

# 不同激素配伍对雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)细胞生长和虾青素累积的调节作用、藻株差异及应用\*

韩春梅<sup>1, 2, 3</sup> 刘建国<sup>1, 2</sup> 张勇<sup>2</sup>

(1. 中国科学院海洋研究所 青岛 266071; 2. 云南爱尔发生物技术有限公司 楚雄 675000;  
3. 大连工业大学 大连 116034)

**提要** 利用生长素(NAA、3-IBA)和细胞分裂素(6-BA、kt)两类植物激素,对比研究了其不同配伍对 4 株雨生红球藻 H<sub>0</sub>、H<sub>2</sub>、H<sub>3</sub> 和 H<sub>4</sub> 细胞生长以及虾青素累积的调节作用。结果表明,尽管在不同株系之间存在一定的差异,但激素明显促进该藻细胞生长和虾青素累积,而对细胞大小没有产生明显影响。激素对红球藻细胞数量的增加主要是靠加快游动细胞阶段无性繁殖过程来实现的;而激素对虾青素含量的提高却是通过增加细胞数量和细胞内虾青素积累的协同作用结果,其中以细胞数量的增加为主。在激素单因素实验中,3-IBA 对 H<sub>0</sub> 细胞生长增加效果最好,对 H<sub>2</sub>、H<sub>3</sub> 细胞生长增加效果较好的是 kt,对 H<sub>4</sub> 细胞生长增加效果最明显的是 NAA。与空白对照组相比,上述激素处理后细胞生长速度分别提高了 1.95、1.54、4.25 和 1.78 倍。经过激素多因素实验,H<sub>0</sub>、H<sub>2</sub>、H<sub>3</sub> 和 H<sub>4</sub> 藻株的细胞生长增加效果分别是空白组的 1.44、2.62、2.52、1.07 倍,而虾青素含量分别为空白组的 1.09、1.61、1.37、2.35 倍。根据 4 株藻株的实验结果以及综合考虑各激素的市场价格,建议在规模化生产中,采用 1.75mg/L NAA 和 4mg/L 3-IBA 以提高红球藻的培养效果。

**关键词** 雨生红球藻, 虾青素, 细胞分裂素, 生长素

**中图分类号** Q946

虾青素具有极高的抗氧化性,其还原能力是类胡萝卜素的 10 倍、维生素 E 的 100—550 倍(Miki, 1991),在医药、保健、化妆品、食品以及饲料添加剂等方面都有广泛的应用前景,市场供不应求(Domínguez-Bocanegra *et al*, 2007)。在生产虾青素的众多来源中,雨生红球藻能积累干重 1%—5%的虾青素,而被誉为天然虾青素的浓缩品,是生产虾青素的最好自然来源(刘伟等, 2006; He *et al*, 2007)。

规模化培养雨生红球藻的关键问题是调节红球藻的细胞周期,实现细胞快速生长繁殖和大量累积虾青素。刘建国等(2000)报道了该藻细胞周期,可简

单地将复杂的细胞周期划分为游动和不动细胞阶段;游动细胞阶段细胞主要以无性生殖,产生 2、4、8 个游动孢子的繁殖方式实现细胞增值,同时部分细胞营养繁殖纵列产生 2 个子细胞进行细胞增值。研究发现,游动细胞分裂过程中,随着细胞浓度增加和培养时间的延长,细胞不断向外释放抑制自身细胞生长的信号物质。该抑制性信号物质主要抑制游动细胞的细胞质分裂,而对其 DNA 复制过程的影响不明显(孙艳妮等, 2001)。如果能够寻找到适宜的方法减少或克服上述细胞抑制现象,无疑对雨生红球藻规模化培养开发虾青素资源具有积极促进作用。

\* 国家自然科学基金项目,30771638 号;中国科学院海洋研究所与云南爱尔发生物技术有限公司联合赞助,2007—2014。韩春梅, E-mail: hcmchunmei@163.com

通讯作者: 刘建国, 研究员, E-mail: jgliu@ms.qdio.ac.cn

收稿日期: 2008-04-25, 收修改稿日期: 2008-06-10

众所周知, 植物生长素具有促进高等植物细胞伸长、生长作用(Zhao *et al.*, 2008), 而细胞分裂素能促进细胞分裂和分化, 延迟细胞衰老等作用(Ondrej *et al.*, 2008)。早在 1940 年就从巨藻和刺酸藻等很多海藻中检测到 IAA 的存在, 并且外源植物生长素可促进微藻类植物生长发育(牟晓真等, 2000)。在微藻方面, 1.0mg/L 的 IAA 可以促进小球藻细胞伸长(Roborgh *et al.*, 1948), 使细胞大小增加 3 倍(Algeus, 1946)。植物激素在雨生红球藻方面的报道很少, 孟春晓等(2007)报道抑制细胞生长的脱落酸(ABA)可以促进虾青素累积。但是至今尚未见促进生长类的激素如生长素和细胞分裂素对红球藻生长的研究, 更没有这两类激素合理搭配调节红球藻的细胞生长和虾青素累积等生理过程的研究工作。本文中选用了 NAA、3-IBA、6-BA 和 kt 四种植物激素和 4 株雨生红球藻株系进行实验, 以期寻找具有广谱性的激素配伍, 促进细胞生长和虾青素积累, 进而应用到规模化生产中。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验藻种和所用激素

雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)藻株共 4 株, 分别编号为 H<sub>0</sub>、H<sub>2</sub>、H<sub>3</sub>、H<sub>4</sub>, 全部来自中国科学院海洋研究所藻类与藻类生物技术实验室。

生长素: 萘乙酸(NAA)、3-吲哚丁酸(3-IBA), 分别购自天津科密欧化学试剂有限公司和 sigma 公司。细胞分裂素: 6-苄氨基嘌呤(6-BA)、6-糠氨基嘌呤(kt), 都购自 sigma 公司。

### 1.2 培养基和激素母液的配制

培养基为 MCM 的修正配方(张京浦等, 1994)。100mg/L 生长素母液的配制, 称取 10mg NAA(或 3-IBA), 加入数滴 95%的酒精, 充分溶解, 然后再加入蒸馏水定容至 100ml。100mg/L 细胞分裂素母液的配制, 称取 10mg 6-BA(或 kt), 加入数滴 1mol/L 的盐酸, 充分溶解, 然后再加入蒸馏水定容至 100ml。

### 1.3 培养方法

利用 RXZ 智能型人工气候箱(宁波江南仪器厂)培养雨生红球藻藻株, 培养温度为(24±1)℃, 光照强度为 100μE/(m<sup>2</sup>·s), 光暗周期为 12h: 12h, 一周后, 将雨生红球藻放在靠窗口位置积累虾青素, 光照为室内漫散光, 光照时间为(12±0.5)h, 最大光照强度为 800μE/(m<sup>2</sup>·s)。5L 的三角烧瓶培养过程中通入含 0.55%二氧化碳的空气, 通气量为 2.50L/min。

### 1.4 细胞数量和细胞大小的计算

在培养期间定时取样, 用血球计数板显微计数。每一处理有 2 个以上重复, 每个重复细胞显微计数 20 次, 以平均值±SD 表示。细胞大小利用测微尺测定, 每个样本测定 20 次, 取其平均值±SD 表示。

### 1.5 虾青素含量的测定

取一定藻液至离心管中, 离心, 弃上清液, 并加入 100%的丙酮研磨, 然后离心。将上层色素溶液转移到容量瓶中, 藻渣按上述方法重新萃取, 直到藻体呈白色为止, 将色素溶液定容。采用 722S 型分光光度计和 1cm 光径的比色杯, 分别测定 480、645、663nm 波长下色素提取液的光吸收值(OD 值)。依据 Lichtenthaler(1976)和 Davies(1976)的方法计算虾青素含量, 具体公式如下:

$$\text{虾青素含量(mg/L)} = 4.6 \times (OD_{480} - 0.638 \times OD_{645} + 0.114 \times OD_{663}) \times \text{稀释倍数}$$

### 1.6 实验设计

单因素实验: 每一种激素设定七个处理浓度, 分别为 0、1.75 × 10<sup>-4</sup>、1.75 × 10<sup>-3</sup>、1.75 × 10<sup>-2</sup>、0.175、1.75、3mg/L, 简称为 A、B、C、D、E、F、G。

均匀设计实验: 在单因素实验基础上, 采用 U\*(6<sup>4</sup>)表进行优化, 四个因素分别为 NAA、3-IBA、6-BA、kt; 六水平为 0、1.75 × 10<sup>-2</sup>、0.175、1.75、3、4mg/L, 具体配比见表 1 上半部分。

正交设计实验: 根据均匀实验结果, 选用正交表 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)再次优化(表 2)。四个因素分别为 NAA、3-IBA、6-BA、kt。对于 H<sub>0</sub>、H<sub>4</sub>, 三水平为 NAA: 1.75、1.75 × 10<sup>-2</sup>、4mg/L; 6-BA: 0、1.75、3mg/L; 3-IBA: 3、4、1.75mg/L; kt: 0.175、3、0mg/L。对于 H<sub>2</sub>, 三水平为 NAA: 1.75、0.9、1.75 × 10<sup>-2</sup> mg/L; 6-BA: 0、0、0mg/L; 3-IBA: 3、3.5、4mg/L; kt: 0.175、0.1、0mg/L。对于 H<sub>3</sub>, 三水平为 NAA: 1.75、2.4、3mg/L; 6-BA: 0、0.1、0.175mg/L; 3-IBA: 3、1.5、0mg/L; kt: 0.175、0.1、1.75 × 10<sup>-2</sup>mg/L。另外, 根据正交分析结果, 又对 H<sub>3</sub> 进行了再次优化, 其浓度为: NAA 3mg/L、6-BA 0.1mg/L、3-IBA 1.5mg/L、kt 1.75 × 10<sup>-2</sup>mg/L。

## 2 结果与讨论

### 2.1 激素单独使用对雨生红球藻细胞生长的影响

4 株雨生红球藻在不同浓度 4 种激素中的生长速率如表 3 所示。结果表明, 4 种激素对 4 株红球藻的细胞生长均产生不同程度的促进作用, 但具体浓度随株系不同而存在一定的差异。其中对 4 个不同藻株

表 1 均匀设计激素配伍及对 4 株雨生红球藻细胞生长的影响(浓度单位: mg/L)  
Tab.1 Hormone uniform design and their impacts on cell growth in four stains of *H. pluvialis*

编号	实验设计			
	NAA	6-BA	3-IBA	kt
1	0.000	$1.75 \times 10^{-2}$	0.175	4.000
2	$1.75 \times 10^{-2}$	1.750	4.000	3.000
3	0.175	4.000	$1.75 \times 10^{-2}$	1.750
4	1.750	0.000	3.000	0.175
5	3.000	0.175	0.000	$1.75 \times 10^{-2}$
6	4.000	3.000	1.750	0.000

  

藻株	培养时间(d)	比生长速率						适宜配比
		1	2	3	4	5	6	
H <sub>0</sub>	5	0.24	0.37	—	0.36	0.34	0.41	2、4、6号
H <sub>2</sub>	5	0.25	0.32	0.13	0.35	0.29	0.35	2、4、6号
H <sub>3</sub>	6	0.09	—	0.04	0.25	0.23	0.11	4、5号
H <sub>4</sub>	5	0.21	0.33	—	0.35	0.31	0.33	2、4、6号

注：表中“—”处为负增长

表 2 正交设计实验表  
Tab.2 The orthogonal experimental design

编号	NAA	6-BA	3-IBA	kt
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3
5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1

的细胞生长有明显促进作用的激素、浓度和效果分别如下：各激素浓度处理都促进 H<sub>0</sub> 藻株生长的激素为 3-IBA，其中在  $1.75 \times 10^{-4}$  mg/L 时效果最佳，可使 H<sub>0</sub> 增效 1.95 倍；H<sub>2</sub> 藻株细胞生长对激素反应不很一致，但是其中  $1.75 \times 10^{-2}$  mg/L 的 6-BA 或  $1.75 \times 10^{-2}$  mg/L 的 kt 可分别使 H<sub>2</sub> 增效 1.38、1.54 倍；H<sub>3</sub> 藻株的细胞生长对激素 NAA、3-IBA 和 kt 的反应比较明显，增加效果也较普遍一致，在 3mg/L 的 NAA、3mg/L 的 3-IBA 和 1.75mg/L kt 处理浓度条件下激素的促进效果最为明显，可分别使 H<sub>3</sub> 细胞分裂速率增效 3.38、1.60、4.25 倍；就 H<sub>4</sub> 而言，在最适宜激素浓度下，NAA  $1.75 \times 10^{-2}$  mg/L、3-IBA 0.175mg/L 或 kt  $1.75 \times 10^{-4}$  mg/L 分别使 H<sub>4</sub> 增效 1.78、1.32、1.20 倍。综上所述，不同激素对红球藻细胞生长有明显促进作用的藻株

数量存在差异，其中 NAA 可使 2 株红球藻细胞生长加快，3-IBA 对 3 株藻细胞生长具有促进作用；kt 诱导 3 株藻细胞生长加快；而 6-BA 只对 1 株产生促进作用。因此，如果单独使用一种激素，生长素类优先选择 3-IBA，其浓度为  $1.75 \times 10^{-4}$ —3mg/L；细胞分裂素类首选 kt，其浓度为  $1.75 \times 10^{-4}$ —1.75mg/L。

对同一藻株而言，对比生长素和细胞分裂素这两类激素的处理效果，可以发现生长素的最佳浓度都大于或等于细胞分裂素的浓度，说明藻株细胞生长对生长素不是很敏感，而对细胞分裂素更敏感，当细胞分裂素浓度较高(在 1.75—3mg/L)时，对细胞生长不仅没有促进作用，相反还会严重阻碍 H<sub>0</sub>、H<sub>2</sub>、H<sub>4</sub> 细胞生长，甚至出现负增长。在植物激素中促进生长的激素主要有生长素、细胞分裂素等，若是二者交互使用，如果浓度适宜是否对细胞生长的协同增效作用？为回答该问题，作者进一步研究了生长素和细胞分裂素配伍对红球藻细胞生长的影响。

## 2.2 激素配伍使用对雨生红球藻细胞生长和虾青素累积的影响

在均匀设计实验中，各激素配比组对 4 株藻株的细胞比生长速率结果归纳如表 1 下半部分所示。结果表明，4 号处理(即 NAA 1.75mg/L、3-IBA 3mg/L、kt 0.175mg/L)对 4 株藻株的生长都有明显的促进作用；除 H<sub>0</sub> 藻株的 6 号处理比生长速率高于 4 号外，其余的株系比生长速率最高的都是 4 号；尽管不同藻株之间存有一定程度的差异，4 号处理条件下 H<sub>0</sub>、H<sub>2</sub>、H<sub>3</sub>

表 3 不同激素和浓度组合对 4 株雨生红球藻细胞生长的影响  
Tab.3 Effect of different hormone combinations on cell growth in four strains of *H. pluvialis*

藻株	使用激素	培养时间(d)	比生长速率							最佳浓度(mg/L)	最佳增效倍数
			A*	B*	C*	D*	E*	F*	G*		
H <sub>0</sub>	NAA	4	0.42	0.29	0.35	0.43	0.45	0.31	0.34	0.175	1.07
	3-IBA	5	0.19	0.37	0.31	0.24	0.25	0.24	0.36	$1.75 \times 10^{-4}$	1.95
	6-BA	9	0.21	0.18	0.22	0.17	0.20	0.19	—	$1.75 \times 10^{-3}$	1.05
	kt	5	0.37	0.36	0.39	0.35	0.30	—	—	$1.75 \times 10^{-3}$	1.05
H <sub>2</sub>	NAA	5	0.22	0.04	0.14	0.02	0.24	0.20	0.23	0.175	1.09
	3-IBA	5	0.22	0.21	0.22	0.20	0.22	0.15	0.24	3.000	1.09
	6-BA	8	0.13	0.16	0.06	0.18	0.16	—	—	$1.75 \times 10^{-2}$	1.38
	kt	8	0.13	0.07	0.15	0.20	0.19	0.12		$1.75 \times 10^{-2}$	1.54
H <sub>3</sub>	NAA	5	0.08	0.18	0.20	0.26	0.22	0.20	0.27	3.000	3.38
	3-IBA	7	0.15	0.14	0.09	0.17	0.19	0.22	0.24	3.000	1.60
	6-BA	9	0.36	0.28	0.28	0.31	0.35	0.36	0.39	3.000	1.08
	kt	5	0.04	0.05	0.04	0.03	-0.01	0.17	0.11	1.750	4.25
H <sub>4</sub>	NAA	7	0.13	0.15	0.13	0.24	0.11	0.14	0.16	$1.75 \times 10^{-2}$	1.78
	3-IBA	4	0.34	0.27	0.42	0.38	0.45	0.42	0.39	0.175	1.32
	6-BA	4	0.44	0.21	0.49	0.50	0.22	—	—	$1.75 \times 10^{-2}$	1.14
	kt	8	0.10	0.12	0.09	0.09	0.08	—	—	$1.75 \times 10^{-4}$	1.20

\* 表中编号参照 1.6 实验设计, 其中“—”处为负增长

和 H<sub>4</sub> 比生长速率分别为 0.36、0.35、0.25、0.35, 上述结果均较对照组高。相反, 3 号处理(即 NAA 0.175mg/L、6-BA 4mg/L 3-IBA  $1.75 \times 10^{-2}$  mg/L、kt 1.75mg/L)对藻株促进作用不明显, 甚至有抑制现象, 明显是劣势处理组合。1、2、4、5、6 号处理对红球藻细胞生长有明显促进作用的藻株数量分别为: 1 号处理, 3 株; 2 号处理, 3 株; 4 号处理, 4 株; 5 号处理, 3 株; 6 号处理, 3 株。所以, 1、2、4、5、6 号处理均能促进细胞生长, 鉴于该结果和正交实验只有三水平, 所以, H<sub>0</sub>、H<sub>2</sub>、H<sub>4</sub> 选择 2、4、6 号处理的激素配比时培养效果较理想, 而 H<sub>3</sub> 选择 4、5 号处理的激素配比时培养效果较好。为获得更好的培养效果, 作者在此基础上进一步利用正交设计实验再次优化, 结果如表 4 所示。

从在正交设计实验各配比组对 4 株藻株的各生长指标可以看出, 就细胞浓度而言, 不同藻株细胞生长对激素适应能力存在差别, 最适宜的激素配伍也不同, 4 株藻株的适宜配比分别为: H<sub>0</sub> 藻株, NAA 1.75mg/L、3-IBA 3mg/L、kt 0.175mg/L; H<sub>2</sub> 藻株, NAA 1.75mg/L、3-IBA 4mg/L; H<sub>3</sub> 藻株, NAA 3mg/L、6-BA 0.1mg/L、3-IBA 3mg/L、kt  $1.75 \times 10^{-2}$  mg/L; H<sub>4</sub> 藻株, NAA  $1.75 \times 10^{-2}$  mg/L、3-IBA 4mg/L。尽管在最适宜

的激素配伍条件下可以明显促进细胞的生长和虾青素的累积, 但是对细胞大小影响作用不明显, 细胞大小在 22.8—28.4 $\mu$ m 波动(表 4)。由此可以推测, 上述激素对细胞数量的增加并不以减小细胞大小为代价。从比生长速率和 OD 值(750nm)可以看出, 合适的激素配比可以明显促进藻株 H<sub>0</sub>、H<sub>3</sub>、H<sub>2</sub> 细胞生长, 且对上述株系促进作用依次加强。虾青素含量和细胞内虾青素含量表明, 适宜的激素配比明显增加了藻株 H<sub>3</sub>、H<sub>2</sub>、H<sub>4</sub> 虾青素累积, 其促进作用在上述株系中呈现依次加强的趋势。

另外, 以 H<sub>3</sub> 为例进一步对虾青素累积进行了极差分析, 实验结果(表 5)表明, 8 号处理即 NAA(3)6-BA(2)3-IBA(1)kt(3)效果最优, 且随着 NAA 和 3-IBA 的含量增加, 虾青素含量也增加; 而随着 6-BA 和 kt 浓度的增大, 虾青素含量先增大再减小。因此, NAA(3)6-BA(2)3-IBA(2)kt(3)更有利于促进虾青素的积累。通过反复正交优化, 8 号处理对红球藻 H<sub>3</sub> 藻株的细胞生长和虾青素积累都有明显提高, 为最明显的优势组。建议生产过程中培养红球藻 H<sub>3</sub> 株系时采用该处理, 即 NAA(3)6-BA(2)3-IBA(1)kt(3), 以增加培养效果。

尽管适宜不同藻株生长所需的激素配比存在一

表4 不同激素配伍对4株雨生红球藻细胞生长和虾青素累积的影响

Tab.4 Impacts of different hormone combinations on cell growth and astaxanthin accumulation in four strains of *H. pluvialis*

藻株	生长指标	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8*	9*	对照组	适宜配比	增效倍数
H <sub>0</sub>	初始细胞浓度	1.7±1.0	1.6±1.0	1.8±1.4	1.7±1.1	2.3±2.1	2.0±1.3	2.6±1.7	2.7±1.8	2.3±1.4	2.2±2.0	1	
	最终细胞浓度	18.1±4.9	0.3±0.4	10.2±2.7	16.0±4.5	11.4±3.9	0.6±0.7	0.3±0.9	19.0±5.6	15.2±3.0	14.5±4.4		
	比生长速率	0.52	—	0.43	0.45	0.43	—	—	0.42	0.38	0.36		1.44
	吸光度(750nm)	0.13	0.04	0.07	0.13	0.09	0.05	0.04	0.164	0.209	0.098		1.33
	细胞大小(μm)	26.7±4.1	23.3±3.6	25.7±3.6	25.8±3.7	25.8±4.8	24.1±3.8	23.0±6.1	25.7±3.5	24.8±3.7	24.2±3.9		
	虾青素含量(mg/L)	8.10	—	6.97	—	7.40	—	—	6.04	9.89	7.50		1.08
	细胞内虾青素含量	0.76	—	1.11	—	0.86	—	—	2.52	1.11	1.10		
H <sub>2</sub>	初始细胞浓度	3.7±1.5	3.7±1.9	3.9±1.9	3.7±1.9	3.7±1.8	3.8±2.7	2.9±1.8	3.6±1.8	3.6±2.0	5.1±3.2	3	
	最终细胞浓度	9.8±3.2	15.3±3.1	26.3±5.3	17.6±3.7	10.5±3.6	13.4±3.5	13.1±3.3	15.7±5.0	12.7±4.0	10.6±3.0		
	比生长速率	0.16	0.20	0.32	0.26	0.17	0.21	0.25	0.25	0.21	0.12		2.67
	吸光度(750nm)	0.20	0.28	0.39	0.30	0.20	0.27	0.20	0.26	0.28	0.20		1.95
	细胞大小(μm)	26.9±4.1	24.0±4.5	24.1±3.5	25.8±4.5	24.3±4.7	27.9±6.6	26.6±4.8	25.5±4.7	25.3±4.2	23.9±3.8		
	虾青素含量(mg/L)	4.00	5.53	5.85	—	4.20	3.43	3.40	3.71	3.68	3.60		1.63
	细胞内虾青素含量	1.21	0.86	0.86	—	0.45	0.39	0.47	0.44	0.69	0.28		3.07
H <sub>3</sub>	初始细胞浓度	3.7±1.8	4.2±2.1	3.9±2.0	4.4±2.6	5.3±2.9	4.3±2.1	4.5±1.8	2.3±1.7	4.0±1.9	4.1±1.7	8	
	最终细胞浓度	14.9±6.1	18.6±9.7	15.5±7.2	15.5±4.4	21.1±9.3	14.3±3.8	19.5±5.1	17.3±5.2	16.7±4.2	9.7±3.6		
	比生长速率	0.32	0.30	0.34	0.26	0.29	0.36	0.32	0.50	0.29	0.20		2.50
	吸光度(750nm)	0.20	0.17	0.19	0.20	0.20	0.18	0.20	0.21	0.15	0.10		2.10
	细胞大小(μm)	31.9±5.8	27.5±5.3	21.0±4.3	26.3±4.7	24.9±5.8	27.3±6.6	25.1±5.3	27.8±5.5	27.2±4.9	22.8±3.8		
	虾青素含量(mg/L)	9.70	12.2	10.2	9.90	11.0	13.7	9.90	14.5	13.5	11.0		1.32
	细胞内虾青素含量	0.56	1.34	0.92	0.45	0.68	1.13	0.76	0.86	1.09	0.68		1.26
H <sub>4</sub>	初始细胞浓度	3.4±2.6	3.0±2.1	2.8±1.3	2.5±1.8	2.9±1.7	3.7±2.0	3.0±1.9	1.5±1.6	3.3±1.9	2.4±1.9	4	
	最终细胞浓度	16.1±3.7	2.4±1.7	1.8±1.2	13.8±4.2	9.5±3.3	1.8±1.6	2.6±1.7	10.9±3.8	1.8±1.2	12.0±3.3		
	比生长速率	0.39	—	—	0.48	0.33	—	—	0.51	—	0.45		1.07
	吸光度(750nm)	0.33	0.04	0.05	0.31	0.18	0.04	0.04	0.26	0.05	0.27		1.15
	细胞大小(μm)	26.2±4.8	23.1±4.1	27.1±4.8	28.4±5.4	28.9±4.1	23.4±3.8	25.6±4.6	27.4±3.9	28.3±3.5	28.4±4.5		
	虾青素含量(mg/L)	9.50	—	—	13.0	12.0	—	—	8.91	—	5.50		2.36
	细胞内虾青素含量	2.33	—	—	1.94	0.89	—	—	2.97	—	0.67		2.90

\* 表示编号参照 1.6 实验设计和表 2, 其中“—”为负增长。细胞浓度单位为万/ml, 细胞内虾青素含量单位为  $\times 10^{-10}$ g/cell

表 5 H<sub>3</sub> 虾青素含量的极差分析结果(单位: mg/L)  
Tab.5 The range analysis result of astaxanthin content in *H. pluvialis* Stain 3

试验组	NAA	6-BA	3-IBA	kt	虾青素含量
1	1.75	0.00	3.00	0.175	9.74
2	1.75	0.10	1.50	0.10	12.17
3	1.75	0.175	0.00	$1.75 \times 10^{-2}$	10.19
4	2.40	0.00	1.50	$1.75 \times 10^{-2}$	9.94
5	2.40	0.10	0.00	0.175	11.36
6	2.40	0.175	3.00	0.10	13.66
7	3.00	0.00	0.00	0.10	9.87
8	3.00	0.10	3.00	$1.75 \times 10^{-2}$	14.48
9	3.00	0.175	1.50	0.175	13.47
	32.10	29.55	37.88	34.57	
	34.96	38.01	35.58	35.70	
	37.82	37.32	31.42	34.61	
K <sub>1</sub>	10.70	9.85	12.63	11.52	
K <sub>2</sub>	11.65	12.67	11.86	11.90	
K <sub>3</sub>	12.61	12.44	10.47	11.54	
R	1.91	2.82	2.16	0.38	

定差异, 如 H<sub>2</sub>、H<sub>4</sub> 需要含有 3-IBA 4mg/L, 而无 6-BA 和 kt; H<sub>0</sub>、H<sub>2</sub> 都需要 NAA 1.75mg/L; H<sub>0</sub>、H<sub>2</sub>、H<sub>4</sub> 均不需要 6-BA; H<sub>0</sub>、H<sub>3</sub> 都需要 3-IBA 3mg/L 等。但不同藻株之间也表现出一定程度的共同特征, 如: 激素对 H<sub>2</sub>、H<sub>4</sub> 细胞生长的促进生长作用较接近, 浓度也基本均一致(NAA 用量例外), 另外藻株 H<sub>0</sub> 对激素反应的变化趋势也基本偏同于 H<sub>2</sub>、H<sub>4</sub> 的特性, 同时, 就整体而言, 不同红球藻株系生长对生长素的浓度需求较高, 而细胞分裂素的需求量较低, 甚至完全不需要(如 H<sub>2</sub>、H<sub>4</sub>)。

生长促进剂生长素和细胞分裂素促进高等植物的细胞分裂和伸长, 该过程即不涉及有性细胞, 也不存在无性细胞, 属于典型营养繁殖过程。而生长素和细胞分裂素对雨生红球藻细胞生长的促进作用, 主要作用于该藻细胞周期的游动细胞阶段, 这阶段主要通过无性生殖产生游动孢子方式实现细胞增殖, 显微镜下观察很少见到二分裂方式, 因此不属于营养繁殖范畴; 另外经过显微测量, 细胞大小没有显著变化(表 4), 也未出现高等植物细胞伸长的现象。上述结果意味着激素对雨生红球藻细胞生长的促进完全不同于高等植物细胞的作用机制, 已经超出了传统高等植物生理学知识内容, 这表明生长促进剂不但能促进高等植物营养繁殖, 而且能促进微藻的无性繁殖。

在激素单独使用时, NAA 0.175mg/L 适宜 H<sub>0</sub>、H<sub>2</sub>; 3-IBA 3mg/L 适宜 H<sub>2</sub>、H<sub>3</sub>; 6-BA  $1.75 \times 10^{-2}$  mg/L 适宜 H<sub>2</sub>、H<sub>4</sub> (表 3)。在激素配伍使用时, NAA 1.75mg/L 适宜 H<sub>0</sub>、H<sub>2</sub>; 3-IBA 4mg/L 适宜 H<sub>2</sub>、H<sub>4</sub>; 不加 6-BA 适合 H<sub>0</sub>、H<sub>2</sub>、H<sub>4</sub>; 不加 kt 适合 H<sub>2</sub>、H<sub>4</sub> (表 4)。可以看出 H<sub>2</sub> 藻种更能表现出雨生红球藻所需的激素种类以及浓度, 选择 H<sub>2</sub> 激素配比应用在雨生红球藻的规模化培养中相对也更适宜。另外, 对比激素单独使用和配伍使用对雨生红球藻细胞生长增效(表 3、表 4), 可以看出细胞分裂素对生长的促进作用相对而言不是很明显, 在生产上可以考虑只使用细胞生长素。目前 NAA、3-IBA、6-BA、kt 的市场价格分别为: 2000 元/kg、650 元/kg、8 万元/kg、24 万元/kg, 那么按照 H<sub>0</sub>、H<sub>2</sub>、H<sub>3</sub>、H<sub>4</sub> 最适宜的激素配比(NAA 1.75mg/L、3-IBA 3mg/L 和 kt 0.175mg/L; NAA 1.75mg/L 和 3-IBA 4mg/L; NAA 3mg/L、6-BA 0.1mg/L、3-IBA 3mg/L 和 kt  $1.75 \times 10^{-2}$  mg/L; NAA  $1.75 \times 10^{-2}$  mg/L 和 3-IBA 4mg/L), 配制 1 吨上述培养液所需激素的市场价格分别为: 47.45、6.10、20.15、2.60 元, 从原料市场价格分析, 添加 3-IBA 和 NAA 相对更经济。那么综合实验结果和激素的市场价格, 在雨生红球藻的规模化培养中, 选择如下配比: NAA 1.75mg/L、3-IBA 4mg/L 可以明显的加快细胞的生长和虾青素的累积, 同时也从最大程度上节约了成本, 建议在规模化培养红球藻中使用此激素配比。

### 3 结论

3.1 激素对细胞生长和虾青素积累都有显著的促进作用, 这种作用在不同藻株间存在一定的差异。

3.2 激素促进细胞生长的作用机制不同与高等植物, 主要通过增加无性繁殖方式实现的。而激素对虾青素含量的提高是通过增加细胞内虾青素含量和增加细胞数量来实现的。激素对细胞大小影响不明显。

3.3 在生长素类中, 3-IBA 对雨生红球藻细胞生长的促进作用比 NAA 好; 在细胞分裂素类中, kt 对细胞生长促进效果比 6-BA 好。建议在雨生红球藻的规模化培养应用的激素配物及浓度为 NAA 1.75mg/L、3-IBA 4mg/L。

### 参 考 文 献

- 刘 伟, 刘建国, 林 伟等, 2006. 雨生红球藻规模化培养工艺的构建与应用. 饲料工业, 27(12): 12—17  
刘建国, 殷明焱, 张京浦等, 2000. 雨生红球藻的细胞周期初探. 海洋与湖沼, 31(2): 145—150  
孙艳妮, 殷明焱, 2001. 雨生红球藻的信号物质. 海洋湖沼通

- 报, (3): 22—28
- 牟晓真, 范 晓, 韩丽君, 2000. 藻类中植物生长素的研究. 海洋科学集刊, 42: 65—72
- 张京浦, 刘建国, 1994. 温度对雨生红球藻光合作用的影响. 植物生物学学报, 4(1): 6—10
- 孟春晓, 高政权, 2007. 外源脱落酸(ABA)对雨生红球藻中虾青素积累的影响. 饲料与添加剂, (7): 68—69
- Algeus S, 1946. Untersuchungen uber die Ernahrung physiologie der Chlorophyceen, Botan. Notiser, 129—280
- Chang Duk Kang, Sang Jun Sim, 2007. Selective extraction of free astaxanthin from *Haematococcus* culture using a tandem organic solvent system. Biotechnol Prog, 23: 866—871
- Davies B H, 1976. Carotenoids. In: Goodwin T W ed. Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. Vol.2. London: Academic Press, 38—166
- Domínguez-Bocanegra A R, Ponce-Noyola T, Torres-Muñoz J A, 2007. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* and *Haematococcus pluvialis*: a comparative study. Appl Microbiol Biotechnol, 75: 783—791
- He Ping, James Duncan, James Barber, 2007. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*: effects of cultivation parameters. Journal of Integrative Plant Biology, 49(4): 447—451
- Lichtenthaler H K, 1976. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. In: Packer L, Douce R ed. Methods in Enzymology. Vol.148. San Diego, California: Academic Press, 350—382
- Miki W, 1991. Biochemical functions and activities of animal carotenoids. Pure & Appl Chem, 63: 141—148
- Ondrej Novák, Eva Hauserová, Petra Amaková *et al*, 2008. Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. Phytochemistry, 69(11): 2214—2224
- Roborgh J R, Thomas J B, 1948. The synthesis of growth substances. I. The action of heteroauxin on the growth of *Chlorolla vulgaris* and the influence of light on the production of growth substances. Koninkl Ned Akad Wetenschap Proc, B51: 87—99
- Zhao Yunde, 2008. The role of local biosynthesis of auxin and cytokinin in plant development. Plant Biology, 11: 16—22

## CELL GROWTH AND ASTAXANTHIN ACCUMULATION OF FOUR STRAINS OF *HAEMATOCCUS PLUVIALIS* EXPOSED TO DIFFERENT PLANT REGULATORS

HAN Chun-Mei<sup>1, 2, 3</sup>, LIU Jian-Guo<sup>1, 2</sup>, ZHANG Yong<sup>2</sup>

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071; 2. Yunnan Alphy Biotech Co. Ltd, Chuxiong, 675000; 3 Dalian Polytechnic University, Dalian, 116034)

**Abstract** The regulatory effect of different combinations of plant regulators [auxin (NAA, 3-IBA) and cytokinin (6-BA, kt)] on cell growth and astaxanthin accumulation in four strains of *Haematococcus pluvialis* were compared in an orthogonal experimental design. The results show that using phytohormones at a proper concentration can significantly increase cell growth and astaxanthin accumulation. The increase in cell number is realized by accelerating the asexual propagation in the motile cell stage, while that in astaxanthin accumulation depends on mainly cell growth rate and partly on high astaxanthin content in cell. In a single-factor experiment, among plant regulators, 3-IBA is shown the best for H<sub>0</sub> cell growth, kt for promoting cell growth of strains H<sub>2</sub> and H<sub>3</sub>, and NAA for H<sub>4</sub> growth. The cell growth rate increase by 1.54—4.25 times over that of control. In a multiple-factors experiment, the cell numbers is 1.07—2.62 times higher than its control group, so does the astaxanthin accumulation amount for 1.09—2.35 times higher. Considering the current market price of phytohormones, NAA at 1.75mg/L and 3-IBA at 4mg/L are recommended in mass cultivation of *H. pluvialis*.

**Key words** *Haematococcus pluvialis*, Astaxanthin, Cytokinin, Auxin