

外源 CaCl_2 调控浒苔(*Ulva prolifera*)高温逆境的比较转录组研究*

唐晓雯¹ 范美华^{1①} 王超峰¹ 廖智¹ 李鹏¹ 徐年军^{2,3,4,5} 王健鑫^{1①}

(1. 浙江海洋大学海洋科学与技术学院 舟山 316022; 2. 宁波大学 海洋生物技术与工程国家地方联合工程实验室 宁波 315832; 3. 应用海洋生物技术教育部重点实验室 宁波 315832; 4. 浙江海洋高效健康养殖省部共建协同创新中心 宁波 315832; 5. 浙江省海洋生物工程重点实验室 宁波 315832)

摘要 钙(Ca^{2+})作为一种必需的信号分子,在植物的生长发育和非生物胁迫调节中起着至关重要的作用。本实验采用 BGISEQ 平台进行高通量测序,获得浒苔外源 CaCl_2 添加(UpCa)和高温对照(UpHT)处理下相关的转录组数据,分析了在高温($35\text{ }^\circ\text{C}$)下外源 CaCl_2 的添加转录组的变化。结果显示,根据 UpHT 和 UpCa 处理分析共获得 36625 条基因;与 UpHT 相比,在 UpCa 下鉴定出 7513 个差异表达的基因,包括 6002 个上调基因,1151 个下调基因,对差异基因进行了 GO 富集和 KEGG 富集分析。对膜转运、植物信号转导和环境适应性相关的差异基因进行 KEGG 富集分析,主要富集在内吞(Endocytosis)、植物病原菌互作(Plant-pathogen interaction)、丝裂原激活的蛋白激酶信号通路(MAPK signaling pathway-plant)、植物激素的信号传递(Plant hormone signal transduction)、ABC 转运(ABC transporters)和磷脂酰肌醇信号系统(Phosphatidylinositol signaling system)等代谢通路上。植物激素信号转导途径中,细胞分裂素、脱落酸、油菜素内酯和乙烯信号转导途径增强。抗氧化酶中 FeSOD、谷胱甘肽过氧化物酶、谷胱甘肽 S 转移酶和抗坏血酸过氧化物酶等基因表达上调,下调的基因主要是热激蛋白。 Ca^{2+} 信号组分基因钙结合蛋白、钙调素、钙/钙调素依赖的蛋白激酶以及钙/钙调蛋白依赖性 3',5'环核苷酸磷酸二酯酶的基因表达上调,丝裂原活化蛋白激酶激酶激酶和磷脂酰肌醇信号相关的基因也差异性上调。本研究系统阐述了植物信号转导、抗氧化酶、MAPK 信号系统以及 Ca^{2+} 信号组分基因在外源 CaCl_2 对浒苔高温压力的调节中的重要作用,可为进一步阐明 Ca^{2+} 信号对高温的调节适应机制提供理论基础。

关键词 浒苔(*Ulva prolifera*); 外源氯化钙; 转录组; 高温

中图分类号 Q523.8; Q789; S917 **doi:** 10.11693/hyh20201000297

浒苔(*Ulva prolifera*)是典型的大型绿藻,属于石莼目(Ulvales)、石莼科(Ulvaceae)。浒苔繁殖速度快、环境适应性强,是绿潮暴发的优势藻种,在海洋生态平衡中发挥重要的作用。浒苔在生长过程中不可避免的受到高温、光照和盐度等环境变化的影响,而温度是限制浒苔生长和繁殖的关键因素(Fan *et al.*, 2018)。

其中,高温作为影响浒苔生长发育的关键因素,越来越受到学者的高度关注。迄今为止,已有学者相继报道了温度对浒苔生长发育或者分子机理的影响(李雪娜等, 2016; Fan *et al.*, 2018)。

温度的升高影响着浒苔的生活史,导致浒苔形态和生理指标发生变化,影响孢子囊的形成、孢子释

* 浙江省省属高校基本科研业务费项目, 2019J00049 号; 浙江省自然科学基金项目, LY20D060006 号; 宁波大学海洋学院联合实验室开放基金项目, 2019—2021; 浙江海洋大学博士启动基金项目, Q1701 号; 浙江省一流学科开放基金项目, 2019—2021。唐晓雯, E-mail: 1759406725@qq.com

通信作者: 范美华, E-mail: dinger503@163.com; 王健鑫, E-mail: jxwang@zjou.edu.cn

收稿日期: 2020-10-26, 收修改稿日期: 2020-12-29

放和幼苗成长(Wang *et al.*, 2016; Chávez-Sánchez *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017; Rybak, 2018)。高温条件下, 大型海藻主要通过调节自身的生长发育过程来提高生存和繁殖能力, 特别是光合作用、基因的表达、蛋白质的合成和代谢都有适应性的改变, 而这些改变主要是通过植物信号响应系统来实现的。

钙离子(Ca^{2+})作为植物信号系统中普遍存在的第二信使, 在植物的生长发育和非生物刺激调节中发挥着重要的作用。 Ca^{2+} 信号也是响应非生物刺激的关键信号。高温胁迫下, 大型海藻会诱导一系列抗氧化物酶, 蛋白激酶以及 Ca^{2+} 依赖性相关蛋白的表达, 积累了多种糖和氨基酸代谢产物(Fan *et al.*, 2018; He *et al.*, 2018b)。高温胁迫下, 在转录组水平主要涉及光合作用和能量代谢率降低, 抗氧化活性物质的增加, Ca^{2+} 信号途径调节的热休克蛋白(Hsp70)、锰超氧化物歧化酶(Mn-SOD)和过氧化氢酶(CAT)等分子伴侣与自由基清除相关酶基因的表达也明显上调。另外, 筛选鉴定了参与 Ca^{2+} 信号转导、藻类生长和植物激素生物合成的基因和蛋白(Im *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2017, 2018), 并且 Ca^{2+} 信号在应激反应中起到重要的调节作用。高温下, 外源 Ca^{2+} 处理使小麦钙依赖蛋白激酶(calcium-dependent protein kinase, CDPK)、HSP、SOD 和 APX 基因的表达差异性上调(Goswami *et al.*, 2015)。 Ca^{2+} 在扁浒苔(*Ulva compressa*)中对铜胁迫的调节可能是通过 CaMs 或者 CDPKs 来激活抗氧化基因的表达(González *et al.*, 2012); 外源 Ca^{2+} 处理在一定程度上可提高杜氏盐藻(*Dunaliella salina*)对高渗透胁迫和 UV-B 响应的调节作用(陈辉, 2011)。

综上所述, 高温影响了藻类的生长发育, Ca^{2+} 信号作为第二信使在高温调节中起到关键作用, 但是 Ca^{2+} 信号对浒苔高温胁迫的调节机制还不清楚, 需要进一步研究。本实验以浒苔为材料, 采用转录组测序的方法, 阐述外源 Ca^{2+} 添加对浒苔高温胁迫转录组响应调节机制, 不仅有助于了解 Ca^{2+} 信号调节的通路, 而且对浒苔规模暴发的机制提供大量的基因数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2019年6月份在青岛石老人海滩海面采集漂浮浒苔样品(120.481037°E, 36.100093°N)。采集后的浒苔先清洗掉其他杂质、0.2% KI 处理 5 min 和灭过菌的海水进行洗涤。浒苔在加入 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的 Provasoli 培养基中进行培养。培养条件为 25 °C、12 h

光照和 12 h 黑暗的光周期, 光照强度为 40 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 。

1.2 实验方法

1.2.1 实验处理 2 g 浒苔分别放在含有 5 mmol/L CaCl_2 的 400 mL Provasoli 培养基中, 转移到 35 °C 高温的培养箱中进行培养(处理组, 标记为 UpCa)。2 g 浒苔在不含 CaCl_2 的 400 mL Provasoli 培养基中在 35 °C 高温培养作为对照, 标记为 UpHT。每个处理有 3 个生理性重复。在光照强度 40 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 、光照周期 12L:12D 的光照培养箱培养 3 h, 每个样品各取 1 g, 液氮冷冻, -70 °C 保存直至 RNA 提取, RNA 提取后送样到武汉华大基因进行转录组测序。

1.2.2 RNA 提取和 cDNA 文库的构建 利用十六烷基三甲基溴化铵-聚乙烯吡咯烷酮(CTAB-PVP)的方法根据说明书来提取浒苔的总 RNA, 使用 NanoDrop ND2000 紫外分光光度计(Thermo)测定 RNA 的浓度和质量。利用 Illumina TruSeq RNA Sample Prep Kit 进行文库构建。文库的构建是带 polyA 的 mRNA 被含有 OligodT 的磁珠富集纯化。二价阳离子把富集的 mRNA 片段化, 将片段化的 RNA 合成 cDNA (朱婷芳等, 2020)。在 BGISEQ (MGI2000)平台按照标准程序进行测序。

1.2.3 数据处理 在 BGISEQ 平台获得原始序列(Raw data), 用 fastq 文件格式存储结果。利用 SOAPnuke 软件将原始序列过滤, 去除带接头(Adaptor)的 reads、含有 N(无法确定碱基信息)的比例 >10%的 reads 和低质量 reads(质量值 $Q \leq 15$ 的碱基数占整个 reads 总碱基数的 50%以上), 得到 Clean data (朱婷芳等, 2020)。Clean reads 通过 HISAT 和 Bowtie2 软件比对到参考基因序列, 进行基因注释。转录本的表达水平主要通过 RSEM 计算获得。

1.2.4 差异基因的鉴定和 GO、KEGG 富集分析 主要是根据 UpHT(对照) vs UpCa(处理)即实验组与对照组的样品的 Unigene 表达量进行对比, 差异基因(Differentially Expressed Genes)的筛选主要是根据 $P < 0.05$ 和 $|\log_2(\text{UpCa FPKM}/\text{UpHT FPKM})| \geq 1$ 作为筛选标准, 获得 DEGs (Wang *et al.*, 2010)。利用 KEGG 数据库和 GO 数据库对 DEGs 进行 KEGG 通路和 GO 富集分析(He *et al.*, 2018a), 将 Q 值 ≤ 0.05 的 GO 注释和 KEGG 注释归属为 DEGs 显著富集的 GO 和 KEGG 通路。 Q 值是用 KOBAS(2.0)的 BH 方法得到的修正后的 P 值(Hu *et al.*, 2019)。

2 结果

2.1 转录组测序结果

本研究以 UpCa 和 UpHT 处理的浒苔总 RNA 为

模板, 每个 3 个重复, 共构建了 6 个 cDNA 文库, 利用 BGISEQ 平台进行了转录组测序。UpHT 对照组平均获得 48.51 M 的总 Raw reads, 过滤后获得 43.12 M Clean reads, 过滤后的碱基数是 6.47 Gb, 过滤后的 reads 的比例是 88.88% (表 1)。UpCa 实验处理组平均

获得 48.67 M 的总 Raw reads, 经过数据过滤获得 43.25 M Clean reads。过滤后的碱基数是 6.49 Gb, 过滤后的 reads 比例为 88.86% (表 1)。UpHT 和 UpCa 处理比对到基因的 Clean reads 的比例分别为 50.53% 和 45.64%。

表 1 浒苔 UpHT 和 UpCa 处理转录组的测序结果

Tab.1 The result of transcriptome sequencing in *U. prolifera* under UpHT and UpCa treatments

样品	Raw reads (M)	Clean reads (M)	过滤后的碱基(Gb)	Clean reads Q20 (%)	过滤后的 reads 比例(%)
UpHT1	47.94	42.69	6.40	96.56	89.04
UpHT2	49.08	43.56	6.53	96.4	88.75
UpHT3	48.50	43.10	6.49	96.15	88.85
UpCa_1	46.20	40.90	6.13	96.41	88.53
UpCa_2	49.08	43.92	6.59	96.37	89.49
UpCa_3	50.74	44.94	6.74	96.44	88.56

注: Q_{20} 表示过滤后的 reads 中质量值大于 20 的碱基数(测序错误率 $P < 0.01$) 占总碱基数的比例, $Q = -10 \lg P$, M 为 million

2.2 基因的注释

UpHT 主要注释到 26545 条基因, UpCa 注释到 35368 条基因, 交叉的基因有 25288 条, 总共注释到 36625 条基因(图 1)。



图 1 UpCa 处理组和 UpHT 对照组基因表达的韦恩图

Fig.1 The venn diagram of gene expression between the treatment group UpCa and the control group UpHT

2.3 差异基因的筛选和表达

参照其他相关的基因库, 在 $P < 0.05$ 和 $|\log_2(FC)| \geq 1$ 条件下, 获得 7153 个 DEGs (图 2)。其中上调的 DEGs 有 6002 个, 下调的 DEGs 有 1151 个(图 2a)。

2.4 DEGs 的 GO 分类和富集分析

对 DEGs 进行 GO 分类分析, 共有 4335 条 DEGs 基因被注释归属到 GO 的功能统计里面, 结果如图 3 所示。对于参与的生物过程(biological process)来说, GO 注释最多的为细胞的过程(cellular process, 1691)、代谢的过程(metabolic process, 1446)、生物的调节(biological regulation, 447)、定位(localization, 360)、对刺激反应(response to stimulus, 328)、信号(signaling, 119)和发育过程(developmental process, 63)等。对于细

胞的构成 (cellular component) 来说膜(membrane, 1731)、膜部分(membrane part, 1630)和细胞(cells, 1612)是 GO 基因注释最多的分类。对与分子功能(molecular function)来说, 注释的基因归类最丰富的为结合(binding, 2218)、催化的活性(catalytic activity, 2511)和转运活性(transporter activity, 286)等。另外, 有 29 个 DEGs 归属到抗氧化活性(antioxidant activity), 25 个 DEGs 归属到信号转导活性(signal transducer activity)。

对 DEGs 进行 GO 富集分析, 结果如图 4 所示。在生物过程(biological process)的 GO 通路中 DEGs 主要富集到有机循环化合物代谢过程(organic cyclic compound metabolic process, GO: 1901360, 741)、细胞芳香族化合物的代谢过程(cellular aromatic compound metabolic process, GO: 0006725, 714)、杂环代谢过程(heterocycle metabolic process, GO: 0046483, 714)、有机循环复合生物合成过程(organic cyclic compound biosynthetic process, GO: 1901362, 286)和 RNA 代谢过程(metabolic process, GO: 0016070, 318)等 GO 术语。

参与细胞组成(Cellular component)的 GO 通路中, 富集程度最高的是 nucleus (GO: 0005634, 601)和细胞内的核糖核蛋白复合体(Intracellular ribonucleoprotein complex, GO: 0030529, 765)。参与分子功能(molecular function)富集程度最高的包括催化活性(catalytic activity, GO: 0003824, 2511)和连接酶活性, 形成碳氮键(ligase activity, forming carbon-nitrogen bonds, GO: 0016879, 87)等(图 4)。

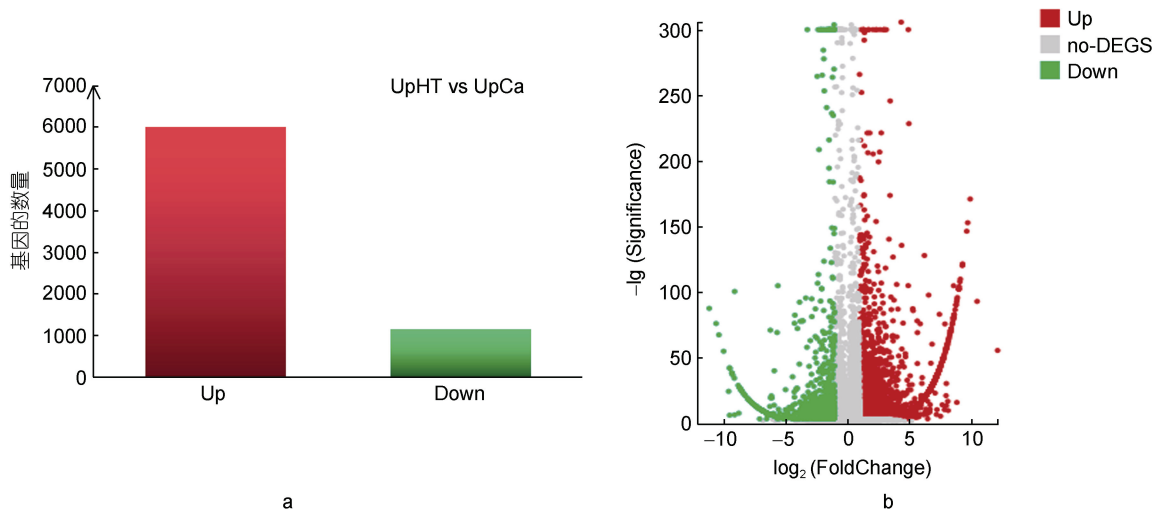


图 2 浒苔 UpCa 处理下差异基因的分析

Fig.2 Differentially expressed genes of *U. prolifera* under UpCa compare to UpHT

注: a. 上调和下调基因的数目; b. 火山图。X 轴代表 log₂ 转换后的差异倍数, Y 轴代表 -lg 转换后的显著性值。红色点表示上调的 DEGs, 绿色点表示下调的 DEGs, 灰色点表示差异不显著的基因

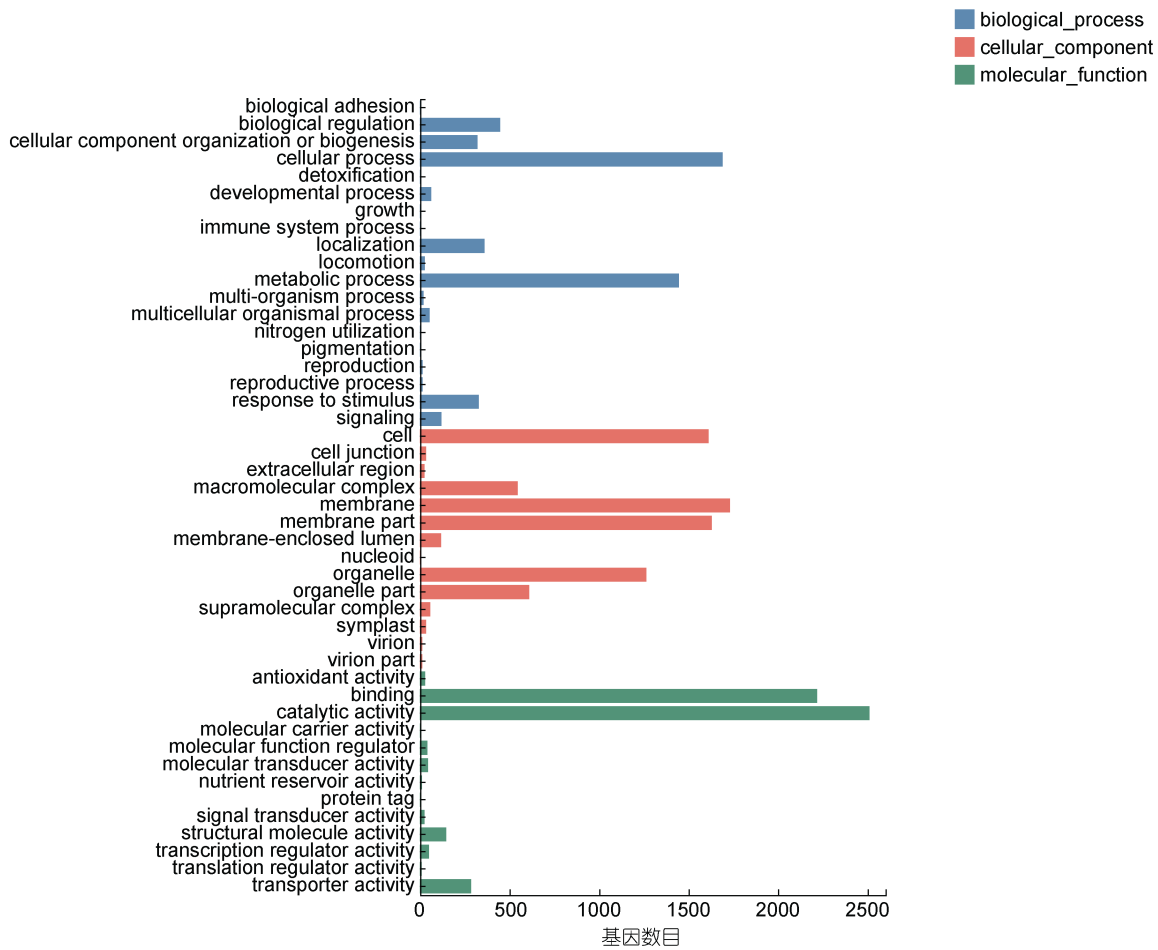


图 3 差异基因 GO 分类

Fig.3 The statistical results of DEGs GO classification

注: X 轴代表注释到 GO 条目上的基因数目, Y 轴代表 GO 功能分类

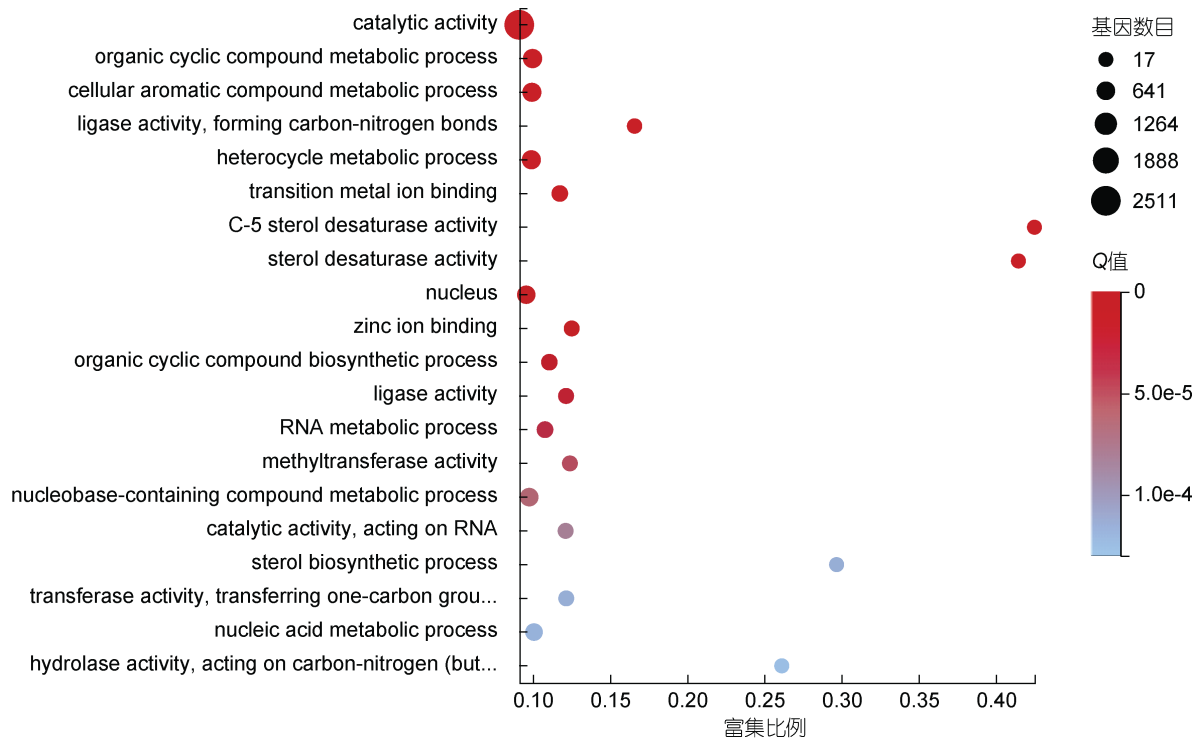


图 4 差异基因 GO 富集分析气泡图

Fig.4 Results of top GO enrichment of differentially expressed genes

2.5 差异表达基因的 KEGG 通路和 KEGG 富集分析
 为了研究涉及重要代谢途径的基因，我们把注释的基因 Mapped 到 KEGG pathway 途径中。通过 KEGG 和 KOBAS 软件，共有 2121 个 DEGs 基因

mapped 到 21 个 level2。47 个 DEGs mapped 到 environmental adaptation, 66 个 DEGs mapped 到 signal transduction, 20 个 DEGs mapped 到 Membrane transport (图 5)。

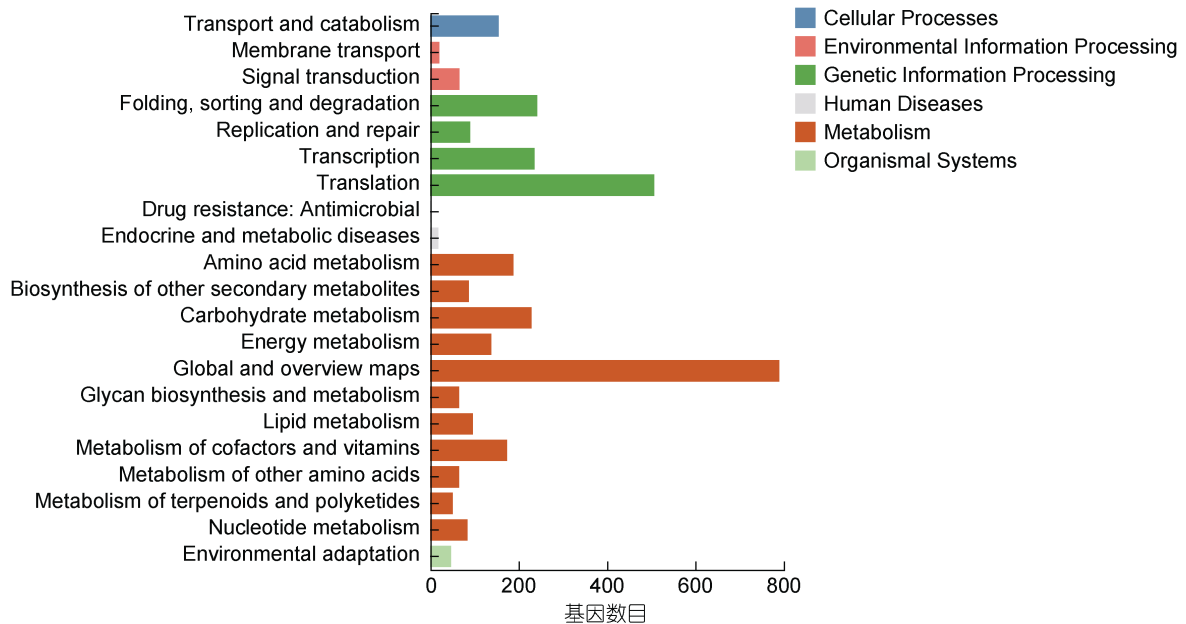


图 5 差异基因的 KEGG 分类

Fig.5 Differentially expressed genes KEGG analysis

根据 KEGG 注释结果, 利用 KOBAS 进行 KEGG 富集分析。富集程度较高的 Pathway 代谢途径主要是烟酸和烟酰胺代谢(nicotinate and nicotinamide metabolism, ko00760, 36)、核糖核酸聚合酶(RNA polymerase, ko03020, 95)、赖氨酸降解(lysine degradation, ko00310, 34)、糖基磷脂酰肌醇生物合成(glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor biosynthesis, ko00563, 20)、维生素 B₁ 代谢(thiamine metabolism, ko00730, 20)、RNA 降解(RNA degradation, ko03018, 60)、类胡萝卜素生物合成(carotenoid biosynthesis, ko00906, 22)和植物激素信号转导(plant hormone signal transduction, ko04075, 33)等(图 6)。

进一步对 KEGG 分类中运输和分解代谢(transport and catabolism, 155)、膜运输(membrane transport, 20)、信号转导(signal transduction, 66)和环境适应(environmental adaptation, 47)共 288 个 DEGs 进行 KEGG 富集散点图分析(图 7)。富集程度较高的代谢途径主要包括内吞(endocytosis, ko04144, 72)、植物-病原体相互作用(plant-pathogen interaction, ko04626, 42)、植物激素信号转导(plant hormone signal transduction, ko04075, 33)、丝裂原激活的蛋白激酶植物信号通路(MAPK signaling pathway-plant, ko04016,

42)、ABC 转运(ABC transporters, ko02010, 20)和磷酸肌醇代谢(inositol phosphate metabolism, ko00562, 14)等(图 7)。

3 讨论

藻类在遭受一系列的非生物胁迫, 如高温、低温、干旱等环境状况, 其对环境压力的防御机制主要是通过抗氧化酶的表达来调节适应性机制。我们主要从信号传导、抗氧化酶和热激蛋白等方面对差异基因的表达和鉴定进行进一步分析。

3.1 植物激素和信号转导相关的基因的鉴定和分析

已有的研究表明在非生物胁迫条件下高温改变了激素相关蛋白的表达(Reguera *et al*, 2013; Fan *et al*, 2018)。在本研究中, UpCa 处理改变了高温条件下参与植物激素信号转导和激素生物合成的关键酶的表达。筛选获得 33 个编码关键蛋白激酶的差异表达基因, 其中 32 个 DEGs 上调, 1 个 DEGs 下调。脱落酸(abscisic acid, ABA)途径和细胞分裂素转导途径在植物的生长发育及压力胁迫调节中有很重要的作用。组氨酸磷酸转移蛋白(histidine-containing phosphoryltransfer protein, AHP)主要作为细胞分裂素传感因子组氨酸激酶和反应调节因子(B-type ARR)之间的磷酸化转移

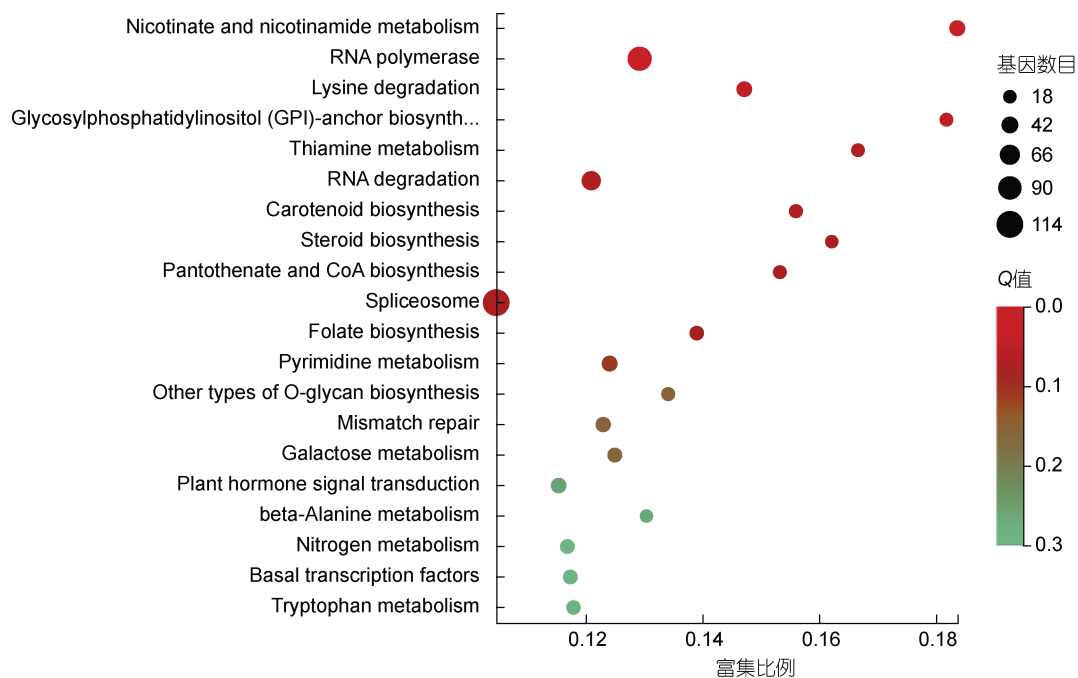


图 6 差异基因的 KEGG 富集分析

Fig.6 The KEGG enrichment analysis of DEGs

注: Rich Factor 是指在该代谢通路中差异表达的基因数与注释基因总数的比值。比值越大, 说明富集程度越高。Q value 是校验后的 P value, 在 0—1 之间, 越邻近 0, 富集越显著

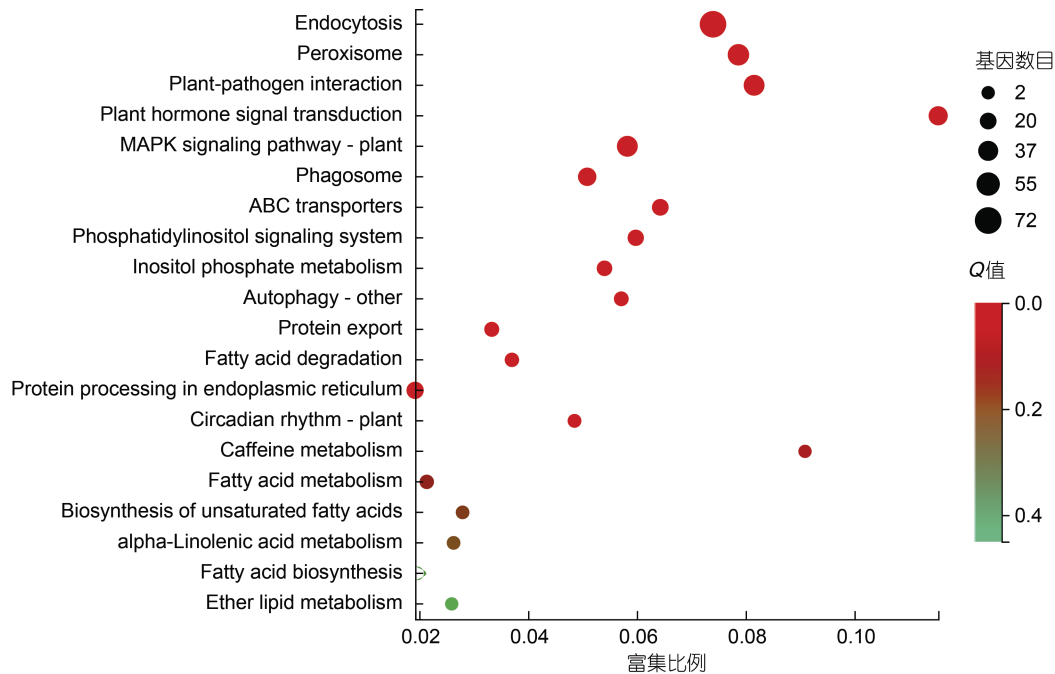


图7 信号和膜运输相关基因的 KEGG 富集分析

Fig.7 The KEGG enrichment analysis of DEGs involved in signal and membrane transport

的介质, 通过 His 到 Asp 的多步磷酸化, 在促进细胞分裂素信号转导中发挥重要作用。在细胞分裂素 (cytokinin) 信号转导通路中, 下游的 AHPs 主要是通过保守的组氨酸残基来转运需要转运的保守的氨基酸。1 个 unigene 编码的 AHP 和 8 个 unigenes 编码的反应调节因子 (two-component response regulator ARR-B family) 的表达水平都是差异性上调。在 ABA 的信号转导途径中, 在拟南芥的生化 and 分子遗传学研究中, 已经发现蛋白磷酸酶 2C (PP2C) 酶是植物信号转导过程中的负调节因子 (Rodriguez, 1998; Fan *et al.*, 2018)。在没有 ABA 的情况下, PP2C 主要抑制蔗糖非发酵相关蛋白激酶 2 (sucrose non-fermenting 1-related protein kinase 2, SnRK2) 蛋白的活性状态。在 ABA 的信号转导途径中, SnRK2s 起着重要的作用。SnRK2s 蛋白活性状态的抑制导致下游转录调控的减少。ABA 减轻 PP2C 对 SnRK2s 的抑制作用, 激活 SnRK2s 启动下游信号转导。已有的研究表明, 苜蓿在高温压力下, AHP 和 SnRK2s 蛋白的表达增加, 而 PP2C 蛋白的表达降低说明细胞分裂素和 ABA 的信号转导通路在高温下被诱导 (Reguera *et al.*, 2013; Fan *et al.*, 2018)。本研究表明, 在 UpCa 处理下 8 个 unigenes 编码丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶 (serine/threonine-protein kinase, SRK2), 基因表达都显著上调。PP2C 也是显著性上调 (表 2)。另外, MAPK signal system 中, 有丝分裂原活化蛋白激酶激酶激酶

17/18 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 17/18, MAPKKK17/18) 和有丝分裂原活化蛋白激酶激酶 (mitogen-activated protein kinase kinase 9, MAPKK9) 都是上调。结果表明 UpCa 处理缓解了高温的压力, 改变了 ABA 信号转导途径、细胞分裂素信号途径和 MAPK signal 途径, 提高了对高温压力的适应性调节。

在油菜素内酯 (brassinosteroid, BR) 信号转导通路中, 丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶 (serine/threonine-protein phosphatase BSU1, Unigene3691_All) 基因的表达增加, BR 的信号途径增强。乙烯信号转导途径中, 8 个 unigene 编码的乙烯受体 (ethylene receptor, ETR) 和 CL3860.Contig2_All 编码的 EIN3-binding F-box protein 都是差异性上调。4 个 unigenes 编码的 CTR1 (serine/threonine-protein kinase CTR1) 表达上调。

植物的生长受到环境和激素信号的协调调节, 油菜素类固醇 (BR)、细胞分裂素和 ABA 在温度胁迫适应性调节中发挥重要作用; 然而, 激素信号转导与环境信号之间的相互作用在分子水平上仍不清楚。结果表明, 可能是在高温状况下, 苜蓿自身有一套应激反应机制来应对高温胁迫, 氯化钙的施加促进了这一套反应机制。因此, 苜蓿细胞分裂素、脱落酸、油菜素内酯和乙烯信号转导途径增强, 促进了对非生物环境胁迫的适应。在应对高温胁迫时, 苜蓿激素信号转导途径中氯化钙调节起着重要的作用, 但是其具体机制有待进一步深化研究。

表 2 抗氧化、植物信号转导和 Ca²⁺ 相关差异基因(部分)
Tab.2 Antioxidant, plant signal transduction and Ca²⁺ related differentially expressed genes (portion)

基因 ID	基因描述	比率
CL1545.Contig1_All	next to BRCA1 gene 1 protein	3.28
CL2017.Contig1_All	K00432//glutathione peroxidase	0.44
CL2243.Contig1_All	K13299//glutathione S-transferase kappa 1	0.19
CL2987.Contig2_All	K03564//peroxiredoxin Q/BCP	0.43
CL3441.Contig3_All	K10878//meiotic recombination protein SPO11	3.52
CL3645.Contig1_All	K00434//L-ascorbate peroxidase	2.31
CL5883.Contig2_All	K13179//ATP-dependent RNA helicase DDX18/HAS1	287.36
CL6286.Contig1_All	K00432//glutathione peroxidase	2.02
CL7704.Contig1_All	K00799//glutathione S-transferase	0.45
CL7712.Contig1_All	K19511//peroxidase	3.29
CL776.Contig3_All	K22020//mucin-19	2.15
GW320988.1	K00799//glutathione S-transferase	0.44
GW321598.1	K00434//L-ascorbate peroxidase	4.30
GW321766.1	K04564//superoxide dismutase, Fe-Mn family	2.16
GW321894.1	K00432//glutathione peroxidase	4.78
GW322475.1	K00799//glutathione S-transferase	75.06
GW323156.1	K09489//heat shock 70 kDa protein 4	0.26
GW324240.1	K10878//meiotic recombination protein SPO11	2.21
Unigene7522_All	K12598//ATP-dependent RNA helicase DOB1	7.06
Unigene7890_All	thioredoxin [<i>Raphidocelis subcapitata</i>]	0.48
Unigene7993_All	K00799//glutathione S-transferase [EC:2.5.1.18]	2.17
CL1491.Contig1_All	K14498//serine/threonine-protein kinase SRK2	180.04
CL1996.Contig2_All	K14491//two-component response regulator ARR-B family	25.12
CL2513.Contig1_All	K14510//serine/threonine-protein kinase CTR1	2.01
CL318.Contig12_All	K14513//ethylene-insensitive protein 2	399.55
CL318.Contig7_All	K14513//ethylene-insensitive protein 2	72.51
CL444.Contig5_All	K14498//serine/threonine-protein kinase SRK2	25.26
CL628.Contig4_All	K14498//serine/threonine-protein kinase SRK2	180.04
CL6954.Contig2_All	K04422//mitogen-activated protein kinase kinase kinase 13	25.11
CL7403.Contig1_All	K14509//ethylene receptor	24.84
GW321307.1	K14490//histidine-containing phosphotransfer protein	399.55
Unigene18393_All	K14491//two-component response regulator ARR-B family	0.05
Unigene26733_All	K14498//serine/threonine-protein kinase SRK2	23.38
Unigene3691_All	K14501//serine/threonine-protein phosphatase BSU1	2.44
Unigene5445_All	K14510//serine/threonine-protein kinase CTR1	72.51
Unigene5496_All	K14491//two-component response regulator ARR-B family	55.83
Unigene7934_All	K14497//protein phosphatase 2C	3.23
CL1996.Contig3_All	K14491//two-component response regulator ARR-B family	25.26
CL3860.Contig2_All	K14515//EIN3-binding F-box protein	23.38
CL444.Contig1_All	K14498//serine/threonine-protein kinase SRK2	72.50
CL3373.Contig2_All	K13412//calcium-dependent protein kinase	0.24
CL3373.Contig3_All	K13412//calcium-dependent protein kinase	120.13

续表

基因 ID	基因描述	比率
CL359.Contig3_All	K13448//calcium-binding protein CML	0.02
CL4671.Contig4_All	K16900//two pore calcium channel protein, plant	27.85
CL468.Contig4_All	K13412//calcium-dependent protein kinase	5.37
CL4858.Contig1_All	K13448//calcium-binding protein CML	12.07
CL4864.Contig2_All	K05849//solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger)	49.85
CL528.Contig1_All	K13412//calcium-dependent protein kinase	2.50
CL6080.Contig2_All	K13448//calcium-binding protein CML	3.20
CL688.Contig10_All	K16900//two pore calcium channel protein, plant	4.07
GW322333.1	K21891//calcium load-activated calcium channel	59.42
GW324252.1	K13412//calcium-dependent protein kinase	13.24
CL172.Contig8_All	K07359//calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2	0.24
GW325511.1	K13412//calcium-dependent protein kinase	5.30
Unigene14465_All	K08794//calcium/calmodulin-dependent protein kinase 1	2.03
CL173.Contig7_All	K13755//calcium/calmodulin-dependent 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase	55.17

3.2 编码 Ca²⁺信号组分的基因表达

Ca²⁺信号组分主要由 3 部分组成, 即生成 Ca²⁺信号, 识别 Ca²⁺信号, 转导, 最后开始针对特定刺激的反应。细胞质 Ca²⁺水平是高度动态的, 并通过通道、泵和转运体对各种生物和非生物信号进行调节。信号转导过程中游离 Ca²⁺水平的变化由 Ca²⁺响应蛋白检测。钙调蛋白(CaM)、钙调磷酸酶 b(CBL)和 Ca²⁺依赖的蛋白激酶(CDPKs)直接或间接调节转录的转录因子通过磷酸化/脱磷酸作用响应细胞内 Ca²⁺增加(Shankar *et al*, 2014)。本研究结果表明 15 个 DEGs 编码的 CDPK 基因表达有差异性变化, 其中 4 个 DEGs 编码的基因表达下调, 11 个 DEGs 编码的基因上调。钙结合蛋白(calcium-binding protein CML)、钙/钙调素依赖的蛋白激酶(calcium/calmodulin-dependent protein kinase)、钙调素(calmodulin)和钙/钙调蛋白依赖性 3',5' 环核苷酸磷酸二酯酶(calcium/calmodulin-dependent 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase)的基因表达上调(表 2)。Ca²⁺的感应因子 CDPKs 仅在植物和原生生物中被鉴定, 并且有一个结合 Ca²⁺离子的自动调节域。对于 CDPKs 活性的调控, 不仅需要 Ca²⁺离子, 还需要特定的磷脂和自磷酸化。结果表明, 外源 CaCl₂ 离子的添加激活了多种 Ca²⁺信号组分, 使浒苔产生适应性反应和 Ca²⁺的吸收更加顺畅, 这与已有研究结果相一致(González *et al*, 2012; Shankar *et al*, 2014; Goswami *et al*, 2015)。

3.3 抗氧化基因功能的鉴定

非生物胁迫如高温、低温和干旱可以诱发植物防

御机制, 可以通过调节抗氧化酶表达来适应非生物压力。在高等植物中, 对高温胁迫的信号响应包括正常蛋白质合成的减少, 并伴随着热响应性的基因和热激蛋白(heat shock protein, Hsps)表达的上调, 导致活性氧的积累(Kim *et al*, 2013)。活性氧(ROS)是指自由基, 包括过氧化氢(H₂O₂)、单重态氧(O₂⁻)和羟基自由基(OH[·])。过量的 ROS 会破坏大分子和细胞膜。为了清除有毒的 ROS, 藻类启动自身的抗氧化防御系统, 即超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶、过氧化物酶、硫氧还蛋白和谷胱甘肽等(Wang *et al*, 2011)。目前的研究表明, 主要有 15 个抗氧化基因有差异性表达, 其中 9 个 DEGs 表达上调, 6 个 DEGs 表达下调。上调的基因主要包括抗坏血酸过氧化物酶(L-ascorbate peroxidase)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase)、铁超氧化物歧化酶(Fe superoxide dismutase)、谷胱甘肽 s-转移酶(glutathione S-transferase)、ATP 依赖的 RNA 解旋酶(ATP-dependent RNA helicase DOB1)(表 2)。下调的基因主要为谷胱甘肽过氧化物酶、谷胱甘肽 s-转移酶和热激蛋白(heat shock 70 kDa protein)等(表 2)。

Hsp70 在新生蛋白的折叠、跨膜转运和错误蛋白的修复方面起着重要的作用。在植物遭受压力时, HSP70 上调参与保持细胞的平衡, 保护机体免受伤害。高温下浒苔 Hsp70 的表达升高(Fan *et al*, 2018)。谷胱甘肽过氧化物酶主要是催化氧化谷胱甘肽(glutathione disulfide, GSSG)降解成巯基化的谷胱甘肽(sulfhydryl form glutathione, GSH), GSH 在抵抗氧

化反应和维持细胞的还原环境方面起到重要的作用。本研究结果表明 UpCa 处理缓解了高温压力, Hsp70 的表达量下调, FeSOD genes 和抗坏血酸过氧化物酶基因表达的上调显著增强了浒苔的抗氧化能力。谷胱甘肽过氧化物酶和谷胱甘肽 S-转移酶转录本有上调也有部分下调, 可能是因为不同的转录本可能有相似的表现, 但是它们可能通过不同的 Pathway 途径行使不同的功能。

4 结论

采用 BGISEQ 平台进行高通量测序, 获得了浒苔 UpCa 和 UpHT 处理下相关的转录组数据。分析结果显示, 根据 UpHT 和 UpCa 处理分析共获得 36625 条基因, 在 UpCa 下鉴定出 7513 个差异表达的基因, 包括 6002 个基因上调, 1151 个基因下调, 对差异基因进行了 GO 富集和 KEGG 富集分析。对膜转运、植物信号转导和环境适应性相关的 DEGs 进行分析, 主要富集在内吞 (Endocytosis)、植物-病原体相互作用 (Plant-pathogen interaction)、植物激素信号转导 (Plant hormone signal transduction)、丝裂原激活的蛋白激酶 (MAPK signaling pathway-plant)、ABC 转运 (ABC transporters) 和磷脂酰肌醇信号系统 (Phosphatidylinositol signaling system) 等代谢通路上。

植物激素信号转导途径中, 细胞分裂素、脱落酸、油菜素内酯和乙烯信号转导途径增强。抗氧化酶中 FeSOD、谷胱甘肽过氧化物酶和谷胱甘肽 S 转移酶, 抗坏血酸过氧化物酶等基因表达上调, 下调的基因主要是热激蛋白。Ca²⁺ 信号组分基因钙结合蛋白、钙/钙调素依赖的蛋白激酶、钙调素和钙/钙调蛋白依赖性 3',5'环核苷酸磷酸二酯酶的基因表达上调, 丝裂原活化蛋白激酶激酶和磷脂酰肌醇信号相关的基因也差异性上调。植物信号转导、抗氧化酶、MAPK 信号系统和 Ca²⁺ 信号组分基因在外源 CaCl_2 对浒苔高温压力的调节中具有重要的作用, 不同信号通路之间的相互作用还需要进一步研究。

参 考 文 献

- 朱婷芳, 管 峰, 苗 亮等, 2020. 大弹涂鱼 (*Boleophthalmus pectinirostris*) 单核巨噬细胞低氧胁迫比较转录组学分析. 海洋与湖沼, 51(2): 335—344
- 陈 辉, 2011. 杜氏盐藻耐盐渗透调节与 Ca²⁺ 介导的渗透信号传导. 广州: 华南理工大学博士学位论文
- 李雪娜, 韩 震, 刘贤博等, 2016. 浒苔和马尾藻的生消与海表面温度的相互影响研究. 海洋湖沼通报, (5): 126—130
- Chávez-Sánchez T A, Piñón-Gimate E, Serviere-Zaragoza A *et al*, 2017. Recruitment in *Ulva* blooms in relation to temperature, salinity and nutrients in a subtropical bay of the Gulf of California. *Botanica Marina*, 60(3): 257—270
- Fan M H, Sun X, Liao Z *et al*, 2018. Comparative proteomic analysis of *Ulva prolifera* response to high temperature stress. *Proteome Science*, 16: 17
- Fan M H, Sun X, Xu N J *et al*, 2017. Integration of deep transcriptome and proteome analyses of salicylic acid regulation high temperature stress in *Ulva prolifera*. *Scientific Reports*, 7(1): 11052
- González A, Cabrera M D L Á, Henríquez M J *et al*, 2012. Cross talk among calcium, hydrogen peroxide, and nitric oxide and activation of gene expression involving calmodulins and calcium-dependent protein kinases in *Ulva compressa* exposed to copper excess. *Plant Physiology*, 158(3): 1451—1462
- Goswami S, Kumar R R, Sharma S K *et al*, 2015. Calcium triggers protein kinases-induced signal transduction for augmenting the thermotolerance of developing wheat (*Triticum aestivum*) grain under the heat stress. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 24(4): 441—452
- He B X, Hou L L, Dong M M *et al*, 2018a. Transcriptome analysis in *Haematococcus pluvialis*: astaxanthin induction by high light with acetate and Fe²⁺. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1): 175
- He Y L, Hu C Y, Wang Y H *et al*, 2018b. The metabolic survival strategy of marine macroalga *Ulva prolifera* under temperature stress. *Journal of Applied Phycology*, 30(6): 3611—3621
- Hu C Y, Cui D D, Sun X *et al*, 2019. Transcriptomic analysis unveils survival strategies of autotrophic *Haematococcus pluvialis* against high light stress. *Aquaculture*, 513: 734430
- Im S, Choi S, Hwang M S *et al*, 2015. De novo assembly of transcriptome from the gametophyte of the marine red algae *Pyropia seriata* and identification of abiotic stress response genes. *Journal of Applied Phycology*, 27(3): 1343—1353
- Kim H J, Chiang Y H, Kieber J J *et al*, 2013. SCF^{KMD} controls cytokinin signaling by regulating the degradation of type-B response regulators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(24): 10028—10033
- Li Y H, Wang D, Xu X T *et al*, 2017. Physiological responses of a green algae (*Ulva prolifera*) exposed to simulated acid rain and decreased salinity. *Photosynthetica*, 55(4): 623—629
- Reguera M, Peleg Z, Abdel-Tawab Y M *et al*, 2013. Stress-induced cytokinin synthesis increases drought tolerance through the coordinated regulation of carbon and nitrogen assimilation in rice. *Plant Physiology*, 163(4): 1609—1622
- Rodríguez P L, 1998. Protein phosphatase 2C (PP2C) function in higher plants. *Plant Molecular Biology*, 38(6): 919—927
- Rybak A S, 2018. Species of *Ulva* (Ulvoophyceae, Chlorophyta) as indicators of salinity. *Ecological Indicators*, 85: 253—261
- Shankar A, Srivastava A K, Yadav A K *et al*, 2014. Whole genome transcriptome analysis of rice seedling reveals alterations in Ca²⁺ ion signaling and homeostasis in response

- to Ca^{2+} deficiency. *Cell Calcium*, 55(3): 155—165
- Wang H, Lin A P, Gu W H *et al*, 2016. The sporulation of the green alga *Ulva prolifera* is controlled by changes in photosynthetic electron transport chain. *Scientific Reports*, 6: 24923
- Wang J X, Sommerfeld M, Hu Q, 2011. Cloning and expression of isoenzymes of superoxide dismutase in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) under oxidative stress. *Journal of Applied Phycology*, 23(6): 995—1003
- Wang L K, Feng Z X, Wang X *et al*, 2010. DEGseq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data. *Bioinformatics*, 26(1): 136—138

COMPARATIVE TRANSCRIPTOME STUDY OF *ULVA PROLIFERA* TO CALCIUM CHLORIDE TREATMENT UNDER HIGH TEMPERATURE STRESS

TANG Xiao-Wen¹, FAN Mei-Hua¹, WANG Chao-Feng¹, LIAO Zhi¹, LI Peng¹,
XU Nian-Jun^{2, 3, 4, 5}, WANG Jian-Xin¹

(1. Marine Science and Technology College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China; 2. National Engineering Research Laboratory of marine biotechnology and Engineering, Ningbo University, Ningbo 315832, China; 3. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology (Ningbo University), Ministry of Education, Ningbo 315832, China; 4. Collaborative Innovation Center for Zhejiang Marine High-efficiency and Healthy Aquaculture, Ningbo University, Ningbo 315832, China; 5. Key Laboratory of Marine Biotechnology of Zhejiang Province, Ningbo University, Ningbo 315832, China)

Abstract As a necessary signal molecule, calcium (Ca^{2+}) plays an important role in plant growth and abiotic stress regulation. The transcriptome variation of exogenous CaCl_2 addition in *U. Prolifera* at a high temperature (35 °C) was analyzed in experiment using BGISEQ platform. The high temperature with CaCl_2 addition was the treatment group (denoted UpCa), and high temperature was the control group (UpHT). Results show that 36625 genes were obtained, of which 7513 differentially expressed genes were identified, including 6002 up-regulated genes and 1151 down-regulated genes. The DEGs related to membrane transport, plant signal transduction and environmental adaptability were analyzed. They were mainly enriched in endocytosis, plant pathogen interaction, plant hormone signal transduction, mitogen activated protein kinase (MAPK signaling pathway plant), ABC transporters, and phosphatidylinositol signaling system. In the metabolic pathway of plant signaling transduction system, cytokinin, abscisic acid, brassinolide, and ethylene signal transduction pathways were enhanced. The expressions of FeSOD, GSHPx, glutathione-s-transferase, and ascorbic acid peroxidase were up-regulated, and the down regulated genes were heat shock protein. The expressions of calcium binding protein, calcium/calmodulin dependent protein kinase, calmodulin, and calcium/calmodulin dependent 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase were up-regulated. The mitogen activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK) and phosphatidylinositol signal related genes were also up-regulated. In this study, the important roles of plant signal transduction, antioxidant enzyme, MAPK signal system, and Ca^{2+} signal component genes in exogenous CaCl_2 regulation of high temperature pressure in *U. prolifera* were systematically reviewed. These results will provide a basis for further elucidating the mechanism of Ca^{2+} signal regulation and adaptation to high temperature.

Key words *Ulva prolifera*; exogenous CaCl_2 ; transcriptome; high temperature