

NaCl 浓度对杜氏盐藻中 1 种 NAD⁺ 依赖的 3-磷酸甘油脱氢酶基因表达的影响

蔡 马¹ 姜建国² 余土元¹

1. 仲恺农业工程学院生命科学学院, 广州 510225; 2. 华南理工大学轻工与食品工程学院, 广州 510641

摘要 考察 NaCl 浓度变化对杜氏盐藻细胞形态和单细胞甘油含量变化的影响, 并应用实时定量 PCR 技术检测 NaCl 浓度变化对杜氏盐藻 3-磷酸甘油脱氢酶同工酶中 1 种 NAD⁺ 依赖的 3-磷酸甘油脱氢酶基因表达的影响。结果表明: 不同浓度 NaCl 长期培养时杜氏盐藻细胞形态和体积的变化较小, 但当 NaCl 浓度快速变化时细胞形态和体积变化显著。杜氏盐藻在不同浓度 NaCl 条件下长期培养, 随着 NaCl 浓度增长, 单细胞甘油含量不断积累, 且杜氏盐藻能通过快速降低或提高单细胞甘油含量来应对低渗或高渗震动。不同浓度 NaCl 长期培养时, 杜氏盐藻中 3-磷酸甘油脱氢酶基因的表达水平与 NaCl 浓度呈显著负相关, 但低渗或高渗震动处理 2 h 后, 3-磷酸甘油脱氢酶基因的表达水平与 NaCl 浓度无显著性关系。

关键词 杜氏盐藻; NaCl 浓度; 细胞形态; 甘油含量; 3-磷酸甘油脱氢酶; 实时定量 PCR

中图分类号 Q 943 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)05-0077-07

土壤盐化是普遍存在的环境问题, 同时也是影响植物生存和生长的重要因素^[1]。研究发现, 藻类的耐盐机制与高等植物是类似的^[2]。杜氏盐藻 (*Dunaliella salina*) 是杜氏藻属中的一种极度耐盐的单细胞绿藻, 具有耐受 0.05~5.50 mol/L NaCl 并同时维持相对较低胞内 Na⁺ 浓度的特性^[3]; 盐胁迫下杜氏盐藻的渗透调节响应通过胞内一种主要的单一相容性溶质甘油浓度的变化起作用^[4], 因此, 杜氏盐藻可作为研究盐环境下渗透调节机制的优良模式生物。在高等植物和藻类中, 3-磷酸甘油脱氢酶 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 也被称为磷酸二羟基丙酮还原酶, 是甘油合成途径中的关键酶^[4-5]。Gee 等^[6] 从 *Dunaliella tertiolecta* 中分离了 3 种 3-磷酸甘油脱氢酶的同工酶, 其中 2 种主要的同工酶位于叶绿体中, 第 3 种同工酶位于细胞质中。叶绿体中第 1 种同工酶是细胞在高盐条件下生长时的主要类型, 作用于渗透调节时甘油的形成。第 2 种同工酶在无机磷酸盐含量增加时其特异性活性随之增长, 并且在刺激细胞生长和甘油酯合成中起作用。He 等^[5] 从 *D. salina* 中克隆了 1 个编码 NAD⁺ 依赖的 3-磷酸甘油脱氢酶的 cDNA, 不同条件下 RNA 印迹分析与甘油含量的测定表明该 cD-

NA 可能编码 1 种主要牵涉到甘油合成和渗透调节的 3-磷酸甘油脱氢酶。研究 NaCl 浓度变化对杜氏盐藻细胞形态和单细胞甘油含量变化的影响, 并应用实时定量 PCR 技术检测 NaCl 浓度变化对杜氏盐藻中 3-磷酸甘油脱氢酶同工酶中 1 种 NAD⁺ 依赖的 3-磷酸甘油脱氢酶 (EC1. 1. 1. 8) 基因表达的影响, 旨在为杜氏盐藻渗透调节机制的研究提供重要参考。

1 材料与方法

1.1 杜氏盐藻的梯度培养

杜氏盐藻藻种 FACHB-435, 中国科学院水生生物研究所。盐藻细胞在含 2.0 mol/L NaCl 的杜氏盐藻液体培养基中培养 (条件为温度 26 °C, 108 μmol/(m²·s) 白色荧光灯光照, 光/暗周期为 14 h/10 h, 摇床转速 96 r/min)。细胞培养至对数生长期后, 室温 6 200 r/min 离心 15 min 收集藻体, 再分别接入 10 个梯度 (0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0 mol/L NaCl) 的新鲜培养液中, 接种量为 1% (W/V)。按上述相同的条件进行 NaCl 梯度浓度培养, 细胞再次培养至对数生长期后, 检测细胞形态、单细胞甘油含量及 3-磷酸甘油脱氢酶基因表达量。

收稿日期: 2012-05-15

基金项目: 广东省科技计划项目 (2009B020307013)

蔡马, 硕士, 副教授. 研究方向: 植物生化与分子生物学. E-mail: caimagz@hotmail.com

1.2 高渗和低渗胁迫处理

取 2.0 mol/L NaCl 条件下培养至对数生长期的藻液,室温 6 200 r/min 离心 15 min 收集藻体,分别重悬在含 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0 mol/L NaCl 的等体积新鲜培养液中,立即在电子显微镜下观察细胞形态变化并拍照,室温放置 2 h 后再次对细胞形态进行拍照,同时测量杜氏盐藻细胞内单细胞甘油含量及 3-磷酸甘油脱氢酶基因表达量。

1.3 甘油含量检测

参考 Chen 等^[7]的方法,检测各样品的甘油含量。同时进行细胞计数,得出单细胞甘油含量。

1.4 RNA 的提取

使用 RNAiso Plus (TaKaRa),按试剂使用说明并略加修改进行各藻液样品总 RNA 的提取。使用 DNase I (RNase Free)处理提取出的总 RNA 以分解总 RNA 中的基因组 DNA。

1.5 实时定量逆转录 PCR

使用 Real Time PCR 扩增仪 ABI PRISM[®] 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) 进行实时定量逆转录 PCR 反应,对 3-磷酸甘油脱氢酶基因在不同浓度 NaCl 胁迫条件下的表达情况进行相对定量。使用 SYBR[®] PrimeScript[®] RT-PCR Kit (Perfect Real Time, TaKaRa) 按照说明书进行操作。使用引物 5'-GCTGAGATGTGCGGTAC-CCTGAA-3' 和 5'-CACTGAGGGGGAGAT-GAAGTTGC-3' 扩增 3-磷酸甘油脱氢酶基因片段 (150 bp)。使用引物 5'-ACCACACCTTCT-TCAACGAG-3' 和 5'-GGATGGCTACATACAT-GGCA-3' 扩增 *DsActin* 基因片段 (150 bp) 作为内参照。逆转录反应条件为:37 °C 15 min;85 °C 5 s。反转录产物在 -20 °C 保存,然后进行实时定量 PCR。实时定量 PCR 反应条件为:95 °C 30 s;95 °C 5 s,60 °C 34 s,40 个循环。使用熔解曲线分析 PCR 扩增产物的特异性,观察熔解曲线是否为单峰,熔解曲线为单峰,则 PCR 反应产物为特异性扩增产物。

1.6 统计分析

所有试验结果均是 3 次重复试验的平均值。使用软件 SPSS 13 对数据进行统计分析,在 95% 或 99% 的置信界限确定显著性。

2 结果与分析

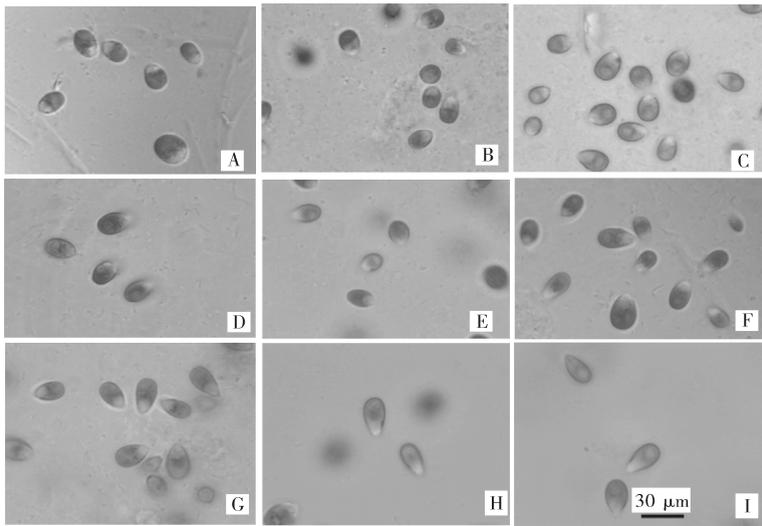
2.1 细胞形态变化

培养的细胞在 NaCl 浓度较低时主要呈球形或

椭圆球形(图 1-A,B,C),NaCl 浓度增大时细胞逐渐变长、变细(图 1-D,E,F,G)。在 NaCl 浓度更高时,盐藻细胞形态主要呈细长形,且细胞浅色的一端形状变尖较为明显(图 1-H,I)。结果表明,在高浓度 NaCl 条件下长期培养使杜氏盐藻细胞适度脱水并使细胞体积缩小,且形态变为细长形,但依然能够生存和持续生长。NaCl 浓度为 2.0 mol/L 时,长期培养的杜氏盐藻细胞形态主要呈椭圆球形(图 1-D)。

当 NaCl 浓度由 2.0 mol/L 稀释为 0.5 mol/L 时,细胞吸水使细胞体积明显膨胀变大,且细胞形状迅速变为圆球形,细胞颜色略浅于 NaCl 浓度改变前的细胞颜色(图 2-A)。当 NaCl 浓度由 2.0 mol/L 稀释为 1.0 或 1.5 mol/L 时,盐藻细胞变化情况与上述情况类似,但变化幅度随处理 NaCl 浓度升高逐渐变小(图 2-B,C)。低渗 NaCl 胁迫处理下部分细胞发生破碎现象,可能是由于体积膨胀程度太剧烈而胀破细胞。当 NaCl 浓度从 2.0 mol/L 迅速增加到 2.5、3.0、3.5 mol/L 时,盐藻细胞失水使细胞迅速萎缩,细胞形状迅速变为圆锥形,细胞颜色变深,细胞萎缩的部分几乎都在颜色较浅的一端(图 2-D,E,F)。当 NaCl 浓度从 2.0 mol/L 增加到 4.0~5.0 mol/L 时,细胞因失水发生萎缩的同时部分盐藻细胞的形态变得不规则,甚至部分细胞发生破碎死亡(图 2-G,H,I),说明过高浓度 NaCl 胁迫对盐藻细胞产生毒害作用。

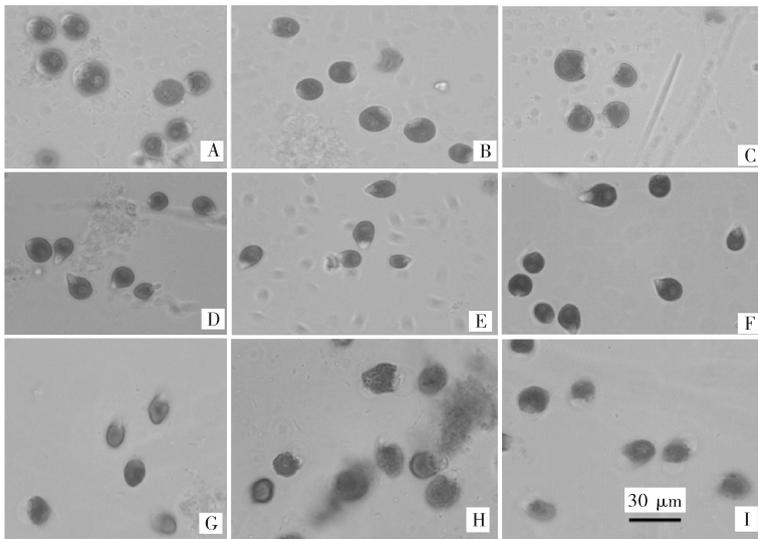
由图 3-A,B,C,D,E,F 可知,NaCl 胁迫处理 2 h 后细胞形态与在相同浓度 NaCl 条件下长期培养的细胞形态(图 1-A,B,C,E,F,G)类似,说明盐藻细胞可能已经适应改变后的 NaCl 浓度。同时,发现少量细胞的形态(图 3-G,H,I)与相同浓度 NaCl 条件下长期培养的细胞形态(图 1-H,I)类似,但大多数细胞形态明显不同且部分细胞已经死亡。杜氏盐藻细胞能在高浓度 NaCl 条件下生存(图 1-H,I),在高浓度 NaCl 胁迫下盐藻细胞可能需要更多时间(>2 h)来适应 NaCl 浓度的改变。当 NaCl 浓度从 2.0 mol/L 增加到 4.0~5.0 mol/L 时,观察到盐藻细胞表面有部分脂质小球的出现(图 4),高浓度 NaCl 胁迫处理 2 h 后所有的脂质小球都消失了,推测脂质小球中含有的物质可能为甘油,当 NaCl 浓度迅速增大时盐藻细胞质内甘油显著积累从而形成脂质小球。



A-I: 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 mol/L NaCl.

图 1 NaCl 梯度浓度条件下培养的杜氏盐藻细胞形态

Fig. 1 Variation of cell shape of *D. salina* grown at different concentrations of NaCl



A-I: NaCl 浓度从 2.0 mol/L 分别变化为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5 mol/L。Cell shape when NaCl was changed from 2.0 mol/L to 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5 mol/L; 图 3 同 The same as Fig. 3.

图 2 杜氏盐藻渗透胁迫处理初期细胞形态

Fig. 2 The initial cell shape of *D. salina* after treating by osmotic shock

2.2 甘油含量

NaCl 梯度浓度长期培养下杜氏盐藻单细胞甘油的积累与 NaCl 培养浓度显著正相关 ($r > 0, P < 0.01$), 单因素方差分析结果显示, 不同浓度 NaCl 条件下长期培养的杜氏盐藻单细胞甘油含量有显著差异 ($P < 0.05$) (图 5-A)。检测到的最小的单细胞甘油含量为 13.22 ± 0.30 pg (NaCl 浓度为 0.5 mol/L), 最大的单细胞甘油含量为 18.16 ± 0.72 pg (NaCl 浓度为 5 mol/L), 表明长期的高浓度 NaCl

胁迫可以促进盐藻细胞内甘油的积累。使用不同浓度 NaCl 胁迫处理下盐藻单细胞甘油含量也有着显著差异 ($P < 0.05$), 同时单细胞甘油含量与处理 NaCl 浓度显著正相关 ($r > 0, P < 0.01$) (图 5-B)。低渗 NaCl 胁迫处理时, 单细胞甘油含量降低, 检测到最小甘油含量为 10.08 ± 0.45 pg (NaCl 浓度为 0.5 mol/L), 甘油含量比胁迫处理前降低 42.20%; 高渗 NaCl 胁迫处理时, 单细胞甘油含量升高, 检测到最大甘油含量为 32.76 ± 0.65 pg (NaCl 浓度为

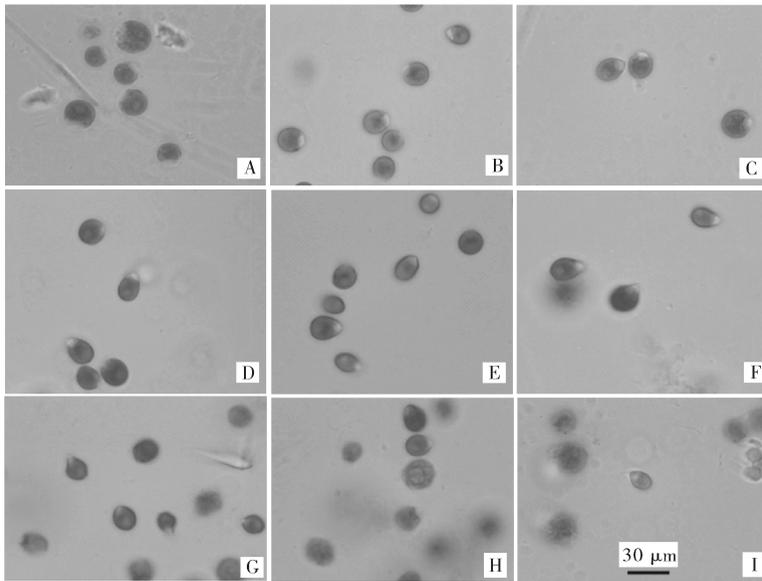
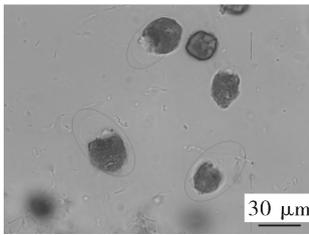


图 3 杜氏盐藻渗透胁迫处理 2 h 后细胞形态

Fig. 3 The cell shape of *D. salina* after 2 h treating by osmotic shock



圈中标示的为带有脂质小球的细胞 The cells with lipid globules were labeled by circles.

图 4 NaCl 从 2.0 mol/L 增加到

4.5 mol/L 时杜氏盐藻细胞形态的变化

Fig. 4 Cell shape of *D. salina* when NaCl was

increased from 2.0 mol/L to 4.5 mol/L immediately

5 mol/L), 比胁迫处理前提高 87.84%。结果表明, 杜氏盐藻可通过调节胞内甘油的合成或降解以维持适合的渗透压来适应环境中 NaCl 浓度的快速变化。因此, 甘油可能在杜氏盐藻的渗透调节中起重要作用, 使杜氏盐藻可以在多种 NaCl 浓度条件下生存。

2.3 3-磷酸甘油脱氢酶基因的相对表达量

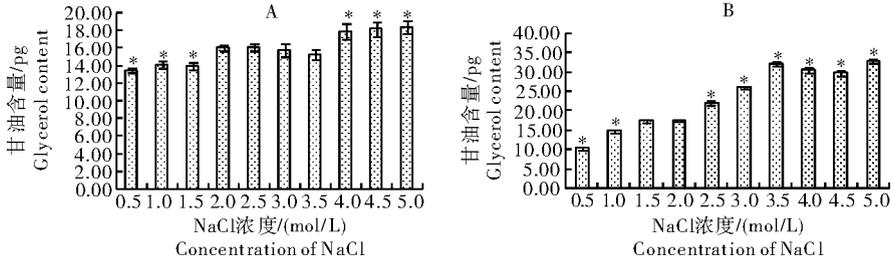
对 NaCl 梯度浓度长期培养时杜氏盐藻细胞中 3-磷酸甘油脱氢酶基因的表达进行检测, 结果表明, NaCl 浓度为 0.5 mol/L 时, 3-磷酸甘油脱氢酶基因有最大表达; NaCl 浓度为 5 mol/L 时, 检测到最小表达, 其表达量只有最大表达量的 1/7 (图 6-A)。相关性分析结果表明, NaCl 梯度浓度长期培养下杜氏盐藻细胞内 3-磷酸甘油脱氢酶基因的表达水平与培养的 NaCl 浓度显著负相关 ($r < 0, P < 0.05$), 3-

磷酸甘油脱氢酶基因的表达水平随 NaCl 浓度的升高而降低, 推测长期高浓度 NaCl 胁迫会抑制杜氏盐藻中该 3-磷酸甘油脱氢酶 (EC1.1.1.8) 的表达活性。对低渗、高渗 NaCl 胁迫处理下杜氏盐藻细胞中 3-磷酸甘油脱氢酶基因的表达情况进行相对定量, 相关性分析结果表明, 低渗、高渗 NaCl 胁迫处理 2 h 后杜氏盐藻细胞内 3-磷酸甘油脱氢酶基因的表达水平与 NaCl 处理浓度无显著性关系 ($P > 0.05$) (图 6-B)。与短期高浓度 NaCl 胁迫下盐藻细胞形态变化情况相类似, 盐藻细胞内 3-磷酸甘油脱氢酶基因的表达可能也需要更多时间 (> 2 h) 达到稳定的水平来适应改变了的盐环境。

对 PCR 后的扩增产物进行熔解曲线分析, 可推断 PCR 产物是否单一。所有 PCR 产物的熔解曲线分析均为单峰, 可证实无非特异性扩增现象 (图 7-A)。绝大多数 PCR 产物的熔解曲线分析为单峰, 因此认为 PCR 扩增产物的特异性是符合要求的 (图 7-B)。

3 讨论

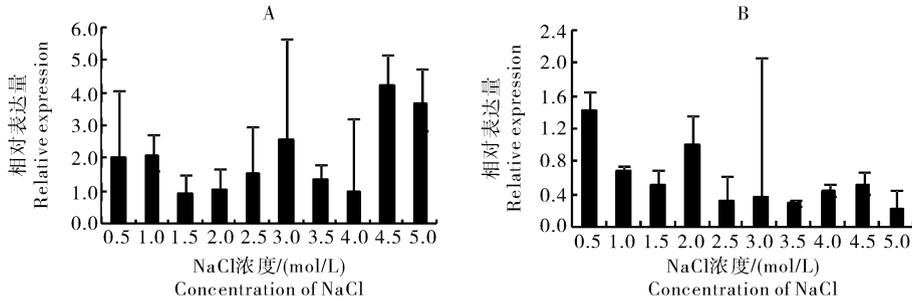
不同浓度 NaCl 长期培养下杜氏盐藻均能生存和持续生长, NaCl 浓度较高时细胞大多呈细长形。4.0~5.0 mol/L NaCl 条件下长期培养时盐藻细胞生物量远小于低浓度 NaCl 培养时的盐藻细胞生物量^[7], 说明高浓度 NaCl 条件对盐藻生长有不利影响。杜氏盐藻的渗透响应涉及外部结构和代谢的变



A: NaCl 梯度浓度长期培养 *D. salina* grown at different concentrations of NaCl; B: 低渗、高渗胁迫处理; 数据为 3 次重复试验的平均值 ± 标准偏差 (*t*-test, $P < 0.01$); 使用单因素方差分析对照样品 (2.0 mol/L) 与其他样品之间的差异显著性; *, $P < 0.05$. *D. salina* cultured in 2.0 mol/L NaCl was treated by hyperosmotic or hypoosmotic shock. Columns represent the means of three replicated studies, with the SD of the means (*t*-test, $P < 0.01$). The significance of the differences between the 2.0 mol/L and other test values were tested by using one-way ANOVA. *, $P < 0.05$.

图 5 不同浓度 NaCl 条件下杜氏盐藻单细胞甘油含量的变化

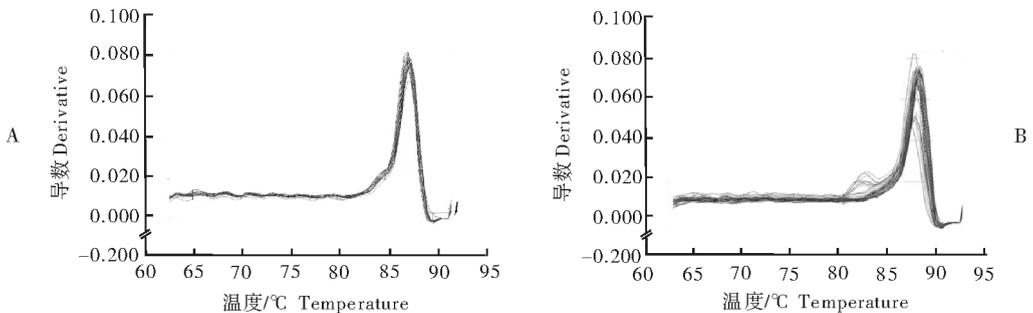
Fig. 5 Single cell glycerol content of *D. salina* under different salinities



A: NaCl 梯度浓度长期培养, 数据为 3 次重复试验的平均值 ± 标准偏差 (*t*-test, $P < 0.01$) Treated under different concentrations of NaCl. All data are the means of values obtained from three parallel experiments ± SD (*t*-test, $P < 0.01$); B: 低渗、高渗胁迫处理, 数据为 4 次重复试验的平均值 ± 标准偏差 (*t*-test, $P < 0.05$) Treated by hyperosmotic and hypoosmotic shocks. All data are the means of values obtained from four parallel experiments ± SD (*t*-test, $P < 0.05$).

图 6 杜氏盐藻细胞内 3-磷酸甘油脱氢酶基因的相对表达量

Fig. 6 Expression of *G3pdh* in *D. salina* grown at concentrations of NaCl(A) and cultured in 2.0 mol/L NaCl treated by hyperosmotic or hypoosmotic shock(B)



A: NaCl 梯度浓度长期培养 Treated under different concentrations of NaCl; B: 低渗、高渗胁迫处理 Treated by hyperosmotic and hypoosmotic shocks.

图 7 3-磷酸甘油脱氢酶和 *DsActin* 基因 PCR 扩增产物的熔解曲线

Fig. 7 The dissociation curve of PCR amplification of *G3pdh* and *DsActin*

化,按照渗透调节的时间长短包含 3 个阶段。第 1 阶段为瞬时响应,包括细胞大小、形状、结构和细胞内离子浓度的变化,在遭受渗透胁迫后几秒钟至 5 min 内响应就会完成。第 2 阶段为短期响应,是调节细胞内甘油浓度来平衡杜氏藻细胞内外渗透压的过程,该过程在渗透胁迫后 2~3 h 内完成,并最终恢复细胞的原始体积。第 3 阶段为长期响应,主要是部分渗透胁迫诱导基因的表达和部分盐诱导蛋白

的积累过程,该阶段通常在渗透胁迫 12~24 h 后开始发生^[2]。研究发现,杜氏盐藻在遭受 3~5 倍原始浓度的高渗或低渗盐胁迫几秒钟内能够有近 2 倍的细胞体积变化^[9]。本研究中,当 NaCl 浓度快速改变时,杜氏盐藻细胞形态和体积均发生显著变化,与杜氏盐藻的瞬时响应阶段一致。研究发现 *D. tertiolecta* 遭受低渗盐胁迫时细胞在 2~4 min 内迅速膨胀变为圆球形^[10]。本研究中,除高盐胁迫处理外,其他细胞在低渗、高渗胁迫处理 2 h 后形态基本恢复,与杜氏盐藻的短期响应阶段一致。本研究表明,杜氏盐藻能够通过降低或提高甘油含量来应对低渗或高渗盐胁迫,该结果与周丽等^[11]的研究结果类似,表明杜氏盐藻细胞内甘油含量与周围环境的 NaCl 浓度是密切相关的。

在甘油的合成途径中,3-磷酸甘油脱氢酶催化磷酸二羟基丙酮生成 3-磷酸甘油,在 3-磷酸甘油磷酸酶的催化下最终合成甘油^[8]。高浓度 NaCl 条件长期培养时杜氏盐藻细胞中一种 3-磷酸甘油脱氢酶的基因表达水平较低,不利于甘油的合成,然而高浓度 NaCl 长期胁迫能够促进单细胞甘油的积累,单细胞甘油含量随着 NaCl 浓度的增加而升高。研究表明,*Dunaliella parva* 细胞内甘油水平在 NaCl 饱和浓度下达到最大值,约 8 mol/L 或为细胞质量的 55%^[4]。因此,除 3-磷酸甘油脱氢酶外,推测杜氏盐藻中可能还存在其他 1 种或多种 3-磷酸甘油脱氢酶同工酶或其他关键酶调控甘油代谢。Forster 等^[12]研究表明,较低的渗透条件导致 *Ashbya gossypii* 细胞内 3-磷酸甘油脱氢酶活性比在高渗条件下更高,与本研究中 3-磷酸甘油脱氢酶的基因表达水平随着 NaCl 浓度的增加而降低的结果类似。He 等^[13]对 *Dunaliella viridis* 在不同浓度 NaCl 长期培养时叶绿体中一种新的 3-磷酸甘油脱氢酶基因 *DvGPDH1* 表达水平的研究表明,*DvGPDH1* 表达水平在 NaCl 浓度为 0.5~2.0 mol/L 时逐渐升高,并在 2.0 mol/L 时达到最大值,而当 NaCl 浓度为 3.0~5.0 mol/L 时基因表达水平却逐渐降低。本研究中,低渗、高渗胁迫处理 2 h 后杜氏盐藻细胞内 3-磷酸甘油脱氢酶基因的表达水平与 NaCl 浓度没有显著性关系,基因的表达可能需要更长时间(>2 h)达到稳定,以适应改变了的 NaCl 浓度。与之不同的是,2.0 mol/L NaCl 的渗透条件诱导 2 h 后在耐盐酵母 *Pichia forinosa* 中就能够显示出较高的 3-磷酸甘油脱氢酶基因表达水平^[14]。上述结果表明,3-磷酸甘油脱氢酶基因在不同浓度 NaCl 条件下

表现出不同的表达水平,可能是在不同浓度 NaCl 下不同植物细胞中几种 3-磷酸甘油脱氢酶的同工酶有不同的酶活性。

3-磷酸甘油脱氢酶基因的表达在不同浓度 NaCl 长期培养和短期胁迫处理下表现出较大的差异性。长期培养时,低浓度 NaCl 条件下基因表达相对较高,而高浓度 NaCl 会抑制基因的表达,短期高浓度 NaCl 胁迫反而可以提高基因的表达量。本研究中,NaCl 浓度为 2.0 mol/L 时基因的表达水平较低,而其他浓度短期胁迫后基因的表达水平大多有不同程度的提高,NaCl 浓度改变较小时基因的表达水平提高较小,NaCl 浓度改变较大特别是 4.5 和 5.0 mol/L NaCl 胁迫时基因的表达水平提高较大,说明 NaCl 浓度的快速变化对基因的表达有刺激作用,推测这种 3-磷酸甘油脱氢酶可能在杜氏盐藻细胞耐受短期盐胁迫特别是高盐胁迫时的甘油调节过程中起作用。同时,根据不同浓度 NaCl 长期培养和短期胁迫下基因表达的差异性,推测 NaCl 对这种 3-磷酸甘油脱氢酶基因的表达同样有抑制作用,随 NaCl 浓度增大抑制作用也不断增强,且抑制作用也与时间相关,随时间变长抑制作用也不断增强,经过一段较长时间的适应后,基因表达达到稳定并最终与长期培养条件下基因的表达情况一致。

在我们的前期研究中,使用同工酶电泳技术检测到 5 种 3-磷酸甘油脱氢酶同工酶,其中 G3pdh-2 存在于 1.5~4.0 mol/L NaCl 条件下,其余几种同工酶(G3pdh-1、G3pdh-3、G3pdh-4 和 G3pdh-5)主要在低浓度 NaCl 条件下起作用^[7]。本研究中,实时定量 PCR 结果显示杜氏盐藻中 1 种 3-磷酸甘油脱氢酶基因在长期低浓度 NaCl 条件下表达水平相对较高并随 NaCl 浓度增加而降低,因此该基因可能编码的是 4 种同工酶(G3pdh-1、G3pdh-3、G3pdh-4 和 G3pdh-5)中的 1 种,并在低浓度 NaCl 条件下起主要作用,至于具体是哪种同工酶需要在后续的研究中进一步考察。

参 考 文 献

- [1] 张加强,潘凤英,廖小芳,等. 红麻杂交种幼苗生长对盐胁迫的响应[J]. 华中农业大学学报, 2011, 30(5): 552-557.
- [2] CHEN H, JIANG J G. Osmotic responses of *Dunaliella* to the changes of salinity[J]. J Cell Physiol, 2009, 219(2): 251-258.
- [3] FRASER P D, BRAMLEY P M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids[J]. Prog Lipid Res, 2004, 43(3): 228-265.

- [4] ALKAYAL F, ALBION R L, TILLET R L, et al. Expressed sequence tag (EST) profiling in hyper saline shocked *Dunaliella salina* reveals high expression of protein synthetic apparatus components[J]. *Plant Sci*, 2010, 179(5):437-449.
- [5] HE Q H, QIAO D R, BAI L H, et al. Cloning and characterization of a plastidic glycerol 3-phosphate dehydrogenase cDNA from *Dunaliella salina*[J]. *J Plant Physiol*, 2007, 64(2):214-220.
- [6] GEE R, COYAL A, BYERRUM R U, et al. Two isoforms of dihydroxyacetone phosphate reductase from the chloroplasts of *Dunaliella tertiolecta* [J]. *Plant Physiol*, 1993, 103(1):243-249.
- [7] CHEN H, JIANG J G, WU G H. Effects of salinity changes on the growth of *Dunaliella salina* and the isozyme activities of glycerol-3-phosphate dehydrogenase[J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(14):6178-6182.
- [8] CUI L Q, CHAI Y R, LI J, et al. Identification of a glucose-6-phosphate isomerase involved in adaptation to salt stress of *Dunaliella salina*[J]. *J Appl Phycol*, 2010, 22(5):563-568.
- [9] PICK U. Adaptation of the halotolerant alga *Dunaliella* to high salinity[G]//LAUCHI A, LUTTGE U. Salinity: environment, plants, molecules. Dordrecht; Kluwer Academic Publishers, 2002:97-112.
- [10] PINONTOAN R, YUASA T, ANDERCA M I, et al. Cloning of a cDNA encoding a 66-kDa Ca²⁺-dependent protein kinase (CDPK) from *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyta)[J]. *J Phycol*, 2000, 36(3):545-552.
- [11] 周丽, 孟祥红, 刘成圣, 等. 渗透胁迫对杜氏盐藻胞内甘油含量及相关酶活性影响[J]. *植物学通报*, 2006, 23(2):145-151.
- [12] FORSTER C, MARIENFELD S, WENDISCH F, et al. Adaptation of the filamentous fungus *Ashbya gossypii* to hyperosmotic stress: different osmoresponse to NaCl and mannitol stress[J]. *Appl Microbiol Biot*, 1998, 50(2):219-226.
- [13] HE Y X, MENG X Z, FAN Q L, et al. Cloning and characterization of two novel chloroplastic glycerol-3-phosphate dehydrogenases from *Dunaliella viridis*[J]. *Plant Mol Biol*, 2009, 71(1/2):193-205.
- [14] PENG F, LI G, WANG X X, et al. Cloning and characterization of a glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) gene from the halotolerant yeast *Pichia forinosa* [J]. *Yeast*, 2010, 27(2):115-121.

Effects of salinities on gene expression of a (NAD⁺)-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase in *Dunaliella salina*

CAI Ma¹ JIANG Jian-guo² YU Tu-yuan¹

1. College of Life Science, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China;

2. College of Food and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China

Abstract Effects of salinity changes on variation of cell shape and single cell glycerol content of *Dunaliella salina* were investigated and effects of salinity changes on the gene expressions of a (NAD⁺)-dependent G3pdh (EC1. 1. 1. 8) among G3pdh isozymes in *D. salina* were detected by real-time quantitative PCR. Results showed that the changes of shape and volume of *D. salina* cell cultured chronically at various salinities were minor. When the salinity changed rapidly, the variations of cell shape and cell volume of *D. salina* were significant, which were recovered basically after 2 h except treated by high salinity. It was found that some lipid globules in the surface of *D. salina* cells when the salinity increased from 2.0 to 4.0-5.0 mol/L NaCl rapidly. When *D. salina* was cultured chronically at various salinities, the accumulation of single cell glycerol increased with increased salinity, and *D. salina* also could rapidly decrease or increase single cell glycerol contents to adapt to hypoosmotic or hyperosmotic shock. The expression level of *G3pdh* in *D. salina* grown at various salinities was significantly inversely correlated with the salinity. There was no significant correlation between the expression level of *G3pdh* and salinity after two hours of treatment by hyperosmotic or hypoosmotic shock.

Key words *Dunaliella salina*; concentrations of NaCl; cell shape; glycerol content; glycerol-3-phosphate dehydrogenase; real-time quantitative PCR

(责任编辑: 陆文昌)