

文章编号: 1000-0615(2017)10-1578-10

DOI: 10.11964/jfc.20161010573

不同高温胁迫条件下的坛紫菜中植物激素分析

宋悦, 崔晓山, 陈娟娟, 杨锐*, 严小军

(宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 为了研究高温胁迫条件下内源性植物激素的变化趋势与坛紫菜在高温耐受性之间的相互关系, 实验以在宁波象山采集的“浙东1号”坛紫菜叶状体为样品, 以液相色谱—质谱联用的选择离子模式作为分析手段, 系统地分析了高温胁迫条件下, 坛紫菜中11种植物激素含量的变化。结果显示, 在高温胁迫环境中共检测出7种植物激素, 分别为异戊烯腺苷、异戊烯腺嘌呤、反式玉米素核苷、吲哚乙酸、茉莉酸甲酯、水杨酸和茉莉酸。在20、25、28和35 °C下, 茉莉酸和茉莉酸甲酯的含量随着刺激温度的上升而升高; 吲哚乙酸、反式玉米素核苷、异戊烯腺苷和异戊烯腺嘌呤在高温组中的含量要明显低于对照组, 呈现下降的趋势。以28 °C作为胁迫温度, 在不同胁迫时间下, 吲哚乙酸、反式玉米素核苷、异戊烯腺苷和异戊烯腺嘌呤的含量随着胁迫时间的延长而降低; 水杨酸和茉莉酸甲酯的含量随着胁迫时间的延长而上升; 茉莉酸的含量先升高后下降。在恢复培养过程中, 水杨酸、茉莉酸、吲哚乙酸和茉莉酸甲酯的含量均呈现下降、升高又下降的变化趋势, 而反式玉米素核苷、异戊烯腺苷和异戊烯腺嘌呤的含量则随着恢复培养过程的进行而逐渐下降。高温胁迫下, 坛紫菜在促进生长类激素和胁迫抑制类激素的共同调控下进行胁迫防御, 维持自身生长。然而, 坛紫菜的防御能力有限, 且高温胁迫引起的藻体自损伤可能难以修复。

关键词: 坛紫菜; 高温胁迫; 植物激素; 液质联用

中图分类号: Q 945.78; S 968.43[†]1

文献标志码: A

紫菜是目前世界上人工培养经济价值最高的一类海藻, 每年创造大量产值^[1]。坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)是我国紫菜的2个主要栽培种之一, 是闽浙沿海海水养殖的主要对象, 其产量占全国紫菜总产量的75%以上^[2-3]。近年来随着全球气候变暖, 每年9—10月, 福建、浙江海域都会发生大幅度高温回暖及无风微浪天气, 水温过高致使紫菜幼苗或成菜烂菜, 造成坛紫菜大面积欠收, 部分地区甚至绝收, 给养殖户造成了巨额经济损失^[4]。

许多植物体内的内源激素调控着其自身代谢的很多方面^[5-10]。当受到病原体侵染、害虫及动物的啃咬、干旱、温度及盐度胁迫等生物和

非生物的伤害后, 植物激素在植物启动防御反应的过程中也发挥着巨大的作用^[11-13]。植物受到逆境胁迫时, 体内的激素发生变化, 通过影响植物的生理生化活动来产生抵御胁迫的能力^[14-15]。植物激素不仅存在于高等植物中, 在低等的海洋藻类中也具有多种生理作用, 如调节藻体的生长和组织器官分化, 并在藻类逆境胁迫响应等过程中起着重要的作用^[16-17]。针对藻类植物激素的种类及调控机制的研究虽然没有高等植物深入, 然而逆境条件下内源激素的变化与海藻的耐受性之间的相互关系也受到研究者越来越多的关注。其中, 水杨酸、茉莉酸和吲哚乙酸等在海藻的逆境胁迫防御中均发挥着重要的作用^[18-20]。

收稿日期: 2016-10-12 修回日期: 2017-03-17

资助项目: 国家星火计划项目(2015GA701027); 浙江省自然科学基金(LY17D060002); 浙江省科技厅公益项目(分析测试)(2016C37090); 宁波大学王宽诚幸福基金

通信作者: 杨锐, E-mail: yangrui@nbu.edu.cn

因此,研究高温胁迫条件下坛紫菜中植物激素种类及含量的变化,有助于深入了解紫菜对胁迫条件进行适应和应激的生理过程及机制。

本研究以坛紫菜“浙东1号”为对象,分析不同胁迫温度、时间以及恢复培养过程中常见植物激素种类和含量的变化,根据不同高温胁迫下植物激素响应的综合分析,探究高温胁迫下坛紫菜可能的激素调控机制,为提高产量、种质培育和规模化养殖提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 实验仪器与试剂

TSQ Quantum Access液相色谱—三重四级杆质谱联用分析系统(美国Thermo Fisher Scientific公司); Hypersil Gold C₁₈色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm, 美国Thermo Fisher Scientific公司); 冷冻干燥机(美国LABCONCO公司)。

甲醇和乙腈为色谱纯; 异戊烯腺苷(iPA)(纯度98%)、异戊烯腺嘌呤(iP)(纯度98%)、玉米素(Z)(纯度99%)、反式玉米素核苷(TZR)(纯度98%)、吲哚乙酸(IAA)(纯度98%)、脱落酸(ABA)(纯度98%)、芸苔素内酯(BR)(纯度95%)、甲基茉莉酸(MeJA)(纯度98%)、水杨酸(SA)(纯度99%)、赤霉素(GA)(纯度95%)、茉莉酸(JA)(纯度95%)、甲酸(纯度96%)、乙酸铵(纯度99%)均为分析纯(美国Sigma-Aldrich公司); 纯水由超纯水系统制备(法国Millipore公司)。

1.2 样品预处理

将2015年11月2日在宁波象山采集的坛紫菜(浙东1号)叶状体保存于-20℃冰箱,实验时,坛紫菜在灭菌的海水中复苏24 h,挑选出健康叶片,于灭菌海水中仔细刷洗去除附生杂物,置于含有0.7% KI的海水中消毒10 min,然后用灭菌海水冲洗2~3次。叶状体培养温度为(19±1)℃,光照强度为20 μmol photons/m²·s,光暗比L:D=12 h:12 h。热激处理温度:坛紫菜复苏完成后取出,分别置于水温为20、25、28和35℃的培养箱内热激1 h。不同热激时间处理:坛紫菜复苏完成后取出,置于水温为28℃的培养箱内,分2组分别热激1和6 h; 不同恢复时间处理:28℃热激6 h完成后将坛紫菜取出,置于水温为20℃的培养箱内分别恢复0、10、20、30、60和120 min。上述3个体系的坛紫菜取出后加液氮于-80℃冰

箱保存,冷冻干燥后用液氮研磨。

1.3 激素分析

准确称取紫菜样品干燥粉末1 g于50 mL离心管中,加入10 mL乙腈:水:甲酸(80:19:1),振荡1 min,冰浴超声20 min,置于-20℃过夜提取16 h,4℃下10 000 r/min离心10 min,上清液转至旋蒸瓶,残渣再用10 mL的乙腈:水:甲酸(80:19:1)提取2次(振荡1 min,冰浴超声20 min,-20℃提取20 min,4℃离心10 min)。合并上清液于旋蒸瓶中,旋转蒸发至干。加1 mL含有10 mmol/L乙酸钠的甲醇:水:乙酸(90:10:0.05)复溶,4℃下10 000 r/min离心10 min,过0.22 μm滤膜于2 mL进样瓶中,每个平行分析3次(为保证样品浓度高于检测线,每个样品设9支管子,3支合并于1个旋蒸瓶中,蒸干复溶进行分析,则每个样品实际取样量为3 g,每个平行再分析3次)。

LC-MS分析LC条件:流动相为10 mmol/L乙酸钠水溶液(A)—甲醇(B); 梯度洗脱:0~10 min,85%~5%A; 10~11 min,5%A; 11~12 min,5%~85%A; 12~15 min,85%A; 流速0.3 mL/min; 进样体积10 μL; 柱温30℃。MS条件:采用电喷雾电离源正、负离子电离模式,喷雾电压3 kV; 鞘气(N₂)流量在正、负离子电离模式下分别为20和15 L/min; 辅助气(N₂)流量在正、负离子电离模式下分别为10和5 Arbs; 离子传输毛细管温度分别为300和200℃; 碰撞气采用氩气,碰撞气压力0.1995 Pa; Q1和Q3分辨率均设定为半峰宽0.7 u。扫描采用选择反应监测(SRM)模式。11种植物激素标准品有相对应的离子通道和碰撞能量(表1)。

2 结果

2.1 坛紫菜中植物激素分析

采用液相色谱—三重四级杆质谱的SRM模式对不同高温胁迫条件下坛紫菜中11种植物激素(异戊烯腺苷、异戊烯腺嘌呤、玉米素、反式玉米素核苷、吲哚乙酸、脱落酸、芸苔素内酯、甲基茉莉酸、水杨酸、赤霉素、茉莉酸)进行分析。根据11种激素的结构以及离子出峰情况,分别采用正、负离子模式进行数据采集(图1)。戊烯腺苷、异戊烯腺嘌呤、玉米素、反式玉米素核苷、吲哚乙酸、脱落酸、芸苔素内酯、甲基茉莉酸这8个植物激素在正离子模式下获得较好的

表 1 11种植物激素标准品在SRM模式下的离子通道

Tab. 1 The transitions of 11 phytohormone standards obtained by QqQ MS in SRM mode

| 化合物 compounds | 通道1 transition 1 | | 通道2 transition 2 | | 通道3 transition 3 | |
|--|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| | 离子通道/(m/z) ion transition | 碰撞能量/(eV) collision energy | 离子通道/(m/z) ion transition | 碰撞能量/(eV) collision energy | 离子通道/(m/z) ion transition | 碰撞能量/(eV) collision energy |
| 异戊烯腺苷 N ₆ -(2-isopentenyl) adenosine | 336.1>136.2 | 30 | 336.1>148.2 | 25 | 336.1>204.1 | 17 |
| 异戊烯基腺嘌呤 N ₆ -(2-isopentenyl) adenine | 204.2>119.2 | 33 | 204.2>136.1 | 15 | 204.2>148.1 | 12 |
| 玉米素 zeatin | 220.1>136.1 | 34 | 220.1>148.2 | 15 | 220.1>202.1 | 11 |
| 反式玉米素核苷 trans-zeatinriboside | 352.0>136.1 | 34 | 352.0>202.3 | 24 | 352.0>220.0 | 20 |
| 吲哚乙酸 indole-3-acetic acid | 176.0>77.2 | 46 | 176.0>102.8 | 31 | 176.0>130.0 | 12 |
| 脱落酸 abscisic acid | 265.0>153.3 | 14 | 265.0>201.0 | 18 | | |
| 芸苔素内酯 brassinolide | 481.0>330.9 | 30 | 481.0>348.9 | 30 | 481.0>443.7 | 30 |
| 茉莉酸甲酯 methyl jasmonate | 225.0>151 | 20 | | | | |
| 水杨酸 salicylic acid | 137.0>65.4 | 34 | 137.0>75.4 | 38 | 137.0>93.2 | 20 |
| 赤霉素 gibberellin | 345.0>43.2 | 39 | 345.0>221.1 | 24 | 345.0>239.2 | 18 |
| 茉莉酸 jasmonic acid | 209.0>59.5 | 15 | 209.0>165.2 | 15 | | |

出峰信号，而水杨酸、赤霉素、茉莉酸在负离子模式下获得相对良好的出峰信号。通过二级质谱分析，分别获得了这11种植物激素的二级碎片信息，通过分析质谱裂解途径，选取主要的碎片离子作为定量离子进行微量成分分析，得到它们的总离子流图(图2)。

通过上述建立的定量分析方法，以不同浓度11种植物激素混标，绘制其标准曲线，并计算出不同高温胁迫条件下的坛紫菜中植物激素的含量(表2)。2015年11月2日在宁波象山采集的“浙东1号”坛紫菜中共发现7种植物激素，分别为吲哚乙酸、水杨酸、茉莉酸、茉莉酸甲酯、反式玉米素核苷、异戊烯腺苷和异戊烯腺嘌呤(图3)。在20℃下的坛紫菜中，吲哚乙酸、茉莉酸和水杨酸为主要的植物激素，其中吲哚乙酸含量最高，其次为茉莉酸，再次为水杨酸。而其余4种植物激素含量较少，均小于2.0 ng/g。

2.2 不同胁迫温度下的植物激素分析

坛紫菜的正常培养温度为20℃左右，25℃为坛紫菜培养的温度上限，28℃为坛紫菜高温胁迫的常用高温点^[4, 21]。而35℃的胁迫温度则是为了能够在短时间内刺激坛紫菜，以便观察坛紫菜中的物质在高温下的快速变化过程，因此本研究以20℃作为对照组，以25、28和35℃条

件分别刺激1 h作为高温组，比较分析不同胁迫温度下的7种植物激素变化趋势。结果显示，茉莉酸和茉莉酸甲酯具有相似的变化规律，随着刺激温度从20升高至28℃，茉莉酸和茉莉酸甲酯的含量逐步增加，当胁迫温度高达35℃时，它们的含量相比在28℃条件下略有下降。吲哚乙酸、反式玉米素核苷、异戊烯腺苷和异戊烯腺嘌呤在高温组中的含量要明显低于对照组，呈现下降的趋势。水杨酸在25℃条件下的含量与对照组相比，下降了38.4%；而后在28℃条件下，与25℃相比，迅速增加231.7%；在35℃条件下，水杨酸的含量与25℃时持平(图3)。

2.3 不同胁迫时间下的植物激素分析

由于在28℃胁迫温度下，水杨酸、茉莉酸和茉莉酸甲酯含量在4组温度中最高，吲哚乙酸含量居中。而反式玉米素核苷、异戊烯腺苷和异戊烯腺嘌呤在3组高温组中含量最高，因此选择28℃作为胁迫温度，考察不同胁迫时间与坛紫菜中植物激素含量之间的相关性。以20℃作为对照组，28℃刺激1和6 h分别作为胁迫时间组进行比较分析。结果显示，吲哚乙酸、反式玉米素核苷、异戊烯腺苷和异戊烯腺嘌呤具有相似的变化趋势，在胁迫时间组中，它们的含量均下降，并低于对照组中的含量；茉莉酸甲酯在

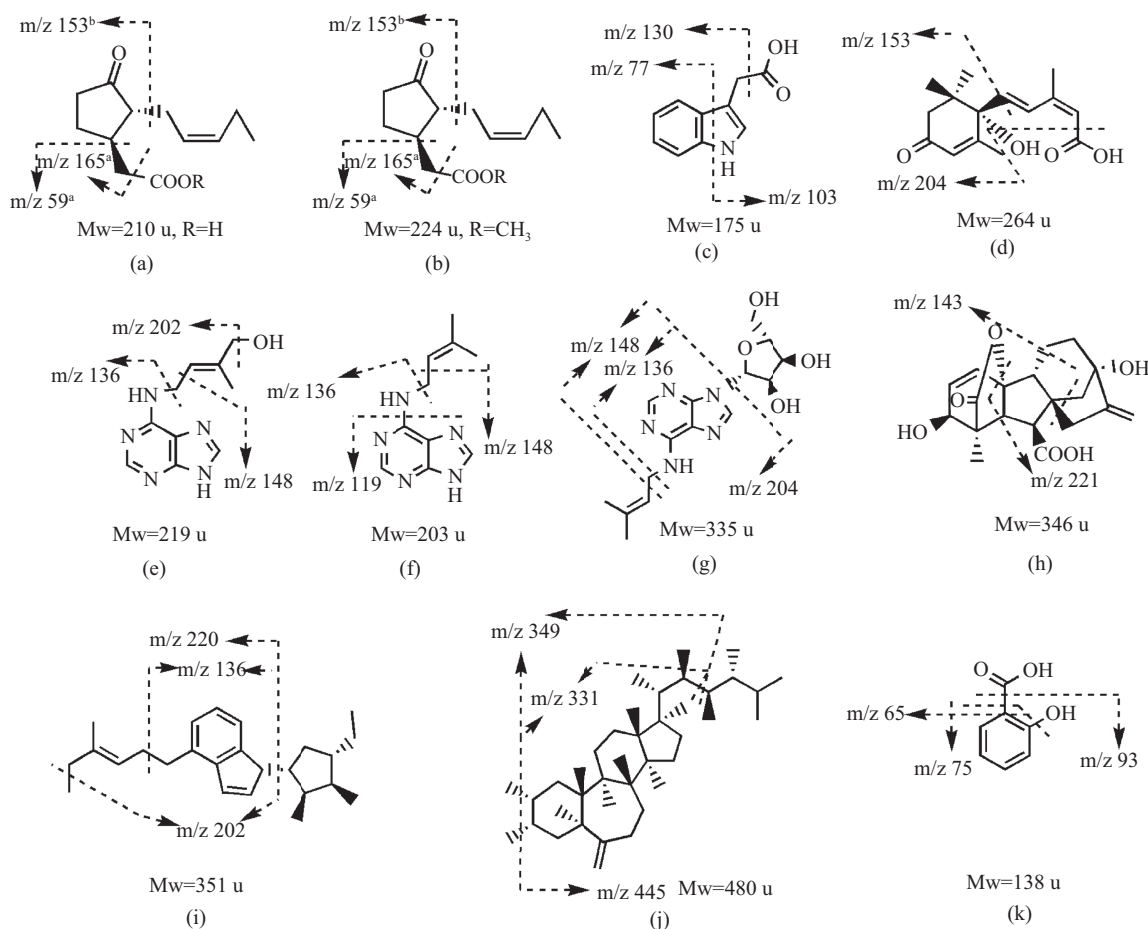


图1 11种植物激素的结构式以及主要碎片离子

(a) 茉莉酸; (b) 茉莉酸甲酯; (c) 吲哚乙酸; (d) 脱落酸; (e) 玉米素; (f) 异戊烯基腺嘌呤; (g) 异戊烯腺苷; (h) 赤霉素; (i) 反式玉米素核苷; (j) 芸苔素内酯; (k) 水杨酸

Fig. 1 The structures and product ions of 11 kinds of phytohormones

(a) JA; (b) MeJA; (c) IAA; (d) ABA; (e) Z; (f) iP; (g) iPA; (h) GA; (i) TZR; (j) BR; (k) SA

不同胁迫时间下的变化过程与茉莉酸不一致, 而与水杨酸的变化趋势一致, 随着胁迫时间的延长, 其含量逐渐升高。在胁迫时间达到1 h时, 水杨酸和茉莉酸甲酯的含量分别为对照组的2.04和1.64倍; 在胁迫时间达到6 h时, 水杨酸和茉莉酸甲酯的含量分别为对照组的10.10和5.70倍。茉莉酸在不同胁迫时间下, 含量先升高后下降, 但均高于对照组的含量。在胁迫时间为1 h时, 含量为对照组的1.67倍; 而在胁迫时间为6 h时, 含量为对照组的1.13倍(图4)。

2.4 不同恢复过程中的植物激素分析

将28 °C胁迫6 h后的坛紫菜放置于20 °C中进行恢复培养, 分别选择恢复培养10、20、30、60和120 min的坛紫菜进行植物激素提取分析。结果显示, 与28 °C胁迫6 h相比, 恢复培养10 min

后, 坛紫菜中水杨酸、茉莉酸、吲哚乙酸、反式玉米素核苷、异戊烯腺苷、异戊烯腺嘌呤和茉莉酸甲酯这7种植物激素均呈现下降趋势。随着恢复培养时间延长, 水杨酸、茉莉酸、茉莉酸甲酯和吲哚乙酸的含量逐渐升高, 但是随着恢复培养时间从60到120 min, 这4种植物激素的含量又逐渐下降。而反式玉米素核苷、异戊烯腺苷和异戊烯腺嘌呤则随着恢复培养过程的进行, 其含量下降缓慢, 均低于对照组和胁迫时间组(图5)。

3 讨论

坛紫菜在受到高温胁迫后, 体内迅速启动各种防御机制, 引起某些特异代谢物的含量和结构发生异常变化。作为生理调节的信号分子,

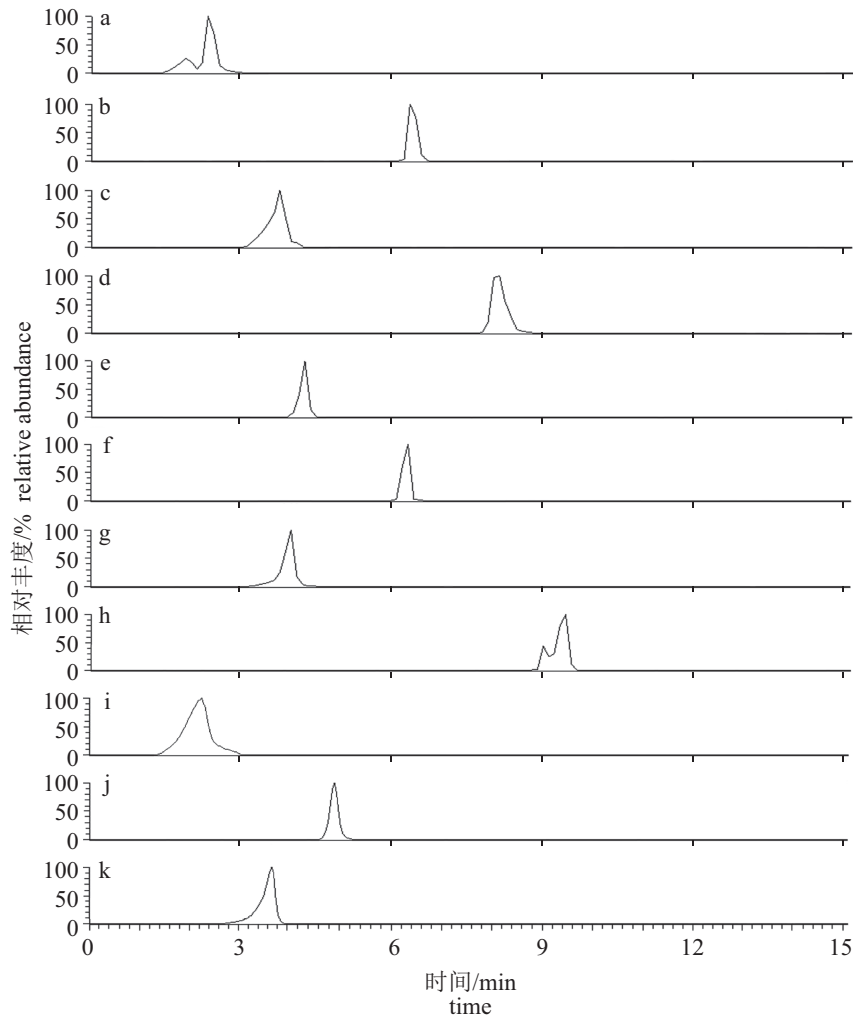


图2 11种植物激素在正负离子模式下的总离子流图

正离子模式: a. 吲哚乙酸; b. 异戊烯腺嘌呤; c. 玉米素; d. 茉莉酸甲酯; e. 脱落酸; f. 异戊烯腺苷; g. 反式玉米素核苷; h. 芸苔素内酯; 负离子模式: i. 水杨酸; j. 茉莉酸; k. 赤霉素

Fig. 2 The total ionization chromatograms of 11 kinds of phytohormones in positive and negative modes

Positive mode: a. IAA; b. iP; c. Z; d. MeJA; e. ABA; f. iPA; g. TZR; h. BR; negative mode: i. SA; j. JA; k. GA

藻体内的植物激素由此发生热激应答现象, 激活藻体内的信息传递系统, 从而产生抵御逆境胁迫的生理活性物质。参与防御的植物激素可以分为两类: “促进生长类”(生长素、细胞分裂素、赤霉素和油菜素内酯)和“胁迫抑制类”(脱落酸、茉莉酸、水杨酸和乙烯)^[22-23]。从生长方面分析, 反式玉米素核苷、异戊烯腺苷和异戊烯腺嘌呤作为细胞分裂素, 具有延缓衰老的作用, 吲哚乙酸起到生长素的作用^[24-25]。这4种激素的含量随着热激时间和热激温度的增加而降低, 说明随着热激程度的增强, 藻体受到的细胞氧化损伤越严重, 坛紫菜的生长抑制程度越深。在不同恢复时间处理下, 生长类激素的含

量在持续的恢复培养下逐渐升高, 说明藻体的生长在不断恢复中。但大量文献证明, 高温会影响到光合成系统, 当光电子能量过多, 光系统Ⅱ被抑制, 影响到电子流动, 最终导致单线态氧的产生, 造成细胞氧化损伤, 最终改变细胞膜特性, 引起聚不饱和脂肪酸的过氧化降解, 造成脂质过氧化物(oxylipins)的累积^[26-28]。高温胁迫下藻体产生的过氧化物在胁迫防御中具有重要作用, 如引起氧化损伤、抑制生长和激活防御基因等, 然而这一高代价防御过程中脂肪酸大量分解, 产生的自由基使得藻体机能受损^[29-31]。正是藻体的自损伤使得藻体短期恢复培养的作用有限, 难以恢复到最初的生长状态。

表 2 11种植物激素的线性方程

Tab. 2 The calibration curves of 11 kinds of phytohormones

| 植物激素 phytohormones | 标准曲线 calibration curves | 相关系数 R^2 correlation coefficients | 检测范围/(ng/mL) test range |
|---|----------------------------|--|----------------------------|
| 异戊烯基腺苷 N_6 -(2-isopentenyl) adenosine | $Y=3573.5+284\ 685X$ | 0.9962 | 0.1~1000 |
| 异戊烯基腺嘌呤 N_6 -(2-isopentenyl) adenine | $Y=5605.3+187\ 687X$ | 0.9980 | 0.1~1000 |
| 玉米素 zeatin | $Y=6067.1+171\ 836X$ | 0.9987 | 0.1~1000 |
| 反式玉米素核苷 trans-zeatinriboside | $Y=6399.75+150\ 052X$ | 0.9989 | 0.1~1000 |
| 吲哚乙酸 indole-3-acetic acid | $Y=1763.05+2417.54X$ | 0.9987 | 10~5000 |
| 脱落酸 abscisic acid | $Y=1373.58+817.52X$ | 0.9929 | 10~5000 |
| 芸苔素内酯 brassinolide | $Y=-2879.06+720.85X$ | 0.9958 | 10~5000 |
| 茉莉酸甲酯 methyl jasmonate | $Y=3527.9+68\ 481.4X$ | 0.9992 | 0.1~1000 |
| 水杨酸 salicylic acid | $Y=450.94+471.411X$ | 0.9992 | 10~5000 |
| 赤霉素 gibberellin | $Y=-60.9+92.31X$ | 0.9984 | 10~5000 |
| 茉莉酸 jasmonic acid | $Y=74.79+107.736X$ | 0.9993 | 10~5000 |

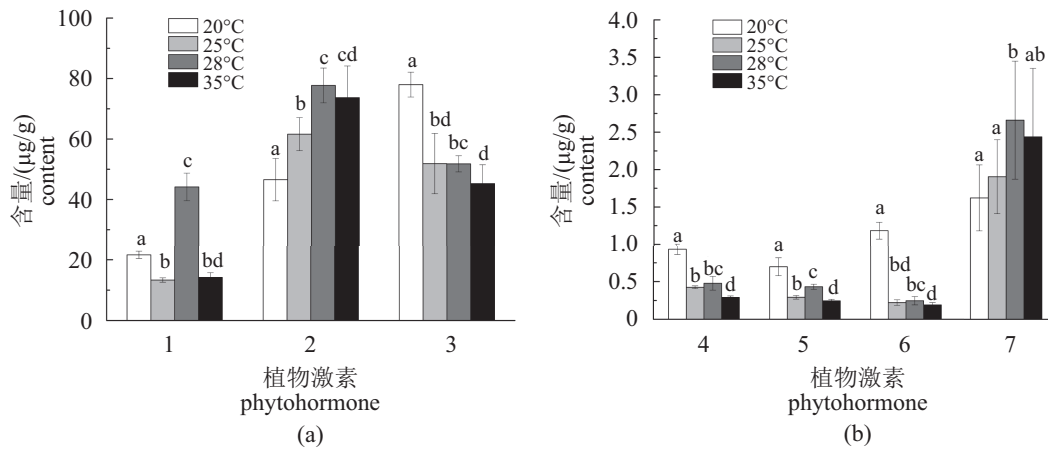


图 3 不同胁迫温度下的坛紫菜植物激素含量

1. 水杨酸; 2. 茉莉酸; 3. 吲哚乙酸; 4. 反式玉米素核苷; 5. 异戊烯基腺苷; 6. 异戊烯基腺嘌呤; 7. 茉莉酸甲酯。不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下同

Fig. 3 The contents of phytohormones in *P. haitanensis* at different high temperature

1. SA; 2. JA; 3. IAA; 4. TZR; 5. iPA; 6. iP; 7. MeJA. Values with different small letter superscripts mean significant differences($P<0.05$). The same below

从胁迫防御方面分析, 对于植物病害的信号分子以及信号传导的研究过程中, 水杨酸和茉莉酸的信号通路调控作用尤为重要^[32-34]。植物的防御反应机制中, 水杨酸作为植物产生系统获得性抗性的内源信号, 当植物受到病原体或非生物因素影响时, 植物体局部水杨酸含量增加, 促进抗逆蛋白合成、提高渗透调节能力和抗氧化能力, 并伴有一些防卫相关蛋白的表达^[35]; 茉莉酸作为内源信号分子参与生物因子和非生

物因子逆境胁迫的信号传递, 能够在机体受到损伤后 2 min 迅速累积, 局部诱导伤害叶片中茉莉酸反应基因的表达达到胁迫防御作用^[36]。茉莉酸甲酯可作为一种内源信号分子参与植物的防御反应, 它易透过细胞膜、可挥发、不易被离子化。因此除了作为细胞内的信号分子, 还能在植株内和植株间通过空气传递信号。在诸多报道中, 水杨酸与茉莉酸的调控并不是单独进行的, 而是存在着相互诱导与抑制作用^[37-38]。

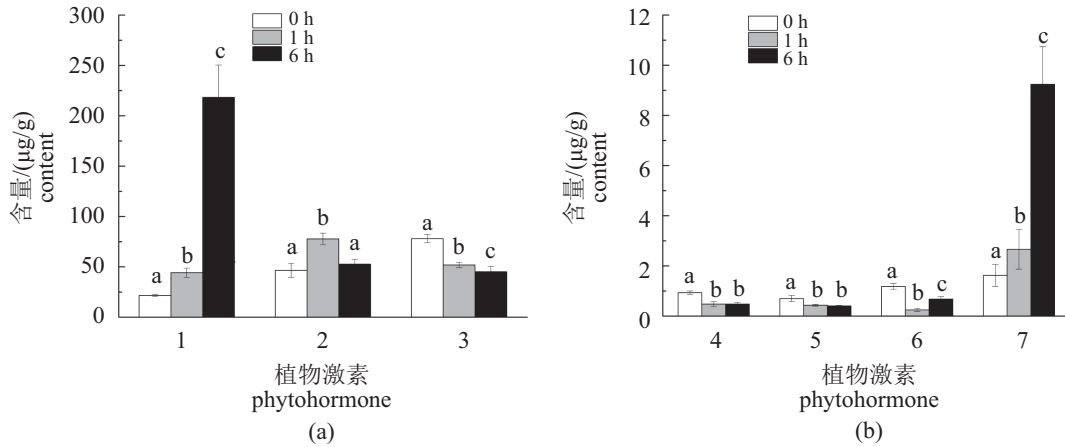


图 4 不同胁迫时间下的坛紫菜植物激素种类和含量

Fig. 4 The contents of phytohormones in *P. haitanensis* for different stimulated time

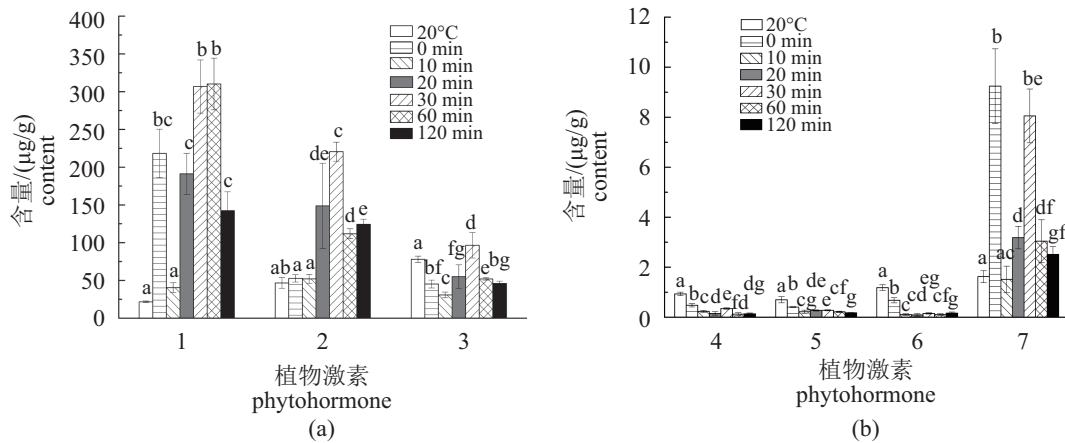


图 5 恢复培养过程中的坛紫菜植物激素种类和含量

Fig. 5 The contents of phytohormones in *P. haitanensis* under recover procedure

在胁迫条件为25 °C下高温胁迫1 h时，水杨酸的含量降低，茉莉酸和茉莉酸甲酯的含量升高，可能是茉莉酸对水杨酸调控作用的抑制。随着胁迫程度的增强，水杨酸的含量显著升高，而茉莉酸的含量变化不显著，甚至在28 °C下高温胁迫1 h时出现下降现象。由此推测，在高温胁迫起始时，坛紫菜以茉莉酸的防御调控作用为主；当高温胁迫程度加深时，坛紫菜以水杨酸的防御调控作用为主。茉莉酸与其衍生物茉莉酸甲酯在不同胁迫条件下的变化也有较大差异，随着胁迫温度升高，坛紫菜中茉莉酸含量逐渐上升，而茉莉酸甲酯含量变化较小，这说明二者中茉莉酸对高温胁迫强度更为敏感。分析发现随着高温胁迫时间的延长，茉莉酸含量先升后降，而茉莉酸甲酯含量逐渐升高；茉莉

酸在茉莉酸羧基甲基转移酶(JA carboxyl methyl transferase, JMT)作用下能够催化形成具有挥发性的茉莉酸甲酯^[39]进行胁迫防御，因此随着胁迫时间的延长，茉莉酸可能代谢转移为茉莉酸甲酯。而35 °C中检测到的7种植物激素含量的统一下降，推测是由于35 °C刺激1 h，坛紫菜难以生存，出现藻体不可逆损伤，导致植物激素含量的下降。将经过28 °C胁迫6 h后的坛紫菜进行恢复培养，结果显示20 °C培养10 min时，出现了胁迫抑制类激素含量的显著下降；恢复培养20 min以后，胁迫抑制类激素的含量逐渐升高，这说明藻体经高温胁迫损伤后，在适宜环境下逐渐开始自身的修复。在恢复培养至120 min时，胁迫抑制类激素含量虽然出现下降，但仍然高于对照组水平，可能由藻体的不可逆损伤或恢复

培养时间不足引起。

综上所述, 在高温胁迫过程中, 坛紫菜的“促进生长类”激素含量随着胁迫程度的增强而降低, “胁迫抑制类”激素含量随着胁迫程度的增强而升高。高温胁迫下的坛紫菜, 在两类激素的共同调控下进行胁迫防御, 维持自身生长。然而坛紫菜的防御能力有限, 因此高温胁迫引起的藻体自损伤是否能够修复, 有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] 汤学军. 我国海藻产业的现状分析和对策[J]. 水产科技, 2003(2): 8-12.
Tang X J. Studies on the present status and development solution of seaweed industry in China[J]. Fishery Sciences & Technology, 2003(2): 8-12(in Chinese).
- [2] 吴宏肖, 严兴洪, 宋武林, 等. 坛紫菜与 *Pyropiaradi* 种间杂交重组优良品系的选育与特性分析[J]. 水产学报, 2014, 38(8): 1079-1088.
Wu H X, Yan X H, Song W L, *et al.* Selection and characterization of an improved strain produced by genetic recombinant of interspecific hybridization between *Pyropia haitanensis* and *Pyropiaradi*[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(8): 1079-1088(in Chinese).
- [3] Blouin N A, Brodie J A, Grossman A C, *et al.* *Porphyra*: a marine crop shaped by stress[J]. Trends in Plant Science, 2010, 16(1): 29-37.
- [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] Fatma M, Khan M, Masood A, *et al.* Coordinate changes in assimilatory sulfate reduction are correlated to salt tolerance: involvement of phytohormones[J]. Annual Review & Research in Biology, 2013, 3(3): 267-295.
- [6] Iqbal N, Nazar R, Khan I R, *et al.* Role of gibberellin regulation of source- sink relations under optimal and limiting environmental conditions[J]. Current Science, 2011, 100(7): 998-1007.
- [7] Gurmani A R, Bano A, Ullah N, *et al.* Exogenous abscisic acid (ABA) and silicon (Si) promote salinity tolerance by reducing sodium (Na⁺) transport and bypass flow in rice (*Oryza sativa indica*)[J]. Australian Journal of Crop Science, 2013, 7(9): 1219-1226.
- [8] Nazar R, Iqbal N, Syeed S, *et al.* Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under salt stress by enhancing nitrogen and sulfur assimilation and antioxidant metabolism differentially in two mungbean cultivars[J]. Journal of Plant Physiology, 2011, 168(8): 807-815.
- [9] Khan M I R, Khan N A. Salicylic acid and jasmonates: approaches in abiotic stress tolerance[J]. Journal of Plant Biochemistry & Physiology, 2013, 1(4): e113.
- [10] Khan M I, Iqbal N, Masood A, *et al.* Salicylic acid alleviates adverse effects of heat stress on photosynthesis through changes in proline production and ethylene formation[J]. Plant Signaling & Behavior, 2013, 8(11): e26374.
- [11] Harman G E, Howell C R, Viterbo A, *et al.* Trichoderma species-opportunistic, avirulent plant symbionts[J]. Nature Reviews Microbiology, 2004, 2(1): 43-56.
- [12] Bray E A. Abscisic acid regulation of gene expression during water-deficit stress in the era of the *Arabidopsis* genome[J]. Plant, Cell & Environment, 2002, 25(2): 153-161.
- [13] Conrath U. Systemic acquired resistance[J]. Plant Signaling & Behavior, 2006, 1(4): 179-184.
- [14] Morillon R, Chrispeels M J. The role of ABA and the transpiration stream in the regulation of the osmotic water permeability of leaf cells[J]. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 2001, 98(24): 14138-14143.
- [15] Zeid I M. Response of bean (*Phaseolus vulgaris*) to exogenous putrescine treatment under salinity stress[J]. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2004, 7(2): 219-225.
- [16] Tarakhovskaya E R, Maslov Y I, Shishova M F. Phytohormones in algae[J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2007, 54(2): 163-170.
- [17] Yokoya N S, Stirk W A, van Staden J, *et al.* Endogenous cytokinins, auxins, and abscisic acid in red algae from Brazil[J]. Journal of Phycology, 2010, 46(6): 1198-1205.
- [18] 朱招波, 孙雪, 徐年军, 等. 水杨酸对龙须菜抗高温生理的影响[J]. 水产学报, 2012, 36(8): 1304-1312.
Zhu Z B, Sun X, Xu N J, *et al.* Effects of salicylic acid on the resistance of *Gracilaria/Gracilariopsis lemaneiformis*

- formis* to high temperature[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(8): 1304-1312(in Chinese).
- [19] 范美华, 孙雪, 王日昕, 等. 浒苔中MnSOD和CAT基因克隆和表达分析[J]. 水产学报, 2014, 38(12): 1976-1984.
Fan M H, Sun X, Wang R X, *et al.* Gene cloning and expression analysis of MnSOD and CAT from *Ulva prolifera*[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(12): 1976-1984(in Chinese).
- [20] 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[J]. 水生生物学报, 2013, 37(3): 535-540.
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(in Chinese).
- [21] 严兴洪, 王素娟. 温度, 光强和盐度对坛紫菜体细胞发育的影响[J]. 热带海洋, 1993, 12(1): 94-99.
Yan X H, Wang S J. The effects of temperature, light intensity and salinity on the development of somatic cells from *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta)[J]. Tropical Oceanology, 1993, 12(1): 94-99(in Chinese).
- [22] Świątek A, Lenjou M, Van Bockstaele D, *et al.* Differential effect of jasmonic acid and abscisic acid on cell cycle progression in tobacco BY-2 cells[J]. Plant Physiology, 2002, 128(1): 201-211.
- [23] Okamoto M, Tsuboi Y, Goda H, *et al.* Multiple hormone treatment revealed novel cooperative relationships between abscisic acid and biotic stress hormones in cultured cells[J]. Plant Biotechnology, 2012, 29(1): 19-34.
- [24] Park W K, Yoo G, Moon M, *et al.* Phytohormone supplementation significantly increases growth of *Chlamydomonas reinhardtii* cultivated for biodiesel production[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013, 171(5): 1128-1142.
- [25] Piotrowska-Niczyporuk A, Bajguz A. The effect of natural and synthetic auxins on the growth, metabolite content and antioxidant response of green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae)[J]. Plant Growth Regulation, 2013, 73(1): 57-66.
- [26] Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance[J]. Trends in Plant Science, 2002, 7(9): 405-410.
- [27] Vidoudez C, Pohnert G. Comparative metabolomics of the diatom *Skeletonema marinoi* in different growth phases[J]. Metabolomics, 2012, 8(4): 654-669.
- [28] 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.
- [29] Splivallo R, Novero M, Berteaux C M, *et al.* Truffle volatiles inhibit growth and induce an Oxidative Burst in *Arabidopsis thaliana*[J]. New Phytologist, 2007, 175(3): 417-424.
- [30] Bendera M, Ekesi S, Ndung'u M, *et al.* A major host plant volatile, 1-octen-3-ol, contributes to mating in the legume pod borer, *Maruca vitrata* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae)[J]. The Science of Nature, 2015, 102: 47.
- [31] Oikawa P Y, Lerdau M T. Catabolism of volatile organic compounds influences plant survival[J]. Trends in Plant Science, 2013, 18(12): 695-703.
- [32] Li L, Li C Y, Howe G A. Genetic analysis of wound signaling in tomato. Evidence for a dual role of jasmonic acid in defense and female fertility[J]. Plant Physiology, 2001, 127(4): 1414-1417.
- [33] Linkies A, Leubner-Metzger G. Beyond gibberellins and abscisic acid: how ethylene and jasmonates control seed germination[J]. Plant Cell Reports, 2012, 31(2): 253-270.
- [34] Stitz M, Gase K, Baldwin I T, *et al.* Ectopic expression of *AtJMT* in *Nicotiana attenuata*: creating a metabolic sink has tissue-specific consequences for the jasmonate metabolic network and silences downstream gene expression[J]. Plant Physiology, 2011, 157(1): 341-354.
- [35] Delaney T P, Uknes S, Vernooij B, *et al.* A central role of salicylic acid in plant disease resistance[J]. Science, 1994, 266(5118): 1247-1250.
- [36] Glauser G, Dubugnon L, Mousavi S A R, *et al.* Velocity estimates for signal propagation leading to systemic jasmonic acid accumulation in wounded *Arabidopsis*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(50): 34506-34513.
- [37] Spoel S H, Koornneef A, Claessens S M C, *et al.* NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol[J]. The Plant Cell, 2003, 15(3): 760-770.

- [38] Mur L A J, Kenton P, Atzorn R, *et al.* The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death[J]. *Plant Physiology*, 2006, 140(1): 249-262.
- [39] Seo H S, Song J T, Cheong J J, *et al.* Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(8): 4788-4793.

The profiling of eleven phytohormones in *Pyropia haitanensis* under different high-temperature environments

SONG Yue, CUI Xiaoshan, CHEN Juanjuan, YANG Rui*, YAN Xiaojun

(School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: In order to investigate the relationship between the high temperature resistance and variation of phytohormones under high temperature environment, thalli of *Pyropia haitanensis*, Zhedong No. 1, collected from Xiangshan, Ningbo were used as experimental materials. And a method using high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry in selective reaction mode was developed, to analyse the variations of 11 kinds of phytohormones of *P. haitanensis* under different high temperature environments. The results showed that there were totally 7 kinds of phytohormones detected in the *P. haitanensis* under different high temperature environments, including N₆-(2-isopentenyl) adenosine, N₆-(2-isopentenyl)adenine, *trans*-zeatinriboside, indole-3-acetic acid, jasmonic acid, salicylic acid and methyl jasmonate. At the different high temperature 20, 25, 28 and 35 °C, the contents of methyl jasmonate and jasmonic acid were increased as the stimulated temperature rose. While the contents of N₆-(2-isopentenyl) adenosine, N₆-(2-isopentenyl) adenine, *trans*-zeatinriboside and indole-3-acetic acid in high temperature group were lower than those of control group and showing the decreased trends. When at the different heat shock time, as the stimulated time increased, the contents of N₆-(2-isopentenyl) adenosine, N₆-(2-isopentenyl)adenine, *trans*-zeatinriboside, indole-3-acetic acid were reduced, while the contents of salicylic acid and methyl jasmonate were increased by comparing to that of control group. However, the content of jasmonic acid was increased, then decreased at 6h to that of control group. In the recovery procedure, the contents of indole-3-acetic acid, jasmonic acid, salicylic acid and methyl jasmonate were decreased, then increased, finally decreased again. For N₆-(2-isopentenyl) adenosine, N₆-(2-isopentenyl)adenine and *trans*-zeatinriboside, the contents of them were reduced gradually. Under high-temperature stress, the stress responses of *P. haitanensis* are co-regulated by positive growth regulator phytohormones and stress phytohormones to maintain its growth. However, the defense capacity of *P. haitanensis* is limited and it might be difficult for algae to repair its damage caused by high-temperature stress.

Key words: *Pyropia haitanensis*; high-temperature treatment; phytohormone; LC-MS

Corresponding author: YANG Rui. E-mail: yangrui@nbu.edu.cn

Funding projects: China Spark Program (2015GA701027); Natural Science Foundation of Zhejiang Province of China (LY17D060002); Grant of Science Technology Department of Zhejiang Province (2016C37090); K. C. Wong Magna Fund in Ningbo University