

文章编号: 1000-0615(2018)07-1077-08

DOI: 10.11964/jfc.20171010994

坛紫菜自由丝状体响应琼胶寡糖的激发

杜莉, 杨锐, 骆其君, 严小军, 陈海敏*

(宁波大学海洋学院, 浙江省海洋生物工程重点实验室, 浙江宁波 315211)

摘要: 为了研究琼胶寡糖对坛紫菜自由丝状体藻丝生长和壳孢子囊枝形成的激发的影响, 实验采用琼胶寡糖激发坛紫菜自由丝状体, 以液相氧电极检测坛紫菜丝状体净光合放氧速率的变化; 以对羟基苯乙酸(POHPAA)化学发光法检测坛紫菜丝状体的 H_2O_2 释放量; 利用LC-MS检测红藻糖苷含量变化; 利用实时定量PCR技术检测坛紫菜丝状体 H_2O_2 产生相关基因(*Phrboh*、*PhSOD*)和红藻糖苷合成相关基因(*Phnho1*、*Phgpdh*、*Phtps*)的表达情况; 并利用显微镜观察法检测壳孢子囊枝数量的变化。结果发现, 琼胶寡糖能够激发坛紫菜自由丝状体的系列响应, 表现在净光合放氧速率以及光合同化产物红藻糖苷的含量和生物合成出现增加; H_2O_2 释放量持续增加, 与产生 H_2O_2 相关的2个酶基因*Phrboh*和*PhSOD*的表达增强。此外, 琼胶寡糖也能够促进在坛紫菜自由丝状体的发育, 在培养第30天时, 琼胶寡糖处理组的壳孢子囊枝形成率达到59%, 显著高于对照组46%。综上所述, 琼胶寡糖能够增加坛紫菜自由丝状体的光合速率和光合同化产物, 并通过形成 H_2O_2 的酶的表达来诱导活性氧的释放; 琼胶寡糖还能促进坛紫菜自由丝状体的繁殖发育。

关键词: 坛紫菜; 琼胶寡糖; 自由丝状体; 响应

中图分类号: S 968.4

文献标志码: A

寡糖是一类重要的植物激发子, 能够诱导植物的抗性反应, 且具有调节植物生长、发育和繁殖等作用^[1-2]。近年来研究发现, 寡糖能够作为激发子诱导海藻的防御反应。如琼胶寡糖能够诱导红藻江蓠(*Gracilaria conferta*)产生氧爆发, 减少附生菌数量^[3]; 褐藻胶寡糖能诱导掌状海带(*Laminaria digitata*)产生氧爆发, 增强其抵御内生植物绒状带绒藻(*Laminariocolax tomentosoides*)侵染能力^[4]。前期研究发现, 坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)叶状体也能响应琼胶寡糖处理, 产生活性氧爆发^[5]、减少藻体表面附生菌数量^[6]、降低藻体腐烂率^[7]等现象。此外, 在壳孢子附网后浸泡琼胶寡糖也能够增加附网强度, 更好的促进坛紫菜叶状体的生长, 促进增产^[8]。

坛紫菜的生活史包括二倍体丝状体和单倍体叶状体阶段。丝状体在繁殖发育时, 会经历膨大藻丝、壳孢子囊枝的形成与壳孢子放散等阶段, 诱导提高紫菜自由壳孢子囊枝的形成率一直是紫菜自由壳孢子囊枝育苗的关键^[9-10]。我们的前期研究虽然已证实坛紫菜叶状体能够受琼胶寡糖的激发, 但丝状体的响应情况却不详。本研究以坛紫菜自由丝状体为材料, 进一步研究琼胶寡糖激发对藻丝生长发育的影响, 从光合速率和活性氧的激发等角度来研究丝状体应答琼胶寡糖的方式; 并观察琼胶寡糖对膨大藻丝形成的促进作用, 从而为琼胶寡糖在紫菜自由丝状体培养和自由壳孢子囊枝育苗方面的应用提供初步的理论依据。

收稿日期: 2017-10-10 修回日期: 2018-01-03

资助项目: 现代农业产业技术体系专项(CARS-50); 浙江省重大科技专项(2016C02055-6B); 宁波市科技计划项目(2017C110026, 2017C10020)

通信作者: 陈海敏, E-mail: chenhaiamin@nbu.edu.cn

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

“浙东1号”坛紫菜自由丝状体，由浙江省海洋生物工程重点实验室提供。

1.2 实验方法

丝状藻丝生长阶段 (1)材料处理。取过滤后的灭菌海水，添加Ⅲ号营养母液(990 nmol/L KNO_3 ，57 nmol/L K_2HPO_4 ，9 nmol/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，54 nmol/L Na_2EDTA ，1 nmol/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)作为自由丝状体的培养液。培养温度为20 °C，光照强度为40 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ，光照周期为12 L : 12 D。

(2)琼胶寡糖制备。2%琼胶溶液，在90 °C下以0.05 mol/L HCl降解2 h，冷却至室温后用1 mol/L NaOH溶液中和pH至7，进行冷冻干燥^[7]。以100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 琼胶寡糖处理坛紫菜自由丝状体，培养密度为(10±0.02) g/L，处理至0、0.5、0.75、1和3 h时分别收集样品。

(3)净光合放氧速率检测。利用液相氧电极(Hansatech，英国)对每个样品进行净光合放氧速率的测定。控制培养温度为20 °C，光照强度为40 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ，具体操作和计算方法参考已有文献^[11]。

(4) H_2O_2 释放量检测。样品处理不同时间后，测定培养液 H_2O_2 浓度，具体计算方法参照已有文献^[12]，将POHPAA原液(6.13 $\mu\text{mol}/\text{L}$ POHPAA，276.9 U/L 过氧化物酶(POD)，和8.6 mmol/L Tris-HCl，pH=8.8)加入到200 μL 培养液中，黑暗条件下孵育35 min后以全波长扫描多功能酶标仪(Thermo，美国)测定荧光信号，激发光和发射光分别为313和400 nm。根据不同浓度 H_2O_2 的荧光信号值绘制出标准曲线，利用该标准曲线和各样品的荧光信号值计算各样品中 H_2O_2 浓度。

(5)红藻糖苷含量检测。每个样品取鲜重100 mg放于含1 mL 70%乙醇的萃取管中，以均质器(Bertin，法国)萃取9 min(5 000 r/min，30 s×3，15 s，6个循环)。离心收集上清液，30 °C减压蒸发至干，用1 mL色谱级甲醇溶液复溶，将复溶液稀释50倍，经0.22 μm 有机滤膜过滤后以LC-MS分析。根据不同浓度含红藻糖苷2种同分异构体(flavidoside和iso-flavidoside)混合标准品的峰面积绘制2条标准曲线，利用该标准曲线和样品各分组的峰面积计算各样品中红藻糖苷含量。LC-

MS检测。液相条件：氨基柱，流动相为甲醇和10 mmol/L乙酸铵水溶液(体积比=1 : 9)等度洗脱，流速300 $\mu\text{L}/\text{min}$ ，柱温30 °C。质谱条件：电喷雾电离源负离子电离模式，雾电压2 500 V，鞘气(N_2)压力25 L/min，辅助气(N_2)流量5 Arbs，离子传输毛细管温度300 °C，采用选择反应监测(SRM)扫描模式，采集时间为0.6 s，质量扫描范围为50~600 m/z。产物离子253/89(m/z)和253/119(m/z)用作定量。

(6)荧光定量PCR(qRT-PCR)检测。参照Plant RNA Kit (OMEGA)总RNA抽提试剂盒说明书提取每个样品总RNA，根据Takara PrieScript RT reagent Kit (TaKaRa，中国)试剂盒反转成cDNA。以18S rRNA基因作为内参基因，在Light Cyber 96 System (Roche，瑞士)仪器中检测坛紫菜丝状体中NADPH氧化酶(*Phrboh*)基因、超氧化物歧化酶(*PhSOD*)基因、甘油激酶(*Phnho1*)基因、3-磷酸甘油脱氢酶(*Phgpdh*)基因、红藻糖苷-6-磷酸合成酶(*Phtps1-4*)基因的相对表达量。共进行3次生物学重复，每个样品做3个技术重复，反应体系20 μL ，扩增程序：95 °C预变性3 min；95 °C变性5 s，55 °C退火18 s，72 °C延伸13 s，50个循环；总延伸结束后，加入溶解曲线的制备(60~95 °C范围内)步骤。用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法进行分析。

壳孢子囊枝形成阶段 (1)材料处理。取过滤后的灭菌海水，添加 1×10^{-6} NO_3^- 、 1×10^{-6} K_2HPO_4 作培养液，温度为(28±0.2) °C，光照强度为20 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ，光照周期为8 L : 16 D。在壳孢子囊枝形成过程中进行3次琼胶寡糖处理，分别在第0、5和10天进行，1 h/次，处理浓度为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，处理后使用海水清洗2~3次。以不加琼胶寡糖的丝状体作为对照组。

(2)壳孢子囊枝囊形成率检测。每隔10 d更换海水培养液，在正置显微镜(OLYMPUS BX60，日本)下观察藻丝发育程度，每个样品随机选取10个视野记录数据。壳孢子囊枝形成率(%)=镜检10个视野中自由丝状体中壳孢子囊枝数目/被镜检的自由丝状体总数×100，取平均值。

1.3 数据统计

n=3，数据以平均值±标准差(mean±SD)表示。应用t检验比较样品组与对照组的均数间的差别，P<0.05表示显著差异。

表1 qRT-PCR扩增目标基因的引物序列

Tab. 1 Primer sequences of target genes amplified by qRT-PCR

引物名称 primer	序列(5'→3') sequence	扩增片段 大小/bp length
<i>Phrboh</i> -QF	TGCCGCTCAAGACGACCTA	90
<i>Phrboh</i> -QR	CACCCACCACAGACCCAGA	
<i>PhSOD</i> -QF	GCTGATGGAGGGCATTGTC	158
<i>PhSOD</i> -QR	CGGTGTAGTTCTTGCAATGA	
<i>Phnho1</i> -QF	CAACTGCACCTCATCCACACG	214
<i>Phnho1</i> -QR	CATCACCTGAAACGCAATCGCC	
<i>Phgpdh</i> -QF	AACCTCACGGACATCATCAAC	138
<i>Phgpdh</i> -QR	CGGCAGCACAAAACACCAG	
<i>Phtps1</i> -QF	GCCCGACGAGGACCAAGACT	132
<i>Phtps1</i> -QR	AAGAGCGGCCACAACACG	
<i>Phtps2</i> -QF	TATGTCAGGCCAAGAACCG	196
<i>Phtps2</i> -QR	GAGTGCATGAGGATGTAGCG	
<i>Phtps3</i> -QF	GGGACCTCACCCGTACACTT	142
<i>Phtps3</i> -QR	GCTGACAGATAGCCCATTCG	
<i>Phtps4</i> -QF	AGGTGGTGGAGGTGTATGAT	184
<i>Phtps4</i> -QR	CACGGAATGTGAAGGAAGAA	
<i>Ph18S rRNA</i> -QF	AGTTAGGGGATCGAAGACGA	153
<i>Ph18S rRNA</i> -QR	CAGCCTTGCGACCATACTC	

2 结果

2.1 琼胶寡糖对自由丝状体净光合放氧速率的影响

在100 μg/mL琼胶寡糖处理下,坛紫菜丝状体净光合放氧速率呈持续增加的趋势。在3 h时达到53.3 μmol O₂/(h·g FW)(FW指丝状体鲜重,下同)(图1)。

2.2 琼胶寡糖对自由丝状体H₂O₂释放量及相关基因表达的影响

坛紫菜丝状体H₂O₂的释放量较高,浓度在120.9 nmol/dm³。而添加了琼胶寡糖后,会进一步增加丝状体H₂O₂的释放量,并随时间持续上升,在3 h时释放量可达到未处理的2.0倍,为237.0 nmol/dm³(*P*<0.01,图2),说明琼胶寡糖能够诱导坛紫菜丝状体产生H₂O₂的释放。但丝状体对寡糖的响应不是非常迅速,在0.75 h内变化不

明显。需要达到1 h以上才显示出显著的H₂O₂的释放(*P*<0.05)。

随后对坛紫菜中与H₂O₂的形成有关的2个酶基因的表达进行了qRT-PCR的检测。在生物体内,NADPH氧化酶参与了超氧阴离子(O₂⁻)的产生,而后O₂⁻在SOD酶的作用下形成H₂O₂^[13]。在琼胶寡糖处理下坛紫菜丝状体中*Phrboh*和*PhsS-OD*基因的表达随时间都出现上升趋势。特别是*Phrboh*的上调非常明显,在0.5 h时即已出现显著

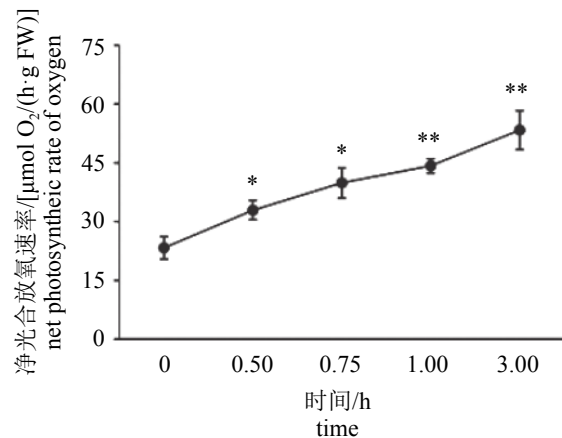


图1 琼胶寡糖对坛紫菜自由丝状体净光合放氧速率的影响

P*<0.05, *P*<0.01, ****P*<0.001(*n*=3),与0 h相比;下同

Fig. 1 Effect of agar-oligosaccharide on net photosynthetic rate of free-living conchocelis of *P. haitanensis*

P*<0.05, *P*<0.01, ****P*<0.001(*n*=3), compared with 0 h; the same below

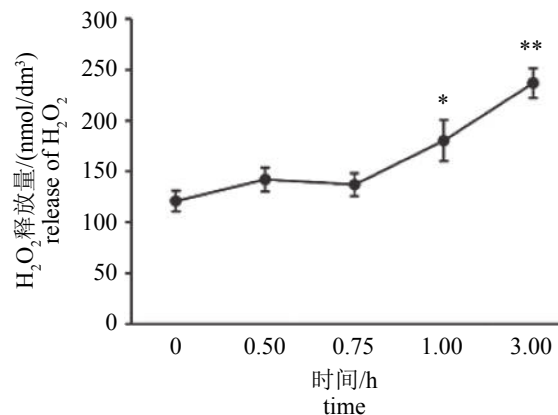


图2 琼胶寡糖对坛紫菜自由丝状体H₂O₂释放量的影响

Fig. 2 Effect of agar-oligosaccharides on the release of H₂O₂ from free-living conchocelis of *P. haitanensis*

上调($P<0.01$), 到3 h时, 可达到对照的15.78倍($P<0.001$)。PhSOD也同样出现上调趋势, 在1 h时达到最大表达量, 为对照组的6.01倍($P<0.01$), 但在3 h时出现小幅下调(图3)。

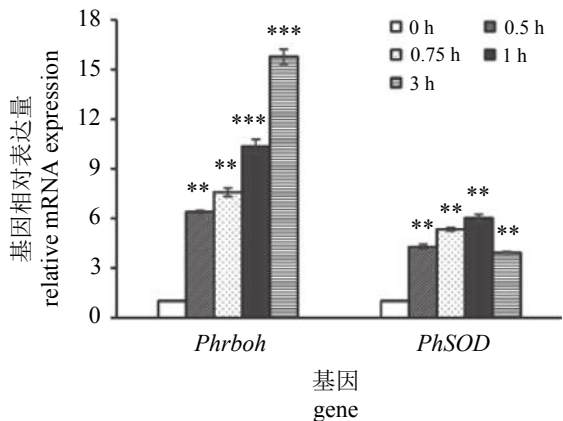


图3 琼胶寡糖处理下坛紫菜自由丝状体中 *Phrbob* 和 *PhSOD* 基因的相对表达量

Fig. 3 Relative expression of *Phrbob* and *PhSOD* genes in free-living conchocelis of *P. haitanensis* treated with agar-oligosaccharides

2.3 琼胶寡糖对自由丝状体红藻糖苷含量及相关基因表达的影响

红藻糖苷是红藻中光同化的初级产物, 有红藻糖苷和异红藻糖苷2种。结果显示, 坛紫菜丝状体中以异红藻糖苷为主, 含量是红藻糖苷的7.8倍。在琼胶寡糖处理后, 二者有相似的变化趋势, 在0.75 h内呈现上升趋势, 在0.75 h时, 含量分别为对照组的1.53倍和1.40倍($P<0.05$)。随后含量都出现降低, 在3 h时基本回复至对照水平(图4)。

随后对红藻糖苷生物合成相关的多个基因的表达进行了qRT-PCR的分析。其中, 3-磷酸—甘油激酶(NHO-1)和3-磷酸—甘油脱氢酶(GPDH)是合成红藻糖苷的前体物质3-磷酸—甘油的合成酶^[14]。Phnho1和Phgpdh基因在琼胶寡糖处理下具有相似的表达趋势, 其中Phgpdh的上调幅度较大。二者在琼胶寡糖处理0.5 h时即出现大幅度的上调表达($P<0.01$)。在1 h时达到最大表达量, 分别为对照的4.71倍和6.01倍($P<0.01$)。但在3 h时均出现下调(图5)。

在坛紫菜中共发现4条编码红藻糖苷-6-磷酸合成酶(TPS)的基因, 该酶是合成红藻糖苷的关键酶^[15]。在琼胶寡糖处理下, 在Phtps基因家族

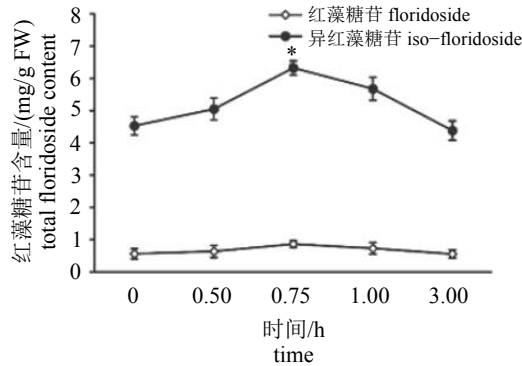


图4 琼胶寡糖对坛紫菜自由丝状体红藻糖苷含量的影响

Fig. 4 Effect of agar-oligosaccharides on total floridoside content of free-living conchocelis of *P. haitanensis*

4个基因中以Phtps2和Phtps3响应较明显, 在0.5 h时即出现显著增高(Phtps2, $P<0.05$; Phtps3, $P<0.01$), 在1 h时达到最大表达量, 分别为对照的4.14倍、3.91倍($P<0.01$)。而Phtps1基因和Phtps4基因的变化幅度相对较小, 但也有相应升高。但是这4个基因在3 h时都出现表达量的下调现象(图5)。

2.4 琼胶寡糖对自由丝状体壳孢子囊枝形成阶段的影响

在传统育苗过程中, 7月中旬开始诱导贝壳丝状体壳孢子囊枝的形成, 诱导时间约为1个

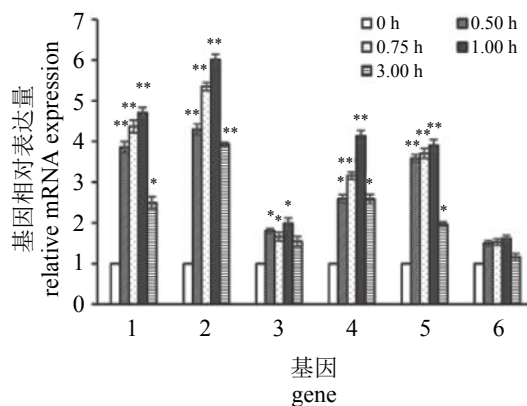


图5 琼胶寡糖处理下坛紫菜自由丝状体中 *Phnho1*、*Phgpdh*和 *Phtps1-4* 的相对表达量

1. *Phnho1*; 2. *Phgpdh*; 3. *Phtps1*; 4. *Phtps2*; 5. *Phtps3*; 6. *Phtps4*

Fig. 5 Relative expression of *Phnho1*, *Phgpdh* and *Phtps1-4* genes in free-living conchocelis of *P. haitanensis* treated with agar-oligosaccharides

月。利用自由丝状体直接育苗来改进传统贝壳丝状体育苗, 简化育苗操作, 关键在于诱导提高紫菜自由壳孢子囊枝的形成率。寡糖作为激发子能够促进植物生长发育和繁殖过程^[1-2], 而对坛紫菜丝状体的繁殖发育影响尚未有研究。我们利用琼胶寡糖分别在培养第0、5和10天处理自由丝状体, 时间1 h/次, 浓度100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 能够提高坛紫菜自由丝状体的壳孢子囊枝形成率。在培养第10天时, 处理组的形成率已高于对照组, 在培养第30天时, 处理组的壳孢子囊枝形成率达到59%, 显著高于对照组46% ($P < 0.05$) (图6)。由此说明, 琼胶寡糖能够促进坛紫菜自由丝状体的发育。

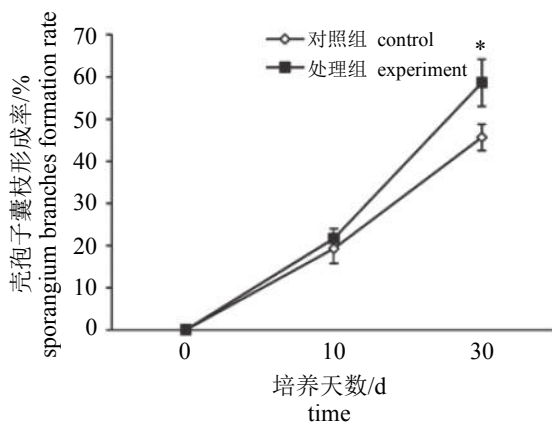


图6 琼胶寡糖对坛紫菜自由丝状体壳孢子囊枝形成率的影响

Fig. 6 Effect of agar-oligosaccharides on sporangium branches formation rate of free-living conchocelis of *P. haitanensis*

3 讨论

光合作用是藻类最基本的生理特征, 环境和化学因素都是其影响因素。寡糖可以加快植物叶片的光合速率^[16-17]。本研究中, 琼胶寡糖同样可以刺激坛紫菜丝状体的净光合放氧速率的持续增加, 表明琼胶寡糖能够提高坛紫菜丝状体的光合作用, 促进其生长。红藻糖苷是大部分红藻中主要的光合可溶性小分子糖, 是光合同化的直接产物, 包括红藻糖苷和异红藻糖苷两种。光合作用时, 红藻经RubisCO酶固定无机碳, 再经磷酸戊糖途径等反应形成3-磷酸甘油, UDP-半乳糖与其结合形成红藻糖苷。因此, 红藻糖苷的含量变化也能反应出红藻的光合效率。

同时, 红藻糖苷也被报道是红藻中主要的渗透压调节物质, 参与藻体的抗胁迫作用。坛紫菜丝状体需要度过夏季的高温阶段, 红藻糖苷的合成和积累对丝状体应对高温胁迫具有重要意义。本研究中发现, 丝状体中两种红藻糖苷以异红藻糖苷含量居多, 这与叶状体相同^[18]。但从相对含量来看, 丝状体中二者的含量明显低于叶状体, 如异红藻糖苷在鲜重叶状体中是9.26 mg/g, 而在鲜重丝状体中只有4.55 mg/g。说明丝状体对光合速率和生长的需求没有叶状体强, 这与其生活状态是相符的。本研究发现, 丝状体同样可以受琼胶寡糖的应激, 在处理的0.75 h内, 丝状体中两种红藻糖苷的含量都是逐渐增加的, 随后回到对照水平, 这表明寡糖能够快速引起丝状体中红藻糖苷的同化合成。本研究也对这几种与红藻糖苷合成有关的酶进行了qRT-PCR的分析。结果发现, 所有相关的酶基因在琼胶寡糖刺激后都出现不同程度的上调, 其中甘油激酶基因*Phnho1*和甘油3-磷酸脱氢酶基因*Phgpdh*的上调幅度非常大, 因为3-磷酸甘油是糖代谢和脂代谢的关键中间物, 其合成关键酶的大幅度上调, 也说明基础代谢的加强。而4条红藻糖苷-6-磷酸合成酶基因的上调幅度有所差异, 以*Phtps2*和*Phtps3*的上调更明显, 说明4条基因在坛紫菜中有可能存在不同分工, 推测这两个基因在红藻糖苷合成过程中起到主要作用。

氧爆发是藻类防御反应的普遍现象^[19-20]。之前的研究发现, 坛紫菜丝状体具有高 H_2O_2 释放的特点, 丝状体的 H_2O_2 释放量超过叶状体7倍^[21], 本研究结果显示利用琼胶寡糖刺激后, 丝状体的 H_2O_2 释放量进一步增高, 但与叶状体或其他藻类不同, 其他藻类受到寡糖刺激后, 会迅速做出反应, 在短时间内出现活性氧的爆发峰, 持续约十几分钟后恢复至正常^[3-4, 19, 22], 而本研究中 H_2O_2 的反应较迟钝, 在处理的0.75 h内无显著变化, 1 h时才明显升高, 且持续3 h, 即在2 h内活性氧并没有下降。此现象较特殊, 说明丝状体能够承受较高的活性氧。细胞内 H_2O_2 的产生首先是通过NADPH氧化酶催化形成超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$), 再由SOD酶催化 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 形成 H_2O_2 ^[13]。本研究对 H_2O_2 形成的这两个基因*Phrbob*和*PhSOD*进行转录水平的分析发现, 二者的表达均上调。说明琼胶寡糖能够诱导坛紫菜丝状体中NADPH氧化酶基因和SOD基因的上调表达, 从而提高酶

活力,参与H₂O₂的产生。

20世纪80年代,有报道首次阐明寡糖与植物的生长发育有关^[23]。随后研究也表明,寡糖能够作为一种信号分子,参与植物的生长调控过程,影响植物的发育和繁殖方向,诱导植物产生防御反应^[23]。本研究结果显示,在丝状体壳孢子囊枝形成阶段,利用琼胶寡糖处理自由丝状体,在培养第10天时,处理组的形成率已高于对照组,在培养第30天时,处理组的壳孢子囊枝形成率达到59%,显著高于对照组46%。说明琼胶寡糖能够加速诱导自由丝状体进入壳孢子囊枝,促进坛紫菜自由丝状体的发育。目前,尚未清楚寡糖对藻类生殖调节的作用机制。陈焯^[24]对坛紫菜孢子囊枝形成过程中主要的生化组分研究发现,在坛紫菜自由丝状体发育过程中,藻胆蛋白与叶绿素a比值、碳水化合物含量一直呈上升趋势,与孢子囊枝数量之间呈较明显的正相关。藻胆蛋白与叶绿素a作为红藻中的主要光合色素,其比值上升在一定程度上反应出光合作用效率的提高。红藻糖苷作为坛紫菜中主要的光合产物,是最主要的可溶性碳水化合物。本研究中,琼胶寡糖处理后,坛紫菜自由丝状体的光合作用和光合同化产物都增加。推测琼胶寡糖促进坛紫菜自由丝状体的繁殖发育,可能是通过促进自由丝状体的光合作用和光合同化产物的积累,为丝状体发育提供必要的物质基础,进而促进壳孢子囊枝的形成。

综上所述,琼胶寡糖不仅能够激发叶状体的抗性反应,同样能够增加丝状体的光合速率和光合同化产物;并通过增加形成H₂O₂的酶的表达来诱导活性氧的释放;并且琼胶寡糖还能够促进坛紫菜自由丝状体的繁殖发育。因此,在坛紫菜实际育种和养殖中,有望开发琼胶寡糖作为丝状体激发子,促进其生长和发育,但其效果仍需在实际生产中验证。

参考文献:

- [1] Albersheim P, Valent B S. Host-pathogen interactions in plants: plants, when exposed to oligosaccharides of fungal origin, defend themselves by accumulating antibiotics[J]. *Journal of Cell Biology*, 1978, 78(3): 627-643.
- [2] 郭卫华, 赵小明, 杜昱光. 壳寡糖对黄瓜种子萌发和幼苗生长及光合特性的影响[J]. *中国农学通报*, 2009, 25(3): 164-169.
- [3] Guo W H, Zhao X M, Du Y G. Effects of oligochitosan on the seed germination seedling growth and photosynthetic characters of cucumber[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2009, 25(3): 164-169(in Chinese).
- [4] Weinberger F, Friedlander M, Hoppe H G. Oligoagars elicit a physiological response in *Gracilaria conferta* (Rhodophyta)[J]. *Journal of Phycology*, 1999, 35(4): 747-755.
- [5] K pper F C, Kloareg B, Guern J, et al. Oligoguluronates elicit an oxidative burst in the brown algal kelp *Laminaria digitata*[J]. *Plant Physiology*, 2001, 125(1): 278-291.
- [6] 朱竹君, 骆其君, 严小军, 等. 琼胶寡糖聚合度对坛紫菜抗性诱导的影响[J]. *海洋学报*, 2012, 34(6): 205-209.
- [7] Zhu Z J, Luo Q J, Yan X J, et al. Effects of degree of polymerization of oligoagars on inducing the defense response in *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta)[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2012, 34(6): 205-209(in Chinese).
- [8] 朱方超, 李崇丰, 王秀娟, 等. 琼胶寡糖激发坛紫菜对附生细菌的减少作用[J]. *中国生物防治学报*, 2012, 28(3): 394-399.
- [9] Zhu F C, Li C F, Wang X J, et al. Oligoagars induce defense response of *Porphyra haitanensis* to epiphytic bacteria[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2012, 28(3): 394-399(in Chinese).
- [10] 刘方方, 骆其君, 陈海敏, 等. 琼胶寡糖对坛紫菜抗烂性的诱导效应[J]. *宁波大学学报(理工版)*, 2014, 27(4): 12-15.
- [11] Liu F F, Luo Q J, Chen H M, et al. Rot-resistance effect of oligoagar on disease of *Pyropia haitanensis*[J]. *Journal of Ningbo University (Natural Science & Engineering Edition)*, 2014, 27(4): 12-15(in Chinese).
- [12] Chen H M, Jian Q L, Luo Q J, et al. Application of oligoagars as elicitors for field aquaculture of *Pyropia haitanensis*[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2016, 28(3): 1783-1791.
- [13] 郭文竹. 环境因子对条斑紫菜孢子体生长发育的影响[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
- [14] Guo W Z. Effects of environmental factors on the growth and development of *Pyropia yezoensis* sporophyte[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012(in Chinese).
- [15] 陈翠芬, 李信书, 杨玲, 等. 外界因子对条斑紫菜自由壳孢子囊枝形成和生长影响[J]. *生物技术通报*, 2008(4): 167-170.

- Chen C F, Li X S, Yang L, *et al.* Effect of external factors on formation and growth of free-living conchospore in *Porphyra yezoensis*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2008(4): 167-170(in Chinese).
- [11] 卓品利, 钟佳丽, 王东, 等. 不同光照条件下外源水杨酸对浒苔响应紫外辐射胁迫的影响[J]. *应用生态学报*, 2017, 28(6): 1977-1983.
- Zhuo P L, Zhong J L, Wang D, *et al.* Effect of exogenous salicylic acid and ultraviolet radiation on *Ulva prolifera* under different light conditions[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2017, 28(6): 1977-1983(in Chinese).
- [12] Miller W L, Kester D R. Hydrogen peroxide measurement in seawater by (p-hydroxyphenyl) acetic acid dimerization[J]. *Analytical Chemistry*, 1988, 60(24): 2711-2715.
- [13] 钱飞箭. 坛紫菜受高温和干出胁迫的机理及脂代谢关键基因的研究[D]. 宁波: 宁波大学, 2014.
- Qian F J. Study on the mechanism of *Pyropia haitanensis* induced by stressed and lipid metabolism related gene[J]. Ningbo: Ningbo University, 2014(in Chinese).
- [14] Lai X J, Yang R, Luo Q J, *et al.* Glycerol-3-phosphate metabolism plays a role in stress response in the red alga *Pyropia haitanensis*[J]. *Journal of Phycology*, 2015, 51(2): 321-331.
- [15] 赖晓娟. 坛紫菜糖苷合成途径中关键基因的研究[D]. 宁波: 宁波大学, 2014.
- Lai X J. Research on the key genes in the biosynthetic pathway of floridoside in *Pyropia haitanensis*[J]. Ningbo: Ningbo University, 2014 (in Chinese).
- [16] 李艳, 魏立君, 王青, 等. 壳寡糖对油菜叶片光合特性的影响[J]. *中国农学通报*, 2010, 26(2): 132-136.
- Li Y, Wei L J, Wang Q, *et al.* Effects of oligochitosan on photosynthetic parameter of *Brassica napus* L. leaves [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, 26(2): 132-136(in Chinese).
- [17] 张运红, 孙克刚, 杜君, 等. 海藻寡糖增效尿素对水稻光合特性及碳代谢产物积累的影响[J]. *中国土壤与肥料*, 2016(3): 54-59.
- Zhang Y H, Sun K G, Du J, *et al.* Effects of alginate-derived oligosaccharides synergistic urea on the photosynthetic characteristics and accumulation of carbon metabolites in rice[J]. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2016(3): 54-59(in Chinese).
- [18] 宋丹丹. 高温胁迫下坛紫菜中红藻糖苷含量变化以及相关抗逆基因的表达[D]. 宁波: 宁波大学, 2014.
- Song D D. The changes of floridoside content and the expression of stress resistance related genes in *Pyropia haitanensis* (Rhodophyta) under heat stress[D]. Ningbo: Ningbo University, 2014(in Chinese).
- [19] Weinberger F, Richard C, Kloareg B, *et al.* Structure-activity relationships of oligoagar elicitors toward *Gracilaria conferta* (Rhodophyta)[J]. *Journal of Phycology*, 2001, 37(3): 418-426.
- [20] Hou Y, Wang J, Simerly T, *et al.* Hydrogen peroxide released from *Pyropia yezoensis* induced by oligo-porphyrans: mechanisms and effect[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2015, 27(4): 1639-1649.
- [21] Luo Q J, Zhu Z G, Zhu Z J, *et al.* Different responses to heat shock stress revealed heteromorphic adaptation strategy of *Pyropia haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta) [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e94354.
- [22] Weinberger F, Leonardi P, Miravalles A, *et al.* Dissection of two distinct defense-related responses to agar oligosaccharides in *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta) and *Gracilaria conferta* (Rhodophyta)[J]. *Journal of Phycology*, 2005, 41(4): 863-873.
- [23] 黄菊艳. 寡糖对植物不同发育形式的生理调节作用[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
- Huang J Y. The effects of oligosaccharides on biological activity of different growth modes of plants[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014(in Chinese).
- [24] 陈焯. 坛紫菜孢子囊枝形成的化学基础及发育调控的初步研究[D]. 宁波: 宁波大学, 2004.
- Chen Y. Preliminary study on the chemical basis and development regulation of sporangial branchlets of *Porphyra haitanensis*[D]. Ningbo: Ningbo University, 2014(in Chinese).

Response of free-living conchocelis of *Pyropia haitanensis* to agaro-oligosaccharides

DU Li, YANG Rui, LUO Qijun, YAN Xiaojun, CHEN Haimin*

(Key Laboratory of Marine Biotechnology in Zhejiang Province, School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: This study was designed to research the response of free-living conchocelis growth and sporangium branches formation stage of free-living conchocelis of *Pyropia haitanensis* to agaro-oligosaccharide. After being treated with agaro-oligosaccharide, the net photosynthetic rate of free-living conchocelis of *P. haitanensis* was measured by liquid phase electrode; the concentration of H₂O₂ in the medium was determined by the dimerization of (p-hydroxyphenylethyl) acetic acid; the floridoside content was detected by LC-MS; the H₂O₂ related genes (*Phrboh*, *PhSOD*) and the floridoside synthesis related genes (*Phnhol*, *Phgpdh*, *Phtps*) expression was detected by real-time PCR; the number of sporangium branches was examined by microscopy. The results showed that the agaro-oligosaccharides can stimulate a series of responses of free-living conchocelis of *P. haitanensis*. These responses include increased photosynthetic rate; increase the content and biosynthesis of photosynthetic products of floridoside; the release of H₂O₂ continues to increase which was associated with the activation of two enzymes associated with H₂O₂ gene *Phrboh* and *PhSOD*. In addition, agaro-oligosaccharides can also promote the development of free-living conchocelis of *P. haitanensis*. On thirtieth day of culture, the sporangium branches formation rate of agaro-oligosaccharides treatment group reached 59%, significantly higher than the control group 46%. In conclusion, agaro-oligosaccharide can increase the free-living conchocelis of *P. haitanensis* photosynthetic rate and photosynthetic products, and can increase the expression of H₂O₂ synthesis enzyme to induce the release of ROS. Meanwhile, agaro-oligosaccharides can promote the reproduction of free-living conchocelis of *P. haitanensis*.

Key words: *Porphyra haitanensis*; agaro-oligosaccharides; free-living conchocelis; response

Corresponding author: CHEN Haimin. E-mail: chenhaimin@nbu.edu.cn

Funding projects: China Agriculture Research System (CARS-50); Major Scientific and Technological Special Projects of Zhejiang Province (2016C02055-6B); Ningbo Science and Technology Planning Project (2017C110026, 2017C10020B)