

基于转录组分析不同食物水平对海月水母水螅体无性繁殖的影响

朱见斌^{1,2}, 王建艳³, 甄毓^{1,2}, 米铁柱^{1,2}

(1.中国海洋大学 海洋环境与生态教育部重点实验室 山东 青岛 266100; 2.中国海洋大学 环境科学与工程学院 山东 青岛 266100; 3.北京自然博物馆科学研究部 北京 100050)

摘要:为研究食物水平对海月水母水螅体无性繁殖能力及转录水平调控的影响,本文对不同食物水平培养下(F1组:25个卤虫/组/2天;F2组:250个卤虫/组/2天;F3组:1000个卤虫/组/2天)海月水母水螅体进行转录组分析,筛选差异表达基因,研究差异基因的富集通路,探讨了海月水母繁殖策略的分子机制。结果表明,15℃下匍匐茎出芽生殖是海月水母最主要的无性繁殖方式。食物水平越高,水螅体产生的子代个体(水螅体及碟状体)数量越多。转录组分析结果显示,F1组与F2组相比共有331个基因的表达水平呈显著性差异;F3组与F2组相比共有168个基因呈显著性差异。差异基因主要富集到两条与细胞生长、增殖、分化等相关的信号通路,分别为丝裂原活化蛋白激酶信号通路(mitogen-activated protein kinase, MAPK)和细胞周期信号通路(cell cycle)。随着食物水平升高,上述两条信号通路所涉及差异基因的表达对于海月水母无性繁殖均有促进作用。本研究结果有助于进一步认识海月水母无性繁殖的分子机制,为海月水母爆发的机理研究提供参考。

关键词:水母暴发;食物水平;无性繁殖;转录组;信号通路

中图分类号:Q178.53 文献标识码:A 文章编号:1007-6336(2023)02-0169-07

Effects of different food supplies on the asexual reproduction of *Aurelia coerulea* based on transcriptome analysis

ZHU Jian-bin^{1,2}, WANG Jian-yan³, ZHEN Yu^{1,2}, MI Tie-zhu^{1,2}

(1.Key Laboratory of Marine Environment and Ecology, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266100, China; 2.College of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, China; 3.Department of Science Research, Beijing Museum of Natural History, Beijing 100050, China)

Abstract: To examine the molecular mechanism of *Aurelia coerulea*'s asexual reproductive strategy, transcriptome analysis was performed on polyps of *A. coerulea* under different food supplies (25, 250 and 1000 newly hatched *Artemia nauplius* individuals per group every two days). We looked into the pathway where the differential gene enriched and screened the genes that were considerably expressed differently. Stolon budding was the most common type of asexual reproduction in *A. coerulea* polyps observed. The output of daughter polyps and ephyra increased considerably as food supplies increased. There were 331 genes that differed between the F1 and F2 groups, and 168 genes that differed between the F3 and F2 groups, according to transcriptome analysis. Two signal transduction pathways, MAPK (mitogen-activated protein kinase) and Cell

收稿日期:2022-01-20, 修订日期:2022-04-29

基金项目:国家自然科学基金项目(41906112);北京市自然科学基金项目(8194059);国家重点研发计划课题项目(2017YFC1404404);北京市博士后科研活动经费项目(2016ZZ-85)

作者简介:朱见斌(1995—),男,山东日照人,硕士研究生,主要研究方向为海洋生态学, E-mail: ouc1014@163.com

通讯作者:王建艳(1985—),女,山东临沂人,副研究员,主要研究方向为海洋生物学/海洋生态学, E-mail: wjy198530@163.com

cycle, were strengthened by the KEGG pathway analysis, which improved cell growth, proliferation and differentiation. The differentially expressed genes involved in the MAPK and Cell cycle signal pathways upregulated or down-regulated in response to increased food availability, speeding up the asexual reproduction. The findings of this study will help researchers better understand how *A. coerulea* reproduces asexually in response to food availability.

Key words: jellyfish bloom; food supply; asexual reproduction; transcriptome; signal pathways

海月水母(*Aurelia coerulea*)是我国海域大型水母优势种之一,近年来常在近海聚集性暴发,给海洋渔业、旅游业、工业等带来巨大经济损失^[1-2]。海月水母生活史包括两个阶段:营底栖附着生活的螅状体阶段和营浮游生活的水母体阶段。螅状体通过出芽生殖产生子代螅状体,也可通过横裂生殖产生碟状体,碟状体进一步发育长成水母体^[3]。

海月水母具有多种无性繁殖方式和灵活的繁殖策略,保证其适应环境条件的改变并在环境适宜时大量繁殖子代个体。海月水母无性繁殖方式多达 7 种,包括出芽生殖(budding)、匍匐茎生殖(reproduction from parts of stolons)、足囊生殖(podocyst formation)、内繁殖体生殖(internal production of free-swimming propagules)、外繁殖体生殖(external production of free-swimming propagules)、纵向分裂(longitudinal fission)和横裂生殖(strobilation)^[4]。温度、食物、光照、溶解氧等被认为是影响海月水母无性生殖的关键因子^[5-6]。

除生理生态观察实验外,研究者也开始尝试利用转录组等分子生物学技术探索海月水母生活史不同阶段转换的内在机制。转录组测序分析表明,编码维生素 A 酸(RA)受体的 RxR 基因在海月水母螅状体横裂期明显上调表达,推测 RA 可能是连接温度感应受体(temperature sensing receptor)和诱发下游横裂变态基因的中间环节;CL390 基因可以编码横裂生殖激素(strobilation hormone)的先导物,进而诱发海月水母的横裂生殖^[7]。低温处理下细胞外分泌蛋白信号通路(wingless-int, Wnt)被抑制,转化生长因子信号通路(transforming growth factor beta, TGF- β)、丝裂原活化蛋白激酶信号通路(mitogen-activated protein kinase, MAPK)和细胞周期信号通路(Cell Cycle)被激活^[8]。

本文以海月水母为研究对象,对不同食物水平下的螅状体进行转录组分析,筛选差异表达基因,研究差异基因富集的通路,探讨海月水母无性繁殖策略的分子机制,为探索我国灾害性水母暴发的原因与防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 海月水母螅状体的培养

实验所用海月水母螅状体由中国科学院海洋研究所提供,保存于中国海洋大学环境科学与工程学院赤潮分子检测实验室。培养温度为 $(18.5\pm 0.5)^\circ\text{C}$,盐度为 34.1。 15°C 是海月水母螅状体出芽和横裂生殖的关键节点^[9]。本实验在 15°C 下,设置 3 个不同的食物水平(低食物组 F1: 25 个卤虫/组/2 天;中食物组 F2: 250 个卤虫/组/2 天;高食物组 F3: 1000 个卤虫/组/2 天),每组设置 3 个生物学重复。

将附着有水螅体的波纹板统一裁剪为大小相同的正方形($2\text{ cm}\times 2\text{ cm}$),留取生长状态良好且大小基本相同(约 1 mm)的水螅体(每板 5 只),将其置于 250 mL 的玻璃烧杯中,培养水体为 150 mL。实验前将放有水螅体的烧杯分别置于 15°C 培养箱中,在黑暗条件下培养 7 天,不投喂饵料。实验过程中培养箱内保持黑暗状态。食物量采用密度法控制,即用所需食物个数除以 1 mL 悬浮液里卤虫无节幼虫的个数得出所需食物体积。用移液器吸取一定体积的所需食物并对准螅状体喂食。每两天喂食一次,喂食半小时后更换烧杯中的海水。实验过程中产生的子代螅状体及足囊用解剖针剔除,游离的碟状体用吸管清除。每天利用解剖镜观察并记录水螅体的无性繁殖,实验周期为 50 天。

1.2 提取 RNA 与文库构建

实验周期为 50 天,此时横裂生殖基本结束。实验结束时,将每组的 5 只水螅体收集至冻

存管中,液氮冷冻保存,用于RNA的提取。每个实验组的3个平行样品分别用于提取RNA,并上机分析。螅状体总RNA的提取采用酚-氯仿-异戊醇抽提法,具体参照谭树亮等的操作^[10]。样品送由北京诺禾致源生物信息科技有限公司完成测序(Illumina HiSeq 2000 平台)。

1.3 转录本生物信息分析

测序数据采用无参转录组分析。转录本生物信息分析方法同参考文献^[10]。

2 结果与讨论

2.1 不同食物水平对出芽繁殖的影响

在3个食物水平下,海月水母匍匐茎出芽和直接出芽的数量如图1所示。在15℃下,海月水母螅状体无性繁殖主要为匍匐茎出芽。F1、F2和F3组每组螅状体通过匍匐茎出芽产生的子代螅状体累积个数分别为26、32、58个。截

至实验结束,高食物组(F3组),匍匐茎出芽产生的子代螅状体占子体总量的93.5%。低食物组(F1组),匍匐茎出芽生殖产生子代螅状体占子体总量的100%。高食物组(F3组)子代螅状体的数量显著高于F2组和F1组($P<0.05$, Mann-Whitney U test),说明在充足的食物条件下螅状体主要进行匍匐茎出芽生殖。F2组与F1组通过匍匐茎出芽产生的子代数量无显著性差异($P>0.05$, Mann-Whitney U test)。对于直接出芽生殖,低食物组中产生的子代个体为0,中、高食物组直到培养末期才有少量的子代个体产生,表明在15℃条件下食物无论是短缺还是充裕,直接出芽方式都不是海月水母螅状体的优先选择。子代螅状体能够利用匍匐茎出芽脱离母体,附着于远离母体的基质上^[11],海月水母螅状体在生存环境适宜时通过匍匐茎出芽可最大程度地占据生存空间,形成种群效应。

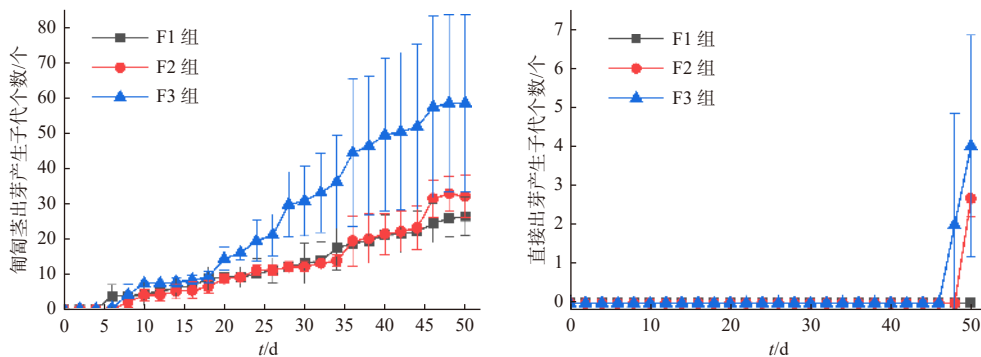


图1 不同食物水平对海月水母螅状体出芽繁殖的影响

Fig. 1 Effects of different food supplies on the budding reproduction of *A. coerulea* polyps

2.2 不同食物水平对横裂生殖的影响

3个食物水平组的螅状体同时进入横裂间期(从横裂体出现到第一个碟状体释放的时期为横裂间期),横裂间期持续时间依次为F3组(8 d)>F2组(6 d)>F1组(4 d),食物越充足横裂间期持续时间越长。食物水平越高,螅状体最终释放碟状体的数量越多(图2)。F2组释放的碟状体数量在前期高于F3组,但F3组最终产生的碟状体数量最多。F2组和F3组释放的碟状体数量显著高于F1组($P<0.05$, Mann-Whitney U test)。F2组和F3组之间无显著性差异($P>0.05$, Mann-Whitney U test)。与本文研究结果相类似,徐盛

楠^[12]发现投食组海月水母螅状体产生碟状体的数量明显多于饥饿组,而且饥饿组螅状体释放碟状体的时间早于投食组。当面临食物短缺时,海月水母螅状体通过尽快启动横裂生殖释放碟状体补充水母体数量,以摆脱栖息地的不良条件,这可能是其生存繁殖的策略之一。

2.3 海月水母无性繁殖的转录组结果

2.3.1 转录本拼接与注释

将 clean reads 用 Trinity 软件拼接完成之后,共获得 449361 条转录本,194278 条 unigenes,拼接后转录组 unigenes 的 N50 为 1239 bp,平均长度为 903 bp。在七大数据库中,转录本数据在

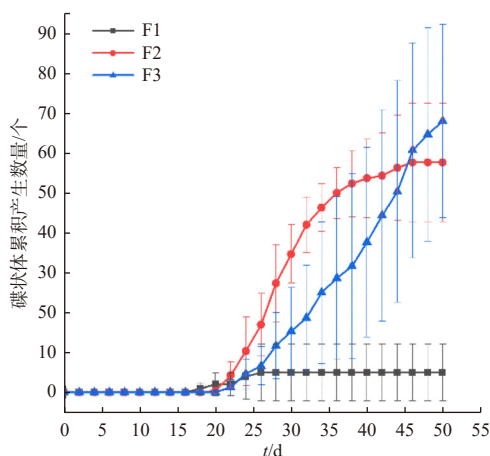


图2 不同食物水平对海月水母螅状体横裂生殖的影响

Fig. 2 Effects of different food supplies on strobilation of *A. coerulea* polyps

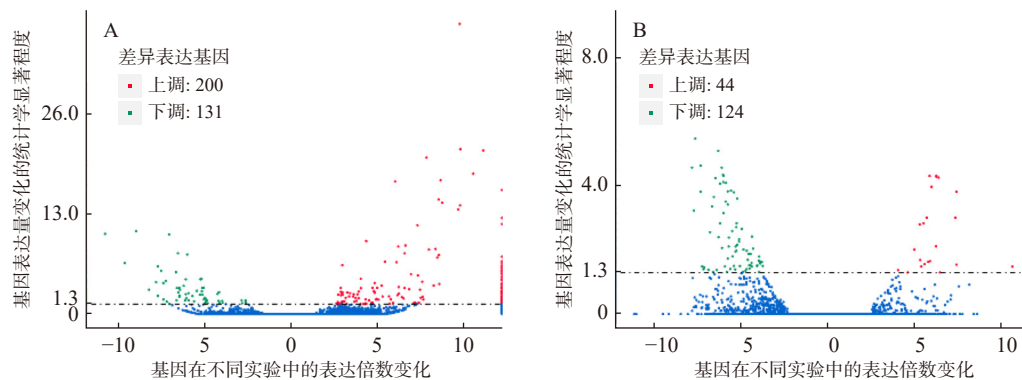
NR 数据库注释成功率最高, 为 42.82%。其次为 GO、PFAM、SwissProt, 注释成功率均接近 39%。KO 注释成功率最低, 仅为 20.93%。至少在一个数据库中注释成功的基因有 115147 条, 注释成功率达到了 59.26%。

与 NR 数据库的比对结果表明, 本研究基因数据与近缘物种基因序列的相似性最高的物种是普通水螅 (*Hydra vulgaris*), 其次为明星海葵

(*Nematostella vectensis*)、文昌鱼 (*Branchiostoma floridae*)。GO 数据库将注释成功的基因分为三大类, 分别是生物学过程、细胞成分、分子功能, 注释到这三个分类下面基因个数最多的条目依次是细胞过程、细胞部件、结合功能。将全部 unigenes 用于 KOG 比对注释, 注释成功后分为 26 个组分, 最多的功能归类于翻译、核糖体的结构和生物发生、翻译蛋白的修饰转换及结合、通用功能和信号转导机制。将基因参与的 KEGG 代谢通路进行分类, 代谢途径根据已注释 Unigenes 数目由多到少依次为信号转导、翻译、运输和代谢等。

2.3.2 差异基因 KEGG 富集分析

以 F2 组为中等食物水平, 分别统计其与低食物水平组 (F1 组) 和高食物水平组 (F3 组) 的差异表达基因 (图 3)。F1 组 (25 个卤虫/组/2 天) 与 F2 组 (250 个卤虫/组/2 天) 相比, 共有 200 个基因的表达水平出现显著上调, 131 个基因出现显著下调。与 F2 组相比, F3 组 (1000 个卤虫/组/2 天) 共有 44 个基因出现显著上调, 124 个基因出现显著下调。



(横坐标代表基因在不同实验组中表达倍数变化; 纵坐标代表基因表达量变化的统计学显著程度)

图3 不同食物水平下海月水母螅状体基因差异表达分析火山图(A: F2 组 vs F1 组; B: F3 组 vs F2 组)

Fig. 3 Analysis of gene differential expression of *A. coerulea* polyps under different food supplies (A: F2 vs F1; B: F3 vs F2)

以 Rich factor、qvalue 及 Gene number 来衡量富集程度, KEGG 富集分析结果如图 4 所示。F1 组与 F2 组相比, 差异基因显著富集在氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation)、心肌收缩 (cardiac muscle contraction) 上; F3 组与 F2 组

相比, 差异基因显著富集在糖酵解/糖异生 (glycolysis/gluconeogenesis)、组氨酸代谢 (histidine metabolism)、甘油酯代谢 (glycerolipid metabolism)、碳水化合物消化吸收 (carbohydrate digestion and absorption) 等途径。

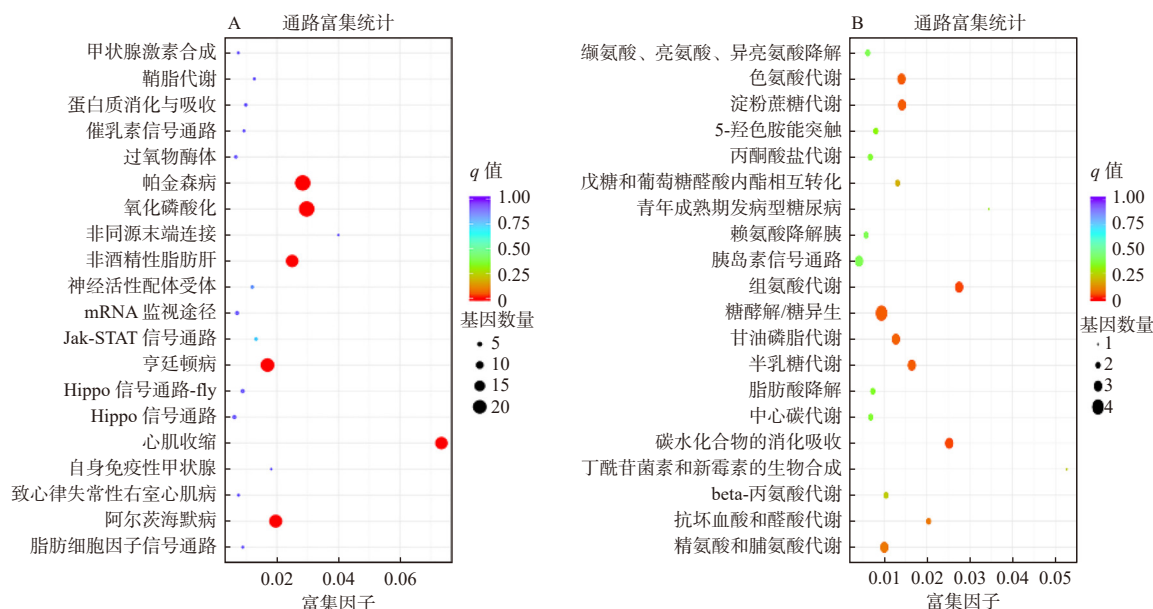


图4 不同食物水平下海月水母水螅体差异基因 KEGG 富集分析(A: F2 组 vs F1 组; B: F3 组 vs F2 组)

Fig. 4 KEGG enrichment analysis of differentially expressing genes of *A. coerulea* polyps under different food supplies (A: F2 vs F1; B: F3 vs F2)

2.3.3 无性繁殖相关的富集信号通路

本研究的差异基因主要富集到两条与海月水母无性繁殖相关的信号通路,分别为 MAPK 信号通路和 Cell cycle 信号通路。通过 KEGG 富集分析,共有 874 个基因被注释到 MAPK 信号通路(图 5)。MAPK 是丝氨酸/苏氨酸激酶,可磷酸化转录因子和其他下游激酶,介导从细胞表面到细胞核的细胞信号转导,并负责许多生物活动和细胞过程,如增殖和分化^[13]。海月水母 MAPK 信号通路中主要有 4 条分支路线(ERK、JNK、p38/MAPK、ERK5)用以调控细胞生长和分化。其中,ERK 主要负责细胞增殖分化;JNK 和 p38 功能相似,与炎症、凋亡、生长有关。从图 5 可以看出,p38 信号通路由三级激酶链组成,MKK3、MKK6 是主要的上游激活物。JNK 信号通路能被磷酸化的 MKK4 或 MKK7 激活,活化后的 JNK 可以调节多种转录因子。对水螅的研究表明,MAPK 通路可以启动其受伤后细胞凋亡的补偿性代谢增殖,代表了一种启动再生过程的进化机制,MAPK 通路对水螅头部再生起着至关重要的作用^[14]。

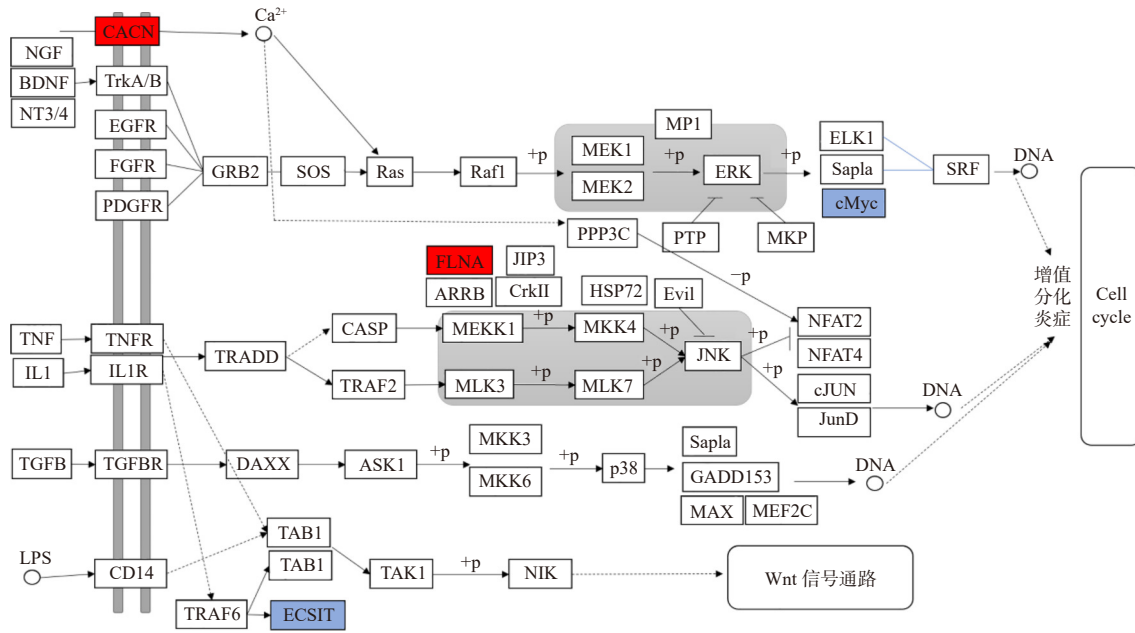
F1 组与 F2 组相比,显著差异表达的基因共有两个,CACN(voltage-dependent calcium channel

P/Q type α 1A, 上调)和 *cMyc*(Myc proto-oncogene protein, 下调);CACN 全称为 P/Q 型钙通道 α 1A 亚单位基因 *CACNA1A*,在神经元发育、神经递质释放等方面发挥重要作用,在 MAPK 通路间接调控 *NFAT-2* 以及 *NFAT-4*,而 *NFATs* 已被证实能够参加细胞的增殖分化^[15],CACN 基因上调不利于 *NFATs* 的积累,从而间接抑制海月水母的无性繁殖。*c-Myc* 基因的表达与细胞增殖和分化有关^[16],其下调表达不利于 ERK、MAPK 信号通路对于细胞分化的调控。F3 组与 F2 组相比,差异表达的基因是 *FLNA* (filamin, 上调)和 *ECSIT*(evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathway, 下调)。*FLNA* 是一类支架蛋白,主要功能是协助调控 JNK 模块^[17]。*FLNA* 上调有利于激活 JNK 途径,从而促进细胞的增殖分化。

Cell cycle 通路处于 MAPK 通路的下游,其作用为控制细胞分裂周期。在 Cell cycle 通路中,最核心的调控因子是 *Cyclin*(细胞周期蛋白)和 *CDK*(细胞周期蛋白依赖性激酶)构成的复合物。海月水母体注释到与 *Cyclin* 有关的基因主要为 *CycA/B/D/E/H*,与 *CDK* 有关的基因主要有 *CDK1/2/4/6/7*。通过 KEGG 富集分析,转录组中共

有 527 个基因被归到 Cell cycle 信号通路中(图 6)。F1 组与 F2 组相比, 有两个基因出现显著上调, 分别是 14-3-3 protein beta/theta/zeta 和 SCF(S-phase kinase-associated protein 1), 有 1 个基因(*cMyc*)出现下调。14-3-3 蛋白被证实哺乳动

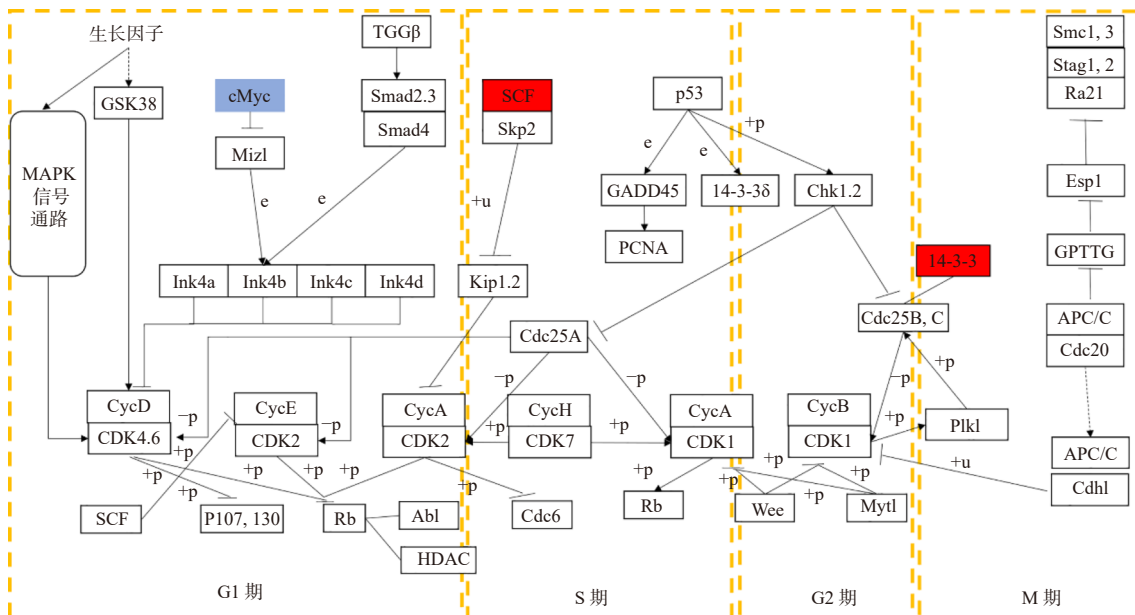
物中共有 7 种亚型($\beta, \epsilon, \eta, \gamma, \theta, \sigma$ 和 ζ), 并且与生物体生长发育具有密切的联系^[18]。14-3-3 蛋白作为一种细胞周期调控性蛋白, 能与 *Cdc25C* 上磷酸活化点结合, 抑制其活性, 进而影响细胞周期的进程^[19]。14-3-3 蛋白位于 p53 下游, 对



(红色表示基因表达上调, 蓝色表示基因表达下调)

图 5 海月水母转录组中 MAPK 信号通路

Fig. 5 MAPK signaling pathway in the transcriptome of *A. coerulea*



(红色表示基因表达上调, 蓝色表示基因表达下调)

图 6 海月水母转录组中 Cell cycle 信号通路

Fig. 6 Cell cycle signaling pathway in the transcriptome of *A. coerulea*

CDK2/cyclinE 具有负调节作用, 通过促进 G1 期阻滞从而阻止 *CDC2/cyclinB* 进入细胞质, 因此导致 G2 期阻滞^[20]。14-3-3 蛋白上调有利于将细胞分裂阻滞于细胞间期。*SCF* 是有丝分裂 S 期重要的上游调控蛋白复合物, 主要通过调节 *KIP/CIP* 蛋白的泛素化, 消除 *KIP/CIP* 蛋白对 *cyclin-CDK* 的抑制效应。因此, *SCF* 上调有利于加速细胞的增殖分裂。*cMyc* 调节 *cyclin D* 的表达, 进一步调控细胞有丝分裂的过程。综上所述, *SCF* 表达水平的上调以及 *cMyc* 表达水平的下调均有利于细胞进行分裂, 这可能也是食物充足有利于水螅体无性繁殖的分子机制之一。

3 结论

(1) 在 15 °C 条件下, 匍匐茎出芽生殖是海月水母最主要的无性繁殖方式。食物水平越高, 出芽生殖产生的子代个体越多。食物越充足横裂间期持续时间越长, 释放碟状体的数量越多。

(2) 转录组数据分析表明, 在不同食物水平下, 海月水母水螅体无性繁殖的差异基因主要富集在 MAPK 和 Cell cycle 这两条信号通路上。当食物水平升高时, MAPK、Cell cycle 信号途径均向着促进细胞分裂和分化方面作出响应, 这是食物充足促进水螅体无性繁殖的重要分子调控机制。

参考文献:

- [1] DONG Z J. Blooms of the moon jellyfish *Aurelia*: causes, consequences and controls. Sheppard C. World Seas: An Environmental Evaluation[M]. 2nd ed. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier, 2019: 163-171.
- [2] PURCELL J E, UYE S I, LO W T. Anthropogenic causes of jellyfish blooms and their direct consequences for humans: a review[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2007, 350: 153-174.
- [3] LUCAS C H. Reproduction and life history strategies of the common jellyfish, *Aurelia aurita*, in relation to its ambient environment[J]. *Hydrobiologia*, 2001, 451: 229-246.
- [4] 孙明, 段妍, 柴雨, 等. 海月水母水螅体无性繁殖方式观察及一种新发现报道[J]. *水产学报*, 2020, 44(12): 2007-2016.
- [5] PURCELL J E, HOOVER R A, SCHWARCK N T. Interannual variation of strobilation by the scyphozoan *Aurelia labiata* in relation to polyp density, temperature, salinity, and light conditions *in situ*[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2009, 375: 139-149.
- [6] ISHII H, OHBA T, KOBAYASHI T. Effects of low dissolved oxygen on planula settlement, polyp growth and asexual reproduction of *Aurelia aurita*[J]. *Plankton and Benthos Research*, 2008, 3(S1): 107-113.
- [7] FUCHS B, WANG W, GRASPEUNTNER S, et al. Regulation of polyp-to-jellyfish transition in *Aurelia aurita*[J]. *Current Biology*, 2014, 24(3): 263-273.
- [8] 吴晓雅, 龚先宇, 谭树亮, 等. 低温诱导海蜇水螅体横裂生殖的分子信号调控机制初探[J]. *海洋环境科学*, 2021, 40(1): 66-72.
- [9] XING Y Z, LIU Q, ZHANG M, et al. Effects of temperature and salinity on the asexual reproduction of *Aurelia coerulesa* polyps[J]. *Journal of Oceanology and Limnology*, 2020, 38(1): 133-142.
- [10] 谭树亮, 米铁柱, 甄毓, 等. 叫啉美辛诱导海蜇水螅体横裂生殖的分子信号调控机制[J]. *中国海洋大学学报: 自然科学版*, 2017, 47(7): 63-71.
- [11] MILLER M E C, GRAHAM W M. Environmental evidence that seasonal hypoxia enhances survival and success of jellyfish polyps in the northern Gulf of Mexico[J]. *Journal of Experimental Marine biology and Ecology*, 2012, 432/433: 113-120.
- [12] 徐盛楠. 温度和食物对不同地理群体海月水母无性生殖的影响[D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2019.
- [13] PEARSON G, ROBINSON F, GIBSON T B, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions[J]. *Endocrine Reviews*, 2001, 22(2): 153-183.
- [14] CHERA S, GHILA L, WENGER Y, et al. Injury-induced activation of the MAPK/CREB pathway triggers apoptosis-induced compensatory proliferation in hydra head regeneration[J]. *Development Growth & Differentiation*, 2011, 53(2): 186-201.
- [15] MACIAN F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2005, 5(6): 472-484.
- [16] 邱少松, 郑佳琳, 杨林, 等. *CyclinE* 及相关基因在人原发性肝癌中的表达及其意义[J]. *中国肿瘤*, 2016, 25(2): 143-149.
- [17] WESTON C R, DAVIS R J. The JNK signal transduction pathway[J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2002, 12(1): 14-21.
- [18] KILANI R T, MEDINA A, AITKEN A, et al. Identification of different isoforms of 14-3-3 protein family in human dermal and epidermal layers[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2008, 314(1/2): 161-169.
- [19] PENG C Y, GRAVES P R, THOMA R S, et al. Mitotic and G₂ checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216[J]. *Science*, 1997, 277(5331): 1501-1505.
- [20] YANG H Y, WEN Y Y, CHEN C H, et al. 14-3-3 σ positively regulates p53 and suppresses tumor growth[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2003, 23(20): 7096-7107.