

## Flg22 诱导的海带孢子体防御反应初步研究

王莎莎, 魏晓娇, 路博钧, 王高歌\*

(中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

**摘要:** 以鞭毛蛋白 N 端一个保守的 22 个氨基酸多肽(fl22)为激发子, 研究其诱导海带孢子体防御反应的特征, 以丰富植物分子病理学理论。采用 Evans blue 染色方法发现, fl22 诱导后 2 h 内, 未能观察到海带孢子体细胞死亡现象, 诱导后 4~10 h, 观察到大量死亡的细胞。TUNEL(TdT-mediated dUTP-biotin nick and labeling)检测方法证实, 受 fl22 诱导后海带孢子体有 DNA 断裂现象, 而且 3'-OH 末端断裂的数量随诱导时间的延长而增多, 并有从诱导部位向外扩散的趋势。运用 Luminol 荧光检测方法检测到受 fl22 诱导后海带孢子体 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 释放量迅速增加, 至 3 h 时达到峰值, 约为 20 μmol/L。应用荧光染料 2',7'-二氢二氯荧光黄双乙酸钠(DCFH-DA)进行 ROS 组织学检测, 发现 fl22 诱导后 1 h 即观察到绿色的荧光信号, 信号强度随诱导时间的延长而增加, 诱导后 3 h 信号最强, 随后绿色荧光信号的强度逐渐减弱。ROS 的产生趋势与 Luminol 荧光检测方法的结果相一致。结果表明, fl22 也是诱导海带孢子体防御反应的有效激发子。

**关键词:** 海带; fl22; 激发子; 防御反应

**中图分类号:** Q 942; S 917.3

**文献标志码:** A

在长期的生物进化过程中, 藻类与高等植物一样, 形成了自身有效的防御机制来抵御外界病原物的侵染<sup>[1-2]</sup>。研究表明, 激发子可以诱导藻类产生一系列防御反应。藻类的激发子分为内源激发子和外源激发子。内源激发子来源于宿主, 如寡聚胶质多糖, 是由病原体分泌的胶质酶水解宿主细胞壁而产生的<sup>[3]</sup>。外源激发子是由病原体合成, 如病原体外膜及细胞壁的组成成分<sup>[4-5]</sup>或胞外分泌物<sup>[6]</sup>。内源激发子寡糖诱导的防御反应在红藻江蓠(*Gracilaria conferta*)和褐藻掌状海带(*Laminaria digitata*)都有报道。Weinberger 等<sup>[7-8]</sup>发现来自江蓠细胞壁的寡糖可诱导爆发式呼吸氧的产生及超敏反应, 其中十二糖和十六糖是活性成分, 表明寡糖是江蓠的激发子。褐藻多糖多聚 α-1,4-L-古洛糖醛酸是海带细胞壁的主要成份之一, Küpper 等<sup>[9]</sup>报道了多聚 α-1,4-L-古洛糖醛酸可诱导掌状海带产生爆

发式呼吸氧, 说明褐藻多糖可诱导海带产生防御反应。除了上述内源激发子外, 藻类也能识别外源激发子, 如微生物相关分子模式(microbe-associated molecular patterns, MAMPs), 从而引发防御反应。Bouarab 等<sup>[10]</sup>报道红藻皱波角叉菜(*Chondrus crispus*)的内生绿藻(*Acrochaete operculata*)的细胞提取物可诱导其产生爆发式呼吸氧。Weinberger 等<sup>[11]</sup>发现从琼脂降解菌 *Flavobacterium-Cytophaga* 1A 中分离纯化的一个低分子量(700~1 500 u)的多肽是江蓠的激发子, 但没有得到具体的序列。Küpper 等<sup>[12]</sup>报道来源于细菌 *Salmonella arboratus equi* 的脂多糖(LPS)作为激发子可诱导掌状海带产生爆发式呼吸氧。

MAMPs 是病原体生长所必需, 结构恒定且进化保守的一些分子, 如真菌中细胞膜和细胞壁的组成成份几丁质和麦角固醇; 细菌运动器官鞭毛

收稿日期: 2011-11-30 修回日期: 2012-09-03

资助项目: 国家教育部回国人员科研启动基金资助[2010]-1561; 山东省自然科学基金(Y2007D42); 青岛市科委课题[12-1-4-1-(4)-jch]; 中国海洋大学“国家大学生创新训练项目”(201210423048)

通讯作者: 王高歌, E-mail: wgaoge@ouc.edu.cn

的主要组分鞭毛蛋白; 细菌细胞膜中的脂多糖(LPS)等<sup>[13-14]</sup>。现已证实, 细菌鞭毛蛋白是高等植物的有效外源激发子, 也是目前研究的热点问题。来源于不同病原菌的鞭毛蛋白 N 端和 C 端比较保守, 中间部分为可变区<sup>[15]</sup>。鞭毛蛋白 N 端保守的 22 个氨基酸的多肽(flgl22), 是其作为激发子的活性位点, 可诱导高等植物产生防御反应。受鞭毛蛋白或 flgl22 诱导后, 拟南芥细胞产生乙烯<sup>[16]</sup>, 胼胝体沉积、生长抑制, 活性氧爆发, 以及大量防御相关基因的表达<sup>[17-18]</sup>。鞭毛蛋白或 flgl22 能够诱导烟草和番茄细胞的碱化反应, 活性氧的爆发以及乙烯的生物合成<sup>[16,19]</sup>。另外, 来源于水稻不相容的燕麦假单胞菌(*Pseudomonas avenae*)的鞭毛蛋白能诱导水稻细胞出现超敏反应的细胞死亡以及防御相关基因 *EL2* 的表达<sup>[20]</sup>。进一步研究表明, 在拟南芥及烟草和番茄中存在 flgl22 的受体蛋白<sup>[21-23]</sup>。但目前低等藻类中未见鞭毛蛋白诱导藻类产生防御反应的相关报道。

与高等植物相比, 目前很难建立“藻类—病原菌”互作的实验模型, 因为从病烂海藻中分离出来的病原菌均为条件致病菌, 而且在实验室条件下培养, 容易失去致病性, 很难进行重复性实验。在我们之前的研究中, 麦氏交替单胞菌(*Alteromonas macleodii*)被认为是导致海带孔烂病的致病菌<sup>[24]</sup>。我们的研究表明: 麦氏交替单胞菌与培养其的菌液混合, 可以成功地感染海带孢子体, 而单独使用麦氏交替单胞菌则不能感染海带孢子体(未发表的数据)。这表明在培养的过程中, 麦氏交替单胞菌有可能分泌一些致病因子到培养基中, 而真正使海带染病的正是这些致病因子。细菌鞭毛蛋白在构建鞭毛时被大量地分泌到周围环境中, 海带致病菌麦氏交替单胞菌在组装其鞭毛的过程中也可能分泌鞭毛蛋白到培养基中, 这种鞭毛蛋白也可能是海带染病的致病因子。根据鞭毛蛋白和 flgl22 是高等植物的有效激发子的事实, 本实验以 flgl22 为激发子, 研究 flgl22 诱导的海带孢子体防御反应特征, 以解析海带防御反应的机制, 丰富植物分子病理学的理论, 并为海带抗病新品系的繁育提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

海带(*Saccharina japonica*)小孢子体采于山东省青岛市 8 号码头。flgl22 由生物工程(上海)有限公

司合成。称取 4.5 mg flgl22 多肽溶解在 4 mL 0.1% 牛血清蛋白(BSA)的无菌海水中, 配制成 500  $\mu\text{mol/L}$  的 flgl22 溶液。

### 1.2 flgl22 诱导处理

取健康的海带小孢子体的边缘部, 置于盛有灭菌海水的培养皿中, 用无菌棉球反复擦洗藻体表面。然后用灭菌刀片将孢子体切割成小块(1.0 cm $\times$ 1.0 cm), 并在海带块上划 0.4~0.5 cm 长的刀口, 然后将 50  $\mu\text{L}$  flgl22 工作液(终浓度为 500  $\mu\text{mol/L}$ )注入海带刀口处, 置于光照培养箱中培养。培养温度(15 $\pm$ 1)  $^{\circ}\text{C}$ , 光照强度 20  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 。诱导过程中每隔一段时间取样, 测定各指标的变化。设两组对照, 对照组 1 加入 50  $\mu\text{L}$  无菌海水, 对照组 2 加入 50  $\mu\text{L}$  0.1% BSA 的无菌海水。每个实验 3 次重复。

### 1.3 flgl22 诱导组织中细胞死亡的检测

用无菌海水冲洗受 flgl22 诱导的海带组织块, 然后放入含有 0.05% Evans blue 的无菌海水中, 室温条件下温浴 15 min, 再用无菌海水冲洗组织块上多余的 Evans blue 染料, 显微镜(Olympus, CX31-32C02, Japan)下观察细胞死亡现象。

### 1.4 TUNEL(TdT-mediated dUTP-biotin nick and labeling)检测

受诱导海带孢子体石蜡组织切片方法参照王高歌<sup>[25]</sup>的方法。TUNEL 检测步骤按照试剂盒(REF 11 684 795 910, In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Roche Applied Science, USA)说明书进行。荧光显微镜(E800, Nikon, Japan)下观察实验结果。激发波长 450~500 nm, 检测波长 515~565 nm。

### 1.5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的检测

将 100  $\mu\text{L}$  受 flgl22 处理的孢子体组织处理液加入 1 mL Ependorf 离心管, 分别依次加入 250  $\mu\text{L}$  13 mmol/L K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 和 100  $\mu\text{L}$  0.3 mmol/L Luminol 溶液, 用移液器迅速混匀该混合液, 立即放入荧光检测仪中检测瞬时荧光强度。用已知浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液绘制标准曲线。将海带孢子体测得的荧光强度和标准曲线比对, 得到 flgl22 诱导后海带孢子体释放的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。

### 1.6 ROS 的组织学检测

用无菌海水冲洗 flgl22 诱导的海带组织块, 然后放入 2 mL 含有 50  $\mu\text{mol/L}$  2',7'-二氢二氯荧光黄双乙酸钠(DCFH-DA, Sigma, USA)的无菌海水中,

室温条件下温浴 5 min, 再用无菌海水冲洗 2 次。荧光显微镜(BX51, Olympus, Japan)下观察 ROS 的产生情况。激发波长 450~500 nm, 检测波长 515~565 nm。

## 2 结果

### 2.1 受 flg22 诱导海带孢子体死亡细胞的检测

运用 Evans blue 染色方法, 受 flg22 诱导后海带孢子体在 2 h 内未观察到细胞死亡现象(图版 I-3); 诱导后 4~10 h, 可以观察到大量的 Evans blue 染色细胞, 表明有明显的细胞死亡现象(图版 I-4~7), 而对照组实验 10 h 后仍未观察到细胞死亡现象(图版 I-1,2)。

### 2.2 TUNEL 检测

运用 TUNEL 原位检测发现, flg22 诱导的海带孢子体部位有绿色荧光信号, 由 DNase I 原位消化的 TUNEL 阳性对照实验有大量的绿色荧光信号(图版 II-1), 而不含有末端转移酶的阴性对照则没有绿色荧光信号(图版 II-2)。flg22 诱导后 2~10 h, 绿色荧光信号随诱导时间的延长而增多(图版 II-5~14); 而且, 有从诱导部位向外扩散的趋势(图版 II-10~14)。上述结果说明 flg22 诱导后的海带孢子体组织中有 DNA 断裂的 3'-OH 末端产生。

### 2.3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的检测

Flg22 诱导后 1~3 h, 孢子体释放的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 随时间延长而迅速增加, 至 3 h 达到峰值, 约为 20 μmol/L。3 h 以后, 孢子体细胞产生的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 开始减少。诱导后 6 h, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 产生量几乎恢复到初始值。两组对照实验产生的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 均无明显升降变化, 一直保持在较低水平(图 1)。

### 2.4 ROS 的组织学检测

实验结果表明, flg22 诱导的海带孢子体组织中检测到 ROS 的产生。与对照相比(图版 III-2,3), 诱导后 1 h 即观察到绿色的荧光信号(图版 III-4); 而且, 诱导后 1~3 h, 绿色荧光信号的强度随诱导时间的延长而增加(图版 III-4~6)。诱导后 4~6 h, 绿色荧光信号的强度逐渐减弱(图版 III-7~9)。

## 3 讨论

### 3.1 Flg22 激发子的浓度

在高等植物中, flg22 激发子的浓度一般是 10 μmol/L<sup>[16-17]</sup>, 甚至 10 nmol/L 的 flg22 也能也激

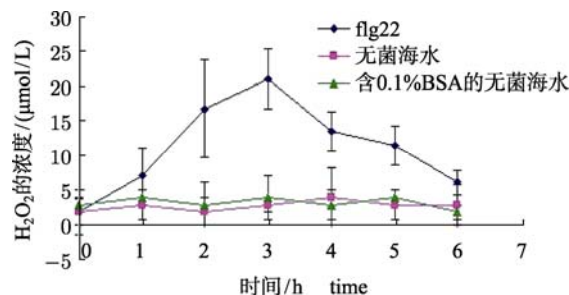
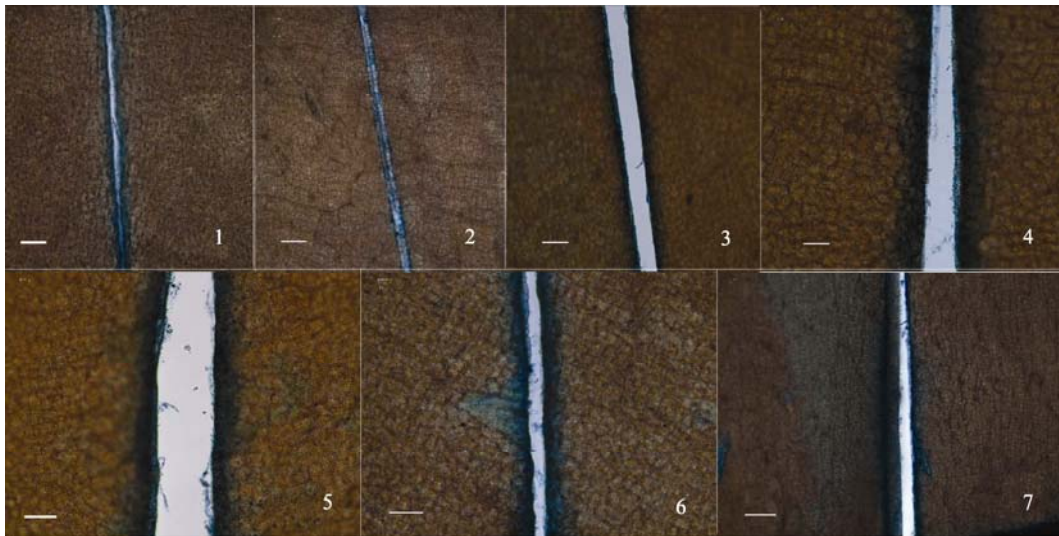


图 1 Flg22 诱导后海带孢子体释放的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
Fig. 1 Release of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in flg22-induced sporophytes of *S. japonica*

发防御反应<sup>[26]</sup>。本研究中 flg22 的浓度为 500 μmol/L, 明显高于高等植物中能够诱导细胞死亡的浓度。因此认为, 这与海带细胞壁的组成成分有关。海带细胞壁与高等植物细胞壁的化学组成成分存在明显的区别, 海带细胞壁含有褐藻胶、纤维素、半纤维素和果胶质, 本实验所用的海带孢子体处于脆嫩期, 这个时期叶片长度生长最快, 细胞壁中的褐藻胶及多种多糖含量增多, 细胞壁厚度也逐渐增加, 所以需要更高浓度的 flg22 才能诱导其产生防御反应。

### 3.2 TUNEL 检测

超敏反应细胞死亡是一种主动的程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD)过程<sup>[27]</sup>, PCD 过程中最显著的生化特征是 DNA 的降解。这种 DNA 的降解是由于内源性核酸内切酶被激活, 细胞自身的染色质或 DNA 被切割, 出现单链或双链缺口, 并产生与 DNA 断点数目相同的 3'-OH 末端, 可运用脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的原位缺口末端标记法(TdT-mediated dUTP-biotin nick and labeling, TUNEL)进行原位检测。凋亡的细胞中, 在脱氧核糖核苷酸末端转移酶(TdT)的作用下, 脱氧核糖核苷酸和荧光素形成的衍生物可被标记到 DNA 的 3'-OH 末端, 因而可在荧光显微镜下进行凋亡细胞的检测。而正常的或正在增殖的细胞几乎没有 DNA 的断裂, 因而没有 3'-OH 形成, 所以很少能够被标记。TUNEL 检测结果表明, flg22 诱导后 2~10 h, 海带孢子体组织中出现 DNA 断裂的 3'-OH 末端, 而且 3'-OH 断裂末端的量随诱导时间的延长而增多, 这与高等植物超敏反应中 PCD 的 DNA 断裂结果相似<sup>[28-29]</sup>, 说明海带孢子体在受 flg22 诱导后也存在 PCD 的 DNA 降解。Wang 等<sup>[30]</sup>在研究褐藻酸降解菌侵染海带孢子体(幼龄期)后

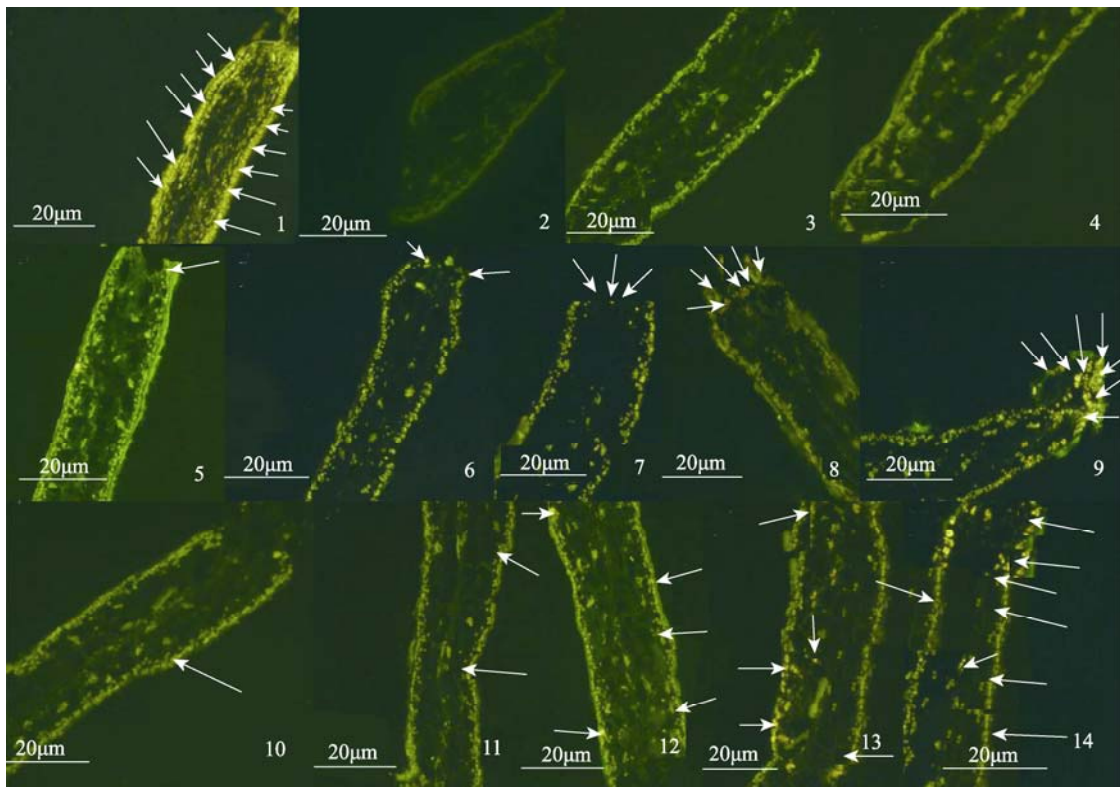


图版 I Flg22 诱导后海带孢子体 Evans blue 染色观察

1. 无菌海水对照实验; 2. 0.1%BSA 的无菌海水对照实验; 3~7. flg22 诱导后 2 h, 4 h, 6 h, 8 h 和 10 h 的海带孢子体组织块。1~3.7. 50  $\mu\text{m}$ ; 4~6. 25  $\mu\text{m}$ 。

**Plate I The observation of Evans blue dye in flg22-induced sporophytes of *S. japonica***

1. Control experiment treated with sterilized seawater; 2. Control experiment treated with sterilized seawater contained 0.1% BSA; 3-7. Sporophytes induced by flg22 at 2 h, 4 h, 6 h, 8 h and 10 h respectively. Scale bars: 1-3.7. 50  $\mu\text{m}$ ; 4-6. 25  $\mu\text{m}$ .



图版 II Flg22 诱导后海带孢子体的 TUNEL 检测结果

1. TUNEL 阳性对照实验, 显示 DNA 断裂的 3'-OH 末端; 2. TUNEL 阴性对照实验; 3. 无菌海水对照实验; 4. 含 0.1%BSA 的无菌海水对照实验; 5~14. flg22 诱导后 2 h(5, 10), 4h(6, 11), 6 h(7, 12), 8 h(8, 13) 和 10 h(9, 14) 的 TUNEL 检测结果。箭头表示 DNA 断裂的 3'-OH 末端。

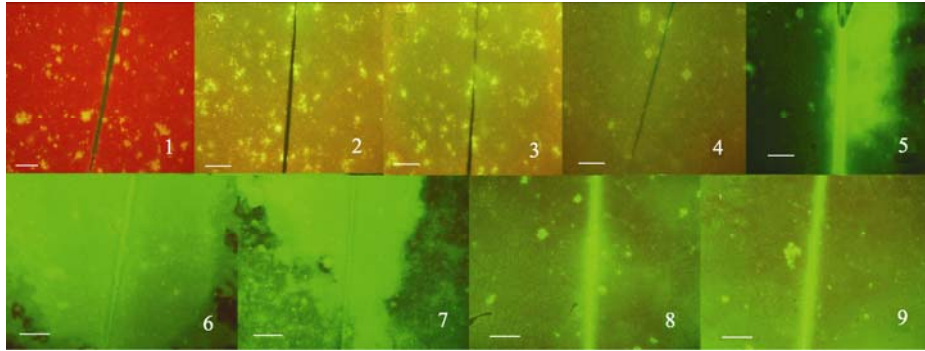
**Plate II The detection of TUNEL in flg22-induced sporophytes of *S. japonica***

1. TUNEL-positive control experiment, showing broken 3'-OH groups of DNA; 2. TUNEL-negative control experiment; 3. Control experiment treated with sterilized seawater; 4. Control experiment treated with sterilized seawater contained 0.1% BSA; 5-14. Results of TUNEL detection in flg22-induced sporophytes incubated at 2 h (5, 10), 4 h (6, 11), 6 h (7, 12), 8 h (8, 13) and 10 h (9, 14) respectively. Arrows show broken 3'-OH groups of DNA.



的 20~60 min, 也得到了相同的结果, 但 3'-OH 断裂末端出现的时间明显提前, 这可能与实验材料

有关, 本实验所用的海带孢子体(脆嫩期)与其相比更加成熟, 因此, 抗感染能力也会随之增强。



图版 III Flg22 诱导后海带孢子体产生 ROS 的组织学检测结果

**Plate III Fluorescence images of ROS production in flg22-induced sporophytes of *S. japonica***

1. 未用 2',7'-二氯二氧荧光黄双乙酸钠(DCFH-DA)处理的荧光显微照片; 2. 无菌海水对照实验; 3. 0.1% BSA 的无菌海水对照实验; 4-9. flg22 诱导后 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h 和 6 h 的组织学检测结果。1~4, 6~9. 50  $\mu\text{m}$ ; 5. 25  $\mu\text{m}$ 。

1. Fluorescence images of sporophytes without DCFH-DA; 2. Control experiment treated with sterilized seawater; 3. Control experiment treated with sterilized seawater contained 0.1% BSA; 4-9. Results of ROS histological detection in flg22-induced sporophytes incubated at 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h and 6 h respectively. Scale bars. 1-4, 6-9. 50  $\mu\text{m}$ , 5. 25  $\mu\text{m}$ .

### 3.3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的产生

在高等植物中, 当受到机械损伤或者病原体等外源激发子侵染后, 防御反应初期一个明显特征是释放大量的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。Weinberger 等<sup>[7]</sup>发现来自江蓠细胞壁的寡糖诱导江蓠 15 min 内即出现大量 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的释放, 这是因为结合在细胞膜上依赖 NAD(P)H 的氧化酶<sup>[31]</sup>或非原质体的超氧化酶<sup>[32]</sup>被激活, 从而导致分子氧化。Küpper 等<sup>[9]</sup>研究发现褐藻多糖多聚  $\alpha$ -1,4-L-古洛糖醛酸诱导掌状海带 5~10 min 内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 达到最大释放量, 之后 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度开始逐渐减少, 40~50 min 后回复到初始水平, 说明海带在氧化爆发过程中自身存在抗氧化作用, 海带细胞内的抗氧化酶的激活与海带的抗氧化机制有关。在本研究, flg22 诱导海带孢子体后 1~3 h, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的释放量即有明显的升高, 在 3 h 出现了峰值, 之后 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度开始逐渐减少。本实验结果与上述等研究结果相似<sup>[7,9]</sup>, 说明 flg22 能够诱导海带孢子体产生爆发式呼吸氧, 并且 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的大量产生出现在诱导的早期阶段, 这可能是因为海带孢子体组织可以识别 flg22, 从而启动防御反应, 激活某些氧化酶, 从而导致活性氧的产生。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度在诱导后 3 h 达到最大值, 之后 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度开始逐渐减少。我们推测: 一方面是海带中的抗氧化酶系统开始发挥作用以减轻过量的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对海带自生细胞的损伤;

另一方面可能是因为 flg22 诱导使海带因细胞结构完整性被破坏、细胞免疫防御能力降低, 从而无法产生足量的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。

在高等植物中, 活性氧在免疫防御反应的作用: 直接作为抗菌剂<sup>[33]</sup>, 促进寄主细胞壁结构的加厚<sup>[34]</sup>; 作为被侵染细胞过敏性坏死的局部触发信号<sup>[35-36]</sup>, 以及作为第二信使调控抗病相关基因的表达并启动植物抗毒素合成基因的转录<sup>[37]</sup>。在海藻中, 关于活性氧在免疫防御反应中的作用也被研究报道。Bouarab 等<sup>[10]</sup>发现, 皱波角叉菜的内生绿藻 *Acrochaete operculata* 的细胞提取物诱导其产生的活性氧, 增加了皱波角叉菜对其寄生毒性的抗性。Weinberger 等<sup>[11]</sup>指出, 寡糖诱导的江蓠产生的活性氧抑制了其表面附生菌的生长。Küpper 等<sup>[9,38]</sup>在海藻中也发现寡古洛糖醛酸诱导的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 能够控制其附生致病菌的生长, 并增加了海带对其内生褐藻绒状带绒藻(*Laminariocolax tomentosoides*) 感染的抗性。实验运用 Luminol 荧光检测方法, 发现 flg22 诱导后海带孢子体中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的水平明显提高, 组织学检测方法检测的 ROS 的产生趋势与 Luminol 荧光检测方法的结果一致。实验推测 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的大量产生可以增加海带自身抗性, 控制其表面附生致病菌的生长, 以及作为分子信号激活下游的一系列免疫防御反应, 在海带早期免疫防御反

应中起重要作用。

### 3.4 关于实验对照组的设计

牛血清白蛋白(BSA)是牛血清中的一种球蛋白,一般做为稳定剂被用于蛋白或多肽的保存溶液和反应液中,用来防止酶的分解和变性。加入 BSA 后,它可能起到“保护”或“载体”作用,能使蛋白或多肽活性大幅度提高。先前关于 flg22 诱导的高等植物防御反应的研究中,都利用 0.1% BSA 作为 flg22 稳定剂,以提高其活性<sup>[16-17]</sup>。因此,本研究也采用 0.1% BSA 的无菌海水稀释 flg22 贮存液,以提高 flg22 的活性,同时,设计了无菌海水和 0.1% BSA 无菌海水两组对照实验。实验结果表明,0.1% BSA 的无菌海水对照实验的结果与单独的无菌海水对照实验结果一致,无显著差异,也说明本研究所有结果都是由 flg22 诱导产生的。

### 参考文献:

- [1] Pohnert G. Chemical defense strategies of marine organisms[J]. Topics in Current Chemistry, 2004, 239: 179-219.
- [2] Cosse A, Leblanc C, Potin P. Dynamic defense of marine macroalgae against pathogens: from early activated to gene-regulated responses[J]. Advances in Botanical Research, 2007, 46: 221-266.
- [3] Nothnagel E A, Mcneil M, Albersheim P, et al. Host-pathogen interactions: XXII. A galacturonic acid oligosaccharide from plant cell walls elicits phytoalexins [J]. Plant Physiology, 1983, 71(4): 916-926.
- [4] Sharp J K, McNeil M, Albersheim P. The primary structure of one elicitor-active and seven elicitor-inactive hexa(beta-D-glucopyranosyl)-D-glucitols isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1984, 259(18): 11321-11336.
- [5] Baureithel K, Felix G, Boller T. Specific, high affinity binding of chitin fragments to tomato cells and membranes. Competitive inhibition of binding by derivatives of chitoooligosaccharides and a Nod factor of *Rhizobium*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1994, 269(27): 17931-17938.
- [6] Nürnberger T, Nennstiel D, Jabs T, et al. High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses[J]. Cell, 1994, 78(3): 449-460.
- [7] Weinberger F, Friedlander M, Hoppe H G. Oligogars elicit a physiological response in *Gracilaria conferta* (Rhodophyta)[J]. Journal of Phycology, 1999, 35(4): 747-755.
- [8] Weinberger F, Richard C, Kloareg B, et al. Structure-activity relationships of oligogars elicitors toward *Gracilaria conferta* (Rhodophyta)[J]. Journal of Phycology, 2001, 37(3): 418-426.
- [9] Küpper 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.
- [10] Bouarab K, Potin P, Correa J, et al. Sulfated oligosaccharides mediate the interaction between a marine red alga and its green algal pathogenic endophyte[J]. The Plant Cell, 1999, 11(9): 1635-1650.
- [11] Weinberger F, Friedlander M. Endogenous and exogenous elicitors of a hypersensitive response in *Gracilaria conferta* (Rhodophyta)[J]. Journal of Applied Phycology, 2000, 12(2): 139-145.
- [12] Küpper F C, Gaquerel E, Boneberg E M, et al. Early events in the perception of lipopolysaccharides in the brown alga *Laminaria digitata* include an oxidative burst and activation of fatty acid oxidation cascades[J]. Journal of Experimental Botany, 2006, 57(9): 1991-1999.
- [13] Nürnberger T, Brunner F, Kemmerling B, et al. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences[J]. Immunological Reviews, 2004, 198(1): 249-266.
- [14] Weinberger F. Pathogen-induced defense and innate immunity in macroalgae[J]. Biological Bulletin, 2007, 213(3): 290-302.
- [15] Schuster S C, Khan S. The bacterial flagellar motor[R]. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 1994, 23: 509-539.
- [16] Felix G, Duran J D, Volko S, et al. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin[J]. The Plant Journal, 1999, 18(3): 265-276.
- [17] Gómez-Gómez L, Felix G, Boller T. A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*[J]. The Plant Journal, 1999, 18(3): 277-284.
- [18] Zipfel C, Robatzek S, Navarro L, et al. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception[J]. Nature, 2004, 428(6984): 764-767.
- [19] Nguyen H P, Chakravarthy S, Velásquez A C, et al. Methods to study PAMP-triggered immunity using tomato and *Nicotiana benthamiana*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2010, 23(8): 991-999.
- [20] Che F S, Nakajima Y, Tanaka N, et al. Flagellin from an incompatible strain of *Pseudomonas avenae* induces a resistance response in cultured rice cells[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(41): 32347-32356.

- [21] Gómez-Gómez L, Boller T. FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*[J]. *Molecular Cell*, 2000, 5(6): 1003–1011.
- [22] Meindl T, Boller T, Felix G. The bacterial elicitor flagellin activates its receptor in tomato cells according to the address-message concept[J]. *The Plant Cell*, 2000, 12(9): 1783–1794.
- [23] Heese A, Hann D R, Gimenez-Ibanez S, *et al.* The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(29): 12217–12222.
- [24] Wang G G, Shuai L, Li Y, *et al.* Phylogenetic analysis of epiphytic marine bacteria on the hole-rotten diseased sporophytes of *Laminaria japonica*[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2008, 20(4): 403–409.
- [25] 王高歌. 海带抗病原菌侵染过程的机理研究[C]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2003.
- [26] Navarro L, Bari R, Achard P, *et al.* DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling[J]. *Current Biology*, 2008, 18(9): 650–655.
- [27] Mittler R, Lam E. Sacrifice in the face of foes: pathogen induced programmed cell death in plants[J]. *Trends in Microbiology*, 1996, 4(1): 10–15.
- [28] Levine A, Pennell R I, Alvarez M E, *et al.* Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response[J]. *Current Biology*, 1996, 6(4): 427–437.
- [29] Ryerson D E, Heath M C. Cleavage of nuclear DNA into oligonucleosomal fragments during cell death induced by fungal infection or by abiotic treatments[J]. *The Plant Cell*, 1996, 8(3): 393–402.
- [30] Wang G G, Lin W, Zhang L J, *et al.* Programmed cell death in *Laminaria japonica* (Phaeophyta) tissues infected with alginic acid decomposing bacterium[J]. *Progress in Natural Science*, 2004, 14(12): 1064–1068.
- [31] Doke N, Miura Y. *In vitro* activation of NADPH-dependent  $O_2^-$  generating system in a plasma membrane-rich fraction of potato tuber tissues by treatment with an elicitor from *Phytophthora infestans* or with digitonin[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1995, 46: 17–28.
- [32] Halliwell B. Lignin synthesis: the generation of hydrogen peroxide and superoxide by horseradish peroxidase and its stimulation by manganese (II) and phenols[J]. *Planta*, 1978, 140(1): 81–88.
- [33] Averyanov A A, Lapikova V P, Djawakhia V G. Active oxygen mediates heat-induced resistance of rice plant to blast disease[J]. *Plant Science*, 1993, 92(1): 27–34.
- [34] Brisson L F, Tenhaken R, Lamb C. Function of oxidative cross-linking of a plant cell wall proline rich protein: a novel rapid defense response[J]. *Cell*, 1992, 70(1): 21–30.
- [35] Adam A, Farkas T, Somlyai G, *et al.* Consequence of  $O_2^-$  generation during a bacterially induced hypersensitive reaction in tobacco: deterioration of membrane lipids[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1989, 34(1): 13–26.
- [36] Baker C J, Orlandi E W. Active oxygen in plant pathogenesis[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 1995, 33: 299–321.
- [37] Inzé D, Montagu M V. Oxidative stress in plants[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 1995, 6(2): 153–158.
- [38] Küpper F C, Müller D G, Peters A F, *et al.* Oligoalginate recognition and oxidative burst play a key role in natural and induced resistance of sporophytes of laminariales[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2002, 28(10): 2057–2081.

## Preliminary study on flg22-induced defense responses in sporophytes of *Saccharina japonica* (Phaeophyta)

WANG Sha-sha, WEI Xiao-jiao, LU Bo-jun, WANG Gao-ge\*

(College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** Flg22 is an N terminal 22 amino acid peptide of flagellin. Flg22-induced defense responses were investigated in sporophytes of *Saccharina japonica* in this study. Our results would enrich the theory of plant molecular pathology. The results of Evans blue dye showed that cell death in the sporophytes of *S. japonica* was not observed within 2 h after flg22 induction, whereas large amounts of cell death were observed from 4 to 10 h. By using TdT-mediated dUTP-biotin nick and labeling (TUNEL), fragments with 3'-OH groups of nuclear DNA were observed. The number of 3'-OH increased gradually with the induction time and spread from the induction sites. The concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> increased rapidly in flg22-induced sporophytes of *S. japonica*, with a peak of about 20 μmol/L at 3 h by using Luminol-dependent fluorescence detection method. Histological observation of radical oxygen species (ROS) production, detected by using the fluorescent dye 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), showed that green DCF fluorescence intensity increased gradually with the induction time, reaching the highest level at 3 h, then decreased from 3 to 5 h. The histological observation showed a consistent result with that of quantitative analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The results indicate flg22 is an effective elicitor which could induce defense responses in sporophytes of *S. japonica*.

**Key words:** *Saccharina japonica*; flg22; elicitor; defense response

**Corresponding author:** WANG Gao-ge. E-mail: wgaoge@ouc.edu.cn