

文章编号: 1000-0615(2016)06-0956-09

DOI: 10.11964/jfc.20150910055

不同生长阶段的坛紫菜对琼胶寡糖激发的响应差异研究

孙闪闪, 缪杭斌, 朱正刚, 陈海敏, 朱竹君, 严小军, 朱鹏*

(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: 为研究不同生长阶段的坛紫菜对琼胶寡糖激发子的抗性响应差异, 选择生长期为50、60、80、110和140 d的坛紫菜叶状体以及自由丝状体, 检测在琼胶寡糖刺激后各生长阶段坛紫菜的 H_2O_2 释放, 相关防御基因(*Phhsp70*、*Phrboh*、*Phsod*、*Phlox*)的表达, 以及挥发性物质的变化。结果显示, 丝状体 H_2O_2 的释放量显著高于叶状体, 100 $\mu\text{g/mL}$ 琼胶寡糖可诱导不同时期坛紫菜的 H_2O_2 爆发。丝状体响应琼胶寡糖刺激后, 4个防御相关基因出现显著上调, 而叶状体各生长阶段的基因上调幅度较小, 各基因变化趋势不同。挥发性物质的种类及含量在不同生长阶段不同, 但C8类物质较多。经寡糖处理后, 80 d叶状体和丝状体时期的挥发性物质增加的种类较多。研究表明, 不同生长阶段的坛紫菜对琼胶寡糖刺激的响应能力和方式不同, 以丝状体的响应最强烈。

关键词: 坛紫菜; 琼胶寡糖; H_2O_2 ; 防御相关基因; 挥发性物质

中图分类号: S 968.4

文献标志码: A

坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)是中国特有的物种, 主要分布于浙江、广东、福建等南方海域, 是我国重要的经济海藻之一, 也是中国产量最高的紫菜养殖种类^[1]。坛紫菜的生长周期包括叶状体和丝状体2种形态各异的时期, 丝状体时期藻体处于夏季休眠阶段, 具有较强的环境适应性^[2]。坛紫菜的养殖一般是从当年的九月开始到来年的二月结束, 十月份之前坛紫菜处于生活周期的幼年时期; 十一月份其生长状态最佳; 自十二月份以后进入衰老阶段, 藻体生长状态下滑。

坛紫菜生活在开放的海域, 难免受到外界环境的影响^[3]。藻类如同高等动植物一样, 在应对胁迫时也会作出各种反应。比如在高温胁迫时, 坛紫菜会出现活性氧爆发、膜系统受损、抗氧化系统启动等现象^[4]。在干出胁迫时, 坛紫菜中的红藻糖苷的含量会显著上升, 其相关的合成基因也启动表达^[5]。琼胶寡糖是坛紫菜的内源激发子, 在琼胶寡糖刺激下, 坛紫菜叶状体

也会出现活性氧爆发、挥发性物质增高、抗性基因上调表达等反应^[6]。

那么坛紫菜在不同的生长阶段, 其防御水平和方式是否存在差异? Luo等^[7]发现, 丝状体具有更强的防护机制, 而叶状体则表现出典型的抗性反应。琼胶寡糖野外处理坛紫菜叶状体和壳孢子放散时, 发现壳孢子放散阶段诱导的效果比较好^[8], 说明坛紫菜不同时期响应外界刺激的反应是不同的。近年来, 尽管对坛紫菜胁迫响应的报道较多, 但基本都局限于叶状体的某一个生长阶段的抗性研究, 观察不到不同时期的响应差异。因此, 本研究拟选择琼胶寡糖作为坛紫菜的抗性激发子, 观察坛紫菜在叶状体的幼、中、老年时期和丝状体时期, 响应琼胶寡糖刺激的抗性反应差异, 从而初步探索坛紫菜的免疫防御规律, 并为坛紫菜在养殖时期, 选择使用琼胶寡糖作为免疫激发子的时机提供理论借鉴。

收稿日期: 2015-09-1 修回日期: 2016-02-04

资助项目: 宁波市创新团队(2011B81007); 浙江省重大科技专项(2012C12907-6); 国家公益性行业(海洋)科研专项(201105023; 201505033)

通信作者: 朱鹏, E-mail: zhupeng@nbu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

坛紫菜叶状体(“浙东1号”), 2013年采自浙江省象山县坛紫菜养殖场, 采集时间分别为生长50 d(当年的10月20日), 60 d(10月30日), 80 d(11月20日), 110 d(12月19日)和140 d(来年的1月19日)。采集期间, 坛紫菜正常收割。采集后经阴干, 置于-20 °C下保存。实验前, 先用无菌海水清洗2~3次, 再以0.7% KI(w/v)处理5~10 min, 20 °C活化24~48 h。

“浙东1号”的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, 在(20±1)°C和140 μmol photons×m⁻²/s(光周期L: D=12 h: 12 h)条件下用人工海水培养, 每周更换新的培养液。

琼胶寡糖由本实验室自制, 聚合度在2~12^[9]。

1.2 坛紫菜释放H₂O₂检测

以含100 μg/mL 琼胶寡糖的海水培养液处理不同生长阶段的坛紫菜1 h(培养密度为7 mg/mL)。各时间点取培养液, 添加对羟基苯乙酸(POHPAA)混合剂(6.13 μmol/L POHPAA, 276.9 U/L过氧化物酶, 8.6 mmol/L Tris-HCl, pH=8.8), 避光反应35 min后检测吸光值(ex=313 nm, em=400 nm)^[10]。

1.3 荧光定量PCR分析

不同生长阶段的坛紫菜分别经100 μg/mL琼胶寡糖处理45 min后采集样品, 提取总RNA, 反转成cDNA后, 利用定量PCR法测定*Phhsp70*、*Phlox*、*Phrboh*和*Phsod*的表达变化。*Phrboh*的正向引物: 5'-TGCCGCTCAAGACGACCTA-3', 反向引物: 5'-CACCCACCACAGACCCAGA-3', 扩增90 bp片段; *Phsod*正向引物: 5'-GCTGATGGAGGGCATTGTC-3', 反向引物: 5'-CGGTGTA GTTCTTGGCAATGA-3', 扩增158 bp片段; *Phhsp70*正向引物: 5'-GTGGAGATGACTTTTGACCAACA-3', 反向引物: 5'-GCTTGGGACCATCTTGTGTAG-3', 扩增201 bp片段; *Phlox*定量正向引物: 5'-TGCCCCACTTCGCCGACACC-3', 反向引物: 5'-GCCGCCGAGAAGACGTCCATCC-3', 扩增130 bp片段; 以*Ph18S*为参照基因, 正向引物: 5'-AGTTAGGGGATCGAAGACGA-3', 反向引物: 5'-CAGCCTTGCGACCATACTC-3', 扩增153 bp。将上述所得的cDNA作为模板, 利用takara SYBR Premix Ex Taq™ II(Perfect Real Time)(Takara, China)进行荧光定量PCR检测, 所有基因采用同

一扩增程序: 95 °C 15 s, 55 °C 20 s, 72 °C 10 s, 共40个循环。用2^{ΔΔCt}法进行结果分析。

1.4 挥发性成分分析

100 μg/mL琼胶寡糖处理坛紫菜后, 在0和60 min时采集叶片, 液氮研磨, 添加内标物香草醛, 置于15 mL SPME顶空瓶中, 75 μm Carboxen-PDMS/DVB萃取头(美国Supelco公司)老化后插入顶空瓶中, 40 °C搅拌萃取50 min, 25 °C平衡吸附20 min, 取出萃取头立即插入进样口, 脱吸附5 min, GC-MS(日本SHIMADZU公司)分析。

GC条件: 采用Vocol毛细管柱(60 m×0.32 mm×1.8 μm, 美国Supelco公司), 进样口温度210 °C, 载气为99.999%的高纯氮, 柱流速2.0 mL/min, 柱起始温度35 °C保持3 min, 以3 °C/min升至40 °C, 保持1 min, 再以5 °C/min升至210 °C, 保持25 min。

MS条件: 电子轰击(electron impact, EI)源分析, 能量为70 eV, 离子源温度200 °C, 接口温度210 °C。质量扫描范围为m/z 45~1000。数据根据NIST 147及WILEY 7谱库检索, 以标准图谱为基础, 进行化合物的定性, 利用峰面积归一法计算峰面积, 使用香草醛为内参, 根据内标法得到挥发性物质的含量。

利用主成分分析(PCA)软件SIMCA-P⁺(V.12.0, Umetrics AB公司, 瑞典)分析不同阶段坛紫菜的挥发性物质差异。

1.5 数据分析

数据以平均数±标准差(mean±SD)表示, n=3。数据利用SPSS (11.5)LSD多重比较分析, 当组间差异P<0.05时认为有差异显著。

2 结果

2.1 不同阶段坛紫菜受琼胶寡糖刺激的H₂O₂响应

对比0 min(即未受琼胶寡糖刺激)时5个时期的叶状体和丝状体的H₂O₂释放情况(表1), 发现丝状体的H₂O₂释放量远远高于叶状体时期, 达到5倍以上(P<0.01), 而不同时期的叶状体的释放量也有所差异, 随养殖时间延长, 释放量增加, 以养殖后期的140 d的含量最高, 50 d的幼紫菜含量最低。不同生长阶段的坛紫菜在100 μg/mL琼胶寡糖处理后, 都出现H₂O₂的爆发现象, 叶状体的爆发速度较快, 在5 min时迅速增高, 甚至出现高峰, 持续10 min, 各阶段差异不显著; 而丝状体的H₂O₂爆发较晚, 在10 min时出现高

表 1 琼胶寡糖刺激下不同时期坛紫菜释放H₂O₂含量的变化情况

Tab. 1 Differences of release of H₂O₂ in different stages of *P. haitanensis* induced by agaro-oligosaccharides

时间/min time	时期/d stage					
	50 d	60 d	80 d	110 d	140 d	丝状体 conchocelis
0	-4.03±8.7 ^{c4}	3.93±8.38 ^{bc23}	6.77±2.8 ^{bc4}	22.28±8.42 ^{bc3}	29.73±3.46 ^{b2}	152.18±0.47 ^{a1}
5	57.29±17.51 ^{a1}	60.93±12.18 ^{a12}	61.91±15.47 ^{a1}	71.74±15.02 ^{a1}	57.50±8.93 ^{a12}	167.59±10.07 ^{b1}
10	51.31±42.84 ^{a12}	69.85±11.55 ^{a1}	59.03±14.44 ^{a12}	75.61±11.36 ^{a1}	68.64±0.65 ^{a1}	221.05±44.78 ^{b1}
15	17.21±2.08 ^{a34}	37.90±5.5 ^{a123}	62.35±18.9 ^{a1}	55.72±18.53 ^{a12}	34.99±9.35 ^{a2}	209.45±81.69 ^{b1}
20	28.87±0.71 ^{a23}	24.68±2.46 ^{a3}	26.23±3.88 ^{a34}	40.64±12.99 ^{a23}	48.48±18.45 ^{a12}	186.91±20.49 ^{b1}
30	-2.39±3.8 ^{c4}	43.17±5.88 ^{b123}	33.59±16.06 ^{bc23}	25.76±9.61 ^{bc3}	44.32±15.17 ^{b2}	216.99±45.42 ^{a1}

注：不同肩标表示显著性差异，同一行的显著性差异用字母表示，相同字母表示没有差异性(P>0.05)，不同字母表示有显著性差异(P<0.05)；同一列显著性差异用数字表示，数字相同表示差异不显著(P>0.05)，不同数字表示有显著性差异(P<0.05)

Notes: Significant differences were expressed in different superscripts. The different small letter superscripts in the same line indicate a significant difference (P<0.05), the same letters indicate no significant differences (P>0.05). The different digits in the same column indicate a significant difference (P<0.05), the same digits indicate t no significant differences (P>0.05)

峰，增高幅度和持续时间与叶状体接近。

2.2 不同阶段坛紫菜响应琼胶寡糖应激的基因表达变化

琼胶寡糖刺激下，不同生长阶段的坛紫菜的

Phhsp70、*Phlox*、*Phrboh*和*Phsod* 4个基因的相对表达情况不同(图 1)，但总体而言，丝状体的响应最强烈，4个基因都出现显著上调，特别是*Phlox*的上调倍数达到(166.06±56.52)倍(P<0.01)，*Phhsp70*和*Phsod*也出现极显著上调，分别上调

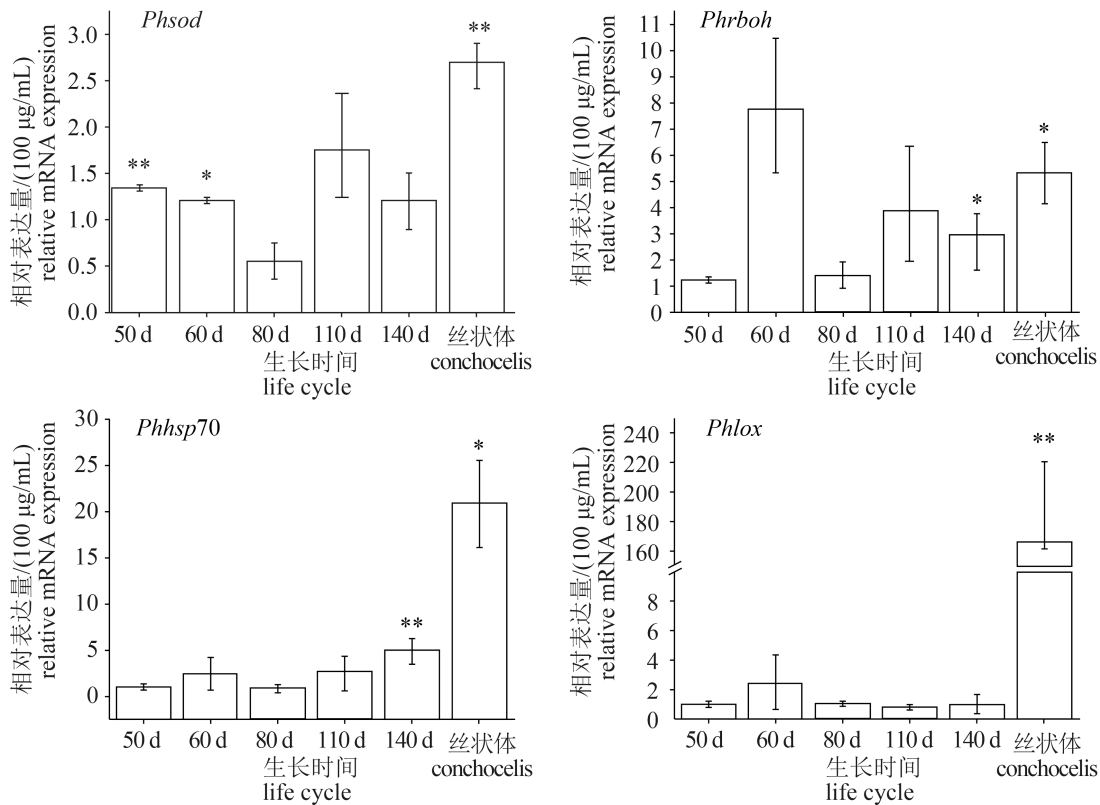


图 1 琼胶寡糖刺激下不同生长阶段的坛紫菜基因的相对表达情况

*P<0.05, **P<0.01 (n=3), 与 0 min 相比

Fig. 1 The relative expression levels of four genes of *P. haitanensis* at different stages after being treated with agaro-oligosaccharides

*P<0.05, **P<0.01 (n=3), compared with the expression of 0 min

(20.89±4.67)倍($P<0.01$)和(2.70±0.21)倍($P<0.01$)。而5个不同时期的叶状体的各基因上调倍数都较小, 且没有与养殖周期形成有关的规律性, 其中80d养殖期的4个基因的变化幅度最小, *Phhsp70*和*Phlox*的转录几乎未变, 甚至*Phsod*出现下调1.82倍的现象; 而养殖后期的140d的老紫菜的*Phhsp70*和*Phrboh*却出现显著上调现象, 分别上调(4.94±1.25)倍($P<0.01$)和(2.95±0.81)倍($P<0.05$)。另外, 60d养殖期的坛紫菜各基因的上调倍数也较大, 比如*Phrboh*上调(7.77±2.69)倍, 但没有显著性。

2.3 不同生长阶段坛紫菜的挥发性成分分析

首先对未受琼胶寡糖处理的不同生长阶段的坛紫菜挥发性物质进行分析, 通过二维空间上的物质聚类分布的PCA得分图来分析样品间的相似或非相似性, 每个标注点代表一个时期的一个样品。丝状体时期的挥发性物质单独成簇, 与几个叶状体时期的物质明显分开, 说明二者的挥发性物质差异非常大(图2)。5个叶状体时期的挥发物互相间基本能分开, 并可以清楚地显示出样品与养殖时间密切相关的分布趋势(自右上至左下)。其中110d和140d的物质非常接近, 50d和60d的略靠近。

表2列出了50、80和110d叶状体和丝状体时

期的挥发性物质的情况。坛紫菜产生的挥发性物质主要为醛类、醇类、烷烃、酮类、脂肪酸甲酯等, 这些物质在4个时期的坛紫菜中都含有, 丝状体中略少, 110d的其次(表2)。从组成来看, 50d的叶状体中以醇和酮类物质的种类和含量较多, 醛类的也较多, 特别是2, 4-戊二烯醛达到(950.73±444.87) $\mu\text{g}/100\text{mg}$; 80d的叶状体中烷烃类物质的种类较多, 其中十七烷达到(544.87±385.91) $\mu\text{g}/100\text{mg}$; 110d的叶状体中酮类和烯烃的种类较多; 而丝状体的物质种类较分散, 各类物质都存在。另外, 坛紫菜的挥发性物质中的C8挥发性物质较多, 如2-辛烯醛、5-辛烯-1-醇、3-辛酮、1-辛烯-3-醇、2-辛烯-1-醇和3-辛醇等, 以丝状体和50d的叶状体中的种类最多, 而且, 丝状体中的C8挥发性物质含量高于叶状体。如丝状体中3-辛酮、1-辛烯-3-醇和2-辛烯-1-醇的含量都较高。

2.4 不同阶段坛紫菜响应琼胶寡糖刺激时的挥发性物质的变化差异

受琼胶寡糖刺激后, 各生长阶段的挥发性物质含量大部分呈下降趋势, 但有少量物质出现上升, 并且, 刺激之后各阶段均有不同种类的新的挥发性成分出现, 但出现的物质种类不同(表3)。80d叶状体和丝状体时期挥发性物质增

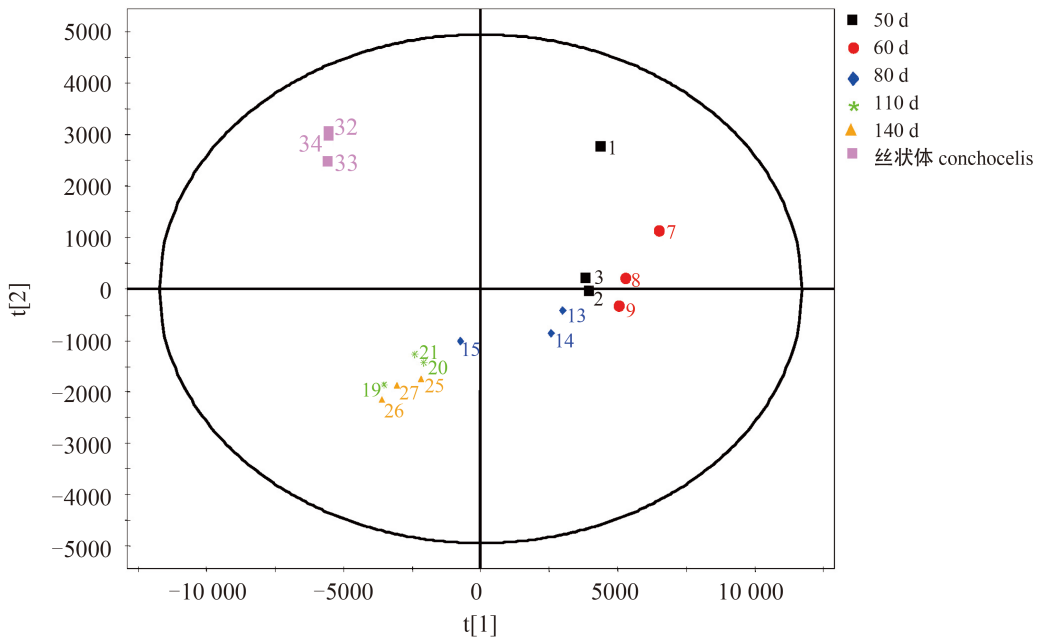


图2 不同生长阶段坛紫菜的挥发性物质的主成分分析图

Fig. 2 Principal component analysis (PCA) scores scatter plot for the volatiles at different growth stages of *P.haitanansis*

表 2 坛紫菜不同生长阶段叶状体中的挥发性物质

Tab. 2 Volatiles of conchocelis and thallus at different stages

μg/100 mg

挥发物 volatiles	50 d	80 d	110 d	丝状体 conchocelis
十六酸甲酯 methyl hexadecanoate	—	23.80±11.84	3.00±2.68	1.29±0.27
9-十二酸甲酯 methyl dodecanoate	2.93±1.38	—	—	—
辛酸甲酯 methyl dodecanoate	6.64±4.36	0.53±0.12	—	—
十四酸甲酯 methyl myristate	—	—	—	6.49±2.89
丁酸甲酯 methyl butyrate	—	0.831±0.556	4.478±4.594	—
壬醛 nonanal	4.13±2.02	1.23±0.61	0.91±0.66	1.47±0.25
2,4-戊二烯醛 2,4-pentadienal	950.73±444.87	2.67±1.80	3.17±3.80	—
2-辛醛 2-octanal	30.50±13.88	—	—	3.79±1.89
2-辛烯醛 2-octenal	—	3.56±1.74	—	4.21±2.05
4-戊烯醛 4-pentenal	—	0.969	—	—
十四醛 tetradecanal	—	5.814	—	—
十二醛 dodecyl aldehyde	—	—	3.960±4.235	—
顺-2-反-6-壬二烯醛 (E)-2,(Z)-6-nonadienal	—	2.121±0.871	—	—
5-辛烯-1-醇 5-octen-1-ol	16.07±10.48	—	18.81±0.00	—
1-十四醇 1-tetradecanol	12.13±0.87	—	1.15±0.57	4.93±5.81
2-乙基-1-己醇 2-ethyl-1-hexanol	33.80±11.62	—	—	—
2-辛烯-1-醇 2-octen-1-ol	20.64±4.84	11.84±4.49	—	31.72±23.70
1-辛烯-3-醇 1-octen-3-ol	39.56±7.08	15.11±7.78	10.97±10.64	56.30±46.31
1-十五醇 1-pentadecanol	1.99±0.52	—	—	—
3-辛醇 3-octanol	—	—	—	9.55±10.05
5-甲基-5-庚烯-3-酮 5-methyl-5-hepten-3-one	45.79±26.33	—	20.86±16.17	—
3-辛酮 3-octanone	53.74±17.53	33.97±10.85	27.01±23.08	56.92±41.10
3-戊酮 3-pentanone	—	—	1.608±1.549	—
1-十五烯 1-pentadecene	—	—	2.16±0.00	40.23±10.20
8-十七烯 8-heptadecene	1.03±0.00	—	152.35±127.89	19.97±10.25
1-十三烯 1-tridecene	—	3.298±3.716	—	—
十五烷 pentadecane	10.48±6.16	1.55±0.01	0.46±0.00	—
十四烷 tetradecane	0.85±0.02	—	—	—
十七烷 heptadecane	—	544.87±385.91	—	26.30±9.65
十一烷 undecane	—	11.653±0.914	—	—
十八烷 octadecane	—	3.761±0.744	—	—
十二烷 dodecane	—	5.126±5.908	—	—
1-十二烯基-3-炔 1-dodeceny-3-alkynyl	7.72±6.44	18.06±5.75	28.33±35.87	28.53±12.40

表 3 不同生长阶段坛紫菜在琼胶寡糖刺激下的挥发性物质变化
 Tab. 3 The changes of volatiles of different stages of *P. haitanensis* in responding to agaro-oligosaccharides $\mu\text{g}/100\text{ mg}$

挥发性物质 volatiles	50 d	60 d	80 d	110 d	140 d	丝状体 conchocelis
十六酸甲酯 methyl hexadecanoate	新增	0.14	0.72	0.51	2.22	2.49
9-十二酸甲酯 methyl dodecanoate	0.06	—	—	—	—	—
辛酸甲酯 methyl octanoate	0.98	—	0.92	—	0.28	0.92
己酸甲酯 methyl caproate	—	—	—	—	0.17	—
十四酸甲酯 methyl myristate	—	—	—	—	—	1.31
壬醛 nonanal	0.53	0.11	2.71	—	—	—
2-辛醛 2-octanal	0.33	1.20	—	—	—	0.95
2,4-戊二烯醛 2,4-pentadienal	0.11	1.12	1.79	—	—	1.23
2-辛烯醛 2-octenal	—	0.47	2.83	—	—	1.92
顺-2-反-6-壬二烯醛 (E)-2,(Z)-6-nonadienal	—	0.41	1.02	1.16	0.38	—
十四醛 tetradecanal	—	—	0.77	—	—	—
7-辛烯-4-醇 7-octen-4-ol	新增	—	—	—	—	—
2-辛烯-1-醇 2-octen-1-ol	0.69	0.97	1.76	新增	0.58	1.19
5-辛烯-1-醇 5-octen-1-ol	0.56	—	—	—	—	—
3,6-壬二烯-1-醇 3,6-Nonadien-1-ol	0.55	—	—	—	—	—
1,5-辛二烯-3-醇 1,5-octadien-3-ol	0.48	1.39	2.55	0.27	1.06	0.99
1-辛烯-3-醇 1-octen-3-ol	0.19	0.67	1.56	1.84	0.91	0.87
十一醇 undecanol	—	—	新增	—	—	—
9-十八烯-1-醇 9-octadecen-1-ol	—	—	—	—	2.77	—
2-戊烯-1-醇 2-penten-1-ol	—	—	—	—	0.36	—
3-辛醇 3-octanol	—	—	—	—	—	0.32
3-辛酮 3-octanone	0.61	1.21	6.61	0.00	0.75	1.23
5-甲基-5-庚烯-3-酮 5-methyl-5-hepten-3-one	0.00	1.15	—	—	—	—
1-戊烯-3-酮 ethylvinylketone	—	—	—	1.18	3.06	—
1-十五烯 1-pentadecene	3.29	0.00	—	—	—	0.77
8-十七烯 8-heptadecene	0.75	0.38	0.52	0.16	2.39	2.98
十五烷 pentadecane	0.65	0.00	1.61	—	—	—
十九烷 nonadecane	—	新增	—	—	—	—
十一烷 undecane	—	—	0.00	—	—	—
十二烷 dodecane	—	—	0.00	—	—	—
十七烷 heptadecane	—	—	—	—	0.80	0.19
1-十二烯基-3-炔 1-dodeceny-3-alkynyl	0.49	0.00	0.79	2.19	0.86	1.48

加的种类较多, 其中80 d叶状体的几种C8挥发性物质增加较多, 如2-辛烯醛、1, 5-辛二烯-3-醇和3-辛酮增加倍数都在2倍以上(2.83、2.55和6.61

倍); 丝状体中十六酸甲酯和8-十七烯增加倍数较多(2.49和2.98倍), 并且2-辛烯醛、3-辛酮等C8挥发性物质也有增加。50 d叶状体有2个新的

峰出现, 分别是十六酸甲酯和7-辛烯-4-醇, 另外, 十五烯增加3.29倍。

3 讨论

在紫菜的生活史中, 丝状体时期是耐受力最强的时期, 放散的果孢子钻入贝壳萌发成丝状体后将度过整个夏天, 经历高温、强光照的过程^[11], 因此这个时期应对环境胁迫必然有其特殊性; 而不同的叶状体时期, 由于成熟度不同、环境温度差异, 它们的胁迫响应方式和响应程度也有可能存在差异。本研究发现, 丝状体时期, H₂O₂的释放量是叶状体的5倍以上, 而挥发性物质组成与叶状体时期有很大差别, 说明高自由基水平和特殊的挥发性物质组成可能是丝状体应对高温、强光照胁迫的一种策略^[7]。

琼胶寡糖是坛紫菜的一种内源性激发子, 活性氧的爆发、抗性基因的表达以及挥发性物质的产生是其典型的响应方式, 因此琼胶寡糖具有诱导坛紫菜抗性反应的作用^[12]。在前期研究中, 我们曾将琼胶寡糖用于野外坛紫菜的养殖, 观察到在不同季节浸泡琼胶寡糖, 得到的效果有所差异, 壳孢子(丝状体)时期诱导效果最好^[8]。在本研究中, 我们观察到受琼胶寡糖刺激后, 在各检测指标中, 丝状体的变化均比较特殊, 其中H₂O₂在丝状体时期表现为释放时间延后, 但释放量总体上依然呈现上升趋势; 几个抗性基因都出现了显著的上调, 除坛紫菜的呼吸爆发氧化酶类似物基因(*Phrboh*)外, 其他3个基因的表达都远高于叶状体时期, 特别是脂氧合酶基因(*Phlox*)上调达(166.06±56.52)倍。脂氧合酶的活性与植物的抗性相关^[13], 在植物中它是茉莉酸合成途径中的重要酶类^[14]。之前的研究发现坛紫菜中的oxylipin途径与其他的藻类不同, 没有明显oxylipins的存在, 但检测到大量的单链挥发性物质^[12], 而很多烯醛、烯醇、烯酮类物质的来源是oxylipin途径, 其上游的关键酶就是脂氧合酶, 并且坛紫菜中二十碳脂肪酸的含量较高, 经脂氧合酶在12位断裂后, 会进一步代谢为C8的短链醛醇, 我们发现丝状体中的C8烯醛和烯醇的含量都较高, 经琼胶寡糖刺激后含量有所增加, 说明脂氧合酶在丝状体的抗性反应中必然起一定的作用。

对比叶状体时期, 其响应程度在不同时期存

在差异, H₂O₂的响应程度和时间在各时期差异不大; 各类抗性基因上调幅度也不大, 140 d叶状体的*Phhsp70*和*Phrboh*出现显著上调, 可能与它处于养殖末期, 藻体老化有关。60 d的叶状体的各个基因也有一定程度的上调, 考虑到它处于生长状态良好的时期, 可以作为琼胶寡糖适宜的应激时间, 来提高后面生长时期的生长质量。从挥发性物质变化来看, 80 d的释放种类增加较多, 这个时期是坛紫菜生长状态最好的时期, 挥发性物质的产生可能有助于其抵抗病原体, 增加抗性。

综上所述, 不同生长阶段的坛紫菜响应琼胶寡糖的方式各有特点, 相比之下, 丝状体对其具有更强的应激能力, 说明利用琼胶寡糖在丝状体时期刺激, 可能会产生较好的抗性效果; 而叶状体时期, 以生长状态良好的中前期的响应较强, 可以作为海上养殖的适宜应激时间。

参考文献:

- [1] 张学成, 秦松, 马家海, 等. 海藻遗传学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005.
Zhang X C, Qin S, Ma J H, *et al.* The genetics of marine algae[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2005 (in Chinese).
- [2] Asamizu E, Nakajima M, Kitade Y, *et al.* Comparison of RNA expression profiles between the two generations of *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta), based on expressed sequence Tag frequency analysis [J]. Journal of Phycology, 2003, 39(5): 923-930.
- [3] 闫咏, 马家海, 许璞, 等. 1株引起条纹紫菜绿斑病的柠檬假交替单胞菌[J]. 中国水产科学, 2002, 9(4): 353-358.
Yan Y, Ma J H, Xu P, *et al.* *Pseudoalteromonas citrea*, the causative agent of green-spot disease of *Porphyra yezoensis* [J]. Journal of Fishery of China, 2002, 9(4): 353-358 (in Chinese).
- [4] 张元, 谢潮添, 陈昌生, 等. 高温胁迫下坛紫菜叶状体的生理响应[J]. 水产学报, 2011, 35(3): 379-386.
Zhang Y, Xie C T, Chen C S, *et al.* Physiological responses of gametophytic blades of *Porphyra haitanensis* to rising temperature stresses [J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(3): 379-386 (in Chinese).
- [5] Qian F J, Luo Q J, Yang R, *et al.* The littoral red alga *Pyropia haitanensis* uses rapid accumulation of

- floridoside as the desiccation acclimation strategy [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2015, 27(1): 621-632.
- [6] 朱竹君, 陈海敏, 骆其君, 等. 琼胶寡糖诱导坛紫菜活性氧爆发[J]. *水产学报*, 2012, 36(6): 969-973.
- Zhu Z J, Chen H M, Luo Q J, *et al.* Oxidative burst in *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(6): 969-973 (in Chinese).
- [7] 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.
- [8] 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*, 2015, DOI: 10.1007/s10811-015-0734-y.
- [9] Chen H M, Zheng L, Lin W, *et al.* Product monitoring and quantitation of oligosaccharides composition in agar hydrolysates by precolumn labeling HPLC [J]. *Talanta*, 2004, 64(3): 773-777.
- [10] 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.
- [11] 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 mechanism of *Pyropia haitanensis* induced by stressed and lipid metabolism related gene [D]. Ningbo: Ningbo University, 2014 (in Chinese).
- [12] Wang X J, Chen H M, Chen J J, *et al.* Response of *Pyropia haitanensis* to agaro-oligosaccharides evidenced mainly by the activation of the eicosanoid pathway [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2013, 25(6): 1895-1902.
- [13] 张凤娟. 光肩星天牛对槭树挥发物的响应及虫害诱导信号物质研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2006.
- Zhang F J. Study on the response of *Anoplophora glabripennis* (Motschulsky) to the volatiles from maples and herbivore-induced signals [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2006 (in Chinese).
- [14] 王秀娟, 陈海敏, 严小军. 琼胶寡糖诱导菜豆活性氧相关防御及机理初探[J]. *中国生物防治学报*, 2011, 27(2): 254-259.
- Wang X J, Chen H M, Yan X J. Research on the mechanism of agaro-oligosaccharides induced reactive oxygen related defense response against kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2011, 27(2): 254-259 (in Chinese).

Study on the different responses of different growth stages of *Pyropia haitanensis* to agaro-oligosaccharides

SUN Shanshan, MIAO Hangbin, ZHU Zhenggang, CHEN Haimin,
ZHU Zhujun, YAN Xiaojun, ZHU Peng*

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

Abstract: Oligosaccharides could induce physiological responses of algae to defend attacks from pathogens. This study was designed to research the different responses of different growth stages of *Pyropia haitanensis* to agaro-oligosaccharide elicitor. Six growth stages including 50, 60, 80, 110 and 140 days *P. haitanensis* thallus and free-living conchocelis were selected to detect the release of hydrogen peroxide (H_2O_2) by (p-hydroxyphenyl) acetic acid fluorometric method, expression of defense related genes (*Phhsp70*, *Phrboh*, *Phsod*, *Phlox*) by real-time quantitative RT-PCR, and volatiles changes by GC-MS after being elicited with agaro-oligosaccharides. The results showed that, without treatment with agaro-oligosaccharides, free-living conchocelis contains significantly higher levels of hydrogen peroxide and fatty-derived volatiles than those of the thallus. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ agaro-oligosaccharides can induce the quick outbreak of H_2O_2 of different growth stages of *P. haitanensis*, and thallus responded faster than conchocelis. Four defense-related genes were significantly up-regulated in conchocelis, such as *Phlox* was up-regulated 166.06 ± 56.52 folds, while the genes of thallus at different growth stages exhibited a slight extent of up-regulation, moreover, the changes of these genes had variation trend at different stages. The composition and contents of volatile substances varied with different growth stages, but the 8-carbon volatiles predominated, such as 2-octenal, 5-octen-1-ol, 2-octen-1-ol and 1-octen-3-ol, etc. By using PCA method, the profiles of volatiles of thallus and conchocelis could be separated clearly, indicating an obvious difference in the profiles of volatiles between them. After being stimulated with agaro-oligosaccharides, some new volatiles in 80 d thallus and conchocelis were generated, and some 8-carbon volatiles were increased significantly. Overall, these results indicated that the different growth stages of *P. haitanensis* had different response modes to agaro-oligosaccharides, in which conchocelis responded most intensively.

Key words: *Pyropia haitanensis*; agaro-oligosaccharides; H_2O_2 ; defense-related genes; volatiles

Corresponding author: ZHU Peng. E-mail: zhupeng@nbu.edu.cn

Funding projects: Ningbo Innovation Team (2011B81007); Major Science and Technology Projects in Zhejiang Province (2012C12907-6); National Special Research Fund for Non-Profit Marine Sector (201105023, 201505033)