

刘晨临, 王秀良, 林学政. 南极红藻 *Iridaea cordata* 和 *Curdiea racovitzae* 转录组分析及其极端光环境适应相关基因的挖掘[J]. 海洋学报, 2020, 42(10): 110–120, doi:10.3969/j.issn.0253-4193.2020.10.011

Liu Chenlin, Wang Xiuliang, Lin Xuezheng. *De nova* transcriptome analysis and mining extreme light environments acclimation responding genes of Antarctic seaweed *Iridaea cordata* (Gigartinales, Rhodophyta) and *Curdiea racovitzae* (Gracilariaceae, Rhodophyta)[J]. Haiyang Xuebao, 2020, 42(10): 110–120, doi:10.3969/j.issn.0253-4193.2020.10.011

南极红藻 *Iridaea cordata* 和 *Curdiea racovitzae* 转录组分析及其极端光环境适应相关基因的挖掘

刘晨临^{1,3}, 王秀良^{2,3}, 林学政¹

(1. 自然资源部第一海洋研究所, 山东 青岛 266061; 2. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071; 3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室 海洋生物学与生物技术实验室, 山东 青岛 266237)

摘要: 南极红藻具有重要的生态学功能和开发利用价值。南极极端环境赋予了其独特的生理耐受机制, 也是发现新基因和代谢途径的理想材料。我们测序分析了南极产胶红藻 *Iridaea cordata* (Turner) Bory 和 *Curdiea racovitzae* Hariot 的转录组序列, 并与其常温近缘种进行了比较, 同时挖掘了其光限制和强紫外线辐射等光环境适应相关的基因。*I. cordata* 和 *C. racovitzae* 的转录组序列分别拼接成了 14 055 条和 12 006 条非冗余基因, 平均长度分别为 1 473 bp 和 1 448 bp。在 *I. cordata* 转录组中发现多条与绿藻基因同源的捕光复合物 LHC 基因 *Lhca2*、*Lhca6* 和 *Lhcb*, 并且在两种南极红藻中都各发现了 1 条编码结合岩藻黄质和 Chl *a/c* 蛋白的 *Lhcf* 基因, 目前尚未在其他红藻中发现这类基因。光裂解酶修复紫外线诱导 DNA 损伤, 在 *I. cordata* 的转录组序列中发现了 6-4 光裂解酶, 光裂解酶 CPD I 和 CPD II 基因, 而 *C. racovitzae* 转录组序列中仅找到了光裂解酶 CPD II 基因。尽管南极红藻中这些特有基因的功能有待进一步的验证, 但是本文为后续研究红藻的南极极端光环境适应机制提供了方向。

关键词: 南极红藻; 转录组; 极端光环境适应; *Iridaea cordata*; *Curdiea racovitzae*

中图分类号: S917.3

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2020)10-0110-11

1 引言

生活在南极的大型海藻约有 120~130 种, 其中三分之一的是南极特有的^[1]。在西南极半岛, 大型海藻广泛生长在潮间带或浅岸海底的礁石上。乔治王岛(King George Island)的梅尔维尔角(Melville Cape), 90% 以上的岩石底层被海藻覆盖。而在将军湾(Admiralty Bay), 夏季大型海藻带几乎环绕着整个海湾沿岸, 覆盖了约 37% 海湾面积。褐藻和红藻在潮下带岩石基底上呈垂直分布, 最深可达 100 m 水深处^[2-3]。大型海藻是近岸海洋系统重要的初级生产者, 为其他

海洋生物提供庇护和食物来源^[4]。除生态学意义, 许多大型海藻也具有较高的经济价值, 目前对南大洋海藻资源的开发利用日益成为热点^[5]。产胶红藻 *Iridaea cordata* (Turner) Bory 和 *Curdiea racovitzae* Hariot 是南极和亚南极海岸潮间带和潮下带的常见物种^[6]。*I. cordata* 产卡拉胶^[7], 其硫酸多糖具有抗癌活性^[8], *C. racovitzae* 则是产琼胶海藻^[9]。

许多来自南极的物种只在低于 5℃ 的温度条件下生长和繁殖。低温需求决定了它们在南极的北部分布边界。*I. cordata* 的最适生长温度在 0~5℃, 生存温度的上限为 11~16℃^[10]。除冰冻和低温外, 海藻的

收稿日期: 2019-07-02; 修订日期: 2019-11-18。

基金项目: 国家自然科学基金(41276203); 国家南极观测监测网运维与管理项目(JDKC0518013)。

作者简介: 刘晨临(1974—), 女, 山东省滨州市人, 博士, 主要从事藻类逆境分子生物学研究。E-mail: chenlinliu@fio.org.cn

生长发育也被南极地区多种极端的光环境影响。夏季, 潮间带海藻暴露在强烈的紫外线辐射下, 需要有效的紫外线伤害的防御和修复能力^[11-12]。在 *I. cordata* 中发现了能够吸收紫外线, 降低紫外辐射伤害的类菌胞素氨基酸^[13]。而冬季由于极夜和海冰覆盖, 黑暗时间较长, 海藻生长必须适应弱光环境, 降低其光合作用和生长对光照的需求量^[14-15]。在南极漫长黑暗的冬季, 因为具有较高的光合效率和极低的光补偿点和光饱和点, *I. cordata* 仍然能够持续生长^[10]。

目前, 对南极大型海藻的研究主要集中在生态分布、生物量和生物多样性^[2-3, 6, 15-16]、功能活性物质的发现^[17-18], 以及光合生理活性^[10-12, 19-20]等方面。迄今为止, 除了南极绿藻 *Prasiola crispa* 的转录组数据^[21], 未见其他南极海藻功能基因或转录组学研究的报道。南极藻类因其特有的耐受极端环境的能力, 成为发现新基因和新代谢机制的理想材料。而转录组测序和分析是发现这些基因资源最经济、有效的手段。我们从两种南极红藻的转录组序列中, 挖掘了一些独特的可能与其南极极端光环境, 包括弱光和强紫外线辐射等适应相关基因, 为后续开展南极红藻极端环境适应机制研究提供了依据。同时从南极红藻中发现的光修复酶基因, 在化妆品领域也有开发利用的前景。

2 材料与方法

2.1 海藻样品

2018年2月, 在第34次中国南极科学考察中, 依托“向阳红01”号科学考察船, 在西南极南设得兰群岛乔治王岛的长城站附近(62.216°S, 58.960°W)潮间带采集红藻样品。采样时阴天有小雨, 气温约2℃。用无菌海水清洗藻体后, 置于船上-150℃冰箱保存。保持冷冻状态至回国后, 在实验室提取藻样的总RNA。

2.2 总RNA提取和cDNA文库的构建

首先将冷冻的海藻样品浸入液氮中, 用冷却的研钵研磨成细粉。使用天根植物RNAprep试剂盒提取总RNA。采用微量核酸定量仪检测RNA的质量和浓度。测序文库使用TruSeq RNA样品制备试剂盒(Illumina, USA)构建。用Illumina PCR引物进行15个循环的PCR反应, 选择性富集两端连接接头分子的DNA片段, 并用AMPure XP系统纯化(Beckman Coulter, USA)。采用安捷伦(Agilent)生物分析仪2100系统中的高灵敏度DNA分析技术对产物进行定量。Illumina HiSeq测序委托上海派森诺生物技术有限公司完成。

2.3 转录组数据组装和功能注释

在数据组装前先过滤原始数据。使用Cutadapt(v1.15)软件删除引物或接头序列。过滤掉超过10%碱基质量低于Q20的或未知核苷酸(Ns)碱基超过5%的序列。使用Trinity(v2.5.1)软件对转录本进行拼接^[22]。选择每个基因最长的转录本作为该基因的代表性序列称为非冗余基因。BlastX同源搜索NCBI非冗余蛋白数据库NR(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), E-value<10⁻⁵。利用真核生物直系同源蛋白质聚类EggNOG(Evolutionary Genealogy of Genes: Non-supervised Orthologous Groups, http://eggno.gembl.de/version_3.0/)对非冗余基因进行功能分类注释^[23]。利用京都基因与基因组百科全书KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.kegg.jp/>)进行代谢通路注释, 获得物种内分子间相互作用和反应的网络。KEGG代谢通路注释以双向最佳匹配(BBH)的方法, 采用KAAS软件完成^[24]。使用PrimerPro(<http://web-docs.cs.ualberta.ca/~yifeng/PrimerPro/>)的微卫星搜索模块(MISA)筛选简单重复序列(SSRs)。

2.4 系统进化树的构建

基因家族系统进化树的构建用MEGA X软件完成^[25], 将选择的序列经MUSCLE比对后, 采用默认参数, 用邻接法构建系统树。经过1000次自展值的检验, 显示一致性的系统树。

3 结果与讨论

3.1 南极红藻 *Iridaea cordata* 和 *Curdia racovitzae* 转录组组装和注释

南极红藻 *I. cordata* 和 *C. racovitzae* 的形态如图1所示。红藻的鉴定采用克隆的18S rRNA基因与GenBank已知序列进行比对, 相似性为100%。

每种红藻的转录组测序量约为6 G, *I. cordata* 和 *C. racovitzae* 的转录组序列分别拼接成了14 055条和12 006条非冗余基因(表1)。非冗余基因的平均长度分别为1 473 bp和1 448 bp。*I. cordata* 的鸟嘌呤和胞嘧啶(GC)含量约为53.82%, *C. racovitzae* 的GC含量约为47.28%。GC含量在一定程度上反映了基因组的热稳定性。角叉菜 *Chondrus crispus* 的GC含量约为55.6%^[26], 而龙须菜 *Gracilariopsis lemaneiformis* GC含量为48.13%^[27]。南极红藻的GC含量与常温红藻的GC含量差别不大。

I. cordata 和 *C. racovitzae* 转录组序列在各个数据库的注释情况见表2。在NR数据库, *I. cordata* 和 *C. racovitzae* 分别有4 788条(34.07%)和4 468条(37.21%)

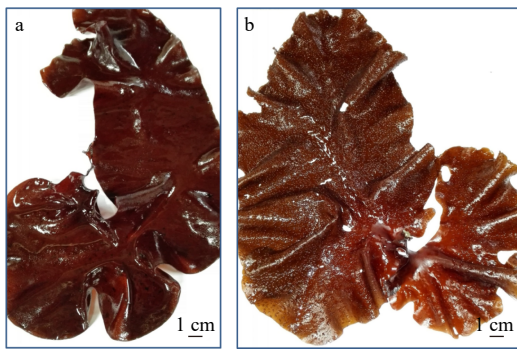


图 1 南极红藻 *Iridaea cordata* (a) 和 *Curdiea racovitzae* (b) 的形态

Fig. 1 The morphology of *Iridaea cordata* (a) and *Curdiea racovitzae* (b)

非冗余基因得到注释。在 Swissprot 数量库中 *I. cordata* 和 *C. racovitzae* 则分别有 4864(34.61%) 和 4938(41.13%) 条非冗余基因得到注释。紫菜 *Pyropia tenera* 转录组序列在 UniProt 数据库(不含其他紫菜属物种的基因

组和转录组序列)中也仅有 33.6% 的重叠群匹配到同源序列^[28]。这说明了红藻基因与公共数据库中已知基因序列间的同源性较低,继续丰富不同种类红藻基因数据资源是很有必要的^[29]。

I. cordata 和 *C. racovitzae* 中被 EggNOG 注释的非冗余基因分别有 4 523 和 4 238 条(图 2)。除了一般功能预测和功能未知的分类,翻译后修饰、蛋白反转和分子伴侣类别的非冗余基因(579, 581)最多,其次依次是翻译、核糖体结构和起源(485, 485)、信号传导机制(389, 321)、碳水化合物转运和代谢(301, 280)、能量的产生和转换(259, 279)、RNA 加工和修饰(237, 221)、复制、重组和修复(209, 176)、细胞内转移、分泌和囊泡转运(209, 220)、氨基酸转运和代谢(201, 209)以及转录(198, 193)等分类。

3.2 南极红藻转录组序列与常温近缘红藻基因组序列的比较

在已完成全基因组测序的红藻中,角叉菜与

表 1 南极红藻 *Iridaea cordata* 和 *Curdiea racovitzae* 转录本和非冗余基因

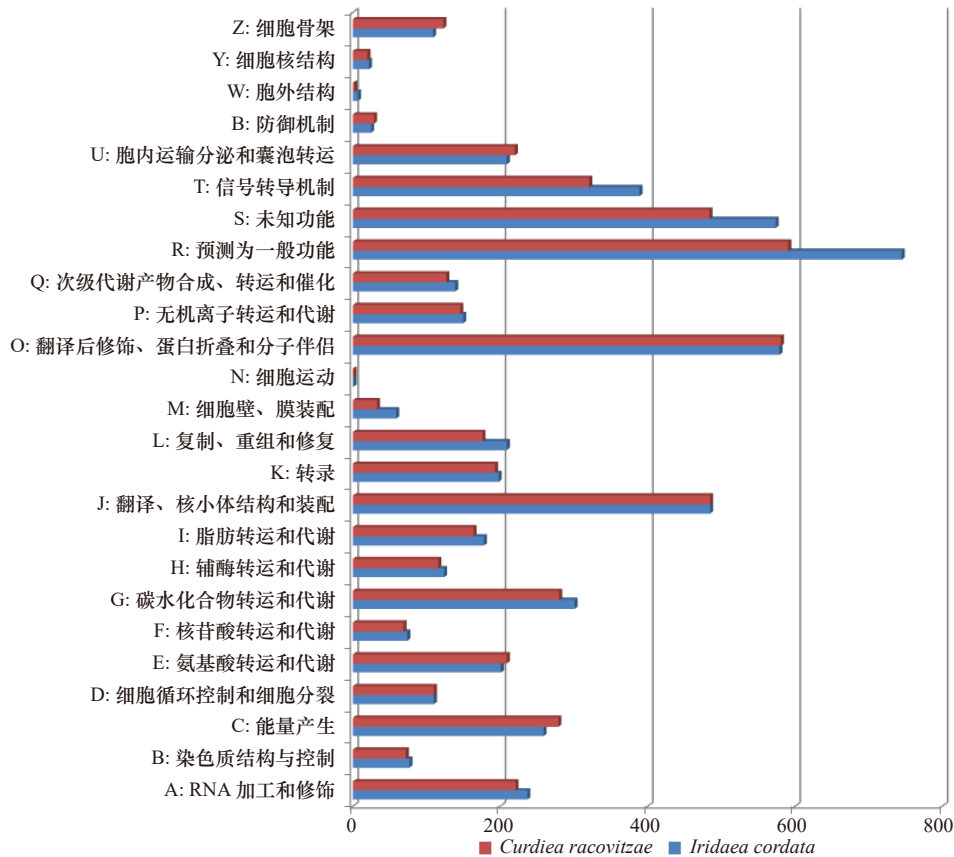
Table 1 The contigs and unigenes of *Iridaea cordata* and *Curdiea racovitzae*

	<i>Iridaea cordata</i>		<i>Curdiea racovitzae</i>	
	重叠群	非冗余基因	重叠群	非冗余基因
总长度/bp	23 957 720	20 707 433	19 982 213	17 378 947
序列数目	32 395	14 055	26 226	12 006
最大序列长度/bp	24 631	24 418	27 865	26 227
平均序列长度/bp	740	1 473	762	1 448
N50/bp	2 724	3 133	3 256	3 673
N50 序列数	2 329	1 901	1 635	1 307
N90/bp	199	537	210	457
N90 序列数	15 816	7 637	12 822	6 213
GC%	53.82	53.29	47.28	46.88

表 2 *Iridaea cordata* 和 *Curdiea racovitzae* 转录组序列在各个数据库的注释结果

Table 2 The annotation results of *Iridaea cordata* and *Curdiea racovitzae* transcriptome

数据库	<i>Iridaea cordata</i>		<i>Curdiea racovitzae</i>	
	数目	百分比	数目	百分比
NR	4 788	34.07	4 468	37.21
GO	1 806	12.85	1 838	15.31
KEGG	2 024	14.40	1 903	15.85
EggNOG	4 523	32.18	4 238	35.3
Swissprot	4 864	34.61	4 938	41.13
全部数据库	972	6.92	947	7.89

图2 *Iridaea cordata* 和 *Curdiea racovitzae* 转录组序列的 EggNOG 功能分类Fig. 2 EggNOG function classification of *Iridaea cordata* and *Curdiea racovitzae*

I. cordata 都属于杉菜目, 亲缘关系最近。龙须菜与 *C. racovitzae* 同属于江蓠目, 有较近的亲缘关系。我们将所测的两种南极红藻的转录组序列分别与角叉菜 (基因组 GenBank 序列收录号: PRJEA78309、PRJNA193762) 和龙须菜 (PRJNA361418) 的基因组的蛋白编码序列用本地 BlastX (E-value < 10^{-5}) 进行比较, 发现有 5 955 条 *I. cordata* 的非冗余基因与 4 059 条角叉菜的序列匹配。 *C. racovitzae* 的 4 964 条非冗余基因匹配到了 3 596 条龙须菜基因序列 (图 3), 但是两两物种间, 互相不匹配的序列占有更大比例, 说明同目的红藻间遗传差异较大。

3.3 捕光复合物基因家族

在光系统中, 捕光复合物 LHC (Light-Harvesting Complex) 负责捕获光能并将能量转移到反应中心。除了吸收光, 这些蛋白质还参与了光保护反应, 以清除光合作用过程中产生的活性氧^[30]。我们从红藻角叉菜、龙须菜和耐受酸热环境的单细胞红藻 *Galdieria sulphuraria* (PRJNA13023) 的基因组序列, 以及两种南极红藻转录组序列中, 通过 BlastP 比对、KEGG 注释分析和 Pfam 注释查找有 CB (Chloro a/b-bind) 结构域的序列^[31], 筛选了假定的 LHC 家族基因, 利用这些

基因编码的蛋白序列构建了系统树 (图 4)。之前的研究认为红藻中仅有光系统 I (PSI) 相关的, 与叶绿素 *a* 和类胡萝卜素结合的 LHC 天线蛋白, 称为 LHCR^[32-33]。 LHCR 的数目在不同红藻间存在差异, 蛋白分离纯化的结果表明紫球藻有 6 种不同的 LHCR 蛋白, *G. sulphuraria* 有 5 种, 而 *Cyanidioschyzon merolae* 只有 3 种^[31]。

从角叉菜、龙须菜和 *G. sulphuraria* 的基因组序列中各找到了 5、13 和 10 条 *Lhc* 序列。角叉菜的 5 条 *Lhc* 基因均编码红藻型 LHC 蛋白, 龙须菜有 7 条 *Lhc* 基因, 6 条其他类型的 *Lhc* 基因。 *G. sulphuraria* 中有 9 条 *Lhc* 基因和 1 条其他类型的 *Lhc* 基因。从 *I. cordata* 和 *C. racovitzae* 转录组中分别找到了 8 条和 5 条 *Lhc* 基因。分别包括 4 条 *Lhc* 和 1 条 *Lhcf* 基因。 *Lhcf* 编码岩藻黄质和 Chl *a/c* 结合蛋白, 属于 PSI 天线复合物。 LHCF 是硅藻和褐藻中的主要天线蛋白, 但还未见在红藻中的报道^[34-35]。此外, *I. cordata* 转录组中还包含多条与绿藻 LHC 蛋白同源的序列, 参照莱茵衣藻 LHC 的分类, 分别为 *Lhca2*, *Lhca6* 和 *Lhcb* 基因 (图 5)。在莱茵衣藻中, LHCa2 和 LHCa6 属于 PSI, 而 LHCb 属于 PSII。

目前关于 LHC 蛋白的进化还缺少切实的证据,

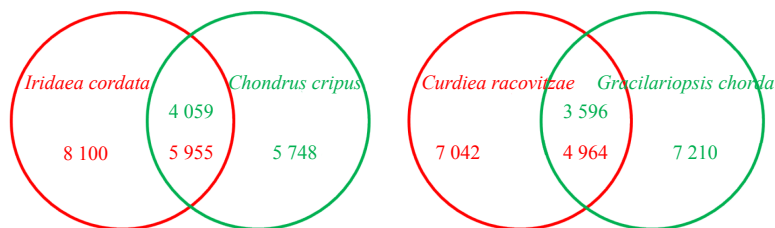


图3 角叉菜 *Chondrus crispus* 与 *Iridaea cordata*, 龙须菜 *Gracilariopsis chorda* 与 *Curdiea racovitzae* 匹配基因数目的韦恩图

Fig. 3 Diagram of the matching gene numbers between *Chondrus crispus* and *Iridaea cordata*, *Gracilariopsis chorda* and *Curdiea racovitzae*

红色表示南极红藻, 绿色表示常温红藻

Red represents the Antarctic red algae, green represents the normal temperate red algae

一种观点认为, 红藻、绿藻和高等植物 *Lhc* 基因家族是共同起源, 独立进化的^[32]。在进化过程中, 由于藻胆体的丢失, 有些 *Lhca* (*LhcI*) 的基因功能进一步分化, 成为 PSII 的天线蛋白^[33]。绿藻中编码 *Chl a/b*-和 *Chl a/c* 结合蛋白的基因在 LHCI / LHCII 分化之前就已经彼此分离^[36]。LHCb 是植物生长和光保护反应的关键蛋白。目前对 PSII 中 LHC 蛋白的研究主要在高等植物和绿藻中, 而其他物种中则少见报道^[36]。对于南极红藻 *I. cordata* 特有的 *Lhc* 基因的蛋白产物还需要蛋白分离纯化等生物化学的方法进行验证。但是 *Lhc* 基因家族的扩张能够增强 *I. cordata* 在光限制环境中的光吸收和能量转移能力, 可能是适应南极冬季弱光环境生存的关键。

3.4 光裂解酶基因家族

环境非生物胁迫, 如干旱或紫外线, 可诱导藻类 DNA 损伤。目前发现的两种光裂解酶, 环丁烷嘧啶二聚体 (CPD) 光裂解酶和 6-4 光裂解酶, 可以特异性地修复不同类型的 UV 诱导的 DNA 损伤, CPD 和 6-4 嘧啶酮光产物 (6-4 PP)^[37]。光裂解酶属于紫外线/蓝光激活蛋白家族——光裂解酶/隐花色素 (CPF) 家族, 这个超家族包括光裂解酶、隐花色素 (Cry) 和 Cry-DASH。这三类成员有很高的同源性, 都含有能结合两个生色团的 PHR (Photolyase Homology Region) 功能区^[38], 但是 Cry-DASH 和隐花色素的 PHR 无光裂解酶活性^[39]。

从红藻角叉菜、龙须菜和 *G. sulphuraria* 的基因组序列, 以及南极红藻的转录组序列中通过 Pfam 注释, 选取了所有含 PHR 功能区的序列, 作为假定的光裂解酶/隐花色素 CPF 家族蛋白序列, 同时参考 Fortunato 等^[40] 构建的 CPF 超级家族系统树, 选择其中的绿藻、硅藻、褐藻和拟南芥的序列, 与我们筛选的红藻 CPF 家族蛋白序列一起构建了的系统进化树, 并对进化树的分支进行了功能划分 (图 6)。 *I. cordata* 的转

录组序列中有 4 条 CPF 家族基因, 分别属于 6-4 光裂解酶, 光裂解酶 CPD I 和 CPD II 家族。 *C. racovitzae* 转录组序列中有 6 条 CPF 家族基因, 分别编码隐花色素 Cry、Cry-DASH、Cry-DASH II 和光裂解酶 CPD II。 6-4 光裂解酶分支的物种, 包括红藻、硅藻、褐藻、绿藻和高等植物。 Fortunato 等^[40] 未在角叉菜中发现 6-4 光裂解酶基因, 认为只有单细胞红藻中有 6-4 光裂解酶, 但是我们在除 *C. racovitzae* 之外的所有红藻中, 都找到了 6-4 光裂解酶同源序列, 说明其在红藻中是广泛存在的。光裂解酶 CPD, 分为 2 个分支, CPD II 广泛分布于各类生物物种^[40], 与我们的结果一致。而 CPD I 则主要存在于细菌、古细菌、蓝细菌和真菌中^[37, 40]。 Fortunato 等^[40] 未在灰色藻、甲藻和红藻角叉菜中找到 CPD I 家族基因, 但是在我们的系统进化树中, 在红藻 *I. cordata*, 龙须菜以及硅藻中都找到了 CPD I 的同源序列。我们认为在少数种类的硅藻和红藻中存在的 CPD I 基因可能是通过水平基因转移从原核生物中获得的, 用于修复其因生活环境严酷而造成的 DNA 损伤。在 *I. cordata* 转录组中未找到红藻中普遍存在的 Cry 和 Cry-DASH 序列, 同时在 *C. racovitzae* 转录组中未发现 6-4 光裂解酶, 可能是转录组测序未能完全覆盖基因组中所有编码序列导致的。

3.5 简单重复序列 SSR

从转录组序列中筛选的 SSR 序列, 因为其丰富性且与编码基因紧密相关, 成为在物种适应性、生物地理分布和进化研究中的重要分子标记。利用 MISA 软件分别从 *I. cordata* 的 3 014 条非冗余基因中鉴定出 5 560 个 SSR 位点, 从 *C. racovitzae* 的 1 636 条非冗余基因中鉴定出 2 473 个 SSR 位点。其中单核苷酸重复最多。紫菜 *P. seriata* 中三核苷酸的数目最多^[29]。SSR 的频率和分布被认为取决于各种因素, 如数据集的大小、工具和使用的标准^[41]。

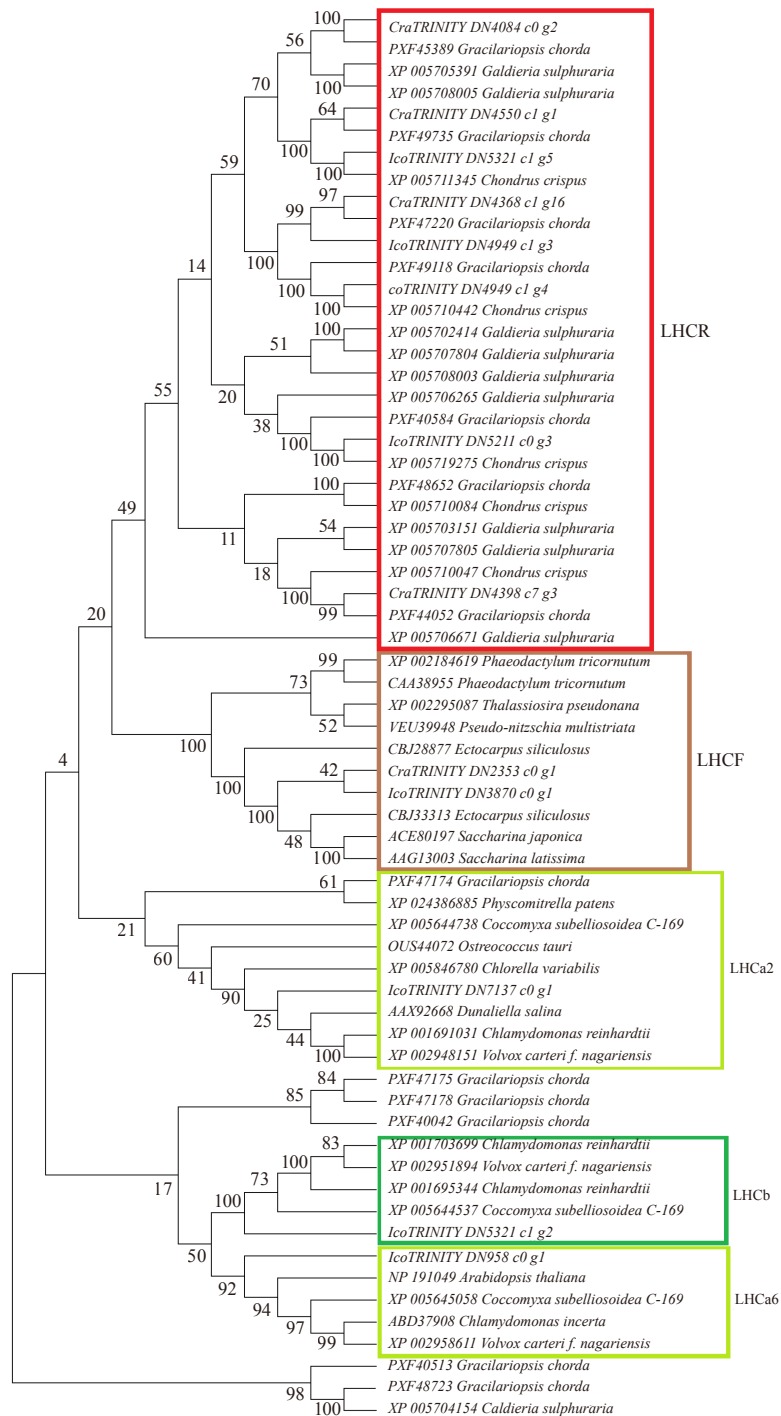


图4 捕光复合物的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of the light harvesting complex superfamily

进化树由来自几种主要红藻的基因组或转录组中的所有 LHC 基因编码的蛋白序列, 以及褐藻、绿藻和硅藻的部分 LHC 蛋白序列组成。5 种类型的 LHC 用不同颜色的方框区分。LHCr 为红藻型捕光复合物, LHCF 是硅藻和褐藻中主要的天线蛋白, LHCa2、LHCA6 和 LHCB 主要来自绿藻。*IcoTRINITY* 和 *CraTRINITY* 分别表示 *Iridaea cordata* 和 *Curdiea racovitzae* 的蛋白编码序列。进化树经 MEGA-X 软件用邻接法构建, 得到

1 000 次检验一致性的系统树, 自举值在相应的节点标示

All of LHC sequences from the genome or transcriptome of several red algae species, and some LHCs from brown algae, green algae and diatoms are shown in the tree. Five LHC branches are represented by different color boxes. LHCr is from red algae, LHCF is mainly from diatom and brown algae, LHCa2, LHCA6 and LHCB are mainly from green algae. *IcoTRINITY* and *CraTRINITY* represent the sequences from *Iridaea cordata* and *Curdiea racovitzae*, respectively. The phylogenetic tree is obtained using Neighbor-Joining (NJ) method by MEGA-X software. Bootstrap values referred to 1 000 replicates are shown at the nodes

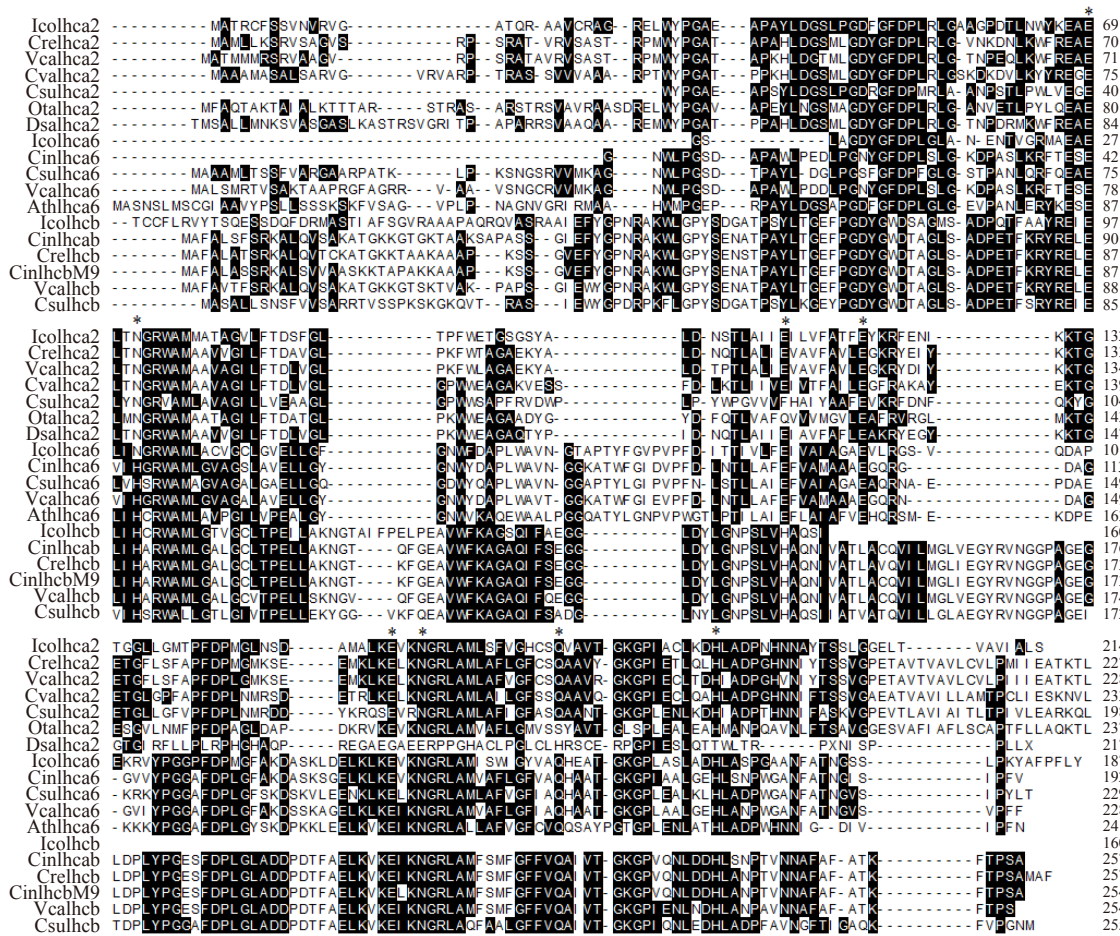


图 5 *Iridaea cordata* 的 *Lhca2*、*Lhca6* 和 *Lhcb* 基因编码的蛋白序列与绿藻 LHC 序列的比较

Fig. 5 Alignment of *Lhca2*, *Lhca6* and *Lhcb* of *Iridaea cordata* with homologous LHCs in green algae

3 种 LHC 序列用绿色线段区分, *表示参考莱茵衣藻序列中的叶绿素分子结合位点。Ath: 拟南芥; Cin: 衣藻; Cre: 莱茵衣藻; Csu: 胶球藻; Cva:

小球藻; Dsa: 杜氏盐藻; Ico: 南极红藻; Ota: 绿藻; Vca: 团藻

Three LHC groups are distinguished with green lines; *marks amino acid residues that binding chlorophylls in *Chlamydomonas reinhardtii* sequences.

Ath: *Arabidopsis thaliana*; Cin: *Chlamydomonas incerta*; Cre: *Chlamydomonas reinhardtii*; Csu: *Coccomyxa subellipsoidea*; Cva: *Chlorella variabilis*;

Dsa: *Dunaliella salina*; Ico: *Iridaea cordata*; Ota: *Ostreococcus tauri*; Vca: *Volvox carteri f. nagariensis*

南极历史上的冰川期对潮间带物种造成了毁灭性的破坏,但是南极大陆架边缘仍有零散的冰川未影响到的区域,成为潮间带海藻的庇护所。在过去的 500 万年间,南极地区至少发生了 38 个冰期-间冰期循环^[42]。由此可能会导致南极潮间带生物生殖隔离和遗传分化的产生^[43]。利用单一基因的 DNA 条形码序列研究冰川期栖息地减少对南极半岛和南设得兰群岛常见的 6 种大型红藻遗传多样性的影响,由于得到的遗传多样性水平极低,无法有效划分海藻的种群,难以确定南极海藻起源的冰川庇护所的位置^[6]。采用 SSR 标记获得海藻种内的更精细的遗传学分化,则有希望解决这一问题。同时 SSR 标记还可以应用于研究南极的地质演变以及预测气候变化对南极生态系统的影响。

4 结论

南极红藻是南极地区重要的生物资源,作为极端环境生物,对其转录组序列的研究有助于新基因和代谢途径的发现。由于实验材料获取和运输保藏困难,很难获取新鲜的材料提取 RNA 用于转录组测序,这可能是目前南极大型海藻转录组学研究较少的原因。我们依托“向阳红 01”号的船载超低温冰箱,保证了从样品采集到实验室 RNA 提取的过程中,材料保存完好。提取到了符合建库要求的 RNA,顺利完成了两种产胶红藻的转录组测序工作。通过分析转录组序列,我们发现了一些可能与南极红藻光限制和紫外线辐射等极端光环境适应相关的特有基因,南极红藻更加多样化的 *Lhc* 基因可能是增强 *I. cordata* 在光

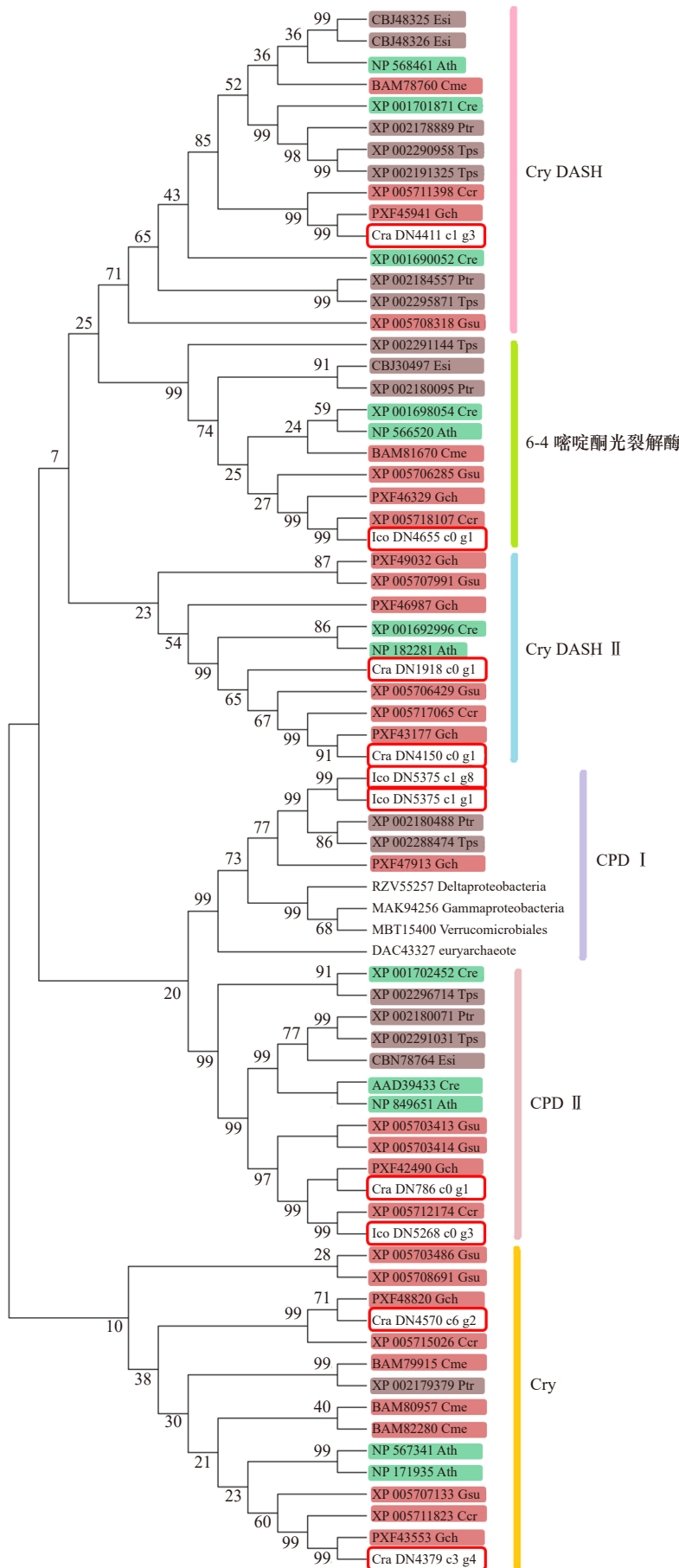


图 6 光裂解酶/隐花色素超家族的系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree of the cryptochrome/photolyase family

进化树中序列的物种包括红藻(红色标记), 绿藻和高等植物(绿色标记)。两株南极红藻用红线框标记。聚类的6个分支用不同颜色的边线表示, 包括环丁烷嘧啶二聚体光裂解酶 CPDI 和 CPDII, 6-4 嘧啶酮光裂解酶, 隐花色素 Cry, Cry-DASH 和 Cry-DASH II。1 000 次检验一致性的系统树经 MEGA-X 软件用邻接法构建, 自举值在相应的节点标示。Ath: 拟南芥; Ccr: 皱波角叉菜;

酶 CPDI 和 CPDII, 6-4 嘧啶酮光裂解酶, 隐花色素 Cry, Cry-DASH 和 Cry-DASH II。The phylogenetic tree is constructed using Neighbor-Joining (NJ) method by MEGA-X. Bootstrap values referred to 1000 replicates are shown at the nodes. Taxonomic abbreviations: Ath: *Arabidopsis thaliana*; Ccr: *Chondrus crispus*; Cme: *Cyanidioschyzon merolae*; Cra: *Curdiea racovitzae*; Cre: *Chlamydomonas reinhardtii*; Esi: *Ectocarpus siliculosus*; Geh: *Gracilaria lemaneiformis*; Gsu: *Galdieria sulphuraria*; Ptr: *Phaeodactylum tricornutum*; Tps: *Thalassiosira pseudonana*

Species in the evolutionary tree include red algae (red marker), and brown algae and diatoms (brown marker). Two Antarctic red algae are labeled with red frame. The six clusters are represented by different color lines, including photolyase CPDI and CPD II, 6-4 photolyase, and cryptochromes Cry, Cry-DASH and Cry-DASH II. The phylogenetic tree is constructed using Neighbor-Joining (NJ) method by MEGA-X. Bootstrap values referred to 1000 replicates are shown at the nodes. Taxonomic abbreviations: Ath: *Arabidopsis thaliana*; Ccr: *Chondrus crispus*; Cme: *Cyanidioschyzon merolae*; Cra: *Curdiea racovitzae*; Cre: *Chlamydomonas reinhardtii*; Esi: *Ectocarpus siliculosus*; Geh: *Gracilaria lemaneiformis*; Gsu: *Galdieria sulphuraria*; Ptr: *Phaeodactylum tricornutum*; Tps: *Thalassiosira pseudonana*

限制环境中的光吸收和能量转移能力, 适应南极冬季弱光环境生存的关键。而光裂解酶基因与其适应极地的强紫外线辐射密切相关。这些基因的功能仍有

待于进一步的验证。通过转录组测序获得的 SSR 标记也为南极红藻的适应性和遗传多样性的研究开展奠定了基础。

参考文献:

- [1] Wiencke C, Clayton M. Antarctic seaweeds[M]//Wägele J W. Synopsis of the Antarctic Benthos. Ruggell: ARG Gantner, 2002.
- [2] Oliveira E C, Absher T M, Pellizzari F M, et al. The seaweed flora of Admiralty Bay, King George Island, Antarctica[J]. *Polar Biology*, 2009, 32(11): 1639–1647.
- [3] Pellizzari F, Silva M C, Silva E M, et al. Diversity and spatial distribution of seaweeds in the South Shetland Islands, Antarctica: an updated database for environmental monitoring under climate change scenarios[J]. *Polar Biology*, 2017, 40(8): 1671–1685.
- [4] Martín A, Miloslavich P, Díaz Y, et al. Intertidal benthic communities associated with the macroalgae *Iridaea cordata* and *Adenocystis utricularis* in King George Island, Antarctica[J]. *Polar Biology*, 2016, 39(2): 207–220.
- [5] Dhargalkar V K, Verlecar X N. Southern Ocean seaweeds: a resource for exploration in food and drugs[J]. *Aquaculture*, 2009, 287(3/4): 229–242.
- [6] Guillemín M L, Dubrasquet H, Reyes J, et al. Comparative phylogeography of six red algae along the Antarctic Peninsula: extreme genetic depletion linked to historical bottlenecks and recent expansion[J]. *Polar Biology*, 2018, 41(5): 827–837.
- [7] McCandless E L, Craigie J S, Hansen J E. Carrageenans of gametangial and tetrasporangial stages of *Iridaea cordata* (Gigartinales)[J]. *Canadian Journal of Botany*, 1975, 53(20): 2315–2318.
- [8] Kim H J, Kim W J, Koo B W, et al. Anticancer activity of sulfated polysaccharides isolated from the Antarctic red seaweed *Iridaea cordata*[J]. *Ocean and Polar Research*, 2016, 38(2): 129–137.
- [9] Falshaw R, Furneaux R H, Stevenson D E. Agars from nine species of red seaweed in the genus *Curdiea* (Gracilariaceae, Rhodophyta)[J]. *Carbohydrate Research*, 1998, 308(1/2): 107–115.
- [10] Wiencke C, Rahmel J, Karsten U, et al. Photosynthesis of marine Macroalgae from Antarctica: light and temperature requirements[J]. *Botanica Acta*, 1993, 106(1): 78–87.
- [11] Navarro N P, Mansilla A, Plastino E M. UVB radiation induces changes in the ultra-structure of *Iridaea cordata*[J]. *Micron*, 2010, 41(7): 899–903.
- [12] Navarro N P, Huovinen P, Gómez I. Stress tolerance of Antarctic macroalgae in the early life stages[J]. *Revista Chilena de Historia Natural*, 2016, 89(1): 5.
- [13] McClintock J B, Karentz D. Mycosporine-like amino acids in 38 species of subtidal marine organisms from McMurdo Sound, Antarctica[J]. *Antarctic Science*, 1997, 9(4): 392–398.
- [14] Cormaci M, Furnari G, Scammacca B, et al. Summer biomass of a population of *Iridaea cordata* (Gigartinales, Rhodophyta) from Antarctica[J]. *Hydrobiologia*, 1996, 326–327(1): 267–272.
- [15] Wiencke C, Clayton M N, Gómez I, et al. Life strategy, ecophysiology and ecology of seaweeds in polar waters[J]. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 2007, 6(1/3): 95–126.
- [16] Wulff A, Iken K, Liliana Quartino M, et al. Biodiversity, biogeography and zonation of marine benthic micro- and macroalgae in the Arctic and Antarctic[J]. *Botanica Marina*, 2009, 52(6): 491–507.
- [17] Amsler D C, Okogbue I N, Landry D M, et al. Potential chemical defenses against diatom fouling in Antarctic macroalgae[J]. *Botanica Marina*, 2005, 48(4): 318–322.
- [18] Martins R M, Nedel F, Guimaraes V B S, et al. Macroalgae extracts from Antarctica have antimicrobial and anticancer potential[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 412.
- [19] Maccoll R, Eisele L E, Williams E C, et al. The discovery of a novel R-phycoerythrin from an Antarctic red alga[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(29): 17157–17160.
- [20] Zacher K, Roleda M Y, Wulff A, et al. Responses of Antarctic *Iridaea cordata* (Rhodophyta) tetraspores exposed to ultraviolet radiation[J]. *Phycological Research*, 2009, 57(3): 186–193.
- [21] Carvalho E L, Maciel L F, Macedo P E, et al. *De novo* assembly and annotation of the Antarctic alga *Prasiola crista* Transcriptome[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2017, 4: 89.
- [22] 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.
- [23] Powell S, Szklarczyk D, Trachana K, et al. eggNOG v3.0: orthologous groups covering 1133 organisms at 41 different taxonomic ranges[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(D1): D284–D289.
- [24] Moriya Y, Itoh M, Okuda S, et al. KAAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server[J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(S2): W182–W185.
- [25] Kumar S, Stecher G, Li M, et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547–1549.

- [26] Collén J, Porcel B, Carré W, et al. Genome structure and metabolic features in the red seaweed *Chondrus crispus* shed light on evolution of the Archaeplastida[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(13): 5247–5252.
- [27] Sun X, Wu J, Wang G C, et al. Genomic analyses of unique carbohydrate and phytohormone metabolism in the macroalga *Gracilariopsis lemaneiformis* (Rhodophyta)[J]. *BMC Plant Biology*, 2018, 18(1): 94.
- [28] Choi S, Hwang M S, Im S, et al. Transcriptome sequencing and comparative analysis of the gametophyte thalli of *Pyropia tenera* under normal and high temperature conditions[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2013, 25(4): 1237–1246.
- [29] Im S, Choi S, Hwang M S, et al. *De novo* assembly of transcriptome from the gametophyte of the marine red algae *Pyropia seriata* and identification of abiotic stress response genes[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2015, 27(3): 1343–1353.
- [30] Green B R, Durnford D G. The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1996, 47: 685–714.
- [31] Engelken J, Brinkmann H, Adamska I. Taxonomic distribution and origins of the extended LHC (light-harvesting complex) antenna protein superfamily[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2010, 10(1): 233.
- [32] Durnford D G, Deane J A, Tan S, et al. A phylogenetic assessment of the eukaryotic light-harvesting antenna proteins, with implications for plastid evolution[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1999, 48(1): 59–68.
- [33] Busch A, Hippler M. The structure and function of eukaryotic photosystem I[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2011, 1807(8): 864–877.
- [34] de Martino A, Douady D, Quinet-Szely M, et al. The light-harvesting antenna of brown algae: highly homologous proteins encoded by a multigene family[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2000, 267(17): 5540–5549.
- [35] Reith M. Molecular biology of Rhodophyte and Chromophyte plastids[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 2014, 46: 549–575.
- [36] Ballottari M, Girardon J, Dall'Osto L, et al. Evolution and functional properties of Photosystem II light harvesting complexes in eukaryotes[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2012, 1817(1): 143–157.
- [37] Sancar A. Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors[J]. *Chemical Reviews*, 2003, 103(6): 2203–2237.
- [38] Chaves I, Pokorny R, Byrdin M, et al. The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2011, 62: 335–364.
- [39] Selby C P, Sancar A. A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(47): 17696–17700.
- [40] Fortunato A E, Annunziata R, Jaubert M, et al. Dealing with light: the widespread and multitasking cryptochrome/photolyase family in photosynthetic organisms[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2015, 172: 42–54.
- [41] Varshney R K, Graner A, Sorrells M E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications[J]. *Trends in Biotechnology*, 2005, 23(1): 48–55.
- [42] Allcock A L, Strugnell J M. Southern Ocean diversity: new paradigms from molecular ecology[J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 2012, 27(9): 520–528.
- [43] Riesgo A, Taboada S, Avila C. Evolutionary patterns in Antarctic marine invertebrates: an update on molecular studies[J]. *Marine Genomics*, 2015, 23: 1–13.

***De nova* transcriptome analysis and mining extreme light environments
acclimation responding genes of Antarctic seaweed *Iridaea cordata*
(Gigartinales, Rhodophyta) and *Curdiea racovitzae*
(Gracilariaceae, Rhodophyta)**

Liu Chenlin^{1,3}, Wang Xiuliang^{2,3}, Lin Xuezheng¹

(1. First Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, Qingdao 266061, China; 2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 3. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266237, China)

Abstract: Antarctic red algae play important roles in the coastal ecosystems and industrial applications. Meanwhile, their unique physiological acclimation mechanisms to the extreme environments endow them to be ideal organisms for discovering new genes and new metabolic pathways. In this study, we sequenced the transcriptomes of Antarctic red algae *Iridaea cordata* (Turner) Bory and *Curdiea racovitzae* Hariot, and compared with their moderate temperature close relatives. The transcriptome sequences of *I. cordata* and *C. racovitzae* were assembled into 14 055 and 12 006 Unigenes, with an average length of 1 473 bp and 1 448 bp, respectively. The *Lhca2*, *Lhca6* and *Lhcb* genes homologous to the green algae genes were found in *I. cordata* transcriptome while not in other red algae. *Lhcf* gene encoding fucoxanthine and Chl *a/c* binding protein presenting in brown algae and diatoms were identified in both *I. cordata* and *C. racovitzae*. Photolyase repairs UV-induced DNA damages. 6-4 photolyase, CPD I and CPD II genes were identified in the transcriptome of *I. cordata*, while only CPD II gene was found in the transcriptome of *C. racovitzae*. Although the functions of those specific genes in Antarctic red algae are expected further investigation, our study provides a foundation for the following researches on the acclimation mechanisms of seaweeds to the extreme light environments in Antarctica.

Key words: Antarctic red algae; transcriptome; extreme light environmental acclimation; *Iridaea cordata*; *Curdiea racovitzae*