

doi: 10.7541/2020.153

龙须菜在不同盐度胁迫下的琼胶积累及相关生理生化变化的研究

陈月^{1,2} 蔡西栗³ 孙雪^{1,2} 张小倩^{1,2} 徐年军^{1,2}

(1. 宁波大学应用海洋生物技术教育部重点实验室, 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, 宁波 315211; 3. 浙江省平阳县海洋与渔业局, 平阳 325400)

摘要: 为了探究不同盐度对龙须菜生长、琼胶合成及相关基因表达的影响, 研究了15、25和35三种盐度条件下龙须菜的生长速率、琼胶含量、琼胶合成酶 α -半乳糖苷酶(GLA)、半乳糖苷转移酶(GAT)、 α -1,3-糖脂磺基转移酶(GST)、半乳糖-2,6-硫酸化酶(GAS)的基因表达。结果表明, 盐度25时龙须菜生长速率最高, 为7.17%/d, 高于低盐(15)时的6.27%/d和高盐(35)时的3.57%/d, 低盐和高盐都表现出明显的暗呼吸速率上升和光合速率下降。龙须菜培养15d后, 在低盐条件下琼胶含量为9.27%, 盐度25和高盐分别为6.91%和8.09%。培养第3天时, 在低盐和高盐下龙须菜中 gla 基因表达量和酶活都显著高于盐度25的表达量; 15d后在盐度25条件下 gla 基因表达量仍然最低, 但GLA酶活无显著差异。 gat 基因在低盐条件下先降低后升高, 在高盐条件下表达量始终最高, 为盐度25的3.03倍。在低盐条件下 gst 和 gas 基因都在短期内出现显著下降, 但15d后恢复到与正常盐度无显著差异。龙须菜半乳糖含量在高盐条件下相对盐度25显著升高, 达到其3.27倍, 而在低盐条件下各种单糖含量相对较低, 半乳糖含量极低。研究结果说明过高和过低盐度都会对龙须菜造成一定程度的胁迫, 并促进琼胶的合成, 但其促进琼胶积累的机制存在差异, α -半乳糖苷酶和半乳糖苷转移酶在其中扮演着非常重要的角色。

关键词: 龙须菜; 琼胶; 盐度胁迫; α -半乳糖苷酶; 半乳糖苷转移酶

中图分类号: Q949.29 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2020)06-1322-08

琼胶是一种胶状的半乳聚糖生物大分子, 是由D型半乳糖与3,6-内醚-L-半乳糖以 β -1,3和 α -1,4糖苷键重复交联而成的中性多聚糖, 作为红藻细胞壁的组成成分, 与陆地植物的半纤维素的生物功能相似, 但其更强的柔韧性给予了大型海藻抵抗强烈波浪和水流的能力^[1]。在红藻中琼胶还具有抵抗病原菌侵扰, 保持细胞内离子平衡, 提高海藻抵抗极端的盐度、pH、温度逆境等功能^[2,3]。

琼胶生物合成开始于高尔基体中的半乳糖糖基化, 随后在转移到细胞壁之前进行早期的硫酸化, 关于半乳糖转运体的研究还十分缺乏, 只知道它位于高尔基体膜上, 之后琼胶大分子中C-6位硫酸化的L型半乳糖单位会脱水形成3,6-内醚-L-半乳糖, 3,6-内醚-L-半乳糖含量的多少决定了琼胶的凝胶性能,

而半乳糖的硫化并非只发生在C-6位上, 在L-半乳糖的C-2和C-3位与D-半乳糖的C-2和C-4位也发现了硫化, 这些半乳糖硫化可能都需要特异的磺基转移酶与硫酸化酶^[3]。

龙须菜(*Gracilariopsis lemaneiformis*)是红藻门(Rhodophyta)、江蓠科(Gracilariaceae)、龙须菜属(*Gracilariopsis*)的大型产琼胶海藻, 在中国沿海地区大面积养殖, 由于琼胶市场需求量的上升, 中国龙须菜产量从2004年的 8.88×10^7 kg, 增加到了2017年的 30.86×10^7 kg, 并且仍在不断增加^[4,5]。由于其生长速度快, 产量高, 琼胶品质好, 是生产琼胶的主要原料^[6]。龙须菜的琼胶合成代谢通路一直都是研究的热点, 克隆出龙须菜中UDP-葡萄糖焦磷酸化酶基因、半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶基因、葡

收稿日期: 2019-01-03; 修订日期: 2020-01-16

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0901502); 国家自然科学基金(31672674); 浙江省自然科学基金重点项目(LZ17D060001); 宁波市种业创新重大专项(2019B10009)资助 [Supported by the National Key R & D Program of China (2018YFD0901502); the Natural Science Foundation of China (31672674); the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LZ17D060001); Key Program of Science and Technology in Ningbo Government (2019B10009)]

作者简介: 陈月(1993—), 硕士研究生; 主要从事海洋藻类生理与活性物质研究。E-mail: 1059222377@qq.com

通信作者: 徐年军(1973—), 研究员, 博导; 主要从事藻类生理生化研究。E-mail: xunianjun@nbu.edu.cn

葡萄糖磷酸变位酶基因, 并发现这些基因的表达对琼胶含量有一定影响^[7-9], α -葡萄糖苷酶可以催化降解红藻淀粉生成葡萄糖, 也可能促进龙须菜琼胶含量的积累^[10]。

研究发现部分产胶红藻在生长盐度变化时琼胶含量会出现上升, 推测其在抵抗细胞外部渗透压变化的过程中会合成更多的琼胶, 为细胞提供更强的支撑力, 其中合成琼胶所用半乳糖前体的来源可能是红藻糖苷和红藻淀粉的降解, 而促进红藻糖苷降解的正是 α -半乳糖苷酶(GLA)^[10-12]。与其他江蓠品种相比, 龙须菜对高温的耐受性更强, 但对盐度的耐受范围更窄, 在盐度25环境下生长状态最好^[13]。不同盐度培养的龙须菜会出现琼胶含量的显著差异, 在低盐条件下培养2周, 琼胶含量显著升高^[8]。本实验研究了不同盐度下龙须菜的生长速率、暗呼吸与光合放氧速率、琼胶含量和代表性糖类的相对含量以及琼胶合成过程中 gla 、 gat 、 gst 和 gas 基因的表达量变化, 揭示了不同盐度条件导致琼胶含量变化的规律, 旨在发现盐度逆境胁迫对龙须菜琼胶合成的影响, 探究其在琼胶合成通路中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料处理

实验材料龙须菜为981品系, 采自福建霞浦海藻养殖场(26°71'N, 119°99'E), 养殖海域内海水盐度接近25, 用消毒海水清洗, 刷除杂藻与泥沙, 截取健康侧枝于实验室恒温光照培养箱中驯化培养1个月。实验设置3个盐度, 分别为15(低盐)、25(正常海水盐度)、35(高盐), 培养温度为23℃, 光强40 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 光暗周期为12L:12D, Provasoli培养基每3—4d更换1次, 分别在第3和第15天取样测定酶活和基因表达, 琼胶含量与糖含量测定只在第15天取样。

1.2 相对生长速率(RGR)的测定

通过测定龙须菜在培养周期内的藻体鲜重变化, 计算龙须菜的相对生长速率(Relative growth rate, RGR), 测定时用吸水纸包裹藻体4000 r/min离心30s, 去除藻体表面水分后称重。

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

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

1.3 暗呼吸和光合放氧速率的测定

采用液相氧电极(Hansatech, 英国)测定龙须菜的暗呼吸与光合放氧速率, 先使用耗氧剂连二亚硫酸钠对培养液氧含量曲线进行调零校准, 然后称取0.01 g龙须菜放入2 mL的氧饱和新鲜培养液中, 严

格控制温度在23℃, 遮罩避光测定暗呼吸速率, 然后在培养光强下测定光合放氧速率。

1.4 α -半乳糖苷酶活性的测定

α -半乳糖苷酶(GLA)活力的测定参照Ekman等的方法并加以修改^[12], 利用GLA能将对硝基酚- α -吡喃半乳糖降解成对硝基酚的特性, 通过在405 nm比色测定对硝基苯酚的生成量, 可以计算反应液中GLA的活力。

1.5 琼胶的提取与含量测定

龙须菜中琼胶的提取方法参照薛志欣等^[14], 具体操作略有改动。先取一定量的藻体, 用清水冲洗干净藻体表面的盐分后在65℃烘干至恒重, 称量干重, 并按每100 mg干重藻体加入4 mL 4% NaOH溶液, 在85℃水浴中处理2h, 用2层300目筛绢网过滤并洗涤藻体至中性, 然后每100 mg干重藻体添加6 mL蒸馏水, 于120—125℃的高压锅中加热煮沸提取琼胶2h。用8层300目筛绢网挤压过滤并收集滤液, 待滤液在室温下冷却并凝固后放入-20℃冷冻过夜, 常温解冻后用蒸馏水浸泡冲洗去除杂质, 最后冷冻干燥获得琼胶干重。计算琼胶含量(%)。

1.6 目的基因的克隆及定量

目的基因片段的获得 根据龙须菜基因组组装结果^[15]设计引物(表1), PCR扩增得到编码993个氨基酸的 gla 基因(MF988355)、编码706个氨基酸的 gat 基因(MF988358)、编码352个氨基酸的 gst 基因(MF988360)及编码627个氨基酸的 gas 基因(MF988361.1)。

总RNA的提取及反转录 称取新鲜龙须菜藻体100 mg, 按照OMEGA公司的Plant RNA Kit试剂盒说明书方法提取总RNA, 经过电泳检测, Nano-drop测定纯度和浓度后, 使用TaKaRa去基因组DNA反转录试剂盒得到各个样本相同浓度的cDNA模板, -20℃冷冻保存。

目的基因的相对定量与表达分析 根据目的基因的序列信息使用primer5.0设计定量专用的特异引物, 首先进行预实验对引物的熔解曲线进行分析, 确定引物的特异性, 选用 β -actin基因作为内参进行上样误差校正和标准化, 内参定量PCR引物参考朱招波等^[16]并进行验证。使用Eppendorf实时荧光定量PCR仪, 以反转录合成的cDNA为模板进行实时荧光定量PCR, 反应采用20 μL 体系: SYBR Green I Master (Roche) 10 μL , 正向和反向引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)各0.4 μL , cDNA模板2 μL , ddH₂O 7.2 μL 。每组处理进行两次完全独立实验, 每个独立实验进行三次生物学重复。反应结束后进行 C_t 值分析, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法确定各目的基因的mRNA相对含量^[17]。

表 1 所用引物及其用途

Tab. 1 The primers and purpose

名称 Name	序列Sequence (5'—3')	用途Purpose
P1	ATGAATGCTTCCAAGCAG TTTAAGGA	<i>gla</i> 基因扩增的正向引物
P2	CTAGTTAAGCACGGAGG CTGAGCTT	<i>gla</i> 基因扩增的反向引物
P3	ATGCACGCCATTGCGTCC	<i>gat</i> 基因扩增的正向引物
P4	TTACAAAAGGGTATTCGA TCTCCC	<i>gat</i> 基因扩增的反向引物
P5	ATGATCTGGGCCTCTTTC CTTTGGT	<i>gas</i> 基因扩增的正向引物
P6	TCAGCCACGATTGAATTT GCGAAT	<i>gas</i> 基因扩增的反向引物
P7	ATGGACTCGAACTCGAAT CAAGCTG	<i>gst</i> 基因扩增的正向引物
P8	CTACGGATCGTCTTCGT GTGATT	<i>gst</i> 基因扩增的反向引物
P9	TCTTCCTCACGCTGTGCT CC	β -actin基因RT-qPCR扩 增的正向引物
P10	AGTTGCTGCTTGATGTCT CG	β -actin基因RT-qPCR扩 增的反向引物
P11	TCAAGGCATCAGCAACA G	<i>gla</i> 基因RT-qPCR扩增的 正向引物
P12	ACGATCCAGAGGGAGAC A	<i>gla</i> 基因RT-qPCR扩增的 反向引物
P13	GCTGTCCAAAGCCGATTA	<i>gat</i> 基因RT-qPCR扩增的 正向引物
P14	GGGCAATGAGGGTGTCT	<i>gat</i> 基因RT-qPCR扩增的 反向引物
P15	GACATTTCGGAAGCCAC A	<i>gas</i> 基因RT-qPCR扩增的 正向引物
P16	GCCCATAATCCACCCACG	<i>gas</i> 基因RT-qPCR扩增的 反向引物
P17	GTTGCGTCCACCACCTCT G	<i>gst</i> 基因RT-qPCR扩增的 正向引物
P18	TCGAAAGCTGGCACTAC ATCTC	<i>gst</i> 基因RT-qPCR扩增的 反向引物

1.7 单糖含量的GC-MS分析

将龙须菜干样品研磨成粉后取20 mg, 加入700 μ L的甲醇涡旋混匀15s, 14000 r/min离心10min后取上清500 μ L, 加入300 μ L三氯甲烷混匀, 待溶液完全混匀后再加入750 μ L的纯水, 混匀15s后14000 r/min离心10min, 取100 μ L上清液在旋转蒸发仪中抽干水分。加入40 μ L的甲氧基胺盐酸盐(20 mg/mL吡啶溶解), 在37°C下震荡反应2h, 然后混匀并短暂离心, 加入70 μ L N-甲基-N-(三甲基硅烷)三氟乙酰胺(MSTFA), 在37°C下震荡反应30min, 混匀并短暂离心后转移100 μ L至样品瓶待测^[18]。

使用1300/ITQ 900 GC-MS系统 (Thermo Fisher Scientific, USA) 进行检测分析。GC-MS条件如下: Restek TR-5ms (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 mm) 色谱柱, 进样口温度为 250°C, EI离子源230°C, 使用高纯氮气作为载气, 进样量1 μ L, 不分流进样。初始温度60°C, 2min后以10°C/min的速度升高到150°C, 保留10min后继续以15°C/min的升温速度达到250°C, 质谱m/z范围在50—550。通过National Institute of Standards and Technology(NIST) 和MassBank web-

site(<http://www.massbank.jp>) 的质荷比及相对丰度比对化合物进行鉴定分析。

1.8 数据处理

采用SPSS 22软件进行数据处理和统计分析, 用one-way ANOVA(Tukey) 进行差异显著性检验, 设显著性水平为 $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 不同盐度处理下龙须菜的生长速率及光合特性变化

盐度25时龙须菜的生长速度最快, 高盐和低盐条件下的龙须菜生长速率都有不同程度的降低(图1)。在高盐条件下龙须菜生长受到了显著的抑制, 与正常盐度相比, 相对生长速率降低了50.21%($P<0.05$); 在低盐条件下龙须菜的生长也受到了一定的抑制, 相对生长速率降低了12.53%。

在盐度25的培养条件下, 龙须菜暗呼吸和光合放氧速率较为平稳, 生长的第3和第15天没有明显变化(图2), 呼吸速率约为13 μ mol O₂/(h·g), 光合放氧速率约为18 μ mol O₂/(h·g)。与盐度25相比, 低盐和高盐下生长3d后, 呼吸速率显著升高($P<0.05$), 在低盐下升高了82.57%, 在高盐下升高了53.40%, 在生长到达第15天时, 在低盐下的呼吸速率与正常盐度没有显著差异($P>0.05$), 而在高盐下的龙须菜呼吸速率仍然比正常盐度要高18.20%($P<0.05$)。龙须菜光合放氧速率在低盐和高盐条件下3d后与正常盐度龙须菜相比显著降低 ($P<0.05$), 分别降低了

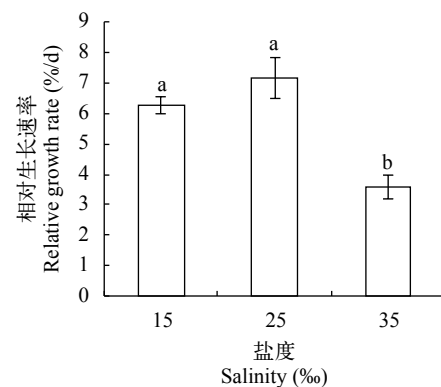


图 1 不同盐度处理下龙须菜的相对生长速率

Fig. 1 The relative growth rate (RGR) of *G. lemaneiformis* in different salinities

相同字母(a/a)表示不同盐度处理下差异不显著; 不同字母(a/b)表示不同盐度处理下差异显著($P<0.05$)

The same letters above histogram bars indicate no significant difference between different salinity treatment, and the different letters indicate significant differences among the salinity treatments ($P<0.05$)

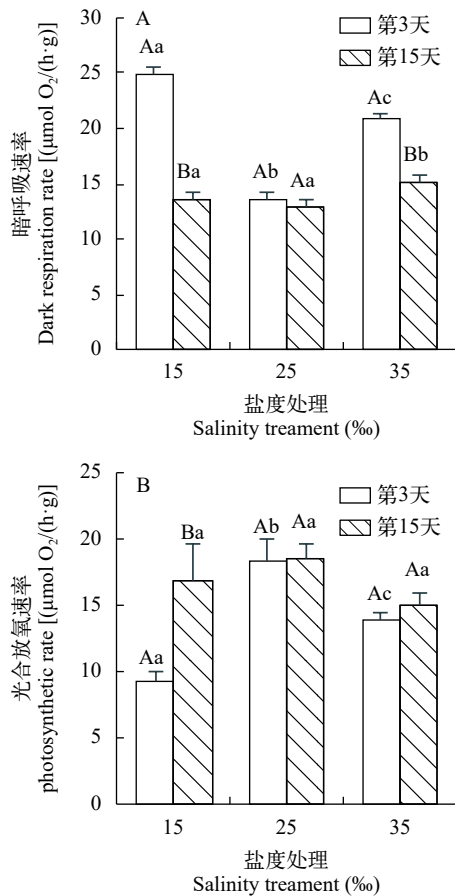


图2 在不同盐度处理下龙须菜生长3d及15d后的暗呼吸速率(A)和光合放氧速率(B)

Fig. 2 Dark respiration rate (A) and photosynthetic oxygen evolution rate (B) of *G. lemaneiformis* in different salinities after 3d and 15d

不同大写字母表示同一盐度下不同时间点之间的差异显著, 不同小写字母表示不同盐度差异显著 ($P < 0.05$), 下同

The different capital letters above histogram bars indicate significant difference between different time points under the same salinity treatment and the different lower case letters indicate significant differences among the salinity treatments ($P < 0.05$), the same applies below

49.62%和24.84%, 经过15d的适应之后, 在低盐和高盐下龙须菜的光合放氧速率恢复到与正常盐度没有显著性差异($P > 0.05$)。

2.2 不同盐度条件对龙须菜琼胶含量的影响

在培养15d后, 盐度15、25和35条件龙须菜琼胶含量分别为9.27%、6.91%和8.09%(图3), 在低盐和高盐条件下龙须菜的琼胶含量都显著高于盐度25条件下的琼胶含量($P < 0.05$), 在不同盐度下龙须菜琼胶含量盐度15>盐度35>盐度25。

2.3 不同盐度对龙须菜基因表达的影响

图4显示, 在处理第3和第15天时, 在低盐和高盐条件下龙须菜中的*gla*基因表达均高于正常盐度,

在第3天, 分别达到正常盐度的1.58倍($P < 0.05$)和1.16倍($P > 0.05$), 在第15天时分别为正常盐度的1.34倍($P < 0.05$)和1.63倍($P > 0.05$)。在低盐条件下*gat*基因的表达在短期内受到了一定的抑制, 相对正常盐度降低了48%, 在高盐条件下为正常盐度

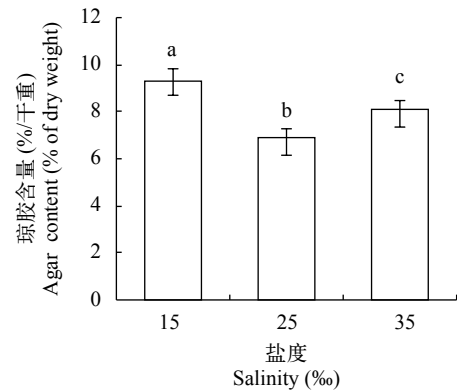


图3 龙须菜在不同盐度下培养15天后的琼胶含量

Fig. 3 The agar content of *G. lemaneiformis* in different salinities after 15 days

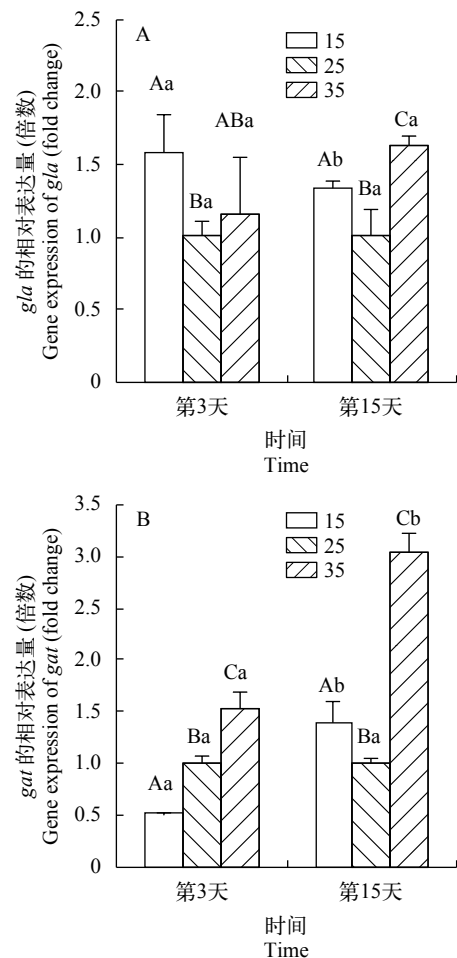


图4 不同盐度对龙须菜*gla*(A)和*gat*(B)基因表达的影响

Fig. 4 Effects of different salinity on *gla* (A) and *gat* (B) gene expression of *G. lemaneiformis*

1.53倍; 在第15天时低盐下表达量回升到正常盐度的1.38倍, 在高盐下表达量升高到正常盐度的3.03倍, 都表现显著差异($P<0.05$)。

相对于盐度25, 在低盐条件下龙须菜*gas*基因的相对表达量在处理的第3天显著下降了52.59% ($P<0.05$), 高盐下无显著差异; 第15天时3个盐度下的表达量无显著差异(图5)。在处理第3天时, 在高

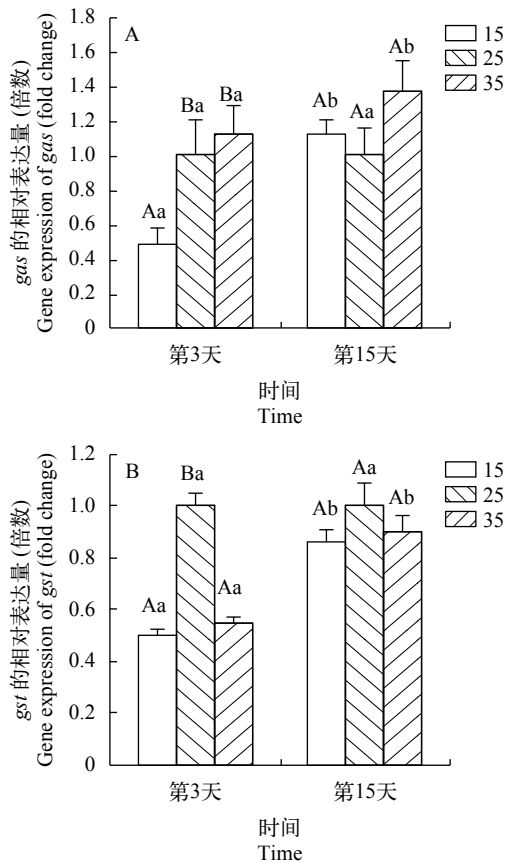


图5 不同盐度对龙须菜*gas*(A)和*gst*(B)基因表达的影响

Fig. 5 Effects of different salinity on *gas* (A) and *gst* (B) gene expression of *G. lemaneiformis*

盐和低盐条件下龙须菜*gst*基因的表达量相对盐度25分别显著下降50%和45% ($P<0.05$), 在高盐和低盐条件下的表达量无显著差异 ($P>0.05$), 在第15天时都与盐度25无显著差异 ($P>0.05$)。

2.4 不同盐度对龙须菜GLA酶活性的影响

在处理第3天时, 在不同盐度条件下龙须菜中的GLA酶活发生显著变化(图6), 在低盐和高盐条件下酶活分别达到正常盐度的1.63倍和2.53倍 ($P<0.05$), 不同盐度之间差异显著 ($P<0.05$), 当培养15d时在不同盐度下龙须菜的GLA酶活性已无明显差异。

2.5 不同盐度下龙须菜中代表性糖类的相对含量变化

龙须菜在3种不同盐度下生长15d后, 使用MSTFA对样品进行糖的衍生化处理, 对其进行GC-MS分析, 检测到的代谢产物主要有核糖醇、果糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖和海藻糖等(图7)。

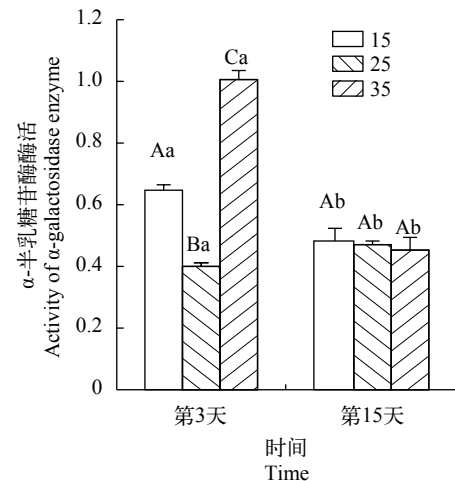


图6 不同盐度对龙须菜GLA酶活性的影响

Fig. 6 The activities of GLA of *G. lemaneiformis* under different salinity

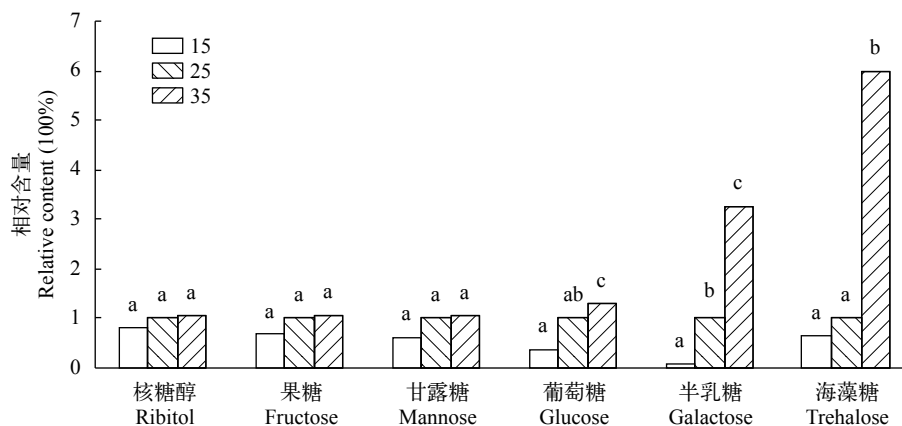


图7 不同盐度处理15天后龙须菜中糖类相对含量变化

Fig. 7 Changes of sugar content of *G. lemaneiformis* after 15d of different salinity treatments

在高盐条件下半乳糖和海藻糖的含量显著升高, 分别为盐度25的3.27倍和6.00倍, 其他糖类与正常盐度无显著差异。

3 讨论

盐度是影响海洋藻类生长繁殖的重要环境因子, 具有明显的地理与季节性变化。盐度对各种红藻琼胶的产量和质量的影响有较大差异, 研究表明红藻在盐度变化时, 生长速度下降, 光合作用、碳固定及氮磷的吸收受到抑制, 同时会消耗更多的能量来维持细胞的离子平衡, 从而导致琼胶含量的下降^[19-21]。也有研究证明红藻在环境盐度变化时, 因为要抵抗外部渗透压的变化, 细胞需要补充和修饰细胞壁间的琼胶, 从而为细胞提供更强的支撑力, 引起琼胶含量的上升, 其中琼胶前体的来源可能是红藻糖苷与红藻淀粉的降解^[10-12]。

3.1 盐度对龙须菜生长、形态结构和呼吸的影响

在盐度25条件下龙须菜的生长速度最快, 其次为盐度15, 盐度35最慢。在不同盐度下龙须菜在15d后形态特征也有了一定的区别, 在低盐条件下侧枝分化较少, 在高盐条件下生长受到明显抑制, 枝干最短。在盐度15条件下的龙须菜细胞色素体板层结构明显肿胀且细胞间孔状联系部分被破坏, 胞内红藻淀粉颗粒变少; 在盐度35条件下的藻体细胞内出现大量白色盐粒, 色素体板层结构模糊肿胀且细胞间孔状联系扭曲变形^[22]。低盐与高盐处理后的龙须菜在短期内暗呼吸速率都显著升高且光合放氧速率下降, 但是在经过半个月的适应之后, 盐度对光合及呼吸的影响明显降低。

3.2 龙须菜琼胶合成单体和前体聚合通路的酶

琼胶的合成可以分为琼胶单体的生物合成和琼胶前体形成聚合两部分, 其中关于琼胶单体的合成研究比较多, 迄今为止已经找到了一些与琼胶单体合成有关的酶, 如UDP-葡萄糖焦磷酸化酶、半乳糖-1-磷酸尿苷转移酶、GDP-甘露糖-3',5'-表异构酶和GDP-甘露糖焦磷酸化酶等, 逐渐完善出了琼胶单体合成的通路^[7, 23, 24], 但目前琼胶单体的聚合及其半乳糖骨架上各种取代基支链的形成还不够了解。半乳糖苷转移酶、磺基转移酶、硫酸酯酶、甲基转移酶和丙酮酰转移酶作为琼胶合成第二阶段的关键酶类, 它们的变化与琼胶的含量及质量都具有相关性。

3.3 盐度对龙须菜琼胶合成相关酶和基因表达的影响

GLA可以催化降解红藻糖苷来生成琼胶合成前体UDP-D-半乳糖^[25], 研究对龙须菜在3种不同盐度下*gla*、*gat*、*gst*和*gas*基因的表达进行了分析, 在

高盐条件下龙须菜中GLA酶活和基因表达量都最高, 半乳糖的含量也显著高于其他两组, 但是酶活和基因相对表达量的变化与琼胶含量并不呈现完全的线性相关, 说明虽然细胞中红藻糖苷降解生成了半乳糖, 但是产生的半乳糖并没有被充分利用, 反而随之积累而含量升高, 并通过反馈调节使*gat*基因过量表达。在低盐条件下龙须菜中GLA酶活升高, 但半乳糖的含量却明显降低, 说明发生了活跃的半乳糖转化, 红藻糖苷降解生成的半乳糖进入了合成琼胶的通路。在低盐条件下红藻淀粉也会降解生成葡萄糖, 但实验显示葡萄糖含量也显著下降。Hu等^[26]发现在低盐条件下培养2周后龙须菜中不仅淀粉含量下降, 其淀粉合成酶的基因表达也会受到抑制, 说明在低盐条件下龙须菜会消耗其他的多糖来合成更多的琼胶来保护自己, 同时也发现合成GDP-L-半乳糖的通路会受到抑制, 表明此时UDP-D-半乳糖的升高才是琼胶含量增长的原因, 增长的琼胶几乎都源自红藻淀粉与红藻糖苷的转化而不是由卡尔文循环提供原料。

GST是将糖脂硫化的关键酶, 在细胞膜上起到抗菌抗氧化的作用, 这也是藻类细胞中半乳糖和硫酸基重要流向之一。实验中发现它在逆境盐度下表达受到抑制, 显示流向细胞膜合成的半乳糖与硫酸基的减少^[27]。藻类中多糖需要在高尔基体中硫化之后才能转运到胞外生成琼胶^[3]。我们发现在低盐条件下*gas*基因的相对表达量会下降, 这可能导致了6-硫酸根-L-半乳糖的生成量减少, 进入细胞壁间的C-3和C-4位硫酸化的半乳糖相对含量升高后, 正常生成琼胶所需的3,6-内醚-L-半乳糖含量减少, 而硫酸酯基取代基含量上升, 长期过程中导致琼脂胶的含量上升而琼脂糖的含量下降, 凝胶强度下降但含量上升。单纯减少硫元素的输入在短时间内会让龙须菜中琼胶含量和凝胶强度都有轻微的上升, 长时间内又会引起琼胶含量的下降^[28], 很有可能就与GAS的作用有关。影响龙须菜琼胶含量的因素复杂多样, 这些因素往往还会对琼胶的凝胶质量产生影响, 想要分别完全揭示这些因素的作用模式是比较困难的^[29]。

本结果表明, 在低盐条件下, 龙须菜中红藻淀粉和红藻糖苷降解后生成的单糖大量的进入到琼胶合成的途径中, 在GAS的作用下, 琼胶中的硫酸酯基含量上升, 导致了凝胶强度下降但琼胶含量上升。在高盐条件下, 虽然也有红藻淀粉和红藻糖苷降解, 但降解后形成的单糖没有去合成琼胶, 推测在高盐条件下琼胶合成通路中有关键酶活性被抑制, 引起了半乳糖的积累及其向海藻糖的转化。

参考文献:

- [1] Elizabeth F B, Cecile H, Gurvan M. Sweet and sour sugars from the sea: the biosynthesis and remodeling of sulfated cell wall polysaccharides from marine macroalgae [J]. *Perspectives in Phycology*, 2015, **2**(1): 51-64.
- [2] Deniaud-Bouët E, Kervarec N, Michel G, *et al.* Chemical and enzymatic fractionation of cell walls from Fucales: insights into the structure of the extracellular matrix of brown algae [J]. *Annals of Botany*, 2014, **114**(6): 1203-1216.
- [3] Lee W K, Lim Y Y, Leow T C, *et al.* Biosynthesis of agar in red seaweeds: A review [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017(164): 23-30.
- [4] Fisheries and Fisheries Administration Bureau, Ministry of Agriculture. China Fishery Statistical Yearbook [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2018: 28. [农业农村部渔业渔政管理局、全国水产技术推广总站、中国水产学会. 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2018: 28.]
- [5] 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 [J]. *水生生物学报*, 2013, **37**(3): 535-540.]
- [6] Chen W Z, Xu D, Wang L G, *et al.* Preliminary study on economic characteristics and agar characteristics of two new strains of *Gracilaria lemaneiformis* [J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2009, **39**(3): 437-442.
- [7] Min L, 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.
- [8] Chang L P, Sui Z H, Feng F, *et al.* Relationship between gene expression of UDP-glucose pyrophosphorylase and agar yield in *Gracilariopsis lemaneiformis* (Rhodophyta) [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2014, **26**(6): 2435-2441.
- [9] Tang X B, Xu N J, Sun X, *et al.* Effects of 24-epibrassinolide on the agar synthesis and expression of genes involved in marine alga *Gracilariopsis lemaneiformis* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, **39**(12): 1788-1798. [汤小彬, 徐年军, 孙雪, 等. 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 [J]. *水产学报*, 2015, **39**(12): 1788-1798.]
- [10] Rincones R E, Yu S, Pedersén M. Effect of dark treatment on the starch degradation and the agar quality of cultivated *Gracilariopsis lemaneiformis* (Rhodophyta, Gracilariales) from Venezuela [J]. *Hydrobiologia*, 1993, **260-261**(1): 633-640.
- [11] Daugherty B K, Bird K T. Salinity and temperature effects on agar production from *Gracilaria verrucosa* Strain G-16 [J]. *Aquaculture*, 1988, **75**(1-2): 105-113.
- [12] Ekman P, Yu S, Pedersen M. Effects of altered salinity, darkness and algal nutrient status on floridoside and starch content, α -galactosidase activity and agar yield of cultivated *Gracilaria sordida* [J]. *British Phycological Journal*, 1991, **26**(2): 123-131.
- [13] Xie X J, Kuang J X, Chen S M, *et al.* Effects of environmental factors on the growth of four species of *Gracilaria* [J]. *Guangxi Sciences*, 2014, **6**(21): 596-599. [解修俊, 邝继鲜, 陈世明, 等. 环境因子对4种江蓠生长的影响 [J]. *广西科学*, 2014, **6**(21): 596-599.]
- [14] Xue Z X, Yang G P, Wang G C. Study on extraction method of agar from *Gracilaria lemaneiformis* [J]. *Marine Sciences*, 2006, **8**(30): 71-77. [薛志欣, 杨桂朋, 王广策. 龙须菜琼胶的提取方法研究 [J]. *海洋科学*, 2006, **8**(30): 71-77.]
- [15] Sun X, Wu J, Wang G, *et al.* Genomic analyses of unique carbohydrate and phytohormone metabolism in the macroalga *Gracilariopsis lemaneiformis* (Rhodophyta) [J]. *BMC Plant Biology*, 2018, **18**(1): 94-104.
- [16] Zhu Z B, Sun X, Xu N J, *et al.* Effects of salicylic acid on the resistance of *Gracilaria/Gracilariopsis lemaneiformis* to high temperature [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, **36**(8): 1304-1312. [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.]
- [17] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402-408.
- [18] He Y L, Hu C Y, Wang Y H, *et al.* The metabolic survival strategy of marine macroalga *Ulva prolifera* under temperature stress [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2018, **30**(6): 3611-3621.
- [19] Macler B A. Salinity effects on photosynthesis, carbon allocation, and nitrogen assimilation in the red alga, *Gelidium coulteri* [J]. *Plant Physiology*, 1988, **88**(3): 690-694.
- [20] Wu H L, Shin S K, Jang S, *et al.* Growth and nutrient bio-extraction of *Gracilaria chorda*, *G. vermiculophylla*, *Ulva prolifera*, and *U. compressa* under hypo- and hyper-osmotic conditions [J]. *Algae*, 2018, **33**(4): 329-340.
- [21] He L H, Wu M, Yuan P, *et al.* Effects of co-culture and salinity on the growth and agar yield of *Gracilaria tenuistipitata* var *liui* Zhang et Xia [J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2002, **20**(4): 365-370.
- [22] Cai X L. The physiological response of marine red alga *Gracilaria lemaneiformis* under temperature and salinity stress [D]. Ningbo: Ningbo University, 2012: 23-25. [蔡西栗. 龙须菜对温度和盐度逆境胁迫的生理响应 [D]. 宁波: 宁波大学, 2012: 23-25.]
- [23] 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.
- [24] Siow R S, Teoh S, Teo S S, *et al.* Molecular cloning and characterization of GDP-mannose-3',5'-epimerase; from *Gracilaria changii* [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2013, **25**(5): 1309-1318.
- [25] Macler B A. Regulation of carbon flow by nitrogen and light in the red alga, *Gelidium coulteri* [J]. *Plant Physiology*, 1986, **82**(1): 136-141.
- [26] Hu Y Y, Du Q W, Mi P, *et al.* Gene cloning and expression regulation in the pathway of agar and floridean starch synthesis of *Gracilariopsis lemaneiformis* (Rhodophyta) [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2019, **31**(3): 1889-1896.
- [27] Rivera-Marrero C A, Ritzenthaler J D, Newburn S A, *et al.* Molecular cloning and expression of a novel glycolipid sulfotransferase in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Microbiology*, 2002, **148**(3): 783-792.
- [28] Lee W K, Namasivayam P, Ho C L. Effects of sulfate starvation on agar polysaccharides of *Gracilaria* species (Gracilariaceae, Rhodophyta) from Morib, Malaysia [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2014, **26**(4): 1791-1799.
- [29] Lee W K, Lim Y Y, Leow T C, *et al.* Factors affecting yield and gelling properties of agar [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2016, **29**(3): 1-14.

AGAR ACCUMULATION AND PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY CHANGES OF *GRACILARIOPSIS LEMANEIFORMIS* UNDER DIFFERENT SALINITY STRESSES

CHEN Yue^{1,2}, CAI Xi-Li³, SUN Xue^{1,2}, ZHANG Xiao-Qian^{1,2} and XU Nian-Jun^{1,2}

(1. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology of 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; 3. Bureau of Ocean and Fisheries of Pingyang County, Pingyang 325400, China)

Abstract: In order to investigate the effects of different salinities on the growth and agar synthesis genes of marine macroalgae *Gracilariopsis lemaneiformis*, three different salinities (15, 25 and 35) were applied to evaluate correlations between agar content and the expression of genes related to agar synthesis including α -galactosidase (*gla*), galactose transferase (*gat*), α -1, 3-glycolipid sulfotransferase (*gst*), and galactose-2, 6-sulfurylases (*gas*). As results, under salinity 25, the growth rate of *G. lemaneiformis* was the highest with the RGR of 7.17%/d, which was higher than 6.27%/d of salinity 15 and 3.57%/d of salinity 35. Both adverse salinities showed significant increase in dark respiration rate and decrease in photosynthetic rate during the experimental period. After 15 days of culture, the agar content of *G. lemaneiformis* under low salt conditions was 9.27%, while that in high salt conditions was 8.09% and in normal salinity 25 was only 6.91%. On the 3rd day of culture, the gene expression level and enzyme activity of galactosidase at low and high salinity was significantly higher than that of salinity 25. After 15 days of culture, the *gla* gene expression in salinity 25 was still the lowest one, while the GLA enzyme activity in different salinity showed no significant difference. Under low salt condition, the expression of *gat* gene decreased first and then increased. Under high salt condition, the expression of *gat* gene was always the highest one, which was 3.03 times of that in salinity 25. For three days of low salinity cultivation, the expression of *gst* and *gas* genes decreased significantly, but it recovered to normal level in a long term of 15 days. The content of galactose in high salinity was 3.27 times of that in salinity 25, and the monosaccharide contents of low salinity were relatively low, among them, the galactose content was extremely low. In conclusion, our research indicated that either too high or too low salinity would cause a certain degree of stress and increase of agar content in *G. lemaneiformis*, but the mechanism of promoting agar accumulation is different while α -galactosidase and galactose transferase played an important role in this process.

Key words: *Gracilariopsis lemaneiformis*; Agar; salinity stress; α -galactosidase; Galactose transferase