

胁迫条件下褪黑素诱导雨生红球藻虾青素合成

崔 静, 李 涛, 丁 巍, 赵永腾, 余旭亚 *

(昆明理工大学 生命科学与技术学院, 云南 昆明 650500)

摘要: 雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)在胁迫条件下可大量积累虾青素,已成为天然虾青素的主要来源。通过解析外源褪黑素(Melatonin, MLT)调控雨生红球藻在缺氮联合高光照胁迫条件下的防御效应,以期建立虾青素高效合成的技术体系。结果表明,胁迫条件下外源 MLT 的诱导显著促进了虾青素的积累,最高质量分数达到 32.37 mg/g,较对照组增加了 2.25 倍。此外,外源 MLT 提高了胞内 NO 和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)的含量,同时上调了虾青素合成关键酶基因 *dxs* 和 *chy* 的表达水平。研究表明,外源 MLT 诱导高光缺氮胁迫下雨生红球藻中虾青素的高效合成可能与 MLT 调控藻细胞内的 NO、MAPK 含量和虾青素合成关键酶基因 *dxs* 和 *chy* 的表达水平相关。

关键词: MLT;雨生红球藻;虾青素;NO;MAPK

中图分类号:Q 81 文章编号:1673-1689(2020)06-0015-07 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.06.003

Induced Synthesis of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* by Melatonin under Stress

CUI Jing, LI Tao, DING Wei, ZHAO Yongteng, YU Xuya *

(Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract: *Haematococcus pluvialis* is a major source of natural astaxanthin due to its ability to accumulate astaxanthin under stress conditions. In order to establish a technical system for the regulation of efficient synthesis of astaxanthin, this experiment analyzed the effect of exogenous melatonin (MLT) on the defense response of *Haematococcus pluvialis* under nitrogen deficiency combined with high light condition. The results showed that the induction of exogenous MLT significantly promoted the accumulation of astaxanthin under stress conditions, with the highest content reaching 32.37 mg/g, which was 2.25 times higher than that of the control group. In addition, exogenous MLT increased the levels of intracellular NO and mitogen-activated protein kinase (MAPK), and upregulated the expression levels of *dxs* and *chy*, which are the key enzyme genes for astaxanthin synthesis. This study showed that the efficient synthesis of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* induced by exogenous MLT under high light and nitrogen stress may be related to the increase of NO and MAPK and the expression of the enzyme genes *dxs* and *chy*.

Keywords: melatonin, *Haematococcus pluvialis*, astaxanthin, NO, MAPK

收稿日期: 2018-09-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21766012, 21666012); 云南省重大科技专项计划项目 (2018ZG003); 云南省健康科技计划项目 (2014NS227)。

* 通信作者: 余旭亚(1969—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事微藻生物能源技术研究。E-mail: xuya_yu@163.com

虾青素具有淬灭单线态氧的能力,是一种具有强抗氧化特性的萜类化合物,被作为添加剂广泛应用于食品和水产生物的养殖中^[1-2]。在胁迫条件下,雨生红球藻会大量合成虾青素,被公认为是天然虾青素的最佳生物来源^[3-4]。虾青素作为一种具有强抗氧化特性的物质,其生物合成是雨生红球藻抵抗生物或非生物胁迫的一种防御作用^[5-6]。雨生红球藻中虾青素含量的积累,对提高其响应外界胁迫的防御作用尤为重要。

MLT是一种新的植物生长调节剂和抗氧化剂,可提高植物对各种生物和非生物胁迫的耐受性^[7]。Shi等^[8]的研究显示,外源添加MLT处理病原菌Pst DC3000侵染的拟南芥叶片,可增加NO生成及SA相关基因的表达,增加对病原菌的抗性。雨生红球藻作为一种真核单细胞绿藻,在胁迫条件下,MLT对虾青素积累的作用,及其与藻细胞内信号分子之间的相互作用仍未见报道。

包括微藻在内的真核生物中,在外部环境刺激下,各种信号通路会开启或关闭,并逐级放大或相互关联,从而调控生物体内的复杂生理活动。NO作为一种多用途的细胞信号效应器,它在不同的代谢过程中起着重要作用,如抗生物和非生物胁迫,调节激素信号传导等^[9],是生物体内一种重要的信号分子。有丝分裂激活蛋白激酶(MAPK)信号通路,在各种真核生物的复杂生理活动中扮演着重要的角色,NO和MAPK信号通路对调节多种细胞功能发挥了核心作用^[10],但是在微藻中,关于这些信号级联的作用鲜有研究。

作者旨在缺氮联合高光照条件下,外源添加MLT诱导雨生红球藻积累虾青素,初步阐明MLT对雨生红球藻应激反应的调控作用。并利用小分子抑制剂的化学遗传学,研究了MLT调控NO介导的MAPK信号传导途径对雨生红球藻中虾青素积累的影响。

1 材料与方法

1.1 雨生红球藻的培养和诱导

雨生红球藻 *Haematococcus pluvialis* LUGU 由云南泸沽湖水样中分离纯化所得^[11]。以BBM为基础培养基,于3 L鼓泡式光生物反应器(直径0.2 m,高0.3 m)中培养,(其中含2 L BBM培养基),并以0.1 vvm的速度通入无菌空气,光照强度为2 800 lx,培

养温度(25±1)℃,培养到对数后期(大约9.0×10⁵ cells/mL)。

3 800 g离心5 min,无菌水洗涤2次,以去除残留的营养物质。将所获的藻液沉淀,重新悬浮至缺氮的BBM(500 mL锥形瓶,其中含360 mL培养基)培养基中,最初的细胞浓度调整为2×10⁵ cells/mL。将不同的化学小分子加入到缺氮BBM培养基中(表1)。将未经处理的藻细胞培养作为对照组。每组设3个平行样。以0.4 vvm的速度通入无菌空气,光照10 000 lx,温度保持在(28±1)℃,室内培养13 d。

表1 诱导虾青素生物合成不同诱导子的处理浓度

Table 1 Concentration of different treatments used for the induction of astaxanthin biosynthesis

处理方式 ^a	处理浓度 ^b /(μmol/L)
MLT	10
SNP	200
cPTIO	0.15
U0126	20

a:MLT,褪黑素;SNP,NO供体;cPTIO,NO清除剂;U0126,MAPK抑制剂

b:不同诱导组的浓度优化

1.2 藻细胞生物量质量浓度、虾青素的测定

为测定 *Haematococcus pluvialis* LUGU 的干细胞质量(DCW),每隔4天取10 mL诱导藻液,并3 800 g离心5 min,所获沉淀用蒸馏水洗涤2次,离心、收集、置于EP管中,储存于-20℃,冷冻干燥并测定质量。

利用高效液相色谱(HPLC)测定虾青素含量。取各干燥样品10 mg,充分研磨,然后用丙酮:氯仿(1:1, v/v)溶液提取干藻粉中虾青素,4℃条件下,12 000 g离心5 min。多次重复此过程,至藻细胞呈白色。将提取后的溶液置于45℃真空干燥箱完全干燥。随后用1 mL甲醇:二氯甲烷(3:1, v/v)溶液溶解干燥的提取物,HPLC上样检测。其中,HPLC条件为:流动相A为丙酮,流动相B是体积比为9:1的甲醇:水;洗脱梯度为:B 80%~20% 25 min,B 20% 10 min,B 20%~80% 15 min,进样量20 μL,流速为1.25 mL/min。光谱扫描波长范围为250~700 nm,检测波长为476 nm。用液相色谱标准曲线计算虾青素质量浓度c(mg/L),虾青素质量分数为:

$$P = c / DCW$$

其中, P 为虾青素质量分数,(mg/g); DCW 为干细胞质量浓度,(g/L)。

1.3 藻细胞内 NO 的检测

用双胺荧光素(DAFM-FM DA)检测 NO 水平^[12]。将新鲜藻细胞(1×10^6 cells/mL)离心、洗涤,加入 $5 \mu\text{mol/L}$ DAF-FM DA,避光、恒温 37°C 条件下,置于 HEPES/PBS 缓冲液(pH 7.4)中振荡孵育 20 min。离心、洗涤,利用激光扫描共聚焦显微镜采集藻细胞荧光图片;荧光分光光度计检测微藻细胞荧光强度,计算 NO 含量。

1.4 总蛋白质提取和蛋白免疫印迹

取新鲜藻液 5 mL, $3\,500\text{ g}$ 离心 10 min,将沉淀物悬浮于 Tris 缓冲盐溶液(TBS, 浓度 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 浓度 150 mmol/L NaCl, pH 7.5)中。 $12\,000\text{ g}$ 离心 5 min,并将沉淀物加入含有浓度 1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0),体积分数 0.2% 聚乙炔吡咯烷酮, 体积分数 2.0% 2-巯基乙醇, 1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L 磷酸酶抑制剂复合物 I 和 1 mmol/L PMSF 的提取液中。 4°C 匀浆研磨, $12\,000\text{ g}$ 离心 30 min 得到总蛋白质提取液。根据 Bradford^[13]法测定上清液中总蛋白质的含量。上清液储存于 -80°C 。

样品蛋白质通过质量分数 12% SDS-PAGE 分离并转移至硝酸纤维素膜。将膜置于 5 g/dL 脱脂奶粉 TBST 溶液中封闭 1 h, 然后放入含有 p38MAPK 抗体的抗血清溶液中 4°C 孵育过夜后,用 TBST 洗涤,随后用 1:1 000 稀释度的抗兔免疫球蛋白 G 的辣根过氧化物酶缀合的抗体孵育 2 h^[14-15]。通过使用增强的化学发光底物检测试剂盒使抗原抗体复合物可视化,进而得到 MAPK 蛋白质表达量。

1.5 RNA 提取及基因表达量的检测

使用 TriZol 试剂提取总 RNA。利用 RT-PCR 试剂盒(TaKaRa)对 $1\text{ }\mu\text{g}$ RNA 进行反转录,然后进行 qRT-PCR 扩增,使用 ABI 7500 荧光定量仪分析 *dxs* 和 *chy* 相对转录水平。表 2 为内参基因 18 S 和 *dxs*、*chy* 的荧光定量引物。其中内参基因的作用即作为内标以调节 RNA 的用量和循环数,使内标基因在诱导条件下的表达丰度一致。qRT-PCR 数据结果用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ^[16]的方法进行分析。

1.6 统计分析

每组试验设置 3 个平行。采用 ANOVA(SPSS 20.0)一步法分析所得试验数据。最小显著性差异进

表 2 酶基因荧光定量引物

Table 2 Primers of Enzyme genes for qRT-PCR

基因	引物序列(5' - 3')	退火温度/ $^\circ\text{C}$	片段大小/bp
<i>dxsF</i>	GTCTCCGCACTCTTCACC	57	299
<i>dxsR</i>	CCCACCCAGTACAACAAC	54	271
<i>chyF</i>	CCAATCACTAACCCTCGCTA		
<i>chyR</i>	TGGTCCAAGCGGTAGGGTGC	55	521
18sF	CAAAGCAAGCCTACGCTCT		
18sR	ATACGAATGCCCCGACT		

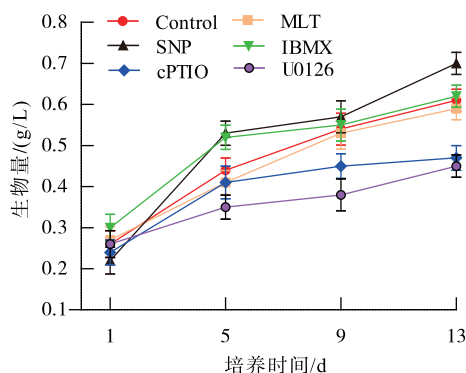
行多重比较检验,分析不同试验的组间差异,当 $p < 0.05$ 时具有显著性意义, $p < 0.01$ 具有极显著性意义。

2 结果与讨论

2.1 不同处理对雨生红球藻生物量和虾青素积累的影响

不同诱导方法对雨生红球藻生物量和虾青素积累的影响见图 1,随着培养时间的延长,所有实验组的生物量呈上升趋势。经过 13 d 的培养,对照组、MLT 组和 SNP 组的生物量分别达到了 0.61 、 0.59 、 0.70 g/L 。MLT 结合 cPTIO 组和 MLT 结合 U0126 组的雨生红球藻生长受到抑制,与对照组相比,生物量分别降低 22.95% 和 26.23%。

生物量增加的同时,虾青素的质量分数在所有实验组中也显示出不同程度的提高。如图 1 (b)所示,在 0~13 d 培养过程中,对照组虾青素的质量分数为 14.36 mg/g 。在外源添加 MLT 后,细胞内的虾青素质量分数迅速增加至 32.37 mg/g ,与对照组相比,增加了 2.25 倍。在 SNP 诱导组中,虾青素质量分数也明显比对照组更高,并在 13 d 后达到峰值 19.69 mg/g 。相比之下, cPTIO 和 U0126 的预处理导



(a)不同处理对雨生红球藻生物量的影响。

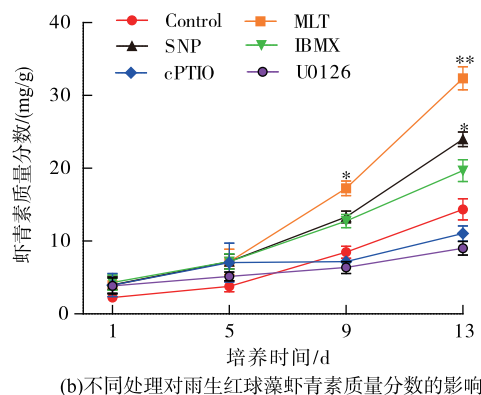


图1 不同处理对再生红球藻生物量和虾青素质量分数的影响
Fig. 1 Effects of different treatments on biomass and astaxanthin content of *H. pluvialis*

致了虾青素的积累减少,最高质量分数分别为 11.04 mg/g 和 9.03 mg/g。

2.2 不同诱导方法对雨生红球藻细胞内 NO 水平的影响

生物体内,NO 是参与多种生理活动的信号分子。为了确定 MLT 对虾青素积累的调控机制是否依赖 NO 对胁迫的反应,应用 MLT、SNP(NO 供体)和 MLT 结合 cPTIO (NO 消除剂)3 种处理方式处理雨生红球藻,另设有对照组。不同诱导方法对雨生红球藻细胞内 NO 水平的影响如图 2 所示。相比对照组,MLT 处理组和 SNP 处理组的 NO 水平显著增加,而 MLT 结合 cPTIO 处理组细胞内 NO 水平显著降低。

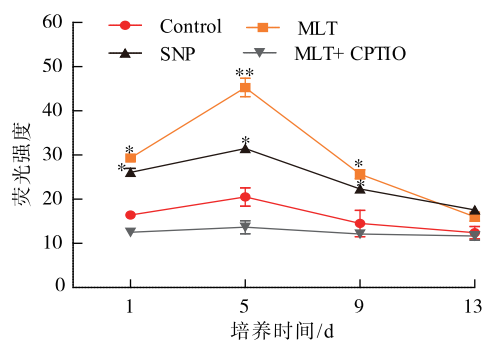


图2 不同处理对雨生红球藻细胞内 NO 水平的影响
Fig. 2 Effects of different treatments on nitric oxide levels in *H. pluvialis*

2.3 不同诱导方法对雨生红球藻细胞内 MAPK 的影响

MAPK 是将细胞外刺激信号转换成细胞内反应的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在许多真核生物的

生理过程中发挥着重要的细胞信号传导作用,参与细胞内多种代谢过程^[17]。Western blotting 检测 MAPK 表达水平的结果如图 3 所示。当利用不同化学分子诱导藻细胞后,在第 5 天 MAPK 的含量显示出显著差异。相比对照组,MLT 诱导组和 SNP 诱导组的 MAPK 水平显著提高,而 MLT 结合 cPTIO、MLT 结合 U0126 处理组的 MAPK 表达水平被明显抑制。至第 13 天,与第 5 天的水平相比,所有组的 MAPK 含量均增加;相比之下,MLT 结合 U0126 组,MAPK 水平仍然低于其它组,虾青素的合成也受到抑制(图 1 (b)),源于 U0126 对 MAPK 的抑制作用。

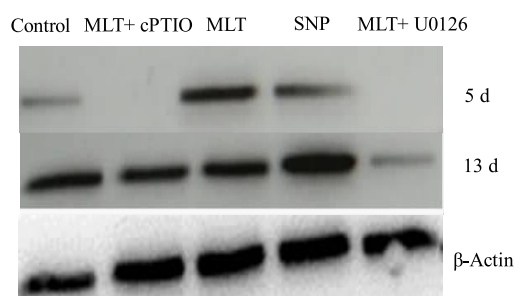


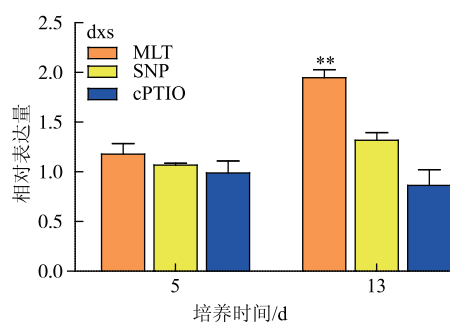
图3 不同处理对雨生红球藻细胞内 MAPK 的影响
Fig. 3 Effects of different treatments on MAPK in *H. pluvialis* cells

2.4 不同诱导方法对雨生红球藻虾青素积累相关基因转录水平的影响

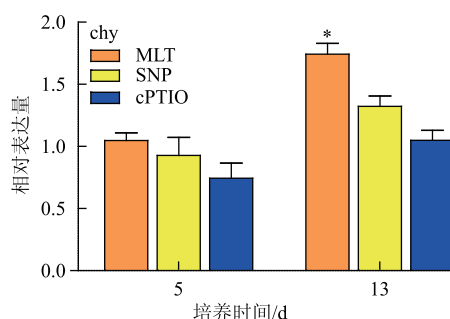
环境胁迫条件下,外源化学物质或植物激素的添加,可调节微藻中与虾青素生物合成相关基因的表达量^[18]。为了确定缺氮联合高光条件下,MLT 对雨生红球藻虾青素合成相关基因转录水平的影响,借助实时荧光定量 PCR,在诱导 5 d 和 13 d,对藻细胞虾青素合成关键基因 *dxs* 和 *chy* 的表达水平进行检测、分析。图 4 显示,第 5 天的 cPTIO 诱导组中,上述 2 种基因表达水平均相对较低。在第 13 天,MLT 诱导组和 SNP 诱导组, *dxs* 和 *chy* 的转录水平与对照相比均表现出显著性增加,达到最大转录水平。其中,在 MLT 处理组与对照组相比, *dxs* 和 *chy* 的最大转录水平分别提高了 1.95 和 1.74 倍;在 SNP 组, *dxs* 和 *chy* 的最大转录水平均是对照组的 1.32 倍。然而,在 cPTIO 诱导组中,2 种基因的转录水平均显著降低。

2.5 讨论

研究表明,在胁迫条件下,雨生红球藻会大量



(a)不同处理对*dxs*转录水平的影响



(b)不同处理对*chy*转录水平的影响

图4 不同处理对*dxs*、*chy*转录水平的影响

Fig. 4 Effects of different treatments on the transcription level of *dxs*, *chy*

积累虾青素,生物量也会受到一定影响^[19]。在本研究中,MLT诱导组生物量与对照组相比,没有显著差异。这一结论与之前的研究结果相似,强光照条件下添加MLT可以抑制莱茵衣藻生物量的降低^[20]。周永斌等^[21]发现SNP对种子发芽势、发芽率及幼苗的根长、叶绿素含量和生物量有明显的促进作用,且Giba等^[22]也发现NO消除剂可抑制皇后树种子萌发而SNP则促进种子萌发。由于藻类和植物的相似性,我们的结果也与之相似,作为NO的供体,SNP的添加促进了雨生红球藻的生长,生物量质量浓度达到了0.70 g/L;NO清除剂-cPTIO的添加和MAPK抑制剂-U1026的添加均抑制了雨生红球藻的生长。

一些化合物,作为代谢的启动因子或增强子,能够直接调节细胞代谢,可以应用于雨生红球藻以促进虾青素的积累^[23-24]。近年的研究表明,茉莉酸(JA)、水杨酸(SA)、赤霉素(GA3)、脱落酸(ABA)、黄腐酸(FA)和2,4-表油菜素内酯(EBR)均可以增强虾青素的积累^[25-26]。MLT作为一种信号分子和抗氧化剂,其外源添加也显著促进了雨生红球藻虾青

素含量。在胁迫条件下,MLT可能是以增强雨生红球藻中虾青素积累的方式响应外界刺激,提高雨生红球藻对外界胁迫的抵御能力。另外,SNP诱导组的虾青素含量得到提升,MLT结合cPTIO和U1026的处理导致了虾青素的积累减少,推测虾青素的积累可能与藻细胞内NO水平有关,而NO作为信号分子可能是通过激活了MAPK信号通路从而提高了虾青素积累量^[27]。

通过测定雨生红球藻细胞内的NO含量,发现MLT处理组和SNP处理组的NO水平提高,MLT结合cPTIO处理组细胞内NO含量显著降低,相应地,虾青素积累量也显著降低(图1(b))。这一结果表明虾青素的积累与藻细胞内NO水平有关,且MLT调控雨生红球藻对外界胁迫的作用依赖于NO的介导。

为了验证NO作为信号分子是否通过激活MAPK信号通路,从而提高虾青素积累量,即MAPK是否为NO在藻细胞中的一个重要靶点,本研究借助Western blotting检测了MAPK的表达水平。结果表明,MAPK抑制组中,MAPK含量显著低于对照组,虾青素的合成受到抑制(图1(b))。NO清除组中,MAPK水平没有受到抑制,虾青素合成同样受到抑制(图1(b)),表明藻细胞内NO水平可通过影响MAPK含量影响雨生红球藻中虾青素的积累。

Neill^[28]和Asai^[29]的研究结果显示,NO信号的传递与MAPK信号通路有关,如:NO处理能诱导拟南芥悬浮细胞 4.7×10^4 的MAPK活性增高。Pagnussat等^[30]的研究也表明,外源NO和生长素诱导黄瓜不定根形成过程中激活了 4.8×10^4 MAPK活性,而NO清除剂-cPTIO不仅能抑制该激酶活性的增加,而且能抑制外源NO和生长素对不定根形成的诱导作用,证明了NO激活MAPK信号通路是生长素诱导不定根形成必须的。

Shi等^[31]发现MLT可诱导高水平的NO刺激防御相关基因的表达,而NO清除剂可抑制烟草和拟南芥中防御相关基因的表达。本研究的结果与此一致,在胁迫条件下,外源MLT的添加,提高了雨生红球藻细胞内的NO水平,激活了依赖于NO的MAPK信号通路,虾青素的积累作为雨生红球藻响应外界刺激,提高其对外界胁迫的方式,虾青素合成关键酶基因的表达水平得到上调,从而提高了虾青素积累量。在许丽丽等^[32]的RNA-Seq分析表明,

MLT 的处理使葡萄果实中有 30 个 *sts* 基因表达上调,提高了葡萄果实和根系中白藜芦醇的含量。

3 结 语

综上,可提出一种褪黑素诱导虾青素高效合成的信号通路模型(见图 5)。高光照、氮缺陷条件下,外源添加 MLT 提高了雨生红球藻细胞内的 NO 水平,激活了依赖于 NO 的 MAPK 信号通路,上调了虾青素合成关键酶基因 *dxs* 和 *chy* 的表达水平,进而促进了虾青素的大量积累。实验证实了在雨生红球藻中 MAPK 是 NO 作用的一个靶点,这为基因工程改造雨生红球藻以提高虾青素产量提供了科学的依据,对进一步研究雨生红球藻高效合成虾青素具有一定的理论和实践意义。随着 MLT 诱导雨生红球藻虾青素生物合成体系的建立和信号转导调控的进一步研究,分子水平调控雨生红球藻虾青素合

成将为虾青素生产提供一种有效策略。

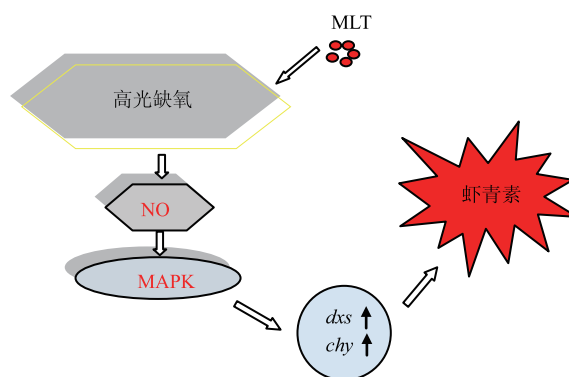


图 5 褪黑素诱导雨生红球藻在胁迫条件下积累虾青素的信号通路假设模型示意

Fig. 5 Schematic diagram of the signal pathway hypothesis model for the accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* induced by melatonin under stress

参考文献:

- [1] ZHANG Z, HUANG J J, SUN D, et al. Two-step cultivation for production of astaxanthin in *Chlorella zofingiensis* using a patented energy-free rotating floating photobioreactor (RFP)[J]. **Bioresour Technol**, 2017, 224: 515-522.
- [2] HAN T, LI X, WANG J, et al. Effects of dietary astaxanthin (AX) supplementation on pigmentation, antioxidant capacity and nutritional value of swimming crab, *Portunus trituberculatus* [J]. **Aquaculture**, 2018, 490: 169-177.
- [3] ALLEWAERT C C, VANORMELINGEN P, DAVELOSE I, et al. Intraspecific trait variation affecting astaxanthin productivity in two *Haematococcus*, (*Chlorophyceae*) species [J]. **Algal Research**, 2017, 21: 191-202.
- [4] 廖兴辉, 王明兹, 李小妹, 等. 高产虾青素的雨生红球藻胁迫条件和中试研究 [J]. **食品与发酵工业**, 2015, 41(6): 29-34.
- [5] SU Y, WANG J, SHI M, et al. Metabolomic and network analysis of astaxanthin-producing *Haematococcus pluvialis* under various stress conditions [J]. **Bioresour Technol**, 2014, 170: 522-529.
- [6] KOBAYASHI M. Astaxanthin biosynthesis enhanced by reactive oxygen species in the green alga *Haematococcus pluvialis* [J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 2003, 8(6): 322-330.
- [7] 杨小龙, 须晖, 李天来, 等. 外源褪黑素对干旱胁迫下番茄叶片光合作用的影响 [J]. **中国农业科学**, 2017, 50(16): 3186-3195.
- [8] SHI H, CHEN Y, TAN D, et al. Melatonin induces nitric oxide and the potential mechanisms relate to innate immunity against bacterial pathogen infection in *Arabidopsis* [J]. **Journal of Pineal Research**, 2015, 59(1): 102.
- [9] TAKEDA S, GAPPER C, KAYA H, et al. Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells [J]. **Science**, 2008, 319(5867): 1241-1244.
- [10] MESKIENE I, HIRT H. MAP kinase pathways: molecular plug-and-play chips for the cell [J]. **Plant Molecular Biology**, 2000, 42(6): 791-806.
- [11] ZHAO Y, SHANG M, XU J W, et al. Enhanced astaxanthin production from a novel strain of *Haematococcus pluvialis* using fulvic acid [J]. **Process Biochemistry**, 2015, 50: 2072-2077.
- [12] LUO B F, DU S T, LU K X, et al. Iron uptake system mediates nitrate-facilitated cadmium accumulation in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants [J]. **Journal of Experimental Botany**, 2012, 63(8): 3127-3136.
- [13] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. **Analytical Biochemistry**, 1976, 72(1-2): 248-254.
- [14] YAMAUCHI K, MITSUNAGA T, INAGAKI M, et al. Synthesized quercetin derivatives stimulate melanogenesis in B16

- melanoma cells by influencing the expression of melanin biosynthesis proteins MITF and p38 MAPK[J]. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 2014, 22(13): 3331-3340.
- [15] BACKMAN L, PERSSON K. The no-nonsense SDS-PAGE[J]. **Methods in Molecular Biology**, 2018, 1721: 89.
- [16] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) method[J]. **Methods—A Companion To Methods in Enzymology**, 2001, 25(4): 402-408.
- [17] 邹隆强. MAPK 信号传导通路在髓核细胞研究进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2012, 20(21): 1963-1965.
- [18] SHANG M, WEI D, ZHAO Y, et al. Enhanced astaxanthin production from *Haematococcus pluvialis*, using butylated hydroxyanisole[J]. **Journal of Biotechnology**, 2016, 236: 199-207.
- [19] CHEN T, WEI D, CHEN G U, et al. Employment of organic acids to enhance astaxanthin formation in heterotrophic *Chlorella zofingiensis*[J]. **Journal of Food Processing and Preservation**, 2009, 33.2: 271-284.
- [20] TAL O, MALIKIEL H, SINAM B, et al. Melatonin regulates antioxidative mechanisms in microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* (*Volvocales*, *Chlorophyceae*)[J]. **Phycologia**, 2015, 54(3): 292-298.
- [21] 周永斌, 殷有, 苏宝玲, 等. 外源一氧化氮供体对几种植物种子的萌发和幼苗生长的影响[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(3): 316-318.
- [22] GIBA Z, GRUBIIC D, TODOROVIC S, et al. Effect of nitric oxide-releasing compounds on phytochrome-controlled germination of empress tree seeds[J]. **Plant Growth Regulation**, 1998, 26.3: 175-181.
- [23] YU X, CHEN L, ZHANG W, et al. Chemicals to enhance microalgal growth and accumulation of high-value bioproducts[J]. **Frontiers in Microbiology**, 2015, 6: 56.
- [24] LU Y, XU J. Phytohormones in microalgae: a new opportunity for microalgal biotechnology[J]. **Trends in Plant Science**, 2015, 20(5): 273-282.
- [25] YU X, NIU X, ZHANG X, et al. Identification and mechanism analysis of chemical modulators enhancing astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*[J]. **Algal Research**, 2015, 11: 284-293.
- [26] 尚敏敏, 赵永腾, 赵鹏, 等. 黄腐酸对 *Haematococcus pluvialis* LUGU 虾青素积累和 *lcy* 基因表达量的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(7): 702-706.
- [27] 王鹏程, 杜艳艳, 宋纯鹏. 植物细胞一氧化氮信号转导研究进展[J]. 植物学报, 2009, 44(5): 517-525.
- [28] NEILL S J, DESIKAN R, CLARKE A, et al. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants[J]. **Journal of Experimental Botany**, 2002, 53(372): 1237-1247.
- [29] ASAI S, YOSHIOKA H. The role of radical burst via MAPK signaling in plant immunity[J]. **Plant Signaling & Behavior**, 2008, 3(11): 920-922.
- [30] PAGNUSSAT G C, LANTERI M L, LOMBARDO M C, et al. Nitric oxide mediates the indole acetic acid induction activation of a mitogen-activated protein kinase cascade involved in adventitious root development[J]. **Plant Physiology**, 2004, 135(1): 279-286.
- [31] SHI H T, LI R J, CAI W, et al. Increasing nitric oxide content in *Arabidopsis thaliana* by expressing rat neuronal nitric oxide synthase resulted in enhanced stress tolerance[J]. **Plant & Cell Physiology**, 2012, 53(2): 344-57.
- [32] 许丽丽, 岳倩宇, 卞凤娥, 等. 褪黑素诱导 *sts* 基因表达提高葡萄白藜芦醇含量[J]. 食品科学, 2018, 39(10): 165-172.