

DOI: 10.12264/JFSC2022-0378

慢性盐度胁迫下金钱鱼卵巢转录组分析

潘巧怡^{1,2}, 翟毅^{1,2}, 蔡博生^{1,2}, 江东能^{1,2}, 石红娟^{1,2}, 黄洋^{1,2}, 李广丽^{1,2}, 邓思平^{1,2}

1. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524088;

2. 广东省名特优鱼类生殖调控与繁育工程技术研究中心, 广东 湛江 524088

摘要:为了阐明盐度胁迫对金钱鱼(*Scatophagus argus*)代谢和生殖的影响, 采用 RNA-seq 技术对低盐组(5)、对照组(25)和高盐组(35)处理 40 d 后的 2 龄性成熟金钱鱼卵巢进行转录组分析。结果发现, 金钱鱼卵巢转录组测序获得 raw reads 共 398681318, clean reads 共 396910398。从低盐胁迫相对对照组(5 vs 25)和高盐胁迫相对对照组(35 vs 25)中分别筛选到 373 个和 874 个差异表达基因(DEGs)。与对照组相比, 低盐胁迫后氨基酸代谢相关基因(*sds*、*bhmt*)和脂肪酸代谢相关基因(*pnpla2*)显著下调; 高盐胁迫后 *pgr*、*cyp17a1* 和 *ers1* 等生殖相关基因显著下调。KEGG 通路富集分析发现, 低盐胁迫组相对对照组显著富集与代谢相关的通路为半胱氨酸和甲硫氨酸代谢, 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成代谢, 脂肪酸生物合成, 脂肪酸代谢, 皮质醇的合成和分泌, 醛固酮的合成和分泌, 脂肪细胞脂解的调节等; 高盐胁迫组相对对照组中显著富集的与生殖相关的通路为雌激素信号传导通路。这些结果表明, 氨基酸和脂肪酸的代谢调控可能在金钱鱼卵巢的低渗透压调节中起重要作用, 高盐胁迫可能抑制了金钱鱼卵巢中性类固醇激素的合成和延迟卵巢成熟发育时间。

关键词: 金钱鱼; 慢性盐度胁迫; 转录组测序; 差异表达基因

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005–8737–(2023)03–0324–10

盐度可影响鱼类的生长和生理代谢活动等^[1], 当外界环境盐度发生变化时, 鱼体会通过启动相关基因表达、形成相关分子调控信号网络、引起上皮运输和渗透调控因子以及自身器官感知盐度的变化等方式来适应环境应激^[2]。研究表明, 日本黄姑鱼(*Nibea japonica*)鳃、肾脏和肌肉都存在响应急性盐度胁迫的反应^[3]。盐度胁迫促进尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)肝脂肪分解作用和脂肪酸的氧化, 影响脂肪酸组成和脂代谢过程, 并通过体内脂代谢调节适应环境的盐度变化^[4]。低盐度胁迫可影响大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)肾组织代谢通路相关基因的表达^[5], 抑制肝脏代谢酶活性^[6]。

盐度是影响鱼类性腺发育和成熟的重要因素^[7]。在淡水中, 松江鲈(*Trachidermis fasciatus*)卵巢虽

可发育, 但不能发育到成熟和排卵^[8]。大幅度升高盐度可抑制尼罗罗非鱼和黑头软口鲮(*Pimephales promelas*)的性腺发育和生殖^[9–10]; 在海水条件下, 大马哈鱼(*Oncorhynchus keta*)的性腺发育缓慢, 但进入淡水后其性腺可迅速发育并达到性成熟^[11]。在淡水中, 鳗鲡(*Anguilla japonica*)性腺不能完全发育成熟, 但经过适当盐度的养殖后, 可促进性腺发育成熟并排卵^[12]。

金钱鱼(*Scatophagus argus*)又名金鼓鱼, 隶属于鲈形目(Perciformes)、金钱鱼科(Scatophagidae)、金钱鱼属(*Scatophagus*), 是我国南方沿海池塘和网箱养殖的重要种类^[13]。金钱鱼存在性腺发育不同步的现象, 即雄鱼精巢先成熟, 但雌鱼卵泡尚未完全发育成熟^[14], 其人工繁殖技术尚不完善^[15]。

收稿日期: 2022-10-31; 修订日期: 2023-01-12.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31972775).

作者简介: 潘巧怡(1997–), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产经济动物繁殖生理学. E-mail: 2247643867@qq.com

通信作者: 邓思平, 教授, 研究方向为水产经济动物繁殖生理学. E-mail: dengsp@gdou.edu.cn

金钱鱼为广盐性鱼类, 盐度可影响金钱鱼幼鱼的鳃线粒体丰富细胞的形态结构, 或增加鳃线粒体丰富细胞数量以适应环境盐度的变化^[16]。急性盐度胁迫后, 金钱鱼肾脏中生长激素水平显著升高以适应高盐度环境^[17]; 在淡水和高盐胁迫后, 金钱鱼幼鱼肝脏中抗氧化酶活性提高以抵抗环境盐度变化产生的氧化应激^[18]。已有研究表明, 环境盐度可能在金钱鱼的性腺发育和成熟中发挥重要作用, 如 25 盐度下饲养的雌鱼性腺指数(gonadosomatic index, GSI)和血清雌二醇(17 β -estradiol, E2)水平显著性高于盐度 5 和 35 下的相应指标^[19]。但盐度在金钱鱼卵巢发育中的作用及作用机理仍不清楚, 盐度胁迫对金钱鱼性腺转录组影响的研究尚未见报道。因此, 本研究通过转录组测序技术和实时荧光定量 PCR 技术(RT-qPCR), 挖掘和分析响应盐度胁迫 40 d 后卵巢中的代谢与生殖相关基因, 为阐明金钱鱼对环境盐度的适应性及盐度对金钱鱼生殖调控的作用及作用机理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

雌性金钱鱼成鱼(体长: 18.0~24.0 cm, 体重: 300.0~450.0 g)的暂养和盐度处理均在广东海洋大学东海岛海洋生物研究基地进行。金钱鱼在盐度为 25, 温度为 27~29 °C 的环境中暂养两周, 暂养过程采用自然光周期, 每天 08:00 和 16:00 投喂商业浮性饲料(总投喂量约为鱼体重的 1%)。暂养结束后, 将金钱鱼立即随机放入 6 个水泥池(5.0 m×4.0 m×3.0 m)中, 每池 30 尾鱼。共设置低盐组(5)、高盐组(35)和对照组(25) 3 个盐度处理组, 每个盐度处理组设置两个重复。低盐组和对照组使用海水和淡水混合配制, 高盐组使用海水和海水晶进行配制。按照与暂养相同的饲养条件, 在不同盐度处理 40 d 后, 分别在各盐度组随机挑选 3 尾鱼采用 MS-222 麻醉后取卵巢组织于液氮中速冻后置于-80 °C 冰箱中保存, 以用于后续总 RNA 提取、反转录和测序。

1.2 总 RNA 提取

按照 RNA iso (TAKARA)试剂盒提取卵巢总

RNA, 采用 Nanodrop 2000 超微量核酸蛋白测定仪(Thermo Scientific, 美国)检验样品浓度和纯度, 利用质量分数 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 提取的总 RNA 置于-80 °C 保存, 备用。

1.3 RNA 文库构建以及测序

用 Ribo-ZeroTM 磁性试剂盒(Epicentre, Madison, WI, USA)去除总 RNA 中的 rRNA, 通过 Oligo (dT) 磁珠富集法富集真核 mRNA。将富集得到的 mRNA 用 Fragmentation Buffer 片段化为模板, 随机寡核苷酸为引物, 在 M-MuLV 逆转录酶体系中合成 cDNA 第一条链, 随后用 RNaseH 降解 RNA 链, 并在 DNA polymerase I 体系下, 以 dNTPs 为原料合成 cDNA 第二条链。QiaQuick PCR 提取试剂盒(Qiagen, Venlo, 荷兰)纯化双链 cDNA、末端修复、加 poly (A)尾并连接到 Illumina 测序适配器。将获得检测合格的 cDNA 文库送样到广州基迪奥生物科技有限公司进行 HiSeq2500 高通量测序。

1.4 转录组的组装和注释

为了确保后续用于信息分析的数据质量, 利用 fastp (版本 0.18.0)进一步筛选 reads, 包括移除包含 adapters 的 reads、接头污染的 reads、低质量的 reads、含 N 比例大于 10%的未知核苷酸 reads 以及含有 50%以上低质量(Q 值 ≤ 20) reads。采用 HISAT2 比对系统^[20]将 clean reads 比对到金钱鱼参考基因组, 建立参考基因组的索引后对参考基因组进行注释。

1.5 差异表达基因和通路富集分析

利用 StringTie 软件计算 FPKM 值, 采用 DESeq2^[21]软件进行差异表达基因(DEGs)分析, 以差异倍数 $|\log_2(FC)| \geq 1$ 且 $P \leq 0.05$ 作为差异表达基因检测过程中的筛选标准。通过基迪奥在线平台(<https://www.omicsmart.com/>)对差异表达基因进行 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析。

1.6 实时荧光定量 PCR

利用 Primer Premier 5 软件设计差异表达基因引物, 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表 1)。以 β -actin 为内参基因, 采用 RT-qPCR 对 14 个差异表达基因进行验证。RT-qPCR 根据 PerfectStartTM Green qPCR SuperMix 试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)说明书操作步骤, 在实

时荧光定量 PCR 仪(Roche, 瑞士)上进行 RT-qPCR 反应。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[22]计算各盐度组间差异表达基因的相对表达量。使用 SPSS 25.0 软件进行单因素方差分析($P<0.05$)。

表 1 检测金钱鱼卵巢转录组差异表达基因所用引物
Tab. 1 Primers used for verification of DEGs in the ovary transcriptome of *Scatophagus argus*

基因	gene	引物	primer	序列(5'-3')	sequence (5'-3')
sds		sds-f		AACGCTTCGTAGACGATGAGA	
		sds-r		ATGTTGTTTCCACCGCACAC	
atp2b3		atp2b3-f		GAAGATGCTGGGCTTGTTT	
		atp2b3-r		TCCGAGGTGTTGGTCAGTTA	
bhmt		bhmt-f		TCGCTGGGTGCGTGCTAA	
		bhmt-r		ACTGGTTTCCCGCTGGTCT	
pnpla2		pnpla2-f		CCTGCTCCTACCTATCACGC	
		pnpla2-r		AAAGCCCAGAACACCAACTC	
mmp2		mmp-f		TTTCGACGTAGAAGCCAACA	
		mmp-r		TGCCCTTGAGTAGAAAGATGG	
sox9b		sox9b-f		AATACCCGCATCTGCACAAC	
		sox9b-r		CAAACGCTCAGCTTCTTCCA	
pgr		pgr-f		CAACAGGAAGCAGCAACTGG	
		pgr-r		CACCTGGACTCAGACCTCACC	
cyp17a1		cyp17a1-f		CCTCATGTGGCTCTCGGTGACA	
		cyp17a1-r		ACCAGTGCCGTCGCTGTTCA	
esr1		esr1-f		AGATGCGTTTCTGTGCTGTATG	
		esr1-r		TCTTCTCCGATTCTGTCAAT	
wt1		wt1-f		TCCTCCTGTTTACGGATGCC	
		wt1-r		TGGTGGATGCCAGTGATTGA	
igfbp5		igfbp5-f		AAACCTGCTACCCACCCA	
		igfbp5-r		GCTTCTCTTCTGCTCCTTGC	
igfbp7		igfbp7-f		ACTGGAATCTGCGTCTGTAAG	
		igfbp7-r		GATGGGTTCTTTGCCCTCTTT	
coll17a1		coll17a1-f		TGTCAAATGGCGTTGGTGTC	
		coll17a1-r		TGAAATGCTTCCCGCTGTCT	
fstl1		fstl1-f		GGTCTCAGTCTGGCTGTCCG	
		fstl1-r		GTCAGCAGCATAGCAAACCA	
β -actin		β -actin-f		GAGAGGTTCCGTTGCCAGAG	
		β -actin-r		CAGACAGCACAGTGTGGCGT	

2 结果与分析

2.1 卵巢转录组 reads 测序结果

高通量测序结果显示, 9 个金钱鱼卵巢 mRNA 转录组库总共获得 raw reads 数目为 398681318, clean reads 序列数目为 396910398, clean reads 比率达到 99.4%。测序质量结果显示, 所有过滤后转录库 Q20 均超过 97%, Q30 则均超过 92%, GC 含量占比约在 51.99%~52.61% (表 2)。

表 2 不同盐度(5, 25 和 35)暴露下金钱鱼卵巢转录组测序数据的统计汇总结果

Tab. 2 Summary of sequencing data in the ovarian transcriptome of *Scatophagus argus* under different salinity (5, 25 and 35) exposure

样品	原始读取	干净读取(比率/%)	Q20/%	Q30/%	GC/%
sample	raw reads	clean reads (ratio/%)			
5ppt-1	37647426	37454608 (99.49)	97.34	92.96	52.42
5ppt-2	48015306	47790366 (99.53)	97.26	92.75	52.35
5ppt-3	45105610	44840712 (99.41)	97.15	92.62	52.25
25ppt-1	37826392	37724488 (99.73)	97.69	93.52	52.61
25ppt-2	44161754	43972426 (99.57)	97.26	92.79	51.99
25ppt-3	44699466	44511250 (99.58)	97.34	92.98	52.33
35ppt-1	50101946	49876524 (99.55)	97.27	92.86	52.31
35ppt-2	44875484	44682740 (99.57)	97.31	92.96	52.58
35ppt-3	46247934	46057284 (99.59)	97.31	92.91	52.52

2.2 差异表达基因分析

卵巢组织转录组分析发现, 在低盐组相对对照组中有 373 个 DEGs, 其中 139 个 DEGs 上调, 234 个 DEGs 下调; 在高盐组相对对照组有 874 个 DEGs, 其中 142 个 DEGs 上调, 732 个 DEGs 下调。以 25 为对照组, 将对比后的 DEGs 进行韦恩分析 (图 1), 同时在两个比较组中表现的 DEGs 共有 130 个, 在低盐组相对对照组中特异性差异的基因有 243 个, 在高盐组相对对照组中特异性差异的基因有 744 个。

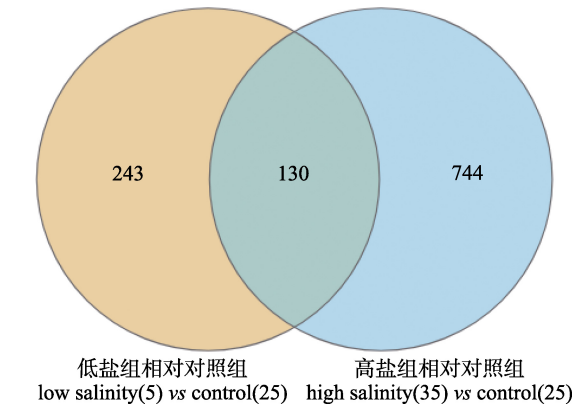


图 1 不同盐度(5, 25 和 35)暴露后金钱鱼卵巢转录组中差异表达基因韦恩图
Fig. 1 Venn diagram of DEGs of ovarian transcriptome in *Scatophagus argus* exposed under different salinity (5, 25 and 35)

2.3 GO 和 KEGG 富集分析

对差异表达基因进行 GO 功能富集分析, 显

示共富集到 45 个 GO 条目, 涉及 3 个方面: 生物学过程(biological process, BP)、分子功能(molecular function, MF)和细胞组分(cellular component, CC), 其中 BP 20 个、MF 9 个、CC 16 个。生物

学过程主要涉及代谢过程、生物调控和发育过程等; 分子功能主要涉及催化活性、信号转导活性和分子功能调节等; 细胞组分主要涉及细胞组分、细胞以及细胞器等(图 2)。

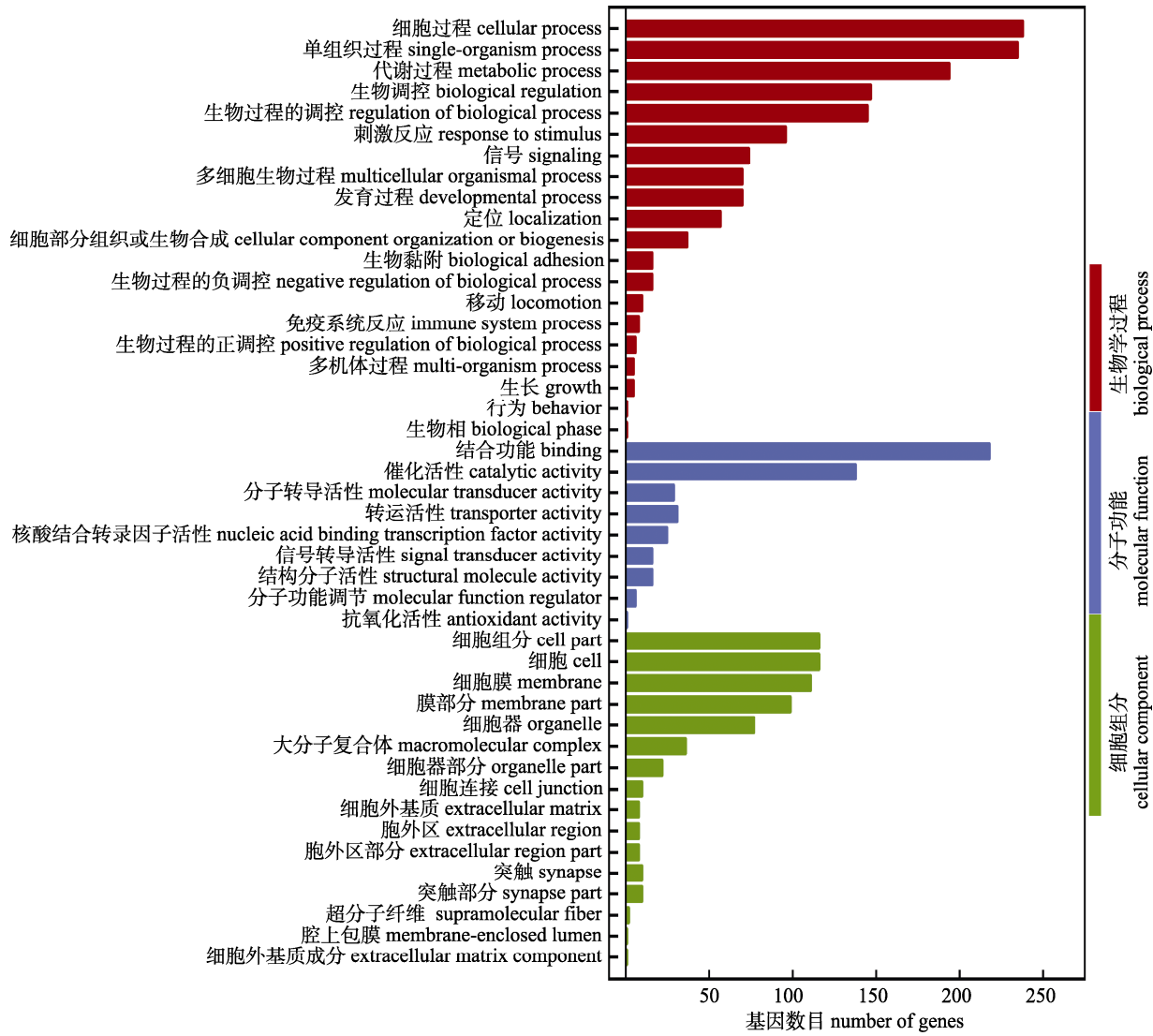


图 2 不同盐度(5, 25 和 35)暴露后金钱鱼卵巢中差异表达基因的 GO 功能富集分析
Fig. 2 GO enrichment analysis of DEGs of ovary in *Scatophagus argus* under different salinity (5, 25 and 35) exposure

对差异表达基因进行 KEGG 富集通路分析, 结果显示, 低盐组相对对照组共富集到 245 个通路, 差异表达基因显著富集的通路中与代谢相关的有脂肪酸生物合成、半胱氨酸和甲硫氨酸代谢、脂肪酸代谢、皮质醇的合成和分泌、醛固酮的合成和分泌、脂肪细胞脂解的调节以及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成(图 3a)。高盐组相对对照组共富集到 283 个通路, 其中与生

殖调节有关的信号通路只有雌激素信号传导通路(图 3b)。

2.4 代谢和生殖相关的差异表达基因的筛选

通过富集通路以及参考文献, 筛选得到 14 个与代谢和生殖相关的差异表达基因。其中与代谢相关的差异表达基因有: *sds* (丝氨酸脱水酶)、*atp2b3* (ATP 酶质膜钙转运蛋白 3)、*bhmt* (甜菜碱--同型半胱氨酸 S-甲基转移酶)、*pnpla2* (含 2 的类

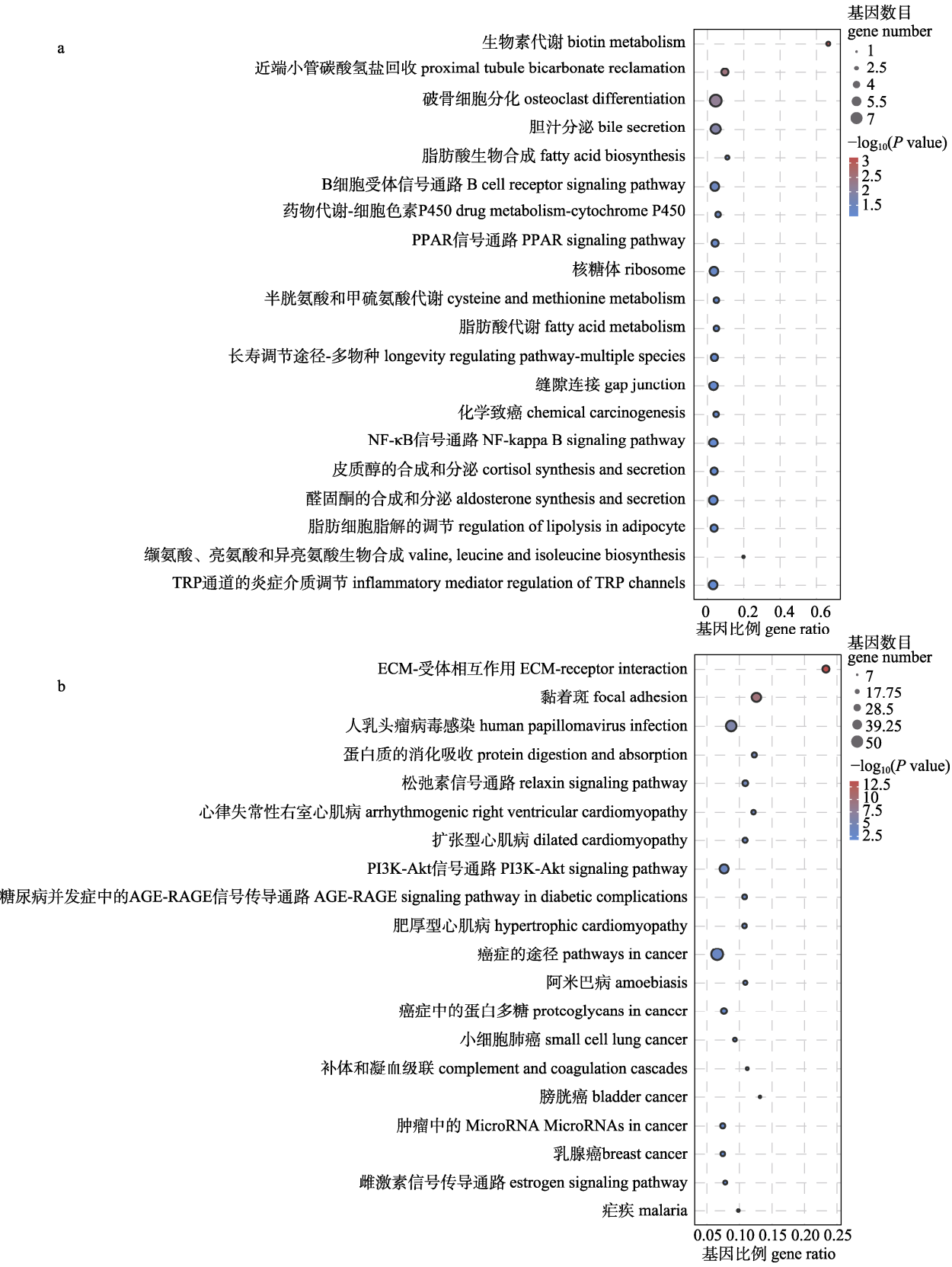


图 3 金钱鱼卵巢中低盐胁迫(a)和高盐胁迫(b)相对对照组差异表达基因富集的前 20 条 KEGG 通路

Fig. 3 Top 20 KEGG enriched pathways of ovarian DEGs in *Scatophagus argus* in low-salinity vs control group (5 vs 25)(a) and high-salinity vs control group (35 vs 25)(b)

patatin 磷脂酶结构域); 与生殖调节相关的差异表达基因有 *mmp2* (基质金属肽酶 2)、*sox9b* (SRY 盒转录因子 9b)、*pgr* (孕激素核受体)、*cyp17a1* (细胞色素 P450 家族 17 亚家族 A 成员 1)、*esr1* (雌激素受体 1)、*wt1* (WT1 转录因子)、*igfbp5* (胰岛素样生长因子结合蛋白 5)、*igfbp7* (胰岛素样生长因子结合蛋白 7)、*col17a1* (XVII 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链)、*fstl1* (卵泡抑素样 1)(表 3)。

表 3 不同盐度(5, 25 和 35)暴露后金钱鱼卵巢中与代谢和生殖相关的显著差异表达基因
Tab. 3 Significant DEGs related to metabolism and reproduction in ovary of *Scatophagus argus* under different salinity (5, 25 and 35) exposure

基因 ID gene ID	基因名 gene name	盐度 salinity	log ₂ (变化倍数) log ₂ (FC)	基因注释 gene annotation
EVM0013696	<i>sds</i> (↓)	5	-2.31	丝氨酸脱水酶 serine dehydratase
EVM0017405	<i>atp2b3</i> (↑)	5	+4.94	ATP 酶质膜钙转运蛋白 3 ATPase plasma membrane Ca ²⁺ transporting 3
EVM0008809	<i>bhmt</i> (↓)	5	-1.09	甜菜碱--同型半胱氨酸 S-甲基转移酶 betaine--homocysteine S-methyltransferase
EVM0009794	<i>pnpla2</i> (↓)	5	-11.09	含 2 的类 patatin 磷脂酶结构域 patatin like phospholipase domain containing 2
EVM0003932	<i>mmp2</i> (↓)	35	-2.50	基质金属肽酶 2 matrix metalloproteinase 2
EVM0002022	<i>sox9b</i> (↑)	35	+1.54	SRY 盒转录因子 9b SRY-box transcription factor 9b
EVM0000485	<i>pgr</i> (↓)	35	-1.94	孕激素核受体 progesterone receptor
EVM0020229	<i>cyp17a1</i> (↓)	35	-2.61	细胞色素 P450 家族 17 亚家族 A 成员 1 cytochrome P450 family 17 subfamily A member 1
EVM0019758	<i>esr1</i> (↓)	35	-2.04	雌激素受体 1 estrogen receptor 1
EVM0009602	<i>wt1</i> (↓)	35	-1.72	WT1 转录因子 WT1 transcription factor
EVM0003189	<i>igfbp5</i> (↓)	35	-2.65	胰岛素样生长因子结合蛋白 5 insulin-like growth factor binding protein 5
EVM0008137	<i>igfbp7</i> (↓)	35	-1.89	胰岛素样生长因子结合蛋白 7 insulin-like growth factor binding protein 7
EVM0002372	<i>col17a1</i> (↓)	35	-1.71	XVII 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链 collagen type XVII alpha 1 chain
EVM0013256	<i>fstl1</i> (↓)	35	-1.12	卵泡抑素样 1 follistatin like 1

2.5 慢性盐度胁迫对金钱鱼卵巢中代谢和生殖相关基因的影响

RT-qPCR 和 RNA-seq 结果显示, 低盐组相对对照组金钱鱼卵巢中与代谢相关的基因 *atp2b3* 的表达上调, *sds*、*bhmt*、*pnpla2* 的表达下调; 高盐组相对对照组金钱鱼卵巢中与生殖相关的基因 *sox9b* 的表达上调, *mmp2*、*pgr*、*cyp17a1*、*esr1*、*igfbp5*、*igfbp7*、*col17a1* 和 *fstl1* 等基因的表达下调。RT-qPCR 结果与金钱鱼卵巢组织转录组分析的结果相一致(图 4)。

3 讨论

3.1 低盐处理对金钱鱼卵巢中代谢通路和代谢相关基因表达的影响

盐度可影响鱼类的生长及其生理功能^[23]。水体的盐度变化不仅会影响水产动物机体的渗透压调节, 还会影响氨基酸代谢、能量代谢等^[24-25]。游离氨基酸对硬骨鱼类的细胞体积变化以及在渗

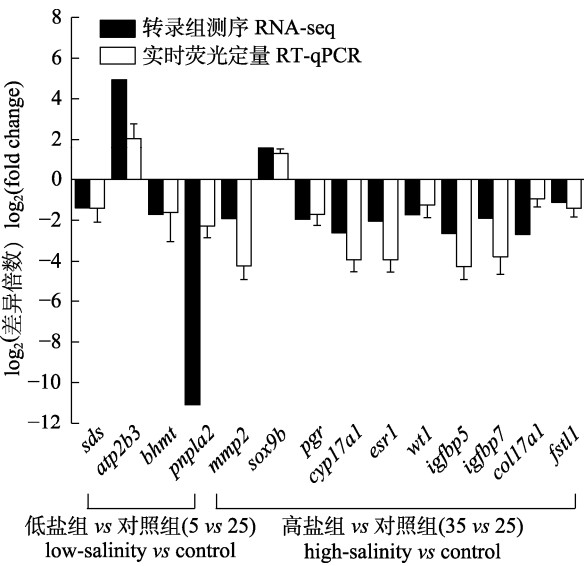


图 4 实时荧光定量 PCR 与转录组检测金钱鱼卵巢中不同盐度(5、25 和 35)暴露后组间差异表达基因差异倍数的比较分析

Fig. 4 Comparison of the fold change expression of putative DEGs between RNA-seq and qRT-PCR in ovary in *Scatophagus argus* under different salinity (5, 25 and 35) exposure

透调节中具有重要作用^[24,26]。当环境盐度发生变化时,为适应渗透压,大菱鲂幼鱼可通过新陈代谢途径改变体内氨基酸的含量^[27];在环境盐度降低时,三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)血清中的精氨酸和脯氨酸含量降低^[28];在环境盐度降低时,在南美蓝对虾(*Penaeus stylirostris*)中甘氨酸和脯氨酸的含量明显降低^[29];中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)肌肉中的精氨酸、脯氨酸和丙氨酸含量随着盐度降低而显著降低^[30]。当环境盐度发生变化时,不同物种中游离氨基酸种类的变化并不一致,这些氨基酸在渗透调节中作用的机理尚不清楚。在本研究中,低盐处理 40 d 后,金钱鱼卵巢转录组中前 20 个 KEGG 通路显著富集了多个氨基酸代谢通路,如半胱氨酸和甲硫氨酸代谢,缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成等多个氨基酸代谢通路。低盐度胁迫时,RT-qPCR 和 RNA-Seq 发现金钱鱼 *sds*、*bhmt* 的表达均显著下调。*sds* 编码与丝氨酸和甘氨酸代谢有关的酶,*bhmt* 编码一种胞质酶,能分别催化甜菜碱和高半胱氨酸向二甲基甘氨酸和蛋氨酸的转化。因而,丝氨酸、甘氨酸以及蛋氨酸代谢的下降可能是金钱鱼卵巢应对低盐度胁迫的一个重要调节方式。然而,氨基酸在金钱鱼卵巢渗透调节中的作用以及氨基酸代谢是否会影响金钱鱼卵巢发育等有待进一步深入研究。

当受到环境盐度胁迫时,鱼类细胞内外的离子浓度随水体盐度的变化而变化,为了维持体内正常的渗透压,鱼体需要改变细胞膜中脂肪酸的种类和含量以调整膜的通透性,即鱼类渗透压的调节与脂肪酸代谢有关^[31]。在本研究中,低盐处理 40 d 后,金钱鱼卵巢转录组中前 20 个 KEGG 通路中显著富集了多个脂肪酸代谢通路,如脂肪酸生物合成、脂肪酸代谢通路、脂肪细胞脂解的调节、醛固酮的合成和分泌等代谢通路。*pnpla2* 编码甘油三酯脂肪酶,该酶能够特异性地将甘油三酯水解为二酰基甘油并释放游离脂肪酸,*pnpla2* 的突变会导致脂肪的蓄积,使得游离脂肪酸含量下降^[32]。低盐胁迫时,金钱鱼 *pnpla2* 的表达下调,表明卵巢中脂肪酸含量在低盐处理后可

能降低。类似的结果还在其他鱼类的研究中发现,如日本鲈(*Lateolabrax japonicus*)^[33]和欧洲舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[34]在低盐度胁迫时二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸水平降低,大菱鲂幼鱼^[27]的脂肪酸含量总体随盐度降低而减少。此外,在低盐度胁迫下,金钱鱼卵巢组织中多个脂肪酸代谢通路的大部分基因下调,这些结果表明,金钱鱼可能通过降低卵巢内脂肪酸水平的方式以适应低盐环境。然而,脂肪酸在鱼类卵巢渗透压中的作用,以及其代谢随盐度变化的作用有待进一步的研究。

3.2 高盐处理对金钱鱼卵巢中生殖调节通路和生殖调节相关基因表达的影响

性类固醇激素在鱼类性别维持、性腺发育和生长发育中具有重要作用^[35]。在本研究中,高盐度处理 40 d 后,经 KEGG 分析发现,显著富集的和生殖调节有关的信号通路为雌激素信号传导通路。筛选到与生殖相关的 *pgr*、*cyp17a1*、*esr1*、*fstll* 等基因差异表达基因。孕激素受体 *pgr* 主要受特异配体孕激素的调控^[36],在斑马鱼(*Danio rerio*)的研究中发现,*pgr* 的表达下调会影响延迟卵母细胞的成熟以及影响排卵^[37]。*Cyp17a1* 参与性类固醇激素的合成^[38],在青鳉(*Oryzias latipes*)卵母细胞生长过程,*cyp17a1* 可促进 17 β -estradiol (E_2)的产生^[39]。*Cyp17a1* 基因的突变可导致尼罗罗非鱼中 E_2 的产生显著下降,*cyp17a1* 对于 E_2 的产生是必不可少的^[40]。*Esr1* 的敲除会导致性腺发育不全^[41]。转录组和 RT-qPCR 的结果表明,高盐度胁迫后,*pgr*、*cyp17a1*、*esr1* 的表达下调。已有研究表明,金钱鱼性腺在淡水或低盐海水中可正常发育,但需要在较高的盐度(25)中才能生殖^[42],但高盐度(35)胁迫会降低金钱鱼雌鱼血清中 E_2 的水平^[19],Su 等^[19]研究表明,金钱鱼性类固醇激素含量在盐度 25 中最高(相较于盐度 5 和 35),在不同海水盐度下卵巢最终都能发育成熟,但在盐度 25 中的 GSI 最高,本研究中,高盐度胁迫 40 d 后,金钱鱼卵巢中 *pgr*、*cyp17a1*、*esr1* 的表达下调,这表明高盐度的胁迫会降低金钱鱼卵巢中性类固醇激素的合成,可能会延迟卵巢成熟发育时间甚至影响

排卵等。但盐度影响鱼类性腺发育和成熟的作用机理仍需进一步的深入研究。

综上所述, 低盐度处理主要降低了半胱氨酸和甲硫氨酸代谢、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成; 降低脂肪酸合成; 皮质醇的合成和分泌、醛固酮的合成和分泌、脂肪细胞脂解的调节等代谢通路和下调了氨基酸和脂肪酸代谢相关的基因, 丝氨酸、甘氨酸、蛋氨酸和脂肪酸的代谢的下降可能在低渗透压的调节中起重要作用; 高盐度处理则显著影响了雌激素信号传导通路和下调了生殖相关基因, 高盐胁迫可能抑制了性类固醇激素的合成和延迟卵巢成熟发育时间等。

参考文献:

- [1] Rhee J S, Kim B M, Seo J S, et al. Cloning of growth hormone, somatolactin, and their receptor mRNAs, their expression in organs, during development, and on salinity stress in the hermaphroditic fish, *Kryptolebias marmoratus*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2012, 161(4): 436-442.
- [2] Ran F X, Jin W J, Huang S, et al. Research progress on the effects of salinity change on fish[J]. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition), 2020, 48(8): 10-18. [冉凤霞, 金文杰, 黄岫, 等. 盐度变化对鱼类影响的研究进展[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2020, 48(8): 10-18.]
- [3] Meng W, Xu K D, Li Z H, et al. Transcriptome analysis of *Nibea japonica* under acute salinity stress[J]. Journal of Fisheries of China, 2021, 45(5): 649-660. [孟玮, 徐开达, 李振华, 等. 急性盐度胁迫对日本黄姑鱼肌肉组织转录组的影响[J]. 水产学报, 2021, 45(5): 649-660.]
- [4] Song L Y, Cheng Y M, Zhao J L. Effects of salinity on the fatty acid composition and the expression of lipid-metabolism-related genes in the liver of Nile tilapia[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2020, 27(8): 859-867. [宋凌元, 程亚美, 赵金良. 盐度胁迫对尼罗罗非鱼肝脂脂肪酸组成与脂代谢相关基因表达的影响[J]. 中国水产科学, 2020, 27(8): 859-867.]
- [5] Cui W X. Construction of transcriptome under salinity stress and research of related functional genes on turbot (*Scophthalmus maximus*)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2017. [崔文晓. 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)盐度胁迫转录组构建及相关功能基因研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.]
- [6] Zhang J S. Effects of low-salinity stress on liver metabolizing enzyme and osmoregulation genes expression of turbot (*Scophthalmus maximus*)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020. [张金生. 低盐胁迫对大菱鲆肝脏代谢酶和渗透调节基因表达的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.]
- [7] Niu J Y, Liu Z C. Study on ecological factors affecting gonad development of fish[J]. Agriculture and Technology, 2016, 36(16): 109. [牛景彦, 刘占才. 影响鱼类性腺发育的生态因素研究[J]. 农业与技术, 2016, 36(16): 109.]
- [8] Shao B X, Wang C X, Huang C F. The influence of environmental salinity on the prolactin and gonadotropin-secreting regions in the pituitary of *Trachidermus fasciatus*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1980, 11(4): 314-319, 378. [邵炳绪, 王昌燮, 黄翠芳. 环境盐度对松江鲈鱼垂体激素分泌的影响[J]. 海洋与湖沼, 1980, 11(4): 314-319, 378.]
- [9] Schofield P J, Peterson M S, Lowe M R, et al. Survival, growth and reproduction of non-indigenous Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758). I. Physiological capabilities in various temperatures and salinities[J]. Marine and Freshwater Research, 2011, 62(5): 439.
- [10] Hoover Z, Weisgerber J N, Pollock M S, et al. Sub-lethal increases in salinity affect reproduction in fathead minnows[J]. Science of the Total Environment, 2013, 463-464: 334-339.
- [11] Choi Y J, Kim N N, Shin H S, et al. The expression of leptin, estrogen receptors, and vitellogenin mRNAs in migrating female chum salmon, *Oncorhynchus keta*: The effects of hypo-osmotic environmental changes[J]. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2014, 27(4): 479-487.
- [12] Zhang S. Study on mechanisms of effect of salinity on gonadal development of cultured *Anguilla japonica*[D]. Xiamen: Jimei University, 2012. [张森. 盐度影响人工养殖日本鳗鲡性腺发育的机理研究[D]. 厦门: 集美大学, 2012.]
- [13] Sun X N, Liu J Y, Feng G P, et al. Advances in reproductive biology of *Scatophagus argus*[J]. Fisheries Science & Technology Information, 2020, 47(5): 283-288. [孙雪娜, 刘鉴毅, 冯广朋, 等. 金钱鱼繁殖生物学研究进展[J]. 水产科技情报, 2020, 47(5): 283-288.]
- [14] Lan G B, Yan B, Liao S M, et al. Biology of spotted scat *Scatophagus argus*: A review[J]. Fisheries Science, 2005, 24(7): 39-41. [兰国宝, 阎冰, 廖思明, 等. 金钱鱼生物学研究及回顾[J]. 水产科学, 2005, 24(7): 39-41.]
- [15] Yang W, Chen H P, Jiang D N, et al. An overview on biology and artificial propagation and culture in the spotted scat *Scatophagus argus*[J]. Journal of Biology, 2018, 35(5): 104-108. [杨尉, 陈华谱, 江东能, 等. 金钱鱼生物学及繁殖技术研究进展[J]. 生物学杂志, 2018, 35(5): 104-108.]
- [16] Liu J Y, Yu Y F, Feng G P, et al. Effects of different salinities on the structure of gill mitochondria-rich cells of juvenile *Scatophagus argus*[J]. Marine Fisheries, 2022, 44(2): 209-218. [刘鉴毅, 余焱方, 冯广朋, 等. 不同盐度水平对金钱鱼幼鱼鳃线粒体丰富细胞结构的影响[J]. 海洋渔业,

- 2022, 44(2): 209-218.]
- [17] Mu X J, Su M L, Gui L, et al. Comparative renal gene expression in response to abrupt hypoosmotic shock in spotted scat (*Scatophagus argus*)[J]. General and Comparative Endocrinology, 2015, 215: 25-35.
- [18] Liu Y S, Xu J B, Shi Y H, et al. Effects of salinity on digestive enzyme and antioxidant enzyme activities of juvenile mackerel[J]. Fisheries Science & Technology Information, 2020, 47(4): 181-185. [刘永士, 徐嘉波, 施永海, 等. 盐度对金钱鱼幼鱼消化酶和抗氧化酶活性的影响[J]. 水产科技情报, 2020, 47(4): 181-185.]
- [19] Su M L, Duan Z Y, Shi H W, et al. The effects of salinity on reproductive development and egg and larvae survival in the spotted scat *Scatophagus argus* under controlled conditions[J]. Aquaculture Research, 2019, 50(7): 1782-1794.
- [20] Kim D, Langmead B, Salzberg S L. HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements[J]. Nature Methods, 2015, 12(4): 357-360.
- [21] Love M I, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. Genome Biology, 2014, 15(12): 550.
- [22] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [23] Zhu K C, Song L, Guo H Y, et al. Identification of fatty acid desaturase 6 in golden pompano *Trachinotus ovatus* (Linnaeus 1758) and its regulation by the PPAR α transcription factor[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 20(1): 23.
- [24] Zhang W X, Pan X, Shen X Q, et al. Effects of salinity stress on anscrition and expression in juvenile *Hippocampus kuda* bleeker[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2021, 45(5): 995-1004. [张文馨, 潘霞, 沈锡权, 等. 盐度胁迫对幼体大海马基因转录表达的影响[J]. 水生生物学报, 2021, 45(5): 995-1004.]
- [25] Huang G Q, Zhang L Y, Li J, et al. Effects of salinity acclimatization on the osmoregulation and energy metabolism of brown flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Periodical of Ocean University of China, 2013, 43(5): 44-51. [黄国强, 张灵燕, 李洁, 等. 盐度驯化对褐牙鲆幼鱼渗透压调节和能量代谢的影响[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2013, 43(5): 44-51.]
- [26] Liu L, Chen C, Li Y L, et al. Effects of short-term salinity stress on antioxidant and digestive physiology of hybrid progeny(Cromilepites altivelis ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂)[J]. Marine Sciences, 2018, 42(2): 78-87. [刘玲, 陈超, 李炎璐, 等. 短期低盐度胁迫对驼背鲈(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交子代幼鱼抗氧化及消化生理的影响[J]. 海洋科学, 2018, 42(2): 78-87.]
- [27] Zeng L, Lei J L, Liu B, et al. Effects of salinities on muscle amino acid and fatty acid composition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. Marine Sciences, 2014, 38(12): 40-47. [曾霖, 雷霖霖, 刘滨, 等. 盐度对大菱鲆幼鱼肌肉氨基酸和脂肪酸组成的影响[J]. 海洋科学, 2014, 38(12): 40-47.]
- [28] Long X W, Wu R F, Hou W J, et al. Effects of water salinity on the growth, ovarian development, osmoregulation, metabolism and antioxidant capacity of adult female swimming crab(*Portunus trituberculatus*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(8): 1768-1780. [龙晓文, 吴仁福, 侯文杰, 等. 水体盐度对雌性三疣梭子蟹生长、卵巢发育、渗透压调节、代谢和抗氧化能力的影响[J]. 水产学报, 2019, 43(8): 1768-1780.]
- [29] Cobb B F 3rd, Conte F S, Edwards M A. Free amino acids and osmoregulation in penaeid shrimp[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1975, 23(6): 1172-1174.
- [30] Wang Y R, Li E C, Yu N, et al. Characterization and expression of glutamate dehydrogenase in response to acute salinity stress in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e37316.
- [31] Xie D Z, Wang S Q, You C H, et al. Influencing factors and mechanisms on HUFA biosynthesis in teleosts[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(2): 456-466. [谢帝芝, 王树启, 游翠红, 等. 鱼类高度不饱和脂肪酸合成的影响因素及其机理[J]. 中国水产科学, 2013, 20(2): 456-466.]
- [32] Han S L. The interaction between lipophagy and lipolysis in regulation of lipid metabolism in fish[D]. Shanghai: East China Normal University, 2021. [韩思兰. 鱼类脂滴自噬与脂滴水解在脂代谢调控中的互作机制研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2021.]
- [33] Xu J, Yan B L, Teng Y J, et al. Analysis of nutrient composition and fatty acid profiles of Japanese Sea bass *Lateolabrax japonicus* (Cuvier) reared in seawater and freshwater[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2010, 23(5): 401-405.
- [34] Hunt A Ö, Özkan F, Engin K, et al. The effects of freshwater rearing on the whole body and muscle tissue fatty acid profile of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)[J]. Aquaculture International, 2011, 19(1): 51-61.
- [35] Wang J L, Yang Y M, Yang Q, et al. Effects of sex steroid hormones(estradiol and testosterone) on growth traits of female, male and pseduo-male Chinese tongue sole(*Cynoglossus semilaevis*)[J]. South China Fisheries Science, 2021, 17(4): 27-34. [王佳林, 杨英明, 杨倩, 等. 性类固醇激素雌二醇、睾酮对半滑舌鳎雌、雄、伪雄鱼生长性能的影响[J]. 南方水产科学, 2021, 17(4): 27-34.]
- [36] Shi H J, Ru X Y, Liu Y Q, et al. Transcriptomic analysis of hypothalamus in female *Scatophagus argus* after 17 β -estradiol injection[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2021, 41(2): 76-85. [石红娟, 茹笑影, 刘玉琪, 等. 17 β -雌二醇注

- 射雌性金钱鱼下丘脑转录组分析[J]. 广东海洋大学学报, 2021, 41(2): 76-85.]
- [37] Wu X J, Zhu Y. Downregulation of nuclear progesterone receptor (Pgr) and subfertility in double knockouts of progesterone receptor membrane component 1 (*pgrmc1*) and *pgrmc2* in zebrafish[J]. General and Comparative Endocrinology, 2020, 285: 113275.
- [38] Zhai Y, Liu J Y, Jia L Y, et al. Cloning, tissue distribution and expression of *cyp17a1* at different ovarian development stages in spotted scat (*Scatophagus argus*)[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2018, 38(5): 1-7. [翟毅, 刘建业, 贾丽英, 等. 金钱鱼 *cyp17a1* 基因克隆、组织分布及在卵巢发育中的表达[J]. 广东海洋大学学报, 2018, 38(5): 1-7.]
- [39] Zhou L Y, Wang D S, Shibata Y, et al. Characterization, expression and transcriptional regulation of *P450c17-1* and *-II* in the medaka, *Oryzias latipes*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, 362(3): 619-625.
- [40] Yang L Y, Zhang X F, Liu S J, et al. *Cyp17a1* is required for female sex determination and male fertility by regulating sex steroid biosynthesis in fish[J]. Endocrinology, 2021, 162(12): bqab205.
- [41] Couse J F, Yates M M, Deroo B J, et al. Estrogen receptor- β is critical to granulosa cell differentiation and the ovulatory response to gonadotropins[J]. Endocrinology, 2005, 146(8): 3247-3262.
- [42] Cai Z P, Wang Y, Hu J W, et al. Reproductive biology of *Scatophagus argus* and artificial induction of spawning[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2010, 29(5): 180-185. [蔡泽平, 王毅, 胡家玮, 等. 金钱鱼繁殖生物学及诱导产卵试验[J]. 热带海洋学报, 2010, 29(5): 180-185.]

Ovarian transcriptome analysis in *Scatophagus argus* under chronic salinity stress

PAN Qiaoyi^{1,2}, ZHAI Yi^{1,2}, CAI Bosheng^{1,2}, JIANG Dongneng^{1,2}, SHI Hongjuan^{1,2}, HUANG Yang^{1,2}, LI Guangli^{1,2}, DENG Siping^{1,2}

1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2. Guangdong Research Center on Reproductive Control and Breeding Technology of Indigenous Valuable Fish Species, Zhanjiang 524088, China

Abstract: Salinity is an important environmental factor that can affect the reproduction, growth, development, and metabolism of fish. To clarify the effects of salinity stress on reproduction and metabolism, we studied a two-year-old sexually mature spotted scat (*Scatophagus argus*). The ovarian transcriptome was analyzed using the RNA-sequence technique after the fish were stressed with low salinity (5), control (25), and high salinity (35) for 40 days. We obtained 398681318 raw reads and 396910398 clean reads from the ovarian transcriptome. A total of 373 and 874 differentially expressed genes (DEGs) were obtained from the low salinity group vs control (5 vs 25) and the high salinity group vs control (35 vs 25), respectively. Compared with the control, the genes related to amino acid metabolism (*sds*, *bhmt*) and fatty acid metabolism (*pnpla2*) were down-regulated with low salt stress, and the reproductive related genes such as *pgr*, *cyp17a1*, and *ers1* were down-regulated with high salt stress. KEGG pathway enrichment revealed that DEGs were significantly enriched in pathways related to cysteine and methionine metabolism; valine, leucine, and isoleucine biosynthesis; fatty acid biosynthesis; fatty acid metabolism; cortisol synthesis and secretion; aldosterone synthesis and secretion; and regulation of lipolysis in adipocytes with low salinity stress when compared to the control. Compared with the control group, KEGG analysis showed that estrogen signaling pathways were significantly enriched under high salt stress. These results suggest that amino acids and fatty acids are important in metabolic regulation during hypoosmotic pressure adaptation in the ovary. High salt stress may inhibit the synthesis of steroid sex hormones and delay the maturation and development of the ovary in the spotted scat.

Key words: *Scatophagus argus*; chronic salinity stress; transcriptome; differentially expressed gene

Corresponding author: DENG Siping. E-mail: dengsp@gdou.edu.cn