

盐度胁迫对幼体大海马基因转录表达的影响

张文馨 潘霞 沈锡权 徐永健

EFFECTS OF SALINITY STRESS ON ANSCRIPTION AND EXPRESSION IN JUVENILE *HIPPOCAMPUS KUDA BLEEKER*

ZHANG Wen-Xin, PAN Xia, SHEN Xi-Quan, XU Yong-Jian

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2021.2020.152>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

龙须菜在不同盐度胁迫下的琼胶积累及相关生理生化变化的研究

AGAR ACCUMULATION AND PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY CHANGES OF *GRACILARIOPSIS LEMANEIFORMIS* UNDER DIFFERENT SALINITY STRESSES

水生生物学报. 2020, 44(6): 1322–1329 <https://doi.org/10.7541/2020.153>

卵巢成熟期和退化期星斑川鲷脑垂体和下丘脑组织的转录组比较分析

COMPARISON ANALYSIS ON TRANSCRIPTOME IN THE PITUITARY GLAND AND HYPOTHALAMUS OF STARRY FLOUNDER (*PLATICHTHYS STELLATUS*) AT THE OVARY MATURATION AND DEGRADATION STAGES

水生生物学报. 2017, 41(2): 346–355 <https://doi.org/10.7541/2017.42>

不同温度条件下鲁氏耶尔森氏菌的链特异性转录组分析

CHAIN SPECIFICITY TRANSCRIPTOME ANALYSIS IN DIFFERENT TEMPERATURES CONDITIONED OF *YERSINIA RUCKERI*

水生生物学报. 2019, 43(5): 969–976 <https://doi.org/10.7541/2019.115>

凡纳滨对虾低温差异表达miRNA的分析鉴定及靶基因的验证

IDENTIFICATION AND ANALYSIS OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED MIRNA UNDER LOW TEMPERATURE AND VALIDATION OF TARGET GENES IN *LITOPENAEUS VANNAMEI*

水生生物学报. 2019, 43(6): 1203–1209 <https://doi.org/10.7541/2019.142>

红鳍东方GPI基因对急性低盐胁迫的响应机制

THE EFFECT OF ACUTE LOW SALINITY STRESS ON GPI GENE IN *TAKIFUGU RUBRIPES*

水生生物学报. 2019, 43(4): 771–777 <https://doi.org/10.7541/2019.091>

盐度和温度对不同规格虎斑乌贼幼体的耗氧率、排氨率和窒息点的影响

EFFECTS OF SALINITY AND TEMPERATURE ON THE OXYGEN CONSUMPTION, AMMONIA EXCRETION RATES AND SUFFOCATION THRESHOLD OF DIFFERENT SIZES OF JUVENILE *SEPIA PHARAONIS*

水生生物学报. 2017, 41(5): 1027–1035 <https://doi.org/10.7541/2017.128>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2021.2020.152

盐度胁迫对幼体大海马基因转录表达的影响

张文馨 潘霞 沈锡权 徐永健

(宁波大学海洋学院, 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 宁波 315211)

摘要: 为探究大海马(*Hippocampus kuda* Bleeker)幼体在高盐、低盐胁迫条件下的基因表达水平的变化规律, 对实验条件下的大海马幼体的肝脏样品进行了转录组测序。对照组(CK, 25‰)、高盐(HS-test, 31‰)和低盐(LS-test, 17‰)胁迫组共获得71794个单基因簇(Unigenes), N50为1780 bp, 平均长度为820.71 bp。高盐胁迫组与对照组比较, 共获得2740个差异表达基因(DEGs), 其中495个DEGs上调, 2245个DEGs下调; 与对照组相比, 低盐胁迫组共获得3715个DEGs, 其中1854个DEGs上调, 1861个DEGs下调。高/低盐胁迫组DEGs经KEGG数据库富集发现, 高/低盐度胁迫均能导致大海马幼体体内氨基酸代谢、免疫代谢、能量和脂肪酸代谢相关基因受到影响。其中, 低盐胁迫时能量代谢和氨基酸代谢的相关基因显著上调, 高盐胁迫时脂肪酸代谢的相关基因显著下调, 而高/低盐胁迫时免疫代谢的相关基因都显著上调。从经过盐度胁迫的大海马幼体的肝脏转录组中分别筛选到免疫相关基因*Gst*、*Hsp70*、*Hsp90*、*Sod*、*Bcl-2*、*Gadd45a*、*Tcrβ*、*Tap2*和*Traf3*, 脂肪酸代谢相关基因*Fadsd6*、*Fas*、*Sqle*、*Cyp51*、*Elovl6*和*Slc27a6*, 能量代谢相关基因*Vlcad*、*Pdha1*、*Mdh1*、*Idh3b*、*G6pd*和*Sdh*, 及一些氨基酸代谢相关基因*Gluc*、*Atp6v1e1*、*Sms*、*Fadh*、*Asl*、*Ass1*和*Glud1*等, 可作为大海马幼体响应环境盐度变化应激的候选基因。研究结果为盐度胁迫下大海马幼体的稳态调控机制的研究奠定了一定基础, 有助于在养殖实践中预防极端的盐度改变对大海马幼体所造成的影响。

关键词: 大海马; 盐度胁迫; 转录组测序; 差异表达基因

中图分类号: Q344⁺.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2021)05-0995-10



海马是一种深受东南亚国家喜爱的传统中药^[1]。当前, 因全球野生海马种群的栖息地遭到破坏而导致其资源数量骤减, 但海马的市场需求却与日俱增。因此, 海马养殖业极具潜力, 不仅可以满足市场需求, 还能够保护其野生资源^[2]。尽管多年来针对海马的繁殖和培育开展了许多研究工作, 但仍然存在诸多养殖技术难题^[3], 这些问题主要由养殖环境的胁迫所致。

盐度是鱼类生长发育的重要环境因素之一, 盐度变化对海马的生长发育及生理生化等方面存在很大影响^[4]。已有一些研究涉及其他海洋鱼类, 证明盐度变化会影响鱼类的存活和生长^[5], 甚至影响鱼类的性别决定和早期发育^[6]。而盐度胁迫会引起渗透胁迫, 导致鱼类血浆应激相关激素增多, 能量

代谢受到影响, 电解质平衡被破坏, 进而影响生物体内的渗透压稳态和免疫稳态^[7]。Lu等^[8]的研究发现, 高盐胁迫使黄鳝(*Nibea albiflora*)肝胰腺抗氧化酶和非特异性免疫酶活性发生显著变化。有报道指出, 长期低盐胁迫显著降低了小龙虾(*Cherax quadricarinatus*)免疫相关基因(*Toll*基因和*ProPO*基因)的表达水平^[9]。这些工作对于海马养殖条件的研究都有很好的借鉴。海马属于广盐性鱼类, 可以存活于10‰—32‰盐度的环境中^[10], 但海马幼体对盐度变化的适应能力差, 盐度急剧变化会导致渗透胁迫, 并增加渗透调节和其他几种生物过程所需的能量需求^[11, 12], 因此盐度波动对海马幼体的影响较大。为减轻和避免盐度变化带来的不利影响, 本研究以养殖大海马(*Hippocampus kuda*)幼体为研究对象,

收稿日期: 2020-07-01; 修订日期: 2021-04-07

基金项目: 宁波市自然科学基金(2017A610282); 教育部重点科技项目(212070); 宁波大学学科开放基金(xkzsc1508)资助 [Supported by the Natural Science Foundation of Ningbo Under Contract (2017A610282); the Key Project of Ministry of Education, Science and Technology (212070); the Subject Open Fund of Ningbo University (xkzsc1508)]

作者简介: 张文馨(1996—), 女, 硕士研究生; 主要从事海洋生物资源开发与利用研究。E-mail: zhangwenxin6@126.com

通信作者: 徐永健, 教授, 博士生导师; 主要从事生物资源开发和利用、水产动物行为生态学与微环境养殖研究。E-mail: xuyongjian@nbu.edu.cn

采用RNA-Seq技术对盐度胁迫下大海马幼体的肝脏组织进行了转录组测序,分析其肝脏组织在高/低盐度胁迫下的转录表达情况,揭示了大海马盐度应激的调控机制,并从中挖掘响应盐度应激的候选基因,作为海马养殖过程中的生物标记指示物。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本实验用生物大海马幼体由宁波大学海马养殖研究实验室培育。挑选健康无病且活力良好的个体[个体质量: (0.46 ± 0.07) g, 体长: (5.78 ± 0.42) cm ($P > 0.05$)], 于实验前置于循环水养殖系统中暂养1周。暂养期间使用盐度25‰、温度 $(25 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 、含氧量 $\text{DO} > 5$ mg/L过经砂滤后的天然海水,每日定时投喂2次,摄食2h后吸污并换水50%。实验开始后,各组盐度设置如下:对照组盐度25‰(Control, CK)、高盐胁迫组31‰(HS-test)和低盐胁迫组17‰(LS-test),各组水温均保持 25°C 。急性盐度胁迫12h后,每组随机取3尾大海马的肝脏置于同一冻存管中制成一个混样以消除个体误差,以此每组各设置3个生物学重复^[13]。样品组织以液氮速冻,置于 -80°C 冰箱中保存。

1.2 RNA提取、文库构建和测序

采用RNAiso plus试剂盒(大连宝生生物有限公司)提取肝脏总RNA。采用Multiskan SkyHigh微孔板分光光度计(Thermo Fisher Scientific, 美国)检验RNA样品的浓度($\text{ng}/\mu\text{L}$)和纯度(A_{260}/A_{280} 值),利用1%的琼脂糖凝胶电泳检查RNA样品的完整性,采用Bioanalyzer 2100系统(Agilent Technologies, 美国)评估RNA的浓度和完整性。取每组2 μg RNA样品,采用NEBNext UltraTM RNA文库制备试剂盒(New England Biolabs, 美国)构建测序文库并在Illumina平台上测序,测序策略为PE150[安诺优达基因科技(北京)有限公司]。

1.3 转录组的组装,注释和DEGs分析

使用Perl脚本处理原始数据,以确保后续用于信息分析的数据质量,包括去除接头污染的Reads、低质量的Reads及含N比例大于5%的Reads。对过滤后所得到的Clean Data的质量和数量等性状进行统计,包括过滤后的总序列中质量值大于30(错误率 $< 0.1\%$)的碱基数的比例(Clean Q30 bases rate, Q30)、数据量和碱基含量等。采用Trinity软件对进行组装,对得到的全长转录本进行评估,然后进行开放阅读框(Open reading frame, ORF)预测和功能分析^[14]。采用RPKM法计算基因表达量^[15],采用DEGseq v1.18.0软件^[16]对差异表达基因进行分

析。对DEGs($Q \leq 0.05$ 且 $|\log_2 \text{ratio}| \geq 1$)进行基因本体(Gene Ontology, GO)富集分析及京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)数据库通路富集分析。

1.4 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)分析

本实验以 $\beta 2$ -微球蛋白(beta-2 microglobulin, B2M)作为内参基因^[14],对10个差异表达基因的RNA-Seq结果进行了验证。根据转录组文库中的Unigene序列,用Primer Premier 5软件设计特异性引物(表1)。使用Eppendorf Mastercycler ep real-plex4(Eppendorf, 德国)和TB Green Premix Ex TaqTM II(Tli RNaseH Plus; TaKaRa, 大连)试剂盒对差异表达基因的表达量进行定量测定,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[17]计算目的基因的相对表达水平。

2 结果

2.1 大海马肝脏 mRNA 测序结果及从头组装

高通量测序结果显示(表2),CK、HS-test、CK和LS-test组分别获得55510236、58040146和55840746个原始读段(Raw reads)。过滤后分别获得54453888(CK)、56489512(HS-test)和54407308(LS-test)个Clean reads。Q30分别为97.80%(CK)、95.88%(HS-test)和95.84%(LS-test),均大于95%,证明数据可靠。Trinity软件组装高质量的测序数据后(表3),共生成154430个转录本,最大长度为15866 bp,最小长度为201 bp,平均长度为1234.69 bp, N50长度为2318 bp。所得转录本序列进一步组装处理后获得71794个单基因簇(Unigene),平均长度为820.71 bp, N50为1780 bp。其中68.07%的Unigenes在200—600 bp, 9.96%的Unigenes在600—1000 bp, 1000—2000 bp占10.87%, 11.10%的Unigenes在2000 bp以上。

2.2 基因功能注释

将获得的Unigene数据信息分别在蛋白质家族域数据库(Pfam)、蛋白质序列数据库(Swiss-Prot)、非冗余蛋白数据(Nr)、真核生物蛋白相邻类的聚簇(KOG)、基因本体论(GO)数据库和东京基因与基因组百科全书(KEGG)等数据库比对注释。结果显示(表4), 37.61%的Unigenes在Nr数据库中注释,占比最多;核酸序列数据库(Nt)注释的Unigenes占31.19%; 4781个Unigenes在KEGG数据库中注释,仅占比6.66%; 24450个Unigenes在GO数据库中得到了注释,占比34.06%。GO数据库涵盖3个方面(图1):生物过程(Biological process)、细胞组成(Cellular component)和分子功能(Molecular function)。利用Trinotate的注释结果,统计每个GO条目

中注释到的基因, 并根据二级GO条目得到统计结果。生物学过程中, 占比前5的主要类别依次为细胞过程(72.75%)、生物调节(50.84%)、代谢过程(51.46%)、生物过程调节(47.50%)和刺激反应(36.05%); 在分子功能类别中代表性的类别分别是结合功能(63.10%)、催化活性(34.67%)和分子功能调节(7.62%); 细胞组成部分中最主要的类别为分别为细胞(79.42%)、细胞组分(79.26%)、细胞器(63.61%)和膜(46.63%)。

在 KOG 数据库中, 14428个基因注释到了 25 个直系同源组(图 2), 其中信号转导机制(T, 23.61%)与一般功能预测(R, 13.54%)代表了最大的类群, 其次是转录(K, 11.73%)、翻译后修饰/蛋白质周转/分子伴侣(O, 8.18%)和细胞内运输/分泌和囊泡运输(U, 6.10%)。

由图 3 可知, *HS-test* vs. CK 共获得2740 个差异表达基因($P<0.05$), 其中显著下调495 个, 显著上

调 2245 个; *LS-test* vs. CK 共获得 3715 个差异表达基因, 1854 个显著上调, 1861 个显著下调。高温胁迫组的上调基因数量低于下调基因; 而在低温胁迫组中, 上下调基因数量占比相当。

肝脏转录组中差异表达基因个数统计结果显示(图 4), 两两比对的三组均显著差异表达的基因共计161个, *HS-test* vs. CK 与 *LS-test* vs. CK 有 1260个相同的差异表达基因, 而 1480 个差异基因仅在 *HS-test* vs. CK 显著表达, 共有2455 个差异基因仅在 *LS-test* vs. CK 显著表达。

2.3 差异表达基因的 KEGG 富集分析

KEGG 是一个实用程序数据库, 整合了系统功能信息、基因组信息和化学信息, 有助于了解生物系统的高级功能和实用性, 如在分子水平探究细胞、生物和生态系统的信息, 而差异表达基因的 Pathway 注释分析有助于在被整合的分子互动网络中进一步解读基因的功能^[18], 是国际最常用的生物

表 1 RT-qPCR所用基因及其引物序列

Tab. 1 Primers used for RT-qPCR

序号 Number	基因ID Gene ID	基因注释Gene annotation	引物序列Primer (5'—3')	扩增效率 Amplification efficiency (%)
1	TRINITY_DN21408_c0_g2	谷胱甘肽S-转移酶A样Glutathione S-transferase A-like (GST)	AAATGACTCTGTACTGGGGCG CCCCTGGGGTTAATATCGAGC	96
2	TRINITY_DN22446_c2_g4	凋亡调节因子Bcl-2Apoptosis regulator Bcl-2 (Bcl-2)	GTGAGGTACGTGCCGATGGT GGGCTGGGATGCTTTTGTG	103
3	TRINITY_DN18527_c0_g2	脂肪酸合酶Fatty acid synthase (Fas)	GTCCCATTTGTGCTGTGTGAC CGGACTCCTGAATATCCAGCC	105
4	TRINITY_DN17925_c0_g1	超长链特异性酰基辅酶A脱氢酶Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase (Vlcad)	AAAGTGGCCAGTCTTCTACG ACTGCCTGTGTAGCTTGACTC	105
5	TRINITY_DN21693_c1_g1	丙酮酸脱氢酶E1成分亚单位 α Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha (Pdha1)	TTGCCCGTCATCTTCATCTG GACATCCATACCATCCACCCT	95
6	TRINITY_DN20289_c6_g1	细胞溶质苹果酸脱氢酶Cytosolic malate dehydrogenase (Mdh1)	TCTGCGACCACATGAGGGA TCTGGACGGGAAGGAGTAG	100
7	TRINITY_DN22605_c1_g1	异柠檬酸脱氢酶3 (NAD+) β Isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) beta (Idh3b)	CTGGACCTGTTTGCCAATGTG AATCACACCGGTCACACTCTC	104
8	TRINITY_DN18237_c0_g1	葡萄糖-6-磷酸脱氢酶Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6pd)	CATGCACGCAGTTCTGATAGC GGGTGATCTGGCCAAGAAGAA	105
9	TRINITY_DN19718_c0_g6	生长停滞和DNA损伤诱导蛋白 GADD45 α Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD45 alpha-like (Gadd45 α)	CTTTGGAAGGGACGTAGGCA AAACATCCGCAGAGGAGTGAA	104
10	TRINITY_DN12165_c0_g1	超氧化物歧化酶Superoxide dismutase (SOD)	TCACATACTTCACGGGTTTCG AGGGAAATGTTCAAGGTACTGC	102
11	TRINITY_DN14235_c1_g1	β 2-微球蛋白Beta-2 microglobulin (B2M)	TACACCCACCAGCCAGGAAA GGACTCGACGACATCGAACATC	100

表 2 大海马测序数据的统计汇总

Tab. 2 Statistic summary of the sequencing data of *H. kuda*

组别Group	原始序列数 Raw reads number	过滤后序列数 Clean reads number	过滤后碱基数 Clean bases number	过滤后序列质量大于30的 碱基数比例Q30 (%)
对照组CK	55510236	54453888	7749733968	97.80
高盐胁迫组 <i>HS-test</i>	58040146	56489512	8126998064	95.88
低盐胁迫组 <i>LS-test</i>	55840746	54407308	7888244898	95.84

表 3 组装结果统计表

Tab. 3 Statistics of assembly results

序列长度 Length (bp)	组装的转录本 Trinity	单基因簇 Unigenes
200—600	74243	48867
600—1000	18364	7154
1000—2000	29552	7801
>2000	32271	7972
总计Count	154430	71794
最小长度Min length	201	201
最大长度Max length	15866	15866
平均长度Mean length	1234.69	820.71
N50	2318	1780
N90	476	278

注: N50代表序列从大到小排列, 当其累计长度刚刚超过全部序列总长度50%时, 最后一个序列的大小即为N50的大小。N90代表序列从大到小排列, 当其累计长度刚刚超过全部序列总长度90%时, 最后一个序列的大小即为N90的大小

Note: N50 means that the sequence is distributed from large to small, and when the extension length just exceeds 50% of the total length of the entire sequence, the size of the last sequence is the size of N50. N90 means that the sequence is distributed from large to small, and when the extension length just exceeds 90% of the total length of the entire sequence, the size of the last sequence is the size of N90

表 4 各个数据库的注释汇总表

Tab. 4 Summary of comments in each database

数据库 Database	单基因簇数量 Number of unigenes	百分比 Percentage (%)
非冗余蛋白数据库Nr	26999	37.61
核酸序列数据库Nt	22389	31.19
京都基因与基因组百科全书KEGG	4781	6.66
蛋白质序列数据库Swiss-Prot	22277	31.03
蛋白质家族域数据库Pfam	12391	17.26
基因本体论数据GO	24450	34.06
保守域数据库CDD	15719	21.89
真核生物蛋白相邻类的聚簇KOG	14428	20.1
总单基因簇Total unigenes	71794	100

信息数据库之一。将获得的转录组差异表达基因在KEGG中进行富集比对时, 对 KEGG数据库中的 Pathway 信息应用超几何检验进行富集分析, 归纳差异表达基因中显著富集的 Pathway($Q < 0.05$)^[14]。其中 Q 值为多重假设检验校正之后的 P 值, Q 值越小, 表示差异表达基因在该通路中的富集显著性越高^[19]。在本研究中, HS-test vs. CK 的差异表达基因共富集到 227 条代谢调节通路, 其中显著富集的通路是类固醇生物合成(Steroid biosynthesis)。LS-test vs. CK 的差异表达基因富集到252条代谢调节通路,

其中显著富集的通路有蛋白酶体(Proteasome)、氧化磷酸化(Oxidative phosphorylation)、类固醇生物合成(Steroid biosynthesis)及柠檬酸循环(Citrate cycle)等。

表 5和表 6 分别为HS-test vs. CK和LS-test vs. CK的差异表达基因富集得到的前 20 个 KEGG 代谢通路, 其中高盐胁迫组中代谢途径 (如类固醇生物合成、维生素消化吸收、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢等氨基酸代谢、甘油磷脂代谢、蛋白质运输、磷酸盐和次磷酸盐代谢、不饱和脂肪酸的生物合成、类固醇激素生物合成等)和免疫途径 (如PPAR信号通路、抗原加工提呈、NF- κ B信号通路、HIF-1信号通路、IgA生成的肠道免疫网络、细胞色素P450对异生素的代谢等)受到影响。低盐胁迫组富集得到的代谢通路主要涉及氨基酸相关代谢有关通路 (如甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢、 β -丙氨酸代谢、赖氨酸降解、赖氨酸生物合成)、能量和脂肪酸代谢有关通路 [如类固醇生物合成、氧化磷酸化、柠檬酸循环、碳代谢、淀粉和蔗糖代谢、核糖体生物发生 (真核生物)]和免疫代谢相关通路 (如蛋白酶体、抗原加工提呈、抗坏血酸和藻酸盐代谢)等。

根据表 5和表 6富集通路中的有关基因, 结合所查阅的相关文献, 最终筛选得到*Gst*、*Hsp70*、*Hsp90*、*Sod*、*Bcl-2*、*Gadd45a*、*Tcr β* 、*Tap2*和*Traf3*等免疫相关基因, *Fadsd6*、*Fas*、*Sqle*、*Cyp51*、*Elovl6*和*Slc27a6*等脂肪酸代谢相关基因, *Vlcad*、*Pdha1*、*Mdh1*、*Idh3b*、*G6pd*和*Sdh*等能量代谢相关基因, 及*Gldc*、*Atp6v1e1*、*Sms*、*Fadh*、*Asl*、*Ass1*和*Glud1*等与氨基酸代谢以及渗透转运有关的基因在盐度应激中发挥重要作用。

本研究共筛选出了 *Gst*、*Hsp70*、*Hsp90*、*Sod*、*Bcl-2*、*Gadd45a*、*Fadsd6*、*Fas*、*Sqle*、*Cyp51*、*Elovl6*、*Pdha1*、*Mdh1*、*Idh3b*、*G6pd*、*Sms*、*Asl*和*Glud1* 等对盐度胁迫敏感的候选基因。

2.4 实时荧光定量 PCR 验证

为验证RNA-Seq检测结果的准确性, 通过查阅文献共选取 10个差异表达基因 (表 1)进行验证。以 *B2M* 作为内参基因, 采用 RT-qPCR 相对定量方法, 检测这些差异表达基因在试验组与处理组中的表达量差异。将 RT-qPCR 检测结果与转录组分析结果进行比较, 结果表明, 10个差异表达基因的 RNA-seq 相对表达水平与 RT-qPCR 相对表达趋势基本一致 (图 5和图 6), 证明了转录组分析结果的可靠性。

3 讨论

水环境中盐度的变化能够对水产动物的行为和生理生化等方面产生十分复杂的影响, 从行为至分子水平的影响均十分严重, 且影响程度存在物种差异性^[20]。盐度变化一般会直接破坏水产动物的电解质平衡, 导致渗透压改变, 此外还会影响氨基酸代谢、能量代谢、免疫代谢和应激激素水平等方面^[21]。有研究表明, 鱼类和甲壳类水产动物的鳃^[22, 23]、肌肉^[24]和肝脏^[25, 26]等组织器官都会因盐度变化而受到影响。本研究结果也表明, 高盐和低盐对大海马幼体造成的影响是不同的 (表 5 和表 6): 在暴露于低盐时, 主要涉及与氨基酸代谢 (大部分基因上调)、能量代谢 (大部分基因上调) 和免疫功能 (大部分基因上调) 相关的途径发生改变; 而暴露于高

盐时, 免疫功能 (大部分基因上调) 和脂质代谢 (大部分基因下调) 相关的途径发生了明显变化。

3.1 盐度对大海马免疫功能的影响

盐度胁迫会造成水产动物体内氧化损伤, 其中氧化应激下的酶活性变化及其相关机制已有许多报道^[22, 27]。在本研究中的低盐胁迫下, 蛋白酶体途径显著富集, 且富集于此途径的基因均显著上调 (如26s蛋白酶体非ATP酶调节亚单位11A、B等)。蛋白酶体途径可以响应感染、热休克或氧化损伤等多种细胞应激, 此途径具有重要且复杂的功能。热休克蛋白 (HSP) 可以识别错误折叠或未折叠的蛋白质, 通过蛋白酶体的水解作用降解蛋白^[28]。本研究发现, 低盐胁迫会使大海马幼体体内产生氧化损伤, DEGs中抗氧化基因 (如*Sod*和*Gst*) 和热休克蛋白基因 (如*Hsp70*和*Hsp90*) 的显著上调证实了这一

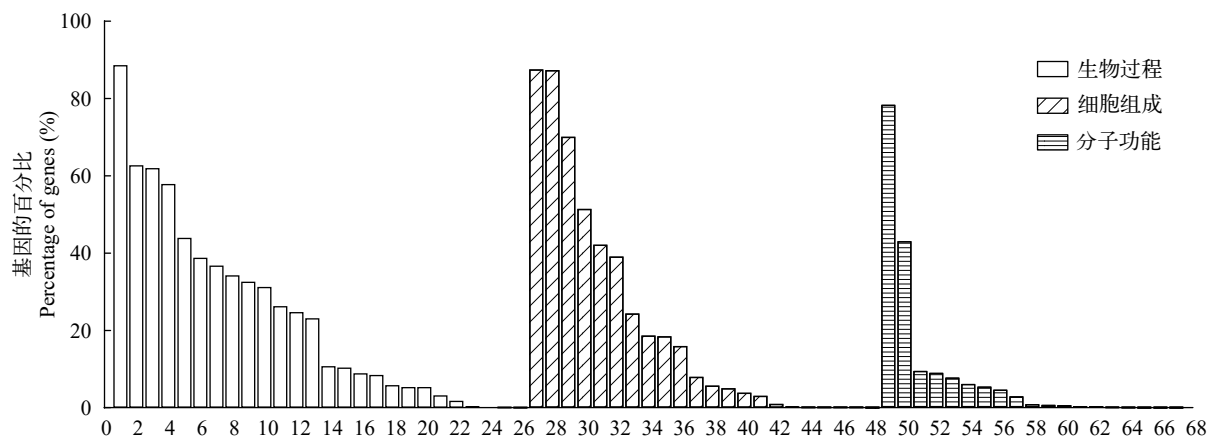


图1 GO统计柱状图

Fig. 1 GO statistics histogram

1. 细胞过程; 2. 代谢过程; 3. 生物调节; 4. 生物过程调节; 5. 刺激反应; 6. 多细胞生物过程; 7. 发育过程; 8. 细胞部分组织或生物合成; 9. 定位; 10. 信号; 11. 生物过程的正调控; 12. 定位的建立; 13. 生物过程的负调控; 14. 免疫系统反应; 15. 移动; 16. 生物黏附; 17. 多机体过程; 18. 生长; 19. 生殖; 20. 生殖过程; 21. 行为; 22. 节律过程; 23. 细胞杀伤; 24. 细胞聚集; 25. 解毒; 26. 生物相; 27. 细胞; 28. 细胞部分; 29. 细胞器; 30. 膜; 31. 细胞器部分; 32. 膜部分; 33. 含蛋白复合物; 34. 细胞间区域组分; 35. 膜结合腔体; 36. 细胞间区域组分; 37. 胞间连丝; 38. 超分子纤维; 39. 突触; 40. 突触部分; 41. 细胞外基质; 42. 细胞外基质成分; 43. 核体; 44. 病毒粒子; 45. 其他组织; 46. 其他组织部分; 47. 病毒粒子部分; 48. 共质体; 49. 结合功能; 50. 催化活性; 51. 分子功能调节剂; 52. 转运因子活性; 53. 信号传导活性; 54. 酶调节剂活性; 55. 分子感应器活性; 56. 结构分子活性; 57. 转录因子活性, 蛋白质结合; 58. 受体调节剂活性; 59. 电子传递活性; 60. 通道调节器活动; 61. 抗氧化活性; 62. 化学排斥因子活性; 63. 翻译调控因子活性; 64. 趋化因子活性; 65. 蛋白标签; 66. 金属伴侣蛋白活性; 67. 形态发生素活性

1. cellular process; 2. metabolic process; 3. biological regulation; 4. regulation of biological process; 5. response to stimulus; 6. multicellular organismal process; 7. developmental process; 8. cellular component organization or biogenesis; 9. localization; 10. signaling; 11. positive regulation of biological process; 12. establishment of localization; 13. negative regulation of biological process; 14. immune system process; 15. locomotion; 16. biological adhesion; 17. multi-organism process; 18. growth; 19. reproduction; 20. reproductive process; 21. behavior; 22. rhythmic process; 23. cell killing; 24. cell aggregation; 25. detoxification; 26. biological phase; 27. cell; 28. cell part; 29. organelle; 30. membrane; 31. organelle part; 32. membrane part; 33. protein-containing complex; 34. extracellular region; 35. membrane-enclosed lumen; 36. extracellular region part; 37. cell junction; 38. supramolecular fiber; 39. synapse; 40. synapse part; 41. extracellular matrix; 42. extracellular matrix component; 43. nucleoid; 44. virion; 45. other organism; 46. other organism part; 47. virion part; 48. symplast; 49. binding; 50. catalytic activity; 51. molecular function regulator; 52. transporter activity; 53. signal transducer activity; 54. enzyme regulator activity; 55. molecular transducer activity; 56. structural molecule activity; 57. transcription factor activity, protein binding; 58. receptor regulator activity; 59. electron transfer activity; 60. channel regulator activity; 61. antioxidant activity; 62. chemorepellent activity; 63. translation regulator activity; 64. chemoattractant activity; 65. protein tag; 66. metallochaperone activity; 67. morphogen activity

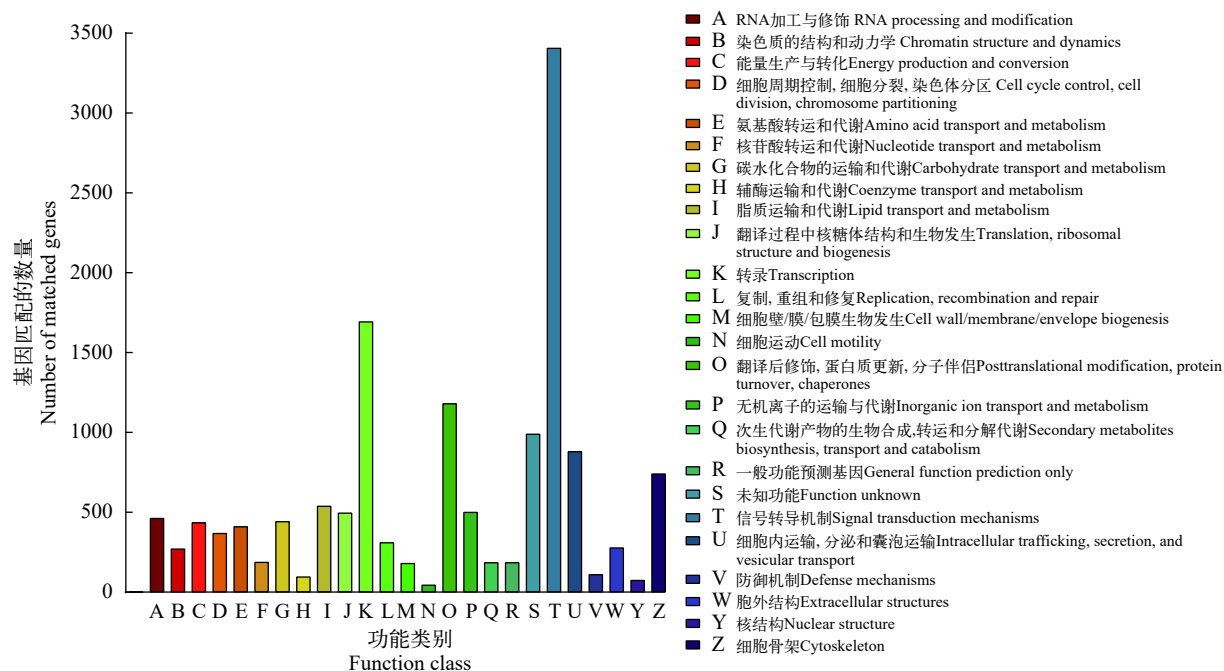


图2 KOG统计图

Fig. 2 KOG chart

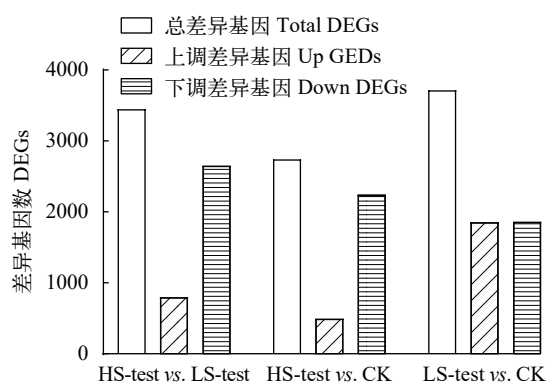


图3 大海马肝脏转录组中差异表达基因个数统计图

Fig. 3 Statistical diagram of differentially expressed genes in liver transcriptome of *H. kuda*

点。此外,表5和表6的结果发现了多个免疫相关通路,如抗原加工提呈、NF- κ B信号通路和IgA生成的肠道免疫网络等,经分析发现高/低盐胁迫组中多数免疫相关基因显著上调,如*Tcr β* 、*Tap2*、*Traf3*和*Gadd45a*等。在水体盐度变化时,大海马免疫防御系统中的免疫分子转录增加,推测是为环境应激可能导致的疾病做准备^[29]。

3.2 盐度对大海马幼体氨基酸代谢的影响

游离氨基酸、离子通道和水通道蛋白是已知的3种盐度胁迫效应物^[30]。据报道游离氨基酸在细胞体积变化和渗透调节过程中具有重要功能,且大多数水生物种在环境盐度变化时,将体内的游离氨基酸积累在细胞内^[31]。在本研究中,表6的前20个

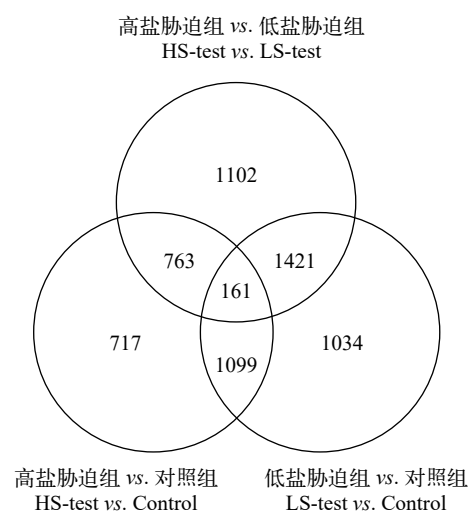


图4 大海马肝脏转录组中差异基因韦恩图

Fig. 4 Venn diagram of differential gene in liver transcriptome of *H. kuda*

KEGG通路中低盐胁迫组富集了多个氨基酸代谢通路,如甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢、赖氨酸降解和生物合成及 β -丙氨酸代谢等代谢途径。除表6外,本研究还富集到了半胱氨酸和蛋氨酸代谢、组氨酸代谢、精氨酸生物合成及精氨酸和脯氨酸代谢等通路。以上通路中富集的基因多数显著上调,表明氨基酸代谢的增加可能是大海马幼体应对低盐胁迫的一个重要调节途径,类似结果也在牡蛎(*Crassostrea gigas*)^[32]、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[33]及

表 5 HS-test vs. CK差异基因富集的前20个KEGG代谢通路

Tab. 5 Top 20 KEGG metabolic pathways enriched for HS-test vs. CK differential genes

通路ID Pathway ID	上调DEGs Up- regulated DEGs	下调DEGs Down- regulated DEGs	Q值 Q value	代谢通路注释Metabolic pathway annotation
ko00100	0	9	0.0023	类固醇生物合成Steroid biosynthesis
ko04977	4	3	0.1968	维生素消化吸收Vitamin digestion and absorption
ko03320	3	10	0.1968	PPAR信号通路PPAR signaling pathway
ko04612	9	1	0.1968	抗原加工提呈Antigen processing and presentation
ko00260	3	6	0.1968	甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢Glycine, serine and threonine metabolism
ko04710	1	8	0.1994	昼夜节律Circadian rhythm
ko04711	0	5	0.2081	昼夜节律-果蝇Circadian rhythm-fly
ko00564	5	9	0.4242	甘油磷脂代谢Glycerophospholipid metabolism
ko00630	3	4	0.4242	乙醛酸和二羧酸代谢Glyoxylate and dicarboxylate metabolism
ko00909	0	2	0.5387	倍半萜类化合物和三萜类化合物的生物合成Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis
ko03060	1	4	0.6468	蛋白质运输Protein export
ko04064	8	4	0.6884	NF-κB信号通路NF-kappa B signaling pathway
ko04066	2	11	0.7365	HIF-1信号通路HIF-1 signaling pathway
ko04976	1	8	0.7687	胆汁分泌Bile secretion
ko01040	1	3	0.7687	不饱和脂肪酸的生物合成Biosynthesis of unsaturated fatty acids
ko04672	5	0	0.7687	IgA生成的肠道免疫网络Intestinal immune network for IgA production
ko00980	2	3	0.8420	细胞色素P450对异生素的代谢Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450
ko00440	0	2	0.8420	磷酸盐和次磷酸盐代谢Phosphonate and phosphinate metabolism
ko00140	3	2	0.8420	类固醇激素生物合成Steroid hormone biosynthesis
ko00534	1	3	0.8420	糖胺聚糖生物合成-硫酸乙酰肝素/肝素Glycosaminoglycan biosynthesis-heparan sulfate/heparin

表 6 LS-test vs. CK差异基因富集的前20个KEGG代谢通路

Tab. 6 Top 20 KEGG metabolic pathways enriched for LS-test vs. CK differential genes

通路ID Pathway ID	上调DEGs Up- regulated DEGs	下调DEGs Down- Regulated DEGs	Q值 Q value	代谢通路注释Metabolic pathway annotation
ko03050	24	0	2.27E-07	蛋白酶体Proteasome
ko00190	45	1	2.56E-05	氧化磷酸化Oxidative phosphorylation
ko00100	2	9	0.0024	类固醇生物合成Steroid biosynthesis
ko00020	12	2	0.0290	柠檬酸循环 (TCA循环)Citrate cycle (TCA cycle)
ko04612	16	0	0.0394	抗原加工提呈Antigen processing and presentation
ko01200	24	5	0.0577	碳代谢Carbon metabolism
ko00053	4	4	0.0787	抗坏血酸和藻酸盐代谢Ascorbate and aldarate metabolism
ko00982	4	5	0.1366	药物代谢-细胞色素P450Drug metabolism-cytochrome P450
ko00410	8	3	0.1452	β-丙氨酸代谢Beta-Alanine metabolism
ko00500	7	4	0.1571	淀粉和蔗糖代谢Starch and sucrose metabolism
ko00983	6	5	0.1571	药物代谢-其他酶Drug metabolism-other enzymes
ko04721	13	3	0.1571	突触小泡循环Synaptic vesicle cycle
ko03008	21	0	0.1689	核糖体在真核生物中的生物发生Ribosome biogenesis in eukaryotes
ko04966	8	0	0.2045	收集导管酸分泌Collecting duct acid secretion
ko00380	10	3	0.2295	色氨酸代谢Tryptophan metabolism
ko03013	34	1	0.2571	RNA转运RNA transport
ko03040	29	1	0.2916	剪接体Spliceosome
ko00310	11	7	0.3013	赖氨酸降解Lysine degradation
ko00300	2	0	0.3219	赖氨酸生物合成Lysine biosynthesis
ko00250	7	2	0.3219	丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢Alanine, aspartate and glutamate metabolism

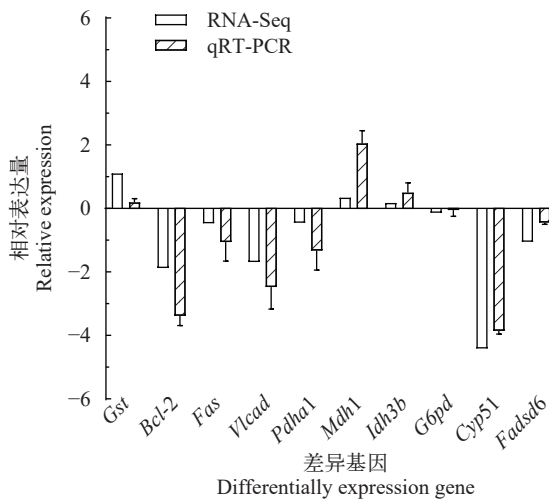


图5 高盐胁迫组 (HS-test) RT-qPCR 及 RNA-Seq 的比较分析
Fig. 5 Comparative analysis of RT-qPCR and RNA-Seq in HS-test

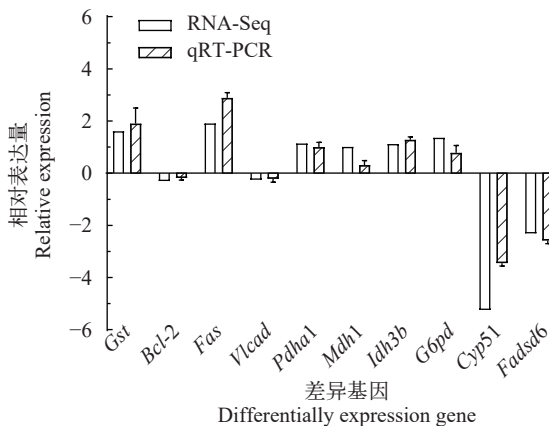


图6 低盐胁迫组 (LS-test) RT-qPCR 及 RNA-Seq 的比较分析
Fig. 6 Comparative analysis of RT-qPCR and RNA-Seq in LS-test

凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)^[26]等水产动物中被发现。但研究发现不同物种中重要的游离氨基酸种类并不一样^[32], 因此可以将氨基酸的定性及定量作为今后研究的重要内容之一, 将氨基酸代谢相关的潜在标志基因与氨基酸含量相联系, 进一步了解盐度胁迫下大海马幼体渗透调节过程中氨基酸代谢的机制。

3.3 盐度对大海马幼体渗透调节的影响

肝脏是鱼类代谢的主要器官, 同时可以为渗透调节作用提供能量^[34]。关于渗透调节过程中能量代谢的研究主要集中在鱼类的生理生化反应、氧气消耗和氨排泄等方面, 而在分子水平上的研究较少。水产动物的能量代谢途径在响应盐度应激时起关键作用^[35], 有研究发现在高盐胁迫下斑点鲈 (*Lateolabrax maculatus*) 肝脏中能量代谢相关的许多基因显著上调^[25]。而本研究在低盐胁迫下大部

分能量代谢的关键基因 (如 *Vlcad*、*Pdha1*、*Mdh1*、*Idh3b* 和 *G6pd* 等) 显著上调, 说明大海马幼体肝脏在低盐胁迫时的能量代谢过程可能承担了重要的角色。推测大量能量用于合成关键蛋白、离子调节和渗透调节等过程, 以维持体内的稳态和渗透平衡^[36]。

3.4 盐度对大海马幼体脂肪酸代谢的影响

水产动物的脂肪酸代谢在盐度胁迫下也承担了多种功能, 一种是提供能量维持离子转运并调节渗透压, 另一种是调整细胞膜的结构^[26]。在本研究中高盐胁迫下大海马幼体肝脏中富集了多个脂肪酸合成和降解途径 (如不饱和脂肪酸的生物合成、类固醇生物合成、类固醇激素生物合成、脂肪酸代谢、脂肪酸降解和甘油磷脂代谢等), 且通路中的大部分基因显著下调, 如 *Fadsd6*、*Cyp51*、*Sqle*、*Fabp* 和 *Slc27a6* 等脂肪代谢基因在高盐胁迫下均显著下调, 由此推测大海马幼体体内可能有足够的能量用于抵抗高盐胁迫。

参考文献:

- [1] Cividanes M S, Joyeux J C, Rodrigues R V, et al. Tolerance and growth of the longsnout seahorse *Hippocampus reidi* at different salinities [J]. *Aquaculture*, 2016(463): 1-6.
- [2] Blanco A, Chamorro A, Planas M. Implications of physical key factors in the early rearing of the long-snouted seahorse *Hippocampus guttulatus* [J]. *Aquaculture*, 2014(433): 214-222.
- [3] Arturo J, Simões N, Mascaró M. Feeding the lined seahorse *Hippocampus erectus* with frozen amphipods [J]. *Aquaculture*, 2018(491): 82-85.
- [4] Huang J X, Qin G, Zhang B, et al. Effects of food, salinity, and ammonia-nitrogen on the physiology of juvenile seahorse (*Hippocampus erectus*) in two typical culture models in China [J]. *Aquaculture*, 2020(520): e734965.
- [5] Le K X, Jiang X M, Wang Y, et al. Salinity effects on growth and enzyme activity of juvenile *Sepia pharaonis* [J]. *Journal of Oceanography*, 2015, 34(6): 64-72. [乐可鑫, 蒋霞敏, 汪元, 等. 盐度对虎斑乌贼幼体生长与酶活的影响 [J]. *热带海洋学报*, 2015, 34(6): 64-72.]
- [6] Aishi K, Sinnasamy S, MacRae T H, et al. *Hsp70* knock-down reduced the tolerance of *Litopenaeus vannamei* post larvae to low pH and salinity [J]. *Aquaculture*, 2019(512): e734346.
- [7] Liu Y, Wen H S, Li J F, et al. Effects of salinity and pH on hatching and larval activity of *Lateolabrax maculatus* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(12): 1867-1877. [刘阳, 温海深, 李吉方, 等. 盐度与pH对花鲈孵化、初孵仔鱼成活及早期幼鱼生长性能的影响 [J]. *水产学报*, 2017, 41(12): 1867-1877.]
- [8] Hu Y M, Li Q, Liu S K, et al. Effects of acute tempera-

- ture and salinity stress on survival and immune indexes of Iwagaki oyster, *Crassostrea nippona* [J]. *Journal of Fisheries Sciences of China*, 2020, **27**(3): 286-294. [胡益鸣, 李琪, 刘士凯, 等. 温度和盐度急性胁迫对岩牡蛎存活及免疫指标的影响 [J]. 中国水产科学, 2020, **27**(3): 286-294.]
- [9] Lu T, Peng T, Lei Y, *et al.* Effects of salinity on the growth, plasma ion concentrations, osmoregulation, non-specific immunity, and intestinal microbiota of the yellow drum (*Nibea albiflora*) [J]. *Aquaculture*, 2020(582): e735470.
- [10] Wang R P, Dai L L, Chen Y F, *et al.* Effects of short-term temperature or salinity stress on feeding behavior and antioxidant of marine medaka (*Oryzias melastigma*) [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2019, **50**(2): 378-387. [王润萍, 戴铃灵, 陈雅飞, 等. 短期温度、盐度胁迫对海洋青鳉鱼 (*Oryzias melastigma*) 摄食行为及抗氧化的影响 [J]. 海洋与湖沼, 2019, **50**(2): 378-387.]
- [11] Liu S B, Qi C L, Jia Y Y, *et al.* Growth and intestinal health of the red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, reared under different salinities [J]. *Aquaculture*, 2020(524): e735256.
- [12] Blondeau B E, Hiroi J, Lorin N C. Ion uptake pathways in European sea bass *Dicentrarchus labrax* [J]. *Gene*, 2019(700): 126-137.
- [13] Liu S K, Wang X L, Sun F Y, *et al.* RNA-Seq reveals expression signatures of genes involved in oxygen transport, protein synthesis, folding, and degradation in response to heat stress in catfish [J]. *Physiological Genomics*, 2013, **45**(12): 462-761.
- [14] Pan X, Xu Y J, Ning Y, *et al.* Effects of Temperature Stress on Genes' Transcription and Expression in Juvenile *Hippocampus kuda* Bleeker [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2020, **34**(7): 1421-1431. [潘霞, 徐永健, 宁燕, 等. 温度胁迫对幼体大海马基因转录表达的影响 [J]. 核农学报, 2020, **34**(7): 1421-1431.]
- [15] Mortazavi A, Williams B A, McCue K, *et al.* Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq [J]. *Nature Methods*, 2008, **5**(7): 621-628.
- [16] Wang L K, Feng Z X, Wang X, *et al.* DEGseq: An R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data [J]. *Bioinformatics*, 2009, **26**(1): 136-138.
- [17] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402-408.
- [18] Luo H, Ye H, Xiao S J, *et al.* Application of transcriptomics technology to aquatic animal research [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, **39**(4): 598-607. [罗辉, 叶华, 肖世俊, 等. 转录组学技术在水产动物研究中的运用 [J]. 水产学报, 2015, **39**(4): 598-607.]
- [19] Liu F X, Yang W G, Sun Q H. Research on transcriptome sequencing data analysis and high-throughput GO annotation theory [J]. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 2018, **46**(31): 88-91, 100. [刘粉香, 杨文国, 孙勤红. 基于转录组测序数据分析及高通量 GO 注释理论的研究 [J]. 安徽农业科学, 2018, **46**(31): 88-91, 100.]
- [20] Mao M G, Sun X R, Jiang J L, *et al.* The effect of acute low salinity stress on *GPI* gene in *Takifugu rubripes* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, **43**(4): 771-777. [毛明光, 孙心如, 蒋洁兰, 等. 红鳍东方鲀 *GPI* 基因对急性低盐胁迫的响应机制 [J]. 水生生物学报, 2019, **43**(4): 771-777.]
- [21] Iuri S A A, Adalto B, Indianara F B, *et al.* Salinity influence on growth, osmoregulation and energy turnover in juvenile pompano *Trachinotus marginatus* Cuvier 1832 [J]. *Aquaculture*, 2016(455): 63-72.
- [22] Derakhshani Z, Bhavne M, Shah R M. Metabolic contribution to salinity stress response in grains of two barley cultivars with contrasting salt tolerance [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2020(179): e104229.
- [23] Lin G M, Zheng M, Gao D, *et al.* Hypoosmotic stress induced tissue-specific immune responses of yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*) revealed by transcriptomic analysis [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2020(99): 473-482.
- [24] Sheng A C, Hou J L, Yao N, *et al.* Comparative transcriptome analysis of *Triplophysa yarkandensis* in response to salinity and alkalinity stress [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part D*, 2020(33): e100629.
- [25] Zhang X, Wen H, Wang H, *et al.* RNA-Seq analysis of salinity stress-responsive transcriptome in the liver of spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*) [J]. *PloS One*, 2017, **12**(3): e0173238.
- [26] Chen K, Li E, Li T, *et al.* Transcriptome and molecular pathway analysis of the hepatopancreas in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* under chronic low-salinity stress [J]. *PloS One*, 2015, **10**(7): e0131503.
- [27] Qian J H, Li Z M, Shen Y C, *et al.* Synergistic effect of temperature and salinity on antioxidant enzymes activities of *Chlamys nobilis* [J]. *South China Fisheries Science*, 2015, **11**(6): 49-57. [钱佳慧, 栗志民, 申玉春, 等. 温度和盐度对华贵栉孔扇贝抗氧化酶活性的联合效应研究 [J]. 南方水产科学, 2015, **11**(6): 49-57.]
- [28] Lu Z, Huang W Q, Wang S, *et al.* Liver transcriptome analysis reveals the molecular responses to low-salinity in large yellow croaker *Larimichthys crocea* [J]. *Aquaculture*, 2020(517): e734827.
- [29] Hu D X, Pan L Q, Zhao Q, *et al.* Transcriptomic response to low salinity stress in gills of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. *Marine Genomics*, 2015(24): 297-304.
- [30] Liu L, Chen C, Li Y L, *et al.* Effects of short-term salinity stress on antioxidant and digestive physiology of hybrid progeny (*Cromileptes altivelis* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂) [J]. *Marina Sciences*, 2018, **42**(2): 78-87.

- [31] Zhang M L, Sun Y H, Liu Y K, *et al.* Response of gut microbiota to salinity change in two euryhaline aquatic animals with reverse salinity preference [J]. *Aquaculture*, 2016(454): 72-80.
- [32] Yao T, Wang Z P, Yan X W, *et al.* Effect of salinity on growth and survival of *Crassostrea gigas*, *C. ariakensis* and juvenile hybrids [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, **35**(5): 1581-1586. [姚托, 王昭萍, 闫喜武, 等. 盐度对长牡蛎和近江牡蛎及其杂交稚贝生长和存活的影响 [J]. 生态学报, 2015, **35**(5): 1581-1586.]
- [33] Xu Z, Gan L, Li T, *et al.* Transcriptome profiling and molecular pathway analysis of genes in association with salinity adaptation in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* [J]. *PLoS One*, 2015, **10**(8): e0136506.
- [34] Cui W X, Ma A J, Huang Z H, *et al.* Effects of salinity stress on the mRNA expression of PRL and $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ of turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. *Progress in Fishery Science*, 2017, **38**(6): 32-40. [崔文晓, 马爱军, 黄智慧, 等. 大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) PRL 基因、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 基因对盐度胁迫的响应 [J]. 渔业科学进展, 2017, **38**(6): 32-40.]
- [35] Jaffer Y D, Saraswathy R, Ishfaq M, *et al.* Effect of low salinity on the growth and survival of juvenile pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*: A revival [J]. *Aquaculture*, 2020(505): e734561.
- [36] Li C, Li N, Dong T T, *et al.* Analysis of differential gene expression in *Litopenaeus vannamei* under high salinity stress [J]. *Aquaculture Reports*, 2020(18): e100423.

EFFECTS OF SALINITY STRESS ON ANSCRIPTION AND EXPRESSION IN JUVENILE *HIPPOCAMPUS KUDA* BLEEKER

ZHANG Wen-Xin, PAN Xia, SHEN Xi-Quan and XU Yong-Jian

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ministry of Education, School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Salinity is an important environmental factor that affects the life cycle of aquatic organisms, including their growth, development and reproduction. In fish, acute salinity changes cause a series of physiological responses. *Hippocampus kuda* is an important economic resource and can adapt to a wide range of salinity levels, while the juveniles are highly sensitive to salinity stress, which may cause pathological signs or diseases by alleviating the immune roles and then lead to mass mortality. The survival rate of cultivated *H. kuda* is low in China because of the toxic effects of salinity stress on juvenile seahorse. To understand molecular mechanisms of its low survival rate, this study used high-throughput sequencing technology to analyze differentially expressed genes (DEGs) in juvenile seahorse hepatopancreatic tissues treated with normal-salinity water (CK, salinity=25‰), low-salinity water (LS-test, salinity=17‰), and high-salinity water (HS-test, salinity=31‰) respectively for 12h. According to the result of RNA-Seq, a total of 71794 uni-genes were produced among control group, high-salinity stress group and low-salinity stress group, and the sequence N50 value was 1780 bp, with an average length of 820.71 bp. Compared with the control group, there were 2740 differently expressed genes selected in high salinity group, of which 495 genes were up-regulated and 2245 were down-regulated. On the other hand, 3715 differently expressed genes were selected in low-salinity group, of which 1854 genes were up-regulated and 1861 genes were down-regulated. Ten dysregulated DEGs (*Gst*, *Bcl-2*, *Fas*, *Vlca*, *Pdha1*, *Mdh1*, *Idh3b*, *G6pd*, *Gadd45a* and *SOD*) were confirmed by qRT-PCR. According to the result of Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis, the DEGs were mainly related to metabolism and immune responses. With respect to metabolism, the low-salinity group had enhanced energy and amino acid metabolism, while high-salinity group had reduced lipid metabolism related genes expression. Both high- and low-salinity group had enhanced immune metabolism pathways. Based on our results, we collected the lipid metabolism related genes (*Fadsd6*, *Fas*, *Sqle*, *Cyp51*, *Elovl6* and *Slc27a6*), amino acid metabolism related genes (*Gluc*, *Atp6v1e1*, *Sms*, *Fadh*, *Asl*, *Ass1* and *Glud1*), energy metabolism related genes (*Vlca*, *Pdha1*, *Mdh1*, *Idh3b*, *G6pd* and *Sdh*) and immune related genes (*Gst*, *Hsp70*, *Hsp90*, *Sod*, *Bcl-2*, *Gadd45a*, *Tcrβ*, *Tap2* and *Traf3*) of *H. kuda* as genetic indicators to identify the stressor. This study will promote the discovery of the molecular mechanism of salt stress adaptation of aquatic organisms, and provides a reference for ambient salinity control in aquaculture.

Key words: *Hippocampus kuda* Bleeker; Salinity stress; Transcriptome; Differentially expressed genes