海草组学研究进展

李玲兰^{1,2}, 江志坚^{1,2,3,4*}, 方扬^{1,2}, 何佳潞^{1,2}, 刘松林^{1,3,4}, 吴云超^{1,3,4}, 黄小平^{1,2,3,4}

1. 中国科学院南海海洋研究所, 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室, 广州 510301;

2. 中国科学院大学, 北京 100049;

3. 南方海洋科学与工程广东省实验室, 广州 511458;

4. 中国科学院南海生态环境工程创新研究院, 广州 510301

* 联系人, E-mail: jiangzj1982@scsio.ac.cn

2020-06-28 收稿, 2020-09-02 修回, 2020-09-02 接受, 2020-09-03 网络版发表

国家重点研发计划(2017YFC0506104)、国家自然科学基金(41976144, 41730529)和广东省自然科学基金(2019A1515010552, 2020A1515010907)资助

摘要 近年来, 组学技术在海草(seagrass, 地球上唯一一类可以完全生活在海水中的高等被子植物)研究中的应用得到了飞速发展, 并取得了重要进展. 目前已对鳗草(*Zostera marina*)和牟氏鳗草(*Zostera muelleri*)进行了全基因组测序, 并利用组学技术对鳗草、牟氏鳗草及大洋波喜藻草(*Posidonia oceanica*)等的遗传发育和抗胁迫反应等方面进行了研究. 本文综述了组学技术在海草研究中的应用, 例如利用基因组学研究海草的遗传多样性及DNA甲基化抗胁迫机制、利用转录组学和蛋白质组学研究海草如何通过基因和蛋白质表达调控来应对胁迫, 以及利用代谢组学研究环境胁迫下海草代谢物及其代谢途径的变化. 在此基础上, 对未来海草组学领域需开展的工作进行了展望: (1) 发展和应用低成本、快速测定海草基因组的技术, 加强对海草物种遗传多样性、适应进化、分类鉴定及DNA表观修饰等的研究; (2) 构建更多高质量的海草转录组数据库, 同时加强非编码RNA的生物学功能、海草有性生殖分子机制和组织间转录组差异的研究; (3) 发展和应用优质的蛋白质提取方法及最新的蛋白质组学技术, 同时加强海草亚细胞蛋白质组学的研究; (4) 将靶向及非靶向代谢组学结合起来, 加强研究海草初生代谢物与次生代谢物成分的鉴定和相互作用过程、代谢物在海草生长发育过程中的调节机制, 以及次生代谢物在防御中的作用机理等; (5) 利用多组学技术, 加强研究海草的生活史、不同胁迫因子的联合作用、海草与动物的相互作用和协同进化机理, 深入揭示海草遗传进化及抗胁迫分子机制.

关键词 海草, 基因组学, 转录组学, 蛋白质组学, 代谢组学, 组学

海草(seagrass)是地球上唯一一类可以完全生活在海水中的高等被子植物^[1]. 海草床(seagrass bed)是地球上分布最广泛的沿海生态系统之一^[2], 具有重要的生态系统服务功能. 例如, 海草床为海洋动物(如绿海龟、儒艮等)提供重要的食物来源和栖息地^[3,4]; 同时, 海草床是生物圈中碳储存的关键场所^[5]. 然而, 海草床生态系统正面临着多重威胁, 包括富营养化、沉积物覆盖、物种入侵、人为渔业活动、病原菌侵害、全球升温、

海洋酸化、台风等, 海草床面积急剧衰退^[6,7]. 海草床退化机制和保护研究已成为国际上公认的一个研究热点. 为了更好地了解海草如何适应和响应各种环境压力, 获取其早期指示指标, 越来越多的学者利用组学(Omics)技术, 包括基因组学、转录组学、蛋白质组学、代谢组学等探究海草对环境的适应机制和响应过程^[8,9](图1). 特别是鳗草(*Zostera marina*)和牟氏鳗草(*Zostera muelleri*)全基因组测序的完成, 大大地促进了

引用格式: 李玲兰, 江志坚, 方扬, 等. 海草组学研究进展. 科学通报, 2020, 65: 4063–4072

Li L L, Jiang Z J, Fang Y, et al. Advances in seagrass' omics research (in Chinese). Chin Sci Bull, 2020, 65: 4063–4072, doi: [10.1360/TB-2020-0788](https://doi.org/10.1360/TB-2020-0788)

图1 (网络版彩色)海草组学研究示意图

Figure 1 (Color online) Schematic diagram of seagrass' omics research

组学技术在海草研究中的应用和发展。组学技术的应用揭示了海洋唯一被子植物海草与陆生植物的基因组差异，并解释了海草如何在分子层面应对全球变化和人类活动的干扰^[10]，但我国海草组学的研究相对国外尚处于初级阶段，亟待深入开展和进一步发展。目前与海草组学相关的研究多依赖于数据库的搜索与比对，亟需更多的高质量数据来不断完善海草组学数据库。因此，本文综述了国内外关于海草基因组学、转录组学、蛋白质组学、代谢组学的研究进展，并对今后的研究方向提出展望，可为我国在这方面的研究提供相关基础。

1 海草基因组学

海草基因组由海草的编码DNA、非编码DNA、线粒体DNA和叶绿体DNA组成。大洋波喜荡草(*Posidonia oceanica*)和鳎草首次公布的(4C)基因组大小为11.16和1.26 pg^[11,12]。Koce等人^[13]测定了4种海草的基因组大小，发现诺氏鳎草(*Zostera noltii*)(2n=12)、鳎草(2n=12)、小丝粉草(*Cymodocea nodosa*)(2n=28)和大洋波喜荡草的2C值分别为1.5、1.1、1.2和6.2 pg。经对比，先前公布的鳎草及大洋波喜荡草的2C值均低于Koce等人^[13]对其基因组大小的估计，这可能是由于单宁酸引起的

化学计量误差，而不是物种内基因组大小的真实生物学差异。

自拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的基因组测序完成以来，基因组测序技术成为研究植物基因组最有力的工具之一^[14]。Oetjen等人^[15]使用未命名微卫星、源自表达序列标签(express sequence tags, EST)文库的基因相关微卫星和单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)三类微卫星标记(simple sequence repeats, SSR)，对Wadden海域不同生境的鳎草(潮间带和潮下带种群)进行基因组扫描，发现46个遗传标记中的6个存在选择差异，表明栖息地特异性选择对基因组产生影响。Barghini等人^[16]报告了大洋波喜荡草基因组的重复元件，发现其基因组的很大一部分由Copia和Gypsy超家族的长末端重复(long terminal repeat, LTR)逆转座子组成。2016年，*Nature*首次发布了鳎草的基因组，并与淡水近缘植物大浮萍(*Spirodela polyrrhiza*)的进行对比，发现鳎草失去了所有和气孔相关的基因，而且与防御相关的基因如NBS_LRR(nucleotide binding site-leucine rich repeat)抗性基因，以及参与萜类化合物和乙烯信号合成的基因也缺失了；同时，由于鳎草生活在UV-B、红色和远红波长穿透率较低的海底环境中，也失去了紫外线保护基因和远红外线传感的光敏色素基

因。此外, 鳗草重新编码细胞壁成分, 维持渗透平衡以适应盐度环境和进行气体交换^[2,17]。同年, 牟氏鳗草全基因组测序工作完成, 同样发现其为适应海洋环境, 也丢失或修改了与激素生物合成、信号转导以及细胞壁分解代谢等相关的基因^[18,19]。研究发现, 完整的鳗草叶绿体基因组序列长度为143877 bp, 其总GC含量为35.5%; 这个环状基因组包括78个蛋白质编码基因、30个tRNA和8个rRNA, 系统发育分析显示, 鳗草与淡水植物伊乐藻(*Elodea canadensis*)和穿叶眼子菜(*Potamogeton perfoliatus*)之间的关系最密切^[20]。海菖蒲(*Enhalus acoroides*)叶绿体基因组全长176211 bp, 具有一大一小单拷贝区和一对反向重复序列构成的典型四分体结构, 其GC含量为38.4%, 在该基因组中共发现95个蛋白编码基因、39个tRNA基因和8个rRNA基因^[21]。

DNA甲基化是真核生物中最常见也是最重要的表观遗传修饰^[22], 基因组学的应用可以揭示海草如何通过甲基化和碱基组成的变化等抗环境胁迫。利用Cs₂SO₄梯度超速离心和分子杂交研究发现, 经过1 μmol/L汞处理15 d, 大洋波喜荡草中A-T含量丰富的DNA序列损失约为48%, 但其位置不会改变^[23]。利用甲基化敏感扩增多态性技术(methylation-sensitive amplified polymorphism, MSAP)研究光限制下大洋波喜荡草基因组, 发现其细胞间期基因组超甲基化, 包括光感知和收获等相关基因, 如*PoPHYB*(photoreceptor/signal transducer protein *P. oceanica* phytochrome B gene)和*LHCB5*(light harvesting complex of photosystem II 5 gene), 表明这两个基因可能通过甲基化的表观遗传修饰在大洋波喜荡草抗弱光胁迫中起重要作用^[24]。研究发现, 不同叶龄的大洋波喜荡草叶片应对高温胁迫的反应有所差异, 幼叶通过下调光合作用电子传递、碳同化和叶绿素生物合成的相关基因, 以及过度表达线粒体交替呼吸和细胞程序性死亡抑制等的基因来应对高温胁迫, 而成熟叶片则通过提高甲基化水平来缓冲功能基因下调, 表明成熟叶片在高温胁迫下的可塑性更高^[25]。

海草遗传多样性的研究可以揭示海草对海洋环境的适应进化机制, 也能为进一步分析其进化潜力和未来变化趋势进行生态保护提供依据^[26]。通过对比研究不同深度的大洋波喜荡草的遗传分化, 发现浅水区海草具有较高的遗传和基因型多样性, 在光胁迫下能更快做出反应^[27]。利用原位遮荫实验研究不同基因型澳洲波喜荡草(*Posidonia australis*)对弱光的生理和生长响应, 发现基因型多样性较低的海草更容易受到弱光

的影响, 仅在3周后生长速率就显著下降, 表明遗传多样性较高的海草可能包含高性能基因型来提高海草的抗胁迫能力^[28]。利用微卫星基因座(microsatellite loci)对不同地理位置的日本鳗草(*Zostera japonica*)、大洋波喜荡草及海菖蒲进行基因型分析, 结果都表明地理位置差异和潮汐运动对基因流造成影响, 进而影响海草的遗传多样性^[29-32]。而且, 遗传多样性研究有助于确定优先保护的海草种群, 例如, 基于等位基因的独特性与丰富度, 对海南东部海域8个海菖蒲种群进行遗传贡献分析发现, 黎安种群的贡献率最高, 其次为港东和铁炉港, 这3个种群应优先保护^[30]。

目前已利用基因组学技术仅对鳗草和牟氏鳗草进行了全基因组测序, 并对部分海草的基因组大小、基因组结构、基因甲基化修饰和遗传多样性等进行了研究, 其他海草亟须进行全基因组测序。同时, 关于海草遗传多样性和DNA表观修饰等方面的研究, 目前仅涉及大洋波喜荡草等部分海草, 其他海草物种也亟待开展深入研究。

2 海草转录组学

目前的海草转录组研究主要依赖于转录组测序(RNA-seq)、表达序列标签(EST)及DNA微阵列(DNA microarray)等技术。已有部分数据库(Dr. Zompo、SeagrassDB)提供了少数几种海草的转录组资源。其中, 第一个交互式海草序列数据库Dr. Zompo, 从不同深度(5和25 m)的大洋波喜荡草及5种不同海域的鳗草样品中获得总共14597种EST, 基于Ruby on Rails框架构成。它具有丰富的功能, 包括检索实验确定的热响应转录本、挖掘分子标记(SSR和SNP)以及加权关键词搜索, 从而可以访问在多个级别收集的注释, 包括Pfam、GeneOntology和KEGG等数据库, 还连接了拟南芥信息资源(the *Arabidopsis* Information Resource, TAIR)和水稻基因组注释计划等植物基因站点^[33]。不过, Dr. Zompo数据库覆盖的物种有限, 仅提供了北半球物种鳗草和大洋波喜荡草的转录组资源。SeagrassDB基于8种海草: 鳗草、大洋波喜荡草、齿叶丝粉草(*Cymodocea serrulata*)、单脉二药草(*Halodule uninervis*)、卵叶喜盐草(*Halophila ovalis*)、红纤维虾形草(*Phyllospadix iwatensis*)、针叶草(*Syringodium isoetifolium*)、牟氏鳗草和浮萍(*Lemna minor*), 构成了一个涵盖海草和水生植物的大规模系统发育谱转录库。该数据库共包含1052262个UniGenes, 可以使用基于BLAST的方法进行基因比对

和序列检索,以进行功能基因挖掘、系统基因组学研究以及进行水生和陆地植物物种的转录组比较^[34]。

与基因组不同,转录组可以提供特定环境胁迫下的基因表达信息、推断未知基因的功能及揭示特定调节基因的作用机制。海草如何通过基因表达调控来应对光胁迫是转录组学的研究热点之一。Bruno等人^[35]选择参与叶绿素-生育酚生物合成途径的*PoCHL P*(*Posidonia Oceanica* chlorophyll-tocopherols)基因来标记大洋波喜荡草对光的响应,发现*PoCHL P*主要在成熟叶片中表达,其转录本主要在表皮层中积累,光照条件能在不同的叶片分化和代谢状态下调节其表达。通过对比研究不同深度的大洋波喜荡草对光的适应机制,发现光合作用、细胞能量代谢和蛋白质周转相关基因差异表达,与光合作用相关的mRNA表现出明显的日波动,而且深处的基因如光合作用基因和光保护基因的表达普遍延迟^[27,36]。另有研究发现,浅层的大洋波喜荡草相对受到强光的照射,光适应(RuBisCO、铁氧还蛋白、叶绿素结合蛋白)和光保护(抗氧化酶、叶黄素循环相关基因、生育酚生物合成)的基因上调,需要大量的能量再投资(例如蛋白质修复)来激活特定的防御机制,以避免光损伤和保持高光合性能,而深层的大洋波喜荡草可能不受光的限制,无应激反应^[37]。

同样,温度胁迫也是研究热点之一。在高温胁迫下,大洋波喜荡草的小热激蛋白(small heat shock protein, *sHSP*)显著上调,而*HSP70*(heat shock protein 70)和*HSP81*(heat shock protein 81)则显著下调;DNA修复和细胞凋亡抑制过程相关的基因*BI-1*(BAX inhibitor-1)、*DDB*(damage DNA binding protein)上调,而*DADI*(defender against cell death 1)下调,表明这些基因对高温胁迫的反应最为强烈^[38]。通过比较5个表达序列标签文库研究诺氏鳗草对高温胁迫的反应,发现高温条件下,热休克蛋白在30 min内过度表达,而光合作用相关的酶则受到抑制,细胞将能量转向防御策略^[39]。同样,鳗草EST文库中编码富含半胱氨酸的金属硫蛋白基因*mt3*(Metallothionein 3)的转录本最丰富,占比为2.5%~15%,且在温度胁迫下被下调约6倍,光捕获复合物、光系统I和II的反应中心亚基以及暗反应的组分之间在温度胁迫下也会发生复杂的光合调节;另外,还发现约1/3高温胁迫下差异表达的TUG(tentative unigene)与陆地植物拟南芥胁迫反应的特征一致^[40]。

此外,关于海草应对高盐度、重金属及CO₂胁迫等的基因表达调控机制也有相关报道。研究发现,鳗草通

过调节活性氧清除、应激蛋白、渗透调节物质合成、光合作用、蛋白激酶和金属硫蛋白等相关基因的表达来抗高盐度胁迫。如鳗草质膜H⁺-ATPase(*Z. marina* H⁺-ATPase)基因*ZHA1*在成熟叶片的表皮细胞中高水平特异性表达,表明其在海草的耐盐机制中起重要作用;通过与条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)、水稻(*Oryza sativa* L.)对比,发现了大量鳗草特有的基因和功能未知的新基因^[41~44]。高CO₂胁迫下,小丝粉草光合作用相关的转录本显著增加,且由于光合作用产物增多及生物合成和抗胁迫过程对能量的需求,与呼吸途径相关的转录本上调;此外,参与化学防御过程的碳基次生化合物生物合成相关的酶的转录本上调^[45]。通过分析重金属铜(Cu)、铅(Pb)和镉(Cd)胁迫下的日本鳗草转录组,发现离子结合相关基因*VOLCADRAFT_92044*(NR ID: XP_002951489.1)、氧化还原酶活性相关基因(NR ID: XP_010940090.1)和营养库活性相关基因(NR ID: AA-F21988.2AF116537_1)可作为这些重金属胁迫下日本鳗草的指示基因^[46]。Cu胁迫下牟氏鳗草叶片的全转录组分析显示,酶防御机制如过氧化物酶(peroxidase, POD)和谷胱甘肽S转换酶(glutathione S-transferase, GST),化学防御机制(CyP450和衰老调节剂)和糖酵解如磷酸果糖激酶(phosphofructokinase, PFK)和醛缩酶(aldehyde aldolase)相关基因的表达上调,而光合作用,如光系统I(photosystem I, PS I)和ATP合成酶(ATP synthase)、固碳(Rubisco大亚基)相关基因的表达下调,其叶绿体功能、调节性胁迫反应和防御机制受到干扰,而且具有Cu浓度依赖性^[47,48]。

研究显示,不同基因型的海草种群在应对同一环境胁迫时的应激及复原反应有所不同。通过对比研究欧洲南北部鳗草种群在热胁迫下的基因表达差异,发现两个种群在26°C的温度胁迫下基因表达模式相似,但高温胁迫后南部种群的基因表达模式相比于北部种群恢复更快,群体之间的总体基因表达的差异与系统地理学差异一致^[49~51]。不过,欧洲南部的诺氏鳗草对高温胁迫的响应较北部弱,同时诺氏鳗草诱导热休克蛋白的温度阈值高于鳗草^[51]。不同纬度的鳗草种群抗高温胁迫反应对比研究表明,抗氧化基因锰超氧化物歧化酶(manganese superoxide dismutase, SOD Mn)基因在两个种群中的差异表达显著,表明其在热应激反应中起核心作用,但高纬度群体中的基因表达更具多样性,除SOD Mn基因外,抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)和编码光系统II(photosystem II, PS II)

叶绿体前体蛋白相关基因的表达也具有显著差异^[52]。

从分子层面揭示海草有性生殖机制以及不同组织间转录组的差异有助于了解海草的生殖、生活史特征及其遗传基础,但目前这方面的研究报道还很少。通过对比研究大洋波喜荡草叶和雌雄花组织之间的差异基因表达,发现光合作用和代谢过程相关基因在叶中上调,而细胞壁组织、生长和外部包囊结构组织相关基因则在花中显著上调;另外,雌花组织中富集的基因与光合作用、蛋白质生色团连接和叶绿素生物合成过程有关,表明其对有性生殖的贡献^[53]。

转录组学技术揭示了海草在光、温度、高盐度、重金属及CO₂等胁迫下的基因表达调控机制。目前已建立了Dr Zompo和SeagrassDB两个全球可用的海草转录组数据库,但其覆盖的物种不够全面。同时,关于海草有性生殖分子机制及组织间转录组差异的研究领域,除大洋波喜荡草外,其他海草还未涉及。此外,海草转录组学大多局限于对编码RNA(mRNA)的研究,而非编码RNA的生物学功能还亟待深入研究。

3 海草蛋白质组学

海草蛋白质组是指海草基因组表达的全部蛋白质及其存在方式,海草蛋白质组学从海草机体或组织的蛋白质整体活动的角度来揭示和阐明生命活动的基本规律,主要从样品中分离蛋白质及鉴定被分离的蛋白质^[54,55]。一维凝胶电泳(one-dimensional gel electrophoresis, 1DE)、双向凝胶电泳(two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)、双向荧光差异凝胶电泳(two-dimensional fluorescence difference in gel electrophoresis, 2D-DIGE)及无标签定量(label-free quantification)是近年来海草蛋白质组研究的主要技术。海草是盐生植物,受组织体内的盐分、细胞壁、纤维素、多糖、酚类等的影响,海草的蛋白质提纯效果的好坏影响了海草蛋白质组学的应用与发展。Spadafora等人^[56]提出一种适用于大洋波喜荡草叶片的蛋白质提取方案,该方案使用20%三氯乙酸从组织粉末中沉淀出蛋白质,并在溶解于丙酮中时去除酚类、糖类和其他可溶性分子,获得了较高的蛋白质提取率和优质的2-DE蛋白质谱。在此基础上,Jiang等人^[55]应用了4种蛋白质提取方法对比牟氏鳗草和澳洲波喜荡草叶片蛋白的提取效果,发现改进后的BPP(硼砂/聚乙烯-聚吡咯烷酮/苯酚)方法(M-BPP)能在短时间内有效去除干扰物而无蛋白质损失,使两种海草叶片蛋白质点数量相比BPP方法各增

加了40%和15%,并获得了优质的2-DE谱;而且,还联合蛋白质免疫印迹法证实了海草中存在磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC)蛋白(光合固定CO₂的关键酶)。

蛋白质是基因功能的执行者,可为胁迫反应的本质提供直接基础。而且由于mRNA可变剪切和磷酸化等蛋白质翻译后修饰调控,蛋白质组比转录组和基因组更加复杂多样,其研究更具深度和广度。因此,从蛋白质层面解释海草如何应对环境胁迫,如低光或过饱和光环境、高盐度和重金属胁迫,为保护海草生态系统提供理论基础也至关重要。一维凝胶电泳、双向凝胶电泳及无标签定量等蛋白质组学技术研究均表明,大洋波喜荡草通过调节碳固定(如RuBisCo大亚基)、蛋白质周转(如高氯酸可溶性翻译抑制蛋白)、光合作用(如PSI和PSII亚基)和能量代谢(如ATP合成酶)相关的蛋白质以适应不同的光照条件^[27,36,57-59]。利用一维凝胶电泳结合质谱技术(mass spectrometry, MS),发现在盐胁迫下,小丝粉草下调线粒体和叶绿体ATP合成酶,从而通过抑制光合作用和降低呼吸活性来适应高盐度环境^[58]。利用双向凝胶电泳研究发现,过饱和光照条件下,牟氏鳗草的Calvin-Benson和Krebs循环、糖酵解、光呼吸甘氨酸裂解系统和抗氧化系统的蛋白质上调或出现,以维持牟氏鳗草的光合作用和生长;而在低光条件下,光合作用的关键代谢酶和碳水化合物、氨基酸的代谢下调,导致牟氏鳗草代谢活性和光合作用性能降低^[60]。利用NADH偶联酶测定法测定RuBisCo复合物和PEPC的活性,发现48 h低光照条件下牟氏鳗草中PEPC蛋白活性或RuBisCo含量没有显著变化^[54]。采用以蛋白质为中心的双向凝胶电泳和4种以肽为中心的蛋白质组学方法对牟氏鳗草进行研究,发现以肽为中心的SDB-RPS分馏法的蛋白质覆盖率最高;同时,发现RuBisCo、果糖二磷酸醛缩酶、磷酸果糖激酶、谷胱甘肽转移酶和过氧化物酶可以作为牟氏鳗草Cu胁迫的潜在生物标志物;此外,利用40/80% Percoll梯度法分离牟氏鳗草叶绿体并研究其蛋白质组,发现大部分蛋白与光合作用亚基(PS II和PS I)、ATP合成酶和叶绿素a/b结合蛋白相关^[48]。

目前海草蛋白质的提纯效果仍不够好,阻碍了海草蛋白质组学的发展。同时,海草蛋白质组学的研究多基于双向凝胶电泳等方法,最新的蛋白质组学技术如数据非依赖型采集模式(data-independent acquisition, DIA)、同位素标记相对和绝对定量(isobaric tags for re-

lative and absolute quantitation, iTRAQ)等,很少应用到海草蛋白质组的研究中。除叶绿体外,海草其他亚细胞蛋白质组也应纳入研究。

4 海草代谢组学

代谢组学在海草组学研究中尚处于起步阶段。一篇关于海洋大型植物包括海草的代谢组学的综述,介绍了色谱、质谱等分析采样和样品制备工具,计算机模拟数据分析工具和陆生植物、海藻等植物的代谢组数据库,同时指出在海洋大型植物中已鉴定出多种能防御天敌的次生代谢产物,例如酚类、固醇、类黄酮、脂肪酸和萜类化合物^[61]。

代谢组学放大了基因和蛋白质表达的细微变化,产物容易检测,而且不需要进行繁琐的测序和建库,能直观地反映海草抗胁迫代谢机制。例如,通过对比分析鳗草和诺氏鳗草热应激相关的适应性代谢过程及转录组,发现在热胁迫下,编码参与蔗糖和果糖分解的酶的基因表达被下调,编码参与肌醇合成的酶的基因则被上调,从而导致蔗糖、果糖及肌醇大量累积;卡尔文循环,糖酵解和戊糖磷酸途径参与了热适应机制,以减轻热应激的影响^[62]。基于GC-TOF-MS(gas chromatography/time of flight/mass spectrometry)非靶向代谢组学研究发现,鳗草可通过丙氨酸分流、 γ -氨基丁酸分流和2-氧戊二酸分流联动碳氮代谢的机制耐缺氧^[63]。利用色谱、同位素示踪等方法研究鳗草硫耐性代谢机制,发现鳗草主要通过氧化硫化物以及将硫化物结合到植物组织中来耐受硫^[64]。利用代谢组学研究光强和紫贻贝(*Mytilus edulis*)对鳗草的影响,发现在强光下,贻贝促进鳗草的氮代谢和能量代谢;相反,在弱光下,贻贝阻碍其氮代谢和能量代谢,增强对硫化物毒性的反应,导致氧化能量代谢受抑和组织降解^[65]。利用高效薄层色谱法(high performance thin-layer chromatography, HPTLC)探讨意大利油轮失事对大洋波喜荡草代谢物的影响,发现油轮的长期遮盖,降低光强,导致大洋波喜荡草叶片的聚合多酚降低,而茎中的脂肪醇和脂肪酸含量则增加^[66]。水产养殖废水胁迫下的小丝粉草代谢组研究表明,促进生长的代谢物(蔗糖、果糖、肌醇、二十七烷、二十四烷、豆甾醇、儿茶素和 α -生育酚)含量较低,与根茎产量呈正相关;而与应激反应有关的代谢物(丙氨酸、丝氨酸、脯氨酸、腐胺、鸟氨酸、3,4-二羟基苯甲酸和肉桂酸)含量较高,与根茎产量呈负相关^[67]。利用气相色谱-质谱(gas chromatogra-

phy-mass spectrometer, GC-MS)分析羽叶二药草(*Halodule pinifolia*)的代谢组,共发现包括类黄酮、糖、氨基酸和植物激素在内的35种化合物,具有药理活性的迷迭香酸(RA)是其主要次生代谢产物;从中分离得到的RA纯度为98%,分子量为360 Da,在干重提取物中的浓度为40 mg/g^[68]。

代谢组学直观地揭示了海草应对缺氧和温度等胁迫时的代谢调控机制,但目前海草代谢组学的研究大都是非靶向的,靶向代谢组学技术在海草中的应用尚处于起始阶段。同时,关于海草初生代谢物和次生代谢物在海草生长发育和防御中的生物学功能还亟待深入探究。

5 研究展望

结合目前国外学者研究的热点,并针对中国在海草组学研究的不足,对未来海草组学领域需开展的工作进行了展望。

(1) 加强海草全基因组测序技术和遗传进化研究。发展低成本、快速测定全基因组的技术将是今后海草基因组学研究的一个重要方向。同时,利用生态基因组学将海草个体、种群及群落、生态系统不同层次的生态学相互作用整合起来,确定其在生态学响应及相互作用中的关键基因和遗传途径,能更好地阐明海草适应进化机制和遗传机制^[69]。此外,海草基因组学还应加强遗传多样性、分类鉴定以及响应胁迫的表现修饰如DNA甲基化等方面的研究。

(2) 完善海草转录组数据库,加强非编码RNA的研究。参照其他模式植物,构建更多高质量的数据库。除大洋波喜荡草外,其他海草有性生殖分子机制及组织间转录组差异的研究也亟须开展。同时,具有基因剪接、RNA修饰、蛋白质运输、管家和调控等生物功能的非编码RNA(ncRNA)^[10],如miRNA、lncRNA和circRNA的生物学功能还亟待深入研究。

(3) 加强海草亚细胞蛋白质组学的发展和应用。海草蛋白质组学的发展依赖于高效的提取方法以及高通量的分析方法,因此还应开发更多优质的提取方法,并将最新的蛋白质组学技术应用到海草研究。而且,海草亚细胞蛋白质组学如叶绿体蛋白质组学也应大力发展和应用,全面认识海草叶绿体蛋白的组成、特点及其在叶绿体代谢网络中的作用,有助于揭示海草光合作用适应环境变化的调节机制。

(4) 加强海草生长发育和防御代谢机制的研究。靶

向代谢组学有利于了解不同环境条件下特定的代谢物或代谢通路变化, 还能对非靶向代谢组学所发现的差异代谢物进行验证, 因此海草靶向代谢组学也应大力发展。此外, 海草代谢组学应加强初生代谢物与次生代谢物成分的鉴定和相互作用机制、代谢物在海草开花结果等生长发育过程中的调节机制, 同时次生代谢物在防御中的作用机制等研究也应加强。

(5) 结合多组学技术探讨海草抗多胁迫联合作用的

分子机制。应加强不同胁迫因子对海草联合作用的研究。海草如何应对生物胁迫如动物啃食、与植食者之间的协同进化机制如改变彼此种群的分布和动态等还亟待研究。同时, 在利用组学技术对海草进行研究时最好综合利用多种组学技术, 将转录组学和基因组学等数据库与蛋白质序列、代谢数据以及环境信息相互关联, 同时结合离子组学、表型组学等组学方法, 深入揭示海草遗传进化、生长发育及抗胁迫分子机制。

致谢 感谢澳大利亚悉尼科技大学Manoj Kumar博士对英文摘要的润色以及提出的宝贵意见。

参考文献

- Huang X P, Jiang Z J, Zhang J P, et al. The Chinese nomenclature of the global seagrasses (in Chinese). *Acta Oceanol Sin*, 2018, 40: 127–133 [黄小平, 江志坚, 张景平, 等. 全球海草的中文命名. *海洋学报*, 2018, 40: 127–133]
- Olsen J L, Rouzé P, Verhelst B, et al. The genome of the seagrass *Zostera marina* reveals angiosperm adaptation to the sea. *Nature*, 2016, 530: 331–335
- Beck M W, Heck K L, Able K W, et al. The identification, conservation, and management of estuarine and marine nurseries for fish and invertebrates. *Bioscience*, 2001, 51: 633–641
- Jiang Z, Huang D, Fang Y, et al. Home for marine species: Seagrass leaves as vital spawning grounds and food source. *Front Mar Sci*, 2020, 7: 194
- Fourqurean J W, Duarte C M, Kennedy H, et al. Seagrass ecosystems as a globally significant carbon stock. *Nat Geosci*, 2012, 5: 505–509
- Orth R J, Carruthers T J B, Dennison W C, et al. A global crisis for seagrass ecosystems. *Bioscience*, 2006, 56: 987–996
- Huang X P, Huang L M, Li Y H, et al. Main seagrass beds and their habitat threats along the coast of South China (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2006, 51(Suppl): 114–119 [黄小平, 黄良民, 李颖虹, 等. 华南沿海主要海草床及其生境威胁. *科学通报*, 2006, 51(增刊): 114–119]
- Procaccini G, Beer S, Björk M, et al. Seagrass ecophysiology meets ecological genomics: Are we ready? *Mar Ecol*, 2012, 33: 522–527
- Davey P A, Pernice M, Sablok G, et al. The emergence of molecular profiling and omics techniques in seagrass biology; furthering our understanding of seagrasses. *Funct Integr Genomics*, 2016, 16: 465–480
- Chen S T, Qiu G L. A review of current status of molecular biology in seagrass biology (in Chinese). *Guangxi Sci*, 2017, 24: 448–452 [陈思婷, 邱广龙. 海草分子生物学研究进展. *广西科学*, 2017, 24: 448–452]
- Cavallini A, Natali L, Giordani T, et al. Cytophotometric and biochemical characterization of *Posidonia oceanica* L. (Potamogetonaceae) genome. *Caryologia*, 1995, 55: 47–53
- Hanson L, Brown R L, Boyd A, et al. First nuclear DNA C-values for 28 angiosperm genera. *Ann Bot*, 2003, 91: 31–38
- Koce J D, Vilhar B, Bohanec B, et al. Genome size of Adriatic seagrasses. *Aquat Bot*, 2003, 77: 17–25
- The Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 2000, 408: 796–815
- Oetjen K, Ferber S, Dankert I, et al. New evidence for habitat-specific selection in Wadden Sea *Zostera marina* populations revealed by genome scanning using SNP and microsatellite markers. *Mar Biol*, 2009, 157: 81–89
- Barghini E, Mascagni F, Natali L, et al. Analysis of the repetitive component and retrotransposon population in the genome of a marine angiosperm, *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *Mar Genom*, 2015, 24: 397–404
- Williams S L. From sea to sea. *Nature*, 2016, 530: 290–291
- Golicz A A, Schliep M, Lee H T, et al. Genome-wide survey of the seagrass *Zostera muelleri* suggests modification of the ethylene signalling network. *J Exp Bot*, 2015, 66: 1489–1498
- Lee H T, Golicz A A, Bayer P E, et al. The genome of a southern hemisphere seagrass species (*Zostera muelleri*). *Plant Physiol*, 2016, 172: 272–283
- Xing Q, Guo J. Characterization of the complete chloroplast genome of the seagrass *Zostera marina* using Illumina sequencing technology. *Conserv Genet Resour*, 2018, 10: 419–422
- Yu S, Cui M Y, Shi M M. The characteristics of the complete chloroplast genome of *Enhalus acoroides*. *Mitochondrial DNA Part B-Resour*, 2020, 5: 1374–1375
- Fang Y Y, Xiao L, Lu W J, et al. Research progress and prospect of DNA methylation in perennial (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2020, 50: 154–166 [房媛媛, 肖亮, 卢文杰, 等. DNA甲基化研究进展及其在木本植物中的发展趋势. *中国科学: 生命科学*, 2020, 50: 154–166]

- 23 Maestrini P, Giordani T, Polizzi E, et al. Mercury-induced DNA variations in the genome of *Posidonia oceanica* Delile. *Caryologia*, 2012, 55: 47–53
- 24 Greco M, Chiappetta A, Bruno L, et al. Effects of light deficiency on genome methylation in *Posidonia oceanica*. *Mar Ecol Prog Ser*, 2013, 473: 103–114
- 25 Ruocco M, De Luca P, Marín-Guirao L, et al. Differential leaf age-dependent thermal plasticity in the keystone seagrass *Posidonia oceanica*. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 1556
- 26 Procaccini G, Olsen J L, Reusch T B H. Contribution of genetics and genomics to seagrass biology and conservation. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2007, 350: 234–259
- 27 Procaccini G, Ruocco M, Marín-Guirao L, et al. Depth-specific fluctuations of gene expression and protein abundance modulate the photophysiology in the seagrass *Posidonia oceanica*. *Sci Rep*, 2017, 7: 42890
- 28 Evans S M, Vergés A, Poore A G B. Genotypic diversity and short-term response to shading stress in a threatened seagrass: Does low diversity mean low resilience? *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1417
- 29 Procaccini G, Mazzella L. Population genetic structure and gene flow in the seagrass *Posidonia oceanica* assessed using microsatellite analysis. *Mar Ecol Prog Ser*, 1998, 169: 133–141
- 30 Yu S, Liu S, Jiang K, et al. Population genetic structure of the threatened tropical seagrass *Enhalus acoroides* in Hainan Island, China. *Aquat Bot*, 2018, 150: 64–70
- 31 Jiang K, Tsang P K E, Xu N N, et al. High genetic diversity and strong differentiation in dramatically fluctuating populations of *Zostera japonica* (Zosteraceae): Implication for conservation. *J Plant Ecol*, 2018, 11: 789–797
- 32 Hodoki Y, Ohbayashi K, Tanaka N, et al. Evaluation of genetic diversity in *Zostera japonica* (Aschers. et Graebn.) for seagrass conservation in brackish lower reaches of the Hii river system, Japan. *Estuaries Coasts*, 2013, 36: 127–134
- 33 Wissler L, Dattolo E, Moore A D, et al. Dr. Zompo: An online data repository for *Zostera marina* and *Posidonia oceanica* ESTs. *Database*, 2009, 2009: bap009
- 34 Sablok G, Hayward R J, Davey P A, et al. SeagrassDB: An open-source transcriptomics landscape for phylogenetically profiled seagrasses and aquatic plants. *Sci Rep*, 2018, 8: 2749
- 35 Bruno A, Bruno L, Chiappetta A, et al. *PoCHL P* expression pattern in *Posidonia oceanica* is related to critical light conditions. *Mar Ecol Prog Ser*, 2010, 415: 61–71
- 36 Dattolo E, Gu J, Bayer P E, et al. Acclimation to different depths by the marine angiosperm *Posidonia oceanica*: Transcriptomic and proteomic profiles. *Front Plant Sci*, 2013, 4: 195
- 37 Dattolo E, Ruocco M, Brunet C, et al. Response of the seagrass *Posidonia oceanica* to different light environments: Insights from a combined molecular and photo-physiological study. *Mar Environ Res*, 2014, 101: 225–236
- 38 Traboni C, Mammola S D, Ruocco M, et al. Investigating cellular stress response to heat stress in the seagrass *Posidonia oceanica* in a global change scenario. *Mar Environ Res*, 2018, 141: 12–23
- 39 Massa S I, Pearson G A, Aires T, et al. Expressed sequence tags from heat-shocked seagrass *Zostera noltii* (Hornemann) from its southern distribution range. *Mar Genom*, 2011, 4: 181–188
- 40 Reusch T B H, Veron A S, Preuss C, et al. Comparative analysis of expressed sequence tag (EST) libraries in the seagrass *Zostera marina* subjected to temperature stress. *Mar Biotechnol*, 2008, 10: 297–309
- 41 Fukuhara T, Pak J Y, Ohwaki Y, et al. Tissue-specific expression of the gene for a putative plasma membrane H⁺-ATPase in a seagrass. *Plant Physiol*, 1996, 110: 35–42
- 42 Kong F, Zhou Y, Sun P, et al. Generation and analysis of expressed sequence tags from the salt-tolerant eelgrass species, *Zostera marina*. *Acta Oceanol Sin*, 2013, 32: 68–78
- 43 Lv X F, Yu P, Deng W H, et al. Transcriptomic analysis reveals the molecular adaptation to NaCl stress in *Zostera marina* L. *Plant Physiol Biochem*, 2018, 130: 61–68
- 44 Li H. *De novo* assembly and characterization of the transcriptome of marine higher plant *Zostera marina* L. using illumina paired-end sequencing (in Chinese). Master Dissertation. Qingdao: Ocean University of China, 2015 [李红. 海洋高等植物大叶藻(*Zostera marina* L.)响应环境胁迫的转录组特性分析. 硕士学位论文. 青岛: 中国海洋大学, 2015]
- 45 Ruocco M, Musacchia F, Olivé I, et al. Genomewide transcriptional reprogramming in the seagrass *Cymodocea nodosa* under experimental ocean acidification. *Mol Ecol*, 2017, 26: 4241–4259
- 46 Lin H, Sun T, Zhou Y, et al. Which genes in a typical intertidal seagrass (*Zostera japonica*) indicate copper-, lead-, and cadmium pollution? *Front Plant Sci*, 2018, 9: 1545
- 47 Shah Mohammadi N, Buapet P, Pernice M, et al. Transcriptome profiling analysis of the seagrass, *Zostera muelleri* under copper stress. *Mar Pollut Bull*, 2019, 149: 110556

- 48 Mohammadi N S. Molecular and physiological investigation of trace metal stress in seagrass, *Zostera muelleri*. Doctor Dissertation. Sydney: University of Technology Sydney, 2019
- 49 Jueterbock A, Franssen S U, Bergmann N, et al. Phylogeographic differentiation versus transcriptomic adaptation to warm temperatures in *Zostera marina*, a globally important seagrass. *Mol Ecol*, 2016, 25: 5396–5411
- 50 Franssen S U, Gu J, Bergmann N, et al. Transcriptomic resilience to global warming in the seagrass *Zostera marina*, a marine foundation species. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 19276–19281
- 51 Franssen S U, Gu J, Winters G, et al. Genome-wide transcriptomic responses of the seagrasses *Zostera marina* and *Nanozostera noltii* under a simulated heatwave confirm functional types. *Mar Genom*, 2014, 15: 65–73
- 52 Winters G, Nelle P, Fricke B, et al. Effects of a simulated heat wave on photophysiology and gene expression of high- and low-latitude populations of *Zostera marina*. *Mar Ecol Prog Ser*, 2011, 435: 83–95
- 53 Entrambasaguas L, Jahnke M, Biffali E, et al. Tissue-specific transcriptomic profiling provides new insights into the reproductive ecology and biology of the iconic seagrass species *Posidonia oceanica*. *Mar Genom*, 2017, 35: 51–61
- 54 Kim M, Pernice M, Watson-Lazowski A, et al. Effect of reduced irradiance on ^{13}C uptake, gene expression and protein activity of the seagrass *Zostera muelleri*. *Mar Environ Res*, 2019, 149: 80–89
- 55 Jiang Z, Kumar M, Padula M P, et al. Development of an efficient protein extraction method compatible with LC-MS/MS for proteome mapping in two Australian seagrasses *Zostera muelleri* and *Posidonia australis*. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1416
- 56 Spadafora A, Filadoro D, Mazzuca S, et al. 2-DE polypeptide mapping of *Posidonia oceanica* leaves, a molecular tool for marine environment studies. *Plant Biosyst*, 2008, 142: 213–218
- 57 Mazzuca S, Spadafora A, Filadoro D, et al. Seagrass light acclimation: 2-DE protein analysis in *Posidonia* leaves grown in chronic low light conditions. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2009, 374: 113–122
- 58 Piro A. Leaf proteomics of seagrasses under light conditions and salinity. Doctor Dissertation. Italy: Università della Calabria, 2013
- 59 Mazzuca S, Björk M, Beer S, et al. Establishing research strategies, methodologies and technologies to link genomics and proteomics to seagrass productivity, community metabolism, and ecosystem carbon fluxes. *Front Plant Sci*, 2013, 4: 38
- 60 Kumar M, Padula M P, Davey P, et al. Proteome analysis reveals extensive light stress-response reprogramming in the seagrass *Zostera muelleri* (Alismatales, Zosteraceae) metabolism. *Front Plant Sci*, 2017, 7: 2013
- 61 Kumar M, Kuzhiumparambil U, Pernice M, et al. Metabolomics: An emerging frontier of systems biology in marine macrophytes. *Algal Res*, 2016, 16: 76–92
- 62 Gu J, Weber K, Klemp E, et al. Identifying core features of adaptive metabolic mechanisms for chronic heat stress attenuation contributing to systems robustness. *Integr Biol*, 2012, 4: 480
- 63 Hasler-Sheetal H, Fragner L, Holmer M, et al. Diurnal effects of anoxia on the metabolome of the seagrass *Zostera marina*. *Metabolomics*, 2015, 11: 1–11
- 64 Hasler-Sheetal H, Holmer M. Sulfide intrusion and detoxification in the seagrass *Zostera marina*. *PLoS One*, 2015, 10: e0129136
- 65 Toniolo C, Di Sotto A, Di Giacomo S, et al. Seagrass *Posidonia oceanica* (L.) Delile as a marine biomarker: A metabolomic and toxicological analysis. *Ecosphere*, 2018, 9: e02054
- 66 Hasler-Sheetal H, Castorani M C N, Glud R N, et al. Metabolomics reveals cryptic interactive effects of species interactions and environmental stress on nitrogen and sulfur metabolism in seagrass. *Environ Sci Technol*, 2016, 50: 11602–11609
- 67 de Kock W, Hasler-Sheetal H, Holmer M, et al. Metabolomics and traditional indicators unveil stress of a seagrass (*Cymodocea nodosa*) meadow at intermediate distance from a fish farm. *Ecol Indic*, 2020, 109: 105765
- 68 Danaraj J, Saravanakumar A, Kumar S, et al. GC-MS based metabolomics analysis and characterization of rosmarinic acid from tropical seagrass *Halodule pinifolia*. *Pharm Res-Dordr*, 2019, 10: 23
- 69 Shi Y B, Li J M, Jin Z X. Advance in ecologiccal genomics (in Chinese). *Acta Ecol Sin*, 2012, 32: 5846–5858 [施永彬, 李钧敏, 金则新. 生态基因组学研究进展. *生态学报*, 2012, 32: 5846–5858]

Summary for “海草组学研究进展”

Advances in seagrass' omics research

Linglan Li^{1,2}, Zhijian Jiang^{1,2,3,4*}, Yang Fang^{1,2}, Jialu He^{1,2}, Songlin Liu^{1,3,4}, Yunchao Wu^{1,3,4} & Xiaoping Huang^{1,2,3,4}

¹ Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China;

² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

³ Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory, Guangzhou 511458, China;

⁴ Innovation Academy of South China Sea Ecology and Environmental Engineering, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China

* Corresponding author, E-mail: jiangzj1982@scsio.ac.cn

Seagrasses are submerged marine macrophytes, they form highly productive ecosystems that play a critical role in climate change mitigation. Seagrass meadows are known to stabilise coastal sediments, recycle nutrients, and provide nursery grounds and food sources for fishes and megafauna. However, nearly 30% of seagrass habitats have been lost worldwide because of global climate change and sustained negative pressure from coastal developments, as well as eutrophication and dredging. This global decline and ongoing threat from climate change have weakened their capacity to support coastal productivity. This alarming decline highlights a global urgency for the implementation of effective seagrass management strategies to prevent their decline.

Until now, the physiological indicators used to monitor seagrass health, including seagrass species composition, above ground biomass, and spatial coverage, have failed to provide any insights into the intensity of environmental stress at the physiological and/or molecular level, which has led to their decline. Therefore, seagrass restoration efforts require highly accurate and novel tools for monitoring seagrass health and effective management strategies. In the era of systems biology, omics (transcriptomics, proteomics, and metabolomics) and their integration have shown promise in the identification of biomarkers of phenotypic plasticity of an organism under specific environmental conditions. Recently, with the influx of genomic information regarding seagrasses, omics have emerged as a new frontier in seagrass research and have deepened our understanding of their adaptation and underlying tolerance mechanisms to environmental stresses.

This review article provides a state-of-art on seagrass' omics and discusses their potential to discover stress biomarkers, and thereby aid in developing robust diagnostic tools for monitoring seagrass' health and their management for protection and conservation. We discuss how omics platforms are advancing in technology, such as whole-genome shotgun, RNA-seq, 2-DE, and multidimensional GC- and MS-based platforms, which helps in developing high-throughput protocols for possible implementation in seagrass research. This article further discusses how such innovations can provide knowledge on: (1) Molecular adaptation and acclimatisation mechanisms in seagrass responses to light, salinity, thermal, carbon dioxide, eutrophication, and heavy metal concentration, (2) their genetic diversity and evolution, and (3) seagrass reproduction and development. Moreover, we discuss the organelle, such as the chloroplast, based omics frontier to explore its potential in seagrass research to better understand the biological processes at the organelle level and how it may help determine the role of different organelles in providing tolerance against various environmental stresses. Lastly, we discuss the do's and don'ts of the experimental designs, methodological procedures, and analytical tools learned from higher plant studies to facilitate multi-omics studies and data integration in seagrass research. Creating an online user friendly database sourced from multi-omics studies and a suite of tools for analysis will attract seagrass molecular biologists and ecologists working on seagrass ecology, restoration, development, and evolution, and will improve the molecular horizons of seagrass research.

seagrass, genomics, transcriptomics, proteomics, metabolomics, omics

doi: [10.1360/TB-2020-0788](https://doi.org/10.1360/TB-2020-0788)