

doi:10.3969/j.issn.2095-1736.2018.04.044

代谢中间物对斜生栅藻叶绿素荧光特性 以及油脂积累的研究

成杰^{1,3}, 武迪¹, 钱改改¹, 巩东辉^{1,2}, 苏勇宁⁵, 陈高⁴, 季祥^{1,2}

- (1. 内蒙古科技大学 生命科学与技术学院, 包头 014010; 2. 内蒙古自治区生物质能源化利用
重点实验室, 包头 014010; 3. 厦门大学 海洋与地球学院, 厦门 361000;
4. 山东省农业科学院 生物技术研究中心, 济南 250000;
5. 内蒙古再回首生物工程有限公司, 鄂尔多斯 016100)

摘要 为了研究代谢中间物(柠檬酸与苹果酸)的添加对斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus* XJ002)光合效率以及胞内油脂积累的影响,研究了代谢中间物的添加对XJ002藻株生物量、光合色素、叶绿素荧光特性以及胞内总脂含量的影响。结果表明:添加高浓度代谢中间物导致藻细胞生物量与光合色素含量显著下降,损坏藻细胞光系统II反应中心供体侧的放氧复合体(OEC)结构,抑制光系统II反应中心受体侧电子传递活性。当柠檬酸与苹果酸处理浓度为0.15 g/L时,XJ002藻株胞内总脂含量是对照组的1.85倍和1.34倍。高浓度代谢中间物的添加,显著提高了XJ002藻株胞内总脂含量,与苹果酸相比,柠檬酸的添加效果更佳。

关键词 柠檬酸;苹果酸;斜生栅藻;叶绿素荧光;总脂

中图分类号 Q949.2; S216.2

文献标识码 A

文章编号 2095-1736(2018)04-0044-05

Effects of metabolic intermediates on chlorophyll fluorescence and total lipid content of *Scenedesmus obliquus* XJ002

CHENG Jie^{1,3}, WU Di¹, QIAN Gai-gai¹, GONG Dong-hui^{1,2},
SU Yong-ning⁵, CHEN Gao⁴, JI Xiang^{1,2}

- (1. School of Life Science and Technology, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014010;
2. Inner Mongolia Key Laboratory of Biomass-Energy Conversion, Baotou 014010;
3. College of Ocean and Earth Sciences, Xiamen University, Xiamen 361000;
4. Biotechnology Research Center, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250000;
5. Inner Mongolia Rejuve Biotech Limited Company, Ordos 016100, China)

Abstract In order to study the effects of exogenous metabolic intermediates on photosynthetic efficiency and total lipid content in *Scenedesmus obliquus* XJ002, we added metabolic intermediates (citric acid and malic acid) to study biomass, photosynthetic pigments, chlorophyll fluorescence characteristics and lipid content of XJ002. The results showed that the addition of high concentrations of metabolic intermediates resulted in a significant decrease in biomass, chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoid content. The high concentration treatments could damage the oxygen evolving complex at the donor side of reaction center of photosystem II, and inhibited electron transfer activity of receptor side of reaction center of photosystem II. The addition of intermediate metabolites resulted in a significant increase in the total lipid content of XJ002. When the concentration of citric acid and malic acid was 0.15 g/L, the total lipid content was 1.85 and 1.34 folds higher than the control group. The addition of high concentration of metabolic intermediates results in a significant increase in total lipid content in the cell of XJ002. Compared with malic acid, citric acid has the better effect.

Keywords citric acid; malic acid; *Scenedesmus obliquus*; chlorophyll fluorescence; total lipid

收稿日期:2017-05-22;修回日期:2017-06-13

基金项目:国家自然科学基金(41666007);内蒙古自治区科技计划项目(201601061);内蒙古科技大学大学生创新基金

作者简介:成杰,在读博士,主要从事海洋微藻研究,E-mail:15049210053@163.com

通信作者:季祥,博士,教授,主要从事生物质能、能源微藻研究,E-mail:jixiang@imust.cn

能源是推动人类社会发展的基础,化石能源的使用同时也带来了环境污染、温室效应等严重的问题^[1-2]。生物燃料(Biofuel)由于环境友好、可再生性而备受关注^[3-4]。生物柴油作为液体燃料可直接应用于柴油机等常规设备^[5]。能源微藻具有光合效率高、成本低、含油量高、生产效率高优点^[6-9],被认为是未来生物柴油的主要原料^[10-11]。目前微藻生物柴油成本较高^[12],而降低能源微藻成本的关键在于:1)选育获得高效适合工业化生产的藻株;2)建立利用低成本规模微藻培养技术和设备;3)进一步提高藻细胞内的油脂含量。

通过调控藻细胞油脂代谢途径来提高藻细胞油脂积累是目前研究的热点。本研究选取了苹果酸、柠檬酸两个中间代谢物,通过调控与乙酰辅酶 A 相关的代谢反应,促使代谢流向油脂合成的方向移动,为进一步揭示油脂代谢中的关键调控因子,为促进微藻生物能源研究提供参考。

1 材料与实验方法

1.1 实验材料及处理

藻种斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus* XJ002)为内蒙古自治区生物质能源化利用重点实验室保存。取若干个 250 mL 锥形瓶,分别向其中加入一定数量的经高压蒸汽灭菌 BG11 培养基以及柠檬酸、苹果酸储备液,使每个锥形瓶中柠檬酸、苹果酸的终浓度分别为 0.00、0.01、0.05 和 0.15 g/L,每组重复 3 次。然后加入 XJ002 藻株,摇匀,藻液的最终体积为 150 mL,初始 OD_{680} 值为 0.270,置于光照培养箱中培养。培养温度为 $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$,光照强度 4800 lx,光暗周期 14 h:10 h,静置培养,每天定时摇匀 3 次,并每隔 24 h 改变各锥形瓶的位置。

1.2 实验方法

藻细胞内光合色素的提取参照 Sartory 等^[13]方法。藻细胞叶绿素荧光特性通过植物效率分析仪(PEA, Hansatech)测定。测定前,取不同处理组的藻细胞,利用 BG11 基础培养基将各个处理组的吸光度 OD_{680} 调成同一水平,并置于暗环境中 30 min,在暗环境中进行测定操作。各荧光参数的意义见表 1。取培养至对数生长期后期的各处理组藻液适量,尼罗红染色测定藻细胞内油脂含量(%)。

2 结果与讨论

2.1 代谢中间物的添加对 XJ002 藻株生物量的影响

图 1 表示在藻细胞一个培养周期(15 d)内,柠檬酸与苹果酸对 XJ002 藻细胞生物量的影响。由图 1 可知,从第 2 天开始,不同浓度柠檬酸与苹果酸处理对藻细胞生物量的影响表现出一定的差异。低浓度的柠檬酸与苹果酸处理对藻细胞生长影响不大,高浓度的柠檬酸与苹果酸处理,藻细胞的生长状态受到明显的抑

制。0.15 g/L 的苹果酸与柠檬酸处理组的藻细胞生物量比对照组分别降低了 23.08% 和 21.21% ($P < 0.01$)。藻细胞只有在一定的 pH 值范围内(7.7 ~ 9.4)才可以保持良好的生长状况,超出这个范围,藻细胞的各项生理功能会受到影响,导致藻细胞生长缓慢,甚至引起藻细胞的死亡。外源柠檬酸与苹果酸的加入会降低培养基中的 pH 值,培养基中过低的 pH 值对藻细胞的生长代谢、光合作用以及藻细胞对营养盐的摄取都会产生显著地影响。

表 1 JIP - 测定所用的快速叶绿素荧光诱导动力学曲线(O-J-I-P)的参数

Table 1 Formulae and glossary of terms used in the JIP-test in the analysis of the O-J-I-P fluorescence transient

参数	说明
F_v/F_m	PSII 反应中心最大光能转化效率
$Plabs$	光性能指数
ABS/RC	PSII 单位反应中心吸收的光能
DI_o/RC	PSII 反应中心吸收的光能中用于热耗散的能量
ET_o/RC	PSII 反应中心吸收的光能中用于电子传递的能量
V_j	在 J 点的相对可变荧光强度
M_o	O-J-I-P 荧光诱导曲线的初始斜率
S_m	标准化后的 O-J-I-P 荧光诱导曲线、荧光强度 $F = F_M$ 及 y 轴之间的面积
ET_o/TR_o	反应中心捕获的激子中用来推动电子传递到电子传递链中超过 Q_A 的其他电子受体的激子占用来推动 Q_A 还原激子的比率(在 $t = 0$ 时)
ET_o/ABS	用于电子传递的量子产额(在 $t = 0$ 时)

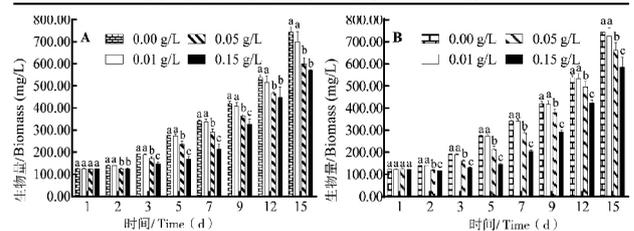


图 1 不同浓度代谢中间物处理对 XJ002 藻细胞生长的影响

Fig 1 Effect of various concentrations of metabolic intermediates on the biomass of *Scenedesmus obliquus* XJ002

A: 柠檬酸; B: 苹果酸

2.2 代谢中间物的添加对 XJ002 藻株光合色素的影响

表 2 表明,不同浓度柠檬酸与苹果酸处理条件下, XJ002 藻株胞内的光合色素具有显著的差异。低浓度的柠檬酸与苹果酸处理对藻细胞光合色素的积累具有轻微的促进作用,随着柠檬酸与苹果酸浓度的增加,叶绿素 a、叶绿素 b 以及类胡萝卜素均出现下降的总体趋势。与对照组相比,0.15 g/L 柠檬酸处理时,叶绿素 a 与类胡萝卜素分别下降了 45.02% 和 48.92% ($P < 0.01$)。当 0.15 mol/L 苹果酸处理时,叶绿素 a 与类胡萝卜素分别下降了 40.70% 和 43.25% ($P < 0.01$)。与苹果酸相比,柠檬酸降低的幅度更大。叶绿素 a 作为捕光色素蛋白复合体的重要组分与光合作用密切相

关。研究表明,高浓度的柠檬酸与苹果酸处理会降低藻细胞内光合色素含量,导致光合效率的下降,进而抑制藻细胞的生长。

表 2 不同浓度柠檬酸与苹果酸对斜生栅藻细胞内光合色素含量的影响

Table 2 Effect of various concentrations of citric acid and malic acid on the photosynthetic pigments of *Scenedesmus obliquus* XJ002

处理 Treatments (g/L)	叶绿素 a Chlorophyll - a ($\mu\text{g/mL}$)	叶绿素 b Chlorophyll-b ($\mu\text{g/mL}$)	叶绿素 (a + b) Chl (a + b) ($\mu\text{g/mL}$)	类胡萝卜素 Carotenoids ($\mu\text{g/mL}$)	叶绿素 a/b Chl a/b	类胡萝卜素 叶绿素 (a + b) Caro/Chl (a + b)
0.00	4.287 \pm 0.037	1.407 \pm 0.135	5.695 \pm 0.172	2.134 \pm 0.043	3.059 \pm 0.268	0.375 \pm 0.004
柠檬酸 Citric acid	0.01	4.751 \pm 0.004	1.324 \pm 0.018	6.075 \pm 0.014	2.272 \pm 0.009	0.374 \pm 0.002
	0.05	2.370 \pm 0.459	0.659 \pm 0.219	3.029 \pm 0.678	1.235 \pm 0.288	0.407 \pm 0.004
	0.15	2.357 \pm 0.463	0.612 \pm 0.201	2.969 \pm 0.664	1.090 \pm 0.187	0.370 \pm 0.020
	0.01	5.043 \pm 0.206	1.463 \pm 0.137	6.506 \pm 0.344	2.478 \pm 0.157	0.381 \pm 0.004
苹果酸 Malic acid	0.05	2.731 \pm 0.011	0.631 \pm 0.083	3.362 \pm 0.072	1.304 \pm 0.064	0.388 \pm 0.011
	0.15	2.542 \pm 0.065	0.644 \pm 0.012	3.186 \pm 0.077	1.211 \pm 0.012	0.380 \pm 0.013

2.3 添加外源代谢中间物对 XJ002 藻株叶绿素荧光参数的影响

2.3.1 添加外源代谢中间物对 XJ002 藻株叶绿素荧光诱导动力学曲线的影响

由图 2 可知,不同浓度中间代谢物处理 15 d 后各处理组的快速叶绿素荧光诱导动力学曲线有着显著的差异。低浓度的柠檬酸与苹果酸处理下,藻细胞快速叶绿素荧光诱导动力学曲线较为集中,随着柠檬酸与苹果酸处理浓度的增加,曲线依次呈现出下降的总体趋势。低浓度的柠檬酸处理组的曲线与对照组有轻微的差异,而低浓度的苹果酸处理组的曲线与对照组基本没有差异,说明藻细胞对柠檬酸的毒性效应更敏感。

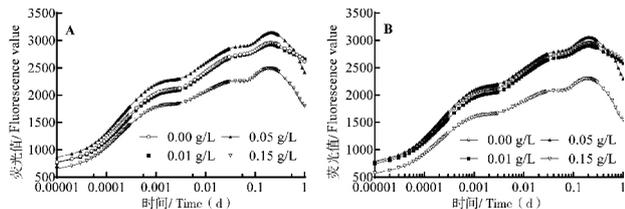


图 2 不同浓度代谢中间物处理对 XJ002 藻细胞叶绿素荧光诱导曲线的影响

Fig 2 Effects of various concentrations of metabolic intermediates on the chlorophyll fluorescence induction curve of *Scenedesmus obliquus* XJ002

A: 柠檬酸; B: 苹果酸

2.3.2 代谢中间物的添加对 XJ002 藻株光合作用光系统 II 反应中心供体侧的影响

W_k 值是衡量藻细胞 PSII 反应中心供体侧放氧复合体是否受损的唯一指标, W_k 值的增加说明 PSII 反应中心供体侧的放氧复合体受损,进而影响了 PSII 反应中心供应电子的能力以及向下游传递电子的效率。由图 3 可知,低浓度的柠檬酸与苹果酸处理导致藻细胞 W_k 值出现轻微下降的趋势,高浓度的柠檬酸与苹果酸处理引起藻细胞 W_k 值出现显著增加,当 0.15 g/L 柠檬酸与苹果酸处理藻细胞时, W_k 值分别是对照组的 1.037 倍和 1.021 倍 ($P < 0.05$)。结果表明高浓度的柠檬酸与苹果酸处理破坏了 PSII 反应中心供体侧的放氧复合体结构。

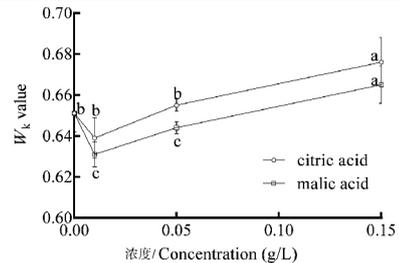


图 3 不同浓度代谢中间物处理对 XJ002 藻株光系统 II 反应中心供体侧 W_k 值的影响

Fig 3 Effect of various concentrations of metabolic intermediates on W_k of the donor side in photosystem II

2.3.3 代谢中间物的添加对 XJ002 藻株光合作用光系统 II 反应中心的影响

1) 代谢中间物的添加对光系统 II 最大光化学效率 (F_v/F_m) 以及基于吸收光的光性能指数 (PI_{abs}) 的影响。PSII 反应中心最大光化学效率 (F_v/F_m) 通常被用于反映 PSII 光化学效率以及预测植物胁迫程度。一般而言, F_v/F_m 值在非胁迫条件下基本保持不变,而且不受物种与环境的影响。当藻细胞受到外界环境胁迫时, F_v/F_m 值会出现显著变化,因而可以作为细胞受到胁迫的指示器。本研究中,不同浓度有机酸处理下, F_v/F_m 值基本保持不变;低浓度的有机酸处理对光性能指数 (PI_{abs}) 的影响不大,高浓度的有机酸处理导致 PI_{abs} 呈现出下降的趋势。由图 4 可知,与对照组相比,当 0.15 g/L 柠檬酸与苹果酸处理藻细胞时, PI_{abs} 值分别降低了 16.44% 和 0.34%。

2) 代谢中间物的添加对 XJ002 藻株光合作用光系统 II 反应中心能量分配的影响。 ABS/RC 是指单位反应中心吸收的光能, DIO/RC 是指反应中心用于热耗散的能量, ETo/RC 是指反应中心用于电子传递的能量。由图 5 可知,外源柠檬酸处理对光系统 II (PSII) 反应中心能量分配影响不大。随着柠檬酸处理浓度的增加, ABS/RC 基本不变, DIO/RC 基本不变, ETo/RC 有所降低。当 0.15 g/L 柠檬酸处理藻细胞时, ETo/RC 值比对照组分别降低了 4.66% ($P < 0.01$)。外源苹

果酸处理对光系统 II (PSII) 反应中心能量分配基本没有影响。

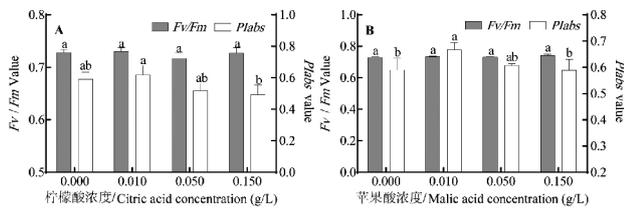


图 4 不同浓度代谢中间物处理对光系统 II 最大光化学效率 (F_v/F_m) 以及基于吸收光的光性能指数 ($Plabs$) 的影响

Fig 4 F_v/F_m value and $Plabs$ value under various concentrations of metabolic intermediates

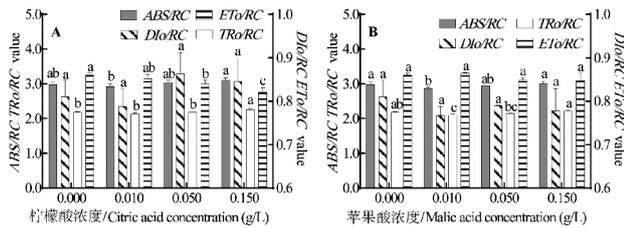


图 5 不同浓度代谢中间物处理对光系统 II 反应中心能量分配的影响

Fig 5 Effects of various concentrations of metabolic intermediates on the energy distribution of reaction centers in photosystem II

2.3.4 代谢中间物的添加对 XJ002 藻株光合作用光系统 II 反应中心受体侧电子传递活性的影响

由图 6 - A 可知,随着柠檬酸处理浓度的增加, ETo/ABS 与 ETo/TRo 出现降低的总体趋势,当 0.15 g/L 柠檬酸处理藻细胞时, ETo/ABS 值与 ETo/TRo 值比对照组分别降低了 8.24% 和 8.10% ($P < 0.01$)。由图 6 - B 可知,外源苹果酸处理对 ETo/ABS 值影响不大,随着苹果酸处理浓度的增加, ETo/TRo 出现降低的总体趋势,当 0.15 g/L 柠檬酸处理藻细胞时, ETo/TRo 值比对照组分别降低了 3.50%。图 6 - C 可知, Mo 随着柠檬酸处理浓度的增加表现出上升的总体趋势,各处理组间差异显著 ($P < 0.01$)。当柠檬酸处理浓度为 0.15 g/L 时, Mo 值是对照组的 1.09 倍 ($P < 0.01$); Sm 随着柠檬酸处理浓度的增加表现出上升的总体趋势,各处理组间差异显著 ($P < 0.01$)。当柠檬酸处理浓度为 0.15 g/L 时, Sm 值是对照组的 1.13 倍 ($P < 0.01$)。当柠檬酸处理浓度为 0.15 g/L 时, V_j 值是对照组的 1.05 倍 ($P < 0.01$)。图 6 - D 可知,高浓度的苹果酸处理浓度的增加导致 Mo 、 Sm 、 V_j 值均存在增加的趋势,各处理组间差异显著 ($P < 0.01$)。当苹果酸处理浓度为 0.15 g/L 时, Mo 、 Sm 、 V_j 值是分别是对照组的 1.04、1.13 和 1.23 倍 ($P < 0.01$)。

代谢中间物的添加使得 XJ002 藻细胞叶绿素荧光动力学曲线降低,与此同时,导致了許多荧光参数的改变。 W_k 值的增加说明 PSII 反应中心供体侧的放氧复合体受损,进而影响了 PSII 反应中心供应电子的能力

以及向下游传递电子的效率。代谢中间物的添加对光系统 II (PSII) 反应中心能量分配基本没有影响。但是,外源柠檬酸与苹果酸处理导致有活性的反应中心反应数量降低,中心吸收的光能更多地被用于 Q_A 的还原,使得 Q_A 被还原的速度加快了。这将会导致藻细胞内大量积累 Q_A^- ,从而对藻细胞产生毒害作用。

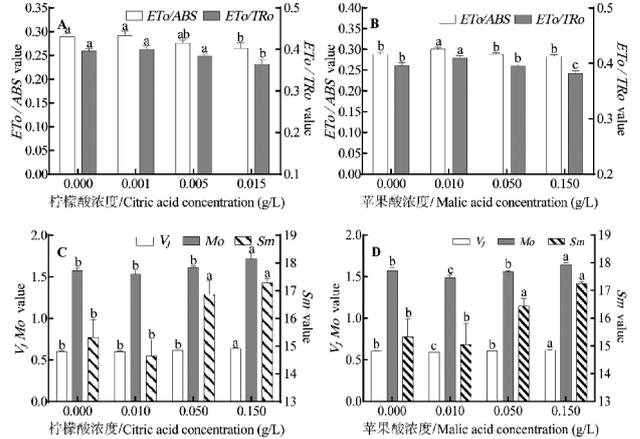


图 6 不同浓度代谢中间物处理对光系统 II 反应中心受体侧电子传递活性的影响

Fig 6 Effects of various concentrations of metabolic intermediates on the electron transport activity of the acceptor side in photosystem II

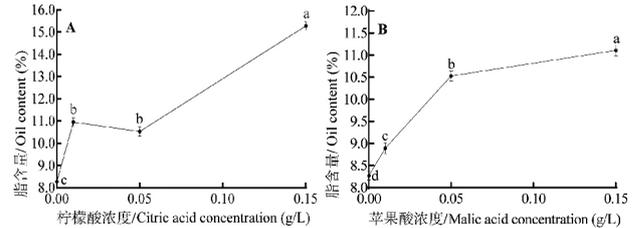


图 7 不同浓度代谢中间物处理对 XJ002 藻细胞总脂含量的影响

Fig 7 Effects of various concentrations of metabolic intermediates on the total lipid content of *Scenedesmus obliquus* XJ002

2.4 添加外源代谢中间物对 XJ002 藻株胞内总脂含量的影响

由图 7 可知,外源柠檬酸与苹果酸的添加对 XJ002 藻细胞总脂含量产生了显著的影响。随着柠檬酸、苹果酸处理浓度的增加, XJ002 藻株胞内总脂含量 (%) 会有显著提高。当柠檬酸与苹果酸处理浓度为 0.15 g/L 时, XJ002 藻株胞内总脂含量是对照组的 1.85 倍和 1.34 倍。与苹果酸相比,柠檬酸的处理效果更佳。

各种脂肪酸从头合成途径中,合成的原料是各种代谢过程产生的乙酰辅酶 A,通过调控培养条件,研究细胞内碳原子的流向,引导碳代谢流向油脂合成的方向。通过对油脂合成起主要作用的碳代谢途径分析,本研究选取了苹果酸、柠檬酸两个代谢中间物,它们在胞内均可通过参与三羧酸循环调控乙酰辅酶 A 的代谢,后者可以用于藻细胞油脂的合成。结果表明,外源柠檬酸与苹果酸的添加可以提高 XJ002 藻细胞总脂含

量 外源添加低浓度的柠檬酸与苹果酸 强化了藻细胞内碳代谢途径,在保证藻细胞生物量基本保持不变的情况下还可以进一步促进藻细胞内总脂的含量。除此之外,高浓度的柠檬酸与苹果酸的添加抑制了藻细胞的光合作用,使得胞内更多的碳原子用于中性脂的合成,从而使得总脂的含量有了一定程度的提高。

3 结论

高浓度柠檬酸与苹果酸的添加导致 XJ002 藻细胞生物量、叶绿素 a、叶绿素 b 以及类胡萝卜素含量显著下降。与此同时 破坏了光系统 II 反应中心供体侧放氧复合体的结构,抑制了反应中心供体侧和受体侧电子传递活性,显著提高了 XJ002 藻株胞内总脂含量,与苹果酸相比 柠檬酸的添加效果更佳。

参考文献

[1]HÖÖK M, TANG X. Depletion of fossil fuels and anthropogenic climate change—A review[J]. *Energy Policy*, 2013, 52: 797–809.
[2]CHIARI L, ZECCA A. Constraints of fossil fuels depletion on global warming projections [J]. *Energy Policy*, 2011, 39 (9): 5026–5034.
[3]李元广, 谭天伟, 黄英明. 微藻生物柴油产业化技术中的若干科学问题及其分析[J]. *中国基础科学*, 2009, 11 (5): 64–70.
[4]CUTZ L, HARO P, SANTANA D, et al. Assessment of biomass energy sources and technologies: the case of central America [J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2016, 58: 1411–1431.

(上接第28页)

[16]PAULASKAS A, GALDIKAITĖ-BRAZIENĖ E, RADZIJEVSKAJA J, et al. Genetic diversity of *Ixodes ricinus* (Ixodida: Ixodidae) ticks in sympatric and allopatric zones in Baltic countries [J]. *Journal of Vector Ecology*, 2016, 41 (2): 244–253.
[17]SOSHINA V A, PAVLOV S D, ZELENINA D A. Genetic diversity of charrs of the Commander Islands based on the analysis of mitochondrial DNA [J]. *Russian Journal of Genetics*, 2016, 52 (11): 1208–1213.
[18]ZHOU R, JIA-QI L I, YOU L I, et al. Effects of environmental factors on the population genetic diversity in the rusty-necklaced partridge (*Alectoris magna*) [J]. *Journal of Lanzhou University*, 2012, 48 (2): 80–85.
[19]GRANT W S, BOWEN B W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation [J]. *Journal of Heredity*, 1998, 89 (5): 415–426.
[20]LI Y L, XUE D X, GAO T X, et al. Genetic diversity and population structure of the roughskin sculpin (*Trachidermus fasciatus*, Heckel) inferred from microsatellite analyses: implications for its conservation and management [J]. *Conservation Genetics*, 2016, 17 (4): 921–930.
[21]CHO I C, LEE J H, LEE J G, et al. Complete mitochondrial genome sequence and genetic diversity of duroc breed [J]. *Journal of Animal Science & Technology*, 2004, 46 (6): 937–946.
[22]HAI T, HUANG J L, ZHAO Y P, et al. Analysis of genetic diver-

[5]阎恩泽, 唐忠, 杜泽学, 等. 发展我国生物柴油产业的探讨 [J]. *中国工程科学*, 2005, 7 (4): 1–5.
[6]RAHEEM A, AZLINA W W, YAP Y H T, et al. Thermochemical conversion of microalgal biomass for biofuel production [J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2015, 49: 990–999.
[7]MAKAREVICIENE V, SKORUPSKAITE V, ANDRULVICIUTE V. Biodiesel fuel from microalgae—promising alternative fuel for the future: a review [J]. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 2013, 12 (2): 119–130.
[8]RAWAT I, KUMAR R R, MUTANDA T, et al. Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production [J]. *Applied Energy*, 2011, 88 (10): 3411–3424.
[9]ABDEL-RAOUF N, AL-HOMAIDAN A A, IBRAHEEM I B M. Microalgae and wastewater treatment [J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2012, 19 (3): 257–275.
[10]HU Q, SOMMERFELD M, JARVIS E, et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances [J]. *The Plant Journal*, 2008, 54 (4): 621–639.
[11]WIJFFELS R H, BARBOSA M J. An outlook on microalgal biofuels [J]. *Science*, 2010, 329 (5993): 796–799.
[12]HAAS M J, MCALOON A J, YEE W C, et al. A process model to estimate biodiesel production costs [J]. *Bioresource Technology*, 2006, 97 (4): 671–678.
[13]SARTORY D P, GROBBELAAR J U. Extraction of chlorophyll a from freshwater phytoplankton for spectrophotometric analysis [J]. *Hydrobiologia*, 1984, 114 (3): 177–187.

ity and phylogeny of the mitochondrial cytochrome b gene of mongolian horses and mongolian wild horse [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2014, 41 (6): 162–167.
[23]ZHANG M, DUAN J, XU D, et al. Analysis on genetic diversity of mtDNA of coreius heterodon in the lower reaches of the Yangtze River by PCR-RFLP [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2009, 13 (10): 1023–1029.
[24]SONG J, HOU F, ZHANG X, et al. Mitochondrial genetic diversity and population structure of a vulnerable freshwater fish, rock carp (*Procypris rabaudi*) in upper Yangtze River drainage [J]. *Biochemical Systematics & Ecology*, 2014, 55 (4): 1–9.
[25]CHEN S, CHEN W, SHEN X, et al. Analysis of the genetic diversity of garlic (*Allium sativum*, L.) by simple sequence repeat and inter simple sequence repeat analysis and agro-morphological traits [J]. *Biochemical Systematics & Ecology*, 2014, 55 (8): 260–267.
[26]HASSANIEN H A, ELNADY M, OBEIDA A, et al. Genetic diversity of Nile tilapia populations revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) [J]. *Aquaculture Research*, 2015, 35 (6): 587–593.
[27]LOPES M S, EL-BASYONI I, BAENZIGER P S, et al. Exploiting genetic diversity from landraces in wheat breeding for adaptation to climate change [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66 (12): 34–86.
[28]ELLEGGREN H, GALTIER N. Determinants of genetic diversity. [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2016, 17 (7): 422–433.