

光对海带雌、雄配子体 *lhcf5* 和 *lhcf6* 基因相对转录量的影响

邹丹燕, 毕燕会, 周志刚

(上海海洋大学 农业部水产种质资源与利用重点开放实验室; 上海高校水产养殖学 E-研究院, 上海 201306)

摘要: 利用实时荧光定量 PCR (Q-RT-PCR) 方法分析了在不同光照强度、光质及有利于配子产生的条件下, *lhcf5* 和 *lhcf6* 基因在海带 (*Laminaria japonica*) 雌、雄配子体中转录量的变化。不同光照强度条件下(光源为白光), *lhcf5* 和 *lhcf6* 基因在黑暗中接近不转录; 雌配子体在光照强度 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 时转录量最高, 而雄配子体的最高转录量出现在 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 的光照强度处; 高于此光照强度, 2 个基因的转录量都会随光照强度增加而降低。相对于同强度的白光来说, 红光照射无论是短时间(3 d)还是长时间(7 d), 都会促进 2 个基因的相对转录水平; 蓝光对雌配子体中 2 个基因转录的促进作用不明显, 而对它们在雄配子体中的转录有一定的促进作用。将海带配子体从营养生长转至有利于配子发生的条件下, 雌、雄配子体 *lhcf5* 和 *lhcf6* 基因在第 1 天的转录量都明显增加; 雌配子体在第 4 天以及第 12 天(*lhcf6*)或第 14 天(*lhcf5*)均显著增加, 第 6 天及第 10 天接近不转录; 雄配子体在第 8 天及第 14 天增加, 第 10 天也近似不转录; 发育阶段其他时间内的转录量都低于营养生长期的。结果表明, 海带配子体 *lhcf5* 和 *lhcf6* 的转录受光诱导, 其中红光的促进作用最明显; 其转录可能因有利于配子体细胞叶绿体结构的完善及物质与能量的积累而利于细胞分裂与营养生长。[中国水产科学, 2009, 16(6): 850-858]

关键词: 海带; 配子体; *lhcf* 基因; 光照强度; 光质; 转录量

中图分类号: S93

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2009)06-0850-09

含褐藻素的光捕获蛋白复合体(Light harvesting complex containing fucoxanthin, LHCF)广泛存在于褐藻、硅藻和金藻中。从蛋白质的结构与功能来分析, 它们镶嵌于藻细胞的类囊体膜上以结合天线或辅助色素, 为光合反应中心捕获与传递光能。显然, 在配子体的生长与发育过程中, *lhcf* 家族基因的表达有利于叶绿体的发育及功能完善^[1]。

LHCF 的基因表达及蛋白质合成一般都会受到如光照强度和光质等外界因子的影响。Passaquet 和 Lichtl^[2] 通过 Northern 杂交显示金藻门(Chrysophyta)中 *Giraudyopsis stellifer* 一编码光捕获蛋白的 *cac* 基因转录受光诱导, 黑暗中该基因不表达。在一种小环藻 *Cyclotella cryptica* 中, 4 个编码光捕获蛋白 *fcp* 基

因的转录水平在一天中随光照强度增加而升高; 且所有 *fcp* 基因在红光下转录量较蓝、绿光高^[3]。在红光、蓝光、白光照射条件下, 巨藻(*Macrocystis pyrifera*)大部分 *fcp* 基因的转录水平存在差异, 且红光更能提高 *fcp* 基因的表达量^[4]。关于海带(*Laminaria japonica*)配子体 *lhcf5* 和 *lhcf6* 这 2 个基因的表达是否也受到光的调控尚未见报道。

光照强度、光质对海带配子体的生长与发育有着显著的影响。Hsiao 和 Druehl^[5] 发现糖海带(*L. saccharina*)配子体发育主要依赖光照条件, 而非营养状况。另外, 有研究表明, 蓝光、红光也能刺激海带配子体的生长^[6]及糖海带^[7-8]配子体的发育, 在糖海带中蓝光对配子体发育的促进作用比红光更

收稿日期: 2009-03-30; 修订日期: 2009-04-29.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30471328, 30671627); 教育部高等学校博士学科点专项基金项目(20060624001); 上海市教育委员会海洋生物学重点学科资助项目(J50701)。

作者简介: 邹丹燕(1985-), 女, 硕士研究生, 主要从事海藻生物技术研究. E-mail: dyzoum@stmail.shou.edu.cn

通讯作者: 周志刚, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事藻类学及藻类分子生物学的研究. Tel: 021-61900424; E-mail: zgzhou@shou.edu.cn

强; 当光照强度为 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 时, 皱海带 (*L. religiosa*) 配子体的繁殖率达到最大^[9]。而光对海带配子体生长发育的影响与 *lhcf5* 和 *lhcf6* 这 2 个基因的表达有何联系尚无明确的阐述。

本实验在海带雄配子体抑制消减 cDNA 文库构建^[10]与生物信息学分析^[11]及海带配子体 *lhcf5* (GenBank 登录号 EU751620) 和 *lhcf6* (GenBank 登录号 DQ250739)^[12]等 2 个基因的克隆基础上, 运用实时荧光定量 PCR (Quantitative Real-time PCR, Q-RT-PCR) 分析这 2 个基因在不同光照强度、光质以及有利于配子发生条件下的相对转录量, 以期探讨光对海带雌、雄配子体 *lhcf5* 和 *lhcf6* 基因表达的影响及其与配子体生长发育的关系, 为海带配子体生长发育的分子机理研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 海带配子体培养

按文献 [13] 的方法在 PES 培养基中分别培养海带雌、雄配子体。正常培养条件: 水温度为 $(17 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、光照强度 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、光周期 L : D=16 : 8。利用 Philips 直型荧光灯管提供白色冷光源。

1.1.1 不同光照强度条件下的培养 将海带雌、雄配子体用粉碎机 (Philips) 制成悬浮液, 离心收集配子体细胞并分装于试管中, 于正常条件下先培养 3 d 再后在黑暗中放置 12 h, 接着置于上述白色光源下, 以同样温度和光周期但不同光照强度 ($0 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、 $120 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 和 $160 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 条件下充气培养, 培养 6 h 时收集配子体, 以提取总 RNA。

1.1.2 不同光质条件下的培养 按 1.1.1 方法粉碎并分装海带配子体, 正常培养条件下先培养 3 d 并在黑暗中放置 12 h 后, 分别置于 1.1 所述同样温度但不同光质 (白光、蓝光、红光) 条件下充气培养, 光照强度均为 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。分别利用 Philips 的 TL⁰-D 36 W/03 型和 Osram 的 L 36 W/60 型荧光灯管提供蓝光 (400 ~ 480 nm) 和红光 (600 ~ 700 nm)。于第 3 天和第 7 天中午 12 : 00 收集配子体, 以提取总 RNA。

1.1.3 在有利于配子发生的条件下培养 鉴于海带配子体可能含有有利于异性配子产生的信号物质, 为此, 分别将收集的雌、雄配子体用研钵磨碎, 4°C 条件下 12 000 r/min 离心 5 min。取上清液用微孔滤膜 ($\phi=0.22 \mu\text{m}$) 除菌, 制备出信号物质粗提液, 置 -76°C 保存备用。

按 1.1.1 方法粉碎并分装海带雌、雄性配子体, 各加入 1 mL 异性信号物质粗提液, 然后在温度为 $(12 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、白光且光照强度为 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、光周期 L : D=10 : 14 有利于配子发生的条件下^[13-14]充气培养。分别于第 0 天、1 天、2 天、4 天、6 天、8 天、10 天、12 天和第 14 天中午 12 : 00 收集配子体, 以提取总 RNA。

1.2 RNA抽提

海带配子体在收集后立即用 RNAiso (TaKaRa) 试剂盒抽提总 RNA, 并用 DNase I (TaKaRa) 于 37°C 处理 30 min, 以酶解 DNA。然后加入 $1 \mu\text{L}$ 25 mmol/L EDTA 并于 65°C 处理 10 min 以灭活 DNase I。利用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 并于 -76°C 保存备用。

1.3 实时荧光定量PCR (Q-RT-PCR)

1.3.1 cDNA 第一链的合成 以海带配子体总 RNA 为模板, 用 PrimeScriptTM RT 试剂盒 (TaKaRa) 按照操作说明合成 cDNA 第一链。10 μL 反应体系包括 2 μL 5 $\times$ PrimeScriptTM 缓冲液、0.5 μL PrimeScriptTM RT 酶混合液 I、0.5 μL Oligo dT 引物 (50 $\mu\text{mol/L}$)、0.5 μL 随机引物 (100 $\mu\text{mol/L}$) 及总 RNA 150 ng。37 $^\circ\text{C}$ 温育 15 min, 85 $^\circ\text{C}$ 处理 5 s 以灭活反转录酶。产物于 -20°C 保存, 作为 RT-Q-PCR 反应的模板。

1.3.2 PCR 引物设计 以海带配子体 18S rRNA 基因 (GenBank 登录号 EU293553) 为内参^[15], 分析海带配子体在不同光质、光照强度及有利于配子发生等条件下, *lhcf5* 与 *lhcf6* 基因的转录水平。18S rRNA 基因的正向引物为 5'-TCGGACGGTTTTGTGGTGA-3', 反向引物为 5'-CCTTCCTTGATGTGGTAGCC-3'。根据海带配子体 *lhcf5* 和 *lhcf6* 基因的 cDNA (GenBank 登录号分别为 EU751620 和 DQ250739) 的序列, 利用 Primer

Premier 5.0 软件设计特异性引物。*lhcf5* 基因的正向引物为 5'-TTTTGCCGACATCCCACTCA-3', 反向引物为 5'-CCACGACCATACATTTATTCTACGC-3'; *lhcf6* 基因的正向引物为 5'-CCACCTCACCCAGCAGAACA-3', 反向引物为 5'-ATGGCATCCACGACGAAG-3'。引物合成由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.3.3 Q-RT-PCR 反应 在 iCycler iQ5 (Bio-Rad) 上完成 Q-RT-PCR 反应。20 μL 反应体系包括 10 μL SYBR Ex Script™ (TaKaRa), 0.4 μL (10 $\mu\text{mol/L}$) 正向引物、0.4 μL (10 $\mu\text{mol/L}$) 反向引物及 1 μL 上述合成的 cDNA 第一链。反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 15 s, 然后 45 个循环包括 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s、58.9 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s 及 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s。所有样品进行 3 次重复处理。

1.4 数据处理

利用 $2^{-\Delta C_t}$ 来表示 *lhcf5*、*lhcf6* 基因在每个样品中的相对表达量, 其中 $\Delta C_t = \text{目标基因扩增的 } C_t \text{ 值} - \text{内参 18S rRNA 基因 } C_t \text{ 值}$ 。所有值均为 3 个反应的平均值 $\pm$ 标准偏差 ($\bar{x} \pm \text{SD}$)。用 t 检验进行差异显著性分析, $P < 0.05$ 认为差异显著, $P < 0.01$ 认为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 光照强度对海带配子体 *lhcf5* 和 *lhcf6* 基因表达的影响

在不同光照强度条件下, *lhcf5* (图 1A) 和 *lhcf6* (图 1B) 基因在海带雌、雄配子体中的相对转录量总体变化趋势比较一致。当处于黑暗条件下, *lhcf5* 和 *lhcf6* 基因在雌、雄配子体中的转录量都很低, 接近不表达。若给予适量的光照强度, 例如在 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 或 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 的光照强度下, *lhcf5* 和 *lhcf6* 基因的相对转录量都得到较显著的提高 ($P < 0.05$)。结果表明, 一定的光强度可以诱导这 2 个基因在海带配子体中的转录。但过高的光照强度对它们的转录不利, 甚至还会抑制 (图 1), 这在雄配子体中的表现格外显著 ($P_{lhcf5} < 0.01$, $P_{lhcf6} < 0.05$)。如在 160 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 光照强度下, *lhcf5* 和 *lhcf6* 在雄配子体中的相对表达量分别为 4.216×10^{-3} 和 4.560×10^{-3} , 只相当于黑暗条

件下 (分别为 1.284×10^{-2} 和 1.067×10^{-2}) 的 32.8% 和 42.7%。

海带雌配子体的 *lhcf5* 和 *lhcf6* 基因, 在 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 光照强度条件下, 相对转录量都最高, 分别为 1.349×10^{-1} 和 8.209×10^{-2} , 相当于黑暗条件下 (分别为 1.04×10^{-2} 和 1.031×10^{-2}) 的 12.9 倍和 8 倍; 当高于此光照强度时, *lhcf5* 和 *lhcf6* 基因的相对转录量分别随光照强度增加而降低, 但也明显高于黑暗条件下的相对转录量, 即使在处于 160 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 光照强度下这个最低点 ($P_{lhcf5} < 0.1$, $P_{lhcf6} < 0.05$) 时。在雄配子体中, *lhcf5* 和 *lhcf6* 基因的最高相对转录量出现在 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 的光照强度条件下, 分别为 1.490×10^{-1} 和 1.303×10^{-1} , 相当于黑暗条件下的 11.6 倍和 12 倍。在本研究的光照强度范围内, 低于此光照强度时, 基因的相对转录量随光照强度增加而增强; 而高于此光照强度时, 转录量却随光照强度增加而降低。这些结果显示海带雄配子体 *lhcf5* 和 *lhcf6* 基因对较高光照强度的反应比雌配子体敏感。

黑暗条件下, *lhcf5* 和 *lhcf6* 基因在雌、雄配子体中的表达量均接近; 其他相同的光照强度条件下, 除 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 外, *lhcf5* 和 *lhcf6* 基因在雌配子体中的相对转录量高于雄配子体的; 但当光照强度为 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 时, *lhcf5* 和 *lhcf6* 基因在雄配子体中的表达量显著高于雌配子体的 (图 1, $P_{lhcf5} < 0.01$)。这些结果表明, 适当提高光照强度有利于 *lhcf5* 和 *lhcf6* 基因在雄配子体中的转录, 从而暗示有可能会促进海带雄配子体的生长。

2.2 光质对海带配子体 *lhcf5* 和 *lhcf6* 基因表达的影响

相对于白光来说, 红光无论是短时间 (3 d) 或长时间 (7 d) 光照射, 对 *lhcf5* (图 2A) 及 *lhcf6* (图 2B) 基因在海带雌、雄配子体中相对转录量的促进作用都是非常明显的, 且对雌配子体 *lhcf5* 及 *lhcf6* 基因相对转录量的促进作用高于雄配子体。红光的促进作用在短时间 (3 d) 内, 在雌配子体中表现更加显著 ($P_{lhcf5} < 0.05$, $P_{lhcf6} < 0.01$)。如红光条件下培养 3 d, *lhcf5* 和 *lhcf6* 基因在海带雌配子体中的相对转录量 (分别为 6.308×10^{-2} 和 4.461×10^{-2}) 为白光条

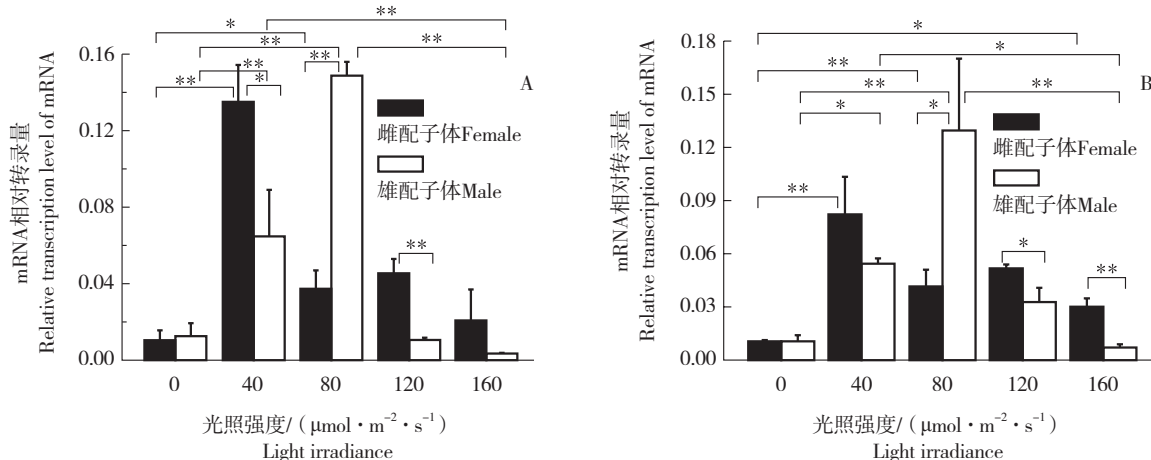


图1 不同光照强度条件下,海带配子体 *lhc5* (A)和 *lhc6* (B)基因的相对转录量

“*”表示差异显著;“**”表示差异极显著。

Fig. 1 Relative transcription of *lhc5* (A) and *lhc6* (B) of *L. japonica* gametophytes grown under various light intensities
“*” means significant difference; “**” means extremely significant difference.

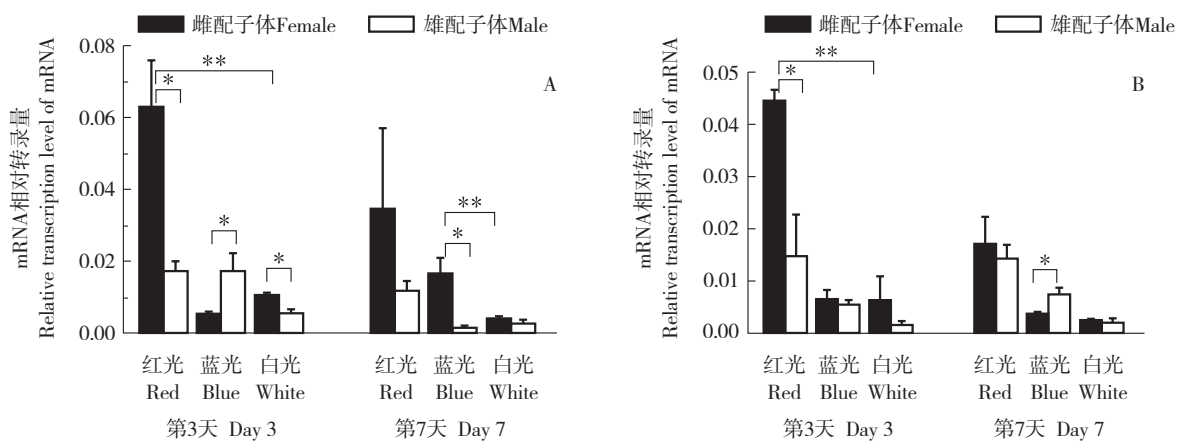


图2 不同光质条件下,海带配子体 *lhc5* (A)和 *lhc6* (B)基因的相对转录量

“*”表示差异显著;“**”表示差异极显著。

Fig. 2 Relative transcription of *lhc5* (A) and *lhc6* (B) of *L. japonica* gametophytes grown under red, blue and white light
“*” means significant difference; “**” means extremely significant difference.

件下(分别为 1.090×10^{-2} 和 6.375×10^{-3})的 5.8 倍和 7.0 倍;它们在海带雄配子体的相对转录量(分别为 1.758×10^{-2} 和 1.495×10^{-2})为白光条件下(分别为 5.893×10^{-3} 和 1.764×10^{-3})的 3.0 倍和 8.5 倍。相对于短时间来说,长时间(7 d)的红光照射下, *lhc5* 和 *lhc6* 基因在海带配子体中的相对表达量尽管比较低(图2),但它们与白光条件下的比值(雌配子体中,分别为 8.1 倍和 6.9 倍,雄配子体中为 4.1 倍和 6.7 倍)与短时间的照射结果是相近的。

与红光的显著促进作用不同,蓝光对海带配子体 *lhc5* 及 *lhc6* 基因转录的影响比较复杂(图2)。对于雌配子体来说,在短时间(3 d)的蓝光条件下, *lhc5* 基因的相对转录量(5.759×10^{-3})只为白光条件下(1.090×10^{-2})的 52.9%,而在长时间(7 d)照射条件下, *lhc5* 基因的相对转录量较白光条件有显著提高(图2A, $P < 0.05$); *lhc6* 基因的相对转录量,无论在短时间(3 d)或长时间(7 d)的蓝光照射条件下,它们与白光照射条件的相对转录量都很接近(图

2B)。但在雄配子体中,除长时间(7 d)的蓝光条件下 *lhcf5* 基因的相对转录量(1.801×10^{-3}) 只为白光(2.960×10^{-3}) 的 60.9% 外(图 2A),其他情况下,蓝光对这 2 个基因的转录均表现出显著的促进作用。说明蓝光对雌配子体 *lhcf5* 和 *lhcf6* 基因的转录促进作用不明显,但对雄配子体的转录有促进作用。

2.3 配子发生适宜条件下*lhcf5*与*lhcf6*基因的差异表达

当把海带配子体从较长日照[光周期为 16 h : 8 h (L : D)]、较低光照强度($40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 和较高温度(17 ± 1) °C 等有利于营养生长的条件下(营养生长期,图 3 中的第 0 天)转至短日照[光周期为 10 h : 14 h (L : D)]、较强光照强度($80 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 和较低温度(12 ± 1) °C 等有利于配子发生的条件下(图 3 中的第 1 天开始),海带配子体 *lhcf5* 和 *lhcf6* 基因在第 1 天的相对转录量显著提高,第 2 天开始后,2 个基因的相对转录量大都低于第 1 天的,这在雌配子体中表现特别显著($P < 0.01$)。如 *lhcf5* 和 *lhcf6* 基因在第 1 天时的相对转录量(分别为 6.983×10^{-2} 和 7.712×10^{-2}),分别是营养生长期(第 0 天)转录量(分别为 1.036×10^{-2} 和 2.120×10^{-2}) 的 6.743 倍和 3.638 倍。而从第 2 天开始,无论是 *lhcf5* 还是 *lhcf6* 基因,它们的值都低于第 1 天的。

在不考虑第 1 天的情况下,与营养生长期相比较,雌配子体中 *lhcf5* 和 *lhcf6* 基因的相对转录量在有利于配子产生条件(适宜条件)下,除第 4 天以及第 12 天(*lhcf6*) 或 14 天(*lhcf5*) 的显著增加外,其他的都不高于营养生长期,甚至在第 6 天及第 10 天接近不转录。雄配子体中 *lhcf5* 和 *lhcf6* 基因的相对转录量,除了在第 8 天及第 14 天的增加外,其他组都低于营养生长期,甚至在第 10 天, *lhcf5* 和 *lhcf6* 基因也近似不转录。总体来看,有利于配子产生的综合因素不太有利于 *lhcf5* 和 *lhcf6* 基因的转录。

雌配子体 *lhcf5* 和 *lhcf6* 基因的相对转录量在第 4 天以及第 12 天(*lhcf6*) 或第 14 天(*lhcf5*) 显著增加($P < 0.05$)。在雄配子体中,这 2 个基因的转录量也在第 8 天及第 14 天得到增加,可能是配子体对部分细胞分裂与配子囊形成共同需要物质和能量所产生的响应。

3 讨论

3.1 海带配子体*lhcf5*与*lhcf6*基因表达与光的关系

当在全黑暗条件下,海带配子体的 *lhcf5* 与 *lhcf6* 基因的相对转录量都很低,接近不表达;若给予适当的光照强度,表达水平都得到一定程度的提高(图 1)。说明海带配子体的 *lhcf5* 与 *lhcf6* 基因的转录与

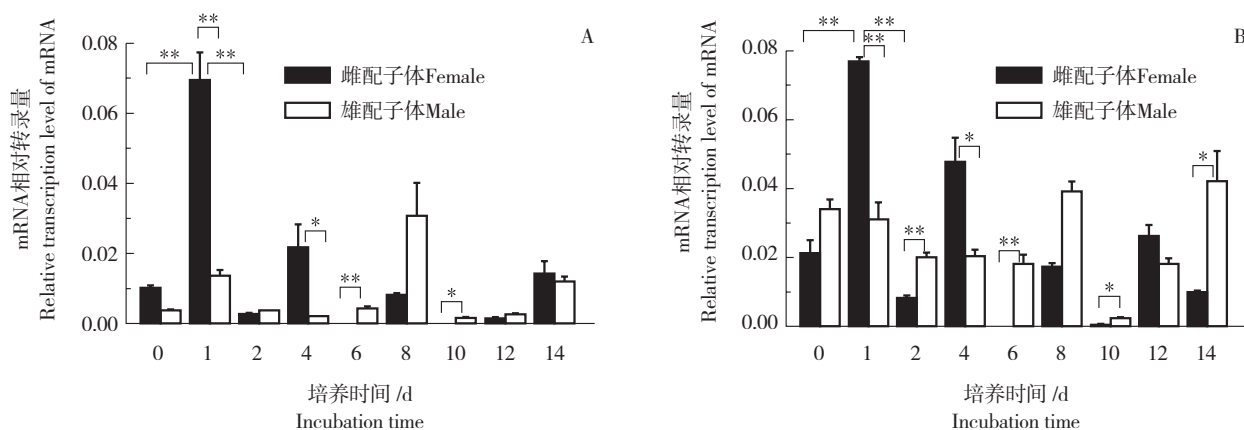


图 3 在有利于配子产生的条件下,海带配子体 *lhcf5* (A) 和 *lhcf6* (B) 基因的相对转录量

“*”表示差异显著($P < 0.05$);“***”表示差异极显著($P < 0.01$)。

Fig. 3 Relative transcription of *lhcf5* (A) and *lhcf6* (B) of *L. japonica* gametophytes grown under the favored conditions for gametogenesis

“*” means significant difference ($P < 0.05$); “***” means extremely significant difference ($P < 0.01$).

Giraudyopsis stellifer^[2] 一样也受到光的诱导。在一定光照强度范围内, 海带配子体 *lhcf5* 与 *lhcf6* 基因的相对转录量随光照强度增加而增强; 高于最高表达点的光照强度时, 这 2 个基因的相对转录量随光照强度增加而下调(图 1)。此规律与高等植物中同源基因 *lhcb* 的表达趋势一致^[16-17], 这可能与藻体对环境的适应能力和自我光保护有关。在光照过弱及营养不足等胁迫条件下, 增加类囊体膜上光捕获蛋白的表达, 更有效地进行光捕获及后续反应^[18-20]。在光照强度超过光合作用所需的最大限量时, 通过降低类囊体膜上捕光蛋白的表达, 以减少光量子的捕获及后续的电子传递进而降低暗反应效率。

与白光条件下相比, 海带配子体 *lhcf5* 和 *lhcf6* 基因在红光下的相对转录量, 无论在短时间(3 d)还是长时间(7 d)照射下, 都具有明显的促进作用(图 2)。这与在 *Cyclotella cryptica* 这种小环藻^[3] 以及巨藻^[4] 中的研究结果是一致的。海带自然生长的潮下带水体中主要分布的是短波长的蓝光和绿光^[21], 因此, 用适量的红光来培养海带配子体细胞, 细胞膜或细胞骨架上^[22] 可能存在的红光受体, 就可以把感知到的光信号转换成生物化学信号^[23], 后者直接结合在光捕获蛋白基因上游的启动子元件上, 从而激活 *lhcf* 基因的表达^[24]。基于蓝光对海带配子体 *lhcf5* 和 *lhcf6* 基因转录作用的复杂性, 推测在海带雌、雄配子体之间也可能存在同一蓝光受体但不同的转录调控机制或不同的蓝光受体系统。有关红光及蓝光受体、信号转导及对 *lhcf* 基因表达的直接证据有待进一步完善。

3.2 海带配子体 *lhcf5* 与 *lhcf6* 基因的表达与配子体生长发育的关系

生物体的营养生长与繁殖发育是一对矛盾的统一体。例如糖海带带片在产生孢子囊前就出现一段生长缓慢期^[25]; 在春季, 不产生孢子囊的糖海带所含碳水化合物量比能产生的低^[26]; 在有利于糖海带配子体生长与配子囊形成之前, 细胞中的 DNA、RNA、蛋白质和碳水化合物的量都达到最大值^[27], 说明在孢子囊或配子囊成熟之前需要进行干物质的积累。

因此, 海带配子体的营养生长表现为细胞分裂、体积及内含物的增加, 而繁殖发育表现为自丝状体末端细胞开始膨大以致配子囊的产生及配子的释放^[28-29]。但无论是配子体细胞营养生长还是繁殖发育, 都是通过其叶绿体进行光能的吸收、转换及碳同化来提供它们所需要的物质与能量。

通过研究发现, (1) 红光可促进海带配子体 *lhcf5* 与 *lhcf6* 基因的转录(图 2); 实际上, 红光可以促进糖海带配子体的营养生长、丝状体分支但不容易产生配子囊^[7-8]。(2) 相对红光来说, 蓝光对海带雄配子体 *lhcf5* 与 *lhcf6* 基因的转录有一定的促进作用, 但对雌配子体的作用不明显(图 2); 虽然蓝光对糖海带配子体的发育具有明显的诱导作用^[7-8], 但在海带配子体的生长中也表现出一定的促进作用^[6]。(3) 适量地增加光照强度(如 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 或 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), 可增加海带配子体 *lhcf5* 与 *lhcf6* 基因的转录量; 在 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 至 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 的光照强度下, 皱海带(*L. religiosa*) 雌配子体在光合作用与生长等方面表现得更出色^[9]; 在设计 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、 $70 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 和 $90 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 等光照强度下, $90 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 可以增加海带配子体克隆的生物量^[30]。因此, 可以推测 *lhcf5* 与 *lhcf6* 基因转录量的增加无论从细胞结构的完善还是从物质与能量的角度来说, 都有利于海带配子体细胞的分裂与营养生长。

当将海带配子体从营养生长状态突然转到有利于配子发生的条件下培养时, 由于配子体细胞还没有足够的时间调整自己以应对变化的环境, 鉴于 *lhcf5* 与 *lhcf6* 基因的转录主要受光的诱导(图 1), 因此随培养条件从低光照强度到高光照强度的突然转变, *lhcf5* 与 *lhcf6* 基因的表达量突然升高(图 3 中的第 1 天); 有报道认为, 低温也可能刺激光合作用短暂地增加^[31]。当在有利于海带配子发生的条件下, 虽然光照强度增加, 但 *lhcf5* 与 *lhcf6* 基因转录量除第 1 天外, 多数低于营养生长时的转录量(图 3), 表明有利于海带配子发生的条件是不利于配子体 *lhcf5* 和 *lhcf6* 等基因的转录, 从而可能因能量与物质的不

足导致配子体细胞分裂受阻,以转向发育生长为主并产生配子。

从海带配子形态发生及发育角度分析,并非所有的配子体细胞都进行同步发育^[28-29,32]。当丝状配子体末端细胞产生配子囊时,其他细胞还得生存或可能以比营养生长低的速度来进行细胞分裂,虽然较低温度不利于细胞分裂^[7-8,33],但此时的光照强度是营养生长期的2倍。当使用配子体细胞克隆在棕绳上进行海带育苗时,1到2个星期在棕绳上就可以肉眼发现增加了许多的配子体,尽管育苗之初使用的配子体量非常少。说明有利于配子发生的条件下,海带配子体细胞仍可以较慢的速度分裂、生长。这就是为什么雌配子体 *lhcf5* 与 *lhcf6* 基因在配子体发育过程的第4天或第12天、而雄配子体在第8天或第14天的转录量比营养生长期高的原因之一(图3)。值得关注的是 *lhcf5* 与 *lhcf6* 基因在雌、雄配子产生过程中的较高转录先后顺序,与配子形成及释放的顺序比较吻合^[34]。推测 *lhcf5* 与 *lhcf6* 基因在雌、雄配子产生过程中的较高转录也有利于物质与能量的积累并分配至配子囊,便于释放配子、完成受精过程。

参考文献:

- [1] Peter H, Markus F, Suneel K. Algal sensory photoreceptors [J]. J Phycol, 2001, 37: 668-676.
- [2] Passaquet C, Lichtl C. Molecular study of a light-harvesting apoprotein of *Giraudyopsis stellifer* (Chrysophyceae) [J]. Plant Mol Biol, 1995, 29: 135-148.
- [3] Oeltjen A, Krumbein W E, Rhiel E. Investigations on transcript sizes, steady state mRNA concentrations and diurnal expression of genes encoding fucoxanthin chlorophyll a/c light harvesting polypeptides in the centric diatom *Cyclotella cryptica* [J]. Plant Biol, 2002, 4: 250-257.
- [4] Apt K E, Clendennen S K, Powersand D A, et al. The gene family encoding the fucoxanthin chlorophyll proteins from the brown alga *Macrocystis pyrifera* [J]. Mol Gen Genet, 1995, 246: 455-464.
- [5] Hsiao S I C, Druehl L D. Environmental control of gametogenesis in *Laminaria saccharina*. IV. *In situ* development of gametophytes and young sporophytes [J]. J Phycol, 1973, 9: 160-164.
- [6] Shi C J, Kataoka H, Duan D L. Effects of blue light on gametophyte development of *Laminaria japonica* (Laminariales, Phaeophyta) [J]. Chin J Oceanol Limnol, 2005, 23: 323-329.
- [7] Lüning K, Dring M J. Reproduction induced by blue light in female gametophytes of *Laminaria saccharina* [J]. Planta, 1972, 104: 252-256.
- [8] Lüning K, Dring M J. Reproduction, growth and photosynthesis of gametophytes of *Laminaria saccharina* grown in blue and red light [J]. Mar Biol, 1975, 29: 195-200.
- [9] Lee J A. Gametogenesis and early sporophyte development of *Laminaria religiosa* Miyabe in the east coast of Korea [J]. Korean J Phycol, 1992, 7: 109-119.
- [10] 史西志, 毕燕会, 周志刚. 海带雄性配子体差异表达基因片段的克隆及筛选 [J]. 水产学报, 2005, 29: 666-669.
- [11] 陆广琴, 欧阳珑玲, 周志刚. 海带雄配子体抑制消减 cDNA 文库的生物信息学分析 [J]. 中国水产科学, 2009, 16 (2): 221-229.
- [12] 毕燕会, 周志刚. 海带配子体叶绿素 *a/c* 结合蛋白基因 *lhcf6* 的序列特征与系统发生分析 [J]. 高技术通讯, 2008, 1: 84-90.
- [13] 周志刚, 吴超元. 海带无性繁殖系的形成及孢子体诱导 [J]. 生物工程学报, 1998, 14: 109-111.
- [14] 方宗熙, 欧毓麟, 崔竞进, 等. 海带配子体无性繁殖系培育成功 [J]. 科学通报, 1978, 23: 115-116.
- [15] 毕燕会, 邹丹燕, 周志刚. 海带配子体 18S rRNA 基因的克隆、序列分析及其作为内参基因的应用 [J]. 华北农学报, 2009, 24: 49-54.
- [16] Escoubas J M, Lomas M, LaRoche J, et al. Light intensity regulation of *cab* gene transcription is signaled by the redox state of the plastoquinone pool [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 10 237-10 241.
- [17] Pursiheimo S, Mulo P, Rintamäki E, et al. Coregulation of light-harvesting complex II phosphorylation and *lhcb* mRNA accumulation in winter rye [J]. Plant J, 2001, 26: 317-327.
- [18] Eppard M, Krumbein W E, von Haeseler A, et al. Characterization of *fcp4* and *fcp12*, two additional genes encoding light harvesting proteins of *Cyclotella cryptica* (Bacillariophyceae) and phylogenetic analysis of this complex gene family [J]. Plant Biol, 2000, 2: 283-289.
- [19] Papagiannakis E, van Stokkum I H M, Fey H, et al. Spectroscopic characterization of the excitation energy transfer in the fucoxanthin-chlorophyll protein of diatoms [J]. Photosynth Res, 2005, 86: 241-250.
- [20] Dolganov N A, Bhaya D, Grossman A R. Cyanobacterial protein with similarity to the chlorophyll *a/b* binding proteins of higher plants: evolution and regulation [J]. Plant Biol, 1995, 92: 636-640.
- [21] Katoh T, Mimuro M, Takaichi S. Light-harvesting particles isolated from a brown alga, *Dictyota dichotoma*. A supramolecular assembly of fucoxanthin-chlorophyll-protein complexes [J]. Biochim Biophys Acta, 1989, 976: 233-240.

- [22] Wada M, Grolig F, Haupt W. Light-oriented chloroplast positioning. Contribution to progress in photobiology [J]. J Photochem Photobiol, 1993, 17: 3–25.
- [23] Smith H. Phytochromes and light signal perception by plants—an emerging synthesis [J]. Nature, 2000, 407: 585–591.
- [24] Golden S S. Light-responsive gene expression in cyanobacteria [J]. J Bacteriol, 1995, 177: 1 651–1 654.
- [25] Lüning K. Photoperiodic control of sorus formation in the brown alga *Laminaria saccharina* [J]. Mar Ecol Prog Ser, 1988, 45: 137–144.
- [26] Lee J A, Brinkhuis B H. Reproductive phenology of *Laminaria saccharina* (L.) Lamour. (Phaeophyta) at the southern limit of its distribution in the northwestern Atlantic Ocean [J]. J Phycol, 1986, 22: 276–285.
- [27] Hsiao S I C, Druehl L D. Environmental control of gametogenesis in *Laminaria saccharina*. II. Correlation of nitrate and phosphate concentrations with gametogenesis and selected metabolites [J]. Can J Bot, 1973, 51: 829–839.
- [28] Williams J L. The gametophytes and fertilization in *Laminaria* and *Chorda*. (Preliminary account.) [J]. Ann Bot, 1921, 35: 603–607.
- [29] Maier I, Müller D G. Antheridium fine structure and spermatozoid release in *Laminaria digitata* (Phaeophyceae) [J]. Phycologia, 1982, 21: 1–8.
- [30] 杨迎霞, 罗世菊, 解建祖, 等. 光照强度对海带配子体克隆生长的影响 [J]. 水产科技情报, 2002, 29 (3): 114–116.
- [31] Havaux M. Effects of chilling on the redox state of the primary electron acceptor QA of photosystem II in chilling-sensitive and resistant plant species [J]. Plant Physiol Biochem, 1987, 25: 735–743.
- [32] Lüning K. Egg release in gametophytes of *Laminaria saccharina*: Induction by darkness and inhibition by blue light and U.V. [J]. Br Phycol J, 1981, 16: 379–393.
- [33] Lüning K, Neushul M. Light and temperature demands for growth and reproduction of laminarian gametophytes in southern and central California [J]. Mar Biol, 1978, 45: 297–309.
- [34] Yabu H. Early development of several species of Laminariales in Hokkaido [J]. Mem Fac Fish Hokkaido Univ, 1964, 12: 1–72.

Effects of light on the relative transcription of *lhcf5* and *lhcf6* genes from the gametophytes of *Laminaria japonica*

ZOU Dan-yan, BI Yan-hui, ZHOU Zhi-gang

(Key Laboratory of Genetic Resources and Their Applications in Aquaculture, Aquaculture E-Institute of Shanghai Municipal Education Commission, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The relative transcription of *lhcf5* and *lhcf6* genes between male and female gametophytes of *Laminaria japonica* grown under different wave lengths of light, light intensities and the conditions favorable for the gametogenesis was estimated by using quantitative real-time PCR (Q-RT-PCR). The *lhcf5* and *lhcf6* genes were transcribed very little at dark. They reached a maximum in transcription under $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ in males, and under $80 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ in females. When light irradiance was higher than the most moderate one, the relative transcription level of *lhcf5* and *lhcf6* genes decreased while light intensity increased. Compared to the illumination only with white light at the same irradiance, red light could significantly promote the relative transcription of the two genes for a both short (3 d) and long (7 d) illumination time. Blue light had a positive effect on promoting transcription of the two genes in the male gametophytes, on the contrary, its effect on females was not clear. When transferred to the conditions favorable for gametogenesis from vegetative growth, both male and female gametophytes showed a remarkably increased transcription level of *lhcf5* and *lhcf6* genes on the first day. In addition, *lhcf6* and *lhcf5* genes were transcribed higher on days 4 and 12 (*lhcf6*) or day 14 (*lhcf5*) in female gametophytes, even if then were nearly not transcribed on Days 6 and 10. By contrast, there was an increase of the transcription of these genes on Day 8 and 14 in males, even if they were nearly not transcribed on Day 10. These manifested a lower transcription level on other days during the developmental stages than that of the vegetative growth period. These results suggest that the regulation of *lhcf5* and *lhcf6* genes can be induced by light, among which red light can promote the transcription level significantly. It was further deduced that the transcription of *lhcf5* and *lhcf6* genes is not only helpful to cellular substance and energy storage but also to construction of chloroplast of the gametophytes, all providing good materials to cell division and vegetative growth. [Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16 (6): 850–858]

Key words: *Laminaria japonica*; male gametophyte; female gametophyte; *lhcf* genes; light; transcription

Corresponding author: ZHOU Zhi-gang. E-mail: zgzhou@shou.edu.cn