

文章编号: 1000-0615(2019)04-0886-09

DOI: 10.11964/jfc.20170910965

## 龙须菜中 *rbcL* 和 *hsp70* 对高温和植物激素的响应

吕燕<sup>1</sup>, 汪芳俊<sup>1</sup>, 林丽春<sup>1</sup>, 徐年军<sup>1</sup>, 陆开形<sup>2</sup>, 孙雪<sup>1\*</sup>

(1. 宁波大学海洋学院, 浙江宁波 315211;

2. 宁波大学科学技术学院, 浙江宁波 315211)

**摘要:** 龙须菜已在我国沿海从南到北广泛栽培, 但其栽培周期受夏季高温的限制。本研究采用qRT-PCR和Western blot技术研究了龙须菜核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶/加氧酶大亚基(*rbcL*)和热休克蛋白70(HSP70)对高温胁迫及3种抗逆植物激素的响应。结果显示: ①高温(33 °C)显著抑制了龙须菜*rbcL*转录和蛋白的表达水平, 而100 μmol/L水杨酸(SA100)和50 μmol/L茉莉酸甲酯(MJ50)的添加可减轻高温的不利影响。在SA100和MJ50组中, *rbcL*转录表达量分别为高温组的1.31倍和1.32倍(3 h), *rbcL*蛋白表达量分别为高温组的1.36倍和2.10倍(24 h); 并且这2种激素也能一定程度上缓解高温对藻体Rubisco活性的抑制作用, 恢复Rubisco活化状态。但是50 μmol/L脱落酸(ABA50)的添加则基本上抑制了*rbcL*表达及Rubisco活性。②3种激素进一步促进了高温诱导的龙须菜HSP70的表达, 在激素添加后, 其转录水平升高0.53~1.00倍(3 h), 蛋白水平升高0.93~2.45倍(24 h)。可见, 植物激素SA、MJ和ABA在调控由高温引起的光合作用酶的抑制和热休克蛋白的诱导表达方面发挥了一定的作用。

**关键词:** 龙须菜; 热休克蛋白70; Rubisco大亚基; 高温; 水杨酸; 茉莉酸甲酯; 脱落酸  
**中图分类号:** S 917.3 **文献标志码:** A

龙须菜(*Gracilariopsis lemaneiformis*)是红藻门(Rhodophyta), 真红藻纲(Florideophyceae), 江蓠科(Gracilariaceae)的一种大型经济海藻。野生型龙须菜原产于山东沿海海域。随着耐热品系981和07-2的成功选育, 目前龙须菜已在我国福建宁德、浙江温州和广东汕头等地区形成规模产业, 成为继海带和紫菜之后的第3大栽培海藻<sup>[1]</sup>。但在南方海域龙须菜仍存在不能成功渡夏的问题。因此, 进一步培育性状稳定、耐热性更强的龙须菜新品系, 研究龙须菜对高温胁迫的响应机制, 成为人们关注的问题。

光合作用是植物生命过程中的重要组成部分, 也是对高温胁迫最敏感的生理过程之一。高温可对植物光合系统造成多种危害, 一方面高温可引起叶绿体类囊体膜脂过氧化, 破坏光系统II(photosystem II, PSII)捕光色素复合体和

放氧复合体, 降低PSII反应中心活性, 导致光合速率下降<sup>[2]</sup>; 另一方面高温可影响光合作用酶的活性。核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶/加氧酶(ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, Rubisco)是光合碳同化的关键酶, 其大亚基(Rubisco large subunit, *rbcL*)主要起催化作用。研究表明高温引起植物光合作用的下降主要与PSII的功能、Rubisco活化状态有关<sup>[3]</sup>。

高温对植物造成胁迫或伤害, 同时植物自身也会启动一些保护机制, 如活性氧(reactive oxygen species, ROS)清除酶系、热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)、内源激素、信号转导系统等来响应高温逆境, 从而减轻高温对植物体的损伤<sup>[4]</sup>。热休克蛋白是植物体在受到高温、干旱、过氧化等逆境时应激合成的一系列蛋白质分子<sup>[5]</sup>。HSPs在维持细胞内蛋白质正常构象, 促进变性

收稿日期: 2017-09-11 修回日期: 2018-05-29

资助项目: 国家自然科学基金(41376151, 31672674); 宁波大学“水产”浙江省重中之重学科开放基金(xkzsc1525)

通信作者: 孙雪, E-mail: sunxue@nbu.edu.cn

蛋白复性或降解,修复热损伤,增强机体耐高温等方面发挥了重要作用<sup>[6]</sup>。根据分子量的不同,HSPs可分为5类,其中HSP70是HSPs家族中含量最丰富、高度保守的一类蛋白,在应对高温等逆境时起关键作用<sup>[7-8]</sup>。

植物激素在调控植物生长、光合作用及抗氧化等方面发挥着重要作用<sup>[9]</sup>。此外,水杨酸(salicylic acid, SA)、茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MJ/MeJA)和脱落酸(abscisic acid, ABA)等植物激素也可作为内源信号分子,调控植物应对病虫害、高温、高盐、干旱等多种生物和非生物胁迫<sup>[10-12]</sup>。

本实验以龙须菜为对象,研究了高温及SA等3种抗逆植物激素对*rbcL*和*hsp70*转录、翻译水平的表达及Rubisco活性的影响,以探讨龙须菜光合作用和抗逆相关的基因在抗热应激反应中的响应模式,以及外源植物激素在藻类植物抗高温胁迫中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验材料为龙须菜耐高温品系981,采自福建霞浦。先用软毛刷充分刷洗藻体,以除去其表面附着生物,再用灭菌海水冲洗几遍,然后截取约3~4 cm幼嫩藻体尖端部分在23 °C恒温光照培养箱中预培养2~3 d,光强约40 lx,光周期12L:12D。

### 1.2 实验设计

参考王重彬等<sup>[13]</sup>及预实验的结果,SA、MJ和ABA浓度分别设置为100、50、50 μmol/L。共5个处理组:23 °C(常温组)、33 °C(高温组)、33 °C+SA100、33 °C+MJ50和33 °C+ABA50,每组3个

重复。置于光照培养箱中培养,在0、3、6、12、24 h取样,将藻体吸干水后液氮速冻,-80 °C保存备用。

### 1.3 总RNA提取及cDNA的合成

称取约100 mg藻体,用RNeasy Plant Mini Kit和RNase-Free DNaseI(Qiagen,德国)提取总RNA,NanoDrop 1000 Spectrophotometer(Thermo Scientific,美国)和1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA浓度、纯度及有无降解。用反转录试剂盒PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser(TaKaRa,大连)合成第一链cDNA,作为实时荧光定量PCR(qRT-PCR)的模板。

### 1.4 qRT-PCR检测

*rbcL*和*hsp70*基因序列来自龙须菜转录组测序结果(NCBI登录号MF964224和MF964223),PCR反应体系和程序等参考Wang等<sup>[14]</sup>,引物序列等见表1。以18S rRNA基因为内参<sup>[15]</sup>,采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法分析目的基因相对表达水平<sup>[16]</sup>。

### 1.5 总蛋白的提取

称取约200 mg藻体,分别用植物蛋白抽提试剂盒和BCA蛋白测定试剂盒(康为世纪,北京)提取龙须菜总蛋白及定量蛋白。将蛋白样品分装后-80 °C保存,用于蛋白免疫印迹(Western blot)分析。

### 1.6 Western blot检测

取10 μL的蛋白样品(30 μg),进行SDS-PAGE(5%浓缩胶,12%分离胶)电泳,将分离的蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜(PVDF膜)进行免疫检测。*rbcL*蛋白的一抗为Rabbit polyclonal Rubisco large subunit, form I and form II, HSP70蛋白的一抗为

表1 qRT-PCR反应的引物名称和序列

Tab. 1 The name and sequence of primers for qRT-PCR

基因 gene	引物 primer name	引物序列(5'-3') primer sequences (5'-3')	扩增长度/bp amplicon length
<i>rbcL</i>	<i>rbcL</i> -F	AGTAACTCCTGTGCTTCTGGTGGT	182
	<i>rbcL</i> -R	CTTCATTACGAGCCATAACCATAGA	
<i>hsp70</i>	<i>hsp70</i> -F	TTTTGATTTGGGAGGTGGAAC	199
	<i>hsp70</i> -R	GAGACGGCGAACGGAACG	
18S rRNA	18S-F	CCTGAGAGACGGCTACCACATCCA	167
	18S-R	AGACTTGCCCTCTGCTGGCTCCTC	

Rabbit polyclonal heat shock protein 70 cytoplasmic (Agriser, 瑞典), 二抗为辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG (H+L)(康为世纪, 北京)。实验操作流程参考Wang等<sup>[17]</sup>, 用Gel-Pro analyzer软件对蛋白条带进行灰度计算, 分析目的蛋白的相对表达水平。

### 1.7 Rubisco活性的测定

Rubisco初始活性和总活性的测定方法参考Lu等<sup>[18]</sup>, 以 $\mu\text{mol CO}_2/(\text{g}\cdot\text{min})$ 为酶活性单位。Rubisco活化状态=初始活性/总活性。

### 1.8 数据分析

利用Excel 2013进行数据处理和作图, 实验数据均以平均值 $\pm$ 标准差表示, 使用SPSS 13.0软件进行单因素方差分析, 并采用Duncan法进行多组样本间差异显著分析,  $P<0.05$ 表示差异显著。

## 2 结果

### 2.1 高温和植物激素对*rbcL*基因表达的影响

龙须菜中*rbcL*基因表达受到高温胁迫的显著抑制(图1)。在23 °C常温组, *rbcL*基因的表达量较稳定, 而在高温处理的各组(包括添加激素组)*rbcL*表达量均显著降低, 并随着胁迫时间的延长其表达量下降更显著。在3~24 h各采样时间点, 高温组的*rbcL*表达量分别降为常温组的37.46%、30.30%、10.20%和5.29%( $P<0.05$ )。

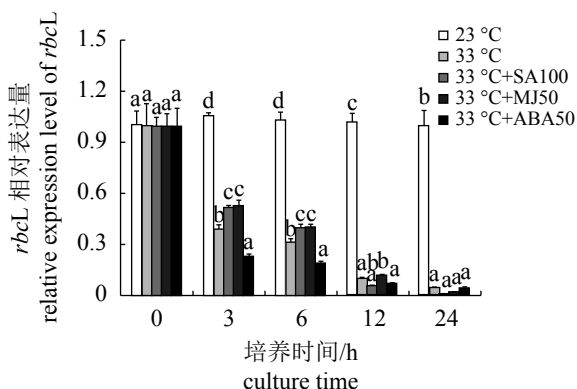


图1 高温和植物激素处理对龙须菜*rbcL*基因表达的影响

不同小写字母表示不同处理组之间差异显著( $P<0.05$ ), 下同

### Fig. 1 Effects of heat and phytohormone treatments on the expression of *rbcL* gene in *G. lemaneiformis*

Different small letters mean significant difference ( $P<0.05$ ) among different treatments, the same below

在高温条件下, 不同植物激素对*rbcL*基因表达的影响不同。SA100和MJ50组的*rbcL*表达量在3 h和6 h时均高于高温组( $P<0.05$ ), 分别为高温组的1.31和1.32倍(3 h)、1.28和1.30倍(6 h)。而ABA50组的*rbcL*基因表达量在3 h和6 h时均显著低于高温组, 分别为高温组的58.57%和62.42%( $P<0.05$ )。在12 h和24 h时, 3种激素添加组的*rbcL*表达量与高温组均无显著差异。该结果表明外源添加SA100或MJ50在短期内促进了*rbcL*基因的表达, 而ABA50的添加则会协同高温共同抑制*rbcL*表达。

### 2.2 高温和植物激素对*hsp70*基因表达的影响

与*rbcL*基因不同, 龙须菜中*hsp70*基因受到高温的显著诱导(图2)。在高温胁迫下, *hsp70*基因表达呈现出先上升后降低的趋势, 并且在3~12 h均高于常温组。在3 h时, 高温组*hsp70*表达量最高, 是常温组的9.95倍( $P<0.05$ ); 在6 h和12 h时, 高温组*hsp70*表达量分别是常温组的4.00倍和2.46倍( $P<0.05$ ); 而到24 h时, *hsp70*的表达量降至常温组的27.50%( $P<0.05$ )。

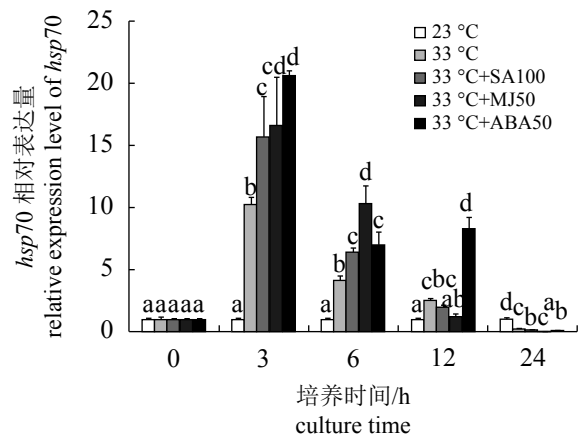


图2 高温和植物激素处理对龙须菜*hsp70*基因表达的影响

### Fig. 2 Effects of heat and phytohormone treatments on the expression of *hsp70* gene in *G. lemaneiformis*

外源植物激素对*hsp70*基因表达的诱导作用显著。在3 h时, SA100、MJ50、ABA50组中藻体的*hsp70*基因表达量均达到最大, 分别是23 °C组的15.21倍、16.14倍和19.94倍( $P<0.05$ ), 是33 °C组的1.53倍、1.62倍和2.00倍( $P<0.05$ )。在6 h时, 3种激素组中*hsp70*基因表达量均高于高温组( $P<0.05$ ), 其中MJ50的诱导作用最显著。在12 h时,

SA100组中*hsp70*基因表达量与高温组差异不显著, MJ50组中*hsp70*的表达量显著低于高温组; 而ABA50对*hsp70*的表达仍具有显著的诱导作用, 其表达量是高温组的3.29倍。到24 h时, 3种植物激素处理组中*hsp70*表达量均低于常温组( $P<0.05$ )。该结果表明在高温胁迫下外源添加SA100、MJ50或ABA50均能迅速诱导龙须菜体内*hsp70*基因的表达, 但这种诱导作用持续时间较短。其中,

ABA50对*hsp70*基因的诱导作用最持久。

### 2.3 高温和植物激素对*rbcL*蛋白表达的影响

与*rbcL*转录水平的表达结果类似, 龙须菜中*rbcL*蛋白表达也受到高温的抑制(图3)。在3~24 h各采样时间点, 高温组中藻体*rbcL*蛋白表达量均低于23 °C组, 其表达量分别降为常温组的75.60%、78.40%、55.28%和41.40%( $P<0.05$ )。

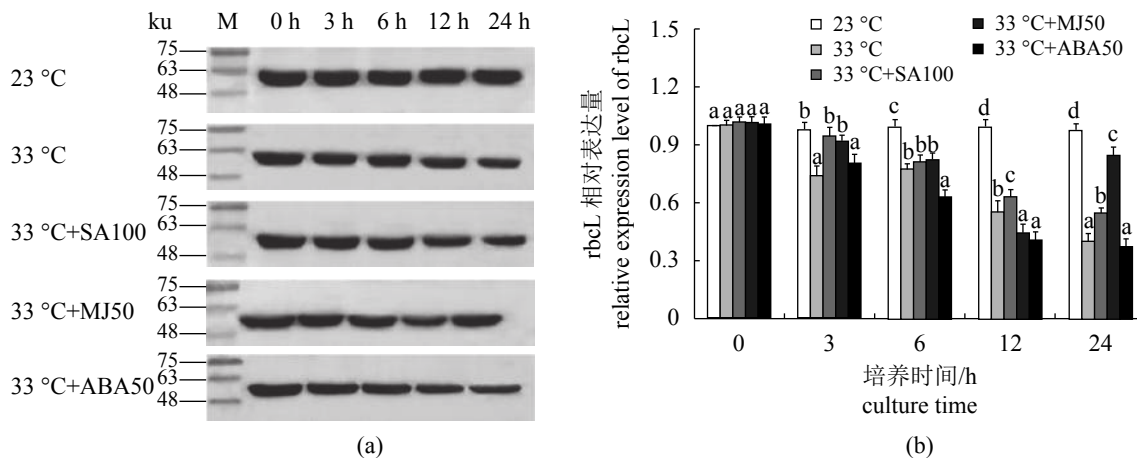


图3 高温和植物激素处理对龙须菜*rbcL*蛋白表达的影响

(a) Western blot结果; (b) 蛋白相对表达水平; 下同

Fig. 3 Effects of heat and phytohormone treatments on the expression of *rbcL* protein in *G. lemaneiformis*

(a) results of Western blot; (b) protein relative expression level; the same below

外源添加植物激素后, *rbcL*蛋白对3种植物激素表现出不同的响应模式。在SA100组中, *rbcL*蛋白表达量除了在6 h时与高温组差异不显著, 在其余各个时间点均显著高于33 °C组, 如在24 h时, 其蛋白表达量是高温组的1.36倍。在MJ50组中, *rbcL*蛋白表达在3~24 h期间表现出几种不同的表达模式, 其中在24 h时, *rbcL*蛋白表达量显著高于高温组(2.10倍)。在ABA50组中, *rbcL*蛋白表达呈下降的趋势, 在6 h和12 h时其蛋白表达量与高温组有显著差异, 分别为高温组的81.32%和74.22%。以上结果表明外源添加SA100或MJ50能够不同程度地促进高温下抑制的龙须菜*rbcL*蛋白上调表达, 缓解高温对*rbcL*蛋白表达的抑制作用, 而ABA50则无此作用, 甚至会促进高温下*rbcL*蛋白的下调表达。

### 2.4 高温和植物激素对HSP70蛋白表达的影响

在高温条件下, HSP70蛋白表达量均高于23 °C组(图4)。除了在3 h时与常温组无显著差异, 在6~24 h各采样时间点其蛋白表达量分别为常温

组的2.84倍、6.41倍和4.29倍( $P<0.05$ )。

3种植物激素的添加多促进了HSP70蛋白水平的表达。在SA100组中, HSP70蛋白表达水平在6 h和24 h时分别比高温组升高了25%和1.19倍( $P<0.05$ )。在MJ50组的3 h和24 h, HSP70蛋白表达量约达到了高温组的2倍; 而在12 h时, 其蛋白表达量与高温组无显著差异( $P>0.05$ )。在ABA50组中, HSP70蛋白表达水平在3~24 h均显著高于高温组, 最高达到了高温组的3.45倍(24 h)。以上结果表明外源添加SA100、MJ50或ABA50都能不同程度促进高温下HSP70蛋白的上调表达, 其作用由强到弱依次为ABA50>SA100>MJ50。

### 2.5 高温和植物激素对Rubisco活性及活化状态的影响

在23 °C培养条件下, 龙须菜Rubisco的初始活性和总活性基本稳定; 而在33 °C高温下, 藻体2种Rubisco活性随着胁迫时间的延长逐渐降低(图5)。到24 h时, Rubisco的初始活性和总活性均降到最低, 分别只有常温组的19.67%和23.89%

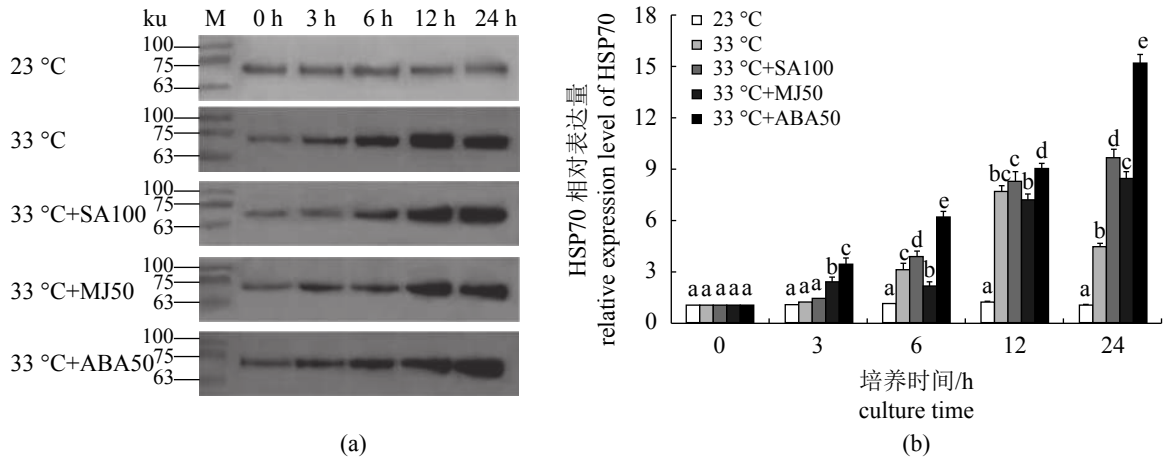


图 4 高温和植物激素处理对龙须菜HSP70蛋白表达的影响

Fig. 4 Effects of heat and phytohormone treatments on the expression of HSP70 protein in *G. lemaneiformis*

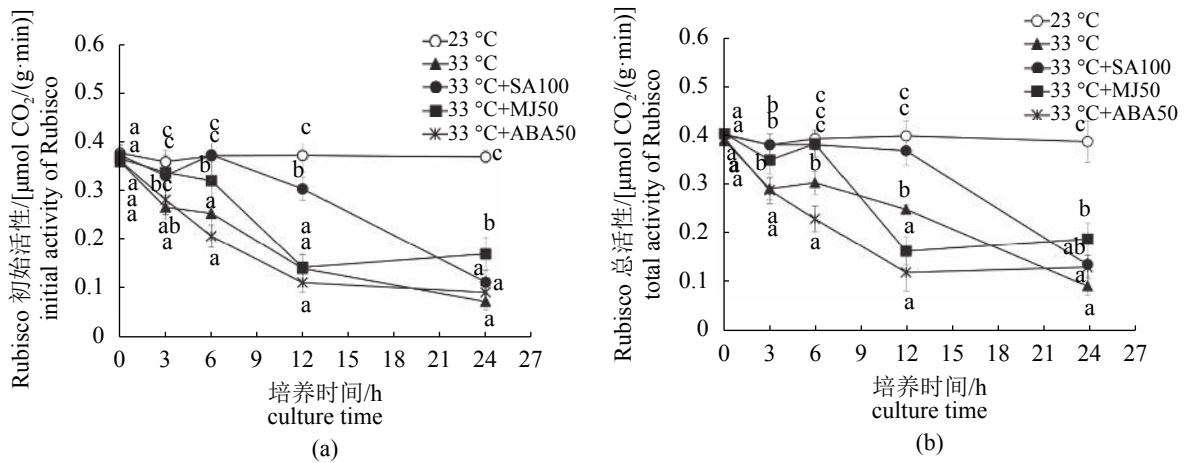


图 5 高温和植物激素处理对龙须菜Rubisco初始活性(a)和总活性(b)的影响

Fig. 5 Effects of heat and phytohormone treatments on the initial activity (a) and total activity (b) of Rubisco in *G. lemaneiformis*

( $P < 0.05$ ).

不同植物激素的添加对Rubisco活性的影响不同。在SA和MJ处理组中，Rubisco的初始活性、总活性在0~6 h期间均大于33 °C组，如在6 h时，SA100组藻体Rubisco初始活性和总活性值均达到最高，分别为33 °C组的1.47倍和1.25倍( $P < 0.05$ )，接近23 °C组的水平( $P > 0.05$ )；而6 h时MJ50组中藻体Rubisco初始活性和总活性是33 °C组的1.26倍( $P < 0.05$ )，此时总活性已与常温组无显著差异( $P > 0.05$ )，但初始活性仍低于23 °C组。在ABA50组中，Rubisco总活性与初始活性的变化基本一致，呈不断下降的趋势，且多低于高温组。

与Rubisco活性快速下降不同的是，Rubisco活化状态受高温的影响下降稍微滞后一些，在3 h

时与23 °C组无显著差异，在6 h和12 h时高温组活化状态分别下降至常温组的88.55%和60.09% ( $P < 0.05$ )，而到24 h时，Rubisco活化状态有所回升，但仍低于常温组( $P < 0.05$ ) (表2)。3种激素添加对Rubisco活化状态多表现为促进作用。SA100组中Rubisco活化状态在6 h和12 h时分别为高温组的1.17倍和1.47倍，接近于常温组的水平( $P > 0.05$ )；而MJ50组活化状态在12 h和24 h时均高于高温对照组(分别为1.55倍和1.15倍)，达到常温组的水平；ABA50组则在3~12 h期间均可提高Rubisco活化状态(为高温组的1.07~1.71倍)，与23 °C组无显著差异，但在24 h时则表现为抑制作用。

综上，SA100和MJ50均能提高Rubisco的初始活性和总活性，缓解高温对藻体Rubisco活性

表2 高温和激素处理对龙须菜Rubisco活化状态的影响

Tab. 2 Effects of heat and phytohormone treatments on Rubisco activation state in *G. lemaneiformis*

处理 treatment	培养时间/h culture time				
	0	3	6	12	24
23 °C	0.96±0.02 <sup>a</sup>	0.96±0.01 <sup>bc</sup>	0.96±0.03 <sup>bc</sup>	0.95±0.10 <sup>b</sup>	0.98±0.02 <sup>a</sup>
33 °C	0.94±0.02 <sup>a</sup>	0.93±0.05 <sup>ab</sup>	0.85±0.01 <sup>a</sup>	0.57±0.00 <sup>a</sup>	0.80±0.03 <sup>b</sup>
33 °C+SA100	0.95±0.01 <sup>a</sup>	0.88±0.03 <sup>a</sup>	1.00±0.03 <sup>a</sup>	0.84±0.02 <sup>b</sup>	0.83±0.04 <sup>b</sup>
33 °C+MJ50	0.92±0.06 <sup>a</sup>	0.98±0.02 <sup>bc</sup>	0.85±0.02 <sup>a</sup>	0.89±0.15 <sup>b</sup>	0.92±0.01 <sup>a</sup>
33 °C+ABA50	0.93±0.04 <sup>a</sup>	0.99±0.05 <sup>a</sup>	0.92±0.06 <sup>b</sup>	0.97±0.16 <sup>b</sup>	0.71±0.10 <sup>a</sup>

注: 表格中不同字母上标表示不同处理组之间差异显著( $P<0.05$ )

Notes: different letters superscript mean the significant difference ( $P<0.05$ ) among different treatments

的影响,并且SA100的效果更为显著,而ABA50则加剧了高温对Rubisco活性的抑制作用。从Rubisco活化状态分析,3种植物激素在一定程度上均能恢复藻体Rubisco活化状态,甚至达到常温组的水平,但在ABA50组的24 h时例外。

### 3 讨论

#### 3.1 高温和植物激素对Rubisco的影响

Rubisco是一种参与光合作用和光呼吸的双功能酶,也是植物可溶性蛋白中含量最高的蛋白质。高温、干旱等非生物胁迫均能影响植物体内Rubisco活性及其活化状态<sup>[19-20]</sup>。在40 °C和45 °C高温胁迫下,陆地棉(*Gossypium hirsutum*)叶片Rubisco活化状态分别下降至28 °C(对照组)的65%和10%<sup>[21]</sup>。黄瓜(*Cucumis sativus*)叶片在低温处理10 d后,其Rubisco蛋白含量、Rubisco初始活性和总活性均降低<sup>[22]</sup>。Luo等<sup>[3]</sup>发现在40 °C和45 °C高温下葡萄叶片净光合速率和Rubisco活化状态均受到显著的抑制;恢复培养1 d后,Rubisco活化状态均能上升到正常水平,而净光合速率虽有所上升,但不能恢复正常。本研究结果显示*rbcL*在转录和翻译水平的表达及Rubisco活性均受到高温的显著抑制,Rubisco活化状态呈先下降后升高的趋势,在12 h时降至最低,到24 h时藻体活化状态又有所升高,推测这可能与后期藻体自身的热适应及热休克蛋白的大量表达参与PSII功能修复有关。

植物激素可提高植物应对高温胁迫的能力,包括恢复受损的光合效率和光合作用酶的作用<sup>[23-24]</sup>。

大量研究结果已表明外源SA能够有效地缓解高温对PSII的损伤,增强植物PSII的最大光能转换效率( $F_v/F_m$ )和实际光能转换效率( $\Phi_{PSII}$ )<sup>[15, 25]</sup>。本研究表明SA可减轻高温对藻体Rubisco活性及大亚基的伤害,恢复Rubisco活化状态,该结果与Wang等<sup>[26]</sup>在葡萄叶片中的研究结果一致。有关MJ对植物光合作用特性影响的结论不尽相同,吴文华等<sup>[27]</sup>认为MJ处理会抑制水稻幼苗Rubisco蛋白及其大、小亚基的合成,降低叶片Rubisco活性和光合速率。而本研究表明MJ能够有效缓解高温引起的Rubisco活性及大亚基表达水平的下降,与金微微等<sup>[28]</sup>报道的结果类似。ABA除了在某些时间点能够促进Rubisco活化状态之外,对Rubisco活性及大亚基表达基本表现为抑制作用,与Pandey等<sup>[29]</sup>报道的ABA能够使棉花在逆境下维持较高的Rubisco酶活性的结论不一致,推测这可能与ABA所用浓度或物种的不同有关。

#### 3.2 高温和植物激素对HSP70的影响

HSP70是热休克蛋白家族中的重要成员,作为分子伴侣参与一系列的生命活动。HSP70受到热应激可以大量表达,并对热应激造成的损伤有一定的修复作用,提高机体的抗逆性。如Schuster等<sup>[30]</sup>和Schroda等<sup>[31]</sup>的研究表明,莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)中小分子量的热激蛋白(HSP-22)和HSP70的表达对PSII具有保护和修复作用。研究表明高温能够诱导植物体内*hsp70*表达上调,如30~40 °C高温可诱导石莼(*Ulva prolifera*)*hsp70*基因表达量升高<sup>[32]</sup>;35 °C高温可诱导龙须菜耐高温品系981和07-2中HSP70蛋白的大量表达<sup>[17]</sup>;Gu等<sup>[33]</sup>比较了野生型和981品系龙须菜中的2条基因*hsp70-1*和*hsp70-2*分别在28 °C和32 °C条件下转录水平的变化,结果发现*hsp70*基因表达水平与龙须菜的抗高温能力有直接关系。本研究表明龙须菜HSP70能快速响应高温胁迫,在高温胁迫初期即可诱导*hsp70*基因(3 h)和蛋白(6 h)大量表达,随后其基因和蛋白表达量均有所降低,这与巨藻(*Macrocystis pyrifera*)孢子体、坛紫菜中*hsp70*表达量随着温度变化的趋势相同<sup>[34-35]</sup>。Li等<sup>[36]</sup>研究发现在32 °C高温胁迫后期(6 h后)龙须菜可以启动泛素蛋白酶降解途径来抵御高温的伤害。因此推测HSP70参与了热胁迫早期的快速应答响应,随着胁迫时间的延长,藻体可能会启动其他的防御机制来抵御高温胁迫。

研究表明植物激素可诱导热休克蛋白的表达, 增强植物的抗逆性。如外施ABA可诱导高温胁迫下嫁接黄瓜 $hsp70$ 转录和翻译水平的表达, 提高黄瓜的耐热性<sup>[37]</sup>; 在干旱和高温结合的胁迫下, 外源ABA可促进玉米HSP70的合成及提高抗氧化酶的活性<sup>[38]</sup>。本研究表明SA、MJ及ABA均能诱导龙须菜体内HSP70大量表达, 该结果与王重彬等<sup>[13]</sup>的SA能够促进 $hsp70$ 基因表达的结论相同, 而与MJ对 $hsp70$ 表达无影响的结论不同, 这可能与所用的2条 $hsp70$ 基因序列不同有关。

综上, 高温抑制了光合作用关键酶Rubisco的活性及大亚基的表达, 同时刺激了HSP70大量表达。SA和MJ可缓解高温引起的Rubisco活性的降低, 提高藻体Rubisco活化状态; SA、MJ和ABA均能进一步促进由高温诱导的HSP70表达, 并且ABA的作用最大。因此, 这3种植物激素在龙须菜应对高温胁迫方面都发挥了积极的作用。

#### 参考文献:

- [1] 张学成, 费修纭, 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.  
Zhang X C, Fei X G, Wang G C, *et al.* Genetic studies and large scale cultivation of *Gracilaria lemaneiformis*[J]. Periodical of Ocean University of China, 2009, 39(5): 947-954(in Chinese).
- [2] 唐婷, 郑国伟, 李唯奇. 植物光合系统对高温胁迫的响应机制[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2012, 28(2): 127-132.  
Tang T, Zheng G W, Li W Q. Defense mechanisms of plants photosystem to heat stress[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2012, 28(2): 127-132(in Chinese).
- [3] Luo H B, Ma L, Xi H F, *et al.* Photosynthetic responses to heat treatments at different temperatures and following recovery in grapevine (*Vitis amurensis* L.) leaves[J]. PLoS ONE, 2011, 6(8): e23033.
- [4] Zhang X W, Li J P, Liu A L, *et al.* Expression profile in rice panicle: Insights into heat response mechanism at reproductive stage[J]. PLoS ONE, 2012, 7(11): e49652.
- [5] Wang W X, Vinocur B, Shoseyov O, *et al.* Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response[J]. Trends in Plant Science, 2004, 9(5): 244-252.
- [6] Mayer M P, Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2005, 62(6): 670-684.
- [7] Sung D Y, Kaplan F, Guy C L. Plant Hsp70 molecular chaperones: protein structure, gene family, expression and function[J]. Physiologia Plantarum, 2001, 113(4): 443-451.
- [8] Yoshimi T, Odagiri K, Hiroshige Y, *et al.* Induction profile of HSP70-cognate genes by environmental pollutants in *Chironomidae*[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2009, 28(2): 294-301.
- [9] 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.
- [10] Wang L J, Chen S J, Kong W F, *et al.* Salicylic acid pretreatment alleviates chilling injury and affects the antioxidant system and heat shock proteins of peaches during cold storage[J]. Postharvest Biology and Technology, 2006, 41(3): 244-251.
- [11] Wasternack C, Hause B. Jasmonates: Biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in Annals of Botany[J]. Annals of Botany, 2013, 111(6): 1021-1058.
- [12] Sánchez-Vallet A, López G, Ramos B, *et al.* Disruption of abscisic acid signaling constitutively activates *Arabidopsis* resistance to the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina*[J]. Plant Physiology, 2012, 160(4): 2109-2124.
- [13] 王重彬, 邹同雷, 孙雪, 等. 水杨酸和茉莉酸甲酯对高温龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)理化及基因表达的影响[J]. 海洋与湖沼, 2015, 46(5): 1132-1138.  
Wang C B, Zou T L, Sun X, *et al.* Effects of salicylic acid and methyl jasmonate on physicochemical property and gene expression of *Gracilaria lemaneiformis* under heat stress[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2015, 46(5): 1132-1138(in Chinese).
- [14] Wang F J, Wang C B, Zou T L, *et al.* Comparative transcriptional profiling of *Gracilaria lemaneiformis* in response to salicylic acid- and methyl jasmonate-mediated heat resistance[J]. PLoS ONE, 2017, 12(5): e0176531.
- [15] 朱招波, 孙雪, 徐年军, 等. 水杨酸对龙须菜抗高温生

- 理的影响[J]. 水产学报, 2012, 36(8): 1304-1312.
- Zhu Z B, Sun X, Xu N J, *et al.* Effects of salicylic acid on the resistance of *Gracilaria/Gracilariopsis lemaneiformis* to high temperature[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(8): 1304-1312(in Chinese).
- [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*, 2001, 25(4): 402-408.
- [17] Wang Y, Feng Y Q, Wang H F, *et al.* Physiological and proteomic analyses of two *Gracilaria lemaneiformis* strains in response to high-temperature stress[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2016, 28(3): 1847-1858.
- [18] Lu K X, Cao B H, Feng X P, *et al.* Photosynthetic response of salt-tolerant and sensitive soybean varieties[J]. *Photosynthetica*, 2009, 47(3): 381-387.
- [19] 潘璐, 刘杰才, 李晓静, 等. 高温和加富CO<sub>2</sub>温室中黄瓜 Rubisco活化酶与光合作用的关系[J]. 园艺学报, 2014, 41(8): 1591-1600.
- Pan L, Liu J C, Li X J, *et al.* Correlation between rubisco activase and photosynthesis of cucumber in greenhouse under high temperature and elevated CO<sub>2</sub>[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2014, 41(8): 1591-1600(in Chinese).
- [20] Parry M A J, Andralojc P J, Khan S, *et al.* Rubisco activity: effects of drought stress[J]. *Annals of Botany*, 2002, 89(7): 833-839.
- [21] Crafts-Brandner S J, Law R D. Effect of heat stress on the inhibition and recovery of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activation state[J]. *Planta*, 2000, 212(1): 67-74.
- [22] Zhou Y H, Yu J Q, Mao W H, *et al.* Genotypic variation of Rubisco expression, photosynthetic electron flow and antioxidant metabolism in the chloroplasts of chill-exposed cucumber plants[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2006, 47(2): 192-199.
- [23] Janda T, Gondor O K, Yordanova R, *et al.* Salicylic acid and photosynthesis: signalling and effects[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2014, 36(10): 2537-2546.
- [24] Chen Y E, Cui J M, Li G X, *et al.* Effect of salicylic acid on the antioxidant system and photosystem II in wheat seedlings[J]. *Biologia Plantarum*, 2016, 60(1): 139-147.
- [25] Shi Q H, Bao Z Y, Zhu Z J, *et al.* Effects of different treatments of salicylic acid on heat tolerance, chlorophyll fluorescence, and antioxidant enzyme activity in seedlings of *Cucumis sativa* L.[J]. *Plant Growth Regulation*, 2006, 48(2): 127-135.
- [26] Wang L J, Fan L, Loescher W, *et al.* Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under heat stress and accelerates recovery in grapevine leaves[J]. *BMC Plant Biology*, 2010, 10: 34.
- [27] 吴文华, 潘瑞焱. 茉莉酸甲酯对水稻幼苗光合作用的影响[J]. 植物学报, 1998, 40(3): 256-262.
- Wu W H, Pan R C. Effect of jasmonic acid methyl ester on the photosynthesis of rice seedlings[J]. *Acta Botanica Sinica*, 1998, 40(3): 256-262(in Chinese).
- [28] 金微微, 张会慧, 王炎, 等. 茉莉酸甲酯对干旱及复水下烤烟幼苗光合特性和抗氧化酶的影响[J]. 干旱区地理, 2011, 34(6): 933-940.
- Jin W W, Zhang H H, Wang Y, *et al.* Effects of methyl jasmonate on photosynthetic characteristics and antioxidant enzyme of flue-curing tobacco seedlings under drought stress and rehydration[J]. *Arid Land Geography*, 2011, 34(6): 933-940(in Chinese).
- [29] Pandey D M, Goswami C L, Kumar B, *et al.* Hormonal regulation of photosynthetic enzymes in cotton under water stress[J]. *Photosynthetica*, 2000, 38(3): 403-407.
- [30] Schuster G, Even D, Kloppstech K, *et al.* Evidence for protection by heat-shock proteins against photoinhibition during heat-shock[J]. *The EMBO Journal*, 1988, 7(1): 1-6.
- [31] Schroda M, Vallon O, Wollman F A, *et al.* A chloroplast-targeted heat shock protein 70(HSP70) contributes to the photoprotection and repair of photosystem II during and after photoinhibition[J]. *The Plant Cell*, 1999, 11(6): 1165-1178.
- [32] Zhang H N, Li W, Li J J, *et al.* Characterization and expression analysis of *hsp70* gene from *Ulva prolifera* J. Agardh (Chlorophycophyta, Chlorophyceae)[J]. *Marine Genomics*, 2012, 5: 53-58.
- [33] Gu Y H, Zhang X, Lu N, *et al.* Cloning and transcription analysis of *hsp70-1* and *hsp70-2* of *Gracilaria lemaneiformis* under heat shock[J]. *Aquaculture*, 2012, 358-359: 284-291.
- [34] Huovinen P S, Oikari A O J, Soimasuo M R, *et al.* Impact of UV radiation on the early development of the giant kelp (*Macrocystis pyrifera*) gametophytes[J]. *Photochemistry and Photobiology*, 2000, 72(3): 308-313.
- [35] 刘伟, 杨锐, 徐丽宁, 等. 坛紫菜*hsp70*基因克隆与表



- 达[J]. 宁波大学学报(理工版), 2012, 25(2): 17-25.
- Liu W, Yang R, Xu L N, *et al.* Cloning and expression of hsp70 for *Porphyra haitanensis*[J]. *Journal of Ningbo University (Natural Science & Engineering)*, 2012, 25(2): 17-25(in Chinese).
- [36] Li G Q, Zang X N, Zhang X C, *et al.* Cloning of ubiquitin-activating enzyme and ubiquitin-conjugating enzyme genes from *Gracilaria lemaneiformis* and their activity under heat shock[J]. *Gene*, 2014, 538(1): 155-163.
- [37] Li H, Liu S S, Yi C Y, *et al.* Hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced HSP70 accumulation and heat tolerance in grafted cucumber plants[J]. *Plant, Cell and Environment*, 2014, 37(12): 2768-2780.
- [38] Hu X L, Liu R X, Li Y H, *et al.* Heat shock protein 70 regulates the abscisic acid-induced antioxidant response of maize to combined drought and heat stress[J]. *Plant Growth Regulation*, 2010, 60(3): 225-235.

## Responses of *rbcl* and *hsp70* to heat and phytohormone treatments in *Gracilaria lemaneiformis*

LÜ Yan<sup>1</sup>, WANG Fangjun<sup>1</sup>, LIN Lichun<sup>1</sup>, XU Nianjun<sup>1</sup>, LU Kaixing<sup>2</sup>, SUN Xue<sup>1\*</sup>

(1. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. College of Science and Technology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

**Abstract:** Seaweed *Gracilaria lemaneiformis* is mainly used as the bait for abalone and raw material for agar production in China. This macroalga is widely cultivated along the coasts of China from south to north, but its cultivation period is limited by high temperature in summer. In the current study, the effects of heat and phytohormone treatments on Rubisco large subunit (*rbcl*) and heat shock protein 70 (HSP70) were investigated by using quantitative real-time PCR and Western blot technologies in *G. lemaneiformis*. The results showed that transcript and protein levels of *rbcl* in *G. lemaneiformis* were inhibited by heat stress (33 °C), however, 100 μmol/L salicylic acid (SA100) and 50 μmol/L methyl jasmonate (MJ50) treatments reduced the inhibition of high temperature on the expression of *rbcl*. In SA100 and MJ50 groups, the transcriptional expression of *rbcl* increased to 1.31- and 1.32-fold at 3 h, and the protein levels of *rbcl* were enhanced to 1.36- and 2.10-fold at 24 h compared to the heat-stress group, respectively. Moreover, SA100 and MJ50 effectively alleviated the inhibition effect of heat stress on Rubisco activity, and recovered the Rubisco activation states. However, the addition of 50 μmol/L abscisic acid (ABA50) mainly inhibited *rbcl* expression and Rubisco activity. Heat stress stimulated the transcript and protein levels of HSP70; *hsp70* transcript expression further rose by 0.53–1.00 times at 3 h, and its protein expression enhanced by 0.93–2.45 times at 24 h in the heat-stress group after applying SA100, MJ50 or ABA50. In conclusion, SA, MJ and ABA play a certain role in regulating the inhibition of photosynthesis enzyme and the induction of heat shock proteins caused by heat stress.

**Key words:** *Gracilaria lemaneiformis*; heat shock protein 70; Rubisco large subunit; heat stress; salicylic acid; methyl jasmonate; abscisic acid

**Corresponding author:** SUN Xue. E-mail: sunxue@nbu.edu.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (41376151, 31672674); Open Fund of Zhejiang Provincial Top Key Discipline of Aquaculture in Ningbo University (xkzsc1525)