CHLG) 是合成 Chl *a* 的关键酶, 镁原叶啉 IX 经过 CHLG 等一系列反应生成 Chl *a*。本研究发现, *CHLG* 在橘色品系、红色品系、野生品系和翠绿色品系中显著上调表达。

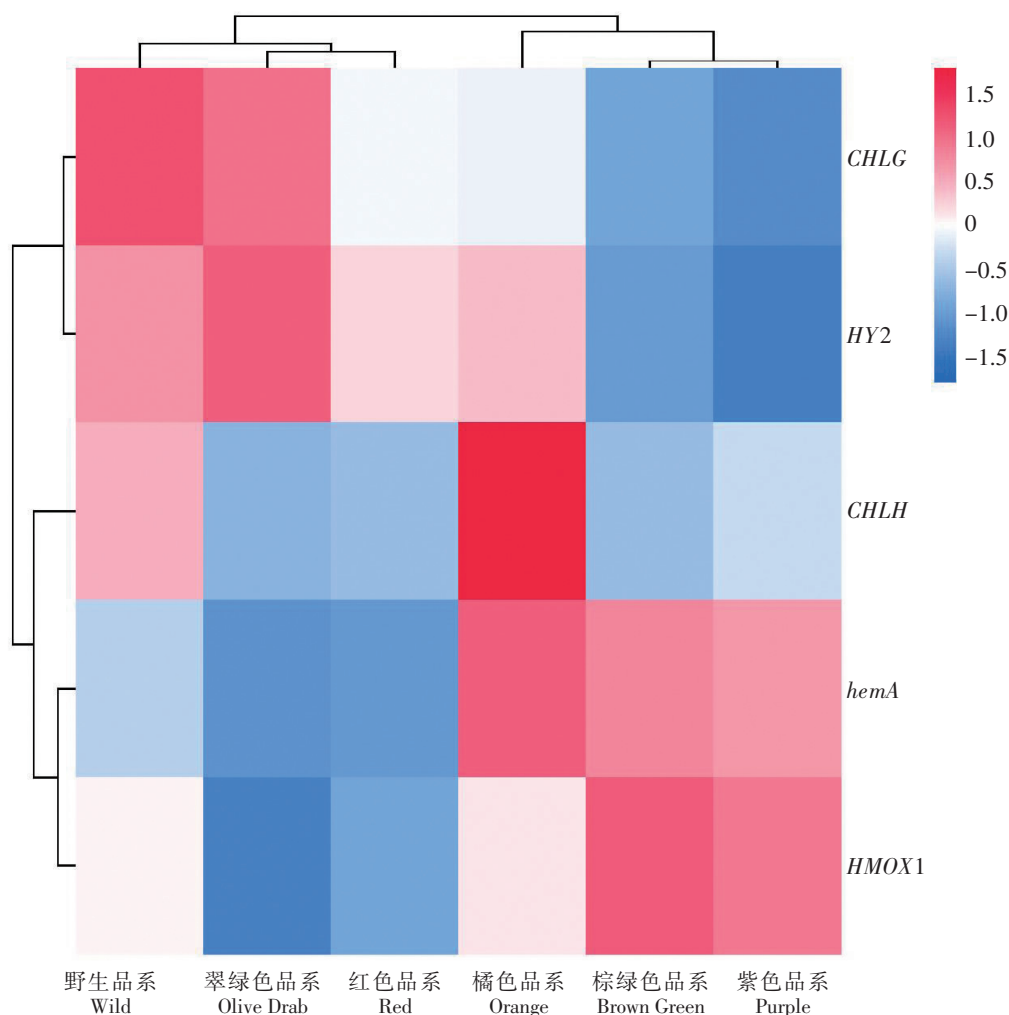
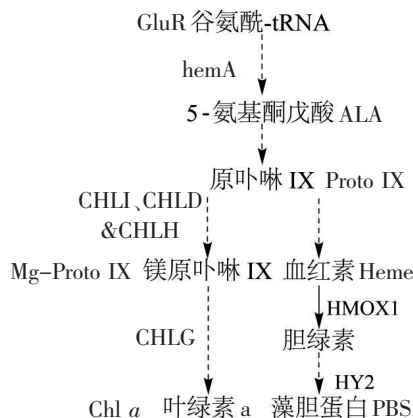


图 3 叶绿素和藻胆蛋白合成通路相关基因的聚类分析

Fig.3 Clustering analysis of the differentially expressed genes in the biosynthesis of chlorophyll and phycobiliprotein

在藻胆蛋白的合成通路中, 血红素氧化酶 (HMOX1) 是催化血红素合成胆绿素的关键酶, 原卟啉IX经过一系列反应合成血红素, 血红素再经过 HMOX1 催化合成胆绿素。在本实验中, *HMOX1* 在橘色品系、紫色品系、野生品系和棕绿色品系的表达水平高于其他品系。胆绿素再经过铁氧还蛋白氧化还原酶 (HY2) 等一系列反应催化, 最终合成藻胆蛋白。而 *HY2* 在橘色品系、红色品系、野生品系和翠绿色品系中的表达水平较高。



说明: 黑色箭头表示代谢流直接到下一个酶(实线)或者经过几个酶反应的步骤(虚线)。

Note: Black arrows indicate the metabolic flow directly to the next enzyme (solid line) or combine several enzymic steps (dashed line).

图 4 叶绿素和藻胆蛋白合成通路

Fig.4 Biosynthesis pathway of chlorophyll and phycobiliprotein

### 3 讨论

本研究中, 红黄组品系的平均 PE 含量比绿组高 3.5 倍, 而 PC 和 APC 含量却没有显著差异。同时, 红黄组的平均 Chl *a* 含量显著低于绿组 ( $P < 0.05$ ), 进而造成两组藻体在颜色上的差异。张倩<sup>[24]</sup>对皱紫菜 (*Pyropia crispata*) 色素突变体的研究数据表明, 红色品系皱紫菜 (PC-ZH) 的 PE 含量明显高于其他绿颜色的皱紫菜。黄慧珍<sup>[1]</sup>也发现, 坛紫菜野生品系的 PE 含量是翠绿色品系的十多倍。本研究中, 橘色、紫色、红色和野生品系的  $w(\text{PE})/w(\text{Chl } a)$  高, 其中橘色、紫色和红色藻体的  $w(\text{PE})/w(\text{Chl } a)$  大于 10, 翠绿色和棕色品系的  $w(\text{PE})/w(\text{Chl } a)$  小于 5。在色泽的差异上, 橘色、紫色、红色和野生品系  $a$  值显著大于翠绿色和棕色品系, 所以橘色、紫色、红色和野生品系呈现红色, 而翠绿色和棕色品系呈现绿色。

在叶绿素和藻胆蛋白合成基因的表达中 (见图 4), 橘色品系、紫色品系和棕绿色品系的 *hemA* 相关基因的表达水平较高, 说明坛紫菜藻体可能大量合成 ALA, 为 Chl *a* 和藻胆蛋白的合成提供更多前体, 有利于藻体的色素合成。李爽<sup>[25]</sup>将 *hemA* 基因克隆到 pET28a 载体上, 并在大肠杆菌中诱导表达, 通过分离纯化得到谷氨酰 tRNA 还原酶。重组菌发酵液上清中 ALA 含量达 40.2 mg/L, 通过过筛试验和紫外分光光度检测验证显色物质为卟啉类。

在合成通路后续反应中, 镁离子螯合酶催化合成镁原卟啉IX, 镁离子螯合酶是原卟啉IX合成镁原卟啉IX的关键酶。在色素合成通路中, 镁离子螯合酶催化镁原卟啉IX的合成, 决定了通路色素合成的走向 (见图 4)。本研究在坛紫菜转录组中发现的 CHLI、CHLD 和 CHLH 是镁离子螯合酶的亚基, 参与组成镁离子螯合酶, 进而参与 Chl *a* 的合成。小球藻突变体的研究中 CHLI、CHLD 和 CHLH 表达水平的降低, 引起突变体 Chl *a* 合成缺陷, 导致小球藻突变体光合作用降低, 最终造成突变体藻体颜色比野生型浅<sup>[1]</sup>。在本研究中, 橘色品系和野生品系的 CHLI、CHLD 和 CHLH 基因表达水平高于其他品系 (见图 3)。此外, 通过红黄组间比较, 发现橘色品系和野生品系的 Chl *a* 含量较高 (见图 2b), 说明藻体可能大量催化原卟啉IX (Protoporphyrin IX) 合成镁原卟啉IX (Mg Protoporphyrin IX), 进而合



成 Chl *a*。在 Chl *a* 合成通路中, CHLG 是催化镁原卟啉合成 Chl *a* 的关键酶。在盐生杜氏藻 (*Dunaliella salina*)<sup>[26]</sup> 和茶树<sup>[27]</sup> 的研究中均发现, CHLG 表达水平的降低, 会造成植株的黄化, 生长缓慢。在本研究中, 野生品系和翠绿色品系 CHLG 基因表达水平较高, 并且野生品系和翠绿色品系的 Chl *a* 含量也高 (见图 2b)。此外, 研究发现, 油菜 (*Brassica napus* L.) 中 HMOX1 的表达水平高, 会抑制 Chl *a* 的合成, 转向合成胆绿素, 造成油菜失绿的现象<sup>[28]</sup>。牟钰<sup>[29]</sup> 对白菜 (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis*) 的研究发现, 血红素加氧酶在血红素代谢过程中限制了血红素的降解, 使血红素含量积累, 血红素积累后抑制 ALA 的合成, ALA 合成受阻致使叶绿素合成减少, 最终导致叶色变异。

而红藻在血红素氧化酶 (HMOX1) 和铁氧还蛋白氧化还原酶 (HY2) 等一系列生化反应下, 催化血红素合成藻胆蛋白。Emborg 等<sup>[30]</sup> 发现拟南芥中血红素加氧酶发生突变, 使血红素合成的光敏生色团合成受阻。同样, 本研究发现红黄组藻体的 HMOX1 和 HY2 上调表达, 而橘色品系、红色品系、紫色品系和野生品系的 PE 含量明显高于其他品系。

因此, 本研究推测, HMOX1 和 HY2 的高表达水平, 可能会抑制 Chl *a* 的合成, 并大量合成胆绿素, 最终导致藻体颜色上表现出失绿<sup>[28]</sup>。而在绿组中, 棕绿色品系 HMOX1 的表达水平高于翠绿色品系, 然而棕绿色品系在 CHLG 的表达水平却低于翠绿色品系, 最终导致棕绿色品系的 PE 含量显著高于翠绿色品系 ( $P < 0.05$ ), 而 Chl *a* 含量低于翠绿色品系, 进而导致棕绿色品系比翠绿色品系的颜色更深。

## 4 结论

综上所述, 红黄组品系藻体 PE 含量高导致  $w(\text{PE})/w(\text{Chl } a)$  高, 绿组品系藻体 Chl *a* 含量高导致  $w(\text{PE})/w(\text{Chl } a)$  低, 从而导致红黄组品系藻体呈现红色, 绿组品系藻体呈现绿色。进一步通过转录组分析发现, 绿组品系藻体中, Mg-螯合酶和叶绿素合成酶表达水平上调, 合成更多 Chl *a*, 使得藻体呈绿色; 红黄组品系藻体中, 血红素合成时血红素氧化酶和铁氧还蛋白氧化还原酶上调, 催化血红素合成胆绿素, 最终合成藻胆蛋白, 促使藻体颜色变深, 呈红黄色。本研究有助于进一步理解坛紫菜色素合成通路中关键酶的作用, 为探究坛紫菜色素突变体的形成机制提供了理论依据。

## [ 参 考 文 献 ]

- [1] 农业农村部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2018.
- [2] 赖平玉. 紫菜养殖存在的主要问题及对策 [J]. 中国水产, 2006(10): 46-48.
- [3] YAN X H, WANG S J. The effect of colchicine on the growth and development of the somatic cells from *P. haitanensis* [J]. Marine Sci, 1990, 1: 28.
- [4] 严兴洪. 紫外线辐射与条斑紫菜原生质体后代发育和变异 [J]. 上海水产大学学报, 1992, 1(1/2): 71.
- [5] 有贺祐胜, 于廷林. 条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis*) 的颜色和色素 [J]. 国外水产, 1982(4): 8-13.
- [6] 徐燕. 坛紫菜诱变与杂交育种初步研究 [D]. 厦门: 集美大学, 2007.
- [7] 梁艳. 坛紫菜新品系纯系主要经济性状的研究及 DNA 序列分析 [D]. 厦门: 集美大学, 2009.
- [8] 黄惠珍. 坛紫菜色素突变体超微结构及色素基因表达的比较研究 [D]. 厦门: 集美大学, 2012.
- [9] ARUGA Y. Color and the pigments of *Porphyra yezoensis* [J]. Our Nori Res, 1980, 34: 8-13.
- [10] ARUGA Y. *In vivo* absorption spectra and pigment contents of the two types of color mutants of *Porphyra* [J]. Japanese Journal of Phycology, 1984, 32 (3): 243-250.
- [11] NAGATA N, TANAKA R, SATOH S, et al. Identification of a vinyl reductase gene for chlorophyll synthesis in *Arabidopsis thaliana* and implications for the evolution of prochlorococcus species [J]. The Plant Cell, 2005, 17(1): 233-240.
- [12] CZARNECKI O, GRIMM B. Post-translational control of tetrapyrrole biosynthesis in plants, algae, and cyanobacteria [J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(4): 1675-1687.
- [13] WETTSTEIN D V. Plant Molecular Biology 2: Chlorophyll biosynthesis [M]. New York: Springer US, 1991.

- [14] HOTTA Y, TANAKA T, TAKAOKA H, et al. New physiological effects of 5-aminolevulinic acid in plants: the increase of photosynthesis, chlorophyll content, and plant growth [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1997, 61(12): 2025-2028.
- [15] TANAKA Y, TANAKA A, TSUJI H. Effects of 5-aminolevulinic acid on the accumulation of chlorophyll *b* and apoproteins of the light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein complex of photosystem II [J]. *Plant & Cell Physiology*, 1993, 34(3): 465-472.
- [16] GOUGH S P, KANNANGARA C G. Biosynthesis of  $\delta$ -aminolevulinate in greening barley leaves III: the formation of  $\delta$ -aminolevulinate integrin mutants of barley [J]. *Carlsberg Research Communications*, 1979, 44(6): 403-416.
- [17] 姚嘉龙, 郭蓓, 谢皓. 叶绿素合成关键酶基因表达的半定量 RT-PCR 分析 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2015, 34(3): 593-598.
- [18] TERRY M J, KENDRICK R E. Feedback inhibition of chlorophyll synthesis in the phytochrome chromophore-deficient aurea and yellow-green-2 mutants of tomato [J]. *Plant Physiology*, 1999, 119(1): 143-152.
- [19] 王广策, 邓田, 曾呈奎. 藻胆蛋白的研究概况 (I): 藻胆蛋白的种类与组成 [J]. *海洋科学*, 2000, 24(2): 22-24.
- [20] JAYARAMAN V, HWANGBO K, LIM J M, et al. Reduced gene expression at the branch point of chlorophyll and heme biosynthesis in Arctic *Chlorella* ArM0029B [J]. *Plant Biotechnology Reports*, 2017, 11(1): 9-15.
- [21] 张海波, 侯和胜. 紫菜色素突变体研究进展 [J]. *生物技术通讯*, 2007, 18(2): 353-356.
- [22] 高洪峰, 曹文达, 纪明候. 坛紫菜中藻胆蛋白的性质和化学组成研究 [J]. *海洋与湖沼*, 1993, 24(4): 351-355.
- [23] JENSEN A. Chlorophylls and carotenoids [M]. London: Cambridge University Press, 1978: 59-70.
- [24] 张倩, 丁洪昌, 严兴洪, 等. 皱紫菜 (*Pyropia crispata*) 色素突变体的分离与特性分析 [J]. *上海海洋大学学报*, 2019, 28(4): 526-532.
- [25] 李爽. 谷氨酰 t-RNA 还原酶基因 (*hemA*) 的高效表达及其对 5-ALA 合成的影响 [D]. 榆林: 西北农林科技大学, 2007.
- [26] 陈卫民, 张书, 费保进, 等. 不同光照下盐生杜氏藻光捕获蛋白基因 *lhcb* 和叶绿素 *a* 合成酶基因 *cao* 的表达变化 [J]. *应用与环境生物学报*, 2010, 16(1): 18-22.
- [27] 马春雷, 姚明哲, 王新超, 等. 茶树叶绿素合成相关基因克隆及在白叶 1 号不同白化阶段的表达分析 [J]. *作物学报*, 2015, 41(2): 240-250.
- [28] ZHU L, YANG Z, ZENG X, et al. Heme oxygenase 1 defects lead to reduced chlorophyll in *Brassica napus* [J]. *Plant Molecular Biology*, 2017, 93(6): 579-592.
- [29] 牟钰. 白菜黄化突变基因 *py2* 的精细定位 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2018.
- [30] EMBORG T J, WALKER J M, NOH B, et al. Multiple heme oxygenase family members contribute to the biosynthesis of the phytochrome chromophore in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2006, 140(3): 856-868.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 黄力行)