

茉莉酸甲酯对雨生红球藻虾青素含量和 *dxs* 基因表达的影响

王鑫威, 王丽丽, 龚一富*, 金思, 李林, 陈东瑞

(宁波大学海洋学院, 海洋生物工程重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 雨生红球藻是一种能产生重要次生代谢产物——虾青素的单细胞绿藻, 茉莉酸甲酯 (MeJA) 等诱导因子可促进植物次生代谢产物的积累。以雨生红球藻为研究对象, 研究了不同浓度 MeJA 对雨生红球藻细胞生长、虾青素含量和 *dxs* 基因表达的影响。结果表明, MeJA 在抑制雨生红球藻细胞生长和总虾青素产量的积累的同时, 却能促进雨生红球藻单位细胞虾青素的合成能力。当 MeJA 浓度为 800 $\mu\text{mol/L}$ 时, 单位细胞虾青素合成能力可达 1.75×10^{-9} mg, 相比对照组 (1.42×10^{-9} mg) 增加 23.24%。RT-PCR 分析结果表明, *dxs* 基因的表达受 MeJA 的诱导, 800 $\mu\text{mol/L}$ MeJA 处理条件下, *dxs* 基因的表达水平最高。相关分析结果表明, MeJA 作用下的雨生红球藻虾青素含量和 *dxs* 基因表达量呈正相关, 推断 *dxs* 基因可能是雨生红球藻虾青素合成的一个关键酶基因, 这为进一步通过代谢工程策略提高雨生红球藻虾青素含量提供了一个靶点, 也为虾青素规模化生产和探讨虾青素积累的分子机理提供参考。

关键词: 雨生红球藻; 茉莉酸甲酯; 虾青素; 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶 (DXS)

中图分类号: Q 785; S 917.3

文献标志码: A

雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 是一种单细胞绿藻, 属绿藻门 (Chlorophyta)、团藻目 (Volvocales)、红球藻科 (Haematococcaceae)、红球藻属, 能生产一种红色的天然次生代谢产物——虾青素 (astaxanthin)。虾青素是一种优质、高效、安全的着色剂和天然抗氧化剂, 能提高动物的免疫力和存活率, 增加动物产品的营养价值和色泽外观^[1-2]。虾青素对人体绝对安全, 不仅可以用作水产养殖的饲料添加剂、人的食品添加剂, 在药品、化妆品和高级营养保健品等领域也有着非常大的应用潜力^[3-4]。目前, 虾青素国际市场供货能力有限, 远远不能满足市场需求, 导致其价格昂贵, 仅合成品价格就高达每千克 3 000 美元。因此, 采用各种途径提高雨生红球藻虾青素含量一直是国内外研究的热点。

茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 是高等植物体内的一种新发现的内源生长调节物质, 在植

物次生代谢过程中起诱导信号传导作用, 从而提高植物次生代谢产物的含量^[5]。GONG 等^[6] 和 KANG 等^[7] 研究表明, MeJA 能有效调控银杏 (*Ginkgo biloba*) 细胞中银杏内酯的合成, 提高银杏内酯的含量。余龙江等^[8] 研究也表明, 在红豆杉 (*Taxus mairei*) 胚性细胞培养的第 10、20 天加入 100 $\mu\text{mol/L}$ MeJA, 使紫杉醇产量提高了 140.2% 和 137.7%。朱颖等^[9] 研究也表明, MeJA 能诱导杜氏盐藻 β -胡萝卜素含量。目前, 对雨生红球藻虾青素积累的影响因子主要为光照、缺氮、温度和 pH 等因素^[10-13], 而 MeJA 等诱导因子对雨生红球藻虾青素积累的影响和机理方面的研究尚未见报道。

虾青素属于四萜衍生物, 在细胞质体中合成, 在质体中, 新近研究证实了一条独立于细胞质甲羟戊酸 (MVA) 途径的萜类合成的新途径, 即 2-C-甲基-D-赤藻糖醇-4-磷酸 (MEP) 途径, 植物中单萜、二萜和少数倍半萜都由这条途径合成^[14]。1-

收稿日期: 2010-02-12 修回日期: 2011-10-02

资助项目: 宁波市农业创新创业资金 (2010C91050); 宁波市科技攻关项目 (2010C10051, 2010C10057); 浙江省高校优秀青年教师资助项目; 宁波大学学科项目 (XK10911; XKL121); 2009 年度浙江省大学生新苗人才计划项目

通讯作者: 龚一富, E-mail: gongyifu@163.com

脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶(1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, DXS)是 MEP 途径的第一个酶,也是第一个关键酶^[15]。超量表达 *dxs* 基因可提高单萜化合物、类胡萝卜素、萜类化合物和萜类吲哚生物碱的含量^[16-18]。目前,王丽丽等^[19]从雨生红球藻中克隆了 *dxs* 基因的核心片段,但 MeJA 对雨生红球藻虾青素合成基因 *dxs* 表达的影响还未见报道。

本研究针对雨生红球藻虾青素在应用上的巨大潜力,研究了 MeJA 对雨生红球藻细胞生长和虾青素积累的影响,为雨生红球藻虾青素的规模化生产提供理论基础。同时,研究了 MeJA 胁迫对虾青素合成关键酶基因 *dxs* 表达的影响,为探明雨生红球藻虾青素积累的分子机理研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 藻种和试剂

雨生红球藻由宁波大学海洋生物工程重点实验室微藻室提供,用 BBM(Bold's basal medium)培养基培养。PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit 购自 TaKaRa 公司;总 RNA 提取试剂 BIOZOL Reagent 购自 BioFlux 公司。

1.2 雨生红球藻培养和 MeJA 浓度设置

用 BBM 培养基将雨生红球藻培养至对数生长期,光照强度为 4 000 lx,24 °C,12 h/12 h(光/暗)培养 10 d,离心收集并用去离子水清洗两次,重新悬浮于添加不同质量浓度 MeJA 诱导子的 500 mL BBM 培养基中,置于高光照强度下(12 000 lx, 24 °C,24 h)进行胁迫培养,以诱导细胞合成与虾青素积累。

设置 7 个 MeJA 摩尔浓度水平,分别为 0,50, 100,200,400,800 和 1 600 μmol/L,每个浓度梯度设 3 个重复,每隔 3 天取样一次,测定雨生红球藻细胞密度,每隔 6 天取一次样,测定雨生红球藻虾青素的含量。

1.3 雨生红球藻细胞密度的测定

将雨生红球藻藻液以 10 倍梯度稀释成 5 组不同的藻液。取 10 μL 待测藻液滴入血球计数板计数框内,在光学显微镜下观察,共观察 3 片,取平均数,直接计算出雨生红球藻细胞数量(/mL)。同时以不加藻种的 BBM 培养基为空白调零管,采用分光光度法测定同一个样品的光吸收

值 OD_{680 nm}。根据测定结果以雨生红球藻细胞密度为 X 轴,光吸收值 OD_{680 nm} 为 Y 轴绘制细胞密度-光密度标准曲线,得到回归方程 $y = 0.0434x - 0.0481$ (式中 y 为 OD 值, x 为每毫升藻液的细胞数量,直线方程的相关系数是 0.9811)。

每 3 天从含不同质量浓度 MeJA 的雨生红球藻培养液中定时取出 2 mL 藻液,在 680 nm 处测定其 OD 值,根据上述得出的雨生红球藻细胞密度-光密度回归方程,计算培养液中雨生红球藻的细胞密度。

1.4 虾青素含量的测定

每隔 6 天从含不同质量浓度 MeJA 的雨生红球藻培养液中定时取出 25 mL 藻液进行虾青素含量的测定。藻液于 5 000 r/min 离心 5 min,弃上清液得到藻细胞沉淀。加入 5 mL 5% KOH 和 30% CH₃OH 的混合液于 70 °C 水浴 5 min 破坏叶绿素。5 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,收集藻体用液氮研磨,加入 3 mL 二甲基亚砜,70 °C 水浴 10 min,期间不断摇匀,5 000 r/min 离心 5 min,取上清液。重复抽提藻细胞沉淀 2~3 次直至藻体发白,取上清液于 490 nm 下测定虾青素含量 OD_{490 nm}。单位体积雨生红球藻虾青素含量(C)按下列公式计算^[20]:

$$C(\text{mg/L}) = (4.5 \times A_{490} \times V_a) / V_b$$

式中, A 表示 OD 值, V_a 表示二甲基亚砜的体积, V_b 表示藻液体积。

有关差异的显著性分析参照袁志发等^[21]采用的单因子方差分析法。

1.5 雨生红球藻 *dxs* 基因表达分析

根据已经获得的雨生红球藻 *dxs* 基因的核心序列^[19],设计并合成一对特异性引物,上游引物(FDXS): 5'-AACGAGGTGAAGAGTGCGGAG-AC-3' 和下游引物(RDXS): 5'-CGTCAAAC-ACTCGCTCAGGGTAG-3',PCR 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

用 BIOZOL 法提取不同浓度 MeJA 处理的雨生红球藻 RNA,采用 One Step RT-PCR 方法测定 *dxs* 基因的表达。One Step RT-PCR 中以 β -actin(上游引物 actinF: 5'-GAGCAACTGGGATGATATGG-3',下游引物 actinR: 5'-ATTTCGCTTTCAGCAGTGGT-3')基因作为内标调整 RNA 的用量和循环数,使内标基因在不同浓度诱导下的表达丰度一致。以 MeJA 处理的雨生红球藻

RNA 为模板,以 FDXS 和 RDXS 为上下游引物进行 PCR 扩增检测不同浓度 MeJA 对雨生红球藻 *dxs* 基因表达的影响。

利用 GeneScope 软件将不同质量浓度 MeJA 诱导下雨生红球藻细胞 *dxs* 基因的表达水平转换成相对光密度值,与此诱导条件下的雨生红球藻虾青素含量进行一元线性回归分析(回归方程中 y 为虾青素含量, x 为 *dxs* 基因表达水平),以研究不同质量浓度 MeJA 诱导下雨生红球藻虾青素含量和 *dxs* 基因表达量之间的相关性。

2 结果

2.1 MeJA 对雨生红球藻细胞生长的影响

不同摩尔浓度 MeJA 胁迫对雨生红球藻细胞生长的影响结果见图 1,随着培养时间的延长,雨生红球藻细胞的生长量逐渐增加。无 MeJA 胁迫时,藻细胞生长迅速,细胞密度呈对数增长趋势;当添加一定浓度 MeJA 时,雨生红球藻细胞生长呈现不同的抑制效应,高浓度(1 600 $\mu\text{mol/L}$) MeJA 胁迫时可明显抑制藻细胞的生长。

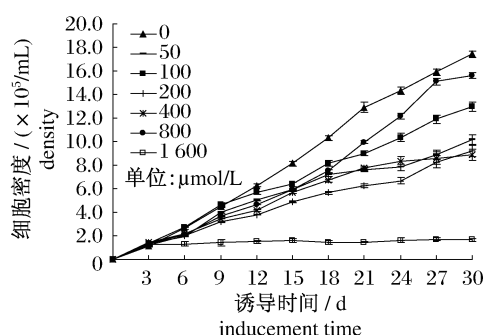


图 1 MeJA 对雨生红球藻细胞生长的影响
Fig. 1 The effect of MeJA on the cell growth of *H. pluvialis*

比较不同浓度 MeJA 胁迫下雨生红球藻在对数生长期(18 d)时的细胞密度(图 2),结果表明,MeJA 抑制雨生红球藻细胞的生长,添加了 MeJA 处理组的藻细胞密度均低于对照组。不添加 MeJA 时,藻细胞密度值最大,为 $1.029 \times 10^6/\text{mL}$ 。而当 MeJA 浓度为 1 600 $\mu\text{mol/L}$ 时,藻细胞密度值为 $1.451 \times 10^5/\text{mL}$ 。

2.2 MeJA 对雨生红球藻总虾青素产量的影响

不同摩尔浓度 MeJA 对雨生红球藻总虾青素产量的影响结果见图 3,随着培养时间的延长,雨生红球藻总虾青素产量呈逐渐增加的趋势。当 MeJA 浓度为 0 ~ 800 $\mu\text{mol/L}$ 时,总虾青素产量呈对数增长

趋势;而当 MeJA 浓度为 1 600 $\mu\text{mol/L}$ 时,总虾青素产量因藻细胞死亡而不能积累虾青素。

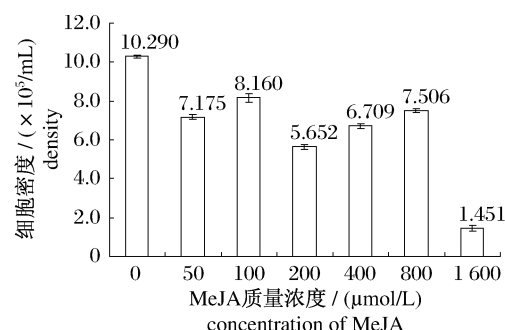


图 2 不同浓度 MeJA 对雨生红球藻细胞生长的影响(18 d)

Fig. 2 The effect of different concentration of MeJA on the cell growth of *H. pluvialis* (18 d)

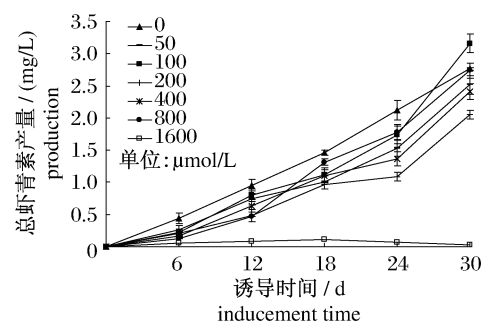


图 3 MeJA 对雨生红球藻总虾青素产量的影响
Fig. 3 The effect of MeJA on the total astaxanthin production of *H. pluvialis*

比较不同浓度 MeJA 胁迫下雨生红球藻在对数生长期(18 d)总虾青素产量的变化,结果表明,添加 MeJA 处理组的总虾青素产量均低于对照组。当 MeJA 浓度为 0 $\mu\text{mol/L}$ 时,总虾青素产量最高,达 1.466 mg/L(图 4)。

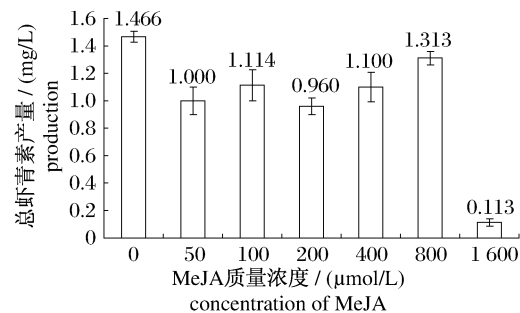


图 4 不同浓度 MeJA 诱导条件下雨生红球藻的总虾青素产量(18 d)

Fig. 4 The inducement of different concentration MeJA on the total astaxanthin production of *H. pluvialis* (18 d)

2.3 MeJA 对雨生红球藻虾青素合成能力的影响

总虾青素产量不能反应单细胞虾青素的合成能力,本研究根据已经测得的雨生红球藻细胞密度和总虾青素产量,计算 MeJA 胁迫下雨生红球藻在对数生长期(18 d)的单位细胞虾青素含量,代表雨生红球藻细胞虾青素生物合成能力。研究结果表明(图 5),随着 MeJA 浓度的增加,雨生红球藻单位细胞虾青素合成能力呈先升高后降低的趋势。当 MeJA 浓度为 800 $\mu\text{mol/L}$ 时,单位细胞虾青素合成能力最强,达 1.75×10^{-9} mg,相比对照组(1.42×10^{-9} mg)增加 23.24%。

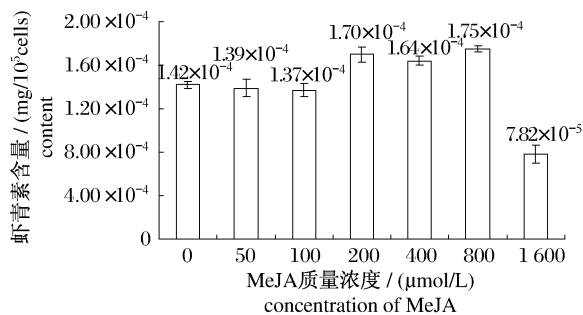


图 5 不同浓度 MeJA 诱导条件下雨生红球藻单位细胞的虾青素含量(18 d)

Fig.5 The inducement of different concentration of MeJA on the unicellular astaxanthin content of *H. pluvialis* (18 d)

2.4 MeJA 诱导下雨生红球藻虾青素含量和 *dxs* 基因表达量的关系

采用 RT-PCR 方法研究不同浓度 MeJA 诱导下雨生红球藻细胞虾青素合成相关基因 *dxs* 的表达水平,结果表明,随着 MeJA 浓度的增加,*dxs* 基因表达呈先增加后降低的趋势,当 MeJA 浓度为 800 $\mu\text{mol/L}$ 时,雨生红球藻 *dxs* 基因的表达水平最强(图 6),这与在该浓度下虾青素合成能力最强的结论一致。

比较不同浓度 MeJA 诱导下的雨生红球藻虾青素含量和 *dxs* 基因表达量之间的相关性,结果表明,当 *dxs* 基因表达水平增强时,雨生红球藻虾青素含量也随之提高,当 *dxs* 基因表达水平减弱时,雨生红球藻虾青素含量也随之降低,两者呈现一定的正相关。对虾青素含量和 *dxs* 基因表达水平进行线性回归分析,结果表明,MeJA 作用下的雨生红球藻虾青素含量和 *dxs* 基因表达量呈线性相关,其回归方程为 $y = 5 \times 10^{-5}x + 9 \times 10^{-5}$ (式

中, y 为虾青素含量, x 为 *dxs* 基因表达水平,直线方程的相关系数是 0.981)。由此可以看出,用 *dxs* 基因表达水平可以反映雨生红球藻的虾青素含量,*dxs* 基因可能是雨生红球藻虾青素合成的一个关键酶基因。

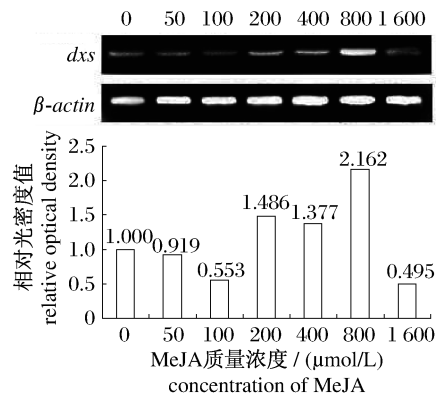


图 6 不同浓度 MeJA 诱导下雨生红球藻细胞 *dxs* 基因的表达水平

Fig.6 The inducement of different concentration MeJA on the *dxs* gene expression level of *H. pluvialis*

3 讨论

MeJA 是植物体内起整体性调控作用的植物生长调节物质,可通过信号转导途径调控植物的生长发育和应激反应^[22-23],而外源 MeJA 胁迫能够在植物的抗逆反应中诱导植物防御基因的表达,促进防御反应化合物次生代谢产物的形成和积累,因此,MeJA 是促进次生代谢产物积累的重要诱导因子。在 MeJA 胁迫过程中,MeJA 可调控植物抗毒素^[24]、生物碱^[6,25-28]、黄酮类物质^[29-31]、酚醛塑料^[32]和萜类^[33]等防御相关化合物的合成。但 MeJA 诱导藻类次生代谢产物积累方面的报道较少,朱颖等^[9]研究表明,MeJA 对盐藻类胡萝卜素含量有极显著的影响,100 $\mu\text{mol/L}$ MeJA 处理盐藻时其 β -胡萝卜素含量最高,200 $\mu\text{mol/L}$ MeJA 处理盐藻时其叶绿素含量最高。本研究结果也表明,一定浓度的 MeJA 能够促进雨生红球藻单位细胞虾青素的合成能力,经 200~800 $\mu\text{mol/L}$ MeJA 处理后,雨生红球藻内的虾青素含量均有不同程度的提高,其中,当 MeJA 浓度为 800 $\mu\text{mol/L}$ 时,单位细胞虾青素含量最高,达 1.75×10^{-9} mg。

MeJA 通过诱导次生代谢产物生物合成相关

基因的表达来促进次生代谢产物的积累。MeJA能调控蛋白酶抑制剂^[34]、防御素和硫堇^[35]等防御基因的表达。长春花多种生物碱合成关键酶基因,如 *g10h*、*str*、*tdc*、*sgd*、*d4h* 等均在转录水平上受 MeJA 的诱导和调控^[36]。GONG 等^[6]研究表明,用 MeJA 处理银杏愈伤组织细胞后,银杏内酯含量与银杏 *dxs* 基因的表达水平成正比,表明由 DXS 催化的酶促反应是银杏内酯生物合成的重要调节步骤,*dxs* 是实现银杏内酯代谢工程的重要候选功能基因。本研究结果表明,MeJA 也可诱导雨生红球藻虾青素生物合成相关基因 *dxs* 的表达水平,且雨生红球藻虾青素含量与 *dxs* 基因表达量成正相关,表明 *dxs* 基因也是雨生红球藻虾青素生物合成途径中的一个关键酶基因。但虾青素的生物合成涉及多个反应步骤,要探明虾青素生物合成的分子机制,需要系统地研究 MeJA 诱导后对多个代谢相关基因表达的影响。

参考文献:

- [1] RICHMOND A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology [M]. Iowa, USA: Blackwell Science Ltd, 2004: 281 - 288.
- [2] SHIBATA A, KIBA Y, ALATI N, *et al.* Molecular characteristics of astaxanthin and beta-carotene in the phospholipids, monolayer and their distributions in the phospholipids bilayer [J]. Chemistry Physics Lipids, 2001(11): 11 - 22.
- [3] 殷明炎, 刘建国, 张京浦, 等. 雨生红球藻和虾青素研究述评 [J]. 海洋湖沼通报, 1998(2): 53 - 62.
- [4] 魏东, 藏晓南. 大规模培养雨生红球藻生产天然虾青素的研究进展和产业化现状 [J]. 中国海洋药物, 2001(5): 4 - 8.
- [5] GUNDLACH H, MULLER M J, KUTCHAN T M, *et al.* Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992, 89: 2389 - 2392.
- [6] GONG Y F, LIAO Z H, CHEN M, *et al.* Molecular cloning and expression profile analysis of *Ginkgo biloba* DXS gene encoding 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway [J]. Planta Medica, 2006(72): 329 - 335.
- [7] KANG S M, MIN J Y, KIM Y D, *et al.* Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of bilobalide and ginkgolides in cell cultures of *Ginkgo biloba* [J]. *In Vitro Cell Development Biology Plant*, 2006, 42(1): 44 - 49.
- [8] 余龙江, 朱敏, 刘幸福, 等. MeJA 对中国红豆杉胚性细胞紫杉醇生物合成的影响 [J]. 武汉植物学研究, 1999, 17(4): 371 - 374.
- [9] 朱颖, 王丽丽, 柴芸彬, 等. 茉莉酸甲酯对杜氏盐藻 β -胡萝卜素含量的影响 [J]. 宁波大学学报: 理工版, 2010, 23(1): 13 - 17.
- [10] 陈兴才, 黄伟光, 欧阳琴. 雨生红球藻的培养及虾青素累积条件的探讨 [J]. 福州大学学报: 自然科学版, 2005, 33(2): 259 - 263.
- [11] 苗凤萍, 李夜光, 耿亚红. 温度对雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 生物量和虾青素产量的影响 [J]. 武汉植物学研究, 2005, 23(1): 73 - 76.
- [12] 蒋霞敏, 柳敏海, 任凯来. 化学因子对雨生红球藻诱变株虾青素积累的调控 [J]. 宁波大学学报: 自然科学版, 2005, 18(3): 306 - 312.
- [13] 董庆霖, 赵学明, 邢向英, 等. 碳和氮代谢被抑制诱导雨生红球藻细胞内虾青素的合 [J]. 化学工程, 2006, 34(12): 46 - 48, 57.
- [14] LIAO Z H, CHEN M, GONG Y F, *et al.* Isoprenoid biosynthesis in plants: pathways, gene, regulation and metabolic engineering [J]. Journal of Biology Science, 2006, 6(1): 209 - 219.
- [15] ROHMER M. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants [J]. Natural Product Reports, 1999, 16: 565 - 574.
- [16] BOUVIER F, D' HARLINGUE A, SUIRE C, *et al.* Dedicated roles of plastid transketolases during the early onset of isoprenoid biosynthesis in pepper fruits [J]. Plant Physiology, 1998, 117(4): 1423 - 1431.
- [17] CHAHED K, OUDIN A, GUIVARC' H N, *et al.* 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase from periwinkle: cDNA identification and induced gene expression in terpenoid indole alkaloid producing cells [J]. Plant Physiology Biochemistry, 2000, 38: 559 - 566.
- [18] LOIS L M, RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN M, GALLEGÓ F, *et al.* Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: Regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase [J]. The Plant Journal, 2000, 22(6): 503 - 513.
- [19] 王丽丽, 龚一富. 雨生红球藻虾青素合成关键酶基因 DXS 的克隆及生物信息学分析 [C]. 广州: 广东省研究生学术论坛论文集, 2008: 144 - 151.
- [20] 陈晓飞, 严小军. 红球藻虾青素含量测定方法的探讨 [J]. 宁波大学学报: 自然科学版, 2007, 20(4):

- 441 - 445.
- [21] 袁志发,周静芋. 试验设计与分析[M]. 北京:高等教育出版社,2000:172 - 88.
- [22] 蒋科技,皮妍,侯嵘. 植物内源茉莉酸类物质的生物合成途径及其生物学意义[J]. 植物学报,2010,45(2):137 - 148.
- [23] LIANG Y S, CHOI Y H, KIM H K. Metabolomic analysis of methyl jasmonate treated *Brassica rapa* leaves by 2-dimensional NMR spectroscopy [J]. *Phytochemistry*,2006,67:2503 - 2511.
- [24] BLECHERT S, BRODSCHELM W, HOLDER S, *et al.* The octadecanoic pathway-signal molecules for the regulation of secondary pathways [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,1995,92:4099 - 4105.
- [25] BALDWIN I T, ZHANG Z P, DIAB N, *et al.* Quantification, correlations and manipulations of wound-induced changes in jasmonic acid and nicotine in *Nicotiana sylvestris* [J]. *Planta*, 1997, 201: 397 - 404.
- [26] EL-SAYED M, VERPOORTE R. Methyl jasmonate accelerates catabolism of monoterpene indole alkaloids in *Catharanthus roseus* during leaf processing[J]. *Fitoterapia*,2005,76:83 - 90.
- [27] 站晴晴,金钺,魏建和,等. 北柴胡不定根培养及茉莉酸甲酯处理对柴胡皂苷含量的影响[J]. 生物技术通讯,2011,22(1):57 - 60.
- [28] 黄永鑫,藏玲玲,蒋琛. 水杨酸和茉莉酸甲酯对喜树种子中次生代谢产物含量的影响[J]. 价值工程,2011,3:299.
- [29] 杨英,郑辉,何峰. 不同浓度茉莉酸甲酯对悬浮培养的胀果甘草细胞合成甘草总黄酮的影响[J]. 云南植物研究,2008,30(5):586 - 592.
- [30] 王学勇,崔光红,黄璐琦,等. 诱导子对丹参毛状根中丹参酮类成分积累影响[J]. 中国中药杂志,2007,32(10):976 - 979.
- [31] 马君兰,赵越. 外源茉莉酸甲酯(MeJA)对大豆异黄酮合成途径的影响[J]. 东北农业大学学报,2011,42(5):14 - 18.
- [32] MIZUKAMI H, TABIRA Y, ELLIS B E. Methyl jasmonate-induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell-suspension cultures [J]. *Plant Cell Reports*,1993,12(12):706 - 709.
- [33] WANG Y D, YUAN Y J, WU J C. Induction studies of methyl jasmonate and salicylic acid on taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* [J]. *Biochemistry Engineering Journal*, 2004,19:259 - 265.
- [34] FARMER E E, RYAN C A. Interplant communication-airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase-inhibitors in plant-leaves[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,1990,87:7713 - 7716.
- [35] BOHLMANN H, VIGNUTELLI A, HILPERT B, *et al.* Wounding and chemicals induce expression of the *Arabidopsis thaliana* gene Thi2. 1, encoding a fungal defense thionin, via the octadecanoid pathway [J]. *FEBS Letters*,1998,437:281 - 286.
- [36] COLLU G, UNVER N, PELTENBURG-LOOMAN A M G, *et al.* Geraniol 10-hydroxylase1, a cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis[J]. *FEBS Letters*,2001,508:215 - 220.

The effects of methyl jasmonate (MeJA) on the astaxanthin production and *dxs* gene expression of *Haematococcus pluvialis*

WANG Xin-wei, WANG Li-li, GONG Yi-fu*, JIN Si, LI Lin, CHEN Dong-ru

(Key Laboratory of Marine Biotechnology, Faculty of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: *Haematococcus pluvialis*, a unicellular green alga, is one of the potent biological sources for valuable secondary metabolite astaxanthin production. Methyl jasmonate (MeJA), a naturally-occurring plant cellular signal molecular, was found to induce secondary metabolites production. In this paper, the effects of MeJA on the cell growth, astaxanthin production and *dxs* gene expression of *Haematococcus pluvialis* were investigated in detail, which provides a theoretical foundation for cosmically manufacturing astaxanthin. The results showed that, the addition of different concentrations of MeJA restrained the cell growth of *H. pluvialis* and decreased total astaxanthin production also. Addition of MeJA could promote unit cell astaxanthin accumulation, and with the increased MeJA concentrations, the unit cell astaxanthin content showed the tendency that was first increased and then decreased. The optimum addition concentration of MeJA for astaxanthin production was 800 $\mu\text{mol/L}$. The highest yield of the unit cell astaxanthin content in *H. pluvialis* was 1.75×10^{-9} mg, which increased by 23.24% compared with 1.42×10^{-9} mg without MeJA. This study provides a simple means to increase astaxanthin production. RT-PCR analysis showed that *dxs* gene expression was induced by MeJA. With the treatment of 800 $\mu\text{mol/L}$ MeJA, *dxs* gene expression levels were the highest. The correlation analysis results showed that, the astaxanthin content of *H. pluvialis* and the amount of *dxs* gene expression were in positive correlation, thus it can be seen that the *dxs* gene expression level can reflect the astaxanthin production of *H. pluvialis*, and *dxs* gene was a key enzyme gene of astaxanthin synthesis of *H. pluvialis*.

Key words: *Haematococcus pluvialis*; methyl jasmonate (MeJA); astaxanthin; 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (*dxs*)

Corresponding author: GONG Yi-fu. E-mail: gongyifu@163.com