

DOI: 10.12264/JFSC2025-0011

基于转录组学探究温度对中华绒螯蟹胚胎发育的影响机制

崔超越^{1,2}, 耿智^{1,3}, 冯广朋^{1,3}, 张涛^{1,3}, 赵峰^{1,3}, 杨刚^{1,3}, 庄平^{1,3}, 黄晓荣^{1,3}

1. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 农业农村部东海与远洋渔业资源开发利用重点实验室, 上海 200090;
2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;
3. 上海长江口渔业资源增殖和生态修复工程技术研究中心, 上海 200090

摘要: 中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)是我国重要的经济蟹类, 温度是影响其胚胎发育的关键环境因子之一。本研究通过设置恒温 9 °C、恒温 15 °C 以及从 9 °C 逐渐升高至 15 °C 三个实验组, 查明每个实验组胚胎发育的时间和有效积温, 并利用转录组学技术揭示了温度对中华绒螯蟹胚胎发育的分子调控机制。结果表明, 温度显著影响胚胎发育进程及有效积温, 在恒温 9 °C 时, 胚胎停滞在卵裂期不发育, 其有效积温为 1961.95 h·°C; 温度从 9 °C 逐渐升高至 15 °C 时, 胚胎能够发育至原蚤状幼体期, 且与恒温 15 °C 组相比, 胚胎发育时间缩短了 144 h, 有效积温下降了 1303.77 h·°C。温度变化显著影响了胚胎发育相关基因的表达模式, 与恒温 9 °C 时相比, 当温度从 9 °C 升高至 15 °C 时, 与胚胎发育相关的间隔基因(LOC126998238)显著下调, 功能通路主要富集在内质网蛋白靶向; 与变温时相比, 在恒温 15 °C 下, 胚胎中的母体效应基因(LOC126984051)则显著上调, 功能通路主要富集在小分子代谢。研究表明, 在一定范围内, 胚胎发育随温度升高而加快, 与恒温条件相比, 变温能显著影响胚胎发育相关基因的表达及功能通路的富集, 从而促进中华绒螯蟹胚胎的发育。

关键词: 中华绒螯蟹; 温度; 胚胎发育; 有效积温; 转录组学分析

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005–8737–(2025)05–0595–13

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)是一种典型的洄游性物种, 隶属于十足目(Decapoda), 方蟹科(Grapsidae), 绒螯蟹属(*Eriocheir*)^[1–2]。每年 11 月至次年 5 月, 中华绒螯蟹进行降河生殖洄游, 亲蟹在长江口咸淡水交汇处产卵后, 其胚胎发育从受精卵开始, 标志着新一轮生命周期的启动^[3–5]。中华绒螯蟹胚胎发育既具备甲壳动物的典型模式, 又表现出独特的生物学特征, 是一个复杂而有序的生理生化过程^[6–7]。

中华绒螯蟹生殖洄游过程的时间跨度长, 且伴随着显著的环境温度变化。根据蒋金鹏^[8]对中华绒螯蟹产卵场分布的相关调查发现, 3 月由于水温较低, 导致亲蟹所产胚胎出现发育停滞的现

象。温度作为重要的环境因子, 不仅影响水生生物生长、发育、摄食和繁殖等生命活动^[9–10], 还可以改变生物大分子的活性和稳定性, 以及膜的流动性和可透过性^[11–12], 即使是微小的温度波动, 也可能打破细胞的生理平衡, 从而影响其功能和改变发育进程^[13–14]。目前, 尽管已有研究发现温度对中华绒螯蟹胚胎发育能产生一定影响^[15], 但其影响机制尚未见报道。近年来, 随着分子生物学等技术的快速发展, 为揭示水生生物生命活动的内在规律和分子机制提供了重要手段^[16]。目前, 关于环境因子对水生生物影响的分子调控机制研究主要集中于免疫应答、能量代谢及生命活动特征等^[17–20]。这些研究虽然取得了一定进展, 但研

收稿日期: 2024-02-14; 修订日期: 2024-03-10.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFF0608204); 国家科技资源共享服务平台; 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2020TD13)

作者简介: 崔超越(2000–), 女, 硕士研究生, 研究方向为水生生物繁育生物学. E-mail: chaoyue_c@163.com

通信作者: 黄晓荣, 副研究员, 从事鱼类种质资源保护与繁育生物学研究. E-mail: hxr828@126.com

究的环境因子多为溶氧, 尚未见到有关温度的研究报道。

为探究温度对中华绒螯蟹胚胎早期发育的影响机制, 本研究利用转录组测序技术, 首次对不同温度条件下中华绒螯蟹胚胎进行转录组分析, 筛选与发育和代谢相关的差异基因, 确立参与胚胎发育的信号通路, 查明温度对中华绒螯蟹胚胎发育影响的分子机制, 旨在为解析长江口中华绒螯蟹渔业资源变动规律提供科学依据和支撑。

1 材料与方法

1.1 实验动物来源

所选 180 只中华绒螯蟹亲蟹均来源于江苏省高邮湖养殖场, 亲本雌蟹(120 只)和雄蟹(60 只)的平均体重分别为 (87.35 ± 6.2) g 和 (133.8 ± 15.59) g。将雌雄亲蟹分开暂养于 2 个长方形的水槽中 7 d, 水槽长 1.80 m, 宽 1.55 m, 高 0.80 m, 保持水深 0.30 m。

1.2 研究方法

1.2.1 温度设置 交配和产卵实验所设温度分别为恒温 9 °C(Z9)、变温 9 °C~15 °C(Z15)和恒温 15 °C(ZP), 实验开始时从暂养水槽中取 20 只雌蟹和 10 只雄蟹放至圆形水槽中, 水槽直径 1.80 m, 高 0.60 m, 水深保持 0.30 m。实验初始的平均温度为 (14.80 ± 0.42) °C, 2 个恒温组分别使用冷暖机调节并控制水温。变温组每 12 h 升高 1 °C, 达到设定温度后进行交配实验。交配实验中各组水体盐度保持 18.21 ± 0.30 , pH 保持 7.29 ± 0.06 , 每天用盐度计、温度计分别对水体的盐度和温度进行校准。实验期间水体保持自然光照, 持续供氧。每日 8:30 投喂新鲜缢蛏 (*Sinonovacula constricta*), 投喂量按亲蟹体重的 1%~3%, 并及时清除残饵。

1.2.2 样本采集 待各温度组雌蟹产完卵后 3 d, 将各组中雄蟹移出。从 9 °C 组中抱卵蟹腹部随机取胚胎 300 粒左右, 按照黄晓荣^[5]的方法, 在 Olympus 显微镜下进行观察、鉴定并拍照。从 9 °C 组选取的胚胎均处于受精卵时期, 将选取均处于受精卵的胚胎放置于 1.5 mL 离心管中, 并立即置于液氮中冷却, 20 min 后转至-80 °C 冰箱中保存, 同时将抱卵蟹重新放回原缸中。接着, 将温度每

12 h 升高 1 °C 直至 15 °C 后继续养殖。恒温 15 °C 组与变温组一样, 每 2 d 从抱卵蟹腹部随机取胚胎 30~40 粒左右, 在 Olympus 显微镜下观察, 当所有胚胎都处于囊胚期时, 按照上述相同的方法保存胚胎样品。记录每天的平均水温, 并据此求出孵化所需要的有效积温。有效积温按照公式 $K=N \cdot (T-C)$ 计算, 式中, K 为中华绒螯蟹胚胎发育所需要的有效积温($h \cdot ^\circ C$); N 为中华绒螯蟹胚胎完成发育所需要的时间(h); T 为发育期间的平均水温($^\circ C$); C 为中华绒螯蟹胚胎发育的阈温度($^\circ C$)。

1.2.3 RNA 提取、cDNA 文库构建和高通量测序 利用 Qubit RNA 检测试剂盒对总 RNA 精确定量, 以确定文库构建所加入总 RNA 的量。利用 Nuclease free 及 Beads Wash Buffer 进行片段化程序, 结束后进入第一链合成反应。将 1st Strand Synthesis Reaction Buffer 从-20 °C 取出, 解冻后颠倒混匀; 配制第一链 cDNA 合成的反应液, 将上述 PCR 管置于 PCR 仪中, 进行第一链 cDNA 的合成。将 2nd Strand Synthesis Buffer 从-20 °C 取出, 解冻后颠倒混匀; 配制第二链 cDNA 合成反应液。将上述 PCR 管置于 PCR 仪中, 进行第二链 cDNA 的合成, 最后形成双链结构。然后对双链 cDNA 进行磁珠纯化、及片段化分选, 最后进行文库扩增获得文库。经过检测和质控后, 最终获得能够适用于 Illumina 平台的测序文库。CDNA 文库构建、转录组测序由生工生物工程(上海)股份有限公司通过 Illumina HiSeq™平台完成。

1.2.4 转录组组装和功能注释 使用 Trimmomatic 进行数据处理, 将原始数据中含有带接头的、低质量的序列进行过滤, 并使用滑窗法去除 reads 尾部质量值在 20 以下的碱基以及去除 reads 长度小于 35 nt 的 reads 本身及其配对 reads^[21]。对 raw reads 进行质控后, 得到高质量的 clean reads。将参考基因组作为参考序列, 使用 HISAT2 将质控后的测序序列与参考基因组进行比对, 并通过 RSeQC 统计比对结果, 获取 clean reads 在参考基因组的位置信息, 得到样品特有的序列特征信息^[22]。从基因组中提取新基因的序列, 将新基因使用 DIAMOND 软件与 GO 基因功能注释。

1.2.5 转录组数据分析 所有样品进行 PCA (principal components analysis)主成分分析。采用 TMM 对 read count 数据进行标准化处理, 之后用差异表达基因 (DEGseq) 进行差异分析。筛选条件设为: $qvalue < 0.05$ 且差异倍数 $|foldchange| > 2$ 。随后, 绘制 DEGs 的火山图; 此外, 通过绘制聚类分析图用于判断实验组之间的 DEGs 表达模式。

找到差异基因后, 使用 clusterProfiler 进行 KEGG 通路和 KOG 分类富集分析, 使用 topGO 进行 Gene ontology(GO)富集分析, 当矫正后的 P 值($Qvalue$) < 0.05 时, 认为该功能存在显著富集情况。

2 结果与分析

2.1 胚胎发育时间和有效积温

不同温度下中华绒螯蟹胚胎发育时间及所需有效积温见表 1。随温度的升高, 胚胎发育所需时间逐渐缩短。在 9 ℃ 时, 胚胎发育至多细胞期后停滞, 耗时 616 h, 所需的有效积温为 1961.95 h·℃。将温度升高至 15 ℃ 时, 胚胎能够继续发育至原溞状幼体期, 所需时间 824 h, 有效积温为 7460.43 h·℃。恒温 15 ℃ 时, 胚胎发育至原溞状幼体期, 所需时间 968 h, 此时的有效积温为 8764.20 h·℃, 比变温组所需时间和有效积温分别增加了 144 h 和 1303.77 h·℃。

表 1 不同温度下中华绒螯蟹胚胎发育时间和有效积温

Tab. 1 *Eriocheir sinensis* embryonic development time and effective cumulative temperature at different temperatures

发育时期 developmental period	发育时间/h developmental time			有效积温/h·℃ effective cumulative temperature		
	9 ℃	15 ℃	9-15 ℃	9 ℃	15 ℃	9-15 ℃
卵裂期 cleavage stage	616	216	120	1961.95	1955.65	1086.47
囊胚期 blastula stage	—	336	228	—	3042.12	2064.29
原肠期 gastrula stage		426	318		3856.97	2879.15
前无节幼体 egg-nauplius stage		596	464		5396.14	4201.02
后无节幼体 egg-metanauplius stage		752	608		6808.55	5504.78
原溞状幼体期 original zoea stage		968	824		8764.20	7460.43

2.2 转录组测序结果分析

9 个样品共获得 425886606 条 Raw Reads, 经对原始数据过滤后, 恒温 9 ℃ (Z9)、变温 (Z15)、恒温 15 ℃ (ZP) 分别共获得 129779732 条、130090864 条和 137695862 条 clean reads, GC 含

量平均分别为 48.02%、50.57% 和 45.09% (表 2)。其中, Q30 碱基百分比均高于 91%, Q20 碱基百分比在 96% 及以上, 测序错误率为 0.04% 和 0.01%, 均低于 0.5%, 这些数据都表明测序结果可靠, 可以进行下一步分析。

表 2 中华绒螯蟹转录组数据质控分析

Tab. 2 Quality control analysis of *Eriocheir sinensis* transcriptome data

样品 sample	原始 read raw read	高质量 read clean read	高质量 read 碱基总数(G) clean base	测序错误率/% error rate	Q20 百分比/% Q20	Q30 百分比/% Q30	G 和 C 的数量 百分比/% GC content
Z15-2	44804912	42318964	140.81	0.04	97.32	93.74	43.56
Z15-3	49378264	46626980	140.03	0.04	97.01	92.96	51.21
Z15-1	48629946	45610162	139.71	0.04	96.83	92.54	49.48
Z9-1	55597278	53926144	140.33	0.01	98.40	96.04	52.19
Z9-2	40643844	39261232	142.93	0.01	98.27	95.72	50.75
Z9-3	39127020	37986050	143.53	0.01	98.50	96.24	48.88
ZP-1	48656146	45791676	139.26	0.01	97.12	93.27	45.07
ZP-2	47229722	44215610	138.53	0.01	97.00	93.04	45.08
ZP-3	51819474	48645016	139.03	0.01	97.07	93.19	45.69

2.3 基因表达水平相关性分析

主成分分析 PCA 结果见图 1a, 结果显示三组样本在主成分空间中明显分离, 表明数据质量较

高且样本间的变异能被有效捕捉。样品间表达水平相关性分析显示, 恒温 15 ℃(ZP) vs. 变温(Z15)组具有较高的相似基因表达模式(图 1b)。

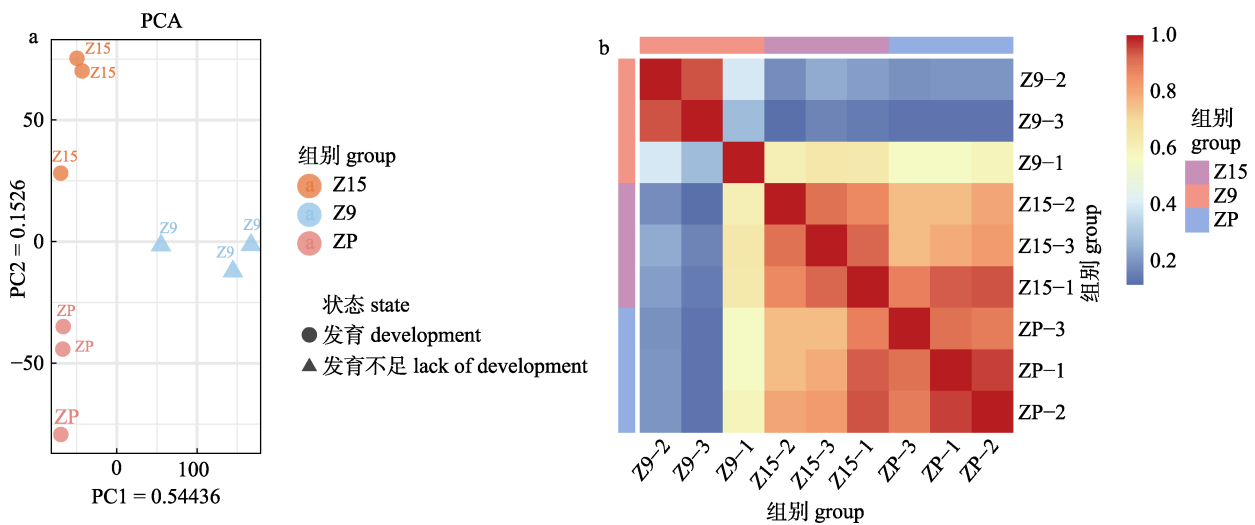


图 1 Z9、Z15、ZP 的主成分 PCA 分析图(a)和 Z9、Z15、ZP 的样本间距离 heatmap(b)
PCA 分析图中不同颜色或形状的点代表不同环境或条件下的样本组; 距离 heatmap 颜色块代表距离值, 颜色越红表示样本间距离越近, 相似度越高, 颜色越蓝则距离越远。

Fig. 1 Principal component PCA analysis plots for Z9, Z15, and ZP (a) and inter-sample distance heatmaps for Z9, Z15, and ZP (b)
Points of different colors or shapes in the PCA analysis graph represent sample groups in different environments or conditions; distance heat map color blocks represent distance values, the redder color means the closer distance between the samples and the higher the similarity, and the bluer color means the further distance.

2.4 差异表达分析

对上述定量的测序数据进行差异表达筛选, 使用 DESeq 软件进行分析, 差异基因统计结果如表 3 所示。变温 15 ℃ (Z15) vs. 恒温 9 ℃ (Z9) 组共鉴定得到 4767 个 DEGs, 其中包括 1800 个上调基因和 2967 个下调基因; 恒温 15 ℃ (ZP) vs. 变温 15 ℃ (Z15) 组共鉴定得到 2061 个 DEGs, 其中包括 1326 个上调基因和 735 个下调基因。火山图可直观展示两两分组样品间差异基因的整体分布情况(图 2), 图中红色表示上调基因, 蓝色表示下调基因, 黑色表示非差异基因, 从图中可直观看出 ZP vs. Z15 上下调基因差异相比 ZP vs. Z15 组更显著。

表 3 Z15 vs. Z9 组和 ZP vs. Z15 组的差异基因数目
Tab. 3 Number of genes differentially expressed between Z15 vs. Z9 group and ZP vs. Z15 group

群体 group	上调 up	下调 down	总数 total
Z15 vs. Z9 组	1800	2967	4767
ZP vs. Z15 组	1326	735	2061

2.5 与发育相关的差异表达基因

为探究不同温度下中华绒螯蟹胚胎发育的差异, 对发育和代谢相关的信号通路及 DEGs 进行了筛选及进一步分析。结果表明, 与胚胎发育和能量代谢相关的 DEGs 也有显著差异表达 ($P<0.05$) (表 4)。在 Z15 vs. Z9 组中, 参与胚胎发育和代谢相关的基因如母体效应基因、间隔基因、对控基因等均显著下调, 最显著的为与胚胎发育相关的间隔基因(LOC126998238); 在 ZP vs. Z15 组中, 参与胚胎发育和代谢相关的基因如母体效应基因、间隔基因等均显著上调, 最显著的为与胚胎发育相关的母体效应基因(LOC126984051)。

2.6 差异表达基因 KEGG 富集分析

变温 15 ℃(Z15) vs. 恒温 9 ℃(Z9)组 KEGG 分析共富集到 287 个通路, 恒温 15 ℃(ZP) vs. 变温 15 ℃(Z15)组 KEGG 分析共富集到 264 个通路。Z15 vs. Z9 组中有 147 个差异基因富集到产热 (thermogenesis) (ko04714)、103 个差异基因富集

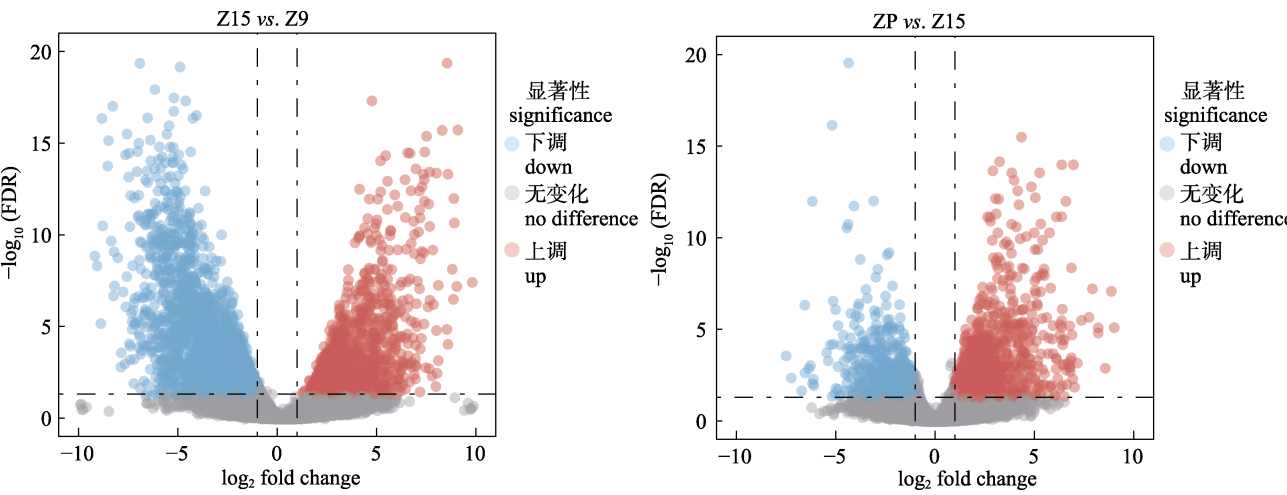


图 2 Z15 vs. Z9 组(a)与 ZP vs. Z15 组(b)表达差异火山图

Fig. 2 Volcano plot of expression differences between Z15 vs. Z9 group (a) and ZP vs. Z15 group (b)

表 4 中华绒螯蟹胚胎中与发育和能量代谢相关基因在 Z15 vs. Z9 组与 ZP vs. Z15 组中差异表达

Tab. 4 DEGs potentially associated with development and energy in embryos of *Eriocheir sinensis* in the Z15 vs. Z9 group and ZP vs. Z15 group

Z15 vs. Z9 组中差异表达基因 differentially expressed genes in the Z15 vs. Z9 group			ZP vs. Z15 组中差异表达基因 differentially expressed genes in the ZP vs. Z15 group		
功能组/基因 functional group/gene	描述 description	表达 expression	功能组/基因 functional group/gene	描述 description	表达 expression
母体效应基因 maternal effect gene					
LOC127001330	aristaless	down	LOC126998221	tudor	down
LOC127004846	bicaudal	up	LOC127008723	tudor	up
LOC126985892	bicaudal	down	LOC126984051	helicase	up
LOC126984051	probable	down			
间隔基因 gap gene					
LOC126998238	protein giant-like	down	LOC126998238	protein giant-like	up
对控基因 pair-rule gene					
LOC126985973	runt	up	LOC127007755	runt	up
			LOC126985973	runt	down
分段极性基因 segment-polarity gene					
LOC126981930	armadillo	down	LOC127008728	frizzled	up
LOC127010020	frizzled	down	LOC127004134	cholinesterase	up
LOC127005590	patched	down	LOC126995658	pangolin	up
LOC127006813	wnt	up	LOC127003511	patched	up
LOC127006594	wnt	up	LOC127005590	patched	down
LOC126996456	wnt	down	LOC127003491	patched	up
LOC127009570	wntless	down			
背腹形态基因 dorsoventral patterning gene					
LOC126996302	pipe	down	LOC126988486	pipe	up
LOC126988486	pipe	down	LOC126984731	snail	up
LOC127005490	pipe	down	LOC127001902	twist	up
LOC126989807	pipe	down	LOC127008988	twist	up
LOC127000086	pipe	down			
LOC127008977	pipe	down			

(待续 to be continued)

(续表 4 Tab. 4 continued)

Z15 vs. Z9 组中差异表达基因 differentially expressed genes in the Z15 vs. Z9 group			ZP vs. Z15 组中差异表达基因 differentially expressed genes in the ZP vs. Z15 group		
功能组/基因 functional group/gene	描述 description	表达 expression	功能组/基因 functional group/gene	描述 description	表达 expression
Hox 基因 Hox gene					
LOC126987920	Msx	down	LOC127010173	Msx	up
LOC127010173	Msx	down	LOC127010172	Msx	up
LOC127010171	Msx	down	LOC127010171	Msx	up
LOC127000418	UBX	up	LOC127003446	Msx	up
			LOC127000418	Ubx	down
能量代谢基因 energy metabolism gene					
LOC127007080	COX	down	LOC126986374	IDH	up
LOC126998534	COX	down	LOC127008879	ATPase	up
LOC126981735	COX	down	LOC126995924	ATPase	up
LOC127007080	COX	down	LOC126986384	ATPase	up
LOC126998534	COX	down			
LOC126981735	COX	down			
LOC127000860	SDH	down			
LOC126999774	SDH	down			
LOC126986374	IDH	down			
LOC126997865	ATPase	down			
LOC127008879	ATPase	down			
LOC126995924	ATPase	down			
LOC126986384	ATPase	down			
LOC126994218	ATPase	down			
LOC127002038	ATPase	up			
LOC127007311	ATPase	down			
LOC126986410	V-ATPase	up			

到嘌呤代谢(purine metabolism) (ko00230)、94 个差异基因富集到酸化磷酸化(purine metabolism) (ko00190)等通路, ZP vs. Z15 中有 103 个差异基因富集到嘌呤代谢(purine metabolism) (ko00230)、77 个差异基因富集到药物代谢-其他酶(drug metabolism-other enzymes) (ko00983)、61 个差异基因富集到细胞衰老(cellular senescence) (ko04218)等通路。

对 DEGs 进行 KEGG 功能富集分析(图 3), KEGG 结果显示, Z15 vs. Z9 组中表达基因主要富集在核糖体(ribosome)相关通路显著富集。使用相同的方法分析 ZP vs. Z15 组, 结果显示 ZP 组高表达基因主要富集在其他聚糖降解(other glycan degradation)、组氨酸代谢(histidine metabolism)、赖氨酸分解(lysine degradation)等通路中。Z15 vs. Z9 组与恒温 15 ℃(ZP) vs. 变温(Z15)组相比, 富集差异较大。

2.7 差异表达基因 GO 注释、分类和富集分析

对 Z15 vs. Z9 组与 ZP vs. Z15 组分别进行注释(图 4 和图 5), 两组均注释到三个分类功能, 分别为细胞组成(cellular component)、生物过程(biological process)和分子功能(molecular Function)3 个部分。Z15 vs. Z9 组的生物过程功能主要包含 cellular process (2002 条)、metabolic process (1517 条)、biological regulation (1501 条)等相关的 GO 注释; 细胞组分中主要包含 cell (1994 条)和 cell part (1991 条)等相关的 GO 注释; 分子功能中主要包含 binding (1331 条)、catalytic activity (908 条)等相关的 GO 注释。ZP vs. Z15 组的生物过程功能主要包含 cellular process (926 条)、metabolic process (738 条)、biological regulation (695 条)等相关的 GO 注释; 细胞组分中主要包含 cell(892 条)和 cell part (892 条)等相关的 GO 注释; 分子功能中主要包含 binding (623 条)、catalytic

activity(400 条)等相关的 GO 注释。
进一步对生物过程(BP)中基因在 GO 富集结果进行分析, 结果见图 6。变温 Z15 vs. Z9 组中, 变温 15 °C(Z15)高表达基因主要富集在内质网蛋白靶向(protein targeting to ER), 内质网蛋白定位(establishment of protein localization to

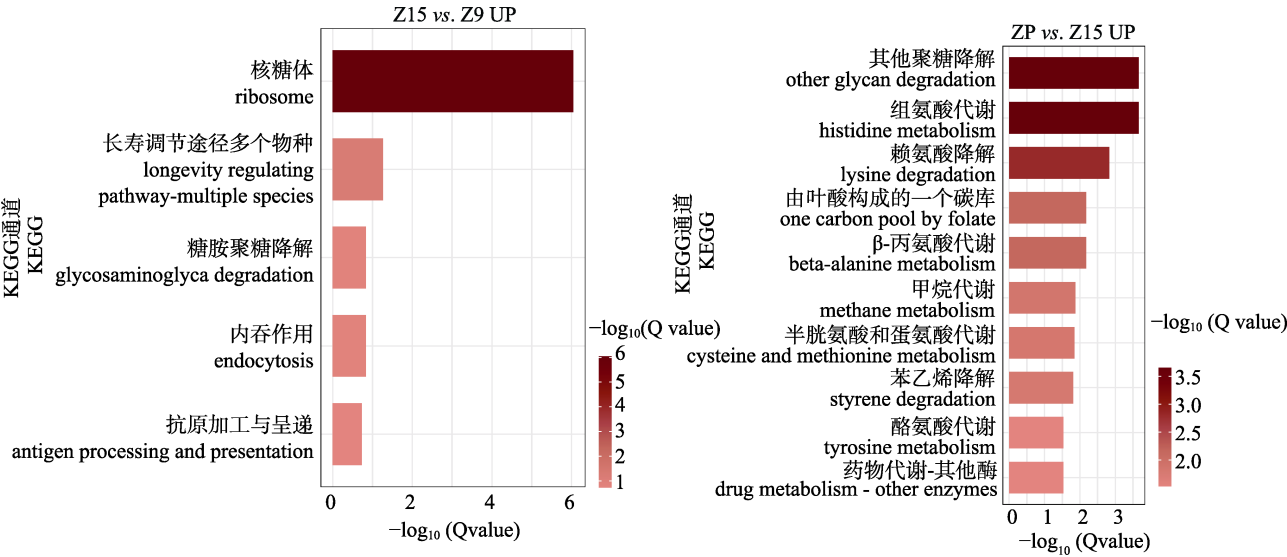


图 3 Z15 vs. Z9 组(a)与 ZP vs. Z15 组(b) KEGG 富集通路柱状图
Fig. 3 Histogram of KEGG-enriched pathway in Z15 vs. Z9 group (a) and ZP vs. Z15 group (b)

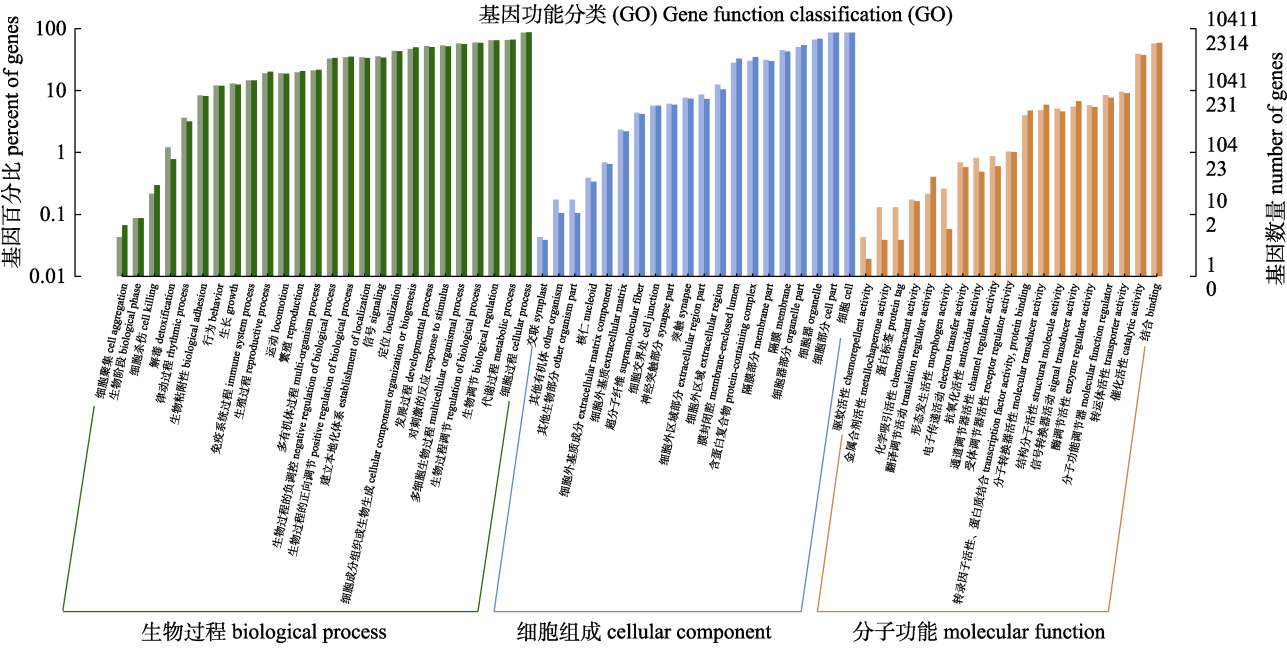
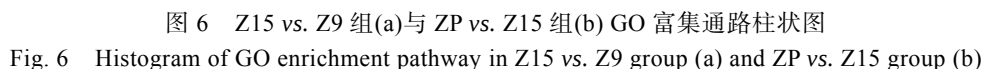
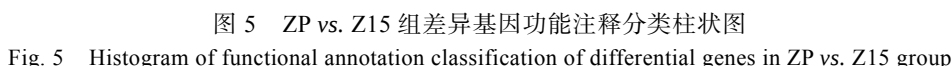


图 4 Z15 vs. Z9 组差异基因功能注释分类柱状图
横轴为功能分类, 不同颜色代表不同的分类。柱状图和纵坐标轴上的数值浅色代表差异基因, 深色代表所有基因;
右侧纵轴为该分类内基因个数, 左侧纵轴为(差异基因/所有基因)注释到该功能的基因数目占比。
Fig. 4 Histogram of functional annotation classification of differential genes in Z15 vs. Z9 group
The horizontal axis is the functional classification, and different colors represent different classifications. The light colors of the values on the bar graph and vertical axis represent differential genes, and the dark colors represent all genes.
The right vertical axis is the number of genes within the classification, and the left vertical axis is the percentage of genes annotated to the function (differential genes/all genes).



甲壳动物胚胎发育早期形态上无较大差异, 主要不同体现在胚胎发育时间。虾蟹类的胚胎发育与其孵化率以及初孵幼体质量密切相关^[23-24]。中华绒螯蟹胚胎发育周期较长, 通常需历经数月才能完成。在此期间发育受到水温主导因子的影

响, 适宜的水温条件是中华绒螯蟹胚胎孵化的关键^[25]。蒋金鹏^[8]调查发现, 3月长江口横沙以东水域的水温仅为 9℃, 此时中华绒螯蟹的胚胎发育处于卵裂期, 当水温升高后, 胚胎才能继续发育, 这一现象与本实验中的观察结果一致。有研究表明, 胚胎在阈值温度以上才能正常发育, 当外部温度低于此阈值时, 胚胎发育将处于停滞状态^[26]。本研究发现, 温度 9℃时, 中华绒螯蟹胚胎发育至细胞分裂期后不再继续发育, 但胚胎并未死亡, 随水温的升高, 胚胎可以继续发育, 且发育速度比恒温 15℃下更快。推测在低温环境下中华绒螯蟹所产胚胎的代谢酶活性较低, 随着时间的延长, 代谢酶的功能受到抑制, 最终导致胚胎发育停滞。当升高温度后, 胚胎中的代谢酶活性被激活, 胚胎不仅能够继续发育, 且发育速度加快, 因此胚胎的滞育时间与温度有着密切的关系。

3.2 温度对中华绒螯蟹胚胎发育基因与注释结果的影响

关于中华绒螯蟹各时期胚胎的转录组测序及功能研究已有相关报道^[15, 27-29], 但并未从胚胎滞育这一角度进行研究, 本研究首次通过温度激发中华绒螯蟹胚胎发育, 从而找到激活胚胎发育的相关基因。研究表明, 当目的基因上调时, 相关基因表达显著升高, 生物体基因的相关功能被激发, 当基因下调时则相反^[30-32]。本研究中, 比较转录组分析发现, Z15 vs. Z9 组鉴定到的差异基因较多, 其中上调基因占 37.76%。表明当温度从 9℃升高至 15℃时, 相关功能基因的表达水平发生了明显的变化, 大量的功能基因被激活并开始调控胚胎的发育过程。同时, Z15 vs. Z9 组的相关代谢基因均下调, 尤其间隔基因(LOC126998238)最为显著, 这可能是由于低温条件下, 参与胚胎前后轴早期模式形成的间隔基因受到抑制, 导致胚胎发育的停滞。当温度升高时, 这些基因被激活, 以应对环境变化并调整胚胎的发育过程; 而在 ZP vs. Z15 组中, 相关基因均显著上调, 母体效应基因(LOC126984051)上调尤为显著, 推测这可能是由于温度升高后, 胚胎中的组织分化和构建过程被激活, 从而加速了胚胎的发育, 然而, 在恒温

15℃下, 胚胎发育过程中的基因表达变化减少, 尽管仍有部分基因保持上调, 但这些变化可能仅是为了维持胚胎发育的稳定, 还不足以加快胚胎发育进程。

本研究对所有 DEGs 进行 GO 功能注释分析, 结果显示注释到生物学进程、细胞组分和分子功能三大类中, 两组均主要涉及细胞过程、代谢过程、生物调控、细胞、细胞部分等功能条目, 这表明中华绒螯蟹胚胎在变温升温和恒温升温的条件下, 胚胎的代谢和细胞活性均增强, 这与彭光源^[33]的研究结果一致。但从条目的数量来看, Z15 vs. Z9 组明显高于 ZP vs. Z15 组, 推测这可能是由于变温的刺激促使胚胎代谢更快, 细胞活性更强, 从而使得胚胎发育速度比恒温下更为迅速。

3.3 温度对中华绒螯蟹胚胎发育关键通路的影响

三个温度处理组中华绒螯蟹两个时期胚胎的 KEGG 数据库富集显示, Z15 vs. Z9 组和 ZP vs. Z15 组中, 大部分富集到的都是代谢物通路, 最显著的通路为核糖体相关通路。GO 数据库分析结果表明, Z15 vs. Z9 组中, 变温 15℃(Z15)高表达基因主要富集在内质网蛋白靶向等通路中, ZP vs. Z15 组中, 恒温 15℃(ZP)高表达基因主要富集在小分子代谢物等代谢通路中。

从 9℃升温至 15℃时, 胚胎在内质网蛋白质加工、翻译及膜蛋白定位等活动显著增加, 这些高表达的通路可能与胚胎从停滞状态转变为继续发育的过程密切相关, 表明内质网功能和蛋白质合成在这一过程中发挥了关键作用。内质网应激及未折叠蛋白反应(UPR)可调控细胞增殖、分化和凋亡的分子机制^[34]。有研究发现, 诱导胚胎中内质网应激会导致胚胎过早孵化; 相反地, 若抑制内质网应激则促进卵母细胞的成熟及胚胎发育^[35-37]。这与本研究结果有相似之处。此外, 核糖体相关通路是细胞内重要的生物学过程, 决定了细胞内蛋白质合成的速率^[38]。核糖体合成是控制细胞生长和增殖的主要代谢途径^[39]。Alli Shaik^[40]和 Lundberg^[41]均发现当生物体长期处于稳态时, 蛋白质的表达水平主要取决于 mRNA 水平, 当稳态被打破时, 其翻译水平与转录水平的

变化表现出不同的趋势。本实验中,从 9℃升温至 15℃时,胚胎 KEGG 富集在核糖体的相关通路均呈现上调趋势。这可能是由于低温下的胚胎面临较大的蛋白质合成挑战,因而无法正常发育,当温度升高时,核糖体合成增多,使得形成胚胎的细胞进行生长和增殖。在恒温 15℃下胚胎发育上调通路涉及较多的是代谢调节,尤其是甘聚糖降解及组氨酸代谢,这表明在恒温 15℃下,胚胎中的代谢过程在不断调整,以适应环境的变化从而保证胚胎发育进入到一个相对稳定的状态。

综合分析发现,核糖体通路及内质网蛋白质加工、翻译及膜蛋白定位信号通路在胚胎发育过程中发挥了重要作用,特别是在胚胎启动发育时起着至关重要的作用。因此,推测核糖体通路及内质网蛋白质加工、翻译及膜蛋白定位信号通路是主要参与中华绒螯蟹胚胎启动发育的通路。

4 结论

本研究通过转录组学分析,探究了温度对中华绒螯蟹胚胎发育的影响机制。结果表明,恒温 9℃时,胚胎停滞在细胞分裂期不发育,有效积温为 1961.95 h·℃;恒温 15℃,胚胎能够正常发育,发育至原蚤状幼体期时有效积温达到 8764.20 h·℃;当温度从 9℃升高至 15℃时,胚胎发育至原蚤状幼体期时有效积温为 7460.43 h·℃,与恒温相比,变温更能促进中华绒螯蟹胚胎的发育。低温环境下胚胎发育受到抑制,主要表现为发育和代谢相关基因表达的显著下调和代谢活动的下降;而当温度逐渐升高时,胚胎发育加快,相关基因和代谢途径的表达显著上调。这一过程涉及内质网功能、蛋白质合成和脂质代谢等重要生物学机制。本研究结果为深入理解温度对中华绒螯蟹胚胎发育影响的分子机制提供了新的视角,为解析长江口中华绒螯蟹资源变动规律提供了科学支撑。

参考文献:

[1] Li C B, Shen C C, Feng G P, et al. Research progress on habitat suitability of *Eriocheir sinensis*[J]. Marine Fisheries, 2023, 45(6): 766-774. [李春波, 沈晨晨, 冯广朋, 等. 中华

绒螯蟹栖息地因子适宜范围的研究进展[J]. 海洋渔业, 2023, 45(6): 766-774.]

- [2] Herborg L M, Rushton S P, Clare A S, et al. The invasion of the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) in the United Kingdom and its comparison to continental Europe[J]. Biological Invasions, 2005, 7(6): 959-968.
- [3] Du N S. Migration of the Chinese mitten crab[J]. Fisheries Science & Technology Information, 2004, 31(2): 56-57, 94. [堵南山. 中华绒螯蟹的洄游[J]. 水产科技情报, 2004, 31(2): 56-57, 94.]
- [4] Zhang L S, Xu Q Y. Studies on sex maturity and early maturity of mitten crab (*Eriocheir sinensis*) in natural and farming water[J]. Fisheries Science & Technology Information, 2001, 28(3): 106-111. [张列士, 徐琴英. 自然及养殖水体河蟹性成熟和性早熟的研究[J]. 水产科技情报, 2001, 28(3): 106-111.]
- [5] Huang X R, Zhuang P, Zhang L Z, et al. Embryonic development and the variation of some metabolism enzyme activity during embryonic development of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(2): 192-199. [黄晓荣, 庄平, 章龙珍, 等. 中华绒螯蟹胚胎发育及几种代谢酶活性的变化[J]. 水产学报, 2011, 35(2): 192-199.]
- [6] Cather J N. Embryology and phylogeny in annelids and arthropods[J]. International Journal of Insect Morphology and Embryology, 1974, 3(3-4): 443.
- [7] García-Castro P, Giambó-Falian I, Carvacho I, et al. Phenogenetics of cortical granule dynamics during zebrafish oocyte-to-embryo transition[J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2025, 13: 1514461.
- [8] Jiang J P. The distributional features of the spawning ground of *Eriocheir sinensis* and correlation to major environmental factors in Yangtze[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2014. [蒋金鹏. 长江口中华绒螯蟹产卵场分布及与重要环境因子的相关性[D]. 上海: 上海海洋大学, 2014.]
- [9] Montgomery J C, MacDonald J A. Effects of temperature on nervous system: Implications for behavioral performance[J]. American Journal of Physiology, 1990, 259(2): R191-R196.
- [10] Brander K. The effect of temperature on growth of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.)[J]. ICES Journal of Marine Science, 1995, 52(1): 1-10.
- [11] Somero G N. Proteins and temperature[J]. Annual Review of Physiology, 1995, 57(1): 43-68.
- [12] Ueda M J, Ito T, Okada T S, et al. A correlation between membrane fluidity and the critical temperature for cell adhesion[J]. The Journal of Cell Biology, 1976, 71(2): 670-674.

- [13] Beitinger T L, Bennett W A, McCauley R W. Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature[J]. *Environmental Biology of Fishes*, 2000, 58(3): 237-275.
- [14] Wang Z F, Cui X D, Gong H X, et al. The biological zero degree and effective cumulative temperature of the Chinese sawtooth rice shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. *Hebei Fisheries*, 2014(2): 10-12. [王战芳, 崔晓东, 巩海雪, 等. 中华锯齿米虾生物学零度及有效积温的研究[J]. *河北渔业*, 2014(2): 10-12.]
- [15] Zhao Y L, Du N S, Lai W. Effects of different gradient temperature on embryonic development of the Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis* (Crustacea, decapod)[J]. *Zoological Research*, 1993, 14(1): 49-53. [赵云龙, 堵南山, 赖伟. 不同水温对中华绒螯蟹胚胎发育的影响[J]. *动物学研究*, 1993, 14(1): 49-53.]
- [16] Luo H, Ye H, Xiao S J, et al. Application of transcriptomics technology to aquatic animal research[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(4): 598-607. [罗辉, 叶华, 肖世俊, 等. 转录组学技术在水产动物研究中的运用[J]. *水产学报*, 2015, 39(4): 598-607.]
- [17] Kaptaner B, Ünal G, Doğan E, et al. Histology of corpuscles of stannius in lake van fish (*Alburnus tarichi* Gildenstädt, 1814) (Cyprinidae)[J]. *Anatomia Histologia Embryologia*, 2021, 50(2): 404-410.
- [18] Lin X, Xie X Y, Ou Y J, et al. Effects of dissolved oxygen on gill tissue of juvenile *Eleuthero nema tetradactylum* based on transcriptome sequencing[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2024, 55(3): 660-669. [林欣, 谢希尧, 区又君, 等. 基于转录组测序分析溶解氧对四指马鲛幼鱼鳃组织的影响[J]. *南方农业学报*, 2024, 55(3): 660-669.]
- [19] Yang L D, Wang Y, Zhang Z L, et al. Comprehensive transcriptome analysis reveals accelerated genic evolution in a Tibet fish, *Gymnodiptychus pachycheilus*[J]. *Genome Biology and Evolution*, 2015, 7(1): 251-261.
- [20] Li Y D, Hui M, Cui Z X, et al. Comparative transcriptomic analysis provides insights into the molecular basis of the metamorphosis and nutrition metabolism change from zoeae to megalopae in *Eriocheir sinensis*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2015, 13: 1-9.
- [21] Bolger A M, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2114-2120.
- [22] Kim D, Langmead B, Salzberg S L. HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements[J]. *Nature Methods*, 2015, 12(4): 357-360.
- [23] Wen X B, Chen L Q, Zhou Z L, et al. Reproduction response of Chinese mitten-handed crab (*Eriocheir sinensis*) fed different sources of dietary lipid[J]. *Comparative Biochemistry & Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2002, 131(3): 675-681.
- [24] Wu X G, Cheng Y X, Zeng C S, et al. Reproductive performance and offspring quality of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards) females fed an optimized formulated diet and the razor clam *Sinonovacula constricta*[J]. *Aquaculture Research*, 2009, 40(12): 1335-1349.
- [25] Zhao Y C, Wang J R, Shen M, et al. Effects of temperature and high salinity on eggs hatching, metamorphosis rate and salinity tolerance of larva in *Litopenaeus vannamei*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2019, 50(2): 347-354. [赵玉超, 王仁杰, 沈敏, 等. 高盐和温度对凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 受精卵孵化及幼体发育的影响[J]. *海洋与湖沼*, 2019, 50(2): 347-354.]
- [26] Wang J Q, Zhang T, Tong Y, et al. Effects of embryonic developmental stages *in vitro* from fertilized eggs in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* on larva rearing[J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2005, 20(3): 192-197. [王吉桥, 张涛, 佟鹰, 等. 不同发育期中华绒螯蟹胚胎离体孵化和幼体培育的研究[J]. *大连水产学院学报*, 2005, 20(3): 192-197.]
- [27] He J, Wan L T, Yu H H, et al. Effect of water temperature on embryonic development of *Protunus trituberculatus* in an off-season breeding mode[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2022, 9: 1066151.
- [28] Dong P S. Global transcriptomes analysis provide insights into genes expression and pathways activated during embryogenesis in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2017. [董鹏生. 基于转录组学技术探究中华绒螯蟹胚胎发育期间的基因和通路表达特征[D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.]
- [29] Graveley B R, Brooks A N, Carlson J W, et al. The developmental transcriptome of *Drosophila melanogaster*[J]. *Nature*, 2011, 471(7339): 473-479.
- [30] Du J, Liu Y, Song C W, et al. Discovery of sex-related genes from embryonic development stage based on transcriptome analysis in *Eriocheir sinensis*[J]. *Gene*, 2019, 710: 1-8.
- [31] Chen M, Lin J Y, Wu X M, et al. Comparative analysis of embryo proper and suspensor transcriptomes in plant embryos with different morphologies[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(6): e2024704118.
- [32] Zhou C E, Zhao W, Zhang S Q, et al. High-throughput transcriptome sequencing reveals the key stages of

- cardiovascular development in zebrafish embryos[J]. BMC Genomics, 2022, 23(1): Article No.587.
- [33] Peng G Y, Shi X T, Xiao K, et al. Transcriptome response of growth, immunity and digestion to temperature in Dabry's sturgeon (*Acipenser dabryanus*)[J]. China Feed, 2025(1): 101-111. [彭光源, 史雪涛, 肖衍, 等. 基于转录组学解析水温对长江鲟仔稚鱼生长, 免疫和消化的影响[J]. 中国饲料, 2025(1): 101-111.]
- [34] Kratochvílová K, Morán L, Pad'ourová S, et al. The role of the endoplasmic reticulum stress in stemness, pluripotency and development[J]. European Journal of Cell Biology, 2016, 95(3-5): 115-123.
- [35] Kawakami T, Yoshimi M, Kadota Y, et al. Prolonged endoplasmic reticulum stress alters placental morphology and causes low birth weight[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2014, 275(2): 134-144.
- [36] Yoon S B, Choi S A, Sim B W, et al. Developmental competence of bovine early embryos depends on the coupled response between oxidative and endoplasmic reticulum stress[J]. Biology of Reproduction, 2014, 90(5): Article No.104.
- [37] Zhang J Y, Diao Y F, Oqani R K, et al. Effect of endoplasmic reticulum stress on porcine oocyte maturation and parthenogenetic embryonic development *in vitro*[J]. Biology of Reproduction, 2012, 86(4): Article No.128.
- [38] He Q, Li M, Tang W C, et al. Effects of ionizing irradiation on ribosome signaling pathway in spleen tissues of mice[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2019, 35(9): 1244-1250. [何清, 李敏, 唐文诚, 等. 电离辐照损伤对小鼠脾脏组织核糖体信号通路的影响[J]. 中国药理学通报, 2019, 35(9): 1244-1250.]
- [39] Gnanasundram S V, Fåhræus R. Translation stress regulates ribosome synthesis and cell proliferation[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(12): 3757.
- [40] Shaik A A, Wee S, Li R H X, et al. Functional mapping of the zebrafish early embryo proteome and transcriptome[J]. Journal of Proteome Research, 2014, 13(12): 5536-5550.
- [41] Lundberg E, Fagerberg L, Klevebring D, et al. Defining the transcriptome and proteome in three functionally different human cell lines[J]. Molecular Systems Biology, 2010, 6(1): Article No.450.

Transcriptomics investigation of the mechanism underlying temperature effects on the embryonic development of *Eriocheir sinensis*

CUI Chaoyue^{1,2}, GENG Zhi^{1,3}, FENG Guangpeng^{1,3}, ZHANG Tao^{1,3}, ZHAO Feng^{1,3}, YANG Gang^{1,3}, ZHUANG Ping^{1,3}, HUANG Xiaorong^{1,3*}

1. Key Laboratory of East China Sea & Oceanic Fishery Resources Exploitation and Utilization, Ministry of Agriculture and Rural affairs; East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. Shanghai Engineering Research Center of Fisheries Stock Enhancement and Habitat Restoration of the Yangtze Estuary, Shanghai 200090, China

Abstract: *Eriocheir sinensis* is an important economic crab in China; it has a typical migratory habit, including an annual reproductive migration from November to May and for mating and spawning at the confluence of salty and fresh water at the mouth of the Yangtze River. When the broodstock crab spawns, the fertilized egg will commence a new life cycle. At this time, temperature is one of the key environmental factors regulating the development of the embryo, which is particularly sensitive to ambient temperature during its development, and even small temperature differences may cause stagnation of embryonic development. Therefore, it is important to investigate the effect of temperature on embryonic development of *E. sinensis*. In order to explore the molecular mechanism of temperature-regulated embryonic development in *E. sinensis*, three experimental groups were set up, namely, constant temperature of 9 °C, constant temperature of 15 °C, and gradually increasing temperature from 9 °C to

15 °C. We utilized transcriptomics to screen genes associated with embryonic development and to identify the signaling pathways involved in the temperature-regulated embryonic development. The results showed that temperature significantly affected embryonic development process and effective cumulative temperature. At a constant temperature of 9 °C, the embryos were stagnant at the egg cleavage stage, and their effective cumulative temperature was 1961.95 h·°C. In the experimental group, with a gradual temperature increase from 9 °C to 15 °C, the embryos were able to develop to the prothallus larval stage, and embryo development time and effective cumulative temperature were reduced by 144 h and 1303.77 h·°C, respectively, compared with that under a constant temperature of 15 °C. Temperature changes significantly regulated the expression patterns of genes related to embryo development. A total of 4767 differentially expressed genes were identified under a temperature increase from 9 °C to 15 °C, including 1800 up-regulated genes and 2967 down-regulated genes. The gap gene (LOC126998238) related to embryonic development was significantly down-regulated, and the functional pathway was mainly enriched in endoplasmic reticulum protein targeting. At a constant temperature of 15 °C, a total of 2061 differentially expressed genes were identified, including 1326 up-regulated genes and 735 down-regulated genes. Further analysis revealed that the maternal effect gene (LOC126984051) was significantly up-regulated in embryos, and the functional pathways were mainly enriched in small molecule metabolism. The results showed that embryo development accelerated with increasing temperature within a certain range and that variable temperature accelerated embryo development more than constant temperature. Variable temperature significantly increased the expression of genes related to embryonic development and embryonic energy metabolism, and it accelerated embryonic development. The results of this study can provide a theoretical reference for the interpretation of the regulatory mechanism of temperature on the embryonic development of *E. sinensis*.

Key words: *Eriocheir sinensis*; temperature; embryonic development; effective cumulative temperature; transcriptomic analysis.

Corresponding author: HUANG Xiaorong; E-mail: hxr828@126.com