

水杨酸和茉莉酸甲酯对高温龙须菜(*Gracilariopsis lemaneiformis*)理化及基因表达的影响*

王重彬^{1,2} 邹同雷^{1,2} 孙雪^{1,2} 汪芳俊^{1,2} 徐年军^{1,2}

(1. 宁波大学海洋学院 宁波 315211; 2. 浙江省海洋生物工程重点实验室 宁波 315211)

摘要 本文研究了两种抗逆植物激素——水杨酸(SA)和茉莉酸甲酯(MJ)对高温胁迫龙须菜的生长、脯氨酸和丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)、碳酸酐酶(CA)、硝酸还原酶(NR)活性及 4 种相关基因表达的影响。结果表明, 100 μ mol/L SA (SA100)、50 μ mol/L MJ (MJ50)、50 μ mol/L SA+25 μ mol/L MJ (SA50/MJ25)实验组对龙须菜生长促进作用较大, 其相对生长速率分别为对照组的 1.78、1.65 和 1.29 倍。这 3 个处理组均可提高龙须菜脯氨酸含量, 其中 SA100 作用最强; 对 MDA 含量的降低程度以 SA50/MJ25 组最强。SA100 增强 SOD 和 CA 活性的作用最大, 而 MJ50 可增强 NR 活性。SA100 处理 HSP70、MnSOD、CA 和 NR 基因表达量分别为对照组的 2.04、4.65、2.15 和 1.58 倍, MJ50 处理后 MnSOD、CA 和 NR 基因表达量则分别降为对照组的 0.47、0.50 和 0.46 倍, 而 SA50/MJ25 则促进了 HSP70 基因表达, 降低了 CA 和 NR 基因表达。本研究表明 SA 和 MJ 可以缓解高温胁迫对龙须菜的不利影响, 其中以 SA100 的作用最大, MJ50 作用最小。

关键词 龙须菜; 水杨酸; 茉莉酸甲酯; 高温; 基因表达

中图分类号 Q946 doi: 10.11693/hyhz20150300081

龙须菜(*Gracilariopsis lemaneiformis*)为红藻门(Rhodophyta)的一种大型经济海藻, 主要用于琼胶提取和鲍鱼养殖, 少量用于食用及食品加工。此外, 龙须菜还具有净化海洋环境、防止海水富营养化的生态作用(Zou *et al.*, 2014)。野生龙须菜原产于山东, 后来培育出 981 抗高温优良品种(张学成等, 2009), 现在广东、福建、浙江等海域都有龙须菜养殖。但是我国南方夏季水温较高, 使得龙须菜的养殖时间有所减少, 影响了其产量。

水杨酸(salicylic acid, SA)又名 2-羟基苯甲酸, 是植物体内的一种酚类植物激素, 对植物的生长发育具有重要的调控作用。近年来研究表明水杨酸还可以提高植物抗病虫害等生物胁迫, 以及抗重金属、抗盐、抗高低温等非生物胁迫能力(Hayat *et al.*, 2010)。高温逆境不仅可以引起植物细胞膜损伤和代谢的变

化, 而且还可以产生氧化压力。水杨酸可以通过降低热胁迫引起的植物细胞膜损伤, 增加蛋白和脯氨酸含量, 以及增强过氧化物酶(POX)和抗坏血酸过氧化物酶(APOX)等抗氧化酶活性来对抗热胁迫(Chakraborty *et al.*, 2005)。水杨酸还可以通过减轻热诱导的净光合速率的降低来保护高温影响的光合作用(Wang *et al.*, 2010)。最近研究表明 SA 诱导的玉米幼苗的耐热性可以被 H₂S 供体所增强, 推测 H₂S 可能是 SA 诱导耐热性中一种新的下游信号分子(Li *et al.*, 2015)。

茉莉酸类物质(jasmonates, JAs)是一种脂肪酸类的植物激素, 包括茉莉酸(jasmonic acid, JA)和茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA 或 MJ)等衍生物。茉莉酸类物质在植物体内普遍存在, 可作为内源信号分子来调节植物的生长发育, 也可调控植物对各种环

* 国家自然科学基金项目, 31072229 号, 41376151 号; 宁波大学学科项目, xk1141053 号。王重彬, 硕士研究生, E-mail: shuiwuhen1219@126.com

通讯作者: 孙雪, 副研究员, E-mail: sunxue@nbu.edu.cn

收稿日期: 2015-03-18, 收修改稿日期: 2015-06-23

境胁迫的响应(Wasternack *et al.*, 2002)。在植物抗高温逆境方面, 茉莉酸类物质相比水杨酸的报道要少。据报道在诱导蝴蝶兰幼苗耐热性方面, 茉莉酸甲酯的作用要强于水杨酸(杨华庚等, 2011)。而茉莉酸与水杨酸代谢途径相互协调是增强植物基础耐热性所需要的(Clarke *et al.*, 2009)。水杨酸和茉莉酸类物质在提高植物抗逆性方面具有相同或相似的作用, 但两者之间的相互作用关系比较复杂。如在调控一些基因表达方面, SA 和 MeJA 存在着单向的、相互对立的和相互协同的 3 种不同作用方式(Salzman *et al.*, 2005)。因此这两种植物激素在信号通路间的相互作用一直是研究的热点。

本文主要从生理生化和基因转录表达两个方面来分析水杨酸和茉莉酸甲酯单独和组合使用对高温胁迫下龙须菜的影响, 以探讨两者在龙须菜中抗高温胁迫的作用关系和作用机理, 为龙须菜在夏季高温条件下的海区养殖提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验材料为龙须菜 981 品种, 采自浙江温州, 实验室 23°C 暂养 1 个月。实验时选择生长状态良好的藻体, 在 33°C 的光照培养箱中培养, 光强 2000—3000 lx, 光暗周期 L : D (12h : 12h), 使用 Provasoli 培养基(Provasoli, 1968)。

1.2 实验方法

1.2.1 激素浓度设置 水杨酸浓度梯度分别设置为 0、50、100、150 和 200 μmol/L, 茉莉酸甲酯(下文中将其简称为 MJ)浓度组分别为 0、25、50、100 和 150 μmol/L, SA/MJ 组合使用浓度分别为 0、50/25、50/50、100/25 和 100/50 μmol/L。每组 3 个平行。

1.2.2 龙须菜相对生长速率测定 称取 500mg 龙须菜藻体置于光照培养箱中培养, 按照 1.2.1 中设置的 SA、MJ 和 SA/MJ 各 5 个浓度分别培养, 3 天后称量藻体吸干水分后的鲜重。按照以下公式计算藻体日相对生长速率: $RGR(\%/d) = 100\% \times (\ln W_t - \ln W_0) / t$, 其中 W_t 为 t 时间的鲜质量(简记为 FW), W_0 为开始时的鲜质量, t 为实验天数(Abreu *et al.*, 2009)。

1.2.3 脯氨酸和丙二醛(MDA)含量测定 取 1.2.2 中对龙须菜生长促进作用最大的 3 个激素浓度组: SA100 (100 μmol/L SA)、MJ50 (50 μmol/L MJ)和 SA50/MJ25 (50 μmol/L SA + 25 μmol/L MJ)进行后续实验, 以下相同。脯氨酸含量测定采用磺基水杨酸法, 通过

标准曲线计算脯氨酸含量(李合生, 2000)。MDA 含量测定使用硫酸巴比妥法, 利用公式 $C_{MDA} = 6.54(A_{532} - A_{600}) - 0.56A_{450}$ 计算 MDA 含量(李合生, 2000)。

1.2.4 超氧化物歧化酶(SOD)活性测定 使用 SOD 试剂盒(A001-1, 南京建成生物工程研究所)进行 SOD 活性测定。

1.2.5 碳酸酐酶(CA)活性测定 采用 pH 计法(Moskvin *et al.*, 1998), 稍有改进。CA 活性(WA)计算公式为: $WA = (T_0/T-1) \times 10$, 其中 T_0 和 T 分别为反应体系中未加和加入藻提取液时 pH 值下降一个单位所需的时间。

1.2.6 硝酸还原酶(NR)活性测定 使用硝酸还原酶试剂盒(IY1-2, 苏州科铭生物技术有限公司)进行 NR 活性测定。记录 540nm 处的最大吸收峰, 再通过标准曲线来计算 NR 活性。

1.2.7 四条基因的转录表达分析 以 18S rDNA 做内参, 热休克蛋白 70(HSP70)基因与 18S rDNA 的荧光定量 PCR 引物参考朱招波等(2012), 锰超氧化物歧化酶(MnSOD)基因引物序列参考 Lu 等(2012)。根据已测龙须菜转录组中碳酸酐酶(CA)和硝酸还原酶(NR)序列信息, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计 CA 和 NR 荧光定量 PCR 引物, 其中 CA 基因上游引物为 5'-AAGTCTCAAATGTCGCTCGCAA-3', 下游引物为 5'-TCGGGGAGTGGAAGTGAA CATT-3'; NR 基因上游引物为 5'-AGCCACGGGACTTTCACTGTTA-3'; 下游引物为 5'-AAGTCTCAAATGTCGCTCGCAA-3'。引物合成和测序均由英潍捷基(上海)贸易有限公司完成。

在激素添加 6h 后分别提取各组样品的总 RNA, 反转录成 cDNA 用做荧光定量 PCR 的模板。反应体系为 2×SYBR Premix Ex Taq 10 μL, cDNA 2.0 μL, 正向和反向引物各 0.5 μL, RNase-free H₂O 7 μL。PCR 循环参数为: 95°C 2min; 95°C 10s, 58°C 15s, 72°C 20s; 40 个循环。反应结束后进行 C_T 值分析, 采用 2^{-ΔΔCT} 法确定各基因的相对表达量(Livak *et al.*, 2001)。

1.2.8 数据处理 利用 Excel 2007 进行作图与数据统计, 使用 SPSS13.0 单因素方差分析进行差异显著性分析, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 水杨酸和茉莉酸甲酯对龙须菜生长的影响

3 组植物激素处理对龙须菜生长的作用不同

(图 1)。从图 1A 中可见, 不同浓度 SA 添加后龙须菜相对生长速率不同程度升高, 但方差分析显示仅 100 $\mu\text{mol/L}$ SA 组与对照组差异显著。100 $\mu\text{mol/L}$ SA 处理 3 天后藻的相对生长速率为 3.19%, 是对照组的 1.78 倍 ($P<0.05$)。而 50、150 和 200 $\mu\text{mol/L}$ SA 组与对照组之间, 以及 4 个不同 SA 浓度处理组之间差异均不显著。

50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ MJ 显著促进了龙须菜的生长(图 1B)。其中 50 $\mu\text{mol/L}$ MJ 对藻生长的促进作用最大, 其

相对生长速率达到 2.65%, 为对照组的 1.65 倍; 100 $\mu\text{mol/L}$ MJ 组藻的相对生长速率为对照组的 1.36 倍, 而 25 和 150 $\mu\text{mol/L}$ MJ 组与对照组差异不显著。

水杨酸/茉莉酸甲酯组合使用后龙须菜生长状况如图 1C 所示。其中, SA/MJ 浓度为 50/25 $\mu\text{mol/L}$ 时促进了龙须菜的生长, 其相对生长速率最高(2.37%), 是对照组的 1.29 倍 ($P<0.05$)。而其它 3 个 SA/MJ 处理组与对照组无显著差异。

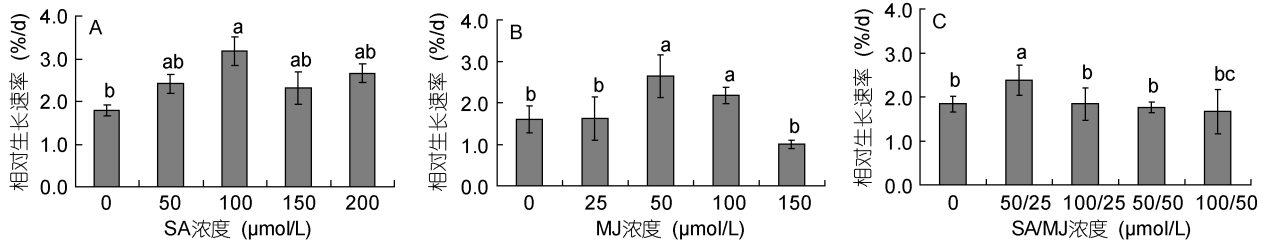


图 1 水杨酸和茉莉酸甲酯对龙须菜相对生长速率的影响

Fig.1 Effects of salicylic acid and methyl jasmonate on the relative growth rate of *G. lemaneiformis* (mean \pm SD)

图中的 a、b、c 等字母表示差异显著。下同

2.2 水杨酸和茉莉酸甲酯对龙须菜脯氨酸含量的影响

4 组龙须菜中脯氨酸含量随时间增加基本呈现先升后降再上升的趋势(图 2)。第 3 天, 除 MJ50 组外, 其它 3 组脯氨酸含量稍有下降。在第 5 天, MJ50 和 SA50/MJ25 组的脯氨酸含量达到最高, 两组分别比对照组增加了 1.22 和 1.25 倍 ($P<0.05$); 在第 6 天, SA50/MJ25 组的脯氨酸含量达到最高, 为 110.99 $\mu\text{g/g}$, 比对照组增加了 1.85 倍 ($P<0.05$)。总体来看, 不同时间处理组中前 3 天 SA100 组中藻的脯氨酸含量最高, 而后 3 天 SA50/MJ25 组脯氨酸含量最高。

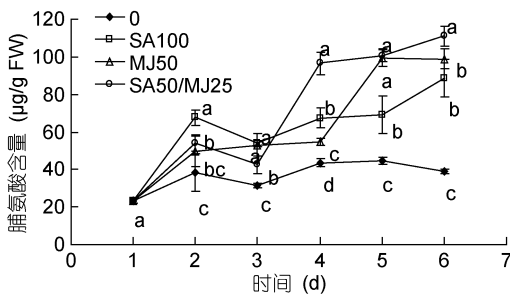


图 2 水杨酸和茉莉酸甲酯对龙须菜脯氨酸含量的影响

Fig.2 Effects of salicylic acid and methyl jasmonate on the proline content of *G. lemaneiformis* (mean \pm SD)

2.3 水杨酸和茉莉酸甲酯对龙须菜丙二醛含量的影响

添加激素的 3 组龙须菜中 MDA 含量均低于对照组, 且 3 个处理组与对照组 MDA 含量变化趋势类似,

大致呈现升—降—升的趋势(图 3)。SA100 组的 MDA 含量从第 3 天到第 6 天与对照组无显著差异。MJ50 组的 MDA 含量在第 2 天到第 4 天显著低于对照组 ($P<0.05$), 在第 6 天达到最高值(0.064 $\mu\text{mol/g}$), 与对照组无显著差异。SA50/MJ25 组中 MDA 含量从第 2 天到第 5 日均低于对照组 ($P<0.05$), 在第 5 天达到最低值, 为对照组的 53.4%。可见, 3 个添加激素组对 MDA 含量的影响以 SA50/MJ25 组最大。

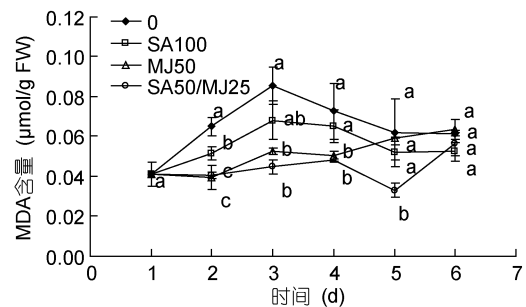


图 3 水杨酸和茉莉酸甲酯对龙须菜 MDA 含量的影响

Fig.3 Effects of salicylic acid and methyl jasmonate on the MDA content of *G. lemaneiformis* (mean \pm SD)

2.4 水杨酸和茉莉酸甲酯对超氧化物歧化酶活性的影响

龙须菜 SOD 活性随时间变化大致呈现先略上升后又下降的趋势(图 4)。各组藻的 SOD 活性在第 12h 最高, 但只有 SA100 组藻的 SOD 活性与其它 3 组差异显著 ($P<0.05$), 而 MJ50 和 SA50/MJ25 组与对照组

无显著差异。在第 24h, SA100、MJ50 和 SA50/MJ25 组的 SOD 活性分别为对照组的 119.95%、113.95%和 116.90%, 与对照组差异均显著。可见, SA100 对 SOD 活性影响最大。

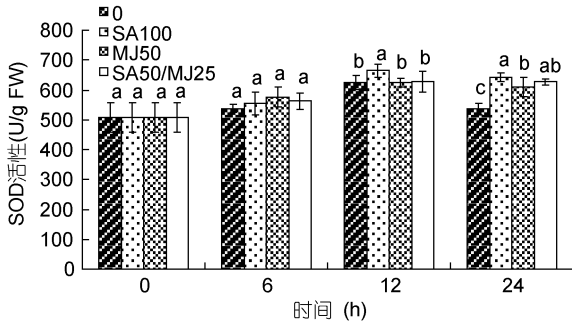


图 4 水杨酸和茉莉酸甲酯对龙须菜 SOD 活性的影响
Fig.4 Effects of salicylic acid and methyl jasmonate on the SOD activity of *G. lemaneiformis* (mean±SD)

2.5 水杨酸和茉莉酸甲酯对碳酸酐酶活性的影响

对照组与 3 个添加激素组龙须菜的 CA 活性均随时间增加而升高(如图 5)。在第 24h, 3 个处理组略高于对照组, 但与对照组间无显著差异。在第 48h, 各组藻中 CA 活性明显升高, 对照组、SA100、MJ50、SA50/MJ25 组的 CA 活性分别是各自起始值的 2.78 倍、3.34 倍、2.95 倍和 3.12 倍; 但在 48h, 仅 SA100 组藻的 CA 活性比对照组高 19.8%, 差异显著 ($P<0.05$), 其它两个激素处理组藻的 CA 活性与对照组差异不显著。

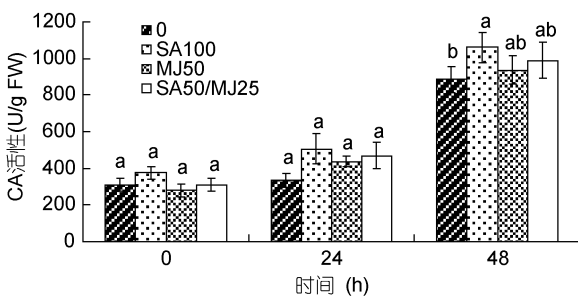


图 5 水杨酸和茉莉酸甲酯对龙须菜 CA 活性的影响
Fig.5 Effects of salicylic acid and methyl jasmonate on CA activity of *G. lemaneiformis* (mean±SD)

2.6 水杨酸和茉莉酸甲酯对硝酸还原酶活性的影响

4 组龙须菜中 NR 活性均随培养时间延长而降低(图 6), 这与该酶是诱导酶有关。在第 24h, 对照组、SA100、MJ50 和 SA50/MJ25 组的 NR 活性分别降为各自 0h 酶活性的 61.16%、59.72%、56.44%和 59.04%; 但 4 组之间无显著差异。在第 48h, 各组藻的 NR 活

性继续下降, 但与 24h 相差不大; 并且仅 MJ50 组藻的 NR 活性高于对照组, 是对照组的 1.12 倍 ($P<0.05$), 其它两个激素处理组与对照差异不显著。

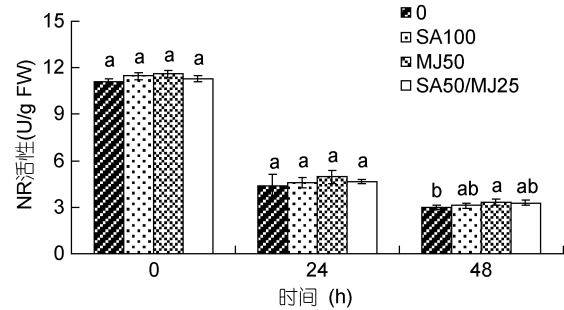


图 6 水杨酸和茉莉酸甲酯对龙须菜 NR 活性的影响
Fig.6 Effects of salicylic acid and methyl jasmonate on NR activity of *G. lemaneiformis* (mean±SD)

2.7 水杨酸和茉莉酸甲酯对 HSP70 和 MnSOD 基因表达的影响

3 种激素处理 6h 后龙须菜 HSP70 基因表达变化如图 7A 所示。SA100、MJ50 和 SA50/MJ25 组藻中 HSP70 基因表达量分别为对照组的 2.04 倍、0.81 倍和 1.54 倍。该结果表明 SA100 和 SA50/MJ25 都能够促进 HSP70 基因的表达, 其中 SA100 的促进作用要大于 SA50/MJ25, 而 MJ50 组对 HSP70 基因表达无影响 ($P>0.05$)。

3 种激素处理 6h 后龙须菜 MnSOD 基因表达变化如图 7B 所示。SA100、MJ50、SA50/MJ25 处理组 MnSOD 表达量分别为对照组的 4.65 倍、0.47 倍、1.11 倍。统计学分析表明 SA100 组与对照组差异极显著, MJ50 组与对照组之间差异显著, 而 SA50/MJ25 组与对照组之间差异不显著。因此, SA100 极大地促进了龙须菜 MnSOD 基因的表达, MJ50 抑制了 MnSOD 基因的表达, 而 SA50/MJ25 对 MnSOD 基因表达无影响。

2.8 水杨酸和茉莉酸甲酯对 CA 和 NR 基因表达的影响

3 种激素处理 6h 后龙须菜 CA 基因表达变化如图 8A 所示。SA100、MJ50、SA50/MJ25 组中 CA 表达量分别为对照组的 2.15 倍、0.50 倍、0.61 倍。方差分析显示 3 个处理组与对照组之间差异均显著。该结果表明在高温胁迫下 SA100 能够促进 CA 基因的表达, 而 MJ50 与 SA50/MJ25 抑制了 CA 基因的表达。

3 种激素处理 6h 后龙须菜 NR 基因表达变化如图 8B 所示。SA100、MJ50、SA50/MJ25 组中 NR 表达量分别为对照组的 1.58 倍、0.46 倍、0.43 倍, 且 3 个

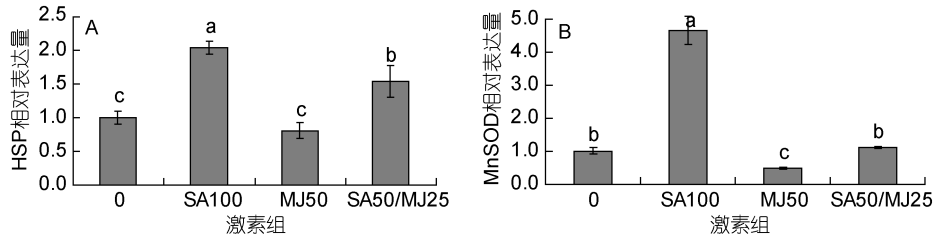


图7 水杨酸和茉莉酸甲酯对 HSP70 和 MnSOD 基因表达的影响

Fig.7 Effects of salicylic acid and methyl jasmonate on the expression of HSP70 and MnSOD genes of *G. lemaneiformis* (mean±SD)

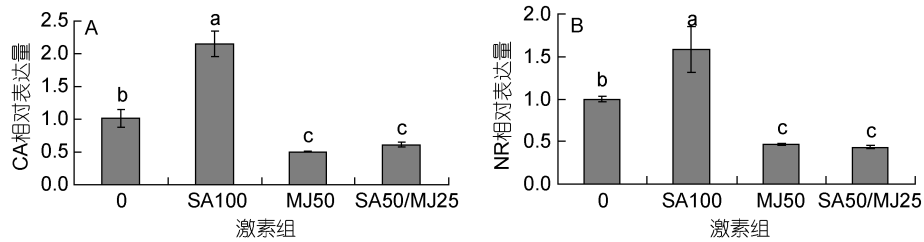


图8 水杨酸和茉莉酸甲酯对 CA 和 NR 基因表达的影响

Fig.8 Effects of salicylic acid and methyl jasmonate on the expression of CA and NR genes of *G. lemaneiformis* (mean±SD)

处理组与对照组之间差异显著, 而 MJ50 组与 SA50/MJ25 组之间无显著差异。该结果表明在高温胁迫下 SA100 能够促进 NR 基因的表达, 而 MJ50 与 SA50/MJ25 则抑制了 NR 基因的表达。三个激素处理组对该藻 NR 基因表达的影响与其对 CA 基因表达的影响类似。

3 讨论

3.1 两种植物激素对植物生长的影响

水杨酸和茉莉酸类物质作为新型植物激素, 在调节植物生长发育和抗逆性中发挥了重要作用。如 SA 的施加可以正向调控盐度和硼引起的胡萝卜储藏根干重和胡萝卜素含量的降低(Eraslan *et al.*, 2007)。激素对植物生长的作用具有浓度依赖性, 如 10^{-5} mol/L SA 对芥菜的作用要优于对照及 10^{-3} 和 10^{-4} mol/L SA (Fariduddin *et al.*, 2003)。本实验中 100 μ mol/L SA 对龙须菜生长的促进作用最大, 与朱招波等(2012)报道的促进龙须菜中最大相对生长速率的 10 μ g/mL 水杨酸浓度较接近。本文结果表明 SA 和 MJ 单独及组合使用都可以促进高温胁迫龙须菜的生长, 三者的最适作用浓度分别是 100 μ mol/L、50 μ mol/L 和 50/25 μ mol/L, 在最适作用浓度下龙须菜的相对生长速率比对照组分别提高了 0.78、0.65 和 0.29 倍。可见 SA 和 MJ 可以促进龙须菜在高温培养条件下的生长, 并且作用强弱依次为 SA100>MJ50>SA50/MJ25。

3.2 两种植物激素对植物渗透调节物质、抗氧化物质及抗氧化酶的影响

脯氨酸是植物细胞内的一种渗透调节物质, 在植物抗热、抗干旱和抗高盐等逆境胁迫中发挥了重要作用。SA 能够提高热驯化鹰嘴豆中脯氨酸含量, 增强其抗热能力(Chakraborty *et al.*, 2005)。据朱招波等(2012)报道, 10.0 μ g/mL SA 处理第 3 天, 龙须菜中的脯氨酸含量比对照组增加 26%。而本研究结果表明 3 种激素处理均可以提高龙须菜的脯氨酸含量, 在第 5 和 6 天脯氨酸含量最高, 其中 MJ50 和 SA50/MJ25 组的影响要大于 SA100 组。

丙二醛是细胞膜被破坏后的代谢产物, 其含量高低可以反映植物细胞膜的损坏程度。杨华庚等(2011)报道 SA、MJ 和钙均可以降低高温胁迫下蝴蝶兰幼苗的 MDA 含量。朱招波等(2012)发现 10.0 μ g/mL SA 处理 MDA 含量比对照低 10%。但未见两种激素联合作用对藻类 MDA 含量影响的报道。本实验中各组藻的 MDA 含量随时间增加呈现先升后降的趋势, 说明高温胁迫已对龙须菜细胞膜造成不利影响。3 种处理中以 SA50/MJ25 对 MDA 含量降低的作用最大, 而 SA100 对 MDA 含量无影响。

超氧化物歧化酶(SOD)是一种重要的抗氧化酶, 可以清除生物体内过多的氧自由基。外源水杨酸和茉莉酸甲酯能够提高植物 SOD 酶活性(Wang *et al.*, 2006; 杨华庚等, 2011)。本实验结果也表明在龙须菜高温胁迫中, SA100 可以增强 SOD 活性。

3.3 植物激素对两种碳氮代谢酶的影响

CA 为含锌离子的金属酶, 能够催化 CO_2 和 HCO_3^- 相互转化, 参与离子交换、生物合成、呼吸作用等多种生物功能(Smith *et al*, 2000)。研究表明 CA 活性受植物激素的调节, 如油菜素甾醇、赤霉素、生长素、细胞分裂素和脱落酸处理后, 芥菜中 CA 活性出现先升后降的趋势(Hayat *et al*, 2001)。但是 $10\mu\text{mol/L}$ 茉莉酸甲酯对豌豆幼苗 CA 活性的影响不显著(Lazova *et al*, 1999)。在本研究中, 仅 SA100 组在处理 48h 时藻的 CA 活性升高。

NR 是植物硝酸盐代谢的关键酶, 可以催化 NO_3^- 还原为 NO_2^- 的反应。SA 可以显著提高芥菜 NR 活性(Fariduddin *et al*, 2003); SA 处理可以提高干旱所引起的番茄中 CA 和 NR 活性的降低(Hayat *et al*, 2008)。本实验中仅 MJ50 组在处理 48h 时有微弱的升高 NR 活性的作用, 而其它两组处理对 NR 活性无影响。

3.4 植物激素对相关基因表达的影响

HSP70 家族作为一种分子伴侣, 与植物的正常生理代谢或胁迫响应相关, 是抗高温胁迫研究中的一种重要指标。本实验中 SA100 和 SA50/MJ25 处理 6h 后 HSP70 表达量升高, 但 MJ50 对 HSP70 表达量无影响。该结果与朱招波等(2012)用的 $10\mu\text{g/mL}$ 水杨酸处理 24h 时 HSP70 表达量下降的报道不同, 这可能与高温处理时间不同等因素有关。

MnSOD 是 SOD 酶中含有锰的一种抗氧化酶, 该酶在植物的抗氧化研究中报道较多。龙须菜中 MnSOD 在 32°C 高温胁迫中表达量升高(Lu *et al*, 2012)。SA 能够促进浒苔中 MnSOD 基因的表达, 且在一定范围内 SA 浓度与 MnSOD 表达量成正比(范美华等, 2014)。本实验中 SA100 极大地促进了 MnSOD 基因的表达, 而 MJ50 抑制了 MnSOD 基因的表达, SA50/MJ25 对 MnSOD 基因表达无影响。

蛋白核小球藻中 CA 活性和基因表达受盐度和无机碳浓度等环境因子的影响(王玮蔚等, 2014), 但植物激素对 CA 基因表达影响的报道很少。本实验中 SA100 处理能够促进 CA 基因表达, MJ50 和 SA50/MJ25 则抑制 CA 基因表达。其中 SA100 对 CA 基因表达的影响与其对 CA 活性影响结果一致, 即 SA100 可以增强 CA 蛋白与转录水平的表达。

NR 基因表达及其酶活性受硝酸盐、光照、谷氨酰胺等多种非生物胁迫因子的诱导和调控(Hoff *et al*, 1994)。此外, NLPs、LBD 和 HY5 等转录因子在调控拟南芥 NR 基因表达中也发挥了重要作用

(Yanagisawa, 2014)。两种植物激素细胞分裂素和脱落酸在调控 NR mRNA 水平中起到相互拮抗的作用(Hoff *et al*, 1994)。本研究表明 SA100 能够促进 NR 基因表达, MJ50 与 SA50/MJ25 则抑制 NR 基因表达。相比对 NR 基因表达的影响, 3 种激素处理对 NR 活性的影响不大。

4 结语

水杨酸和茉莉酸甲酯是具有明确抗逆作用的植物激素。本文在低等藻类植物龙须菜中的研究再次证明了两者的均有促进高温胁迫龙须菜生长的作用。此外, SA 和 MJ 单独或组合使用还可以增强渗透调节物质脯氨酸含量, 降低膜损伤代谢物 MDA 含量, 以及增强抗氧化酶 SOD 活性。而对于碳氮代谢酶, 不同激素处理组对于 CA 活性的增强作用较强, 而对 NR 活性影响不大。再结合 3 个处理组对 4 种基因表达的影响, 可以推断两种植物激素单独或组合使用均有提高龙须菜抗高温的能力, 其中 SA100 效果最显著, MJ50 效果较弱, 而 SA50 和 MJ25 组合使用效果介于两者之间。

参 考 文 献

- 王玮蔚, 孙 雪, 王冬梅等, 2014. 盐度和无机碳对蛋白核小球藻生长、胞外碳酸酐酶活性及其基因表达的影响. 水产学报, 38(7): 920—928
- 朱招波, 孙 雪, 徐年军等, 2012. 水杨酸对龙须菜抗高温生理的影响. 水产学报, 36(8): 1304—1312
- 李合生, 2000. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 258—260
- 杨华庚, 颜漂亮, 陈慧娟等, 2011. 高温胁迫下外源茉莉酸甲酯、钙和水杨酸对蝴蝶兰幼苗耐热性的影响. 中国农学通报, 27(28): 150—157
- 张学成, 费修缙, 王广策等, 2009. 江蓠属海藻龙须菜的基础研究与大规模栽培. 中国海洋大学学报, 39(5): 947—954
- 范美华, 孙 雪, 王日昕等, 2014. 浒苔中 MnSOD 和 CAT 基因克隆和表达分析. 水产学报, 38(12): 1976—1984
- Abreu M H, Varela D A, Henriquez L *et al*, 2009. Traditional vs. integrated multi-trophic aquaculture of *Gracilaria chilensis* C. J. Bird, J. McLachlan & E. C. Oliveira: productivity and physiological performance. Aquaculture, 293(3—4): 211—220
- Chakraborty U, Tongden C, 2005. Evaluation of heat acclimation and salicylic acid treatments as potent inducers of thermotolerance in *Cicer arietinum* L. Curr Sci, 89(2): 384—389
- Clarke S M, Cristescu S M, Miersch O *et al*, 2009. Jasmonates act with salicylic acid to confer basal thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. New Phytol, 182(1): 175—187
- Eraslan F, Inal A, Gunes A *et al*, 2007. Impact of exogenous salicylic acid on the growth, antioxidant activity and physiology of carrot plants subjected to combined salinity and boron toxicity. Scientia Hort, 113(2): 120—128

- Fariduddin Q, Hayat S, Ahmad A, 2003. Salicylic acid influences net photosynthetic rate, carboxylation efficiency, nitrate reductase activity, and seed yield in *Brassica juncea*. *Photosynthetica*, 41(2): 281—284
- Hayat Q, Hayat S, Irfan M *et al*, 2010. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environ Exp Bot*, 68(1): 14—25
- Hayat S, Ahmad A, Mobin M *et al*, 2001. Carbonic anhydrase, photosynthesis, and seed yield in mustard plants treated with phytohormones. *Photosynthetica*, 39(1): 111—114
- Hayat S, Hasan S A, Fariduddin Q *et al*, 2008. Growth of tomato (*Lycopersicon esculentum*) in response to salicylic acid under water stress. *J Plant Int*, 3(4): 297—304
- Hoff T, Truong H-N, Caboche M, 1994. The use of mutants and transgenic plants to study nitrate assimilation. *Plant, Cell & Environmet*, 17(5): 489—506
- Lazova G N, Kicheva M I, Popova L P, 1999. The effect of abscisic acid and methyl jasmonate on carbonic anhydrase activity in pea. *Photosynthetica*, 36(4): 631—634
- Li Z G, Xie L R, Li X J, 2015. Hydrogen sulfide acts as a downstream signal molecule in salicylic acid-induced heat tolerance in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *J Plant Physiol*, 177(1): 121—127
- Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4): 402—408
- Lu N, Zang X N, Zhang X C *et al*, 2012. Gene cloning, expression and activity analysis of manganese superoxide dismutase from two strains of *Gracilaria lemaneiformis* (Gracilariaceae, Rhodophyta) under heat stress. *Molecules*, 17(4): 4522—4532
- Moskvin Q V, Razgulyayeva A Y, Shutova TV *et al*, 1998. Carbonic anhydrase activity of different photosystem II preparations. In: Garab G ed. *Photosynthesis: mechanisms and effects*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1201—1204
- Provasoli L, 1968. Media and prospects for the cultivation of marine algae. In: Watarnable A and Hattori R (eds) *Culture and collection of algae*. Proceedings of the US-Japan Conference, Hakone: Japan Soc Plant Physiol, 63—75
- Salzman R A, Brady J A, Finlayson S A *et al*, 2005. Transcriptional profiling of *Sorghum* induced by methyl jasmonate, salicylic acid, and aminocyclopropane carboxylic acid reveals cooperative regulation and novel gene responses. *Plant Physiol*, 138(1): 352—368
- Smith K S, Ferry J G, 2000. Prokaryotic carbonic anhydrases. *FEMS Microbiol Rev*, 24(4): 335—366
- Wang L J, Fan L, Loescher W *et al*, 2010. Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under heat stress and accelerates recovery in grapevine leaves. *BMC Plant Biol*, 10: 34
- Wang L J, Li S H, 2006. Salicylic acid-induced heat or cold tolerance in relation to Ca^{2+} homeostasis and antioxidant systems in young grape plants. *Plant Sci*, 170(4): 685—694
- Wasternack C, Hause B, 2002. Jasmonates and octadecanoids: Signals in plant stress responses and development. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 72: 165—221
- Yanagisawa S, 2014. Transcription factors involved in controlling the expression of nitrate reductase genes in higher plants. *Plant Sci*, 229: 167—171
- Zou D H, Gao K S, 2014. Temperature response of photosynthetic light- and carbon-use characteristics in the red seaweed *Gracilariopsis lemaneiformis* (Gracilariales, Rhodophyta). *J Phycol*, 50(2): 366—375

EFFECTS OF SALICYLIC ACID AND METHYL JASMONATE ON PHYSICOCHEMICAL PROPERTY AND GENE EXPRESSION OF *GRACILARIOPSIS LEMANEIFORMIS* UNDER HEAT STRESS

WANG Chong-Bin^{1,2}, ZOU Tong-Lei^{1,2}, SUN Xue^{1,2}, WANG Fang-Jun^{1,2}, XU Nian-Jun^{1,2}

(1. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 2. Key Laboratory of Marine Biotechnology of Zhejiang Province, Ningbo 315211, China)

Abstract Salicylic acid (SA) and methyl jasmonate (MJ) are two new types of phytohormone which can resist effectively in adverse environments. In this study, the effects of SA and MJ on growth, proline and MDA contents, activities of SOD, CA and NR, and 4 relevant gene expressions in high-temperature-cultured *Gracilariopsis lemaneiformis*, were investigated. Results showed that 100 μ mol/L SA (SA100), 50 μ mol/L MJ (MJ50), and 50 μ mol/L SA+25 μ mol/L MJ (SA50/MJ25) experimental groups could promote notably the algal growth by 1.78, 1.65, and 1.29 times compared to the control, respectively. Proline contents were enhanced in all the three treatments, highest in SA100 group, whereas SA50/MJ25 had the strongest effect on reducing MDA content. In the SA100 group, enzymatic activities of SOD and CA were enhanced significantly, while enzymatic activity of NR in MJ50 group was improved. After treated with SA100, expressions of HSP70, MnSOD, CA and NR genes were improved by 2.04, 4.65, 2.15, and 1.58 times of the control. In addition, expressions of MnSOD, CA and NR genes in MJ50 group decreased by 0.47, 0.50, and 0.46 time of the control. In SA50/MJ25 group, expression of HSP70 gene was enhanced but those of CA and NR genes were depressed. Therefore, SA and MJ could alleviate heat stress on *G. lemaneiformis* strongest in SA100 group and smallest in MJ50 group.

Key words *Gracilariopsis lemaneiformis*; salicylic acid; methyl jasmonate; heat stress; gene expression