

龙须菜(*Gracilariopsis lemaneiformis*)海藻糖-6-磷酸合成酶(TPS)对逆境胁迫的响应*

张莹莹 吕 燕 宣雯燕 张小倩 徐年军 孙 雪

(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)

摘要 非还原性二糖海藻糖及其代谢物是调控植物生长发育和逆境响应的信号分子。本研究以大型海藻龙须菜(*Gracilariopsis lemaneiformis*)为对象,从基因转录、蛋白和酶活性 3 个水平探讨了海藻糖合成酶——海藻糖-6-磷酸合成酶(TPS)对高温、高盐及渗透胁迫的响应。龙须菜中 4 条 TPS 序列均具有 TPS 家族保守结构域(Glyco-transf-20)和 TPP 家族保守结构域(Trehalose-PPase),且属于 Class I 亚家族。在转录水平上,高盐胁迫主要促进了 *TPS1*、*TPS2* 和 *TPS4* 基因的表达,而渗透胁迫则总体抑制了 *TPS1*、*TPS2* 和 *TPS3* 基因的表达。在高盐胁迫 48 h 时,TPS1 蛋白含量升高到对照组的 2.03 倍。在高温和高盐胁迫 24 h 时,TPS 活性升高,而在高盐胁迫 48 h 及渗透胁迫条件下酶活性降低。可见海藻糖-6-磷酸合成酶参与了龙须菜抗高温和高盐胁迫的应答,但对渗透胁迫不敏感。该研究为提高龙须菜抗逆性及培育抗逆龙须菜品种提供了参考。

关键词 龙须菜;海藻糖;海藻糖-6-磷酸合成酶;非生物胁迫

中图分类号 S968.43 **doi:** 10.11693/hyh20200700225

龙须菜(*Gracilariopsis lemaneiformis*)隶属红藻门(Rhodophyta)、江蓠目(*Gracilariales*),是一种生长在潮间带的大型经济海藻。龙须菜不仅可用作琼胶提取原料、鲍的饵料及食材,而且在去除氮磷、降低海水富营养化、维持海洋生态平衡方面也具有重要的环境效益(Chen *et al.*, 2015)。野生型龙须菜主要分布在山东沿海,其生长主要集中在春秋两季,生长的适温范围为 12—23°C(张学成等,2009)。随着耐高温 981 品系等的成功培育,大规模的龙须菜栽培逐渐从原来的北方低温海区扩展到了南方高温海区。但南方夏季海水温度高,龙须菜无法成功度夏,并且潮汐以及采收运输过程中藻体还可能会受到渗透胁迫的影响。因此,研究龙须菜抗逆胁迫对其夏季栽培及运输等具有一定的参考价值。

海藻糖是一种非还原性二糖,广泛存在于植物、细菌、真菌和无脊椎动物中。海藻糖不仅可用于生物

体内碳的存储和运输,还可作为压力保护剂使生物更好地抵抗不利环境胁迫(Schluepmann *et al.*, 2004; O'Hara *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2016)。高含量海藻糖对于许多沙漠植物如折扇叶(*Myrothamnus flabellifolius*)、卷柏(*Selaginella tamariscina*)等的生存是必需的(Goddijn *et al.*, 1999; Paul *et al.*, 2008)。在热激条件下,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中海藻糖积累可达到细胞干重的 30% (Bell *et al.*, 1998)。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中海藻糖含量的增加会提高其对盐胁迫的耐受性(Krasensky *et al.*, 2014)。可见生物体内海藻糖的积累与逆境胁迫存在着密切关系。此外,海藻糖及其代谢物海藻糖-6-磷酸(Trehalose-6-phosphate, T6P)还参与一些信号调控,它们可能作为中央代谢调节器,协调植物中多种代谢通路。

自然界中有 5 条海藻糖合成途径,其中 OtsA-OtsB 途径在生物中分布最广泛,也是植物中发

* 国家重点研发计划项目,2018YFD0901502 号;国家自然科学基金项目,31672674 号;浙江省自然科学基金项目,LY19C190003 号,LQ20C190002 号;宁波市科技局项目,2019B10009 号。张莹莹,硕士研究生,E-mail: 1113973798@qq.com

通信作者:孙 雪,博士,研究员,E-mail: sunxue@nbu.edu.cn

收稿日期:2020-07-31,收修改稿日期:2020-09-25

现的唯一的海藻糖合成途径(Paul *et al.*, 2008)。在植物中,海藻糖合成由两步反应组成,首先海藻糖-6-磷酸合成酶(Trehalose-6-phosphate synthase, TPS)催化尿苷二磷酸-葡萄糖与葡萄糖-6-磷酸合成 T6P,然后 T6P 在海藻糖磷酸磷酸酶(Trehalose-6-phosphate phosphatase, TPP)催化下脱磷酸形成海藻糖。海藻糖-6-磷酸合成酶在调控碳水化合物代谢、生长发育及胁迫应答响应中起着重要作用。如即使在合适的开花条件下,缺失 *TPS1* 的拟南芥开花也会推迟到很晚(Wahl *et al.*, 2013)。与非转基因水稻(*Oryza sativa*)相比,过表达 *TPS* 基因的转基因水稻在高盐、干旱和低温条件下能够更好地维持生长和抗光氧化损伤(Li *et al.*, 2011)。在高温下, *TPS1* 基因敲除的酵母菌不生长,而 *TPS1* 过表达的菌株则生长良好(Jiang *et al.*, 2016)。

目前许多生物中 *TPS* 基因序列信息已经阐明。尽管高等植物中不会大量积累海藻糖,但是基因组测序结果显示植物中存在着 *TPS* 基因家族。如水稻、小麦(*Triticum aestivum*)和大豆(*Glycine max*)中分别有 11 条、12 条和 13 条 *TPS* 基因,木豆(*Cajanus cajan*)中则有 28 条 *TPS* 序列(Zang *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2015)。但是在藻类中关于 *TPS* 基因信息及抗逆性的工作较少。在本研究中,我们分析了从龙须菜基因组中筛选到的 4 条 *TPS* 基因序列,并在转录、蛋白及酶活性 3 个水平探究了 *TPS* 对高温、高盐及渗透胁迫的响应。该研究丰富了海藻糖在藻类抗逆胁迫中的工作,为提高龙须菜抗逆性提供了资料。

1 材料与方法

1.1 材料与培养条件

龙须菜耐高温 981 品系采自福建霞浦县长春镇养殖场(119°59'E, 26°43'N)。首先用毛刷清洗去除藻体表面附着物,然后挑取生长状态良好的龙须菜,用镊子截取 5—10 cm 长的藻体尖部,置于光照培养箱中进行培养。培养条件为:温度 23 °C,光强约 40 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,光周期 12L:12D,培养基使用盐度 30 的无菌海水。

1.2 材料处理

实验共设置 4 个组:对照组(CK: 23 °C, 盐度 30)、高温组(HS: 30 °C, 盐度 30)、高盐组(SS: 23 °C, 盐度 45)和渗透胁迫组(OS: 23 °C, 盐度 30, 5% PEG6000),其他培养条件与 1.1 相同,每组 3 个重复。分别在培养 0、3、6、12 h 取约 100 mg 样品用于实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)分析;分别在 0、12、24、

48 h 取约 200 mg 样品用于蛋白免疫印迹(Western blot)分析或酶活性测定。

1.3 *TPS* 序列的生物信息学分析

结合龙须菜基因组测序和 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术,我们得到 4 条龙须菜 *TPS* 基因序列,分别记为 *TPS1*—*TPS4*。利用 ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>)进行 *TPS* 蛋白基本理化性质预测。利用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)分析 *TPS* 蛋白结构和功能域。使用 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)对 *TPS* 蛋白中跨膜结构进行预测。分别利用 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)和 Plant-mPLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>)对 *TPS* 蛋白进行信号肽和亚细胞定位分析。用 MEGA 7.0 软件的邻接法构建 *TPS* 系统进化树(饶莉萍等, 2020),bootstrap 值设置为 1000。

1.4 *TPS* 基因转录分析

参考林丽春等(2019)的方法,将 1.2 中的样品进行总 RNA 提取和 cDNA 的合成。以 *actin* 和 *eIF* 为内参基因,利用 Primer Premier 5.0 软件设计 *TPS* 和内参基因序列的 RT-qPCR 引物(表 1),引物序列交由华大基因有限公司合成。所有基因片段均经过 T-A 克隆和测序验证为正确的序列。在 Eppendorf 荧光定量 PCR 仪(Mastercycler ep realplex, Germany)中进行 RT-qPCR 扩增,所用试剂和反应程序等参照孙鹏等(2019)的方法进行。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法分析目的基因的相对表达水平(Livak *et al.*, 2001)。

1.5 抗体制备与 Western blot 分析

根据抗体制备原则及 *TPS* 氨基酸序列设计多肽序列,交由杭州华安生物技术有限公司完成抗体制备。经过特异性验证和检测,只有 *TPS1* 蛋白制得了合格抗体,其多肽序列为 NDDPNRIRTPRSIHC。

根据吕燕等(2019)的方法进行蛋白提取和浓度测定。总蛋白经过 SDS-PAGE 电泳后,将胶转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,用 5%牛血清白蛋白于室温封闭 2 h,然后用封闭液稀释(1:200)的一抗溶液于 4 °C 孵育过夜,洗膜 3 次,加入 1:8000 稀释的 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗(康为世纪,货号 CW0103)溶液孵育 1.5 h,洗膜,最后加入 Western Bright ECL 化学发光液(Advansta)反应后,在 Tanon 5200 全自动化学发光图像分析系统中检测、成像,用 Image J 软件分析目的蛋白条带的灰度值。

表 1 RT-qPCR 的引物
Tab.1 Primers used for RT-qPCR

基因	引物名称	引物序列(5'—3')	扩增长度(bp)
TPS1	TPS1-F	ACTACGACGGAACCTCTACCCC	148
	TPS1-R	ACACCACGTCCCATAAGATTA	
TPS2	TPS2-F	ACTACGCTGGCGACAAAATG	194
	TPS2-R	CTTCGCATTTGGCAGACGGT	
TPS3	TPS3-F	GCAACCAATCTGCCCATCGT	180
	TPS3-R	GCGGTTGGCGGAGTATCTTG	
TPS4	TPS4-F	CGTGCCGCTGCCTATTGTTT	174
	TPS4-R	CGCAGAAGGCTTGGCAGGAG	
actin	actin-F	CTGAGGAGTTTGAAAGGGAGA	203
	actin-R	GGAGCAAGAATAAGAGCCTGAA	
eIF	eIF-F	CACCGAGACCTTTGACGACAT	234
	eIF-R	GGAGCAAGAATAAGAGCCTGAA	

1.6 酶的提取及 TPS 活性分析

酶提取方法参考 Pramanik 等(2005)并进行了一些修改。将 200 mg 龙须菜在液氮中研磨成粉末, 然后加入 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(含 100 mmol/L 的 NaCl, DTT 和 PMSF, pH 7.5)提取。最后将提取物以 13000×g (4 °C)离心 5 min, 上清液即为酶粗提液。

TPS 活性测定方法参考 Hottiger 等(1987)。该方法检测了在葡萄糖-6-磷酸存在下 UDP-葡萄糖中 UDP 的释放, 以 340 nm 吸光度的降低来计算 UDP 的释放量。将每 g 样品每 min 形成 1 nmol UDP 定义为一个酶活性单位(U), 酶活性表示为 U/g 藻体鲜重(FW)。

1.7 数据分析

采用 Excel 2013 进行数据处理和作图, 实验数据均以平均值±标准偏差(mean±SD)表示。用 SPSS 13.0 中的 One-way ANOVA 和 Tukey 多重比较进行统计学分析, 以 $P < 0.05$ 设为差异显著。对于 RT-qPCR 的数据, 把每个组在 0 h 时的基因表达量记为 1, 将基因表达倍数上调 2 倍或下调 0.5 倍设为差异显著(Chang *et al.*, 2014)。

2 结果与分析

2.1 TPS 序列和结构特征

龙须菜 4 条 TPS 基因编码的蛋白特征如表 2 所示, 其在 GenBank 中的序列号分别为 MT919220—MT919223。其中 TPS3 基因序列最长, 其次是 TPS1, 两者分别编码 1140 和 1007 个氨基酸, 而 TPS2 和 TPS4 开放阅读框较短, 其编码蛋白分子量分别为 84.9 ku 和 100.6 ku。4 条序列中, TPS1、TPS2 和 TPS4 为酸性蛋白(pI 为 5.60—6.14), 而 TPS3 则偏弱碱性(pI 为 7.94)。4 条 TPS 蛋白的不稳定指数在 43.75—52.98 之间, 以 40 为稳定性蛋白的标准, 龙须菜 TPS 蛋白均为不稳定性蛋白; 平均亲水系数在 -0.382 和 -0.229 之间, 均为亲水性蛋白。

对龙须菜 TPS 蛋白序列进行结构域分析(图 1), 发现 4 条 TPS 的 N 端都有 TPS 家族保守结构域(Glyco-transf-20), C 端都包含 TPP 家族保守结构域(Trehalose-PPase)。除了以上两个结构域之外, TPS1 蛋白的 N 端还包含一个 CBM-2 保守结构域(carbohydrate-binding module), 而 TPS3 蛋白的 C 端

表 2 龙须菜 TPS 蛋白序列的基本特征
Tab.2 Characteristics of TPS sequences in *G. lemaneiformis*

基因	基因号	编码氨基酸数	蛋白分子量(ku)	等电点	不稳定指数	平均亲水系数
TPS1	Contig4915.8	1007	114.4	5.69	48.10	-0.382
TPS2	Contig214.2	742	84.9	5.60	46.56	-0.328
TPS3	Contig18.3	1140	127.2	7.94	52.98	-0.229
TPS4	Contig174.1	893	100.6	6.14	43.75	-0.298

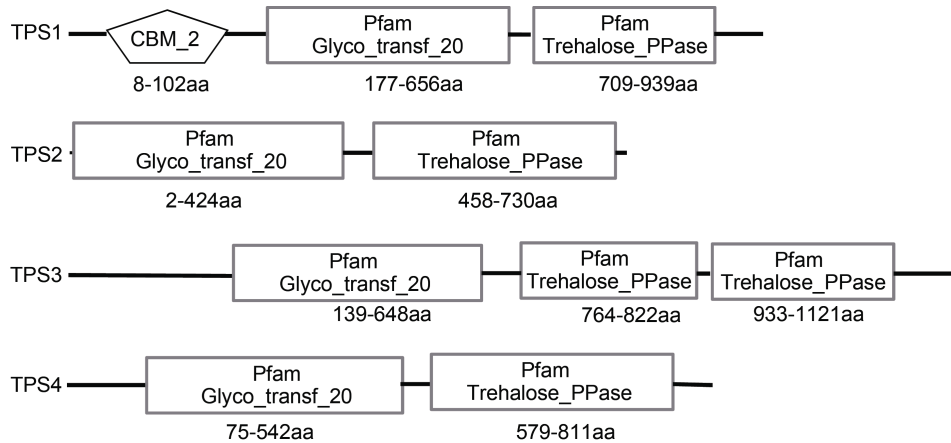


图1 龙须菜 TPS 蛋白的结构域组成

Fig.1 Domain compositions of TPS sequences in *G. lemaneiformis*

764—882 aa 和 933—1121 aa 各有 1 个 TPP 家族保守结构域。跨膜区和信号肽分析发现 TPS1—TPS4 蛋白均无跨膜区,也无信号肽序列。亚细胞定位分析结果表明 TPS1、TPS2 可能位于细胞质或液泡中,TPS3、TPS4 则可能位于叶绿体或液泡中。

2.2 龙须菜 TPS 蛋白序列系统进化分析

在 GenBank 数据库中选了 24 条藻类 TPS 蛋白序列,将这些 TPS 与 4 条龙须菜 TPS 序列一起构建系统进化树(图 2a)。在进化树中,28 条 TPS 分列在 4 个簇中,各个簇中分别包含 1 条龙须菜 TPS 序列。在每一个簇中,龙须菜 TPS 与绳状龙须菜(*G. chorda*)TPS 距离最近,相似性均在 99% 以上,与皱波角叉菜(*Chondrus crispus*)TPS 相似性为 51%—77%,3 者的 4 条 TPS 分别一一对应。其次较为相似的为坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)、温泉红藻(*Galdieria sulphuraria*)等红藻。

为了进一步分析龙须菜 TPS 所属亚家族,我们又将龙须菜中 4 条 TPS 与酿酒酵母(*S. cerevisiae*)TPS 序列一起构建了进化树(图 2b)。结果显示龙须菜的 4 条 TPS 与 *Sc*TPS1 聚在一个簇中,*Sc*TPS2、*Sc*TPS3 和 *Sc*TSL1 分布在外围,说明龙须菜中 4 条 TPS 蛋白均与 *Sc*TPS1 的关系较近。再结合 Leyman 等(2001)对拟南芥中 11 条 TPS 的分析结果,即 *At*TPS1—*At*TPS4 与 *Sc*TPS1 相似度最大,属于 Class I 亚家族,而 *At*TPS5—*At*TPS11 与 *Sc*TPS2 相似度最大,属于 Class II 亚家族,我们推测龙须菜中 4 条 TPS 序列属于 Class I 亚家族。

2.3 龙须菜 TPS 基因对 3 种胁迫条件的响应

龙须菜中 4 条 TPS 基因对不同胁迫条件的响应不同(图 3)。高盐胁迫显著促进了 TPS1、TPS2 和 TPS4

的转录表达,而渗透胁迫则多抑制 TPS1、TPS2 和 TPS3 的表达。各基因的表达如下:

TPS1 基因的表达模式: 在对照组中,TPS1 基因的转录水平基本稳定($P>0.05$)。在高温胁迫组中,TPS1 表达量呈先上升后下降的趋势,在 6 h 和 12 h 时 TPS1 基因表达量分别为 0 h 的 1.90 倍($P>0.05$)和 0.48 倍($P<0.05$),但与对照组中相应时间点之间差异不显著。在高盐胁迫组中,TPS1 表达量在 3 h 和 6 h 时分别是 0 h 的 2.39 倍和 2.74 倍($P<0.05$),且与对照组中差异显著。在渗透胁迫组中,TPS1 基因表达变化幅度较小,并且在 6 h 时低于对照组。

TPS2 基因的表达模式: 在对照组中,TPS2 基因的表达量随时间的增加而逐渐上升。在高温条件下,TPS2 基因表达量在 6 h 时最高,但与对照组无显著差异。高盐促进了 TPS2 基因的表达,在 3、6 和 12 h 时其表达量分别为 0 h 的 7.45、7.19 和 11.21 倍,但仅在 3 h 时高于对照组($P<0.05$)。与 TPS1 类似,渗透胁迫条件对 TPS2 基因表达量影响较小,仅在 12 h 时低于对照组($P<0.05$)。

TPS3 基因的表达模式: 对照组中 TPS3 基因表达变化稳定。高温处理后 TPS3 基因表达量在 6 h 时达到最高,但与对照组差异不显著。除渗透胁迫 12 h 时 TPS3 表达量稍有下降之外,在其余时间点高盐和渗透胁迫处理对 TPS3 基因表达量均无显著影响。

TPS4 基因的表达模式: 在高温及渗透胁迫条件下,与前面 3 条 TPS 基因表达变化不同,TPS4 基因在 3 h 后表达量均下调。且与对照组各时间点无显著差异。而高盐胁迫时,TPS4 基因在 3 h 和 6 h 时表达量高于对照组。

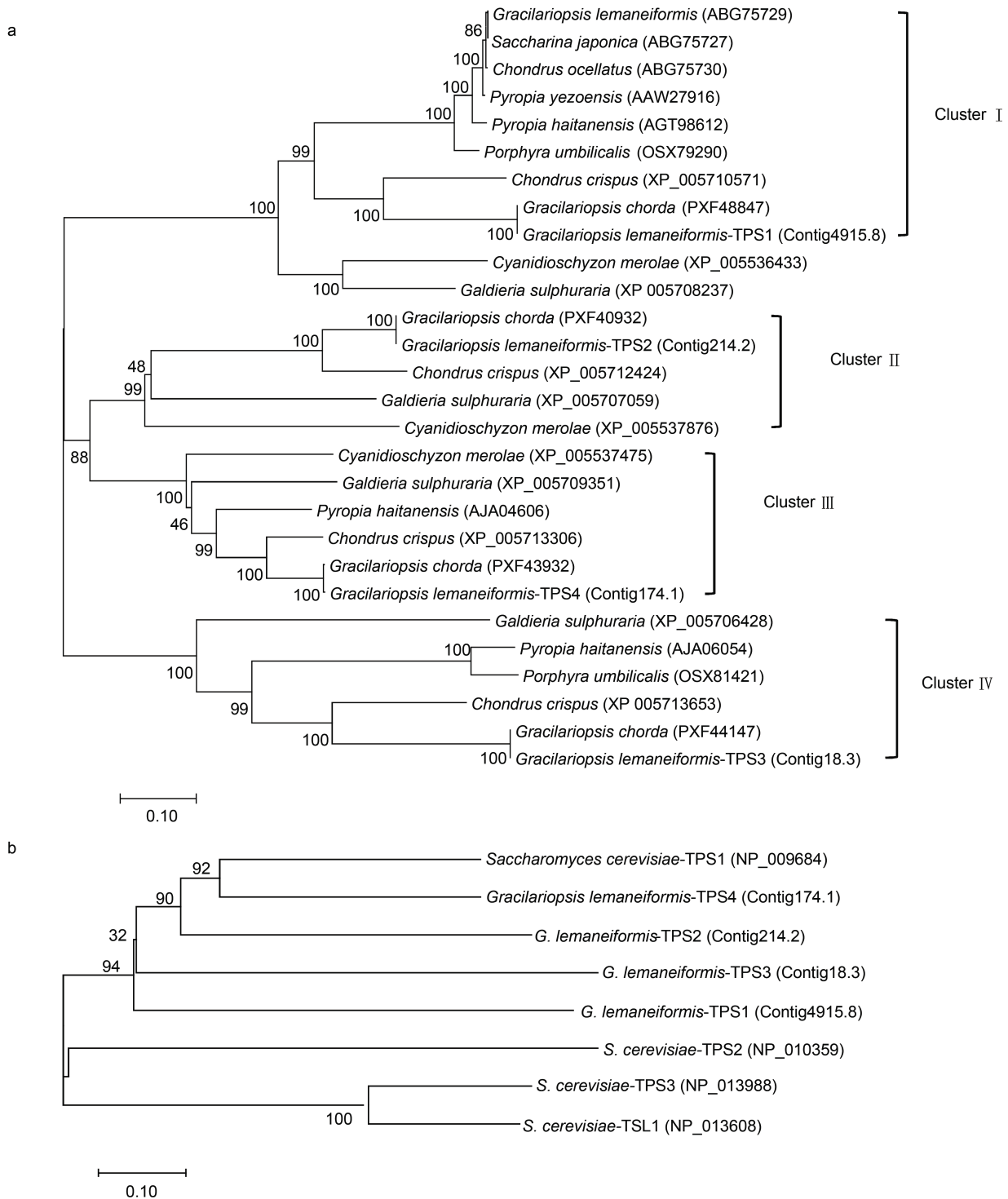


图 2 基于 TPS 蛋白序列构建的系统进化树

Fig.2 Phylogenetic tree based on the TPS protein sequences

注: a. 藻类 TPS; b. 龙须菜和酿酒酵母 TPS

2.4 龙须菜 TPS1 蛋白对 3 种胁迫条件的响应

龙须菜 TPS1 蛋白水平变化与 TPS1 转录变化类似(图 4)。在对照组、高温和渗透胁迫组中, TPS1 蛋白表达量在 48 h 内比较稳定, 与对照组之间也无显

著差异。而在高盐胁迫组中, TPS1 蛋白表达水平缓慢上升, 在 48 h 时其表达量达到对照组的 2.03 倍 ($P<0.05$)。可见高盐处理可促进龙须菜 TPS1 转录和蛋白水平的升高。

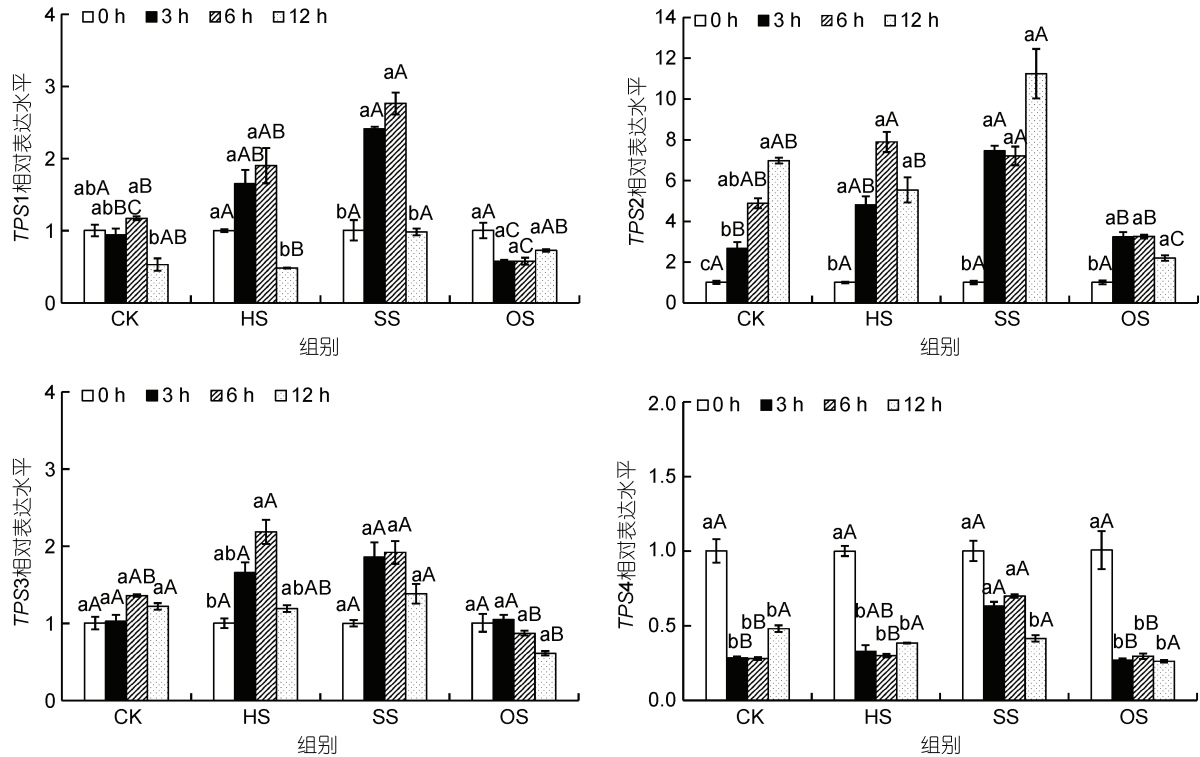


图3 不同胁迫条件对龙须菜 *TPS* 基因表达的影响

Fig.3 Effects of different stresses on the expression of *TPS* genes in *G. lemaneiformis*

注: CK. 对照组, HS. 高温组, SS. 高盐组, OS. 渗透胁迫组; 不同小写字母表示同组中不同时间点差异显著($P < 0.05$), 不同大写字母表示同一时间点不同组差异显著($P < 0.05$), 下同

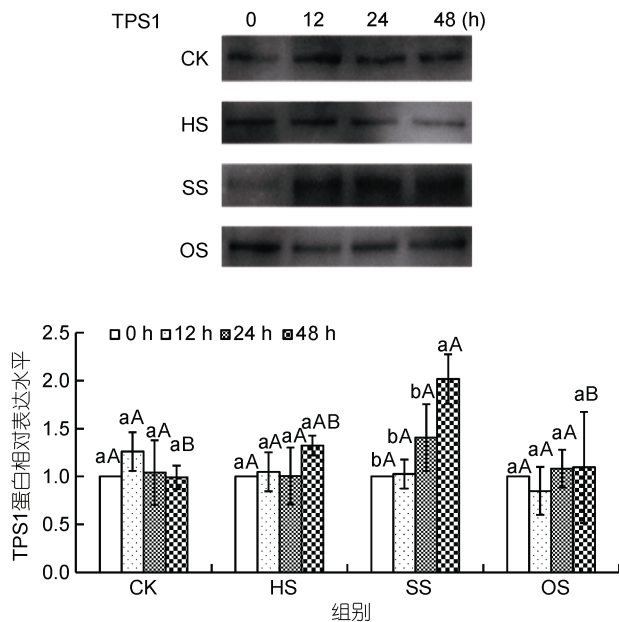


图4 不同胁迫条件对龙须菜 *TPS1* 蛋白表达的影响

Fig.4 Effects of different stresses on the expression of *TPS1* protein in *G. lemaneiformis*

2.5 龙须菜 *TPS* 酶对 3 种胁迫条件的响应

3 种胁迫处理显著影响了龙须菜 *TPS* 活性(图 5)。

在对照组中, 龙须菜 *TPS* 活性比较稳定。在高温组中, *TPS* 活性在 24 h 达到最高(1.28 倍, $P < 0.05$), 并且高于对照组。在高盐组中, 龙须菜 *TPS* 活性在 24 h 时升高为对照组(24 h)的 1.11 倍($P < 0.05$), 在 48 h 时其活性降低至对照组(48 h)的 66.34% ($P < 0.05$)。在渗透胁迫组中, *TPS* 活性逐渐下降, 且在 12—48 h 与对照组差异显著。可见, 高温胁迫可以短时促进 *TPS* 活性, 高盐胁迫则先促进、后抑制 *TPS* 活性, 而渗透胁迫则会显著抑制 *TPS* 活性。

3 讨论

海藻糖具有高度的化学稳定性, 是天然双糖中最稳定的, 素有“生命之糖”之称。海藻糖对生物膜、蛋白质和核酸等生物大分子具有非特异的保护作用 (Richards *et al*, 2002), 其代谢及信号途径在植物生长和抗逆等方面发挥了重要作用。

目前越来越多的全基因组测序工作已完成, 人们在已测序高等植物基因组中发现了庞大的 *TPS* 基因家族 (Yang *et al*, 2012)。根据与酵母 *ScTPS1* 或 *ScTPS2* 的相似性, *TPS* 基因可以被归为 Class I 和

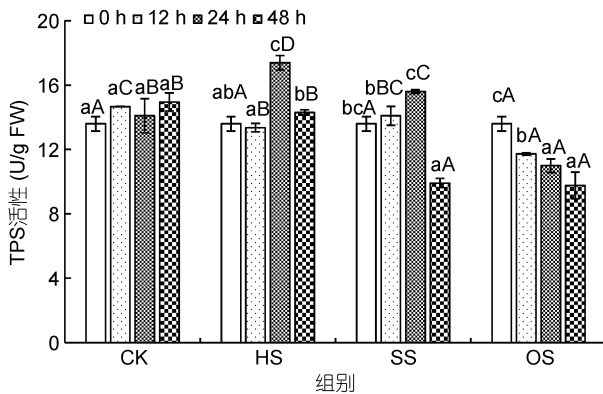


图5 不同胁迫条件对龙须菜 TPS 活性的影响

Fig.5 Effects of different stresses on the TPS activity in *G. lemaneiformis*

Class II 两个亚家族(Leyman *et al.*, 2001)。近年来,藻类 *TPS* 基因序列也相继被报道。Wang 等(2010)克隆了包括海带(*Saccharina japonica*)、条斑紫菜(*P. yezoensis*)、坛紫菜等在内的 10 种大型海藻的 *TPS* 基因序列,并且发现它们在核苷酸和氨基酸组成上具有高度保守性。大型红藻绳状龙须菜和皱波角叉菜基因组中各有 4 条 *TPS* 基因(Collén *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2018),本课题组在龙须菜基因组中也发现了 4 条 *TPS* 基因(Sun *et al.*, 2018),且 4 条 *TPS* 基因均属于 Class I 亚家族。*TPS* 氨基酸序列高度保守,如龙须菜与绳状龙须菜 *TPS* 相似性达 99% 以上,而基因序列决定功能,推测 *TPS* 基因在进化过程中功能也高度保守。

大量 *TPS* 基因家族在高等植物中担负着不同功能,随着组织和环境的不同而具有不同的表达模式。如毛白杨(*Populus tomentosa*)中只有 10 条 *TPS* 基因在所有组织及氯化钠、干旱等条件下能够表达;拟南芥中 *AtTPS2* 和 *AtTPS3* 不表达,*AtTPS4* 只在根和花中表达,其余 8 条基因在根、茎、叶等组织中均能表达(Yang *et al.*, 2012)。相比于高等植物,藻类中 *TPS* 基因家族成员较少,但这些基因在藻类的抗逆胁迫中也发挥了重要作用。如失水条件下海带 *TPS* 基因表达量在 3 h 最高,可达到 0 h 的 300 倍(Deng *et al.*, 2014);坛紫菜中 3 条 *TPS* 基因对 29 °C 高温胁迫无应答,而在高度失水胁迫中发挥了应激调节作用(史健志等, 2015)。本文中 *TPS1*—*TPS3* 3 条龙须菜 *TPS* 基因在渗透胁迫下多被抑制,与海带、坛紫菜不同,推测其原因可能与海带、坛紫菜本身具有较强的脱水性有关。而对于高温胁迫,*TPS1*—*TPS3* 表达量虽上升但与对照组差异不显著,即对高温无显著应答,该结果与史健志等(2015)的研究结果类似,可能是由于本文设置的

30 °C 高温较低的原因。而且,本文中 *TPS1* 蛋白与 *TPS1* 基因在应对高温和高盐胁迫时的响应趋势较为类似,即对高温无明显响应,而受高盐胁迫的诱导。

在生物体内海藻糖及其代谢物的含量变化与 *TPS* 等代谢酶的活性变化密切相关。如受热激处理时金针菇(*Flammulina velutipes*)中 *TPS* 和 *TPP* 活性升高,海藻糖酶活性下降,海藻糖快速积累(Liu *et al.*, 2016)。在干旱处理 14 d 的 *Capparis ovata* Desf 中 *TPS* 和 *TPP* 活性上升,同时海藻糖酶活性降低,海藻糖含量增加(Ilhan *et al.*, 2015)。与以上结果一致,本文中 *TPS* 活性在高温胁迫 24 h 时升高,而海藻糖酶活性降低,24 h 时海藻糖含量开始显著增加(Lv *et al.*, 2019)。但在高盐和渗透胁迫处理下,*TPS* 活性与海藻糖含量无正相关性,可能是因为海藻糖合成还受 *TPP* 的调控。

4 结论

海藻糖不仅是生物体内碳储存物质,还可作为保护剂来抵抗不利环境胁迫。相比于大多数高等植物和紫菜,龙须菜中海藻糖含量十分丰富,因此海藻糖在龙须菜中可能具有重要的作用。龙须菜中 4 条 *TPS* 基因序列高度保守,推测为 Class I 亚家族。在基因转录、蛋白和酶活性水平上,*TPS* 主要对高盐和高盐胁迫响应较大,而对渗透胁迫不敏感或受其抑制,该结果有助于更深入地了解海藻糖及其代谢酶在藻类抵御非生物胁迫中的作用,为提高藻类抗逆性提供了理论资料。

参 考 文 献

- 史健志,徐燕,纪德华等,2015. 坛紫菜 6-磷酸海藻糖合成酶(*TPS*)家族基因的克隆及表达特征分析. 水产学报, 39(4): 485—495
- 吕燕,汪芳俊,林丽春等,2019. 龙须菜中 *rbcl* 和 *hsp70* 对高温和植物激素的响应. 水产学报, 43(4): 886—894
- 孙鹏,杜宇,吕燕等,2019. 龙须菜卤代烷烃脱卤酶基因的转录及原核表达. 水产学报, 43(12): 2468—2475
- 张学成,费修缙,王广策等,2009. 江蓠属海藻龙须菜的基础研究与大规模栽培. 中国海洋大学学报, 39(5): 947—954
- 林丽春,吕燕,孙鹏等,2019. 龙须菜(*Gracilariopsis lemaneiformis*)中两种分支酸代谢酶对温度和水杨酸的响应及其原核表达研究. 海洋与湖沼, 50(1): 220—227
- 饶莉萍,苏文瑾,刘意等,2020. 甘薯苯丙氨酸解氨酶基因 *IbPAL* 的克隆与表达分析. 植物科学学报, 38(3): 360—368
- Bell W, Sun W N, Hohmann S *et al.*, 1998. Composition and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* trehalose synthase complex. The Journal of Biological Chemistry, 273(50): 33311—33319

- Chang L P, Sui Z H, Fu F *et al*, 2014. Relationship between gene expression of UDP-glucose pyrophosphorylase and agar yield in *Gracilariopsis lemaneiformis* (Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 26(6): 2435—2441
- Chen B B, Zou D H, Jiang H, 2015. Elevated CO₂ exacerbates competition for growth and photosynthesis between *Gracilaria lemaneiformis* and *Ulva lactuca*. *Aquaculture*, 443: 49—55
- Collén J, Porcel B, Carré W *et al*, 2013. Genome structure and metabolic features in the red seaweed *Chondrus crispus* shed light on evolution of the Archaeplastida. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(13): 5247—5252
- Deng Y Y, Wang X L, Guo H *et al*, 2014. A trehalose-6-phosphate synthase gene from *Saccharina japonica* (Laminariales, Phaeophyceae). *Molecular Biology Reports*, 41(1): 529—536
- Godijn O J M, van Dun K, 1999. Trehalose metabolism in plants. *Trends in Plant Science*, 4(8): 315—319
- Hottiger T, Schmutz P, Wiemken A, 1987. Heat-induced accumulation and futile cycling of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology*, 169(12): 5518—5522
- Ilhan S, Ozdemir F, Bor M, 2015. Contribution of trehalose biosynthetic pathway to drought stress tolerance of *Capparis ovata* Desf. *Plant Biology*, 17(2): 402—407
- Jiang H, Liu N N, Liu G L *et al*, 2016. Melanin production by a yeast strain XJ5-1 of *Aureobasidium melanogenum* isolated from the Taklimakan desert and its role in the yeast survival in stress environments. *Extremophiles*, 20(4): 567—577
- Krasensky J, Broyart C, Rabanal F A *et al*, 2014. The redox-sensitive chloroplast trehalose-6-phosphate phosphatase AtTPPD regulates salt stress tolerance. *Antioxidants & Redox Signaling*, 21(9): 1289—1304
- Lee J M, Yang E C, Graf L *et al*, 2018. Analysis of the draft genome of the red seaweed *Gracilariopsis chorda* provides insights into genome size evolution in Rhodophyta. *Molecular Biology and Evolution*, 35(8): 1869—1886
- Leyman B, Van Dijk P, Thevelein J M, 2001. An unexpected plethora of trehalose biosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana*. *Trends in Plant Science*, 6(11): 510—513
- Li H W, Zang B S, Deng X W *et al*, 2011. Overexpression of the trehalose-6-phosphate synthase gene *OsTPS1* enhances abiotic stress tolerance in rice. *Planta*, 234(5): 1007—1018
- Liu J H, Shang X D, Liu J Y *et al*, 2016. Changes in trehalose content, enzyme activity and gene expression related to trehalose metabolism in *Flammulina velutipes* under heat shock. *Microbiology*, 162(8): 1274—1285
- Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} method. *Methods*, 25(4): 402—408
- Lv Y, Sun P, Zhang Y Y *et al*, 2019. Response of trehalose, its degrading enzyme, sucrose, and floridoside/isofloridoside under abiotic stresses in *Gracilariopsis lemaneiformis* (Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 31(6): 3861—3869
- O'Hara L E, Paul M J, Wingler A, 2013. How do sugars regulate plant growth and development? New insight into the role of trehalose-6-phosphate. *Molecular Plant*, 6(2): 261—274
- Paul M J, Primavesi L F, Jhurreea D *et al*, 2008. Trehalose metabolism and signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 417—441
- Pramanik M H R, Imai R, 2005. Functional identification of a trehalose 6-phosphate phosphatase gene that is involved in transient induction of trehalose biosynthesis during chilling stress in rice. *Plant Molecular Biology*, 58(6): 751—762
- Richards A B, Krakowka S, Dexter L B *et al*, 2002. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. *Food and Chemical Toxicology*, 40(7): 871—898
- Schluepmann H, Van Dijken A, Aghdasi M *et al*, 2004. Trehalose mediated growth inhibition of *Arabidopsis* seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. *Plant Physiology*, 135(2): 879—890
- Singh N K, Gupta D K, Jayaswal P K *et al*, 2012. The first draft of the pigeonpea genome sequence. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 21(1): 98—112
- Sun X, Wu J, Wang G C *et al*, 2018. Genomic analyses of unique carbohydrate and phytohormone metabolism in the macroalga *Gracilariopsis lemaneiformis* (Rhodophyta). *BMC Plant Biology*, 18(1): 94
- Tang B, Wei P, Zhao L N *et al*, 2016. Knockdown of five trehalase genes using RNA interference regulates the gene expression of the chitin biosynthesis pathway in *Tribolium castaneum*. *BMC Biotechnology*, 16(1): 67
- Wahl V, Ponnu J, Schlereth A *et al*, 2013. Regulation of flowering by trehalose-6-phosphate signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 339(6120): 704—707
- Wang G L, Zhao G, Feng Y B *et al*, 2010. Cloning and comparative studies of seaweed trehalose-6-phosphate synthase genes. *Marine Drugs*, 8(7): 2065—2079
- Xie D W, Wang X N, Fu L S *et al*, 2015. Identification of the trehalose-6-phosphate synthase gene family in winter wheat and expression analysis under conditions of freezing stress. *Journal of Genetics*, 94(1): 55—65
- Yang H L, Liu Y J, Wang C L *et al*, 2012. Molecular evolution of trehalose-6-phosphate synthase (TPS) gene family in *Populus*, *Arabidopsis* and rice. *PLoS One*, 7(8): e42438
- Zang B S, Li H W, Li W J *et al*, 2011. Analysis of trehalose-6-phosphate synthase (TPS) gene family suggests the formation of TPS complexes in rice. *Plant Molecular Biology*, 76(6): 507—522

RESPONSE OF TREHALOSE-6-PHOSPHATE SYNTHASE (TPS) TO ABIOTIC STRESS IN *GRACILARIOPSIS LEMANEIFORMIS*

ZHANG Ying-Ying, LYU Yan, XUAN Wen-Yan, ZHANG Xiao-Qian, XU Nian-Jun, SUN Xue

(School of Marine Sciences, Ningbo University, Key Laboratory of Marine Biotechnology of Zhejiang Province, Ningbo 315211, China)

Abstract The non-reducing disaccharide trehalose and its metabolites are signaling molecules that regulate the growth, development, and stress response. In this paper, the responses of trehalose synthase (TPS) to high-temperature, high-salinity, and osmotic stresses were investigated at three levels of gene transcription, protein, and enzyme activity of seaweed *Gracilariopsis lemaneiformis*. Four TPS sequences of *G. lemaneiformis* contained both TPS-family conserved domains (Glyco-Transf-20) and TPP-family conserved domains (Trehalose-PPase), and belong to the Class I subfamily of TPS. At the transcriptional level, high-salinity stress mainly promoted the expression of *TPS1*, *TPS2*, and *TPS4*, while *TPS1*, *TPS2*, and *TPS3* were almost suppressed under osmotic stress. At the protein level, *TPS1* was promoted a 2.03-fold increment at 48 h under high-salinity compared with the control. *TPS* activity was increased at 24 h under high-temperature and high-salinity stresses, and was inhibited at 48 h under high-salinity stress and at 24—48 h under osmotic stress. In summary, the above results indicate that *TPS* was involved in the response of *G. lemaneiformis* to high-temperature and high-salinity stresses, but was not sensitive to osmotic stress. This study will provide a reference for improving the anti-adversity or breeding the stress-resistant varieties of *G. lemaneiformis*.

Key words *Gracilariopsis lemaneiformis*; trehalose; trehalose-6-phosphate synthase; abiotic stress