

低盐胁迫下坛紫菜叶状体的转录组分析

冯 畅¹, 丁洪昌¹, 严兴洪^{1,2*}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

摘要: 为探索坛紫菜叶状体响应低盐胁迫的分子生理学机制, 本研究采用第二代高通量测序技术, 分析比较在正常盐度(26, 对照组)和低盐度(3, 胁迫组)下培养不同时间(3、6和9 h)的坛紫菜叶状体转录组数据。结果显示, 测序数据经 *de novo* 组装, 获得了 33 872 条 unigenes, 平均长度为 612 bp; 与对照组相比, 3 个胁迫组分别产生了 1108、1638 和 1881 条差异性表达基因。GO 功能富集分析显示, 一些可能与低盐胁迫相关的重要生物过程得到了显著富集, 如单分子有机物代谢过程, 单糖的合成代谢和分解过程, 糖质新生, 有机物分解代谢过程等。KEGG 代谢通路富集分析发现, 低盐胁迫不同时间富集到的代谢通路存在很大差异, 低盐胁迫 3 h 响应的差异性表达基因富集到 3 个 KEGG 代谢通路, 其中 2 个与氨基酸合成相关, 1 个与光合作用相关; 而低盐胁迫 6 和 9 h 的差异性表达基因则大多富集到与糖类功能相关的代谢通路。荧光定量 PCR (qRT-PCR) 验证结果显示, 所选取的 8 个差异性表达基因的表达趋势与高通量测序结果相一致。上述结果说明, 坛紫菜叶状体在受到低盐胁迫时, 应激反应具有时间特异性, 早期主要通过合成或者降解蛋白质来抵御低盐环境, 随着胁迫时间延长, 细胞通过改变可溶性物质的含量、减慢能量代谢等途径以抵御低盐逆境。

关键词: 坛紫菜; 低盐胁迫; 转录组; 荧光定量 PCR (qRT-PCR); 差异性表达基因

中图分类号: Q 786; S 968.43

文献标志码: A

紫菜是一种重要的经济红藻, 被广泛栽培于中、日、韩三国^[1]。在我国, 坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)和条斑紫菜(*P. yezoensis*)被大面积栽培, 前者属暖温性海藻, 被栽培于闽、浙、粤三省沿海, 其年产量约占我国紫菜年总产量的 75%^[2-3]。

潮间带是海、陆交界的一个特殊区域, 每日有涨潮和干出的变化, 对生长在潮间带的海藻来说, 干出会使藻体表面的水分蒸发, 引起盐度的大幅度升高, 而干出时遇到大雨, 又会使得藻体表面的盐度急剧下降。海藻的生长需要一个适宜的盐度, 盐度过高或过低均会造成盐度胁迫。已有研究表明, 鼠尾藻(*Sargassum thunbergii*)在受到低盐胁迫时, 其表现光合速率

下降, 随着胁迫时间的延长, 下降幅度会逐渐增大^[4]。盐生隐杆藻(*Aphanothece halophytica*)在受到低盐胁迫时, 其细胞内的超氧化物歧化酶活性提高, 表明其通过调节抗氧化系统来保护自身免受低盐胁迫带来的负面压力^[5]。人工栽培在潮间带的坛紫菜, 也经常遇到降雨, 面临低盐胁迫。杨惠^[6]对条斑紫菜采用 8 种短时间胁迫刺激进行转录组分析, 发现了一系列与干旱、高光、类黄酮生物合成、活性氧清除酶等相关的基因; Kim 等^[7]对在高温胁迫下的列紫菜(*P. seriata*)转录组进行分析, 筛选出特异表达基因 *HTR2*, 并初步阐明了列紫菜应对高温胁迫的分子机制; 王莉^[8]通过对坛紫菜失水胁迫和复水后的转录组分

收稿日期: 2016-04-22 修回日期: 2016-07-10

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划(2012AA10A411); 国家自然科学基金(31072208); 国家农业科技成果转化资金(2013GB2C220537); 福建省省长专项基金(2014S1477-10)

通信作者: 严兴洪, E-mail: xhyan@shou.edu.cn

析, 发现细胞凋亡、分子伴侣和抗氧化系统在坛紫菜失水和复水条件下起着重要作用; Xie等^[9]利用第二代测序技术对坛紫菜的整个转录组进行了剖析, 重点关注了其中的碳固定途径。但关于坛紫菜耐低盐的分子生理机制尚未见报道。

本研究通过分析比较在正常盐度(26, 对照组)和低盐度(3, 胁迫组)下培养不同时间(3、6和9 h)的坛紫菜叶状体转录组数据, 旨在探讨坛紫菜响应低盐胁迫的分子生理学机制, 为坛紫菜耐低盐品种的选育奠定理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

本实验所用坛紫菜为野生型品系(*WT*, *PT-001*)^[10], 其室内壳孢子采苗和叶状体培养方法同文献[10]。

采用Trizol(Invitrogen)试剂提取样品RNA。qRT-PCR相关试剂Prime Scrip™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)、SYBR® Premix Ex Taq™(TliRNase H Plus)购自TaKaRa公司。

1.2 低盐胁迫实验

取在正常盐度(26)下培养40 d的未成熟坛紫菜叶状体作为低盐胁迫的实验材料, 胁迫盐度选用3, 因为该盐度接近坛紫菜生存的极限盐度, 在此盐度下可以短时间成活^[11]。为获得较全面的转录组数据, 胁迫时间分别设置3 h(*LS 3 h*)、6 h(*LS 6 h*)和9 h(*LS 9 h*)3组, 分别进行高通量测序。将在正常盐度下培养的叶状体作为对照组(*LS 0 h*)。各胁迫组与对照组的比较, 分别被标记为*LS 3 h vs LS 0 h*、*LS 6 h vs LS 0 h*和*LS 9 h vs LS 0 h*。

1.3 RNA提取、文库构建

低盐胁迫组和对照组的叶状体RNA提取参考杨惠^[6]的方法。转录组的测序工作在北京诺禾致源生物信息科技有限公司完成。

1.4 转录组数据组装及基因功能注释

将测序获得的原始数据(raw reads)去除带有接头的、低质量的序列, 得到高质量干净序列(clean reads)进行后续分析。采用Grabherr等^[12]的拼接方法对clean reads进行拼接获得转录本, 选取每条基因中最长的转录本作为unigene。通过与NCBI蛋白及核酸数据库比对注释, 对相关基

因功能进行注释与分析。

1.5 目标基因qRT-PCR转录组数据验证

选取8个差异性表达基因进行qRT-PCR分析, 对高通量测序数据进行验证。分别提取对照组(*LS 0 h*)与低盐胁迫组(*LS 3 h*、*LS 6 h*、*LS 9 h*)的坛紫菜叶状体RNA, 经反转录后用相关引物(表1)进行qRT-PCR实验, 18S *rRNA*基因作为内参^[13]。使用PrimeScrip™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa, RR047A)反转录试剂盒合成cDNA模板。20 μL的qRT-PCR反应体系包含10 μL 2×SYBR Premix Ex Taq (TliRNase H Plus), 0.2 μmol/L的引物和2 μL的模板cDNA。PCR反应采用两步法:95°C预变性30 s; 95°C 5 s、60°C 30 s, 40个循环。所有样品重复3次, 差异表达水平计算方法为 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ^[14]。

表 1 低盐胁迫条件下培养的坛紫菜叶状体8个差异性表达基因qRT-PCR引物

Tab. 1 Primers of eight differentially expressed genes used for quantitative real-time PCR in *P. haitanensis* blades cultured at low salinity

基因 gene ID	引物序列(5'→3') primer sequences
C13696_g2	CTACGAGTCCATGGCCAAGTTCCTC AGTTGTTGACGATGATGGCCTTGGT
C22571_g1	GTCATCAGCGCAAGG GCGGGTGAAGTTCAGTCC
C22461_g1	CTCGTTCATCCTCCAGCAGTTT AAACACATCACAGTCAATGGCG
C16653_g1	CAGTACGCCATTGCCTTCC CATCGCCACATACATCTCA
C7158_g2	ATGAGTCCATCCAAGACGC CTCCTTGCTCGTCTTGCCAT
C19547_g1	TGGCATCAACTTCTAGCCC AAGTTCGAGCCCAGGAAGTC
C4736_g1	GGGCTTCTTCATCATCTCT GGGTCAACAACCGCAC
C10461_g1	CAAGGGTGAAGATGGTGGCT TGGCGTCCGTGAAGATGTAG
18S <i>rRNA</i>	GTCCAGAGCGCTTTGAGATG AACCCATAATCCCGTCACC

2 结果

2.1 转录组序列

Illumina Hiseq™2000测序共获得了163 591 952条raw reads, 去除低质量和接头序列后得到clean reads 147 317 814条, 碱基总量大于16 G。经*de novo*拼接组装后, 得到transcripts 36 348条, 长度范围为201~15 015 bp。最终获得33 872条unigenes, 其长度范围为201~15 015 bp(表2)。基因相似性

表2 低盐胁迫条件下培养的坛紫菜叶状体的转录组测序数据拼接结果与统计

序列种类 sequence types	最小长度/bp minimum length	最大长度/bp maximum length	平均长度/bp mean length	200~500 bp	500~1000 bp	1000~2000 bp	总数 total numbers
转录子 transcripts	201	15 015	638	23 724	7202	3530	36 348
unigenes	201	15 015	612	22 626	6566	3103	33 872

比对主要基于BLAST算法，NR、GO和KEGG 3个数据库分别获得21.87%、32.79%和11.47%的注释率。

2.2 差异性表达基因分析

分别从LS 3 h vs LS 0 h、LS 6 h vs LS 0 h和LS 9 h vs LS 0 h 3个比较组中获得1108、1638和1881个差异性表达基因[筛选条件： $qvalue < 0.005$ & $|\log_2(\text{foldchange})| > 1$]。其中，3个比较组的共有差异性表达基因为853个。在LS 3 h vs LS 0 h、LS 6 h vs LS 0 h和LS 9 h vs LS 0 h组中，特异性的差异基因数分别为135、87和416个(图1)。初步统计在注释信息较明确的共有差异性表达基因中，有较多的HSP蛋白基因、蛋白激酶基因和泛素蛋白基因。

2.3 GO功能显著性富集分析

各比较组中富集比较突出的GO条目(corrected P value < 0.05)(表3)，发现LS 3 h vs LS 0 h组显著富集的GO条目为代谢过程(metabolic process)；LS 6 h vs LS 0 h组发生显著富集的GO条目为辅因子结合(cofactor binding)的分子功能、单分子有机物代谢过程(single-organism metabolic process)、催化活性(catalytic activity)等；LS 9 h vs LS 0 h组显著富集的则是分解过程(catabolic process)、有机物质分解代谢过程(organic substance catabolic

process)、辅因子结合(cofactor binding)等条目。差异性表达基因大多富集于GO条目中的生物过程(biology process)，而细胞组分(cellular component)

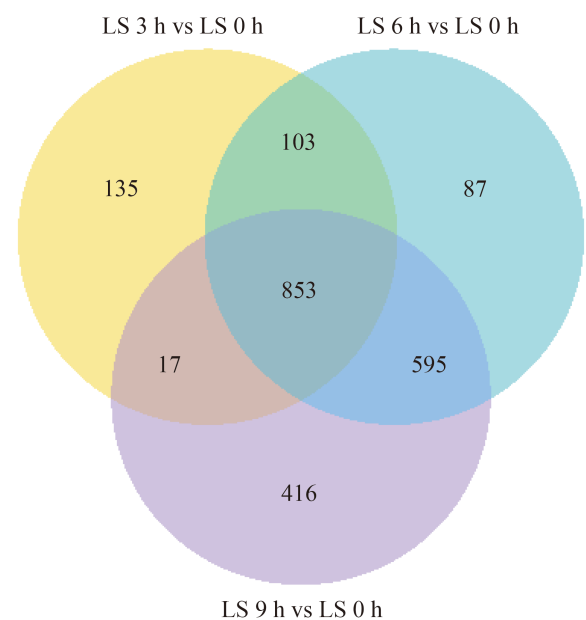


图1 低盐胁迫条件下培养的坛紫菜叶状体3个比较组的差异性表达基因韦恩图

Fig. 1 Venn chart for differentially expressed genes of three comparison groups in *P. haitanensis* blade cultured at low salinity

表3 低盐胁迫条件下培养的坛紫菜叶状体的差异性表达基因GO分析

比较组 comparison groups	GO层级 GO accession	功能描述 description	校正P值 corrected P-value	差异基因数 DEG items
LS 3 h vs LS 0 h	GO:0008152	代谢过程	0.020	296
	GO:0048037	辅因子结合	0.003	81
LS 6 h vs LS 0 h	GO:0044710	单分子有机物代谢过程	0.012	348
	GO:0003824	催化活性	0.035	634
	GO:0009056	分解过程	0.001	112
LS 9 h vs LS 0 h	GO:1901575	有机物质分解过程	0.008	101
	GO:0048037	辅因子结合	0.010	85

与分子功能(molecular function)则富集较少, 尤其是细胞组分, 3个组中只有LS 6 h vs LS 0 h组发生少量富集。

2.4 KEGG代谢通路分析

3个比较组的差异基因在KEGG代谢通路中出现不同程度的显著富集。LS 3 h vs LS 0 h组富集到3条代谢通路, 分别为氨基酸生物合成、氨酰-tRNA生物合成、卟啉与叶绿素II代谢; LS 6 h vs LS 0 h和LS 9 h vs LS 0 h组的差异基因则分别富集到9条和8条代谢通路, 多数与糖类功能(如戊糖磷酸途径、果糖与甘露糖途径、糖酵解/糖异生等)相关, 少数与蛋白酶体、氨基酸合成相关(表4)。

2.5 转录组数据验证

选取5个上调表达的差异基因(c7158_g2、c16653_g1、c19547_g1、c22461_g1、c22571_g1), 3个下调表达的差异基因(c4736_g1、c10461_g1、c13696_g2)通过qRT-PCR方法进行验证。结果发现, 8个差异性表达基因在3、6和9 h 3个低盐胁迫时间点的表达趋势与高通量测序结果基本一致(图2), 即表明测序结果真实可靠。

表 4 低盐胁迫条件下培养的坛紫菜叶状体的差异性表达基因KEGG功能富集分析

Tab. 4 KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes in *P. haitanensis* blade cultured at low salinity

比较组 comparison groups	条目 terms	校正P值 corrected P-value	unigenes数目/条 unigenes numbers
LS 3 h vs LS 0 h	氨基酸生物合成	0.014	36
	氨酰-tRNA生物合成	0.014	19
	卟啉与叶绿素II代谢	0.044	15
LS 6 h vs LS 0 h	蛋白酶体	0.000	21
	氨基酸生物合成	0.000	51
	氨酰-tRNA生物合成	0.000	27
	碳代谢	0.001	51
	戊糖磷酸途径	0.002	19
	光合生物的碳固定途径	0.012	21
	果糖与甘露糖代谢	0.012	15
	糖酵解/糖异生	0.023	24
LS 9 h vs LS 0 h	氨基糖与核苷酸糖代谢	0.025	12
	碳代谢	0.000	59
	蛋白酶体	0.001	20
	氨基酸合成	0.003	50
	光合生物的碳固定途径	0.003	25
	戊糖磷酸途径	0.004	20
	果糖与甘露糖代谢	0.016	16
	氨酰-tRNA生物合成	0.016	23
	糖酵解/糖异生	0.025	26

3 讨论

目前, 关于紫菜的逆境生理研究, 多集中在高盐、失水等胁迫方面^[15-16]。研究发现, 在遭遇高盐渗透胁迫时, 紫菜能够形成特殊的细胞壁减少细胞水分流失和维持细胞矿物质^[17]; 紫红紫菜(*P. purpurea*)的细胞内红藻糖苷(fluidoside)的含量明显增多, 推测红藻糖苷可能作为渗透保护物质发挥作用^[15]。坛紫菜在遭受外界渗透压胁迫时, 与碳固定相关的酶基因表达发生变化, 同时细胞内积累大量的碳水化合物, 而且不同程度的渗透压胁迫引起坛紫菜不同的生理反应^[16]。为了解坛紫菜适应低盐胁迫的分子机制, 本研究共获得33 872条unigenes, 发现多条与低盐胁迫相关的代谢通路及其功能基因, 较之前小规模cDNA测序和基因芯片分析所获得的少量转录组数据相比^[9-18], 丰富了坛紫菜的转录组数据库。

早期研究发现, 集胞藻在盐胁迫环境中, 存在短期和长期响应的机制^[19], 本研究对坛紫菜进行低盐胁迫时, 同样发现随着胁迫时间不同, 坛紫菜的响应机制随之发生改变, 另外还发现其在不同时间有共同表达的差异基因。LS 3 h vs LS 0 h、LS 6 h vs LS 0 h和LS 9 h vs LS 0 h 3个比较组获得的差异性表达基因数分别为1108、1638和1881, 三组共有的差异性表达基因数为853个, 而特异性的差异性表达基因数分别为135、87和416个, 这表明随着低盐胁迫坛紫菜叶状体的时间不同, 功能特异性差异基因的表达也随之发生变化。对各组获得的差异性表达基因进行GO功能富集分析, 发现3组富集的GO条目数分别为10、43和31, 这些GO条目多与tRNA降解与合成、氨基酸活化和蛋白折叠等功能相关, 初步表明, 坛紫菜叶状体在受到低盐胁迫时, 可能通过改变蛋白质结构以及含量, 并合成或者降解一些蛋白酶类来抵抗低盐逆境。GO功能分析和KEGG代谢通路分析结果显示, 3个比较组的共有差异性表达基因均未出现显著富集, 但对其初步统计分析发现存在许多与蛋白激酶、热激蛋白(HSP)和泛素蛋白相关的基因, 且在3组中均发生较高表达。

逆境胁迫能够影响植物体内所有物质的代谢活动, 尤其是与氨基酸和糖类相关的代谢^[20]。本研究中, 蛋白酶体、氨基酸生物合成、氨酰-tRNA生物合成、碳代谢和单糖代谢等代谢路径

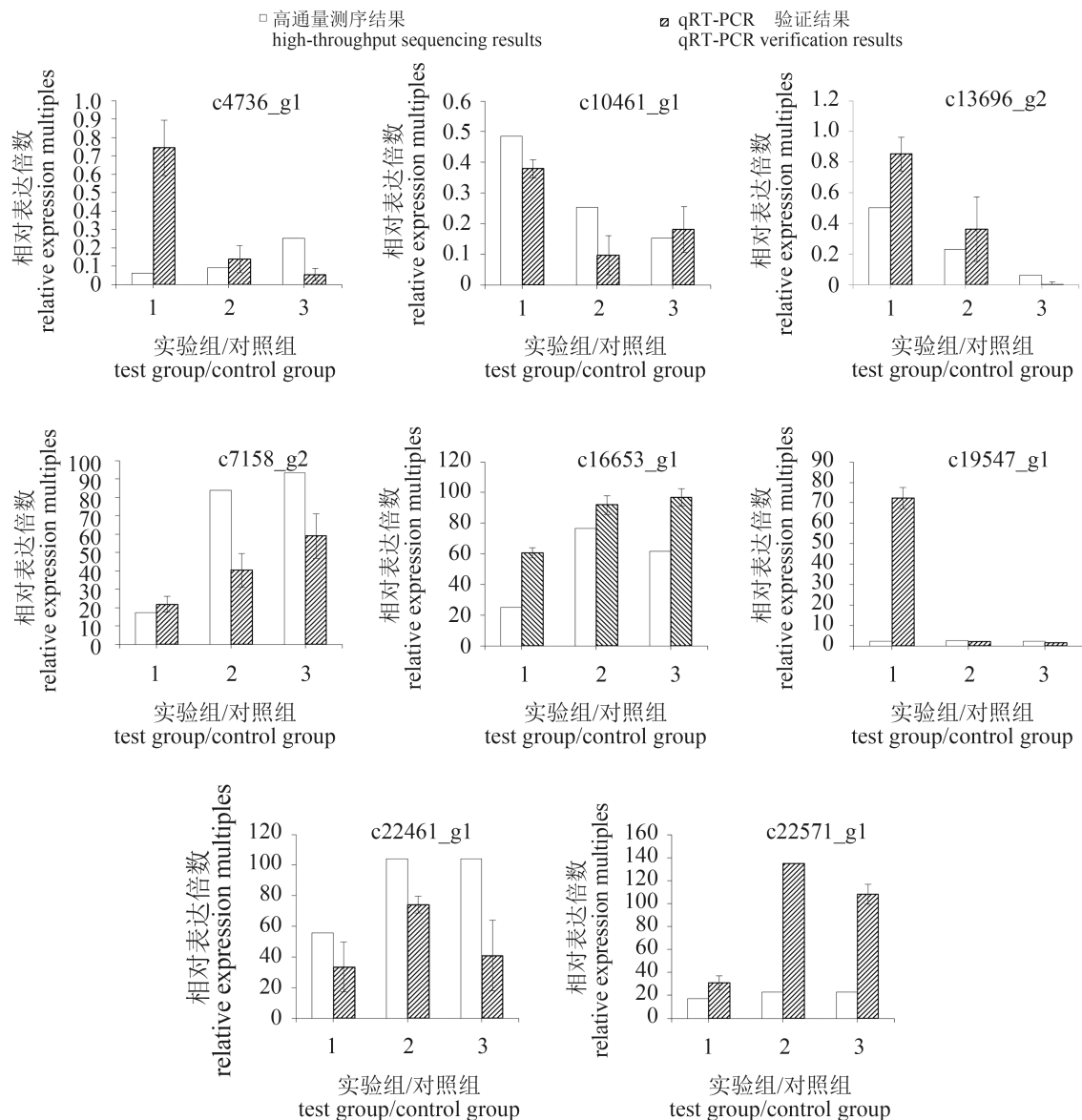


图2 坛紫菜8个差异性表达基因在低盐胁迫3个不同时间点(3、6和9 h)相对表达量的qRT-PCR验证

Fig. 2 Quantitative real-time PCR validation of relative expression levels of eight differentially expressed genes at three time points (3, 6 and 9 h) of low-salinity stress in *P. haitanensis*

1. LS 3 h vs LS 0 h; 2. LS 6 h vs LS 0 h; 3. LS 9 h vs LS 0 h

发生显著富集,说明坛紫菜叶状体在受到低盐逆境胁迫时,氨基酸的合成发生了很大变化,可能其光合作用也受到一定影响。下调基因显著富集的相关代谢通路,如光合作用有机物碳固定代谢、碳代谢和糖酵解/糖异生代谢通路,均表明坛紫菜叶状体受到低盐胁迫时,光合作用受到了一定程度的抑制,推测其可能通过减少物质合成,控制能量代谢来抵抗低盐环境^[21-22]。上调表达的差异基因在蛋白酶体代谢和氨基酸合成代谢途径显著富集,这表明坛紫菜叶状体可能通过增加可溶性物质^[23-24]来维持胞内外的

透压平衡。

坛紫菜叶状体在受到低盐胁迫时,应激反应具有时间特异性,早期以合成或者降解蛋白质为主来抵御低盐环境,随着胁迫时间的延长,藻体细胞通过改变可溶性物质的含量,减慢能量代谢等来抵御低盐逆境。本研究为后续进一步探索坛紫菜耐低盐的分子机制奠定了基础。

参考文献:

- [1] 张卫兵,徐加达,端木怡燕,等.日韩两国紫菜产业分析及启示[J].食品科技,2005(10):9-12.

- Zhang W B, Xu J D, Duanmu Y Y, *et al.* Analysis of laver industry in Japan and South Korean[J]. Food Science and Technology, 2005(10): 9-12(in Chinese).
- [2] 福建省水产局. 坛紫菜人工养殖[M]. 福州: 福建人民出版社, 1979: 1-101.
Fujian Fisheries Bureau. Artificial cultivation of *Porphyra haitanensis*[M]. Fuzhou: Fujian People Publishing House, 1979: 1-101(in Chinese).
- [3] 张学成, 秦松, 马家海, 等. 海藻遗传学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 184-225.
Zhang X C, Qin S, Ma J H, *et al.* The genetics of marine algae[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2005: 184-225(in Chinese).
- [4] 马兴宇, 刘福利, 梁洲瑞, 等. pH与盐度胁迫对鼠尾藻光合作用及抗氧化系统的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2014, 23(2): 208-214.
Ma X Y, Liu F L, Liang Z R, *et al.* Effects of pH and salinity stress on photosynthesis and antioxidant system of *Sargassum thunbergii*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2014, 23(2): 208-214(in Chinese).
- [5] 周亚维, 焉婷婷, 李朋富, 等. 盐度胁迫下盐生隐杆藻抗氧化防御系统的变化[J]. 海洋科学, 2010, 34(9): 30-35.
Zhou Y W, Yan T T, Li P F, *et al.* Changes in antioxidative defense systems of *Aphanothece halophytica* in response to salt stresses[J]. Marine Sciences, 2010, 34(9): 30-35(in Chinese).
- [6] 杨惠. 条斑紫菜功能基因组及重复序列特征研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011: 30-90.
Yang H. Characteristics of the functional genome and repetitive sequences in *Porphyra yezoensis*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011: 30-90(in Chinese).
- [7] Kim E, Park H S, Jung Y, *et al.* Identification of the high-temperature response genes from *Porphyra seriata* (Rhodophyta) expression sequence tags and enhancement of heat tolerance of *Chlamydomonas* (Chlorophyta) by expression of the *Porphyra HTR2* gene[J]. Journal of Phycology, 2011, 47(4): 821-828.
- [8] 王莉. 坛紫菜响应失水胁迫的转录组和表达谱特征分析[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013: 19-78.
Wang L. Analysis of transcriptome and expression profiles in response to desiccation stress in *Pyropia haitanensis*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013: 19-78(in Chinese).
- [9] Xie C T, Li B, Xu Y, *et al.* Characterization of the global transcriptome for *Pyropia haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta) and development of cSSR markers[J]. BMC Genomics, 2013, 14: 107.
- [10] 梁志强. 坛紫菜遗传育种的初步研究[D]. 上海: 上海水产大学, 2004: 10-22.
Liang Z Q. Primary study on genetics and breeding of *Porphyra haitanensis*[D]. Shanghai: Shanghai Fisheries University, 2004: 10-22(in Chinese).
- [11] 檀应华, 黄林彬, 严兴洪. 坛紫菜耐低盐品系的选育与特性分析[J]. 海洋与湖沼, 2014, 45(3): 504-512.
Tan Y H, Huang L B, Yan X H. Selection and characterization of a low-salinity tolerant strain in *Pyropia haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta)[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2014, 45(3): 504-512(in Chinese).
- [12] Grabherr M G, Haas B J, Yassour M, *et al.* Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome[J]. Nature Biotechnology, 2011, 29(7): 644-652.
- [13] 梅高尚, 纪德华, 李兵, 等. 坛紫菜核糖体蛋白S15a基因的克隆及高温胁迫表达分析[J]. 水产学报, 2012, 36(12): 1826-1833.
Mei G S, Ji D H, Li B, *et al.* Molecular cloning and expression analysis under high temperature stress of ribosomal protein S15a gene from *Porphyra haitanensis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(12): 1826-1833(in Chinese).
- [14] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [15] Reed R H, Collins J C, Russell G. The effects of salinity upon galactosyl-glycerol content and concentration of the marine red alga *Porphyra purpurea*[J]. Journal of Experimental Botany, 1980, 31(6): 1539-1554.
- [16] Wang L, Mao Y X, Kong F N, *et al.* Genome-wide expression profiles of *Pyropia haitanensis* in response to osmotic stress by using deep sequencing technology[J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 1012.
- [17] Cole K M, Sheath R G. Biology of the red algae[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1990: 221-257.
- [18] Fan X L, Fang Y J, Hu S N, *et al.* Generation and analysis of 5318 expressed sequence tags from the filamentous sporophyte of *Porphyra haitanensis*

- (Rhodophyta)[J]. *Journal of Phycology*, 2007, 43(6): 1287-1294.
- [19] 黄思强. 集胞藻PCC6803在高盐和低氮环境中的基因表达变化规律[D]. 天津: 天津大学, 2013: 1-70.
- Huang S Q. Integration of proteomic and transcriptomic reveals varying pattern of gene expression in *Synechocystis* sp. PCC6803 under salt stress and nitrogen starvation[D]. Tianjin: Tianjin University, 2013: 1-70(in Chinese).
- [20] Kaplan F, Kopka J, Haskell D W, *et al.* Exploring the temperature-stress metabolome of *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2004, 136(4): 4159-4168.
- [21] Qin D D, Wu H Y, Peng H R, *et al.* Heat stress-responsive transcriptome analysis in heat susceptible and tolerant wheat (*Triticum aestivum* L.) by using wheat genome array[J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 432.
- [22] Wang W X, Vinocur B, Shoseyov O, *et al.* Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response[J]. *Trends in Plant Science*, 2004, 9(5): 244-252.
- [23] Collén J, Guisile-Marsollier I, Léger J J, *et al.* Response of the transcriptome of the intertidal red seaweed *Chondrus crispus* to controlled and natural stresses[J]. *New Phytologist*, 2007, 176(1): 45-55.
- [24] Rosa M, Prado C, Podazza G, *et al.* Soluble sugars: Metabolism, sensing and abiotic stress: a complex network in the life of plants[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2009, 4(5): 388-393.

Transcriptomic profiling of *Pyropia haitanensis* blade in responding to low-salinity stress

FENG Chang¹, DING Hongchang¹, YAN Xinghong^{1,2*}

(1. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai 201306, China)

Abstract: In order to probe the physiological mechanisms of *Pyropia haitanensis* blade responding to low-salinity stress, in this paper, the next-generation high-throughput sequencing technology was applied to compare transcriptome data of *P. haitanensis* blades being cultured at normal salinity of 26 (control group) and at low-salinity of 3 (stress group) for 3, 6, and 9 hours, respectively. Results revealed that the *de novo* assembly of sequence data generated 33 872 unigenes, of which average length was 612 base pairs. Compared with control group, 1 108, 1 638 and 1 881 differentially expressed genes were produced from three stress groups, respectively. The analysis of gene ontology functional enrichment revealed that some important biological processes related to low-salinity stress, such as single-organism metabolic process, monosaccharide biosynthetic process, monosaccharide catabolic process, gluconeogenesis, organic substance catabolic process, etc., got significantly enriched. The results of KEGG pathways enrichment showed that metabolic pathway varied mostly with different treated time. Differentially expressed genes produced from LS 3 h vs LS 0 h group tended to cluster into three KEGG metabolic pathways, one of which related to photosynthesis, and the other two were both interrelated with amino acid biosynthesis. However, under low-salinity stress for 6 and 9 hours, most differentially expressed genes were enriched in metabolic pathways carbohydrate involved. Quantitative real-time PCR validation results showed that expression levels of eight selected differentially expressed genes were consistent with high-throughput sequencing results. All the results above revealed that stress responses of *P. haitanensis* were time-specific when exposed to low-salinity. In the early stage, *P. haitanensis* mainly synthesized or degraded protein to resist low-salinity environment. With low-salinity stress carried on, cells changed the content of soluble substances and slowed down energy metabolism to resist low-salinity adversity.

Key words: *Pyropia haitanensis*; low-salinity stress; transcriptome; quantitative real-time PCR; differentially expressed genes

Corresponding author: YAN Xinghong. E-mail: xhyan@shou.edu.cn

Funding projects: National High Technology Research & Development Program (“863”Program) (2012AA10A411); National Natural Science Foundation of China (31072208); National Agricultural Science and Technology Achievements Transformation Project (2013GB2C220537); Special Fund of Fujian Provincial Governor (2014S1477-10)