水生生物学报
ACTA HYDROBIOLOGICA SINICA

基于转录组测序的卤虫卵生和卵胎生相关基因表达研究

欧阳雪梅 郑毓毓 韩学凯 许如意 隋丽英

TRANSCRIPTOME-BASED ANALYSIS OF OVIPAROUS AND OVOVIVIPAROUS-RELATED GENE EXPRESSION IN *ARTEMIA*

OUYANG Xue-Mei, ZHENG Yu-Yu, HAN Xue-Kai, XU Ru-Yi, SUI Li-Ying

在线阅读 View online: https://doi.org/10.7541/2022.2021.0308

doi: 10.7541/2022.2021.0308

基于转录组测序的卤虫卵生和卵胎生相关基因表达研究

欧阳雪梅 郑毓毓 韩学凯 许如意 隋丽英

(天津科技大学海洋与环境学院, 亚洲区域卤虫参考中心, 天津 300457)

摘要: 为揭示卤虫(*Artemia*)不同繁殖模式的发生机制, 文章通过构建孤雌生殖卤虫卵生和卵胎生差异转录组文库并结合生物信息学分析, 对两种繁殖模式间的差异表达基因进行查找筛选, 然后利用qRT-PCR对候选繁殖模式相关基因的表达进行分析。转录组测序显示有1452个差异表达基因, 包括601个上调基因和851个下调基因。根据差异表达基因GO功能分类结果可知, 注释到生物过程、细胞组成和分子功能的unigene分别有1243、306和530个。KEGG富集分析结果显示差异基因显著富集在抗原加工和核糖体通路中。结合转录组分析, 进一步筛选得到6个生殖相关基因, 并针对不同繁殖模式下的卤虫进行qRT-PCR, 结果表明, 6个生殖相关基因在卵生卤虫卵巢中的表达量均显著高于卵胎生卤虫。此外, 对6个候选生殖相关基因编码的蛋白质保守结构域进行预测, 发现均与之前报道的相应基因保守结构域一致。综上所述, 研究所选择的6个基因可能影响参与了卤虫的生殖过程。研究结果为孤雌卤虫繁殖模式分子机制调控的研究提供了基础信息, 有助于完善卤虫的生殖生物学理论。

关键词: 转录组; 生殖相关基因; 繁殖模式; 卤虫

中图分类号: Q344^{+}.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2023)02-0323-09

小型甲壳动物卤虫(*Artemia*)广泛分布于沿海盐池和内陆盐湖高盐水体中, 是卤水生态系统食物链的重要组成部分和生物调节者[1]。卤虫具有两种生殖方式, 分别为孤雌生殖和两性生殖, 同时雌性卤虫以卵生(Oviparous, OVI)、卵胎生(Ovoviviparous, OVOVI)两种方式进行繁育, 即雌性卤虫以产休眠卵或以生产无节幼体的方式来繁殖后代[2]。

卤虫的繁殖模式可能受内在遗传因子与外部环境因素的影响[3], 对于其繁殖模式形成的分子机制研究, 主要集中在休眠卵形成相关功能基因克隆和表达方面。目前已发现多种卤虫繁殖相关基因, 如BAP1是一种参与调节G1/S期和休眠卵形成的分子, 有助于维持休眠卵的周期停滞[4]; 还鉴定了参与卤虫休眠卵形成过程的胁迫应答转录辅因子p8[5]。有研究报道, 在卤虫的卵生途径中*Afr-AMPKα*基因的mRNA表达水平显著降低, 这可能与卤虫的不同繁殖方式有关[6]。此外, 在卤虫中, 染色质组蛋白的积累可能导致细胞周期阻滞, 影响胚胎发育, 并参与卤虫休眠胚胎形成过程[7]。然而目前哪些基因在卤虫产卵或产幼过程中起关键作用还不清楚, 其不同繁殖方式产生的内在分子机制仍需进一步探究。

近年来转录组测序技术已被广泛的应用于甲壳动物发育、繁殖和免疫等方面的研究, 并用于发掘参与其各种生理过程的关键基因及信号通路[8]。在卤虫转录组学研究方面, 有报道采用转录组测序技术进行卤虫耐盐相关基因挖掘, 为研究卤虫独特的耐盐机制提供了基础资料[9]; Diego等[10]构建了雌雄差异转录组, 并开发了雌雄相关SNP标记, 为卤虫和其他甲壳类动物性别偏向基因的表达提供了重要信息。但迄今为止, 有关卤虫卵生和卵胎生不同繁殖模式的转录组学研究还未见报道, 相关的繁殖模式差异基因有待进一步发掘。因此本实验利用Illumina HiSeq 2500测序平台构建了孤雌生殖卤虫在卵生和卵胎生两种繁殖模式下的转录组文库, 并对差异表达基因进行功能注释, 筛选与卤虫生殖相关的候选基因并开展表达研究, 为揭示其不同繁

收稿日期: 2021-11-03; **修订日期:** 2022-08-02

基金项目: 天津市自然科学基金(18JCQNJC78500); 教育部长江学者和创新团队发展计划(IRT-17R81)资助 [Supported by the Natural Science Foundation of Tianjin (18JCQNJC78500); the Changjiang Scholars and Innovation Team Development Program of the Ministry of Education (IRT-17R81)]

作者简介: 欧阳雪梅(1997—), 女, 硕士研究生; 研究方向为卤水生物资源利用。E-mail: oy1505439426@163.com

通信作者: 隋丽英, 女, 博士, 教授; 研究方向为卤水生物资源利用。E-mail: suily@tust.edu.cn

殖模式的发生机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验选取新疆艾比湖孤雌生殖卤虫, 在28℃和光照条件下孵化培养。在6个1 L锥形瓶中每个饲养200只卤虫并投喂新鲜培养的盐生杜氏藻*Dunaliella salina*。根据王智超[11]在对光诱导卤虫卵生卵胎生不同繁殖模式的研究, 得到相应繁殖模式的卤虫, 以备后用。收集晚期胚胎的卵巢组织, 解剖后迅速置于液氮中, –80℃冰箱中保存, 用于分析候选生殖相关基因在不同繁殖模式的表达情况。

1.2 文库构建与测序

从卵巢组织样品中提取总RNA, 检验其浓度、纯度及完整性。在样品检测合格后, 将mRNA反转录为双链cDNA, 并将其纯化。经末端修复和接头连接后通过PCR富集得到最终的cDNA文库, 并对其质量进行检测, 然后在Illumina HiSeq 2500平台进行转录组测序[12]。

1.3 从头组装和功能注释

为获取后续分析所需的参考序列, 将测序得到的原始序列进行过滤, 首先对原始数据进行测序数据质量评估, 将带接头的、低质量的数据过滤得到测序读段, 后将获得的测序读段用Trinity[13]软件进行序列拼接, 将Trinity拼接得到的转录本序列, Corset层次聚类并去冗余后得到最长Cluster序列进行后续的分析。为获得全面的基因功能信息, 将拼接所得的序列与NR、NT、PFAM、KOG、KO、SwissProt、GO和KEGG等数据库进行比对注释[14]。

1.4 差异表达基因

将测序读段运用Bowtie 2进行比对, 利用DEGseq得到卤虫卵生和卵胎生两种繁殖模式间的差异表达基因[14], 在筛选过程中, 以q value<0.005且$\log_2$|fold_change|>1为筛选阈值。为了获得关于差异表达基因更多信息, 通过KEGG通路富集和GO功能对其进行分析[15]。

1.5 qRT-PCR分析

从转录组筛选的差异基因中, 参照转录组注释并结合文献查找筛选得到Serine/threonine-like kinase(*SLK*)、Double sex and mab-3 related transcription factor(*Dmrt*)、Feminization-1(*fem-1*)和5-hydroxytryptamine receptor gene(*5-HT*), 以及参与原始生殖细胞的迁移和维持的*Nanos*和调节成熟促进因子亚基的周期蛋白*cyclin B*等6个候选生殖相关基因并进行引物设计(表 1), 以*β-actin*作为内参基因对孤雌卤虫卵巢不同繁殖模式的mRNA表达量进行qRT-PCR检测, 采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法[16]计算目的基因在生殖腺不同繁殖模式的相对表达水平。

表 1 qRT-PCR引物

Tab. 1 qRT-PCR primers

引物Primer	序列Sequence (5′—3′)
5-HT-F	GCACCTCGAATCCCTTGAAC
5-HT-R	GAAATCTTGAGCGCCTCTGG
cyclin B-F	ACGCCACAGTCATGAAGAGA
cyclin B-R	TCTTCTCAAATGCGCAGACG
Nanos-F	TGGTGAAGCCGAATTGATGC
Nanos-R	TTTCTTTCAGCGCGTGACTT
Dmrt3-F	CTGCAACAGGAGCCTCAATC
Dmrt3-R	TGGAGTTGTAGTCGGAGTCG
fem-1-F	ACGCCTTAGAAATGCAGCAG
fem-1-R	TCACAGTCAAGACCCGTTGA
SLK-F	AAAGGCAACTCAAGCACCAG
SLK-R	ACTTCCCGTGAATGTCACCT
β-actin-F	GTGTGACGATGATGTTGCGG
β-actin-R	GCTGTCCTTTTGACCCATTCC

1.6 候选生殖相关基因的蛋白结构域和系统发育分析

通过在线软件对候选生殖相关基因进行保守结构域预测(https : //www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/docs/cdd_search.html); 采用NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)数据库对候选生殖相关基因的氨基酸序列进行BLAST比对, 分析与其他物种的相似性; 利用MEGA7.0软件将不同物种的氨基酸序列进行多重比对, 构建系统进化树。

2 结果

2.1 Unigene的组装和功能注释

从原始数据中将低质量序列剔除后, 共得到了94901316条序列, 从头组装后得到97146条unigene (表 2), 长度大于2000 bp的有12338条, 平均长度为

表 2 Unigene序列在公共数据库中的注释结果

Tab. 2 Comment results of the unigene sequence in the public database

数据库Database	注释基因数量 Number of annotated genes	注释百分比 Annotation percentage (%)
NR数据库	33184	34.15
NT数据库	12641	13.01
PFAM数据库	36049	37.10
KO数据库	20595	21.20
KOG/COG数据库	19946	20.53
Swiss-prot数据库	31480	32.40
GO数据库	36331	37.39
在所有数据库中均注释	4109	4.22
合计ALL	97146	100.00

1023 bp, N50 unigene有1558个, N90 unigene有450个。

将获得的97146条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)数据库和基因组百科全书(KEGG)七大数据库进行比对注释。结果显示, 注释率最高的是GO数据库, 达到37.39%; 注释率最低的为NT数据库中, 仅为13.01%(表 2)。转录组原始数据已上传至基因组数据中心, 登录号为: PRJNA788349。

2.2　差异表达基因分析

转录组数据分析获得卵生和卵胎生卤虫卵巢的1452个差异表达基因, 上调基因与下调基因分别为601个和851个(图 1)。

GO数据库涵盖3个方面(图 2): 生物过程(Biological process)、细胞组成(Cellular component)和分子功能(Molecular function)。统计结果显示: 注释到生物过程数据库中的差异表达基因有1243个, 其中22.84%富集在有机氮化合物代谢, 碳水化合物衍生物代谢过程占11.19%; 注释富集至分子功能数据库的有530个差异表达基因, 17.13%为结构分子活性, 几丁质结合占6.06%; 富集至细胞组分的有306个, 细胞组分占11.54%, 核蛋白复合体占7.11%, 核糖体蛋白占6.41%。

在本研究中, 对卵生、卵胎生的差异表达基因进行KEGG富集分析, 共富集到220条代谢调节通路, 挑选了富集最显著的20条信号通路条目在图 3中进行展示。表 3为卵生和卵胎生差异表达上调和下调基因富集的前10个信号通路, 其中上调富集基因数目最多的通路为蛋白质消化吸收, 下调富集基因数目最多的为核糖体通路。

从KEGG富集通路中筛选后利用NCBI比对, 挑选可能对卤虫不同生殖模式起到调控作用的基因, 并结合文献查找获得了Serine/threonine-like kinase(*SLK*)、Double sex and mab-3 related transcription factor(*Dmrt3*)、Feminization-1(*fem-1*)和5-hydroxytryptamine receptor gene(*5-HT*), 以及参与原始生殖细胞的迁移和维持的*Nanos*和调节成熟促进因子亚基的周期蛋白*cyclin B*共6个候选生殖相关基因。

2.3　候选生殖相关基因编码蛋白的保守结构域预测

对SLK蛋白的保守结构域预测发现该蛋白共包含1个结构域, 其中第334—581位氨基酸为 MPP_PPP_family结构域(图 4A)。对Dmrt3蛋白的保守结构域预测发现该蛋白共包含1个结构域, 其中第68—208位氨基酸为 DM superfamily结构域(图 4B)。对Fem-1蛋白的保守结构域预测发现该蛋白共包含5个结构域, 其中第92—183位氨基酸、第158—240位

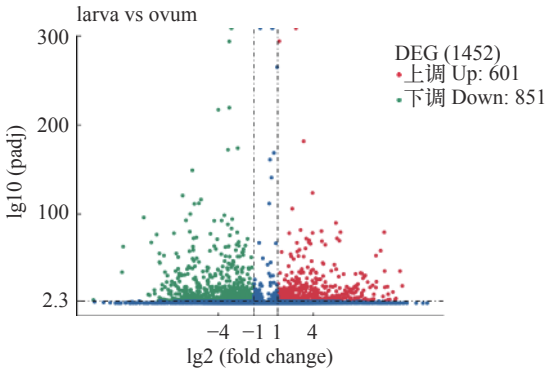

图 1　卵胎生与卵生卤虫卵巢中上调和下调的差异表达基因

Fig. 1　Up-regulated and down-regulated differentially expressed genes in ovoviviparous vs oviparous *Artemia* ovary

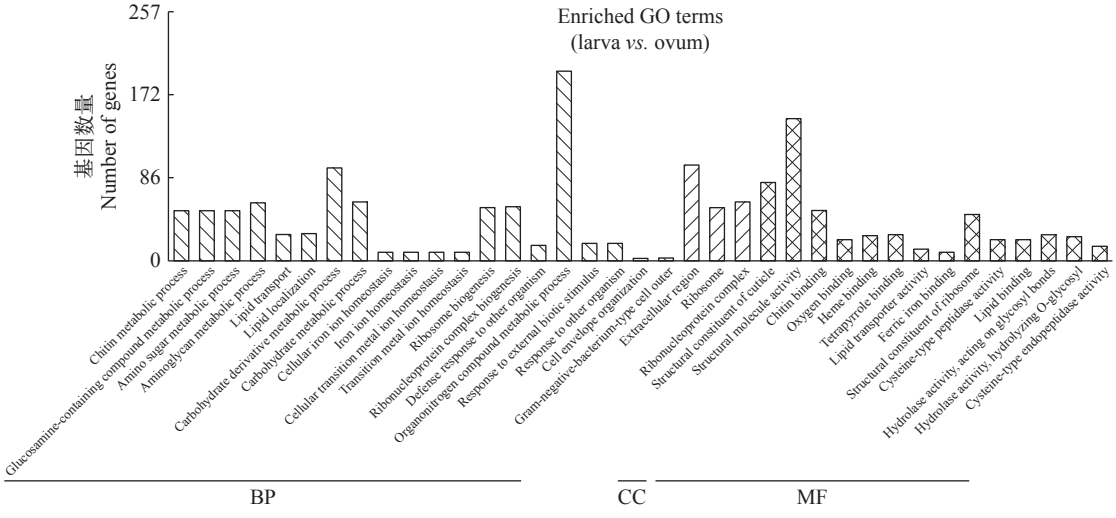

图 2　GO富集分析图

Fig. 2　Enrichment scatter diagram of GO pathway

氨基酸、第44—116位氨基酸都为Ank_2结构域, 第527—571位氨基酸为 Ank_2超家族结构域, 第486—582位氨基酸为ANKYR结构域(图 4C)。对CyclinB蛋白的保守结构域预测发现该蛋白共包含2个结构域, 其中第61—190位氨基酸为CYCLIN_CCNB1-like_rpt1结构域, 第195—315位氨基酸为CYCLIN_SF 超家族结构域(图 4D)。对5-HT蛋白的保守结构域预测发现该蛋白共包含1个结构域, 其中第32—371位氨基酸为7tmA_5-HT7结构域(图 4E)。对Nanos蛋白的保守结构域预测发现该蛋白共包含1个结构域, 其中第232—279位氨基酸为zf-nanos结构域(图 4F)。

2.4 候选生殖相关基因的相似性分析及系统进化树构建

分别对候选生殖相关基因构建系统进化树分析可知, *SLK*基因氨基酸序列与昆虫纲中的马铃薯的*SLK*序列相似性最高(图 5A)。*Dmrt3*基因氨基酸序列与两栖纲、鳃足纲(节肢动物门)相关物种的*Dmrt3*基因氨基酸序列相对较近, 其中*Dmrt3*基因与两性卤虫和盐湖卤虫的*Dmrt3*序列相似性最高(图 5B)。*fem-1*基因氨基酸序列与鳃足纲(节肢动物门)和桡足纲相关物种的*fem-1*基因氨基酸序列相对较近, 其中*fem-1*基因与两性卤虫的*fem-1*序列相似性最高(图 5C)。*cyclinB*基因氨基酸序列与辐鳍鱼纲(脂鲤科)相关物种的*cyclinB*基因氨基酸序列相对较近(图 5D)。5-*HT*基因氨基酸序列与介形虫的5-*HT*序列相似性最高(图 5E)。*Nanos*基因氨基酸序列与昆虫纲的相关物种的*Nanos*基因氨基酸序列相对较近, 其中*Nanos*基因与多胚跳小蜂和竹节虫的*Nanos*序列相似性最高(图 5F)。

2.5 qRT-PCR验证和卤虫候选生殖相关基因的表达分析

qRT-PCR的结果表明, 所选的与生殖相关候选基因在卵生和卵胎生两种繁殖模式中的表达量具有显著性差异。*SLK*、*Dmrt3*、*fem-1*、*cyclin B*、*5-HT*和*Nanos*在卤虫卵巢中的表达量均为卵生高于卵胎生(P<0.05; 图 6)。

3 讨论

3.1 转录组测序分析

本研究以卵生和卵胎生生殖方式的孤雌卤虫为材料进行转录组测序, 获得了97146条非冗余Unigene序列, 其中注释到已知基因的Unigene为37.39%, 注释率相对较低。在其他关于甲壳动物的转录组测序比对注释的报道中也出现了许多未被注释到的情况, 如日本沼虾(*Macrobrachium nipponensis*)转录组中只有23.89%为被注释的序列[17], 银色小长臂虾(*Palaemonetes argentinusfan*)中注释到的序列只有24%[18], 而凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的注释率也只有37.28%[19]。出现转录组注释率低的原因可能是在目前公共基因数据库中相关物种基因注释信息有限。而随着卤虫基因组测序结果的完成与公布, 这些潜在的与生殖相关功能基因有望得到进一步挖掘。

已有研究证实, 甲壳动物的卵巢发育受到内部因子如类固醇激素、神经多肽、神经递质以及外源环境因子的综合调控[14, 20—24]。本研究从GO富集数据库中筛选到一些参与卵泡细胞发育、卵母细胞分化、生殖细胞发育、卵壳形成和性腺发育等过程的基因, 这些基因可能参与卤虫不同繁殖模式

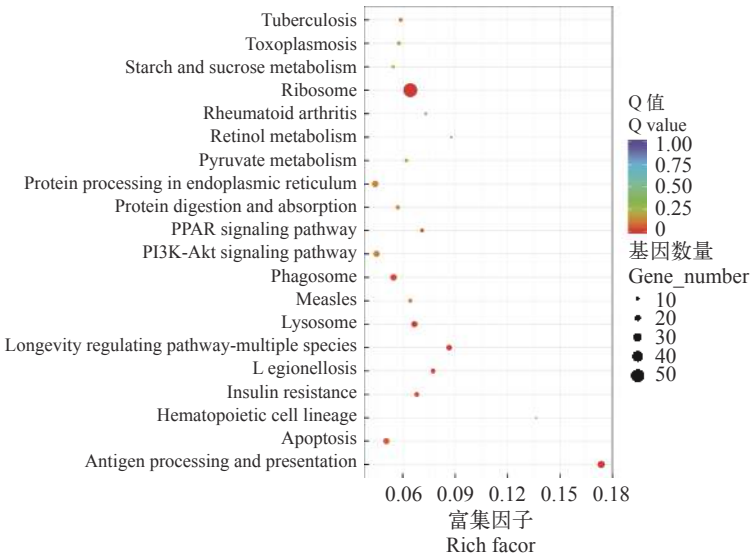

图 3 KEGG pathway富集散点图

Fig. 3 Enrichment scatter diagram of KEGG pathway

的生殖过程。Unigene在KOG真核直系同源数据库中注释到参与信号转导机制、细胞周期控制、细胞分裂、染色体分裂及核苷酸运输和代谢等相关基因, 可能与卤虫生殖有关。另外从KEGG代谢通路注释分析中, 筛选到一些代谢通路如甾体激素生物合成[25]、PI3K-Akt信号通路[26]、TGF-beta信号通路[27—29]及Wnt信号通路[30], 这些都与甲壳动物卵巢的发育和成熟相关, 因此我们推断这些代谢通路可能参与卤虫不同生殖模式的发生过程。

表 3　卤虫表达上调和下调基因富集的10个信号通路

Tab. 3　The top -ten enriched pathways of up -regulated and down-regulated unigene in *Artemia*

	通路名称 Pathway_term	富集因子 Rich_factor	*Q*值 *Q* value	基因数 Gene_number
上调表达基因 Up-regulated unigene	蛋白质消化吸收 Protein digestion and absorption	0.047619048	0.000168817	10
	阿米巴疾病 Amoebiasis	0.044025157	0.005670205	7
	叶酸生物合成 Folate biosynthesis	0.076923077	0.108059701	3
	甘油脂代谢 Glycerolipid metabolism	0.035714286	0.141920793	4
	细胞外基质受体相互作用 ECM-receptor interaction	0.027777778	0.141920793	5
	谷胱甘肽代谢 Glutathione metabolism	0.032786885	0.141920793	4
	小细胞肺癌 Small cell lung cancer	0.032520325	0.141920793	4
	PI3K-Akt信号通路PI3K-Akt signaling pathway	0.017130621	0.141920793	8
	化学致癌作用 Chemical carcinogenesis	0.044776119	0.141920793	3
	肾素-血管紧张素系统Renin-angiotensin system	0.044117647	0.141920793	3
下调表达基因 Down-regulated unigene	核糖体 Ribosome	0.063157895	4.68E-12	54
	抗原处理和呈递 Antigen processing and presentation	0.159722222	4.68E-12	23
	长寿调节途径-多种生物 Longevity regulating pathway-multiple species	0.081730769	5.20E-05	17
	溶酶体 Lysosome	0.063333333	0.00030973	19
	军团菌病 Legionellosis	0.077348066	0.000509087	14
	胰岛素抵抗 Insulin resistance	0.067961165	0.001609763	14
	细胞凋亡 Apoptosis	0.048192771	0.003953602	20
	麻疹Measles	0.064327485	0.011564643	11
	吞噬体 Phagosome	0.044776119	0.014675213	18
	弓形虫病 Toxoplasmosis	0.057803468	0.034988835	10

3.2　生殖相关候选基因表达分析

卤虫产卵和产幼的机制复杂, 可能与*p26*基因[31]、卵壳[32]、卵黄蛋白和外部环境因素有关[3, 33]。本研究的不同生殖模式中的319个差异表达基因显著富集至抗原处理和呈递、内质网蛋白加工过程、PI3K-Akt信号通路、核糖体、吞噬体等KEGG通路中, 这些代谢通路对于卤虫生长发育相关蛋白的合成和转运起到调控作用。为进一步探究这些过程是否与卤虫不同繁殖模式的生殖过程有关, 从这些通路中筛选到了可能与卤虫不同生殖模式相关的候选基因*SLK*、*Dmrt3*、*cyclin B*、*Nanos*、*fem-1*和*5-HT*, 对卤虫在不同繁殖模式下生殖相关基因进行了蛋白结构域预测和表达情况分析。研究发现上述6个基因预测得到的蛋白结构域与之前报道的相应基因保守结构域一致, 且均与生殖相关。这预示着本研究所选6个生殖候选基因在卤虫中可能同样参与生殖发育过程。

在关于卵胎生卤虫研究中发现, *SLK*主要参与调控细胞周期、细胞凋亡等过程[34], 并且胚胎发育时期SLK蛋白表达量比卵母细胞发育时期高[35]。对*Artemia franciscana*的雌虫及雄虫做转录组分析发现, *Dmrt*相关基因调控性腺分化过程中蜕皮素的生物合成, 并参与性别决定过程, 表明卤虫中*Dmrt*基因参与生殖腺的早期发育[36]。对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)*fem-1*基因研究发现, 该基因的表达量在卵巢组织和睾丸组织中最高, 并且在早期胚胎发育时高度表达, 说明该基因对于性腺发育后期有潜在作用, 同时与中华绒螯蟹的生殖密切相关[37]。在克氏原螯虾(*Procarabarus clarkii*)中发现*cyclin B*基因在细胞分化、脂质转运体活性和减数分裂周期过程中都发挥着重要作用, 说明*cyclin B*在甲壳类卵母细胞成熟调控中起着不可或缺的翻译激活作用[38]。5-HT既是神经递质又是神经激素, 存在于卵巢和雄激素腺中, 并对性腺成熟产生影响。*5-HT*基因在远洋梭子蟹(*Portunus pelagicus*)的中枢神经系统和卵巢中存在, 并可能通过作用于中枢神经系统的某些生殖激素对远洋梭子蟹的繁殖起着关键作用[39]。*Nanos*基因在成年雌性斑马鱼(*Brachydanio rerio*)生殖系的初期卵母细胞中表达, 对于斑马鱼卵母细胞的持续产生起着重要作用[40]; 在多倍体银鲫(*Carassius gibelio*)中发现, *Nanos2*在生殖干细胞中呈现出偏向表达的特征, 调控卵巢早期胞囊的发

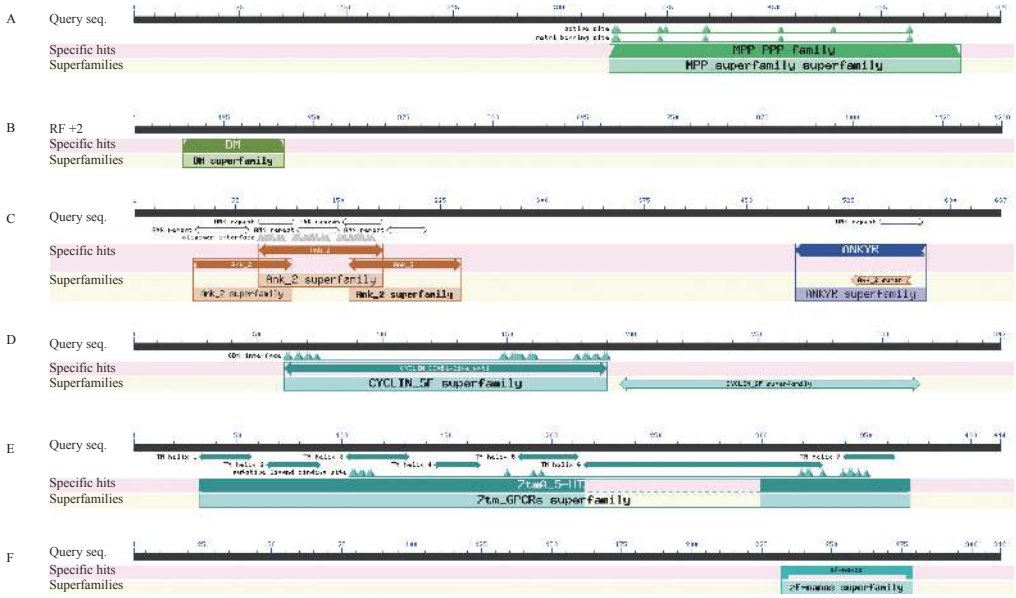

图 4 SLK、Dmrt3、Fem-1、CyclinB、5-HT和Nanos蛋白保守结构域预测

Fig. 4 Prediction of conservative domains of SLK, Dmrt3, Fem-1, CyclinB, 5-HT and Nanos proteins

A. SLK蛋白; B. Dmrt3蛋白; C. Fem-1蛋白; D. CyclinB蛋白; E. 5-HT蛋白; F. Nanos蛋白

A. SLK protein; B. Dmrt3 protein; C. Fem-1 protein; D. CyclinB protein; E. 5-HT protein; F. Nanos protein

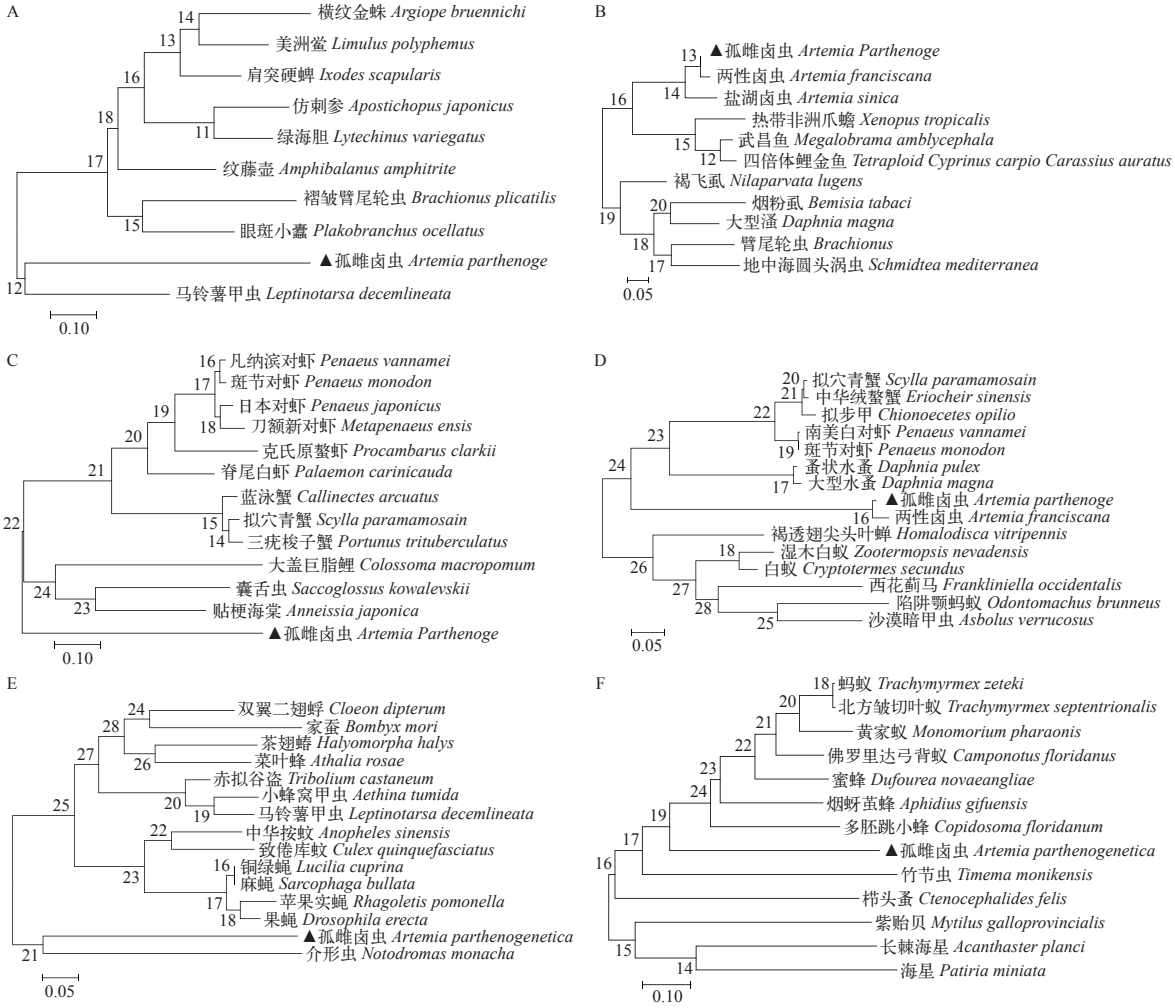

图 5 SLK、Dmrt3、Fem-1、CyclinB、5-HT和Nanos蛋白系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of SLK, DMRT3, Fem-1, CyclinB, 5-HT and Nanos proteins

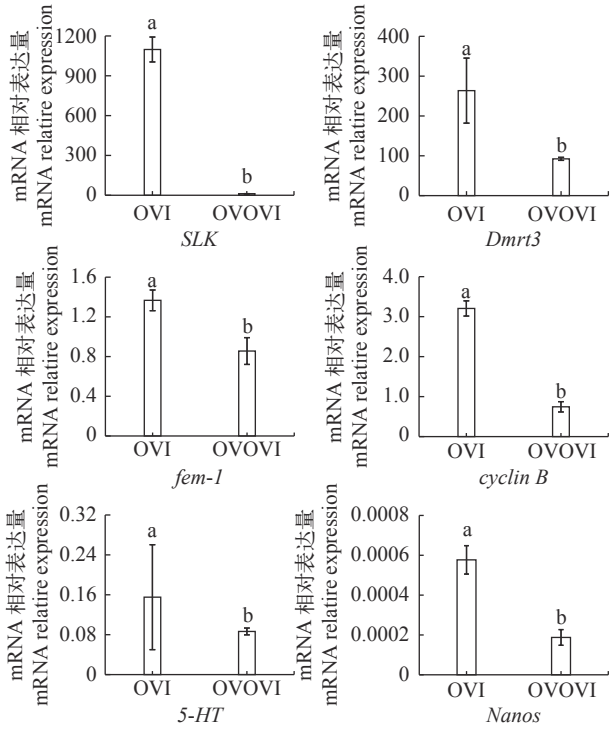

图 6　*SLK*、*Dmrt3*、*fem-1*、*cyclinB*、*5-HT*和*Nanos*基因在不同繁殖模式下的表达情况

Fig. 6　Expression of *SLK*, *Dmrt3*, *fem-1*, *cyclinB*, *5-HT* and *Nanos* genes in different reproductive modes of *Artemia* oocysts

相同字母表示差异不显著(P>0.05); 不同字母表示差异极显著(P<0.01); OVI. 卵生; OVOVI. 卵胎生

The same letter indicate no significant difference (P>0.05); the difference between different letters is the extremely remarkable difference (P<0.01); OVI: oviparous; OVOVI. ovoviviparous

育过程[41]。在本研究中, 通过实时荧光定量PCR得到*SLK*、*Dmrt*、*fem-1*、*cyclin B*、*5-HT*和*Nanos*的表达情况, 在卤虫不同繁殖模式下, 以上基因在卤虫卵生繁殖模式中的表达量均显著高于卵胎生表达量, 因此推测这些基因可能更多参与卤虫休眠卵形成过程。

4　结论

利用高通量测序技术分析了卤虫卵生和卵胎生差异转录组文库, 结合KEGG富集通路及GO功能分类对两种繁殖模式间的差异表达基因进行了分析。挑选6个生殖相关候选基因, 分别对其蛋白结构域进行预测并分析其在不同生殖模式下的表达情况, 发现*SLK*、*Dmrt3*、*cyclin B*、*fem-1*、*5-HT*和*Nanos*在卵生卤虫卵囊的表达量显著高于卵胎生卤虫, 说明这些基因可能更多地参与卤虫休眠卵形成过程, 影响卤虫卵生繁殖模式形成。在后续研究中将进一步利用RNAi技术精确地靶向敲降目的基因, 检测出下游基因表达量的变化, 并结合蛋白印迹技术对目标基因功能进行深入研究。

参考文献:

[1] Dattilo A M, Bracchini L, Carlini L, *et al*. Estimate of the effects of ultraviolet radiation on the mortality of *Artemia franciscana* in naupliar and adult stages [J]. *International Journal of Biometeorology*, 2005, **49**(6): 388-395.

[2] Liang P, MacRae T H. The synthesis of a small heat shock/alpha-crystallin protein in *Artemia* and its relationship to stress tolerance during development [J]. *Developmental Biology*, 1999, **207**(2): 445-456.

[3] Chen S, Chen D F, Yang F, *et al*. Characterization and processing of superoxide dismutase-fused vitellogenin in the diapause embryo formation: a special developmental pathway in the brine shrimp, *Artemia parthenogenetica* [J]. *Biology of Reproduction*, 2011, **85**(1): 31-41.

[4] Yang F, Jia S N, Yu Y Q, *et al*. Deubiquitinating enzyme BAP1 is involved in the formation and maintenance of the diapause embryos of *Artemia* [J]. *Cell Stress and Chaperones*, 2012, **17**(5): 577-587.

[5] Qiu Z, MacRae T H. Developmentally regulated synthesis of p8, a stress-associated transcription cofactor, in diapause-destined embryos of *Artemia franciscana* [J]. *Cell Stress & Chaperones*, 2007, **12**(3): 255-264.

[6] Zhu X J, Feng C Z, Dai Z M, *et al*. *AMPK* alpha subunit gene characterization in *Artemia* and expression during development and in response to stress [J]. *Stress*, 2007, **10**(1): 53-63.

[7] Zhou R, Yang F, Chen D F, *et al*. Acetylation of chromatin-associated histone H3 lysine 56 inhibits the development of encysted *Artemia* embryos [J]. *PLoS One*, 2013, **8**(6): e68374.

[8] Maher C A, Kumar-Sinha C, Cao X, *et al*. Transcriptome sequencing to detect gene fusions in cancer [J]. *Nature*, 2009, **458**(7234): 97-101.

[9] De Vos S, van Stappen G, Sorgeloos P, *et al*. Identification of salt stress response genes using the *Artemia* transcriptome [J]. *Aquaculture*, 2019(500): 305-314.

[10] Valenzuela-Miranda D, Gallardo-Escárate C, Valenzuela-Muñoz V, *et al*. Sex-dependent transcriptome analysis and single nucleotide polymorphism (SNP) discovery in the brine shrimp *Artemia franciscana* [J]. *Marine Genomics*, 2014(18): 151-154.

[11] Wang Z C. The diapause induction of parthenogenetic *Artemia*-studies on combined effects of environmental factors, sensitive stages, and expression of related proteins [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2015. [王智超. 光周期、盐度、温度对孤雌卤虫的滞育诱导效应研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015.]

[12] Cao J M, Li S C, He D. Transcriptome analysis of *Salix matsudana* under cadmium stress [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2020, **36**(7): 1365-1377. [曹继敏, 李双财, 何德. 镉胁迫后旱柳转录组变化分析 [J]. 生物工程

学报, 2020, **36**(7): 1365-1377.]

[13] Grabherr M G, Haas B J, Yassour M, *et al*. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome [J]. *Nature Biotechnology*, 2011, **29**(7): 644-652.

[14] Liu H F, Lu L S, Wang J, *et al*. Transcriptome analysis of spotted steed (*Hemibarbus maculatus* Bleeker) to identify genes related to ovary development [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, **43**(8): 1714-1722. [刘慧芬, 卢良盛, 王静, 等. 基于转录组测序技术筛选花鳉卵巢发育相关基因 [J]. 水产学报, 2019, **43**(8): 1714-1722.]

[15] Jiang H X, Liu H F, Ma X, *et al*. Transcriptome analysis of *Procambarus clarkii* oscreen genes related to ovary development, immunity and growth [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, **45**(3): 396-414. [江红霞, 刘慧芬, 马晓, 等. 转录组测序筛选克氏原螯虾卵巢发育、免疫和生长相关基因 [J]. 水产学报, 2021, **45**(3): 396-414.]

[16] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method [J]. *Nature Protocols*, 2008, **3**(6): 1101-1108.

[17] Jiang H, Li X, Sun Y, *et al*. Insights into sexual precocity of female oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* through transcriptome analysis [J]. *PLoS One*, 2016, **11**(6): e0157173.

[18] Oliphant A, Alexander J L, Swain M T, *et al*. Transcriptomic analysis of crustacean neuropeptide signaling during the moult cycle in the green shore crab, *Carcinus maenas* [J]. *BMC Genomics*, 2018, **19**(1): 711.

[19] Dong L J, Meng X H, Kong J, *et al*. Screening of differentially expressed genes related to the cold tolerance in *Litopenaeus vannamei* based on high-throughput transcriptome sequencing [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, **26**(1): 161-171. [董丽君, 孟宪红, 孔杰, 等. 基于转录组分析筛选凡纳滨对虾低温胁迫下的差异表达基因 [J]. 中国水产科学, 2019, **26**(1): 161-171.]

[20] Muhd-Farouk H, Jasmani S, Ikhwanuddin M. Effect of vertebrate steroid hormones on the ovarian maturation stages of orange mud crab, *Scylla olivacea* (Herbst, 1796) [J]. *Aquaculture*, 2016(451): 78-86.

[21] Tomy S, Saikrithi P, James N, *et al*. Serotonin induced changes in the expression of ovarian gene network in the Indian white shrimp, *Penaeus indicus* [J]. *Aquaculture*, 2016(452): 239-246.

[22] Wu W F, Chen L L, Li Y J, *et al*. Effects of tributyltin on the activities of immunologic enzyme in blood serum of the *Macrobrachium rosenbergill* [J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2014, **34**(3): 17-21. [吴维福, 陈娈娈, 李郁娇, 等. 三丁基锡对罗氏沼虾血清中免疫酶活力的影响 [J]. 广东海洋大学学报, 2014, **34**(3): 17-21.]

[23] Qiao H, Xiong Y, Zhang W, *et al*. Characterization, expression, and function analysis of gonad-inhibiting hormone in Oriental River prawn, *Macrobrachium nipponense* and its induced expression by temperature [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2015(185): 1-8.

[24] Warrier S, Subramoniam T. Receptor mediated yolk protein uptake in the crab *Scylla serrata*: crustacean vitellogenin receptor recognizes related mammalian serum lipoproteins [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2002, **61**(4): 536-548.

[25] Chambard J C, Lefloch R, Pouysségur J, *et al*. ERK implication in cell cycle regulation [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2007, **1773**(8): 1299-1310.

[26] Halm S, Ibañez A J, Tyler C R, *et al*. Molecular characterisation of growth differentiation factor 9 (*gdf9*) and bone morphogenetic protein 15 (*bmp15*) and their patterns of gene expression during the ovarian reproductive cycle in the European sea bass [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2008, **291**(1/2): 95-103.

[27] Patnaik S, Mohanty M, Bit A, *et al*. Molecular characterization of Activin Receptor Type IIA and its expression during gonadal maturation and growth stages in rohu carp [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2017(203): 1-10.

[28] Wang Z P, Mu X Y, Guo M, *et al*. Transforming growth factor-β signaling participates in the maintenance of the primordial follicle pool in the mouse ovary [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, **289**(12): 8299-8311.

[29] Wu X Y, Gong X Y, Tan S L, *et al*. Preliminary study on the molecular signaling regulation mechanism in *Rhopilema esculentum* polyps strobilation induced by low temperature [J]. *Marine Environmental Science*, 2021, **40**(1): 66-72. [吴晓雅, 龚先宇, 谭树亮, 等. 低温诱导海蜇螅状体横裂生殖的分子信号调控机制初探 [J]. 海洋环境科学, 2021, **40**(1): 66-72.]

[30] Everaert C, Luypaert M, Maag J L V, *et al*. Benchmarking of RNA-sequencing analysis workflows using whole-transcriptome RT-qPCR expression data [J]. *Scientific Reports*, 2017(7): 1559.

[31] Clegg J S, Willsie J K, Jackson S A. Adaptive significance of a small heat shock/α-crystallin protein (p26) in encysted embryos of the brine shrimp, *Artemia franciscana* [J]. *American Zoologist*, 2015, **39**(6): 836-847.

[32] Dai L, Chen D F, Liu Y L, *et al*. Extracellular matrix peptides of *Artemia* cyst shell participate in protecting encysted embryos from extreme environments [J]. *PLoS One*, 2011, **6**(6): e20187.

[33] Yang F, Chen S, Dai Z M, *et al*. Regulation of trehalase expression inhibits apoptosis in diapause cysts of *Artemia* [J]. *The Biochemical Journal*, 2013, **456**(2): 185-194.

[34] Strange K, Denton J, Nehrke K. Ste20-type kinases: evolutionarily conserved regulators of ion transport and cell volume [J]. *Physiology* (*Bethesda*), 2006(21): 61-68.

[35] Jo E, Lee S J, Choi E, *et al*. Sex-biased gene expression and isoform profile of brine shrimp *Artemia franciscana*

by Transcriptome Analysis [J]. *Animals* (*Basel*), 2021, **11**(9): 2630.

[36] Zhou R, Sun Y X, Yang W J, *et al*. Identification and characterization of a Ste20-like kinase in *Artemia* and its role in the developmental regulation and resistance to environmental stress [J]. *PLoS One*, 2014, **9**(3): e92234.

[37] Song C, Cui Z, Hui M, *et al*. Molecular characterization and expression profile of three *Fem-1* genes in *Eriocheir sinensis* provide a new insight into crab sex-determining mechanism [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2015(189): 6-14.

[38] Shui Y, Liu G F, Xu Z H, *et al*. Exploring potential proteins associated with *cyclin B* 3′UTR in *Procambarus clarkii* oocytes [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019, **517**(3): 458-462.

[39] Nakeim J, Kornthong N, Saetan J, *et al*. Presence of serotonin and its receptor in the central nervous system and ovary and molecular cloning of the novel crab serotonin receptor of the blue swimming crab, *Portunus pelagicus* [J]. *Acta Histochemica*, 2020, **122**(1): 151457.

[40] Draper B W, McCallum C M, Moens C B. *nanos1* is required to maintain oocyte production in adult zebrafish [J]. *Developmental Biology*, 2007, **305**(2): 589-598.

[41] Zhang Q Q, Zhou L, Li Z, *et al*. Allelic diversification, syntenic alignment and expression patterns of *nanos2* in polyploid gibel carp [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, **44**(5): 1087-1096. [张琴琴, 周莉, 李志, 等. 多倍体银鲫*nanos2*等位多态性、共线性和表达模式分析 [J]. 水生生物学报, 2020, **44**(5): 1087-1096.]

TRANSCRIPTOME-BASED ANALYSIS OF OVIPAROUS AND OVOVIVIPAROUS-RELATED GENE EXPRESSION IN *ARTEMIA*

OUYANG Xue-Mei, ZHENG Yu-Yu, HAN Xue-Kai, XU Ru-Yi and SUI Li-Ying

(*Asia Regional Artemia Reference Center*, *College of Marine and Environmental Sciences*, *Tianjin University of Science and Technology*, *Tianjin* 300457, *China*)

Abstract: *Artemia* is not only one of the most important live feed for larvi culture, but also an ideal experimental organism for scientific research. Female *Artemia* produce either nauplii via ovoviviparous pathway or diapause cyst via oviparous pathway. In order to reveal the mechanism of different reproductive modes of *Artemia*, the reproductive differential transcriptomes of parthenogenetic *Artemia* were constructed, bioinformatics analysis were performed to screen reproductive differential expression genes, and the gene expression patterns were studied by using qRT-PCR. Transcriptome analysis showed that there were 1452 differentially expressed genes, of which 601 genes were up-regulated and 851 down-regulated in the abscising carpopodium. According to GO function classification, 1243306 and 530 unigene were annotated into biological process, cell composition and molecular function respectively. KEGG enrichment analysis showed that differential genes were significantly enriched in antigen processing and ribosome pathways. Combined with transcriptome data and qRT-PCR analysis, six reproductive-related genes were screened and verified. The results showed that all the six reproductive-related genes had higher expression in oviparous *Artemia* than in ovoviviparous *Artemia*. In addition, the conserved domains of the proteins encoded by six candidate reproductive related genes were predicted and phylogenetic trees were constructed respectively. The results showed that the protein domains were consistent with the previously reported reproductive genes. Over all, our study indicated that the selected six genes may influence the reproductive process of *Artemia*. This study provides valuable information for dissecting the molecular mechanism of reproductive pattern in the parthenogenetic *Artemia*, and may also help to refine the reproductive biological theory of *Artemia*.

Key words: Transcriptome; Reproductive-related genes; Reproductive mode; *Artemia*