

不同盐浓度处理下的紫球藻转录组测序分析

高帆^{1,2*}, 宋韡³, 汤丽群¹

(1. 山西大学 生命科学学院, 山西 太原 030006;

2. 山西大学 教务处, 山西 太原 030006;

3. 山西体育职业学院, 山西 太原 030036)

摘要: 转录组测序是挖掘调控微藻独特生物学功能及代谢通路关键基因的重要技术手段之一,但目前国内外对于不同盐浓度处理下的紫球藻(*Porphyridium*)转录组测序研究很少。为进一步挖掘不同浓度盐处理条件下紫球藻的功能基因,分析其参与的关键代谢通路,探究其在该藻类生长发育、生物活性物质合成及其产业化应用中的价值,本研究运用形态学、生理生化、分子生物及生物信息技术,分别对基础培养基条件(0.06 mol·L⁻¹ NaCl)、中盐(1.0 mol·L⁻¹ NaCl)和高盐(3.0 mol·L⁻¹ NaCl)处理条件下的紫球藻(*P. purpureum*)进行特征及转录组测序分析。研究共获得65 790条单基因(Unigenes),其中CDS(Coding Sequence)序列49 653条,29.81%的Unigenes可被七大生物信息数据库注释,*de novo*组装了357条Contigs,其中N50长度5 467 bp,GC(Guanine and Cytosine)占比58.26%。差异表达基因(Differentially Expressed Genes, DEGs)可划分为3大簇,其中高盐处理组相关基因单独聚为一簇。以基础培养基处理组为对照,中、高盐浓度处理组共筛选获得上调表达DEGs 34 016条,下调表达DEGs 69 086条,共有DEGs 15 263条。不同比较组间共有DEGs的GO(Gene Ontology)富集程度最高的是细胞膜整体组分,KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)通路富集程度最高的是RNA转运。本研究所得紫球藻转录组测序数据及组装质量较高,筛选获得的DEGs及其功能信息可在该藻类高渗透压环境下生理机制研究、高品质微藻资源分子选育及模式微藻工业应用中提供重要的参考。

关键词: 紫球藻;耐盐性;转录组测序;差异表达基因

中图分类号:Q949.2

文献标志码:A

文章编号:0253-2395(2024)04-0854-11

Transcriptomic Analysis of *Porphyridium purpureum* Under Different Salinity Treatments

GAO Fan^{1,2*}, SONG Wei³, TANG Liqun¹

(1. School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;

2. Academic Affairs Office, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;

3. Shanxi Sports Vocational School, Taiyuan 030036, China)

Abstract: As an essential technology to screen the key genes with the unique biological functions and involved in the important metabolic pathways in microalgae, transcriptomic sequencing has been widely utilized in algae research. However, nowadays, a few studies on the transcriptomic sequencing of *Porphyridium* under different salinity treatments have been reported around the world. In order to screen the functional genes of *Porphyridium* under different salt treatment conditions, analyze their related key metabolic path-

收稿日期:2023-11-06;接受日期:2024-01-26

基金项目:山西省基础研究计划(自由探索类)(202103021224009);教育部产学合作协同育人项目(220504697124957);山西省高等学校教学改革创新项目(J20220046);山西省科技战略研究专项(202204031401051)

作者简介:高帆(1985-),男,山西长治人,博士,高级实验师,主要研究方向为藻类系统发育及分子生物学。E-mail:gao-fan@sxu.edu.cn

引文格式:高帆,宋韡,汤丽群.不同盐浓度处理下的紫球藻转录组测序分析[J].山西大学学报(自然科学版),2024,47(4):854-864. DOI:10.13451/j.sxu.ns.2024009

ways, and explore their values in the growth and development, synthesis of bioactive substances, and industrial application, the morphological, physiological and biochemical, molecular biological and bioinformatic techniques have been used to feature analysis and transcriptomic sequencing of *P. purpureum* under the basic medium ($0.06 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$), moderate salt ($1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$) and high salt ($3.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$) treatments, respectively. A total of 65 790 unigenes were obtained, including 49 653 coding domain sequences (CDS). 29.81% of them could be annotated among the seven bioinformatic databases. Totals of 357 contigs could be *de novo* assembled with a length of 5 467 bp for N50 and a GC ratio of 58.26%. Furthermore, differential expression genes (DEGs) could be divided into three major clusters *via* the cluster analyzing with the high salt treatment group clustered separately in this alga. Altogether, 34 016 up-regulated DEGs, 69 086 down-regulated DEGs and 15 263 common DEGs were screened from the medium and high salinity treatment groups with the basic medium group as a control, respectively. The highest enriched Gene Ontology (GO) of DEGs among different comparative groups was the integral component of membrane. Meanwhile, the highest enriched Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway was RNA transport. To sum up, abundant transcriptomic sequencing data with high assembly quality of *P. purpureum* with different salt treatments have been obtained in this study. The DEGs and their functional annotations predicted in this alga will provide an important reference in for further researching on its high osmotic pressure adaptability and physiological mechanism, molecular breeding of high-quality microalgae resources and industrial application of the model *Porphyridium* strains.

Key words: *Porphyridium purpureum*; salt tolerance; transcriptomic sequencing; differential expression gene

0 引言

藻类植物可通过维持离子稳态、调节渗透压平衡、抗氧化及非编码RNA调控等方式来应答环境盐度的变化^[1]。紫球藻(*Porphyridium*)是1849年首次被Naegeli发现的红藻门一类原始的单细胞微藻。Liberti(2023)总结性地提出紫球藻属可划分7个品系^[2],即*P. purpureum*、*P. marinum*、*P. aerugineum*、*P. cruentum*、*P. sordidum*、*P. griseum*和*P. violaceum*。林栖凤(2004)的研究表明^[3],紫球藻属于盐生藻类,常分布于海水、咸水、淡水及潮湿的土壤或湿地。Li等(2019)的研究进一步表明^[4],紫球藻属具有广谱耐盐性,可作为土壤盐渍的指示物。近年来,国内外藻类学家的研究显示^[5-7],紫球藻含有胞外多糖、B-藻红蛋白及高不饱和脂肪酸等多种生物活性物质,可被广泛应用于医疗、食品、保健等领域,是一类极具开发潜力的功能藻类。

随着第二代高通量测序技术的飞速发展,以Solexa(Illumina研发)、Proton(HiSeq、Ion Torrent研发)、Solid(ABI研发)、BGISEQ(华大基因研发)等为代表的测序平台被广泛应用于不同动植物、微生物的测序研究^[8]。转录组测序是挖掘特色物种在不同生物或非生物胁迫因子胁迫下的关键基因,解析基因分子调控功能,进而阐明其在极端环境中应答机制的重要

手段之一^[9-10]。目前,国内外学者对于紫球藻的研究多集中于优化培养、品系鉴定、系统发育、高附加值产物作用机理研究及工业化生产等方面^[11-13],对于其盐处理条件下转录组学及其相关耐盐基因的研究很少,挖掘的盐处理条件下关键基因及该藻类盐适应分子机制及代谢通路研究十分薄弱,这在一定程度上限制了极端条件下紫球藻活性物质生物合成机理机制及定向调控耐盐基因表达的研究。通过转录组测试分析,遴选挖掘不同盐浓度处理下的紫球藻功能基因,进而筛选获得其中的关键耐盐基因,探究其参与的代谢通路。这将为耐盐基因在紫球藻生长发育、耐盐机理机制研究、生物活性物质合成、基因工程应用提供重要参考。

本研究团队已采集、鉴定国内外特色紫球藻资源10余株,并优化获得紫球藻室内培养最佳条件。根据我国《“十四五”生物经济发展规划》中关于生物技术赋能特色生物资源产业发展相关要求^[14],为实现我国紫球藻资源的高效利用,也为紫球藻耐盐机理机制的深入研究及特色耐盐基因的挖掘利用,本研究对不同盐浓度(本文特指NaCl)胁迫下的紫球藻进行转录组测序,分析获得盐处理条件下的关键响应基因,预测基因类型、功能以及其可能参与调控的通路。研究结果不仅填补了国内盐处理条件下紫球藻转录组研究的空白,而且为紫球藻适应高渗透压环境的分子应答机制阐释及盐处理条件下代谢

网络的深入研究奠定了理论基础,更为重要的是,本研究结果还将对盐生藻类植物的基因改良及基于现代生物技术的高附加值产物规模化、产业化生产具有一定的指导意义。

1 材料与方法

1.1 紫球藻搜集与室内培养

紫球藻种(*P. purpureum*)购自英国CCAP藻种库,用实验室优化的人工海水培养基基础配方进行室内小规模培养^[15],保持培养液总体积为1.0 L, pH=7.6,光照强度为1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,光周期12:12 h,环境温度(25±3) °C,培养皿保持无菌通风,每7 d进行一次镜检,确保无杂菌污染。

1.2 生长周期测定与实验分组

利用光学显微镜XSP500(上海光学仪器一厂)和细胞计数器C100(深圳瑞沃德生命科技有限公司)对培养周期内的藻细胞进行计数^[16],绘制紫球藻生长周期曲线图,确定其生长周期。将成熟期第33 d的藻液平均分为三组,一组不另添加NaCl(基础培养基),为对照组CO;另两组分别加入1.0 mol·L⁻¹和3.0 mol·L⁻¹ NaCl,分别为中盐处理组MS和高盐处理组HS,每组分别同时处理12 h。

1.3 RNA提取及转录组测序

分别从处理12 h后的CO、MS和HS组中取藻液各300 mL,低温离心后弃上清,*P. purpureum*用液氮速冻15 s,快速研磨10 s后用Trizol法分别提取各处理组藻株成熟期总RNA^[17],用Algae RNA Column extraction Kit(北京百奥莱博科技有限公司)对其质量进行评估(浓度≥115 ng/ μL , OD260/280:1.8~2.2, RIN(RNA Integrity Number)≥6.2)^[18],按照Golden 1st cDNA Synthesis Kit(with dsNase)(上海泽叶生物科技有限公司)操作说明将进行反转录,按照Must-Seq转录组测序文库试剂盒操作说明(广州序科码生物技术有限责任公司)对合格样本进行文库构建。在BGISEQ-500测序平台(深圳华大基因科技有限公司)对合格样品进行转录组测序,质控分析委托上海生工完成。

1.4 测序数据分析及*de novo*从头组装

利用Sentieon联合Trimmomatic软件对*P.*

*purpureum*测序数据进行过滤、筛选^[19],步骤:去除含Adaptor的Reads,去除low-quality数据,过滤N-base且占比高于4%的Reads;用SPAdes软件^[20]对遴选所得Clean Reads进行从头组装(*de novo*组装)。用Trinity软件筛选单基因(Unigenes)^[21],分析其数量和长度^[22],用BUSCO v.4.0.6软件评估从头组装质量^[23]。

1.5 转录组测序数据注释

将*P. purpureum*转录组测序所得单基因分别与SwissPort、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG)、RefSeq Nonredundant Protein(NR)、Gene Ontology(GO)、Nucleotide Sequence(NT)、Pfam及Eukaryotic Orthologous Group(KOG)数据库进行BLAST比对分析(*E*值≤1.00×10⁻¹⁵,序列相似度百分比≥89%,Contigs无冗余)^[24]。

1.6 基因表达分析

P. purpureum Unigenes的表达量用Fragments per Kilobase of Transcript per Million Fragments(FPKM)进行分析^[25],用R语言limma软件包对其差异表达基因(differential expression gene, DEG)进行分析,用DESeq2软件分析log2 fold change值(绝对值≥2.00, *Q*值≤0.1)^[18],用Consensus Cluster Plus R分析*P. purpureum*不同盐浓度处理组的DEGs聚类情况^[6],用Venn图分析不同处理组间共有的DEGs。

1.7 GO与KEGG分析

P. purpureum Unigenes的GO分类用GOEAST工具进行在线分析,R语言对GO进行富集(*Q*值<0.1)^[10]。*P. purpureum* Unigenes KEGG的KOs(KEGG Orthologs)条目分配和通路(pathways)分类基于HMMER程序进行,通路富集须满足*Q*值<0.1^[26]。

2 结果与分析

2.1 不同盐浓度处理下紫球藻形态与生长周期

由图1(a)可知,紫球藻细胞呈圆形或椭圆,细胞呈紫红色,有蛋白核和载色体,无鞭毛,多聚生,细胞直径为(12±3) μm 。由图1(b)可知,随着NaCl浓度的增加,紫球藻细胞色素逐渐加深,细胞逐渐贴壁生长,藻体多呈片状或絮状,暗示其属于嗜盐藻株,细胞生物量

在一定范围内随着盐浓度的增加而增加。

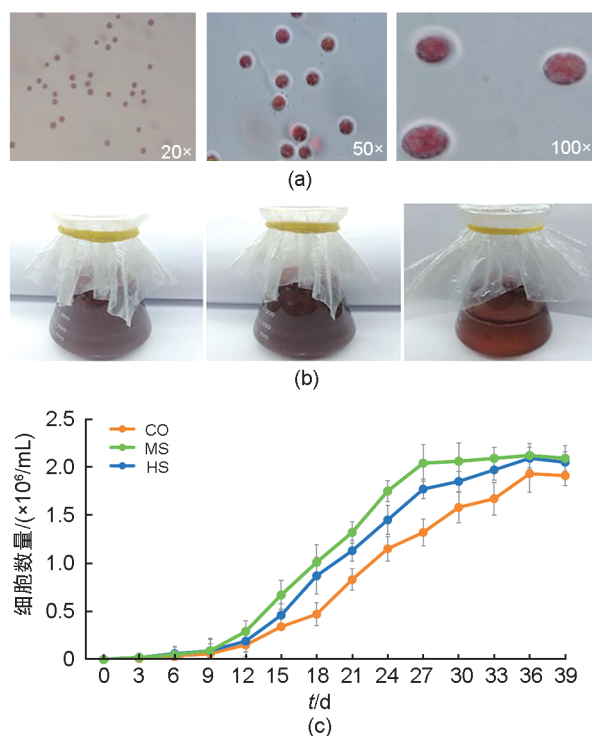


图1 紫球藻形态及生长曲线

(a) 不同放大倍数下(从左至右:20×、50×、100×)的紫球藻显微形态; (b) 低盐(CO)、中盐(MS)、高盐(HS)处理下(从左至右),成熟期紫球藻宏观形态; (c) 39 d内,低盐(CO)、中盐(MS)、高盐(HS)处理下的紫球藻生长曲线

Fig. 1 Morphology and growth curve of *P. purpureum*

(a) Microscopic morphology of *P. purpureum* at different magnifications (from left to right: 20X, 50X, 100X); (b) macromorphology of *P. purpureum* at mature stage under low salt (CO), medium salt (MS), and high salt (HS) treatments from left to right; (c) growth curves of *P. purpureum* under CO, MS, and HS treatments within 39 days of maturity

由图1(c)可知,0~8 d为紫球藻生长初期,3个实验组的平均生物量为 $(0.036 \pm 0.005) \times 10^6$ /mL; 9~26 d为指数生长期,3个实验组的平均生物量为 $(0.956 \pm 0.009) \times 10^6$ /mL; 27~39 d为稳定生长期,3个实验组的平均生物量为 $(1.903 \pm 0.013) \times 10^6$ /mL。MS组的整体生物量高于CO组和HS组,且最大生物量为 $(2.12 \pm 0.012) \times 10^6$ /mL,表明在紫球藻基本培养基盐浓度下,细胞生长所需盐分不够,随着盐浓度的增加,藻细胞生物量逐渐增加,但达到高盐浓度时,细胞因不能适应高渗透压环境而生长受限,生物量有所降低。

2.2 RNA测序与 de novo 组装

*P. purpureum*总RNA平均浓度为119.5 ng/μL, RIN值平均为7.35, OD260/OD280为1.92,该结果符合藻类植物转录组测序标准。3个处理组(每组3个藻株样本)的原始测序大小为19.52 Gb,其中初始测序片段或读长(Reads)约680.51 Mb,每个*P. purpureum*样本的平均Clean reads约48.68 Mb,占比约64.38%(表1)。*P. purpureum*中共鉴定到Unigenes 65 790条,其中完整重叠群(Contig)检测片段共357条(全长 8.26×10^7 bp,百分比90.56%,平均长度952.3 bp)(表1,图2(a))。*P. purpureum*中检测到N50全长约5 467 bp, GC占比约58.26%。基于*P. purpureum*转录组的Unigenes,我们共预测到编码序列(coding sequence, CDS)序列全长约 2.12×10^7 bp,数量共49 653条。*P. purpureum*转录组测序片段中共检测到微卫星序列(simple sequence repeat, SSR)序列总长度约2 123 bp,数量共23 210条, Q20百分比平均约98.75%(Q30为96.67%)。基于*P. purpureum*转录组测序的BUSCO评估(图2(b)),*P. purpureum*不同样本的从头组装完整片段-单拷贝片段、完整片段-双拷贝片段总占比均大于90%,表明该藻株的转录组组装质量较高。

表1 三种不同盐度处理下的紫球藻转录组测序从头组装信息

Table 1 *P. purpureum* transcriptome de novo assembly information under three salinity treatments

指标	值
Clean reads 占比/%	64.38
总Unigene数/条	65 790
Contig总长度/bp	8.26×10^7
Contig平均长度/bp	952
N50长度/bp	5 467
N70长度/bp	1 790
N90长度/bp	585
GC百分比/%	58.26
CDS总数/条	49 653
CDS总长度/bp	2.12×10^7
SSR总长度/bp	23 210

2.3 基因注释信息分析

转录组测序所得约92.38%的Unigenes(共65 790条)可在主要生物信息学数据库中预测到(表2),其中约52.98%的Unigenes有功能或相

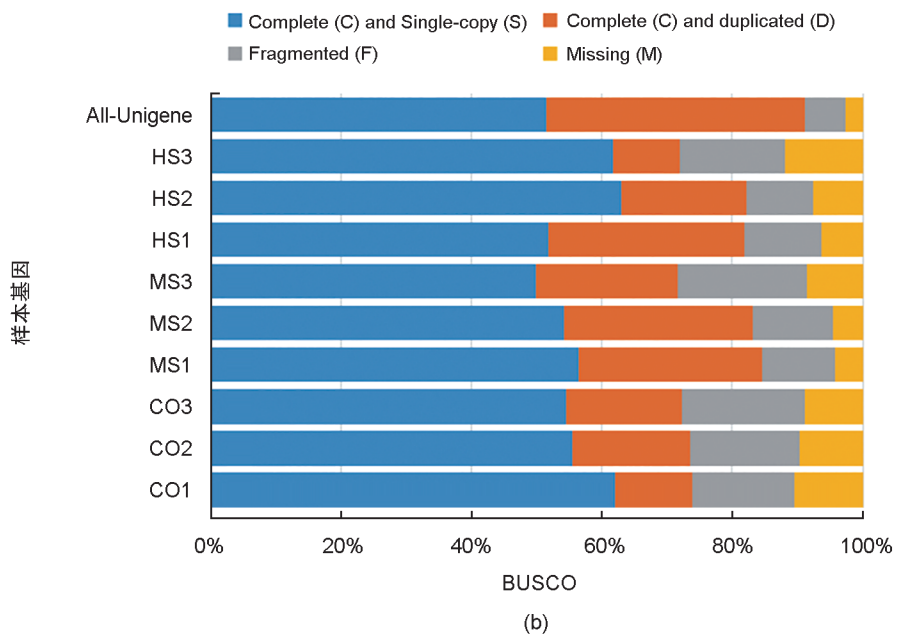
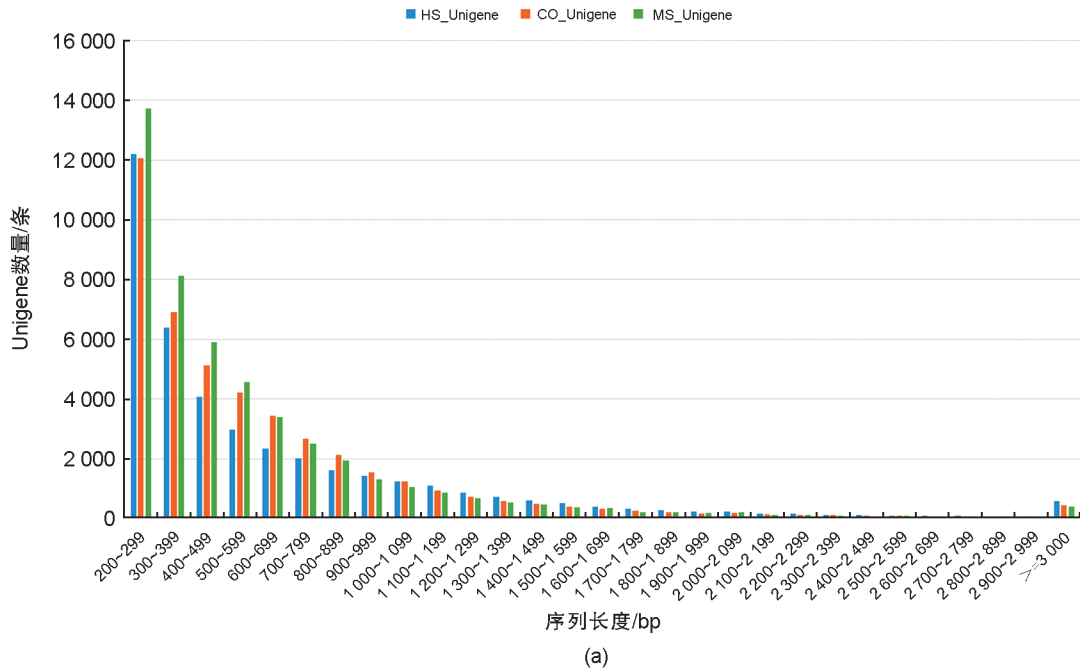


图2 不同盐度处理下,紫球藻转录组测序的单基因长度及组装质量分析

(a)低盐、中盐、高盐处理下的紫球藻单基因长度分布;(b)低盐、中盐、高盐处理下的紫球藻BUSCO转录组组装质量分析

Fig. 2 Single gene length and assembly quality analysis of transcriptome sequencing of *P. purpureum* under different salinity treatments (a) Single gene length distribution of *P. purpureum* under low salt, medium salt, and high salt treatments, respectively; (b) quality analysis of transcriptome assembly of *P. purpureum* BUSCO under low salt, medium salt, and high salt treatments, respectively

关信息注释。由图 3(a)可知, NR、GO、KEGG 和 KOG 的共有 Unigenes 功能注释数有 30 803 条。约 29.81% 的 Unigenes 信息可在低等藻类植物 (*Chlamydomonas eustigma*、*Osreococcus tauri*、*Volvox carteri*) 和高等植物 (*Ricinus communis* 和 *Dorcoceras hygrometricum*) 中注释到, 剩余约

70.19% 的 Unigenes 物种注释信息仍然未知(图 3(b))。由图 3(c)可知, 最多的 KOG 数据库中 Unigenes 注释信息最多的是普遍性功能(4 532 条), 具体功能未知; 其次为后转录水平调控、蛋白质运输及分子伴侣(3 325 条), 最少的 Unigenes 功能被注释与细胞核结构组成有关(12 条)。

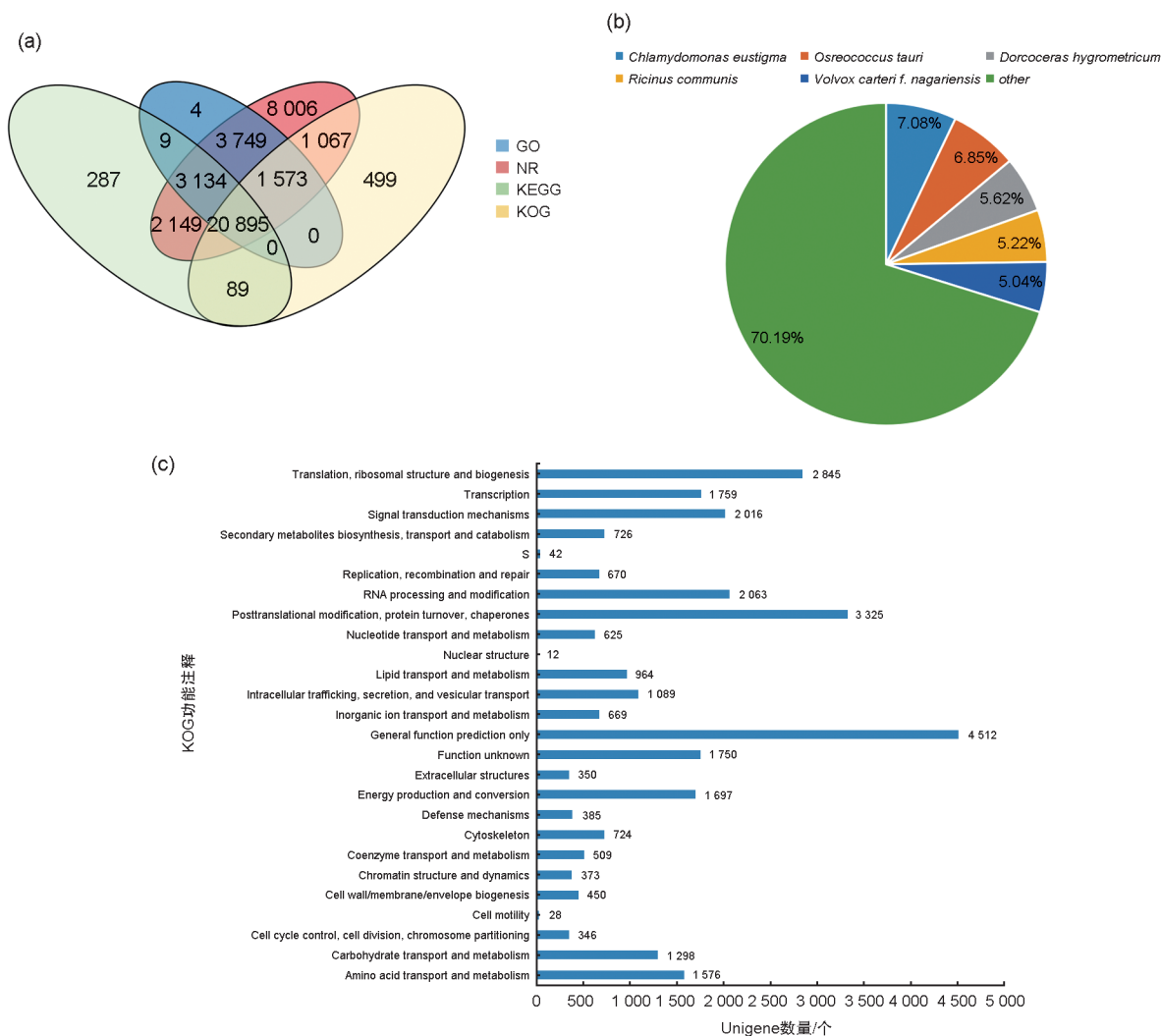


图3 三种不同盐度处理下的紫球藻单基因信息分布及KOG功能注释

(a) 紫球藻单基因注释韦恩图; (b) 紫球藻单基因物种分类注释; (c) 紫球藻单基因KOG功能注释

Fig. 3 Unigenes information distribution and KOG functional annotation of *P. purpureum* under three different salinity treatments

(a) Venn diagram of unigenes annotation in *P. purpureum*; (b) annotations on unigenes species classification of *P. purpureum*;

(c) functional annotation of unigenes KOG in *P. purpureum*

2.4 基因表达分析

由图4(a)可知,基于Unigenes的FPKM值,紫球藻CO组和MS组可聚为一簇,HS组的Unigenes单独聚为一簇,所有Unigenes整体可划分为Cluster I、II和III三大簇。以紫球藻CO组的Unigenes为对照,共检测到63 182条差异表达基因(differentially expressed gene, DEGs)。相对于CO组,MS组共检测到上调表达基因16 572条(M 值 ≥ 2.0 , A 值 ≥ 1.0),下调表达基因29 876条(M 值 ≤ -2.0 , A 值 ≥ 1.0)(图4(b));HS组共检测到上调表达基因17 444条(M 值 ≥ 1.2 , A 值 ≥ -1.2),下调表达基因39 210条(M 值 ≤ -1.8 , A 值 ≥ -1.2)(图4

(c))。由图4(d)可知,两对比较组间共有的差异表达基因有15 263条。

2.5 GO与KEGG代谢通路分析

基于紫球藻组间共有DEGs的GO分类结果显示(图5(a)),GO条目top20中基因功能分类为细胞组分且富集条目最多的是细胞成分和细胞(各37条);分类为生物学过程且富集条目最多的是细胞过程(41条);分类为分子功能且富集条目最多的是连接(58条)。由图5(b)可知,紫球藻不同处理组间共有DEGs的GO富集结果显示,富集度最高的基因功能是细胞膜整体组分(Unigenes数:7 046条, Q 值:0.039)。

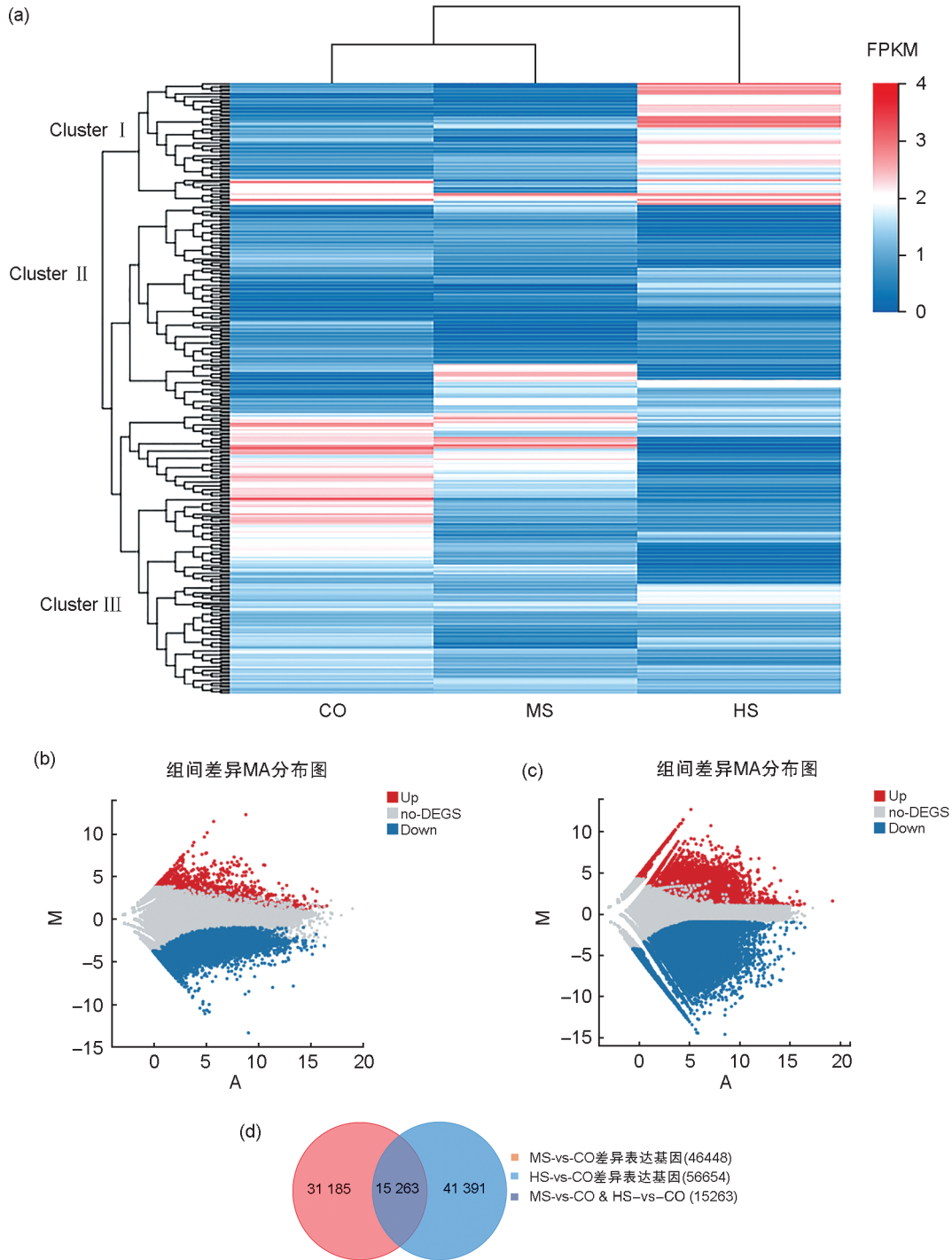


图4 紫球藻不同盐度处理组间的差异表达基因分析

(a) 不同盐度处理组间的紫球藻基因表达聚类图; (b) 紫球藻MS-vs-CO的差异基因表达MA图; (c) 紫球藻HS-vs-CO的差异基因表达MA图; (d) 紫球藻MS-vs-CO和HS-vs-CO差异基因韦恩图

Fig. 4 Analysis of differentially expressed genes in different salinity treatment groups of *P. purpureum*

(a) Cluster diagram of gene expression in *P. purpureum* between different salinity treatment groups; (b) MA diagram of differential gene expression in MS vs CO of *P. purpureum*; (c) MA diagram of differential gene expression in HS vs CO of *P. purpureum*;

(d) Venn diagram of differential genes between MS vs CO and HS vs CO in *P. purpureum*

紫球藻不同处理组间共有 DEGs 的 KEGG 分类结果显示,所有通路可划分为细胞学

程、遗传讯息处理、环境信号处理、有机系统和新陈代谢五大类(图 5(c))。KEGG 功能注释

表2 三种不同盐度处理下的紫球藻转录组单基因生物信息数据库注释

Table 1 Unigene annotation in bioinformatic database based on transcriptome analysis in *P. purpureum* under three salinity treatments

值	总数	NR	NT	Swissprot	KEGG	KOG	Pfam	GO	基因交集数	基因并集数
数量	65 790	48 502	14 982	27 272	33 943	32 052	44 270	29 351	4 590	60 777
占比	100%	52.98%	16.37%	29.79%	37.08%	35.01%	48.36%	32.06%	5.01%	66.39%

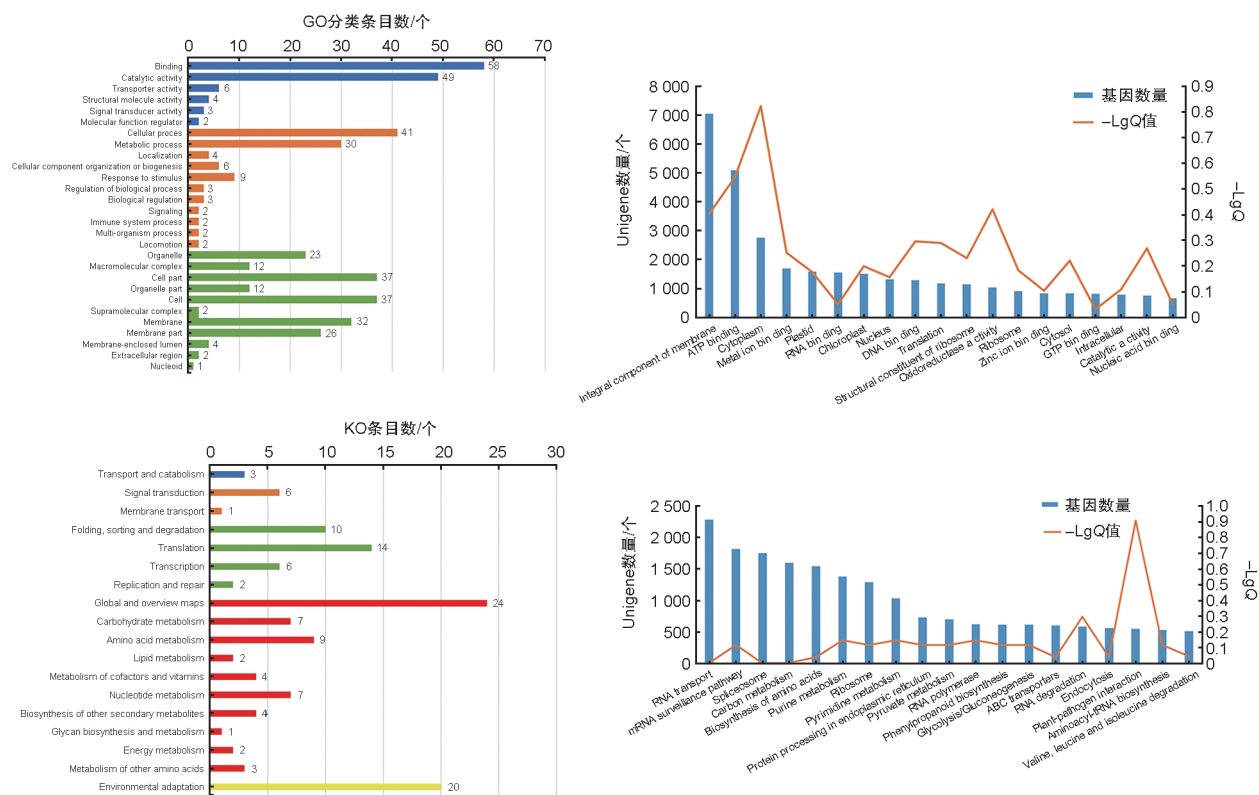


图5 紫球藻不同盐浓度处理组间的共有DGEs的GO与KEGG通路分析

(a) 紫球藻三种不同盐度处理组间共有DEGs GO分类(蓝色代表分子功能,绿色代表细胞组分,橙色代表生物学过程);
 (b) 紫球藻三种不同盐度处理组间共有DEGs GO富集; (c) 紫球藻不同盐度处理组间共有DEGs KO分类(蓝色代表细胞学过程,绿色代表遗传信息处理,橙色代表环境信号处理,红色代表新陈代谢,黄色代表有机系统); (d) 紫球藻不同盐度处理组间共有DEGs KEGG通过富集

Fig. 5 GO and KEGG pathway analyses of the common DEGs among different salt concentrations treatments comparison groups of *P. purpureum*

(a) GO classification of the common DEGs in *P. purpureum* with three different salinity treatments (the blue, green and orange bars represent molecular function, cellular components and biological processes, respectively); (b) GO enrichment of the common DEGs in *P. purpureum* with three different salinity treatments; (c) KO classification of the common DEGs in *P. purpureum* with three different salinity treatments (the blue, green and orange bars represent cellular processes, genetic information processing, environmental signal processing, metabolism, organic systems, respectively); (d) KEGG pathways enrichment of the common DEGs in *P. purpureum* with three different salinity treatments.

最多的是整体代谢通路图(24条)和环境适应(20条)。紫球藻不同处理组间共有DEGs的KEGG富集度最高的是RNA转运(Unigenes数:2 287条,Q值:0.091)(图5(d))。

3 分析与讨论

本研究的供试紫球藻 *P. purpureum* 生长周

期在39 d左右,当盐浓度在 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右时,藻细胞生长旺盛;但当环境盐浓度在 $3.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,藻细胞生长受限。这表明该藻株虽广谱耐盐,但并非典型的嗜盐微藻,工业培育该紫球藻株的NaCl浓度不宜过高。基于BGISEQ-500所得不同盐浓度胁迫下紫球藻转录组测序结果显示,获得单个藻株样本的

Clean reads 大小为 48.68 Mb、GC 百分比 (58.26%) 均高于芦旭丹^[27]利用 Illumina HiSeq 2 500 平台获得的 9 份紫球藻样本转录组测序数据(平均 Clean reads 21.61 Mb, GC 平均百分比 58.04%)。此外,本研究所得紫球藻转录组测序文库的 Q20 和 Q30 平均值 (98.75% 和 96.67%), 以及 N50 长度 (5 467 bp) 亦高于 Lu 等^[28]报道的紫球藻转录组测序值 (Q20: 98.47%, Q30: 95.49%, N50: 5 172 bp)。因此,我们初步认为本研究所得不同盐浓度胁迫下的紫球藻转录组测序结果质量较高,在红藻门植物的生物信息学分析中具有重要的参考价值。

本研究获得 9 个紫球藻样本的 Unigenes 总数 (65 790 条) 及 7 大生物学数据库中共有基因数 (20 895 条) 均高于 Lu 等^[28]获得的 (Unigenes 8 019 条, 共有基因 569 条)。本研究约 29.81% 的紫球藻基因信息在植物物种中具有参考功能, 该基因物种功能信息百分比不仅低于芦旭丹所测紫球藻转录组基因的物种注释百分比 (42.3%), 也低于其他藻类植物转录组的物种注释比例 (一般应大于 50%)^[29], 推测可能的原因是本研究测序获得的 Unigenes 未经开放型阅读框 (ORF) 检测, 由此造成的冗余序列、非功能基因或假基因片段可能对物种数据库的基因功能信息查询与比对造成噪声干扰。此外, 作为一种原始微藻, 紫球藻与原生动物、细菌等有一定的系统进化关系。已有研究表明^[30], 三者间部分基因功能具有一定的同源性。本研究未将原生动物及细菌的基因信息纳入物种注释数据库检测范围, 这也可能造成紫球藻基因注释信息不全的原因之一, 下一步将扩大物种注释范围, 以期获得该藻株更多功能基因信息。

本研究的供试紫球藻 (*P. purpureum*) 在盐处理条件下的差异表达基因数 (15 263 条) 远高于 Wei 等^[31]在氮胁迫下获得供试紫球藻 (*P. cruentum*) 差异表达基因数 (2 100 条), 这暗示了盐处理条件可能对于紫球藻来说是更关键的非生物胁迫因子。Wei 等^[31]对紫球藻基因 GO 分析所得细胞学组分最多的 GO 条目是细胞膜组分, 这与本研究所得一致, 表明氮胁迫和盐处理均会对紫球藻细胞膜结构与组成造成影响; 其所得生物学过程类别和分子调控类别的最多 GO 条

目 (大分子代谢过程和阴离子配位) 均属于本研究所得对应类别最多 GO 条目的具体功能, 表明参与紫球藻氮胁迫响应的功能基因信息较盐处理更为明确。与本研究所得紫球藻 GO 富集程度最高为细胞膜整体组分不同, Wei 等^[31]富集程度最高的是有机氮化合物代谢过程, 这与前者的氮缺失胁迫激发更多相关基因有关。

本研究供试藻株无论在中盐浓度还是高盐浓度处理下, 其下调表达基因数高于上调表达基因数, 暗示了随着环境盐度的升高, 为适应环境的高渗透压, 紫球藻整体基因表达水平下降, 但仍有部分调控藻细胞渗透压的基因受到环境的渗透压的刺激而激发, 表达水平提高, 这些基因多数应属于耐盐基因。此外, 随着环境盐浓度的升高, 紫球藻的细胞数量先升高后降低, 其中, 中盐浓度处理下的藻细胞数高于高盐浓度处理下的细胞数, 这暗示了影响紫球藻细胞生长的基因在低盐到中盐阶段是正向调控方式, 在中盐到高盐阶段是负向调控方式。这与紫球藻耐盐基因的正向调控方式存在差异, 表明紫球藻耐盐基因的表达属于一种环境应激反应, 与其生长发育无完全的相关性。

与本研究所得紫球藻 KEGG 通路数量最多为整体代谢图不同, Wei 等^[31]所得 KEGG 通路数量最多的是翻译, 表明参与氮胁迫调控最多的代谢过程与蛋白质翻译有关, 而参与盐处理条件下的代谢调控通路仍不明朗。究其原因, 这可能与已报道的与紫球藻适应高渗透压环境相关代谢机制及解析的 KEGG 通路较少有关, 须进行高渗透压应答机制深入探究。此外, 与 Wei 等的 KEGG 通路富集结果相似 (富集程度最高的是核糖体)^[31], 本研究所得紫球藻 KEGG 通路富集程度最高的是 RNA 转运, 表明 RNA 分子在紫球藻的氮胁迫与高渗透压环境应答过程中起着重要的调控作用。

4 结论

(1) 不同盐浓度处理条件下的紫球藻转录组测序后共获得 65 790 条 Unigenes, 29.81% 的 Unigenes 被信息注释, 从头组装了 357 条 Contigs, 其中 N50 长度 5 467 bp, GC 占比 58.26%, 以上表明本研究所得紫球藻的转录组测序结果

与组装质量较高。

(2) 根据差异基因表达量, 可将紫球藻 DEGs 划分为 3 大簇, 其中高盐处理组相关基因可单独聚为一簇; MS-vs-CO 和 HS-vs-CO 共筛选获得上调表达 DEGs 34 016 条, 下调表达 DEGs 69 086 条, 共有 DEGs 15 263 条。

(3) 通过 GO 和 KEGG 通路分析可知, 紫球藻 MS-vs-CO 和 HS-vs-CO 共有 DEGs 中 GO 富集程度最高的是细胞膜整体组分, KEGG 通路富集程度最高的是 RNA 转运。研究结果可为紫球藻不同浓度盐处理条件下的响应生理机制研究、特色藻株基因工程研究及其工业应用奠定基础。

参考文献:

- [1] PANDEY G K. Elucidation of Abiotic Stress Signaling in Plants[M]. Germany: Springer, 2015, 62-63. DOI: 10.1007/978-1-4939-2540-7.
- [2] LIBERTI D, IMBIMBO P, GIUSTINO E, *et al.* Shedding Light on the Hidden Benefit of *Porphyridium cruentum*[J]. *Antioxidants*, 2023, **12**(2): 337. DOI: 10.3390/antiox/2020337.
- [3] 林栖凤. 耐盐植物研究[M]. 北京: 科学出版社, 2004.
- LIN Q F. Study on salt-tolerant plants[M]. Beijing: Science Press, 2004.
- LI S H, JI L, SHI Q W, *et al.* Advances in the Production of Bioactive Substances from Marine Unicellular Microalgae *Porphyridium* Spp[J]. *Bioresour Technol*, 2019, **292**: 122048. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.122048.
- [5] MONTOYA E J O, DORION S, ATEHORTUA-GARCÉS L, *et al.* Phycobilin Heterologous Production from the Rhodophyta *Porphyridium cruentum*[J]. *J Biotechnol*, 2021, **341**: 30-42. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2021.09.001.
- [6] HAN S B, ZHAO J L, LIU P, *et al.* Two Foreign Antimicrobial Peptides Expressed in the Chloroplast of *Porphyridium purpureum* Possessed Antibacterial Properties[J]. *Mar Drugs*, 2022, **20**(8): 484. DOI: 10.3390/md20080484.
- [7] HUANG Z C, GUO S, GUO Z, *et al.* Integrated Green One-step Strategy for Concurrent Recovery of Phycobilioproteins and Polyunsaturated Fatty Acids from Wet *Porphyridium* Biomass[J]. *Food Chem*, 2022, **389**: 133103. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.133103.
- [8] 宋韡, 汤丽群, 高帆. 巴夫杜氏藻不同生长时期的转录组分析[J]. *食品与发酵工业*, 2022, **48**(4): 82-89. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.028904.
- SONG W, TANG L Q, GAO F. Transcriptomic Analysis of *Dunaliella parva* During Different Growth Periods[J]. *Food Ferment Ind*, 2022, **48**(4): 82-89. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.028904.
- [9] SUN M, HUANG D J, ZHANG A L, *et al.* Transcriptome Analysis of Heat Stress and Drought Stress in Pearl Millet Based on Pacbio Full-length Transcriptome Sequencing[J]. *BMC Plant Biol*, 2020, **20**(1): 323. DOI: 10.1186/s12870-020-02530-0.
- [10] WAKASA Y, OONO Y, YAZAWA T, *et al.* RNA Sequencing-mediated Transcriptome Analysis of Rice Plants in Endoplasmic Reticulum Stress Conditions[J]. *BMC Plant Biol*, 2014, **14**: 101. DOI: 10.1186/1471-2229-14-101.
- [11] 郭帅, 黄子诚, 谢点, 等. 绿光条件下氮浓度对紫球藻生长和生物活性产物合成的影响[J]. *天然产物研究与开发*, 2021, **33**(10): 1751-1757. DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.10.016.
- GUO S, HUANG Z C, XIE D, *et al.* Effects of Different Nitrogen Concentrations on the Growth and Bioactive Compounds Biosynthesis of *Porphyridium cruentum* under Green Light[J]. *Nat Prod Res Dev*, 2021, **33**(10): 1751-1757. DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.10.016.
- [12] SETYANINGSIH I, PRASETYO H, AGUNGPRIONO D R, *et al.* Antihyperglycemic Activity of *Porphyridium cruentum* Biomass and Extra-cellular Polysaccharide in Streptozotocin-induced Diabetic Rats[J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, **156**: 1381-1386. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.11.178.
- [13] LI C L, WU H B, XIANG W Z, *et al.* Comparison of Production and Fluorescence Characteristics of Phycoerythrin from Three Strains of *Porphyridium*[J]. *Foods*, 2022, **11**(14): 2069. DOI: 10.3390/foods11142069.
- [14] 金力. 推进国家生物计量体系建设推动生物经济高质量发展[J]. *计量学报*, 2023, **44**(3): 313. DOI: 10.3969/j.issn.1000-1158.2023.03.001.
- JIN L. Promote the Construction of National Biometric System and Promote the High-quality Development of Bio-economy[J]. *Acta Metrol Sin*, 2023, **44**(3): 313. DOI: 10.3969/j.issn.1000-1158.2023.03.001.
- [15] GOLUEKE C G, OSWALD W J. The Mass Culture of *Porphyridium cruentum*[J]. *Appl Microbiol*, 1962, **10**(2): 102-107. DOI: 10.1128/am.10.2.102-107.1962.
- [16] 张仁璇, 姜思, 佟少明. Cd²⁺对紫球藻生长及光化学活性的影响[J]. *水生生物学报*, 2018, **42**(5): 1037-1042. DOI: 10.7541/2018.127.
- ZHANG R X, JIANG S, TONG S M. Effects of Cd²⁺ Stress on the Growth and Photochemical Activity of *Porphyridium Purpureum*[J]. *Acta Hydrobiol Sin*, 2018, **42**(5): 1037-1042. DOI: 10.7541/2018.127.
- [17] 林丽琴. 紫球藻藻红蛋白基因的克隆及表达[D]. 福

- 州: 福建师范大学, 2011.
- LIN L Q. Cloning and Expression of Phycoerythrin Gene from *Porphyridium Cruentum*[D]. Fuzhou: Fujian Normal University, 2011.
- [18] GAO F, NAN F R, FENG J, *et al.* Transcriptome Profile of *Dunaliella salina* in Yuncheng Salt Lake Reveals Salt-stress-related Genes Under Different Salinity Stresses[J]. *J Oceanol Limnol*, 2021, **39**(6): 2336–2362. DOI: 10.1007/s00343-021-0164-4.
- [19] SEWE S O, SILVA G, SICAT P, *et al.* Trimming and Validation of Illumina Short Reads Using Trimmomatic, Trinity Assembly, and Assessment of RNA-seq Data[J]. *Methods Mol Biol*, 2022, **2443**: 211–232. DOI: 10.1007/978-1-0716-2067-0_11.
- [20] PRJIBELSKI A, ANTIPOV D, MELESHKO D, *et al.* Using SPAdes de Novo Assembler[J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2020, **70**(1): e102. DOI: 10.1002/cpbi.102.
- [21] YOUNESI-MELERDI E, NEMATZADEH G A, PAKDIN-PARIZI A, *et al.* De Novo RNA Sequencing Analysis of *Aeluropus littoralis* Halophyte Plant under Salinity Stress[J]. *Sci Rep*, 2020, **10**(1): 9148. DOI: 10.1038/s41598-020-65947-5.
- [22] ZHANG X K, DAI P X, GAO Y P, *et al.* Transcriptome Sequencing and Analysis of Zinc-uptake-related Genes in *Trichophyton mentagrophytes*[J]. *BMC Genomics*, 2017, **18**(1): 888. DOI: 10.1186/s12864-017-4284-3.
- [23] WATERHOUSE R M, SEPPEY M, SIMÃO F A, *et al.* BUSCO Applications from Quality Assessments to Gene Prediction and Phylogenomics[J]. *Mol Biol Evol*, 2018, **35**(3): 543–548. DOI: 10.1093/molbev/msx319.
- [24] ETTER P D, PRESTON J L, BASSHAM S, *et al.* Local de Novo Assembly of RAD Paired-end Contigs Using Short Sequencing Reads[J]. *PLoS One*, 2011, **6**(4): e18561. DOI: 10.1371/journal.pone.0018561.
- [25] ZHAO Y D, LI M C, KONATÉ M M, *et al.* TPM, FPKM, or Normalized Counts? A Comparative Study of Quantification Measures for the Analysis of RNA-seq Data from the NCI Patient-derived Models Repository[J]. *J Transl Med*, 2021, **19**(1): 269. DOI: 10.1186/s12967-021-02936-w.
- [26] 何昕颖, 申铁. 铁限制诱导对聚球藻转录组的影响[J]. 江西师范大学学报(自然科学版), 2021, **45**(2): 180–187. DOI: 10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2021.02.11.
- HE X Y, SHEN T. The Effect of Iron Restriction Induction on the Transcriptome of *Synechococcus*[J]. *J Jiangxi Norm Univ Nat Sci Ed*, 2021, **45**(2): 180–187. DOI: 10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2021.02.11.
- [27] 芦旭丹. 培养条件对紫球藻生物活性产物的影响及分子机理研究[D]. 太原: 山西大学, 2021.
- LU X D. Effect of Culture Conditions on Bioactive Products of *Porphyridium Cruentum* and Its Molecular Mechanism[D]. Taiyuan: Shanxi University, 2021.
- [28] LU X D, NAN F R, FENG J, *et al.* Transcriptome Analysis of *Porphyridium purpureum* under Salinities of 0 and 68[J]. *J Oceanol Limnol*, 2022, **40**(4): 1600–1614. DOI: 10.1007/s00343-021-1076-z.
- [29] 高帆, 杨鹏, 王飞, 等. 不同光照强度胁迫下的多型杜氏藻转录组分析[J]. 生物学杂志, 2022, **39**(6): 77–83. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1736.2022.06.077.
- GAO F, YANG P, WANG F, *et al.* Transcriptomic Analysis of *Dunaliella polymorpha* Under Different Light Intensity Stresses[J]. *J Biol*, 2022, **39**(6): 77–83. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1736.2022.06.077.
- [30] GAO F, NAN F R, FENG J, *et al.* Characterization and Comparative Analysis of microRNAs in 3 Representative Red Algae[J]. *Iran J Biotechnol*, 2021, **19**(4): e2868. DOI: 10.30498/ijb.2021.247164.2868.
- [31] WEI L, YOU W X, XU Z R, *et al.* Transcriptomic Survey Reveals Multiple Adaptation Mechanisms in Response to Nitrogen Deprivation in Marine *Porphyridium cruentum* [J]. *PLoS One*, 2021, **16**(11): e0259833. DOI: 10.1371/journal.pone.0259833.