

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2019060401

李璇, 周燕平, 夏琼琼, 等. 磷胁迫对藻类生长代谢的影响及藻类对胁迫响应机制的研究进展[J]. 环境化学, 2020, 39(8): 2074-2083.

LI Xuan, ZHOU Yanping, XIA Qiongqiong, et al. The impacts of phosphorus stress on the growth and metabolism of algae and its response mechanism[J]. Environmental Chemistry, 2020, 39(8): 2074-2083.

磷胁迫对藻类生长代谢的影响及藻类 对胁迫响应机制的研究进展*

李璇¹ 周燕平¹ 夏琼琼² 代瑞华^{1**}

(1. 复旦大学环境科学与工程系, 上海, 200433; 2. 中国市政工程华北设计研究总院有限公司, 天津, 300074)

摘要 磷是藻类所必需的营养元素之一, 水体中的藻类通常可以直接利用溶解性磷酸盐, 而水环境中的溶解性磷酸盐的浓度通常较低, 无法满足藻类的生长需要, 从而造成磷胁迫. 近年来分子生物学水平的研究方法突飞猛进, 通过转录组、蛋白组等组学分析藻类的磷胁迫研究越来越多. 本文从生理学和分子生物学角度综述了磷胁迫对藻类的生长和代谢的影响, 总结了藻类对磷胁迫的响应行为和环境适应机制, 对于探究藻类生长代谢及磷利用的机理有一定的科学意义.

关键词 藻, 磷胁迫, 响应, 生理, 分子生物学.

The impacts of phosphorus stress on the growth and metabolism of algae and its response mechanism

LI Xuan¹ ZHOU Yanping¹ XIA Qiongqiong² DAI Ruihua^{1**}

(1. Department of Environmental Science & Engineering Fudan University, Shanghai, 200433, China;

2. North China Municipal Engineering Design & Research Institute Company, Tianjin, 300074, China)

Abstract: Phosphorus is one of the nutrients that essential to algae. Usually, algae could directly utilize phosphate in the aquatic ecosystem. However, phosphate concentration in natural waters is often too low to satisfy the needs for algae growth, which ultimately leads to phosphorus stress. In recent years, with the rapid development of research methods in molecular biology, more and more studies have conducted on the effect of phosphorus stress on algae growth through transcriptome and proteome. The manuscript has reviewed the relevant studies in physiology and molecular biology with respect to effects of phosphorus stress on the growth and metabolism of algae, and summarized the response behavior and environmental adaptation mechanism of algae towards phosphorus stress. The review is scientifically beneficial to exploring the mechanism of algae growth, metabolism, and phosphorus utilization.

Keywords: algae, phosphorus stress, response, physiology, molecular biology.

2019年6月4日收稿(Received: June 4, 2019).

* 国家自然科学基金(51678159)和城市污水能源资源开发及氮磷深度控制技术的集成研究与综合示范项目(2015ZX07306001)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China (51678159) and the Project for Urban Sewage Energy and Resource Exploitation and the Integrated Research and Comprehensive Demonstration of Nitrogen and Phosphorus Deep Control Technology (2015ZX07306001).

** 通讯联系人, Tel: 021-55664354, E-mail: rhdai@fudan.edu.cn

Corresponding author, Tel: 021-55664354, E-mail: rhdai@fudan.edu.cn

磷是藻类生长和各种代谢活动中不可或缺的营养元素,是组成藻细胞中的各种生化物质(核酸、细胞膜和 ATP 等)的重要元素^[1-2]。在淡水和海洋系统中,由于溶解态磷酸盐是藻类唯一能直接利用的形式,但其在表层水体的存量极低,因此磷胁迫环境普遍存在^[3-4]。此外,除了无机磷酸盐,水环境中也存在其他可生物利用的磷源,大部分为磷酸单酯、磷酸二酯等溶解态有机磷^[5-7]。磷胁迫研究对于探索磷对藻类生长代谢的机理和影响具有重要意义,可以对富营养化引起的藻类暴发研究有所借鉴。

目前的研究发现,磷胁迫不仅影响藻细胞的生长调控和各种代谢活动,同时藻类还会启动各种磷胁迫响应机制^[8-10]。藻类磷胁迫的相关研究大部分集中于表观生理和生态方面,如磷胁迫下藻类的生长速率、光合效率等生理参数以及细胞内外磷的含量的变化^[11-15]。此外,磷胁迫条件下也有多种相关生化物质响应,其中碱性磷酸酶的活性被广泛关注,还有很多磷相关的转运蛋白、水解酶等,但尚未有更深入的研究,这些表观生理的变化一定程度上证明藻类应对磷胁迫的适应行为^[12,16-19]。

随着科学技术的发展,分子生物学研究已经在各种领域中被广泛使用,基因组、转录组和蛋白组等组学的研究给藻类细胞表型和功能、基因结构和表达的探讨提供了更广阔的平台^[10,16,20-21]。目前的磷胁迫研究主要集中在转录组学方面,它关注基因的表达、结构和功能,瞬时间各种基因的差异表达,因此转录组是探索藻类生长与调控,环境胁迫适应机制的有效途径^[22-23]。目前磷胁迫的分子生物学研究主要是关于磷胁迫响应机制的研究,其中碱性磷酸酶的研究居多,但与其他组学的结合以及验证方法也相对缺少。此外,研究还只是停留在实验室培养条件下,对于实际淡水和海洋生态系统的磷胁迫研究很少。

本文综述了国内外基于生理学和分子生物学水平的关于磷胁迫下藻类的生长、代谢活动以及环境适应机制的研究,揭示磷胁迫对于藻类的生长与代谢的影响,探讨磷胁迫下藻类启动胁迫响应机制和适应磷胁迫环境的行为,有助于深入了解藻类磷利用的机理,从生理和分子水平为富营养化导致藻类暴发提供理论支持。

1 磷胁迫对藻类生长和代谢活动的影响 (The effects of phosphorus stress on algae growth and metabolism)

磷胁迫对藻类生长和代谢的影响体现在很多方面,胁迫下藻类的生长速率、生长周期和生长动力学都受到不同的影响,其次磷胁迫下的藻通过降低中枢代谢(糖酵解,磷酸戊糖途径,糖原合成和碳固定等)和光合系统的活性来减少其能量需求^[24]。此外,磷胁迫对某些有毒藻类的产毒代谢也会产生影响。图 1 是磷胁迫对藻类生长和代谢影响的相关研究的简图,总结了目前在生理和分子生物学方面的主要研究。目前大部分的研究只关注了表观生理参数的改变,并没有深入到分子生物学水平,相关基因的组学研究与表型研究也还未找到一定的关联性,同时由于检测技术的限制,一些基因的检测表达差异非常小,无法判断其中的相关性。

1.1 磷胁迫对藻类生长的影响

磷是藻类生长必需的营养元素之一,因此磷胁迫必然对藻类的生长有着直接的影响。Sajeela 等对不同磷浓度下的铜绿微囊藻生长速率及生长动力学进行了比较,发现 0—3 d 时磷限制条件下生长速率极低,但是 3—6 d 内磷限制条件下的生长速率反而比高磷条件下要高。可见磷胁迫对藻类生长有明显的抑制作用,但藻类随时间的生长变化并不完全符合 Monod 和 Droop 模型,后期的生长速率升高可能是磷限制下藻细胞启动胞内磷的利用所致^[25]。Mühlroth 等在低磷培养微藻实验中,发现微藻仅在 48 h 内处于指数生长期而后进入稳定期,而正常培养下的微藻呈指数持续增长^[26]。Harke 等在铜绿微囊藻的无磷培养实验中测得的生长速率仅为 0.13 d^{-1} ,低于正常培养下的生长速率(0.37 d^{-1})^[27];另外对 5 种主要藻类的磷胁迫研究中发现,磷限制下 5 种藻的生长速率及细胞产量均显著降低,说明藻类对磷的需求是不可或缺的^[28]。Wang 等发现莱茵衣藻在低磷($0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)中生长及其不利,且细胞中的大部分细胞器均受到损害,可见莱茵衣藻对磷胁迫的敏感^[29]。此外,还有藻类在磷限制条件下细胞产量降低而细胞增大,这可能是由于磷源缺乏而导致 DNA 复制受阻,阻断细胞周期所造成^[30-31]。可见,目前大部分研究均集中于磷胁迫对藻类生长的影响体现在生长速率、生长动力学,细胞周期的变化上,虽然不同藻类在磷胁迫下的生长速率变化并不一致,但是均发现磷胁迫下藻类与富磷或正常条件下其生长速率或者细胞产量存在显著差异;并且藻类的生长动力学并不能完全按照现有的微生物模型,需要更深入的研究。

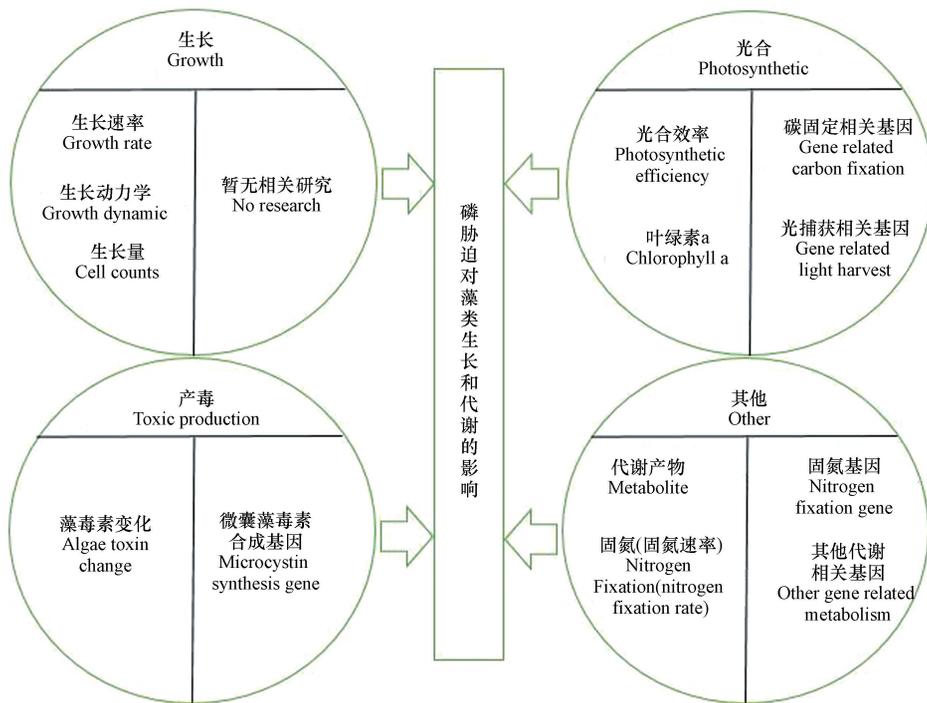


图1 磷胁迫对藻类生长和代谢影响的研究进展简图

(左边表示磷胁迫对藻类生长和代谢影响的生理方面的研究,右边表示磷胁迫对藻类生长和代谢影响的分子生物学方面的研究)

Fig.1 The effects of phosphorus stress on algae growth and metabolism in physiology and molecular biology

(The left side indicates the effects of phosphorus stress on algae growth and metabolism in the physiological aspects, and the right side indicates the effects of phosphorus stress on algae growth and metabolism in the molecular biology)

1.2 磷胁迫对藻类光合作用的影响

光合作用是藻类一项重要的生命过程,很多研究均发现磷胁迫下藻类的光合效率和叶绿素 a 含量降低以及相关基因转录水平的差异表达.在鱼腥藻的磷胁迫实验中,通过转录组研究发现 4 d 后参与光合系统 I 和 II、电子传递机制以及光色素生物合成的基因发生明显下调,其中碳固定关键酶核酮糖-二磷酸羧化酶(RuBisCO)大小亚基基因的转录和蛋白水平均显著降低^[32].但也有研究发现,中肋骨条藻在磷限制条件下 RuBisCO 大亚基基因表达上调,加磷恢复 4 h 后出现下调,同时光捕获复合体(Light-harvesting complex, LHC)基因以及中央色素蛋白在磷饥饿条件下显著性上调表达,磷补充后又出现下调,说明藻细胞的光捕获系统以及碳固定在转录水平上被激活,细胞倾向于从外界获取更多的能量应对磷缺乏^[33].Harke 等发现,铜绿微囊藻在无磷培养下的光合效率显著降低,并且许多重要的编码光合作用相关酶的基因差异表达显著,说明磷可以协同调控蓝藻的光合作用,在磷胁迫时藻细胞需要通过高表达光合作用相关酶加强光能的转换来为细胞提供更多的能量^[27].磷胁迫普遍影响着藻类的光合作用,大多数藻类的光合效率会出现不同程度的降低,藻类通过降低光合系统的能量消耗来应对磷胁迫;但是相关基因的差异表达并不显著,因此缺少深层次的转录和蛋白水平研究,这可能也是转录和蛋白组检测水平的限制.

1.3 磷胁迫对有毒藻类的产毒代谢的影响

很多研究都指出产毒藻的产毒能力与水中磷的浓度有一定的关联,大部分的研究认为磷胁迫会使有毒藻类的产毒能力略有提高,其产毒代谢相关的基因也有一定的差异表达.Teikari 等发现鱼腥藻的微囊藻毒素合成基因簇在磷限制条件下第 4 天的转录本丰度增加,其中 7 个基因在磷胁迫下略微或显著上调,而富磷培养下的基因只有 *mcyF* 和 *mcyJ* 是高于磷胁迫下的表达^[34].Pimentel 等通过实时荧光定量 PCR(Quantitative reverse transcription PCR, RT-qPCR)发现两种有毒铜绿微囊藻的 *mcyD* 基因在磷限制条件下的转录增加,与微囊藻毒素产量增加一致,同时发现氮调节基因(*nctA*)显著上调表达,可能产毒代谢相关基因的差异表达及代谢物产量的提高是细胞对磷缺乏的应激反应及自我保护^[35].然而在某些

研究中则并未发现产毒相关基因的差异表达,甚至有些是下调表达。Steffen 等对铜绿微囊藻(NIES 843)磷胁迫的转录分析指出在磷限制条件下微囊藻毒素合成相关的 10 个基因的转录都有所减少,并且参与氰基青霉素(*mcnA-G*)和铜绿素(*aerA-N*)合成的基因都没有表现出显著的上调^[36]。在聚球藻的磷胁迫研究并未发现相关产毒的基因差异表达,说明磷胁迫可能并不直接影响聚球藻的产毒代谢^[37]。目前尚未有研究证明磷对于有毒藻类的产毒代谢有着直接影响,而相关基因的差异在不同的研究中也有不同的表达,而且有学者认为表示产毒与氮密切相关^[38],可能磷对产毒代谢只是协同作用,具体的相关性以及影响等尚待探究。

1.4 磷胁迫对藻类其他代谢的影响

磷胁迫还影响着藻类的其他代谢,主要是代谢物的增加以及相关代谢基因的差异表达。利玛原甲藻在磷限制下细胞内碳水化合物含量高达 3.4 倍,冈田酸(OA)含量显著增加 2.3 倍,而胞外多糖(EPS)浓度更显著增加至 6.50 倍,说明磷限制对藻的代谢活动产生了显著的影响,可能是藻细胞对磷缺乏的应激反应^[39]。Kamalanathan 等发现磷限制下莱茵衣藻的细胞中性脂质含量反而升高,至少高于富磷下培养的 2.4 倍,该现象非常有利于工业化的生物燃料生产^[40]。束毛藻是典型的海洋中具有显著固氮作用的藻类,Orchard 等在对束毛藻的磷胁迫研究中发现,参与固氮的还原酶(*nifH*)显著下调表达,同时固氮速率也急剧降低,说明磷胁迫对其固氮能力产生了明显的抑制作用,也极大的影响了藻细胞的氮代谢^[41]。Martiny 等通过 DNA 微阵列技术对原绿球藻进行研究,经磷限制后,许多核糖体编码基因发生下调,从而使细胞的代谢速率减小^[42]。Feng 等应用蛋白组学研究磷胁迫下三角褐指藻发现参与蛋白质降解、脂质积累和呼吸等代谢反应的蛋白质发生上调表达,而能量代谢、光合作用以及氨基酸和核酸代谢相关蛋白呈下调趋势,这些蛋白质的差异表达表明磷对于细胞的许多代谢活动都会产生促进或抑制的影响^[43]。磷对于藻类许多代谢都起着协同作用,由此也显示磷对于藻类生长与代谢的重要性。

2 磷胁迫下藻类的响应机制(The mechanism of algae response to phosphorus stress)

磷胁迫下藻类的响应机制主要包括四方面,磷的信号响应系统控制、启动不同磷的利用机制、藻细胞对磷的重分配和增强磷转运^[19, 33]。文中将对四方面展开讨论综述。其中后三种响应机制的代谢途径总结于图 2,图中标注了主要响应过程中的关键酶以及各种形式磷的转化和转移。

2.1 藻类对磷的信号响应系统

藻类对于磷胁迫的感应是通过信号响应系统控制的,磷饥饿信号传导给藻细胞后会引发一系列基因的转录,蓝藻中的信号响应系统主要由 *pho* 调节子组成,不同蓝藻中的 *pho* 调节子基因组成也有所不同,并且不同的基因发挥着不同的作用。蓝藻的 *pho* 调节子是由传感系统 *phoB/phoR* 系统控制,聚球藻的磷胁迫研究中发现 *phoB* 和 *phoR* 基因先于其他 *pho* 基因发生表达,因此 *phoB/phoR* 系统可能直接或间接地控制其他 *pho* 调控子基因的转录,同时也检测出 *pho* 调控子中主要负责调控 P 转运、碱性磷酸酶和 P 代谢相关基因,在磷限制下发生差异表达^[44]。有研究发现并分析了 19 个蓝藻基因组中的 *pho* 调控子,不同蓝藻可能编码不同,不同组合的基因实现对无机磷酸盐、磷酸二酯和磷酸盐等各种磷源的利用以及其他生物过程,由于 *pho* 调节子的多样性使蓝藻更加适应各种磷胁迫的环境^[45]。磷胁迫下束毛藻的 *pho* 基因簇(*phoC-M*)也发生了差异表达,但是具体的作用尚未确定^[15]。另有研究发现聚球藻和原绿球藻中 *ptrA* 基因在磷限制条件下发生上调表达,并且与 *phoB* 和 *phoR* 基因同时产生表达^[46-47]。此外,在真核藻类中也有这磷胁迫响应系统的存在,Frischkorn 等发现金球藻中的推定 *pho81* 和 *pho4* 基因在磷胁迫下发生上调表达^[48]。虽然目前的磷胁迫信号响应机制尚未被确定,但已经在不同藻种之前发现一些相似的潜在的信号响应表达,*pho* 调控子的组成基因依旧还有很多未知,需要我们接下来对其功能及作用进行进一步的探索。

2.2 藻类对不同磷的利用机制

当环境中的磷酸盐含量极低时构成磷胁迫,此时许多藻类会通过调节细胞内储存或利用外源溶解的有机磷,启动各种磷利用机制增加有机磷的水解以应对磷缺乏环境。水环境中常见的有机磷主要有磷酸单酯、磷酸二酯和磷酸盐,其次还有核苷酸的利用,对应的水解利用途径见图 2。碱性磷酸酶(APA)是最早研究的催化有机磷酸酯水解产生无机磷酸盐的酶,而编码碱性磷酸酶基因是 *pho* 调控子的一部分,

目前蓝藻中已经确定 3 种碱性磷酸酶 (*phoA/phoD/phoX*) 存在^[49]. Kageyama 等在极端环境嗜盐隐杆藻中首次鉴定出了 *phoD*, 其编码基因在磷胁迫下发生上调表达, 并且同时具有水解磷酸单酯和磷酸二酯的功能^[18]. 但是关于 *phoX* 的结构功能还尚未研究透彻, 仅有研究表明蓝藻中 *phoX* 的分布较 *phoA* 更为广泛^[17, 50]. Orchard 等在 3 种束毛藻中均发现两个推定的编码碱性磷酸酶 (*phoA/phoX*) 基因在磷胁迫时上调表达, 其中 *phoX* 表现出强烈的上调, 同时碱性磷酸酶活性也一致的增加, 在基因表达恢复到基础水平后酶活性仍然持续一段时间上升^[41]. Harke 等研究了 5 种藻类在磷限制条件下的转录情况, 发现在 *C. affinis* 和 *G. oceanica* 中有 2 种碱性磷酸酶的活性和转录丰度增加, 同时还有酸性磷酸酶的转录物丰度也显著增加^[28]. Teikari 等在鱼腥藻低磷培养实验中发现磷限制条件下的磷酸酶基因发生显著上调表达, 推定的磷酸酶基因在 4 d 时检测高达 39 倍显著上调, 同时金属依赖性磷酸酶也有 2 倍上调表达, 碱性磷酸酶略微上调表达^[34].

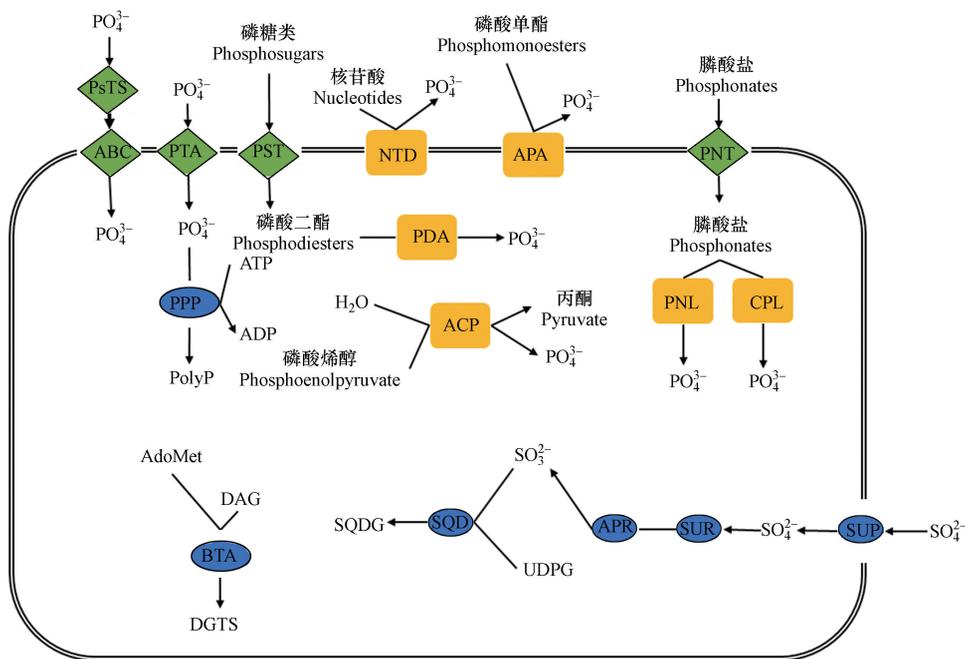


图 2 磷胁迫下藻细胞的响应机制

(图中的方块表示响应过程中的酶或转运蛋白, 其中方块表示藻细胞对不同磷的利用的响应, 椭圆表示藻类对磷的重分配响应, 菱形表示藻细胞转运系统的响应. 图中的大部分缩写已在文中标明, 未出现的缩写如下: PST, 磷糖转运蛋白; PNT, 磷酸转运蛋白; PNL, 通用磷酸裂解酶; SUP, 硫酸盐通透酶; SUR, 硫酸盐还原酶; APR, 腺苷-5'-磷酸硫酸还原酶; UDPG, 尿苷二磷酸葡萄糖; DAG, 二酰基甘油; Adomet, S-腺苷甲硫氨酸; PEP, 磷酸烯醇)

Fig.2 The mechanism of algae response to phosphorus stress

(The square represents the enzymes or transporters under the response. The yellow square indicates algae response to the utilization of alternative phosphorus forms. The blue square indicates response to algae phosphorus sparing and recycling, and the green square indicates response to algae transport system. Most of the abbreviations in the figure have been marked in the manuscript, while the other abbreviations are as follows. PST, P sugar transporter; PNT, Phosphonate transporter; PNL, Generic phosphonate lyase; SUP, Sulfate permease; SUR, Sulfate reductase; APR, Adenosine-5'-phosphosulfate reductase; UDPG, Uridine diphosphate glucose; DAG, diacylglycerol; Adomet, S-adenosylmethionine; PEP, Phosphoenolpyruvate)

除磷酸酶外, 许多藻类还存在磷酸二酯酶 (PDA)、核苷酸酶 (NTD) 等相关利用有机磷的酶. Yamaguchi 等使用磷酸二酯为唯一磷源培养海洋硅藻, 成功鉴定出了磷酸二酯酶, 并且其活性也相应增加^[51]. 磷酸二酯酶对胞内外的磷酸二酯的代谢起重要作用, 除能够打断磷酸二酯键外, 还可能也参与磷限制条件下磷脂的分解, 因此越来越多的研究关注藻细胞中磷酸二酯酶基因的转录与表达^[51-52]. Alexander 等对美国东海岸的硅藻的研究中发现磷限制下编码甘油磷酸二酯酶和 5' 二磷酸核苷酸酶的转录物发生上调表达^[53]. 另有研究通过 Long-SAGE 方法和 PCR 验证在赫氏球石藻的研究中发现编码 5' 核苷酸酶的基因发生上调表达^[54]. Wurch 等使用 Long-SAGE 分析 *Aureococcus*

aophaococcusferens 也发现在磷胁迫下 2 种编码 5' 核苷酸酶基因发生差异表达,证明藻类能够在磷限制下利用有机磷的响应^[55].Dyhrman 等在束毛藻中发现了预测 C-P 裂解酶(CPL)途径的高亲和力转运和磷酸酯化合物水解相关基因发生差异表达^[15].

此外,还有一些藻类能够利用特殊的磷源,并发生相应的基因转录.在某些蓝藻中检测到了亚磷酸盐代谢相关的基因,编码转运蛋白基因(*ptxABC*)以及 NAD 依赖性亚磷酸盐脱氢酶(*ptxD*)发生上调表达^[56].Gomez-Garcia 等发现集胞藻(*Synechocystis* PCC6803)在长期无机磷酸盐饥饿诱导下的多磷酸盐利用酶(*ppX*)和焦磷酸酶(*ppA*),其转录分别达到 10 倍和 20 倍的上调,同时这两种酶的活性和蛋白质水平也显著增加,还有多聚磷酸盐代谢相关 *ppK* 基因也发生显著上调^[57].磷胁迫环境中的不同磷源促进藻细胞形成各种磷利用机制,藻细胞吸收利用其他磷源以满足自身的磷需求,有机磷形式不同决定了关键的利用酶.目前研究显示磷酸酶的差异表达是磷胁迫的重要标志,尤其碱性磷酸酶活性的升高经常作为判断磷胁迫的依据,磷酸酶已是藻细胞在磷胁迫下最普遍的有机磷利用途径.但是很多磷酸酶基因仍是推定假设,还未进一步验证其功能,需要更多的研究完善;而磷酸二酯、磷酸盐等有机磷的利用机制以及其关键酶的研究也更加缺乏.

2.3 藻类细胞对磷的重分配

藻类在磷胁迫下通常会改变细胞内的磷分配,磷的重分配有两种体现方式,一是多聚磷酸盐(PolyP)的储存利用,二是磷脂的替代.一些藻类会在磷充足条件下过量吸收磷储存于细胞内,通过多聚磷酸酶(PPP)的作用将磷以多聚磷酸盐的形态保存,以便在磷胁迫时利用细胞内的磷,转化多聚磷酸盐的同时将 ATP 转化为 ADP(如图 2 所示).Dyhrman 等在对藻类蛋白组和转录组的磷胁迫研究中提出,藻细胞在富磷条件下将磷以多聚磷酸盐的形式储存于细胞内,可能是细胞中液泡转运蛋白伴侣家族[Vacuolar Transporter chaperone (Vtc) 1-4 family]的作用,磷限制下两个推定 *Vtc* 基因转录及其蛋白水平均上调差异表达,说明液泡转运蛋白的作用可能是转运多聚磷酸盐以提高磷代谢^[52].Mühlroth 等发现微绿球藻在磷胁迫下,两种推定液泡转运蛋白伴侣基因分别在培养 24 h 和 48 h 时 3 倍上调表达,并且其转录物与调节 Pi 稳态蛋白具有高度相似性,说明 *Vtc* 基因很可能参与磷胁迫下的 PolyP 代谢^[26].

细胞膜中的磷占胞内总磷的 20%,但当藻类处于磷胁迫时,一些藻类会合成不含磷脂质来保留胞内磷,实现细胞中磷的重分配,目前已有的替代脂质是硫脂(SQDG)和甜菜碱脂(DGTS)^[58],其中最重要的是发现了硫脂合成酶(SQD)和甜菜碱脂合成酶(BTA),如图 2.海洋蓝藻 *Synechococcus* 和 *Trichodesmium* 等和一些真核藻类如硅藻和球藻等都具有不含磷的硫脂替代富含磷的磷脂(PG)的行为,已经是很多藻类中常见的一种保留磷的行为^[59].磷限制条件下,铜绿微囊藻培养后发现 5 个硫酸盐转运蛋白基因的转录丰度显著增加,说明藻细胞对硫的需求增加,因此藻细胞中的磷可能被保留用作更重要的生命活动^[27].Wurch 等在磷胁迫条件下对 *Aureococcus anophagefferens* 的研究中检测到硫脂生物合成蛋白的丰度增加,并且磷限制下的硫脂的胞内浓度高了近乎两倍,而细胞磷脂(PG)则约低 8 倍,相应的 SQDG 相关基因表达也发生上调,说明磷胁迫下藻类启动的磷脂替代的响应来实现胞内磷的保留^[60].Riekhof 等通过藻类模型中脂肪酸和甘油酯代谢的计算机分析,解释预测了编码参与膜脂合成的代谢反应酶的大多数基因,并鉴定和分离了莱茵衣藻中推定的编码合成甜菜碱脂基因(*BTA1/BTA1_{cr}*)^[61].但是也有在原绿球藻和铜绿微囊藻的磷胁迫研究中并未发现相关硫脂合成基因上调表达^[27, 46].除了上述两个主要的藻细胞磷的重分配行为以外,磷缺乏时核糖体和 rRNA 的含量也会降低,已经有相关转录组和蛋白组研究中观察到培养基中转录物和核糖体的下调,以此来保留磷源用作细胞中的其他生命代谢活动^[44, 52].

磷胁迫下藻对磷重分配的两种方式均体现了藻细胞的环境适应行为,本质上都是将胞内磷保留用作更重要的生命活动.在 PolyP 利用的研究中仅发现 *Vtc* 基因可能参与多聚磷酸盐的代谢,但尚未发现多聚磷酸盐的代谢途径及关键酶.藻类的硫脂及甜菜碱脂代谢途径已经基本确认,说明磷脂替代行为是存在于藻细胞内的,但是胁迫下的基因表达依旧处于推断假定阶段,而且形成磷脂替代的行为条件相对苛刻,在实验设计和技术上有较大难度.

2.4 藻类的磷转运系统的变化响应

磷胁迫下,一些藻类通过提高磷的转运速率或亲和力适应低磷环境,增强对磷的吸收来满足其正常的生长和各种代谢活动,因此藻细胞磷酸盐转运系统的响应也尤其明显,藻类主要通过两种方式提高磷

的转运能力,一是增强磷酸盐转运系统,二是启动高亲和磷酸盐转运系统^[52, 62-63]。

增强磷转运系统以应对低磷环境是藻类普遍的一种响应行为,磷胁迫条件下很多藻类转运相关的基因都会出现上调表达。Dyhrman 等利用转录组和蛋白组研究发现假微海链藻通过产生更多的磷酸盐转运蛋白(PTA)以应对磷限制的情况,而且编码磷酸盐转运蛋白基因也出现表达上调,这可能是由于当环境中可利用磷酸盐含量极少时,藻细胞为了获取更多的磷酸盐分子的应激行为^[52]。Beszteri 等研究磷限制条件下的小定鞭金藻(*Prymnesium parvum*),发现了3个编码磷酸盐转运蛋白基因并均呈现显著上调表达^[64]。有磷胁迫研究得出24 h后微绿球藻中3种编码推断磷酸盐转运蛋白和磷酸钠同向转运蛋白发生了2—16倍上调表达^[26]。

除了增强磷转运,藻细胞在磷限制条件下会启动高亲和磷酸盐转运系统,在原核蓝藻和真核藻类细胞中均有发现。蓝藻中的高亲和力磷酸盐转运系统受 *PstSCAB* 基因控制,其中包括高亲和力结合蛋白(*PstS*)和ATP启动的转运蛋白(*PstABC*),如图2绿色方块所示,这些基因在海洋和淡水中的蓝藻细胞都很常见^[47, 65-66]。通过 *PstS* 感知 P_i 水平的变化,*PstS* 与 *PstABC* 转运蛋白系统相互作用将信号传递至传感器系统。在某些藻类中有完整的 *PstSCAB* 基因在磷胁迫下发生上调表达,而在一些藻类中会出现 *PstS* 和 *PstCAB* 仅有一种发生上调表达,其转运系统并不会完全发生,可能由于磷胁迫的程度不同,藻细胞会自身调控高亲和转运系统的运转以响应胁迫^[42]。因此,Pit 等在磷胁迫早期和极端磷胁迫情况下发现 *PstSCAB* 的不同程度的上调表达,有时仅仅是某个基因发生上调^[67]。Teikari 等对鱼腥藻进行磷胁迫研究得出编码两种 *PstABCs* 转运系统的基因都发生不同程度的上调表达,同时摄取和同化相关的 *pho* 调节子的基因表达水平也有上升^[34]。Orchard 等在3种束毛藻中鉴定出了两个编码高亲和磷酸盐结合蛋白基因(*pstS/sphX*),但是只有 *sphX* 基因在磷胁迫下表现出上调^[41]。Harke 等在铜绿微囊藻的磷胁迫转录组研究中发现,相关磷摄取和转运基因(*phoX/sphX*)在转录丰度上有17—49倍上调表达;高亲和磷酸盐转运系统 *pstSCAB* 基因的转录丰度有1.8—49倍上调表达^[27]。真核藻类中高亲和转运系统的关键是高亲和转运蛋白(*TcPHO*),很多藻类中 *TcPHO* 的转录水平在磷耗尽时出现上调^[48, 54-55, 64],与磷限制条件下诱导高亲和力磷酸转运蛋白丰度增加的结果也很一致。Chung 等在低磷酸盐培养条件下研究周氏扁藻中的高亲和转运蛋白基因 *TcPHO* 转录水平从第一天就急剧上升,并且在4 d内一直保持高水平的转录^[68]。Fu 等在假微海链藻中鉴定出编码高亲和磷酸盐转运蛋白基因(*TpPHO*),磷限制条件下 *TpPHO* 显著上调表达^[69]。

磷胁迫下的藻类的磷转运系统响应的两种方式可能同时存在,也可能只有一种出现,目前研究中磷酸盐转运系统的增强是普遍的,但是高亲和转运系统的响应不灵敏,且基因组成及功能仍待研究,目前还需要更多的分子生物学方面的研究。

3 结论与展望 (Results and outlook)

综上所述,磷胁迫影响着藻类的生长、光合作用以及产毒等各种代谢活动,同时藻类也会对磷胁迫有一定的响应机制,包括藻细胞信号响应系统、不同磷利用机制、藻细胞对磷的重分配行为以及磷转运系统响应。在生长代谢影响方面,目前的研究大多还是停留在表观生理层面,没有深入到分子生物学水平,并且其中如光合作用和一些中枢代谢的机理也尚未完全清楚。而在藻细胞响应机制的研究中,对于藻细胞的磷转运系统研究较多,不同磷利用机制中主要是关于碱性磷酸酶的研究,缺少其他磷利用相关酶或基因的研究,在某些藻类中的磷脂替代也研究得相对完善,但是还有待补充。此外,目前的研究大多处于实验室培养条件下,与实际水体中的磷胁迫响应有一定的区别。随着分子生物学的研究手段不断发展,通过表观生理学和分子生物学的结合,对于藻类对磷胁迫的响应和适应机制的机理研究提供更多的理论依据。

参考文献 (References)

- [1] TYRRELL T. The relative influences of nitrogen and phosphorus on oceanic primary production[J]. *Nature*, 1999, 400(6744): 525-531.
- [2] BJERRUM C J, CANFIELD D E. Ocean productivity before about 1.9Gyr ago limited by phosphorus adsorption onto iron oxides[J]. *Nature (London)*, 2002, 417(6885): 159-162.
- [3] SMITH V H. Low nitrogen to phosphorus ratios favor dominance by blue-green algae in Lake phytoplankton[J]. *Science*, 1983, 221

- (4611): 669-671.
- [4] HECKY R E, KILHAM P. Nutrient limitation of phytoplankton in freshwater and marine environments: A review of recent evidence on the effects of enrichment[J]. *Limnology and Oceanography*, 1988, 33(4): 796-822.
- [5] WILHELM S W, DEBRUYN J M, GILLOR O. Effect of phosphorus amendments on present day plankton communities in pelagic Lake Erie [J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 2003, 32(3): 275-285.
- [6] PETERS B R H. The relationship between chemically analyzed phosphorus fractions and bioavailable phosphorus[J]. *Limnology and Oceanography*, 1987, 32(5): 1124-1137.
- [7] KOLOWITH L C, BENNER I R. Composition and cycling of marine organic phosphorus[J]. *Limnology and Oceanography*, 2001, 46(2): 309-320.
- [8] TAKEDA E, TAKETANI Y, NASHIKI K, et al. A novel function of phosphate-mediated intracellular signal transduction pathways[J]. *Advances in Enzyme Regulation*, 2006, 46(1): 154-161.
- [9] PAYTAN A, MCLAUGHLIN K. The oceanic phosphorus cycle[J]. *Chemical Reviews*, 2007, 107(2): 563-576.
- [10] XIUXIU W, BANGQIN H, HUAN Z. Phosphorus deficiency affects multiple macromolecular biosynthesis pathways of *Thalassiosira weissflogii*[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2014, 33(4): 85-91.
- [11] DYHRMAN S, AMMERMAN J, VAN MOOY B. Microbes and the marine phosphorus cycle[J]. *Oceanography*, 2007, 20(2): 110-116.
- [12] LIN X, ZHANG H, HUANG B, et al. Alkaline phosphatase gene sequence characteristics and transcriptional regulation by phosphate limitation in *Karenia brevis* (Dinophyceae)[J]. *Harmful Algae*, 2012, 17: 14-24.
- [13] RUTTENBERG K C, DYHRMAN S T. Dissolved organic phosphorus production during simulated phytoplankton blooms in a coastal upwelling system[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3: 274.
- [14] LINJIAN O, XIAOYUN H, BANGQIN H, et al. Growth and competition for different forms of organic phosphorus by the dinoflagellate *Prorocentrum donghaiense* with the dinoflagellate *Alexandrium catenella* and the diatom *Skeletonema costatum* s.l.[J]. *Hydrobiologia*, 2014, 754(1): 29-41.
- [15] DYHRMAN S T, CHAPPEIL P D, HALEY S T, et al. Phosphonate utilization by the globally important marine diazotroph trichodesmium [J]. *Nature*, 2006, 439(7072): 68-71.
- [16] LIN X, ZHANG H, HUANG B, et al. Alkaline phosphatase gene sequence and transcriptional regulation by phosphate limitation in *Amphidinium Carterae* (Dinophyceae)(1)[J]. *J Phycol*, 2011, 47(5): 1110-1120.
- [17] SEBASTIAN M, AMMERMAN J W. The alkaline phosphatase PhoX is more widely distributed in marine bacteria than the classical PhoA [J]. *ISME Journal*, 2009, 3(5): 563-572.
- [18] KAGEYAMA H, TRIPATHI K, RAI A K, et al. An alkaline phosphatase/phosphodiesterase, PhoD, induced by salt stress and secreted out of the cells of *Aphanothece halophytica*, a halotolerant cyanobacterium[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(15): 5178-5183.
- [19] DYHRMAN S T. Nutrients and their acquisition phosphorus physiology in microalgae[M]. *The Physiology of Microalgae*: Springer International Publishing, 2016.
- [20] MARCHETTI A, SCHRUTH D M, DURKIN C A, et al. Comparative metatranscriptomics identifies molecular bases for the physiological responses of phytoplankton to varying iron availability[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(6): E317-E325.
- [21] BAWA P, ZACKARIA S, VERMA M, et al. Integrative analysis of normal long intergenic non-coding RNAs in prostate cancer[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0122143.
- [22] TAYLOR F J R, HOPPENRATH M, SALDARRIAGA J F. Dinoflagellate diversity and distribution[J]. *Biodiversity and Conservation*, 2007, 17(2): 407-418.
- [23] SHOGUCHI E, SHINZATO C, KAWASHIMA T, et al. Draft assembly of the *Symbiodinium minutum* nuclear genome reveals dinoflagellate gene structure[J]. *Current Biology*, 2013, 23(15): 1399-1408.
- [24] COLLIER J L, GROSSMAN A R. Chlorosis induced by nutrient deprivation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: Not all bleaching is the same[J]. *Journal of Bacteriology*, 1992, 174(14): 4718-4726.
- [25] SAJEELA GHAFFAR R J S, ZAHIRUDDIN K. Effect of phosphorus stress on *Microcystis aeruginosa* growth and phosphorus uptake[J]. *Plos One*, 2017, 12(3): e0174349.
- [26] MUHLROTH A, WINGE P, EL ASSIMI A, et al. Mechanisms of phosphorus acquisition and lipid class remodeling under P limitation in a marine microalga[J]. *Plant Physiology*, 2017, 175(4): 1543-1559.
- [27] HARKE M J, GOBLER C J. Global transcriptional responses of the toxic cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*, to nitrogen stress, phosphorus stress, and growth on organic matter[J]. *Plos One*, 2013, 8(7): e69834.
- [28] HARKE M J, JUHL A R, HALEY S T, et al. Conserved transcriptional responses to nutrient stress in bloom-forming algae[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1279.
- [29] WANG Y, YU J, WANG P, et al. Response of energy microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* to nitrogen and phosphorus stress[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2018, 25(6): 5762-5770.
- [30] SHENG L, ZHILING G, TAO L, et al. Photosynthetic efficiency, cell volume, and elemental stoichiometric ratios in *Thalassiosira*

- weissflogii* under phosphorus limitation[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2011, 29(5): 1048-1056.
- [31] CHAO Z, SENJIE L, LIANGMIN H, et al. Suppression subtraction hybridization analysis revealed regulation of some cell cycle and toxin genes in *Alexandrium catenella* by phosphate limitation[J]. Harmful Algae, 2014, 39: 26-39.
- [32] MARCUS Y, GUREVITZ M. Activation of cyanobacterial RuBP-carboxylase/oxygenase is facilitated by inorganic phosphate via two independent mechanisms[J]. FEBS Journal, 2010, 19(267): 5995-6003.
- [33] 张树峰. 中国近海典型藻华种对环境磷变化响应的转录组学研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2016.
- SHUFENG Z. Transcriptomic analysis of typical algal bloom species in the coast of China sea reveals the response mechanisms to changing ambient phosphorus[D]. Xiamen: Xiamen University, 2016(in Chinese).
- [34] TEIKARI J, OSTERHOLM J, KOPF M, et al. Transcriptomic and proteomic profiling of *Anabaena* sp. Strain 90 under Inorganic phosphorus stress[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(15): 5212-5222.
- [35] PIMENTEL J S, GIANI A. Microcystin production and regulation under nutrient stress conditions in toxic microcystis strains[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(18): 5836-5843.
- [36] STEFFEN M M, DEARTH S P, DILL B D, et al. Nutrients drive transcriptional changes that maintain metabolic homeostasis but alter genome architecture in *Microcystis*[J]. ISME Journal, 2014, 8(10): 2080-2092.
- [37] LUDWIG M, BRYANT D A. Acclimation of the global transcriptome of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain PCC 7002 to nutrient limitations and different nitrogen sources[J]. Frontiers in Microbiology, 2012, 3: 145.
- [38] HARKE M J, GOBLER C J. Daily transcriptome changes reveal the role of nitrogen in controlling microcystin synthesis and nutrient transport in the toxic cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*[J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 1068.
- [39] VANUCCI S, GUERRINI F, MILANDRI A, et al. Effects of different levels of N- and P-deficiency on cell yield, okadaic acid, DTX-1, protein and carbohydrate dynamics in the benthic dinoflagellate *Prorocentrum lima*[J]. Harmful Algae, 2010, 9(6): 590-599.
- [40] KAMALANATHAN M, PIERANGELINI M, SHEARMAN L A, et al. Impacts of nitrogen and phosphorus starvation on the physiology of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Journal of Applied Phycology, 2016, 28(3): 1509-1520.
- [41] ORCHARD E D, WEBB E A, DYHRMAN S T. Molecular analysis of the phosphorus starvation response in *Trichodesmium* spp[J]. Environmental Microbiology, 2009, 11(9): 2400-2411.
- [42] MARTINY A C, COLEMAN M L, CHISHOLM S W. Phosphate acquisition genes in *Prochlorococcus* ecotypes: Evidence for genome-wide adaptation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006, 103(33): 12552-12557.
- [43] FENG T Y, YANG Z K, ZHENG J W, et al. Examination of metabolic responses to phosphorus limitation via proteomic analyses in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 10373.
- [44] TETU S G, BRAHAMSHA B, JOHNSON D A, et al. Microarray analysis of phosphate regulation in the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. WH8102[J]. ISME Journal, 2009, 3(7): 835-849.
- [45] SU Z, OLMAN V, XU Y. Computational prediction of Pho regulons in cyanobacteria[J]. BMC Genomics, 2007, 8: 156.
- [46] REISTETTER E N, KRUMHARDT K, CALLNAN K, et al. Effects of phosphorus starvation versus limitation on the marine cyanobacterium *Prochlorococcus* MED4 II: Gene expression[J]. Environmental Microbiology, 2013, 15(7): 2129-2143.
- [47] SCANLAN D J, OSTROWSKI M, MAZARD S, et al. Ecological genomics of marine picocyanobacteria[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2009, 73(2): 249-299.
- [48] FRISCHKORN K R, HARKE M J, GOBLER C J, et al. De novo assembly of *Aureococcus anophagefferens* transcriptomes reveals diverse responses to the low nutrient and low light conditions present during blooms[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 375.
- [49] 刘朝莹. 鱼腥藻 FACHB709 碱性磷酸酶基因无机磷饥饿应答调控反应[D]. 镇江: 江苏大学, 2012.
- CHAOYING L. The response of alkaline Phosphatases genes in the cyanobacterium *Anabaena* P.EACHB 709 to inorganic phosphorus starvation[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2012(in Chinese).
- [50] KATHURIA S, MARTINY A C. Prevalence of a calcium-based alkaline phosphatase associated with the marine cyanobacterium *Prochlorococcus* and other ocean bacteria[J]. Environmental Microbiology, 2011, 13(1): 74-83.
- [51] YAMAGUCHI H, ARISAKA H, OTSUKA N, et al. Utilization of phosphate diesters by phosphodiesterase-producing marine diatoms[J]. Journal of Plankton Research, 2014, 36(1): 281-285.
- [52] DYHEMAN S T, JENKINS B D, RYNEARSON T A, et al. The transcriptome and proteome of the diatom *Thalassiosira pseudonana* reveal a diverse phosphorus stress response[J]. Plos One, 2012, 7(3): e33768.
- [53] ALEXANDER H, JENKINS B D, RYNEARSON T A, et al. Metatranscriptome analyses indicate resource partitioning between diatoms in the field[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015, 112(17): E2182-E2190.
- [54] DYHRMAN S T, HALEY S T, BIRKELAND S R, et al. Long serial analysis of gene expression for gene discovery and transcriptome profiling in the widespread marine coccolithophore *Emiliania huxleyi*[J]. Applied Environmental Microbiology, 2006, 72(1): 252-260.
- [55] WURCH L L, HALEY S T, ORCHARD E D, et al. Nutrient-regulated transcriptional responses in the brown tide-forming alga *Aureococcus anophagefferens*[J]. Environmental Microbiology, 2011, 13(2): 468-481.
- [56] MARTINEZ A, OSBURNE M S, SHARMA A K, et al. Phosphite utilization by the marine picocyanobacterium *Prochlorococcus* MIT9301 [J]. Environmental Microbiology, 2012, 14(6): 1363-1377.

- [57] MARIA R G, LOSADA M, SERRANO A. Concurrent transcriptional activation of ppa and ppx genes by phosphate deprivation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 302(3): 601-609.
- [58] MERCHANT S S, HELMANN J D. Elemental economy: Microbial strategies for optimizing growth in the face of nutrient limitation[J]. *Advances in Microbial Physiology*, 2012, 60: 91-210.
- [59] VAN MOOY B A, FREDRICKS H F, PEDLER B E, et al. Phytoplankton in the ocean use non-phosphorus lipids in response to phosphorus scarcity[J]. *Nature*, 2009, 458(7234): 69-72.
- [60] WURCH L L, BERTRAND E M, SAITO M A, et al. Proteome changes driven by phosphorus deficiency and recovery in the brown tide-forming alga *Aureococcus anophagefferens*[J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e28949.
- [61] RIEKHOF W R, SEARS B B, BENNING C. Annotation of genes involved in glycerolipid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*: Discovery of the betaine lipid synthase BTA1Cr[J]. *Eukaryot Cell*, 2005, 4(2): 242-252.
- [62] MOORE L R, OSTROWSKI M, SCANLAN D J. Ecotypic variation in phosphorus acquisition mechanisms within marine picocyanobacteria [J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 2005, 39(3): 257-269.
- [63] SCANLAN D J, WILSON W H. Application of molecular techniques to addressing the role of P as a key effector in marine ecosystems[J]. *Hydrobiologia*, 1999, 401: 149-175.
- [64] BESZTERI S, YANG I, JAECKISCH N, et al. Transcriptomic response of the toxic prymnesiophyte *Prymnesium parvum* (N. Carter) to phosphorus and nitrogen starvation[J]. *Harmful Algae*, 2012, 18:1-15.
- [65] SINHA R, PEARSON L A, DAVIS T W. Comparative genomics of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains with differential toxicities[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 83.
- [66] HARKE M J, BERRY D L, AMMERMAN J W, et al. Molecular response of the bloom-forming cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*, to phosphorus limitation[J]. *Microbial Ecology*, 2012, 63(1): 188-198.
- [67] PITT F D, MAZARD S, HUMPHREYS L, et al. Functional characterization of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 pst1 and pst2 gene clusters reveals a novel strategy for phosphate uptake in a freshwater cyanobacterium [J]. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(13): 3512-3523.
- [68] CHUNG C C, HWANG S P L, CHANG J. Identification of a high-affinity phosphate transporter gene in a *Prasinophyte alga*, *Tetraselmis chui*, and its expression under nutrient limitation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(2): 754-759.
- [69] FU M, SONG X, YU Z, et al. Responses of phosphate transporter gene and alkaline phosphatase in *Thalassiosira pseudonana* to phosphine [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e59770.