

## 鼠尾藻基因表达对干露胁迫响应的初步研究

刘福利, 王飞久\*, 孙修涛, 汪文俊, 梁洲瑞, 马兴宇

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

**摘要:** 为阐释鼠尾藻对干露胁迫的适应机制, 本研究应用 RNA-Seq 技术从基因表达水平上研究了鼠尾藻对干露胁迫的分子响应过程。对照组 CO1 获得 17 532 085 条 clean reads, 3 h 干露胁迫的处理组 DR2 获得 14 479 820 条 clean reads。CO1 中检测到的表达基因数为 20 966 个, DR2 中检测到的表达基因数为 20 588 个。CO1 和 DR2 组间差异表达的基因总数为 476 个; 相对于 CO1, DR2 中表达上调的基因数为 135 个 (28.36%), 表达下调的基因数为 341 个 (71.64%)。GO 分析共富集得到 915 个 GO term, 其中 143 个 GO term 涉及的基因表达上调, 860 个 GO term 涉及的基因表达下调。pathway 富集分析发现 104 个代谢途径被富集, 其中表达上调基因参与的代谢途径数为 10 个, 表达下调基因参与的代谢途径为 101 个。差异表达基因编码热休克蛋白家族、抗氧化酶系统、与蛋白合成、加工及降解的相关因子等。以上结果表明, 鼠尾藻对干露胁迫的分子响应是一个复杂的过程, 涉及众多生化代谢途径和信号转导途径。

**关键词:** 鼠尾藻; 干露胁迫; 基因表达; RNA-Seq

**中图分类号:** Q 785; S 968.4

**文献标志码:** A

鼠尾藻隶属于褐藻门 (Phaeophyta)、褐藻纲 (Phaeophyceae)、墨角藻目 (Fucales)、马尾藻科 (Sargassaceae)、马尾藻属 (*Sargassum*), 是太平洋西部特有的暖温带性海藻, 在我国北起辽东半岛南至雷州半岛均有分布<sup>[1]</sup>。鼠尾藻具有较高的经济价值, 在水产饵料、医药 (抗菌、抗肿瘤等活性物质提取)、工业原料 (褐藻胶等提取) 等领域具有应用价值和潜力<sup>[2]</sup>。鼠尾藻被认为是海参的天然优质饵料, 近年来随着海参产业的快速发展, 鼠尾藻市场需求量不断攀升, 导致其野生资源被严重消耗和破坏<sup>[3-4]</sup>。尽管当前已建立起较为成熟的鼠尾藻苗种人工繁育以及养成的技术体系<sup>[3-7]</sup>, 但是鼠尾藻野生资源遭受破坏的局面并未被彻底扭转, 鼠尾藻野生资源依然面临着巨大威胁。

鼠尾藻集中生于中、低潮带的硬质基质上, 少量生于高、中潮带的水洼或石沼中, 其对潮间带环境具有较强的适应力, 甚至在退潮后较长时期暴露于日光下亦可生长<sup>[1]</sup>。鼠尾藻是潮间带的一种优

势马尾藻种, 其藻体较大, 甚者可达 2 m 以上, 可与其他马尾藻类及大型褐藻构成海藻床, 对近海生态平衡维护和环境修复具有重要作用<sup>[8]</sup>。鼠尾藻野生资源的严重消耗、破坏, 势必降低鼠尾藻群体对近海的生态贡献, 进而对近海的生态平衡产生不良影响。因此, 保护日渐稀缺的鼠尾藻资源、构建鼠尾藻资源修复技术成为当前鼠尾藻研究的热点之一。生长于潮间带的鼠尾藻在低潮时经常会受到干露胁迫, 前期研究表明干露是影响鼠尾藻生长和存活的关键因子<sup>[9-10]</sup>, 因此研究鼠尾藻对干露胁迫的适应机制对鼠尾藻资源保护、修复和藻场建设具有重要意义。本实验从基因表达的水平上, 研究鼠尾藻对干露胁迫的分子响应过程, 以为鼠尾藻干露胁迫适应机制的阐释提供理论支持。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

本研究以鼠尾藻幼苗为材料, 藻体长度约为

收稿日期: 2013-09-24 修回日期: 2013-12-09

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划 (2012AA10A413); 中国科学院实验海洋生物学重点实验室开放基金资助

通信作者: 王飞久, E-mail: wangfj@ysfri.ac.cn

3~5 cm,于2013年3月27日采集于青岛太平角潮间带的岩礁上。藻体经自然海水清洗、去除附着物后,置于海水中迅速带回实验室(约1 h内)。鼠尾藻用灭菌过滤海水仔细清洗3次,尽量除净附着物后于自然海水中暂养3 d。

暂养的光照度、光周期和温度分别设置为3 500 lx、光暗周期12 h:12 h和21 ℃。挑选20株生长良好的鼠尾藻,其中10株于暂养条件下继续培养,另外10株置于干燥的灭菌培养皿中进行干露胁迫3 h。正常培养的鼠尾藻为对照组,标记为CO1,胁迫处理的鼠尾藻为处理组,标记为DR2。胁迫处理结束后,用吸水纸除去CO1和DR2藻体表面水分后,立即将CO1和DR2用液氮速冻,并于-80 ℃下保存备用。

## 1.2 RNA-seq 分析

**总 RNA 提取及检测** 取冷冻的藻体约0.1 g,于液氮中快速研磨成粉末,然后按照Pearson等<sup>[11]</sup>的研究方法进行总RNA提取。为保证构建文库的质量,我们用Agilent 2100 Bioanalyzer(Agilent Technologies,美国)对提取的RNA样品的浓度、纯度及完整度进行检测,符合以下标准的总RNA样本用于文库构建:浓度>200 ng/μL,  $1.8 \leq OD_{260/280} \leq 2.2$ , RIN(RNA integrity number)  $\geq 7.5$ 。

**文库构建及 RNA-seq** 样品提取总RNA后,总RNA加热打开二级结构后用带有Oligo(dT)的磁珠富集mRNA,加入适量打断试剂,高温条件下使其片断化,再以片断后的mRNA为模板,合成cDNA,经过磁珠纯化、末端修复、3'末端加碱基A、加测序接头后,进行PCR扩增,从而完成整个文库制备工作。构建好的文库用Agilent 2100 Bioanalyzer和ABI StepOnePlus Real-Time PCR System进行质量和产量检测,文库质控合格后使用Illumina HiSeq™ 2000进行测序。

**数据分析** 原始序列数据经过杂质去除后得到的数据为clean reads,作为后续分析的基础。使用短reads比对软件SOAPaligner/SOAP2将clean reads比对到本实验室前期得到的转录组序列上<sup>[12]</sup>。基因表达量的计算使用RPKM法<sup>[13]</sup>(reads per kb per million reads),将q-value  $\leq 0.005$ 且倍数差异不低于2倍的基因作为差异表达基因(DEG)。该分析首先把所有差异表达基因向Gene Ontology数据库(<http://www.geneontology.org/>)的各个term映射,计算每个term的基因数目,然后应用超几何检验,找出与整个基因组背景相比,在差异表达基因中显著富集的GO条目。另外,通过pathway显著性富集确定差异表达基因参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径。

geneontology.org/)的各个term映射,计算每个term的基因数目,然后应用超几何检验,找出与整个基因组背景相比,在差异表达基因中显著富集的GO条目。另外,通过pathway显著性富集确定差异表达基因参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径。

## 2 结果

### 2.1 RNA-seq 分析

总RNA样品的检测结果表明,经富集的CO1总RNA浓度为517 ng/μL,  $OD_{260/280} = 1.97$ , RIN = 7.8; DR2总RNA浓度为527 ng/μL,  $OD_{260/280} = 1.97$ , RIN = 7.8,两者都符合建库的标准。构建文库并在Solexa测序仪(Illumina HiSeq 2000,美国)上进行测序。测序仪产生的原始图像数据经base calling转化为序列数据,即raw data。CO1获得raw reads为17 827 366条,DR2获得raw reads为14 658 692条(表1)。某些原始序列带有adaptor序列,或含有少量低质量序列。为得到clean reads,我们对raw data进行了处理:去除含adaptor的reads;去除N的比例大于10%的reads;去除低质量reads(质量值 $Q \leq 5$ 的碱基数占整个reads的50%以上)。去除低质量的reads后,CO1中clean reads为17 532 085条,DR2中clean reads为14 479 820条(表1)。

### 2.2 差异表达基因筛选

前期研究中本课题组已获得鼠尾藻的转录组数据,本研究以Trinity软件拼接得到的鼠尾藻转录组作为参考序列<sup>[14]</sup>,采用SOAPaligner/SOAP2软件将每个样品的clean reads对参考序列做比对和定位。CO1的17 532 085条clean reads中有12 050 546条序列被成功定位到参考序列上,占总序列的68.73%; DR2的14 479 820条clean reads中有12 133 399条序列被成功定位到参考序列上,占总序列的83.80%。通过与参考序列比对,CO1中检测到的基因数为21 041个; DR2中检测到的基因数为20 661个。如果将RPKM值大于0.1作为判断基因是否表达的阈值,则CO1表达的基因数为20 966,占检测基因总数的99.6%; DR2表达的基因数为20 588,占检测基因总数的99.6%。无论是CO1还是DR2,不同基因的表达量变化幅度较大,其中RPKM介于0.30~3.57之间的低表达基因在CO1和DR2中所占比

例都最高,RPKM 大于 15 的高表达基因在 CO1 中有 6 060 条,占表达基因总数的 21.68%;在 DR2 中 RPKM 大于 15 的高表达基因有 6 130 条,占表达基因总数的 21.93% (表 2)。

表 1 CO1 和 DR2 RNA-seq 分析结果  
Tab.1 The RNA-seq results of CO1 and DR2

项目 items	对照组 CO1	胁迫组 DR2
raw reads 数量 the number of raw reads	17 827 366	14 658 692
clean reads 数量 the number of clean reads	17 532 085	14 479 820
clean bases 数量(G) the number of clean bases	1.75	1.45
错误率/% error rate	0.04	0.03
Q30 含量/% the content of Q30	87.52	91.68
GC 含量/% the content of GC	51.79	52.06
定位的 reads 数量 the number of positioning reads	12 050 546(68.73%)	12 133 399(83.8%)
检测基因数量 the number of detected genes	21 041	20 661

表 2 CO1 和 DR2 不同基因的表达水平  
Tab.2 The gene expression level of CO1 and DR2

基因表达量区间 RPKM interval	对照组 CO1	胁迫组 DR2
0.1 ~ 0.3	1 150(4.11%)	1 150(4.11%)
0.3 ~ 3.57	7 136(25.53%)	6 874(24.59%)
3.57 ~ 15	6 620(23.68%)	6 434(23.02%)
15 ~ 60	4 319(15.45%)	4 482(16.03%)
> 60	1 741(6.23%)	1 648(5.90%)
总和 total	20 966	20 588

本研究将  $q\text{-value} < 0.005$  且  $|\log_2(\text{fold change})| > 1$  作为筛选差异表达基因(DEG)的标准。火山图可以直观展现不同基因的  $p\text{-value}$  与  $\log_2(\text{fold change})$  的关系,如图 1 所示,同时满足  $q\text{-value} < 0.005$  且  $|\log_2(\text{fold change})| > 1$  的基因为差异表达基因,用红色点来表示;不能同时满足上述条件的则为差异表达不显著的基因,用蓝色点来表示。在 CO1 和 DR2 间差异表达的基因总数为 476 个。相对于 CO1,DR2 中表达上调的基因数为 135 个,占 28.36%;表达下调的基因数为 341 个,占 71.64%。

### 2.3 差异表达基因的 GO 分析

对 476 个差异表达基因进行 GO 富集分析,结果共富集得到 915 个 GO term,其中 135 个上调基因富集得到 143 个 GO term,341 个下调基因对应 860 个 GO term。根据 GO 的基因功能分析体系,476 个差异表达基因对应的 915 个 GO term 被分为 3 大类,即“biological process”、“cellular component”和“molecular function”,如图 2 所示。“biological process”组分为 15 个亚组,其中“cellular macromolecule biosynthetic process”所涉

及的差异表达基因数最多,为 74 个;“gene expression”和“translation”次之,分别涉及 73 和 66 个差异表达基因。“cellular component”组中分为 15 个亚组,其中“intracellular”、“cytoplasm”和“cytoplasmic part”亚组中涉及的差异表达基因最多,分别涉及 147 个、124 个和 108 个差异表达基因。“molecular function”组中分为 15 个亚组,其中“structural molecule activity”、“structural constituent of ribosome”和“RNA binding”亚组中涉及的差异表达基因最多,分别涉及 53 个、47 个和 27 个差异表达基因。

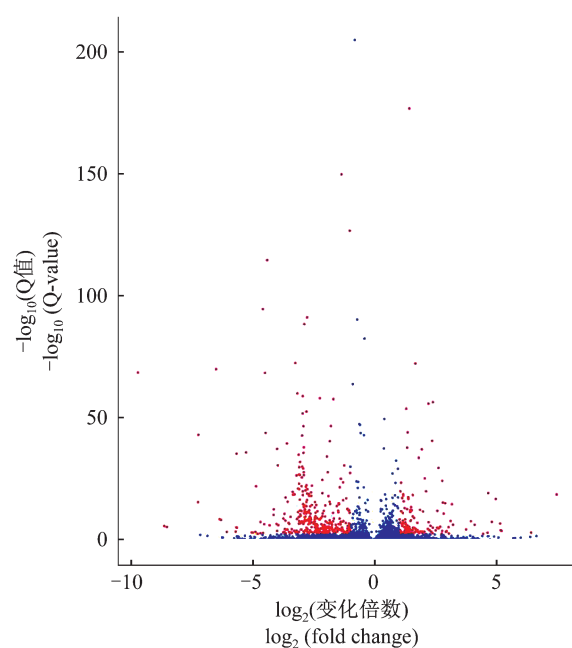


图 1 CO1 和 DR2 差异表达基因的筛选  
Fig.1 Screening of differentially expressed genes between CO1 and DR2

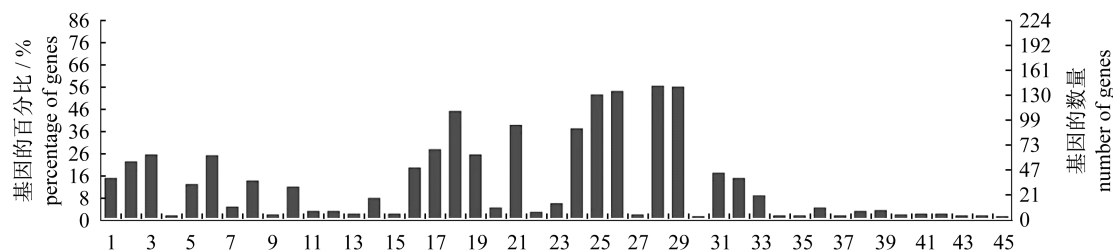


图2 对照组 CO1 和干露胁迫组 DR2 间差异表达基因的 GO 富集柱状图

1. 核糖体生成; 2. 翻译; 3. 细胞大分子生物合成过程; 4. 中心体复制; 5. 内部结构发育; 6. 基因表达; 7. 翻译延伸; 8. 多细胞生物过程; 9. 细胞周期检查点; 10. 多细胞生物发育; 11. 病毒复制; 12. 细胞周期调控; 13. 固有性免疫应答; 14. 器官发育; 15. 纺锤丝组织; 16. 核糖体; 17. 细胞内非膜结合的细胞器; 18. 细胞质; 19. 核糖核酸蛋白复合体; 20. 核糖体小亚基; 21. 细胞质部分; 22. 胞质核糖体小亚基; 23. 细胞液; 24. 大分子复合体; 25. 胞内部分; 26. 细胞内部; 27. 胞质核糖体大亚基; 28. 细胞的; 29. 细胞部分; 30. 膜组分; 31. 结构分子活性; 32. 核糖体结构组分; 33. RNA 结合; 34. 几丁质结合; 35. N-酰基甘露糖胺-6-磷酸-2 异构酶活性; 36. GTP 结合; 37. mRNA 结合; 38. ATP 酶活性; 39. GTP 酶活性; 40. 氢离子转运 ATP 合成酶活性; 41. rRNA 结合; 42. 翻译延伸因子活性; 43. 蛋白精氨酸脱亚氨酶活性; 44. 质子转运 ATP 酶活性; 45. 羧肽酶活性

Fig. 2 GO histogram of genes expressed differently between CO1 and DR2

1. ribosome biogenesis; 2. translation; 3. cellular macromolecule biosynthetic process; 4. centrosome duplication; 5. anatomical structure development; 6. gene expression; 7. translational elongation; 8. multicellular organismal process; 9. cell cycle checkpoint; 10. multicellular organismal development; 11. viral reproduction; 12. regulation of cell cycle; 13. innate immune response; 14. organ development; 15. mitotic spindle organization; 16. ribosome; 17. intracellular non-membrane-bounded organelle; 18. cytoplasm; 19. ribonucleic protein complex; 20. small ribosomal subunit; 21. cytoplasmic part; 22. cytosolic small ribosomal subunit; 23. cytosol; 24. macromolecular complex; 25. intracellular part; 26. intracellular; 27. cytosolic large ribosomal subunit; 28. cell cellular; 29. cell part cellular; 30. membrane fraction; 31. structural molecule activity; 32. structural constituent of ribosome; 33. RNA binding; 34. chitin binding; 35. N-acylmannosamine-6-phosphate 2-epimerase activity; 36. GTP binding; 37. mRNA binding; 38. ATPase activity; 39. GTPase activity; 40. hydrogen ion transporting ATP synthase activity; 41. rRNA binding; 42. translation elongation factor activity; 43. protein-arginine deiminase activity; 44. proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism; 45. carboxypeptidase activity

## 2.4 差异表达基因的 pathway 分析

不同基因相互协调使其生物学功能,通过 pathway 显著性富集能确定差异表达基因参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径。本研究中, pathway 富集分析发现 104 个代谢途径被富集,其中表达上调基因参与的代谢途径数为 10 个,表达下调基因参与的代谢途径为 101 个。其中“ribosome”涉及 64 个 DEG,是涉及最多差异表达基因的代谢途径;“metabolic pathways”和“biosynthesis of secondary metabolites”分别涉及 36 和 19 个差异表达基因,是涉及第二、第三多差异表达基因的代谢途径。差异基因 KEGG 富集散点图(图 3)中,KEGG 富集项分布到不同的象限中,横坐标 rich factor 是差异表达的基因中位于该 pathway 条目的基因数目与所有注释基因中位于该 pathway 条目的基因数的比值。rich factor 越大,表示富集的程度越大。纵坐标  $-\log_{10}(Q-$

value) 中 Q-value 是做过多重假设检验校正之后的 p-value,  $-\log_{10}(Q-value)$  越大,表示富集越显著。挑选富集最显著的 20 条 pathway 条目在图 3 中进行展示。

## 2.5 部分差异表达基因人工功能分析

干露胁迫导致差异表达的基因总数为 476 个,将其中具有明确生物学功能的、且可能与抗性相关的基因挑选出来,并对它们进行重点分析。表 3 中列出了其中差异表达倍数最大的 20 个基因。这些基因编码的蛋白可分为 4 大类,即热休克蛋白家族、抗氧化酶系统和蛋白合成、加工及降解的相关因子。另外,其他的差异表达基因编码的蛋白还包括通道蛋白和转运蛋白,氧化磷酸化和光合作用相关蛋白,信号转导因子,碳代谢、脂质代谢、氨基酸代谢的相关酶类,褐藻多糖代谢相关酶类,以及具有其他生物功能的蛋白。

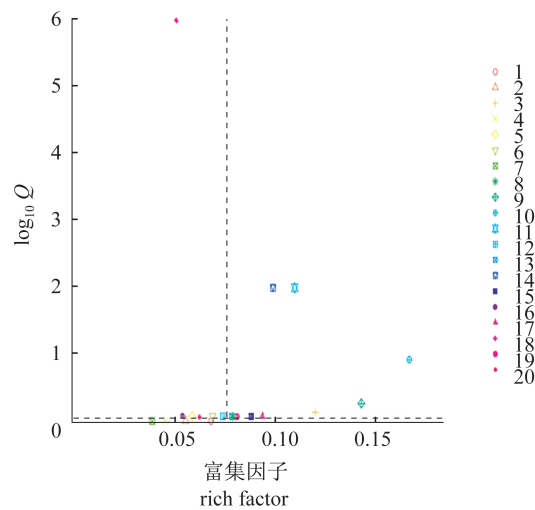


图3 富集最显著的20条 pathway 的散点图

1. 核糖体; 2. 抗氧化系统; 3. 蛋白降解; 4. Hsp 蛋白; 5. 柠檬烯和蒎烯降解; 6. 氯烷烃降解; 7. 激活受体信号途径; 8. 戊糖-葡萄糖醛酸互转; 9. 光合作用; 10. 呼吸链; 11. 甘油酯代谢; 12. 丙酮酸盐代谢; 13. 胞间连接; 14. 硒化合物代谢; 15. 组氨酸代谢; 16. 色氨酸代谢; 17. 抗坏血酸代谢; 18. 糖酵解; 19. 半胱氨酸和甲硫氨酸代谢; 20. 丙氨酸代谢

Fig.3 Scatter diagram for the top 20 most significantly enriched pathways

1. ribosome; 2. antioxidant system; 3. protein degradation; 4. Hsp protein; 5. limonene and pinene degradation; 6. chloroalkane degradation; 7. PPAR signaling pathway; 8. pentose and glucuronate interconversions; 9. photosynthesis; 10. respiratory chain; 11. glycerolipid metabolism; 12. pyruvate metabolism; 13. gap junction; 14. selenocompound metabolism; 15. histidine metabolism; 16. tryptophan metabolism; 17. ascorbate metabolism; 18. glycolysis; 19. cysteine and methionine metabolism; 20. beta-alanine metabolism

### 3 讨论

鼠尾藻生长于潮间带,因潮汐变化的影响,经常受到各种非生物因子的胁迫,例如,在落潮时会受到干露胁迫。研究鼠尾藻对这些胁迫因子的适应及抗性机制,可为鼠尾藻的资源养护、藻场恢复和建设提供理论依据。然而,目前有关环境胁迫对鼠尾藻影响的研究报道较少。Chu 等<sup>[10]</sup>研究了温度、盐度、渗透压和干露胁迫对鼠尾藻相对生长率和存活率的影响,发现鼠尾藻具有较强的胁迫抗性,干露胁迫是影响鼠尾藻的关键胁迫因子。有关鼠尾藻对环境胁迫适应的分子机制的研究目前还未见报道。

从转录组水平上,通过研究环境胁迫对基因表达的影响来研究生物对环境胁迫的适应机制,

在其他藻类已有报道<sup>[15-16]</sup>。尤其是随着二代测序技术的发展,为藻类大规模基因表达模式变化的研究提供了契机,目前在绿藻<sup>[17]</sup>、红藻<sup>[18]</sup>和褐藻中都有报道<sup>[19]</sup>。本研究中,CO1 测序获得 17 532 085 条 clean reads,检测到 21 041 个基因;DR2 测序获得 14 479 820 条 clean reads,检测到 20 661 个基因。设置严格的筛选条件 ( $p\text{-value} \leq$

表3 受干露胁迫调控表达的基因及其表达变化倍数  
Tab.3 The genes regulated by the dehydration stress and their fold changes

基因的编码产物 protein production coding by genes	变化倍数的对数值 $\text{Log}_2(\text{CO1/DR2})$
热休克蛋白 I 17.4 ku 17.4 ku class I heat shock protein	2.5
热休克蛋白 20 heat shock protein 20	3.8
热休克蛋白 40 heat shock protein 40 like protein	1.5
hsp70 型分子伴侣 hsp70-type chaperone (chloroplast)	2.1
热休克蛋白 70 heat shock protein 70	2.5
热休克蛋白 90 heat shock protein 90	1.8
抗坏血酸过氧化物酶 ascorbate peroxidase	1.6
过氧化氢酶 catalase	1.8
超氧化物歧化酶 superoxide dismutase	2.9
谷胱甘肽 S-转移酶 glutathione S-transferase	1.9
谷氧还蛋白 glutaredoxin	2.3
硫氧还蛋白 thioredoxin	2.1
泛素 ubiquitin	1.6
泛素连接酶 E2 ubiquitin-conjugating enzyme E2	2.7
蛋白酶体亚单位 $\beta$ -3 proteasome subunit beta type-3	1.7
60 S 核糖体蛋白 60S ribosomal protein	-2.1
核糖体蛋白 S10 ribosomal protein S10	1.6
光捕获复合体蛋白 light harvesting complex protein	-1.9
叶绿素 a 结合蛋白 Chl. a binding protein	-1.6

0.005且倍数差异不低于2倍),发现3h的干露胁迫导致鼠尾藻表达发生变化的基因数为476个,其中表达上调的基因有135个,表达下调的基因有341个。对在干露胁迫下差异表达的基因进行功能注释和分类,结果发现这些基因具有非常多样化的功能,有些基因参与多个生物过程(biological process),如细胞大分子合成、基因表达和翻译等;有些基因编码某些细胞组件(cellular component),如细胞骨架等;还有一些行使某些分子功能(molecular function),如分子伴侣,抗氧化酶类以及受体蛋白等。对这些差异表达基因进行 pathway 富集分析,发现差异表达基因参与鼠尾藻的多个代谢过程和信号转导途径,如次生代谢物合成等。从以上结果来看,鼠尾藻在干露胁迫下,在转录组水平上发生了大规模的基因表达调整,说明鼠尾藻对干露胁迫的响应是一个复杂过程,需要多代谢过程和多信号途径协调工作,来抵御干露胁迫的不良影响。在其它研究中也发现藻类对环境胁迫的分子响应是个非常复杂的过程,Dittami等<sup>[19]</sup>发现长囊水云(*Ectocarpus siliculosus*)在非生物胁迫下发生了大规模的转录组重排(transcriptome reprogramming),至少70%的基因受胁迫的影响而发生表达变化;同样地,与鼠尾藻同属于墨角藻目的*Fucus serratus*在热胁迫和干露胁迫下发生大量的基因表达调整<sup>[20]</sup>。同样的现象也在*Pyropia tenera*<sup>[18]</sup>,*Saccharina latissima*<sup>[21]</sup>等藻类中发现。

综上所述,干露胁迫是影响鼠尾藻的关键环境因子,影响到鼠尾藻多个代谢过程;反之,鼠尾藻对干露胁迫也产生复杂的响应,通过多个代谢过程和信号途径协调工作,来抵御干露胁迫的不良影响。本研究首次大规模地研究了鼠尾藻在干露胁迫下的基因表达变化,鉴定得到一批与干露胁迫相关的基因,可为将来鼠尾藻对干露胁迫适应机制的研究奠定基础。

感谢实验室研究生凌晶宇在实验工作上的协助。

#### 参考文献:

[1] Zeng C K, Zhang D R, Zhang J F, et al. China common seaweeds [M]. Beijing: Science Press, 1962. [曾呈奎,张德瑞,张峻甫,等.中国经济海藻

志.北京:科学出版社,1962.]

- [2] He P, Xu W D, Wang L M. Research status and development trend of *Sargassum thunbergii* [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2011, 20(3): 363-367. [何平,徐伟定,王丽梅.鼠尾藻研究现状及发展趋势.上海海洋大学学报,2011,20(3):363-367.]
- [3] Wang F J, Sun X T, Li F. Studies on sexual reproduction and seedling-rearing of *Sargassum thunbergii* [J]. Marine Fisheries Research, 2006, 27(5): 1-6. [王飞久,孙修涛,李锋.鼠尾藻的有性繁殖过程和幼苗培育技术研究.海洋水产研究,2006,27(5):1-6.]
- [4] Zhang Z Y, Li X L, Han Y X, et al. Indoor artificial seeding in sea weed *Sargassum thunbergii* [J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2007, 22(4): 255-259. [张泽宇,李晓丽,韩余香,等.鼠尾藻的繁殖生物学及人工育苗的初步研究.大连水产学院学报,2007,22(4):255-259.]
- [5] Sun X T, Wang F J, Liu G Z. The optimization of indoor culture of young tress of *Sargassum thunbergii* [J]. Marine Fisheries Research, 2006, 27(5): 7-12. [孙修涛,王飞久,刘桂珍.鼠尾藻新生枝条的室内培养及条件优化.海洋水产研究,2006,27(5):7-12.]
- [6] Liu Q S, Jiang H T, Liu Y X, et al. Seed rearing technique of *Sargassum thunbergii* o' kuntze [J]. Shandong Fisheries, 2006, 23(12): 5-9. [刘启顺,姜洪涛,刘雨新,等.鼠尾藻人工育苗技术研究[J].齐鲁渔业,2006,23(12):5-9.]
- [7] Zhan D M, Li M Z, Ding G, et al. Study on reproduction biology and artificial breeding techniques of *Sargassum thunbergii* [J]. Marine Fisheries Research, 2006, 27(6): 55-59. [詹冬梅,李美真,丁刚,等.鼠尾藻有性繁育及人工育苗技术的初步研究.海洋水产研究,2006,27(6):55-59.]
- [8] Terawaki T, Yoshikawa K, Yoshida G, et al. Ecology and restoration techniques for *Sargassum* beds in the Seto Inland Sea, Japan [J]. Marine Pollution Bulletin, 2003, 47(1-6): 198-201.
- [9] Chu S H, Zhang Q S, Tang Y Z, et al. High tolerance to fluctuating salinity allows *Sargassum thunbergii* germlings to survive and grow in artificial habitat of full immersion in intertidal zone [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2012, 412: 66-71.
- [10] Chu S H, Zhang Q S, Liu S K, et al. Tolerance of

- Sargassum thunbergii* germlings to thermal, osmotic and desiccation stress [J]. *Aquatic Botany*, 2012, 96 (1):1 - 6.
- [11] Pearson G, Lago-Leston A, Valente M, *et al.* Simple and rapid RNA extraction from freeze-dried tissue of brown algae and seagrasses [J]. *European Journal of Phycology*, 2006, 41(1):97 - 104.
- [12] Li R, Yu C, Li Y, *et al.* SOAP2: an improved ultrafast tool for short read alignment [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(15):1966 - 1967.
- [13] 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.
- [14] Liu F L, Sun X T, Wang W J, *et al.* *De novo* transcriptome analysis-gained insights into physiological and metabolic characteristics of *Sargassum thunbergii* (Fucales, Phaeophyceae) [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2013, DOI 10. 1007/s10811 - 013 - 0140 - 2.
- [15] Roeder V, Collen J, Rousvoal S, *et al.* Identification of stress gene transcripts in *Laminaria digitata* (Phaeophyceae) protoplast cultures by expressed sequence tag analysis [J]. *Journal of Phycology*, 2005, 41(6):1227 - 1235.
- [16] 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.
- [17] Zhang X W, Ye N H, Liang C W, *et al.* *De novo* sequencing and analysis of the *Ulva linza* transcriptome to discover putative mechanisms associated with its successful colonization of coastal ecosystems [J]. *BMC Genomics*, 2012, 13:565.
- [18] 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.
- [19] Dittami S M, Scornet D, Petit J L, *et al.* Global expression analysis of the brown alga *Ectocarpus siliculosus* (Phaeophyceae) reveals large-scale reprogramming of the transcriptome in response to abiotic stress [J]. *Genome Biology*, 2009, 10(6):R66.
- [20] Pearson G A, Hoarau G, Lago-Leston A, *et al.* An expressed sequence tag analysis of the intertidal brown seaweeds *Fucus serratus* (L.) and *F. vesiculosus* (L.) (Heterokontophyta, Phaeophyceae) in response to abiotic stressors. *Marine Biotechnology*, 2010, 12(2):195 - 213.
- [21] Heinrich S, Valentin K, Frickenhaus S, *et al.* Transcriptomic analysis of acclimation to temperature and light stress in *Saccharina latissima* (Phaeophyceae) [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(8):e44342.

## Preliminary study on the response of gene expression to desiccation in *Sargassum thunbergii*

LIU Fuli, WANG Feijiu<sup>\*</sup>, SUN Xiutao, WANG Wenjun, LIANG Zhourui, MA Xingyu  
(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

**Abstract:** In order to elucidate the mechanism of desiccation-stress adaptability in *Sargassum thunbergii*, the molecular responsive process under desiccation stress was studied on the level of gene expression using the RNA-seq technology. A total of 17 532 085 and 14 479 820 clean reads were obtained in the control group CO1 and in the treatment group DR2 (3 h desiccation stress) respectively, and 20 966 and 20 588 genes were detected in CO1 and DR2, respectively. A total of 476 genes were expressed differently between CO1 and DR2, among which 135 (28.36%) and 341 (71.64%) were respectively up- and down-regulated expressed in DR2 compared to CO1. Gene Ontology (GO) enrichment analysis assigned the 476 differently expressed genes (DEG) to 915 GO terms, among which 143 GO terms containing the up-regulated genes while 860 GO terms containing down-regulated genes. Pathway enrichment analysis showed 104 pathways were enriched. The up-regulated genes were involved in 10 pathways, whereas the down-regulated genes were involved in 101 pathways. The DEGs code the Hsp family, antioxidant enzyme system, protein synthesis, process and degradation related factors and so on. The above results indicated that the response process to desiccation stress in *S. thunbergii* was complex, involving many metabolic pathways and signal transduction pathways.

**Key words:** *Sargassum thunbergii*; desiccation stress; gene expression; RNA-Seq

**Corresponding author:** WANG Feijiu. E-mail: wangfj@ysfri.ac.cn