

# 莱茵衣藻丝/苏氨酸蛋白激酶突变株蓝光响应的表征

李旺宁<sup>1</sup>, 梁梦静<sup>1</sup>, 杨泽<sup>1</sup>, 李亚男<sup>1</sup>, 张春辉<sup>1</sup>, 季春丽<sup>1</sup>, 李润植<sup>1</sup>, 秦松<sup>2</sup>, 薛金爱<sup>1\*</sup>, 崔红利<sup>1,2\*</sup>

1 山西农业大学农学院分子农业与生物能源研究所, 山西 太谷 030801

2 中国科学院烟台海岸带研究所 海岸带生物学与生物资源利用重点实验室, 山东 烟台 264003

李旺宁, 梁梦静, 杨泽, 李亚男, 张春辉, 季春丽, 李润植, 秦松, 薛金爱, 崔红利. 莱茵衣藻丝/苏氨酸蛋白激酶突变株蓝光响应的表征[J]. 生物工程学报, 2023, 39(11): 4563-4579.

LI Wangning, LIANG Mengjing, YANG Ze, LI Yanan, ZHANG Chunhui, JI Chunli, LI Runzhi, QIN Song, XUE Jinai, CUI Hongli. Characterization the response of *Chlamydomonas reinhardtii* serine/threonine protein kinase mutant to blue light[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(11): 4563-4579.

**摘要:** 为研究莱茵衣藻丝/苏氨酸蛋白激酶(silk/threonine protein kinase, STK)介导藻细胞蓝光响应的分子机制, 本文对蓝光胁迫下莱茵衣藻 STK 突变株系 *crstk11* (*AphVIII* 盒反向插入 *stk11* 基因编码区)进行表型鉴定及转录组分析。表型鉴定显示, 正常光(白光)下, 野生型株 CC5325 与突变株 *crstk11* 的生长和色素含量差异较小; 蓝光抑制了 *crstk11* 藻细胞生长和叶绿素合成, 但显著促进类胡萝卜素积累。转录组分析显示, 蓝光处理 4 d, 突变株(STK4) vs.野生型(wild type, WT4)共检测到差异表达基因(differential expression genes, DEGs) 860 条(559 个上调, 301 个下调)。高蓝光处理 8 d, STK8 vs. WT8 共获得 1 088 个 DEGs (468 个上调, 620 个下调)。KEGG 富集分析发现, 与 CC5325 相比, *crstk11* 蓝光响应基因主要参与胞内光合作用催化活性、碳代谢和色素合成等。其中, 上调基因包括 *psaA*、*psaB* 和 *psaC*, *psbA*、*psbB*、*psbC*、*psbD*、*psbH* 和 *psbL*, *petA*、*petB* 和 *petD*, 以及编码 ATP 合成酶  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $c$  亚基的基因。下调基因有 *petF* 和 *petJ* 等。研究揭示了莱茵衣藻蛋白激酶 CrSTK11 可能通过介导光合作用、色素合成和碳代谢参与藻细胞蓝光响应, 这为深入解析藻类光胁迫抗性机制提供了新知识。

**关键词:** 莱茵衣藻; 丝/苏氨酸蛋白激酶; 蓝光胁迫; 转录组分析; 差异表达基因

资助项目: 国家自然科学基金(31902394, 41876188); 山西省高等学校科技创新计划(2021L119); 山西农业大学科技创新基金(2018YJ16); 山西省优秀博士来晋工作奖励资金(SXYBKY2019036)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31902394, 41876188), the Science and Technology Innovation Program of Colleges and Universities of Shanxi Province (2021L119), the Science and Technology Innovation Fund of Shanxi Agricultural University (2018YJ16), and the Excellent Doctor Work Award Fund of Shanxi Province (SXYBKY2019036).

\*Corresponding authors. E-mail: CUI Hongli, cuihongli@sxau.edu.cn; XUE Jinai, Xue202310@126.com

Received: 2023-03-10; Accepted: 2023-07-28; Published online: 2023-07-31

## Characterization the response of *Chlamydomonas reinhardtii* serine/threonine protein kinase mutant to blue light

LI Wangning<sup>1</sup>, LIANG Mengjing<sup>1</sup>, YANG Ze<sup>1</sup>, LI Yanan<sup>1</sup>, ZHANG Chunhui<sup>1</sup>, JI Chunli<sup>1</sup>, LI Runzhi<sup>1</sup>, QIN Song<sup>2</sup>, XUE Jinai<sup>1\*</sup>, CUI Hongli<sup>1,2\*</sup>

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

2 Key Laboratory of Coastal Biology and Biological Resources Utilization, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, Shandong, China

**Abstract:** In order to investigate the molecular mechanism of silk/threonine protein kinase (STK)-mediated blue light response in the algal *Chlamydomonas reinhardtii*, phenotype identification and transcriptome analysis were conducted for *C. reinhardtii* STK mutant strain *crstk11* (with an *AphvIII* box reverse insertion in *stk11* gene coding region) under blue light stress. Phenotypic examination showed that under normal light (white light), there was a slight difference in growth and pigment contents between the wild-type strain CC5325 and the mutant strain *crstk11*. Blue light inhibited the growth and chlorophyll synthesis in *crstk11* cells, but significantly promoted the accumulation of carotenoids in *crstk11*. Transcriptome analysis showed that 860 differential expression genes (DEG) (559 up-regulated and 301 down-regulated) were detected in mutant (STK4) vs. wild type (WT4) upon treatment under high intensity blue light for 4 days. After being treated under high intensity blue light for 8 days, a total of 1 088 DEGs (468 upregulated and 620 downregulated) were obtained in STK8 vs. WT8. KEGG enrichment analysis revealed that compared to CC5325, the *crstk11* blue light responsive genes were mainly involved in catalytic activity of intracellular photosynthesis, carbon metabolism, and pigment synthesis. Among them, upregulated genes included *psaA*, *psaB*, and *psaC*, *psbA*, *psbB*, *psbC*, *psbD*, *psbH*, and *L*, *petA*, *petB*, and *petD*, as well as genes encoding ATP synthase  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $c$  subunits. Downregulated genes included *petF* and *petJ*. The present study uncovered that the protein kinase CrSTK11 of *C. reinhardtii* may participate in the blue light response of algal cells by mediating photosynthesis as well as pigment and carbon metabolism, providing new knowledge for in-depth analysis of the mechanism of light stress resistance in the algae.

**Keywords:** *Chlamydomonas reinhardtii*; serine/threonine protein kinase; blue light stress; transcriptome analysis; differential expression gene

植物在逆境胁迫下会接收并转导胁迫信号, 启动体内对逆境胁迫的响应机制, 进而调控下游相关功能基因对逆境胁迫的响应。蛋白激酶(protein kinase, PK)是参与逆境胁迫应答的重要调控蛋白<sup>[1-2]</sup>。众多研究表明, 在逆境胁迫下, 植物通过膜受体蛋白激酶感知外界胁迫信

号, 随后蛋白激酶发生蛋白磷酸化反应, 使信号放大并向下转导, 进而激活下游的转录因子, 以诱导相关抗逆基因的表达, 从而增强植物的抗逆性<sup>[3]</sup>。

蛋白激酶是一类催化特定蛋白质的酶, 其丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸残基可发生共价磷酸

化<sup>[4]</sup>,它能够改变蛋白质分子的氨基酸残基,使其发生磷酸化或自磷酸化作用来调控下游的信号传递网络。目前已在很多植物中分离出了蛋白激酶,如拟南芥<sup>[5]</sup>、玉米<sup>[6-7]</sup>、豌豆<sup>[8]</sup>、小麦<sup>[9]</sup>、紫花苜蓿<sup>[10]</sup>、番茄<sup>[11]</sup>、烟草<sup>[12]</sup>、大豆<sup>[13]</sup>和水稻<sup>[14]</sup>等。这些蛋白激酶的磷酸化过程被证实参与许多信号,包括光、病原体的侵入、高盐、激素、干旱、营养匮乏及低温分子应答等。类受体蛋白激酶(receptor-like protein kinases, RPK1)是结合在膜上的受体蛋白激酶,过表达 RPK1 蛋白的转基因拟南芥植株抗旱性增强,功能缺失突变体 *rpkl-1* 对水分敏感性降低<sup>[5]</sup>;促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)级联途径是真核生物中普遍存在的高度保守的信号转导模式,低温处理下,在烟草中过表达 *ZmMPK17* 的烟草植株通过较少活性氧的积累维持抗氧化防御系统的稳定,以提高植株耐寒性<sup>[15]</sup>;花生中的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶在寒冷和盐胁迫应答中起着重要的作用<sup>[16]</sup>;在水稻中过表达 *OsMAPK33* 也可显著提高水稻对于盐胁迫的敏感性<sup>[17]</sup>。

植物蛋白激酶已成为植物抗逆分子生物学的研究热点之一,其在植物信号转导途径中发挥的作用也逐渐被解析,但关于胁迫诱导信号通路的研究主要集中于模式植物拟南芥和水稻中,却少有人关注激酶在非种子植物中的生物学功能及信号通路。刘志香研究发现集胞藻 PCC6803 中的丝氨酸/苏氨酸激酶 SpkG 参与高盐胁迫的信号传递,丝氨酸/苏氨酸激酶 SpkE 不仅可同时参与低温和氮缺乏两种胁迫介导的信号传递,还可与二元信号转导系统中组氨酸激酶(histidine kinases, HK) Hik34 协同响应氮缺乏胁迫<sup>[18]</sup>。鲍华燕<sup>[19]</sup>通过基因敲除及表达差异分析发现聚球藻(*Synechococcus*) PCC7942 的

Ser/Thr 蛋白激酶 Stk196 参与高温胁迫的信号传递。钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*) *stk2103* 在低温诱导后表达量降低,高温诱导后表达量升高,表明该基因可能参与了钝顶螺旋藻对温度的适应<sup>[19]</sup>。

目前对蛋白激酶的研究仅局限在非生物胁迫(干旱、盐渍、低温和高温)和激素响应方面,对于强光胁迫鲜有报道。Snyders 等通过对拟南芥中类囊体蛋白激酶(thylakoid protein kinase, TAK) TAK1 的研究,结果发现 TAK1 突变体(TAK1 表达水平降低)的光合模式随之发生变化,对强光的敏感性增加<sup>[20]</sup>;Rochaix 研究发现在藻类和陆生植物中保守的 Ser-Thr 蛋白激酶似乎参与了对光环境变化的短期和长期适应;类囊体蛋白激酶 *stt7/STN7* 以及 *stl1/STN8* 能够参与光适应,在波动光下维持质体醌氧化还原平衡和调节代谢的需要;*stt7/STN7* 和 *stl1/STN8* 能够同时参与氧化还原调节与光合基因的表达等过程<sup>[21-23]</sup>。莱茵衣藻中缺失 ATP 依赖性锌金属蛋白酶(ATP-dependent zinc metalloprotease, FtsH)导致高光过敏表型和 PSII 修复功能缺陷,而过表达 *FtsH1* 则能够恢复衣藻细胞对高光的抗性<sup>[24-25]</sup>。Sanyal 等<sup>[26]</sup>通过对莱茵衣藻野生株 CC-125 和向光素突变株(*Bphot*)的研究,证明了钙调神经磷酸酶(calcineurin, CaN) CrCBL1 与 CrPhot 相互作用,且 CrCBL 的表达受光的调节,表明了 CrCBL 可能在衣藻的光依赖性生理反应中起着关键作用。研究发现衣藻中丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶是一种催化组蛋白 H3 的苏氨酸残基磷酸化的蛋白激酶<sup>[27]</sup>,且组蛋白 H3 磷酸化已经被发现能够增加植物细胞对盐胁迫和其他非生物胁迫的适应<sup>[28-29]</sup>。

研究发现激酶在高等植物的逆境胁迫中发挥着重要作用,尽管藻类中有关激酶的逆境胁迫

迫研究较多,但关于光胁迫对莱茵衣藻丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的表型及其转录差异未见报道。因此,本研究以衣藻野生株 CC5325 和丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶突变株 *crstk11* 为研究对象,分析高蓝光处理后的表型和转录组差异,通过对差异表达基因的分析,全面了解蛋白激酶 STKs 介导蓝光胁迫响应涉及的代谢通路,为揭示激酶介导光胁迫抗性机理提供理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 衣藻的培养条件

藻株:莱茵衣藻 CC5325 (简称 CC5325 或 WT)和 LMJ.RY0402.254001\_3 (STK 突变,简称 *crstk11*)均购自莱茵衣藻资源中心<sup>[30]</sup>,现保存于山西农业大学分子农业与生物能源研究所藻种室。采用 TAP (tris-acetate-phosphate)培养基,突变株 *crstk11* 添加巴龙霉素(10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )进行培养,培养条件温度为 23  $^{\circ}\text{C}$ 、光/暗周期为(12 h)/(12 h)、20  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ ,培养期间每天定时摇瓶 2 次,防止细胞贴壁,培养至藻细胞达到对数期。

### 1.2 *crstk11* 突变体分子鉴定

采用 CTAB 法提取野生型株 CC5325 和突变株 *crstk11* 的基因组 DNA,根据 ChlaMmeSeq 方法<sup>[31]</sup>扩增 3 个片段,以确定插入盒在突变株中的插入位点。(1)用基因 *stk11* 引物 F+R 预测插入位点;(2)与 F+C1(插入盒下游引物)引物对的 5'插入盒基因组连接;(3)与(插入盒上游引物) C2+R 引物对的 3'插入盒基因组连接。所用引物列在表 1 中。程序为:98  $^{\circ}\text{C}$  10 min; 98  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  25 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min, 每个样品重复 3 次。

### 1.3 生理指标测定

生长曲线测定:在紫外消杀 30 min 的超净工作台中摇匀吸取各个样品各 3 mL,利用紫外分光光度计在 680 nm 波长下测定藻液的吸光

表 1 文中所用的引物信息

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
<i>Actin-F</i>	AGAAGGACTCGTACGTTGGC	20
<i>Actin-R</i>	CCAGAGTCCAGCACGATACC	20
<i>stk11-F</i>	CTCCTACCCGCTTTCGGAC	19
<i>stk11-R</i>	CATCAGAGTCCAGCGACCAC	20
Cassette-C1	ATACTGCATGTAATGGCCAGG	21
Cassette-C2	GCGGCAGAATAGTCGCGTAT	20
<i>psaA-F</i>	TTGTTAGCCGATAGGCGAGG	20
<i>psaA-R</i>	TCTTGCAAACCTTACGGGACA	21
<i>psbA-F</i>	GTTCTGACGCGTTTGTGAGG	20
<i>psbA-R</i>	AGTTTACTTGCCCGAAGGGG	20
<i>atpA-F</i>	ACTGAAGGTAGCCGTGTTTCG	20
<i>atpA-R</i>	ACCTGTTTGACGGTCACCAA	20
<i>petD-F</i>	AACCTGCTTGGCCTAACGAT	20
<i>petD-R</i>	GATTGGACGACGGTATGGGT	20

值( $OD_{680}$ ),  $OD_{680}$  的变化表示细胞的生长。试验设置 3 个平行,每个平行测定 3 次。

色素测定:色素的测定参照高俊凤<sup>[32]</sup>的方法。

### 1.4 测序样品的制备

针对蓝光诱导培养,取正常培养处于对数期的藻细胞经过黑暗处理 24 h 后,重新悬浮于 TAP 培养基中,每组设置 3 个生物学重复。将野生株 CC5325 和突变株 *crstk11* 分别置于高蓝光(420–500 nm, 1 100 lx)条件下,分别取蓝光处理 4 d 及 8 d 的野生株 CC5325 细胞和突变株 *crstk11* 细胞作为测序样品,4  $^{\circ}\text{C}$ 、4 000 r/min 离心 10 min 收集藻细胞,液氮速冻后用干冰送至北京诺禾致源科技有限公司测序。

### 1.5 转录组数据处理及拼接

将测序获得的原始数据(raw reads)过滤掉有测序接头以及低质量 reads,再通过测序错误率和 GC 含量分布检查获得后续分析使用的高质量序列(clean reads)。利用 Trinity 软件(版本: v2.4.0; 参数设置: min\_kmer\_cov: 3, 其他参数为默认参数)进行组装。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。

### 1.6 功能注释及代谢途径分析

将转录本用 Corset 程序进行层次聚类,得到 FASTA 格式文件。为获得全面的基因功能信息,将组装得到的 unigene 分别注释到非冗余蛋白(non-redundant, NR)数据库、核酸序列(NT)数据库、蛋白家族(Pfam)数据库、原核生物和单细胞真核生物的蛋白质直系同源簇(KOG/COG)数据库、蛋白序列数据库(Swiss-Prot)、京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)及基因本(gene ontology, GO)数据库进行比对和分类,并统计注释到每个数据库上的 unigene 数目。

### 1.7 差异基因的表达分析

在转录组组装和注释之后,使用每千个碱基的转录每百万映射读取的片段(expected number of fragments per kilobase of transcript sequence per millions base pairs sequenced, FPKM)值表示基因表达量的高低。利用 TBtools 软件[三驱科技(杭州)有限公司]对处理组 STK4(突变株,高光处理 4 d) vs. WT4(野生型,高光处理 4 d)以及 STK8(突变株,高光处理 8 d) vs. WT8(野生型,高光处理 8 d)样品进行差异基因表达分析。

### 1.8 莱茵衣藻 *crstk11* 突变株与光合作用相关基因的表达量分析

本研究选取莱茵衣藻 *crstk11* 突变株系光合系统中基因 *psbA*、*psaA*、*atpA* 和 *petD* 作为目的基因,引物序列如表 1 所示,分析衣藻 *crstk11* 突变株中 *psbA*、*psaA*、*atpA* 和 *petD* 等基因在白光和蓝光胁迫下的相对表达量。每个处理设置 3 个生物学平行组和 3 个技术重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 莱茵衣藻 *crstk11* 突变体鉴定

*CrSTK11* 基因在编码序列(coding sequence, CDS)编码区有一个盒反向插入(图 1A)。为了验证该插入,DNA 水平上用 3 对引物(F+R、F+C1 和 C2+R)进行 PCR,结果显示以 WT 基因组 DNA 为模板,只有 F+R 产生 PCR 产物(在 300–400 bp 之间);以突变株 *crstk11* 基因组 DNA 为模板,F+R 无 PCR 产物,而 F+C1 和 C2+R 各有一个 PCR 产物(在 300–1 000 bp 之间)(图 1B)。RNA 水平上使用引物 *Actin-F/R* 和 *stk11-F/R*,以 CC5325 和 *crstk11* 的 cDNA 为模板,引物 *Actin-F/R* 各有一个 PCR 产物(在 300–400 bp 之间),引物 *stk11-F/R* 野生株 CC5325 有一个 PCR 产物(在 300–400 bp 之间),突变株 *crstk11* 未产生 PCR 产物(图 1C)。试验表明该盒以反义方向插入到 *crstk11* 的 CDS 编码区中。

进一步对野生株 CC5325 和突变株 *crstk11* 进行固液体平板的筛选,弱光培养 1 周左右,发现 CC5325 在含巴龙霉素的平板上不能正常生长,而 *crstk11* 在含巴龙霉素的平板上变绿(图 1D),之后在含有巴龙霉素的 TAP 液体培养基中进行重复筛选(图 1E),验证正确后用于后续试验。

### 2.2 蓝光对莱茵衣藻 CC5325 和 *crstk11* 生长及色素的影响

为了检测高蓝光胁迫对突变株 *crstk11* 细胞生长的影响(图 2A),用  $OD_{680}$  的值绘制生长曲线。如图 2B、2C 所示,莱茵衣藻 CC5325 和 *crstk11* 在第 2–6 天处于指数生长期,第 6 天细胞密度达到峰值,随后缓慢降低。在正常生长条件下,突变株比野生株生长速率稍慢,颜色上也没有明显差异,均可正常生长(图 2B)。在高蓝光胁迫条件下,*crstk11* 突变株生长速率明

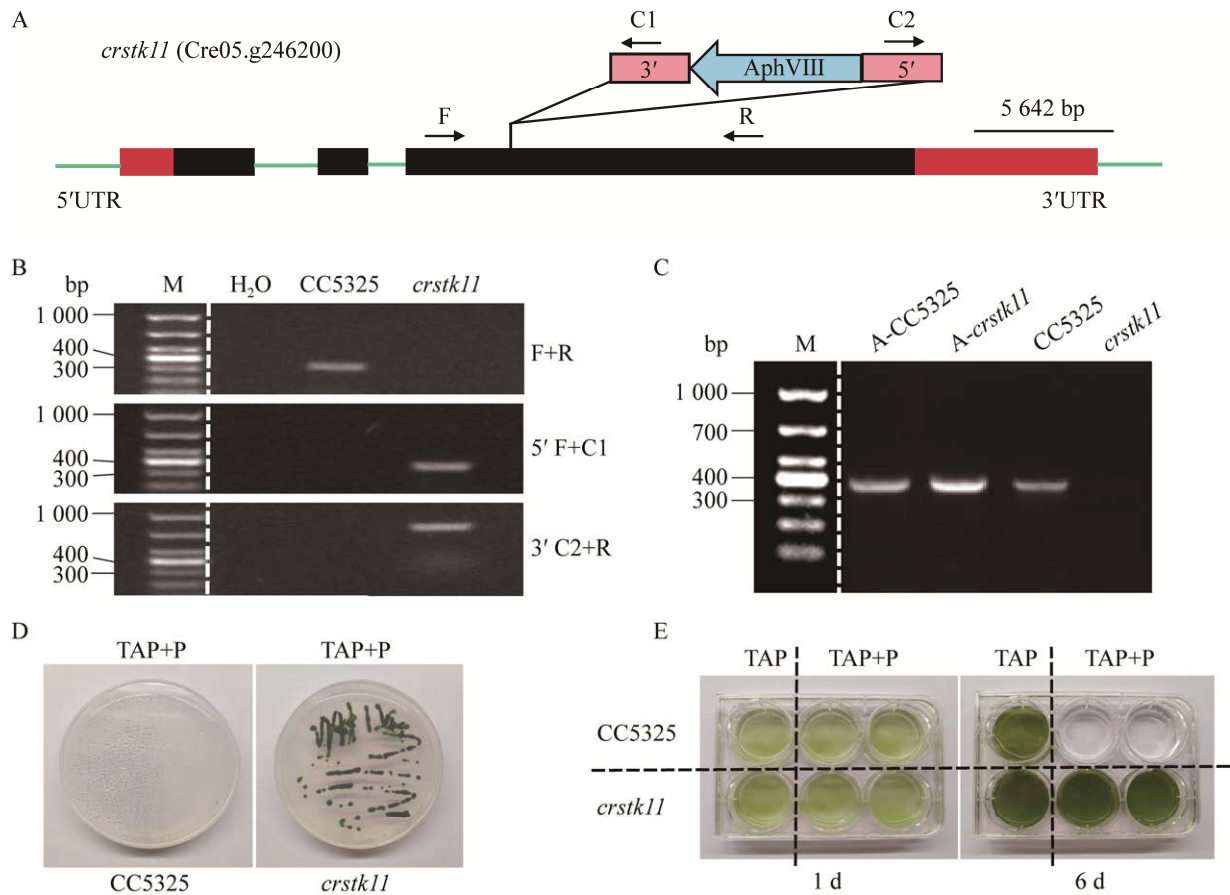


图 1 莱茵衣藻 *crstk11* 突变体鉴定

Figure 1 Schematic representation of the *crstk11* mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. A: Schematic map of the inserted cassette. B: PCR confirmation of insertion site in gene DNA sequence. C: PCR validation of the RNA levels at insertion sites. D: Plate screening of mutant strains. E: Liquid screening of mutant strains. P: Paromomycin.

显降低(图 2C)。进一步测定色素含量显示, 光照处理 4 d, 白光下 CC5325 和 *crstk11* 叶绿素 a、叶绿素 b 及类胡萝卜素含量差异不明显; 在蓝光下与 CC5325 相比较, *crstk11* 叶绿素 a 降低 14.2%, 叶绿素 b 降低 20.6%, 相反其类胡萝卜素升高 8.8% (图 2D–2F)。光照处理 8 d, 可以看出 CC5325 和 *crstk11* 中的色素含量明显提高, 但是在白光下 CC5325 和 *crstk11* 叶绿素 a、叶绿素 b 及类胡萝卜素含量差异不显著; 在蓝光下与 CC5325 相比较, *crstk11* 叶绿素 a 降低 32.9%, 叶绿素 b 降低 39.3%, 相反其类胡萝卜

素升高 53.5% (图 2D–2F)。以上结果表明, 与白光相比, 蓝光能显著提高衣藻色素含量, 但是高蓝光不利于突变株 *crstk11* 的生长以及色素的积累。由此推测突变株由于 CDS 区有表达盒的插入, 使其对蓝光胁迫比较敏感, 进而影响色素的合成。

### 2.3 莱茵衣藻 *crstk11* 转录组拼接、功能注释及蛋白编码序列预测

转录组测序获得 raw reads 后, 去除接头和低质量序列, 利用 Trinity 软件(版本: v2.4.0; 参数设置: min\_kmer\_cov: 3, 其他参数为默认

参数), 将 clean reads 进行从头(*de novo*)组装成转录本, 共获得 61 893 个转录本(transcripts)和 27 840 个非重复序列基因(unigenes), 其中长度大于 2 000 bp 的分别达到 23 617 个和 8 536 个(表 2, 图 3)。从组装结果来看, 转录本和 unigene 的 N50 值均大于平均值, 表明转录组的组装效果较好。

基于 7 个数据库的比对, 共 25 082 个非重

复序列基因在 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 90.09%。其中在 NR、NT、GO 及 Pfam 数据库的注释率较高, 分别达到 77.83% (21 668 条)、71.99% (20 044 条)、52.12% (14 234 条)及 52.12% (14 234 条)。共有 2 271 条非重复序列基因在所有数据库同时注释, 注释率达到 8.15% (表 3)。

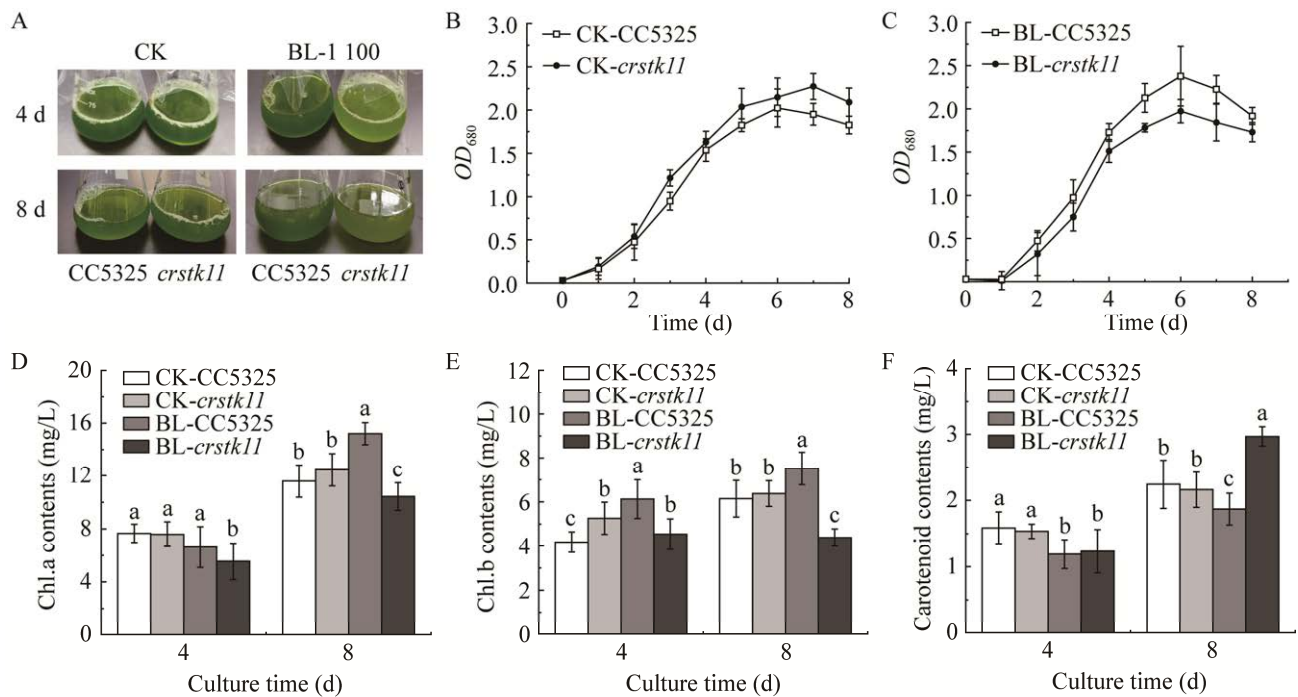


图 2 蓝光对莱茵衣藻 CC5325 和 *crstk11* 生长及色素的影响

Figure 2 Effects of blue light on growth and pigment of wild-type *Chlamydomonas reinhardtii* CC5325 and *crstk11* mutant strain. A: Difference of blue light reaction between *Chlamydomonas* wild strains and mutant in different culture periods. B: Growth changes of *Chlamydomonas* wild strains and mutant under white light. C: Growth changes of *Chlamydomonas* wild strains and mutant under blue light. D: Changes of chlorophyll a in wild strains and mutant under different culture conditions. E: Changes of chlorophyll b in wild strains and mutant under different culture conditions. F: Changes of carotenoid a in wild strains and mutant under different culture conditions. Different lowercase letters indicate a statistical difference at  $P < 0.05$  level.

表 2 莱茵衣藻转录组转录本和非重复序列基因的序列大小

Table 2 Sequence size (bp) and number of transcript and unigene in *Chlamydomonas reinhardtii*

Transcript length interval	300–500 bp	500–1 000 bp	1 000–2 000 bp	>2 000 bp	Total
Number of transcripts	11 711	12 369	14 196	23 617	61 893
Number of unigenes	7 271	6 249	5 784	8 536	27 840

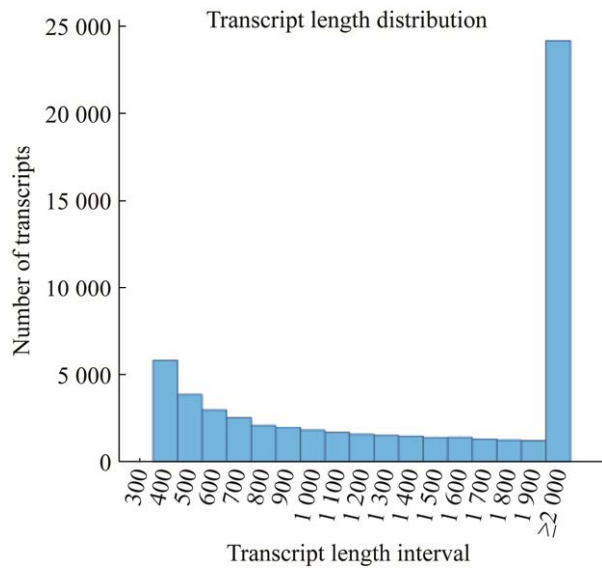


图3 Unigene 序列长度分布

Figure 3 Sequence length distribution of unigenes.

表3 莱茵衣藻转录组非重复序列基因的功能注释统计结果

Table 3 Statistics of annotation results of unigene functional annotation in *Chlamydomonas reinhardtii*

Database	Number of unigenes	Percentage (%)
Annotated in NR	21 668	77.83
Annotated in NT	20 044	71.99
Annotated in KO	4 528	16.26
Annotated in SwissProt	7 668	27.54
Annotated in Pfam	14 234	51.12
Annotated in GO	14 234	51.12
Annotated in KOG	4 156	14.92
Annotated in all databases	2 271	8.15
Annotated in at least one database	25 082	90.09

## 2.4 莱茵衣藻 *crstk11* 转录组基因差异表达分析

基因差异表达分析数据表明, 蓝光处理第4天(STK4 vs. WT4), 以莱茵衣藻 WT 为对照材料, 突变株 *crstk11* 有 860 个基因的表达量发生了显著变化(上调 559, 下调 301)。随着蓝光照射处理时间的增加, 上调和下调基因的数量均显著增加, 有 1 088 个基因的表达量发生了显著变化(上调 468, 下调 620) (图 4A)。根据韦恩

图可知, 蓝光处理不同时间, STK vs. WT 共有的差异表达基因为 184 个(图 4B)。

## 2.5 莱茵衣藻 *crstk11* 转录组差异表达基因的 GO 注释分析

为了研究差异表达基因的功能, 对高蓝光下莱茵衣藻差异表达基因进行 GO 富集。结果显示, 高蓝光条件下 *crstk11* 与 CC5325 相比, 有 501 个差异表达基因(differential expression genes, DEGs)注释到 GO 数据库的生物过程(biological processes, BP)、细胞组分(cell components, CC)和分子功能(molecular function, MF) 3 大类型,

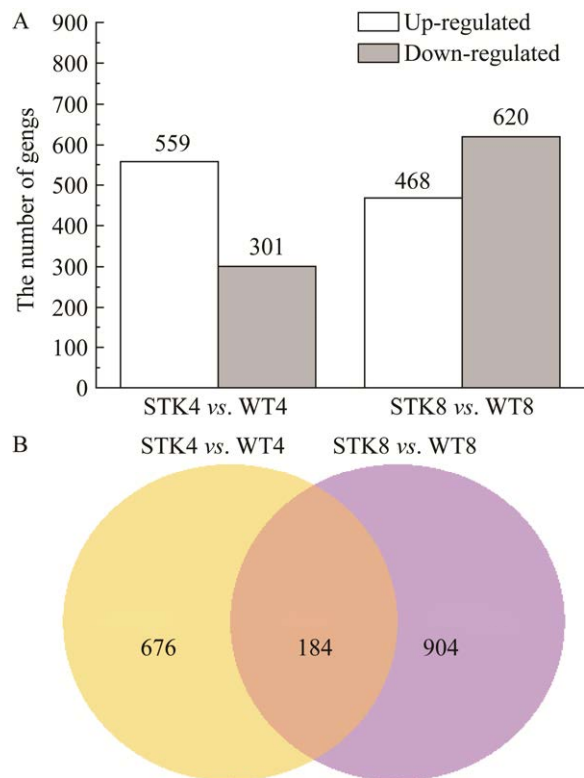


图4 高蓝光诱导下莱茵衣藻 *crstk11* 差异基因表达分析

Figure 4 Differential gene expression analysis of *Chlamydomonas reinhardtii crstk11* grown under high intensity blue light. A: Analysis of expression levels of up-regulated genes and down-regulated genes in STK vs. WT in different culture periods. B: Common differentially expressed genes in STK vs. WT in different culture periods.



其中上调基因 289 个, 下调基因 212 个。显著性富集通路有 42 条, 其中生物过程(BP) 25 条、细胞组分(CC) 5 条及分子功能(MF) 12 条。主要涉及具体通路如图 5 所示。蓝光处理 4 d, *crstk11* 与对照 WT 相比其显著性富集通路有 8 条, 其中生物过程(BP) 3 条、细胞组分(CC) 2 条及分子功能(MF) 3 条(图 5A); 蓝光处理 8 d, *crstk11* 与对照相比其显著性富集通路有 4 条, 其中生物过程(BP) 1 条、细胞组分(CC) 1 条及分子功能(MF) 2 条(图 5B)。

GO 富集分析发现分子功能 BP 富集较多的 GO 条目有细胞过程、代谢过程、生物调节、生物过程的调节; 细胞组分 CC 得富集最多的 GO

条目包括细胞结构、细胞内物质、复杂的蛋白成分; 分子功能 MF 富集最多的 GO 条目有结合物、催化还原活性、转运活性、转录调节活性和结构分子活性。有趣的是, 蓝光诱导的第 4 天与第 8 天相比, 共有的显著富集通路涉及核糖体生物起源、核糖体、结构分子活性和核糖体的结构组成。

## 2.6 莱茵衣藻 *crstk11* 转录组差异表达基因的 KEGG 富集分析

为了准确分析莱茵衣藻野生株 CC5325 和突变株 *crstk11* 响应蓝光胁迫代谢通路的变化, 对差异表达基因进行 KEGG 通路分析, 结果表明, 蓝光处理第 4 天共有 146 个差异基因得到

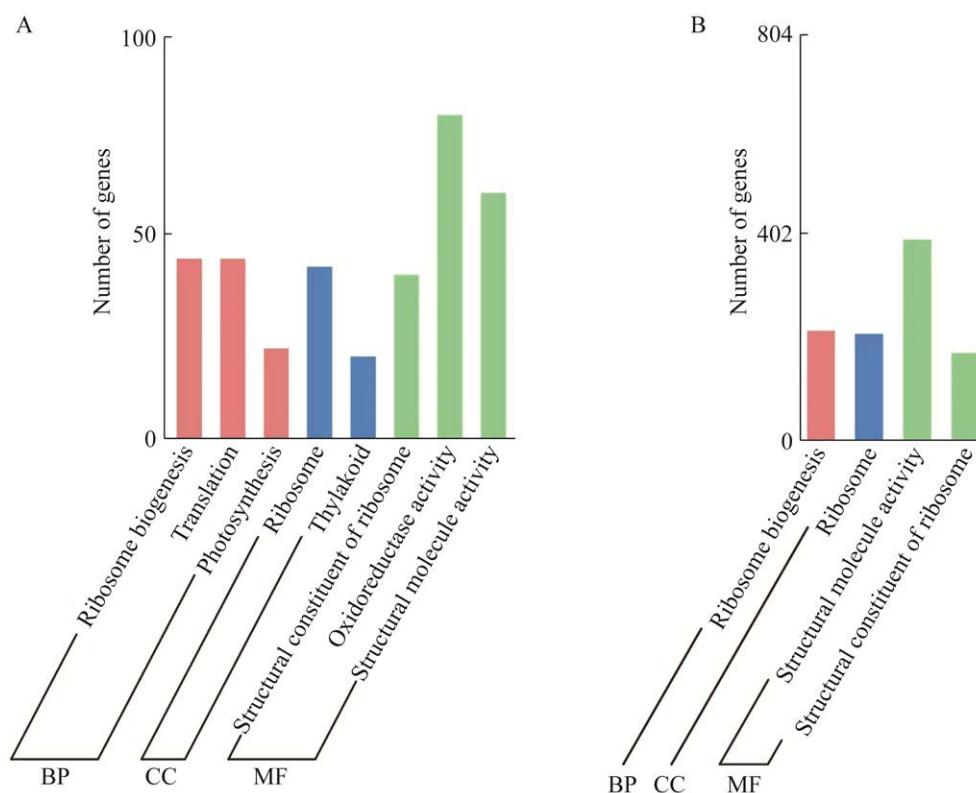


图 5 高蓝光诱导下莱茵衣藻 *crstk11* 差异表达基因的 GO 注释

Figure 5 GO annotation of differentially expressed gene in *Chlamydomonas reinhardtii crstk11* strain induced by high intensity blue light. A: GO enrichment analysis of differentially expressed genes in STK4 vs. WT4. B: GO enrichment analysis of differentially expressed genes in STK8 vs. WT8. BP: Biological processes; CC: Cell components; MF: Molecular function.

注释, 显著富集到 199 条代谢通路。其中上调基因显著富集的 3 条通路, 包括光合作用相关基因 21 个、核糖体相关基因 20 个、RNA 聚合酶相关基因 5 个; 下调差异表达基因显著富集到 4 条通路, 碳代谢相关基因 18 个、三羧酸循环相关基因 18 个、谷胱甘肽代谢相关基因 6 个、抗原处理和呈递相关基因 4 个和 2-氧代羧酸代谢相关基因 6 个(图 6A、6B)。

蓝光处理第 8 天, 共有 141 个差异基因得到注释, 显著富集到 146 条代谢通路。其中, 上调差异表达基因显著富集到 5 条通路, 富集因子最高的为光合作用、碳代谢、氧化磷酸化和光合作用生物的固碳作用和卟啉与叶绿素代谢, 富集差异基因数量最显著的是光合作用, 代谢通路涉及的相关基因为 20 个, 其次为碳代谢, 相关基因有 10 个; 下调差异表达基因显著富集到 3 条通路, 为抗原处理和呈递、军团杆菌病和长寿调节途径—多物种, 对应相关基因又分别有 5 个、6 个和 7 个(图 6C、6D)。

在高蓝光处理 4 d 或 8 d, 上调表达基因的 KEGG 富集通路均有光合作用, 且蓝光处理时间从 4 d 延长到 8 d 时, 碳代谢通路由下调转变为上调, 暗示高蓝光诱导莱茵衣藻突变株 *crstk11* 抗强光胁迫与这些基因的表达密不可分。

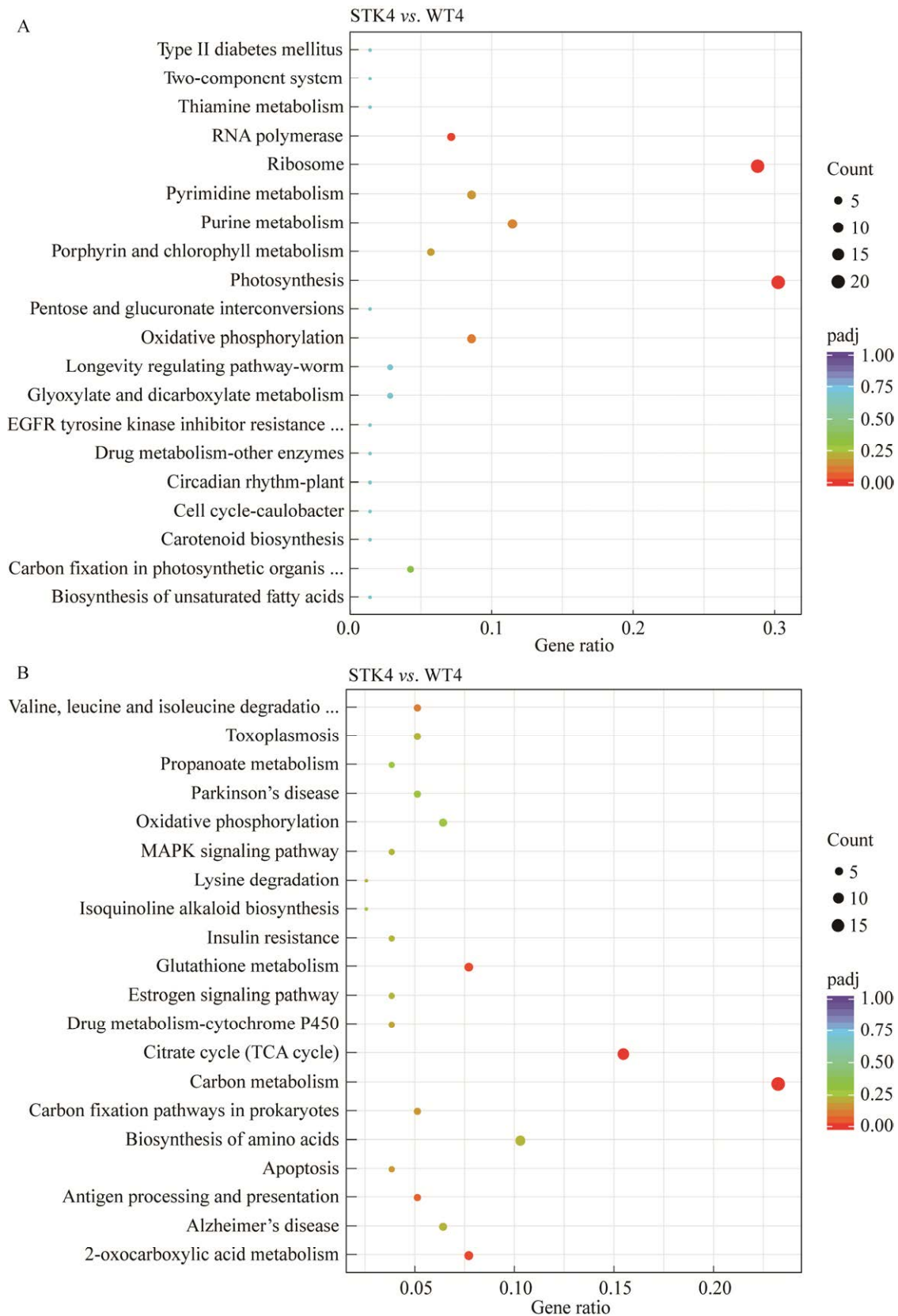
## 2.7 光合作用、碳代谢和色素合成途径基因的表达模式分析

通过聚类热图, 对代谢途径中差异基因进行可视化分析, 比较光合作用、碳代谢和色素合成通路中各基因在对照组和实验组之间的显著差异。结果如图 7 所示, 光合代谢通路中, 野生株 WT 和突变株 *crstk11* 在高蓝光处理 4 d 和 8 d 过程中共有 21 个差异表达基因(DEGs)得到富集,

蓝光处理第 4 天有 19 个 DEGs 与光合代谢途径相关, 处理第 8 天有 18 个 DEGs 富集到光合代谢途径。对通路中差异表达基因进行分析, 发现蓝光处理下突变株 *crstk11* 中 PSI 蛋白复合物编码基因 *psaA*、*psaB*、*psaC* 以及 PSII 蛋白复合物编码基因 *psbA*、*psbB*、*psbC*、*psbD*、*psbH* 和 *psbL* 表达上调; 编码细胞色素 b6/f 复合物亚基的基因 *petA*、*petB* 和 *petD* 表达上调, 而编码 *petF* 和 *petJ* 蛋白的基因表达下调; 编码 ATP 合成酶  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $c$  亚基的 3 个基因表达也上调(图 7A)。ADH5 碳代谢通路中共鉴定到 30 个参与该通路的基因, 其中 *RBCS* 与在各样本中均呈现出高表达(图 7B)。色素合成代谢通路中发现 *ALAD* 和 *CPOX* 在野生株 WT 的表达均高于突变株 *STK*, *LCYB* 和 *LCYE* 的表达在突变株 *STK* 中略高于野生株 WT (图 7C)。

## 2.8 不同光照条件下 *crstk11* 突变株中与光合作用相关基因的表达模式

为探究蓝光对衣藻 *crstk11* 突变株光合作用分子机制的影响, 利用 qRT-PCR 技术对光合系统 I (photosystem I) 中基因 *psbA*、光合系统 II (photosystem II) 中基因 *psaA*、ATP 合酶(F-type ATPase)中基因 *atpA* 以及细胞色素 b/f 复合物(cytochrome b/f6 complex)中基因 *petD* 等差异基因进行进一步分析, 结果如图 8 所示。白光条件下, 衣藻野生型(CC5325)和突变株系(*crstk11*)的 *psbA*、*psaA*、*atpA* 以及 *petD* 基因间的差异不显著(图 8A–8D); 蓝光条件下, 与 CC5325 相比, *crstk11* 中的基因 *psbA*、*psaA*、*atpA* 和 *petD* 表达均上调( $P < 0.05$ ), 分别提升 21.64%、32.16%、23.05%和 19.55% (图 8A–8D)。该结果表明 *CrSTK11* 基因的缺失会导致莱茵衣藻对强光胁迫的响应出现缺陷, 说明 *CrSTK11* 基因在强光胁迫中可能起正调控的作用。



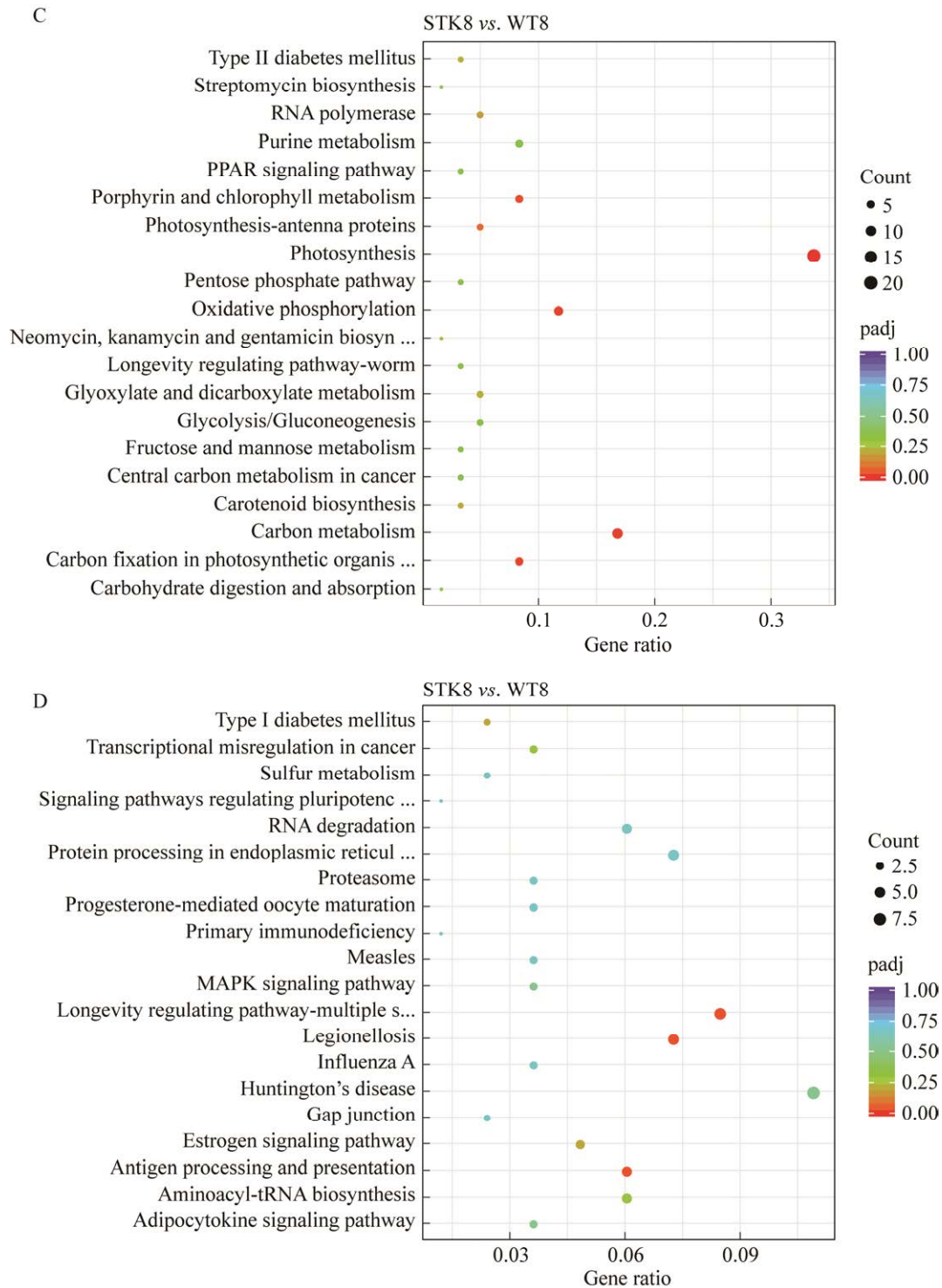


图 6 高蓝光诱导下莱茵衣藻 *crstk11* 差异表达基因的 KEGG 富集通路

Figure 6 KEGG enrichment pathway of differentially expressed gene in *Chlamydomonas reinhardtii* *crstk11* strain induced by high intensity blue light. A and C, B and D were the metabolic pathways enriched by up-regulated and down-regulated differentially expressed genes, respectively. The position, size and color of the dots represent metabolic pathway, gene number and padj value, respectively.

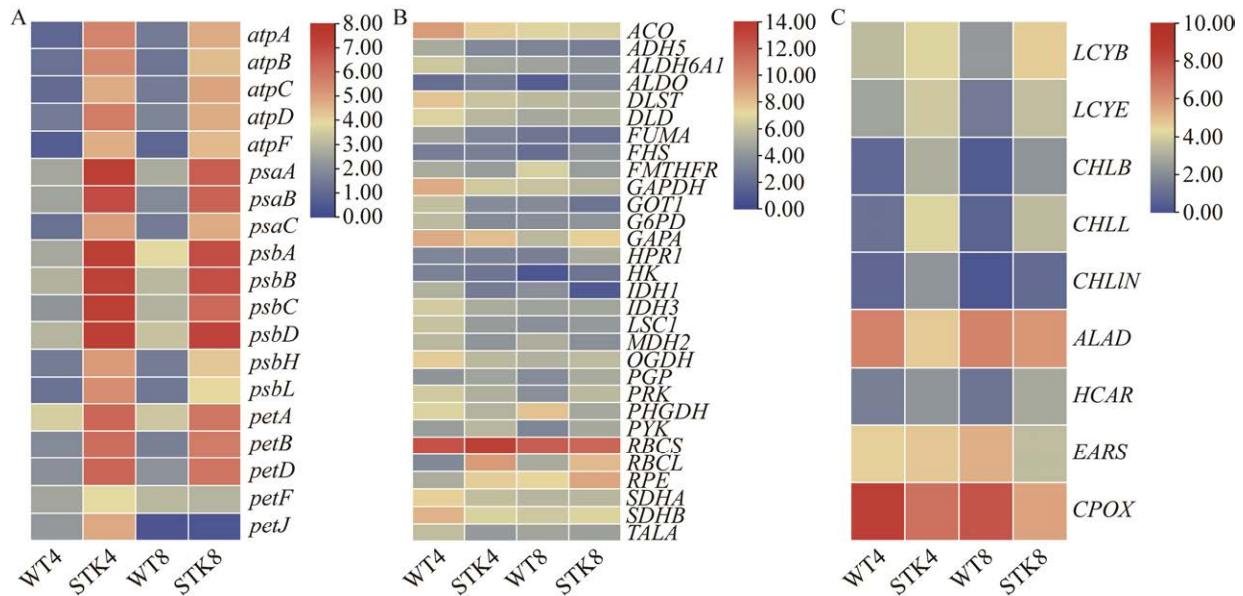


图 7 莱茵衣藻 *crstk11* 与光合作用、碳代谢和色素代谢通路中相关基因的热图谱

Figure 7 Heat map showing expression patterns of genes related to photosynthesis, carbon metabolism and pigment metabolism pathway in *Chlamydomonas reinhardtii crstk11*. The color depth in the red and blue rectangles indicates high and low expression levels. The color bars at the bottom of each heat map show the corresponding proportion of  $\log_2$ -fold change in the gene expression. A: Analysis of differentially expressed genes of photosynthetic metabolic pathway in STK vs. WT at different culture stages. B: Analysis of differentially expressed genes of carbon metabolic pathway in STK vs. WT at different culture stages. C: Analysis of differentially expressed genes of pigment metabolic pathway in STK vs. WT at different culture stages.

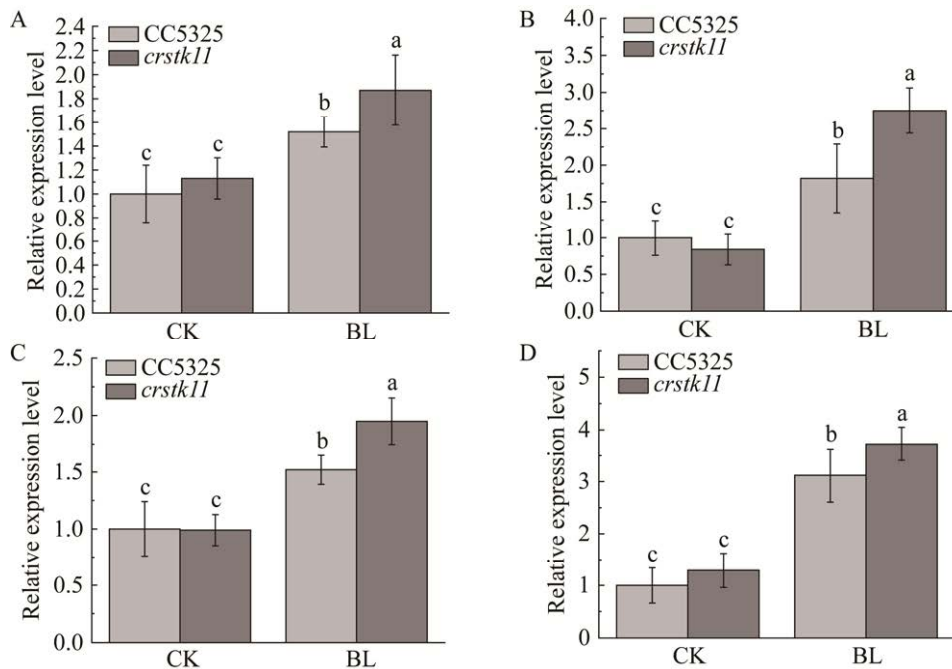


图 8 蓝光对莱茵衣藻 *crstk11* 中光合相关基因表达的影响

Figure 8 Effect of blue light on the expression of photosynthetic-related genes in *Chlamydomonas reinhardtii crstk11*. A: *psbA*. B: *psaA*. C: *atpA*. D: *petD*. Different lowercase letters indicate a statistical difference at  $P < 0.05$  level.

### 3 讨论与结论

植物在长期的进化过程中逐渐形成了对外部刺激快速感知和主动适应的能力,体内逆境信号的传递在植物快速感知外部刺激和主动适应非生物胁迫过程中起着非常重要的作用。蛋白激酶通过感知外界胁迫信号,启动相应的生理生化反应来减缓逆境胁迫对植物的伤害<sup>[33]</sup>。微藻在受到逆境胁迫后,会启动细胞内的响应机制,通过调控细胞内的代谢途径和信号转导途径,调节基因的表达水平来适应逆境。

本文通过对衣藻激酶突变株 *crstk11* 进行普通 PCR 检测证明该激酶的基因已被完全突变。在正常生长条件(白光)下,野生株 CC5325 与突变株 *crstk11* 生长没有明显差异,然而,在高蓝光胁迫 1 d 后,突变株生长速率缓慢,最终在胁迫 8 d 后快速变黄。这说明 STK11 激酶参与蓝光胁迫条件下莱茵衣藻生长的调控。与该结论相似的是,刘志香<sup>[18]</sup>研究发现正常光下野生株集胞藻(PCC6803)与突变株 *spkE* 生长差异不大,但 *spkE* 在氮缺乏胁迫条件下 1 d 后生长速率相当缓慢,最终 6 d 后快速死亡。进一步测定藻细胞光合色素结果显示,正常光下 CC5325 与 *crstk11* 叶绿素 a、叶绿素 b 以及类胡萝卜素之间差异不大,蓝光下二者差异显著,*crstk11* 中类胡萝卜素含量明显增高,该结论与赵佳琳<sup>[34]</sup>在集胞藻 PCC6803 中的研究类似,即高温胁迫下突变株 *AspkC* 的生长速率明显慢于野生株,叶绿素、类胡萝卜素等光合色素的含量也与野生株存在明显差异。

近年来, RNA-Seq 已广泛应用于植物、动物以及人的各种生理,病理条件下 RNA 的测序和分析<sup>[35-37]</sup>。在植物或藻类筛查出大量胁迫导致的差异表达基因,对这些差异基因进行功能注释和代谢通路分析,可探究植物或藻类响应

逆境胁迫的分子机理<sup>[38-41]</sup>。本研究首次探讨衣藻丝/苏氨酸蛋白激酶突变株 *crstk11* 基因表达与蓝光胁迫之间的关系。以蓝光处理 4 d 和 8 d 的衣藻 *crstk11* 为材料筛选差异表达基因,蓝光处理 4 d,差异表达的基因主要富集在光合作用、核糖体、碳代谢、TCA 循环、谷胱甘肽代谢和 RNA 聚合酶等基础代谢过程;蓝光处理 8 d,主要富集光合作用、碳代谢、氧化磷酸化、光合作用生物的固碳作用和卟啉与叶绿素代谢等过程。与第 4 天相比,蓝光胁迫 8 d 后,下调基因数均高于上调基因数,表明这些基因在该藻株光合作用、生长发育及新陈代谢等过程起关键作用的光胁迫响应基因,其总体调控方式是负向的。而与其他非生物胁迫下(如高盐胁迫、高温胁迫、强酸以及强碱等)的响应基因调控方式不同(一般为正向调控)<sup>[42-43]</sup>。KEGG 富集分析表明,蓝光处理显著诱导了与光合作用、碳代谢相关的基因的表达。蓝光处理后,发现突变株 *crstk11* 细胞中基因总体表达为上调模式,其中处理 4 d 的样品中基因 *psaA*、*psaB*、*psdA*、*psdB*、*psdC* 和 *psdD* 的表达明显上调,处理 8 d 的样品中基因 *psdA*、*psdB* 和 *psdD* 的表达明显上调,这些基因在光合作用电子传递和 ATP 合成中发挥重要作用。本研究结果表明,蓝光能显著激活衣藻 *crstk11* 细胞中 PSI 和 PSII,加快光合电子传递,最终导致光合作用和碳代谢的增强。与之相似,Beauvais-Flück 等<sup>[44]</sup>报道,在  $10^{-6}$  mol/L 铜环境下暴露 2 h 后,莱茵衣藻和伊乐藻(*Elodea nuttallii*)中差异表达的基因主要参与能量代谢、离子转运、细胞过程、应激、抗氧化代谢和发育等。杜氏盐藻通过提高光合作用、碳固定、蛋白质合成等基因的表达增强其耐盐性<sup>[41]</sup>。

进一步对莱茵衣藻野生型及激酶突变株系中的差异表达基因 *psbA*、*psaA*、*atpA* 和 *petD*

等在蓝光胁迫条件下的表达模式进行了分析。研究表明,白光条件下,野生型及激酶突变株系基因表达差异不显著;蓝光胁迫下,与野生型相比,突变株中基因表达上调,说明 *stk11* 基因的缺失使衣藻突变株 *crstk11* 对强光胁迫敏感。该结论与 Pandey 等<sup>[45]</sup>的研究一致,即 CIPK21 功能缺失突变体 *cipk21* 对高盐和渗透压力条件极为敏感。

光照胁迫是植物界中一类重要的非生物胁迫,对植物的光合作用、生长发育、呼吸作用具有重要的调节作用<sup>[46]</sup>。本研究鉴定获得莱茵衣藻丝/苏氨酸蛋白激酶 *crstk11* 突变株,揭示了其色素代谢表型,并基于 *crstk11* 突变株对蓝光响应的转录组测序结果,分析了藻细胞在高蓝光胁迫下的差异表达基因及其代谢通路和丝/苏氨酸蛋白激酶 STK11 可能介导的蓝光胁迫应答过程。研究结果为藻类植物光胁迫应答关键基因的挖掘与功能验证及光合调控分子机制的研究奠定了基础。

## REFERENCES

- [1] OSAKABE Y, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K, TRAN LS P. Sensing the environment: key roles of membrane-localized kinases in plant perception and response to abiotica stress[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(2): 445-458.
- [2] KEMAL, KAZAN. Diverse roles of jasmonates and ethylene in abiotic stress tolerance[J]. *Trends in Plant Science*, 2015, 20(4): 219-229.
- [3] 裴丽丽, 郭玉华, 徐兆师, 李连城, 陈明, 马有志. 植物逆境胁迫相关蛋白激酶的研究进展[J]. *西北植物学报*, 2012, 32(5): 1051-1061.  
PEI LL, GUO YH, XU ZS, LI LC, CHEN M, MA YZ. Research progress on stress-related protein kinase in plants[J]. *Acta Botanica Boreai Occidentalia Sinica*, 2012, 32(5): 1052-1061 (in Chinese).
- [4] 赵琳琳, 徐启江, 姜勇, 李玉花. 生物和非生物胁迫下的植物细胞中丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号转导[J]. *植物生理学通讯*, 2008(1): 169-174.  
ZHAO LL, XU QJ, JIANG Y, LI YH. The mitogen-activated protein kinase signal transduction in plant cell under biotic and abiotic stress conditions[J]. *Plant Physiology Communications*, 2008(1): 169-174 (in Chinese).
- [5] OSAKABE Y, MIZUNO S, TANAKA H, MARUYAMA K, OSAKABE K, TODAKA D, FUJITA Y, KOBAYASHI M, SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Overproduction of the membrane-bound receptor-like protein kinase 1, RPK1, enhances abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(12): 9190-9201.
- [6] PAN JW, ZHANG MY, KONG XP, XING X, LIU YK, ZHOU Y, LIU Y, SUN LP, LI DQ. ZMMPK17, a novel maize group D MAP kinase gene, is involved in multiple stress responses[J]. *Planta*, 2012, 235(4): 661-676.
- [7] WALKER JC, ZHANG R. Relationship of a putative receptor protein kinase from maize to the S-locus glycoproteins of *Brassica*[J]. *Nature*, 1990, 345(6277): 743-746.
- [8] LIN X, FENG XH, WATSON JC. Differential accumulation of transcripts encoding protein kinase homologs in greening pea seedlings[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88(16): 6951-6955.
- [9] ANDERBERG RJ, WALKER-SIMMONS MK. Isolation of a wheat cDNA clone for an abscisic acid-inducible transcript with homology to protein kinases[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(21): 10183-10187.
- [10] PAY A, JONAK C, BOQRE L, MESKIENE I, MAIRINGER T, SZALAY A, HEBERLE-BORS E, HIRT H. The MsK family of alfalfa protein kinase genes encodes homologues of shagav/alvcogen synthase kinase-3 and shows differential expression patterns in plant organs and deveopment[J]. *Plant Journal*, 1993, 3(6): 847-856.
- [11] MARTIN GB, BROMMONSCHENKEL SH, CHUNWONGSE J, FRARY A, GANAL MW, SPIVEY R, WU T, EARLE ED, TANKSLEY SD. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato[J]. *Science*, 1993, 262(5138): 1432-1436.
- [12] ITO Y, BANNO H, MORIBE T, HINATA K, MACHIDA Y. NPK15, a tobacco protein-serine/threonine kinase with a single hydrophobic region near

- the amino-terminus[J]. *Molecular and General Genetics* MGG, 1994, 245(1): 1-10.
- [13] ZHANG CB, ZHAO HK, LIU YZ, LI QY, LIU XD, TAN H, YUAN CP, DONG YS. Isolation and characterization of a novel glycogen synthase kinase-3 gene, *GmGSK*, in *Glycine max* L. that enhances abiotic stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology Letters*, 2010, 32(6): 861-866.
- [14] 董海涛, 吴玉良. 差异显示法克隆水稻抗白叶枯病相关蛋白激酶基因[J]. *浙江农业大学学报*, 1998, 24(5): 548-552.
- DONG HT, WU YL. Molecular cloning of differentially expressed gene with kinase motif induced by *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*[J]. *Journal of Zhejiang Agricultural University*, 1998, 24(5): 548-552 (in Chinese).
- [15] 潘教文. 玉米 D 族促分裂原活化蛋白激酶 MAPK 基因 *ZmMPK17* 的分离与功能分析[D]. 山东: 山东农业大学博士学位论文, 2014.
- PAN JW. Isolation and functional analysis of a group D MAPK gene *ZmMPK17* in *Zea mays*[D]. Shandong: Doctoral dissertation of Shandong Agricultural University, 2014 (in Chinese).
- [16] RUDRABHATLA P, RAJASEKHARAN R. Mutational analysis of stress-responsive peanut dual specificity protein kinase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(19): 17328-17335.
- [17] LEE SK, KIM BG, KWON TR, JEONG MJ, PARK SR, LEE JW, BYUN MO, KWON HB, MATTHEWS BF, HONG CB, PARK SC. Overexpression of the mitogen-activated protein kinase gene *OsMAPK33* enhances sensitivity to salt stress in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Journal of Biosciences*, 2011, 36(1): 139-151.
- [18] 刘志香. 集胞藻 PCC6803 二元信号转导系统与 STK 系统对特定胁迫条件的协同作用机制研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2014.
- LIU ZX. The interaction mechanism study between two-component signal transduction systems and serine/threonine kinase systems in *Synechocystis* sp. PCC6803 under specific stress conditions[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2014 (in Chinese).
- [19] 鲍华燕. 两种蓝藻真核型 Ser/Thr 激酶基因功能的初步验证[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所)硕士学位论文, 2009.
- BAO HY. Preliminary validation of functions of two eukaryotic Ser/Thr kinase genes in *Cyanobacteria*[D]. Qingdao: Master's Thesis of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2009 (in Chinese).
- [20] SNYDERS S, KOHORN BD. Disruption of thylakoid-associated kinase 1 leads to alteration of light harvesting in *Arabidopsis*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(34): 32169-32176.
- [21] ROCHAIX JD. Role of thylakoid protein kinases in photosynthetic acclimation[J]. *FEBS Letters*, 2007, 581(15): 2768-2775.
- [22] ROCHAIX JD, LEMEILLE S, SHAPIGUZOV A, SAMOL I, FUCILE G, WILLIG A, GOLDSCHMIDT-CLERMONT M. Protein kinases and phosphatases involved in the acclimation of the photosynthetic apparatus to a changing light environment[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 2012, 367(1608): 3466-3474.
- [23] ROCHAIX JD. Redox regulation of thylakoid protein kinases and photosynthetic gene expression[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2013, 18(16): 2184-2201.
- [24] MALNOË A, WANG F, GIRARD-BASCOU J, WOLLMAN FA, VITRY CD. Thylakoid FtsH7 protease contributes to photosystem II and cytochrome *b6f* remodeling in *Chlamydomonas reinhardtii* under stress conditions[J]. *The Plant Cell*, 2014, 26(1): 373-390.
- [25] WANG F, QI Y, MALNOË A, CHOQUET Y, WOLLMAN FA, VITRY CD. The high light response and redox control of thylakoid FtsH protease in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Molecular Plant*, 2017, 10(1): 99-114.
- [26] SANYAL SK, SHARMA K, BISHT D, SHARMA S, SUSHMITA K, KATERIYA S, PANDEY GK. Role of calcium sensor protein module CBL-CIPK in abiotic stress and light signaling responses in green algae[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 237: 124163.
- [27] CHEUNG P, DAVID ALLIS C, SASSONE-CORSI P. Signaling to chromatin through histone modifications[J]. *Cell*, 2000, 103(2): 263-271.
- [28] SOKOL A, KWIATKOWSKA A, JERZMANOWSKI A, PRYMAKOWSKA-BOSAK M. Upregulation of stress-inducible genes in tobacco and *Arabidopsis* cells in response to abiotic stresses and ABA treatment correlates with dynamic changes in histone H3 and H4 modifications[J]. *Planta*, 2007, 227(1): 245-254.
- [29] ZHU JK. Abiotic stress signaling and responses in plants[J]. *Cell*, 2016, 167(2): 313-324.
- [30] LI XB, ZHANG R, PATENA W, GASG SS, BLUM SR,



- IVANOVA N, YUE R, ROBERTSON JM, LEFEBVRE PA, FITZ-GIBBON ST, GROSSMAN AR, JONIKAS MC. An indexed, mapped mutant library enables reverse genetics studies of biological processes in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Plant Cell*, 2016, 28(2): 367-387.
- [31] ZHANG R, PATENA W, ARMBRUSTER U, GANG SS, BLUM SR, JONIKAS MC. High-throughput genotyping of green algal mutants reveals random distribution of mutagenic insertion sites and endonucleolytic cleavage of transforming DNA[J]. *Plant Cell*, 2014, 26(4): 1398-1409.
- [32] 高俊凤. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- GAO JF. *Plant Physiology Experiment Instruction*[M]. Beijing: Higher Education Press, 2006 (in Chinese).
- [33] LIU P, XU ZS, PP L, HU D, CHEN M, LI LC, MA YZ. A wheat *PI4K* gene whose product possesses threonine autophosphorylation activity confers tolerance to drought and salt in *Arabidopsis*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(10): 2915-2927.
- [34] 赵佳琳. 集胞藻 PCC 6803 丝氨酸/苏氨酸激酶 SpkC 对高温胁迫的响应[D]. 烟台: 中国科学院大学(中国科学院烟台海岸带研究所)硕士学位论文, 2018.
- ZHAO JL. The response of serine/threonine protein kinase SpkC against high temperature stress in *Synechocystis* sp. PCC6803[D]. Yangtai: Master's Thesis of Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, 2018 (in Chinese).
- [35] PETRE B, LORRAIN C, STUKENBROCK EH, DUPLESSIS S. Hostspecialized transcriptome of plant-associated organisms[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2020, 56: 81-88.
- [36] DELROISSE J, DUCHATELEL L, FLAMMANG P, MALLEFET. *De novo* transcriptome analyses provide insights into opsin-based photoreception in the lanternshark *Etmopterus spinax*[J]. *PLoS One*, 2018, 13(12): e0209767.
- [37] SHOVLIN S, TROPEA D. Transcriptome level analysis in Rett syndrome using human samples from different tissues[J]. *Orphanet Journal of Rare Disease*, 2018, 13(1): 1-15.
- [38] de VRIES J, de VRIES S, CURTIS BA, ZHOU H, PENNY S, FEUSSNER K, PINTO DM, STEINERT M, COHEN AM, von SCHWARTZENBERG K, ARCHIBALD JM. Heat stress response in the closest algal relatives of land plants reveals conserved stress signaling circuits[J]. *The Plant Journal*, 2020, 103(3): 1025-1048.
- [39] YANG FF, XIANG WZ, LI T, LONG LJ. Transcriptome analysis for phosphorus starvation-induced lipid accumulation in *Scenedesmus* sp.[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 16420.
- [40] 王敏. 碳酸盐逆境下微藻 *Nannochloris* sp. JB17 的生长、油脂积累及转录组动力学研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学博士学位论文, 2020.
- WANG M. Growth, oil accumulation and transcriptome dynamics of microalgae *Nannochloris* sp. JB17 under carbonate stress[D]. Harbin: Doctoral Dissertation of Northeast Forestry University, 2020 (in Chinese).
- [41] 尹伊. 浒苔氮胁迫下生理响应和 MAPK 信号通路的初步研究[D]. 苏州: 苏州大学硕士学位论文, 2020.
- YIN Y. Preliminary study on physiological response and MAPK signaling pathway of *Enteromorpha prolifera* under nitrogen stress[D]. Suzhou: Master's Thesis of Soochow University, 2020 (in Chinese).
- [42] HE QH, LIN YQ, TAN H, ZHOU Y, WEN YL, GAN JJ, LI RW, ZHANG QL. Transcriptomic profiles of *Dunaliella salina* in response to hypersaline stress[J]. *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 1-17.
- [43] LIANG MH, JIANG-JG, WANG L, ZHU J. Transcriptomic insights into the heat stress response of *Dunaliella bardawil*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2020, 132: 109436.
- [44] BEAUVAIS-FLÜCK R, SLAVEYKOVA VI, COSIO C. Comparative study of Cu uptake and early transcriptome responses in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* and the macrophyte *Elodea nuttallii*[J]. *Environmental Pollution*, 2019, 250: 331-337.
- [45] PANYAL GK, KANWAR P, SINGH A, STEINHORST L, PANDEY A, K YADAV AK, TOKAS I, SANYAL SK, KIM BG, LEE SC, CHEONG YH, KUDLA J, LUAN S. Calcineurin B-like protein-interacting protein kinase CIPK21 regulates osmotic and salt stress responses in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2015, 169(1): 780-792.
- [46] 何培磊, 叶自慧, 孙延军, 周厚高. ALA 对菊花抗氧化酶系统光照胁迫效应的缓解作用[J]. *江苏农业科学*, 2021, 49(1): 107-111.
- HE PL, YE ZH, SUN YJ, ZHOU HG. Alleviating effects of ALA on light stress of chrysanthemum antioxidant enzyme system[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2021, 49(1): 107-111 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)