

• 工业生物技术 •

## 光诱导雨生红球藻虾青素积累的信号通路转录组分析

崔红利<sup>1,2\*</sup>, 许文鑫<sup>1,2\*</sup>, 崔玉琳<sup>3</sup>, 季春丽<sup>1,2</sup>, 张春辉<sup>1,2</sup>, 秦松<sup>3</sup>, 李润植<sup>1,2</sup>

1 山西农业大学 农学院, 山西 太谷 030801

2 山西农业大学 分子农业与生物能源研究所, 山西 太谷 030801

3 中国科学院烟台海岸带研究所, 山东 烟台 264003

崔红利, 许文鑫, 崔玉琳, 等. 光诱导雨生红球藻虾青素积累的信号通路转录组分析. 生物工程学报, 2021, 37(4): 1260-1276.  
Cui HL, Xu WX, Cui YL, et al. Transcriptome analysis of signal transduction pathway involved in light inducing astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. Chin J Biotech, 2021, 37(4): 1260-1276.

**摘要:** 雨生红球藻 *Haematococcus pluvialis* 在逆境胁迫条件下可大量积累虾青素, 被认为自然界最理想的虾青素生产者。高光能有效诱导其虾青素的合成与积累, 但藻细胞感知和转导光信号进而调控虾青素积累的机制尚不清楚。文中采用 Illumina HiSeq 2000 高通量测序技术分别获得正常、高白光及高蓝光处理组 4.0 G、3.8 G 及 3.6 G 的原始数据量, 经质控与拼接之后获得 51 954 条长度至少为 200 bp 的 unigenes 基因, 经过比对分析, 共有 20 537 个 unigenes 在 NR、NT、KO、SwissProt、PfamGO 及 KOG 等数据库中的至少 1 个数据库中注释成功, 达到 39.52%。差异表达基因分析显示, 高白光 vs 正常组共获得 1 255 个 DEGs; 高蓝光 vs 正常组共获得 1 494 个 DEGs; 高白光与高蓝光 vs 正常组共同的 DEGs 有 1 008 个。KEGG 富集分析显示, 与对照组相比高白光与高蓝光共同的显著富集通路包括光合作用、类胡萝卜素合成、脂肪酸合成、氧化磷酸化、DNA 复制、碳代谢及氮代谢等过程。通过对转录组数据进一步分析, 挖掘鉴定了大量光受体及其信号转导通路中的互作蛋白。随机筛选 DEGs 基因 15 条, 采用荧光定量 PCR 技术检测其转录水平, 结果表明与转录组差异表达数据高度一致。光受体及其信号转导通路中的互作蛋白基因差异表达分析, 推测“光信号→光受体→互作蛋白(互作蛋白→转录因子/转录调节子)→功能基因表达→虾青素积累”的信号转导通路可能参与上述调控过程, 为深入解析光诱导虾青素合成的转录调控机制奠定了基础。

**关键词:** 雨生红球藻, 高光, 虾青素, 转录组测序, 光信号通路

**Received:** July 27, 2020; **Accepted:** November 26, 2020

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 31902394), Key Research and Development (R&D) Planning Project of Shanxi Province, China (No. 201803D31063), Applying Basic Research Planning Project of Shanxi Province, China (No. 201801D22125), Science and Technology Innovation Planning Project of Shanxi Agricultural University (No. 2018YJ16), Key Lab of Marine Bioactive Substance and Modern Analytical Technique (No. MBSMAT-2016-03).

\*These authors contributed equally to the work.

**Corresponding author:** Runzhi Li. Tel: +86-354-6288344; E-mail: rli2001@126.com

国家自然科学基金 (No. 31902394), 山西省重点研发计划 (No. 201803D31063), 山西省应用基础研究项目 (No. 201801D22125), 山西农业大学科技创新基金项目 (No. 2018YJ16), 国家海洋局海洋生物活性物质与现代分析技术重点实验室项目 (No. MBSMAT-2016-03) 资助。

网络出版时间: 2020-12-22

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20201221.1054.001.html>

# Transcriptome analysis of signal transduction pathway involved in light inducing astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*

Hongli Cui<sup>1,2\*</sup>, Wenxin Xu<sup>1,2\*</sup>, Yulin Cui<sup>3</sup>, Chunli Ji<sup>1,2</sup>, Chunhui Zhang<sup>1,2</sup>, Song Qin<sup>3</sup>, and Runzhi Li<sup>1,2</sup>

1 College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi, China

2 Institute of Molecular Agriculture and Bioenergy, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi, China

3 Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, Shandong, China

**Abstract:** The unicellular green alga *Haematococcus pluvialis* is the best source of natural astaxanthin (AST) in the world due to its high content under stress conditions. Although high light (HL) can effectively induce AST biosynthesis, the specific mechanisms of light signal perception and transduction are unclear. In the current study, we used transcriptomic data of normal (N), high white light (W), and high blue light (B) to study the mechanisms of light inducing AST accumulation from the point of photoreceptors. The original data of 4.0 G, 3.8 G, and 3.6 G for N, W, and B were obtained, respectively, by the Illumina Hi-seq 2000 sequencing technology. Totally, 51 954 unigenes (at least 200 bp in length) were generated, of which, 20 537 unigenes were annotated into at least one database (NR, NT, KO, SwissProt, Pfam, GO, or KOG). There were 1 255 DEGs in the W vs N, 1 494 DEGs in the B vs N, and 1 008 DEGs in the both W vs N and B vs N. KEGG enrichment analysis revealed that photosynthesis, oxidative phosphorylation, carotenoid biosynthesis, fatty acids biosynthesis, DNA replication, nitrogen metabolism, and carbon metabolism were the significantly enriched pathways. Moreover, a large number of genes encoding photoreceptors and predicted interacting proteins were predicted in *Haematococcus* transcriptome data. These genes showed significant differences at transcriptional expression levels. In addition, 15 related DEGs were selected and tested by qRT-PCR and the results were significantly correlated with the transcriptome data. The above results indicate that the signal transduction pathway of “light signal - photoreceptors - interaction proteins - (interaction proteins - transcription factor/transcriptional regulator) - gene expression - AST accumulation” might play important roles in the regulation process, and provide reference for further understanding the transcriptional regulation mechanisms of AST accumulation under HL stress.

**Keywords:** *Haematococcus pluvialis*, high light, astaxanthin, transcriptome, light signal pathway

虾青素是一种具有超强抗氧化活性的次生类胡萝卜素，被称为“抗氧化剂之王”，具有良好的着色效果和重要的生物学功能，已被广泛应用于水产养殖、食品工业、医疗卫生、化妆及保健品等领域<sup>[1]</sup>。雨生红球藻 *Haematococcus pluvialis* 是一种淡水单细胞绿藻，是目前已知虾青素含量最高的物种，在胁迫条件下虾青素含量可达细胞干重的 4%，是极为理想的天然虾青素来源<sup>[2]</sup>。然而，藻细胞中虾青素的积累是一个胁迫诱导的过程，即虾青素的合成伴随着大量游动细胞转化为厚壁孢子，此时藻细胞的生长受到严重的抑制，这种矛盾已经成为利用雨生红球藻制备虾青素的限制因子<sup>[3-4]</sup>。因此，阐明虾青素合成途径、挖掘高效胁迫因子及解析诱导信号通路是解决上述矛盾的

关键，也是雨生红球藻制备虾青素产业目前亟需解决的理论与技术瓶颈。

雨生红球藻虾青素的积累受到多种因素的影响，包括光、营养成分、生物节律、活性氧、光合作用、发育过程、表观遗传、自身反馈及某些代谢物等<sup>[5]</sup>，但大多数研究者认为光照是影响雨生红球藻虾青素合成的重要因子<sup>[5-8]</sup>。前期工作和同行文献表明，在同等光强条件下，与自然光（白光）相比，蓝光能够更有效地诱导雨生红球藻虾青素的积累，且虾青素合成相关基因在转录水平的表达显著增高<sup>[6-9]</sup>。蓝光诱导虾青素的积累与相关基因在转录水平的高表达密不可分，但藻细胞感知和转导光信号进而激活基因转录水平的分子机制不清楚。植物依靠光受体，例如蓝光受体向光素

PHOT (Phototropin)、隐花色素 CRY (Cryptochrome) 及紫外光受体 UVR8 (UV resistance locus 8) 通过构象改变和磷酸化等感知光信号, 并通过多种互作蛋白形成复杂的接收和转导系统, 并与体内其他信号转导途径耦合, 进而调控基因的表达, 最终调控光响应生理过程<sup>[10-15]</sup>。对真核微藻而言, 在已知的光受体中, CRYs 以多个等位基因形式广泛分布于真核微藻<sup>[16]</sup>, 而 PHOT 和 UVR8 则是单个等位基因形式仅存在于真核绿藻<sup>[17-18]</sup>。突变和 RNA 干扰实验验证, 莱茵衣藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 中 CrePHOT 蛋白参与细胞有性生活周期, 并能调控捕光复合物、叶绿素和类胡萝卜素的合成等靶基因转录水平的表达<sup>[19]</sup>, 这为从光受体角度研究高光诱导雨生红球藻虾青素积累的转录调控机制提供了新思路。

近年来, 转录组学技术为揭示生物信号感知与代谢调控机制提供了强有力的工具。例如基于基因组和转录组结合技术对雨生红球藻虾青素合成、积累、调控与转录水平的可变性剪切进行了研究<sup>[20]</sup>。大量研究者采用转录组测序技术针对胁迫因子诱导雨生红球藻虾青素和脂肪酸积累及相关基因在转录水平的表达进行了广泛的研究, 包括不同光质和光强<sup>[21]</sup>、添加碘化钾<sup>[22]</sup>、氮缺乏<sup>[23]</sup>、细胞周期<sup>[24-25]</sup>、高光诱导下添加醋酸钠和  $\text{Fe}^{2+}$ <sup>[26]</sup>、高光诱导下添加茉莉酸甲酯和水杨酸<sup>[27]</sup>及高  $\text{CO}_2$  浓度等<sup>[28]</sup>。但上述研究通常重点关注诱导条件对雨生红球藻生长、生理及虾青素积累的影响与其合成途径相关基因的表达模式, 对其转录调控机制的研究较少, 尤其是未见光受体及其信号通路的相关报道。

针对高光诱导雨生红球藻虾青素积累的转录调控机制不清楚的现状, 本文利用转录组测序技术分析高光处理后的转录差异, 对差异表达基因进行了聚类分析, 重点分析了光受体及其互作蛋白, 研究旨在初步推测存在光受体介导的高光诱导雨生红球藻虾青素积累的信号转导通路,

为进一步揭示其转录调控机制提供新视角与奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 雨生红球藻的培养及测序样品制备

本实验所用 *Haematococcus pluvialis* Flotow 1844 购自藻类和原生生物培养中心 (英国 CCAP 藻种库: <https://www.ccap.ac.uk/>), 由本实验室保存。采用 BBM 培养基, 培养条件为光强  $25 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  (LED 白光), 温度  $22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , 光/暗周期 12 h/12 h, 静置培养每天摇动 2-3 次。针对高光诱导培养, 取正常培养处于指数生长后期的藻细胞经过黑暗处理 24 h 后, 重新悬浮于 BBM 培养基中, 每组设置 3 个生物学重复并分别置于正常培养 (LED 白光,  $25 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ )、高白光 (390-770 nm,  $500 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ) 和高蓝光 (420-500 nm,  $500 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ) 条件下, 于 72 h 离心收集藻细胞, 用 PBS 缓冲液冲洗两次, 样品于液氮中保存。将每组 3 个生物学重复样品混合测序。参照 Plant RNA Purification Reagent 试剂盒进行总 RNA 提取, 并利用 Nanodrop2000 进行浓度和纯度 ( $OD_{260}$  与  $OD_{280}$  比值) 检测, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性, 最后用 Agilent 2100 测定其 RIN 值。cDNA 文库构建与测序委托北京诺禾致源生物信息科技有限公司完成。利用带 Oligo (dT) 的磁珠进行 mRNA 的富集, 加入裂解液将 mRNA 随机打断, 合成第一条 cDNA 链, 进而合成第二条 cDNA 链, 利用 AMPure XP beads 纯化 cDNA, 进而经过末端修复, 进行片段大小筛选, 最终通过 PCR 富集得到 cDNA 文库。采用 Illumina Hiseq-2000 双端测序, 测序读长为 PE100。

### 1.2 雨生红球藻转录组数据预处理及拼接

高通量测序获得的原始图像数据文件经 CASAVA 碱基识别 (Base Calling) 分析转化为原始测序序列 (Sequenced Reads) 进而经过错误率检查、A/T/G/C 含量分布及接头序列去除得到有

效测序数据 (Clean reads)。采用 Trinity 软件 (版本: v2012-10-05; 参数设置: min\_kmer\_cov 为 2, 其他参数为默认参数) 进行转录本拼接<sup>[29]</sup>, 形成一个转录组, 以此作为后续分析的参考序列, 取每条基因中最长的转录本作为 Unigene, 并对转录本及 Unigene 的长度进行统计。

### 1.3 雨生红球藻转录组基因功能注释、分类及蛋白编码序列 (CDS) 预测

将获得的 Unigene 基因序列与 Nr、PDB、PIR、PRF、Nt、Pfam、KOG、COG、KEGG 及 GO 等数据库进行比对注释与分类。将 Unigene 基因比对到蛋白库, 进行 ORF 编码框的提取; 或者采用 estscan 软件预测 ORF, 从而得到核酸序列和氨基酸序列。

### 1.4 雨生红球藻转录组基因差异表达及富集分析

将 Trinity 拼接得到的转录组作为参考序列, 采用 RSEM 软件将每个样品的 clean reads 与参考序列进行匹配<sup>[30]</sup>, 对 bowtie 的比对结果进行统计, 进一步得到了每个样品比对到每个基因上的 read count 数目, 并对其进行 FPKM 转换<sup>[31]</sup>, 对于无生物学重复的样品, 先采用 TMM 对 read count 数据进行标准化处理, 再用 DEGseq 进行差异分析, 筛选阈值为  $qvalue < 0.005$  且  $|\log_2 \text{FoldChange}| > 1$ 。采用 DESeq 软件<sup>[32]</sup>以对其进行筛选, 筛选阈值为  $p_{adj} < 0.05$ 。根据实验目的筛选差异基因后, 采用 GO 和 KEGG 进行富集分析。本文中涉及高光诱导下雨生红球藻转录组原始数据和处理结果都已经提交到国家微生物科学数据中心 (NMDCX0000104)。

### 1.5 雨生红球藻转录组中光受体及其互作蛋白的预测及分析

用高等植物和真核微藻中功能验证的光受体、互作蛋白及其调控靶基因为源序列 (具体信息见网络版附表 S1), 采用本地 BLAST 搜索雨生

红球藻转录组中光受体及其互作蛋白同源序列, 结合功能注释进一步补充完善, 并进行基因差异表达分析。

### 1.6 重要功能基因 qRT-PCR 验证

随机选择高光诱导下高表达 DEGs 基因 6 个 (*PSY*、*BCH*、*BKT*、*DGAT1-1*、*DGAT2-2*、*DGAT2-5*)、低表达 DEGs 基因 3 个 (*PEPS*、*3-KCT*、*PKS*)、光受体基因 2 个 (*PHOT*、*CPF-2*) 及其信号转导通路互作蛋白基因 4 个 (*WRKY-2*、*MUB-2*、*COPI*、*SPA1*), 共 15 个基因。根据预测基因的 CDS 序列设计荧光定量特异性引物。雨生红球藻  $\beta$ -actin 作为内参基因, 所有的引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 引物序列见表 1。采用宝生物 (SYBR Premix Ex Taq II) 荧光定量试剂盒进行 qRT-PCR 检测。程序条件如下: 95 °C 10 min, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 30 s, 60 °C 15 s。每个样品 3 个平行, 采用相对定量  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法来验证不同高光诱导 72 h 条件下选择目的基因的转录水平<sup>[33]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 雨生红球藻转录组测序、拼接、功能注释及蛋白编码序列预测

对照 (N)、高蓝光 (B) 及高白光 (W) 处理组分别获得 4.0 G、3.8 G 及 3.6 G 的有效数据。通过拼接获得 131 385 个转录本 (transcripts) 和 51 954 个非重复序列基因 (unigenes), 其中长度大于 2 000 bp 的分别达到 18 508 个和 4 284 个 (表 2)。

基于 7 个数据库的比对, 共有 20 537 个 unigenes 在 NR、NT、KO、SwissProt、Pfam、GO 及 KOG 等数据库中至少 1 个数据库中注释成功, 注释率达到 39.52%。其中在 GO、Pfam 及 NR 数据库的注释率较高, 分别达到 32.28% (16 772 条)、30.14% (15 660 条) 及 28.32% (14 718 条)。共有 1 424 条 unigene 在所有数据库同时注释, 注释率达到 2.74% (表 3)。

表 1 荧光定量 qRT-PCR 引物

Table 1 Primer sequences of qRT-PCR

DEGs	Transcriptome data	Gene name	Sequence (5'-3')	Size
Up	comp57514_c0	<i>PSY</i> (phytoene synthase)	F: CCAAACGCCAATAAGATAACG R: TGCTCTGTCAAGCCAAACTG	442
Up	comp56899_c0	<i>BCH</i> (beta-carotene hydroxylase)	F: AATCAGCAAACCTGCGGACGAA R: TAGGTGGCAAGGATGGCAAG	149
Up	comp57659_c2	<i>BKT</i> (beta-carotene ketolase)	F: CAGTGTTCTCCACGCCATTT R: GCATACTCTGCCAAGAAGT	245
Up	comp59843_c2	<i>DGATI-1</i> (diacylglycerol acyltransferase)	F: TATGTCAGGCAGCACGCCGGT R: CCAATGGTGATGGAGCCAAA	204
Up	comp54162_c0	<i>DGAT2-2</i> (diacylglycerol acyltransferase)	F: CTCCGTGGCGGTGATAGTAG R: GATCTCCAGCGGCTTGTCTT	432
Up	comp54843_c0	<i>DGAT2-5</i> (diacylglycerol acyltransferase)	F: TGTACCTACGCAAGCCACAG R: ACCAGCGAACCAGCCAGTC	137
Down	comp41479_c0	<i>PEPs</i> (phosphoenolpyruvate synthase)	F: CGCGCCGGGATCGAGGCCAG R: GAACCCCTGATGCACGCGAT	274
Down	comp51697_c1	<i>3-KCT</i> (3-ketoacyl-CoA thiolase)	F: GTGGCGCAGCCGCCGACGC R: CTGGATCGCGCCATGGCCTTC	258
Down	comp56566_c0	<i>PKs</i> (pyruvate kinase)	F: TCTTCCAGGGGCATCAGGACG R: AAGTCAGCCACTCCACGTC	234
Up	comp61615_c0	<i>PHOT</i> (phototropin)	F: TGATGCTACCCTACCTGATATG R: TGA CTGCCTTGCCCTCTGTTT	323
Up	comp59629_c0	<i>CPF-2</i> (cryptochrome/photolyase family)	F: GTGGCGGGATTCTTTTCGCTTC R: CGTTCTGCCTGCCTCGGTTG	209
Up	comp56997_c0	<i>WRKY-2</i> (wrky)	F: TCGGAGACCTTGCTGATGACG R: CCCTTTACAACTTCTGCCCA	295
Up	comp57039_c0	<i>MYB-3</i> (myb)	F: TATTGGGCACTTAACTGTTC R: TTGCTGGCATTGGGTATCCTT	215
Up	comp55814_c0	<i>COPI</i> (constitutively photomorphogenic1)	F: CGGATACAGGAGCACTTGGAT R: GACGGCAGGTGAGTCTTGG	310
Down	comp58791_c1	<i>SPA1</i> (suppressor of PHYA-105 1)	F: TGCCATCTGATAGCTGGCT R: TTCGATTGGAATGCTTGCA	241
Control	comp59437_c0	<i>ACTIN</i> (actin)	F: AGCGGGAGATAGTGGGGACA R: ATGCCACCGCCTCCATGC	189

表 2 雨生红球藻转录组 transcript 和 Unigene 的序列大小

Table 2 Sequence size (bp) and number of transcript and Unigene in *Haematococcus* transcriptome

Transcript length interval	200–500 bp	500–1 000 bp	1 000–2 000 bp	>2 000 bp	Total
Number of transcripts	51 222	30 279	31 376	18 508	131 385
Number of unigenes	32 284	8 412	6 974	4 284	51 954

## 2.2 雨生红球藻转录组基因差异表达分析

通过基因差异表达分析得到, 高蓝光 vs 正常组共获得 1 494 个 DEGs, 其中上调基因 (Up-regulated genes) 数量为 732 个, 下调基因 (Down-regulated genes) 数量为 762 个;

高白光 vs 正常组共获得 1 255 个 DEGs, 其中上调基因 (Up-regulated genes) 数量为 664 个, 下调基因 (Down-regulated genes) 数量为 591 个; 高白光与高蓝光 vs 正常组共同的 DEGs 有 1 008 个 (图 1A–B)。

表3 雨生红球藻转录组 Unigene 的功能注释统计结果  
Table 3 Statistics of annotation results of Unigene functional annotation in *Haematococcus* transcriptome

	Number of Unigenes	Percentage (%)
Annotated in NR	14 718	28.32
Annotated in NT	6 582	12.66
Annotated in KO	4 151	7.98
Annotated in SwissProt	11 145	21.45
Annotated in Pfam	15 660	30.14
Annotated in GO	16 772	32.28
Annotated in KOG	7 640	14.70
Annotated in all Databases	1 424	2.74
Annotated in at least one Database	20 537	39.52

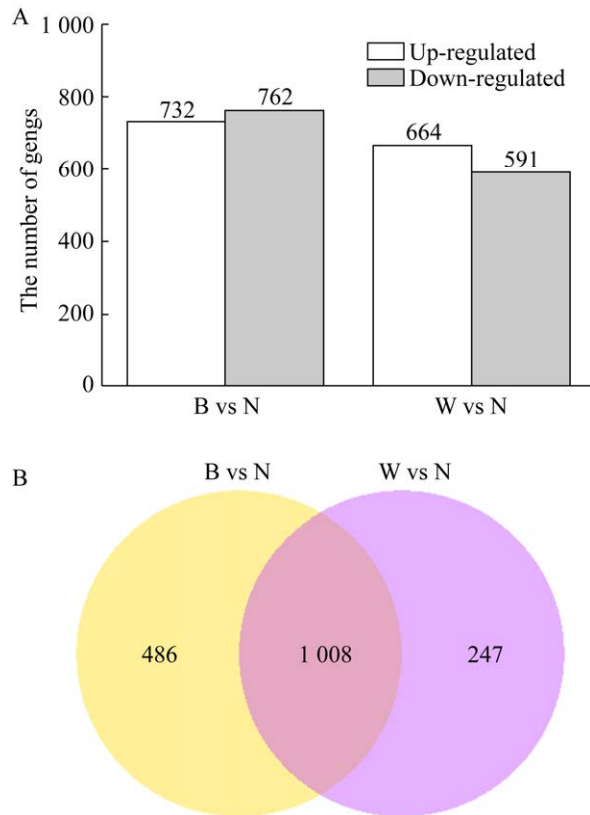


图1 雨生红球藻高光诱导下基因差异表达分析  
Fig. 1 Analysis of DEGs in *Haematococcus* transcriptome.

### 2.3 雨生红球藻转录组差异表达基因的 GO 注释分析

为了研究不同处理组间的基因功能差异,对上述差异表达的基因进行 GO 功能注释级。结果

显示,高蓝光与对照相比有 1 025 个 DEGs 注释到 GO 数据库的生物过程 (BP)、细胞组分 (CC) 及分子功能 (MF) 3 大类型,其中上调基因 511 个,下调基因 514 个。其显著性富集通路有 30 条,其中生物过程 (BP) 8 条、细胞组分 (CC) 20 条及分子功能 (MF) 2 条。主要涉及具体通路如图 2 所示。高白光组与对照组相比有 877 个 DEGs 注释到 GO 数据库 3 大类型,其中上调基因 477 个,下调基因 400 个 (图 2)。其显著性富集通路有 34 条,其中生物过程 (BP) 13 条、细胞组分 (CC) 17 条及分子功能 (MF) 4 条。主要涉及具体通路如图 2A-B 所示。有趣的是,在高蓝光和高白光诱导下,共有的显著富集通路涉及光合作用 (Photosynthesis)、光合系统 (Photosystem)、抗氧化活力 (Antioxidant activity) 及代谢过程 (Metabolic process)。

### 2.4 雨生红球藻转录组差异表达基因的 KEGG 富集分析

为了明确不同处理组间的差异表达代谢通路,采用 KEGG 进行差异表达基因代谢通路富集分析。结果显示 (表 4),高蓝光组与对照组相比,共有 1 328 个差异基因注释到 KEGG 途径的 218 条具体分支通路,其中上调基因显著富集的 5 条分支通路包括光合作用 (Photosynthesis) 相关基因 19 个、核糖体 (Ribosome) 相关基因 32 个、氧化磷酸化 (Oxidative phosphorylation) 相关基因 26 个、类胡萝卜素合成 (Carotenoid biosynthesis) 相关基因 6 个及不饱和脂肪酸合成 (Biosynthesis of unsaturated fatty acids) 相关基因 3 个;下调基因显著富集的 5 条分支通路包括 DNA 复制 (DNA replication) 相关基因 4 个、氮代谢 (Nitrogen metabolism) 相关基因 4 个、碳代谢 (Carbon metabolism) 相关基因 13 个、光合作用中的碳固定 (Carbon fixation in photosynthetic organisms) 相关基因 7 个及嘧啶代谢 (Pyrimidine metabolism) 相关基因 14 个。高白光组与对照组相比,共有 1 121 个差异基因注释到 KEGG 途径的 215 条具体分支通

路, 其中上调基因显著富集的 5 条分支通路包括光合作用 (Photosynthesis) 相关基因 15 个、光合作用天线蛋白 (Photosynthesis-antenna proteins) 相关基因 7 个、脂肪酸合成 (Fatty acid biosynthesis) 相关基因 5 个、类胡萝卜素合成 (Carotenoid biosynthesis) 相关基因 5 个及氧化磷酸化

(Oxidative phosphorylation) 相关基因 22 个; 下调基因显著富集的 5 条分支通路包括 DNA 复制 (DNA replication) 相关基因 13 个、嘧啶代谢 (Pyrimidine metabolism) 相关基因 11 个、碳代谢 (Carbon metabolism) 相关基因 12 个、氮代谢 (Nitrogen metabolism) 相关基因 4 个及光转导

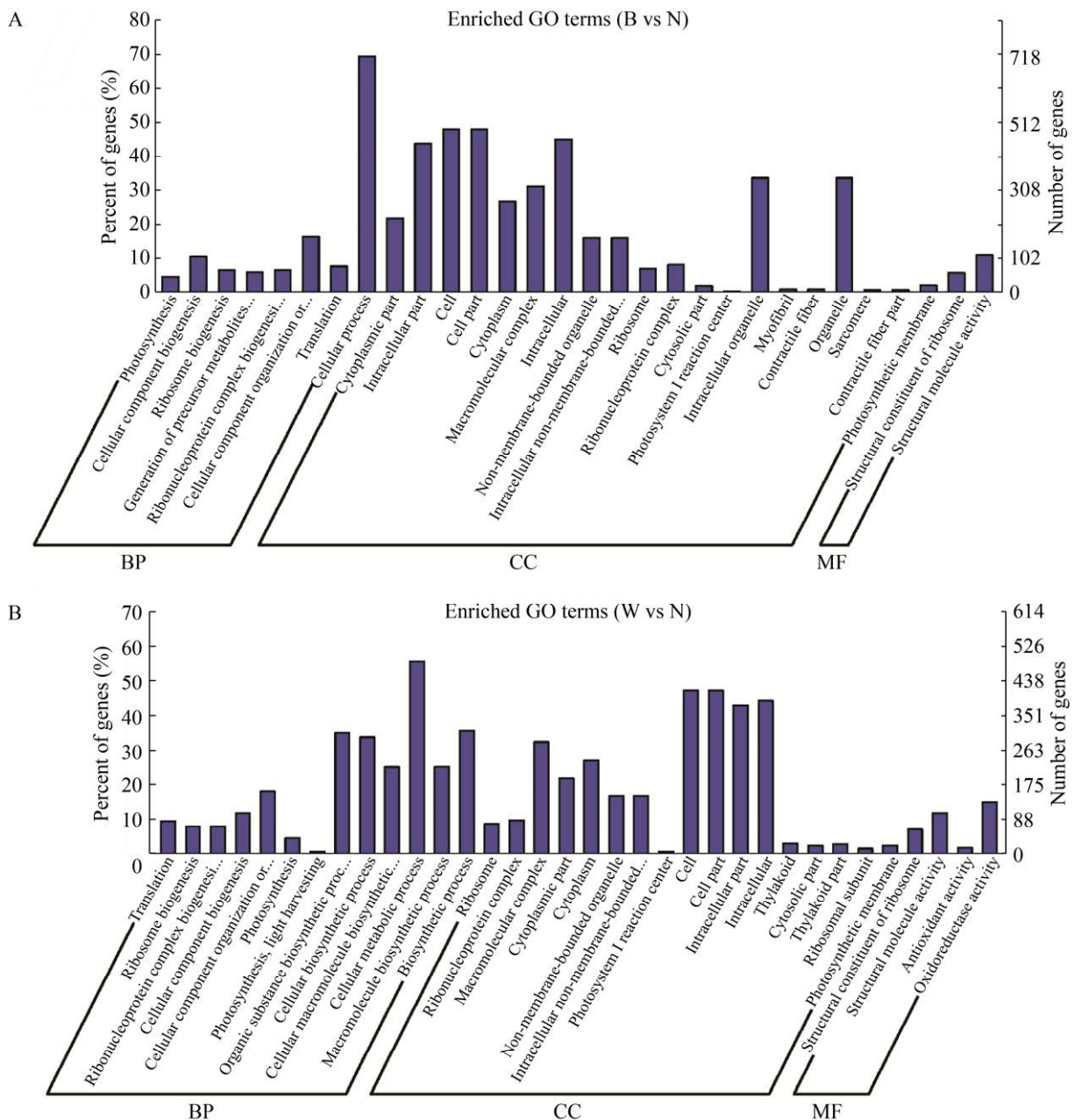


图 2 雨生红球藻转录组中高光诱导下差异表达基因的 GO 二级节点注释  
Fig. 2 The GO annotation of DEGs in *Haematococcus* transcriptome.



表 4 雨生红球藻转录组显著 KEGG 富集通路

Table 4 The significant KEGG enrichment pathway in *Haematococcus* transcriptome

Group	KEGG ID	Annotation description	P-value	Gene number
B vs N Up	ko00195	Photosynthesis	1.52E-10	19
B vs N Up	ko03010	Ribosome	1.38E-15	32
B vs N Up	ko00190	Oxidative phosphorylation	2.36E-05	26
B vs N Up	ko00906	Carotenoid biosynthesis	3.25E-10	6
B vs N Up	ko01040	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	2.34E-16	3
B vs N Down	ko03030	DNA replication	5.64E-23	16
B vs N Down	ko00910	Nitrogen metabolism	1.87E-15	4
B vs N Down	ko01200	Carbon metabolism	2.98E-02	13
B vs N Down	ko00710	Carbon fixation in photosynthetic organisms	3.54E-09	7
B vs N Down	ko00240	Pyrimidine metabolism	5.64E-36	14
W vs N Up	ko00195	Photosynthesis	2.39E-24	15
W vs N Up	ko00196	Photosynthesis-antenna proteins	4.65E-42	7
W vs N Up	ko00061	Fatty acid biosynthesis	2.98E-19	5
W vs N Up	ko00906	Carotenoid biosynthesis	5.67E-12	5
W vs N Up	ko00190	Oxidative phosphorylation	2.54E-11	22
W vs N Down	ko03030	DNA replication	6.68E-05	13
W vs N Down	ko00240	Pyrimidine metabolism	8.25E-09	11
W vs N Down	ko01200	Carbon metabolism	3.25E-54	12
W vs N Down	ko00910	Nitrogen metabolism	2.48E-08	4
W vs N Down	ko04744	Phototransduction	1.24E-04	2

(Phototransduction) 相关基因 2 个。具体参与显著富集通路的基因见附表 2 (见网络版)。有趣的是, 无论是高白光还是高蓝光, 在上调表达基因的 KEGG 富集通路中共有脂肪酸合成与类胡萝卜素合成通路, 暗示高光诱导下雨生红球藻中类胡萝卜素和脂肪酸的积累与这些基因的高表达密不可分。

## 2.5 雨生红球藻光受体基因挖掘与差异表达分析

植物依靠光受体感知光信号, 并通过多种互作蛋白形成复杂的接收和转导系统, 与体内其他信号转导途径耦合, 进而调控基因的表达, 最终调控光响应生理过程。我们推测雨生红球藻中存在类似的信号感知与转导通路, 所以对其体内的光受体及互作蛋白进行了挖掘与差异表分析。

我们在雨生红球藻转录组数据中共发现了 9 个光受体同源基因 (图 3 和表 5), 包括 1 个蓝光受体向光素 PHOT (Phototropin)、7 个隐花色素与光解酶 CPFs (Cryptochrome/photolyase family) 和

1 个 UVR8 (UV resistance locus 8) 成员。其中 PHOT 和 UVR8 以单拷贝形式存在, 而 CPFs 以多拷贝形式存在。蓝光受体隐花色素 CRY 属于隐花色素/光解酶 CPF 家族, 在氨基酸序列水平上与光解酶 PHO (Photolyase) 存在极高相似性。通过进一步序列比对分析, 我们在 7 个 CPF 家族成员中鉴定了 2 个植物类型 CRY 和 1 个 DASH 类型 CRY, 其他类型 CPF 家族成员由于不是编码区全长, 因此无法进一步进行分类鉴定。基因差异表达分析表明, PHOT 和 CPF-2 在高光诱导下呈现显著高表达 (分别上调 2.6–3.2 倍和 3.7–5.6 倍), 而 CPF-3 和 CPF-4 在高光诱导下低表达 (下调 0.5–3.2 倍)。有趣的是, UVR8 和 CPF-1 仅在高蓝光下高表达, 分别达到 2.3 和 3.8 倍, 而 CPF-5 和 CPF-6 仅在高白光下高表达, 分别达到 3.4 和 5.1 倍, 上述结果暗示这些光受体可能以协同作用共同调控雨生红球藻对高光诱导的响应 (表 5)。



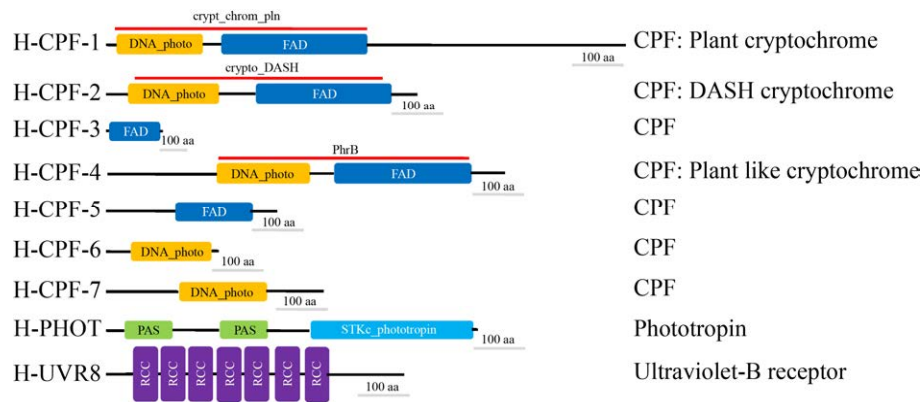


图3 雨生红球藻转录组中预测的光受体基因及结构域

Fig. 3 The predicted photoreceptor gene and structure domain in *Haematococcus* transcriptome.

表5 雨生红球藻转录组中预测的光受体及互作蛋白信息

Table 5 Information for the prediction photoreceptor and interacting protein in *Haematococcus* transcriptome

Gene	Transcriptome data	B vs N (log <sub>2</sub> .Fold)	W vs N (log <sub>2</sub> .Fold)	Gene	Transcriptome data	B vs N (log <sub>2</sub> .Fold)	W vs N (log <sub>2</sub> .Fold)
<i>PHOT</i>	comp61615_c0	3.2	2.6	<i>CPF-1</i>	comp59741_c0	3.8	1.2
<i>CPF-2</i>	comp59629_c0	5.6	3.7	<i>CPF-3</i>	comp58616_c0	-3.2	-2.4
<i>CPF-4</i>	comp59582_c0	-0.5	-1.2	<i>CPF-5</i>	comp57508_c1	-2.5	3.4
<i>CPF-6</i>	comp51104_c0	-2.3	5.1	<i>CPF-7</i>	comp59815_c2	-1.4	-2.1
<i>UVR8</i>	comp58392_c7	2.3	1.5	<i>COPI</i>	comp55814_c0	2.4	1.9
<i>COP8</i>	comp57867_c1	0.5	2.4	<i>COP9</i>	comp59015_c0	0.7	2.1
<i>COP13</i>	comp54442_c0	2.8	1.9	<i>SPA1</i>	comp58791_c1	-2.1	-3.5
<i>HY5</i>	comp59348_c0	2.1	3.5	<i>WRKY-1</i>	comp60211_c0	-2.7	-3.4
<i>WRKY-2</i>	comp56997_c0	5.2	4.6	<i>MYB-1</i>	comp58792_c2	-2.5	-1.9
<i>MYB-2</i>	comp59976_c1	2.9	3.2	<i>MYB-3</i>	comp57039_c0	6.5	4.8
<i>MYB-4</i>	comp58936_c1	-1.3	-0.9	<i>MYB-5</i>	comp59790_c0	3.2	-1.5
<i>BBX21</i>	comp56830_c0	3.5	1.8	<i>CO</i>	comp56830_c0	3.5	1.8
<i>CSN5A</i>	comp55852_c0	3.5	1.2	<i>CUL4-1</i>	comp57138_c0	-2.2	-3.5
<i>CUL4-2</i>	comp60689_c0	-2.6	-3.1	<i>CUL4-3</i>	comp60068_c0	-2.2	-1.5
<i>DDB1A</i>	comp61166_c1	-0.3	-1.2	<i>DDB1B</i>	comp61620_c0	-2.3	-1.5
<i>RUS1-1</i>	comp57987_c0	-0.7	-1.2	<i>RUS1-2</i>	comp58436_c6	-1.5	-2.3
<i>RUS1-3</i>	comp61012_c0	-0.2	-1.2	<i>ELI1</i>	comp47965_c0	0.8	3.2
<i>LHCSR1</i>	comp54240_c0	4.5	3.9	<i>PIN3</i>	comp55142_c0	-2.1	1.9
<i>PSBS2-1</i>	comp62091_c0	4.8	5.6	<i>PSBS2-2</i>	comp53715_c0	2.5	3.2
<i>PSBS2-3</i>	comp53715_c1	5.2	4.6	<i>PSBS2-4</i>	comp61375_c0	1.4	2.5
<i>DET1</i>	comp55757_c11	-1.5	-2.3	<i>RPT2-1</i>	comp56679_c0	2.7	-1.2
<i>RPT2-2</i>	comp58847_c0	0.4	-1.2	<i>RPT2-3</i>	comp56653_c0	1.8	1.3
<i>RPT2-4</i>	comp56850_c0	2.5	3.4	<i>RPT2-5</i>	comp56882_c0	1.9	1.6
<i>RPT2-6</i>	comp60352_c0	1.8	-2.5	<i>RPT2-7</i>	comp60015_c2	-0.5	-2.1
<i>RPT2-8</i>	comp59654_c2	1.6	1.2	<i>RPT2-9</i>	comp50090_c0	-1.2	-0.9
<i>RPT2-10</i>	comp60912_c0	2.2	2.6	<i>RPT2-11</i>	comp56654_c1	-1.9	-0.5
<i>RPT2-12</i>	comp52939_c0	-2.4	-1.2	<i>RPT2-13</i>	comp56654_c2	-0.6	-0.9
<i>RPT2-14</i>	comp462307_c0	0.6	2.5	<i>RPT2-15</i>	comp58999_c5	-1.3	-2.4
<i>ABCBI9-1</i>	comp61151_c0	1.3	-2.1	<i>ABCBI9-2</i>	comp59851_c4	1.2	0.2
<i>ABCBI9-3</i>	comp57437_c1	2.2	1.9	<i>ABCBI9-4</i>	comp60106_c0	-3.2	-2.5
<i>ABCBI9-5</i>	comp58093_c0	-0.1	-1.2	<i>ABCBI9-6</i>	comp58498_c4	-0.8	-1.5
<i>ABCBI9-7</i>	comp61335_c0	1.8	-2.3	<i>ABCBI9-8</i>	comp61560_c1	-0.4	-1.2
<i>ABCBI9-9</i>	comp62001_c1	2.7	3.2	<i>ABCBI9-10</i>	comp61093_c1	-7.2	-3.4

通过本地 BLAST 程序,我们在雨生红球藻转录组数据中发现了大量的已经报道的蓝光受体 (PHOT 和 CRY) 和紫外光受体 (UVR8) 信号转导通路的互作蛋白,包括非常保守的信号转导通路核心元件 (COP1、SPA1、RPT2、DET1 和 HY5)、转录因子 (MYB 和 WRKY) 及转录调节子 (BBX21、CO、FT、CSN5、CUL4 和 DDB1) (表 5)。高等植物中已经进行了功能验证的经典的 PHOT/CRY/UVR8→COP1/SPA1→HY5 光信号转导通路核心元件在雨生红球藻中都存在,暗示这条通路可能也在雨生红球藻中发挥重要的作用,但是具体的作用机制与参与的功能需要进一步验证。基因差异表达分析表明,这些信号转导通路的互作蛋白绝大多数在高光诱导下都呈现明显差异表达,其中 COP1/8/9/13 和 HY5 家族成员呈现高表达 (上调 0.5–2.8 倍)、而 SPA1 家族呈现低表达 (下调 2.1–3.5 倍)、2 个 MYBs (MYB-2 和 MYB-3) 和 1 个 WRKYs (WRKY-2) 转录因子成员在高光诱导下转录表达水平显著增强,分别达到 2.9–6.5 及 4.6–5.2 倍。在高光诱导下,光受体的互作蛋白 LHCSR1、PSBS、FT 及 ELI1 家族成员均呈现一定程度高表达,而 CUL4、DDB1 和 RUS1 家族成员普遍低表达。这些结果暗示光受体介导的信号转导通路可能参与雨生红球藻对高光的响应过程,但如何具体参与调控虾青素的积累过程还需要进一步验证。

## 2.6 荧光定量 qRT-PCR 验证差异表达基因的表达量

为了进一步验证转录组测序及基因差异表达分析结果质量,随机选择高光诱导下高表达 DEGs 基因 6 个 (*PSY*、*BCH*、*BKT*、*DGAT1-1*、*DGAT2-2*、*DGAT2-5*)、低表达 DEGs 基因 3 个 (*PEPS*、*3-KCT*、*PKS*)、光受体基因 2 个 (*PHOT*、*CPF-2*) 及其信号转导通路互作蛋白基因 4 个 (*WRKY-2*、*MYB-2*、*COP1*、*SPA1*), 共 15 个基因进行雨生红球藻 72 h 高光诱导下的 qRT-PCR 验证。实验结果显示

(图 4), 高光诱导下转录组中显著高表达的基因表达量提高, 而显著低表达的基因表达量显著下降 (图 4), 上述这些基因的表达趋势与转录组数据的基因差异表达基本一致, 说明转录组数据分析合理且可靠。

## 3 讨论

高光能有效诱导雨生红球藻积累虾青素, 并且大多数合成途径关键酶基因在转录水平高表达, 暗示调控机制主要发生在转录水平<sup>[6-9]</sup>, 我们前期研究表明高光诱导下雨生红球藻能大量合成与积累虾青素, 且虾青素合成相关重要功能基因在转录水平显著高表达<sup>[8-9]</sup>。这些结果强烈暗示功能基因转录水平高表达与虾青素的合成与积累密切相关, 但是光诱导雨生红球藻虾青素积累的转录调控机制还不清楚。转录组测序技术已经成为一种研究生物信号感知与代谢调控机制的强有力工具。近年来, 一些学者对不同诱导条件下雨生红球藻进行了转录组测序<sup>[20-28]</sup>, 集中关注了其生长、生理及虾青素积累的影响与其合成途径相关基因的表达模式, 但是对转录调控机制的研究较少, 尤其是未见光受体及其信号通路的相关报道。所以本研究选择高光诱导下的转录组数据为基础, 重点对雨生红球藻中光受体及信号转导通路中的互作蛋白进行挖掘及基因差异表达分析, 以期从光受体角度揭示高光诱导雨生红球藻虾青素积累的转录调控机制的新视角提供数据支持与功能基因。

本研究中高光诱导下雨生红球藻转录组分别获得对照、高蓝光及高白光处理组 4.0 G、3.8 G 及 3.6 G 的有效数据, 获得 131 385 个 transcripts 和 51 954 个 unigenes (表 2)。共有 20 537 个 unigenes 在 NR、NT、KO、SwissProt、Pfam、GO 及 KOG 等数据库中的至少 1 个数据库中注释成功, 注释率达到 39.52%。其中在 GO、Pfam 及 NR 数据库的注释率较高, 分别达到 32.28%、30.14% 及 28.32%,

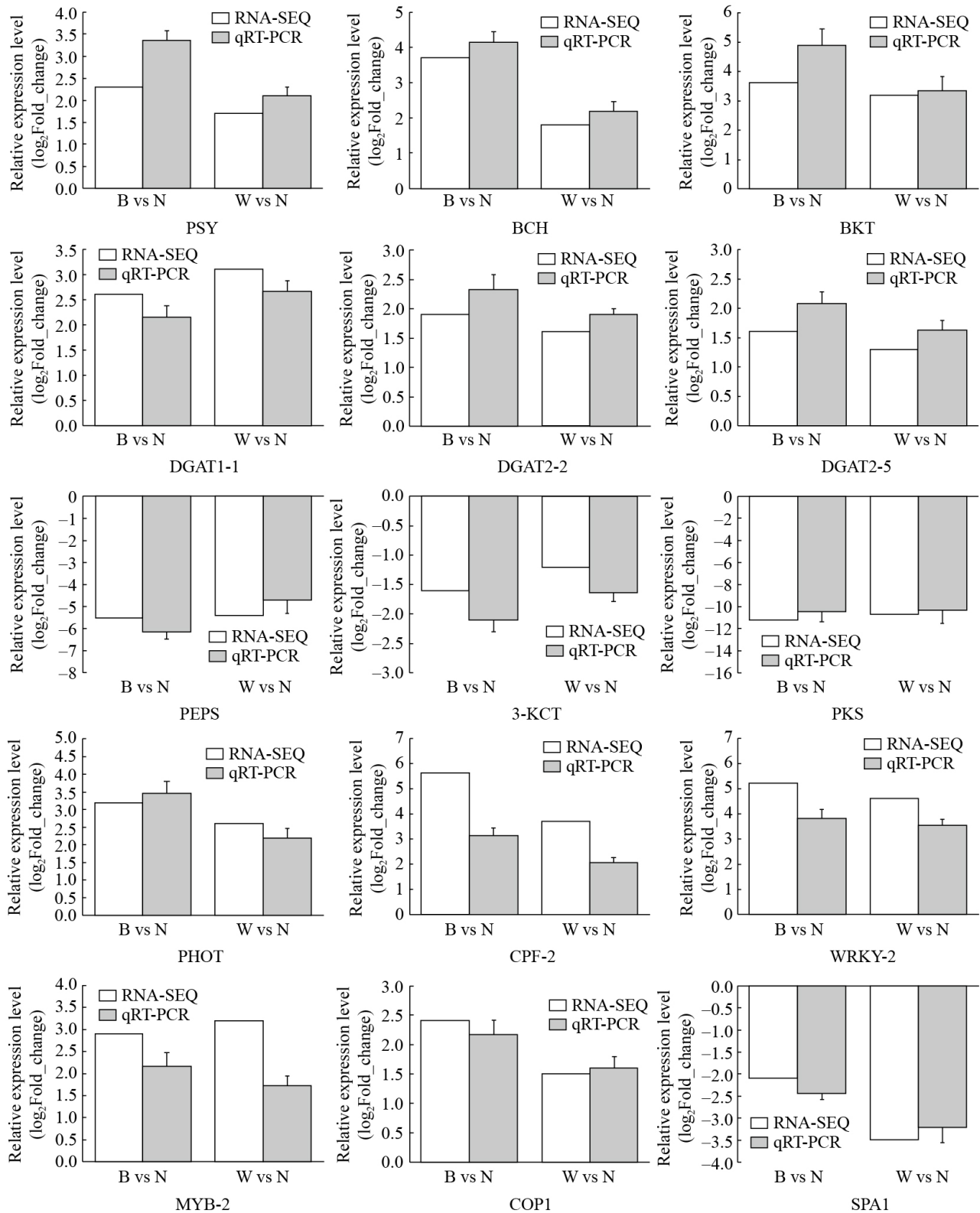


图 4 差异表达基因 qRT-PCR 验证

Fig. 4 The qRT-PCR verification of differential expression of genes.

共有 1 424 条 unigene 在所有数据库同时注释,注释率达到 2.74% (表 3)。基因差异表达分析显示,差异表达基因数量达到 2 749 个 DEGs (图 1A-B)。之前报道在红光和蓝光诱导下雨生红球藻转录组获得 165 372 个 transcripts 和 67 703 个 unigenes,经过多个数据库比对注释,共有 19 591 个、15 843 个及 21 512 个 unigenes 分别成功注释到 Phytozome、UniProt 及 NR 数据库。在蓝光诱导下共鉴定出 2 245 个 DEGs,其中上调 1 786 个,下调 459 个;红光诱导下共鉴定出 171 个 DEGs,其中上调 58 个,下调 113 个<sup>[21]</sup>。类似的在雨生红球藻中高光和乙酸及 Fe<sup>2+</sup>共同诱导下的转录组测序发现,在高光、高光-醋酸钠双重及高光 Fe<sup>2+</sup>双重诱导下,分别获得 7.4 G、8.4 G 及 8.8 G 的数据量,包含 156 992 个 transcripts,平均长度达到 1 047 bp。通过比对注释,共有 76 774 个基因成功注释,注释率达到 48.88%,其中共有 5 918 个基因在 7 个数据库中同时成功注释,注释率达到 3.76%<sup>[26]</sup>。基因差异表达分析,高光诱导下共发现 17 089 个 DEGs,其中上调 8 243 个基因,下调 8 846 个基因<sup>[26]</sup>。雨生红球藻非游动细胞 (Non-motile cell) 的转录组数据发现,获得 241 869 个 transcripts 和 28 407 个 unigenes,通过比对注释,共有 22 990 个基因被成功注释,注释率达到了 80.93%,进一步分析发现了 2 202 个 DEGs<sup>[25]</sup>。差异表达基因进一步 GO 和 KEGG 富集通路分析发现,本研究高光诱导下,参与光合作用 (Photosynthesis)、氧化磷酸化 (Oxidative phosphorylation)、核糖体 (Ribosome)、类胡萝卜素合成 (Carotenoid biosynthesis) 及脂肪酸/不饱和脂肪酸合成 (Biosynthesis of unsaturated/saturated fatty acids) 等途径大量基因呈现显著高表达;同时参与 DNA 复制 (DNA replication)、碳代谢 (Carbon metabolism) 及氮代谢 (Nitrogen metabolism) 等途径大量基因呈现显著低表达。这与之前的不同光强与光质诱导下雨生红球藻转录组分析结果类似<sup>[21,26]</sup>,暗示高光诱导下雨生红球藻中类胡萝卜素和脂肪酸

的积累与这些基因的高表达密不可分。从转录组数据获得量、注释率及差异基因数量来看,本研究与上述类似研究存在一定差距,主要体现在第一原始有效数据获得量偏小,这个主要原因是本研究过程中将 3 个生物学重复样品混合为一进行后续测序及分析,这种方式在后续类似的研究中应该避免;第二注释成功率较低,可能的原因是本研究中的转录组数据分析时间是 2018 年,时间比较早,本身数据库中的雨生红球藻的基因覆盖度较低;第三获得的高光诱导条件下 DEGs 数量较少,可能与诱导时间有关,本研究中仅仅是选取了高光诱导 72 h 的时间点取样进行测序,后续的实验过程应该关注不同时间点的影响。除此之外,雨生红球藻的基因组测序工作也有一些进展。例如陈军等发布了雨生红球藻低覆盖度基因组草图<sup>[34]</sup>和胡章立等发布了雨生红球藻的精细基因组图谱<sup>[20]</sup>,这为转录组数据结合基因组数据分析提供了可能。

对原核蓝藻、真核微藻及高等植物等光合作用的生物而言,光不仅提供能量,而且作为一种重要的环境信号因子,其蕴含的光质、光强及光周期等信息均可调节生物生长、发育及众多生理过程<sup>[11]</sup>。在漫长的进化过程中光合作用生物获得了一套精细的光信号感知与转导系统。通常来讲,植物依靠光受体感知光信号,并通过复杂的接收和转导系统,进而与体内其他信号转导途径耦联,最终调控光响应生理过程,包括光形态发生、叶绿体运动、下胚轴生长、开花时间、生物钟、生物节律、趋光性及次级代谢产物的合成等<sup>[10]</sup>。其中光受体是整个信号通路的开关分子,转导通路核心元件是整个信号通路的中枢系统,互作蛋白中转录因子与转录调节子对功能基因的表达起着重要作用<sup>[11]</sup>。近年来,光信号转导分子机制已成为植物光生物学研究领域的热点。因此,对雨生红球藻中光受体与互作蛋白及信号转导通路的研究具有重要的科学意义。

按照光信号波段的不同,目前发现的光受体主要包括红光受体光敏色素 PHY (Phytochrome)、蓝光受体向光素 PHOT (Phototropin)、隐花色素 CRY (Cryptochrome) 及 AUREO (Aureochrome) 与紫外光受体 UVR8 (UV resistance locus 8)<sup>[10-12]</sup>。对真核微藻而言,在已知的光受体中,CRYs 以多个等位基因形式广泛分布于几乎所有真核微藻<sup>[16]</sup>,而 PHOT 和 UVR8 则是单个等位基因形式仅存在于真核绿藻<sup>[17-18]</sup>,AUREO 是异鞭藻门中进行光合作用的藻类特有的蓝光受体,属于 LOV 光受体蛋白家族<sup>[35]</sup>。我们在雨生红球藻转录组数据中发现了 9 个光受体同源基因(图 3 和表 5),包括 1 个蓝光受体向光素 PHOT (Phototropin)、7 个隐花色素与光解酶 CPFs (Cryptochrome/photolyase family) 和 1 个 UVR8 (UV resistance locus 8) 成员。其中 PHOT 和 UVR8 以单拷贝形式存在,而 CRYs 以多拷贝或双拷贝形式存在,这与之前的研究结果一致<sup>[16-18]</sup>。先前文献表明,在蓝光诱导下的雨生红球藻转录组中,发现了 4 个可能的隐花色素基因<sup>[21]</sup>,但是我们发现了 7 个可能的 CPFs 家族成员。目前真核微藻中光受体的研究集中在基因克隆、表达及功能鉴定方面<sup>[10]</sup>。例如 PHOTs 同源基因已经在雨生红球藻 *H. pluvialis*<sup>[36]</sup>、莱茵衣藻 *C. reinhardtii*<sup>[37]</sup>、团藻 *Volvox carteri*<sup>[38]</sup> 及金牛驼球藻 *Ostreococcus tauri*<sup>[39]</sup> 中克隆和功能鉴定。进一步突变和 RNA 干扰实验验证,CrePHOT 参与细胞有性生活周期,并能调控靶基因转录水平的表达,涉及捕光复合物、叶绿素和类胡萝卜素的合成、眼点大小及细胞周期<sup>[40]</sup>。除此之外,在莱茵衣藻 *C. reinhardtii*<sup>[41]</sup>、红藻 *Cyanidioschyzon merolae*<sup>[42]</sup> 及三角褐指藻 *P. tricornutum*<sup>[43-44]</sup> 中鉴定了多个不同类型的 CRYs。本课题组近期在雨生红球藻中克隆了编码植物类型 CRY 基因并进行了重组表达及光化学特性鉴定<sup>[45]</sup>。同时对雨生红球藻编码 UVR8 的基因进行了克隆及序列分析<sup>[46]</sup>。基因差异表达分析表明(表 5),PHOT 和 CPF-2 在高光诱导下呈现显著高表达,而 CPF-3

和 CPF-4 在高光诱导下低表达。有趣的是,UVR8 和 CPF-1 仅在高蓝光下高表达,而 CPF-5 和 CPF-6 仅在高白光下高表达。先前文献表明, HpCPH1 基因在蓝光和红光诱导下转录水平表达没有显著差异,但是 HpCRY-DASH1 基因在上述诱导条件下显著降低<sup>[21]</sup>,造成结果不一致的原因可能是诱导时间的不同或者 CPFs 家族成员的鉴定不一致。

光受体及其互作蛋白组成的信号转导通路在植物光适应过程中发挥重要的作用<sup>[10-15]</sup>。我们在雨生红球藻转录组数据中发现了大量的已经报道的各类光受体互作蛋白(图 3 和表 5),包括非常保守的信号转导通路核心元件(COP1、SPA1、RPT2、DET1 和 HY5)、转录因子(MYB 和 WRKY)及转录调节子(BBX21、CO、FT、CSN5、CUL4 和 DDB1)。例如,最新研究表明,高等植物中 UVR8 可分别与 WRKY36 和 MYB30/73/77 转录因子互作,进而调控其他相关基因的表达<sup>[47-49]</sup>。BBXs (B-box proteins) 家族成员是光信号通路中重要的转录调节子,可以与其他转录因子组成复合体(BBX-CO-FT 或 BBX28/21-COP1-HY5)共同调控基因的表达<sup>[50-52]</sup>。CSN1-8 家族成员(COP9 signalosome)也在高等植物光响应过程中发挥重要的作用<sup>[53]</sup>。CUL4-DDB1-COP1-SPA 组成的复合体可以调控转录因子活性进而调控高等植物对 UVB 的响应过程<sup>[54]</sup>。RUS 家族成员在拟南芥响应低水平 UVB 诱导过程中发挥重要的作用<sup>[55]</sup>。RPT2 是向光素 PHOT 感知和转导蓝光信号通路中重要的成员之一<sup>[56]</sup>,我们在雨生红球藻转录组数据中发现了大量的 RPT2 家族成员(15 个),其表达量在不同成员与不同光照条件下呈现多样化。有趣的是,大量的光受体互作蛋白 ABCB 转运家族成员(10 个)被鉴定,并且部分成员在高光下表达量增强,暗示可能参与虾青素合成过程中的胡萝卜素或虾青素由叶绿体到细胞质的转运过程。

综上所述,本研究挖掘了大量的光受体及其

信号转导通路的互作蛋白，高等植物中已经验证的多条经典的光受体介导的信号转导通路的同源基因都在雨生红球藻转录组中存在，暗示类似的光信号感知与转导通路在其体内同样发挥重要的作用。但是上述通路在高等植物调控的多种生理过程在真核微藻雨生红球藻中并不存在，例如光形态发生、叶绿体运动、下胚轴生长及开花时间等。尽管高等植物和绿藻很多光受体起源于共同

祖先，在结构方面存在保守性，但作用机制和功能存在物种特异性。因此雨生红球藻中这条通路的行使的具体功能还需要进一步挖掘与验证。更有趣的是，光受体及其信号转导通路的互作蛋白基因表达在雨生红球藻中高光诱导下呈现显著差异。因此，基于高等植物光受体与信号转导通路的作用机制及功能研究进展，结合本研究结果，综上所述，我们推测如下信号转导通路 (图 5)，

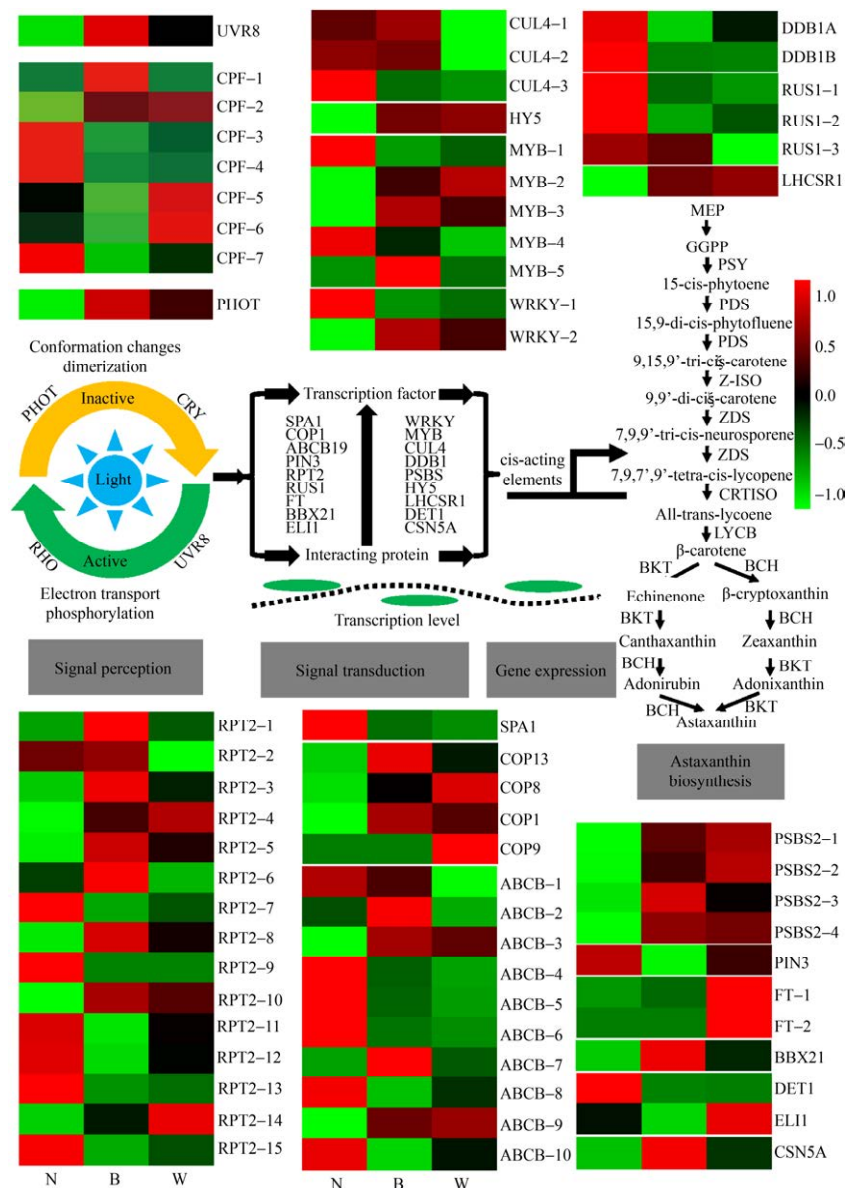


图 5 雨生红球藻光受体及互作蛋白关键酶基因差异表达 (图中-1和1的范围是基于基因的FPKM数值构建heatmap时人为设定的颜色取值范围)

Fig. 5 Differential expression of genes encoding photoreceptors and interacting proteins in *H. pluvialis*.



“光信号→光受体→互作蛋白(转录因子或者转录调节子→转录因子)→目标靶基因表达→生理过程”的信号转导通路可能参与雨生红球藻对高光的响应过程,进而调控虾青素的积累,但具体的作用机制还需要进一步验证。

## 4 结论

基于雨生红球藻高光诱导下的转录组数据,本研究发现高光诱导下参与光合作用、类胡萝卜素合成、脂肪酸合成、氧化磷酸化、DNA复制、碳代谢及氮代谢等过程的功能基因的表达呈现显著差异。通过进一步分析,在雨生红球藻中鉴定了大量光受体及其信号转导通路中的互作蛋白,为下一步这些基因的功能研究提供了候选基因,同时初步推测“光信号→光受体→互作蛋白(转录因子或者转录调节子→转录因子)→目标靶基因表达→生理过程”的信号转导通路可能参与雨生红球藻对高光的响应过程,进而调控虾青素的积累,为从光受体角度解析高光诱导雨生红球藻虾青素积累的转录调控机制奠定了基础,但具体的作用机制还需要进一步验证。

## REFERENCES

- [1] Shah MMR, Liang YM, Cheng JJ, et al. Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: from single cell to high value commercial products. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 531.
- [2] Zhang Z, Wang BB, Hu Q, et al. A new paradigm for producing astaxanthin from the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol Bioeng*, 2016, 113(10): 2088-2099.
- [3] Lemoine Y, Schoefs B. Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress. *Photosynth Res*, 2010, 106(1/2): 155-177.
- [4] 姜思, 佟少明. 雨生红球藻虾青素合成研究进展. *生物工程学报*, 2019, 35(6): 988-997.  
Jiang S, Tong SM. Advances in astaxanthin biosynthesis in *Haematococcus pluvialis*. *Chin J Biotech*, 2019, 35(6): 988-997 (in Chinese).
- [5] Solovchenko AE. Recent breakthroughs in the biology of astaxanthin accumulation by microalgal cell. *Photosynth Res*, 2015, 125(3): 437-449.
- [6] Xi TQ, Kim DG, Roh SW, et al. Enhancement of astaxanthin production using *Haematococcus pluvialis* with novel led wavelength shift strategy. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(14): 6231-6238.
- [7] Hu CY, Cui DD, Sun X, et al. Transcriptomic analysis unveils survival strategies of autotrophic *Haematococcus pluvialis* against high light stress. *Aquaculture*, 2019, 513: 734430.
- [8] Cui HL, Yu XN, Wang Y, et al. Evolutionary origins, molecular cloning and expression of carotenoid hydroxylases in eukaryotic photosynthetic algae. *BMC Genomics*, 2013, 14(1): 457.
- [9] Cui HL, Yu XN, Wang Y, et al. Gene cloning and expression profile of a novel carotenoid hydroxylase (CYP97C) from the green alga *Haematococcus pluvialis*. *J Appl Phycol*, 2014, 26(1): 91-103.
- [10] Lepetit B, Dietzel L. Light signaling in photosynthetic eukaryotes with 'green' and 'red' chloroplasts. *Environ Exp Bot*, 2015, 114: 30-47.
- [11] 崔红利, 陈军, 侯义龙, 等. 真核微藻蓝光受体及其功能研究进展. *生物技术通报*, 2017, 33(4): 51-62.  
Cui HL, Chen J, Hou YL, et al. Research progress on blue light receptors and their functions in eukaryotic microalgae. *Biotech Bull*, 2017, 33(4): 51-62 (in Chinese).
- [12] Fernandez MB, Tossi V, Lamattina L, et al. A comprehensive phylogeny reveals functional conservation of the UV-B photoreceptor UVR8 from green algae to higher plants. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 1698.
- [13] Han X, Chang X, Zhang ZH, et al. Origin and evolution of core components responsible for monitoring light environment changes during plant terrestrialization. *Mol Plant*, 2019, 12(6): 847-862.
- [14] Okajima K. Molecular mechanism of phototropin light signaling. *J Plant Res*, 2016, 129(2): 149-157.
- [15] Wang Q, Lin CT. Mechanisms of cryptochrome-mediated photoresponses in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2020, 71: 103-129.
- [16] Oliveri P, Fortunato AE, Petrone L, et al. The cryptochrome/photolyase family in aquatic organisms. *Mar Genomics*, 2014, 14: 23-37.



- [17] Li FW, Rothfels CJ, Melkonian M, et al. The origin and evolution of phototropins. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 637.
- [18] Kianianmomeni A, Hallmann A. Algal photoreceptors: *in vivo* functions and potential applications. *Planta*, 2014, 239(1): 1-26.
- [19] Huang K, Merkle T, Beck CF. Isolation and characterization of a *Chlamydomonas* gene that encodes a putative blue-light photoreceptor of the phototropin family. *Physiol Plant*, 2012, 115(4): 613-622.
- [20] Luo QL, Bian C, Tao M, et al. Genome and transcriptome sequencing of the astaxanthin-producing green microalga, *Haematococcus pluvialis*. *Genome Biol Evol*, 2019, 11(1): 166-173
- [21] Lee C, Ahn JW, Kim JB, et al. Comparative transcriptome analysis of *Haematococcus pluvialis* on astaxanthin biosynthesis in response to irradiation with red or blue led wavelength. *World J Microbiol Biotechnol*, 2018, 34(7): 96.
- [22] Cui DD, Hu CY, Zou ZM, et al. Comparative transcriptome analysis unveils mechanisms underlying the promoting effect of potassium iodide on astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* under high light stress. *Aquaculture*, 2020, 525: 735279.
- [23] Zhao Y, Hou YY, Chai WJ, et al. Transcriptome analysis of *Haematococcus pluvialis* of multiple defensive systems against nitrogen starvation. *Enzyme Microb Technol*, 2020, 134: 109487.
- [24] Li QQ, Zhang LT, Liu JG. Comparative transcriptome analysis at seven time points during *Haematococcus pluvialis* motile cell growth and astaxanthin accumulation. *Aquaculture*, 2019, 503: 304-331.
- [25] Li QQ, Zhang LT, Liu JG. Examination of carbohydrate and lipid metabolic changes during *Haematococcus pluvialis* non-motile cell germination using transcriptome analysis. *J Appl Phycol*, 2019, 31(1): 145-156.
- [26] He BX, Hou LL, Dong MM, et al. Transcriptome analysis in *Haematococcus pluvialis*: astaxanthin induction by high light with acetate and  $Fe^{2+}$ . *Int J Mol Sci*, 2018, 19(1): 175.
- [27] Gao ZQ, Li Y, Wu GX, et al. Transcriptome analysis in *Haematococcus pluvialis*: astaxanthin induction by salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA). *PLoS ONE*, 2015, 10(10): e0140609.
- [28] Cheng J, Li K, Zhu YX, et al. Transcriptome sequencing and metabolic pathways of astaxanthin accumulated in *Haematococcus pluvialis* mutant under 15%  $CO_2$ . *Bioresour Technol*, 2017, 228: 99-105.
- [29] Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(7): 644-652.
- [30] Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12: 323.
- [31] Trapnell C, Williams BA, Pertea G, et al. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(5): 511-515.
- [32] Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol*, 2010, 11(21): R106.
- [33] Rao XY, Huang XL, Zhou ZC, et al. An improvement of the 2(-delta delta CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath*, 2013, 3(3): 71-85.
- [34] 陈军, 郑华军, 刘亚铭, 等. 雨生红球藻低覆盖度基因组草图分析. *中国生物工程杂志*, 2018, 38(7): 21-28.
- Chen J, Zheng HJ, Liu YM, et al. The analysis of the low coverage *Haematococcus pluvialis* draft genome. *China Biotechnol*, 2018, 38(7): 21-28 (in Chinese).
- [35] Takahashi F, Yamagata D, Ishikawa M, et al. Aureochrome, a photoreceptor required for photomorphogenesis in stramenopiles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(49): 19625-19630.
- [36] 崔红利, 陈军, 王林萍, 等. 雨生红球藻 PHOT 的基因克隆和生物信息学分析. *西南农业学报*, 2017, 30(12): 2639-2647.
- Cui HL, Chen J, Wang LP, et al. Gene cloning and bioinformatics analysis of novel blue photoreceptor phototropin from green alga *Haematococcus pluvialis*. *Southwest China J Agric Sci*, 2017, 30(12): 2639-2647 (in Chinese).
- [37] Huang KY, Merkle T, Beck CF. Isolation and

- characterization of a *Chlamydomonas* gene that encodes a putative blue-light photoreceptor of the phototropin family. *Physiol Plant*, 2002, 115(4): 613-622.
- [38] Kianianmomeni A, Hallmann A. Transcriptional analysis of *Volvox* photoreceptors suggests the existence of different cell-type specific light-signaling pathways. *Curr Genet*, 2015, 61(1): 3-18.
- [39] Sullivan S, Petersen J, Blackwood L, et al. Functional characterization of *Ostreococcus tauri* phototropin. *New Phytol*, 2016, 209(2): 612-623.
- [40] Im CS, Eberhard S, Huang KY, et al. Phototropin involvement in the expression of genes encoding chlorophyll and carotenoid biosynthesis enzymes and LHC apoproteins in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J*, 2006, 48(1): 1-16.
- [41] Beel B, Prager K, Spexard M, et al. A flavin binding cryptochrome photoreceptor responds to both blue and red light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell*, 2012, 24(7): 2992-3008.
- [42] Asimgil H, Kavakli IH. Purification and characterization of five members of photolyase/cryptochrome family from *Cyanidioschyzon merolae*. *Plant Sci*, 2012, 185/186: 190-198.
- [43] Juhas M, Von Zadow A, Spexard M, et al. A novel cryptochrome in the diatom *Phaeodactylum tricorutum* influences the regulation of light-harvesting protein levels. *FEBS J*, 2014, 281(9): 2299-2311.
- [44] Coesel S, Mangogna M, Ishikawa T, et al. Diatom PtCPF1 is a new cryptochrome/photolyase family member with DNA repair and transcription regulation activity. *EMBO Rep*, 2009, 10(6): 655-661.
- [45] Hang W, Gujar A, Zhang HJ, et al. Cloning, expression, and characterization of a novel plant type cryptochrome gene from the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Prot Exp Purif*, 2020, 172: 105633.
- [46] 张宏江, 杭伟, 马浩天, 等. 雨生红球藻 UVR8 的基因克隆和生物信息学分析. *西南农业学报*, 2019, 32(9): 2025-2032.  
Zhang HJ, Hang W, Ma HT, et al. Gene cloning and bioinformatics analysis of novel ultraviolet-B photoreceptor uv resistance locus 8 (UVR8) from Green alga *Haematococcus pluvialis*. *J Southwest Agric*, 2019, 32(9): 2025-2032 (in Chinese).
- [47] Yang Y, Zhang LB, Chen P, et al. UV-B photoreceptor UVR8 interacts with MYB73/MYB77 to regulate auxin responses and lateral root development. *EMBO J*, 2020, 39(2): e101928.
- [48] Yang Y, Liang T, Zhang LB, et al. UVR8 interacts with WRKY36 to regulate *HY5* transcription and hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Nat Plants*, 2018, 4(2): 98-107.
- [49] Yan Y, Li C, Dong XJ, et al. MYB30 is a key negative regulator of *Arabidopsis* photomorphogenic development that promotes PIF4 and PIF5 protein accumulation in the light. *Plant Cell*, 2020, 32(7): 2196-2215.
- [50] Song ZQ, Bian YT, Liu JJ, et al. B-box proteins: pivotal players in light-mediated development in plants. *J Integr Plant Biol*, 2020, 62(9): 1293-1309.
- [51] Lin F, Jiang Y, Li J, et al. B-BOX DOMAIN PROTEIN28 negatively regulates photomorphogenesis by repressing the activity of transcription factor HY5 and undergoes COP1-Mediated degradation. *Plant Cell*, 2018, 30(9): 2006-2019.
- [52] Xu DQ, Jiang Y, Li JG, et al. BBX21, an *Arabidopsis* B-box protein, directly activates HY5 and is targeted by COP1 for 26S proteasome-mediated degradation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(27): 7655-7660.
- [53] Qin NX, Xu DQ, Li JG, et al. COP9 signalosome: Discovery, conservation, activity, and function. *J Integr Plant Biol*, 2020, 62(1): 90-103.
- [54] Huang X, Ouyang XH, Yang PY, et al. Conversion from CUL4-based COP1-SPA E3 apparatus to UVR8-COP1-SPA complexes underlies a distinct biochemical function of COP1 under UV-B. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(41): 16669-16674.
- [55] Tong HY, Leasure CD, Hou XW, et al. Role of root UV-B sensing in *Arabidopsis* early seedling development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(52): 21039-21044.
- [56] Inada S, Ohgishi M, Mayama T, et al. RPT2 is a signal transducer involved in phototropic response and stomatal opening by association with phototropin 1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 2004, 16(4): 887-896.

(本文责编 陈宏宇)