

doi: 10.7541/2022.2022.0033

罗氏沼虾急性低温应激响应的转录组分析

杨旻珉¹ 屠海慧¹ 邢钱钱¹ 唐琼英^{1*} 易少奎¹ 夏正龙² 蔡缪荧² 陈国柱¹
蓝璇¹ 钟镇霄¹ 黄笑¹ 高权新¹ 杨国梁^{1,2*}

(1. 湖州师范学院, 浙江省水生生物资源养护与开发技术研究重点实验室, 中国水产科学研究院水生动物繁育与营养重点实验室, 湖州 313000; 2. 江苏数丰水产种业有限公司, 高邮 225654)

摘要: 为探究罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)急性低温应激响应的基因表达模式, 研究以罗氏沼虾成虾为研究对象, 分别设置实验组(16℃)和对照组(24℃), 实验组从24℃急性降温(2℃/1h)至16℃后的0、1h、3h、6h、12h、24h和回温至24℃后共7个时间点采集肝胰腺组织进行转录组测序分析。差异表达基因(DEGs)筛选结果显示, 胁迫3h与回温后的DEGs数量(5062个)几乎是1h与回温后的1.5倍(3516个), 随着胁迫时间的延长, 各时间点与回温后的DEGs数量逐渐降低。KEGG富集发现, DEGs显著富集在溶酶体、淀粉和蔗糖代谢、抗原加工与呈递等途径中。此外, 罗氏沼虾在急性低温应激下, 黏着斑、ECM-受体互作、细胞色素P450对异生物质的代谢、谷胱甘肽代谢、氧化磷酸化、p53信号通路等相关基因也发生了显著变化。WGCNA分析发现各组间的共有DEGs聚类在与细胞功能及免疫相关模块和与能量物质代谢相关模块上。另外, 花生四烯酸代谢信号通路中的Cytochrome P450 2L1-like基因、谷胱甘肽代谢信号通路中的NADP-specific isocitrate dehydrogenase基因及淀粉和蔗糖代谢信号通路中的Hexokinase基因等的表达量随低温应激时间增加呈先增后减的趋势。这些通路及基因可能在罗氏沼虾急性低温应激下的能量代谢及免疫调节等活动中起重要作用。研究为揭示罗氏沼虾急性低温应激响应的分子调控机制提供了基础数据。

关键词: 急性低温应激; 肝胰腺; 转录组; 差异表达基因; 能量代谢; 免疫调节; 罗氏沼虾

中图分类号: Q344⁺.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2023)04-0581-13



罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*), 又名马来西亚大虾、淡水长臂虾、大河虾等, 隶属于甲壳纲(Crustacea)十足目(Decapoda)长臂虾科(Palaemonidae)沼虾属(*Macrobrachium*), 广泛分布于东南亚、印度洋、太平洋的热带和亚热带地区。因其食性广、生长快、肉质鲜美、经济价值高等优点而被许多国家和地区作为重要的水产养殖品种。

我国于1976年引进该虾, 目前已成为全球罗氏沼虾养殖最多的国家, 养殖面积占世界总面积的一半以上^[1], 养殖产量约占世界总产量的60%^[2]。罗氏

沼虾适宜的生活水温为24—30℃。在25—30℃时, 摄食旺盛; 水温下降到18℃时, 活动减弱, 摄食量减少; 降至14—17℃时, 反应迟钝, 持续一段时间后会逐渐死亡^[3]。因气候条件的限制, 中国罗氏沼虾的主养区江苏、广东、浙江等地养殖的个体大小远不及原产地国家。若能适当延长罗氏沼虾的养殖时间, 提高商品虾规格, 将会提高虾农的养殖效益, 同时也可以向北扩大其养殖范围。另一方面, 近年来低温寒潮等极端天气频发, 给罗氏沼虾的养殖业带来巨大经济损失, 亟待培育耐寒新品种。而

收稿日期: 2022-01-24; 修订日期: 2022-04-26

基金项目: 江苏省科技厅重点研发专项资金(现代农业)项目(BE2019352); 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”重点专项(2018YFD0901300); 国家现代农业产业技术体系资助项目(CARS-48); 浙江省农业(水产)新品种选育重大科技专项(2021C02069-4-3)资助 [Supported by the Major R & D Programme (Modern Agriculture) of Jiangsu Province (BE2019352); National Key R & D Programme of China for Blue Granary (2018YFD0901300); China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-48); Special Funds for Major Science and Technology of Breeding New Agriculture (Aquatic) Varieties in Zhejiang Province (2021C02069-4-3)]

作者简介: 杨旻珉(1995—), 男, 硕士研究生; 主要从事水产动物遗传育种研究。E-mail: ymmhh666@163.com

通信作者: 唐琼英, 研究员; 主要从事水产动物遗传育种研究。E-mail: tangqy@zjhu.edu.cn 杨国梁, 研究员; 主要从事水产动物遗传育种研究。E-mail: ygl0572@163.com *共同通信作者

低温应激响应的机理研究可以为耐寒新品种的培育提供理论指导。

鱼类与虾类等水生动物属于变温动物,其机体的代谢水平和生理调节机制直接受到水温的影响。低温会影响动物体内的信号传导、氧化应激和线粒体酶等相关基因的表达,进而阻碍正常代谢,引起氧化应激水平、脂质代谢水平和免疫系统等的变化^[4,5]。研究发现斑马鱼(*Danio rerio*)从28℃转移至12℃的水中,低温暴露会导致斑马鱼体内细胞的氧化损伤,诱导抗氧化应激响应;抗氧化酶相关基因及抗氧化非酶基因在6h内高表达,产生抗氧化作用^[4]。虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)在4℃的低温环境下,参与蛋白质合成和中间代谢的基因显著高表达^[6]。低温暴露可引发尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)体内与代谢和免疫相关基因的显著高表达,吞噬小体和细胞黏附分子通路的免疫相关通路显著下调^[7]。低温处理的斑马鱼幼鱼转录组分析结果表明,5个功能分类的生物学过程在低温下出现了富集表达;调节剪接体、蛋白酶体、真核核糖体的生物发生和RNA转运相关的基因上调表达^[8]。将鲤(*Cyprinus carpio*)暴露在低温环境中,7个组织中有252个基因上调,涉及RNA处理、翻译起始、线粒体代谢、蛋白酶体功能及脂质膜和染色体的高阶结构修饰;同时还发现了大量具有高度组织特异性调控模式的转录本^[9]。凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)在低温胁迫下,肌肉组织中有72个差异表达基因,在催化活性和代谢相关通路等温度敏感通路富集表达^[10],肝胰腺中与低温耐受相关的基因大量表达^[11]。

对缺乏完整基因组信息的非模式生物,特定组织的转录组数据分析可获得参与特定生物学过程的功能基因信息,如在珠母贝(*Pinctada margaritifera*)、罗氏沼虾和虹鳟的性腺中,基于转录组分析识别了潜在的性别分化和性别决定相关基因^[12-14]。利用RNA-seq技术,研究者发现日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)急性低温胁迫48h后,其肝胰腺中G6PD和PK基因的表达水平上调,进而催化戊糖磷酸化途径,将葡萄糖作为快速能源消耗,产生更多的能量以供机体代谢^[15]。在菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)中基于转录组分析,发现在低温环境下,谷胱甘肽S-转移酶(GST)与硫氧还蛋白过氧化物酶(TPX)基因表达上调,表明相较于生活在最佳温度下的个体,暴露在低温下的个体经历了更多的氧化应激^[16]。

水温骤降比缓降导致的鱼虾类低温应激损伤更为严重。急性低温打破了机体内环境的稳态平

衡,影响其能量代谢和免疫功能等,甚至会导致鱼虾的大量死亡,造成巨大的经济损失。目前,有关罗氏沼虾急性低温应激下的生物学过程尚不清楚,低温响应的相关功能基因及通路的研究也未见报道。因此,本研究采用急性降温方式,对罗氏沼虾在低温胁迫下不同时间点的肝胰腺组织进行转录组分析,研究急性低温处理与正常温度间、不同低温处理时长间肝胰腺组织的基因表达模式,以期筛选出罗氏沼虾急性低温应激响应相关的关键信号通路和关键基因,为揭示甲壳类急性低温应激响应的分子调控机制提供参考,也可以为罗氏沼虾耐寒新品种的选育提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用罗氏沼虾来自育种基地江苏数丰水产种业有限公司。挑选体表无外伤、附肢健全、健康的成虾共60尾作为实验虾。因罗氏沼虾成虾存在明显的性二态,即便相同日龄的雌雄个体间也存在较大差异。为避免性别差异对本实验结果的影响,本研究特设置雌雄比为1:1,对雌雄个体同时进行低温胁迫。雄虾平均体长(14.63±1.02) cm,平均体重(92.82±5.19) g,雌虾平均体长(12.49±1.78) cm,平均体重(46.98±5.68) g。

1.2 实验设计

设置实验组和对照组,实验组(简称M组)设定水温为16℃,对照组(简称C组)保持罗氏沼虾适宜的养殖水温(24℃)。实验组和对照组各30尾虾,每组雌雄比例为1:1,两组分别置于两个150 cm×100 cm的长方形塑料桶中,保持水深为25 cm。M组从24℃开始采用加冰的降温方式,以2℃/h的速率降温,水温下降至16℃时的时间点设置为0,保持16℃水温24h后,再经过6h缓慢回温至24℃。

1.3 样品采集

在对照组中选取3尾存活的虾,设置为C0组。在实验组达到16℃后的1h、3h、6h、12h、24h及回温结束时,每个时间点分别选取3尾存活的虾分别设置为M1、M2、M3、M4、M5和M6组。为尽量消除性别差异对低温胁迫的影响,每次取样确保至少1雌1雄,第3尾随机,采集各虾肝胰腺组织,置于无RNA酶的冻存管中封存,放入液氮中低温保存过夜后,转移至超低温冰箱(-80℃)中,供后续RNA分析。

1.4 转录组测序及序列组装与注释

将采集到的21尾虾的肝胰腺组织委托北京诺禾致源生物信息科技股份有限公司进行RNA的提

取与质控、文库构建(NEBNext[®] Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina[®], NEB, USA)及文库测序, 测序平台为Illumina NovaSeq 6000 (Illumina, USA)。测序原始序列使用Trinity软件^[17]进行组装, 取每个基因中最长的转录本作为Unigenes。使用BUSCO (Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs)对组装的转录本的质量进行评估^[18]。将基因序列分别与NCBI Nt (non-redundant nucleotide sequences)、NCBI Nr (non-redundant protein sequences)、Pfam (Protein family)、KOG/COG (Clusters of Orthologous Groups of proteins/Clusters of Orthologous Groups of prot)、Swiss-prot、KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)、GO (Gene Ontology)共7个公共数据库进行比对注释^[19], 注释使用的软件分别为diamond^[20] (Nr、KOG/COG、Swiss-Prot)、NCBI Blast 2.2.28+ (Nt)、KAAS^[21] (KEGG)、hmmscan^[22] (Pfam)、Blast2Go^[23] (GO)。

1.5 基因差异表达分析及差异表达基因富集分析

本研究采用FPKM (Fragments Per Kilobase of exon model per Million mapped fragments)方法计算基因的表达量^[24]。在检测差异表达基因(Differen-

tially expressed genes, DEGs)时, 筛选标准为FDR (False discovery rate, 错误发现率) <0.05 ^[25]和 $\log_2$ fold change >1 。使用Goseq(1.10.0)和topGO(2.10.0)进行GO富集分析^[26], KOBAS(v2.0.12)进行KEGG富集分析^[27]。

1.6 共表达模块构建与分析

在各比较组间筛选出共有 DEGs的基础上, 整理出所有组间共有的DEGs, 利用R(R version 3.6.0)中的权重基因共表达网络分析(Weighted gene co-expression network analysis, WGCNA)包构建基因共表达网络。通过动态分割算法(Cutree dynamic)寻找基因功能模块(平均表达水平1, 变异系数0.1), 将具有相似表达模式的基因划分为一个模块, 最后基于模块特征向量计算模块与模块之间的差异度, 将相似的模块合并, 并进行WGCNA基因功能模块和样本特征之间的关联性分析^[28]。

1.7 qRT-PCR验证

从筛选到的DEGs中随机选取10个, 利用Primer 6.0 软件设计特异引物(表 1), 由武汉天一辉远基因科技有限公司合成。RNA提取在超净工作台上进行, 按常规TRIzol法(TaKaRa, 中国大连)提取各样

表 1 用于罗氏沼虾急性低温胁迫qPCR分析的基因引物

Tab. 1 Gene primers for qPCR analysis of acute low temperature stress in *M. rosenbergii*

引物名称 Primer name	基因名称 Gene name	产物长度 Product length (bp)	序列 Sequence (5'—3')
Cluster-33315.45697F Cluster-33315.45697R	假定蛋白: LOC113813141 Uncharacterized protein: LOC113813141	160	ACACAAGCAGGTCGCATAGAGC CGCCAAATCCACAGTCCAGGTA
Cluster-33315.46133F Cluster-33315.46133R	β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶 Beta-N-acetylglucosaminidase	185	TCCTCCAGTTTCATCTGCGGTTG TCGTCGCTGCTCCACTTATCTG
Cluster-33315.45505F Cluster-33315.45505R	γ AMP 活化蛋白激酶亚基 γ AMP-activated protein kinase subunit gamma	194	TGTCCTTGGTCCTGCTGGTGAA CGTGCTTGGTGGGTAGTTCTCC
Cluster-33315.44357F Cluster-33315.44357R	细胞色素 P450 2L1 样Cytochrome P450 2L1-like	160	CGTTGGCGAACAATACGAGGAG GATGGCGTAGCTCTGTGTCTGT
Cluster-33315.43475F Cluster-33315.43475R	反式-1, 2-二氢苯-1, 2-二醇脱氢酶 Trans-1, 2-dihydrobenzene-1, 2-diol dehydrogenase	150	CCAGTTTCGGGCAGCCAATAGG GACCACCACCCACAACCTTCAC
Cluster-33315.43078F Cluster-33315.43078R	谷胱甘肽 S-转移酶 μ 1 样 Glutathione S-transferase μ 1-like	108	TGCCTTTGCTGGAAGCCTTCAT CGAGGTATCTGCTAGGTGGGT
Cluster-33315.44900F Cluster-33315.44900R	细胞周期蛋白G2 Cyclin G2	183	CATTGGCAACTTGGGCGTCATC GCTGGTATCTCCGAAGGCTTCA
Cluster-33315.44571F Cluster-33315.44571R	醇脱氢酶 3类 Alcohol dehydrogenase class-3	140	CGCTGCTTGAAGGTGTGGTATG CAGGACAGATGGAAGGCACTCA
Cluster-33315.42081F Cluster-33315.42081R	Ras 相关 C3 肉毒杆菌毒素底物 1 样亚型 X5 Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1-like isoform X5	136	CGCAGGCGACCAATACTGTGAA GTGGCTTGAACGGCTTCTGAGA
Cluster-33315.45323F Cluster-33315.45323R	热休克蛋白70 Heat shock protein 70	120	ACTCTGTCAGCCTCTGCCCAAG ACCACGGAACAAGTCACCACAC
18SF			TATACGCTAGTGGAGCTGGAA
18SR			GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT

本肝胰腺组织总RNA。通过1%琼脂糖凝胶电泳和Nanodrop ND-1000 (Thermo, 美国)检测RNA质量及浓度。qRT-PCR采用SYBR PreMix Ex *Taq*试剂盒 (TaKaRa, 中国大连), 以18S rRNA为内参基因, 每个样品设3个技术重复, 使用CFX96 Touch™ Real-time PCR仪(Bio-Rad, 美国)进行检测, 并利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析基因的相对表达量, 与转录组测序数据进行比较分析。

2 结果

2.1 转录组拼接及序列注释

对罗氏沼虾实验组(M1、M2、M3、M4、M5和M6)和对照组(C0)肝胰腺组织进行转录组测序, 21个样本下机数据质控后共获得142.38 Gb clean data, 各样本的clean data均达5.90 Gb以上, Q30碱基百分比最低为94.49%, 表明获得的转录组测序数据质量较好, 能满足后续分析要求。测序样本质量详情如表2。拼接后共获得252,123条转录本片段(Transcript fragments), 其长度为301—35558 bp, 平均长度为1381 bp, 长度大于2 kb的有47726条, 约占全部转录本的19%。对转录本序列聚类去冗余后得到135239

条基因(Unigenes), 其拼接长度范围为301—35558 bp, 平均长度为1055 bp, N50为1737 bp, 其中长度大于2 kb的有15457条, 约占总基因的11%。BUSCO评估显示完整转录本序列组装完整性(Completeness)为97.2%, 表明数据组装效果较好。通过与Nt、Nr、KOG、GO、KEGG、Pfam和Swiss-Prot等重要数据库进行比对, 共鉴定和注释了40236个基因, 占总数的29.75%。各数据库中注释到的基因数及占总基因数的比例见表3。

2.2 差异表达基因筛选

对罗氏沼虾在急性低温应激(16℃)下持续1h、3h、6h、12h、24h、回温至24℃后(M1-M6组)和对照组(24℃)条件下(C0组)的DEGs进行分析。结果(图1)显示, 罗氏沼虾低温应激1h与对照组的DEGs有1702个(M1 vs. C0); 随着应激时间的延长, 各时间点与对照组的DEGs逐渐增加, 在6h时达到最多(M3 vs. C0, 共2899个), 随后逐渐降低, 到应激24h时为2741个(M5 vs. C0), 期间保持低温应激下的动态平衡; 回温后DEGs的数量(M6 vs. C0, 1969个)恢复到1h时的水平, 重新建立动态平衡。另外, 将低温应激不同时间点分别与回温至24℃后

表2 急性低温应激下罗氏沼虾转录组测序样本质量
Tab. 2 Quality of transcriptome sequencing samples of *M. rosenbergii* under acute low temperature stress

样本 Sample	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 (G)	错误率 Error rate (%)	过滤后序列质量大于 20的碱基数比例Q20 (%)	过滤后序列质 量大于30的 碱基数比例Q30 (%)	GC含量 GC content (%)
C01	23379568	22914824	6.87	0.02	98.32	94.77	43.96
C02	24029340	23579291	7.07	0.02	98.18	94.49	43.52
C03	22762946	22231559	6.67	0.02	98.37	94.91	44.21
M11	21914577	21483440	6.45	0.02	98.27	94.68	44.48
M12	21644434	21168961	6.35	0.02	98.3	94.78	44.01
M13	22306861	21293606	6.39	0.02	98.37	94.93	42.54
M21	22883453	22485963	6.75	0.02	98.36	94.92	44.03
M22	24879818	24430082	7.33	0.02	98.19	94.61	44.06
M23	23238852	22813033	6.84	0.02	98.36	94.93	44.00
M31	22300014	21601471	6.48	0.02	98.29	94.74	43.60
M32	24747603	24102025	7.23	0.02	98.48	95.23	44.91
M33	23994465	23409040	7.02	0.02	98.43	95.09	43.81
M41	22713387	22016757	6.61	0.02	98.32	94.80	43.41
M42	23362302	22918846	6.88	0.02	98.41	95.08	44.36
M43	22886282	22288783	6.69	0.02	98.19	94.56	43.52
M51	26245158	25593705	7.68	0.02	98.33	94.87	44.20
M52	20118392	19681489	5.90	0.02	98.29	94.78	43.89
M53	22748600	22240274	6.67	0.02	98.37	94.93	44.30
M61	22978816	22475617	6.74	0.02	98.42	95.05	43.95
M62	24801163	24256681	7.28	0.02	98.16	94.50	43.24
M63	22036666	21596237	6.48	0.02	98.26	94.73	43.98

进行比较,发现低温应激3h与回温后的DEGs数量(M2 vs. M6, 5062个)几乎是1h与回温后的1.5倍(M1 vs. M6, 3516个);随着应激时间的延长,各时间点与回温后的DEGs数量逐渐降低(M4 vs. M6, 3655个; M5 vs.

表 3 各数据库注释到的罗氏沼虾急性低温应激基因统计

Tab. 3 Statistics on the success rate of gene annotation of acute low temperature stress in *M. rosenbergii*

注释用数据库 Database for annotation	注释到的基 因数目 Number of annotated unigenes	注释到的基因比例 Percentage of annotated unigenes (%)
注释到7个数据库 Annotated in all Databases	2037	1.50
至少注释到1个数据库 Annotated in at least one Database	40236	29.75
注释到GO数据库 Annotated in GO	27044	19.99
注释到KO数据库 Annotated in KO	8410	6.21
注释到KOG数据库 Annotated in KOG	6837	5.05
注释到Nr数据库 Annotated in Nr	24826	18.35
注释到Nt数据库 Annotated in Nt	8089	5.98
注释到Pfam数据库 Annotated in Pfam	27052	20.00
注释到SwissProt数据库 Annotated in SwissProt	13446	9.94
所有基因 Total Unigenes	135239	100.00

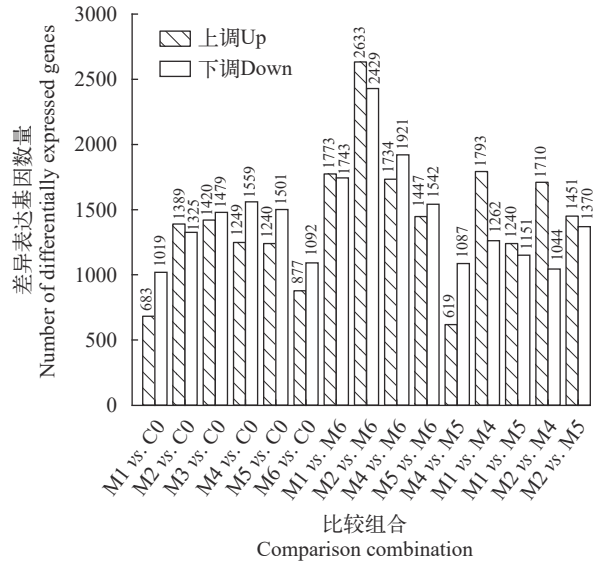


图 1 罗氏沼虾急性低温应激差异表达基因统计

Fig. 1 Statistics of differentially expressed genes in *M. rosenbergii* with acute low temperature stress

比较组合进行差异表达基因筛选的阈值为DESeq² pval<0.05 |log₂FoldChange|>0

The threshold for the differential gene screening of the comparison combination is DESeq² pval<0.05 |log₂FoldChange|>0

M6, 2989个)。同时发现, 应激12h与回温后间的DEGs数量(M4 vs. M6, 3655个)是应激12h与24h间的(M4 vs. M5, 1706个)2倍。应激1h分别与12h及24h间的DEGs数量相差700多个(M1 vs. M4, 3055个; M1 vs. M5, 2391个), 而应激3h分别与12h及24h间的DEGs数量几乎相同(M2 vs. M4, 2754个; M2 vs. M5, 2821个)。

为进一步探寻急性低温应激与正常条件下及不同急性低温应激持续时长间的基因表达异同, 本研究将各比较组在急性低温应激下的共有DEGs再次进行比较, 绘制热图, 探究在急性低温应激下共有DEGs的表达趋势。如图 2所示, 大多数DEGs在对照组与实验组中的表达模式存在明显差异, M4组(低温应激12h组)与其他实验组的DEGs表达模式也有明显差异。整体上, 实验组大部分基因比对照组表达量低, 尤其在M1组(低温应激1h)表现最为明显; 部分基因实验组相对对照组表达量更高。如γ-谷氨酰水解酶(*Gamma-glutamyl hydrolase*)等基因在实验组中的表达量高于对照组, 且在实验组中呈现先增后减的趋势, 并在12h时达到最大; 而海藻糖-6-磷酸合酶(*Trehalose-6-phosphate synthase*)等基因在实验组中的表达量低于对照组, 且在实验组中的表达量呈先增后减的趋势, 在12h时达到最大。

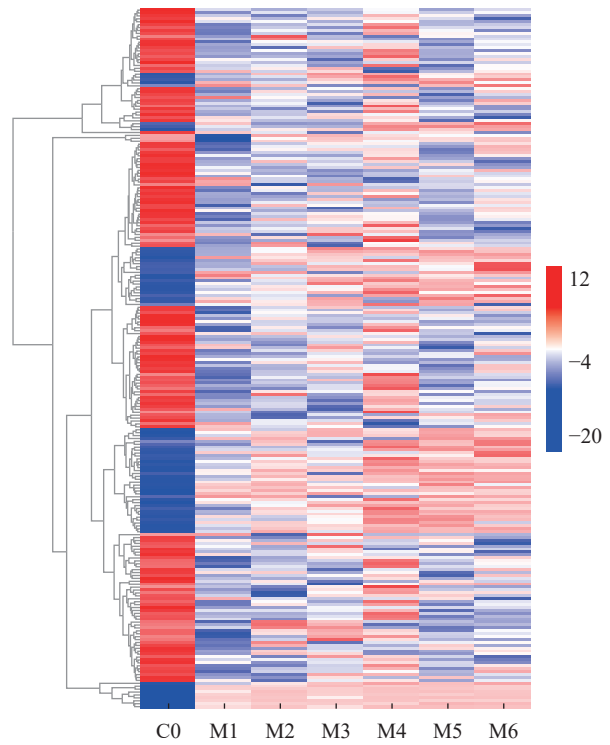


图 2 罗氏沼虾急性低温应激差异表达基因热图

Fig. 2 Heatmap of differentially expressed genes in *M. rosenbergii* with acute low temperature stress

2.3 差异表达基因GO富集分析

对急性低温应激下的DEGs做GO功能分析统计, 图3展示了应激1h与回温后(M1 vs. M6)之间DEGs的分析结果。结果显示, 分子功能类中的催化活性(Catalytic activity)是包含DEGs最多的类别, 其次还有氧化还原酶活性(Oxidoreductase activity)、氧化还原过程(Oxidation-reduction process)、糖代谢过程(Carbohydrate metabolic process)和水解酶活性(Hydrolase activity)等生物功能类和生物过程类。

2.4 差异表达基因KEGG富集分析

从各比较组间KEGG富集分析中选取富集最显著的20个代谢通路(pathway), 做KEGG富集气泡图(部分结果如图4所示, M1 vs. M4)。综合各比较组间结果显示, 所有比较组内DEGs主要集中在溶酶体(Lysosome)、淀粉和蔗糖代谢(Starch and sucrose metabolism)、抗原加工与呈递(Antigen processing and presentation)途径中。所有比较组KEGG富集通路统计显示, 重复率在50%以上的通路还包括黏着斑(Focal adhesion)、ECM-受体互作(ECM-receptor

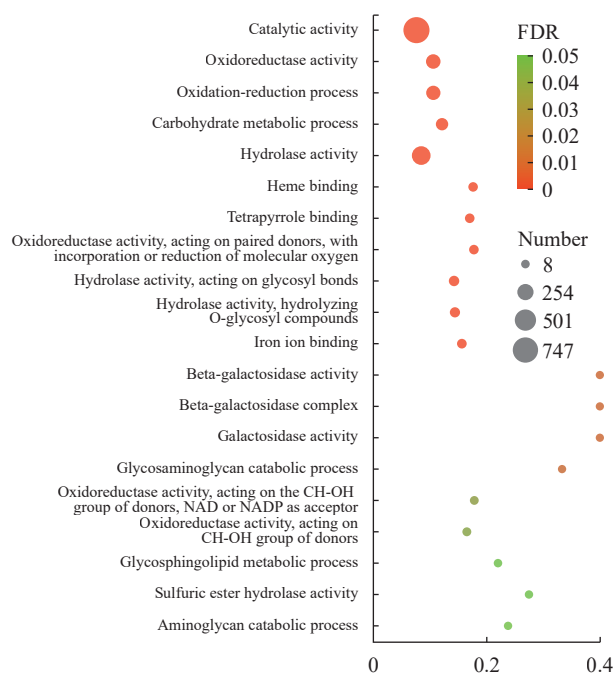


图3 罗氏沼虾急性低温应激差异表达基因GO 富集分析气泡图
Fig. 3 Bubble diagram of GO enrichment analysis of differentially expressed genes in *M. rosenbergii* with acute low temperature stress

FDR的大小用点的颜色来表示, FDR越小则颜色越接近红色, 每个GO term下包含的差异表达基因的多少用点的大小来表示

The size of FDR is represented by the color of dots. The smaller the FDR, the closer the color is to red. The number of differentially expressed genes contained in each GO term is represented by the size of dots

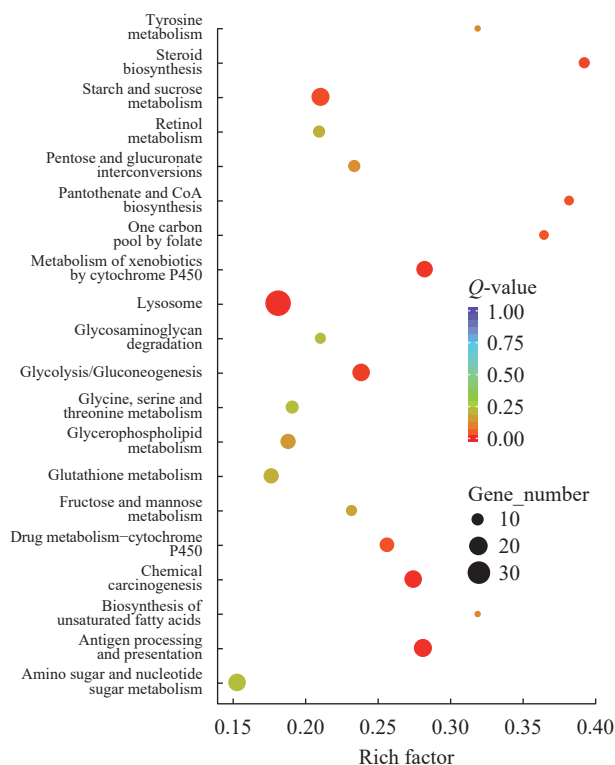


图4 罗氏沼虾急性低温应激差异表达基因KEGG 富集分析气泡图
Fig. 4 Bubble diagram of KEGG enrichment analysis of the differentially expressed genes in *M. rosenbergii*

Q-value 的大小用点的颜色来表示, Q-value 越小则颜色越接近红色, 每个pathway 下包含的差异表达基因的多少用点的大小来表示

The size of Q-value is represented by the color of dots. The smaller the Q-value, the closer the color is to red. The number of differentially expressed genes contained in each pathway is represented by the size of dots

interaction)、细胞色素 P450 对异生物质的代谢 (Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450) 和谷胱甘肽代谢 (Glutathione metabolism) 等信号通路。此外, 氧化磷酸化 (Oxidative phosphorylation)、p53 信号通路、mTOR 信号通路和 MAPK 信号通路在各组中也有富集现象。差异表达基因 *Cytochrome P450 2L1-like* (细胞色素 P450 2L1-like) 在 M1 vs. M4、M2 vs. M4 等组中富集在花生四烯酸代谢 (Arachidonic acid metabolism) 信号通路中并上调表达, 其表达量随应激时间增加呈先增后减的趋势; *NADP-specific isocitrate dehydrogenase* (NADP 特异性异柠檬酸脱氢酶) 在 M4 vs. C0、M1 vs. M5 等组中富集在谷胱甘肽代谢 (Glutathione metabolism) 信号通路中并上调表达, 各时间点表达量呈先减后增的趋势; *Hexokinase* (己糖激酶) 在 M4 vs. C0、M4 vs. M6 等组中富集在淀粉和蔗糖代谢信号通路中并下调表达, 各时

间点表达量呈先增后减的趋势。

2.5 差异表达基因的WGCNA分析

根据差异表达基因的TPM (Transcripts per kilobase million, 每千个碱基的转录数)值进行相关度分析并聚类, 相关度较高的基因被分配到同一个模块中, 在聚类树中聚类到相同的分支。聚类树中不同的分支代表不同的基因共表达模块, 并采用不同颜色表示, 灰色则代表未能划分到任何模块的基因。本研究中共有DEGs划分为3个模块(图 5), 蓝绿色(Turquoise)和褐色(Brown)模块聚在一起, 形成一个大的分支, 蓝色(Blue)模块单独聚为一支。不同模块间包含的基因个数差异较大, 其中Turquoise模块的基因个数最多, 有62个; 其次是Blue, 有39个; 最少的是Brown, 有33个。为了解各个共表达模块中基因的生物学功能, 对模块进行了KEGG功能富集分析, 发现Turquoise模块中的基因富集到了叶酸生物合成(Folate biosynthesis)、C型凝集素受体(C-type lectin receptor)、溶酶体(Lysosome)、AMPK、PI3K-Akt和甘油磷脂代谢(Glycerophospholipid metabolism)等信号通路上; Brown模块中的基因富集到细胞色素 P450 对异生素的代谢(Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450)、谷胱甘肽代谢(Glutathione metabolism)和脂肪酸代谢(Fatty acid

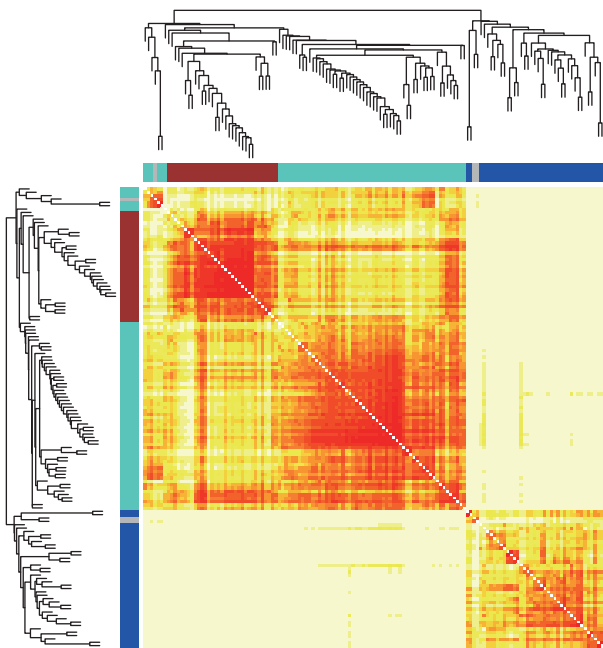


图 5 罗氏沼虾急性低温应激共有差异表达基因样本聚类及基因模块热图

Fig. 5 Clustering and gene module heatmap of public differentially expressed genes in *M. rosenbergii* under acute cold stress

基因聚类树的每一个分支对应一个模块
Each branch of the gene clustering tree corresponds to a module

metabolism)等信号通路上; Blue模块中的基因多数未能在基因库内找到注释, 只富集到了丙型肝炎(Hepatitis C)和催产素(Oxytocin)等信号通路上。

2.6 qRT-PCR验证

为了验证转录组数据的可靠性, 本研究在得到的DEGs中, 随机筛选10个基因进行基因表达分析, 这些基因在Nr数据库中的注释情况及qRT-PCR结果统计见表 4。在转录组结果中, 6个基因Cluster-33315.45505、Cluster-33315.45697、Cluster-33315.46133、Cluster-33315.44571、Cluster-

表 4 用于罗氏沼虾急性低温应激转录组验证的差异表达基因
Tab. 4 Differentially expressed genes and qRT-PCR results for the validation of the transcriptome of *M. rosenbergii* acute low temperature stress

基因ID Gene ID	NR注释 Annotated in NR	log ₂ (差异倍数) log ₂ (Fold change)	表达模式 Regulation
Cluster-33315.45505	假定蛋白: LOC113813141 Uncharacterized protein: LOC113813141	-1.57 (M1 vs. C0)	下调 (down)
Cluster-33315.45697	β-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶 Beta-N-acetylglucosaminidase	-1.81 (M1 vs. C0)	下调 (down)
Cluster-33315.46133	γ AMP 活化蛋白激酶亚基 γ AMP-activated protein kinase subunit gamma	-1.56 (M1 vs. C0)	下调 (down)
Cluster-33315.43078	细胞色素 P450 2L1 样 Cytochrome P450 2L1-like	1.30 (M1 vs. M4)	上调 (up)
Cluster-33315.43475	反式-1, 2-二氢苯-1, 2-二醇脱氢酶 Trans-1, 2-dihydrobenzene-1, 2-diol dehydrogenase	1.09 (M1 vs. M4)	上调 (up)
Cluster-33315.44357	谷胱甘肽 S-转移酶 μ 1 样 Glutathione S-transferase μ 1-like	1.32 (M1 vs. M4)	上调 (up)
Cluster-33315.44571	细胞周期蛋白G2 Cyclin G2	-1.35 (M1 vs. M4)	下调 (down)
Cluster-33315.44900	醇脱氢酶 3类 Alcohol dehydrogenase class-3	1.85 (M1 vs. M4)	上调 (up)
Cluster-33315.42081	Ras 相关 C3 肉毒杆菌毒素底物 1 样亚型 X5 Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1-like isoform X5	-1.59 (M1 vs. M6)	下调 (down)
Cluster-33315.45323	热休克蛋白 70 Heat shock protein 70	-1.19 (M1 vs. M6)	下调 (down)

33315.42081和Cluster-33315.45323在急性低温应激下呈下调表达,而4个基因Cluster-33315.43078、Cluster-33315.43475、Cluster-33315.44357和Cluster-33315.44900则呈上调表达。qRT-PCR分析得到的基因表达趋势与转录组结果中基因表达的趋势一致(图6),表明基于转录组测序技术获得的DEGs分析结果准确可靠。

3 讨论

3.1 急性低温应激时长对罗氏沼虾肝胰腺基因表达的影响

本研究结果显示,急性低温应激持续时间的长短对罗氏沼虾肝胰腺的基因表达会产生不同的影响。与对照组相比,实验组的DEGs数量在前3h呈爆发性增加的趋势,到6h最高,据此推测在急性低温应激的6h内,罗氏沼虾体内稳态产生了剧烈的变化,特别是在3h内变化速度相对较快,但随着应激时间的延长,对低温的适应性逐渐增强,建立了低温环境下的稳态(建立时间点可能在3—6h),且在回温后,稳态又重新恢复到短期低温应激时的平衡。类似地,实验组内各时间点之间的比较分析发现,低温应激3h与回温后的DEGs数量远高于其他比较组,随着应激时间的进一步延长,应激12h和24h分别与回温后的DEGs数量逐渐降低,这也证明低温应激前3h对罗氏沼虾肝胰腺的基因表达具有较大影响,而后罗氏沼虾逐渐适应低温环境,建立起新

的稳态。在对凡纳滨对虾的急性低温胁迫研究中发现,MAPK信号通路上的*p38*基因也有类似的现象存在,*p38*在低温应激前3h内的表达量爆发性增加,而后趋于平稳^[29]。另外,应激12h与回温后的DEGs数量是12h组与24h组间的2倍多,这暗示在较长时间的急性低温应激下,罗氏沼虾体内的稳态与回温后体内的稳态存在极大差异。而在3h分别与12h及24h之间的DEGs数量几乎相同,表明急性低温应激引起的罗氏沼虾体内的新稳态可能在3h后达到新的平衡,这与斑马鱼中的研究结果类似。斑马鱼在急性低温应激1h后,其肝胰腺、大脑和鳃中*SOD*基因的表达量升到最高,到6h时则显著下降,而*CAT*基因的表达量则是在6h时上升至最高^[4]。

将各比较组进行共有DEGs分析后发现,1h、6h、12h和24h分别与对照组间的共有DEGs比3h、6h、12h、24h分别与对照组间的共有DEGs更少,这表明3h的应激可能比1h应激引起更多基因的差异表达。在栉孔扇贝(*Chlamys nobilis*)的急性低温应激研究中发现,在前3h,其体内的*CAT*含量显著上升,而*SOD*含量下降;在3—6h内,*CAT*含量几乎不变,但*SOD*含量显著上升^[30]。总之,各时间点间的DEGs数量分析结果揭示,罗氏沼虾急性低温应激的前3h内,大多数DEGs为应对低温胁迫,其表达量产生了迅速变化,但并不稳定,随着低温应激时间的延长,在3—6h逐渐稳定,随后保持这个稳定的状态。有少数基因的表达量在急性低温应激前期可能无差异表达,或者是差异表达量不明显,但在急性低温应激后期或回温后,这些基因的差异表达量产生了显著的变化(如Cluster-33315.45323是在1h与回温后间比较发现的DEGs)。

3.2 急性低温应激下的罗氏沼虾肝胰腺差异表达基因

虾类的肝胰腺是一个非常重要的器官,有消化、解毒和储存营养等功能。本研究结果显示,急性低温应激下的DEGs大多富集在溶酶体、淀粉和蔗糖代谢、抗原加工和呈递途径中。已有研究表明,低温可影响斑马鱼^[31]、七彩神仙鱼(*Symphyodon aequifasciatus*)^[32]、河豚(*Takifugu obscurus*)^[33]、尼罗罗非鱼^[34]和栉孔扇贝^[30]等水产动物的抗氧化酶活性,溶酶体在低温诱导的细胞程序性死亡中发挥重要作用^[35]。本研究差异表达基因GO分类的分子功能类中,基因富集最多的是催化活性和氧化还原酶等酶的活性,这一结果表明在急性低温应激下,罗氏沼虾肝胰腺中的各种酶基因表达发生了变化,且应激不同时间长度后变化较大,涉及的信号通路也较多,包括氧化磷酸化、p53信号通路、mTOR

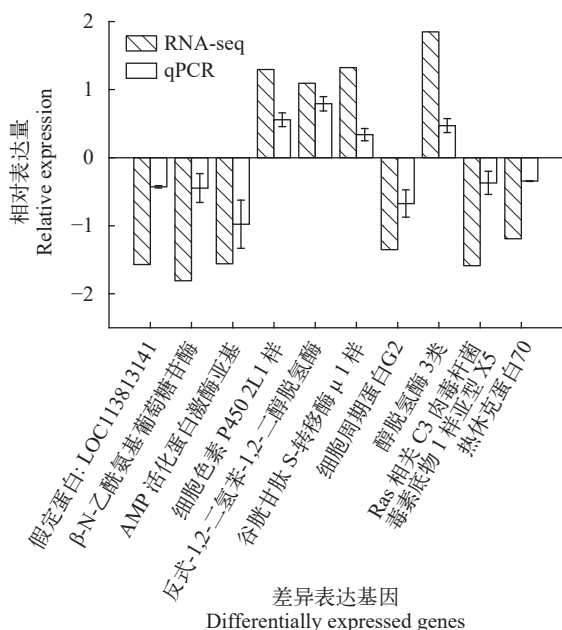


图6 低温下罗氏沼虾差异表达基因的qRT-PCR验证

Fig. 6 qRT-PCR verification of differentially expressed genes in *M. rosenbergii* under low temperature

信号通路、MAPK信号通路、黏着斑、ECM-受体互作、细胞色素 P450 对异生物质的代谢、谷胱甘肽代谢等。在凡纳滨对虾的研究中表明, 温度胁迫可以影响其肝胰腺组织的抗氧化酶和消化酶活性, 及生长代谢和能量代谢等^[36]。在日本沼虾中发现低温会刺激其肝胰腺生物膜流动性下降, 进而上调去饱和酶基因(包括乙酰辅酶A乙酰转移酶、脂肪酸合成酶和 δ -9去饱和酶)的表达水平, 生成棕榈酸, 从而将饱和脂肪酸催化成不饱和脂肪酸, 恢复膜的流动性^[15]。黏着斑的主要作用是连接细胞与细胞外基质; ECM-受体互作通路可影响细胞分化、增殖、黏附和形态发生等生物学过程; 细胞色素 P450 对异生物质的代谢通路则主要负责代谢解毒; 而谷胱甘肽代谢通路则与保持正常的免疫系统功能、抗氧化和整合解毒有关。低温胁迫下的斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)肝胰腺中, 较多DEGs富集在与上述信号通路有类似功能的白细胞跨内皮迁移(Leukocyte transendothelial migration)信号通路与补体和凝血级联(Complement and coagulation cascades)信号通路上, 证明肝胰腺在消除入侵病原体、促进炎症反应、清除凋亡细胞和坏死细胞碎片及调节适应性免疫反应等方面也具有作用^[37]。

低温胁迫会增加活性氧的产生, 而活性氧作为细胞凋亡的第二信使^[38], 与自由基的积累可以导致脱氧核糖核酸损伤以及细胞凋亡^[39]。在河豚的肝胰腺中, 低温会引起谷胱甘肽巯基转移酶(Glutathione S-transferase, GST)含量的增加, 表明河豚在低温环境下, 其肝胰腺内的活性氧含量增加, 进而引发GST含量升高, 以达到解除活性氧毒性的目的, 此外还有很多其他蛋白协同参与抗氧化过程^[40]。类似的, 在黄姑鱼(*Nibea albiflora*)的肝胰腺中也发现低温胁迫诱导的常见代谢物有谷氨酸、氧化谷胱甘肽(GSSG)等^[41]。本研究黏着斑、ECM-受体互作、细胞色素 P450 对异生物质的代谢和谷胱甘肽代谢等富集通路的发现, 表明罗氏沼虾在急性低温胁迫下, 细胞代谢功能可能受到了严重影响, 体内产生大量活性氧, 能量循环平衡被打破, 免疫系统也遭到破坏。这与罗氏沼虾在急性低温环境下表现出的停食、行动迟缓、易感染疾病甚至死亡等现象相互印证。

3.3 罗氏沼虾急性低温应激响应的关键基因及通路

本研究利用WGCNA分析, 特异性地筛选出与目标性状相关的基因, 并进行模块化分类, 得到具有生物学意义的共表达模块^[42]。急性低温应激下罗氏沼虾肝胰腺共有DEGs分成3个模块, 其中包括与细胞功能及免疫相关的Turquoise模块和与能量物

质代谢相关的Brown模块, 从而证明了急性低温应激会对罗氏沼虾的细胞功能、免疫和代谢等方面造成一定的影响。

共有DEGs热图显示, 实验组与对照组间的大多数DEGs的表达模式存在较大差异, 以 γ -谷氨酰水解酶和海藻糖-6-磷酸合酶两个基因为代表的一类基因, 其表达量在实验组中均呈先增后减, 且在12h时达到最大值的趋势。推测罗氏沼虾适应急性低温应激的时间可能为12h, 12h后由于低温应激时间过长, 其内环境稳态被破坏且无法自我调节, 导致基因表达量下降。本研究结果显示, γ -谷氨酰水解酶富集在叶酸生物合成信号通路上。叶酸作为B族维生素的一员, 能抑制PM2.5有机提取物对斑马鱼胚胎心脏发育的毒性, 减少心脏发育缺陷几率^[43]; 在石斑鱼(*Epinephelus malabaricus*)的饲料中添加一定量的叶酸, 能增加其肝脏内超氧化物歧化酶的活性, 减少超氧阴离子的产生率, 从而使鱼体能更好地应对氧化应激造成的损伤^[44]; 另外, 叶酸也能在水产动物的生长和免疫方面起到重要的作用^[45]。在本研究中, 急性低温应激下罗氏沼虾体内的 γ -谷氨酰水解酶表达量较对照组更高, 推测其参与的叶酸生物合成信号通路增强了罗氏沼虾的免疫力和抗氧化能力。

本研究中差异表达基因Cytochrome P450 2L1-like在应激1h、3h分别与12h比较组间富集在花生四烯酸代谢信号通路中且上调表达。细胞色素 P450 (Cytochrome P450, CYP450)是一类含有相同结构域的酶, 具有解毒功能, 污染物可诱导CYP450在mRNA、蛋白质和酶活性等水平上发生变化^[46]。已有研究者建立了CYP450荧光标记转基因斑马鱼, 用于检测铜、铬和锌等环境污染物^[46]; 在昆虫上也发现农药处理后可使CYP450表达量上调^[47]。本研究结果与以上结论一致, 表明罗氏沼虾在面临急性低温应激时, CYP450表达量升高, 进而减少体内的毒性代谢物生成, 抵抗外界低温引起的损伤。

NADP-specific isocitrate dehydrogenase (NADP特异性异柠檬酸脱氢酶)主要存在于细胞质中, 用于产生NADPH, 对生物体的能量代谢、脂类合成以及抗氧化胁迫起重要作用^[48, 49]。本研究结果发现, NADP-specific isocitrate dehydrogenase基因在应激12h与对照组、应激1h与24h比较组间富集在谷胱甘肽代谢信号通路中且上调表达, 推测在急性低温应激下, 罗氏沼虾体内的能量代谢、脂类合成及抗氧化等功能被高度激活, 从而产生更多的脂肪和能量供其保暖、维持正常代谢, 抵抗活性氧等物质带来的氧化损伤。

己糖激酶(Hexokinase, HK)催化的葡萄糖磷酸化是生物体内葡萄糖利用的第一步, 给斑马鱼注射葡萄糖后发现其体内己糖激酶浓度显著增加^[50]; 将条纹厚唇脂鲤(*Prochilodus lineatus*)暴露在不同浓度的铜离子水和酸性水(pH=8.0)中, 其体内的HK活性均有增加^[51]。上述研究结果证明动物体摄入葡萄糖或处于环境胁迫下时, 己糖激酶浓度均会增加, 然而本研究发现, 差异表达基因Hexokinase在应激12h与对照组及12h与回温后两个比较组间富集在淀粉和蔗糖代谢信号通路且下调表达, 推测罗氏沼虾在经历较长时间(12h)的急性低温应激后, 体内葡萄糖含量减少, 己糖激酶活性被抑制, 导致糖代谢能力下降。

花生四烯酸(Arachidonic acid, ARA)作为水产动物中重要的长链高不饱和脂肪酸, 能影响水产动物的生长、抗应激、脂质代谢和免疫调控等一系列生理调控作用^[52, 53]。在中华鲟(*Acipenser sinensis*)饲料中添加0.96%的ARA, 可增强鱼体的抗氧化能力, 增加组织中ARA代谢酶活性^[54]。谷胱甘肽(Glutathione, GSH)作为一种天然的抗氧化剂, 能增强动物的免疫和抗氧化能力, 在清除活性自由基和调节免疫系统方面起到重要作用^[55]。已有研究表明, 在饲料中添加适量的GSH能提升黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)^[56]和草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)^[57]等水产动物的免疫性能, 且能有效增强凡纳滨对虾的抗氨氮应激能力^[58]。基于以上研究结果, 推测罗氏沼虾低温应激下ARA和GSH含量增加, 可增强其免疫力和抗氧化能力, 以对抗低温导致的活性氧增加而引起的氧化及应激损伤。

以上这些基因及其所富集的信号通路, 参与了罗氏沼虾的脂肪酸代谢和糖代谢等能量代谢途径及抗氧化胁迫等功能。这也印证了在急性低温应激下, 罗氏沼虾的肝胰腺中可能存在与脂肪酸代谢、糖代谢、细胞凋亡和活性氧含量等相关的生物学过程的变化。

本研究基于转录组测序分析探讨了急性低温应激对罗氏沼虾肝胰腺基因表达的影响, 探寻不同急性低温应激时长对罗氏沼虾基因表达的影响, 识别了一些与急性低温应激相关的关键基因与代谢通路, 可以为深入研究罗氏沼虾急性低温胁迫响应的分子机理提供参考, 也可以为罗氏沼虾耐寒新品种的培育提供理论基础。

参考文献:

- [1] Fu H T, Jiang S, Xiong Y. Current status and prospects of farming the giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) and the oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) in China [J]. *Aquaculture Research*, 2012, **43**(7): 993-938.
- [2] FAO. FishStatJ-Software for fishery and aquaculture statistics time series [CP/OL]. 2020. <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en>.
- [3] Banu M R, Christianus A, Ikhsan N F M, et al. Effect of cold shock and hormone on growth and male morphotypes of freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) [J]. *Aquaculture Research*, 2016, **47**(12): 3740-3746.
- [4] Wu S M, Liu J H, Shu L H, et al. Anti-oxidative responses of zebrafish (*Danio rerio*) gill, liver and brain tissues upon acute cold shock [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2015(187): 202-213.
- [5] Liu F, Chu T, Wang M, et al. Transcriptome analyses provide the first insight into the molecular basis of cold tolerance in *Larimichthys polyactis* [J]. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 2020, **190**(1): 27-34.
- [6] Vornanen M, Hassinen M, Koskinen H, et al. Steady-state effects of temperature acclimation on the transcriptome of the rainbow trout heart [J]. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 2005, **289**(4): R1177-R1184.
- [7] Zhou T, Gui L, Liu M, et al. Transcriptomic responses to low temperature stress in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019(84): 1145-1156.
- [8] Long Y, Song G L, Yan J J, et al. Transcriptomic characterization of cold acclimation in larval zebrafish [J]. *BMC Genomics*, 2013(14): 612-627.
- [9] Gracey A Y, Fraser E J, Li W, et al. Coping with cold: an integrative, multitissue analysis of the transcriptome of a poikilothermic vertebrate [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004(101): 16970-16975.
- [10] Huang W, Ren C, Li H, et al. Transcriptomic analyses on muscle tissues of *Litopenaeus vannamei* provide the first profile insight into the response to low temperature stress [J]. *PLoS One*, 2017, **12**(6): e0178604.
- [11] Peng J, Wei P, Chen X, et al. Identification of cold responsive genes in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by suppression subtractive hybridization [J]. *Gene*, 2016, **575**(2): 667-674.
- [12] Teaniniuraitemoana V, Huvet A, Levy P, et al. Gonad transcriptome analysis of pearl oyster *Pinctada margaritifera*: identification of potential sex differentiation and sex determining genes [J]. *BMC Genomics*, 2014(15): 491.
- [13] Jung H, Lyons R E, Dinh H, et al. Transcriptomics of a giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*): de novo assembly, annotation and marker discovery [J].

[1] Fu H T, Jiang S, Xiong Y. Current status and prospects of farming the giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) and the oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) in China [J]. *Aquaculture Research*, 2012, **43**(7): 993-938.

- PLoS One*, 2011, **6**(12): e27938.
- [14] Baron D, Houlgate R, Fostier A, *et al.* Large-scale temporal gene expression profiling during gonadal differentiation and early gametogenesis in rainbow trout [J]. *Biology of Reproduction*, 2005, **73**(5): 959-966.
- [15] Wang L, Wang H, Wu N, *et al.* Gene expression associated with acute low thermal stress of *Macrobrachium nipponense* [J]. *Aquaculture Research*, 2021, **52**(9): 4325-4335.
- [16] Nie H, Jiang L, Huo Z, *et al.* Transcriptomic responses to low temperature stress in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016(55): 358-366.
- [17] 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.
- [18] Manni M, Berkeley M R, Seppely M, *et al.* BUSCO update: novel and streamlined workflows along with broader and deeper phylogenetic coverage for coring of eukaryotic, prokaryotic, and viral genomes [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, **38**(10): 4647-4654.
- [19] Kanehisa M, Araki M, Goto S, *et al.* KEGG for linking genomes to life and the environment [J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, **36**(suppl_1): D480-D484.
- [20] Buchfink B, Xie C, Huson D H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND [J]. *Nature Methods*, 2015, **12**(1): 59-60.
- [21] Moriya Y, Itoh M, Okuda S, *et al.* KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server [J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, **35**(suppl_2): W182-W185.
- [22] Finn R D, Tate J, Mistry J, *et al.* The pfam protein families database [J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, **30**(1): 276-280.
- [23] Götz S, García-Gómez J M, Terol J, *et al.* High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite [J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, **36**(10): 3420-3435.
- [24] Trapnell C, Williams B A, Pertea G, *et al.* Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation [J]. *Nature Biotechnology*, 2010, **28**(5): 511-515.
- [25] Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data [J]. *Nature Precedings*, 2010, **11**(10): R106.
- [26] Young M D, Wakefield M J, Smyth G K *et al.* Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias [J]. *Genome Biology*, 2010, **11**(2): R14.
- [27] Mao X, Cai T, Olyarchuk J G, *et al.* Automated genome annotation and pathway identification using the KEGG Orthology (KO) as a controlled vocabulary [J]. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 2005, **21**(19): 3787-3793.
- [28] Langfelder P, Horvath S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis [J]. *BMC Bioinformatics*, 2008(9): 559.
- [29] Luo Z, Huang W, Wang G, *et al.* Identification and characterization of *p38MAPK* in response to acute cold stress in the gill of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. *Aquaculture Reports*, 2020(17): 100365.
- [30] Tan K, Zhang B, Ma H, *et al.* Oxidative stress responses of golden and brown noble scallops *Chlamys nobilis* to acute cold stress [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019(95): 349-356.
- [31] Lu D L, Ma Q, Wang J, *et al.* Fasting enhances cold resistance in fish through stimulating lipid catabolism and autophagy [J]. *The Journal of Physiology*, 2019, **597**(6): 1585-1603.
- [32] Wen B, Jin S R, Chen Z Z, *et al.* Physiological responses to cold stress in the gills of discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*) revealed by conventional biochemical assays and GC-TOF-MS metabolomics [J]. *Science of the Total Environment*, 2018(640/641): 1372-1381.
- [33] Cheng C H, Ye C X, Guo Z X, *et al.* Immune and physiological responses of pufferfish (*Takifugu obscurus*) under cold stress [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017(64): 137-145.
- [34] Panase P, Saenphet S, Saenphet K. Biochemical and physiological responses of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* Lin subjected to cold shock of water temperature [J]. *Aquaculture Reports*, 2018(11): 17-23.
- [35] Vairetti M, Griffini P, Pietrocola G, *et al.* Cold-induced apoptosis in isolated rat hepatocytes: protective role of glutathione [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2001, **31**(8): 954-961.
- [36] Zhu M K, Yao C L. The impact of temperature stress on the oxygen metabolism and energy metabolism in the hepatopancreas of shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, **39**(5): 669-678. [朱孟凯, 姚翠鸾. 温度胁迫对凡纳滨对虾肝胰腺氧代谢及能量代谢的影响 [J]. 水产学报, 2015, **39**(5): 669-678.]
- [37] Sun Z, Tan X, Xu M, *et al.* Liver transcriptome analysis and de novo annotation of the orange-spotted groupers (*Epinephelus coioides*) under cold stress [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2019(29): 264-273.
- [38] Jiang W, Li J, Gao Y, *et al.* Effects of temperature change on physiological and biochemical responses of Yesso scallop, *Patinopecten yessoensis* [J]. *Aquaculture*, 2016(451): 463-472.
- [39] Du Z, Zhu L, Dong M, *et al.* Effects of the ionic liquid [Omim] PF₆ on antioxidant enzyme systems, ROS and DNA damage in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2012(124/125): 91-93.
- [40] Wen X, Zhang X, Hu Y, *et al.* iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of *Takifugu fasciatus* liver in response to low-temperature stress [J]. *Journal of Proteomics*, 2019(201): 27-36.

- [41] Jiao S, Nie M, Song H, *et al.* Physiological responses to cold and starvation stresses in the liver of yellow drum (*Nibea albiflora*) revealed by LC-MS metabolomics [J]. *Science of the Total Environment*, 2020(715): 136940.
- [42] Guo Y C, Wang P J, Jin S, *et al.*, Identification of co-expression gene related to tea plant response to glyphosate based on WGCNA [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2022, **55**(1): 152-166. [郭永春, 王鹏杰, 金珊, 等. 基于WGCNA鉴定茶树响应草甘膦相关的基因共表达模块 [J]. *中国农业科学*, 2022, **55**(1): 152-166.]
- [43] Yue C. The cardiac developmental toxicity of PM_{2.5} and the protective mechanisms of folic acid in zebrafish embryos [D]. Suzhou: Soochow University, 2018. [乐聪. 大气PM_{2.5}对斑马鱼胚胎的心脏发育毒性及叶酸的保护机制 [D]. 苏州: 苏州大学, 2018.]
- [44] Lin Y H, Lin H Y, Shiau S Y. Dietary folic acid requirement of grouper, *Epinephelus malabaricus*, and its effects on non-specific immune responses [J]. *Aquaculture*, 2011, **317**(1-4): 133-137.
- [45] Miao S, Zhang W, Xu W, *et al.* Dietary folic acid requirement of juvenile abalone *Haliotis discus* Hannai Ino. [J]. *Aquaculture*, 2013(400/401): 73-76.
- [46] Li C J, Zhao J, Zhang S Y, *et al.* Generation of cytochrome P-450 CYP3A65 labeled fluorescence transgenic zebrafish and its biological response to environmental pollutants [J]. *Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2014, **28**(6): 870-877. [李春杰, 赵建, 张世勇, 等. 细胞色素 P450CYP3A65斑马鱼模型建立及对环境污染物的生物响应 [J]. *中国药理学与毒理学*, 2014, **28**(6): 870-877.]
- [47] Chang G F, Xue H, Huangfu N B, *et al.* Evaluation the influence of three pesticides on the expression of six Cytochrome P450 genes in *Propylea japonica* [J/OL]. *Chinese Journal of Biological Control*. <https://doi.org/10.16409/j.cnki.2095-039x.2021.11.020> [常国凤, 薛汇, 皇甫宁博, 等. 三种农药对龟纹瓢虫细胞色素P450基因表达的影响 [J/OL]. *中国生物防治学报*. <https://doi.org/10.16409/j.cnki.2095-039x.2021.11.020>]
- [48] Kirsch M, de Groot H. NAD(P)H, a directly operating antioxidant [J]. *The FASEB Journal*, 2001, **15**(9): 1569-1574.
- [49] Nakamura H. Thioredoxin and its related molecules: update 2005 [J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2005, **7**(5/6): 823-828.
- [50] González-Alvarez R, Ortega-Cuellar D, Hernández-Mendoza A, *et al.* The hexokinase gene family in the zebrafish: Structure, expression, functional and phylogenetic analysis [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, **152**(2): 189-195.
- [51] Cleoni S C, Marisa N F. Effects of copper toxicity at different pH and temperatures on the in vitro enzyme activity in blood and liver of fish, *Prochilodus lineatus* [J]. *Molecular Biology Reports*, 2019, **46**(5): 4933-4942.
- [52] Xie F J. Studies on nutritional physiology of amino acid and fatty acid for large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) larvae [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011. [谢奉军. 大黄鱼仔稚鱼氨基酸及脂肪酸营养生理的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.]
- [53] Luo Z, Tan X Y, Li X D, *et al.* Effect of dietary arachidonic acid levels on growth performance, hepatic fatty acid profile, intermediary metabolism and antioxidant responses for juvenile *Synechogobius hasta* [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2012, **18**(3): 340-348.
- [54] Wu J P, Yang D Q, Du H, *et al.* Effects of dietary arachidonic acid content on survival and growth, antioxidant capacity, arachidonic acid metabolic enzyme activities and intestinal microbial composition of F₂ generation Chinese sturgeon [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, **33**(11): 6534-6547. [吴金平, 杨代勤, 杜浩, 等. 饲料花生四烯酸含量对子二代中华鲟成活与生长、抗氧化能力、组织花生四烯酸代谢酶活性及肠道菌群组成的影响 [J]. *动物营养学报*, 2021, **33**(11): 6534-6547.]
- [55] Zhou T T. Effects of glutathione on growth performance and antioxidant ability of GIFT *Oreochromis niloticus* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2012. [周婷婷. 谷胱甘肽对吉富罗非鱼生长性能和抗氧化功能的影响 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2012.]
- [56] Zhou Y L, Sun Y P, Huang Y H, *et al.* Effects of dietary supplementation with glutathione on tissue GSH level, immunity, and antioxidant capacity of juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, **42**(4): 728-735. [周艳玲, 孙育平, 黄燕华, 等. 饲料中添加谷胱甘肽对黄颡鱼幼鱼组织谷胱甘肽含量、免疫及抗氧化性能的影响 [J]. *水生生物学报*, 2018, **42**(4): 728-735.]
- [57] Ming J H, Ye J Y, Zhang Y X, *et al.* Effects of dietary reduced glutathione on growth performance, non-specific immunity, antioxidant capacity and expression levels of IGF-I and HSP70 mRNA of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Aquaculture*, 2015(438): 39-46.
- [58] Xu D D, Liu X H, Cao J M, *et al.* Dietary glutathione as an antioxidant improves resistance to ammonia exposure in *Litopenaeus vannamei* [J]. *Aquaculture Research*, 2012, **43**(2): 311-316.

TRANSCRIPTOMIC RESPONSES TO ACUTE LOW TEMPERATURE STRESS IN GIANT FRESHWATER PRAWN *MACROBRACHIUM ROSENBERGII*

YANG Min-Min¹, TU Hai-Hui¹, XING Qian-Qian¹, TANG Qiong-Ying¹, YI Shao-Kui¹, XIA Zheng-Long²,
CAI Miao-Ying², CHEN Guo-Zhu¹, LAN Xuan¹, ZHONG Zhen-Xiao¹, HUANG Xiao¹,
GAO Quan-Xin¹ and YANG Guo-Liang^{1,2}

(1. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Aquatic Resources Conservation and Development; Key Laboratory of Aquatic Animal Genetic Breeding and Nutrition, Chinese Academy of Fishery Sciences; College of Life Sciences, Huzhou University, Huzhou 313000, China; 2. Jiangsu Shufeng Prawn Breeding Co. LTD, Gaoyou 225654, China)

Abstract: The giant freshwater prawn (GFP) *Macrobrachium rosenbergii* is one of the important economically freshwater shrimp species, and its annual production in China is dominant in the world. However, its tolerance to low temperatures is extremely poor, and acute low temperatures can lead to large-scale deaths and cause huge economic losses. In order to explore genes related to the GFP response to acute low temperature, comparative transcriptomic analyses were performed for the hepatopancreas of adult GFPs exposed to low temperature. The low temperature stress group (16°C) and the control group (24°C) were set up. The water temperature of the stress group was decreased from 24°C to 16°C at a rate of around 2°C/h through adding ice cubes. The hepatopancreas were collected for transcriptomic analyses from exposed shrimps respectively at 1h, 3h, 6h, 12h, 24h after acute cooling at 16°C, rewarming to 24°C and control group. The results of differentially expressed genes (DEGs) showed that 1702 DEGs were identified between samples of cooling for 1h and the control group (M1 vs. C0); the number of DEGs between the stress group and the control group began to increase gradually with stress time, and reached the maximum at 6h (M3 vs. C0, a total of 2899), then gradually decreased, maintaining the homeostasis under low temperature stress. After rewarming to 24°C, the number of DEGs (M6 vs. C0, 1969) returned to the level of 1h stress. Additionally, the DEGs number (5062) between samples of stress for 3h and rewarming to 24°C (M2 vs. M6) was almost 1.5 times of that (3516) between samples of stress for 1h and rewarming (M1 vs. M6). With the extension of time, the number of DEGs decreased gradually, suggesting that the homeostasis of the GFP had drastic changes in the first 3h of acute low temperature stress, but the adaptability to low temperature gradually increased with stress time, and a steady state under low temperature was established probably after being stressed from 3h to 6h, and after rewarming, the homeostasis returned to the equilibrium of short-term cold stress. KEGG enrichment analysis showed that DEGs was enriched in lysosome, starch and sucrose metabolism, antigen processing and presentation. Adhesion spots, ECM-receptor interaction, metabolism of cytochrome P450 to isobiotic substances, glutathione metabolism, oxidative phosphorylation, and p53 signaling pathway were also involved in the regulation of acute cold stress in the GFP. The common DEGs among all groups were clustered as the cell function and immunity modules and energy metabolism modules. In addition, the up-regulated *cytochrome P450 2L1-like* gene in the arachidonic acid metabolic signaling pathway was screened, and its expression increased firstly and then decreased with the increase of cold stress time. *NADP-specific isocitrate dehydrogenase*, an upregulated gene in glutathione metabolic signaling pathway, was firstly reduced and then increased with time. Expression of *hexokinase*, a down-regulated gene in starch and sucrose metabolic signaling pathways, increased and then decreased over time. The above mentioned enriched pathways indicated that the metabolic function of the GFP might have been seriously affected under acute low temperature stress, with a large amount of reactive oxygen species being produced, the balance of energy circulation being disrupted, and the immune system being also damaged, which was corroborated with the phenomena of fasting, slow movement, susceptibility to diseases and even death of the GFP under acute low temperature. Consequently, these screened pathways and genes may play important roles in energy metabolism and immune regulation during acute cold stress in the GFP. The present study provides basic data for revealing the molecular regulatory mechanism of the response of the GFP to acute low temperature stress, also provides a theoretical basis for the selective breeding of new cold-tolerant GFP varieties.

Key words: Acute cold stress; Hepatopancreas; RNA-seq; Differentially expressed genes; Energy metabolism; Immune regulation; *Macrobrachium rosenbergii*