

坛紫菜 6-磷酸海藻糖合成酶(TPS)家族基因的 克隆及表达特征分析

史健志, 徐 燕, 纪德华, 陈昌生, 谢潮添*

(集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 6-磷酸海藻糖合成酶(TPS)是植物海藻糖合成的关键酶,在植物逆境胁迫应答中发挥着重要的作用。实验以坛紫菜转录组测序获得的 unigene 序列为基础,采用 RACE 技术克隆获得坛紫菜的 3 条 TPS 基因序列: *PhTPS1*, *PhTPS2-1* 和 *PhTPS2-2*。序列分析结果表明, *PhTPS1* (收录号:KM580358) 序列全长 3 557 bp, 包含一个 3 462 bp 的开放阅读框, 所编码的多肽包含 1 153 个氨基酸, 分子量为 124.2 ku, 等电点为 6.73, 属于 TPS I 亚家族; *PhTPS2-1* (收录号:KM519457) 序列全长 4 264 bp, 包含一个 4 044 bp 的开放阅读框, 所编码的多肽包含 1 374 个氨基酸, 分子量为 145.2 ku, 等电点为 5.96; *PhTPS2-2* (收录号:KM519458) 序列全长 3 733 bp, 包含一个 3 324 bp 的开放阅读框, 所编码的多肽包含 1 107 个氨基酸, 分子量为 120.2 ku, 等电点为 5.42。 *PhTPS2-1* 和 *PhTPS2-2* 属于 TPS II 亚家族。基因表达水平的定量分析结果表明高温胁迫条件下, 3 条 *PhTPS* 基因的表达模式基本一致, 均表现为先上调后下调, 再上调的趋势; 而 *PhTPS1* 和 *PhTPS2-1* 基因在中低水平的失水条件下, 基因表达水平均没有发生显著变化, 只在高水平失水胁迫下显著上调, *PhTPS2-2* 基因在中高水平失水条件下, 表达水平显著上调。说明 *PhTPS* 基因可能只在高度失水胁迫下发挥应激调节作用。

关键词: 坛紫菜; 6-磷酸海藻糖合成酶; RACE; 荧光定量 PCR

中图分类号: Q 786; S 968.4

文献标志码: A

海藻糖(trehalose)是一种广泛存在于生物界中,由两个吡喃环葡萄糖分子通过 α -1,1 糖苷键连接而成的非还原性双糖,是天然双糖中理化性质最为稳定的一类糖质^[1]。已有研究表明海藻糖能够阻止细胞磷脂双分子膜由液晶态向固态转变,起到稳定蛋白质及核酸等高分子物质的作用,从而增强植物细胞对脱水、干旱、高温、冷冻、高渗透压及有毒试剂等逆境条件的抵抗力,而自然界中其他糖类如蔗糖、葡萄糖等,均不具备这一功能^[1-4]。

植物细胞中海藻糖的合成反应包括两步:首先由 6-磷酸海藻糖合成酶(trehalose-6-phosphate synthase, TPS)催化尿苷二磷酸葡萄糖和 6-磷酸葡萄糖反应形成 6-磷酸海藻糖(trehalose-6-

phosphate, T6P),然后再由 6-磷酸海藻糖酯酶(trehalose-6-phosphate phosphatase, TPP)水解 T6P 形成海藻糖^[3]。由于植物细胞内广泛存在各种非特异性的磷酸酯酶,可以催化 T6P 转化为海藻糖,所以 TPP 基因的表达对海藻糖的积累作用不大,但 TPS 基因的转录表达则对于植物细胞中海藻糖的合成具有决定性作用^[1]。在植物抗逆机制研究中,TPS 基因已经成为继谷氨酸、脯氨酸、甜菜碱合成酶基因之后又一个与抗逆相关的基因,向植物中导入 TPS 基因以提高植物对非生物胁迫的抵抗力已经成为抗逆植物基因工程的一个重要研究方向^[5-8]。

坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)是我国南方沿海广泛栽培的一种大型海藻,创造了可观的经济

收稿日期:2014-09-18 修回日期:2015-01-19

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2012AA10A411);国家自然科学基金(41176151,41276177);福建省种业创新与产业化工程(2014S1477-10)

通信作者:谢潮添, E-mail:ctxie@jmu.edu.cn

<http://www.scxuebao.cn>

价值。但近年来,受全球气候变暖影响,海水水温过高严重影响着坛紫菜栽培的产量和效益^[9-11]。此外,坛紫菜自然分布于潮间带的中高潮区,由于受潮汐的影响,需经历周期性的失水和复水过程,期间伴随着温度、水分、光照和盐度等环境因子的激烈变化^[12-13]。因此研究坛紫菜的抗逆机制,克隆抗逆相关基因,对于后续海藻、乃至经济作物的抗逆基因工程研究具有十分重要的理论和实际应用价值。目前已经在条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)、海带等 10 余种大型海藻中克隆获得了 *TPS* 的全长基因^[14-16],在 GenBank 数据库中已经可以检索到 4 条坛紫菜的 *TPS* 基因,并且青岛农业大学遗传研究室采用条斑紫菜 *TPS* 基因转化水稻,利用 35S 启动子进行过表达,获得了形态发育正常且耐盐、抗旱性显著提高的水稻植株。本课题组前期在坛紫菜的转录组研究中,检索到了 3 条序列与已克隆 *TPS* 基因序列存在差异的坛紫菜 *TPS* 基因片段^[13],本研究对这 3 条坛紫菜 *TPS* 基因(*PhTPS1*, *PhTPS2-1* 和 *PhTPS2-2*)进行全长克隆,并通过实时荧光定量 PCR 技术(qPCR)比较这 3 条基因在高温和失水胁迫下的表达特征,分析它们在坛紫菜胁迫应答中的作用,以为坛紫菜逆境胁迫响应机制的研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 坛紫菜样品及胁迫处理

实验材料为人工杂交选育出的耐高温品系 Z-61,取自福建省坛紫菜种质资源库。将坛紫菜 Z-61 叶状体在适宜条件下[温度(21 ± 0.5)℃,光照强度 $50 \sim 60 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光照周期 12L:12D,每 3 天更换一次过滤的新鲜海水]培养至(15 ± 2)cm 时,选取叶面平滑且生长健康的藻体作为实验组,提取总 RNA,反转录成 cDNA 后用于 *TPS* 基因的全长克隆。

另取一组(15 ± 2)cm 的健康藻体,分别于(29 ± 0.5)℃的恒温光照培养箱中高温胁迫处理(其余培养条件同适宜条件)0、3、6、12、24、48 h,分别提取总 RNA,用于高温胁迫下基因表达水平的 qPCR 分析。

取(15 ± 2)cm 的健康藻体进行失水胁迫处理,具体方法为用纱布轻压吸干藻体表面水分后,置于干燥纱布上,置于 21℃,光照强度 $50 \sim 60$

$\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的干燥箱内干燥失水。根据预实验确定的干燥时间,分别取失水率为 0%、15%、30%、45%、60%、75% 及 90% 的样品和干燥失水至失水率为 90% 后再浸泡于新鲜海水中培养 30 min 后(复水)的样品提取总 RNA,用于失水胁迫下基因表达水平的 qPCR 分析。失水率计算公式为:

$$\text{失水率}(\%) = [\text{鲜重}(\text{mg}) - \text{失水后藻体重}(\text{mg})] / [\text{鲜重}(\text{mg}) - \text{干重}(\text{mg})] \times 100$$

以上每个处理,均设置 3 个生物学重复。

1.2 引物及其序列

基因的 PCR 扩增、RACE 扩增、阳性克隆筛选和基因的表达水平分析所用的引物序列均由上海生工生物工程有限公司合成(表 1)。

1.3 总 RNA 的分离纯化

收集坛紫菜藻体 0.1 g,滤纸吸干后液氮研磨,采用 E. Z. N. A 植物 RNA 提取试剂盒(OMEGA,德国)提取各样品的总 RNA。经凝胶电泳检查所提取总 RNA 的完整性,并在 Cary50 紫外分光光度计(Varian,美国)上分别测定 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 值,根据测定结果计算 RNA 的浓度,判断核酸和蛋白质的污染情况。

1.4 *PhTPS* 基因的克隆

根据坛紫菜转录组数据库 unigene 的注释结果,筛选出 1 条与坛紫菜 *TPS* 基因序列相似性为 99% 的 unigene(Unigene6752),2 条与皱波角叉菜(*Chondrus crispus*) *TPS* 基因序列相似性分别为 58% 和 63% 的 unigene(Unigene8841, Unigene10310)基因,进行 *PhTPS* 基因的克隆。由于 Blast 序列比对分析时发现 Unigene8841 已包含所编码基因 5'端的起始密码子,因此根据 Unigene8841 的序列设计 5'端普通 PCR 引物和 3'端 RACE 扩增的特异性扩增引物(GSP)和巢式引物(NGSP)(表 1);而对于 Unigene6752 和 Unigene10310,则分别设计 5'-和 3'-RACE 扩增的特异性扩增引物(GSP)和巢式引物(NGSP)(表 1)。PCR 30 μL 反应体系包含:15 μL Mix 预混液(全式金,北京),1 μL cDNA(10 ng/ μL),0.5 μL 正向引物(20 $\mu\text{mol}/\text{L}$),0.5 μL 反向引物(20 $\mu\text{mol}/\text{L}$),13 μL ddH₂O。PCR 反应程序:95℃变性 5 min;95℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 60 s,35 个循环;72℃ 10 min。RACE 扩增参照 SMARTer RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒(Clontech,

美国)的指示说明进行。

以上所有扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分离后,采用 DNA 纯化回收试剂盒(TIANGEN,北京)回收目的片段,与 PMD19-T 载体(TaKaRa,大连)连接后导入感受态细胞 *E. coli* DH5 α 中,筛选出阳性克隆进行扩大培养,采用质粒小提试剂盒(TIANGEN,北京)提取质粒后送往上海生物工程股份有限公司测序。

表 1 实验中所用引物的名称和序列
Tab.1 Name and sequence of primers for the experiment

用途 purpose	基因 gene	引物名称 primer name	引物序列 sequences(5'-3')
PCR	<i>PhTPS2-1</i>	T21F-5'	GATCTACGACTCGGGCATGG
		T21R-5'	CTCCTCATTGACCCGCTTGT
	<i>PhTPS1</i>	RT1GSP-5'	CGGGCGTAGTCGTAGGTGTGAAAGC
		RT1NGSP-5'	CACCTTGTTCCGCATCGGCAAAAT
		RT1GSP-3'	CTGGCTGACCTCGCTACCCCCTC
		RT1NGSP-3'	GGTGTTCTCGTACCTGTCCACGTACATCA
		RT21GSP-3'	GCCCCTGGCAGACACGCCCAGTT
		RT21NGSP-3'	GTTGGCGACGACAAGTCTGATGAGC
全长扩增 RACE	<i>PhTPS2-1</i>	RT22GSP-5'	TCACCGCCTGATAGGCCTCCCAGTC
		RT22NGSP-5'	ACGTCACTGCCACGTACCGTGAGCG
	<i>PhTPS2-2</i>	RT22GSP-3'	GGTGTGCTGTCGTCGTCGGGCGT
		RT22NGSP-3'	CCCACCGTAACGCCCATACCCG
	<i>PhTPS1</i>	QT1F	TGACGCCACCTCTACTACA
		QT1R	CAAACCGATGGTTGGCCTTG
定量分析 qPCR	<i>PhTPS2-1</i>	QT21F	TCTGTCACGTGGTTGTACCG
		QT21R	GATCTTGTGACCGACGAGCA
	<i>PhTPS2-2</i>	QT22F	GGCCGGATCAATAGCACGTA
		QT22R	CGTGCTGACAGATAGCCCAT
内参 internal control	<i>PhUBC</i>	UBCF	TCACAACGAGGATTTACCACC
		UBCR	GAGGAGCACCTTGGAACG
阳性克隆筛选 validate positive clone		M13F	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC
		M13R	GAGCGGATAACAATTTACACAGG

1.5 *PhTPS* 基因的生物信息学分析

对所获得的全长基因序列利用 NCBI 的 Blast 程序(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行序列同源性检测,并采用 ORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)软件分析各基因的开放阅读框(ORF)和所编码氨基酸序列;使用在线软件 PROSITE(<http://prosite.expasy.org/>)、InterProScan(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>)和 PrediSi(<http://www.predisi.de>)查找基因序列的保守位点和信号肽序列;采用 Clustal X^[17]进行氨基酸多重序列比对,并采用 MEGA 6.06^[18]软件最大似然法(Maximum Likelihood,ML)构建 PhTPS 蛋白系统进化树。

1.6 *PhTPS* 基因表达水平的 qPCR 分析

分别根据各基因序列设计 qPCR 正反向引

物,并以坛紫菜泛素连接酶(ubiquitin conjugating enzyme,UBC)基因作为内参,对 *PhTPS* 基因在高温和失水胁迫下的表达水平进行 qPCR 检测。

提取的各样品总 RNA 按 PrimeScript[®] RT reagent Kit(TaKaRa,大连)的说明书进行操作。25 μ L 的反应体系包含:12.5 μ L 2 $\times$ SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II(TaKaRa),0.2 μ mol/L 引物和 2 μ L 反转录产物。扩增程序为 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s;95 $^{\circ}$ C 5 s,62 $^{\circ}$ C 31 s,40 个循环。循环结束后从 55 $^{\circ}$ C 缓慢升温至 95 $^{\circ}$ C,绘制溶解曲线。qPCR 扩增在 7300 型定量 PCR 仪(ABI,美国)上进行。

以 10 $\times$ 梯度稀释的 cDNA 为模板进行 qPCR 扩增,分别制作 *PhTPS1*,*PhTPS2-1*,*PhTPS2-2* 和内参基因的标准曲线。每次反应都设置阴性对照

和无模板对照,每个反应设3个平行复孔。应用 Excel 和 SPSS 19.0 软件对实验数据进行统计分析,并采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)和最小显著差异法(LSD)比较不同数据组间的差异, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示极显著差异。

2 结果

2.1 *PhTPS* 基因的全长克隆及序列分析

PhTPS1 以坛紫菜 Unigene 6752 为核心序列,通过 RACE 扩增及测序,分别得到 1 条长度为 948 bp 的 5'-末端序列(图 1-a)和 1 条长度为 1 071 bp 的 3'-末端序列(图 1-b)。根据两条末端序列与核心序列 Unigene 6752 的重叠区进行序列拼接,得到 1 条长度为 3 557 bp 的全长序列,经过 blast 比对,确定该基因为坛紫菜的 *TPS1* 基因,命名为 *PhTPS-1*。该基因已提交到 GenBank 数据库中,收录号为 KM580358。通过 ORF Finder 在线软件分析发现,该基因序列 108 ~ 3 569 个碱基为完整的开放阅读框(open reading frame, ORF),可编码包含 1 153 个氨基酸,分子量为 124.2 ku,等电点为 6.73 的蛋白质。通过 NCBI 的蛋白保守区数据库(CDD)对该基因编码的蛋白质进行保守区预测,发现该蛋白 N 端包含 1 个 GT1_TPS 保守结构域(图 2),该结构域编码的蛋白属于糖基转移酶家族,能够催化 6-磷酸葡萄糖合成 6-磷酸海藻糖。

PhTPS2-1 以坛紫菜 Unigene 8841 为核心序列,通过 5'端普通 PCR 和 3'端 RACE 扩增及测

序,分别得到 1 条长度为 874 bp 的 5'-末端序列(图 1-c)和 1 条长度为 912 bp 的 3'-末端序列(图 1-d)。根据 2 条末端序列与核心序列 Unigene 8841 的重叠区进行序列拼接,得到 1 条长度为 4 264 bp 的全长序列,经过 Blast 比对,确定该基因为坛紫菜的 *TPS2* 基因,命名为 *PhTPS2-1*。该基因已提交到 GenBank 数据库中,收录号为 KM519457。通过 ORF Finder 在线软件分析发现,该基因序列 17 ~ 4 060 个碱基为完整的 ORF,可编码包含 1 347 个氨基酸,分子量为 145.2 ku,等电点为 5.96 的蛋白质。通过 NCBI 的蛋白保守区数据库(CDD)对该基因编码的蛋白质进行保守区预测,发现该蛋白 N 端包含 1 个 GT1_TPS 保守结构域(图 2)。

PhTPS2-2 以坛紫菜 Unigene 10310 为核心序列,通过 RACE 扩增和测序,获得 1 条长度为 649 bp 的 5'-末端序列(图 1-e)和 1 条长度为 838 bp 的 3'-末端序列(图 1-f)。根据 2 条末端序列与核心序列 Unigene 10310 的重叠区进行序列拼接,得到 1 条长度为 3 733 bp 的全长序列,经过 blast 比对,确定该基因为坛紫菜的 *TPS2* 基因,命名为 *PhTPS2-2*。该基因已提交到 GenBank 数据库中,收录号为 KM519458。通过 ORF Finder 在线软件分析发现,该基因序列 253 ~ 3 576 个碱基为完整的 ORF,可编码包含 1 107 个氨基酸,分子量为 120.2 ku,等电点为 5.42 的蛋白质。通过 NCBI 的蛋白保守区数据库(CDD)对该基因编码的蛋白质进行保守区预测,发现该蛋白 N 端同样包含 1 个 GT1_TPS 保守结构域(图 2)。

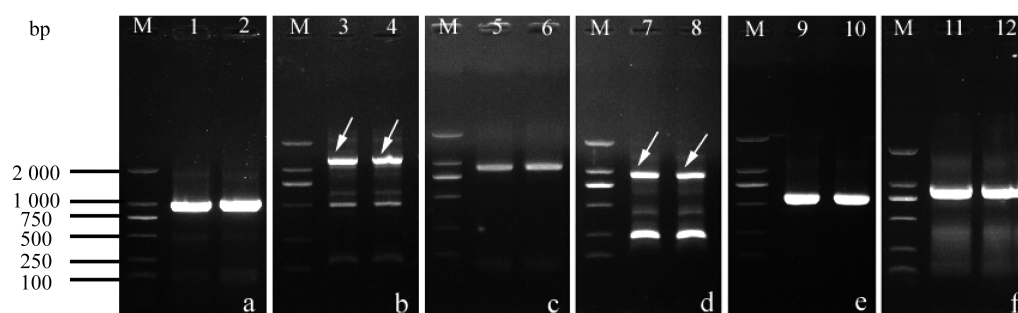


图 1 *PhTPS* 基因扩增产物电泳图

(a) *PhTPS1* 基因的 5'-PCR 扩增产物; (b) *PhTPS1* 基因的 3'-RACE 扩增产物(箭头); (c) *PhTPS2-1* 基因的 5'-PCR 扩增产物; (d) *PhTPS2-1* 基因的 3'-RACE 扩增产物(箭头); (e) *PhTPS2-2* 基因的 5'-RACE 扩增产物; (f) *PhTPS2-2* 基因的 3'-RACE 扩增产物

Fig. 1 Agarose electrophoresis of PCR or RACE products of *PhTPS* genes

(a) 5'-PCR products of *PhTPS1*; (b) 3'-RACE products of *PhTPS1* (Arrow); (c) 5'-PCR products of *PhTPS2-1*; (d) 3'-RACE products of *PhTPS2-1* (Arrow); (e) 5'-RACE products of *PhTPS2-2*; (f) 3'-RACE products of *PhTPS2-2*

PhTPS1	MPGLPHVMSAPTQIPLTPSVQPQLSRGQAGNNSLPHLAAADLPSLSSDGLG-----GKGQA--AAASHLT--EG
PhTPS2-1	-----MGHGLTGTPFLPGIPEDIVSVTDGSEKGTGASGGDGSVDTEGDGQDTGDGLNEYQRELAEEEAQSSSLASTLTEE
PhTPS2-2	-----M
PhTPS1	EILARIQELHRELTVVRESEEAAGAGGGVGAAS--EA-----ATGADGRPGGSVLGENGLGGSTPGRRLLVV
PhTPS2-1	VLLSRLQDLQMEKLLRDRRGAFLLAANGTAPPQLSSDS-VPTVAATSETFA--AHASAASRAAKR--LPPATRMHSGPLFVA
PhTPS2-2	FVLERTADVPFVWV-----GLLPST-DSEK-GRSRGDSR-----HHGSG-GGGHGRSGSGGGGGNGD-----
PhTPS1	SNRLPVTINKN-NDGQWDFKMSAGGL--VSALAGVKNEFFVWVWVSGSEVPDEDQ-----DSLRTTEL--RAQHECVP
PhTPS2-1	SFRLQPSVDISADTGAVKASLSAGGLGLVPAFRHLVSRTRIVWLMPVFAAGQ--VPNAA--TQARIQARLRARKPSAVLSYAP
PhTPS2-2	---GGSGDHGNGDGSNGVRYGKSGRSNGIDLDDPVSRSYNPWRDDLSS--SQRRLG--SGRRPPRGSRGKDPADRSRYVA
PhTPS1	VFLSDFDAHLYYNGFCNDVLPLFHYVPLPIVSSDGERKFDVKYWEAYSKANHRFAEAIMQVYE-----
PhTPS2-1	IFPRPSDA-VTHQAFCNVLAALFHYLPLSF--EGDRSFRPEMFAYKRVNEEYALALLREFERSRRGVPPGHGLGLGGRPASA
PhTPS2-2	VTLP--SSLEAPFYAFCEETLRLLHYDYGAL--GNGSGGVDTDRWEAYQAVNRRFAEAVTEVYE-----
PhTPS1	-----P
PhTPS2-1	KTSVDAQAGPSNAKTSVDAQAEDVDASDVLLADDLLAGGAAADAEANAEPACNPAAAPAAEPAPASGPGLAGGREGAGGVVEE
PhTPS2-2	-----E
PhTPS1	GDLIWVQDYHMLLPSLLRKRIRDVTIGFFLTPFPSEVYRILPMRNKVLQGVLAADLIGFHTYDYARHFLSVCTRILGLEASP
PhTPS2-1	TGVFWVHDFQLMLVPKMLRERMPHAKIGFFLTPFPAGELYRTLPPRRELLEGMLGADLIGFHTYDYARHFLSACERILGLDIRP
PhTPS2-2	GDLVVWHNYHLLLPAMLRRLWYAKIGFFLYTPFPSEIFRLLPQRSEVLRGILGADLAGFHTYDYASKQFLASCARLLGLEGSP
PhTPS1	KGVDY--KDHFAHVGIFPIGIDPTAFIRALDLPVSQERASELQAKFAGKKVLLGVDRLD--YIKGVPHKLMAFETLLARHPWNE
PhTPS2-1	NCVDN--HGVLVHVAIFPFGIDTKFTSAMLRSVIRQRDALKEELAGKKVLLGIDRLD--YIKGIPHKLLAFEFHLETYPYEVG
PhTPS2-2	KGIQVEPGGGHVCEIGIYPPGIDVAGLKAHVVSKAARVRLRDRFAGRAVVDSEVRLDDAFAGIPLTLAFESLLHKHPEYVT
PhTPS1	RAVLVQIAVPSK--TEVEEYKKLSSQTHELVGRINGKFGSVDSPIVFINQSVNFHDLVALYSVADVCVVSSIRGDMNLVSYEYV
PhTPS2-1	HVVLVQIATPSQ--TTSEEYAGFRAEILEEVGRINGRFGTVDDMPIHYREHAMSFDTLCALYSMAADVAVITSLRDMNLVSYEYI
PhTPS2-2	AVVLVLVATIPRHPRLSSYRALASQINTSVGRINSTYGSIGTSPVHFINAELPQDELYALMSVSGVCVVSSIRGDMNLVSYEWA
PhTPS1	MCQR-ERHGVVLSEFAGSAQSLS-GALRVNPNWIEELATALHDALSASPRERQLKQKLYRYVTTHTAAFWAQSFVSELRELAN
PhTPS2-1	VCQA-KNRGVLVSEYTGAAQSLP-GALLCNPWSVEEVSHTLHVALTMSDAERELKHKKLYRYILMHSSSQWGLNFVSDLLQYSA
PhTPS2-2	ICQHAGNRGPLILSEFAAAAHFS-TARHVNPDVDDLKDLAACLTMPTMDKRSRDEAAYRVTTHTAQLWGLNFLEDLEEIEP
PhTPS1	LEREARDARGANLPLPFLRVERELVTAMQPRRHRLFLFEYEGTLCAPVALADLAT-----PSSSLRRYLARLIADRANAVY
PhTPS2-1	ARRLAVE--KLVRLPVAHVR--WLF-ARRRRRLILDYDGTIREWESQPELAE-----PSVRLRTLKRLADDEANMVF
PhTPS2-2	VRARVVA-----TPHLDEAALSDLSRSSTKRKLFLDYDGTIIPFHLWLQAA-----PPPTVTDFTNLVSQPDVEVI
PhTPS1	IFSSRSKTVLDGWFGLHVGLVAEHGCDFRHPGHPA-----WEP-----
PhTPS2-1	IITGRQKDTMRWFSGLGIGFAVEHGFALQWPARVRPMFRASAHRSVSLPLDGPSPMAGFSPLAGPSPLVGLSPIGSPPLPRQ-
PhTPS2-2	ILSGRDRAKLSAWFPDSRIGLAAEHGHLRLPNETEWQVLPGRYSTNAPPPSGPPPLDASAPPNTAPSNVTVPAMPAMPVGL
PhTPS1	-----GSAT-----RMAPLPALSPLLRGV-----GPLAGAAPLA-DTPSWGAPSRRRD-----
PhTPS2-1	SSSGVNVDTPSLIALPKSLASLPVAPAAAAVDTSNRRPQPVSDDGASPSLLVVPDPRDGTADVAAGEPPLLSPAGSRDAALAA
PhTPS2-2	-----RPHHAHHHAHAH-----HAHHVHG-----RPHTGPVLPSPD
PhTPS1	ASGAPDITAGGRGHKKHVSLSDDSSSGSGSSGIGVDSGSASAGASVGGRRGRSSKGGEGGGSSMDSRGGVLPVLGVAA
PhTPS1	-----LIGLHDPAWRD-----EVVPIQLQYFSERTPGSHLELK
PhTPS2-1	AS--AAPAPDAAVR-----PANLHLPGLGSVDSAEEDWWEERPENDPAVERAMVAALAAQARSLKTFERHTPGSFVVDK
PhTPS2-2	AGSSPRSGPDAAVGGEGGGVRLPPPTVTPIGGGVVPVGAAPSPTLGS--TAASTGHIAAWKSAVLPVMRHVVERTPGAVMEEG
PhTPS1	EKVITWHFRDADPQFGSWQAKELQ-LLAESCTSLPVEVVSQS--KFLELRPVGNRVAAVQRIIAELPE-----PALDFVLSL
PhTPS2-1	ESSVTWLYRDADSNFAFTQAKARQR-LEEVGGSPLEVLVGH--KILYVRPGVNGKATVRQIVRRMRHVDGGVGGPDLLFAV
PhTPS2-2	EATVTWHYYDADVDFGRWQARDLQKHLELFLQLHSVEVVSGEKPGKWKIVRPSGVDKAGAVQRALE-----LSGARFDWAIVA

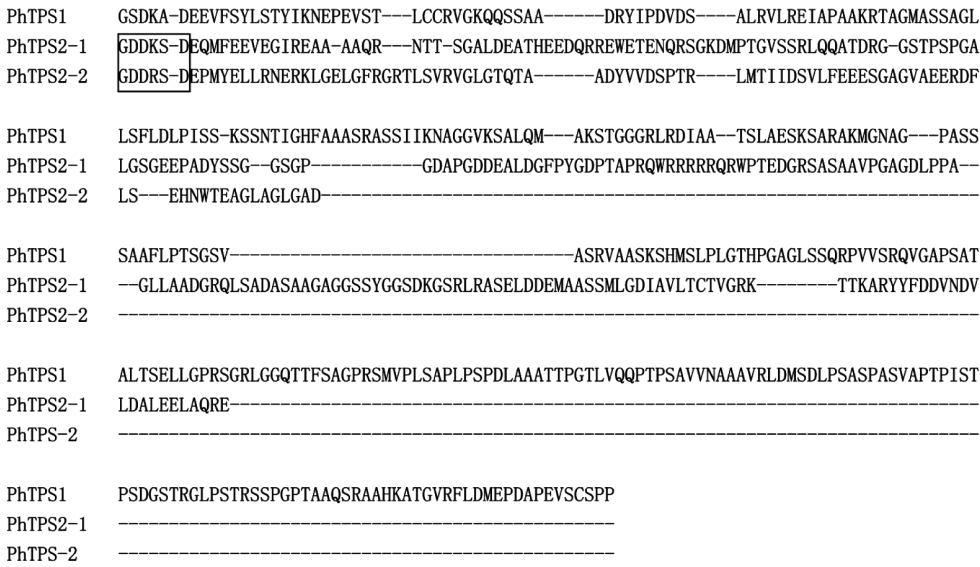


图 2 PhTPS 蛋白氨基酸序列的多重序列比对

下划线部分为 N 端的 GT1_TPS 保守结构域,阴影和“▲”标记位点为 6-磷酸葡萄糖底物结合的保守位点,阴影和“●”标记位点为 UDP-葡萄糖底物结合的保守位点,阴影和方框标记位点为糖原磷酸化酶糖基转移酶(GPGTF)家族共有的保守位点,方框部分为磷酸水解酶(TPS2)的保守位点

Fig. 2 Multi-alignment of amino acid sequence of PhTPS

The underline sections were the conserved N-domains of GT1_TPS. The amino acid sites which indicated with gray background and “▲” were the conserved substrate binding sites of glucose-6-phosphate, the amino acid sites which indicated with gray background and “●” were the conserved substrate binding sites of UDP-glucose; the amino acid sites which indicated with gray background and box were the conserved sites of glycogen phosphorylase glycosyltransferase family, and the amino acid residues which indicated with boxes are the two typical conserved sites in the phosphatase family(TPS2)

2.2 *PhTPS* 基因的多序列比对及系统进化分析

TPS 蛋白氨基酸序列的多重序列比对结果表明,所克隆的 3 条基因均属于 *TPS* 基因家族,其中 PhTPS1 与 GenBank 数据库中已公布的其中 1 条坛紫菜 TPS 氨基酸序列(AGT80036.1)的同源性为 99%,而与其他 3 条已公布坛紫菜 TPS 氨基酸序列的同源性均为 38%;PhTPS2-1 和 PhTPS2-2 与已公布的坛紫菜 TPS 氨基酸序列的同源性较低,仅为 37%~51%(表 2)。多重序列比对结果表明,PhTPS1 蛋白只具有 N 端的 GT1_TPS 保守结构域,属于 I 型 TPS 亚家族;而 PhTPS2-1 和 PhTPS2-2 蛋白除了具

有 N 端的 GT1_TPS 保守结构域外,还包含 C 端具两个磷酸水解酶保守位点的 TPP 结构域(图 2),因此 PhTPS2-1 和 PhTPS2-2 为双功能蛋白,属于 II 型 TPS 亚家族。同时这 3 条 *PhTPS* 基因所编码的氨基酸序列均包含部分高度保守的位点,如参与结合 6-磷酸葡萄糖底物的位点 Arg9、Gly40、Tyr76、Trp85 和 Arg300,参与结合 UDP-葡萄糖底物的位点 Gly22、Asp130、His154、Arg262、Asp361 和 Glu369,其中, Asp361 和 Glu369 是糖原磷酸化酶糖基转移酶(glycogen phosphorylase glycosyltransferase, GPGTF)家族共有的保守位点(图 2)。

表 2 坛紫菜 TPS 蛋白氨基酸的序列同源性
Tab. 2 Sequence similarity among TPS of *P. haitanensis*

	PhTPS1	PhTPS2-1	PhTPS2-2	AGT80036.1	AGT98612.1	AHB86958.1
PhTPS2-1	50					
PhTPS2-2	42	40				
AGT80036.1	99	51	42			
AGT98612.1	38	39	37	38		
AHB86958.1	38	39	38	38	97	
ABG75728.1	38	39	37	38	97	99

为进一步明确 PhTPS 蛋白的系统进化关系,选取 GenBank 数据库中公布的藻类和高等植物的 4 条 I 型或 12 条 II 型 TPS 蛋白的氨基酸序列与本研究克隆的 3 条 *PhTPS* 基因所编码的氨基酸序列,通过 MEGA 6.06 程序采用最大似然法(Maximum Likelihood, ML)构建了系统进化树(图 3)。结果显示,TPS 系统进化树分为明显的两支:4 条 I 型 TPS 蛋白先和 PhTPS1 聚类后,再

与皱波角叉菜(XP_005712424.1) II 型 TPS 蛋白及两条 PhTPS2 蛋白共同聚类为一个分支,而剩余的 II 型 TPS 蛋白聚类为另一个分支(图 3)。说明坛紫菜和皱波角叉菜的 II 型 TPS 蛋白与 I 型 TPS 蛋白的亲缘关系更近,而与其他植物和藻类的 II 型 TPS 蛋白的亲缘关系更远;尤其是条斑紫菜和坛紫菜,尽管二者亲缘关系很近,但它们所具有的 II 型 TPS 蛋白的亲缘关系却很远。

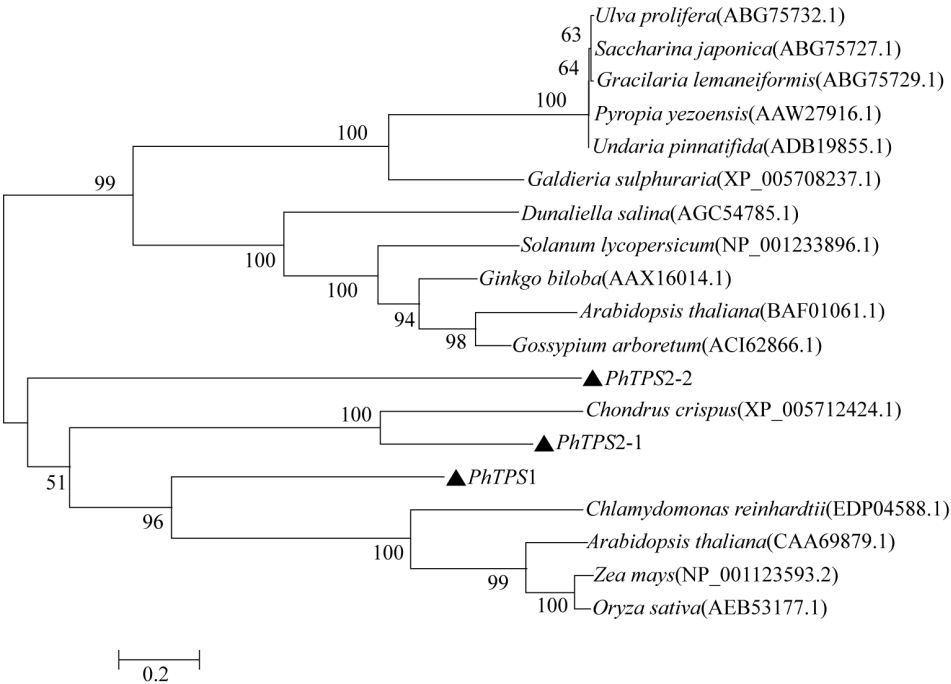


图 3 基于氨基酸序列构建 TPS 的系统进化树
Fig. 3 Phylogenetic tree constructed with TPS amino acid sequences

2.3 *PhTPS* 基因表达水平的实时荧光定量 PCR 分析

为分析 *PhTPS* 基因在坛紫菜响应逆境胁迫中的可能作用,本研究通过 qPCR 技术对 3 条 *PhTPS* 基因在高温和失水胁迫下的表达特征进行了相对定量分析(图 4)。

在 29℃ 高温胁迫不同时间水平条件下, *PhTPS1*、*PhTPS2-1* 和 *PhTPS2-2* 3 个基因的表达模式基本一致:在高温胁迫 3 h 时, *PhTPS1* 和 *PhTPS2-1* 的表达水平由于受短时间高温刺激,表达水平显著上调($P < 0.05$),而 *PhTPS2-2* 的表达水平则没有发生显著变化($P > 0.05$);但当高温胁迫 > 3 h 时,3 个基因的表达水平均受到较长时间高温胁迫的抑制,表达水平显著下调($P < 0.05$);当高温胁迫持续超过 12 h (*PhTPS1* 和

PhTPS2-2) 或 24 h (*PhTPS2-1*) 时,3 个基因的表达水平可能受到藻体细胞中自身应激反馈机制的干预,又显著上调至高温胁迫开始前的水平(*PhTPS2-1* 和 *PhTPS2-2*),甚至更高(*PhTPS1*) ($P < 0.05$,图 4-a,c,e)。说明 *PhTPS* 基因在坛紫菜高温胁迫应答中可能没有发挥明显的作用,其表达水平的动态变化只是一种被动适应的结果。

在不同失水胁迫条件下, *PhTPS1*、*PhTPS2-1* 和 *PhTPS2-2* 3 个基因的表达水平变化模式基本一致,但表达水平发生显著变化的节点并不一致: *PhTPS1* 在中低水平(失水率 $\leq 60\%$) 的失水胁迫条件下,表达水平没有发生显著变化($P > 0.05$),但当失水率为 75% 时,表达水平显著上调($P < 0.05$),上调至失水胁迫前表达水平的 4.47 倍,但随着失水胁迫的加剧,表达水平又显著下调($P <$

0.05),并可在复水 30 min 后,恢复到失水胁迫发生初期水平(图 4-b);*PhTPS2-1* 在低水平(失水率 $\leq 15\%$)的失水胁迫条件下,表达水平没有发生显著变化($P > 0.05$),但当失水率 $> 15\%$ 时,表达水平显著上调($P < 0.05$),并在失水率为 $30\% \sim 75\%$ 时维持稳定($P > 0.05$),当失水率为 90% 时,表达水平再次显著上调($P < 0.05$),此时复水 30 min,*PhTPS2-1* 的表达水平可迅速下调至失水胁迫发生前的水平(图 4-d);*PhTPS2-2* 在失水率

$\leq 75\%$ 时,表达水平没有发生显著变化($P > 0.05$);但当失水率为 90% 时,表达水平显著上调($P < 0.05$),此时复水 30 min,表达水平又迅速下调至失水胁迫发生前水平(图 4-f)。说明 *PhTPS1* 和 *PhTPS2-2* 基因可能只在高水平的失水胁迫应答中发挥应激调节作用,而在低水平的失水胁迫下,作用并不明显;而 *PhTPS2-1* 基因则可能在中高水平的失水胁迫应答中发挥应激调节作用。

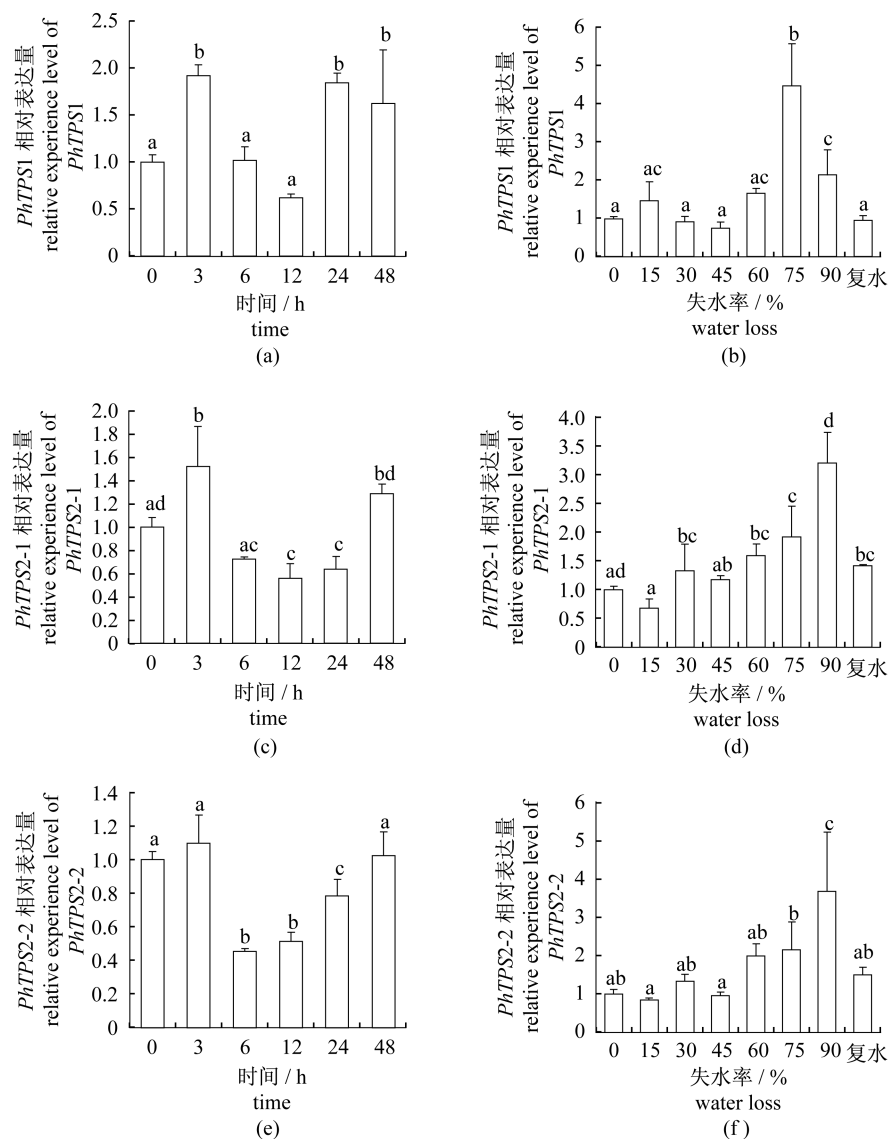


图 4 不同胁迫条件下 *PhTPS* 的相对表达水平

a、c、e; 高温胁迫; b、d、f; 不同水平失水胁迫及复水 30 min。不具有相同字母上标的数据间差异显著($P < 0.05$)

Fig. 4 The relative expression levels of *PhTPS* genes at different levels of stress

a、c、e; The relative expression levels of *PhTPS* genes in different time of high temperature stress; b、d、f; The relative expression levels of *PhTPS* genes in different level of desiccation and in rehydration for 30 min. Bar of each column with different small letters mean significant difference($P < 0.05$)

3 讨论

海藻糖作为一种贮藏性的碳水化合物,提高其在细胞中的积累量是通过基因工程手段提高植物抗逆能力的一种有效方法^[4],而 TPS 是海藻糖生物合成途径的关键酶,将 TPS 基因直接导入水稻等多种植物中已成功获得了抗逆能力明显改善的基因工程作物^[5-8]。然而在已有的转 TPS 基因研究中,大都采用来自大肠杆菌或酵母菌的 TPS 基因作为目的基因,克隆来源更加安全的 TPS 基因是非常必要的。因此本研究以转录组测序获得的 TPS unigene 序列作为核心序列,采用普通 PCR 或 RACE 扩增技术成功克隆了 3 条来自坛紫菜的 TPS 基因。

TPS 基因属于多基因家族,已完成全基因组测序的物种中,拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[19]和水稻^[20]中均发现了 11 个 TPS 基因。根据序列的相似性和特异性,可以将 TPS 同源基因分为 2 个亚家族^[20-21]: I 型 TPS 亚家族基因只含有 N 端的 TPS 保守结构域,该结构域编码的蛋白属于糖基转移酶家族,能够催化 6-磷酸葡萄糖合成 6-磷酸海藻糖;而 II 型 TPS 亚家族基因除了具有 N 端的 TPS 保守结构域外,还包含 C 端具 2 个磷酸水解酶保守位点的 TPP 结构域,为双功能基因。本研究克隆的 3 条坛紫菜 TPS 基因,PhTPS1 属于 I 型亚家族,而 PhTPS2-1 和 PhTPS2-2 则属于 II 型 TPS 亚家族。Wang 等^[15]根据基因的保守序列设计特异性引物,采用 PCR 分段扩增及序列拼接的方法克隆了红藻、褐藻与绿藻等 10 种大型海藻(包括坛紫菜和条斑紫菜)的 TPS 基因,结果发现这 10 条 TPS 基因的同源性均在 90% 以上,无内含子,ORF 均为 2 727 bp,其中坛紫菜与条斑紫菜的亲缘关系最近,但两者 TPS 基因的同源性却最低。而本研究克隆的 3 条坛紫菜 TPS 基因,从 ORF 长度到氨基酸序列的同源性均与其他大型海藻的 TPS 基因相差较大,这在系统进化树中即可看出。即使同样来自坛紫菜的 TPS 基因,只有 PhTPS1 基因与 GenBank 数据库中已公布的其中 1 条坛紫菜 TPS 基因(AGT80036.1)的序列同源性为 99%,而 PhTPS2-1 和 PhTPS2-2 基因与 GenBank 数据库中已公布的坛紫菜 TPS 基因的序列同源性均很低,且 PhTPS1、PhTPS2-1 和 PhTPS2-2 基因之间的序列同源性都低于 50%。

究其原因可能是 Wang 等^[15]是依据基因序列的保守性设计特异性引物进行全长基因克隆的,而本研究则依据的是转录组测序获得的不同 TPS 基因序列片段进行基因全长克隆,因此所克隆的 PhTPS 基因序列同源性较低。鉴于 PhTPS2-1 和 PhTPS2-2 基因序列与已有坛紫菜 TPS 基因的序列同源性差异较大,却拥有典型的 TPS 基因的结构域特征,这 2 个基因应为坛紫菜 TPS 基因家族的新成员。

植物对逆境胁迫的响应是一个非常复杂的生理生化过程,其中包括多种基因、多种生理机制的共同调控。海藻糖由于可与 2 个水分子结合形成玻璃态结构,具有很强的抗脱水作用,在逆境条件下可稳定生物膜、蛋白质和核酸等细胞结构和生物大分子,显著提升植物的抗逆性^[2],因此成为了近年来抗逆基因工程研究的重点。由于栖居环境的特殊性,紫菜被认为是研究潮间带海藻抗逆性的理想物种^[12],摸清坛紫菜海藻糖合成关键酶 TPS 基因在逆境胁迫条件下的表达水平变化,对于了解海藻糖在坛紫菜逆境胁迫应答中的可能作用具有重要意义。本研究采用 qPCR 技术检测了 3 条 PhTPS 基因在坛紫菜受不同程度高温和失水胁迫条件影响时的表达水平变化,结果表明在高温胁迫应答中,PhTPS 基因可能没有发挥明显作用,其表达水平的动态变化只是一种被动适应的结果;而在失水胁迫应答中,PhTPS 基因的表达水平也只在中高水平(PhTPS2-1),甚至只在高水平(PhTPS1 和 PhTPS2-2)的失水胁迫中显著上调,说明 PhTPS 基因可能在中高水平的失水胁迫中发挥应激调节作用。PhTPS 基因在失水胁迫条件下的表达模式与 PhHsp70^[22]及 PhHsp90^[23]等基因在失水胁迫下的表达模式基本一致。这些逆境胁迫相关基因在中低水平的失水胁迫条件下表达水平没有发生显著变化的原因可能与坛紫菜的栖息环境有关:坛紫菜分布于潮间带的中高潮区,在长期的进化过程中已经适应了潮间带伴随潮涨潮落而产生的周期性失水和复水环境条件,中低水平的失水对坛紫菜藻体而言已不构成胁迫,只是生命活动过程中的一个日常现象,因此在发生中低水平的失水时,其不启动应激响应机制,而只在发生高度失水时才启动。这一点同样可以在坛紫菜藻体失水条件下的光合作用速率检测结果中得到证实,中低水平的失水对坛紫菜藻体的光合速

率并没有影响,失水率达 60% 时,藻体仍然能以最大速率进行光合作用^[24]。

参考文献:

- [1] Iturriaga G, Suárez R, Nova-Franco B. Trehalose metabolism: From osmoprotection to signaling [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2009, 10 (9): 3793 – 3810.
- [2] Crowe J H, Crowe L M, Chapman D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organism: The role of trehalose [J]. Science, 1984, 223 (4637): 701 – 703.
- [3] Goddijn O J, Van D K. Trehalose metabolism in plants [J]. Trends in Plant Science, 1999, 4 (8): 315 – 319.
- [4] Paul M J, Primavesi L F, Jhurrea D, et al. Trehalose metabolism and signaling [J]. Annual Review of Plant Biology, 2008, 59: 417 – 441.
- [5] Garg A K, Kim J K, Owens T G, et al. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99 (25): 15898 – 15903.
- [6] Jang I C, Oh S J, Seo J S, et al. Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth [J]. Plant Physiology, 2003, 131 (2): 516 – 524.
- [7] Karim S, Aronsson H, Ericson H, et al. Improved drought tolerance without undesired side effects in transgenic plants producing trehalose [J]. Plant Molecular Biology, 2007, 64 (4): 371 – 386.
- [8] Suárez R, Calderón C, Iturriaga G. Enhanced tolerance to multiple abiotic stresses in transgenic alfalfa accumulating trehalose [J]. Crop Science, 2009, 49 (5): 1791 – 1799.
- [9] Chen C S, Ji D H, Xie C T, et al. Preliminary study on selecting the high temperature resistance strains and economic traits of *Porphyra haitanensis* [J]. Acta Oceanologica Sinica, 2008, 30 (5): 100 – 106. [陈昌生, 纪德华, 谢潮添, 等. 坛紫菜耐高温品系选育及经济性状的初步研究. 海洋学报, 2008, 30 (5): 100 – 106.]
- [10] Yan X H, Lv F, Liu C J, et al. Selection and characterization of a high-temperature tolerant strain of *Porphyra haitanensis* Chang et Zheng (Bangiales, Rhodophyta) [J]. Journal of Applied Phycology, 2010, 22 (4): 511 – 516.
- [11] Li B, Xu Y, Ji D H, et al. Effects of high temperature and non-aeration stress on the quality of *Porphyra haitanensis* [J]. Progress in Fishery Sciences, 2013, 34 (3): 104 – 110. [李兵, 徐燕, 纪德华, 等. 高温静水胁迫培养对坛紫菜品质的影响. 渔业科学进展, 2013, 34 (3): 104 – 110.]
- [12] Blouin N A, Brodie J A, Grossman A C, et al. *Porphyra*: A marine crop shaped by stress [J]. Trends in Plant Science, 2011, 16 (1): 29 – 37.
- [13] Xie C T, Li B, Xu Y, et al. Characterization of the global transcriptome for *Pyropia haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta) and development of cSSR markers [J]. BMC Genomics, 2013, 14 (1): 107.
- [14] Zhang B J, Xuan J S. Silico cloning of the gene encoding trehalose-6-phosphate synthase from *Porphyra yezoensis* [J]. China Journal of Bioinformatics, 2007, 6 (1): 6 – 8. [张冰君, 宣劲松. 条斑紫菜 6-磷酸海藻糖合成酶基因全长 cDNA 的电子克隆. 生物信息学, 2007, 6 (1): 6 – 8.]
- [15] Wang G L, Zhao G, Feng Y B, et al. Cloning and comparative studies of seaweed trehalose-6-phosphate synthase genes [J]. Marine drugs, 2010, 8 (7): 2065 – 2079.
- [16] Deng S Z, Wang B, Gao L, et al. Cloning of trehalose-6-phosphate synthase (TPS) gene from *Porphyra haitanensis* and its prokaryotic expression [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2013, 28 (5): 66 – 73. [邓淑贞, 王斌, 高磊, 等. 坛紫菜 TPS 基因的克隆及其原核表达. 华北农学报, 2013, 28 (5): 66 – 73.]
- [17] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25 (24): 4876 – 4882.
- [18] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28 (10): 2731 – 2739.
- [19] Leyman B, Van D P, Thevelein J M. An unexpected plethora of trehalose biosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana* [J]. Trends in Plant Science, 2001, 6 (11): 510 – 513.
- [20] Zang B S, Li H W, Li W J, et al. Analysis of trehalose-6-phosphate synthase (TPS) gene family

- suggests the formation of TPS complexes in rice[J]. Plant Molecular Biology, 2011, 76(6): 507–522.
- [21] Vandesteene L, Ramon M, Le R K, *et al.* A single active trehalose-6-P synthase (TPS) and a family of putative regulatory TPS-like proteins in *Arabidopsis* [J]. Molecular Plant, 2010, 3(2): 406–419.
- [22] Ji D H, Li B, Xu Y, *et al.* Cloning and quantitative analysis of five heat shock protein 70 genes from *Pyropia haitanensis*[J]. Journal of Applied Phycology, 2014, DOI:10.1007/s10811-014-0314-6.
- [23] Dai Z Z, Li B, Xu Y, *et al.* Cloning and expression pattern analysis of two heat shock protein (*Hsp90*) genes from *Pyropia haitanensis* [J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(3): 340–349. [代真真, 李兵, 徐燕, 等. 坛紫菜两种 Hsp90 基因的克隆及表达特征分析. 水产学报, 2014, 38(3): 340–349.]
- [24] Zou D H, Gao K S. Effects of desiccation and CO₂ concentrations on emerged photosynthesis in *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta), a species farmed in China [J]. European Journal of Phycology, 2002, 37(4): 587–592.

Cloning and expression analysis of trehalose-6-phosphate synthase (TPS) family genes from *Pyropia haitanensis*

SHI Jianzhi, XU Yan, JI Dehua, CHEN Changsheng, XIE Chaotian *

(College of Fisheries, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Trehalose-6-phosphate synthase (TPS), the key enzyme involved in trehalose biosynthesis, plays particularly important roles in a variety of stress responses. In this study, based on unigene sequences which were obtained from whole transcriptome sequencing of *Pyropia haitanensis*, three full-length *PhTPS* genes were obtained by rapid amplification of cDNA ends (RACE), and named *PhTPS1*, *PhTPS2-1* and *PhTPS2-2*. The full-length cDNA of the *PhTPS* gene comprised 3 557 nucleotides and contained an open reading frame of 3 462 bp (GenBank accession: KM580358), encoding a protein of 1 153 amino acid residues with the predicted molecular weight of 124.2 ku and theoretical isoelectric point of 6.73; the full-length cDNA of the *PhTPS2-1* gene comprised 4 264 nucleotides and contained an open reading frame of 4 044 bp (GenBank accession: KM519457), encoding a protein of 1 374 amino acid residues with the predicted molecular weight of 145.2 ku and theoretical isoelectric point of 5.96; and the full-length cDNA of the *PhTPS2-2* gene comprised 3 733 nucleotides and contained an open reading frame of 3 324 bp (GenBank accession: KM519458), encoding a protein of 1 107 amino acid residues with the predicted molecular weight of 120.2 ku and theoretical isoelectric point of 5.42. On the basis of conserved motifs and phylogenetic tree analysis, *PhTPS1* belongs to the I subfamily of TPS and *PhTPS2-1* and *PhTPS2-2* belong to the II subfamily of TPS. The expressions of the three *PhTPS* genes, as measured by real-time quantitative PCR, were significantly induced by high-temperature stress and desiccation stress, but had different expression patterns. During high-temperature stress, the expression levels of the three *PhTPS* genes were all significantly upregulated firstly and then decreased, but as the high-temperature stress continues, the expression levels were upregulated again. However, during desiccation, the expression levels of *PhTPS1* and *PhTPS2-2* were significantly upregulated only when the water loss was > 60% or 75%, but the expression level of *PhTPS2-1* was significantly upregulated when the water loss was > 15%. These results suggested that the three *PhTPS* genes may play important roles in the response to higher desiccation stress.

Key words: *Pyropia haitanensis*; trehalose-6-phosphate synthase; RACE; real-time quantitative PCR

Corresponding author: XIE Chaotian. E-mail: ctxie@jmu.edu.cn