

琼胶寡糖对坛紫菜抗烂性的诱导效应

刘方方, 骆其君, 陈海敏*, 严小军

(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)

摘要: 为研究琼胶寡糖对室内和海区养殖坛紫菜的抗烂效应, 以不同质量浓度琼胶寡糖处理坛紫菜叶片, 通过观察叶片的腐烂情况, 筛选坛紫菜最佳处理方法, 并将其应用于海区养殖坛紫菜. 研究表明: $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 琼胶寡糖处理 2 次, 2 d 一次, 每次 2 h, 能诱导坛紫菜最佳抗烂作用, 使腐烂率下降 37.31% ($P<0.01$), 且只有少量细胞萎缩坏死. 琼胶寡糖处理坛紫菜叶片培养至 40 d 时完全腐烂, 较空白组延后 13 d. 将该条件应用于海区坛紫菜养殖, 能够提高坛紫菜的叶片宽度、鲜重, 并使尖端腐烂率下降 19.36%.

关键词: 琼胶寡糖; 激发子; 坛紫菜; 腐烂率; 养殖

中图分类号: S946.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2014) 04-0012-04

寡糖是植物重要的一类生物激发子, 能激活高等植物的防御反应. 藻类抗性的研究起步较晚, 目前研究的主要是褐藻和红藻^[1], 如文献[2]报道, 寡聚褐藻酸钠能够刺激海带(*Laminaria digitata*)释放 H_2O_2 , 浓度达到 $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时可杀死藻体大部分的褐藻酸钠降解菌; 文献[3-4]报道, 琼寡糖能诱导龙须菜(*Gracilaria conferta*)产生 H_2O_2 的释放, 并杀死大约 90% 的琼胶降解菌.

坛紫菜是我国沿海重要的经济藻类, 浙江、福建等省都有大面积养殖. 近年来, 由于坛紫菜品种退化、人工管理不善、海区环境恶化等原因, 养殖坛紫菜经常出现大面积病烂, 造成巨大的经济损失, 而现有的防治措施仅限于品种改良、养殖技术革新等^[5], 人为干预手段匮乏. 我们前期研究发现, 琼胶寡糖能激发坛紫菜自身防御系统, 促进坛紫菜释放 H_2O_2 , 杀死藻体大部分附生菌和致病菌^[6-7]. 如果效仿陆源农作物的种植模式, 以寡糖激发子作为生物农药, 将可能提高坛紫菜的抗病性, 对海区健康养殖非常重要. 因此, 笔者以腐烂程度作为评价指标, 筛选琼胶寡糖对坛紫菜叶片的抗腐烂最佳条件, 并以该条件处理海区养殖坛紫菜, 观察其生长状态, 从而为坛紫菜健康养殖提供参考.

1 材料与方法

1.1 材料

2012 年 10 月坛紫菜叶状体采自象山县鹤浦镇, 叶状体阴干失水后冻存于 -20°C 冰箱中备用. 坛紫菜培养液为加入 III 号营养母液 ($100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{KNO}_3$ 、 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{FeSO}_4$ 、 $0.25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{MnSO}_4$ 和 $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{EDTA-Na}_2$, 营养母液:消毒海水=1:1 000) 的灭菌海水.

琼胶寡糖制备: 2% 琼胶溶液, 在 90°C 下 $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{HCl}$ 降解 2 h, NaOH 中和至 $\text{pH}=6.8$, 浓缩, 冷冻干燥. 琼胶寡糖聚合度为 2~10, 无硫酸基团.

1.2 坛紫菜叶片腐烂率检测

取出 -20°C 保存的坛紫菜, 无菌海水清洗干净, $0.7\% \text{KI}$ 浸泡 10 min, 再用无菌海水清洗 3 次, 20°C 下活化培养 24~48 h. 从健康坛紫菜叶状体中剪取 $0.5 \text{ cm}\times 0.5 \text{ cm}$ 大小的叶片加入含灭菌海水的 6 孔板内, 密度为 $7 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 20°C 下以 50、100、 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 琼胶寡糖处理叶片 2 h, 去上清, 灭菌海水清洗 3 次后加入培养液, 光照强度 45~54 lx, 光周期 12:12, 20°C 下培养 4 d, 统计叶片腐烂率, 并进行显微镜观察.

收稿日期: 2014-03-08.

宁波大学学报(理工版) 网址: <http://journal.lg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 国家星火重大项目 (2013GA701001); 宁波市科技攻关项目 (201201C1011016).

第一作者: 刘方方 (1979—), 女, 江苏徐州人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 海洋生物学. E-mail: lff8@163.com

*通信作者: 陈海敏 (1975—), 女, 浙江瑞安人, 博士/研究员, 主要研究方向: 海洋药物等. E-mail: chenhaiamin@nbu.edu.cn

不同处理次数的影响:以 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 琼胶寡糖处理坛紫菜叶片不同次数,1次,2次(12 h一次,1 d一次,2 d一次),3次(12 h一次,1 d一次),每次处理时间 2 h,培养 4 d 后,统计腐烂率,方法同上。

另外,以 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 琼胶寡糖处理坛紫菜叶片 2 h 后,连续培养直至出现全部重度腐烂,间隔不同天数记录腐烂程度。叶片腐烂率计算公式为:

腐烂率=(出现腐烂叶片数/总叶片数) $\times 100\%$ 。

轻度腐烂:边缘局部白化;中度腐烂:局部大范围或周围白化;重度腐烂率:整个叶片腐烂。

1.3 海区坛紫菜叶片生长状态试验

2013 年 10 月 9 日于象山县鹤浦镇,对日龄 30 d 的 12 张海区坛紫菜网帘进行实验。用海水将制备的琼胶寡糖溶液稀释成 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,在干出时期,取下 6 张网帘,浸泡 2 次,每次 2 h,2 d 一次,海水冲洗网帘 3 次,再将坛紫菜网放回海里;另外 6 张网帘作为对照。坛紫菜生长至第 1 水收割时,即 45 日龄时,从 $240\ \text{cm}\times 240\ \text{cm}$ 面积的网帘边缘和中间选择 3 个点随机采集约 $60\ \text{cm}\times 60\ \text{cm}$ 坛紫菜叶状体,挑选 30 条完整坛紫菜叶片测量长度、宽度、鲜重,叶片尖端进行显微镜观察,随机拍摄 20 张视野/玻片。同时,收集整张网帘坛紫菜称取鲜重。

1.4 统计分析

实验重复 3 次,以单因素方差分析方法比较实验组与对照组间的显著性, $P<0.05$ 表示显著差异, $P<0.01$ 表示极显著差异。

2 结果

2.1 不同质量浓度琼胶寡糖对坛紫菜叶片腐烂程度的影响

由图 1 可知,坛紫菜叶片培养至第 4 天,不同质量浓度琼胶寡糖处理的坛紫菜叶片的腐烂率都有所下降,其中 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 琼胶寡糖处理组腐烂率

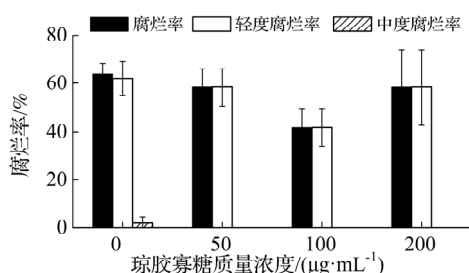
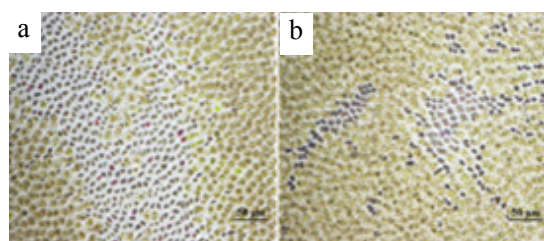


图 1 琼胶寡糖处理坛紫菜叶片 2 h 的腐烂率变化

最低,比空白组下降 22.20% ($P<0.05$),只出现轻度腐烂。显微镜观察表明:空白组坛紫菜叶片大面积细胞萎缩,色素凝集;而 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 处理组的腐烂细胞面积比空白组小(图 2)。由此说明,对于处理 1 次的效果, $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 琼胶寡糖处理 2 h 能较好地诱导坛紫菜叶片的抗腐烂效果。

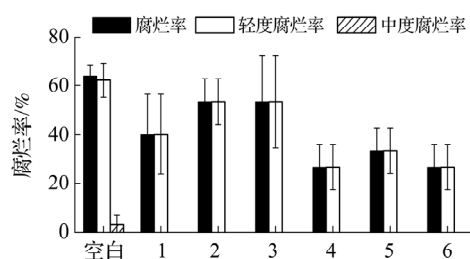


a 为空白组, b 为 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 琼胶寡糖处理组。

图 2 坛紫菜叶片显微镜照片

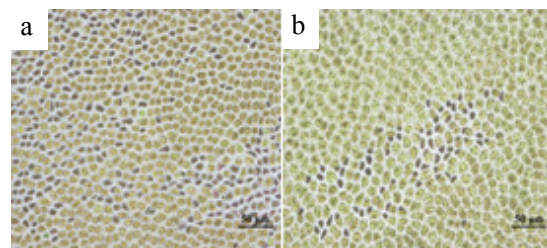
2.2 琼胶寡糖处理次数对坛紫菜叶片腐烂的影响

以 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 琼胶寡糖处理坛紫菜叶片,每次 2 h,对比不同次数和处理间隔的腐烂程度发现,不同处理方式都能降低叶片的腐烂率,但同样处理次数,间隔时间长比间隔时间短的效果好(图 3);而同样间隔时间,处理次数多效果较好。其中以 2 次(每次 2 h,2 d 一次)效果最好,腐烂率较空白组下降 37.31% ($P<0.01$),叶片只有较小面积的细胞萎缩腐烂(图 4)。此外,处理 3 次效果也较明显,其中每天处理 1 次的坛紫菜腐烂率也下降至 27% ($P<0.01$)。



1 为处理 1 次; 2,3,4 为处理 2 次,间隔 12 h,1 d,2 d;
5,6 为处理 3 次,间隔 12 h,1 d。

图 3 琼胶寡糖处理坛紫菜叶片不同次数的腐烂率

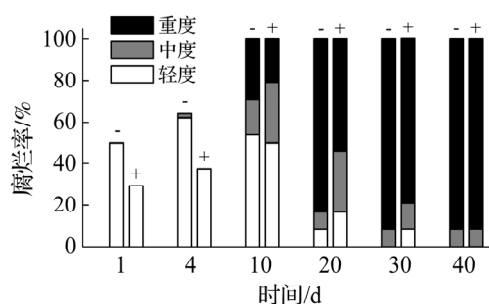


a 为空白组, b 为处理 2 次。

图 4 坛紫菜叶片的显微镜照

2.3 琼胶寡糖延迟坛紫菜叶片腐烂程度的影响

以 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 琼胶寡糖处理坛紫菜叶片 2 次, 每次 2 h, 2 d 一次, 随着培养天数增加, 空白组和处理组的腐烂率不断加剧, 但处理组的腐烂程度明显低于空白组(图 5), 第 1 天和第 4 天, 处理组只出现轻度腐烂, 腐烂率比空白组下降 20.83%, 26.48%; 而第 4 天时, 空白组开始出现中度腐烂; 第 10 天, 空白组和处理组叶片都出现中度和重度腐烂, 总腐烂率均达 100%, 但处理组中重度腐烂率为 20.83%, 空白组的重度腐烂率为 29.16%. 至 20 d 时, 空白组重度腐烂率达 83.33%, 而处理组重度腐烂率为空白组的 65.01%. 到第 40 天时, 2 组坛紫菜叶片的腐烂情况基本一致. 由此表明: 40 d 前, 经琼胶寡糖处理的坛紫菜叶片状态一直比空白组好.



“-”为空白组, “+”为琼胶寡糖处理组.

图 5 琼胶寡糖对坛紫菜叶片腐烂的延迟情况

2.4 琼胶寡糖对海区坛紫菜养殖效果的影响

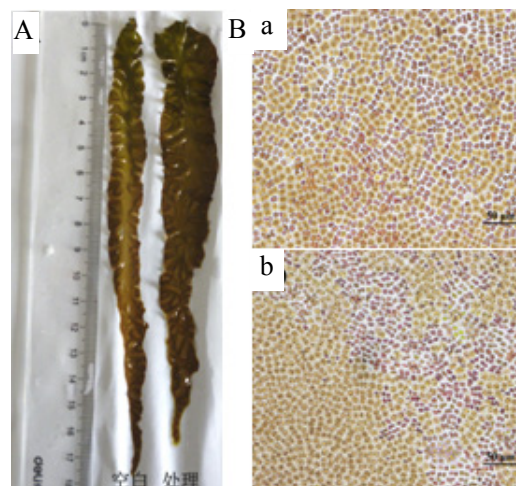
利用筛选出的最佳处理方式对海区日龄为 30 d 的坛紫菜叶片进行浸网实验, 在随后的第 1 水坛紫菜收割日时(日龄 45 d 坛紫菜), 对比处理组和空白组坛紫菜的生长情况(表 1 和图 6).

表 1 琼胶寡糖处理对海区坛紫菜生长状况的影响

生长状况	空白组	处理组
长度/cm	17.22±6.89	17.20±6.53
宽度/cm	1.43±0.66	1.60±0.79
鲜重/(30 条·g ⁻¹)	4.63±0.51	5.73±1.17
整张网帘鲜重/kg	5.92±0.65	7.33±1.50

处理后坛紫菜叶片长度几乎没变, 但宽度比空白组增加 11.89%, 30 条的平均鲜重增加 23.76%, 而整张网帘鲜重增加 23.82%. 从养殖坛紫菜的叶片状况看, 空白组叶片尖端的腐烂率为 78.79%, 而处理组只有 59.43%, 比空白组减少 19.36%. 结果表明, $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 琼胶寡糖处理 2 次(每次 2 h, 2 d

一次)的处理条件不仅能够改善海区坛紫菜的健康状况, 而且能够促进其生长, 提高紫菜产量.



A 为海区坛紫菜叶状体; B 为海区坛紫菜叶状体尖端的显微镜照片, 其中 a 为空白组, b 为 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 琼胶寡糖处理组.

图 6 琼胶寡糖对海区坛紫菜生长状况的影响

3 讨论

寡糖可以激活植物的天然免疫反应, 提高植物的抗病性^[8]. 我国在 2009 年成立寡糖抗逆生物农药产业联盟, 产业化的寡糖对农作物具有良好的抗病、增产效果^[9]. 海洋藻类多糖对农作物也有免疫增强作用, 如褐藻寡糖对水稻、玉米等都具有很好的促生长和抗病性^[10]. 国外研究发现寡糖能够作为内源激发子启动藻类的活性氧爆发以及致病菌的减少^[12-4].

本研究尝试以开发坛紫菜养殖生物农药为目的, 筛选琼胶寡糖最佳的诱导坛紫菜抗性的条件. 从质量浓度看, 没有呈现质量浓度依赖的腐烂率下降的现象, 而是在 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时反而升高. 前期分析发现, 琼胶寡糖能够诱导坛紫菜活性氧产生^[6], 随寡糖质量浓度增高, 可能会产生过多的活性氧对细胞造成损伤. 而 1 h 和 2 h 浸泡时间的对比研究发现, 以 2 h 为好, 因此实验中以 2 h 作为处理时间. 由于动物疫苗的接种可以通过多次接种加强动物的免疫力, 研究发现坛紫菜也存在类似现象, 通过间隔时间多次激发子处理, 能够使坛紫菜腐烂率进一步下降, 其中间隔时间长, 效果相对更好. 激发次数多也可以增强效果, 本研究中以 2 d 激发 1 次, 共激发 2 次的效果最好. 同时还发现, 激发子增强坛紫菜的免疫有一定的时效性, 在培

养的40 d内,琼胶寡糖处理过的叶片的腐烂程度都优于未处理组。由于海区养殖坛紫菜有收割周期,一般3~4 w为一个周期,因此,琼胶寡糖的激发免疫效果在一个收割周期内是可持续起效的,但是否会延续到下一个周期需要在海区实验中进一步观察。

将实验筛选出的最佳条件应用于海区后,发现该条件在海区坛紫菜养殖中同样适用,在第1水坛紫菜养殖周期的中期施用琼胶寡糖,从收割后的数据看,坛紫菜叶状体的宽度和网帘鲜重增加,且叶状体尖端的腐烂程度都小于未处理组,说明琼胶寡糖通过增强坛紫菜的天然免疫能力,改善了坛紫菜的生长状态,从而使其产量得到增加。由于海藻生活在海洋环境中,寡糖激发子的施用问题阻碍了生物农药在养殖藻类中的应用,但是紫菜属于潮间带藻类,每天会经历1~4 h退潮时的干出阶段,在此过程中,可以通过对藻体喷洒寡糖,使其在藻体表面形成寡糖覆盖层,实现短期的激发,再经多次激发,可以达到坛紫菜养殖期间健康生长的目的。

综上所述,利用 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 琼胶寡糖处理坛紫菜2次,每次2 h,2 d一次,能达到有效诱导海区坛紫菜抗烂效应,同时促进坛紫菜生长,为海区坛紫菜健康养殖激发子的开发提供参考。

参考文献:

- [1] Potin P, Bouarab K, Salaun J, et al. Biotic interactions of marine algae[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2002(5):1-10.
- [2] Küpper F, Kloareg B, Guern J, et al. Oligoguluronates elicit an oxidative burst in the brown algal kelp *Laminaria digitata*[J]. Plant Physiology, 2001, 125:278-291.
- [3] Weinberger F, Friedlander M, Hoppe H. Oligoagars elicit an oxidative burst in *Gracilaria conferta* (Rhodophyta) [J]. Journal of Phycology, 1999, 35:747-755.
- [4] Weinberger F, Friedlander M. Response of *Gracilaria conferta* (Rhodophyta) to oligoagars results in defense against agar-degrading epiphytes[J]. Journal of Phycology, 2000, 36:1079-1086.
- [5] 刘瑞棠. 福建坛紫菜养殖烂苗原因分析与几项预防措施[J]. 2011, 26(4):18-23.
- [6] 朱竹君, 陈海敏, 骆其君, 等. 琼胶寡糖诱导坛紫菜活性氧爆发[J]. 水产学报, 2012, 36(6):969-973.
- [7] 朱方超, 李崇丰, 王秀娟, 等. 琼胶寡糖激发坛紫菜对附生细菌的减少作用[J]. 中国生物防治学报, 2012, 28(3):394-399.
- [8] 李国均, 李大勇, 宋凤鸣. 植物诱导免疫及其应用研究进展[J]. 浙江农业学报, 2008, 20:72-77.
- [9] 寡糖抗逆生物农药产业联盟[EB/OL]. [2012-10-08]. <http://agri.chinannn.com/BugTitle.jsp?id=269>.
- [10] 刘瑞志. 褐藻寡糖促进植物生长与抗逆效应机理研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.

Rot-resistance Effect of Oligoagar on Disease of *Pyropia haitanensis*

LIU Fang-fang, LUO Qi-jun, CHEN Hai-min*, YAN Xiao-jun

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology of Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: The anti-rot effect of oligoagar on *Pyropia haitanensis* in both the laboratory and aquaculture is investigated. The concentration of oligoagar and times for treatment are optimized by examining the percentage of rot of thalli. The optimized conditions are then applied for aquaculture of *P. haitanensis*. Results indicate that, processed twice with 2 hours each and once in 2 days, the elicitation of *P. haitanensis* with $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ oligoagars can produce the optimal rot-resistance effect. The rot percentage of algal thalli decrease by 37.31% ($P<0.01$) with only a insignificant number of dead cells. After 40-day culturing, it is found that the thalli of two groups are rotten severely, but the rot in the oligoagar group with anti-rot treatment is delayed for more than 13 days. The aquaculture results reveal that the width and fresh weight of treated group are increased, and the rot percentage of algal thallus tip decrease by 19.36%.

Key words: oligoagar; elicitor; *Pyropia haitanensis*; rot; aquaculture

(责任编辑 史小丽)