

坛紫菜 *PhGME* 基因克隆及差异表达分析

魏鹏华^{1,2,3}, 王文磊^{1,2,3}, 许 凯^{1,2,3}, 徐 燕^{1,2,3},

纪德华^{1,2,3}, 谢潮添^{1,2,3}, 陈昌生^{1,2,3}

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 福建省水产生物育种与健康养殖工程研究中心, 福建 厦门 361021; 3. 农村农业部东海健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021)

[摘要] GDP-甘露糖-3,5-表异构酶(GME)是抗坏血酸合成过程中的关键限速酶。以坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)转录组测序获得的 unigene 序列为基础,采用普通 PCR 技术克隆获得了坛紫菜编码 GME 的基因序列 *PhGME*。序列分析结果表明,*PhGME* 基因序列全长 1411 bp, 包含一个 1260 bp 的开放阅读框,所编码的多肽包含 419 个氨基酸,相对分子质量为 46.46 ku,理论等电点为 6.76,具有 GME 特有的底物结合位点。多序列比对和系统进化树分析结果显示,*PhGME* 与角叉菜同源且关系较近。差异表达分析结果表明,随着高盐胁迫时间的增加,TK 品系处理组坛紫菜 *PhGME* 基因的表达水平均显著高于对照组,同时 TK 品系的 AsA 含量在胁迫处理 6 h 后明显增加。由此推测该基因的上调表达可能有助于抗坏血酸的合成,进而调控藻体抵抗盐胁迫。以上结果说明,*PhGME* 在坛紫菜应对盐胁迫过程中发挥着重要作用,为坛紫菜抗逆功能的研究提供了理论参考。

[关键词] 坛紫菜; GDP-甘露糖-3,5-表异构酶; 基因克隆; 抗坏血酸; 盐胁迫

[中图分类号] S 968.43+1

Cloning and Differential Expression Analysis of GDP-Mannose-3, 5-Epimerase(*PhGME*) Gene from *Pyropia haitanensis*

WEI Penghua^{1,2,3}, WANG Wenlei^{1,2,3}, XU Kai^{1,2,3}, XU Yan^{1,2,3}, JI Dehua^{1,2,3},

XIE Chaotian^{1,2,3}, CHEN Changsheng^{1,2,3}

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Fujian Engineering Research Center of Aquatic Breeding and Healthy Aquaculture, Xiamen 361021, China;

3. Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Xiamen 361021, China)

Abstract: GDP-mannose-3, 5-epimerase(GME) is a key rate limiting enzyme in ascorbic acid synthesis. In this study, based on the unigene sequences obtained via whole transcriptome sequencing of *Pyropia haitanensis*, the full-length of *GME* gene was obtained by PCR, and named *PhGME*. The full-length cDNA of *PhGME* gene comprised of 1411 bp nucleotides and contained an open reading frame of 1260 bp, encoding a protein of 419 amino acid residued with the predicted molecular weight of 46.46 ku and theoretical isoelectric point of 6.76. The sequence of *PhGME* contained specific active sites of GME. Multiple sequence alignment

[收稿日期] 2021-06-24

[基金项目] 国家重点研发项目(2018YFD0901500); 国家自然科学基金项目(41806185); 福建省重大科技专项(2019N20803); 现代农业产业技术体系专项(CARS-50)

[作者简介] 魏鹏华(1998—),女,硕士生,从事水产生物遗传与育种方向研究。通信作者:陈昌生(1957—),男,教授,从事藻类遗传与育种方向研究。E-mail:cschen@jmu.edu.cn

and phylogenetic analysis indicated that the *PhGME* had a close homology relationship with *Chondrus crispus*. The expressions of the *PhGME* gene, as measured by real-time quantitative PCR, under different treatment time points of the same strain, with the increase of hypersaline stress time, the expression level of *PhGME* gene of *P. haitanensis* in the TK strain treatment group was significantly higher than that in the control group, and the AsA content of the TK strain was significantly increased after 6 h of stress treatment. It was speculated that the up-regulated expression of this gene may contribute to the synthesis of ascorbic acid, thereby regulating the algae to resist salt stress. These results suggested that the *PhGME* plays an important role in the response of *P. haitanensis* to hypersaline stress, which provided a theoretical reference for the study of stress resistance of *P. haitanensis*.

Keywords: *Pyropia haitanensis*; GDP-mannose-3, 5-epimerase(*GME*); gene clone; real-time quantitative PCR; hypersaline stress

0 引言

坛紫菜 (*Pyropia haitanensis*) 是我国特有的暖温带栽培品种, 隶属红藻门 (Rhodophyta) 原红藻纲 (Protofloridae) 红毛菜目 (Bangiales) 红毛菜科 (Bangiaceae), 2019 年养殖面积为 1.48×10^4 hm², 养殖产量为 8.08 万吨^[1], 约占紫菜总产量的 75% 以上, 经济效益和生态效益可观。坛紫菜叶状体主要生活在潮间带的中高潮区域, 在潮涨潮落变化之间, 坛紫菜会遭遇温度、光照和盐度等环境因子的变化, 这些频繁变化的环境因子对坛紫菜的生理特征产生较大影响。因此, 坛紫菜已成为大型海藻逆境胁迫研究的代表性物种, 而坛紫菜相关功能基因的克隆和表达分析将使人们更深入地了解坛紫菜对高温^[2]、失水^[3-4]、高光^[5]和盐胁迫^[6]等逆境胁迫的应答机制, 并可为坛紫菜抗逆新品种的选育提供理论依据。

活性氧 (ROS) 是植物代谢的重要产物, 主要在线粒体和叶绿体等部位形成^[7]。常见的几种 ROS 主要有过氧化氢 (H₂O₂)、羟基自由基 (·OH) 和超氧自由基 (O₂⁻·)^[8-9]。正常状态下, 植物体内的 ROS 存在动态平衡。植物遭到胁迫时, 动态平衡被打破, 过量 ROS 对植物造成不同程度的损伤, 甚至引起植物死亡^[10]。为消除氧化剂的影响并保持氧化还原平衡, 植物在长期进化中衍生出了一套活性氧调节系统, 称为抗氧化系统。常见的抗氧化系统分为酶促抗氧化系统和非酶促抗氧化系统^[11]。其中, 非酶促抗氧化系统主要包括抗坏血酸 (AsA)、谷胱甘肽 (GSH)、甘露醇、山梨醇、生育酚及类黄酮等物质^[12]。GSH 是一种重要的抗氧化剂, 能将脱氢抗坏血酸还原成 AsA, 维持其抗氧化活性^[13]。AsA 具有多种抗氧化功能, 是 O₂⁻· 和 ·OH 的有效清除剂, 同时也是 H₂O₂ 的歧化剂^[14]。Kumar 等^[15]研究发现, 江蓠脱水 2~3 h 后, 细胞内 AsA 和 GSH 的含量显著增加。谢佳等^[16]研究发现, 当坛紫菜藻体失水率超过 60% 时, O₂⁻· 含量极显著上升, 抗坏血酸含量也随之增加并作为 O₂⁻· 的主要清除剂清除 O₂⁻·, 避免其对坛紫菜细胞造成严重伤害。以上研究表明, AsA 是坛紫菜等大型海藻在应答非生物胁迫中避免细胞受损的主要抗氧化物质之一, 但其合成机理尚不明确。

植物体内 AsA 主要有 4 种生物合成途径, 其中 *L*-半乳糖途径占主导地位^[17]。*L*-半乳糖是 GDP-*D*-甘露糖经由 GDP-*L*-半乳糖、*L*-半乳糖和 *L*-半乳糖-1,4-内酯作为中介合成的^[18]。GDP-甘露糖-3,5-表异构酶 (*GME*) 是 AsA 生物合成中的关键酶之一。Wolucka 等^[18]研究发现, 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 悬浮细胞内 *GME* 的活性与细胞中的 AsA 含量呈正相关。Ma 等^[19]在研究胁迫对拟南芥影响时发现, 过表达 *GME* 基因后, 转基因植株的 AsA 含量增加了 1.5 倍以上, 而且植株的抗氧化能力也得到了提升。同样, *GME* 的过表达也使水稻中的 AsA 含量增加, 并增强了转基因水稻 (*Oryza sativa*) 对盐胁迫的耐受性^[20]。在番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 中过表达 *SIGME1* 和 *SIGME2* 基因后, 转基因植株体内 AsA 含量也显著提高, 进而增加了对盐胁迫和冷胁迫的抵抗力^[21]。以上结果说明 *GME* 在植物 AsA 合成以及抗氧化过程中发挥着重要作用。那么, 作为 AsA 生物合成中的限速酶, *GME* 基因

是否参与坛紫菜 AsA 的合成进而调控坛紫菜应答逆境胁迫, 目前尚不清楚。

因此, 本研究对坛紫菜中 *GME* 基因进行了全长克隆和生物信息学分析, 并采用实时荧光定量 PCR 技术 (qPCR) 对 *PhGME* 基因在不同程度高盐胁迫条件下的表达特征进行了分析。研究结果可为坛紫菜逆境胁迫响应机制的研究提供功能基因。

1 材料与方法

1.1 实验材料及胁迫处理

实验材料: 本实验所用的坛紫菜 W-28、Z-26-R 品系叶状体取自福建省坛紫菜种质资源库^[22]。选取长度为 15 ~ 20 cm、叶面平滑、无卷曲且生长状况良好的叶状藻体进行后续实验。其中 W-28 (TK) 为厚叶品系、Z-26-R (TN) 为薄叶品系。

培养条件: 温度 21 ℃, 光照强度 50 μmol/ (m² · s), 光周期 12 L: 12 D, 每两天更换一次新鲜的 PES (provasoli's enrichment solution) 培养液。

高盐处理: 选取 15 ~ 20 cm 左右健康完整的藻体, 置于 500 mL 锥形瓶, 培养液盐度 110, 光照强度 50 μmol/ (m² · s), 光周期 12 L: 12 D。胁迫处理 0, 0.5, 6 h 后, 分别提取其总 RNA, 用于高盐胁迫条件下基因表达水平的 qPCR 分析^[23]。

1.2 叶绿素荧光参数 F_v/F_m 测定

本实验采用德国 Walz 公司生产的叶绿素荧光仪 DIVING-PAM 对藻体的最大光合效率 (F_v/F_m) 进行测定, 测定前对藻体进行暗处理 15 min。

1.3 引物及其序列

本研究中 *GME* 基因的克隆、验证、阳性菌落筛选及基因表达水平定量分析所采用的引物序列如表 1 所示, 引物由厦门佰进生物科技有限公司合成。

表 1 实验中所用引物
Tab.1 Primers used in the present study

基因 Gene ID	引物序列 Primer sequences		用途 Purpose
<i>PhGME</i>	F: CACCCGCGCCCTCAACGAA	R: GGAAAGTACATCAGTCGCCCTC	普通 PCR Ordinary PCR
<i>PhGME</i>	F: CTGGTGTCCGACAAGGAGTT	R: TTCATCAGCCGGATCACACC	定量分析 qRT-PCR
<i>UBC</i>	F: TCACAACGAGGATTTACCACC	R: GAGGAGCACCTTGAAACG	内参 Internal control

1.4 *PhGME* 基因的全长克隆及验证

根据坛紫菜转录组数据库中 unigene 基因的注释结果, 选取注释结果为 GDP-甘露糖-3,5-表异构酶基因的 unigene17305 作为 *PhGME* 基因全长克隆的核心序列。根据选取的核心序列设计普通 PCR 引物进行序列扩增验证 (见表 1)。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后, 用通用型 DNA 纯化回收试剂盒 (艾科瑞, 湖南) 对目的片段进行回收, 扩增结束后于 1% (质量分数) 琼脂糖凝胶电泳检测, 再与 pMD19-T 载体 (TaKaRa, 日本) 连接后导入感受态细胞 *E. coli* DH5α 中, 筛选出阳性克隆后进行放大培养, 挑取阳性克隆单菌落, 接种到含 Amp 的 10 mL LB 液体培养液中, 37 ℃ 震荡培养过夜, 摇好的菌液送至厦门铂瑞生物技术有限公司测序。根据测序结果, 获得 *PhGME* 基因全长序列。

1.5 *PhGME* 基因的生物信息学分析

利用 NCBI 的 BlastN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 程序对所获得的 *PhGME* 全长基因序列进行检测。采用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 软件分析 *PhGME* 基因的开放阅读框及其所编码氨基酸的序列。使用在线软件 ExPASy Prot Param (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析 *PhGME* 基因所编码蛋白质的一级结构。使用在线软件 Predict Protein (<https://www.predictprotein.org/>) 分析 *PhGME* 基因所编码蛋白质的二级结构。使用 EXPASY (<http://expasy.org/tools>) 对 *PhGME* 氨基酸序列的三级结构进行预测。使用在线网站 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 分析 *Ph-*

GME 基因是否存在信号肽。通过在线软件 TMHMM Serverv. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 分析 *PhGME* 基因所编码蛋白质是否存在跨膜结构域。使用在线网(<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/>)预测 *PhGME* 潜在的糖基化位点。采用 DNAMAN 进行氨基酸多重序列比对, 并通过 MEGA 6.0 软件采用 Neighbor-Joining (NJ) 法构建 *PhGME* 蛋白质系统进化树。

1.6 *PhGME* 基因在逆境胁迫下表达水平的 qPCR 分析

提取坛紫菜样品总 RNA, 参照 Prime Script™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒 (Takara) 说明书完成定量模板的合成。

根据已获得的 *PhGME* 基因序列设计 qPCR 正反向引物 (见表 1)。以坛紫菜 *UBC* 基因作为内参 (见表 1), 进行 *PhGME* 基因在不同时间高盐胁迫条件下的表达水平的 qRT-PCR 分析。

qRT-PCR 扩增反应体系 (20 μ L): 10 μ L 2 \times SYBR Green Master Mix (艾科瑞), 6.8 μ L 无核酸水, 2 μ L 10 \times 稀释的模板, 正反向引物 (20 mmol/L) 各 0.4 μ L, 以及 0.4 μ L ROX Dye。扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 31 s; 40 个循环。荧光定量 PCR 扩增在 ABI 7300 型定量 PCR 仪 (Applied Biosystems, 美国) 上进行, 每个处理梯度设置 3 个生物学重复和 2 个技术重复。坛紫菜 *PhGME* mRNA 表达水平计算使用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法^[24], 计量数据资料均采用平均值 \pm 标准误 (mean \pm SE) 表示, 并使用 SPSS 17.0 软件进行显著性分析 ($P < 0.05$ 为显著水平)。

2 结果

2.1 坛紫菜 *PhGME* 基因的全长克隆、验证及序列分析

以坛紫菜 Unigene 0017305 序列为核心序列, 通过普通 PCR 扩增和测序获得一条 1411 bp 的基因序列 (见图 1)。经全长序列验证和 BLAST 比对, 确认该基因为坛紫菜 GDP-甘露糖-3,5-表异构酶基因, 命名为 *PhGME*。

通过 ORF Finder 在线软件分析发现, *PhGME* 基因开放阅读框为第 31 个碱基到第 1290 个碱基, 可编码 419 个氨基酸。通过 NCBI 保守结构域分析网站对该蛋白质进行预测, 结果表明: *PhGME* 含有 NADB 保守结构域 (见图 2)。

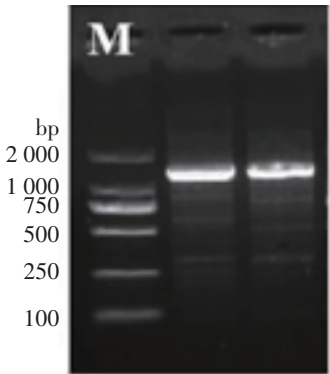


图 1 *PhGME* 基因克隆产物凝胶电泳图
Fig.1 Agarose electrophoresis of PCR products of *PhGME* gene

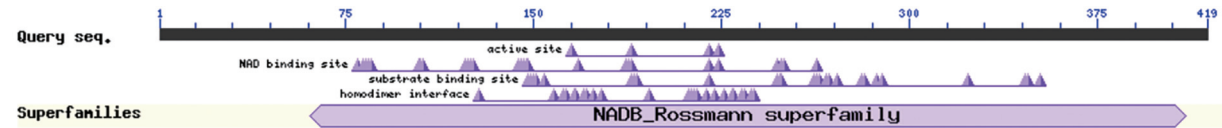


图 2 *PhGME* 基因的结构域预测
Fig.2 The conversed domain predicts of transcription factor *PhGME*

2.2 不同物种 GME 多序列比对

使用 EXPASY(<http://expasy.org/tools>) 对 *PhGME* 氨基酸序列的三级结构进行预测, 结果如图 3 所示。蛋白质三级结构的预测结果表明, *PhGME* 存在结合 GDP- β -L-半乳糖的活性位点, 富含甘氨酸 (GXXGXXG) 结合位点。

根据坛紫菜 GME 氨基酸序列, 在 NCBI 中进行 BLAST 同源检索与比对, 获得相似度较高的其他植物的 GME 氨基酸序列。将坛紫菜 GME 与角叉菜 (*Chondrus crispus*) 的同源蛋白质序列进行多重比对 (见图 4), 结果显示, 它们的氨基酸序列一致性为 99%。

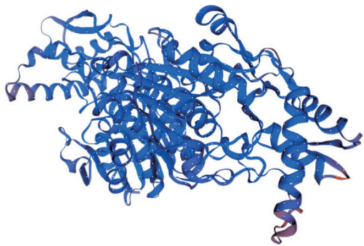


图 3 坛紫菜 *PhGME* 蛋白质三级结构
Fig.3 Three dimension structure of *PhGME* protein in *P. haitanensis*



<http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb>

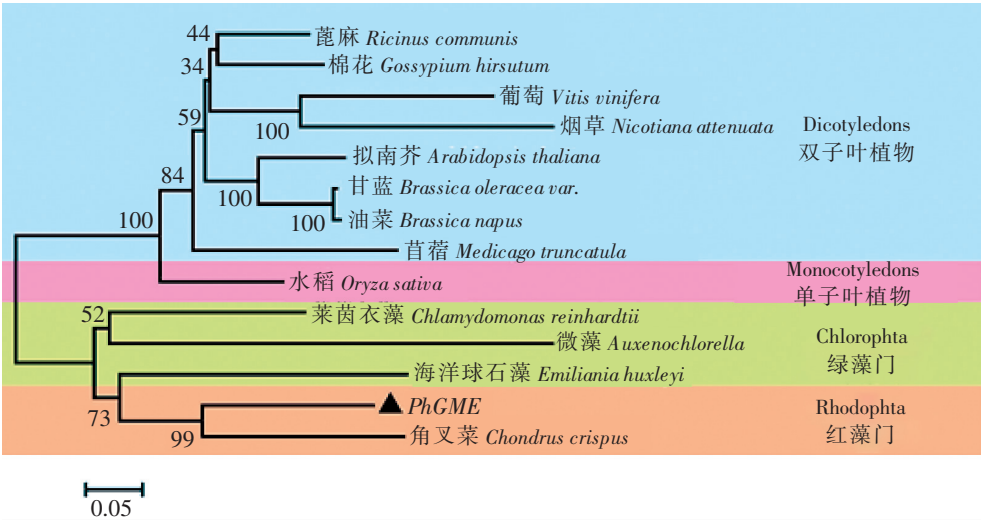


图 5 采用 NJ 法构建的 *PhGME* 基因编码氨基酸序列的系统进化树

Fig.5 Phylogenetic tree based on *PhGME* amino acid sequences by NJ method

利用在线分析工具 SignalP 和 TMHMM 对 *PhGME* 基因信号肽和跨膜结构进行预测，结果表明，*PhGME* 蛋白质有一个信号肽，序列为 AGACTTAAGAACATGATTACGC-CAAG，且该基因无跨膜结构域。利用 PSORT 网站在线 Prediction 工具对该蛋白质进行亚细胞定位预测，结果显示，*PhGME* 定位于细胞质的可能性最大（见表 2）。

2.5 *PhGME* 启动子序列顺式作用元件分析

对 *PhGME* 基因编码区起始密码子上游 2 kb 左右区域内的启动子序列进行分析，结果显示：该序列中含有 1 个与分生组织表达有关的顺式作用元件（CAT-box），1 个参与细胞周期调控的顺式作用元件，2 个与植物激素响应相关的作用元件（包括 1 个脱落酸响应元件（ABRE），1 个与生长素响应元件（TGA-element））；此外，还含有 2 个参与茉莉酸甲酯（MeJA）反应的顺式调控元件和 5 个与光响应相关的顺式作用元件。

表 2 *PhGME* 蛋白质亚细胞定位预测
Tab.2 Subcellar location prediction of *PhGME*

基因在细胞中表达位置 Gene expression position in cells	概率 Rate/%
细胞质 Cytoplasm	0.45
微体(过氧化物酶体) Microbody(peroxisome)	0.30
线粒体基质空间 Mitochondrial matrix space	0.10

表 3 *PhGME* 启动子序列中的主要顺式作用元件
Tab.3 The major cis-acting elements of *PhGME* promoter

顺式作用元件 Cis-acting element	位置 Position	序列 Sequence	功能 Function
A-box	109 - 、917 + 、834 - 、816 - 、843 -	CCGTCC	顺式作用调节元件 Cis-acting regulatory element
ABRE	412 - 、922 + 、923 + 、1621 +	ACGTG、CACGTG、GC-CGCGTGCC	参与脱落酸反应的顺式作用元件 Cis-acting element involved in the abscisic acid responsiveness
C-box	634 -	ACGAGCACCGCC	参与光响应的顺式调控元件 Cis-acting regulatory element involved in light responsiveness
CAAT-box	1070 + 、1324 - 、286 + 、1757 + 、991 - 、1727 + 、1072 - 、1759 -	CAAT、CCAAT	启动子和增强子区的共同顺式作用元件 Common cis-acting element in promoter and enhancer regions
CAT-box	1645 -	GCCACT	与分生组织表达相关的顺式作用调控元件 Cis-acting regulatory element related to meristem expression

续表

顺式作用元件 Cis-acting element	位置 Position	序列 Sequence	功能 Function
CCAAT-box	985 - 、1487 +	CAACGG	MYBHv1 结合位点 MYBHv1 binding site
CCGTCC motif	109 - 、917 + 、816 - 、834 - 、843 -	CCGTCC	
CCGTCC-box	109 - 、834 - 、917 + 、816 - 、843 -	CCGTCC	
CGTCA-motif	938 - 、1171 + 、1150 + 、1366 + 、1022 - 、1165 +	CGTCA	参与 MeJA 反应的顺式调控元件 Cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
DRE core	428 + 、1667 + 、178 + 、415 - 、1957 + 、1537 -	GCCGAC	
G-Box	922 +	CACGTG	参与光响应的顺式调控元件 Cis-acting regulatory element involved in light responsiveness
G-box	1718 + 、65 + 、412 + 、1570 - 、70 + 、1711 + 、922 + 、1766 -	CACGAC 、CACGTC	参与光响应的顺式调控元件 Cis-acting regulatory element involved in light responsiveness
GC-motif	40 + 、884 - 、319 - 、1212 + 、222 - 、899 - 、546 -	CCCCCG	与缺氧特异性诱导相关的增强子样元件 Enhancer-like element involved in anoxic specific inducibility
MSA-like	1485 +	(T/C) C (T/C) AACGG (T/C) (T/C) A	参与细胞周期调控的顺式作用元件 Cis-acting element involved in cell cycle regulation
MYB	1560 +	CAACAG	
MYB recognition site	985 + 、1487 -	CCGTTG	
MYC	1070 - 、1757 - 、1499 -	CATGTG 、CAATTG	
Myb-binding site	1560 +	CAACAG	
Pc-CMA2c	1770 -	GCCCACGCA	光响应元件的一部分 Part of a light responsive element
STRE	7 - 、1461 - 、1437 - 、1986 - 、812 + 、1469 + 、1448 - 、587 - 、1702 - 、1137 + 、1838 -	AGGGG	
	471 - 、604 + 、1 + 、1545 - 、255 - 、1297 - 、511 + 、1615 - 、288 + 、740 + 、500 - 、1434 - 、438 - 、584 -	GGGCGG	光响应元件 Light responsive element
TGA-element	574 - 、644 -	AACGAC	生长素反应元件 Auxin-responsive element
TGACC-motif	938 + 、1171 - 、1150 - 、1366 - 、1022 + 、1165 -	TGACC	参与 MeJA 反应的顺式调控元件 Cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
Unnamed__1	420 - 、1572 + 、794 + 、1883 - 、433 - 、1772 + 、921 -	CGTGG	
Unnamed__2	41 + 、896 + 、883 - 、898 -	CCCCGG	
Unnamed__4	160 - 、1446 + 、980 - 、1836 + 、967 + 、1612 + 、1061 - 、622 + 、1965 + 、1575 - 、1135 - 、810 - 、1880 + 、975 + 、1705 + 、301 - 、1158 -	CTCC	
	1785 -	CCACCT	
as - 1	938 + 、1171 - 、1150 - 、1366 - 、1022 + 、1165 -	TGACC	

2.6 高盐胁迫下坛紫菜藻体叶绿素荧光参数 F_v/F_m 变化

本实验测定不同高盐处理时间下的坛紫菜 F_v/F_m ，观察厚叶品系（TK）、薄叶品系（TN）在高盐胁迫下的耐受情况。由图 6 可知：高盐胁迫下，坛紫菜叶状体的光合参数显著下降，TK 品系的 F_v/F_m 在每个时间点虽有下降但均显著高于 TN 品系 ($P < 0.05$)；当高盐（110）胁迫处理 0.5 h 时，TK 品系下降至 0.6 左右，TN 品系下降至 0.2 左右；当高盐胁迫处理 8 h 时，TK 品系下降至 0.4 以下，TN 品系下降至 0.2 以下，趋近于 0 ($P < 0.05$)，此时藻体光合系统遭受严重损伤，且 TN 品系遭受的损伤更为严重，说明 TK 品系较之 TN 品系更耐受高盐胁迫。因此，本研究挑选 0.5 h 和 6 h 作为盐胁迫条件进行后续实验。

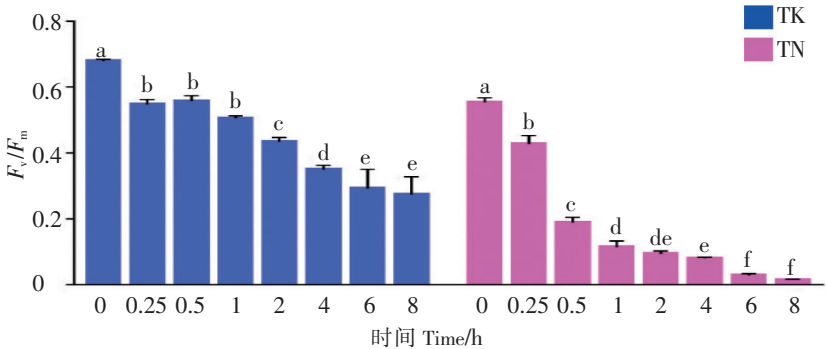


图 6 高盐胁迫下坛紫菜 F_v/F_m 随时间之变化
Fig.6 Chlorophyll fluorescence parameters of *P. haitanensis* under hypersaline stress

2.7 高盐胁迫下坛紫菜不同品系的 *PhGME* 基因差异表达分析

基因表达水平的定量分析是研究基因功能的前提。本研究采用 qRT-PCR 技术分析了 *PhGME* 基因在高盐胁迫条件下的相对表达水平的变化。*PhGME* 基因的表达水平在 TK 品系和 TN 品系中有不同的转录丰度。图 7 显示出高盐胁迫处理不同时间的坛紫菜 *PhGME* 基因的表达分析结果：高盐（110）处理 0.5 h、6 h，TK 品系 *PhGME* mRNA 的相对表达水平平均高于 TN 品系 ($P < 0.05$)；处理 6 h，相较于对照组，TN 品系的基因表达量略有上升；随着盐胁迫时间延长，TK 品系的基因表达量呈逐渐上升趋势 ($P < 0.05$)；处理 6 h，TK 品系 *PhGME* 基因的表达水平是正常盐度条件下生长的 1.48 倍。

2.8 高盐胁迫下不同坛紫菜品系的抗坏血酸含量变化

由图 8 可以看出，坛紫菜叶状体在遭受高盐胁迫时，AsA 含量均有增加。高盐处理 0.5 h、6 h 后，TK 品系的 AsA 含量相较于未胁迫组分别增加了 10 倍和 43 倍；而 TN 品系实验组的 AsA 含量分别是对照组的 4 倍和 5 倍。

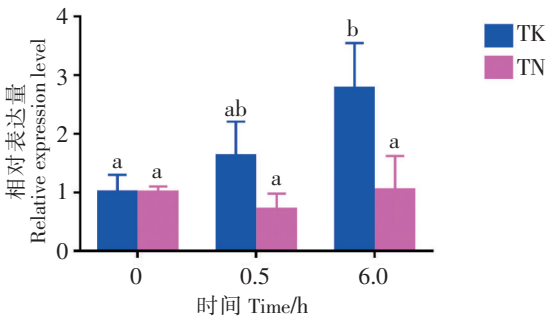


图 7 高盐胁迫下坛紫菜 *PhGME* 基因的相对表达变化
Fig.7 Relative expression of *PhGME* gene in *P. haitanensis* under hypersaline stress

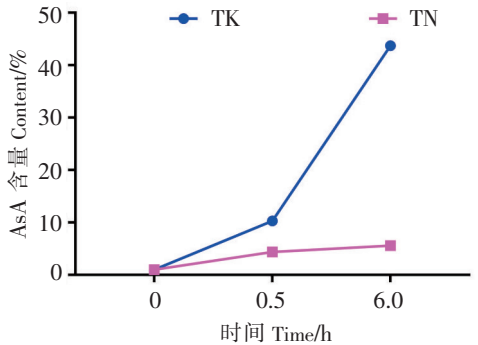


图 8 高盐胁迫下坛紫菜抗坏血酸含量变化
Fig.8 Changes of ascorbic acid content in *P. haitanensis* under hypersaline stress

3 讨论

本研究克隆获得了坛紫菜 *PhGME* 基因, 该基因编码的蛋白质包含 1 个 NAD 结合域 (NAD-binding) (见图 2), 属于 NADB Rossmann 超级家族^[25]。*PhGME* 还具有 GXXGXXG 保守结构, 这与文献^[26]的研究结果一致。研究^[26]表明, 红藻 GME 基因除了具备特有的底物结合位点外, 还应具有属于短链脱氢酶家族 (SDRs) 的 GXXGXXG 保守结构。

研究^[27-28]表明, 在番茄中过表达 *SIGME1* 和 *SIGME2* 基因, 不仅可以提高番茄叶片和果实中 AsA 的含量, 还可以增加其对低温、高盐及氧化胁迫的耐受性。同样 *GME* 的过表达也使水稻中的 AsA 含量增加, 并增强了转基因水稻对盐胁迫的耐受性^[20]。大型海藻中也有相关报导, 例如, 随着盐胁迫处理时间的延长或盐度的增加, 条斑紫菜 (*Pyropia yezoensis*) 藻体内 AsA 的合成基因显著上调, AsA 含量相较于对照组也显著增加了 1.5 倍以上^[29-30]。本研究也得到相同的研究结果, 不同厚度品系藻体中的 AsA 含量均有增加 (见图 8)。其中, TK 品系在高盐胁迫 6 h 后, AsA 含量增长趋势相较于未胁迫组明显上升, 且 TK 品系的 AsA 含量是对照组的 43 倍。高盐胁迫处理 6 h 后, 两个坛紫菜品系中 *PhGME* 基因的表达水平都显著上调, 而且耐盐品系 TK 中 *PhGME* 基因的表达水平更高, 是正常盐度条件下的 1.48 倍 (见图 7)。因此, 高盐胁迫诱导坛紫菜 *PhGME* 基因转录水平上升, 可能促进了藻体内 AsA 合成, 清除过多的 ROS, 维持藻体的氧化还原平衡。

综上所述, *GME* 基因作为植物中一类响应逆境胁迫的基因, 在坛紫菜响应高盐胁迫时发挥了重要的作用。高盐胁迫下 *GME* 参与坛紫菜藻体中 AsA 的合成, 清除过多的 ROS, 维持坛紫菜细胞内的氧化还原平衡。因此, 本研究为理解坛紫菜的耐高盐机制, 培育耐高盐品系, 提供了新的视野和理论基础。

[参考文献]

- [1] 农村农业部渔业局. 中国渔业统计年鉴 2020 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2020: 17-23.
- [2] 陈玉婷, 徐燕, 纪德华, 等. 坛紫菜两种小分子热激蛋白质 (*sHSP*) 基因的克隆及表达特征分析 [J]. 水产学报, 2015, 39(2): 182-192.
- [3] 仵燕青, 肖海东, 许凯, 等. 坛紫菜过氧化氢酶基因的克隆及表达特征 [J]. 水产学报, 2016, 40(10): 1576-1585.
- [4] 曲玲, 徐燕, 纪德华, 等. 坛紫菜细胞质型果糖 1, 6-二磷酸酶基因的克隆及表达分析 [J]. 应用海洋学学报, 2015, 34(3): 402-410.
- [5] 陈陆丹, 许凯, 徐燕, 等. 坛紫菜应答高光强胁迫的生理指标分析 [J]. 应用海洋学学报, 2016, 35(3): 399-404.
- [6] XU Y, CHEN C S, JI D H, et al. Proteomic profile analysis of *Pyropia haitanensis* in response to high-temperature stress [J]. Journal of Applied Phycology, 2014, 26(1): 607-618.
- [7] CHOUDHURY F K, RIVERO R M, BLUMWALD E, et al. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination [J]. The Plant Journal, 2017, 90(5): 856-867.
- [8] MITTLER R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance [J]. Trends in Plant Science, 2002, 7(9): 405-410.
- [9] TAKAHASHI M, ASADA K. Superoxide production in aprotic interior of chloroplast thylakoids [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1988, 267(2): 714-722.
- [10] 张怡, 路铁钢. 植物中的活性氧研究概述 [J]. 生物技术进展, 2011, 1(4): 242-248.
- [11] ZHANG X L, JIA X F, YU B, et al. Exogenous hydrogen peroxide influences antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in cucumber leaves at low light [J]. Scientia Horticulturae (Amsterdam), 2011, 129(4): 656-662.
- [12] 鲁振强. 植物活性氧解毒机理及其应用 [M]. 哈尔滨: 黑龙江大学出版社, 2007.
- [13] CUYPERS A, VANGRONSVELD J, CLIJSTERS H. The redox status of plant cells (AsA and GSH) is sensitive to zinc imposed oxidative stress in roots and primary leaves of *Phaseolus vulgaris* [J]. Plant Physiol Biochem, 2001, 39(7/8):

657-664.

- [14] REISKIND J B, BEER S, BOWES G. Photosynthesis, photorespiration and ecophysiological interactions in marine macroalgae [J]. Aquatic Botany, 1989, 34(1/2/3): 131-152.
- [15] 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 & Experimental Botany, 2011, 72(2): 194-201.
- [16] 谢佳, 徐燕, 纪德华, 等. 坛紫菜叶状体对失水胁迫的抗氧化生理响应 [J]. 中国水产科学, 2014, 21(2): 405-412.
- [17] LI H, HUANG W, WANG G L, et al. Transcriptomic analysis of the biosynthesis, recycling, and distribution of ascorbic acid during leaf development in tea plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 1-11.
- [18] WHEELER G L, JONES M A, SMIRNOFF N, et al. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants [J]. Nature, 1998, 393(6683): 365-369.
- [19] MA L, WANG Y, LIU W, et al. Overexpression of an alfalfa GDP-mannose 3,5-epimerase gene enhances acid, drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* by increasing ascorbate accumulation [J]. Biotechnology Letters, 2014, 36(11): 2331-2341.
- [20] ZHANG G Y, LIU R R, ZHANG C Q, et al. Manipulation of the rice *L*-galactose pathway: evaluation of the effects of transgene overexpression on ascorbate accumulation and abiotic stress tolerance [J]. Plos One, 2015, 10(5): e0125870.
- [21] ZHANG Y Y, LI H X, SHU W B, et al. RNA interference of a mitochondrial APX gene improves vitamin C accumulation in tomato fruit [J]. Scientia Horticulturae, 2011, 129(2): 220-226.
- [22] 陈昌生, 纪德华, 谢潮添, 等. 坛紫菜耐高温品系选育及经济性状的初步研究 [J]. 海洋学报 (中文版), 2008(5): 100-106.
- [23] 张哈哈, 徐燕, 纪德华, 等. 坛紫菜谷胱甘肽过氧化物酶基因的克隆及表达特征 [J]. 中国水产科学, 2016, 23(4): 791-799.
- [24] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR [J]. Methods, 2002, 25(4): 402-408.
- [25] 王美珍, 王学敏, 王赞, 等. 柠条 GDP-甘露糖-3', 5'-异构酶基因的克隆、序列分析及其植物表达载体的构建 [J]. 中国草地学报, 2009, 31(5): 75-83.
- [26] 杨雅焯, 李辉, 林士佳, 等. 茶树 *CsGME1* 基因的克隆与逆境胁迫响应分析 [J]. 西北植物学报, 2020, 40(2): 232-239.
- [27] ZHANG Y Y, LI H X, SHU W B, et al. RNA interference of a mitochondrial APX gene improves vitamin C accumulation in tomato fruit [J]. Scientia Horticulturae, 2011, 129(2): 220-226.
- [28] ZHANG C, LIU J, ZHANG Y, et al. Overexpression of *SIGMEs* leads to ascorbate accumulation with enhanced oxidative stress, cold, and salt tolerance in tomato [J]. Plant Cell Reports, 2011, 76(3): 389-398.
- [29] 余斌. 条斑紫菜 *Pyropia yezoensis* 响应高盐胁迫机制的初步研究 [D]. 青岛: 中国科学院大学 (中国科学院海洋研究所), 2018.
- [30] YU B, YANG J L, NIU J F, et al. Antioxidant responses to hyperosmolarity stress in the intertidal *Pyropia yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) [J]. Algal Research, 2020, 48: 101930.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 黄力行)