

## 水杨酸对龙须菜抗高温生理的影响

朱招波, 孙 雪, 徐年军\*, 骆其君

(宁波大学海洋学院, 教育部应用海洋生物技术重点实验室, 浙江省海洋生物工程重点实验室, 浙江 宁波 315211)

**摘要:** 以龙须菜为材料, 研究了不同浓度水杨酸对高温下龙须菜的生长速率、抗氧化酶、渗透调节物质、藻胆蛋白、叶绿素荧光特性和 HSP70 基因的影响。结果表明, 水杨酸处理组不论是生长、酶活性和膜脂受损情况都不同程度优于对照组, 其中 5.0、10.0  $\mu\text{g/mL}$  处理组效果较好。10.0  $\mu\text{g/mL}$  水杨酸处理组效果最为明显, 日生长速率与对照组相比增长了 340%。在处理第 3 天, 10.0  $\mu\text{g/mL}$  处理组各指标达到最大, SOD 增长了 74%, POD 增长了 70%, CAT 增长了 40%。脯氨酸和甘露醇分别增长了 70%和 26%。藻红蛋白增加了 46.2%, 藻蓝蛋白增长了 40%。与对照组相比, MDA 含量第 1 天下降最为显著, 下降了 10%。高温胁迫下, 龙须菜叶绿素荧光参数 Fv/Fm、Fv/Fo、qP 和  $\Phi\text{PS II}$  均明显降低, 非光化学淬灭(NPQ)呈现先上升后下降的趋势。水杨酸处理能有效减缓 5 种龙须菜叶绿素荧光参数的降低程度。水杨酸处理后 HSP70 基因表达量较对照组低。本实验结果表明水杨酸具有增强龙须菜抗高温胁迫的作用。

**关键词:** 龙须菜; 水杨酸; 逆境生理; 叶绿素荧光; HSP70 基因

**中图分类号:** S 917.3

**文献标志码:** A

龙须菜(*Gracilaria/Gracilariopsis lamaneiformis*)属于红藻门江蓠属海藻, 具有生长快、含胶量高、适温范围广、经济价值大等特点, 不仅是生产琼胶的主要原料, 也可作为鲍鱼的饵料。龙须菜还具有较强的 N、P 吸收能力, 是富营养化海区重要的修复材料<sup>[1-2]</sup>。在原产地辽宁半岛、山东半岛, 野生型龙须菜的最适温度是 12~23  $^{\circ}\text{C}$ , 经过改良的耐高温龙须菜 981 品系在 26  $^{\circ}\text{C}$  生长良好, 能够在北方度夏, 其它季节在南方快速繁殖。目前龙须菜在我国广东、福建、浙江、山东、辽宁等地大量养殖, 已经成为继海带 (*Laminaria*)、紫菜 (*Porphyra*)、裙带菜(*Undaria*)之后的第 4 大栽培海藻<sup>[3]</sup>。

水杨酸(salicylic acid, SA)是植物体内合成的一种小分子酚类化合物, 是一种新型的植物激素。植物体内水杨酸的生物合成是通过莽草酸途径, 经反式桂皮酸转变为香豆素或苯甲酸, 最终形成

水杨酸。大量研究显示, 水杨酸能提高植物抗干旱、抗寒害、抗盐害、抗重金属、抗病性等<sup>[4]</sup>。高温环境在植物生长过程中经常遇到, 高温能使钝顶节旋藻(*Arthrospira platensis*)野生型与直线型突变株藻体生长减缓, 叶绿素 a、藻胆蛋白含量下降, SOD、POD 活性增强<sup>[5]</sup>; 高温也使条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)的生理性状受到胁迫<sup>[6]</sup>。龙须菜不同品系的研究发现, 高温胁迫下, 龙须菜抗氧化系统与耐热性有相关性, 981 和 07-2 品系与野生型相比具有更强的清除活性氧的能力<sup>[7]</sup>。水杨酸在藻类中的作用研究相对较少。加入少量水杨酸可以显著提高菊花江蓠(*G. lichenoides*)在低温环境的生存状态<sup>[8]</sup>。高温对藻类光系统 II (PS II) 的影响直接反应在叶绿素荧光参数(PAM)的变化上。高温使藻类光合活性下降、过剩光能耗散能力下降, 降低光能转化效率和潜在活性, 用于 PS II 光化学的能量

收稿日期: 2011-12-29

修回日期: 2012-02-22

资助项目: 国家自然科学基金项目(31072229); 浙江省钱江人才项目(2007R10038)

通讯作者: 徐年军, E-mail: xunianjun@nbu.edu.cn

占 PS II 天线系统吸收的总光能的比例下降。研究发现龙须菜不同分枝的 PAM 参数变化: 第一级分枝>第二级分枝>第三级分枝, 不同分枝的光合活动具有相同的变化趋势<sup>[9]</sup>。条斑紫菜不同部位的光合效率也不相同, 其中以梢部以下到中部的组织光合作用较高<sup>[10]</sup>。真江蓠(*G.vermiculophylla*)和条斑紫菜等红藻四分孢子生长中光合作用活性也存在部位间的差异性<sup>[11-12]</sup>。水杨酸对龙须菜生理生化影响的研究未见报道。本文研究了不同浓度水杨酸对提高龙须菜抗高温逆境作用及其机制, 为提高产量、种质培育和规模化养殖提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

实验龙须菜于 2010 年 12 月采于福建莆田养殖场, 藻体用消毒海水清洗后, 实验室保种培养。实验开始前选择健康藻体, 预培养一周。实验时 5 L 三角瓶内装有 4 L Provasoli 培养基<sup>[13]</sup>。藻样在光照培养箱中培养, 每天手摇 3~5 次。光照强度 4 000 lx, 温度 33 °C, 光周期 L:D(12 h : 12 h)。

### 1.2 实验方法

配制 2.5、5.0、10.0、20.0、50.0 μg/mL 5 个浓度组水杨酸, 以不添加水杨酸作为对照组。隔天取样。取样时藻体表面水分用滤纸吸干, 冷冻干燥后 -20 °C 冰箱保存。

**藻体生长速率的测定** 在培养的 0、1、3、5、7、9 天取样, 称量藻体质量, 计算藻体日相对生长速率(RGR, %/d)=100%×(LnW<sub>t</sub>/W<sub>0</sub>)/t。W<sub>t</sub> 为 t 时间的鲜质量(g), W<sub>0</sub> 为开始时的鲜质量(g), t 为实验天数(d)。

**甘露醇和脯氨酸含量的测定** 甘露醇采用硫酸铜比色法(Evtushenko 改进法)。准确称取干藻样 0.05 g, 4 mL 去离子水匀浆, 3000 r/min 离心 5 min, 各取 2 mL 上清液, 加入 2.5 mL 3.8 mol/L NaOH 溶液和 3.75 mL 0.1 mol/L CuSO<sub>4</sub> 溶液, 振荡混匀, 立即于沸水浴中加热 5 min, 样品冷却后, 3 000 r/min 离心 5 min, 上清液测定 A<sub>640</sub>。脯氨酸采用磺基水杨酸法测定<sup>[14]</sup>。

**抗氧化酶活性的测定** 准确称取干藻样 0.05 g, 液氮研磨, 加入 0.05 mol/L 磷酸缓冲液 5 mL。7 500 r/min 离心, 取上清液测定。超氧化物歧化酶(SOD)采用 NBT 氮蓝四唑法, 过氧化物酶(POD)测定采用愈创木酚法<sup>[14]</sup>。CAT 活性测定采用

南京建成试剂盒测定。

**丙二醛(MDA)含量的测定** 采用硫酸巴比妥法测定<sup>[14]</sup>, C<sub>MDA</sub>=6.45(A<sub>532</sub>-A<sub>600</sub>)-0.56A<sub>450</sub> 根据提取液计算样品中所含 MDA 的量, 单位为 μmol/g。

**藻胆蛋白的测定** 采用硫酸铵沉淀法提取<sup>[15]</sup>。准确称取 0.05 g 干藻样, 液氮研磨。加入 1 mol/L pH6.8 的 PBS 4 mL 转移至离心管中, 离心, 取粉红色上清液, 加入硫酸铵(饱和度 55%)充分搅匀, 置 4 °C 下避光沉淀过夜。离心得粉红色上清液即为藻胆蛋白粗提物。取上清液, 测其 A<sub>565</sub>、A<sub>615</sub>、A<sub>650</sub> 值, 计算藻胆蛋白含量:

$$C_{RPE} = 0.123A_{565} - 0.068A_{615} + 0.015A_{650}$$

$$C_{RPC} = 0.162A_{615} - 0.001A_{565} - 0.098A_{650};$$

式中, C<sub>RPE</sub> 为藻红蛋白, C<sub>RPC</sub> 为藻蓝蛋白, 根据提取液中藻胆蛋白浓度计算藻体中 RPE、RPC 浓度。

**叶绿素荧光参数的测定** 使用水样叶绿素荧光仪 MINI-PAM(Heinz Walz, Effeltrich, Germany) 进行叶绿素荧光参数的测定。测量前藻体进行暗适应 15 min, 用弱测量光测定 F<sub>0</sub>, 再用饱和脉冲激发测得最大荧光值 F<sub>m</sub>。PS II 的最大光能转换效率(F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>)、实际光能转换效率(ΦPS II)、光化学淬灭(qP)和非光化学淬灭(NPQ)可以通过数据输出直接获得, PS II 的潜在活性用公式 F<sub>v</sub>/F<sub>0</sub>= (F<sub>m</sub>-F<sub>0</sub>)/F<sub>0</sub> 计算出<sup>[16]</sup>。

**RT-PCR 测定 HSP70 的表达** 根据龙须菜 HSP70 编码区序列(DQ834745)和内参基因 18S rDNA(EU937746), 利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物。(1)HSP70 上游引物 5'-ATGCTGGTCA GATA-GCTGGATTA-3'和下游引物 5'-AAACACC ATCTCCGACTTCTA-3'; (2)18 S 上游引物 5'-CCT GAGAGACGGCTACCACATCCA-3'和下游引物 5'-AGACTT GCCCTCTGCTGGCTCCTC-3', 引物合成和测序均由上海 Invitrogen 生物工程有限公司完成。

**总 RNA 的制备** 按照 Trizol 试剂说明书进行。为了防止微量 DNA 的污染, 我们采用 PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser 试剂盒(大连 TaKaRa 生物工程有限公司)进行 cDNA 合成。再按照 SYBR Premix Ex Taq 的说明书进行 RT-PCR 反应, 其反应体系由 SYBR Premix Ex Taq (2×) 10 μL、PCR 正反向引物各 0.5 μL、ddH<sub>2</sub>O 7.0 μL 和 cDNA 模板 2.0 μL 组成。RT-PCR 反应条件:

94℃ 3 min, 94℃ 10 s, 55℃ 15 s, 72℃ 20 s, 40 个循环。反应结束后,用 Rotor-Gene Q 型实时荧光定量 PCR 仪(QIAGEN 公司)分析软件进行定量分析。

### 1.3 统计分析

原始数据的整理采用 Excel 2003, 数据分析采用 SPSS 统计软件进行差异显著性分析。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度水杨酸对高温下龙须菜生长的影响

随着水杨酸处理浓度的升高,龙须菜生长速率在整个实验期间呈现先上升后下降的趋势(图 1)。水杨酸为 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时达到最大值,日相对生长速率为 2.57%,与对照 0.55%相比,增长了 340%。5.0 和 20.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度组次之,增长了 201%和 202%。方差分析显示,水杨酸处理浓度为 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,龙须菜生长速率显著高于其他浓度处理组( $P<0.05$ )。表明高温环境下,适当的水杨酸处理有利于龙须菜的生长。

### 2.2 不同浓度水杨酸对高温下龙须菜渗透调节物质的影响

由图 2-a 可见,处理后第 1 天,2.5、5.0、10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度组甘露醇比对照组增长了 99%、145%和 133%。第 3 天,各处理组甘露醇含量都有不同增长,10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  处理组含量达到了最大值,比对照组增长了 70%,差异极显著( $P<0.01$ )。第 5 天开始,高浓度组(20.0、50.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )甘露醇含量有所上升。

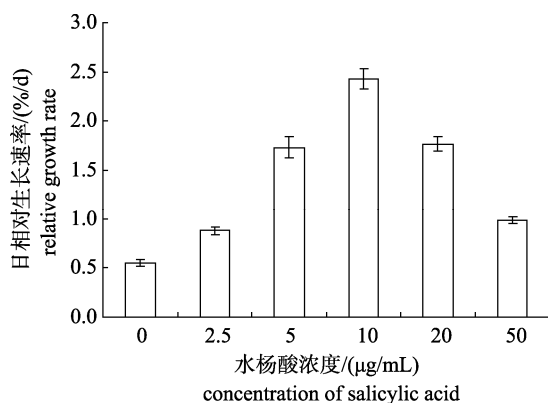


图 1 不同浓度水杨酸对高温逆境下龙须菜相对生长速率的影响

Fig. 1 Effects of different concentration of salicylic acid on the RGR of *G. lemaneiformis* under high temperature stress (mean $\pm$ SD)

图 2-b 显示,随着处理时间的变化,脯氨酸含量整体呈现先上升后下降的趋势。实验第 1 天,对照组脯氨酸含量显著低于其他各处理组( $P<0.05$ )。第 3 天各实验组脯氨酸含量均有不同程度的上升,其中 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组增长最明显,比对照组增长了 26%。第 5 天开始,脯氨酸含量持续下降。

### 2.3 不同浓度水杨酸对高温下龙须菜抗氧化酶活性的影响

高温胁迫 1~3 天内,SOD 活性不同程度的增加(图 3-a)。第 1 天,高浓度处理组(20.0、50.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )SOD 活性达到了最大,与对照组相比分别增长了 27.87%、44.6%。第 3 天,10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  处理组 SOD 活性达到最大值,比对照增长了 74%。而 20.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 50.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度组分别降低了 37.9%和 45.8%,显著低于对照组( $P<0.05$ )。第 5 天开始各处理组 SOD 活性显著高于对照组( $P<0.05$ )。

5.0、10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  处理组 POD 活性显著高于其他处理组( $P<0.05$ )(图 3-b)。第 1 天和第 3 天分别比对照组高 154%、128%和 79%、70%。第 3 天该浓度组显著高于 20.0、50.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和对照组( $P<0.05$ )。第 5、7、9 天,50.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  处理组 POD 活性急剧下降。表明适宜浓度水杨酸促进龙须菜生理,而过高浓度(50.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )不利于龙须菜过氧化氢代谢产物的分解。

CAT 活性整体呈现先上升后下降的趋势(图 3-c)。在第 5 天,2.5、5.0、10.0、20.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  处理组 CAT 活性达到最大值,分别比对照组提高了 146%、185%、234%、129%。而高浓度 50.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  在处理第 3 天 CAT 活性最大,随后开始下降,这一趋势与对照组一致。

高温胁迫第 1 天龙须菜藻体积了大量的 MDA(图 3-d)。50.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  处理组 MDA 含量比对照组高 26%,而 5.0、10.0、20.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度组 MDA 含量显著低于其他组( $P<0.05$ ),其中 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度组比对照低 10%。各处理组 MDA 含量在第 3 天开始有不同程度的下降。在第 5 天对照组和 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度组与其他浓度组差异极显著( $P<0.01$ )。

### 2.4 不同浓度水杨酸对高温下龙须菜藻胆蛋白的影响

实验第 1 天,对照组龙须菜藻红蛋白含量下降显著( $P<0.05$ )。而 5.0 和 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  处理组藻红蛋

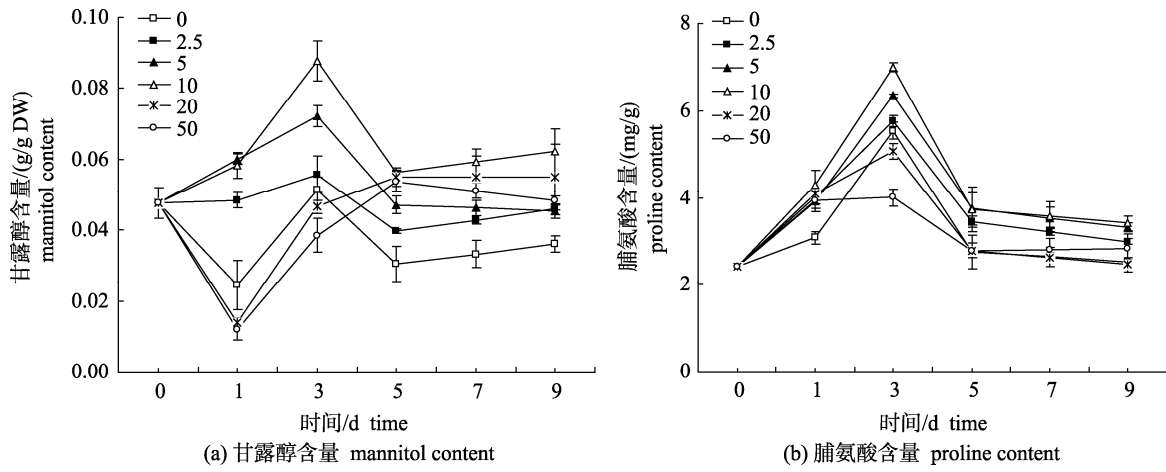


图 2 不同浓度水杨酸对高温逆境下龙须菜甘露醇和脯氨酸的影响  
 Fig. 2 Effects of different concentration of salicylic acid on the mannitol and proline content of *G. lemaneiformis* under high temperature stress(mean±SD)

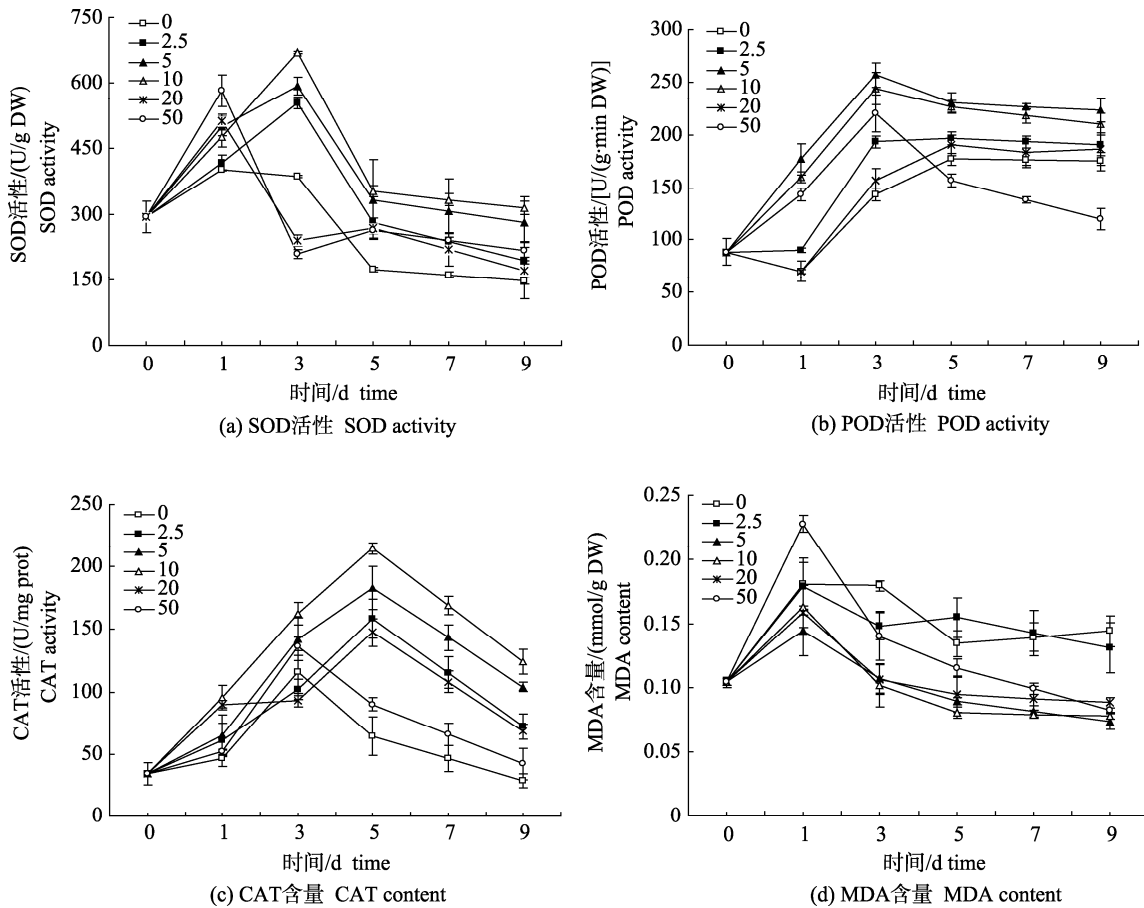


图 3 不同浓度水杨酸对高温逆境下龙须菜抗氧化系统的影响  
 Fig. 3 Effects of different concentration of salicylic acid on the SOD, POD, CAT and MDA content of *G. lemaneiformis* under high temperature stress(mean±SD)

白含量与对照组相比高出了 153%和 101%, 其它各处理组藻红蛋白含量都有下降。第 3 天, 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  处理组藻红蛋白含量达到最大值, 比对照组增长了 46.2%, 第 5 天开始, 藻红蛋白含量略有下降。

藻蓝蛋白含量整体呈现先上升后下降的趋势。第 1 天 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  处理组藻蓝蛋白含量比对照组高 38%, 第 3 天比对照组高 40%。第 5 天开始, 藻蓝蛋白含量开始下降, 但 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  处理组下降

的趋势明显要小于其他处理组( $P<0.01$ )。

## 2.5 水杨酸对高温下龙须菜叶绿素荧光参数的影响

对照组 Fv/Fm、Fv/Fo、qP、 $\Phi$ PS II 参数下降幅度明显大于水杨酸处理组,随着处理时间的延长,下降幅度越大(图 5)。实验第 9 天,处理组 Fv/Fm、Fv/Fo、qP、 $\Phi$ PS II 分别比对照组高 41%、70.1%、301%、47%。NPQ 在处理第 5 天达到最大值 0.403,比对照组高 22.5%。至第 7、9 天,下降为 0.302 和 0.270,分别比对照高 56.5%和 55.2%。

## 2.6 不同浓度水杨酸对高温下龙须菜 HSP70 基因相对表达量的影响

常温 24 h 后,2.5  $\mu$ g/mL 处理组藻体内 HSP70 表达量与对照组相比差异不显著( $P>0.05$ ),其他处理组的表达量均低于对照组(图 6)。而在高温处理 24 h 后,HSP70 变化规律与正常温度处理相近。除 2.5  $\mu$ g/mL 浓度组外,各浓度处理组 HSP70 表达量均不同程度低于对照组。浓度为 10.0  $\mu$ g/mL 时,无论是正常温度处理或高温处理,HSP70 表达量都显著低于其他各浓度组( $P<0.05$ ),仅为对照组表达量的 40.0%和 31.6%。

## 3 讨论

植物的防御反应机制中,水杨酸被作为植物产生系统获得性抗性(SAR)的内源信号。当植物受到病原体或非生物因素影响时,植物体局部水杨酸含量增加,促进抗逆蛋白合成、提高渗透调节能力和抗氧化能力,并伴有一些防卫相关蛋白的表达<sup>[17]</sup>。水杨酸从产生部位通过水杨酸受体蛋白(salicylic acid-binding proteins, SABP)结合到作用

部位,并进一步将信息传递给胞内第二信使(Ca-CaM 系统),第二信使进行胞内传导,引起最终生理效应<sup>[18]</sup>。外源水杨酸的应用提高了植物 SAR 抵御生物或非生物胁迫,有效减缓重金属、温度、水、盐等胁迫对植物产生的影响。

### 3.1 水杨酸对龙须菜生长和渗透调节作用的影响

前期实验检测到龙须菜能产生内源性水杨酸。本实验中 10.0  $\mu$ g/mL 水杨酸能有效提高龙须菜的生长速率,最终比对照增长了 340%。高温环境下添加不同浓度的水杨酸可以有效地促进龙须菜甘露醇合成,水杨酸为 10.0  $\mu$ g/mL 时,藻体在第 1 天甘露醇增加了 133%,并在第 3 天达到最大值。当受到不同环境胁迫时,植物体内游离脯氨酸含量会有很大的变化,有利于龙须菜的抗逆性。

### 3.2 水杨酸对龙须菜抗氧化酶活性的影响

高温下细胞内活性氧产生和消除的平衡遭到破坏而产生自由基。水杨酸处理能够使抗氧化酶活性保持在较高水平<sup>[19]</sup>。龙须菜高温环境下藻体内亚油酸降解过程减缓,推测可能与体内抗氧化酶系统发挥作用有关<sup>[20]</sup>。龙须菜在 30  $^{\circ}$ C 和 35  $^{\circ}$ C 高温下,藻体 POD 活性增强明显,在培养的 12 d 里增加了近 5 倍<sup>[21]</sup>。本实验发现,龙须菜在 0~3 天内,随着处理时间的延长藻体内 SOD、POD 和 CAT 活性也有不同程度的增强,处理组(5.0、10.0  $\mu$ g/mL)显著优于其它浓度组。50.0  $\mu$ g/mL 处理组 MDA 含量显著高于其他处理组,说明在这个浓度下膜脂过氧化程度更加严重。而其他浓度处理组均表现出不同程度的缓解作用,其中 5.0、10.0  $\mu$ g/mL 处理组效果最为明显。

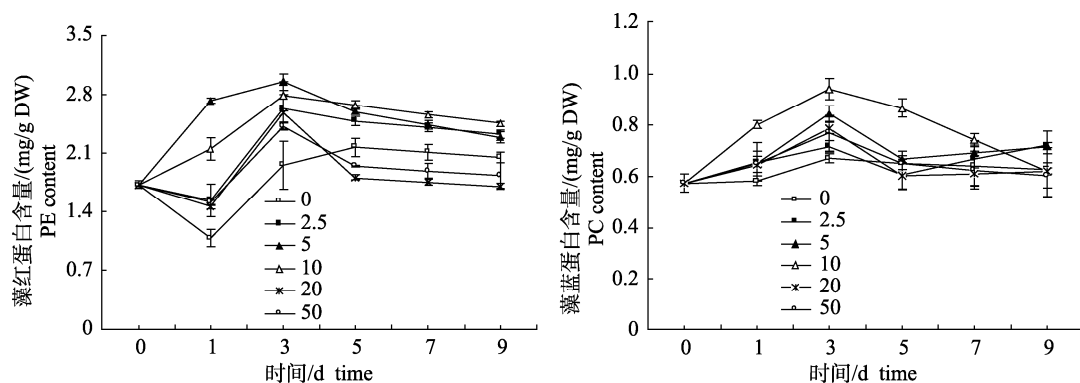


图 4 不同浓度水杨酸对高温逆境下龙须菜藻红蛋白和藻蓝蛋白含量的影响

Fig. 4 Effects of different concentration of salicylic acid on the RPE and RPC content of *G. lemaneiformis* under high temperature stress(mean $\pm$ SD)

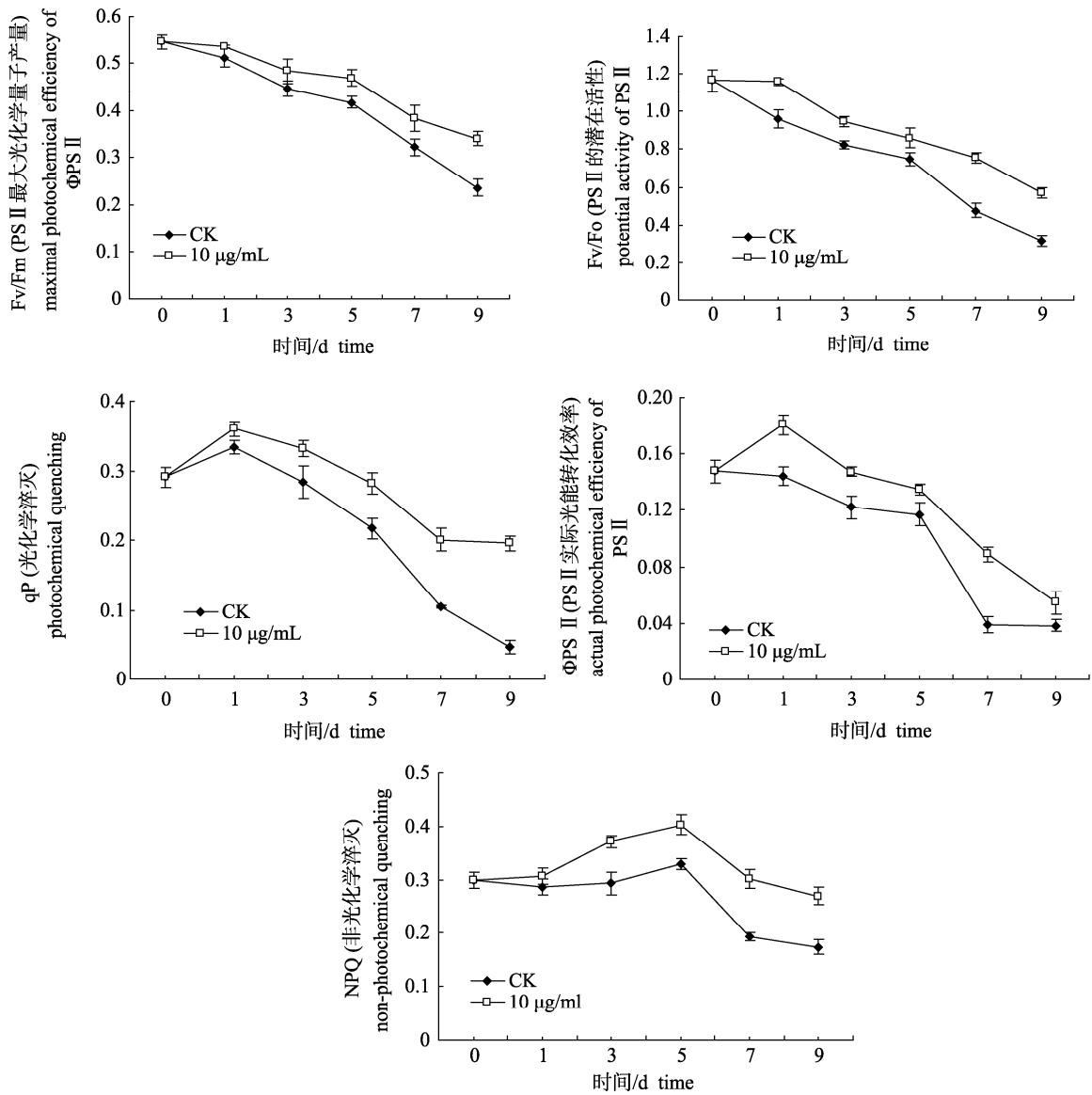


图 5 水杨酸对高温逆境下龙须菜叶绿素荧光参数的影响  
 Fig. 5 Effects of salicylic acid on the chlorophyll fluorescence parameters in *G. lemaneiformis* under high temperature stress(mean±SD)

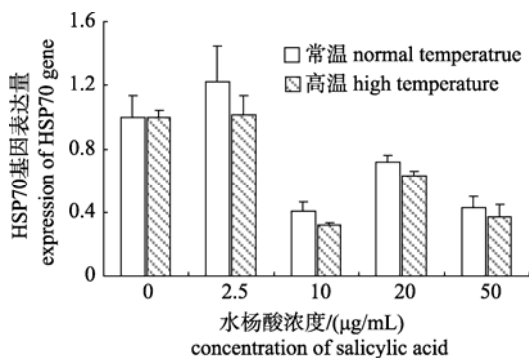


图 6 不同浓度水杨酸对高温逆境下龙须菜 HSP70 基因表达的影响  
 Fig. 6 Effects of different concentration of salicylic acid on the HSP70 expression of *G. lemaneiformis* under high temperature stress (mean±SD)

### 3.3 水杨酸对龙须菜藻胆蛋白含量的影响

藻胆蛋白是存在红藻和蓝藻中特有的捕光色素蛋白, 参与光合作用的能量吸收和传递, 对光照、营养盐和重金属等外界环境变化最为敏感<sup>[22]</sup>。本实验中, 5.0 和 10.0 µg/mL 处理组含量均显著高于其他处理组, 处理第 1 天, 分别比对照组提高了 153%和 101%。10.0 µg/mL 处理对龙须菜藻蓝蛋白的影响最为明显。

### 3.4 水杨酸对龙须菜叶绿素荧光参数的影响

叶绿素荧光技术是一种以光合作用理论为基础, 利用体内叶绿素作为天然探针, 研究和探测植物光合生理状况及各种外界因子影响的活体测定

和诊断技术,能够跟踪检测藻体在高温环境下光合结构损伤程度<sup>[23]</sup>。本实验中,随着高温处理时间的延长,龙须菜的荧光参数 Fv/Fm、Fv/Fo、qP、ΦPS II 均呈现下降趋势, NPQ 参数先上升后下降。这一结果与在微藻中的研究结果一致<sup>[24]</sup>。水杨酸处理后, Fv/Fo 的下降幅度比对照组慢,说明在一定程度上提高了光反应的能量转换效率。qP 反映了光适应状态下 PS II 进行光化学反应的能力,高温环境下水杨酸处理组与对照组相比 qP 值有了一定的提高。ΦPS II 下降表明与 CO<sub>2</sub> 固定相关的电子传递过程受阻程度增加。水杨酸处理组的 ΦPS II 值下降速度缓慢。在实验过程中,水杨酸处理组均提高了 NPQ,可见水杨酸能促进非光学猝灭的升高,通过非辐射性能量耗散的方式进行保护性的调节。高温环境里,作为捕光天线的藻胆蛋白含量下降,导致可以利用的光能减少,进而导致最大光能转换效率(Fv/Fm)、藻类光合活性、ΦPS II 潜在活性下降。通过水杨酸处理,这些参数都有明显提升。

### 3.5 水杨酸对龙须菜 HSP70 基因表达的影响

HSP70 是热休克蛋白家族中重要的组成成员,参与新生蛋白折叠、转运、分子伴侣活性和抗逆性等功能。藻类的热休克反应温度与其他生物一样,都是高于正常生长温度的 5~10 °C<sup>[25]</sup>。单细胞绿藻(*Raphidoecelis subcapitata*)高温环境下 HSP70 的表达可能是一种自我保护机制。在齿缘墨角藻(*Fucus serratus*)和浮萍(*Lemna minor*)中,随着热激温度的上升,HSP 的表达量也跟着上升<sup>[26]</sup>。同时,HSP 还具有间接的抗氧化功能,研究发现 HSPs 可以直接释放和增加 SOD 水平,同时抑制 NADPH 氧化酶,间接降低氧自由基的产生<sup>[27]</sup>,说明 HSP70 与抗氧化酶系统存在协同作用。本研究发现,33 °C 高温环境下,不同浓度水杨酸处理龙须菜藻体 HSP70 表达量均显著低于对照组,其中 10 μg/mL 水杨酸处理组表达量最低,仅为对照组的 31.6%。HSP70 的定量表达研究很好的说明藻体可以通过合成大量的 HSP70 以帮助龙须菜度过和适应高温逆境胁迫。

## 4 小结

适当浓度的水杨酸有利于提高龙须菜的生长速率,水杨酸为 5.0~20.0 μg/mL 时对龙须菜生长均有促进作用,10.0 μg/mL 的处理效果最好。水杨酸促进龙须菜生长的机理可能有:促进甘露醇和脯氨酸的增加;对 SOD 和 POD 活性有很强的诱导作

用,清除藻体自由基,降低 MDA 含量;促进藻胆蛋白的合成,诱导 HSP 基因的表达,从而提高了龙须菜对高温环境的耐受性。

### 参考文献:

- [1] 徐智广,邹定辉,张鑫,等. CO<sub>2</sub> 和硝酸加富对龙须菜 (*Gracilaria lemaneiformis*) 生长、生化组分和营养盐吸收的影响[J]. 生态学报, 2008, 28(8): 3752-3759.
- [2] Zhou Y, Yang H S, Hu H Y, et al. Bioremediation potential of macroalga *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) integrated into fed fish culture in coastal waters of north China[J]. Aquaculture, 2006, 252(2-4): 264-276.
- [3] 张学成,费修缙,王广策,等. 江蓠属海藻龙须菜的基础研究与大规模栽培[J]. 中国海洋大学学报, 2009, 39(5): 947-954.
- [4] Hayat Q, Hayat S, Irfan M, et al. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review[J]. Environmental and Experimental Botany, 2010, 68(1): 14-25.
- [5] 周亚莉,张学成. 节旋藻野生型藻株与直线型突变藻株对高温胁迫的生理响应[J]. 中国海洋大学学报, 2007, 37(sup.): 121-126.
- [6] Zhang B L, Yan X H, Huang L B. Evaluation of an improved strain of *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta) with high-temperature tolerance[J]. Journal of Applied Phycology, 2011, 23 (5): 841-847.
- [7] 鹿宁,臧晓南,张学成等. 高温胁迫下不同龙须菜品系抗氧化能力的比较[J]. 武汉大学学报:理学版, 2010, 56(5): 570-577.
- [8] 范皖苏,黄鹤忠,徐汗福,等. 外源添加剂水杨酸对菊花江蓠抗寒性的影响[J]. 海洋科学, 2011, 35(2): 38-43.
- [9] Wang Z Y, Wang G C, Niu J F, et al. Optimization of conditions for tetraspore release and assessment of photosynthetic activities for different generation branches of *Gracilaria lemaneiformis* Bory[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2010, 28 (4): 738-748.
- [10] 杨睿灵,乔洪金,周伟,等. 条斑紫菜叶状体不同区域光合活性的研究[J]. 海洋科学, 2011, 35(8): 63-66.
- [11] Xie X J, Wang G C, Pan G H, et al. Variations in morphology and PSII photosynthetic capabilities during the early development of tetraspores of *Gracilaria vermiculophylla* (Ohmi) Papenfuss (Gracilariales, Rhodophyta) [J]. BMC Developmental Biology, 2010, 10(43): 1-12.
- [12] Gao S, Wang G C, Yang R L, et al. Variations in the cell walls and photosynthetic properties of *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) during archeospore formation[J]. Journal of Phycology, 2011, 47(4): 839-845.
- [13] Provasoli L. Media and prospects for the cultivation of marine algae[C]// Watanabe A, Hattori A, Eds. Culture

- and collections of algae. US-Japan Conference. Hakone: Japanese Society of Plant Physiology. 1968: 63–75.
- [14] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社, 2000.
- [15] 蔡春尔, 何培民. 硫酸铵三步盐析对藻胆蛋白纯化的影响[J]. 生物技术通报, 2006, 23(4): 121–125.
- [16] Schreiber U, Klughammer C, Kolbowski J. High-end chlorophyll fluorescence analysis with the multi-color-PAM[J]. PAM Application Notes, 2011, 1: 1–19.
- [17] Delaney T P, Uknes S, Vernooij B, *et al.* A central role of salicylic acid in plant disease resistance[J]. Science, 1994, 266(18): 1247–1250.
- [18] Slaymaker D H, Navarre D A, Clark D, *et al.* The tobacco salicylic acid-binding protein 3(SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response[J]. PNAS, 2002, 99(18): 11640–11645.
- [19] Wang L J, Li S H. Salicylic acid-induced heat or cold tolerance in relation to  $Ca^{2+}$  homeostasis and antioxidant systems in young grape plants[J]. Plant Science, 2006, 170(4): 685–694.
- [20] 徐年军, 何艳丽, 唐军, 等. 龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)高温逆境代谢产物的GC-MS分析[J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(2): 221–227.
- [21] 柯德森, 史椰灯, 王正询. 环境因素对龙须菜过氧化物酶活性的影响[J]. 广州大学学报:自然科学版, 2007, 6(4): 26–29.
- [22] Yu J, Yang C C, Yu R A. Toxic response of dimethyl phthalate(DMP) to *Gracilaria lemaneiformis*[J]. Electronic Journal of Biology, 2007, 3(4): 80–86.
- [23] Campebl D, Hurry V, Clarke A K. Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1998, 62(3): 667–683.
- [24] 梁英, 冯力霞, 田传远. 高温胁迫对球等鞭金藻 3011 和 8701 叶绿素荧光特性的影响[J]. 水产学报, 2009, 33(1): 37–44.
- [25] Vayda M E, Yuan M L. The heat shock response of an Antarctic alga is evident at 5 °C[J]. Plant Molecular Biology, 1994, 24(1): 229–233.
- [26] Ireland H E, Harding S J, Bonwick G A, *et al.* Evaluation of heat shock protein 70 as a biomarker of environmental stress in *Fucus serratus* and *Lemna minor*[J]. Biomarkers, 2004, 9(2): 139–155.
- [27] Niedzwiecki A, Reveillaud I, Fleming J E. Changes in superoxide dismutase and catalase in aging heat-shocked *Drosophila*[J]. Free Radical Research Communications, 1992, 17(6): 355–367.



## Effects of salicylic acid on the resistance of *Gracilaria/Gracilariopsis lemaneiformis* to high temperature

ZHU Zhao-bo, SUN Xue, XU Nian-jun\*, LUO Qi-jun

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology of the Ministry of Education, Key Laboratory of Marine Biotechnology of Zhejiang Province, School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

**Abstract:** The marine red algae *Gracilaria/Gracilariopsis lemaneiformis* were used as materials to study the effects of different concentration of salicylic acid on their growth and stress physiology under high temperature condition. The antioxidant enzyme activity, the osmotic regulation substances, phycobili-protein, the features of chlorophyll fluorescence and HSP70 gene were studied when the algae grew in high temperature environment. Results showed that in the salicylic acid treatment group, the growth rate, enzymatic activity or membrane lipids damage degree were better than those of the control group at various degrees, and 5.0 and 10.0  $\mu\text{g/mL}$  of salicylic acid treatment groups were obviously better than the other groups. The treatment with 10.0  $\mu\text{g/mL}$  of salicylic acid showed the best effect with the daily relative growth rate increased 340% compared with the control group. When the treatment was on the 3rd day, each index of the 10.0  $\mu\text{g/mL}$  group reached the maximum value, SOD increased 74%, POD increased 70%, CAT increased 40%, mannitol and proline increased 70% and 26% respectively. The content of phycoerythrin increased 46.2%, phycocyanin content increased 40%. Compared with the control group, the decrease of MDA content on the first day was the most obvious and decreased nearly 10%. The chlorophyll parameters of  $F_v/F_m$ ,  $F_v/F_o$ ,  $qP$  and  $\Phi_{PS\ II}$  of *G. lemaneiformis* decreased under high temperature stress, and the variation tendency of NPQ increased first and then declined. It was found that 10.0  $\mu\text{g/mL}$  of salicylic acid could increase the five kinds of chlorophyll fluorescence values compared with the control group. The expression level of HSP70 gene under high temperature was higher than those under normal conditions, while the expression level of high temperature group with salicylic acid treatment was lower than the control group. In conclusion, salicylic acid showed the effect of improving the high temperature resistance of *G. lemaneiformis*.

**Key words:** *Gracilaria/Gracilariopsis lemaneiformis*; salicylic acid; stress physiology; chlorophyll fluorescence; HSP70 gene

**Corresponding author:** XU Nian-jun. E-mail: xunianjun@nbu.edu.cn