

24-表油菜素内酯对海洋红藻龙须菜琼胶合成及其相关基因表达的影响

汤小彬^{1,2}, 徐年军^{1,2*}, 孙 雪^{1,2}, 李亚鹤^{1,2}, 张 琳^{1,2}

(1. 宁波大学应用海洋生物技术教育部重点实验室,浙江 宁波 315211;

2. 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: 为了探讨外源 24-表油菜素内酯(24-epiBL)对不同温度下龙须菜生长及琼胶含量的影响,并揭示琼胶含量与葡萄糖磷酸变位酶基因(*pgm*)和甘露糖磷酸变位酶基因(*pmm*)表达量之间的关系,研究了不同浓度 24-epiBL 对 3 种温度培养条件下龙须菜的生长、琼胶含量及 2 种琼胶合成相关基因表达的影响。结果显示在 15 和 31 °C 培养时,添加 0.1 mg/L 的 24-epiBL 时龙须菜相对生长速率最高,分别为 9.22%/d 和 11.73%/d;而在 25 °C 培养时,0.5 mg/L 的 24-epiBL 对龙须菜生长促进作用最强,相对生长速率为 14.98%/d;在 15 °C 培养时,0.5 mg/L 的 24-epiBL 添加后琼胶含量最高,为 7.76%;而 25 和 31 °C 时则是 1.0 mg/L 的 24-epiBL 添加后琼胶含量最高,分别为 9.82% 和 6.60%。本研究还扩增得到了分别编码 585 和 249 个氨基酸的 *pgm* 和 *pmm* 基因,这 2 条基因都与皱波角叉菜的相应基因相似性最高;利用实时荧光定量 PCR 检测 *pmm* 和 *pgm* 基因的相对表达量,结果显示在 15 °C 时,24-epiBL 浓度为 0.5 mg/L 时 *pgm* 表达量最高,为对照组的 1.72 倍;在 25 和 31 °C 时,24-epiBL 浓度为 1.0 mg/L 时 *pgm* 表达量最高,分别为对照组的 2.38 倍和 1.51 倍;而 3 种温度培养下 24-epiBL 对 *pmm* 基因的表达也具有一定的促进作用。研究表明,一定浓度的 24-epiBL 能促进龙须菜的生长和琼胶合成,并且 *pgm* 基因的表达量与琼胶含量密切相关,能在一定程度上指示琼胶含量的高低。

关键词: 龙须菜; 24-表油菜素内酯; 生长; 琼胶; 基因表达量

中图分类号: Q 785; S 968.4

文献标志码: A

龙须菜(*Gracilariopsis lemaneiformis*)是一种大型海藻,属于红藻门(Rhodophyta)、江蓠科(Gracilariaceae)、龙须菜属(*Gracilariopsis*)。野生龙须菜适宜的生长温度为 11~23 °C^[1],经过人工筛选获得的龙须菜 981 品系适宜温度范围扩大,最高温度为 26 °C^[2]。高温对龙须菜的生理影响很大,会引起蛋白质变性,酶活降低,细胞结构破坏等;而低温条件下龙须菜生长过于缓慢。

龙须菜中琼胶含量高达 20% 以上,所产琼胶经改性后质量是江蓠中最好的^[3]。琼胶是一种亲水性胶体,由 β-D-半乳糖和 3,6-内醚-L-半

乳糖交联而成,在食品、生物工程和医药等领域都有重要的应用价值。琼胶的生物合成过程分为 3 个阶段:第一阶段包括卡尔文循环和单糖的磷酸化;第二阶段始于葡萄糖-1-磷酸和甘露糖-1-磷酸的生成,终于 UDP-D-半乳糖和 GDP-L-半乳糖的生成;第三阶段包括聚合物的生成和修饰,推测第二个阶段在琼胶的合成过程中发挥了重要作用^[4]。葡萄糖磷酸变位酶(phosphoglucomutase, PGM)催化葡萄糖-6-磷酸和葡萄糖-1-磷酸之间的互相转变^[5],甘露糖磷酸变位酶(phosphomanomutase, PMM)催化

收稿日期:2015-03-02 修回日期:2015-07-22

资助项目:国家自然科学基金(31072229;41376151)

通信作者:徐年军, E-mail: xunianjun@nbu.edu.cn

甘露糖-6-磷酸转化为甘露糖-1-磷酸^[6]。

油菜素内酯(brassinolide)是迄今发现的唯一与动物甾体激素相似的植物内源甾体类活性物质,能促进DNA、RNA和蛋白质的合成,提高抗氧化酶活性等^[7]。24-表油菜素内酯(24-epibrassinolide,24-epiBL)作为人工合成的油菜素内酯类似物,对逆境胁迫下植物的种子萌发、幼苗生长、脂质过氧化、脯氨酸含量等都有重要的调节作用^[8]。

实验针对不同浓度24-epiBL对不同温度下龙须菜的生长速率、琼胶含量以及琼胶合成途径中葡萄糖磷酸变位酶基因(*pgm*)和甘露糖磷酸变位酶基因(*pmm*)表达量的变化进行研究,旨在探讨外源24-epiBL对不同温度下龙须菜生长及琼胶含量的影响,并揭示琼胶含量与*pgm*和*pmm*基因表达量之间的关系。

1 材料与方法

1.1 实验材料与培养

实验用龙须菜981品系采自浙江温州海域,用消毒海水清洗后,实验室培养。实验前,先将健康藻体放于光照培养箱中预培养48 h,培养条件:光照强度40 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光周期L:D(12:12),盐度30。实验设置15、25和31 $^{\circ}\text{C}$ 3个温度组,用24-epiBL母液和灭菌海水配制0、0.02、0.1、0.5和1 mg/L共5个浓度的培养基,其中0 mg/L为对照组。每组3个重复,每瓶放入4 g左右经预培养、健康的龙须菜藻体。24 h后,每瓶称取100 mg左右的藻体投入液氮中保存,提取RNA;剩余的藻体称量后,放60 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中至恒重,提取琼胶。48 h后的处理方法与24 h实验相同。

1.2 相对生长速率(RGR)的测定

通过测定龙须菜培养2 d后藻体鲜重的变化来计算相对生长速率(relative growth rate, RGR)^[9]:

$$RGR(\%/d) = (\ln W_t - \ln W_0) / t \times 100\%$$

式中, W_0 为实验开始时的鲜重(g), W_t 为实验结束时的鲜重(g), t 为实验天数(d)。

1.3 琼胶的提取

参考文献[10]的方法,稍加改动。称量藻体,每0.1 g干重的藻体添加4 mL 2.5% NaOH溶液,放入85 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴2 h。用2层300目筛绢网过

滤洗涤藻体至pH值6.5左右,再用蒸馏水冲洗2~3遍。将水洗后的龙须菜放入三角锥形瓶中,每0.1 g干重的藻体添加6 mL蒸馏水。锥形瓶用棉花塞封口,置于120~125 $^{\circ}\text{C}$ 的高压锅中煮2 h。降温至80 $^{\circ}\text{C}$ 后,用2层纱布和4层300目的筛绢网重叠,用力挤压过滤。过滤物在室温凝固后,放入-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻过夜。解冻后用蒸馏水冲洗,于60 $^{\circ}\text{C}$ 烘24 h至恒重,称量琼胶干重。

$$\text{琼胶含量}(\%) = \text{琼胶干重} / \text{藻体干重} \times 100\%$$

1.4 *pmm*和*pgm*基因的克隆

总RNA的提取及反转录 取100 mg左右新鲜的龙须菜藻体,液氮研磨后收集至含10 μL β -巯基乙醇的500 μL RB裂解液的离心管中,立即漩涡混匀30 s。之后按照Plant RNA Kit试剂盒(OMEGA公司)的操作进行RNA的提取。将经过电泳检测和Nanodrop测定浓度和纯度后的RNA反转录成cDNA(PrimeScriptTM RT reagent Kit, TaKaRa), -20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存。

pmm、*pgm*和 β -actin基因部分片段的获得

采用PCR的方法获得*pmm*、*pgm*和 β -actin基因的部分片段。扩增*pmm*和*pgm*所用的引物根据本课题组龙须菜转录组测序结果而设计(表1, P1~P4), β -actin引物是根据NCBI数据库中相关物种的同源序列而设计(表1, P5和P6)。以cDNA为模板,扩增得到*pgm*、*pmm*和 β -actin的基因片段。PCR扩增于Eppendorf PCR仪中进行,采用20 μL 反应体系。2个基因的退火温度都为60 $^{\circ}\text{C}$ 。PCR产物用1%的琼脂糖凝胶电泳检测。

回收和测序 PCR产物用GenClean琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(GENERAY公司)进行回收,将回收的目标片段连接到pMD18-T载体上,转化*E. coli* DH5a感受态细胞(TaKaRa公司)。用M13F/M13R为引物,进行PCR扩增反应,鉴定长出的菌落,将检测有正确大小插入片段的重组菌落送去测序(华大基因科技股份有限公司)。

序列分析 用ORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)推测开放阅读框,用NCBI的Blast功能进行同源性分析,用Primer premier5.0把核苷酸序列翻译成氨基酸序列,利用Mega5.0中的邻接法构建系统进化树,利用在线软件ExpASy(<http://web.expasy.org/protparam/>)对氨基酸序列进行分析。

表 1 所用引物及其用途
Tab.1 The primers and purpose

名称 name	序列 5'-3' sequence 5'-3'	用途 purpose
P1	GACCATCATGGCTTCGACTT	<i>pgm</i> 基因扩增的正向引物
P2	TTCAGTCCCATTCTGCTC	<i>pgm</i> 基因扩增的反向引物
P3	CCCTATCATGGATCCAAACG	<i>pmm</i> 基因扩增的正向引物
P4	GTCCTAGCGCAACGAAGAGT	<i>pmm</i> 基因扩增的反向引物
P5	ATGACYCAGATSATGTTYGA	β - <i>actin</i> 基因扩增的正向引物
P6	TCDGGGCANCKGAAVCKCTC	β - <i>actin</i> 基因扩增的反向引物
P7	TCTTCCTCACGCTGTGCTCC	β - <i>actin</i> 基因 RT-qPCR 的正向引物
P8	AGTTGCTGCTTGATGTCTCG	β - <i>actin</i> 基因 RT-qPCR 的反向引物
P9	TCCTTCTGATTCTGTGCTGTG	<i>pgm</i> 基因 RT-qPCR 的正向引物
P10	ATTTCCAACCTGTAGGCACTTC	<i>pgm</i> 基因 RT-qPCR 的反向引物
P11	CGTTCTGGGATTACGGTCTC	<i>pmm</i> 基因 RT-qPCR 的正向引物
P12	GCATAGTTTCTCCGGGTTCC	<i>pmm</i> 基因 RT-qPCR 的反向引物

1.5 *pmm* 和 *pgm* 基因的相对定量表达分析

分别称取 100 mg 左右经不同浓度 24-epiBL 处理后的龙须菜用于 RNA 的提取,方法同 1.4。用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒 (TaKaRa 公司) 将提取的 RNA 反转录成 cDNA, -20 °C 保存。以 β -*actin* 基因为内参,进行实时荧光定量 PCR (RT-qPCR, Eppendorf 荧光定量 PCR 仪) 扩增。根据测序结果用 Primer Premier 5.0 设计特异性引物 (表 1, P7 ~ P12)。采用 20 μ L 体系: SYBR Premix Ex Taq II (2 \times) 缓冲液 10 μ L, 正向和反向引物 (10 μ mol/L) 各 0.8 μ L, cDNA 模板 2 μ L, 加 ddH₂O 补足, 使反应总体积为 20 μ L。用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法分析目的基因的相对表达量^[11]。

1.6 统计分析

数据处理和统计分析采用 Origin7.0 软件, 差异显著水平的检验使用 One-Way ANOVA, 设置

显著性水平为 $P < 0.05$, $n = 3$ 。

2 结果与分析

2.1 24-epiBL 对龙须菜相对生长速率的影响

经不同浓度 24-epiBL 处理的龙须菜相对生长速率均高于对照组, 且随着浓度的升高呈现先升后降的趋势 (图 1)。25 °C 时龙须菜的生长状态最好, 平均相对生长速率为 13.75%/d, 15 °C 时的平均相对生长速率为 10.2%/d, 31 °C 时为 8.17%/d。15 °C 培养时, 24-epiBL 浓度为 0.1 mg/L 时龙须菜的相对生长速率最大 (11.73%/d), 是对照组的 1.25 倍; 25 °C 培养条件下, 24-epiBL 浓度为 0.5 mg/L 时的最大相对生长速率为 14.98%/d, 是对照组的 1.18 倍; 31 °C 培养条件下, 24-epiBL 浓度为 0.1 mg/L 时藻体的最大相对生长速率为 9.22%/d, 是对照组的 1.23 倍。

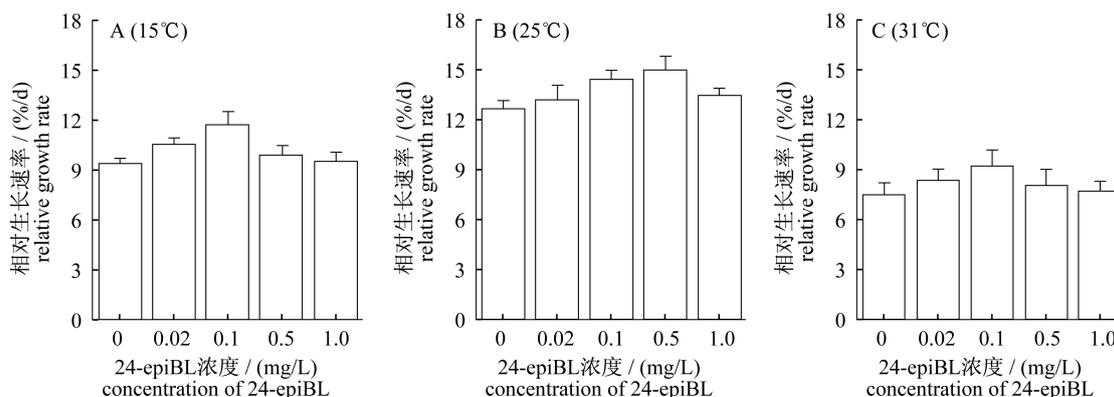


图 1 不同浓度 24-epiBL 对不同温度下龙须菜相对生长速率的影响

Fig.1 Effects of different concentrations of 24-epibrassinolide on the RGR of *G. lemaneiformis* at different temperatures

2.2 24-epiBL 对龙须菜琼胶含量的影响

在 3 种不同温度培养条件下,随着培养时间增加,龙须菜琼胶含量升高,添加激素的各处理组琼胶含量均高于对照组(图 2)。在 24 和 48 h 处理组中,温度对龙须菜琼胶含量的影响为 25 °C > 15 °C > 31 °C。在 15 °C 培养条件下,各激素添加组的琼胶含量均在 24-epiBL 浓度为 0.5 mg/L 时达到最大值,24 h 时为 6.75%,是对照组的 1.36 倍;48 h 时为 8.77%,是对照组的 1.69 倍,都显著高于对照组($P < 0.05$)。在 25 °C 培养条件下,各激素添加组的琼胶含量均随着 24-epiBL 浓度

的升高而增加,在 1.0 mg/L 时达到最大值,24 h 时为 7.68%,是对照组的 1.55 倍;48 h 时为 11.95%,是对照组的 1.97 倍,均显著高于对照组($P < 0.05$)。在 31 °C 培养条件下,24 h 激素添加组中,龙须菜的琼胶含量也随着 24-epiBL 浓度的升高而增加,1.0 mg/L 时的琼胶含量为 6.00%,是对照组的 1.33 倍;48 h 激素添加组的琼胶含量在 24-epiBL 浓度为 0.5 mg/L 时达到最大值(7.19%),是对照组的 1.28 倍,与对照组差异不显著($P > 0.05$)。

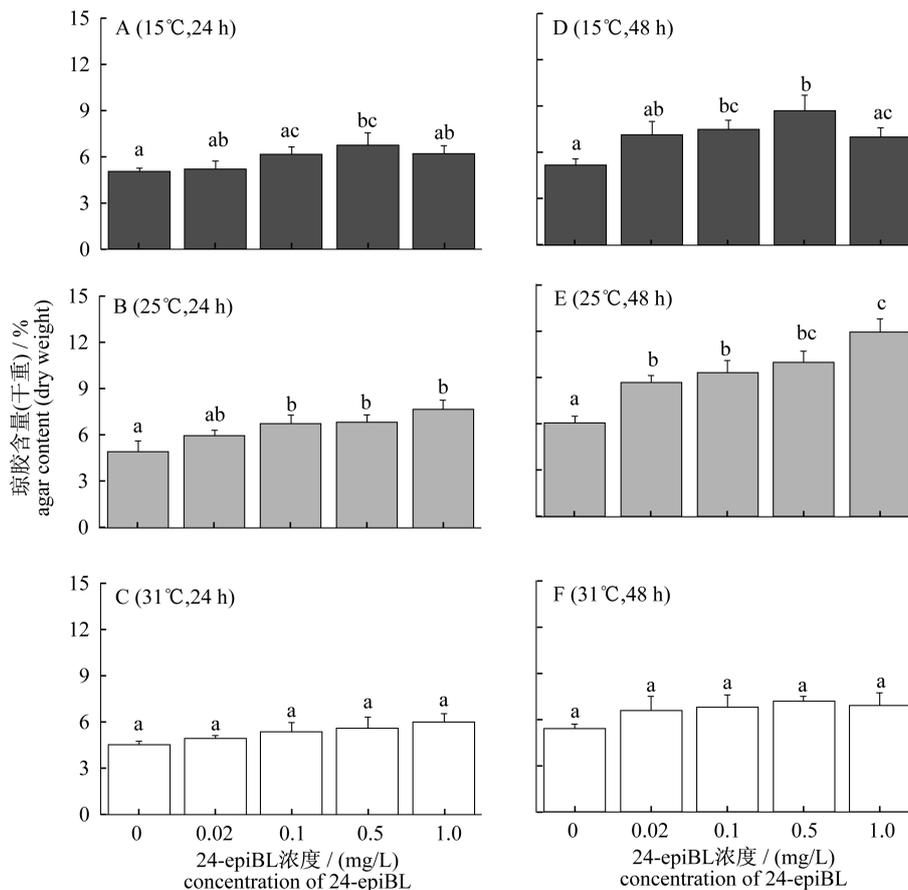


图 2 不同浓度 24-epiBL 对不同温度下龙须菜琼胶含量的影响

不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同

Fig. 2 Effects of different concentrations of 24-epibrassinolide on the agar content of *G. lemaneiformis* at different temperatures

Different letters above the bars indicate significantly different ($P < 0.05$), the same below

2.3 pgm 和 pmm 基因的克隆和序列分析

本研究通过 PCR 扩增得到了 1 868 bp 的 *pgm* 基因片段和 837 bp 的 *pmm* 基因片段,其中 *pgm* 基因片段中包含 1 个 1 758 bp 的完整开放阅读框 (ORF), 编码 585 个氨基酸, 利用 Expsy 分

析预测显示 *pgm* 分子式为 $C_{2792}H_{4360}N_{750}O_{875}S_{19}$, 蛋白分子量大小为 63.04 ku, 理论等电点为 5.06。从 NCBI 数据库中查找部分物种的 *pgm* 氨基酸序列, 与本研究的龙须菜 *pgm* 序列一起构建系统进化树 (图 3)。龙须菜与同纲 (Florideo-

phyceae) 但不同目的皱波角叉菜 (*Chondrus crispus*) pgm 的序列相似性为 79.0%, 二者在进化树中相距最近。然后龙须菜与皱波角叉菜再与蓖麻 (*Ricinus communis*)、川桑 (*Morus notabilis*)、小麦 (*Triticum aestivum*) 和玉米 (*Zea mays*) 组聚在一起, 最后再与盐生杜氏藻 (*Dunaliella*

salina)、莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 和绿藻门 (Chlorophyta) 的 *Bathycoccus prasinus*、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 等聚类。该系统进化树说明龙须菜与红藻门的角叉菜亲缘关系最近, 与某些高等植物的亲缘关系较近, 而与绿藻和其他高等植物的亲缘关系较远。

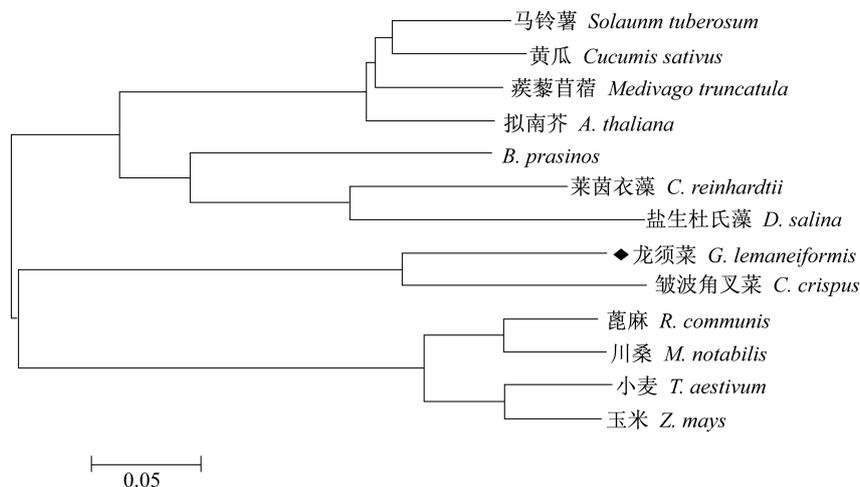


图 3 基于 pgm 氨基酸序列构建的不同物种的进化树

Fig. 3 The phylogenetic tree based on pgm amino acid sequence

Solanum tuberosum pgm (NP 001275281.1, 马铃薯); *Cucumis sativus* pgm (KGN50397.1, 黄瓜); *Medicago truncatula* pgm (XP 003592359.1, 蒺藜苜蓿); *A. thaliana* pgm (NP 199995.1, 拟南芥); *B. prasinus* pgm (XP 007511575.1); *C. reinhardtii* pgm (XP 001697992.1, 莱茵衣藻); *D. salina* pgm (ADD25038.1, 盐生杜氏藻); *G. lemaneiformis* pgm (KP943508, 龙须菜); *C. crispus* pgm (XP_005717288.1, 皱波角叉菜); *R. communis* pgm (XP 002527783.1, 蓖麻); *M. notabilis* pgm (XP 010101975.1, 川桑); *T. aestivum* pgm (CAC85913.1, 小麦); *Z. mays* pgm (NP 001105405.1, 玉米)

pmm 基因片段中包含 1 个 750 bp 的完整 ORF, 编码 249 个氨基酸, 利用 ExPasy 分析预测 *pmm* 蛋白分子式为 $C_{1285}H_{1988}N_{338}O_{385}S_{10}$, 分子量大小为 28.65 ku, 理论等电点为 5.11。从 NCBI 数据库中查找部分物种的 *pmm* 氨基酸序列, 与本研究的龙须菜 *pmm* 序列一起构建系统进化树 (图 4)。龙须菜与皱波角叉菜 *pmm* 序列的相似性为 82.0%, 二者在进化树中相距最近。从进化树中可以看出, 龙须菜与角叉菜、木糖发酵酵母 (*Spathospora passalidarum*)、立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*)、异水霉罗兹壶菌 (*Rozella allomyces*) 和温泉红藻 (*Galdieria sulphuraria*) 的亲缘关系较近, 而与绿藻门的 *Ostreococcus tauri*、褐藻门 (Phaeophyta) 的海带 (*Saccharina japonica*), 以及高等植物如黄瓜和拟南芥等的亲缘关系较远。

2.4 24-epiBL 对龙须菜 *pgm* 基因表达的影响及其和琼胶含量的关系

3 个温度下 48 h 各激素添加组 *pgm* 的表达

量比 24 h 均有所增加 (图 5)。在 15 °C 培养条件下, 24 和 48 h 2 个处理组 *pgm* 的表达量均在 24-epiBL 浓度为 0.5 mg/L 时最高, 24 h 时是对照组的 1.81 倍, 48 h 时是对照组的 1.72 倍, 均显著高于对照组 ($P < 0.05$)。在 25 °C 培养条件下, 24 和 48 h 处理组的表达量随着 24-epiBL 浓度的升高而增加, 在 1.0 mg/L 时最高, 24 h 时的表达量是对照组的 1.63 倍, 与对照组有显著性差异 ($P < 0.05$); 48 h 时是对照组的 3.12 倍, 与对照组及其他处理组都有显著性差异 ($P < 0.05$)。在 31 °C 培养 24 h, 处理组中 *pgm* 的表达量随着 24-epiBL 浓度的升高而增加, 在 1.0 mg/L 时最高, 是对照组的 1.47 倍, 与对照组有显著性差异 ($P < 0.05$), 48 h 处理组的表达量随着 24-epiBL 浓度升高先增加后减少, 在 0.5 mg/L 时最高, 是对照组的 1.62 倍, 与对照组有显著性差异 ($P < 0.05$), 但各处理组间差异不显著。

在 15 °C 培养条件下, *pgm* 的表达量和琼胶含

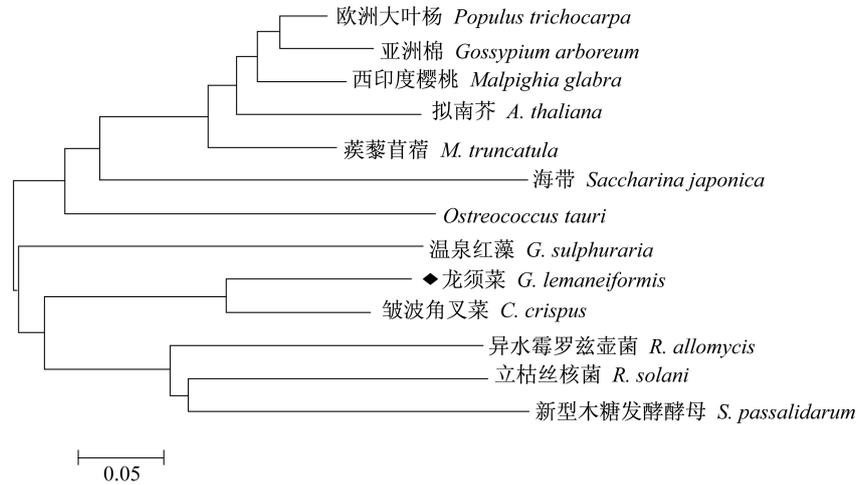


图 4 基于 *pmm* 氨基酸序列构建的不同物种的进化树

Fig. 4 The phylogenetic tree based on *pmm* amino acid sequence

Populus trichocarpa *pmm* (XP 006375330.1, 欧洲大叶杨); *Gossypium arboreum* *pmm* (KHG27673.1, 亚洲棉); *Malpighia glabra* *pmm* (ACN54046.1, 西印度樱桃); *A. thaliana* *pmm* (NP 182103.1, 拟南芥); *M. truncatula* *pmm* (XP 003623887.1, 蒺藜苜蓿); *S. japonica* *pmm* (AIW04131.1, 海带); *Ostreococcus tauri* *pmm* (XP 003074213.1); *G. sulphuraria* *pmm* (XP 005704161.1, 温泉红藻); *G. lemaneiformis* *pmm* (KP943509, 龙须菜); *C. crispus* *pmm* (XP 005713596.1, 皱波角叉菜); *R. allomycis* *pmm* (EPZ35317.1, 异水霉罗兹壶菌); *R. solani* *pmm* (CCO30834.1, 立枯丝核菌); *S. passalidarum* *pmm* (XP 007372278.1, 新型木糖发酵酵母)

量随着 24-epiBL 浓度的升高都呈现先增加后减少的趋势,均在 0.5 mg/L 时最大(图 6)。在 25 °C 培养条件下,*pgm* 的表达量和琼胶含量随着 24-epiBL 浓度的升高而增加,均在 1.0 mg/L 时最高(图 7)。在 31 °C 培养条件下,24 h 处理组 *pgm* 的表达量和琼胶含量随着 24-epiBL 浓度的升高而增加,在 1.0 mg/L 时最高,48 h 处理组 *pgm* 的表达量和琼胶含量随着 24-epiBL 浓度的升高先增加后减少,在 0.5 mg/L 时最高(图 8)。各处理组中 *pgm* 的表达量和琼胶含量在最大值时都与对照组有显著性差异($P < 0.05$)。

2.5 24-epiBL 对龙须菜 *pmm* 基因表达的影响

在 15 和 25 °C 下,48 h 处理组 *pmm* 表达量比 24 h 时要高,但 31 °C 下 24 h 处理组 *pmm* 表达量高于 48 h 处理组(图 9)。24 h 处理组中,*pmm* 表达量随着温度的升高而逐渐上升,31 °C > 25 °C > 15 °C; 48 h 处理组中,*pmm* 的表达量随着温度的升高而逐渐降低,15 °C > 25 °C > 31 °C。15 °C 下处理组 *pmm* 表达量随着 24-epiBL 浓度升高而降低,24 h 处理组在 24-epiBL 浓度为 0.02 mg/L 时表达量最高,是对照组的 1.12 倍,但差异不显著($P > 0.05$); 48 h 时 *pmm* 在 24-epiBL 浓度为 0.02 mg/L 时表达量最高,是对照组的 6.73 倍

($P < 0.05$)。25 °C 下 24 h 处理组 *pmm* 表达量随着 24-epiBL 浓度升高也有所增加,在 1.0 mg/L 时达到最大值,是对照组的 1.72 倍($P < 0.05$); 48 h 处理组中 *pmm* 表达量随着 24-epiBL 浓度升高先增加后减少,在 0.1 mg/L 时达到最大值,是对照组的 3.14 倍($P < 0.05$)。31 °C 下 24 h 处理组中 *pmm* 表达量随着 24-epiBL 浓度升高先增加后减少,在 0.5 mg/L 时达到最大值,是对照组的 2.03 倍($P < 0.05$); 48 h 处理组中 *pmm* 表达量随着 24-epiBL 浓度升高而逐渐增加,各处理组间及对照组和处理组间均没有显著性差异($P > 0.05$)。

3 讨论

油菜素内酯能促进细胞增殖和分化,调节植物的生长发育和生理响应,包括株型、开花、衰老、光形态发生以及对生物和非生物因素的抗性作用^[12]。Xu 等^[13]发现外施 24-表油菜素内酯能改善变型双穗短柄草(*Brachypodium distachyon* L.)的矮化症状。Sun 等^[14]研究发现油菜素内酯能促进棉纤维的成熟。Serna 等^[15]发现喷洒油菜素内酯类似物能提高莴苣(*Lactuca sativa* L.)的

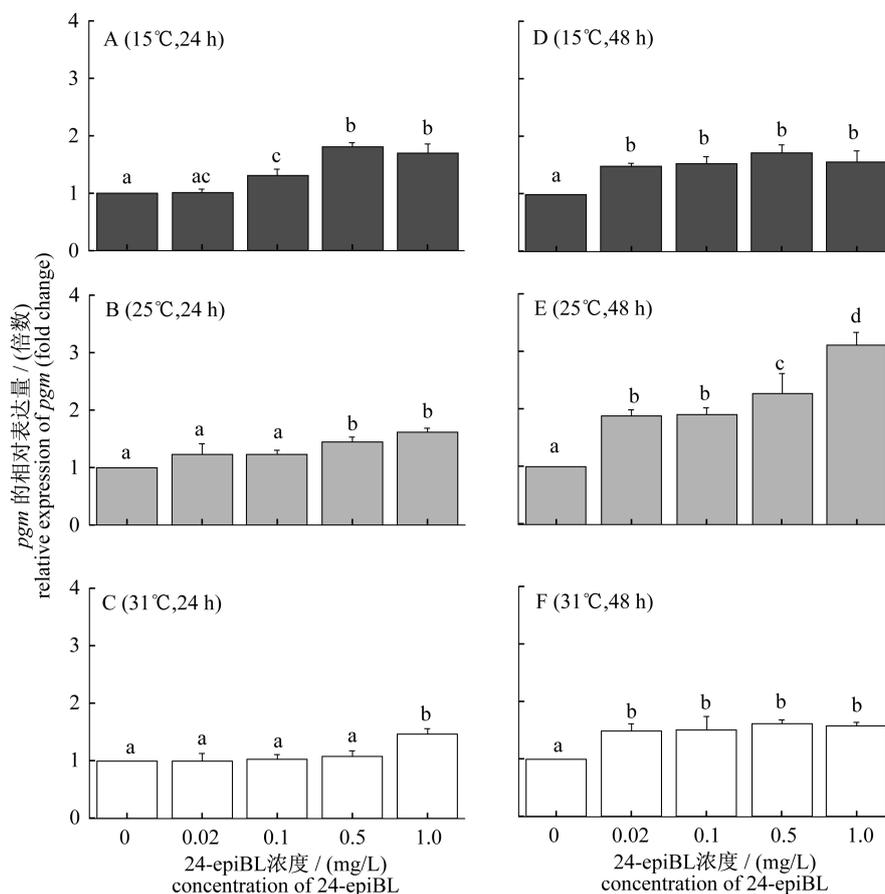


图5 不同浓度24-epiBL对不同温度下龙须菜 *pgm* 基因表达量的影响

Fig. 5 Effects of different concentrations of 24-epibrassinolide on *pgm* expression of *G. lemaneiformis* at different temperatures

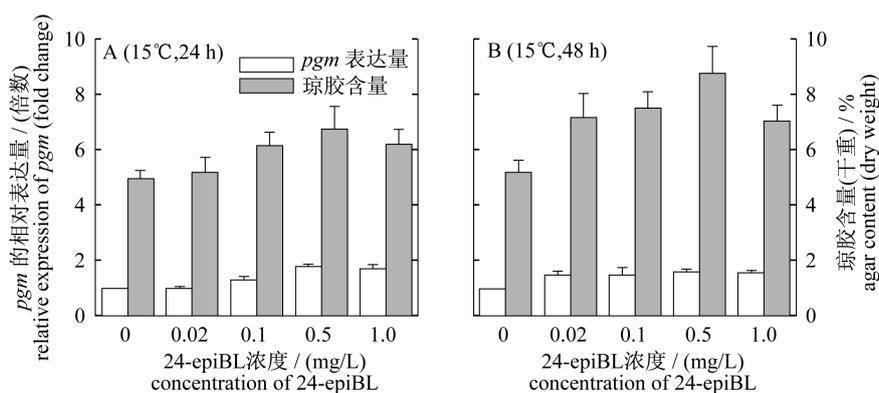


图6 不同浓度24-epiBL对15°C时龙须菜 *pgm* 基因表达量和琼胶含量的影响

Fig. 6 The relationship between *pgm* expression and agar content of *G. lemaneiformis* at different concentrations of 24-epibrassinolide at 15 °C

产量,并且在营养和感官上都没有副作用。李静等^[16]发现24-表油菜素内酯能使龙须菜在高温下维持正常的生理功能。生长速率和琼胶含量是

龙须菜最重要的选育指标,本研究首次尝试使用24-epiBL来提高龙须菜的生长速率和琼胶含量,结果显示3种温度下24-epiBL均

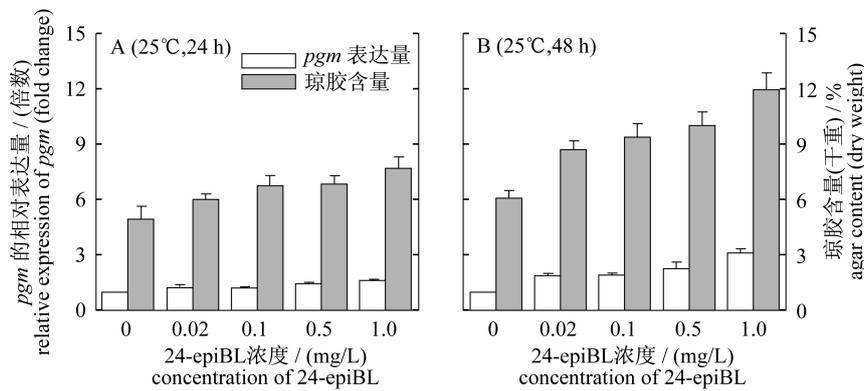


图 7 不同浓度 24-epiBL 对 25 °C 时龙须菜 *pgm* 基因表达量和琼胶含量的影响

Fig. 7 The relationship between *pgm* expression and agar content of *G. lemaneiformis* at different concentrations of 24-epibrassinolide at 25 °C

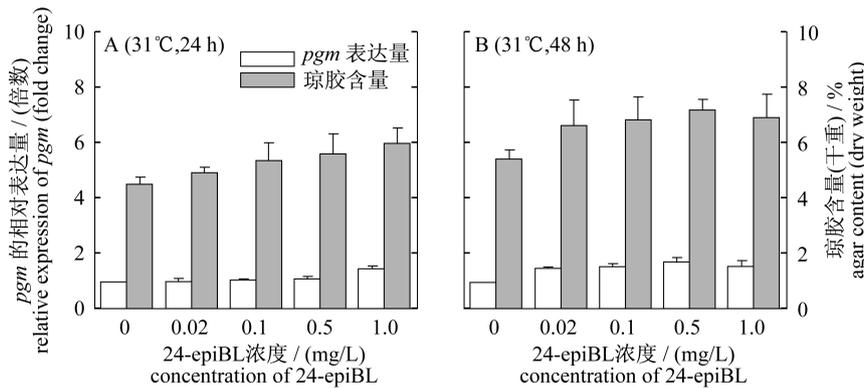


图 8 不同浓度 24-epiBL 对 31 °C 时龙须菜 *pgm* 基因表达量和琼胶含量的影响

Fig. 8 The relationship between *pgm* expression and agar content of *G. lemaneiformis* at different concentrations of 24-epibrassinolide at 31 °C

能促进龙须菜的生长,15 和 31 °C 下 24-epiBL 浓度为 0.1 mg/L 时效果最好,25 °C 下 24-epiBL 浓度为 0.5 mg/L 时效果最好。总体来说,龙须菜的生长速率在 25 °C 时最高,15 和 31 °C 下的生长速率较低,与孙雪等^[17]的研究结果相符。24-epiBL 也能提高龙须菜的琼胶含量,15 °C 下最佳浓度的 24-epiBL 处理后琼胶含量与对照组有显著性差异;25 °C 下效果最好,处理组与对照组间都有显著性差异;31 °C 下激素处理组与对照组间差异不显著。造成以上结果的原因可能是 15 °C 下由于藻体内的各种生理活动受低温抑制,普遍处于较低水平,因此激素处理对它虽然有一定的促进作用,但作用不是太大;25 °C 是较适合龙须菜生长的温度,藻体内各种生理生化活动处于活跃水平,激素刺激后能迅速反应;而 31 °C 下藻体内部分生理活性物

质已经遭受高温的不利影响,因此激素对藻生长的促进作用比较有限。由以上结果可以看出,24-epiBL 能促进龙须菜的生长和琼胶合成,并且在高温条件下对龙须菜的生长也有一定的促进作用,有利于筛选出耐高温的龙须菜品系。

红藻中的琼胶合成过程共有 9 种酶参与^[18]。张杨等^[19]首次克隆出龙须菜 UDP-葡萄糖焦磷酸化酶基因,通过比较高琼胶组藻株与低琼胶组藻株中该基因表达量的变化,得出该基因的表达量与琼胶含量存在显著相关性。Chang 等^[20]通过研究不同培养条件下以及不同品系龙须菜中 UDP-葡萄糖焦磷酸化酶基因的表达量和琼胶含量之间的关系,进一步证明该基因在琼胶合成过程中的作用。Li 等^[21]克隆了龙须菜半乳糖-1-

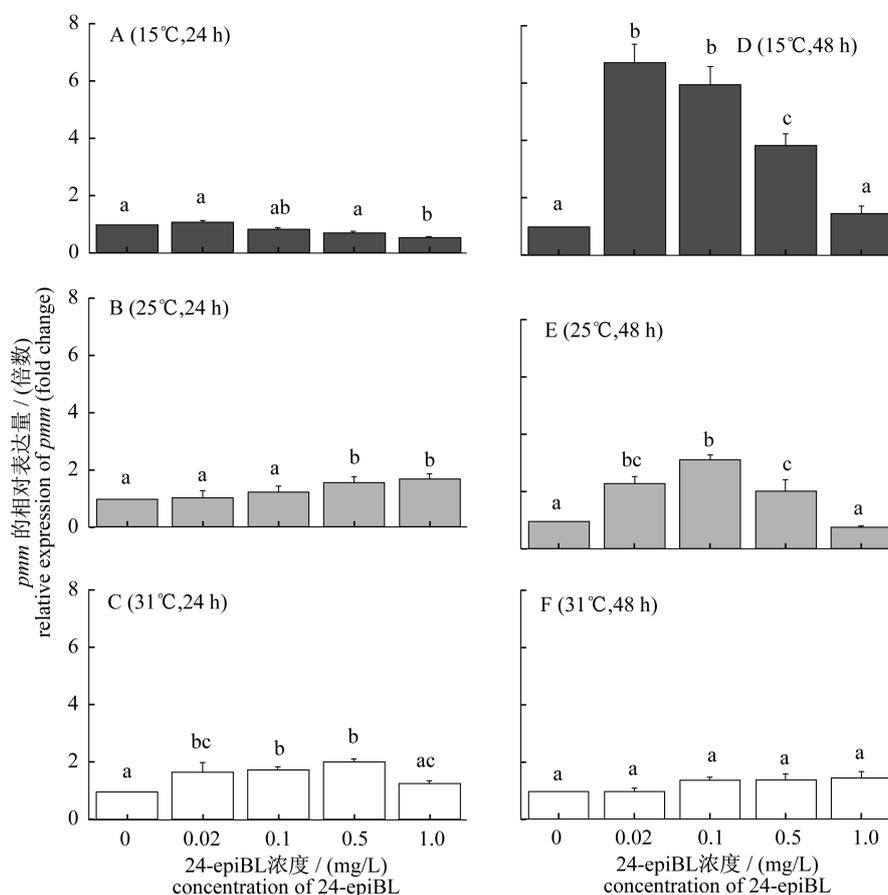


图9 不同浓度24-epiBL对不同温度下龙须菜pmm基因表达量的影响

Fig. 9 Effects of different concentrations of 24-epibrassinolide on pmm expression of *G. lemaneiformis* at different temperatures

磷酸尿苷酰转移酶基因,通过比较高琼胶组藻株和低琼胶组藻株之间该基因表达量的高低得出该基因表达对琼胶含量有一定影响的结论。Siow等^[22]克隆了张氏江蓠(*Gracilaria changii*)中的半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶基因,并通过研究发现张氏江蓠、帚状江蓠(*G. edulis*)和缢江蓠(*G. salicornia*)中该基因的表达量和琼胶含量相一致,指出该酶可能是江蓠琼胶含量的决定因素之一。Gross等^[23]指出参与合成GDP-L-半乳糖的酶可能在琼胶合成途径中发挥了主要作用。Manley等^[4]推测琼胶合成过程的第二阶段在琼胶合成过程中发挥了重要作用。本研究克隆了琼胶合成过程第二阶段中的pmm和pmm,并研究龙须菜981品系在不同温度下经24-epiBL处理后,这2个基因的表达量和琼胶含量之间的关系。本研究发现在15℃时随着24-epiBL浓度的增加,pmm基因的表达量和琼胶含量都呈现先增加后减少的趋势,并且都在24-epiBL浓度为

0.5 mg/L时达到最高值;25℃时pmm基因的表达量和琼胶含量随着24-epiBL浓度的升高都逐渐增加;31℃时,pmm基因的表达量和琼胶含量的变化趋势也相同,证明pmm基因的表达和琼胶含量之间关系密切。而pmm基因的表达量和琼胶含量之间相关性不大,因此pmm基因不能用作龙须菜中筛选琼胶含量的快捷指标。

本研究发现适当浓度的24-epiBL有利于不同温度下龙须菜的生长和琼胶合成,并且龙须菜pmm基因表达量和琼胶含量密切相关,说明pmm基因在龙须菜琼胶合成过程中发挥了重要作用,可作为培育高琼胶含量藻种时检测琼胶含量的快捷指标之一。

参考文献:

- [1] Li G Q, Zang X N, Zhang X C, et al. Cloning of ubiquitin-activating enzyme and ubiquitin-conjugating enzyme genes from *Gracilaria lemaneiformis* and

- their activity under heat shock [J]. *Gene*, 2014, 538 (1): 155 - 163.
- [2] Zhang X C, Fei X G, Wang G C, *et al.* Genetic studies and large scale cultivation of *Gracilaria lemaneiformis* [J]. *Periodical of Ocean University of China; Natural Science*, 2009, 39 (5): 947 - 954. [张学成, 费修缙, 王广策, 等. 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: 自然科学版, 2009, 39 (5): 947 - 954.]
- [3] Marinho S E. Agar polysaccharides from *Gracilaria* species (Rhodophyta, Gracilariaceae) [J]. *Journal of Biotechnology*, 2001, 89 (1): 81 - 84.
- [4] Manley S L, Burns D J. Formation of nucleoside diphosphate monosaccharides (NDP-sugars) by the agarophyte *Pterocladia capillacea* (Rhodophyceae) [J]. *Journal of Phycology*, 1991, 27 (6): 702 - 709.
- [5] Malinova I, Kunz H H, Alseekh S, *et al.* Reduction of the cytosolic phosphoglucomutase in *Arabidopsis* reveals impact on plant growth, seed and root development, and carbohydrate partitioning [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (11): e112468.
- [6] Oesterhelt C, Schnarrenberger C, Gross W. Phosphomannomutase and phosphoglucomutase in the red alga *Galdieria sulphuraria* [J]. *Plant Science*, 1996, 121 (1): 19 - 27.
- [7] Sasse J M. Physiological actions of brassinosteroids; an update [J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2003, 22 (4): 276 - 288.
- [8] Ozdemir F, Bor M, Demiral T, *et al.* Effects of 24-epibrassinolide on seed germination, seedling growth, lipid peroxidation, proline content and antioxidative system of rice (*Oryza sativa* L.) under salinity stress [J]. *Plant Growth Regulation*, 2004, 42 (3): 203 - 211.
- [9] Abreu M H, Varela D A, Henriquez L, *et al.* Traditional vs. integrated multi-trophic aquaculture of *Gracilaria chilensis* C. J. Bird, J. McLachlan & E. C. Oliveira: productivity and physiological performance [J]. *Aquaculture*, 2009, 293 (3 - 4): 211 - 220.
- [10] Xue Z X, Yang G P, Wang G C. Study on extraction method of agar from *Gracilaria lemaneiformis* [J]. *Marine Sciences*, 2006, 30 (8): 71 - 77. [薛忠欣, 杨桂朋, 王广策. 龙须菜琼胶的提取方法研究. 海洋科学, 2006, 30 (8): 71 - 77.]
- [11] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25 (4): 402 - 408.
- [12] Gudesblat G E, Russinova E. Plants grow on brassinosteroids [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2011, 14 (5): 530 - 537.
- [13] Xu Y, Zhang X, Li Q, *et al.* BdBRD1, a brassinosteroid C - 6 oxidase homolog in *Brachypodium distachyon* L., is required for multiple organ development [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2015, 86: 91 - 99.
- [14] Sun Y, Veerabomma S, Fokar M, *et al.* Brassinosteroid signaling affects secondary cell wall deposition in cotton fibers [J]. *Industrial Crops and Products*, 2014, 65: 334 - 342.
- [15] Serna M, Hernandez F, Coll F, *et al.* Brassinosteroid analogues effect on yield and quality parameters of field - grown lettuce (*Lactuca sativa* L.) [J]. *Scientia Horticulturae*, 2012, 143: 29 - 37.
- [16] Li J, Wang Q Q, Xu N J, *et al.* Effects of 24-epibrassinolide on the resistance of *Gracilariopsis lemaneiformis* to high temperature [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2014, 36 (8): 82 - 90. [李静, 王俏俏, 徐年军, 等. 24-表油菜素内酯对龙须菜抗高温胁迫的研究. 海洋学报, 2014, 36 (8): 82 - 90.]
- [17] Sun X, Cai X L, Xu N J. Physiological response of marine red algae *Gracilaria lemaneiformis* to two kinds of adverse temperature stress [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37 (3): 535 - 540. [孙雪, 蔡西栗, 徐年军. 海洋红藻龙须菜对 2 种逆境温度胁迫的应激生理响应. 水生生物学报, 2013, 37 (3): 535 - 540.]
- [18] Li M, Sui Z H, Zhang X C. Advance on the study of carbon metabolism in Rhodophyta [J]. *Marine Sciences*, 2009, 33 (6): 94 - 98. [李敏, 隋正红, 张学成. 红藻碳代谢的研究进展. 海洋科学, 2009, 33 (6): 94 - 98.]
- [19] Zhang Y, Sui Z H, Ding H Y, *et al.* Cloning and analysis of the UDP - glucose pyrophosphorylase (UGPase) gene of *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) and correlation between gene expression and agar synthesis [J]. *Periodical of Ocean University of China; Natural Science*, 2011, 41 (1): 80 - 86. [张杨, 隋正红, 丁弘叶, 等. 龙须菜 UDP - 葡萄糖焦磷酸化酶基因的克隆及其表达与琼胶产量的关系. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2011, 41 (1): 80 - 86.]
- [20] Chang L P, Sui Z H, Fu F, *et al.* Relationship between gene expression of UDP - glucose pyrophosphorylase and agar yield in *Gracilariopsis*

- lemaniformis (Rhodophyta) [J]. Journal of Applied Phycology, 2014, 26(6): 2435 – 2441.
- [21] Li M, Sui Z H, Kang K H, *et al.* Cloning and analysis of the galactose-1-phosphate uridylyltransferase (galt) gene of *Gracilariopsis lemaneiformis* (Rhodophyta) and correlation between gene expression and agar synthesis [J]. Journal of Applied Phycology, 2010, 22(2): 157 – 164.
- [22] Siow R S, Teo S S, Ho W Y, *et al.* Molecular cloning and biochemical characterization of galactose-1-phosphate uridylyltransferase from *Gracilaria changii* (Rhodophyta) [J]. Journal of Phycology, 2012, 48(1): 155 – 162.
- [23] Gross W G, Schnarrenberger C. Purification and characterization of a galactose-1-phosphate: UDP – glucose uridylyltransferase from the red alga *Galdieria sulphuraria* [J]. European Journal of Biochemistry, 1995, 234(1): 258 – 263.

Effects of 24-epibrassinolide on the agar synthesis and expression of genes involved in marine alga *Gracilariopsis lemaneiformis*

TANG Xiaobin^{1,2}, XU Nianjun^{1,2*}, SUN Xue^{1,2}, LI Yahe^{1,2}, ZHANG Lin^{1,2}

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

Abstract: The effects of 24-epibrassinolide on the expression level of two genes, *pgm* encoding phosphoglucomutase (PGM) and *pmm* encoding phosphomannomutase (PMM), involved in agar synthesis at different temperatures as well as the correlation between genes expression level and agar content were investigated in marine red alga *Gracilariopsis lemaneiformis* 981 strain. The open reading frames (ORF) of *pgm* and *pmm* were obtained by PCR, encoding 585 amino acids and 249 amino acids, respectively. The deduced amino acid sequences showed significant similarity to the *pgm* and *pmm* sequences of *Chondrus crispus*. Real time quantitative PCR technique was used to detect the relative expression levels of PGM and PMM. Results showed that the highest growth rate of *G. lemaneiformis* was observed under the treatment of 0.1 mg/L 24-epibrassinolide at 15 and 31 °C, while the highest growth rate was at 0.5 mg/L 24-epibrassinolide treatment group at 25 °C. The agar content and *pgm* expression of *G. lemaneiformis* were the highest at 0.5 mg/L 24-epibrassinolide treatment group at 15 °C, and those of *G. lemaneiformis* was higher than the control and other treated groups when treated at 1.0 mg/L 24-epibrassinolide at 25 and 31 °C. Besides, 24-epibrassinolide could also improve *pmm* expression level at different temperatures. The results indicated that 24-epibrassinolide can improve the growth and agar synthesis of *G. lemaneiformis*, and *pgm* expression level is closely related with agar content, which may be useful in screening for high-agar-content strains.

Key words: *Gracilariopsis lemaneiformis*; 24-epibrassinolide; growth; agar content; gene expression

Corresponding author: XU Nianjun. E-mail: xunianjun@nbu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31072229; 41376151)