

水杨酸对蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*) 生长及抗逆相关基因的影响*

丁聪聪^{1,2} 徐年军^{1,2} 张琳^{1,2} 孙雪^{1,2} 李亚鹤^{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 以蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)为研究对象,首先克隆了热激蛋白 70(HSP70)和磷酸甘油酸激酶(PGK)基因全长序列,然后研究了 0—20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 水杨酸对高温胁迫下 HSP70 和 PGK 基因表达,以及蛋白核小球藻生长、可溶性糖和蛋白含量的影响。结果获得了蛋白核小球藻 HSP70 基因的 cDNA 序列 2405 bp,包括 60 bp 的 5'-非编码区(UTR)、1959 bp 的开放阅读框(ORF)和 386 bp 的 3'-UTR 和 PGK 基因的 cDNA 序列 1664 bp,包括 35 bp 的 5'-UTR,1398 bp ORF 和 231 bp 3'-UTR。序列比较和分析表明该蛋白核小球藻 HSP70 序列与其它绿藻的同源性高达 83%—91%,PGK 为 70%—75%。荧光定量 PCR 结果显示随着水杨酸浓度的增加,HSP70 和 PGK 的表达量在 12h 和 24h 均有所增加,而在 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 水杨酸浓度下表达量最大,12h 时分别为对照组的 2.57 倍和 1.56 倍,24h 则为 1.71 倍和 1.79 倍。1—20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 水杨酸可促进该藻的比生长速率、可溶性糖和蛋白含量的升高。本文结果表明一定浓度水杨酸对高温胁迫蛋白核小球藻有缓解作用,且 5 和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 水杨酸的效果最显著。

关键词 蛋白核小球藻;水杨酸;热激蛋白 70;磷酸甘油酸激酶;高温胁迫

中图分类号 Q946 doi: 10.11693/hyhz20150300082

小球藻(*Chlorella*)为绿藻门(Chlorophyta)、Trebouxiophyceae 纲、小球藻科(Chlorellaceae)的一类单细胞藻类,在自然界广泛分布。小球藻中常见种主要有普通小球藻(*C. vulgaris*)、蛋白核小球藻(*C. pyrenoidosa*)、椭圆小球藻(*C. ellipsoidea*)等。蛋白核小球藻因生长快、易培养,及其独有的具有很高药用价值的小球藻生长因子(CGF)而广受关注。温度作为重要的环境因素之一,在小球藻生长和光合作用中发挥了重要作用(欧阳崢嵘等,2010)。水杨酸作为一种新型植物激素已成为植物体内的重要信号分子来诱导逆境防御机制,参与并调节逆境胁迫。大量的研究证实水杨酸可以提高植物对低温(Lei *et al.*, 2010)、高温(Li *et al.*, 2015)、盐害(Jayakannan *et al.*, 2015)等胁迫的抗性。

热激蛋白(heat shock proteins, HSPs)作为植物体对逆境短期响应的一种分子伴侣,能阻止细胞内变性蛋白发生聚集,并对其修复(Fu *et al.*, 2009),可提高机体耐热性,减轻逆境胁迫对机体的伤害(Koizumi *et al.*, 2014)。大量研究发现,逆境条件如高温、高盐、重金属、干旱和病害等多种胁迫都可诱导 HSPs 的合成(Timperio *et al.*, 2008; 周向红等, 2010)。其中 HSP70 是热激蛋白家族中的重要成员,参与真核细胞新生肽段折叠、定位等正常生命活动过程,以及 DNA 修复、抗氧化活性、光保护物质等多种应激反应。藻类中关于 HSP 的研究已经比较多,其中褐藻门的裙带菜(*Undaria pinnatifida*)和海带(*Laminaria japonica*) (Henkel *et al.*, 2008; Fu *et al.*, 2009)、红藻门的龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*) (Gu *et al.*, 2012)、

* 浙江省自然科学基金资助, LY13D060007 号;宁波市科技攻关项目资助, 2014C10023 号。丁聪聪, 硕士研究生, E-mail: dingcongcon.g@163.com

通讯作者: 徐年军, 博士生导师, 研究员, E-mail: xunianjun@nbu.edu.cn

收稿日期: 2015-03-18, 收修改稿日期: 2015-06-24

绿藻门的孔石莼(*Ulva pertusa*) (Tominaga *et al.*, 2010) 等都有 *HSP70* 基因的相关报道。Liu 等(2014)克隆了普通小球藻 *HSP90* 基因, 但目前尚无蛋白核小球藻 *HSP70* 基因克隆和表达的相关报道。

磷酸甘油酸激酶(phosphoglycerate kinase, PGK) 是生物体内糖酵解过程中的关键酶, 缺乏此酶可引起生物体代谢功能紊乱。磷酸甘油酸激酶在催化 1, 3-二磷酸甘油酸转变成 3-磷酸甘油酸时, 产生一分子的 ATP。逆境条件下, 植物需消耗大量能量来提高抗性, 而能量主要来源为糖酵解途径(Wang *et al.*, 2009)。目前关于 PGK 的研究主要集中在动物方面(Wang *et al.*, 2014), 植物方面有部分蛋白组学相关研究(蒋际谋等, 2014), 基因表达水平研究较少(Ding *et al.*, 2014), 而藻类中的研究更少。Shingaki-Wells 等(2011)发现, 缺氧环境下, 水稻胚芽鞘中 PGK 活性提高, 并证实了在适应缺氧环境的过程中水稻胚芽鞘酵解和酒精发酵增强。而高温下水杨酸对糖代谢分子水平的影响方面的研究还很少。

本文从蛋白核小球藻中分离鉴定了其 *HSP70* 和 *PGK* 基因序列, 并研究了高温胁迫下水杨酸对蛋白

核小球藻生长、可溶性糖和蛋白含量及 *HSP70* 和 *PGK* 基因转录水平的影响。相关研究结果可为水杨酸在抗高温胁迫方面的应用及其作用机制等提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 材料

蛋白核小球藻 820 藻株来自宁波大学海洋生物工程重点实验室藻种室, 培养基为 f/2 培养基, 培养温度为 25°C, 光照强度为 3500 lx, 光照周期为 12L:12D。

1.2 引物序列

从 GenBank 数据库中搜索莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)、普通小球藻等的 *HSP70* 序列, 利用 ClustalX 1.83 软件进行比对, 根据其保守核苷酸序列设计简并引物, 扩增出两条基因的部分 cDNA 序列, 然后根据这部分 cDNA 序列使用 Primer Premier 5.0 软件来设计 5' RACE 和 3' RACE 引物(所用各引物序列见表 1)。

表 1 蛋白核小球藻 *HSP70* 和 *PGK* 基因克隆和荧光定量所用引物
Tab.1 Primer sequences of cloning and real-time PCR for *HSP70* and *PGK* in *C. pyrenoidosa*

基因名称	扩增序列	引物名称及代号	引物序列
<i>HSP70</i>	部分片段	上游引物 F	CACTGGCCCTTCAAGGTGGT
	部分片段	下游引物 R	TCCTCRGCCAGCTGGTTGTG
	5' RACE	外侧引物 5GSP1	CGCAAACGCCGAAGGGCACGAGGG
	5' RACE	内侧引物 5GSP2	GTGCCGCCACCAAGTCAAAGATG
	3' RACE	上游引物 F1	AAGCCGTTGACGCTGCCATTGAGT
	3' RACE	接头引物 AP1	TACCGTCGTTCCACTAGTGATT
	全长验证	上游引物 F2	CACCAGTATGGCGAAGGACG
	全长验证	下游引物 R2	CCAGTCTCCCAGCTACTTGCAC
	荧光定量	上游引物 F3	AGCATCGCAAGCGTGTC
	荧光定量	下游引物 R3	CTCAATGGCAGCGTCAA
<i>PGK</i>	全长	上游引物 F4	GCGGTTTGGTGTGTTGGTGATT
	全长	下游引物 R4	GCGTGTCATGGTTCGAGAAGCT
	荧光定量	上游引物 F5	GAGCACCAGGTCTCGCAATG
	荧光定量	下游引物 R5	GACAGGTGCGCAACGCTCT
	<i>TBP</i>	荧光定量	上游引物 F6
荧光定量		下游引物 R6	ATCTTTGGGTCCACCATTCCG

1.3 *HSP70* 部分 cDNA 片段的克隆

首先 8000 r/min 离心 5min 收集对数期的蛋白核小球藻, 无菌水洗涤藻细胞后再次离心。再按 Trizol 试剂说明提取小球藻总 RNA, 检测总 RNA 质量合格然后根据 PrimeScript[®] RT reagent Kit (TaKaRa) 反转

录试剂盒说明书反转录为 cDNA, 以该 cDNA 为模板利用简并引物进行 PCR 扩增。1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物后, GenClean 琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的片段, 连接至 pMD18-T 载体, 连接后的产物导入大肠杆菌(*E. coli*) DH5 α 感受态细胞, 阳性

克隆送去华大基因(上海)科技服务有限公司测序。

1.4 HSP70 的 RACE 扩增

利用 SMARTer™ RACE cDNA 扩增试剂盒(Clontech 公司)获得基因的 5' 端序列。根据 PrimeScript® RT reagent Kit(Takara)反转录试剂盒说明书进行 3' RACE cDNA 的制备, 3' RACE adaptor 代替试剂盒中的 OligodT Primer 和 Random 6 mers 进行反转录反应。以合成的 cDNA 为模板, 特异性引物 F、接头引物 AP1 作为上下游引物进行 3' RACE PCR 扩增。

1.5 HSP70 和 PGK 基因全长的获得及验证

将测序得到的 HSP70 基因的部分片段、5' RACE 和 3' RACE 片段一起拼接得到其全长 cDNA 序列。PGK 基因序列来自实验室已测蛋白核小球藻的转录组测序结果。为了验证两条基因序列的正确性, 再从基因两端的非翻译区(UTR)区设计一对引物, 利用 Pyrobest Polymerase (TaKaRa)进行 PCR 扩增。产物的回收、转化等同 1.3, 将阳性克隆送去测序。

1.6 HSP70 和 PGK 基因的序列分析

将 HSP70 和 PGK 基因在 NCBI 的 Blastx 中(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blastx>)进行同源性比对; 用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)推测开放阅读框; 利用 ExpASY Proteomics Server (<http://web.expasy.org>)进行氨基酸序列分析; 利用 ClustalX 和 MEGA 5.0 软件中的邻接法(NJ)分别进行多序列比对和系统进化树构建。

1.7 HSP70 和 PGK 基因转录水平的定量分析

样品处理: 处理温度为 35°C, 在处于对数中期的蛋白核小球藻中加入水杨酸母液, 使其终浓度分别为 0、1、5、10、15 和 20 μg/mL, 每组设三个平行, 培养 12h 和 24h 后取样。根据获得的 HSP70 和 PGK 基因设计荧光定量 PCR 引物(表 1)。以 TATA 结合蛋白(TATA-binding protein, TBP)做内参基因, 根据其 cDNA 序列设计荧光定量 PCR 引物(表 1)。将 TBP、HSP70 和 PGK 的荧光定量 PCR 引物扩增序列进行克隆与测序鉴定。

荧光定量 PCR 采用 SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒, 反应体系: 10 μL SYBR Premix Ex Taq, 正反向引物(10 μmol/L)各 0.4 μL, 2 μL cDNA 模板, RNA-free 水补足体积至 20 μL。PCR 循环参数为 95°C 预变性 2min; 然后按 95°C 变性 15s, 55°C 复性 15s, 72°C 延伸 20s 的程序进行 40 个循环; PCR 结束后进行熔解曲线分析 95°C 15s, 60°C 15s, 95°C 15s(一个循环)。每个样品三个平行。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析 HSP70 和 PGK 的相

对表达量。并用 Origin 7.0 软件进行差异显著性分析。

1.8 生长及生化指标的测定

不同浓度水杨酸处理蛋白核小球藻 24h 和 48h 后, 利用分光光度计测定 680nm 下藻的吸光值。根据吸光值与藻细胞密度的标准曲线图计算出细胞密度, 并根据 $\mu=(\ln N-\ln N_0)/(t-t_0)$ 计算藻的比生长速率。其中 N_0 为初始培养时间 t_0 时的细胞密度, N 为 t 时的细胞密度。可溶性糖含量测定采用硫酸蒽酮法, 可溶性蛋白含量测定用考马斯亮蓝法(李合生, 2000)。

1.9 统计分析

数据处理和统计分析采用 Origin7.0 软件, 差异显著水平检验用的是单因素方差分析(one-way ANOVA), $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 HSP70 和 PGK 基因的扩增

使用 HSP70 简并引物扩增得到 1518 bp 长的 cDNA 部分片段, 将其与 3' RACE 扩增得到的长为 611 bp 的产物与长 900 bp 的 5' RACE 产物一起拼接, 得到全长为 2405 bp 的 HSP70 基因(GenBank 号: KP694307), 包括 1959 bp 的开放阅读框(ORF)、60 bp 的 5'端非编码区(5'-UTR)和 386 bp 的 3'端非编码区(3'-UTR)。其中 ORF 区编码 652 个氨基酸, Expasy 分析显示其分子量大小为 71.59 kDa, 理论等电点为 5.12。利用引物 F4 和 R4 扩增得到全长 1664 bp 的 PGK 基因(GenBank 号: KP694308), 包括 35 bp 的 5'-UTR, 1398 bp 的 ORF 和 231 bp 的 3'-UTR, 其中 ORF 编码 465 个氨基酸, 推测其分子量为 49.16 kDa, 理论等电点为 7.01。

2.2 HSP70 和 PGK 基因的分析

将由 HSP70 的 cDNA 序列推导出的氨基酸序列与其它物种的 HSP70 氨基酸序列进行多序列比对(图 1), 结果表明该蛋白核小球藻与普通小球藻和小球藻 *C. variabilis* 的同源性均高达 91%, 与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的同源性为 83%。我们在 HSP70 氨基酸的多序列比对中发现序列保守性强的区域, 包含了三个典型的 HSP70 家族签名基序, 其氨基酸残基序列分别为 10—17 (IDLGTTYS)、203—216 (IFDLGGGTFDVSLL)、339—354 (VVLVGGSTRIPKVQQ), 及细胞质定位的 C-末端的特征基序(EEVD)。

利用邻接法构建了基于 HSP70 氨基酸序列的系统进化树。进化树分析显示, 蛋白核小球藻 HSP70 氨基酸序列与普通小球藻和小球藻 *C. variabilis* 亲缘

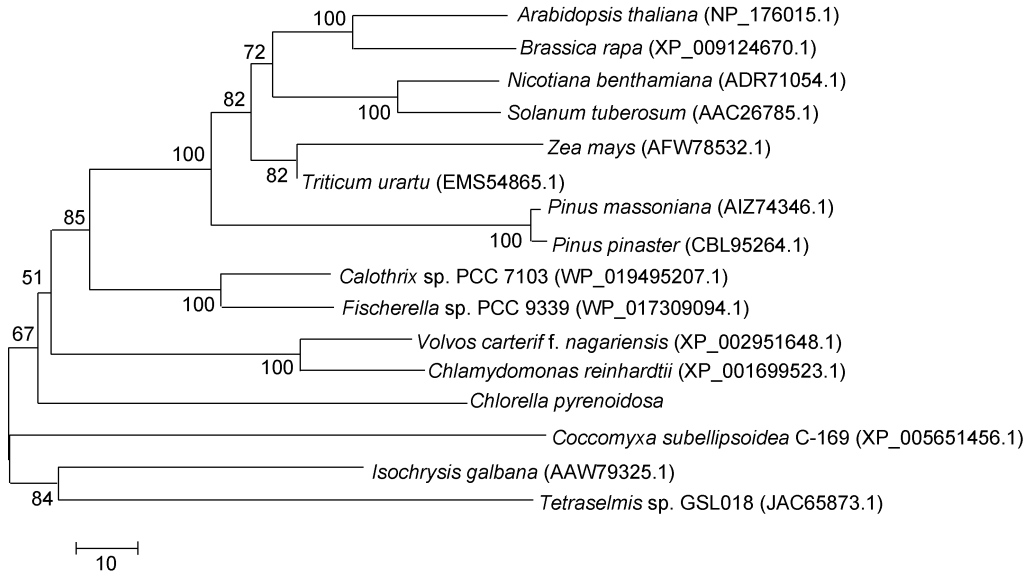


图 4 不同物种基于 PGK 氨基酸序列构建的系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of different species based on PGK amino acid sequences

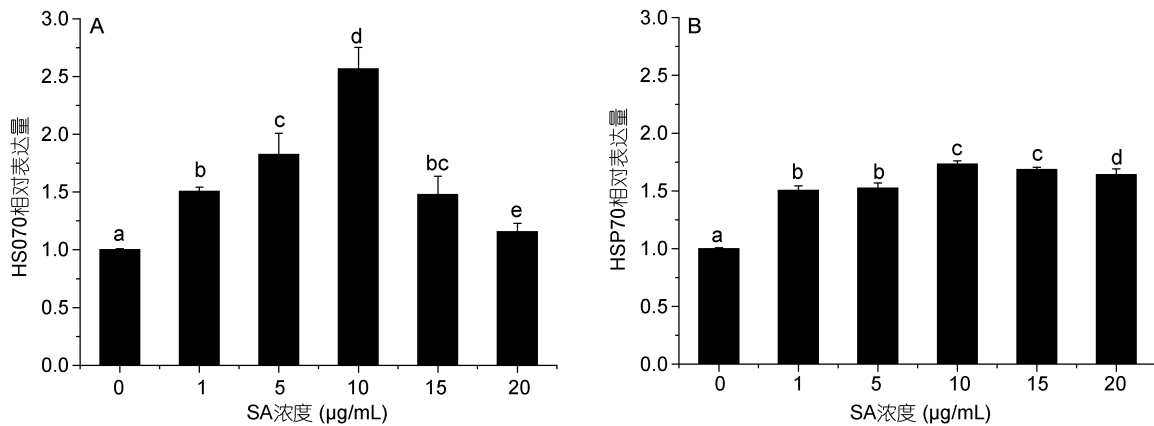


图 5 不同浓度水杨酸对高温培养蛋白核小球藻 HSP70 基因表达的影响(A: 12h, B: 24h)

Fig.5 Effects of salicylic acid concentration on HSP70 relative expression of *C. pyrenoidosa* under high temperature (mean±SD) (A: 12h, B: 24h)

图中不同字母 a、b、c、d、e 表示有显著性差异。下同

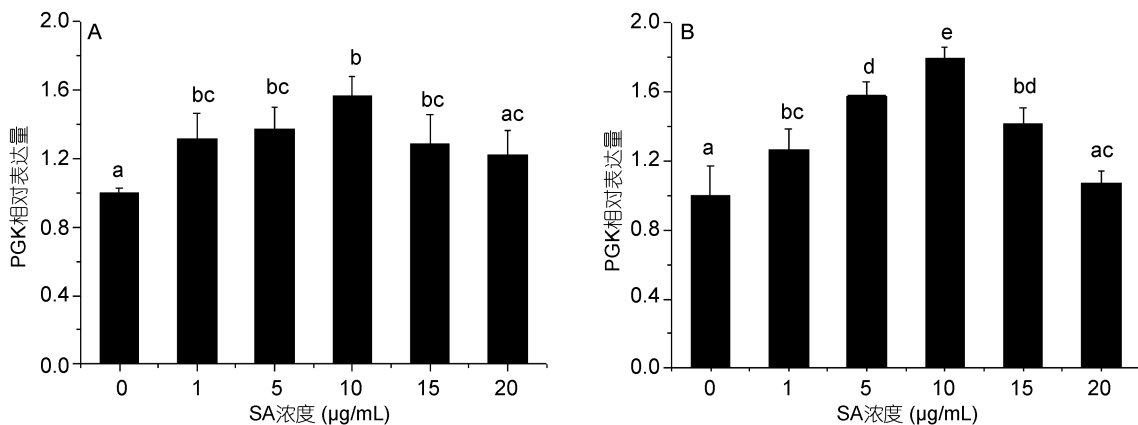


图 6 不同浓度水杨酸对高温培养蛋白核小球藻 PGK 基因表达的影响(A: 12h, B: 24h)

Fig.6 Effects of salicylic acid concentration on PGK relative expression of *C. pyrenoidosa* under high temperature (mean±SD) (A: 12h, B: 24h)

2.4 不同浓度水杨酸对蛋白核小球藻生长的影响

不同浓度水杨酸处理对高温胁迫后蛋白核小球藻生长有明显的影响(图 7)。随着水杨酸浓度的升高,蛋白核小球藻比生长速率(μ)均有所提高,且在一定范围内随着水杨酸浓度的增加而增加。其中高温胁迫 24h 时(图 7A),5 和 10 $\mu\text{g/mL}$ 水杨酸添加后,藻的比生长速率均显著高于对照组($P<0.05$),且在 5 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下达到最高,为对照组的 2.55 倍。在 48h 时,5-20 $\mu\text{g/mL}$ 水杨酸添加后藻的比生长速率显著高于对照组($P<0.05$),而在 10 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下最高,为对照组的 2.07 倍。该结果说明一定浓度的水杨酸促进了高温培养蛋白核小球藻的生长,其中 5 和 10 $\mu\text{g/mL}$ 水杨酸促进作用最好。

2.5 不同浓度水杨酸对可溶性蛋白和可溶性糖含量的影响

不同浓度水杨酸处理对高温胁迫后蛋白核小球

藻可溶性蛋白(图 8)和可溶性糖含量(图 9)有一定的影响。随着水杨酸浓度的增加,小球藻的可溶性蛋白和糖含量均有所增加,且在一定浓度范围内,蛋白和糖含量的增加量与水杨酸浓度呈正相关。其中高温胁迫 24h 和 48h 时,5 个水杨酸处理组藻的蛋白含量均高于对照组($P<0.05$),且在 10 $\mu\text{g/mL}$ 水杨酸组中最高,分别是对照组的 1.51 和 1.18 倍。

在高温胁迫 24h 时,仅 1、5、10 $\mu\text{g/mL}$ 水杨酸处理组藻的可溶性糖含量有所增加($P<0.05$);在 48h 时,5 个水杨酸处理组藻的可溶性糖含量均高于对照组。在 10 $\mu\text{g/mL}$ 水杨酸组中,小球藻的糖含量最高,分别是对照组的 1.10 和 1.34 倍。以上结果说明一定浓度的水杨酸促进了蛋白核小球藻可溶性蛋白和可溶性糖含量的增加。

3 讨论

藻类在生长过程中往往受到多种逆境(高温、低

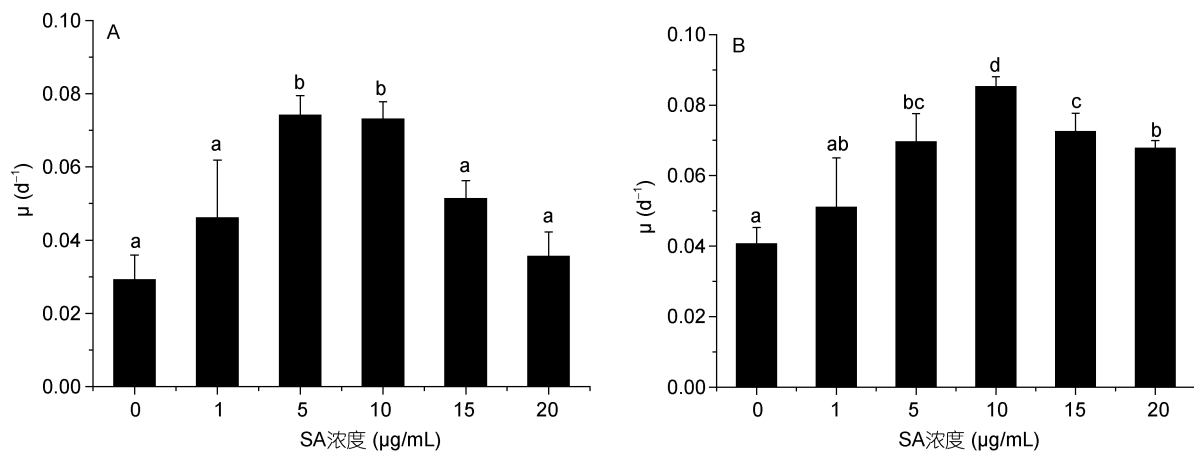


图 7 不同浓度水杨酸对高温培养蛋白核小球藻生长的影响(A: 24h, B: 48h)

Fig.7 Effects of salicylic acid concentration on *C. pyrenoidosa* grown in high temperature (mean \pm SD) (A: 12h, B: 24h)

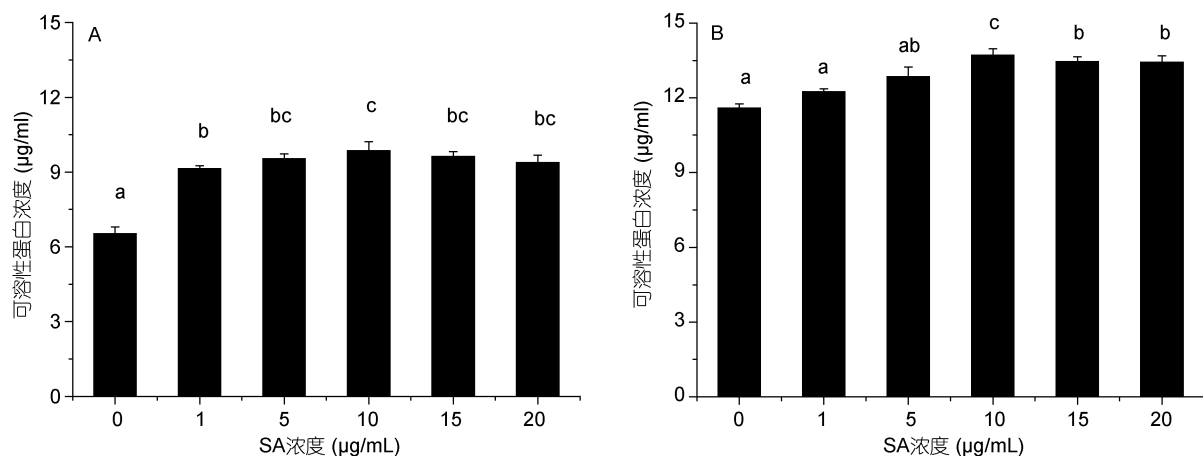


图 8 不同浓度水杨酸对高温培养蛋白核小球藻可溶性蛋白含量的影响(A: 24h, B: 48h)

Fig.8 Effects of salicylic acid concentration on soluble protein content of *C. pyrenoidosa* under high temperature (mean \pm SD) (A: 12h, B: 24h)

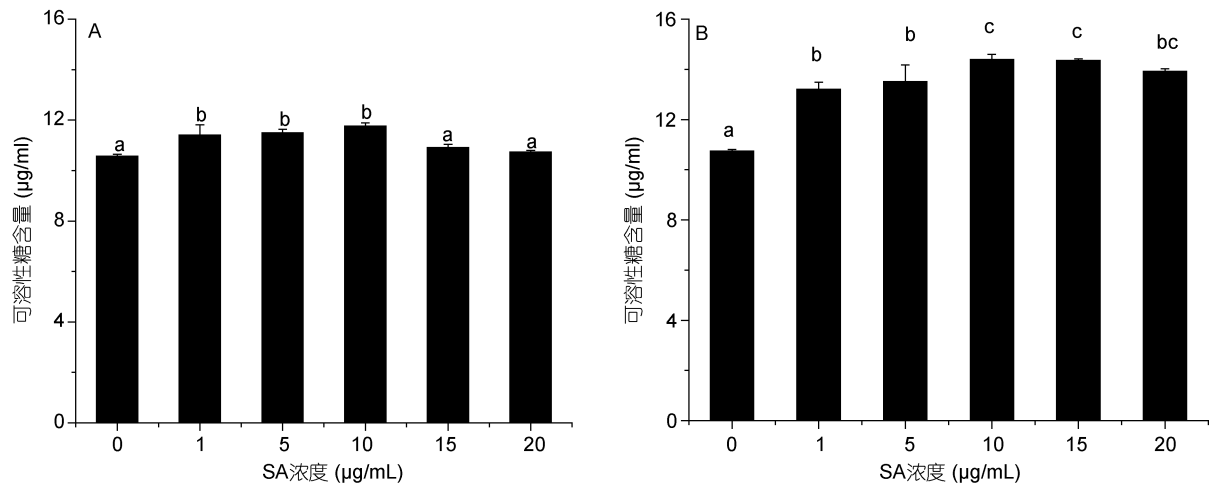


图9 不同浓度水杨酸对高温培养蛋白核小球藻可溶性糖含量的影响(A: 24h, B: 48h)

Fig.9 Effects of salicylic acid concentration on soluble sugar content of *C. pyrenoidosa* under high temperature (mean±SD) (A: 12h, B: 24h)

温、高盐等)的影响,作为一种胁迫生物指示物, HSPs 已得到广泛关注(Dahlhoff, 2004; Elyse Ireland *et al.*, 2004)。在逆境胁迫状态时,生物体大量表达 HSPs 阻止变性蛋白的聚集,修复变性蛋白,并运送未成熟的蛋白质完成包装、代谢、修复,增加细胞抗逆性。有研究发现水杨酸参与植物的抗热反应,它可通过调节活性氧、抗氧化物质含量及活性来提高植物抗逆性(Qu *et al.*, 2013)。何亚丽等(2002)研究认为, SA 通过促进植物在高温胁迫下合成大量的热激蛋白,保持较高的超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性,提高抗氧化能力,降低高温对细胞产生的伤害,从而提高植物抗热性。Pan 等(2006)发现豌豆受到高温胁迫时, SA 处理可诱导 HSP70 的合成。而番茄在面临高温环境时,外施 SA 可诱导 HSP70 mRNA 转录和热休克因子基因表达增强,积累 HSP70 蛋白(Snyman *et al.*, 2008)。本研究发现水杨酸添加后,蛋白核小球藻 HSP70 的表达量不同程度地得到提高,且在水杨酸处理浓度为 10 µg/mL 时 HSP70 表达量最高。该结果说明高温条件下水杨酸可以促进 HSP70 的转录水平表达,从而大量合成 HSP70 蛋白,修复受损细胞使生物体抵御高温环境,从而维持正常的生命活动状态。

高温条件下植物呼吸作用急剧升高,分解代谢增强,能量消耗增加。Gammulla 等(2010)认为高温对水稻糖酵解途径具有负面的影响,且降低细胞能量的产生。磷酸甘油酸激酶(PGK)的编码基因在整个高温处理过程中表达持续上调(Zhang *et al.*, 2012)。而关于水杨酸处理后 PGK 的变化研究较少。Suzuki 等(2014)认为水杨酸促进了 PGK 的表达, Fahraji 等

(2014)研究则表明水杨酸显著刺激 PGK 参与种子的萌发。本研究中 PGK 在水杨酸处理 12h 和 24h 时表达增强,反映了高温胁迫过程中,水杨酸促进细胞呼吸,减轻高温逆境胁迫对机体产生的伤害。

高温条件下小球藻生长受到胁迫,新陈代谢活性降低,比生长速率较小,而水杨酸添加后比生长速率升高,高温对生长的抑制作用得到缓解,这与小麦中的研究结果一致(Shakirova *et al.*, 2007)。高温下淀粉水解作用增强,可溶性糖含量升高,而淀粉的水解为呼吸作用提供能源,增加细胞渗透压,对细胞产生保护作用。有研究认为,高温处理下可溶性糖含量下降(Chaitanya *et al.*, 2001)。而本研究中高温胁迫 48h 比 24h 可溶性蛋白含量有所提高,高温下体内可溶性蛋白含量的提高可增加细胞渗透势等,维持机体正常代谢,提高细胞抗逆性,抵御不良环境胁迫。本研究中经水杨酸处理后可溶性糖和蛋白含量均呈现不同程度的提高,说明水杨酸通过调节渗透调节物质,改变质膜透性,从而提高机体对逆境胁迫的抗性,与 Czerpak 等(2001)的研究结果相符。

综上所述,本文克隆了蛋白核小球藻 HSP70 和 PGK 全长基因,并研究了水杨酸对高温胁迫下蛋白核小球藻中 HSP70 和 PGK 的表达、及藻的生长、生化指标的影响。结果表明适宜浓度的水杨酸对蛋白核小球藻高温胁迫具有一定的缓解作用,且在一定程度上增强了 HSP70 和 PGK 的表达,其中 5—10 µg/mL 时作用最显著,这为利用水杨酸缓解小球藻温度胁迫的研究提供了一定的资料。

参 考 文 献

- 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, 195—197
- 何亚丽, 刘友良, 陈 权等, 2002. 水杨酸和热锻炼诱导的高羊茅幼苗的耐热性与抗氧化的关系. 植物生理与分子生物学学报, 28(2): 89—95
- 欧阳嵘嵘, 温小斌, 耿亚红等, 2010. 光照强度、温度、pH、盐度对小球藻(*Chlorella*)光合作用的影响. 武汉植物学研究, 28(1): 49—55
- 周向红, 李信书, 王 萍等, 2010. 条斑紫菜 HSP90 基因的克隆与表达分析. 水产学报, 34(12): 1844—1852
- 蒋际谋, 邓朝军, 林永祥等, 2014. 枇杷果皮响应高温强光胁迫的蛋白质组分析. 热带亚热带植物学报, 22(4): 383—390
- Chaitanya K V, Sundar D, Reddy A R, 2001. Mulberry leaf metabolism under high temperature stress. *Biologia Plantarum*, 44(3): 379—384
- Czerpak R, Bajguz A, Gromek M *et al*, 2001. Activity of salicylic acid on the growth and biochemism of *Chlorella vulgaris* Beijerinck. *Acta Physiologiae Plantarum*, 24(1): 45—52
- Dahlhoff E P, 2004. Biochemical indicators of stress and metabolism: applications for marine ecological studies. *Annual Review of Physiology*, 66: 183—207
- Ding M, Jiang Y, Cao Y *et al*, 2014. Gene expression profile analysis of Ligon lintless-1 (*Lil*) mutant reveals important genes and pathways in cotton leaf and fiber development. *Gene*, 535(2): 273—285
- Elyse Ireland H, Harding S J, Bonwick G A *et al*, 2004. Evaluation of heat shock protein 70 as a biomarker of environmental stress in *Fucus serratus* and *Lemna minor*. *Biomarkers*, 9(2): 139—155
- Fahraji S S, Kheradmand M A, Raoofi M M *et al*, 2014. Effect of salicylic acid on germination, leaf area, shoot and root growth in crop plants. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, 8(9): 1454—1458
- Fu W, Yao J, Wang X *et al*, 2009. Molecular cloning and expression analysis of a cytosolic Hsp70 gene from *Laminaria japonica* (Laminariaceae, Phaeophyta). *Marine Biotechnology*, 11(6): 738—747
- Gammulla C G, Pascovici D, Atwell B J *et al*, 2010. Differential metabolic response of cultured rice (*Oryza sativa*) cells exposed to high- and low-temperature stress. *Proteomics*, 10(16): 3001—3019
- Gu Y H, Zhang X, Lu N *et al*, 2012. Cloning and transcription analysis of *hsp70-1* and *hsp70-2* of *Gracilaria lemaneiformis* under heat shock. *Aquaculture*, 358—359: 284—291
- Henkel S K, Hofmann G E, 2008. Thermal ecophysiology of gametophytes cultured from invasive *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar in coastal California harbors. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 367(2): 164—173
- Jayakannan M, Bose J, Babourina O *et al*, 2015. The NPR1-dependent salicylic acid signalling pathway is pivotal for enhanced salt and oxidative stress tolerance in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 66(7): 1865—1875
- Koizumi S, Ohama N, Mizoi J *et al*, 2014. Functional analysis of the Hikeshi-like protein and its interaction with HSP70 in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 450(1): 396—400
- Lei T, Feng H, Sun X *et al*, 2010. The alternative pathway in cucumber seedlings under low temperature stress was enhanced by salicylic acid. *Plant Growth Regulation*, 60: 35—42
- 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. *Journal of Plant Physiology*, 177: 121—127
- Liu Z, Zhang L, Pu Y *et al*, 2014. Cloning and expression of a cytosolic HSP90 gene in *Chlorella vulgaris*. *BioMed Research International*, 2014: 487050, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/487050>
- Pan Q, Zhan J, Liu H *et al*, 2006. Salicylic acid synthesized by benzoic acid 2-hydroxylase participates in the development of thermotolerance in pea plants. *Plant Science*, 171(2): 226—233
- Qu A L, Ding Y F, Jiang Q *et al*, 2013. Molecular mechanisms of the plant heat stress response. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 432(2): 203—207
- Shingaki-Wells R N, Huang S, Taylor N L *et al*, 2011. Differential molecular responses of rice and wheat coleoptiles to anoxia reveal novel metabolic adaptations in amino acid metabolism for tissue tolerance. *Plant Physiology*, 156(4): 1706—1724
- Snyman M, Cronjé M J, 2008. Modulation of heat shock factors accompanies salicylic acid-mediated potentiation of HSP70 in tomato seedlings. *Journal of Experimental Botany*, 59(8): 2125—2132
- Suzuki H, Takashima Y, Ishiguri F *et al*, 2014. Proteomic analysis of responsive proteins induced in Japanese birch plantlet treated with salicylic acid. *Proteomes*, 2(3): 323—340
- Tominaga H, Coury D A, Amano H *et al*, 2010. Isolation and characterization of a cDNA encoding a heat shock protein 70 from a sterile mutant of *Ulva pertusa* (Ulvales, Chlorophyta). *Ecotoxicology*, 19(3): 577—588
- Timperio A M, Egidi M G, Zolla L, 2008. Proteomics applied on plant abiotic stresses: role of heat shock proteins (HSP). *Journal of Proteomics*, 71(4): 391—411
- Wang Y T, Huang H Y, Tsai M A *et al*, 2014. Phosphoglycerate kinase enhanced immunity of the whole cell of *Streptococcus agalactiae* in tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 41(2): 250—259
- Wang Y X, Sun Y, Tian Y C *et al*, 2009. Cloning and expressing of putative enolase gene from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Cotton Science*, 21(4): 275—278
- Zhang X, Li J, Liu A *et al*, 2012. Expression profile in rice panicle: insights into heat response mechanism at reproductive stage. *PLoS One*, 7(11): e49652

EFFECTS OF SALICYLIC ACID ON GROWTH AND STRESS-RELATED GENES OF *CHLORELLA PYRENOIDOSA*

DING Cong-Cong^{1,2}, XU Nian-Jun^{1,2}, ZHANG Lin^{1,2}, SUN Xue^{1,2}, LI Ya-He^{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 We cloned heat shock protein 70 (*HSP70*) and phosphoglycerate kinase (*PGK*) genes, and identified the effects of 0—20.0 μg/mL salicylic acid on the gene expression of *HSP70* and *PGK*, algal growth, soluble sugar and protein contents of *Chlorella pyrenoidosa* under high temperature stress. In this study, we obtained a 2405-bp *HSP70* cDNA sequence containing a 60-bp 5'-untranslated region (UTR), a 1959-bp open reading frame (ORF), and a 386-bp 3'-UTR; and a 1664-bp *PGK* cDNA sequence containing a 35-bp 5'-UTR, 1398-bp ORF, and 231-bp 3'-UTR. Sequence comparison and analysis showed that the homology of *HSP70* reached 83%—91% with other green algae, and that of *PGK* was 70%—75%; both are highly conserved. RT-qPCR showed that with increase in salicylic acid concentration, both expression levels of *HSP70* and *PGK* increased at 12h and 24h, maximum in 10 μg/mL salicylic acid. Compared to the control, the expression levels of *HSP70* and *PGK* in 10 μg/mL salicylic acid group at 12h exhibited 2.57-fold and 1.56-fold increase, and 1.71-fold and 1.79-fold at 24h, respectively. Salicylic acid in 1—20 μg/mL concentrations could improve the algal specific growth rate, soluble sugar and protein contents. Therefore, salicylic acid in a certain concentrations could alleviate high temperature stress, and the best results were observed in 5 and 10 μg/mL concentrations.

Key words *Chlorella pyrenoidosa*; salicylic acid; *HSP70*; phosphoglycerate kinase (*PGK*); high temperature stress