

条斑紫菜脱落酸合成对高盐胁迫的响应及其对光合作用的保护

余 斌^{1,3,4}, 杨佳丽^{1,3,4}, 牛建峰^{1,2,4}, 王广策^{1,2,4}

(1. 中国科学院海洋研究所 实验海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋生物与生物技术实验室, 山东 青岛 266237; 3. 中国科学院大学, 北京 100049; 4. 中国科学院海洋大科学研究中心, 山东 青岛 266071)

摘要: 植物在逆境下产生活性氧, 诱导抗氧化酶活性、抗逆基因表达上调。采用梯度盐度胁迫的方法处理条斑紫菜, 发现高盐胁迫下细胞内脱落酸(ABA)含量随盐度的增加而增加, 提示条斑紫菜中可能存在 ABA 介导的抗氧化代谢通路。利用 ABA 间接合成途径相关的几种抑制剂处理条斑紫菜叶状体, 高盐胁迫诱导氧自由基产生, 在藻体复苏过程中通过测定光合作用参数的恢复情况, 探测藻体受到的氧化伤害, 从而证明条斑紫菜中 ABA 生物合成的可能路径。结果显示多效唑显著降低了光系统 II 的电子传递能力, 说明条斑紫菜中 C5 前体的合成是通过类似真菌的 MVA 途径; 萘普生减缓了光合参数的恢复, 说明条斑紫菜中 ABA 合成途径类似于类胡萝卜素参与的间接途径; 然而, 间接途径合成最后一步的抑制剂钨酸钠却没有影响条斑紫菜胁迫后光合作用参数的恢复, 说明条斑紫菜中可能存在经由脱落醇生成 ABA 的支路途径, 而脱落醇可作为活性分子, 调控抗氧化酶的表达。烯唑醇则可能引起 ABA 的分解代谢受到抑制, 导致过氧化氢的过度产生, 并最终对机体产生不利影响。本文的结果为后续条斑紫菜 ABA 介导的抗氧化机制解析提供了数据支持。

关键词: 脱落酸; 生物合成途径; 活性氧清除系统; 高盐胁迫; 植物激素; 光合作用

中图分类号: Q539; Q51 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2018)11-0083-08

DOI: 10.11759/hyhx20180508001

植物激素是一类由植物自身合成的痕量有机物质, 主要包括生长素、脱落酸、乙烯、细胞分裂素、赤霉素等, 具有结构简单, 生理效应复杂的特点。在细胞中, 这些激素相互作用, 通过信号转导感应外界环境的变化, 调控植物体的生长发育^[1]。藻类是比高等植物低级的生物类群, 形态简单, 没有根茎叶的分化, 但有大量的实验证据表明藻类的生长、发育也存在着激素的调控。与高等植物中激素相比, 藻类中激素具有结构类似, 含量更低, 但发挥着更高生理活性的特点^[2]。

无论是高等陆地植物, 还是藻类, 对环境胁迫的响应一直是研究非常活跃的领域。ABA 是以异戊二烯为基本单位的一种倍半萜羧酸类植物激素, 在植物对抗干旱、寒冷、高温和失水胁迫中扮演重要角色, 被称为胁迫激素或应激激素^[3]。研究发现, 高盐、高温、干旱等多种环境因子均能诱导小球藻 (*Chlorella vulgaris* Beyerinck) ABA 含量的上调^[4]。在 150 mmol/L ABA 中培养的莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*), 可以适当减缓低温和强光对光合活性的

影响^[5-6]。低温胁迫下, ABA 促进了莱茵衣藻光系统 II 光失活化合物的修复, 对光合系统起到了保护作用^[7]。李铁松证明海带 ABA 对某些微藻细胞氧化损伤具有保护作用^[8]。另有报道发现, 盐藻 (*Dunaliella parva*) 细胞内 ABA 含量在高盐胁迫 3 h 内出现上调, 且随盐度升高而呈增加的趋势, 但外源添加 ABA, 并不影响盐藻光合作用与呼吸作用, 也不能提高盐藻对高盐胁迫的耐受性^[4]。 *C. reinhardtii* 经 ABA 处理 24 h 后, 细胞内活性氧含量显著下降, 抗坏血酸氧化酶与过氧化氢酶表达上调, 暗示 ABA 可通过诱

收稿日期: 2018-05-08; 修回日期: 2018-10-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(41776150, 41476140); 现代农业产业技术体系专项(CARS-50)

[Foundation: National Natural Science Foundation of China, No. 41776150, No. 41476140; Special Funds for China Agriculture Research System, No. CARS-50]

作者简介: 余斌(1993-), 女, 汉族, 河南信阳人, 硕士研究生, 研究方向为藻类分子生物学, 电话: 0532-82898575, E-mail: yubin_2015@126.com; 牛建峰, 通信作者, 副研究员, 电话: 0532-82898575, E-mail: jf_niu@qdio.ac.cn; 王广策, 通信作者, 研究员, 电话: 0532-82898574, E-mail: gewang@qdio.ac.cn

导抗氧化酶的活性而抑制活性氧的产生,从而减缓失水引起的细胞损伤^[5-6]。

机体内 ABA 的含量由其合成与降解间的平衡决定。生物体内 ABA 的合成前体异戊烯基焦磷酸 (Isopentenyl diphosphate, IPP) 有两种合成途径,一种以丙酮酸和甘油醛-3-磷酸为前体,称为 2-C-甲基-d-赤藓糖醇-4-磷酸 (2-methyl-D-erythritol 4-phosphate, MEP) 途径,另一种是以乙酰-CoA 为底物经甲羟戊酸 (mevalonate, MVA) 合成,称为 MVA 途径^[9-10]。MVA 途径是许多古生物、真菌、动物中合成类异戊二烯的唯一途径,可被多效唑特异性抑制^[11]。以异戊烯基为前体合成法尼基焦磷酸 (Farnesyl pyrophosphate, FPP) 后,可经一系列脱磷酸和氧化过程直接合成 ABA,也可先形成类胡萝卜素,之后类胡萝卜素氧化裂解而间接产生 ABA,其中 ABA 的直接途径至今未被明确解析^[12],目前只在真菌中有报道,关键步骤包括法尼酰二磷酸酯 (Farnesyl diphosphate, FDP) 的环化及紫罗兰叉乙醇的氧化^[5]。高等植物中 ABA 主要由类胡萝卜素途径间接合成,类胡萝卜素在质体中首先形成玉米黄质,后经 9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶 (NCED) 家族的催化形成黄质醛,黄质醛在细胞质中经短链醇脱氢酶 (ABA2)、醛氧化酶 (AAO3) 催化形成 ABA^[13-14]。

ABA 分解代谢主要有 3 种途径,不同的 ABA 羟基化途径可以氧化 ABA 分子中环结构的某个甲基 (C-7j, C-8j 和 C-9j)。3 种形式的羟基化 ABA 均具有生物活性,但羟基化触发了进一步的失活过程^[15-16]。C-8j 位置的羟基化通常被认为是主要的 ABA 分解代谢途径^[17]。ABA 在分解代谢过程中逐步失活。而 8j-羟基 ABA 生物活性几乎不受影响^[18],只有当自发环化后,其生物活性才发生显著的降低^[19]。

紫菜是红藻门红毛菜科紫菜属大型海藻,属于原始低等多细胞藻类,进化地位特殊。自然分布的条斑紫菜常见于潮间带高潮线附近岩石,随着潮水的涨落,周期性地经历着干出与复水两种截然不同的生存条件,低潮时可能同时遭遇温度、盐度和光照的胁迫,涨潮时胁迫消失。这种特殊的生境或环境胁迫的振荡可能使生活期间的物种进化出独特的环境适应机制,是研究藻类抗逆生理及保护性适应机制的理想材料。那么,紫菜中是否存在 ABA 介导的抗逆响应过程?

目前关于潮间带紫菜抗逆机制的研究多侧重于循环电子传递对光合作用系统的保护,及抗氧化酶

的活性测定上^[20-21]。最近, Sun 等^[22]利用数字基因表达谱比较了条斑紫菜 (*Porphyra. yezoensis*) 不同温度处理下差异表达的基因,发现低温胁迫下, ABA 可能参与了对代谢的调控;有文献报道在脐形紫菜 (*P. umbilicalis*) 和紫红紫菜 (*P. purpurea*) 中发现 NCED 和脱落醛氧化酶^[12];利用液相色谱结合质谱的方法,日本研究人员认为条斑紫菜中 ABA 可通过类似陆地植物的代谢途径被合成^[23]。因此,本文采用不同的高盐胁迫,处理条斑紫菜叶状体,测定 ABA 含量,明确 ABA 合成对高盐胁迫的响应;并在此基础上,利用 ABA 间接合成途径及分解途径的抑制剂,研究条斑紫菜中 ABA 的代谢过程;通过叶绿素荧光仪,测定不同条件下光合作用参数的变化,讨论 ABA 在条斑紫菜光合作用系统保护中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

条斑紫菜 (*Py. yezoensis*) 于 2018 年 1 月采自连云港海能达海产品有限公司条斑紫菜栽培海域,连同养殖苗帘一起,运回实验室培养,培养条件设定为:温度 15℃;光照强度 50 μmol/(m²·s);光周期 12L:12D。每隔一天换一次水。

钨酸钠 (Sodium Tungstate) 购自 Macklin 公司、萘普生 (Naproxen) 购自上海彼得医药科技有限公司、烯唑醇 (Diniconazole) 购自源叶生物公司、多效唑 (Paclobutrazol) 购自索莱宝公司。

1.2 方法

1.2.1 高盐胁迫处理

在自然海水中添加 NaCl 至盐度分别为 30, 50, 90, 120。新鲜条斑紫菜分别置于相应盐度海水中胁迫 4 h, 其他条件同实验室正常培养条件。收集高盐胁迫的材料,吸水纸吸干,液氮速冻,于冷冻干燥机冻干,液氮研磨成粉,并再次冻干,-20℃保存,用于 ABA 含量测定。重复 3 次,以保证数据准确可信。

1.2.2 ABA 含量测定

参照 Fu (2012) 的方法,采用 UPLC-MS/MS 测定 ABA 含量^[24]。准确称取 200 mg 高盐胁迫后的条斑紫菜粉末,加入内标 (2H6-ABA 45 pmol)。随后加 2 mL 甲醇于-20℃过夜浸提,4℃ 18 000 rpm/min 离心 15 min,收集上清,冷冻干燥,溶解于 1 mL 氨溶液 (5%) 即为粗提液。采用 Oasis MAX SPE 柱对粗提液进行分离,过柱前色谱柱依次经 4 mL 甲醇、4 mL 水、4 mL 氨溶

液(5%)预平衡, 上样后依次用 4 mL 氨溶液(5%)、4 mL 氨溶液(5%)、4 mL 甲醇洗柱。ABA 可用 4 mL 甲醇(含 5%或 10%甲酸)洗脱。洗脱液在氮气中干燥, 然后溶解于 200 μ L 水/甲醇(20: 80, v/v)溶液, 即为 ABA 提取液。

检测条件: Waters ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱(2.1 mm \times 100 mm i.d., 1.7 μ m); 流动相: A: 0.05% 乙酸水溶液(v/v), B: 0.05% 乙酸乙腈溶液(v/v); 梯度洗脱: 流动相 B 在 5 min 内由 15%升至 40%, 随之在 0.5 min 内升至 80%; 流速 0.5 mL/min; 进样量 5 μ L, 柱温 35 $^{\circ}$ C。WatersQuattro Premier XE 质谱仪(Micro-mass, Manchester, UK)检测。

1.2.3 ABA 代谢抑制剂处理条斑紫菜

ABA 及其代谢抑制剂配制: 将 ABA 纯品溶于乙醇, 配制成 100 mg/mL 的母液, 保存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱备用; 分别将烯唑醇、萘普生原药溶于甲醇, 配成浓度为 32.6 mg/mL 和 57.6 mg/mL 的母液, 常温避光保存, 稀释 1×10^4 倍使用; 多效唑纯品溶于甲醇, 配成浓度为 65.2 mg/mL 的母液, 常温保存, 稀释 1×10^3 倍使用; 钨酸钠使用浓度为 3 mmol/L, 准确称取并于相应海水中溶解, 现配现用。

新鲜条斑紫菜首先在分别含有烯唑醇 (10 μ mol/L)^[6]、萘普生 (25 μ mol/L)^[25]、多效唑 (200 μ mol/L)^[26]和钨酸钠(3 mmol/L)^[27]的 120 高盐海水中, 温度 15 $^{\circ}$ C, 光照强度 50 μ mol/(m²·s)的条件下处理 4 h。接着将高盐胁迫处理后的藻体在含有相应化合物的正常海水中复苏。同时, 进行一组对照处理, 条斑紫菜藻体在 120‰高盐海水中处理 4 h, 后在含有相应化合物的正常海水中复苏。利用 Dual-PAM, 对复苏 0.5 h, 1 h 和 2 h 的样品进行光合作用参数的测定。实验重复 3 次。

1.2.4 条斑紫菜光合作用参数测定

利用调制荧光仪 Dual-PAM-100(Heinz Walz, Efeltrich), 同时测定光系统 I (PS I)和光系统 II (PS II)叶绿素荧光, 分析光合作用系统的活性^[28]。具体测定过程包括: 藻体置于暗处 5~10 min 后以 12 μ mol/(m²·s)的测量光测定初始荧光(F_0), 之后, 使用饱和脉冲 (SP, 强度 6 000 μ mol/(m²·s), 持续时间: 300 ms)获得最大荧光参数(F_m), 可变荧光(F_v)通过最大荧光 F_m 和初始荧光 F_0 的差值得到, 测定过程中光化光由仪器自带 635 nm LED 矩阵提供, 强度设定为 63 μ mol/(m²·s), 通过运行饱和脉冲的方法, 获得 PS II 量子产额(YII), 相对电子传递速率 ETR(II)根据 YII 及光化光的乘积, 由仪器自带软件计算得到。光诱导非光化学能量耗

散量子产额和非光诱导非光化学能量耗散量子产额分别为 $Y(NPQ)$ 和 $Y(NO)$ ^[29]。

类似地, 光系统 I 各参数也是通过饱和脉冲方法测定^[28], 在远红光打开条件下, 通过饱和脉冲氧化 P700, 获得 P_m ; 远红光关闭状态下饱和脉冲结束后测定 P_0 , 参数 P_m 与荧光参数 F_m 的确定方法类似。基于 P_m , P_0 和 P_m , Dual-PAM 系统自带软件计算出光系统 I 的实际量子产 [(Y(I))、电子供体端引起的非光化学能量耗散[Y(ND)]和电子受体端引起的非光化学能量耗散[Y(NA)], ETR(I) 通过公式 $ETR(I)=Y(I)\times PAR\times 0.5$ 获得^[28]。

光合作用参数自动导出后, 在 Microsoft Office Excel 2003 中进行数据处理并作图, $P<0.05$ 时认为差异显著。

3 结果

3.1 不同盐度胁迫条件下 ABA 含量的变化

如图 1 所示, 梯度高盐胁迫 4 h 后条斑紫菜中的 ABA 含量随盐度升高呈现明显的上升趋势, 各盐度处理组中的 ABA 含量存在显著差异($P<0.05$), 120‰盐度胁迫下, 3 种抑制剂的使用均会抑制 ABA 的积累。

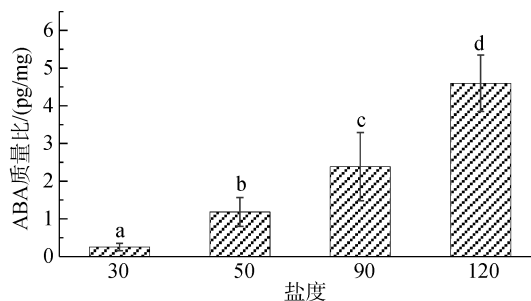


图 1 不同高盐胁迫条件下, 条斑紫菜中 ABA 含量的变化
Fig. 1 Changes in ABA content in *Porphyra yezoensis* during different salinity treatments

3.2 条斑紫菜光合作用参数在外源 ABA 及其代谢抑制剂处理下的变化

条斑紫菜叶状体在 120 盐度下胁迫 4 h 后在正常海水中复苏, 各样本 ETR(II)随恢复时间的推移呈现增加的趋势(图 2), 钨酸钠, 恢复时光系统 II 电子传递速率均与对照基本一致, 在 1 h 就可完全恢复。多效唑处理的样本中 ETR(II)恢复明显慢于对照, 甚至在复苏 4 h 后仍未能恢复到胁迫前的正常水平, 同时发现, 胁迫时添加萘普生的样本 ETR(II)复苏的速率与恢复的程度低于胁迫时未加抑制剂的样本。而胁

胁迫烯唑醇处理的样本在复苏过程中 ETR(II) 基本降至 0, 说明藻体已受到严重损害, 丧失光合活性, 藻

体趋于死亡, 而胁迫时不含烯唑醇的样本在复苏时, 其 ETR(II) 的恢复过程基本与对照相当。

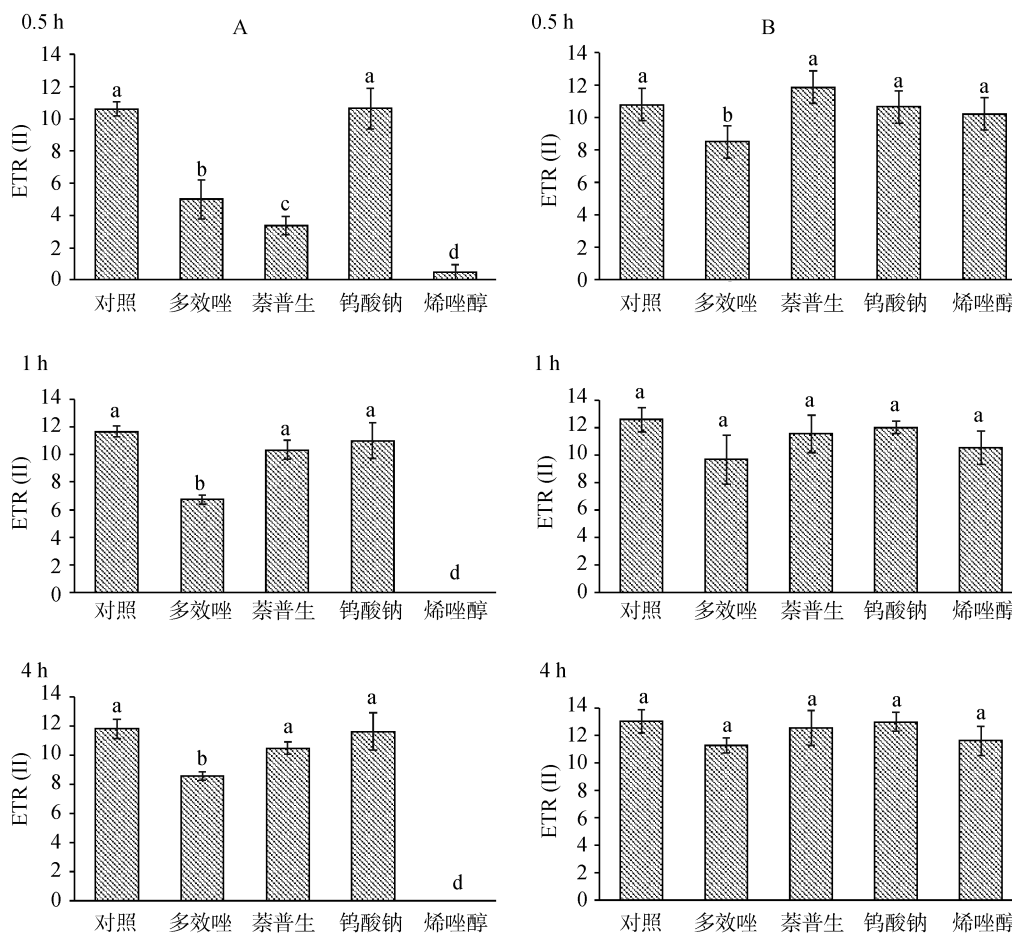


图 2 ABA 代谢抑制剂对光系统 II 电子传递速率的影响

Fig. 2 Changes in ETR(II) of *P. yezoensis* during rehydration and responses to inhibitors

注: A: 藻体在含有抑制剂条件下进行 120‰ 高盐胁迫处理, 复苏时 ETR(II) 随时间的变化; B: 藻体在不含抑制剂条件下进行 120‰ 高盐胁迫处理, 复苏时 ETR(II) 随时间的变化。以上数据均为 3 组独立实验的平均结果 ± 标准误差 (SD)。柱形图上的不同的字母代表不同的显著性差异 ($P < 0.05$, 单因素方差分析, Tukey 检验)

A: Response of ETR(II) during rehydration after stress treatment in the presence of corresponding inhibitors, and B: response of ETR(II) without pretreatment by the inhibitors. The data are the mean of three independent experiments (\pm SD). Different letters represent significant differences in ETR(II) between the different inhibitors ($P < 0.05$, ANOVA, followed by Tukey's post-hoc test for comparisons)

4 讨论

4.1 高盐胁迫对条斑紫菜 ABA 含量的影响

植物具有监测和适应不利环境的能力, 激素在这此过程中扮演了重要角色。胁迫条件下, 激素在植物中的含量、合成及代谢的动态平衡通常会发生改变^[30]。ABA 的累积被认为是植物适应环境胁迫的重要响应, 通过调控下游抗逆相关基因的表达, 控制着众多生理过程。但目前, 关于藻类中 ABA 的研究还相对较少, 因此, 我们研究了高盐胁迫对条斑紫菜 ABA 合成的影响, 发现藻体内 ABA 的含量随胁

迫盐度的升高而明显上升。这是第一次在条斑紫菜中关于 ABA 合成的报道, 与小球藻 (*C. vulgaris* Beyerinck) 和盐藻中 ABA 含量随盐度增加而上调的结果类似^[4, 31]。小球藻在热胁迫下也会合成大量 ABA, 以应对不利环境对其造成的影响^[31]。自然分布的条斑紫菜固着于潮间带高潮线附近的岩石, 随着潮涨潮落经受着干出失水, 高盐、强光等不同的逆境胁迫, 我们的测定结果说明 ABA 在条斑紫菜逆境响应代谢中发挥着重要作用。

4.2 条斑紫菜 ABA 生物合成的可能路径分析

高等植物中, ABA 主要通过间接途径合成。目前

关于藻类中 ABA 的合成还没有系统研究^[32], Hirsch 等^[33]利用盐藻, 通过 ¹⁴C 标记的方法, 鉴定到了 ABA 间接合成途径中的代谢中间物质菜豆酸及二氢菜豆酸, 并确定 C-甲羟戊酸为 ABA 合成的前体, 因而得出结论, 盐藻细胞中已经出现了同高等植物类似的 ABA 代谢途径。间接途径中类胡萝卜素合成抑制达草灭处理某些无色藻类, 结果不仅未发现 ABA 的合成被抑制, 反而发现 ABA 含量上调, 说明这些微藻中可能存在 ABA 的直接合成路径, 而与类胡萝卜素的合成无关^[33]。

以异戊烯基为前体合成法尼基焦磷酸后, 也可经一系列脱磷酸和氧化过程直接合成 ABA, 但到目前为止 ABA 直接途径的具体机制仍未被明确解析^[12]。正常情况下, 植物体内活性氧产生与清除处于一种稳定的动态平衡状态, 但当处于逆境条件下时, 这种平衡遭到破坏, 造成活性氧的大量产生。在高盐胁迫下, 光合作用受到影响, 叶绿素激发导致的氧自由基产生首先可能造成对光合作用系统元件的损伤, 影响光合电子传递链的正常功能。因而, 我们采用 ABA 间接合成途径的抑制剂, 处理条斑紫菜叶状体样本, 通过测定高强度盐度胁迫后, 藻体复苏过程中光合作用参数的恢复情况, 探讨了条斑紫菜中可能存在的 ABA 合成途径。结果显示, 多效唑处理组光系统 II 电子传递速率恢复速度明显低于对照, 意味着多效唑对条斑紫菜中 ABA 的合成具有明显抑制作用, 其中异戊烯基焦磷酸(IPP)主要通过 MVA 途径合成; 萘普生的使用同样也抑制了光合作用参数的恢复, 说明条斑紫菜中 NCED 催化的类胡萝卜素代谢活性对 ABA 合成具有重要影响, 条斑紫菜中存在由类胡萝卜素途径合成 ABA 的可能, 这与在脐形紫菜(*P. umbilicalis*)和紫红紫菜(*P. purpurea*)中的报道相吻合^[12]。同时, 日本研究人员认为条斑紫菜中 ABA 是通过类似陆地植物的代谢途径被合成^[23], 但 ABA 间接途径最后一步由脱落醛氧化生成 ABA 的脱落醛氧化酶(AAO3)未被鉴定, 我们的测定结果也显示, 对 AAO3 具有抑制作用的钨酸钠处理条斑紫菜, 其光合作用参数在复苏过程中与对照一致, 那么, 作者推测, 在条斑紫菜中, 脱落醛可通过一条支路合成 ABA 醇^[34], 更重要的是, 在此支路中, 脱落醇可作为活性分子, 调控抗氧化酶的表达^[15], 对光合作用系统起到保护作用。因此, 条斑紫菜中似乎存在不同于目前研究相对成熟的高等植物及真菌 ABA 合成的路径, 其前体合成与真菌 MVA 途径类似,

ABA 合成中与高等植物类胡萝卜素间接途径类似, 而在脱落醛转变为 ABA 的过程中, 有存在与高等植物不同的分子过程。详细的机制, 有待进一步研究。

4.3 条斑紫菜 ABA 含量调控的生物学意义

植物体内各种形式的 ROS 在抗氧化酶的作用下最终转化成毒性较小的 H₂O₂ 而被代谢。外源施用 ABA 可显著提高玉米过氧化氢酶(Catalase, CAT)的表达活性, ABA 可诱导 Cat1 酶基因的增强子区域被激活而最终导致该酶表达的上调, 而 H₂O₂ 被认为是 ABA 诱导 Cat1 活性的中间代谢物, 很多研究表明, 过氧化氢的含量与 ABA 含量呈现正相关, 氧自由基在 ABA 信号传导通路中对 Cat1 基因的活化中起作用, 在诱导 Cat1 基因表达时, ABA 是作为一个胁迫信号, 而不是激素信号发挥作用的^[35]。另有报道称 ABA 会诱导植物中抗氧化酶铜锌型超氧化物歧化酶(Cu/Zn-SOD)、锰型超氧化物歧化酶(Mn-SOD)、铁型超氧化物歧化酶(Fe-SOD)和 CAT 基因表达上调。这些 ABA 介导的 SOD 和 CAT 基因表达调控在不同的物种中是不一样的^[5]。此外, ABA 还能够提高玉米叶片中非酶抗氧化物的表达, 如还原型抗坏血酸, 还原型谷胱甘肽, α -维生素 E 和类胡萝卜素的含量, 从而提高植株整体的抗氧化能力^[36-38]。

ABA 在抗氧化酶系统方面扮演的角色, 可简单概括为调节 ROS 产生和提高 CAT、抗坏血酸过氧化物酶(Ascorbate Peroxidase, APX)、谷胱甘肽还原酶(Glutathione Reductase, GR)等抗氧化酶及抗氧化分子的活性, 从而增强植物的抗氧化能力。抗氧化酶及抗氧化分子在潮间带海藻适应潮间带生存环境方面发挥了重要作用, 甚至是控制大型藻类生态位分布的关键因子, 抗氧化酶活性高的种类生活在高潮带, 而抗氧化酶活性较低的种类则生活在低潮线位置^[39]。自然分布的条斑紫菜生活在高潮带, 揭示其体内必然存在较活跃的抗氧化酶及抗氧化分子系统, 保护着机体免受氧自由基的伤害。

机体内 ABA 的含量由其合成与分解间的平衡决定。植物中 ABA 的分解代谢主要受一类细胞色素 P450 分子, 即 ABA 8'-羟化酶调控, 有报道发现烯唑醇可作为拟南芥 ABA 8'-羟化酶的竞争性抑制剂阻断 ABA 的分解代谢, 从而导致植物体内 ABA 含量升高, 同时在复水时 ABA 响应基因的转录水平上调, 使得植物耐受失水胁迫的能力得到加强^[6]。我们的测定结果显示, 条斑紫菜在严重胁迫后的恢复中, 如

果 ABA 的分解代谢受到抑制, 其光合作用的恢复基本不受影响, 然而, 在含有烯唑醇的条斑紫菜胁迫后复苏的样本中, 光合作用参数则出现剧烈的降低, 这有可能是过量的 ABA 在胁迫过程中被合成, 而不能被降解, 最终导致过氧化氢的过度累积, 造成藻体光合作用系统的损伤所致。这与之前在蚕豆中的报道相近, 认为低浓度外源 ABA 会显著提高叶片的光合速率, 高浓度的 ABA 则有相反效果^[40]。因此, 条斑紫菜中 ABA 含量的调控, 在其适应潮间带极端多变环境的过程中具有重要意义。

参考文献:

- [1] Jürgens G. Survival of the flexible: hormonal growth control and adaptation in plant development[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2009, 10(5): 305.
- [2] 刘雪梅. 几种大型海藻中植物激素的研究分析[D]. 宁波: 宁波大学, 2012.
Liu Xuemei. Research on phytohormones of several macroalgae[D]. Ningbo: Ningbo University, 2012.
- [3] 温小杰. 植物激素信号传导途径研究进展[J]. *中国农业科技导报*, 2010, 12(6): 10-17.
Wen Xiaojie. Research progress on plant hormone signal pathways[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2010, 12(6): 10-17.
- [4] Bajguz A. Brassinosteroid enhanced the level of abscisic acid in *Chlorella vulgaris* subjected to short-term heat stress[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2009, 166(8): 882.
- [5] Inomata M. The biosynthetic pathway to abscisic acid via ionylideneethane in the fungus *Botrytis cinerea*[J]. *Phytochemistry*, 2004, 65(19): 2667.
- [6] Kitahata N. Chemical regulation of abscisic acid catabolism in plants by cytochrome P450 inhibitors[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2005, 13(14): 4491-4498.
- [7] Saradhi P P. Protection against the photo-induced inactivation of the photosystem II complex by abscisic acid[J]. *Plant Cell & Environment*, 2000, 23(7): 711-718.
- [8] 李铁松. 海带中两种植物激素的分离及其活性研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2008.
Li Tiesong. Isolation of indole-3-acetic acid and abscisic acid in the kelp *Laminaria japonica* aresch. and their bioactivities for microalgae[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2008.
- [9] Eisenreich W. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway[J]. *Cellular & Molecular Life Sciences Cmls*, 2004, 61(12): 1401-1426.
- [10] Rodríguez-Concepción M, Boronat, A. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics[J]. *Plant Physiology*, 2002, 130(3): 1079-1089.
- [11] Bennett R D, Nelson M D. Paclobutrazol Inhibits Abscisic Acid Biosynthesis in *Cercospora roscicola*[J]. *Plant Physiology*, 1986, 80(1): 122.
- [12] Nambara E. Marionpoll A. Abscisic acid biosynthesis and catabolism[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2005, 56(56): 165-185.
- [13] Jt C, Jad Z. Characterization of the 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene family and the regulation of abscisic acid biosynthesis in avocado[J]. *Plant Physiology*, 2000, 124(1): 343.
- [14] And J A D Z, Creelman R A. Metabolism and physiology of abscisic acid[J]. *Annu.rev.plant Physiol. plant Mol. biol.*, 1988, 39(4): 439-473.
- [15] Zhou R. A New Abscisic Acid Catabolic Pathway[J]. *Plant Physiology*, 2004, 134(1): 361-369.
- [16] Zou J T. Induction of Lipid and Oleosin Biosynthesis by (+)-Abscisic Acid and Its Metabolites in Microspore-Derived Embryos of *Brassica napus* L.cv Reston (Biological Responses in the Presence of 8[prime]-Hydroxyabscisic Acid)[J]. *Plant Physiology*, 1995, 108(2): 563.
- [17] Cutler A J, Krochko J E. Formation and breakdown of ABA[J]. *Trends in Plant Science*, 1999, 4(12): 472-478.
- [18] Arai S, Todoroki Y, Ibaraki S, et al. Synthesis and biological activity of 3j-chloro, -bromo, and -iodoabscisic acids, and biological activity of 3j-fluoro-8j- hydroxy-abscisic acid[J]. *Phytochemistry*, 1999, 52: 1185-1193.
- [19] Balsevich J J. Identification of unnatural phaseic acid as a metabolite derived from exogenously added (-)-abscisic acid in a maize cell suspension culture[J]. *Phytochemistry*, 1994, 36(3): 647-650.
- [20] Lu X. NADPH from the oxidative pentose phosphate pathway drives the operation of cyclic electron flow around photosystem I in high - intertidal macroalgae under severe salt stress[J]. *Physiologia Plantarum*, 2016, 156(4): 397.
- [21] 冯琛. 逆境胁迫对条斑紫菜生理生化指标的影响[J]. *海洋湖沼通报*, 2004, (3): 22-26.
Feng Chen. Biochemical and physiological effects of adversity stress on *Porphyra yezoensis*[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2004, (3): 22-26.
- [22] Sun P. Comparative transcriptome profiling of *Pyropia yezoensis* (Ueda) M.S. Hwang & H.G. Choi in response to temperature stresses[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 1-16.
- [23] Mikami K. Comprehensive quantification and genome survey reveal the presence of novel phytohormone action modes in red seaweeds[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2016, 28(4): 2539-2548.

- [24] Fu J. Simple, rapid, and simultaneous assay of multiple carboxyl containing phytohormones in wounded tomatoes by UPLC-MS/MS using single SPE purification and isotope dilution[J]. *Analytical Sciences*, 2012, 28(11): 1081-1087.
- [25] Guo D, Liang J, Li L. Abscisic acid (ABA) inhibition of lateral root formation involves endogenous ABA biosynthesis in *Arachis hypogaea* L.[J]. *Plant Growth Regulation*, 2009, 58(2): 173-179.
- [26] Kim C. Combined transcriptomic and proteomic analysis of rice seed germination under ABA, paclobutrazole and GA treatment[J]. *Plant Growth Regulation*, 2014, 21(6): 684-689.
- [27] Hong C Y. NaCl-induced expression of glutathione reductase in roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings is mediated through hydrogen peroxide but not abscisic acid[J]. *Plant & Soil*, 2009, 320(1-2): 103-115.
- [28] Erhard P, Christof K, and Ulrich S. Monitoring the Effects of Reduced PSII Antenna Size on Quantum Yields of Photosystems I and II Using the Dual-PAM-100 Measuring System[J]. *Pam Application Notes*, 2008, 1: 21-24.
- [29] Kramer D M. New fluorescence parameters for the determination of q(a) redox state and excitation energy fluxes[J]. *Photosynthesis Research*, 2004, 79(2): 209-218.
- [30] Wahid A, Close T J. Expression of dehydrins under heat stress and their relationship with water relations of sugarcane leaves[J]. *Biologia Plantarum*, 2007, 51(1): 104-109.
- [31] Tominaga N, Takahata M, Tominaga H. Effects of NaCl and KNO₃ concentrations on the abscisic acid content of *Dunaliella* sp. (Chlorophyta)[J]. *Hydrobiologia*, 1993, 267(1-3): 163-168.
- [32] Kiseleva A A, Tarachovskaya E R , Shishova M F. Biosynthesis of phytohormones in algae[J]. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2012, 59(5): 595-610.
- [33] Hirsch R, Hartung W, Gimmler H. Abscisic acid content of aunder stress[J]. *Plant Biology*, 2015, 102(4): 326-334.
- [34] Seo M, Koshiba T. Complex regulation of ABA biosynthesis in plants[J]. *Trends in Plant Science*, 2002, 7(1): 41-48.
- [35] Guan L M, Zhao J, Scandalios J G. Cis-elements and trans-factors that regulate expression of the maize Cat1 antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H₂O₂ is the likely intermediary signaling molecule for the response[J]. *Plant Journal*, 2000, 22(2): 87-95.
- [36] Jiang M, Zhang J. Effect of Abscisic Acid on Active Oxygen Species, Antioxidative Defence System and Oxidative Damage in Leaves of Maize Seedlings[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2001, 42(11): 1265.
- [37] Jiang M, Zhang J. Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in abscisic acid- and water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings[J]. *Planta*, 2002, 215(6): 1022-1030.
- [38] Jiang M, Zhang J. Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(379): 2401-2410.
- [39] Burritt D J, Larkindale J, Hurd C L. Antioxidant metabolism in the intertidal red seaweed *Stictosiphonia arbuscula* following desiccation[J]. *Planta*, 2002, 215(5): 829-838.
- [40] Souza T C D. The influence of ABA on water relation, photosynthesis parameters, and chlorophyll fluorescence under drought conditions in two maize hybrids with contrasting drought resistance[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2013, 35(2): 515-527.

Synthesis of abscisic acid in *Pyropia yezoensis* and its protection on photosynthesis under high-salinity stress

YU Bin^{1, 3, 4}, YANG Jia-li^{1, 3, 4}, NIU Jian-feng^{1, 2, 4}, WANG Guang-ce^{1, 2, 4}

(1. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266237, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 4. Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Received: May 3, 2018

Key words: abscisic acid; biosynthetic pathway; reactive oxygen species scavenging system; high-salinity stress; plant hormone; photosynthesis

Abstract: Active oxygen radicals are induced when a plant is subjected to environmental stress. The burst of ROS usually leads to gene upregulation related to stress response and an increase in antioxidase activity. Our results showed that the ABA content in high-salinity stressed *Pyropia yezoensis* presented a significant upregulation compared with that in the control. The results strongly suggested that there might be an antioxidant pathway mediated by ABA in *P. yezoensis*. To find the possible ABA synthesis pathway, the thallus of the algae was treated with inhibitors related to the carotenoid biosynthetic pathway of ABA. Then, the samples were stressed with 120‰ salinity to induce active oxygen radicals. The control was set as the same high-salinity treatment but without corresponding inhibitors. Based on the determination of ETR(II) variation during rehydration, the potential effect of various inhibitors on ABA synthesis was side evaluated. The results showed that ETR(II) was influenced obviously by the addition of paclobutrazol, indicating that the precursor of ABA synthesis was derived from C5 unit, which was similar to the MVA pathway in fungi. Naproxen could slow down the recovery of ETR(II), which meant that the synthesis of ABA in *P. yezoensis* was through the indirect pathway. However, sodium tungstate, which was the inhibitor of the last step in the ABA carotenoid biosynthetic pathway, showed no influence on the recovery of ETR(II), indicating that there might be a bypass pathway in which ABA was biosynthesized through abscisic alcohol, which has been reported as an active molecule with a function similar to that of ABA. Diniconazole repressed the decomposition of ABA, which led to excessive production of hydrogen peroxide, thereby causing damage to photosynthetic apparatus. The results provided data support for future investigation of the antioxidation mechanism mediated by ABA in *P. yezoensis*.

(本文编辑: 梁德海)