



海藻糖对高温胁迫龙须菜的生理及基因表达的影响

陈文康, 张莹莹, 卢俊, 徐年军, 孙雪*

(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 315832)

摘要: 为了探讨海藻糖在大型藻类抗逆中的作用及其机制, 实验利用生理生化分析、高效液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS)、荧光定量 PCR (qRT-PCR) 方法分析了外源海藻糖对高温胁迫下大型海藻龙须菜生长、抗逆相关物质和酶活性、植物激素及相关基因表达的影响。结果发现, 外源添加 10 mmol/L 海藻糖使龙须菜的相对生长速率和脯氨酸含量分别升高 0.34 倍 (3 d) 和 0.30 倍 (24 h), 叶绿素荧光参数、超氧化物歧化酶和海藻糖-6-磷酸合成酶活性升高, 但丙二醛含量和脂氧合酶 (LOX) 活性降低。同时, 海藻糖激活了龙须菜中水杨酸代谢关键酶——异分支酸合成酶的活性及其基因表达, 促进了水杨酸的积累 (2.05 倍)。此外, 海藻糖可以使热激蛋白 70 基因表达稳定升高、*lox2* 基因表达下调 (12 h)。可见, 外源海藻糖可以通过清除活性氧自由基, 降低膜脂过氧化, 促进渗透保护物质和抗逆植物激素水杨酸的积累等来促进高温下龙须菜的生长。本研究证明了海藻糖在龙须菜抗高温胁迫中具有重要作用, 为龙须菜的抗逆育种工作提供了参考。

关键词: 龙须菜; 海藻糖; 高温; 生理; 基因表达

中图分类号: Q 786; S 968.43

文献标志码: A

龙须菜 (*Gracilariopsis lemaneiformis*) 为红藻门 (Rhodophyta)、江蓠目 (Gracilariales) 的一种大型海洋红藻。龙须菜不仅是琼胶提取的主要原料, 也是鲍养殖的饵料。野生型龙须菜的最适生长温度为 10~23 °C, 耐高温龙须菜 981 的最适生长温度为 12~26 °C^[1]。在我国南方海域, 夏季海水温度过高导致龙须菜无法成功度夏, 因而限制了龙须菜的栽培周期、产量和经济效益。

海藻糖是一种非还原性二糖, 广泛存在于细菌、真菌、昆虫、无脊椎动物和高等植物中。目前已知的海藻糖合成途径有 5 条, 其中 OtsA-OtsB 途径是高等植物中唯一的海藻糖合成途径。在此合成途径中, 首先由海藻糖-6-磷酸合成酶 (TPS) 催化尿苷二磷酸-葡萄糖与葡萄糖-6-磷酸反

应生成海藻糖-6-磷酸 (T6P), 然后由海藻糖磷酸酶 (TPP) 催化 T6P 脱磷酸形成海藻糖^[2]。研究表明, 海藻糖及其代谢物 T6P 是调控植物生长发育和逆境响应的信号分子^[3-4]。

生物在面临盐度、干旱、低温等非生物胁迫时, 海藻糖可作为渗透保护剂来稳定生物结构, 因而在对抗逆境胁迫中发挥了重要作用^[5]。研究表明, 15 mmol/L 海藻糖可提高甘草 (*Glycyrrhiza uralensis*) 幼苗的抗氧化酶活性和渗透调节物质含量等, 促进盐胁迫下幼苗的生长^[6]。海藻糖与生物干燥失水的耐受力极度相关, 其含量的增加可使酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 从极端干燥敏感性转变为高干燥耐受性^[7]。海藻糖对热非常稳定, 如有研究发现, 50 mmol/L 海藻糖提高了

收稿日期: 2022-04-24 修回日期: 2022-05-28

资助项目: 国家重点研发计划 (2018YFD0901502); 宁波市重大科技创新项目 (2019B10009); 宁波市重大科技攻关项目 (2021Z114, 2022Z172)

第一作者: 陈文康 (照片), 从事藻类生化与分子生物学研究, E-mail: 1311811067@qq.com

通信作者: 孙雪, 从事藻类生化与分子生物学研究, E-mail: sunxue@nbu.edu.cn



酿酒酵母在 53 °C 高温下的存活率, 可能与海藻糖积累引起的活性氧自由基 (ROS) 水平下降和脂质过氧化损伤的降低相关^[8]。海藻糖还可以通过增强抗氧化系统、激活光合作用和改善细胞结构来减轻夏季高温对芍药 (*Paeonia lactiflora*) 的损伤^[9]。

尽管海藻糖具有较重要的生物学作用, 但是大多数生物体内的海藻糖含量很低, 且在不同物种中其含量差异较大。在藻类中, 紫菜属 (*Porphyra*) 中海藻糖含量极低, 甚至检测不出^[10]。而龙须菜中海藻糖丰度较高, 可达 1~3 mg/g 干重 (DW)^[11]。藻类中关于海藻糖及其生物学功能的研究较少。因此, 本实验拟探究外源海藻糖对高温胁迫下龙须菜的生长、抗逆相关物质及其代谢酶活性等生理指标和相关基因转录表达的影响, 以揭示海藻糖对高温胁迫条件下龙须菜的影响, 为今后提高龙须菜抗逆性的育种工作提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料培养与实验设计

本实验材料龙须菜 981 采自福建霞浦龙须菜栽培基地。首先将龙须菜用海水充分清洗以去除藻体表面附着的泥沙、附生藻类等, 然后取长度为 10~15 cm 的幼嫩藻体再次清洗后放在人工海水中进行适应性培养, 培养温度为 23 °C, 光照强度约为 40 μmol/(m²·s), 光周期为 12 L : 12 D。

高温胁迫实验在 33 °C 培养箱中进行, 其他培养条件同适应性培养。实验设置 5 个组, 添加海藻糖至终浓度分别为 0、5、10、20 和 40 mmol/L, 每个组设 3 个生物学重复。比较各组中龙须菜的相对生长速率后, 选取生长最快的 10 mmol/L 用作后续实验中海藻糖添加浓度 (记为海藻糖组), 添加 0 mmol/L 海藻糖的为对照组。在 0、12、24 和 48 h 分别取样进行丙二醛 (MDA)、脯氨酸和水杨酸 (SA) 含量及超氧化物歧化酶 (SOD) 等活性测定。在 0、3、6 和 12 h 分别取样进行荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析。

1.2 相对生长速率测定和藻体观察

分别在第 1、3 和 5 天准确称量龙须菜藻体的鲜重 (FW), 按照以下公式计算龙须菜的相对生长速率 (RGR, %/d): $RGR = (\ln W_t - \ln W_0) / t \times 100\%$ 。式中, W_0 和 W_t 分别为开始培养和培养第 t 天时藻体鲜重, t 为实验天数 (d)^[12]。同时, 在培养的第 3 天观察藻体状态并拍照。

1.3 叶绿素荧光参数测定

分别在第 0、24、48 和 72 小时, 取样进行叶绿素荧光参数的测定。选取 3 根幼嫩龙须菜进行 15 min 暗处理后, 用 AquaPen-C AP-C 100 便携式调制脉冲荧光仪 (FESTO, 捷克) 测定 PS II 最大光化学效率 (F_v/F_m) 和非光化学淬灭 (NPQ)。

1.4 MDA 和脯氨酸含量测定

准确称取 0.1 g 龙须菜样品, 在液氮中研磨成粉末, 加入一定体积的提取缓冲液混匀后, 以 5 000×g (4 °C) 离心 10 min, 上清液即可用于含量测定。MDA 和脯氨酸含量测定分别使用硫代巴比妥酸法和磺基水杨酸法, 其操作步骤均按照南京建成生物工程研究所的试剂盒进行。

1.5 SOD 和脂氧合酶 (LOX) 活性测定

准确称取 0.1 g 龙须菜, 在液氮中研磨成粉末, 加入 0.9 mL 磷酸盐缓冲液 (PBS) (0.1 mol/L, pH 7.4), 混匀后在 4 000×g 离心 10 min (4 °C), 所得上清液用于 SOD 活性测定 (南京建成生物工程研究所)。将在液氮中研成粉末的龙须菜样品用 1 mL 提取液提取, 然后在 16 000×g 离心 20 min (4 °C), 上清液用于 LOX 活性测定 (苏州科铭生物技术有限公司)。

1.6 TPS 和异分支酸合成酶 (ICS) 活性测定

准确称取 0.1 g 龙须菜, 在液氮中研磨成粉末, 然后用 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5) 进行提取。将提取液以 13 000×g (4 °C) 离心 5 min, 上清液即为酶的提取液。参考 Hottiger 等^[13] 的方法进行 TPS 活性测定。在与上述相同研磨操作后的样品粉末中, 加入一定量的 PBS 进行提取, 使用双抗体夹心法进行 ICS 活性测定 (上海科兴生物科技有限公司)。

1.7 SA 含量测定

将 5 g 龙须菜在冷冻干燥机中干燥, 然后在液氮中研磨成粉末, 参考 Li 等^[14] 的方法进行样品处理。将甲醇/水/甲酸 (15 : 4 : 1, 体积比) 提取的样品用于 HPLC-MS/MS 分析。利用 Thermo Scientific Dionex UltiMate 3 000 液相色谱仪, 其色谱条件: 流动相 A 为水 (加入 10 mmol/L 乙酸铵), 流动相 B 为甲醇。进样量为 3 μL, 洗脱总时间为 40 min, 流动相流速为 0.2 mL/min, 柱温 30 °C。使用 Q-Exactive 静电场轨道阱高分辨质谱仪

(Thermo Fisher 公司, 美国) 进行质谱分析, 其分析条件为负离子模式, 喷雾电压为 3.5 kV, 离子传输管温度为 350 °C, 鞘气压 35 arb, 辅助气压 10 arb。

1.8 qRT-PCR 分析

先按照 Plant RNA Kit (OMEGA) 说明进行龙须菜总 RNA 的提取, 再使用 iScript cDNA Syn-

thesis Kit (BIO-RAD) 逆转录试剂盒进行反转录, 合成的 cDNA 用作 qRT-PCR 的模板。

利用本课题组已使用的龙须菜热激蛋白 70 (*hsp70*)、*lox*、*ics* 基因引物序列 (表 1), 在 Eppendorf mastercycler ep realplex2 PCR 仪中进行 PCR 扩增。使用 *actin* 作为内参, 反应体系和程序同孙鹏等^[15]。根据各基因的循环阈值, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算其相对表达量。

表 1 荧光定量 PCR 引物信息

Tab. 1 qRT-PCR primer information

基因名称 gene name	引物名称 primer name	引物序列(5'-3') primer sequence(5'-3')	扩增长度/bp amplification length
<i>actin</i>	actin-F	CTGAGGAGTTTGAAAGGGAGA	203
	actin-R	AATGTCGCGGTCTTGATAG	
<i>hsp70</i>	hsp70-F	ATGCTGGTCAGATAGCTGGATTA	199
	hsp70-R	AAACACCATCTCCGACTTCTA	
<i>lox1</i>	lox1-F	TGGGCCGATTATTGGGTTCTG	173
	lox1-R	TGGCGATTGGATTCAAGTAG	
<i>lox2</i>	lox2-F	CTTCTACGGAACCTGTCTCATTA	167
	lox2-R	CTTTGCTGGCATTCACTCAT	
<i>ics</i>	ics-F	CGCGGATCCATGACTGAGCAACTTTCTATATCGT	130
	ics-R	CGCGTCGACTCAAGAGTTTGGCAGACTTTTCGTGT	

1.9 数据分析

使用 Excel 2020 软件进行数据分析和作图, 实验数据以平均值±标准差 (mean±SD) 表示 ($n=3$)。利用 SPSS 23 软件进行单因素方差 (One-Way ANOVA) 和 Tukey 检验, $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 海藻糖对龙须菜生长和藻体状态的影响

海藻糖的添加显著影响了高温胁迫龙须菜的生长 (图 1)。随着海藻糖浓度的升高, 其生长速率呈先上升后下降的趋势。在 5 个组中, 5 和 10 mmol/L 海藻糖处理组龙须菜生长最快, 且之间无显著差异。在第 1、3 和 5 天时, 10 mmol/L 海藻糖添加组龙须菜的相对生长速率分别比对照组升高 27.76%、34.64% 和 31.41% ($P<0.05$)。

海藻糖的添加也影响了藻体的生长状况。在高温胁迫 3 天时, 对照组中藻体部分变白, 且有藻段脱落 (图 2-a)。而 10 mmol/L 海藻糖组藻体无明显变白腐烂现象, 且藻体呼吸旺盛, 产生大量气泡 (图 2-b)。

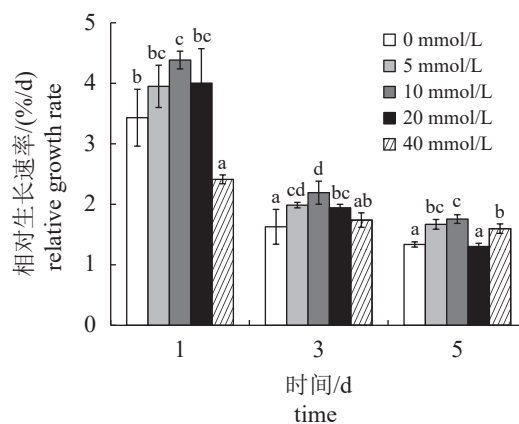


图 1 海藻糖对高温胁迫下龙须菜生长的影响

不同小写字母表示相同时间点不同组之间差异显著 ($P<0.05$); 下同。

Fig. 1 Effects of trehalose on the growth of *G. lemaneiformis* under high temperature stress

Different lowercase letters indicate significant differences between different groups at the same time ($P<0.05$), the same below.

2.2 海藻糖对龙须菜叶绿素荧光参数的影响

龙须菜中 F_v/F_m 在 0~72 h 内随时间增加呈现先降后升再降的趋势在 0~72 h 内随时间增加呈现先降后升再降的趋势 (图 3-a), 在 48 和 72 h 时,

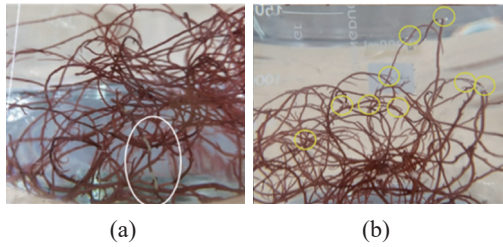


图 2 海藻糖对高温胁迫下龙须菜藻体状态的影响
(a) 对照组, 白色圈出部分为腐烂变白藻体; (b) 海藻糖组, 黄色圈出部分为气泡。

Fig. 2 Effects of trehalose on the thalli of *G. lemaneiformis* under high temperature stress

(a) control group, the white thalli are marked in the white circle; (b) trehalose group, the air bubbles are marked in the yellow circles.

海藻糖组中藻体 F_v/F_m 分别是对照组的 1.03 倍和 1.04 倍 ($P < 0.05$)。与 F_v/F_m 变化趋势不同, 在 24 h 时两组藻 NPQ 均无明显变化, 随后呈上升趋势, 在 48 h 时海藻糖组比对照组藻体 NPQ 升高 44.44% ($P < 0.05$) (图 3-b)。

可见, 外源添加海藻糖能在一定程度上提高龙须菜在高温胁迫下的 PS II 最大光化学效率和 NPQ 参数, 以保护龙须菜免受高温胁迫的损伤。

2.3 海藻糖对龙须菜 MDA 和脯氨酸含量的影响

高温对龙须菜中 MDA 含量的影响结果显示, 在对照组中, 高温胁迫对藻体的细胞膜造成一定损伤, MDA 含量呈增长趋势, 而海藻糖组仅在 48 h 时藻体中 MDA 含量增加。但与对照组相比, 海藻糖组藻体 MDA 含量降低。在 12~48 h 内, 海

藻糖组 MDA 含量分别比相应时间点的对照组降低 23.25%、31.10% 和 30.94% ($P < 0.05$) (图 4-a)。可见, 添加海藻糖可减少高温引起的龙须菜中 MDA 的积累和细胞膜受损程度。

高温胁迫显著促进了 2 组龙须菜脯氨酸含量的升高 (图 4-b)。并且海藻糖组藻体的脯氨酸含量始终高于对照组。在 12、24 和 48 h 脯氨酸含量分别是对照组相应时间点的 1.26 倍、1.30 倍和 1.27 倍 ($P < 0.05$)。可见, 10 mmol/L 海藻糖添加更进一步促进了高温胁迫下龙须菜中脯氨酸的积累。

2.4 海藻糖对龙须菜 SOD 和 LOX 活性的影响

海藻糖的添加促进了龙须菜中 SOD 活性升高。在 12、24 和 48 h 时海藻糖组 SOD 活性分别比对照组高 6.53%、6.03% 和 6.50% (图 5-a), 且均差异显著。可见, 外源海藻糖可激活藻体 SOD 活性, 启动抗氧化防御机制来清除高温产生的活性氧自由基。

海藻糖的添加对龙须菜 LOX 活性的影响如图 5-b 所示, 在 12 和 24 h 时, 海藻糖组藻的 LOX 活性分别比对照组降低 10.07% 和 13.54%, 但差异不显著。到 48 h 时, 海藻糖组藻的 LOX 活性比对照组降低 17.28% ($P < 0.05$)。该结果表明, 海藻糖可以在一定程度上抑制龙须菜 LOX 活性的升高。

2.5 海藻糖对龙须菜 TPS 和 ICS 活性的影响

海藻糖的添加对龙须菜中 TPS 活性影响比较显著, 随处理时间延长呈先升后降的趋势, 但均

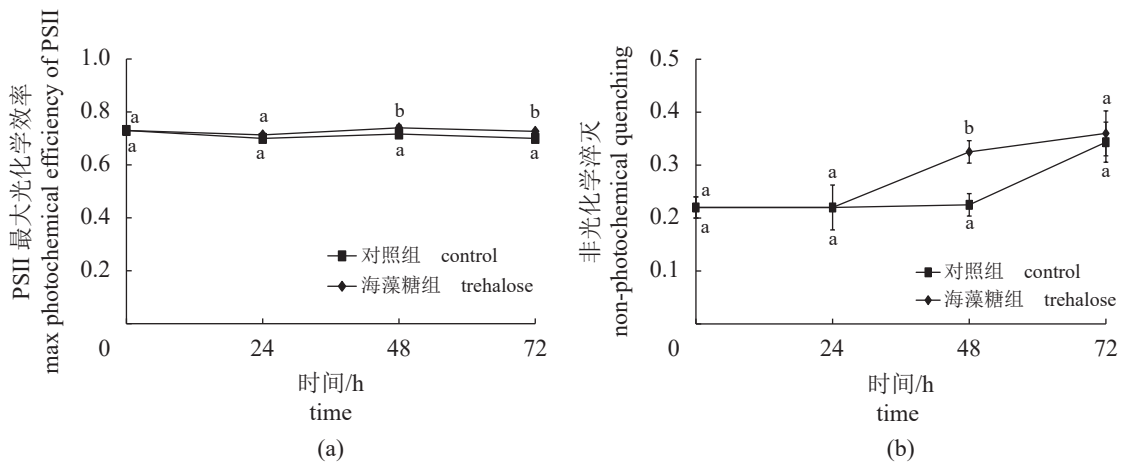


图 3 海藻糖对高温胁迫下龙须菜叶绿素荧光参数的影响

(a) PS II 最大光化学效率, (b) 非光化学淬灭。

Fig. 3 Effects of trehalose on the chlorophyll fluorescence parameters of *G. lemaneiformis* under high temperature stress

(a) maximum photochemical efficiency of PS II, (b) non-photochemical quenching.

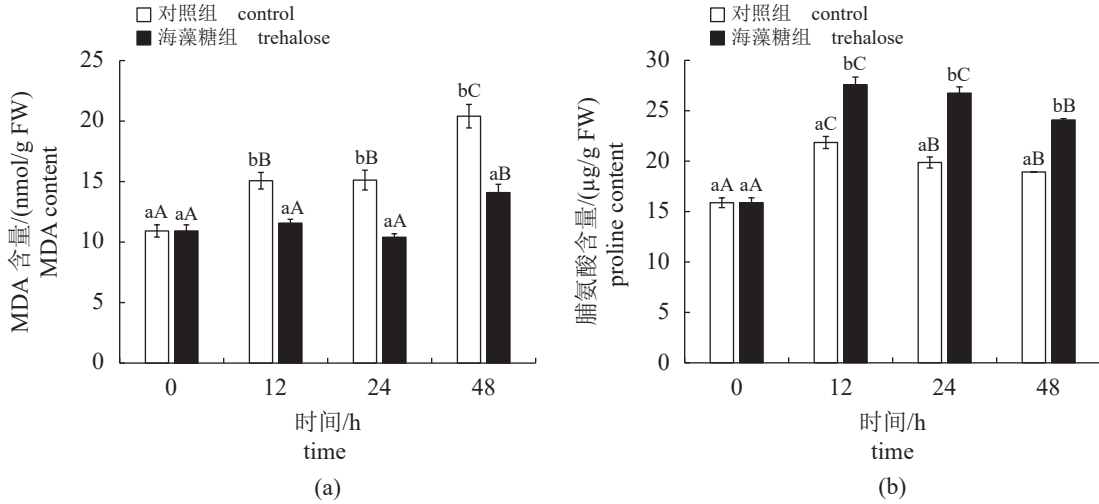


图 4 海藻糖对高温胁迫下龙须菜 MDA (a) 和脯氨酸 (b) 含量的影响

不同小写字母表示相同时间点不同组之间差异显著, 不同大写字母表示同组中不同时间点之间差异显著 ($P < 0.05$), 下同。

Fig. 4 Effects of trehalose on the contents of MDA (a) and proline (b) of *G. lemaneiformis* under high temperature stress

Different lowercase letters indicate significant differences between different groups at the same time, and different capital letters indicate significant differences between different times in the same group ($P < 0.05$), the same below.

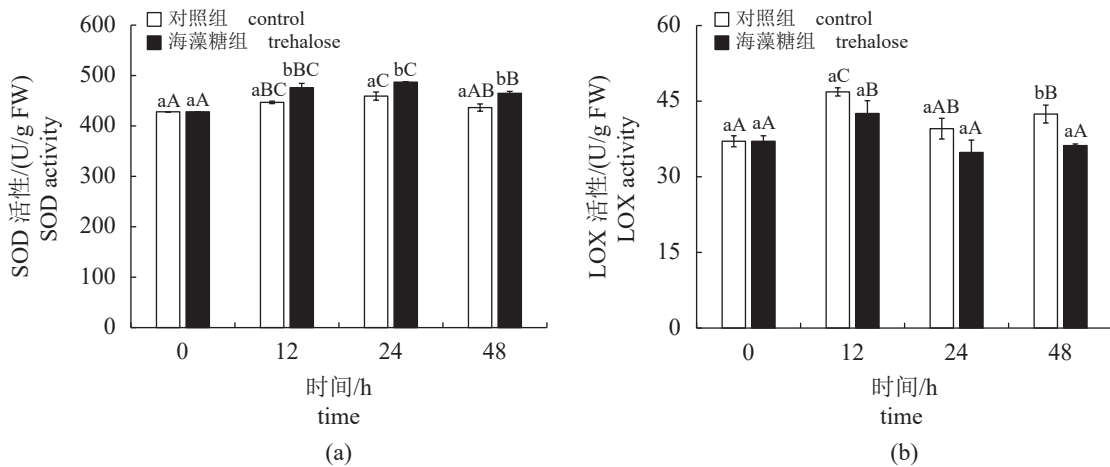


图 5 海藻糖对高温胁迫下龙须菜 SOD (a) 和 LOX (b) 活性的影响

Fig. 5 Effects of trehalose on the activities of SOD (a) and LOX (b) of *G. lemaneiformis* under high temperature stress

高于 0 h。在 12 和 24 h 时, TPS 活性分别是对照组相应时间点的 2.48 倍和 2.91 倍 ($P < 0.05$); 而在 48 h 时, 2 组藻体的 TPS 活性无显著差异 (图 6-a)。

在高温条件下, 龙须菜 ICS 活性随时间变化呈上升趋势。在 12、24 和 48 h, 海藻糖组龙须菜 ICS 活性分别比对照组升高 37.42%、11.44% 和 18.53% ($P < 0.05$) (图 6-b)。可见, 海藻糖的补充可以提高高温胁迫下龙须菜 TPS 和 ICS 的活性。

2.6 海藻糖对龙须菜 SA 含量的影响

在高温条件下, 龙须菜 SA 含量变化结果显示, 在 12 h 时, 海藻糖组龙须菜 SA 含量略低于

对照组 ($P < 0.05$); 在 24 和 48 h 时, 海藻糖组 SA 含量显著增加至对照组的 1.20 倍和 2.05 倍 ($P < 0.05$) (图 7)。可见龙须菜中 SA 含量变化较慢, 长时间海藻糖处理会促进 SA 的积累。

2.7 海藻糖添加后龙须菜 *hsp70* 和 *ics* 基因表达的变化

在高温胁迫的 12 h 内, 对照组龙须菜 *hsp70* 相对表达量快速上升后下降, 在 6 h 达到最大值 (为 0 h 的 19.93 倍); 而海藻糖组 *hsp70* 表达量则缓慢上升 (图 8-a)。在 3 和 6 h 时, 对照组中龙须菜 *hsp70* 表达量均高于海藻糖组, 分别为其 1.77

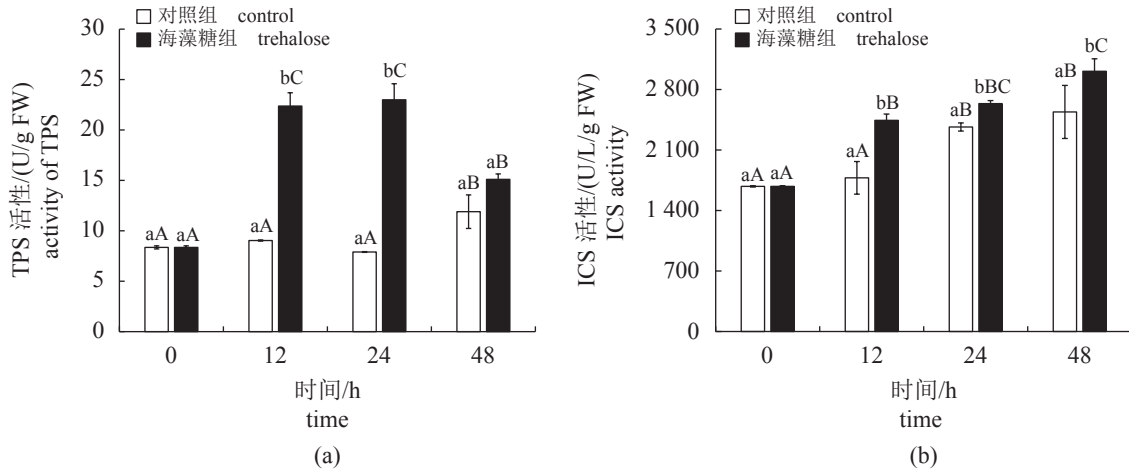


图 6 海藻糖对高温胁迫下龙须菜 TPS (a) 和 ICS (b) 活性的影响

Fig. 6 Effects of trehalose on the activities of TPS (a) and ICS (b) of *G. lemaneiformis* under high temperature stress

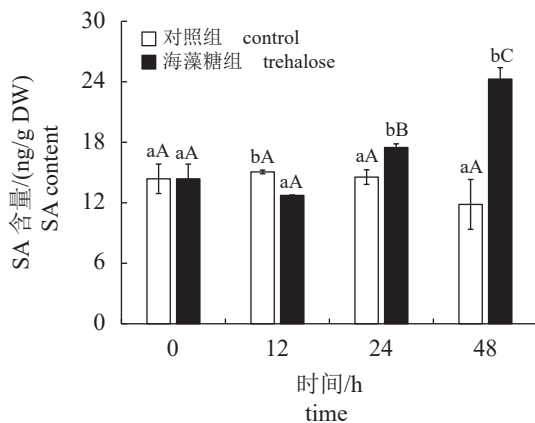


图 7 海藻糖对高温胁迫下龙须菜 SA 含量的影响

Fig. 7 Effects of trehalose on the SA content of *G. lemaneiformis* under high temperature stress

倍和 1.87 倍 ($P < 0.05$)。在 12 h 时, 海藻糖组龙须菜 *hsp70* 的表达量显著高于对照组 (2.34 倍, $P < 0.05$)。以上结果表明, 高温刺激可使 *hsp70* 表达量快速增加, 而外源海藻糖能够促使 *hsp70* 表达量缓慢稳定升高。

在 33 °C 胁迫下, 对照组和海藻糖组龙须菜 *ics* 基因表达水平变化趋势基本一致, 均随时间延长而逐渐升高 (图 8-b)。在 3 h 时, 海藻糖组 *ics* 表达量比对照组降低 32.44% ($P < 0.05$); 在 6 h 时, 两组 *ics* 基因表达量差异不显著 ($P > 0.05$); 在 12 h 时, 海藻糖组 *ics* 基因表达量比对照组升高 22.8% ($P < 0.05$)。该结果表明, 长时间海藻糖处理可促进龙须菜 *ics* 基因的表达。

2.8 海藻糖添加后龙须菜 *lox* 基因表达的变化

在高温条件下, 龙须菜 *lox1* 基因表达量随时

间变化缓慢, 在 12 h 时, 对照组和海藻糖组 *lox1* 表达量分别为 0 h 的 2.13 倍和 2.84 倍 (图 9-a)。并且在 12 h 时, 两组龙须菜中 *lox1* 基因表达量均达最大值, 且海藻糖组 *lox1* 相对表达量是对照组的 1.33 倍 ($P < 0.05$)。

与 *lox1* 表达量变化幅度不同, *lox2* 受热胁迫时上升幅度很大, 对照组和海藻糖组在 6 h 和 12 h 时升高到 0 h 的 17.76 倍和 28.64 倍 (图 9-b)。在高温胁迫 3 和 6 h 时, 海藻糖组藻的 *lox2* 表达量分别比对照组增加 31.16% 和 50.49% ($P < 0.05$); 在 12 h 时, 海藻糖组藻的 *lox2* 表达量有所下降, 比对照组降低 29.62% ($P < 0.05$)。

以上结果表明, *lox2* 较 *lox1* 对高温胁迫更敏感, 同时海藻糖长时间处理会降低 *lox2* 的表达量。

3 讨论

高温是影响植物生长发育的一个重要不利因素, 可导致植物光合速率降低、呼吸异常、气孔闭合等^[16-18]。海藻糖作为一种来源广泛、无毒无害、效果显著的非生物胁迫保护剂, 在抗逆胁迫方面发挥了重要作用^[19-20]。海藻糖可能是作为一个中央代谢调节器来协调植物的代谢网络, 使多种代谢通路共同发挥作用以抵御非生物胁迫。

3.1 海藻糖与植物生长和光合作用

生长速率是评估植物对环境胁迫的耐受性时的常用参数, 高温通常会阻碍植物的生长。如玉米 (*Zea mays*)、花生 (*Arachis hypogaea*) 等的生长速率和产量受热胁迫而降低^[21-22]。外源海藻糖可

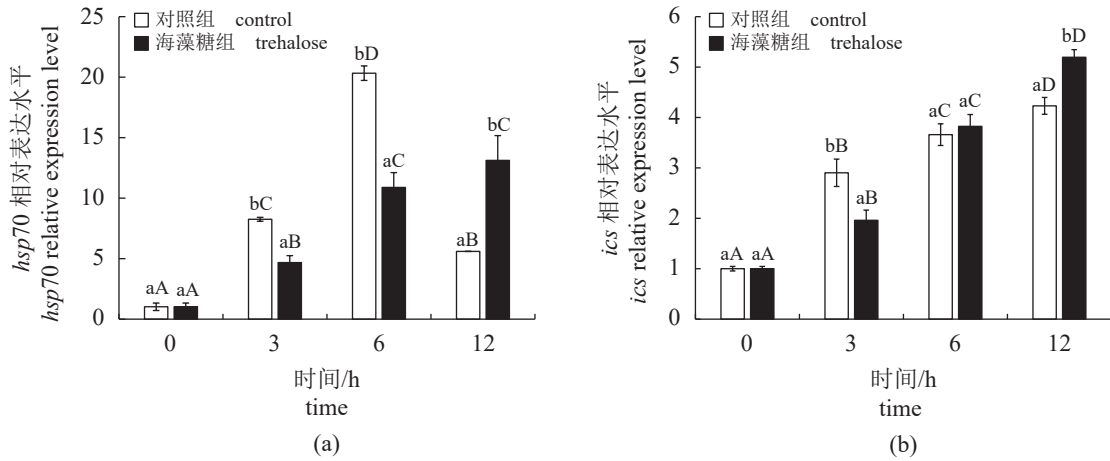


图 8 海藻糖对高温胁迫下龙须菜 *hsp70* (a) 和 *ics* (b) 基因表达的影响

Fig. 8 Effects of trehalose on the expression of *hsp70* (a) and *ics* (b) genes of *G. lemaneiformis* under high temperature stress

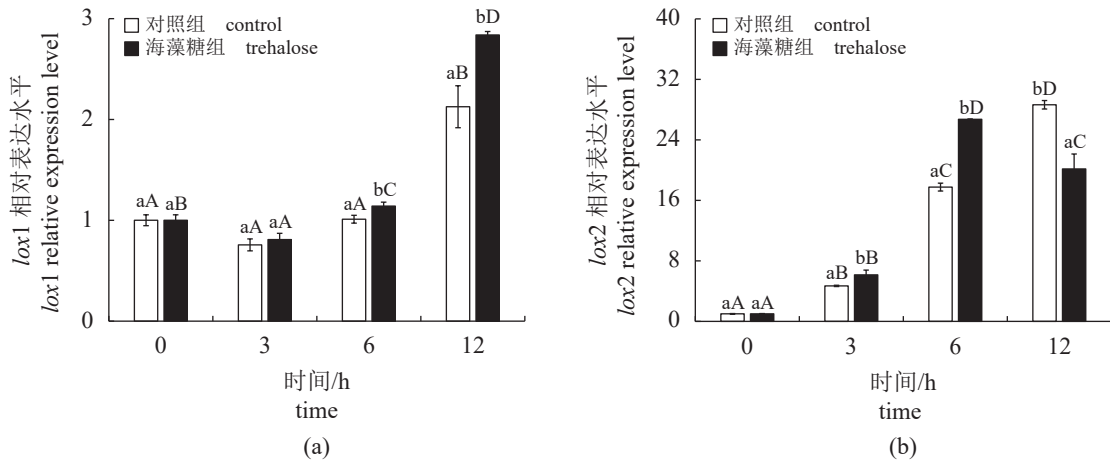


图 9 海藻糖对高温胁迫下龙须菜 *lox1* (a) 和 *lox2* (b) 基因表达的影响

Fig. 9 Effects of trehalose on the expression of *lox1* (a) and *lox2* (b) genes of *G. lemaneiformis* under high temperature stress

以保护植物生长免受高温诱导的热损伤。用海藻糖处理冬小麦幼苗后, 其从热胁迫中恢复的幼苗干重和叶片含水量比未处理组稍有增加^[23]。在本实验中, 外源添加 10 mmol/L 海藻糖可以促进高温胁迫下龙须菜生长速率的提高, 并且能缓解高温导致的龙须菜腐烂变白的现象。

在逆境胁迫对植物造成的不利影响中, 光合作用及其相关生命活动是最直观的影响方面之一。目前, 叶绿素荧光参数已经成为植物生理生态领域研究中广泛使用的技术。在正常生理状态下, 植物体的 *Fv/Fm* 变化较小; 而在胁迫条件下, *Fv/Fm* 下降^[24]。本实验中, 添加海藻糖后藻体的 *Fv/Fm* 升高 (48 h 和 72 h), 推测海藻糖增强了高温胁迫下藻体的 PS II 最大光化学效率来对抗高温

胁迫。NPQ 作为植物的一种自我保护机制, 反映了植物耗散过剩光能转化为热能的能力。本实验中海藻糖组藻体的 NPQ 升高 (48 h), 说明海藻糖能通过增加散热来保护高温胁迫下的藻体, 即光保护能力增强。

3.2 海藻糖与植物活性氧自由基清除和膜脂过氧化

高温胁迫除了可以导致光合作用损伤之外, 还可引起膜脂质过氧化和活性氧自由基产生。MDA 是膜脂质过氧化的最终分解产物, 其含量高表明膜脂质过氧化的程度高, 植物细胞膜受损程度大。SOD 是生物体内重要的抗氧化酶之一, 可以清除活性氧自由基^[25]。海藻糖可以保护高温等

逆境胁迫引起的膜损伤。如在高温胁迫下, 外源海藻糖处理后冬小麦中的活性氧积累量和MDA含量减少^[26]。在低温胁迫下, 12 mmol/L海藻糖可以显著降低玉米幼苗的MDA含量, 增强SOD等抗氧化酶活性^[27]。本实验结果与以上研究结果一致, 即添加海藻糖后龙须菜中MDA含量降低、SOD活性增强, 说明海藻糖可以促进活性氧自由基的清除, 降低膜脂质过氧化, 从而保护龙须菜免受高温损伤。

LOX是脂肪酸氧化途径的重要代谢酶, 该酶不仅参与内源性化合物如花生四烯酸的代谢, 并伴有活性氧自由基的产生, 还能通过影响细胞间的信号转导从而激活其他活性氧自由基产生途径^[28]。因此, LOX活性升高可以引起活性氧自由基增加和膜脂质过氧化。Yang等^[29]对*lox*基因表达进行分析, 结果发现LOX在非生物胁迫和激素响应中均发挥了作用。Luo等^[26]研究表明, 外源海藻糖预处理可以显著降低高温胁迫下冬小麦幼苗中LOX活性。在本实验中, 海藻糖可以降低高温胁迫龙须菜中LOX活性, 但仅在48 h差异显著。与LOX活性变化不同, 编码该酶的2条基因中*lox1*表达上调而*lox2*表达下调(12 h)。已有研究表明, 相比于*lox1*, 在龙须菜中*lox2*在响应高温胁迫中起主导作用^[30]。可见, 海藻糖处理可缓慢降低高温胁迫下龙须菜中LOX活性及其主要抗逆响应基因的表达, 从而缓解其对膜脂质过氧化的影响。

3.3 海藻糖与其他渗透调节物质

脯氨酸是一种重要的渗透调节保护物质, 其在植物细胞内的含量与温度、盐度等变化密切相关。例如, 相比于野生型坛紫菜(*Porphyra haitanensis*), 耐高温坛紫菜藻体中藻胆蛋白、脯氨酸、抗氧化酶活性在高温胁迫下均显著提高^[31]。在本实验中, 海藻糖处理后藻体的脯氨酸含量显著升高, 说明添加海藻糖有利于龙须菜积累脯氨酸, 以改善高温胁迫下龙须菜的渗透调节能力。与本实验结果不同, Abdallah等^[32]研究表明, 25 mmol/L海藻糖处理的盐度胁迫水稻幼苗中脯氨酸含量降低, 推测其原因可能为同样具有渗透保护效果的海藻糖的使用降低了对其他渗透物质如脯氨酸的需求。

作为一种渗透保护物质, 海藻糖与其合成关键酶TPS在植物响应逆境胁迫中起着重要的作用。

TPS对热应激有积极的反应。如在37℃热应激后, 白灵菇(*Pleurotus tuoliensis*)中TPS基因表达量和酶活性均被显著诱导^[33]。在40℃高温处理下, 平菇(*Pleurotus ostreatus*)中TPS活性在15 h时达到最高值; 同时海藻糖含量也达到最高(158.88 mg/g干重)^[34]。在藻类中海藻糖相关的研究报道较少。例如, 坛紫菜中3条TPS基因在高温胁迫下的表达均呈先升后降再上调的趋势^[35]。大型海藻海带(*Saccharina japonica*)中TPS转录水平受干旱诱导显著上调^[36]。过表达TPS基因的凯氏拟小球藻(*Parachlorella kessleri*)转化藻株中海藻糖含量增加, 同时伴有活性氧自由基、细胞膜的脂质过氧化的降低, 从而改善了高光胁迫对藻体生长的不利影响^[37]。在本实验中, 海藻糖处理组中的TPS活性在12和24 h显著增加, 推测外源海藻糖刺激了内源海藻糖的产生, 以共同抵御高温胁迫。该结果与Abdallah等^[32]在水稻(*Oryza sativa*)中发现海藻糖预处理可以刺激内源海藻糖产生的结果类似。

3.4 海藻糖与抗逆植物激素水杨酸

植物激素SA是一种小分子的酚类化合物, 在高等植物体内存在着2条合成途径, 其中ICS是分支酸合成SA途径的关键酶^[38]。SA不仅参与了植物生长发育过程的调控, 而且在抵御生物和非生物胁迫中也发挥了重要作用^[39]。SA还可与海藻糖共同作用, 通过增强SOD、过氧化物酶等抗氧化酶活性, 及增加脯氨酸等的积累来减轻干旱胁迫对罗勒(*Ocimum basilicum*)的不利影响^[40]。SA、乙烯和海藻糖在植物高温胁迫中发挥了核心作用, 这三者的信号途径在转录激活因子MBF1c的控制之下存在着紧密联系的热响应代谢网络^[41]。

海藻糖还可以影响SA的合成来对抗生物胁迫。如海藻糖可以上调青枯病菌感染西红柿中水杨酸依赖的防御基因表达, 并增强了木质部汁液中SA的水平^[42]。在本实验中海藻糖促进了ICS活性的升高, 同时上调了*ics*基因表达量(12 h), 导致内源SA水平升高。可见外源海藻糖还可以通过影响SA的积累来共同对抗高温胁迫。

4 结论

综上, 本实验发现10 mmol/L海藻糖能显著促进高温胁迫下龙须菜的生长并改善藻体发白的状态。海藻糖主要通过以下几种方式来发挥其抗

高温胁迫的作用: ①降低 MDA 含量、LOX 活性及其基因表达, 增强 SOD 活性, 从而清除活性氧自由基、降低膜脂过氧化水平。②增加脯氨酸积累, 激活内源海藻糖合成酶的活性, 从而促进渗透保护物质的积累。③促进 SA 合成关键酶活性及其基因转录水平, 从而促进抗逆植物激素 SA 的积累。此外, 海藻糖还能够提高叶绿素荧光参数, 促进藻体的光合作用, 以及维持热激蛋白 70 转录水平稳定升高。因此, 海藻糖在龙须菜抗高温胁迫中发挥了重要作用。未来对于海藻糖在藻类中的功能、海藻糖与植物激素的关系等方面还将开展深入研究。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 张学成, 费修纭. 全国水产原良种审定委员会审定品种——981龙须菜及其栽培技术介绍[J]. 科学养鱼, 2008(6): 21-22.
Zhang X C, Fei X G. The national aquatic products classification commission approved the new strain of *Gracilaria lemaneiformis*: cultivar 981 and its cultivation techniques[J]. Scientific Fish Farming, 2008(6): 21-22 (in Chinese).
- [2] Paul M J, Primavesi L F, Jhurrea D, et al. Trehalose metabolism and signaling[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2008, 59: 417-441.
- [3] 陈素丽, 彭瑜, 周华, 等. 植物海藻糖代谢及海藻糖-6-磷酸信号研究进展[J]. *植物生理学报*, 2014, 50(3): 233-242.
Chen S L, Peng Y, Zhou H, et al. Research advances in trehalose metabolism and trehalose-6-phosphate signaling in plants[J]. *Plant Physiology Journal*, 2014, 50(3): 233-242 (in Chinese).
- [4] O'Hara L E, Paul M J, Wingler A. How do sugars regulate plant growth and development? New insight into the role of trehalose-6-phosphate[J]. *Molecular Plant*, 2013, 6(2): 261-274.
- [5] Garg A K, Kim J K, Owens T G, et al. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(25): 15898-15903.
- [6] 柳福智, 王宁. 外源海藻糖对NaCl胁迫下甘草幼苗生长及总黄酮含量的影响[J]. *中草药*, 2020, 51(24): 6345-6353.
Liu F Z, Wang N. Effects of exogenous trehalose on growth of *Glycyrrhiza uralensis* seedlings and total flavonoid content under salt stress[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2020, 51(24): 6345-6353 (in Chinese).
- [7] Tapia H, Young L, Fox D, et al. Increasing intracellular trehalose is sufficient to confer desiccation tolerance to *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(19): 6122-6127.
- [8] Li H, Wang H L, Du J, et al. Trehalose protects wine yeast against oxidation under thermal stress[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 26(6): 969-976.
- [9] Zhao D Q, Li T T, Hao Z J, et al. Exogenous trehalose confers high temperature stress tolerance to herbaceous peony by enhancing antioxidant systems, activating photosynthesis, and protecting cell structure[J]. *Cell Stress and Chaperones*, 2019, 24(1): 247-257.
- [10] Karsten U, Görs S, Eggert A, et al. Trehalose, digeneaside, and floridoside in the Florideophyceae (Rhodophyta)-a reevaluation of its chemotaxonomic value[J]. *Phycologia*, 2007, 46(2): 143-150.
- [11] Lv Y, Sun P, Zhang Y Y, et al. Response of trehalose, its degrading enzyme, sucrose, and floridoside/isofloridoside under abiotic stresses in *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta)[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2019, 31(6): 3861-3869.
- [12] Abreu M H, Varela D A, Henríquez 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.
- [13] Hottiger T, Schmutz P, Wiemken A. Heat-induced accumulation and futile cycling of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169(12): 5518-5522.
- [14] Li Y, Zhou C X, Yan X J, et al. Simultaneous analysis of ten phytohormones in *Sargassum horneri* by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization

- ation tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Separation Science*, 2016, 39(10): 1804-1813.
- [15] 孙鹏, 杜宇, 吕燕, 等. 龙须菜卤代烷烃脱卤酶基因的转录及原核表达[J]. *水产学报*, 2019, 43(12): 2468-2475.
- Sun P, Du Y, Lv Y, *et al.* Transcriptional expression and prokaryotic expression analysis of haloalkane dehalogenase gene from *Gracilariopsis lemaneiformis*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(12): 2468-2475 (in Chinese).
- [16] Mittler R. Abiotic stress, the field environment and stress combination[J]. *Trends in Plant Science*, 2006, 11(1): 15-19.
- [17] Wang D, Heckathorn S A, Barua D, *et al.* Effects of elevated CO₂ on the tolerance of photosynthesis to acute heat stress in C₃, C₄, and CAM species[J]. *American Journal of Botany*, 2008, 95(2): 165-176.
- [18] Wang D, Heckathorn S A, Wang X Z, *et al.* A meta-analysis of plant physiological and growth responses to temperature and elevated CO₂[J]. *Oecologia*, 2012, 169(1): 1-13.
- [19] Luo Y, Li W M, Wang W. Trehalose: protector of antioxidant enzymes or reactive oxygen species scavenger under heat stress?[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2008, 63(1-3): 378-384.
- [20] 庞椿朋, 叶亮, 马健, 等. 海藻糖对高温下番茄幼苗叶片光合作用的调控作用[J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(21): 143-146.
- Pang C P, Ye L, Ma J, *et al.* Regulation of trehalose on photosynthesis of tomato seedling leaves under high heat stress[J]. *Jiangsu Agricultural Science*, 2017, 45(21): 143-146 (in Chinese).
- [21] Kebede H, Fisher D K, Young L D. Determination of moisture deficit and heat stress tolerance in corn using physiological measurements and a low-cost microcontroller-based monitoring system[J]. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 2012, 198(1): 118-129.
- [22] Hamidou F, Halilou O, Vadez V. Assessment of groundnut under combined heat and drought stress[J]. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 2013, 199(1): 1-11.
- [23] Luo Y, Gao Y M, Wang W, *et al.* Application of trehalose ameliorates heat stress and promotes recovery of winter wheat seedlings[J]. *Biologia Plantarum*, 2014, 58(2): 395-398.
- [24] 陈莲花, 刘雷. 叶绿素荧光技术在藻类光合作用中的应用[J]. *江西科学*, 2007, 25(6): 788-790,806.
- Chen L H, Liu L. Application of the chlorophyll fluorescence in photosynthesis of algae[J]. *Jiangxi Science*, 2007, 25(6): 788-790,806 (in Chinese).
- [25] Chang B, Ma K B, Lu Z G, *et al.* Physiological, transcriptomic, and metabolic responses of *Ginkgo biloba* L. to drought, salt, and heat stresses[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(12): 1635.
- [26] Luo Y, Li F, Wang G P, *et al.* Exogenously-supplied trehalose protects thylakoid membranes of winter wheat from heat-induced damage[J]. *Biologia Plantarum*, 2010, 54(3): 495-501.
- [27] 刘旋, 田礼欣, 佟昊阳, 等. 低温胁迫下玉米幼苗根系受外源海藻糖调控的生理表现[J]. *生态学杂志*, 2018, 37(8): 2354-2361.
- Liu X, Tian L X, Tong H Y, *et al.* Physiological manifestations of maize seedling roots regulated by exogenous trehalose under low temperature stress[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2018, 37(8): 2354-2361 (in Chinese).
- [28] 彭敏兰, 胡建安. 脂氧合酶介导的氧化代谢与氧化应激[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2014, 28(3): 449-454.
- Peng M L, Hu J A. Lipoxigenase-mediated oxidative metabolism and oxidative stress[J]. *Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2014, 28(3): 449-454 (in Chinese).
- [29] Yang X Y, Jiang W J, Yu H J. The expression profiling of the lipoxigenase (LOX) family genes during fruit development, abiotic stress and hormonal treatments in cucumber (*Cucumis sativus* L.)[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13(2): 2481-2500.
- [30] Hou S N, Lin L C, Lv Y, *et al.* Responses of lipoxigenase, jasmonic acid, and salicylic acid to temperature and exogenous phytohormone treatments in *Gracilariopsis lemaneiformis* (Rhodophyta)[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2018, 30(6): 3387-3394.
- [31] 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).
- [32] Abdallah M M S, Abdelgawad Z A, El-Bassiouny H M S. Alleviation of the adverse effects of salinity stress using trehalose in two rice varieties[J]. *South African Journal of Botany*, 2016, 103: 275-282.
- [33] Wu X L, Hou Z H, Huang C Y, *et al.* Cloning, purification and characterization of trehalose-6-phosphate synthase from *Pleurotus tuoliensis*[J]. *PeerJ*, 2018, 6: e5230.
- [34] Lei M, Wu X L, Zhang J X, *et al.* Gene cloning, expression, and characterization of trehalose-6-phosphate synthase from *Pleurotus ostreatus*[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2017, 57(7): 580-589.
- [35] 史健志. 高温、失水胁迫下坛紫菜渗透压调节系统的初步研究 [D]. 厦门: 集美大学, 2015.
- Shi J Z. Primary study on osmoregulatory system of *Porphyra haitanensis* haitanensis under high temperature and dehydration stress[D]. Xiamen: JiMei University, 2015 (in Chinese).
- [36] Deng Y Y, Wang X L, Guo H, *et al.* A trehalose-6-phosphate synthase gene from *Saccharina japonica* (Laminariales, Phaeophyceae)[J]. *Molecular Biology Reports*. 2014, 41(1): 529-536.
- [37] Rathod J P, Prakash G, Vira C, *et al.* Trehalose phosphate synthase overexpression in *Parachlorella kessleri* improves growth and photosynthetic performance under high light conditions[J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2016, 46(8): 803-809.
- [38] Chen Z X, Zheng Z Y, Huang J L, *et al.* Biosynthesis of salicylic acid in plants[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2009, 4(6): 493-496.
- [39] Hayat Q, Hayat S, Irfan M, *et al.* Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: a review[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2010, 68(1): 14-25.
- [40] Zulfqar F, Chen J J, Finnegan P M, *et al.* Application of trehalose and salicylic acid mitigates drought stress in sweet basil and improves plant growth[J]. *Plants (Basel)*, 2021, 10(6): 1078.
- [41] Suzuki N, Bajad S, Shuman J, *et al.* The transcriptional co-activator MBF1c is a key regulator of thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(14): 9269-9275.
- [42] MacIntyre A M, Meline V, Gorman Z, *et al.* Trehalose increases tomato drought tolerance, induces defenses, and increases resistance to bacterial wilt disease[J]. *PLoS One*, 2022, 17(4): e0266254.

Effects of trehalose on the physiological parameters and gene expression of high-temperature stressed *Gracilariopsis lemaneiformis*

CHEN Wenkang, ZHANG Yingying, LU Jun, XU Nianjun, SUN Xue*

(Key Laboratory of Marine Biotechnology of Zhejiang Province, School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315832, China)

Abstract: *Gracilariopsis lemaneiformis* is a kind of cultivated seaweed with the second highest production in China, which is mainly used to feed abalone and extract agar, but its yield and cultivated period are limited due to the high temperature of the summer in the southern coast. As a signaling molecule, non-reducing disaccharide trehalose plays an important role in enduring high temperature, drought and other adverse stresses. To explore the role and mechanism of trehalose in the stress resistance of *G. lemaneiformis*, this paper investigated the effects of exogenous trehalose on the growth, stress resistance-related substances, metabolic enzymes, endogenous salicylic acid and related genes under high temperature stress using physiological and biochemical test, HPLC-MS/MS and real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR). The results showed that application of 10 mmol/L trehalose promoted the algal growth and proline content of *G. lemaneiformis* with 0.34-fold (3 d) and 0.30-fold increases (24 h) compared to the control, respectively. Meanwhile, trehalose significantly activated the chlorophyll fluorescence parameters and the activities of superoxide dismutase and trehalose-6-phosphate synthase, but malonaldehyde content and lipoxidase (LOX) activity were reduced. Moreover, trehalose significantly stimulated the activity and gene expression of isochorismate synthase, the key enzyme in salicylic acid biosynthesis, and the accumulation of salicylic acid (2.05-fold). Finally, supplementation with trehalose could maintain the stable increase of the gene expression level of heat shock protein 70, while the *lox2* gene expression was downregulated at 12 h. All of these results revealed that trehalose could promote algal growth through scavenging the reactive oxygen species, alleviating the lipid peroxidation of the cell membrane, enhancing the accumulation of osmolytes and phytohormones and so on. This study verifies that exogenous trehalose plays a vital role in resisting high temperature, which will provide a reference for future breeding efforts to improve the stress resistance of *G. lemaneiformis*.

Key words: *Gracilariopsis lemaneiformis*; trehalose; high temperature; physiology; gene expression

Corresponding author: SUN Xue. E-mail: sunxue@nbu.edu.cn

Funding projects: National Key R & D Program of China (2018YFD0901502); Key Program of Science and Technology Innovation in Ningbo (2019B10009); Major Project of Science and Technology in Ningbo (2021Z114, 2022Z172)