

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220113001

http://www.yykxjz.cn/

王旭江, 么宗利, 来琦芳, 于明超, 李新苍, 高鹏程, 周凯, 崔青曼, 刘一萌, 孙真, 李燕. 长期高碱胁迫下凡纳滨对虾基因表达差异研究. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 22-32

WANG X J, YAO Z L, LAI Q F, YU M C, LI X C, GAO P C, ZHOU K, CUI Q M, LIU Y M, SUN Z, LI Y. Transcriptomic analysis of *Litopenaeus vannamei* during long-term exposure to high alkaline water. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(4): 22-32

长期高碱胁迫下凡纳滨对虾基因表达差异研究*

王旭江^{1,2} 么宗利^{2①} 来琦芳² 于明超³ 李新苍² 高鹏程²
周凯² 崔青曼¹ 刘一萌² 孙真² 李燕²

(1. 天津科技大学海洋与环境学院 天津 300457; 2. 中国水产科学研究院东海水产研究所 农业农村部低洼盐碱地水产养殖重点实验室 盐碱水域渔业工程技术研究中心(上海) 上海 200090; 3. 通威股份有限公司 成都 610093)

摘要 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)具有较强的环境适应能力,对盐碱水环境有一定的耐受性,但在高 pH、高碱环境下的存活率不稳定。为探究凡纳滨对虾对长期高碱胁迫的响应机制,本研究以低碱对照组(LSW:碳酸盐碱度为 3 mmol/L,盐度为 6, pH 为 8.1)和高碱胁迫组(AW:碳酸盐碱度为 10 mmol/L,盐度为 6, pH 为 8.8)养殖 42 d 的凡纳滨对虾肠道和鳃组织作为实验材料,通过 Illumina 平台进行转录组测序,对测序数据进行拼接、注释,进而筛选、分析高碱胁迫下的差异表达基因及调控通路并进行定量 PCR 验证。结果显示,2 个组织共同差异表达基因有 243 个,其中,98 个表达上调,145 个表达下调。肠道中差异表达基因主要集中在糖代谢、碳水化合物消化吸收、胆汁分泌、ABC 跨膜转运、紧密连接以及免疫调节等途径。鳃中差异表达基因主要集中在谷胱甘肽代谢、碳酸氢盐转运、精氨酸合成、糖代谢以及离子转运等相关途径。进一步筛选获得 10 个最显著的差异表达基因,经 qRT-PCR 验证发现,凡纳滨对虾鳃中碳酸酐酶(CA1、CA10)、蜕皮激素诱导蛋白(Eip74EF)、β-半乳糖基转移酶(UGT8)基因在高碱胁迫下均表达下调,而 Na⁺/K⁺-ATPase-α(NKA-α)、Na⁺/K⁺ transporting ATPase interacting(NKAIN)、氨转运蛋白(Rhbg)、苹果酸脱氢酶(MDH)等基因表达上调,与转录组表达趋势一致,推测其可能参与了对虾高碱胁迫下的应激响应。凡纳滨对虾表现出较强的高碱适应性,可能是通过下调鳃中 CA 的表达,补偿体内碱中毒,上调 Rh 氨转运蛋白防止氨在体内积累,上调 NKA 相关基因维持体内渗透平衡;但蜕皮激素诱导蛋白(Eip74EF)显著下调,推测其蜕皮功能受到影响。本研究为深入探讨凡纳滨对虾在长期高碱胁迫条件下的生理响应机制提供了基础数据。

关键词 凡纳滨对虾; 转录组; 碳酸盐碱度; 差异表达基因

中图分类号 S603.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2022)04-0022-11

我国拥有丰富的盐碱水资源,其高 pH、高碳酸盐碱度水质特征制约了水生动物的生存、生长和繁

殖。凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)具有较强的抗逆性,在盐碱水中有一定的耐受性。短期盐碱胁迫下,

* 国家重点研究计划(2019YFD0900404)和中国水产科学研究院基本科研业务费(2021XT0401; 2020TD52)共同资助 [This work was supported by the National Key Research Program (2019YFD0900404), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2021XT0401; 2020TD52)]. 王旭江, E-mail: 2694786690@qq.com

① 通信作者: 么宗利, 研究员, E-mail: yaozli@ccsf.ac.cn

收稿日期: 2022-01-13, 收修改稿日期: 2022-04-01

凡纳滨对虾碳酸酐酶(CA)、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 等离子调控类基因差异表达,以增强离子调节的方式进行酸碱和渗透平衡的调控(么宗利等, 2010、2012),但针对长期高碱胁迫下凡纳滨对虾的基因调控研究相对较少。目前,虽然盐碱水凡纳滨对虾养殖取得一定成功,但养殖存活率不稳定,凡纳滨对虾耐盐碱选育鲜有报道。国内通过引进、消化、吸收和自主创新,建立了基于规模化家系的“水产动物多性状复合育种技术”(张天时, 2010),选育的优良性状包括抗病(黄永春等, 2013)、耐低温(景福涛等, 2006)、耐盐碱(李明栋等, 2021)、耐低盐度(郝登春等, 2018)、养殖存活率(孔杰等, 2017)等,为实现凡纳滨对虾良种本土化打下了良好的基础。为有效利用盐碱水资源,迫切需要开展凡纳滨对虾耐盐碱选育工作,从而促进凡纳滨对虾盐碱水养殖业的健康发展。

水生生物耐盐碱性状由多基因互相作用协同控制(么宗利等, 2010),其分子响应机制是一个复杂的过程。研究发现,耐盐碱性状具有一定的遗传潜力,在尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、瓦氏雅罗鱼(*Leuciscus waleckii*)、脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)等水产动物中获得了若干耐盐碱功能基因(唐首杰等, 2018; Chang *et al.*, 2021; 李明栋等, 2021),但功能位点尚不清晰。随着基因组学和生物信息学的高速发展,高通量测序技术逐渐成熟,并广泛应用于功能基因挖掘、分子标记筛选及信号转导等研究中,为耐盐碱响应机制的研究提供了有效的技术手段。其中,转录组测序可以针对各种环境条件下的物种细胞或组织进行高通量测序,并对测序结果进行基因结构分析和功能注释,分析特定条件下相关基因的表达水平,以揭示其代谢网络及调控响应机理(Sims *et al.*, 2014)。本研究采用高通量测序技术对 2 种处理下的凡纳滨对虾肠道和鳃组织进行转录组测序,筛选长期高碱胁迫下差异表达基因以及与盐碱胁迫相关代谢通路,为解析凡纳滨对虾耐盐碱调控机制提供基础数据,同时为盐碱水环境下凡纳滨对虾分子辅助育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用凡纳滨对虾取自通威股份有限公司 2020 年 5 月培育的 G10 代育种群体。对现有 20 个凡纳滨对虾家系进行驯化、筛选、荧光标记后,进行 96 h 高碱急性胁迫实验,依据实验结果,开展 42 d 的高碱胁迫实验。挑选活力相对较好、个体规格比较一

致的凡纳滨对虾作为实验用虾,起始平均体长为 (7.2 ± 0.5) cm,体重为 (4.7 ± 0.6) g。

1.2 碳酸盐碱度胁迫实验

碳酸盐碱度胁迫实验于 2020 年 8 月开始,每个家系挑选规格相对一致的凡纳滨对虾 96 尾,设置低碱对照组(LSW)和高碱胁迫组(AW),每组设置 3 个平行(每个平行 16 尾),每个平行单独放置在 $50\text{ cm}\times 50\text{ cm}\times 50\text{ cm}$ 网箱中养殖。AW 组养殖用水通过添加相应的 Na_2CO_3 和 NaHCO_3 配制而成(碳酸盐碱度为 10 mmol/L,盐度为 6, pH=8.8),LSW 组为对照组(碳酸盐碱度为 3 mmol/L,盐度为 6, pH=8.1)。为保证实验组盐碱水碳酸盐碱度和 pH 稳定,每隔 24 h 换水 50%。经过 42 d 的养殖,选择一个高碱敏感家系[养殖存活率为 $(42.5\pm 8.33)\%$]取样,LSW 和 AW 每组每个平行各取 6 尾虾[体长为 (9.8 ± 0.8) cm,体重为 (9.6 ± 0.9) g],活体解剖,取鳃和肠道组织放入 RNA 保存液保存备用,其中,3 尾用于转录组测序,3 尾用于后期 qRT-PCR 验证。

1.3 RNA 提取及转录组测序

按照常规 Trizol 法提取每尾虾的鳃和肠道组织总 RNA。通过 1% 琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop ND-2000 分光光度计(Thermo, 美国)检测 RNA 质量及浓度。总 RNA 浓度 $>250\text{ ng}/\mu\text{L}$, $\text{OD}_{260\text{ nm}}/\text{OD}_{280\text{ nm}}$ 介于 1.8~2.2 之间,确保 RNA 无降解、无污染,然后,进行文库构建和高通量测序(Hiseq 2500, Illumina, 美国)。

1.4 转录组序列组装及注释

测序原始数据经过质量分析,去除带接头、低质量和 N(无法确定碱基信息)比例大于 10% 的序列,质控后的序列用 Trinity 软件进行拼接,每个基因以拼接得到的最长序列为该基因序列(unigene) (Grabherr *et al.*, 2011)。转录组测序数据用 CASAVA Base Calling 软件、RSEM 软件分析,并利用 HISAT2 将 Clean Reads 与指定参考基因组(ASM378908v1-NCBI)进行序列比对,获取在参考基因组或基因上的位置信息以及测序样本特有的序列特征信息。

1.5 差异表达分析及差异基因富集分析

采用 FPKM 方法计算基因表达量(Trapnell *et al.*, 2010)。利用 R 语言 DESeq 软件包筛选差异表达基因(DEGs),筛选阈值为 fold change >2 和 $Q < 0.05$ (Anders *et al.*, 2010)。对于 DEGs,依据测序结果中的基因 GO (gene ontology)功能注释(Young *et al.*, 2010),

并结合 KEGG 数据库分析差异显著基因参与的代谢通路(Kanehisa *et al*, 2008)。

1.6 qRT-PCR 验证

为了进一步验证转录组数据,选取 10 个差异倍数较大的 DEGs 进行鳃组织 qRT-PCR 验证分析,其中包含 5 个上调和 5 个下调表达的基因。利用 Primer

5.0 软件设计特异性引物(表 1),送交生工生物工程(上海)股份有限公司合成。qRT-PCR 实验采用 TaKaRa 相对荧光定量试剂盒,以 18S rRNA 为内参基因,每个样品 3 次重复,验证所用样品为前期实验经过相同处理的平行样品。利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析基因的相对表达量(Schmittgen *et al*, 2008),与转录组表达数据进行比较分析。

表 1 用于转录组表达验证的引物序列
Tab.1 Genes and primers used for validation of RNA-seq data

基因名称 Gene name	引物名称 Primer name	序列 Sequence (5'~3')
<i>18S rRNA</i>	18S F	TATACGCTAGTGGAGCTGGAA
	18S R	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT
<i>Eip74EF</i>	LOC113800214 F	CAACCATAGCAAGCGACACAAG
	LOC113800214 R	CCACCAGGATCAAGGCAAGAG
<i>CA1</i>	LOC113803091 F	ACGGAGAGCACCACATTGAAG
	LOC113803091 R	GCAGTCAGCGAACCATAAATCAG
<i>Hex-t2</i>	LOC113805141 F	CGTCCGCACAGAATATGATAACAC
	LOC113805141 R	CACCAGCCGCACGATAACC
<i>UGT8</i>	LOC113808551 F	CGCTGGTGCTGGTCAACTC
	LOC113808551 R	CAGGTGCTGGTTCGCTCATG
<i>CA10</i>	LOC113830158 F	TGACCTTCTACCATCTTCACATCC
	LOC113830158 R	GCAAGCCACGGACAGACAG
<i>NKAIN</i>	LOC113812436 F	ATCATCGCCAATTCTTCAACTTC
	LOC113812436 R	CCTATCCATAACCAGGAGCCAAAC
<i>Nmdar1</i>	LOC113812935 F	GCCGCCGACAAGTGGAGAG
	LOC113812935 R	TCACGCCGTTTCGCTTCAG
<i>NKA-α</i>	LOC113815921 F	GTGTAGAATTGGCTGTTGGTGATG
	LOC113815921 R	CGGTCTCGTGGATGGATACTTG
<i>MDH</i>	LOC113820403 F	TCTGCCACCGTACCTCTG
	LOC113820403 R	GCTGCCTGACCACGAGTAAC
<i>Rhbg</i>	LOC113816830 F	GAAGGCAGCAGACGACATCC
	LOC113816830 R	CACACTCCATTCAGGACATTCATC

2 结果与分析

2.1 转录组测序数据质量评估

转录组测序分析共完成 12 个样本的有参转录组测序,获得 75.62 Gb 的 Clean data,各样本有效数据量在 5.72~7.01 Gb,碱基 Q30 在 92.83%~93.47%,平均 GC 含量为 47.76%,说明测序质量符合生物信息学分析要求,测序数据质量如表 2 所示。

2.2 转录组测序 Reads 基因组比对结果

通过将 Clean reads 比对到参考基因组,得到各个样本的基因组比对情况,比率为 80.93%~91.2%。基于比对结果,进行蛋白编码基因表达量分析。根据

蛋白编码基因在不同样本中的表达量进行差异筛选,设有肠道和鳃 2 个差异分组,其检测到的差异基因数量分别为 2480 和 1699,共同差异表达基因为 243 个(图 1)。

对 AW 和 LSW 的差异表达基因分析结果绘制火山图(图 2)。结果显示,在高碱胁迫条件下,肠道组织有 1224 个基因表达上调,有 1256 个基因表达下调;鳃组织有 613 个基因表达上调,1086 个基因表达下调。将 2 个组织在高碱胁迫下的差异表达基因进行比较,2 个组织有 243 个共同的差异表达基因,其中,98 个基因上调表达,145 个基因下调表达,这 243 个共同的差异表达基因可能与高碱胁迫下凡纳滨对虾组织间协同调控分子机制有关。

表 2 样品测序数据与组装结果统计
Tab.2 Summary of sequencing and transcriptome assembly

样本 Sample	原始数据 Raw reads/M	原始碱基 Raw bases/G	过滤数据 Clean reads/M	过滤碱基 Clean bases/G	有效数据 Valid bases/%	Q30 Content/%	GC Content/%
AWI1	44.44	6.67	43.21	6.06	90.98	93.00	46.67
AWI2	41.88	6.28	40.74	5.76	91.77	92.98	46.61
AWI3	41.80	6.27	40.64	5.72	91.17	92.88	47.21
AWG1	46.39	6.96	45.27	6.34	91.09	93.25	47.69
AWG2	46.54	6.98	45.23	6.34	90.85	93.05	49.33
AWG3	43.49	6.52	42.40	5.95	91.25	93.32	47.72
LSWI1	47.11	7.07	45.84	6.39	90.43	93.18	49.02
LSWI2	42.75	6.41	41.58	5.86	91.35	92.83	44.23
LSWI3	48.30	7.24	46.96	6.47	89.30	93.17	47.26
LSWG1	51.76	7.76	50.35	7.01	90.36	93.47	49.35
LSWG2	50.31	7.55	48.94	6.85	90.72	93.20	48.49
LSWG3	50.69	7.60	49.28	6.87	90.32	93.35	49.58

注: AWI1、AWI2 和 AWI3 表示高碱胁迫组对虾肠道组织 3 个生物学重复, AWG1、AWG2 和 AWG3 表示高碱胁迫组对虾鳃组织 3 个生物学重复; LSWI1、LSWI2 和 LSWI3 表示对照组对虾肠道组织 3 个生物学重复, LSWG1、LSWG2 和 LSWG3 表示对照组对虾鳃组织 3 个生物学重复; Q30: Phred 数值大于 30 的碱基占总体碱基百分比。

Note: AWI1, AWI2, and AWI3 are three individual intestines of high-alkaline groups. AWG1, AWG2, and AWG3 are three individual gills of high-alkaline groups; LSWI1, LSWI2, and LSWI3 are three individual intestines of control groups. LSWG1, LSWG2, and LSWG3 are three individual gills of control groups. Q30: The base of the Phred value greater than 30 accounts for the percentage of the overall base.

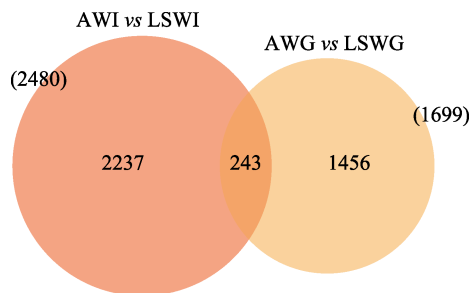


图 1 高碱胁迫下凡纳滨对虾肠道和鳃组织差异表达基因维恩图

Fig.1 Numbers of differentially expressed genes in intestine and gills of *L. vannamei* under high alkaline stress

2.3 高碱胁迫下凡纳滨对虾差异表达基因 GO 富集分析

GO 富集分析显示, 差异基因在生物过程(biological process, BP)、细胞成分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)中均有分布, 其中, 以生物过程居多。肠道中, 差异表达基因共富集到 5253 个 terms, 其中, 生物过程 3223 个, 细胞组分 910 个, 分子功能 1120 个。鳃组织中, 差异表达基因共富集到 3647 个 terms, 其中, 生物过程 1244 个, 细胞组分 1185 个, 分子功能 1218 个。在生物过程中,

生物调节、代谢途径、细胞途径、离子转运以及单有机体过程是包含差异基因最多的几类; 在细胞成分分类中, 差异基因最多的是细胞组分和细胞这两类; 而在分子功能类中, 结合和催化活性这两类包含了最多的差异基因, 挑选每个分类中富集最显著的前 10 个 GO terms 进行展示(图 3)。

2.4 高碱胁迫下凡纳滨对虾差异表达基因 KEGG 富集分析

KEGG 富集结果显示, 2 种处理在肠道组织的 DEGs 涉及 238 个通路, 在鳃组织的 DEGs 涉及 225 个通路, 从 KEGG 富集分析中选取富集最显著的 20 个代谢途径, 绘制 KEGG 富集气泡图(图 4)。其中, 肠道中差异表达基因主要集中在糖代谢、碳水化合物消化吸收、胆汁分泌、ABC 跨膜转运、紧密连接、免疫调节等途径。鳃中差异表达基因主要集中在谷胱甘肽代谢、碳酸氢盐转运、精氨酸合成、糖代谢以及离子转运等相关途径。

2.5 转录组数据的 qRT-PCR 验证

从 2 种不同处理下凡纳滨对虾的肠道和鳃中筛选的 243 个共同 DEGs 中, 根据 GO 和 KEGG 富集结果, 选取 10 个差异倍数较大 DEGs 进行验证(图 5)。

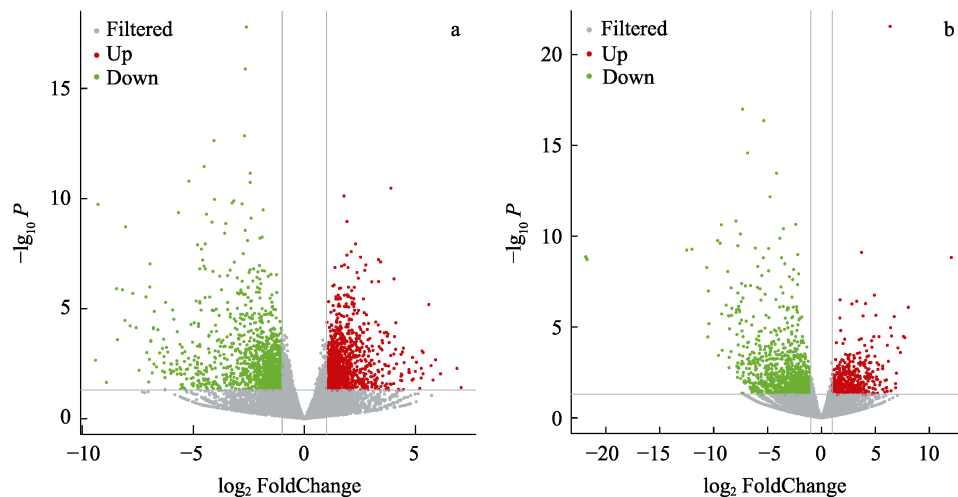


图2 高碱胁迫下凡纳滨对虾差异表达基因火山图

Fig.2 The volcano plot of differentially expressed genes of *L. vannamei* under high alkaline stress

a: 肠道组织差异基因火山图; b: 鳃组织差异基因火山图

灰色为非显著性差异的基因, 红色为显著上调表达基因, 绿色为显著下调表达基因。

a: The volcanic plot of the differentially expressed genes in intestine; b: The volcanic plot of the differentially expressed genes in gills; The gray means non-significant different genes, the red and green means a significant different genes, red means the up-regulated genes, and green means down-regulated genes.

各基因 qRT-PCR 验证表达趋势与转录组表达趋势一致。其中, *NKA-a*、*NKAIN*、*MDH*、*Rhbg* 和 *Nmdar1* 基因在高碱胁迫下呈上调表达, 差异倍数在 1.6~4.1 之间; *Eip74EF*、*CA1*、*CA10*、*UGT8* 和 *Hex-t2* 基因呈下调表达, 差异倍数在 1.9~4.4 之间。

3 讨论

3.1 长期高碱胁迫下凡纳滨对虾转录组分析

长期高碱胁迫下, 凡纳滨对虾肠道中差异基因主要富集在糖代谢、碳水化合物、胆汁分泌等消化吸收相关通路以及细胞凋亡等免疫相关通路, 鳃中差异基因主要富集在谷胱甘肽代谢等氮代谢相关通路以及碳酸氢根转运等离子转运相关通路。鳃和肠道是凡纳滨对虾酸碱调节、渗透调节和生长调控的重要器官。鳃是水生动物特有的呼吸器官, 在气体交换、渗透压平衡和氨氮排泄等方面发挥重要作用(龚仕玲等, 2019)。肠道在机体的生长调节、营养代谢以及免疫防御等方面起到重要作用。研究表明, 高 pH 胁迫会影响肠道组织的消化酶活性和抗氧化酶活性(Duan *et al.*, 2019)。因此, 本研究以选育凡纳滨对虾的鳃和肠道组织作为实验材料, 通过高通量测序技术分析其高碱胁迫和正常碱度条件下转录水平的差异。高碳酸盐碱度会影响对虾的生长和存活(么宗利等, 2010、2012; 柳飞等, 2016), 而青海湖裸鲤(*Gymnocypris*

przewalskii)、瓦氏雅罗鱼(*Leuciscus waleckii*)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)等鱼类在高碱环境下, 其体内会积累氨氮(衣晓飞等, 2017; 徐悦等, 2021; 吴俊伟等, 2016)。本研究中, 凡纳滨对虾肠道消化吸收、鳃氮代谢等通路富集了大量差异表达基因, 推测其在应对长期高碱胁迫时, 生长和氮废物排泄受到较大影响。同时, 凡纳滨对虾细胞凋亡相关通路的变化提示, 胁迫环境可能会破坏其免疫防御系统, 导致免疫抑制(Xiao *et al.*, 2019)。

3.2 高碱环境下凡纳滨对虾相关基因表达

本研究发现, 在应对长期高碱胁迫时, 鳃组织中 *NKAIN*、*NKA-a* 等离子转运基因和 *Rhbg* 氨转运基因表现为上调模式, 而 *CA1*、*CA10*、*Eip74EF* 等基因表现为下调模式。凡纳滨对虾应对高碱胁迫的响应机制较为复杂, 当其暴露在高碱环境中时, 碱性水环境中 HCO_3^- 、 CO_3^{2-} 等离子可直接腐蚀对虾鳃和其他表面暴露部位, 造成器质性损伤, 破坏其离子交换体系, 进而影响对虾的存活。高硬度水体中较高浓度的 CO_3^{2-} 、 HCO_3^- 导致水生动物体内摄入过多的 HCO_3^- , 同时, 外界环境的高 pH 会抑制一些离子交换(如 Na^+/H^+ 、 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 等), HCO_3^- 大量累积, 造成水生动物体内酸碱平衡遭到破坏, 最终导致持续性碱中毒(Yao *et al.*, 2015)。本研究中, 鳃中 *NKA* 相关基因表达上调, 有利于高碱环境下凡纳滨对虾维持体内离子平衡,

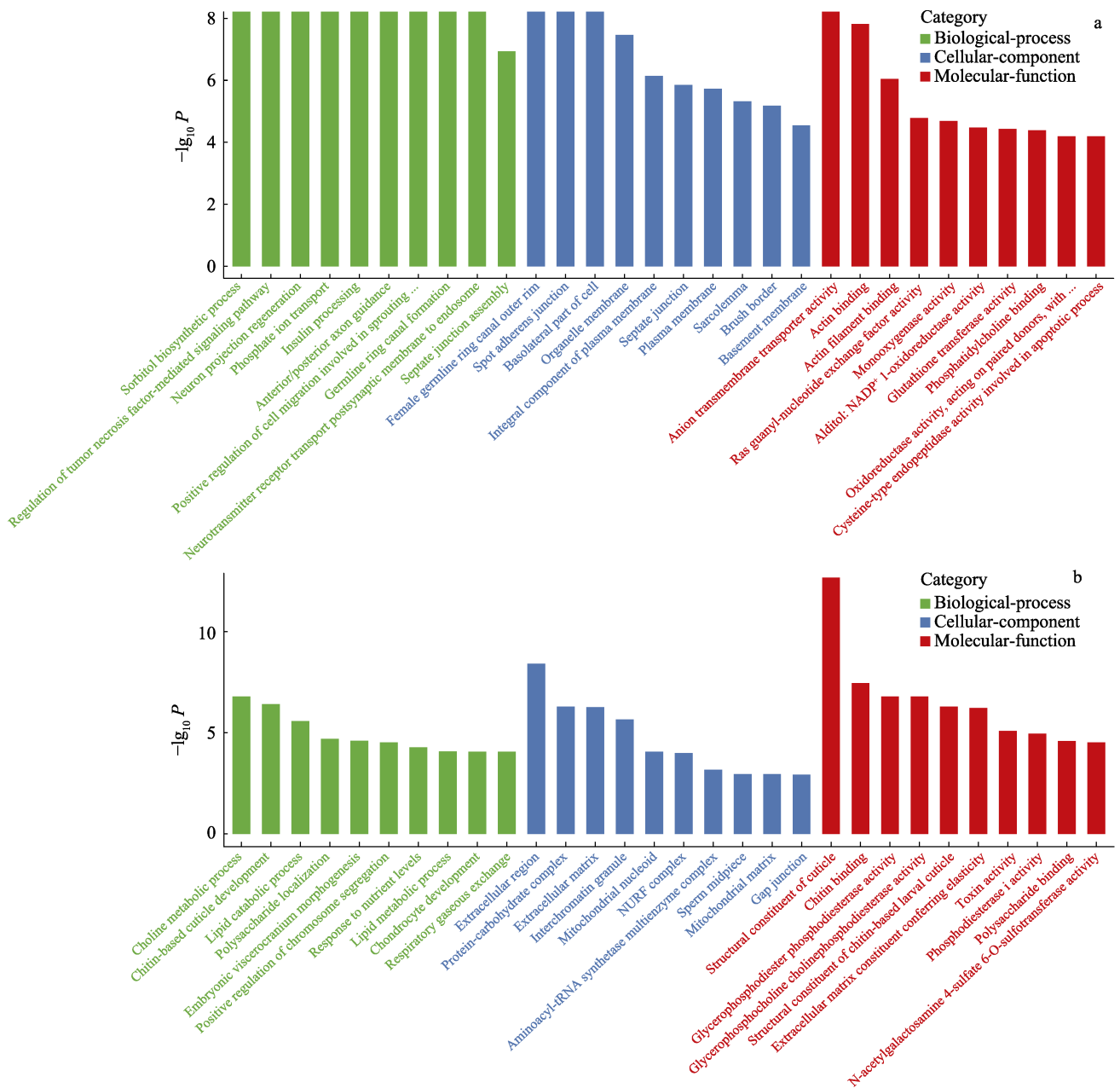


图 3 高碱胁迫下凡纳滨对虾肠道、鳃组织差异基因前 30 GO 富集分析

Fig.3 Top 30 GO enrichment of differentially expressed genes of intestine and gills of *L. vannamei* under high alkaline stress

a: 肠道组织差异基因 GO 富集; b: 鳃组织差异基因 GO 富集

a: GO enrichment terms of differentially expressed genes in intestine tissue;

b: GO enrichment terms of differentially expressed genes in gills tissue

而低表达的碳酸酐酶则有助于降低体内 HCO_3^- 含量，从而维持酸碱平衡。脊尾白虾中 3 种碳酸酐酶(CAs)在盐碱水中响应高碱胁迫分子机制的研究也发现，CAc 和 CAg 在高碱环境中具有重要调节能力，对高碱环境下对虾的存活发挥重要作用，为对虾的存活争取了时间(Ge *et al*, 2019)。研究表明，高碱环境会影响水生动物氨氮的排泄，鱼类可以通过上调 *Rh*、*Ut* 基因增加氨的排泄(衣晓飞等, 2017)。本研究发现，

凡纳滨对虾鳃中 *Rhbg* 表达上调，推测其可能参与了长期高碱胁迫下氨排泄。甲壳类动物外壳由大量 Ca^{2+} 化合物构成，甲壳类动物在蜕皮前期会将外壳中的部分 Ca 重新吸收，但蜕皮后仍需从食物或者通过鳃组织从水体中获取 Ca(董少帅等, 2005)。在长期高碱环境下，由于 Ca^{2+} 的流失，蜕壳周期延长，AW 组在养殖过程中的蜕壳率较低。本研究发现，*Eip74EF* 在鳃中表达下调，而这一基因在调控果蝇(*Drosophila*)

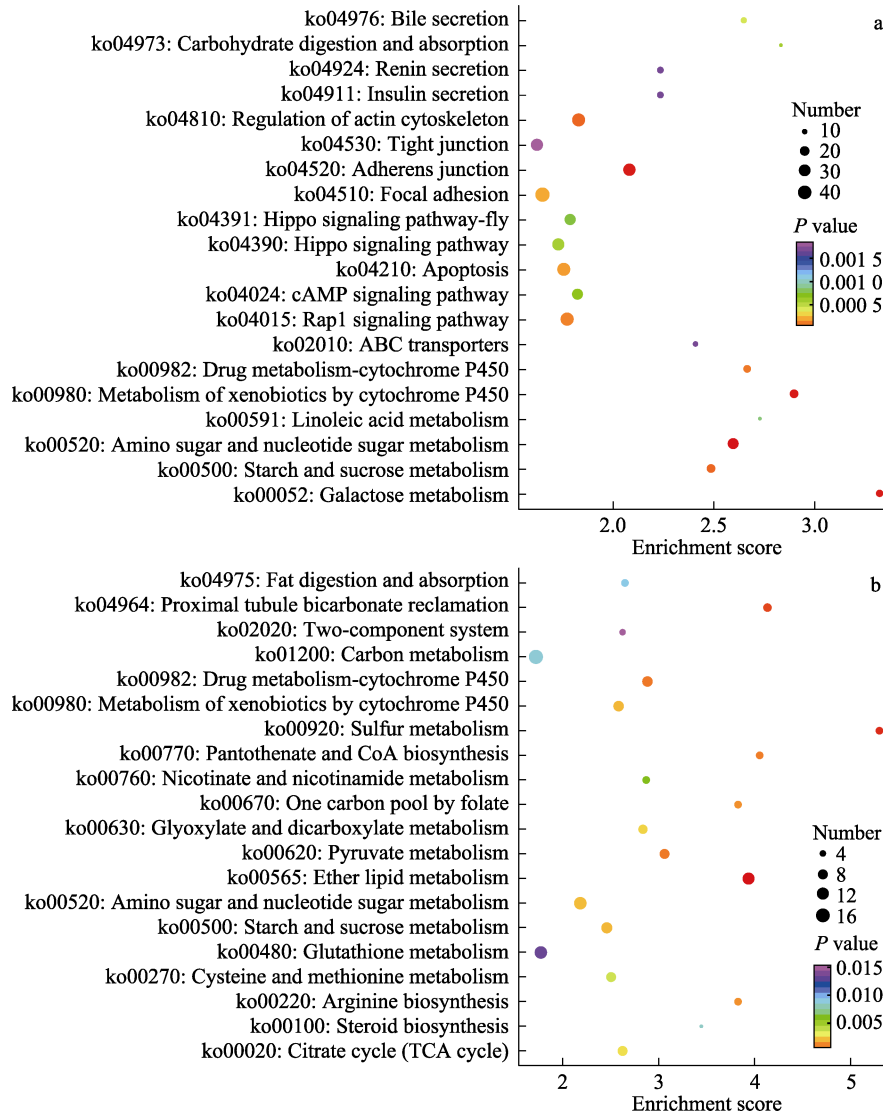


图 4 高碱胁迫下凡纳滨对虾肠道和鳃差异表达基因 KEGG 富集分析气泡图
Fig.4 KEGG enrichment results of differentially expressed genes in intestine and gills of *L. vannamei* under high alkalinity stress

a: 肠道差异表达基因 KEGG 富集分析; b: 鳃差异表达基因 KEGG 富集分析

P 值大小用点的颜色来表示, P -value 越小则颜色越接近红色,

每个通路下包含差异基因的多少用点的大小来表示。

a: KEGG enrichment results of differentially expressed genes in intestine; b: KEGG enrichment results of differentially expressed genes in gills. The P -value is represented by the color of dots. Red color indicates small P -value. The number of differential genes contained in each pathway is represented by the size of dots.

蜕皮变态发育上有着重要的协同作用(Fletcher *et al.*, 1995), 推测其在高碱胁迫下参与对虾蜕壳调控过程。此外, 本研究发现, 鳃部 *Hex-t2*、*UGT8* 等能量代谢基因表达下调, 推测在高碱胁迫下, 对虾能量消耗较大, 通过降低能量消耗维持其基本生命活动。对虾耐碱胁迫是一个复杂的过程, 涉及生理、生化及遗传多个方面。因此, 虾类对高碳酸盐碱度的抵抗能力不仅是单个耐受基因的启动和识别, 更重要的是在整个生

理过程中多个基因的相互作用。

综合转录组和定量 PCR 实验结果显示, 凡纳滨对虾表现出较强的高碱适应性, 可能是通过下调鳃中 *CA* 的表达补偿体内碱中毒, 上调 *Rh* 氨转运蛋白防止氨在体内积累, 上调 *NKA* 相关基因维持体内渗透平衡而得到的结果; 蜕皮激素诱导蛋白(*Eip74EF*)显著下调, 推测其蜕皮功能受到影响。本研究通过对凡纳滨对虾鳃和肠道进行转录组分析, 寻找高碱环境下差

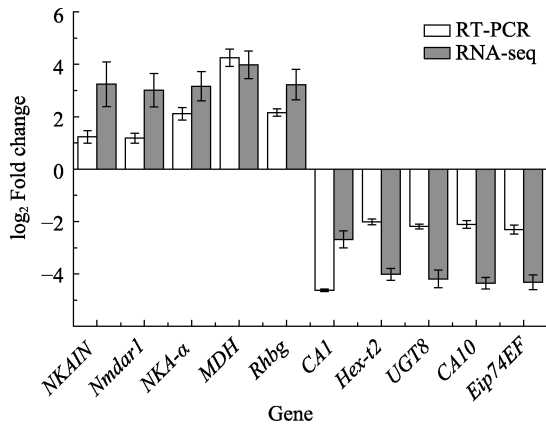


图5 高碱胁迫下凡纳滨对虾鳃组织差异基因 qRT-PCR 验证

Fig.5 Validation of differentially expressed genes in gills of *L. vannamei* using real-time qRT-PCR

异表达基因, 为后续高碱环境下凡纳滨对虾的选育及良种培育提供了理论基础。

参 考 文 献

- ANDERS S, HUBER W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology*, 2010, 11: R106
- CHANG Y M, ZHAO X F, LIEW H J. Effects of bicarbonate stress on serum ions and gill transporters in alkali and freshwater forms of Amur ide (*Leuciscus waleckii*). *Aquatic Physiology*, 2021, 12(5): 676–696
- DONG S S, DONG S L, WANG F, *et al.* The effect of Ca^{2+} concentration on the growth of juvenile *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(2): 211–215 [董少帅, 董双林, 王芳, 等. Ca^{2+} 浓度对凡纳滨对虾稚虾生长的影响. *水产学报*, 2005, 29(2): 211–215]
- DUAN Y F, WANG Y, LIU Q S. Changes in the intestine barrier function of *Litopenaeus vannamei* in response to pH stress. *Fish and Shellfish Immunology*, 2019, 88(3): 142–149
- FLETCHER C, THUMMEL C S. The *Drosophila* E74 gene is required for the proper stage- and tissue-specific transcription of ecdysone-regulated genes at the onset of metamorphosis. *Development*, 1995, 121(5): 1411–1421
- GE Q Q, LI J, WANG J J, *et al.* Characterization, functional analysis, and expression levels of three carbonic anhydrases in response to pH and saline-alkaline stresses in the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*. *Cell Stress and Chaperones*, 2019, 2(3): 212–224
- GONG S L, XIE D M, LI Y W, *et al.* Cadmium exposure induces histological damage, oxidative stress and immune response in yellow catfish. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, 43(2): 340–347 [龚仕玲, 谢冬梅, 李英文, 等. 镉暴露诱导黄颡鱼鳃的组织学损伤、氧化应激和免疫反应. *水生生物学报*, 2019, 43(2): 340–347]
- GRABHERR M G, HAAS B J, YASSOUR M, *et al.* Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, 2011, 29(7): 644–652
- HAO D C, LUAN S, CAO B X, *et al.* Genetic parameters of survival of juvenile families of *Litopenaeus vannamei* during desalination and culture stages. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(1): 90–96 [郝登春, 栾生, 曹宝祥, 等. 凡纳滨对虾家系幼虾淡化和养殖阶段存活性状遗传参数估计. *渔业科学进展*, 2018, 39(1): 90–96]
- HUANG Y C, AI H S, PAN Z C, *et al.* Establishment and WSSV resistant characteristics of selective breeding families for resistance to the white spot syndrome virus of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(3): 359–366 [黄永春, 艾华水, 潘忠诚, 等. 凡纳滨对虾抗 WSSV 选育家系的建立及其抗病特性. *水产学报*, 2013, 37(3): 359–366]
- JING F T, PAN L Q, HU F W. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* to the change of temperature. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2006, 36(S1): 40–44 [景福涛, 潘鲁青, 胡发文. 凡纳滨对虾对温度变化的免疫响应. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2006, 36(增刊): 40–44]
- KANEHISA M, ARAKI M, GOTO S, *et al.* KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(3): 480–484
- KIM D, LANGMEAD B, SALZBERG S L. HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods*, 2015, 12(4): 357–362
- KONG J, LUAN S, LUO K, *et al.* Genetic evaluation for body weight and survival of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) at different salinity. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(4): 573–578 [孔杰, 栾生, 罗坤, 等. 不同盐度下凡纳滨对虾生长和存活性状遗传评估. *水产学报*, 2017, 41(4): 573–578]
- LI M D, LI J T, SHI K P, *et al.* Estimation of heritability and genetic correlation of saline-alkali tolerance in *Exopalaemon carinicauda*. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(1): 117–123 [李明栋, 李吉涛, 史鲲鹏, 等. 脊尾白虾耐盐碱性状遗传力和遗传相关的估计. *渔业科学进展*, 2021, 42(1): 117–123]
- LIU F, LI J, LI J T, *et al.* Effect of carbonate alkalinity stress on the survival, growth, reproduction and immune enzyme activities of *Exopalaemon carinicauda*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(5): 1137–1147 [柳飞, 李健, 李吉涛, 等. 碳酸盐碱度对脊尾白虾生存、生长、繁殖及免疫酶活性的影响. *中国水产科学* 2016, 23(5): 1137–1147]
- SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocols*, 2008, 3(6): 1101–1108

- SIMS D, SUDBERY I, ILOTT N E, *et al.* Sequencing depth and coverage: Key considerations in genomic analyses. *Nature Reviews Genetics*, 2014, 15(2): 121–132
- TANG S J, LI S F, ZHAO J L, *et al.* Heritability analysis of the late selection generations of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) new gift strain using microsatellites. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2018, 48(5): 171–174 [唐首杰, 李思发, 赵金良, 等. “新吉富”罗非鱼选育后期世代遗传潜力的微卫星分析, 海洋湖沼通报, 2018, 48(5): 171–174]
- TRAPNELL C, WILLIAMS B A, PERTEA G. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology*, 2010, 28(5): 511–515
- WU J W, ZHAO J L, ZHAO Y, *et al.* Effects of high carbonate alkalinity stress on changes in ammonia metabolism expression of *Oreochromis niloticus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(6): 1290–1299 [吴俊伟, 赵金良, 赵岩, 等. 高碳酸盐碱胁迫对尼罗罗非鱼氨代谢基因表达变化的影响. 中国水产科学, 2016, 23(6): 1290–1299]
- XIAO J, LI Q Y, TU J P, *et al.* Stress response and tolerance mechanisms of ammonia exposure based on transcriptomics and metabolomics in *Litopenaeus vannamei*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 180(5): 491–450
- XU Y, MI B H, ZHAO X F, *et al.* Effects on alkalinity stress on blood biochemical indices *Leuciscus waleckii*. *Chinese Journal of Fisheries*, 2021, 34(3): 17–21 [徐悦, 米博瀚, 赵雪飞, 等. 碳酸盐胁迫对瓦氏雅罗鱼血液中部分生理生化指标的影响, 水产学杂志, 2021, 34(3): 17–21]
- YAO Z L, LAI Q F, HAO Z R, *et al.* Carbonic anhydrase 2-like and $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ a gene expression in medaka (*Oryzias latipes*) under carbonate alkalinity stress. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2015, 41(6): 1491–1500
- YAO Z L, WANG H, ZHOU K, *et al.* Effects of water carbonate alkalinity and pH on survival rate of post larva *Litopenaeus vannamei*. *Chinese Journal of Ecology*, 2010, 29(5): 945–950 [么宗利, 王慧, 周凯, 等. 碳酸盐碱度和 pH 值对凡纳滨对虾仔虾存活率的影响. 生态学杂志, 2010, 29(5): 945–950]
- YAO Z L, YING C Q, ZHOU K, *et al.* Gene expression profiles of *Litopenaeus vannamei* in response to carbonate alkalinity stress. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(1): 1–12 [么宗利, 应成琦, 周凯, 等. 碳酸盐碱度胁迫下凡纳滨对虾基因的差异表达. 中国水产科学, 2012, 19(1): 1–12]
- YI X F, LAI Q F, SHI J Q, *et al.* Nitrogenous waste excretion and gene expression of nitrogen transporter in *Gymnocypris przewalskii* in high alkaline environment. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(4): 681–689 [衣晓飞, 来琦芳, 史建全, 等. 高碱环境下青海湖裸鲤氮废物排泄及相关基因的表达规律. 中国水产科学, 2017, 24(4): 681–689]
- YOUNG M D, WAKEFIELD M J, SMYTH G K, *et al.* Gene ontology analysis for RNA-seq: Accounting for selection bias. *Genome Biology*, 2010, 11: R14
- ZHANG T S. Analysis of animal models and estimation of genetic parameters in *Fenneropenaeus chinensis* breeding. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2010, 13–17 [张天时. 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)育种的模型分析与遗传参数评估. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2010, 13–17]
- ZOU H, SUN J, YU F, *et al.* Effect of cadmium on lysosomes in BRL 3A cells. *Chinese Veterinary Science*, 2019, 49(12): 1602–1608 [邹辉, 孙建, 于凡, 等. 镉暴露对 BRL3A 细胞溶酶体的影响. 中国兽医科学, 2019, 49(12): 1602–1608]

(编辑 冯小花)

Transcriptomic Analysis of Gene Expression of *Litopenaeus vannamei* during Long-Term Exposure to High Alkaline Water

WANG Xujiang^{1,2}, YAO Zongli^{2①}, LAI Qifang², YU Mingchao³, LI Xincang², GAO Pengcheng², ZHOU Kai², CUI Qingman¹, LIU Yimeng², SUN Zhen², LI Yan²

(1. School of Oceanography and Environment, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China; 2. Key Laboratory of Aquaculture on Saline-Alkaline Land, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Fishery Engineering Technology Research Center for Saline-Alkaline Waters (Shanghai), Shanghai 200090, China; 3. Tongwei Co, LTD, Chengdu, Sichuan 610093, China)

Abstract The total saline-alkaline land area in China is approximately 99.13 million hectares, distributed throughout northern China, coastal areas, and areas along the Huanghe River. About 45.87 million hectares of saline-alkaline water areas are spread around these lands, most of which are athalassic waters characterized by a high pH value above 8.8, associated with high-carbonate alkalinity and various types of ions imbalances. The saline-alkaline land and water cannot be directly used for agriculture, and most of them are arid. The development of aquaculture in saline-alkaline land is not only beneficial to expanding the aquaculture area but also can restore the saline-alkaline soil, which is of great significance to food security and ecological restoration. Saline-alkaline aquaculture is one of the main inland aquaculture models developed in the past ten years. With the maturity of aquaculture technologies, the saline-alkaline aquaculture area has expanded year by year, which has brought earnings to local farmers. China has abundant saline-alkaline water resources. The high pH and high-carbonate alkalinity of these waters restrict the survival, growth, and reproduction of aquatic animals. *Litopenaeus vannamei* is highly resistant to stress and has a certain tolerance to saline-alkaline water. Under short-term saline-alkaline stress, the expression of the carbonic anhydrase (CA), $Na^+/K^+-ATPase$, and other ion-regulated genes of *L. vannamei* were induced, and the acid-base and osmolality balance were determined by strengthening ion regulation. At present, relatively few studies on gene regulation of *L. vannamei* under long-term stress have been performed. Although *L. vannamei* farming has been successful in saline-alkaline water, the survival rate is unstable, and there are few reports on the selective breeding of *L. vannamei* tolerant to salinity and alkalinity. Through independent innovation, a family-based "multi-trait compound breeding technology for aquatic animals" has been established in China. These techniques have laid a good foundation for developing improved *L. vannamei* strains. To effectively utilize saline-alkaline water resources, it is urgent to conduct *L. vannamei* salt-alkali-tolerant breeding and promote the healthy development of the saline-alkaline aquaculture industry. *L. vannamei* has strong environmental adaptability and relatively high tolerance to saline-alkaline water. It is one of the main species of saline-alkaline aquaculture. However, its survival rate in high pH and high-alkaline environments is not stable. To explore the response mechanism to long-term high-alkaline stress, *L. vannamei* was exposed to low-alkaline water as the control group (LSW, carbonate alkalinity of 3 mmol/L, salinity of 6, pH of 8.1) and to high-alkaline stress (AW, carbonate alkalinity of 10 mmol/L, salinity of 6, pH of 8.8) for 42 days. The intestine and gill of *L. vannamei* raised for 42 days were used as the experimental materials. Transcriptome sequencing was performed using the Illumina platform. After splicing analysis and gene annotation, the differentially expressed genes and regulatory pathways regulated under high-alkaline

① Corresponding author: YAO Zongli, E-mail: yaozl@ecs.ac.cn

stress were screened and analyzed, with further verification by qRT-PCR. The results showed 243 differentially expressed genes in both tissues, of which 98 were up-regulated and 145 were down-regulated. The differentially expressed genes in the intestine were enriched for glucose metabolism, carbohydrate digestion and absorption, bile secretion, ABC transmembrane transport, and tight junction related pathways. The differentially expressed genes in gills were enriched for glutathione metabolism, bicarbonate transport, arginine synthesis, sugar metabolism, and ion transport related pathways. The ten most significant differentially expressed genes were further studied and verified by qRT-PCR. Carbonic anhydrase (*CA1*, *CA10*), ecdysone-inducible protein (*Eip74EF*), and β -galactosyltransferase (*UGT8*) genes in gills were down-regulated. However, the expression of Na^+/K^+ -ATPase- α (*NKA-\alpha*), Na^+/K^+ transporting ATPase interacting (*NKAIN*), ammonia transporter (*Rhbg*), and malate dehydrogenase (*MDH*) were up-regulated under high-alkaline stress. The transcriptome expression pattern and qRT-PCR results were consistent. We speculated that these genes may be involved in the shrimp stress response to high-alkaline stress. *L. vannamei* showed a relatively strong high-alkaline tolerance, which may be compensated by down-regulating the expression of *CA* to prevent alkalosis, up-regulating *Rhbg* to prevent ammonia accumulation and *NKA*-related genes to maintain the osmotic balance. The ecdysone function was probably affected as the *Eip74EF* gene was down-regulated. This study provides basic data for further analyzing the physiological response mechanisms of *L. vannamei* under long-term highly alkaline stress.

Key words *Litopenaeus vannamei*; Transcriptome; Carbonate alkalinity; Differential expression genes