

# 海萝抗氧化酶系与失水响应因子表达模式分析

刘 顺<sup>1,2,3</sup>, 胡自民<sup>1,2</sup>, 张全胜<sup>4</sup>, 段德麟<sup>1,2</sup>

(1. 中国科学院 海洋研究所 海洋大科学研究中心 实验海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋生物学与生物技术功能实验室, 山东 青岛 266071; 3. 中国科学院大学, 北京 100049; 4. 烟台大学 海洋学院, 山东 烟台 264005)

**摘要:** 潮间带红藻海萝(*Gloiopeltis furcata*)对失水胁迫具有很强的耐受能力。为探索海萝周期性失水过程中的响应机制, 本研究在 24 h 内设计了两次连续的失水-复水循环处理, 测定了海萝抗氧化酶活力的变化情况。同时, 利用转录组测序技术, 结合荧光定量 PCR 方法(qRT-PCR), 对海萝失水响应基因的转录表达进行了验证。结果表明: 海萝转录组共组装到 32681 条基因。与对照组相比, 处理组共表达了 7161 条差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)。KEGG 分析显示, DEGs 分布在代谢、环境信息加工、有机体系统、遗传信息加工、细胞进程等方面。海萝抗氧化酶活力测定发现, 抗氧化能力对海萝响应失水胁迫十分重要。过氧化氢酶(CAT)、硫氧还蛋白还原酶(TrxR)、超氧化物歧化酶(SOD)参与抗氧化过程, 其中 CAT 酶活力对海萝抵抗失水胁迫尤为重要。此外, qRT-PCR 结果显示, 海萝中渗透调节物质海藻糖苷合成的相关基因(*GfUGPase*、*GfGK*、*GfGPDH*)只对初次失水处理有正响应。而热激蛋白 70 基因(*GfHSP70*)、碳酸酐酶基因(*GfCA*)、MYB 蛋白编码基因(*GfMYB*)以及谷胱甘肽 S 转移酶基因(*GfGST*)在两次失水过程中其转录水平均有上调表达, 它们也参与了海萝失水响应机制。

**关键词:** 海萝(*Gloiopeltis furcata*); 失水; 抗氧化酶; 海藻糖苷; 转录

中图分类号: Q945.78 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2019)05-0001-10

DOI: 10.11759/hyxx 20190404002

潮间带大型海藻固着生长于礁石上, 其每天需经受节律性的干出与浸没<sup>[1]</sup>。退潮时, 潮间带海藻直接暴露于空气中, 其生长状态受失水、温度、高光强等多种环境因子的影响, 而失水是最为重要的一项非生物胁迫<sup>[2]</sup>。失水会损伤藻体组织和细胞结构<sup>[3]</sup>, 同时也会影响海藻光合、呼吸等生理过程<sup>[1]</sup>。此外, 失水会使藻体产生过量的活性氧(reactive oxygen species, ROS), 造成脂质过氧化, DNA 与蛋白质损伤, 甚至引起藻体细胞死亡<sup>[4]</sup>。因此, 失水耐受能力对潮间带海藻十分重要, 是影响其垂直分布的主要因素之一<sup>[1, 2]</sup>。

目前, 对潮间带红藻失水响应机制的转录组学研究主要集中于紫菜属。Im 等<sup>[5]</sup>对不同失水程度的甘紫菜(*Pyropia tenera*)进行了转录组测序, 其鉴定到了一条叶绿体蛋白编码基因 *PtDRG2*, 过表达该基因可增强衣藻对渗透胁迫的耐受能力。Wang 等<sup>[6]</sup>对坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)不同发育阶段和失水处理下的转录组数据进行分析发现, 饱和和脂肪酸合成相关基因、转录因子、分子伴侣共同参与了坛紫

菜失水与复水过程。C<sub>4</sub> 和 C<sub>3</sub> 通路、海藻糖生物合成、叶啉和叶绿素代谢、细胞凋亡、生殖发育、碳水化合物代谢等过程的相关基因参与了失水胁迫。而水通道蛋白和 ABC 转运蛋白可能参与了坛紫菜复水初期反应。Yang 等<sup>[7]</sup>对条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)进行转录组测序发现, 大量的 Unigenes 与条斑紫菜胁迫耐受性相关, 主要包括失水耐受相关基因, 高光耐受相关基因, 类黄酮生物合成相关基因以及活性氧清除相关基因。Sun 等<sup>[8]</sup>分析了条斑紫菜渗透胁迫下的转录组数据发现, 其光合作用相关的 Unigenes 在渗透胁迫时显著下调以防止光合副产物的损伤, 抗氧化酶相关 Unigenes 则上调表达以防止活性氧的

收稿日期: 2019-02-04; 修回日期: 2019-03-27

基金项目: 国家自然科学基金国际(地区)合作项目(41761144057); 山东省重点科技研发项目(2018SDKJ0502-1)

[Foundation: National Natural Science Foundation of China, No.41761144057; Shandong Key Sci-Technology Research Project, No.2018SDKJ0502-1]

作者简介: 刘顺(1993-), 女(满族), 辽宁葫芦岛人, 硕士研究生, 主要从事藻类适应性机制研究, 电话: 0532-82898554, E-mail: liushun8833@163.com; 段德麟, 通信作者, 博士, 研究员, 主要从事藻类化学的研究, 电话: 0532-82898556, E-mail: dlduan@qdio.ac.cn

损伤。但目前,对周期性连续失水—复水条件下,潮间带红藻的转录组研究仍未见报道。

潮间带海藻含有大量抗氧化酶和非酶类抗氧化剂,可清除失水产生的过量 ROS 和有毒代谢物<sup>[9]</sup>。Flores-Molina 等<sup>[3]</sup>认为,藻类抗氧化能力与其所处潮位相关。Fierro 等<sup>[10]</sup>对红藻 *Pyropia orbicularis* 的研究发现,过氧化物酶(peroxidase, PRX)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和硫氧还蛋白(thioredoxin, TRX)在有效消除 ROS 方面发挥重要的作用。此外,潮间带红藻可产生红藻糖苷(fluidoside),其具有渗透压调节、细胞壁修复以及细胞抗氧化等重要功能,可能显著响应失水胁迫<sup>[11-13]</sup>。红藻糖苷是一种多糖,其合成需要甘油-3-磷酸和 UDP-半乳糖作为前体物质。UDP-葡萄糖焦磷酸化酶(UDP-glucose pyrophosphorylase, UGPase)、甘油激酶(glycerol kinase, GK)和 3-磷酸甘油脱氢酶(glycerol 3-phosphate dehydrogenase, GPDH)是红藻糖苷合成过程中关键性的酶<sup>[11, 12]</sup>。Li 等<sup>[13]</sup>证实红藻糖苷可直接作为合成细胞壁多糖的前体物质,参与受损细胞壁合成。Qian 等<sup>[11]</sup>发现,坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)在失水胁迫时会快速积累红藻糖苷。Chen 等<sup>[12]</sup>发现,海萝(*Gloiopeltis furcata*)中的红藻糖苷含量远高于其他潮位的潮间带红藻,他认为,红藻糖苷含量与海藻所处潮位高度呈正相关。

烟台潮间带典型红藻—海萝(*Gloiopeltis furcata*)失水耐受力强<sup>[14]</sup>,经济价值较高<sup>[15]</sup>,是研究潮间带红藻适应性机制的良好材料。Liu 等<sup>[14]</sup>研究发现,海萝藻体虽不具备明显的保水能力,但却可以耐受超过 72 h 的失水,当海萝藻体含水量低至 6%时仍能够在复水后恢复光合活性。此外,Takei 等<sup>[16]</sup>证实,海萝还具有较高的氧自由基(O<sup>2</sup>)清除能力。

本研究选择海萝为实验材料,在 24 h 内设计两次连续的失水-复水循环处理,模拟烟台海域半日潮特征,通过测定并分析海萝抗氧化酶活力与转录组数据,研究其失水响应相关因子,为探索潮间带红藻失水响应分子机制提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

海萝采自山东烟台小黑山高潮带岩石上(37°27'45.23N, 121°26'34.28E),于退潮时进行样品采集。采集后的海萝加冰运至实验室。采用过滤海水清洗海萝藻体表面,人工选择大小、粗细、颜色、

形状均基本一致的幼年期健康藻体(生长期约 3~4 个月,长约 3 cm,宽约 1.5 mm)作为实验材料。正式实验前,将海萝样品置于光照培养箱(GZP-250N,上海森信股份有限公司,中国)中预培养 3 d,使各藻体达到相对一致的生理状态。海萝预培养条件为:温度 11℃,光照 50 μmol photons/(m<sup>2</sup>·s),光周期 12 L : 12 D,光照由培养箱中白色冷光源提供。

### 1.2 失水-复水循环处理

本实验对海萝采取两次连续的失水-复水循环处理方式。用滤纸吸干海萝藻体表面的水分后,取部分健康藻体作为实验对照组(CG)。使用木架固定藻体,将其分别悬挂在通风光照培养箱中进行初次失水处理(first dehydration, FD),总时长 6 h。分别在脱水处理 4.5 h(FD4.5)、6 h(FD6.0)时取样,取样后立即放入液氮中,并储存在-80℃。之后进行初次复水处理(first rehydration, FR)。将样品浸没到过滤海水中,初次复水总时长 6 h,分别在复水 5.5 h(FR5.5)和 6 h(FR6.0)时取样。接着进行二次失水-复水循环处理,二次失水(second dehydration, SD)处理方法与初次失水处理方法相同,二次复水(second rehydration, SR)处理方法与初次复水处理方法相同,在二次失水 4.5 h(SD4.5)和 6 h(SD6.0),二次复水 6 h(SR6.0)时取样。实验过程中,温度控制在 11℃,相对湿度为 77%。在两次失水-复水循环过程中共取 8 个时间点的海萝藻体作为实验样本,缩写为 CG, FD4.5, FD6.0, FR5.5, FR6.0, SD4.5, SD6.0, SR6.0。每个样本包含 3 个以上生物学重复,每个重复包含 4~6 枝藻体。

### 1.3 抗氧化酶活力的测定

粗酶液的制备:取 0.1 g 海萝藻体,经液氮研磨成粉末后转移至 2 mL 离心管中,加入 2 mL 预冷 PBS 缓冲液(PBS 缓冲液为科铭生物 CAT 酶活力测定试剂盒中自带提取液),涡旋混匀后,8000 g 离心 10 min,去除沉淀,所得上清液为待测粗酶液,于 4℃冰箱内暂存,所有酶活力指标在 1 d 内测完。

可溶性蛋白浓度测定按照索莱宝公司 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书进行测定,总抗氧化能力(T-AOC)、硫氧还蛋白还原酶(TrxR)、CAT 酶活力测定试剂盒均购自科铭生物技术有限公司,超氧化物歧化酶(SOD)活力测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。按照各试剂盒说明书进行测定操作。

利用 Excel 对酶活力测定数据进行单因素方差分

析(ANOVA), 并应用基迪奥云平台 T-test 检验([http://www.omicshare.com/tools/Home/Soft/t\\_test](http://www.omicshare.com/tools/Home/Soft/t_test))将处理组与对照组进行比较,  $P < 0.05$  为差异显著,  $P < 0.01$  为差异极显著。

### 1.4 海萝总 RNA 的提取

取 0.05 g 海萝藻体, 液氮预冷后研磨成粉, 用植物 RNA 提取试剂盒(Omega Plant RNA Kit, USA)进行海萝样品总 RNA 提取, 操作流程参照试剂盒说明书。通过 1%琼脂糖凝胶电泳和微量型分光光度计 Nanodrop 2000 检测 RNA 质量, 判断其浓度、完整性及核酸和蛋白质的污染情况。

### 1.5 海萝转录组测序

在广州基迪奥生物科技有限公司开展文库制备工作, 构建好的文库通过 Illumina HiSeqTM 进行测序。去除原始数据中包含有接头、未知碱基占比 > 10%、低质量的( $Q < 20\%$ 的碱基占整条 read 的 40%以上)的 reads, 得到 High quality clean reads, 用于 Unigenes 拼接。利用 BLAST 数据库进行 Unigenes 注释和通路注释, 所用数据库包括 KEGG、KOG、Nr、Swissport。利用 edgeR 进行差异基因分析, 若  $P < 0.05$ , 且  $|\log_2FC| > 1$  则为显著差异表达基因。

### 1.6 实时荧光定量 PCR 实验

以海萝延伸因子 2 基因(Elongation factor 2, *EF2*)作为内参, 在 GeneBank 中获得其碱基序列(EF033553.1), 按照荧光定量引物设计原则, 通过 BLAST 在线引物设计工具和 Primer Premier 5 软件进行引物设计, 所设计引物序列均由青岛瑞博兴科生物技术有限公司进行合成, 引物浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$ 。

选用 Takara PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser 对海萝 RNA 进行反转录实验, 合成 cDNA 模板。以 10 $\times$  cDNA 稀释液为模板, 进行荧光定量 PCR(qRT-PCR)扩增。qRT-PCR 反应操作流程参照 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II(Tli RNaseH Plus, Takara)说明书进行。20  $\mu\text{L}$  反应体系包括: 2  $\mu\text{L}$  稀释后 cDNA 模板, 正向反向引物各 0.8  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$  SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup>(2 $\times$ ), 6.4  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O。使用三步法进行扩增, 扩增程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$  30 s 变性; 95 $^{\circ}\text{C}$  5 s, 55 $^{\circ}\text{C}$  10 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  20 s, 共 40 个循环。循环结束后通过 95 $^{\circ}\text{C}$  15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$  15 s 绘制溶解曲线。qRT-PCR 扩增反应在 Takara TP800 Cyler Dice 上进行。每个反应设置 3 次技术重复, 使用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算目的基因相对表达量, 应用 Excel 处理数据并绘图。所用引物见表 1。

表 1 荧光定量 PCR 所用引物

Tab. 1 Primers for qRT-PCR

引物名称	引物序列
<i>GfEF2F</i>	ACTCTGTTGAGGGTGTCTGCG
<i>GfEF2R</i>	AAAGAGCGGTCCAGCTTGTTA
<i>GfPRXF</i>	CCGTCATCGACAAGGTAGCA
<i>GfPRXR</i>	GCTGTCGGTGCTAACGGTAA
<i>GfGSTF</i>	CGATTCTTCGATACGCCGGA
<i>GfGSTR</i>	CCGCTTGCAGCTTCTCCTTA
<i>GfUGPaseF</i>	AAGCTGCGAGACATGAACGA
<i>GfUGpaseR</i>	CCCACCATGTAACGCGAGTA
<i>GfGPDHF</i>	CTGCATGACGACGAGCTTTG
<i>GfGPDHR</i>	CGGCAGAGGGGGTTAAAGTT
<i>GfGKF</i>	GCCTCCCACTGGCTGTTT
<i>GfGKR</i>	TGCTGTAGGTTTGTACCCGTCT
<i>GfCAF</i>	ACGTGCCAATTACAGCGAGA
<i>GfCAR</i>	ATCTTCACTTCCATGCCCCG
<i>GfMYBF</i>	GCCATGCTTGCGAATAGGTG
<i>GfMYBR</i>	ACAACCACCGCTCTTTCCAT
<i>GfHSP70F</i>	GGTGTTAAGCGGGTTGGAAG
<i>GfHSP70R</i>	TGGAGAATGGCGTTGTTGAG
<i>GfMAPK3F</i>	TGCTCTCCCGTCAAACCTGTC
<i>GfMAPK3R</i>	CAAAGTTTCGTCGTGCTGGG
<i>GfGPDHF</i>	CTGCATGACGACGAGCTTTG
<i>GfGPDHR</i>	CGGCAGAGGGGGTTAAAGTT
<i>GfMPK3F</i>	TGCTCTCCCGTCAAACCTGTC
<i>GfMPK3R</i>	CAAAGTTTCGTCGTGCTGGG

## 2 结果

### 2.1 失水-复水循环条件下海萝抗氧化酶活力的变化

两次连续失水-复水循环处理过程中海萝 T-AOC、SOD、CAT、TrxR 的测定结果如图 1 所示。海萝 T-AOC 在两次失水过程中均有显著上调趋势( $P < 0.05$ ), 在失水 4.5 h 时(FD4.5、SD4.5), T-AOC 上调幅度较小, 约为对照组的 1.2 倍, 在失水 6 h 时(FD6.0、SD6.0)可升高至对照组的 1.5 倍, 复水过程中 T-AOC 下调至正常水平。海萝 SOD 酶活力较高, 除 FR5.5、FR6.0 外, 各处理组 SOD 酶活力均大于 200 U/mg prot。在本实验中, SOD 酶活力在初次失水过程中并没有出现上调, 初次复水(FR5.5、FR6.0)时, SOD 酶活力下调, 低于正常水平。在二次失水(SD4.5、SD6.0)时 SOD 酶活力出

现显著上升趋势( $P<0.05$ ), 但上升倍数较小, 在 SD6.0 时达到正常水平的 1.2 倍。与对照组相比, 海萝 CAT 酶活力在两次失水过程中(FD4.5、FD6.0、SD4.5、SD6.0) 均有极显著( $P<0.01$ )上调。FD4.5、FD6.0 时的 CAT 酶活力约为对照组 1.8 倍, SD4.5 时 CAT 酶活力升高至对照组 2 倍, 在 SD6.0 时其酶活力达到最大值 91.17 U/mg prot, 约为对照组 4.1 倍。在复水过程中

(FR5.5、FR6.0、SR6.0), CAT 酶活力出现下调, 但仍略高于对照组。TrxR 酶活力在 FD4.5 即出现极显著上调( $P<0.01$ ), 达到峰值 3.7 U/mg prot, 约为对照组 2.5 倍, FD6.0 时略有下调, 但仍保持在对照组 1.9 倍左右, 在初次复水时(FR5.5、FR6.0)TrxR 酶活力下调至正常水平, SD6.0 时 TrxR 酶活力再次上调, 达到对照组 1.9 倍, SR6.0 时再次下调至正常水平。

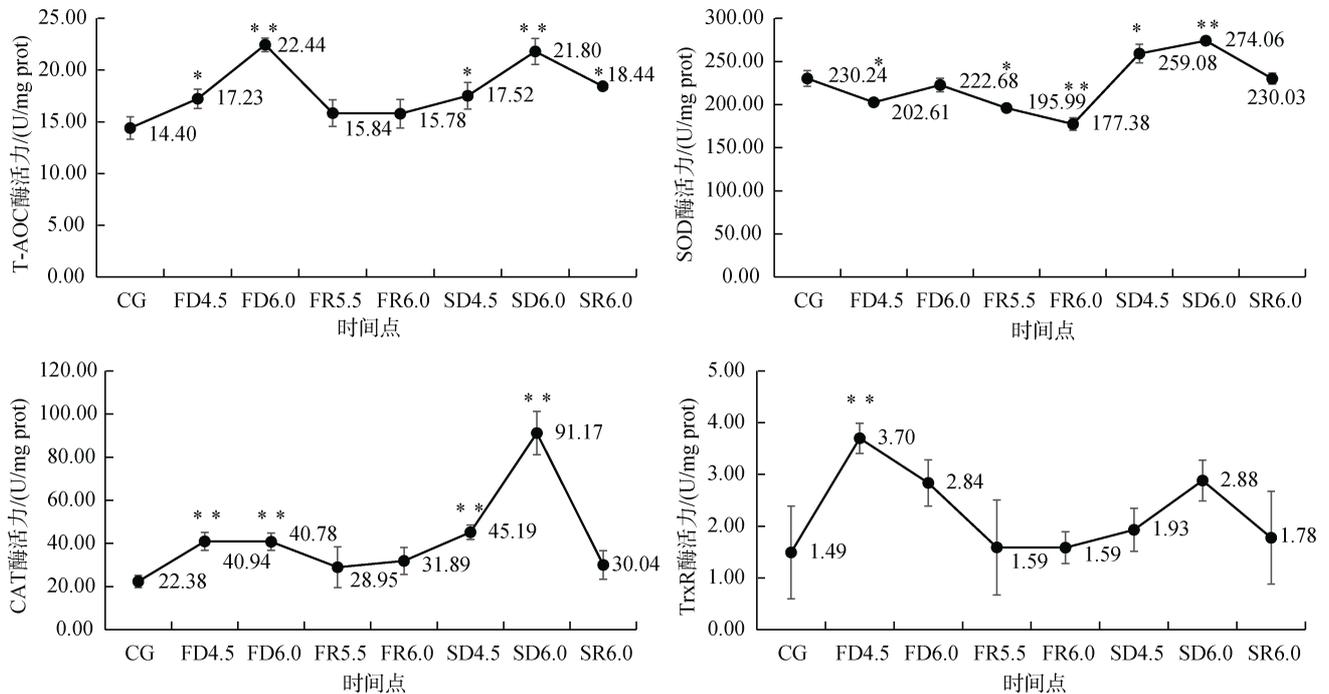


图 1 周期性失水-复水条件下海萝抗氧化酶活力变化情况

Fig. 1 Changes in antioxidant enzymes activities during periodic dehydration-rehydration cycles

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$

## 2.2 海萝转录组数据组装与基因注释情况

对海萝测序得到的 clean reads 进行过滤后发现, 除 T7-e 外, 所有样本的 HQ quality clean reads 占比均大于 98%。将得到 clean reads 进行序列组装后, 得到 32 681 条基因, N50 为 1 238 bp, 平均 GC 含量为 55.32%, 组装得到的 Unigenes 平均长度为 799 bp(表 2), 数据组装效果理想。将拼接获得的 Unigenes 进行功能注释后发现, 共有 12 813 条 Unigenes 获得注释信息, 19 868 条基因暂无注释信息(表 2)。利用 BLASTX 将 Unigenes 序列与 Nr 数据库进行比对后, 确定其同源序列所属物种, 统计比对到各个物种的同源序列数量发现(图 2), 海萝转录组组装得到的 Unigenes 其同源数目最多的物种是皱波角叉菜 (*Chondrus crispus*), 其次是另外一种可在极端环境中生存的红藻(*Galdieria sulphuraria*)。

表 2 海萝转录组测序整体情况

Tab. 2 Overview of the transcriptome data of *Gloiopeltis furcata*

海萝转录组测序整体情况	数据统计
组装到 Unigenes 总体数目	32 681
Unigenes 平均长度/bp	799
GC 含量/%	55
N50 长度/bp	1 238
有注释基因数目	12 813
无注释基因数目	19 868

## 2.3 转录组重复性检验与样本聚类

不同实验组间 PCA 分析显示(图 3a), PC1 可解释所有变量(所有基因表达量)总体方差的 38.1%, PC2 可解释总体方差的 16.7%。本研究中所用实验样本重复性较好, 同一处理组中的三个生物学重复

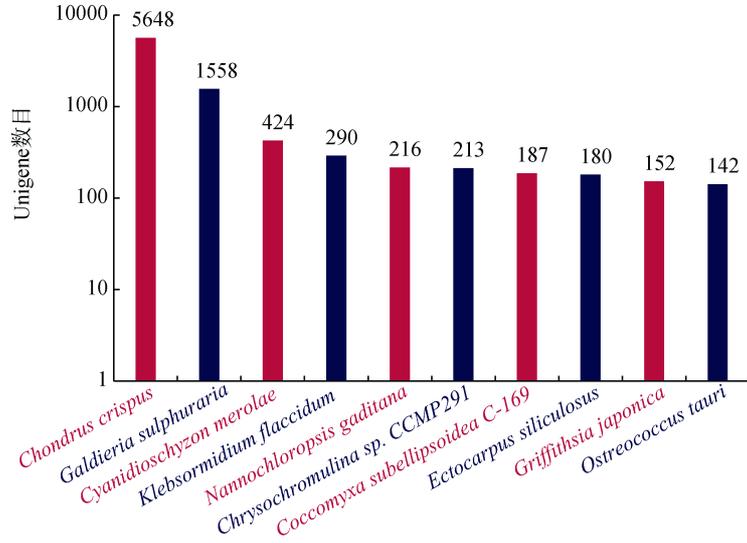


图 2 Unigenes 物种分布统计图

Fig. 2 Cartogram of unigene distribution in different species

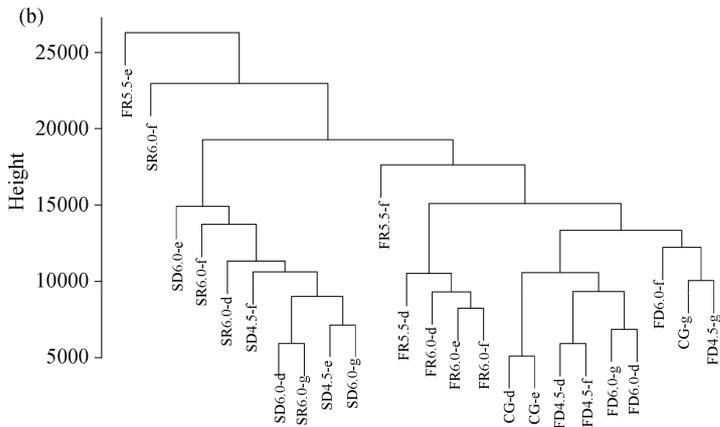
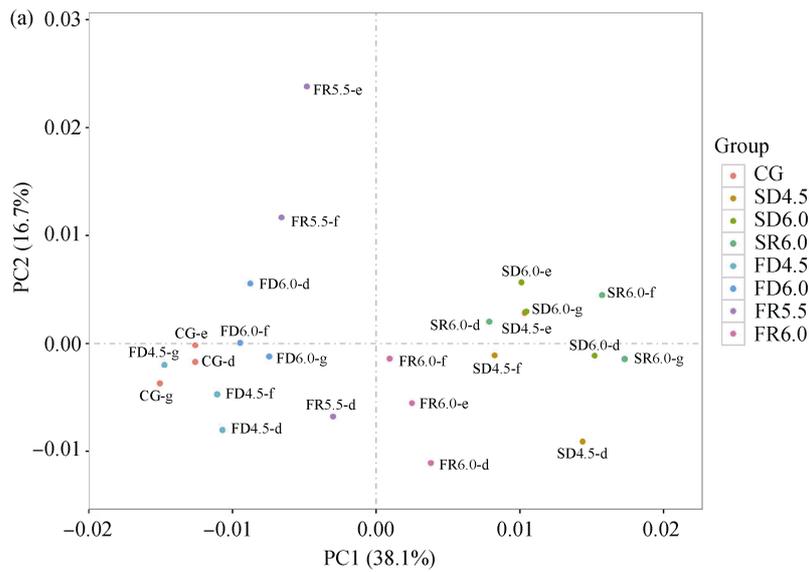


图 3 转录组重复性检验与样本聚类

Fig. 3 Transcriptome repetition test and sample clustering

注: a: 样本 PCA 分析结果; b: 所有样本聚类分析结果

样本可较好地聚集在一起, 仅 FR5.5 组内 e 与 d 相关系数相对较小, 分析可能是海萝藻体个体间差异造成的。另外, 除 FR5.5-e 与 FR5.5-d 外, 初次失水-复水处理的样本更倾向于聚为一枝, 而二次失水-复水处理的样本倾向于聚为另一枝。

## 2.4 差异表达基因的数目统计与分析

海萝转录组共表达了 7161 条差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs), 不同处理组与

对照组之间的上调、下调 DEGs 数目统计结果见图 4a。初次失水-复水循环中, 各处理组分别获得了 222(FD4.5), 689(FD6.0), 2930(FR5.5), 3552(FR6.0) 条 DEGs。二次失水-复水循环中, 各处理组分别获得了 4164(SD4.5), 1739(SD6.0), 1907(SR6.0) 条 DEG。总体来看, 二次失水处理 DEGs 数目多于初次失水处理。对所有差异进行 KEGG 富集分析显示(图 4b), 差异基因分布在代谢、环境信息加工、有机体系统、

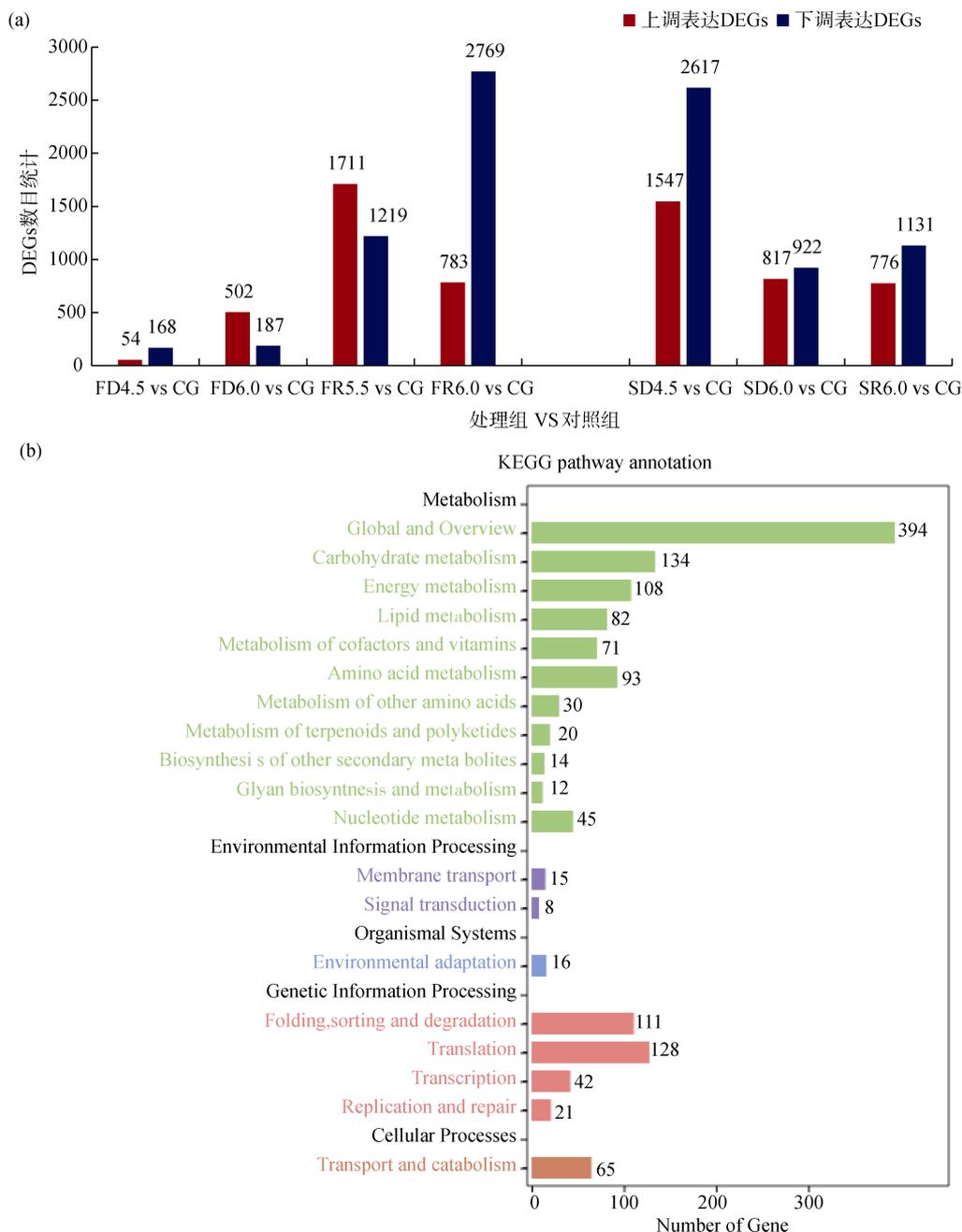


图 4 差异表达基因的数目统计与分析

Fig. 4 Statistical analysis of differentially expressed genes  
注: a: 组间上、下调差异基因数目统计; b: 差异基因 KEGG 分析

遗传信息加工、细胞进程五大方面。其中，参与代谢相关的 DEGs 数目最多，达到 1003 条，另有 302 条 DEGs 与遗传信息加工相关，65 条 DEGs 与细胞进程相关，23 条 DEGs 与有机系统相关，16 条 DEGs 与环境信息加工相关。

## 2.5 候选失水响应相关基因表达模式变化

通过海萝转录组注释情况以及基因表达情况，我们选择了与海萝失水耐受可能相关的 9 条基因(表 3)进行 qRT-PCR 验证。分析其表达模式(图 5)发现：

海萝中，热激蛋白 70 基因(*GfHSP70*)、碳酸酐酶基因(*GfCA*)、MYB 蛋白基因(*GfMYB*)以及编码谷胱甘肽 S 转移酶(Glutathione S-transferase, GST)的基因(*GfGST*)的转录表达随海萝失水-复水处理表现出两次明显上下波动变化。其中，*GfHSP70* 在 FD4.5 时达到峰值，约为对照组 3.2 倍，在 FD6.0 时略有下降，为对照组 2.3 倍，初次复水时(FR5.5、FR6.0)*GfHSP70* 转录表达几乎下降为 0，在 SD4.5 和 SD6.0 时再次上调至正常水平。*GfGST* 在初次失水时上调至对照组 2.6 倍(FD4.5)和 3.4 倍(FD6.0)，在二次失水时(SD4.5、SD6.0)其表达水平均在对照组 1.5 倍以上，在两次复水处理中(FR5.5、FR6.0、SR6.0)*GfGST* 的表达量均

低于对照组。*GfCA* 在二次失水中的上调幅度大于初次失水，其在 FD4.5、FD6.0 时分别达到对照组的 6.3 倍和 8.3 倍，而在二次失水中(SD4.5、SD6.0)升高至对照组 16 倍以上。复水时 *GfCA* 转录水平有明显下调，但仍高于对照组。*GfMYB* 在初次失水过程中上调表达，在 FD4.5 时达到峰值，约为对照组 5.3 倍，在 FD6.0 时约为对照组 3.2 倍，在初次复水过程中(FR5.5、FR6.0)其转录表达几乎下降为 0，SD6.0 时再次上升至略高于对照组的水平。另外，海萝中编码 PRX 酶的基因(*GfPRX*)的转录水平只在初次失水时(FD4.5、FD6.0)有上调表达，初次复水过程中其表达量降低至对照组以下，在 SD6.0 时基本恢复至正常水平。与信号转导相关的促分裂原活化蛋白激酶基因(*GfMAPK*)只在 FD4.5 和 SD4.5 时上调表达，分别达到对照组 1.8 倍和 1.5 倍。

海萝中参与海藻糖苷合成的关键基因 *GfUGPase*、*GfGK* 和 *GfGPDH* 的表达模式相似，均在 FD4.5 和 FD6.0 时上调表达，而在二次失水处理中则变化不明显。其中，*GfUGPase* 与 *GfGK* 在 FD4.5 时均达到对照组 2 倍以上，在 FD6.0 时稍有下降但仍保持在对照组 1.5 倍左右，而 *GfGPDH* 则在 FD6.0 时达到表达量峰值，约为对照组 2 倍。

表 3 海萝候选失水响应基因

Tab. 3 Candidate water loss-responsive genes in *Gloiopeltis furcata*

失水响应候选基因简称	基因编码蛋白	中文名称	参与过程及功能
<i>GfPRX</i>	Peroxioredoxin	过氧化物酶	抗氧化与细胞解毒
<i>GfGST</i>	Glutathione S-transferase	谷胱甘肽 S-转移酶	抗氧化与细胞解毒
<i>GfUGPase</i>	UDP-glucose pyrophosphorylase	UDP-葡萄糖焦磷酸化酶	海藻糖苷合成相关
<i>GfGPDH</i>	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	甘油-3-磷酸脱氢酶	海藻糖苷合成相关
<i>GfGK</i>	Glycerol kinase	甘油激酶	海藻糖苷合成相关
<i>GfCA</i>	Carbonic anhydrase	碳酸酐酶	二氧化碳浓缩机制
<i>GfMYB</i>	MYB domain-containing protein	MYB 蛋白	转录调控相关
<i>GfHSP70</i>	Heat shock protein 70	热激蛋白 70	分子伴侣
<i>GfMAPK</i>	Mitogen-activated protein kinase 3	促分裂原活化蛋白激酶	信号转导

## 3 讨论

O<sup>2-</sup>、过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)和羟基自由基(-OH)等具有强氧化能力的含氧化合物统称 ROS，正常情况下，细胞内 ROS 维持在相对稳定的水平，其产生和清除之间保持动态平衡<sup>[17]</sup>。潮间带海藻的抗氧化系统对清除失水胁迫所产生的过量 ROS 十分重要<sup>[4, 9]</sup>。海萝总体抗氧化能力 T-AOC 在两次失水-复水过程中的

表达趋势基本一致，失水时 T-AOC 表现出显著升高趋势( $P < 0.05$ )，但上升幅度较小，在复水时降低至正常水平(图 1)。这种升高趋势可及时清除海萝失水过程中产生的过量 ROS，起到保护海萝藻体的作用，T-AOC 上升幅度较小可能是因其 ROS 清除系统复杂，总抗氧化能力的轻微上调即会对 ROS 含量产生重大影响，且 ROS 的清除不能无限制的进行，需使其含量维持在一定水平，以起到信号分子等作用<sup>[18]</sup>。

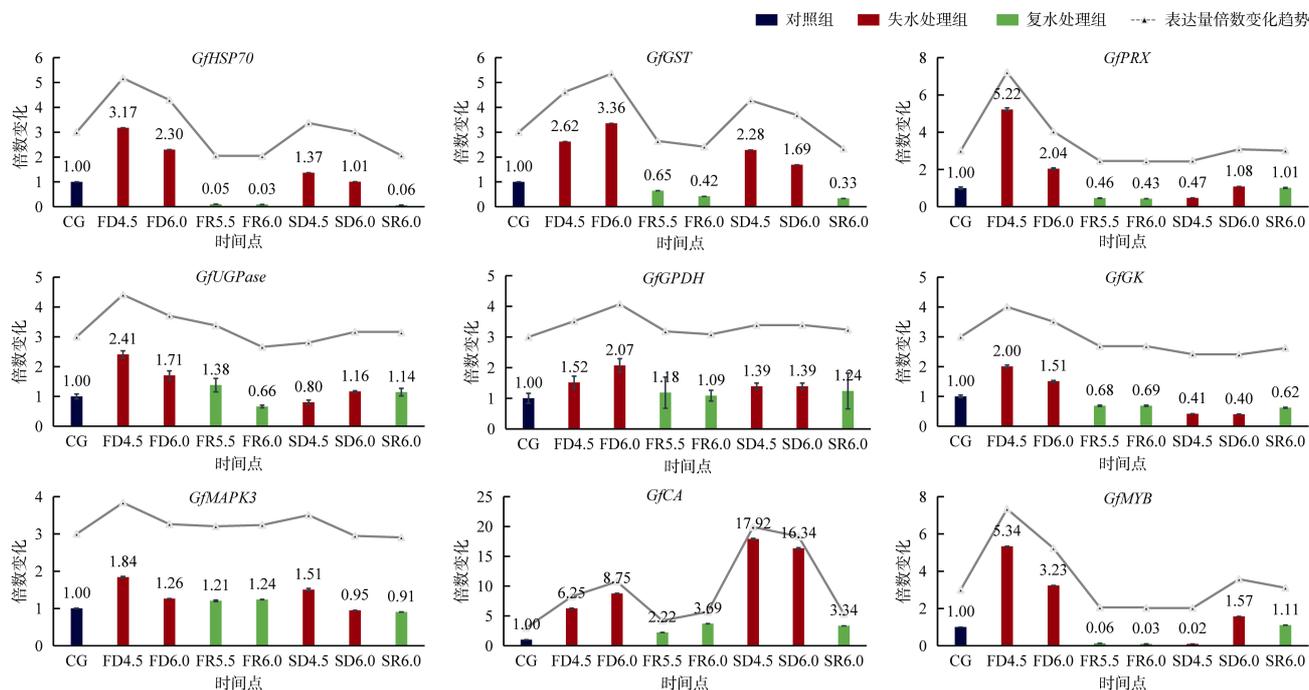


图 5 候选失水响应基因转录水平表达模式

Fig. 5 Transcription-level expression patterns of candidate dehydration-responsive genes

本实验中,不同的抗氧化酶在连续的失水-复水循环过程中的表达趋势不尽相同。其中,海藻CAT的酶活力在两次失水过程中的变化趋势最为明显(图1)。因此,我们认为CAT可能在海藻抵抗失水胁迫时发挥主要作用。CAT可通过催化 $H_2O_2$ 还原为水,消除其负面影响<sup>[10]</sup>。Fierro等<sup>[10]</sup>也发现,失水胁迫下,红藻*P. orbicularis*的CAT酶活力上调表达,且其数值明显高于其它失水不耐受海藻。此外,SOD主要负责清除细胞中多余的 $O_2^-$ ,催化 $O_2^-$ 发生歧化反应生成氧和 $H_2O_2$ <sup>[19]</sup>,TrxR可通过增强酶活力使还原态Trx增加<sup>[20]</sup>,以达到抗氧化防御作用。它们在海藻清除过量ROS过程中也起到一定的作用。

Chen等<sup>[12]</sup>研究表明,海藻在失水时会积累海藻糖苷及其异构体异海藻糖苷。在海藻转录组中,本研究发现了参与海藻糖苷合成过程的关键酶UGPase、GPDH和GK的编码基因(*GfUGPase*、*GfGK*、*GfGPDH*)。於辰佳等<sup>[21]</sup>研究发现,坛紫菜失水过程中,编码UGPase的基因(*Phugp*)在转录水平上调表达,并在复水后迅速恢复。Qian等<sup>[11]</sup>认为,坛紫菜GK基因(*PhNH01*)和GPDH基因(*PhGPDH*)的转录表达也与失水胁迫密切相关。本实验中,海藻*GfUGPase*、*GfGK*、*GfGPDH*基因的转录水仅在初次失水时有上调趋势,可达到对照组1.5倍至2.4倍,但三者二次失水过程中的表达量变化却不明显(图5)。

此外,海藻中还存在参与 $CO_2$ 浓缩机制( $CO_2$  concentrating mechanism)的碳酸酐酶基因(*GfCA*),参与蛋白质折叠的热激蛋白70基因(*GfHsp70*),编码MYB蛋白的基因(*GfMYB*),以及参与细胞解毒过程的GST编码基因(*GfGST*)。它们在两次失水胁迫中均表现出明显的上调趋势(图5)。Chen等对坛紫菜CA的研究也发现,坛紫菜的5条CA基因均在失水时显著上调<sup>[22]</sup>。Sun等<sup>[8]</sup>也报道了条斑紫菜HSP基因在其失水时出现上调表达。MYB蛋白可能通过转录调节作用<sup>[23]</sup>,参与非生物胁迫<sup>[24]</sup>。GST具有细胞解毒作用与过氧化物清除作用<sup>[25]</sup>,可减轻藻体损伤。

在周期性失水-复水循环过程中,CAT、TrxR、SOD参与海藻抗氧化过程,其中CAT酶活力对海藻抵抗失水胁迫尤为重要;海藻海藻糖苷合成相关基因(*GfUGPase*、*GfGK*、*GfGPDH*)仅在初次失水处理中表现出上调趋势。此外,海藻*GfHSP70*、*GfCA*、*GfMYB*、*GfGST*基因的转录水平在两次失水处理时均表现出升高趋势,它们可能也参与了海藻失水响应过程。本研究结果对分析海藻失水耐受机制有重要的参考意义,也为研究潮间带海藻适应性分子机制提供了理论依据。

#### 参考文献:

[1] Davison I R, Pearson G A. Stress tolerance in intertidal

- seaweeds[J]. *Journal of Phycology*, 1996, 32(2): 197-211.
- [2] Zaneveld J S. Factors controlling the delimitation of littoral benthic marine algal zonation[J]. *American Zoologist*, 1969, 9(2): 367-391.
- [3] Flores-Molina M R, Thomas D, Lovazzano C, et al. Desiccation stress in intertidal seaweeds: Effects on morphology, antioxidant responses and photosynthetic performance[J]. *Aquatic Botany*, 2014, 113: 90-99.
- [4] Contreras-Porcia L, Thomas D, Flores V, et al. Tolerance to oxidative stress induced by desiccation in *Porphyra columbina* (Bangiales, Rhodophyta)[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(6): 1815-1829.
- [5] Im S, Lee H N, Jung H S, et al. Transcriptome-based identification of the desiccation response genes in marine red algae *Pyropia tenera* (Rhodophyta) and enhancement of abiotic stress tolerance by *PtDRG2* in *Chlamydomonas*[J]. *Marine Biotechnology*, 2017, 19(3): 232-245.
- [6] Wang Li, Mao Yunxiang, Kong Fanna, et al. Genome-wide expression profiles of *Pyropia haitanensis* in response to osmotic stress by using deep sequencing technology[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16: 1012.
- [7] Yang Hui, Mao Yunxiang, Kong Fanna, et al. Profiling of the transcriptome of *Porphyra yezoensis* with Solexa sequencing technology[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2011, 56(20): 2119-2130.
- [8] Sun Peipei, Tang Xianghai, Bi Guiqi, et al. Gene expression profiles of *Pyropia yezoensis* in response to dehydration and rehydration stresses[J]. *Marine Genomics*, 2019, 43: 43-49.
- [9] Kumar M, Gupta V, Trivedi N, et al. Desiccation induced oxidative stress and its biochemical responses in intertidal red alga *Gracilaria corticata* (Gracilariales, Rhodophyta)[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2011, 72(2): 194-201.
- [10] Fierro C, López-Cristoffanini C, Meynard A, et al. Expression profile of desiccation tolerance factors in intertidal seaweed species during the tidal cycle[J]. *Planta*, 2017, 245(6): 1149-1164.
- [11] Qian Feijian, Luo Qijun, Yang Rui, et al. The littoral red alga *Pyropia haitanensis* uses rapid accumulation of floridoside as the desiccation acclimation strategy[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2015, 27(1): 621-632.
- [12] Chen Juanjuan, Song Dandan, Luo Qiyun, et al. Determination of floridoside and isofloridoside in red algae by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Analytical Letters*, 2014, 47(14): 2307-2316.
- [13] Li Shiyan, Shabtai Y, Arad S. Floridoside as a carbon precursor for the synthesis of cell-wall polysaccharide in the red microalga *Porphyridium* sp.(Rhodophyta)[J]. *Journal of phycology*, 2002, 38(5): 931-938.
- [14] Liu Hongliang, Li Xuemeng, Nan Guoning, et al. Photosynthetic activity of *Gloiopeltis furcata* (intertidal red macroalga) in response to desiccation[J]. *The journal of applied ecology*, 2014, 25(5): 1491-1498.
- [15] 郭永坚, 张文文, 李俊伟, 等. 海萝属藻类繁殖生物学及增殖研究进展[J]. *生态学杂志*, 2015, 8: 2339-2343.
- Guo Yongjian, Zhang Wenwen, Li Junwei, et al. Breeding, restocking and culture of *Gloiopeltis*[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2015, 8: 2339-2343.
- [16] Takei M, Kuda T, Eda M, et al. Antioxidant and fermentation properties of aqueous solutions of dried algal products from the Boso Peninsula[J]. *Japan. Food Bio-science*, 2017, 19: 85-91.
- [17] 杜秀敏, 殷文璇, 赵彦修, 等. 植物中活性氧的产生及清除机制[J]. *生物工程学报*, 2001, 17(2): 121-125.
- Du Xiumin, Yin Wenxuan, Zhao Yanxiu, et al. The production and scavenging of reactive oxygen species in plants[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2001, 17(2): 121-125.
- [18] Mullineaux P M, Exposito-Rodriguez M, Laissue P P, et al. ROS-dependent signaling pathways in plants and algae exposed to high light: comparisons with other eukaryotes[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2018, 122: 52-64.
- [19] Miura C, Sugawara K, Neriya Y, et al. Functional characterization and gene expression profiling of superoxide dismutase from plant pathogenic phytoplasma[J]. *Gene*, 2012, 510(2): 107-112.
- [20] 孙文艳. 硫氧还蛋白还原酶研究进展[J]. *国外医学(医学地理分册)*, 2012, 26(4): 148-151.
- Sun Wenyan. The progress in studies of thioredoxin reductase[J]. *Foreign Medical Sciences (Section of Medgeography)*, 2012, 26(4): 148-151.
- [21] 於辰佳, 张哈哈, 徐燕, 等. 坛紫菜UDP-葡萄糖焦磷酸化酶基因(*Phugp*)的克隆及表达分析[J]. *集美大学学报(自然科学版)*, 2017, 5: 4-12.
- Yu Chenjia, Zhang Hanhan, Xu Yan, et al. Cloning and expression analysis of UDP-Glucose Pyrophosphorylase (UGPase) gene from *Pyropia haitanensis*[J]. *Journal of Jimei University( Natural Science)*, 2017, 5: 4-12.
- [22] Chen Changsheng, Dai Zhenzhen, Xu Yan, et al. Cloning, expression, and characterization of carbonic anhydrase genes from *Pyropia haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta)[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2016, 28(2): 1403-1417.
- [23] 万小荣, 李玲. 植物的 MYB 蛋白[J]. *植物生理学通讯*, 2016, 38(2): 165-170.
- Wan Xiaorong, Li Ling. MYB proteins in plants[J].

- Plant Physiology Communications, 2016, 38(2): 165-170.
- [24] 刘蕾, 杜海, 唐晓凤, 等. MYB 转录因子在植物抗逆胁迫中的作用及其分子机理[J]. 遗传, 2008, 30(10): 1265-1271.
- Liu Lei, Du Hai, Tang Xiaofeng, et al. The roles of MYB transcription factors on plant defense responses and its molecular mechanism[J]. Hereditas, 2008, 30(10): 1265-1271.
- [25] 周向红, 易乐飞, 李信书, 等. 条斑紫菜谷胱甘肽 S-转移酶基因的克隆与表达分析[J]. 水产学报, 2011, 35(9): 1354-1361.
- Zhou xianghong, Yi Lefei, Li Xinshu, et al. Molecular cloning and expression pattern of glutathione S-transferase gene in *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta)[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(9): 1354-1361.

## Expression patterns of antioxidant enzymes and desiccation-responsive factors in *Gloiopeltis furcata* (Gigartinales, Rhodophyta)

LIU Shun<sup>1, 2, 3</sup>, HU Zi-min<sup>1, 2</sup>, ZHANG Quan-sheng<sup>4</sup>, DUAN De-lin<sup>1, 2</sup>

(1. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Center for Ocean Mega-Science, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 4. Ocean School, Yantai University, Yantai 264005, China)

Received: Feb. 4, 2019

Key words: *Gloiopeltis furcata*, desiccation, antioxidant enzymes, floridoside, transcriptome

**Abstract:** The intertidal red seaweed *Gloiopeltis furcata* exhibits strong resistant ability to dehydration stress. To explore the responding mechanisms underlying periodic water loss processes in *G. furcata*, we designed two successive desiccation-dehydration cycles within 24 h and measured the changes in antioxidant enzyme activities in *G. furcata*. Transcriptome sequencing and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) were used to verify the transcriptional expression patterns of dehydration-responsive genes. A total of 32, 681 uni-genes were assembled in transcripts. Compared with the control group, 7, 161 differentially expressed genes (DEGs) were expressed in the treatment groups. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes analysis indicated that the DEGs were related to metabolism, environmental information processing, organismal system, genetic information processing, and cell processes. The results of antioxidant enzyme activity assay showed that antioxidant capacity was crucial for *G. furcata* response to dehydration stress. Catalase, thioredoxin reductase, and superoxide dismutase participate in antioxidant processes, and the activity of CAT is particularly important for the resistance to water loss. In addition, qRT-PCR results showed that genes involved only in floridoside synthesis (*GfUGPase*, *GfGK*, and *GfGPDH*) positively responded to the first desiccation treatment. Furthermore, the transcription levels of genes encoding heat shock protein 70 (*GfHSP70*), carbonic anhydrase (*GfCA*), MYB-domain containing protein (*GfMYB*), and glutathione S-transferase (*GfGST*) were up-regulated during two dehydration periods, showing that these genes also participate in the mechanisms of desiccation response of *G. furcata*.

(本文编辑: 康亦兼)