

DOI: 10.12264/JFSC2021-0212

不同磷酸盐浓度下浮游虫黄藻的转录组比较分析

李月^{1,2}, 王云龙², 欧阳珑玲²

1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 农业农村部东海渔业资源开发利用重点实验室, 上海 200090

摘要: 浮游虫黄藻可与共生虫黄藻一起维持珊瑚群落的健康。前期研究表明 1 株营浮游生活的虫黄藻(*Symbiodinium* sp. ECSFRI081109)在不同磷酸盐浓度培养下的生长速率和碱性磷酸酶活性有所差异。为了解其对不同磷酸盐浓度的响应机制, 本研究利用 RNA-Seq 技术对高磷酸盐初始浓度(35 $\mu\text{mol/L}$)和低磷酸盐初始浓度(0.15 $\mu\text{mol/L}$)下不同培养时间(第 0 天、第 5 天和第 10 天)的虫黄藻进行转录组测序并做比较分析。结果显示: 测序组装后获得 80955 个 Unigenes, 其中在 NR、GO、KEGG、eggNOG、SwissProt 以及 Pfam 数据库中共同注释的有 4407 个。对 5 个实验组的转录组数据进行比较分析, 得到 23 个与磷利用相关的差异表达基因, 主要有磷脂酶 A2、磷脂酶 B、磷脂酶 C、磷脂酶 D、碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、无机磷酸盐转运体、 Na^+ 依赖型磷酸盐转运体、线粒体磷酸盐转运蛋白基因。根据不同磷酸盐初始浓度培养下上述基因的表达量变化, 推测在低磷环境下, 虫黄藻可通过增强对无机磷酸盐的转运能力及利用磷酸酶分解有机磷以缓解磷胁迫, 从而维持细胞生长。本研究旨在深入了解浮游虫黄藻响应不同磷酸盐浓度的分子调控机制提供基础数据。

关键词: 营浮游生活; 虫黄藻; 无机磷; 转录组测序; 差异表达基因

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)04-0585-11

虫黄藻(*Zooxanthellae*)是一类黄褐色单细胞甲藻的总称, 一般分为 9 个系群(A-I)^[1]。大多数虫黄藻可与宿主形成稳定的互惠共生关系, 确保宿主能够适应营养贫瘠的海洋环境^[2-3]; 此外部分虫黄藻也可独立于宿主在海域中营浮游生活^[4-6]。赵振鲁等^[7]认为大量培养离体虫黄藻可以为宿主幼虫提供共生体, 是修复珊瑚礁生态系统的关键。Jenong 等^[8]也认为浮游和共生虫黄藻的生存对于维持健康的珊瑚群落至关重要, 研究浮游虫黄藻的意义由此凸显。目前对于浮游虫黄藻的研究大多集中在分类鉴定^[9-13]、对环境因素(温度、光照)的生理响应^[7,14], 营养盐氮对细胞生长的影响研究^[8]等。前期实验表明相较于高浓度磷酸盐环境下, 低浓度磷酸盐可诱导营浮游生活的虫黄

藻(*Symbiodinium* sp. ECSFRI081109)细胞碱性磷酸酶活性增强, 且在长期低磷酸盐环境下藻细胞可以维持生长(待发表)。然而, 目前尚无从分子机理方面解析浮游虫黄藻对磷酸盐的响应机制。

转录组学是以达到从 RNA 层面了解基因表达水平为目的, 研究特定细胞或组织在一定时间内所有基因转录情况, 探寻转录调控规律的一门学科^[15]。转录组测序技术(RNA-Seq)是一种通过统计分析细胞或组织中所有 RNA 的逆转录 cDNA, 以获取特定细胞或组织在一定时间内所有转录本和基因序列的高通量测序技术^[16]。该技术可以从 RNA 水平对浮游植物进行研究, 揭示生物生长发育调控及环境胁迫下的适应机制, 为进一步的研究提供关键信息^[17-21]。Li 等^[22]实验首次利用转录

收稿日期: 2021-05-08; 修订日期: 2021-05-12.

基金项目: 中国水产科学研究院东海水产研究所基本科研业务费项目(2016T04); 中国水产科学研究院科技创新团队项目(2020TD14).

作者简介: 李月(1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 浮游生物生理生态学; E-mail: liyuepassion@163.com

通信作者: 欧阳珑玲. 研究方向: 藻类生理及生物技术. E-mail: ouyangll@ecsf.ac.cn

组测序技术对单个共生虫黄藻细胞进行分析,初步揭示了虫黄藻与珊瑚礁之间的共生联系。对珊瑚和虫黄藻的共生系统进行转录组学研究发现,海洋污染胁迫情况下,虫黄藻细胞中与光合作用、糖酵解和电子转移等中心能量代谢相关的基因发生下调^[23]。Barshis 等^[24]研究了在热胁迫条件下,珊瑚-虫黄藻共生系统中两种不同虫黄藻的转录组数据,通过比较发现了许多与耐热相关的差异表达基因。然而转录组在浮游虫黄藻上的应用目前尚未见报道。

为了解浮游虫黄藻对磷酸盐响应的内在机制,本研究利用 Illumina Hi-SeqTM 2000 高通量测序平台对高、低两种磷酸盐初始浓度培养下的虫黄藻进行转录组测序,获得高质量基因序列。通过比较,分析不同磷酸盐浓度下的基因表达量,发现与磷利用相关的差异表达基因,为后期研究浮游虫黄藻在贫营养海域的生存机制提供了依据。

1 材料与方 法

1.1 藻种来源及培养

虫黄藻藻株由中国水产科学研究院东海水产研究所提供。配置盐度为 28 的人工海水,经 0.45 μm 滤膜过滤后高压蒸汽灭菌(121 $^{\circ}\text{C}$, 20 min),并在超净工作台中配置 f/2 培养基。培养基中加入终浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的氨苄青霉素、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的卡那霉素、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的链霉素和 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的庆大霉素保持藻细胞无菌。接种前,将 1 mL 藻液加至 5 mL 2216E 液体培养基中,20 $^{\circ}\text{C}$ 培养后观察,确保实验用的藻细胞处于无菌状态。

1.2 实验设计及取样

基于实验室培养所用 f/2 培养基和近年来我国东海区海域中磷酸盐浓度低值平均值设置高(35 $\mu\text{mol}/\text{L}$)、低(0.15 $\mu\text{mol}/\text{L}$)两个磷酸盐初始浓度组。将浓度为 3×10^7 cell/L 的无菌藻细胞接种至上述两种 f/2 培养基中。接种后的虫黄藻放置于光照培养箱中,培养温度为 20 $^{\circ}\text{C}$,光照强度为 50 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光暗比为 12 h : 12 h。取培养第 0 天的藻液,命名为对照组 C0;培养至第 5 天,取高、低磷酸盐初始浓度组的藻液,分别命名为处理组 H5 和 L5;培养至第 10 天,取高、低磷酸盐

初始浓度组的藻液,分别命名为处理组 H10 和 L10。共 5 个实验组,每组设置 3 个生物学重复。藻液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8000 g 离心 10 min,去除培养基后将藻细胞用液氮速冻,-80 $^{\circ}\text{C}$ 下保存,用于总 RNA 提取。

1.3 文库构建和上机测序

对照组 C0、处理组 H5、H10、L5 以及 L10 共 5 个样品的总 RNA 提取方法参照 Invitrogen TRIzol 试剂盒说明书操作进行。使用 1%琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 质量。

总 RNA 样本经检测合格后,将其中含 polyA 结构的 mRNA 运用 Oligo(dT)磁珠富集,离子打断较长的 mRNA 形成长度为 200~300 bp 的片段。以 6 碱基随机引物为原材料, RNA 为模板,加上逆转录酶等辅助酶合成 cDNA 第一链。随后以第一链 cDNA 为模板合成第二链 cDNA。利用 3'-5' 核酸聚合酶及外切酶进行 DNA 双末端修复操作。利用连接酶将含有标签的接头与 DNA 片段相连。使用 VAHTS DNA Clean Beads 纯化游离的接头和片段。为使文库大小为 400~500 bp,利用 PCR 选择性扩增富集文库片段。然后,通过 Agilent 2100 Bioanalyzer 进行质检。最后基于 Illumina Hi-SeqTM 2000 测序平台,运用第二代测序技术(next-generation sequencing, NGS),对文库进行测序。

1.4 测序数据的过滤、拼接

将原始下机数据过滤去除长度 50 bp 以下、带接头、序列平均质量低于 Q20(碱基识别准确率在 99%以上的碱基所占百分比)的 Reads。经选择后的 Reads,使用 Trinity 软件进行转录数据的从头拼接(*de novo assembly*)。

1.5 基因功能注释

通过过滤、拼接后得到 Transcript 序列文件。命名每个基因下最长的转录本为 Unigene,即该基因的代表序列。在 NR、GO、KEGG、eggNOG、SwissProt 以及 Pfam 数据库中对 Unigene 进行功能注释。

1.6 与磷利用相关基因差异表达分析

浮游植物可通过改变细胞内的磷分配、水解利用有机磷或增强细胞磷酸盐转运能力来应对环

境磷酸胁迫^[25-26], 因此对差异表达基因(differentially expressed gene, DEG)分析时重点关注磷脂酶、磷酸酶和磷酸盐转运蛋白基因。统计每个样品比对到每一个基因上的 Reads 数, 并计算每个基因的 FPKM 值(fragments per kilobase million)^[27], 采用 DESeq 对基因表达进行差异分析, 筛选表达差异倍数 $|\log_2\text{FoldChange}|>1$, 显著性 $P<0.05$ 的 DEG。

2 结果与分析

2.1 虫黄藻转录组注释及分析

2.1.1 测序数据统计与拼接结果 对照组 C0、处理组 H5、H10、L5 和 L10 在 Illumina Hi-SeqTM 2000 platform 测序产生原始读序, 各实验组转录数据结果如表 1 所示。原始数据中质量高于 Q20

的 Reads 数量的百分比范围为 97.37%~97.95%, 模糊碱基(N)所占百分比平均值为 0.0013%。将实验组不合格 Reads 进行去除后所得高质量读序用于后续组装。

经 *de novo* 拼接后, 共获得 156495 个 Transcripts, 总长度为 231642201 bp, 序列最大长度为 31642 bp, 平均长度为 1480.19 bp, GC 含量为 59.19%。长度大于 N50 的序列个数为 32932, 长度大于 N90 的序列个数为 106432(表 2)。获得 80955 个 Unigenes, 总长度为 115800513 bp, 序列最大长度为 31642 bp, 平均长度为 1430.43 bp, GC 含量为 59.62%。长度大于 N50 的序列个数为 17777, 长度大于 N90 的序列个数为 55127(表 2)。组装完整性较高, 可用于后续的注释分析。

表 1 虫黄藻转录组测序结果统计

Tab. 1 Statistical analysis of transcriptome sequencing results of *Symbiodinium* sp.

类别 category	C0	H5	H10	L5	L10
原始读序数 raw data	49231824	53771332	46732416	51552452	46302881
高质量读序数 clean data	46670413	50731401	44120353	48595610	43877001
Q20 比例/% Q20 ratio	97.37	97.88	97.95	97.85	97.90
N 比例/% N ratio	0.001022	0.001441	0.001237	0.001461	0.001332

表 2 虫黄藻转录组文库拼接序列特征

Tab. 2 Characteristics of *de novo* assembled sequences from transcriptome library of *Symbiodinium* sp.

类别 category	转录本 transcripts	基因 unigenes
序列总长/bp total length	231642201	115800513
序列数量 sequence number	156495	80955
最长序列长度/bp max length	31642	31642
平均值/bp mean length	1480.19	1430.43
N50	2056	1964
L50	32932	17777
N90	686	679
L90	106432	55127
GC 比例/% GC ratio	59.19	59.62

注: N50 和 N90 分别为将序列按长度从长至短排序, 累加序列的长度至不小于总长 50% 和 90% 的序列的长度。L50 和 L90 分别为长度大于或者等于 N50 和 N90 的序列数量。

Note: N50 and N90 are respectively the length of sequence at 50% and 90% of the total length, when we arrange all sequences from long to short. L50 and L90 are respectively the number of sequence that are longer than, or equal to the N50 length and the N90 length.

2.1.2 Unigene 功能注释及分类 将 Unigene 比对到六大功能数据库, 结果表明注释到 NR 数据库的有 27236 (33.64%), 注释到 GO 数据库的有 23998(29.64%), 注释到 KEGG 数据库的有 17867 (22.07%), 注释到 Pfam 数据库的有 32614 (40.29%), 注释到 eggNOG 的有 45387 (56.06%), 注释到 SwissProt 的有 26767 (33.06%) (表 3)。

为揭示虫黄藻转录组 Unigene 的功能分类, 通过 GO 数据库进行基因生物学特征功能分类。GO 分析结果表明, 被注释的基因参与了多种生理生化代谢途径, 涉及分子功能、细胞组分和生物过程 3 个方面。其中参与分子功能 13 类, 细胞组分 16 类, 生物过程 19 类(图 1)。分子功能方面, 涉及基因最多的是催化活性(2308, 9.62%), 其次是结合(571, 2.38%), 再次是结构分子活性(427, 1.78%), 电子载体活性(53, 0.22%)等参与较少; 细胞组分方面, 涉及基因最多的是细胞(2322, 9.68%), 其

表 3 Unigene 功能注释结果汇总
Tab. 3 Summary of Unigene functional annotation results

项目 item	基因数目 number of Unigenes	比例/% percentage
NR 注释 annotated in NR	27236	33.64
GO 注释 annotated in GO	23998	29.64
KEGG 注释 annotated in KEGG	17867	22.07
Pfam 注释 annotated in Pfam	32614	40.29
eggNOG 注释 annotated in eggNOG	45387	56.06
SwissPort 注释 annotated in SwissPort	26767	33.06
全部数据库均有注释 annotated in all databases	4407	5.44

次是细胞组分(2315, 9.65%), 再次是细胞器(1676, 6.98%), 拟核(5, 0.02%)最少; 生物过程方面, 涉及基因最多的是细胞过程(2362, 9.84%), 其次是代谢过程(2095, 8.73%), 再次是单组织过程(1413, 5.89%), 细胞杀伤(4, 0.02%)最少。

为进一步分析 Unigene 的功能, 进行了 eggNOG 功能分类分析。结果显示共 45387 个 Unigenes 根据功能特性被分成 25 类(图 2), 除仅用于一般功能预测和功能未知基因外, 最大的一类是翻译后修饰、蛋白质周转及伴侣(3704, 8.16%), 其次是信号转导机制(3272, 7.21%), 再次是翻译、核糖体结构

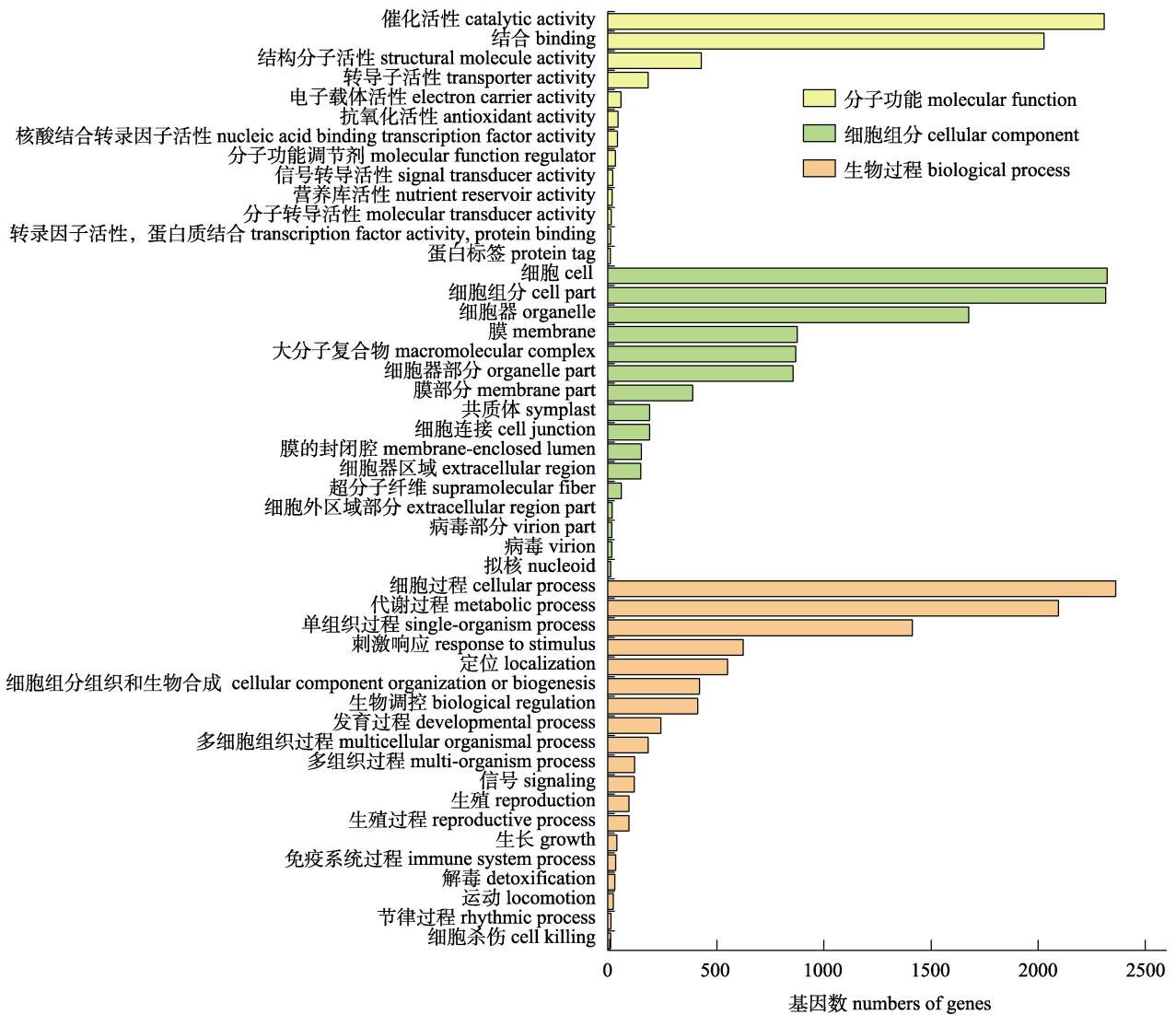


图 1 Unigene 的 GO 注释分布
Fig. 1 GO function classification of Unigene

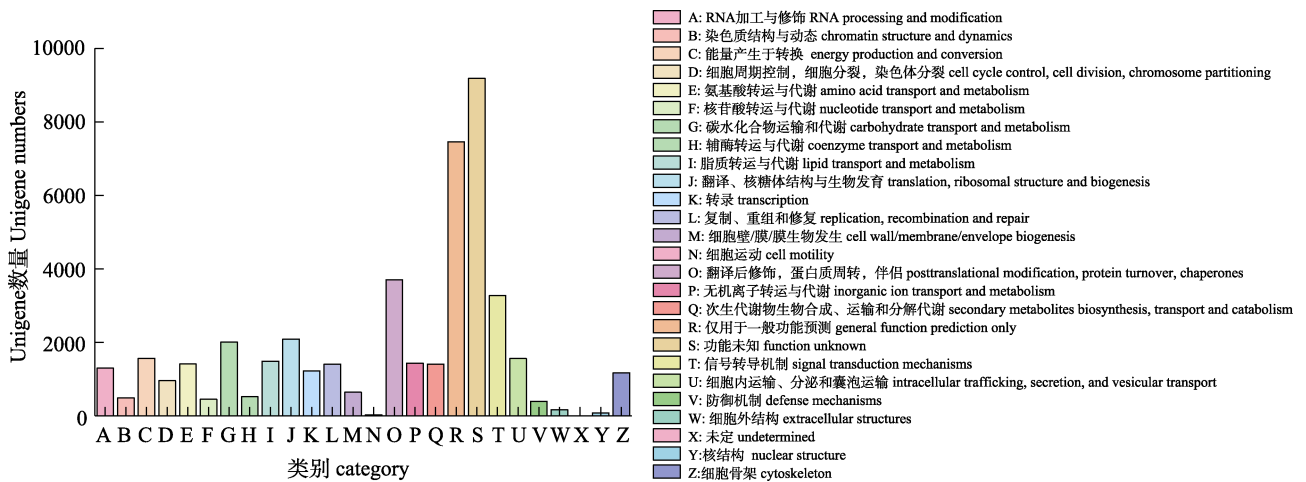


图 2 Unigenes 的 eggNOG 注释分布
Fig. 2 eggNOG function classification of Unigenes

和生物发育(2091, 4.61%), 而细胞外结构(168, 0.37%)、核结构(78, 0.17%)和细胞运动(24, 0.05%)较少。

2.2 不同磷酸盐条件下虫黄藻基因表达差异分析

2.2.1 差异表达基因概况 两两比较对照组 C0、处理组 H5、H10、L5、L10 间的基因表达量。根据比较得到的差异基因统计上调和下调基因的个数, 结果如表 4 所示。与 C0 相比, H5 有 1770 个差异表达基因明显上调, 2992 个差异表达基因明显下调; H10 有 2726 个差异表达基因明显上调, 4239 个差异表达基因明显下调。而 L5 与 C0 相比, 有 2001 个差异表达基因明显上调, 4238 个基因明显下调; L10 与 C0 相比, 有 1058 个差异表达基因明显上调, 4553 个基因明显下调。低磷条件可诱导虫黄藻细胞中更多基因发生表达变化, 且下调基因明显多于上调基因, 约为上调基因表达个数的 2 倍。在高磷酸盐初始浓度培养下, H10 相比于

H5, 有 960 个差异表达基因明显上调, 530 个基因明显下调; 在低磷酸盐初始浓度培养下, L10 相比于 L5 有 269 个差异表达基因明显上调, 812 个基因明显下调。可见, H10 相比于 H5 上调的差异基因出现了大幅增加, 而 L10 比 L5 存在更多的下调基因。两个不同磷酸盐初始浓度组样本间的比较发现, H5 相比于 L5 有 253 个差异表达基因明显上调, 55 个基因明显下调; H10 相比于 L10, 有 120 个差异表达基因明显上调, 24 个基因明显下调, 差异表达基因数量明显下降。

2.2.2 与磷利用相关的差异表达基因分析 虫黄藻转录组中注释得到 40 个编码磷脂酶的基因, 其中差异表达基因有 9 个(图 3), 包括 3 个磷脂酶 A2 基因, 2 个磷脂酶 B 基因, 1 个磷脂酶 C 基因和 3 个磷脂酶 D 基因。由图 3 可知, 在磷脂酶 A2 的基因中, TRINITY_DN63089_c0_g1 和 TRINITY_

表 4 虫黄藻各实验组间差异表达基因数目统计表
Tab. 4 Numbers of differentially expressed genes among samples of *Symbiodinium* sp.

对照组 control group	处理组 treated group	上调个数 up-regulated gene number	下调个数 down-regulated gene number	DEG 数 DEG numbers	比例/% percentage
C0	H5	1770	2992	4762	6.98
C0	H10	2726	4239	6965	9.87
C0	L5	2001	4238	6239	9.38
C0	L10	1058	4553	5611	8.04
H5	H10	960	530	1490	2.12
L5	L10	269	812	1081	1.56
L5	H5	253	55	308	0.46
L10	H10	120	24	144	0.20

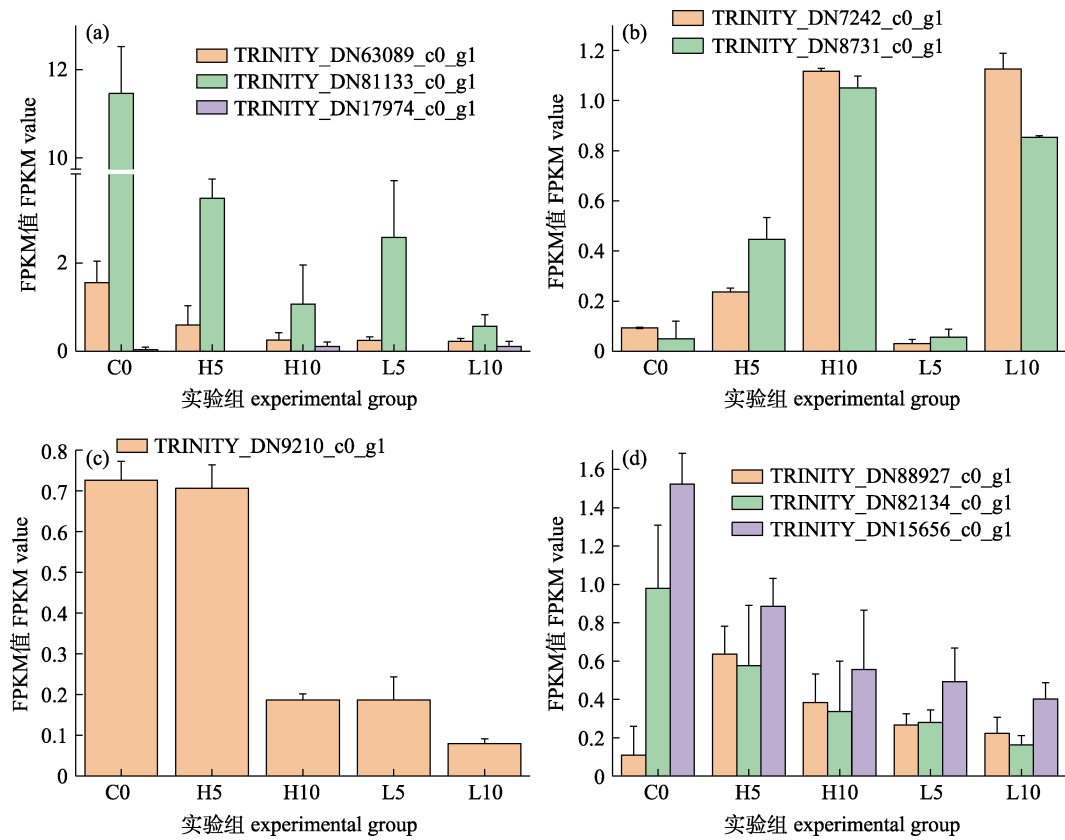


图 3 磷脂酶差异表达基因表达模式

a: 磷脂酶 A2; b: 磷脂酶 B; c: 磷脂酶 C; d: 磷脂酶 D.

Fig. 3 Transcriptional profile of the differentially expressed genes encoding phospholipase
a: phospholipase A2; b: phospholipase B; c: phospholipase C; d: phospholipase D.

DN81133_c0_g1 的基因表达量在高、低磷酸盐初始浓度下均随着培养时间增加而明显下调,且同一培养时间下低磷酸盐初始浓度组比高磷酸盐初始浓度组下降更明显;而 TRINITY_DN17974_c0_g1 呈现先下降后上升的变化情况。磷脂酶 B 的基因则在两种培养条件下的表达量变化有所不同。在高磷酸盐初始浓度下,2 个基因表达量均随培养时间明显升高;在低磷酸盐初始浓度下,两个基因的表达量先下降后明显升高。磷脂酶 C 基因的表达量在高、低磷酸盐初始浓度培养条件下变化相同,即随培养时间增加基因表达量下降,且与前者相比后者在第 5 天时便出现了明显下降。磷脂酶 D 的 3 个基因表达模式存在差异,TRINITY_DN88927_c0_g1 的基因表达量在两种培养条件下先上升后下降;TRINITY_DN82134_c0_g1 和 TRINITY_DN15656_c0_g1 的基因表达量则在两种培养条件下均随培养时间增加而下降。

在注释得到的 54 个磷酸酶编码基因中,差异表达基因有 6 个(图 4),包括 2 个碱性磷酸酶基因和 4 个酸性磷酸酶基因。其中,碱性磷酸酶基因 TRINITY_DN699_c0_g2 在两种培养条件下的表达量变化有所不同:在高磷酸盐初始浓度下,该基因的表达量随时间增加先上升后下降;而在低磷酸盐初始浓度下,该基因的表达量随培养时间增加明显大幅上升。另一个碱性磷酸酶基因 TRINITY_DN71357_c0_g1 表达量的变化则在两种培养条件下表现一致,即随培养时间增加而下降,且在 L5 和 L10 中下调得更加明显。酸性磷酸酶的 4 个基因在两种培养条件下的表达量变化较一致,但不同基因之间表达模式有所不同。TRINITY_DN13671_c0_g1 和 TRINITY_DN9937_c0_g1 基因表达量在两种培养条件下均呈现先下降后上升的变化趋势;TRINITY_DN23614_c0_g1 基因表达量随培养时间增加而升高;TRINITY_DN69826_c0_g1 基因表

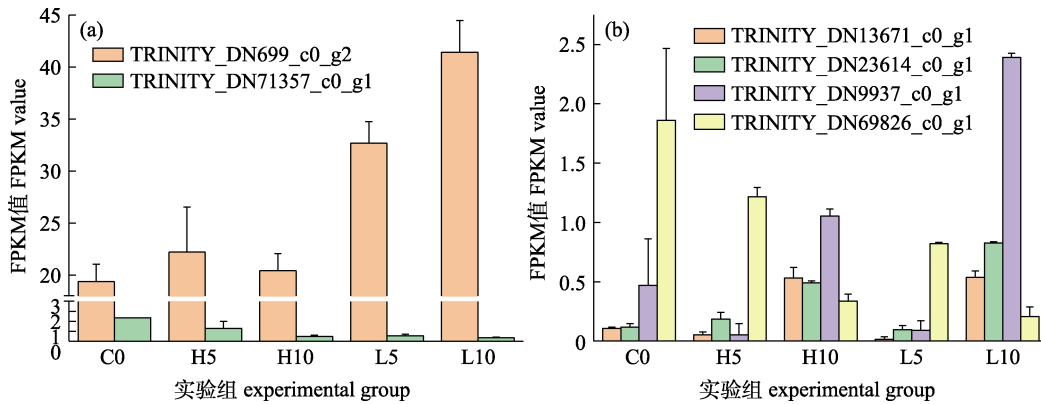


图 4 磷酸酶差异表达基因表达模式

a: 碱性磷酸酶; b: 酸性磷酸酶.

Fig. 4 Transcriptional profile of the differentially expressed genes encoding phosphatase a: alkaline phosphatase; b: acid phosphatase.

达量随培养时间增加而降低。相较于高磷酸盐初始浓度组, 低磷酸盐初始浓度组中酸性磷酸盐酶基因的变化更加明显。

在注释得到的 33 个编码磷酸盐转运体基因中, 差异表达基因有 8 个(图 5), 包括 3 个无机磷酸盐转运体基因, 2 个 Na⁺依赖型磷酸盐转运体基因, 3 个线粒体磷酸盐转运蛋白基因。无机磷酸盐转运体的基因在两种培养条件下的表现较一致, 但不同基因之间表达模式有所不同。TRINITY_DN21318_c0_g1 和 TRINITY_DN15970_c0_g1 基因的表达量在两种培养条件下培养至第 10 天时均呈现明显大幅上升。TRINITY_DN74778_c0_g1 基因的表达量则随培养时间增加而明显大幅下降。Na⁺依赖型磷酸盐转运体的 2 个基因在两种培养条

件下表达量变化存在差异。在高磷酸盐初始浓度下, 其表达量随时间增加呈上升-下降趋势, 且 TRINITY_DN18236_c0_g1 基因的变化比 TRINITY_DN4385_c1_g1 基因更加明显。在低磷酸盐初始浓度下, 2 个基因表达量均随时间增加而升高, 且相较于高磷酸盐初始浓度组, 基因在低磷酸盐初始浓度组中的变化更加明显。线粒体磷酸盐转运蛋白的 3 个基因在两种培养条件下表达量变化相同, 但不同基因的表达模式有所不同。TRINITY_DN12770_c0_g1 基因的表达量随时间增加先上升后下降; TRINITY_DN87838_c0_g1 基因则随时间增加而下降, 且在低磷酸盐初始浓度组中的变化更加明显; TRINITY_DN8324_c0_g1 基因的表达量在培养至第 5 天时无明显变化而在第 10 天时明显升高。

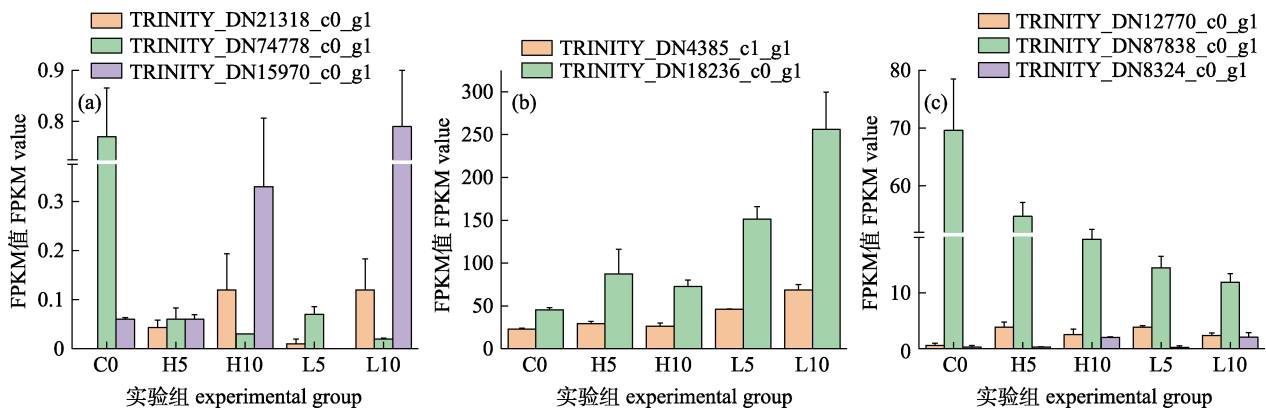


图 5 磷酸盐转运体差异表达基因表达模式

a: 无机磷酸盐转运体; b: Na⁺依赖型磷酸盐转运体; b: 线粒体磷酸盐转运蛋白

Fig. 5 Transcriptional profile of the differentially expressed gene encoding phosphate transporter a: inorganic phosphate transporter; b: sodium-dependent phosphate transporter; c: mitochondrial phosphate carrier protein

3 讨论

本研究中的浮游虫黄藻经显微技术及分子分类技术鉴定为虫黄藻 E 系群, 然而由于目前尚无虫黄藻 E 系群的基因组序列信息, 因此采用 *de novo* 拼接方法对所得转录组数据进行拼接。所有 Reads 经拼接后共获得 156495 个 transcripts, 其 N50 长度为 2056 bp; 80955 个 Unigenes, 其 N50 长度为 1964 bp。文库拼接质量与其他的无参考基因组的藻类转录组相近^[21,28], 可用于后续分析。

对不同磷酸盐初始浓度下不同培养时间的虫黄藻基因转录量进行两两比较, 共发现 23577 个基因存在差异表达。虽然培养至第 5 天时高磷酸盐初始浓度处理组与低磷酸盐初始浓度处理组藻细胞中基因表达差异较大, 但培养至第 10 天时两处理组差异表达基因明显减少, 表明随着磷酸盐消耗两处理组藻细胞状态逐渐趋于一致。

3.1 磷脂酶基因对磷的响应

磷脂酶是生物体中能够分解甘油磷脂的一类酶, 广泛存在于各种原核生物、真核生物及微生物中, 与生物的各项生命活动息息相关, 在细胞膜结构的维护和修复, 细胞内代谢机制和信号转导的调节, 细胞内磷脂的改性等方面发挥作用^[29-31], 主要分为 5 类: 磷脂酶 A1、A2、B、C 和 D。本研究构建的虫黄藻转录组中鉴定到上述 5 种磷脂酶基因。除磷脂酶 A1 外, 其余 4 种磷脂酶编码基因均存在差异表达, 且这些基因的表达模式各不相同。课题组前期研究结果表明高磷酸盐初始浓度组中磷酸盐浓度在第 5 天时迅速降低, 对虫黄藻细胞形成与低磷酸盐初始浓度组一样的磷胁迫状态(待发表)。磷胁迫导致磷脂酶 A2、磷脂酶 C 和磷脂酶 D(TRINITY_DN82134_c0_g1、TRINITY_DN15656_c0_g1)基因的表达量出现明显下调; 而磷脂酶 B 和磷脂酶 D(TRINITY_DN88927_c0_g1)基因却出现了上调。以上与张树峰^[21]在东海原甲藻对磷变化的差异表达基因研究中得出的结论不同, 这可能是藻种不同而产生了不同的响应。磷脂酶 B 又称溶血磷脂酶, 主要用于催化溶血磷脂分子中酯键水解, 生成脂肪酸和甘油磷酸胆碱或甘油磷酸乙醇胺等。磷脂酶 D

主要用于催化磷脂分子中磷酸与取代基团(如胆碱、乙醇胺等)间的酯键, 释放出取代基团。Liu 等^[32]发现离体培养虫黄藻可高效利用磷酸酯, 因此推测低磷条件下浮游虫黄藻可能利用磷脂酶 B 和磷脂酶 D 分解磷脂获得甘油磷酸从而加以利用^[33]。

3.2 磷酸酶基因对磷的响应

无机磷被证明是藻类可直接利用的磷源之一, 当海洋环境中磷酸盐浓度较低时会影响细胞的生长和生理过程。一般情况下, 藻细胞会利用磷酸酶分解出无机磷以维持生长。磷酸酶包括碱性磷酸酶和酸性磷酸酶, 前者是藻细胞在磷胁迫条件下最常发挥作用的磷酸酶。碱性磷酸酶通常位于细胞外表面, 环境中磷胁迫可诱导其活性升高, 以维持藻类在低磷条件下的生长^[34]。本研究鉴定到 2 个碱性磷酸酶基因, 其表达量结果截然不同, 可以看出, 不同碱性磷酸酶编码基因的表达特征有所不同^[33]。前期研究表明虫黄藻碱性磷酸酶活性与环境中无机磷浓度呈负相关(待发表), 因此推测可能是 TRINITY_DN699_c0_g2 编码的碱性磷酸酶在低磷条件下发挥作用。

海洋微藻具有在磷充足时大量积累和储存胞内磷的能力, 在低磷环境下, 诱导胞内酸性磷酸酶活性升高, 从而分解有机磷, 产生能够供植物直接利用的磷源^[35-36]。本研究中鉴定到的酸性磷酸酶基因 TRINITY_DN23614_c0_g1 和 TRINITY_DN9937_c0_g1 的表达量在处理组 H10、L10 中出现了明显性上调, 表明这两个基因编码的酸性磷酸酶在低磷酸盐环境下虫黄藻利用细胞内有机磷中发挥作用。

3.3 磷酸盐转运体基因对磷的响应

浮游植物体内利用磷需要健全的磷酸盐转运系统, 其中磷酸盐转运蛋白是关键的一环。本研究鉴定到的无机磷酸盐转运体是主要协同转运蛋白超家族(major facilitator superfamily, MFS)转运体中一员。MFS 是目前已知最大的膜转运蛋白超家族之一, 是植物吸收磷酸盐的一类重要离子耦合转运蛋白, 对磷酸盐浓度变化反应明显^[37-38]。当环境中磷酸盐浓度较低时, 无机磷酸盐转运体基因 TRINITY_DN21318_c0_g1 和 TRINITY_DN15970_

c0_g1 的表达量随培养时间大幅上升。无机磷酸盐转运体基因的表达量对磷胁迫的响应情况因不同的浮游植物种类而不同, 如亚历山大藻中的无机磷酸盐转运体基因的表达量的变化情况与虫黄藻相同, 但在东海原甲藻中却不因磷限制而上升^[21]。Na⁺依赖型磷酸盐转运体属于溶质载体蛋白家族 20 成员(solute carrier family 20, SLC20), 该家族蛋白是位于细胞表面的一类转运蛋白, 主要作用是从细胞间隙液中吸收磷酸盐以维持细胞正常功能。虫黄藻中 Na⁺依赖型磷酸盐转运体基因表达量随培养时间明显上调, 表明磷饥饿时该藻可通过增强对无机磷酸盐的转运从环境中获得更多磷。线粒体磷酸盐转运蛋白属于溶质载体蛋白家族 25 成员(solute carrier family 25, SLC25), 该转运蛋白位于线粒体外膜, 对植物细胞中 ATP 的浓度有重要调节作用^[39]。虫黄藻细胞中高表达量的线粒体磷酸盐转运蛋白基因(TRINITY_DN87838_c0_g1)在低磷条件下表达量出现下调, 而其他两个基因的表达量出现略微上调, 这与前两种转运体基因对磷的响应特征不同。

4 结论

本研究利用 Illumina Hi-SeqTM2000 高通量测序平台对不同磷酸盐初始浓度的虫黄藻进行转录组测序, 共获得 80955 个 Unigenes; GO 数据库注释显示 23998 个 Unigenes, 分为细胞组分、分子功能及生物过程 3 个方面, 共 48 类; eggNOG 数据库中注释到的 45387 个 Unigenes, 功能系统分为 25 类。虫黄藻转录组中注释得到磷脂酶、磷酸酶及磷酸盐转运体基因, 且各基因对磷响应的模式存在较大差异。根据这些基因表达量变化, 我们推测在低磷环境下浮游虫黄藻可通过增强对无机磷酸盐的转运以及磷酸酶分解有机磷以缓解磷胁迫而为细胞生长提供所需的磷。上述结论需要后续实验对各差异表达基因的功能进行验证后加以证实。

参考文献:

[1] LaJeunesse T C, Parkinson J E, Gabrielson P W, et al. Systematic revision of Symbiodiniaceae highlights the antiquity

and diversity of coral endosymbionts[J]. *Current Biology*, 2018, 28(16): 2570-2580.

- [2] Shinzato C, Shoguchi E, Kawashima T, et al. Using the *Acropora digitifera* genome to understand coral responses to environmental change[J]. *Nature*, 2011, 476(7360): 320-323.
- [3] Shinzato C, Inoue M, Kusakabe M. A snapshot of a coral "holobiont": A transcriptome assembly of the scleractinian coral, *Porites*, captures a wide variety of genes from both the host and symbiotic zooxanthellae[J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(1): e85182.
- [4] Davy S K, Allemand D, Weis V M. Cell biology of cnidarian-dinoflagellate symbiosis[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2012, 76(2): 229-261.
- [5] LaJeunesse T C, Smith R, Walther M, et al. Host-symbiont recombination versus natural selection in the response of coral-dinoflagellate symbioses to environmental disturbance[J]. *Proceedings Biological Sciences*, 2010, 277(1696): 2925-2934.
- [6] Thornhill D J, Howells E J, Wham D C, et al. Population genetics of reef coral endosymbionts (*Symbiodinium*, Dinophyceae)[J]. *Molecular Ecology*, 2017, 26(10): 2640-2659.
- [7] Zhao Z L, Liu J X, Zhang Y H, et al. Physiological responses of *Symbiodinium voratum* to temperature and light intensity[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2019, 50(2): 316-323. [赵振鲁, 刘甲星, 张跃环, 等. 离体培养的虫黄藻(*Symbiodinium voratum*)对温度和光照的生理响应[J]. *海洋与湖沼*, 2019, 50(2): 316-323.]
- [8] Jeong H J, Yoo Y D, Kang N S, et al. Heterotrophic feeding as a newly identified survival strategy of the dinoflagellate *Symbiodinium*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(31): 12604-12609.
- [9] Zhu X, Zhen Y, Yu Z G. Molecular phylogenetic analysis of a *Gymnodinium*-like species isolated from the Jiaozhou Bay of Shandong Province, China[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2011, 33(1): 153-162. [朱霞, 甄毓, 于志刚. 一株分离自胶州湾的裸甲藻形态相似种的分子系统学研究[J]. *海洋学报(中文版)*, 2011, 33(1): 153-162.]
- [10] Jeong H J, Lee S Y, Kang N S, et al. Genetics and morphology characterize the dinoflagellate *Symbiodinium voratum*, n. sp., (Dinophyceae) as the sole representative of *Symbiodinium* clade E[J]. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2014, 61(1): 75-94.
- [11] Gou W L, Sun J, Li X Q, et al. Phylogenetic analysis of a free-living strain of *Symbiodinium* isolated from Jiaozhou Bay, P.R. China[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2003, 296(2): 135-144.
- [12] Shao P, Chen Y Q, Zhou H, et al. Genetic variability in Gymnodiniaceae ITS regions: Implications for species identification and phylogenetic analysis[J]. *Marine Biology*, 2004, 144(2): 215-224.

- [13] Wilcox T P. Large-subunit ribosomal RNA systematics of symbiotic dinoflagellates: Morphology does not recapitulate phylogeny[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1998, 10(3): 436-448.
- [14] Lajeunesse T C, Trench R K. Biogeography of two species of *Symbiodinium* (Freudenthal) inhabiting the intertidal sea Anemone *Anthopleura elegantissima* (Brandt)[J]. *The Biological Bulletin*, 2000, 199(2): 126-134.
- [15] Huang Q Y, Wang Z K, Hu F, et al. RNA-seq based transcriptome analysis and the biosynthesis pathway of carotenoid in *Desmodemus* sp.[J]. *Journal of Applied Oceanography*, 2018, 37(1): 68-76. [黄琼叶, 王昭凯, 胡凡, 等. 栅藻全转录组测序与类胡萝卜素合成途径相关基因分析[J]. *应用海洋学学报*, 2018, 37(1): 68-76.]
- [16] Qi Y X, Liu Y B, Rong W H. RNA-Seq and its applications: A new technology for transcriptomics[J]. *Hereditas*, 2011, 33(11): 1191-1202. [祁云霞, 刘永斌, 荣威恒. 转录组研究新技术: RNA-Seq 及其应用[J]. *遗传*, 2011, 33(11): 1191-1202.]
- [17] Takeda E, Taketani Y, Nashiki K, et al. A novel function of phosphate-mediated intracellular signal transduction pathways[J]. *Advances in Enzyme Regulation*, 2006, 46: 154-161.
- [18] Yu M J, Yang S J, Lin X Z. De-novo assembly and characterization of *Chlorella minutissima* UTEX2341 transcriptome by paired-end sequencing and the identification of genes related to the biosynthesis of lipids for biodiesel[J]. *Marine Genomics*, 2016, 25: 69-74.
- [19] Tian J H, Zheng M G, Zheng L, et al. Transcriptome analysis of *Nannochloropsis gaditana* logarithm and stationary growth phases[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2013, 43(8): 54-59. [田金虎, 郑明刚, 郑立, 等. 海洋微拟球藻转录组在指数期和平台期的差异分析[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2013, 43(8): 54-59.]
- [20] Marcus Y, Gurevitz M. Activation of cyanobacterial RuBP-carboxylase/oxygenase is facilitated by inorganic phosphate via two independent mechanisms[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2000, 267(19): 5995-6003.
- [21] Zhang S F. Transcriptomic study on response of typical algal blooms in coastal waters of China to environmental phosphorus changes[D]. Xiamen: Xiamen University, 2016. [张树峰. 中国近海典型藻华种对环境磷变化响应的转录组学研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2016.]
- [22] Li M L, Liu H D, Guo Y X, et al. Single symbiotic cell transcriptome sequencing of coral[J]. *Genomics*, 2020, 112(6): 5305-5312.
- [23] Gust K A, Najjar F Z, Habib T, et al. Coral-zooxanthellae meta-transcriptomics reveals integrated response to pollutant stress[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 591.
- [24] Barshis D J, Ladner J T, Oliver T A, et al. Lineage-specific transcriptional profiles of *Symbiodinium* spp. unaltered by heat stress in a coral host[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2014, 31(6): 1343-1352.
- [25] Dyhrman S T, Jenkins B D, Rynearson T A, et al. The transcriptome and proteome of the diatom *Thalassiosira pseudonana* reveal a diverse phosphorus stress response[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(3): e33768.
- [26] Lin X, Zhang H, Huang B Q, et al. Alkaline phosphatase gene sequence characteristics and transcriptional regulation by phosphate limitation in *Karenia brevis* (Dinophyceae)[J]. *Harmful Algae*, 2012, 17: 14-24.
- [27] Mortazavi A, Williams B A, McCue K, et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(7): 621-628.
- [28] Shang T G. Effects of infection with *Karenia mikimotoi* on growth, development and photosynthesis of *Sargassum fusiformis* (phaeophyta) at different life stages[D]. Wenzhou: Wenzhou University, 2019. [尚天歌. 米氏凯伦藻(*Karenia mikimotoi*)感染对不同生活史阶段羊栖菜(*Sargassum fusiformis*)生长、发育及光合作用的影响[D]. 温州: 温州大学, 2019.]
- [29] Casado V, Martín D, Torres C, et al. Phospholipases in food industry: A review[M]//Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols. Humana Press, 2012: 495-523.
- [30] Pleskot R, Li J J, Žárský V, et al. Regulation of cytoskeletal dynamics by phospholipase D and phosphatidic acid[J]. *Trends in Plant Science*, 2013, 18(9): 496-504.
- [31] Munnik T, Musgrave A. Phospholipid signaling in plants: Holding on to phospholipase D[J]. *Science Signaling*, 2001, 2001(111): pe42.
- [32] Liu T T, Huang P, Liu J X, et al. Utilization of different dissolved organic phosphorus sources by *Symbiodinium voratum* in vitro[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2019, 95(11): fiz150.
- [33] Wang Z H, Liang Y, Kang W. Utilization of dissolved organic phosphorus by different groups of phytoplankton taxa[J]. *Harmful Algae*, 2011, 12: 113-118.
- [34] Lin S J, Litaker R W, Sunda W G. Phosphorus physiological ecology and molecular mechanisms in marine phytoplankton[J]. *Journal of Phycology*, 2016, 52(1): 10-36.
- [35] Wang H B, Miao Y X, Li X S, et al. Purification and characterization of acid phosphatase in four marine microalgae[J]. *Fisheries Science*, 2013, 32(3): 153-156. [王洪斌, 缪雨溪, 李信书, 等. 4 种海洋微藻酸性磷酸酶的分离纯化及其性质的研究[J]. *水产科学*, 2013, 32(3): 153-156.]
- [36] Wang H L, Hong H S, Hung B Q. A preliminary study on the bioactivity of dissolved organic phosphorus in marine environment[J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 1995, 34(3): 416-420. [王海黎, 洪华生, 黄邦钦. 海洋环境中溶解有机磷的生物活性初探[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 1995, 34(3): 416-420.]
- [37] Nussaume L, Kanno S, Javot H, et al. Phosphate import in plants: Focus on the PHT1 transporters[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2011, 2: 83.
- [38] Pedersen B P, Kumar H, Waight A B, et al. Crystal structure

of a eukaryotic phosphate transporter[J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 533-536.

[39] Zhu W, Miao Q, Sun D, et al. The mitochondrial phosphate

transporters modulate plant responses to salt stress via affecting ATP and gibberellin metabolism in *Arabidopsis thaliana*[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(8): e43530.

Comparative analyses on the transcriptome among free-living zooxanthellae under different phosphate concentrations

LI Yue^{1,2}, WANG Yunlong², OUYANG Longling²

1. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Key laboratory of East China Sea Fishery Resources Exploitation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China

Abstract: Free-living zooxanthellae, much like symbiotic zooxanthellae, contribute to maintaining the health of the coral community. Previous studies have shown that *Symbiodinium* sp., a free-living zooxanthellae, exhibits different responses to various phosphate concentrations in terms of growth and alkaline phosphatase activity. To understand how *Symbiodinium* sp. responds to dynamic changes in dissolved inorganic phosphorus (DIP), we carried out comparative analyses on the transcriptome of this dinoflagellate under two different initial phosphate concentrations in 0, 5, and 10 d. Initial phosphate concentrations of 0.15 and 35 $\mu\text{mol/L}$ were designed based on the phosphate concentration of an F/2 medium typically used in laboratory culture and a low average phosphate concentration of the East China Sea in recent years, respectively. The *de novo* assembly results showed that 231 642201 Transcripts and 80955 Unigenes were obtained; a total of 4407 (5.44%) Unigenes were co-annotated in the NR, gene ontology (GO), Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG), evolutionary genealogy of genes: non-supervised orthologous groups (eggNOG), SwissProt, and protein families (Pfam) databases. In addition, 27 236 (33.64%) Unigenes had significant matches in the NR database. All Unigenes annotated in the NR database were selected for annotation in the GO database. As such, a total of 23998 (29.64%) Unigenes were mapped into three categories: molecular function, cellular population, and biological process. Among the annotations in the GO database, there were 13 sub-categories of molecular functions, 16 sub-categories of cellular components, and 19 sub-categories of biological processes. The eggNOG functional analysis results showed that 45387 (56.06%) Unigenes were divided into 25 categories according to their functional characteristics. The largest category was post-translational modification, protein turnover and chaperone (3704, 8.16%), followed by signal transduction mechanism (3272, 7.21%), translation, ribosomal structure and biological development (2091, 4.61%), extracellular structure (168, 0.37%), nuclear structure (78, 0.17%), and cell movement (24, 0.05%). To obtain the differentially expressed genes related to phosphorus utilization, transcriptome data from five experimental groups were compared and analyzed. The results suggest that there were three phospholipase A2 genes, two phospholipase B genes, one phospholipase C gene, three phospholipase D genes, two alkaline phosphatase genes, four acid phosphatase genes, three inorganic phosphate transporter genes, two sodium-dependent phosphate transporter genes, and three mitochondrial phosphate transporter genes that were differentially expressed. According to the genetic expression profile of the differentially expressed genes, it was hypothesized that the free-living *Symbiodinium* sp. may continue growing under low phosphorus stress by enhancing its ability to transport inorganic phosphate into cells and utilizing organic phosphorus via phosphatase. This study improves the current understanding on the survival mechanism of zooxanthellae in oligotrophic seas. The findings pave an avenue to uncover the molecular regulation mechanism of *Symbiodinium* sp. in response to different phosphate concentrations.

Key words: free-living; zooxanthellae; dissolved inorganic phosphorus; transcriptome; differential gene expression

Corresponding author: OUYANG Longling. E-mail: ouyangll@ecsfa.ac.cn