

维氏气单胞菌感染异育银鲫基因表达谱分析

施 秀, 张婷婷, 贡成良, 曹广力, 薛仁宇, 张 星, 胡小龙 * (苏州大学基础医学与生物科学学院, 江苏苏州 215123)

摘要 [目的] 探讨异育银鲫在维氏气单胞菌感染的条件下肾脏组织基因表达谱。[方法] 运用 RNA-sequencing 技术分析健康和感染维氏气单胞菌的异育银鲫肾脏组织中 mRNA 表达水平的变化。[结果] 通过比较维氏气单胞菌感染组与健康对照组异育银鲫肾脏组织基因表达的差异, 发现维氏气单胞菌感染后 11 567 个基因表达水平发生了显著变化, 其中 5 634 个基因表达水平发生上调, 5 933 个基因表达水平发生下调。对所有差异表达基因 (DEGs) 进行功能注释 (GO) 分析, 发现 1 325 个 DEGs 含有 GO 注释, 其中上调和下调表达基因分别为 581 和 744 个; GO 注释结果显示, 上调表达基因主要富集于 RNA 指导的 DNA 聚合酶活性、II 型特异性脱氧核糖核酸酶活性、内切酶活性等; 下调表达基因主要富集于吡哆醛结合、肽酶抑制剂活性和 RNA 指导的 DNA 聚合酶活性等。对所有 DEGs 进行 KEGG 通路分析, 发现 545 个 DEGs (215 个上调表达基因, 330 个下调表达基因) 含有 KEGG 注释; 上调表达基因主要富集于内质网中的蛋白质加工、抗原加工和呈现和雌激素信号通路等 KEGG 通路; 下调表达基因富集通路主要富集于细胞因子-细胞因子受体相互作用、细胞黏附分子和 jak-STAT 信号通路等 KEGG 通路。对差异表达基因进行荧光定量 PCR 验证, 发现其与 RNA-sequencing 结果具有相似的表达趋势。[结论] 这些研究结果可为后续解析异育银鲫对 *A. veronii* 感染的发病机制提供参考数据。

关键词 维氏气单胞菌; 异育银鲫; 表达谱

中图分类号 S 943 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611 (2020) 23-0131-07

doi: 10. 3969/j. issn. 0517-6611. 2020. 23. 032

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Gene Expression Pattern Analysis of *Carassius auratus gibelio* Infected by *Aeromonas veronii*

SHI Xiu, ZHANG Ting-ting, GONG Cheng-liang et al (School of Biology & Basic Medical Sciences, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123)

Abstract [Objective] The purpose of this study was to explore the mRNA expression pattern in the kidney tissues of *Carassius auratus gibelio* infected by *Aeromonas veronii*. [Method] RNA-sequencing was applied to analyze the gene expression pattern in the kidney tissues of healthy *C. auratus gibelio* and *C. auratus gibelio* infected by *A. veronii*. [Result] Through comparing the gene expression differences of kidney tissues of *C. auratus gibelio* in healthy group and *A. veronii* infection group, it was found that the expression level of 11 567 genes had significant changes, 5 634 genes were up-regulated and 5 933 genes were down-regulated. Through functional annotation (GO) analysis of all differentially expressed genes (DEGs), it was found that 1 325 in all DEGs had GO terms, containing 581 up-regulated genes and 744 downregulated genes. GO annotation results showed that upregulated genes were enriched into the RNA-directed DNA polymerase activity, Type II site-specific deoxyribonuclease activity and endonuclease activity, and downregulated genes were enriched into pyridoxal binding, peptidase inhibitor activity and RNA-directed DNA polymerase activity. Through KEGG pathway analysis of all DEGs, it was found that 545 DEGs (215 up-regulated genes and 330 down-regulated genes) contained KEGG annotations. Upregulated genes were enriched into the KEGG pathways of protein processing in endoplasmic reticulum, antigen processing and presentation and estrogen signaling pathway, wherein, downregulated genes were enriched into the KEGG pathways of cytokine-cytokine receptor interaction, cell adhesion molecules and jak-STAT signaling pathway. The expression levels of several genes were selected to validate by real-time PCR and the results showed that they had the similar expression tendency. [Conclusion] These results could provide reference data for the subsequent analysis of the pathogenesis of *A. veronii* infection in *C. auratus gibelio*.

Key words *Aeromonas veronii*; *Carassius auratus gibelio*; Expression pattern

鲫鱼 (异育银鲫) 作为我国重要的淡水养殖鱼品种之一, 其适应性强、生长速度快、人工养殖简单及其营养丰富和肉味鲜美, 深受消费者的青睐, 其养殖量约占全国淡水鱼养殖产量的 10. 67%^[1]。随着规模化、节约化养殖模式的不断发展, 养殖鱼类因养殖过程中所发生的因病原体感染造成的经济损失日益加剧。出血性败血症对鲫鱼养殖的影响非常大, 目前认为鲫鱼出血性败血症由鲤疱疹 II 型病毒 (CyHV-2) 感染和细菌 (维氏气单胞菌和嗜水气单胞菌) 感染引起, 其中前者致病性强, 致死率高, 发展迅速、短时间内可造成大规模的鲫鱼死亡; 后者发病过程相对温和。关于 CyHV-2 造成的鲫鱼出血性败血症已有诸多报道^[2-4], 但关于维氏气单胞菌 (*Aeromonas veronii*) 导致的鲫鱼出血性败血症的报道相对较

少, 对其发病机制的了解甚少。

目前, 高通量测序技术已发展成熟, 此技术已经在大量物种中开展了基因时空表达研究, 此技术能够快速获得某物种在特定条件下整体基因表达水平的变化, 为整体认识物种中基因表达调控提供了重要的技术手段。RNA-sequencing 技术在鱼类免疫研究中也得到了广泛应用, 例如研究草鱼呼肠孤病毒 (grass carp reovirus, GCRV) 感染草鱼后基因表达差异^[5]; 淋巴囊肿病毒 (lymphocystis disease virus, LCDV) 感染牙鲈 (*Paralichthys olivaceus*) 后基因表达差异^[6]; 传染性鲑鱼贫血症病毒 (infectious salmon anaemia virus, ISAV) 感染大西洋大马哈鱼 (*Salmo salar*) 后基因表达差异^[7]; 鲤春病毒血症病毒 (spring viremia of carp virus, SVCV) 感染斑马鱼 (*Danio rerio*) 后基因表达差异^[8]等; 安圭拉弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 感染大菱鲈 (*Scophthalmus maximus*) 后肠道的基因表达差异^[9]; 嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 感染钝口鲮 (*Megalobrama amblycephala*) 后肾组织的基因表达差异^[10]; 嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 感染金马西尔 (*Tor putito-*

基金项目 苏州大学第六届“互联网+”大学生创新创业项目; 苏州大学第十一届“苏大天官杯”“创青春”大学生创业项目。

作者简介 施秀 (1999—), 女, 江苏南通人, 研究方向: 基因表达调控。
* 通信作者, 副教授, 博士, 硕士生导师, 从事基因表达与调控机制研究。

收稿日期 2020-07-09; **修回日期** 2020-07-24

ra)后肝脏的基因表达差异^[11];爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*)感染黄鲈鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)后脾脏组织的基因表达差异^[12]等。此项技术的应用,让人们从整体水平上认识在病原体感染的情况下宿主细胞内基因的表达谱特征变化。

笔者利用 RNA-sequencing 技术研究了维氏气单胞菌感染异育银鲫的肾组织中基因的表达模式,比较分析了维氏气单胞菌感染和未感染异育银鲫肾脏组织中基因表达模式的异同,并对差异表达基因进行了功能注释和信号通路分析,旨在为探索异育银鲫对维氏气单胞菌的感染应答机制提供线索。

1 材料与方法

1.1 试验材料 健康异育银鲫采样于江苏省昆山市澄湖水产良种场,体重约 30 g/尾,在充氧条件下按照常规饲养条件进行人工饲养。维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)由笔者所在实验室保存,来源于自然发病的异育银鲫,通过 16S rRNA 基因测序进行物种鉴定。随机选取 3 尾健康异育银鲫进行腹腔注射,发病后取其肾脏组织作为试验组 A2;取 3 尾健康异育银鲫的肾脏组织作为对照组 B。

1.2 试验方法

1.2.1 文库构建与测序。利用 mirVanaTM miRNA Isolation Kit (Ambion-1561)试剂盒提取试验组和对照组肾脏组织样本中总 RNA;高质量的 RNA 构建测序文库;构建的文库质量经 Agilent 2100 Bioanalyzer 质检分析;使用 Illumina HiSeqTM 4000 测序仪进行测序。RNA-sequencing 测序委托上海欧易生物医学科技有限公司完成。

1.2.2 测序数据评估。HiSeqTM 4000 测序仪产生的原始数据 raw reads,进行过滤处理获得 clean reads。为了避免样本污染,随机从每个样本中抽取 25 万对 reads 与数据库(ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/db)进行比对,分析统计序列来源。

1.2.3 De novo 测序。利用 Trinity(trinityrnaseq_r20131110)软件^[13]的 paired-end 拼接法,将 clean reads 拼接为转录本序列;通过序列相似性和长度综合分析,选取一条最长的转录本序列作为 unigene;运用 TGICL2.1 软件^[14]聚类去冗余,获得最终的 unigene,de novo 拼接所产生的 unigene 作为后续分析的参考序列。

1.2.4 基因功能的注释。通过 Blastx 工具将所有获得的 unigene 序列分别与数据库 NR、SWISSPROT 和 KOG 比对,选取 e 值<10⁻⁵的注释,获得与 unigene 具有序列相似性最高的蛋白;利用 KAAS(http://www.genome.jp/kaas-bin/kaas_main)软件分析 unigene 所涉及的 KEGG 信息;根据 SWISSPROT 注释结果,得到 unigene 的 GO 功能注释信息。

1.2.5 Unigene 表达丰度。使用 bowtie2^[15]和 eXpress^[16]软件分析 unigene 在试验组和对照组样本中的表达水平。使用 FPKM 法(fragments per kilobase per million reads)计算 unigene 的表达水平^[17]。

1.2.6 筛选差异基因(DEGs)。利用 DESeq 软件^[18]计算试验组和对照组样本中基因表达水平差异,差异基因筛选标准为 P<0.05 且差异倍数(fold change)>2。

1.2.7 DEGs 的功能注释(GO)和 KEGG 富集分析。利用超

几何分布检验方法计算每个 GO 条目中差异表达基因富集的显著性。利用 KEGG 数据库^[19]对差异基因进行 Pathway 分析,并用超几何分布检验的方法计算每个 Pathway 条目中差异基因富集的显著性。

1.2.8 Real-time PCR。为了验证 RNA-sequencing 数据的可靠性,随机选取 5 个显著差异表达的 mRNA[IL-11(IL)、C 型溶菌酶(ctl)、类胰岛素生长因子受体(ILG)、白细胞介素-13 受体(ILR)、toll 样受体-9(TLR)]进行 Real-time PCR 验证。从试验组和对照组肾脏组织样本中提取总 RNA, DNase I 消化后的总 RNA 用随机引物进行反转录。Real-time PCR 操作按照 TransStart Tip Green qPCR SuperMix 说明书进行。Real-time PCR 所用定量引物见表 1。基因相对表达水平以 2^{-ΔΔCt} 法计算。

表 1 Real-time PCR 引物序列
Table 1 The primer sequences for real-time PCR

序号 No.	基因 Gene	引物序列 Primer sequences(5'-3')
1	Actin	qactin-1 为 ATGCTCACGGGTCCCATGCTG; qactin-2 为 GCTGTAGCCTCTCTCGGTCA
2	C-type lysozyme	qctl-1 为 GGCAACTATGTGTGCACGG; qctl- 2 为 CTGGAGTGCCGTCATCGCAC
3	toll-like receptor 9	qTLR-1 为 TGACATTGGCAGCAACCAGC; qTLR-2 为 GATCCAATCCCTGGCTGCC
4	insulin-like growth factor 1 receptor	qILG-1 为 GGAGATCATCAGCAGCATCAAG; qILG-2 为 AGGAACGTTCTCCATGGCTC
5	interleukin-11	qIL-1 为 CCAGACTGACTTTGACAAGC; qIL- 2 为 ACTCTGCTGCTGATCGCTGG
6	interleukin-13 receptor	qILR-1 为 GACACCTACGAGGAACGATG; qILR-2 为 CTGTCCCATTGGTGCAGGCA

2 结果与分析

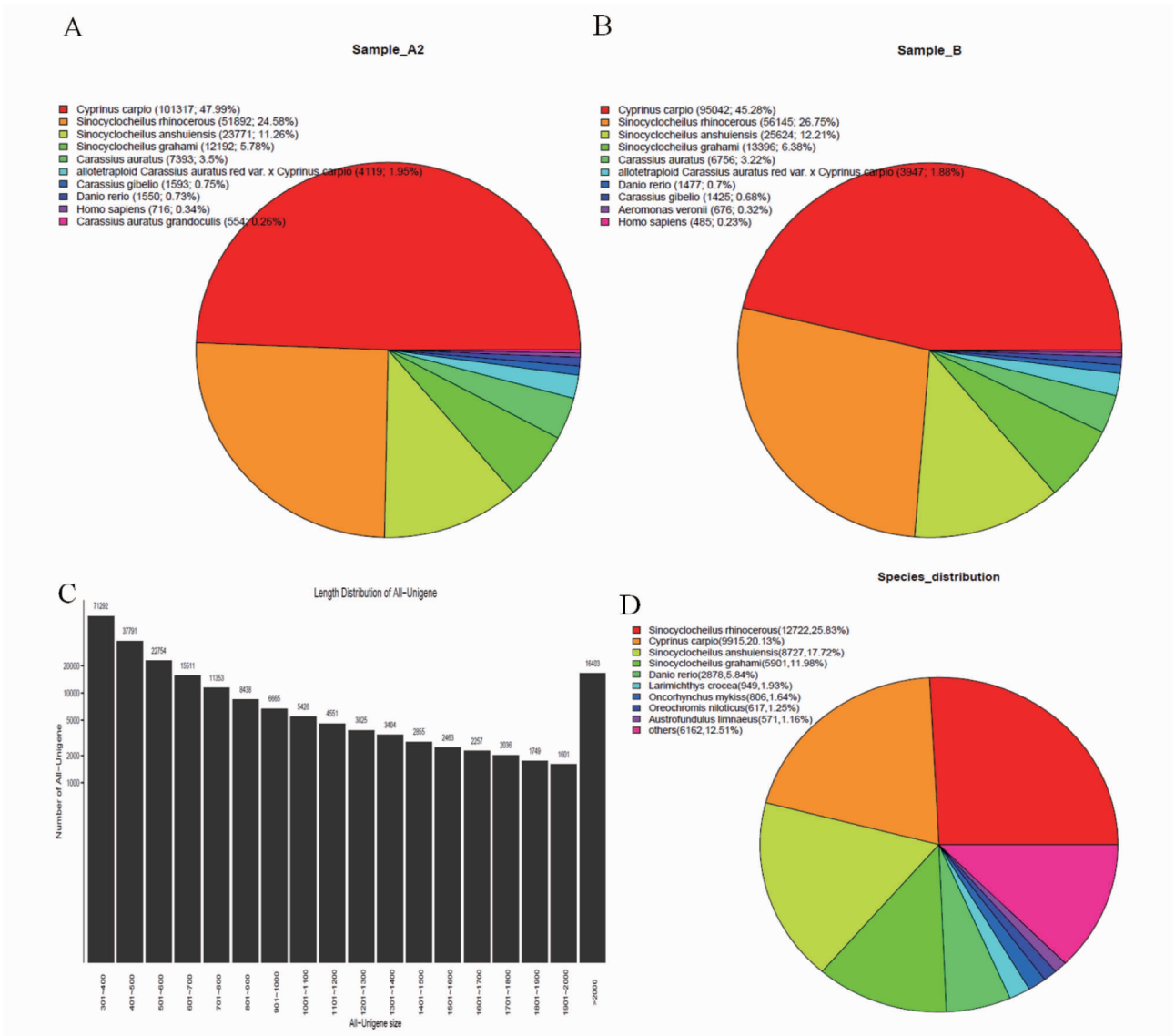
2.1 文库质量检测与 de novo 数据拼接 通过对试验组 A2 和对照组 B 所构建的 2 个文库进行 RNA-sequencing 测序获得 raw bases,经过滤后得到 clean reads,统计显示 clean reads 占 raw bases 的比例约 98%(表 2)。随机从试验组和对照组样本中抽取 25 万对 reads 与数据库(nt)比对,分析序列的物种来源。结果显示,试验组 A2 样本中 reads 匹配的前 10 物种仅为异育银鲫或其近缘物种,对照组 B 样本中 reads 匹配的前 10 物种也为异育银鲫或其近缘物种,及 A. veronii (图 1A、B)。以上研究结果表明,2 个样本测序数据具有较高质量,且不存在其他微生物污染。为便于后续的研究和应用,测序的原始数据均已保存在 NCBI 公共数据库 SRA (SRR8259812 和 SRR8259811)。通过对 unigene 的数量与长度分布统计,共获得 220 374 个 unigene,平均长度为 818.04 bp (图 1C)。将检测到的 unigene 进行数据库物种信息匹配,发现试验组注释的亲缘物种 top5 依次为犀角金线鲃(12 722 个 unigene,占 25.83%)、鲤鱼(9 915 个 unigene,占 20.13%)、安水金线鲃(8 727 个 unigene,占 17.72%)、金线鲃(5 901 个 unigene,占 11.98%)、斑马鱼(2 878 个 unigene,占 5.84%)(图 1D)。

2.2 unigene 功能注释 为了全面了解所有 unigene 的潜在功能,将获得的 unigene 分别与 5 个数据库(NR、SWISSPROT、KOG、GO 和 KEGG)进行序列比对,结果显示 NR 数

数据库中存在 49 248 个 unigene、SWISSPROT 数据库含有 32 191 个 unigene、KOG 数据库存在 24 369 个 unigene、GO 数据库含有 28 873 个 unigene 和 KEGG 数据库含有 13 330 个 unigene(表 3)。

表 2 测序数据产出率统计
Table 2 The output rate statistics of sequencing data

组别 Group	Raw reads	Raw bases	Clean reads	Clean bases	Valid bases/%
试验组 Test group(A2)	108 930 734	13 616 341 750	107 147 464	13 390 438 947	98.34
对照组 Control group(B)	110 419 000	13 802 375 000	108 685 740	13 582 790 228	98.40



注:A. 试验组 A2 样本 reads 数据污染检测;B. 对照组 B 样本 reads 数据污染检测;C. 经拼接获得的 unigene 数量与长度分布;D. 试验组 A2 样本中物种亲缘关系分布
Note:A. The contamination detection of reads data in the samples of test group A2;B. The contamination detection of reads data in the samples of control group B;C. The number and length distribution of unigenes obtained by splicing;D. The distribution of species relationship in the samples of test group A2

图 1 样本 RNA-seq 测序 reads 数据污染检测、长度分布和物种亲缘关系分布

Fig. 1 The contamination detection,length distribution and species relationship distribution of sample RNA-seq reads data

将所有 unigene 进行 GO 注释后归类到生物学过程 (biological process, BP)、细胞组分 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF) 三大类,并进一步细分至 64 个亚类中。试验组样本中的 unigene 注释至 BP 有 164 430 个 (50.55%),注释至 CC 有 121 189 个 (37.26%),注释至 MF 有 39 670 个 (12.20%) (图 2A)。将所有 unigene 进行 KEGG 信号通路分析,结果显示所有 unigene 主要分为细胞进程、环境信息处理、遗传信息处理、人类疾病、代谢和有机系统 6 个

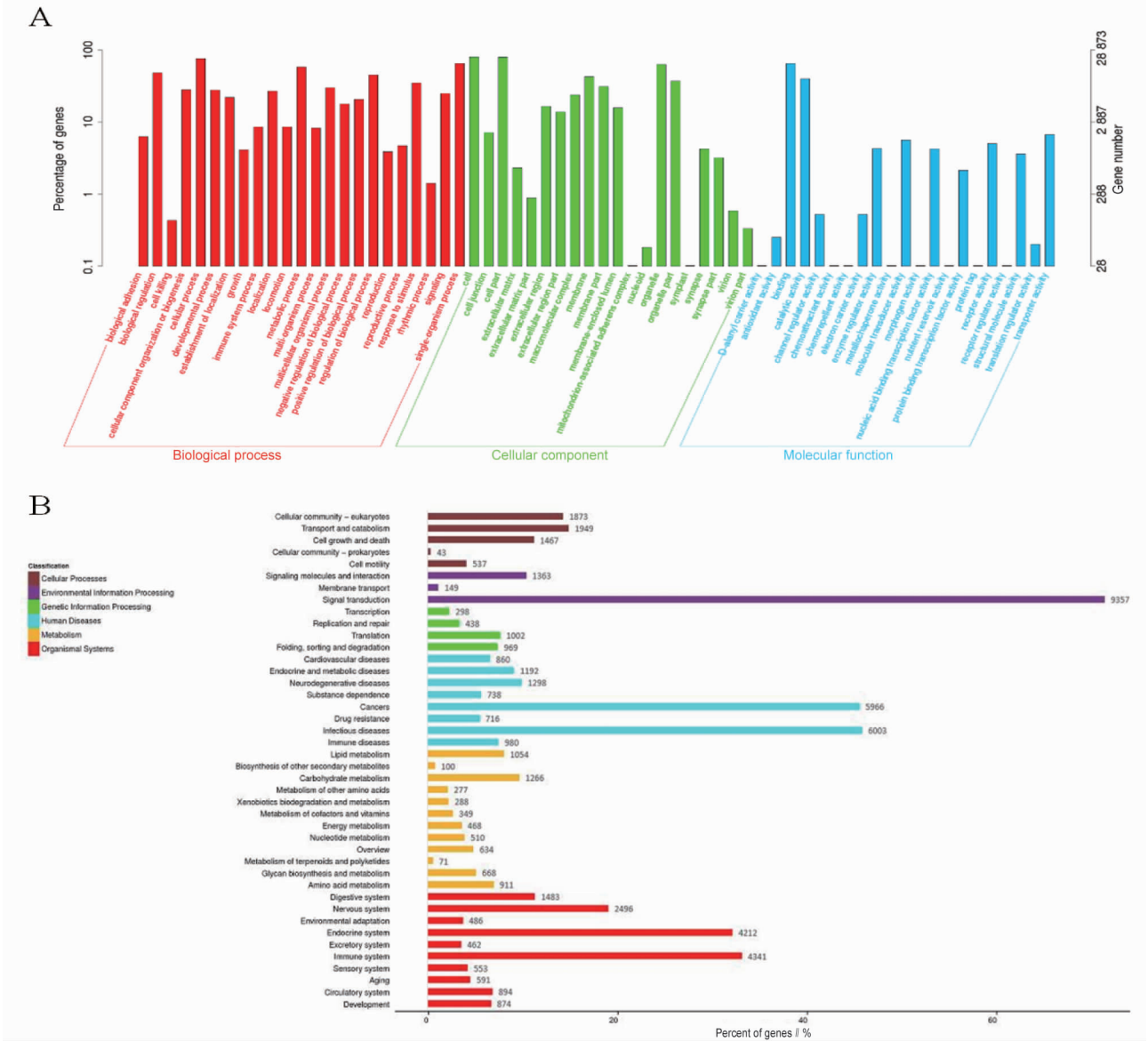
代谢途径,进一步分析显示这些 unigene 参与 42 个 KEGG 信号通路。试验组样本中发现 13 330 个 unigene 含有 KEGG 注释,其中 unigene 主要富集于信号转导(9 357 个 unigene)、感染性疾病(6 003 个 unigene)和癌症(5 966 个 unigene)等相关通路(图 2B)。

2.3 差异表达基因统计 根据差异表达基因(DEGs)筛选要求 $P<0.05$ 且差异倍数(fold change) >2 ,比较了试验组样本和对照组样本中 mRNA 的表达水平差异,发现 11 567 个 DEGs,其中 5 634 个基因表达水平上调和 5 933 个基因表达水平下调。根据 DEGs 绘制火山图(图 3),通过火山图可以

直观地了解试验组和对对照组样本中基因的差异表达情况。

表 3 各数据库注释比例统计
Table 3 Annotation ratio statistics of each database

数据库 Database	annotation_numbers	annotation_ratio %
NR	49 248	22.35
SWISSPROT	32 191	14.61
KOG	24 369	11.06
KEGG	13 330	6.05
GO	28 873	13.10



注:A.GO 注释;B.KEGG 通路分析
Note:A.GO annotation;B.KEGG pathway analysis

图 2 试验组样本中 unigene 的 GO 注释和 KEGG 通路分析
Fig.2 GO annotation and KEGG pathway analysis of unigene in the samples of test group

2.4 DEGs 的 GO 注释分析 通过试验组和对对照组样本中基因表达水平比较以及 GO 数据库分析,发现 1 325 个 DEGs 存在 GO 注释,其中分别包括 581 上调表达基因和 744 个下调表达基因。GO 注释分析显示上调表达基因主要富集于

RNA 指导的 DNA 聚合酶活性(RNA-directed DNA polymerase activity)、II 型特异性脱氧核糖核酸酶活性(Type II site-specific deoxyribonuclease acitivity)和内切酶活性(endonuclease activity)等(图 4A);下调表达基因主要富集于吡哆醛结合(pyid-

oxal binding)、肽酶抑制剂活性(peptidase inhibitor activity)和 RNA 指导的 DNA 聚合酶活性(RNA-directed DNA polymerase activity)等(图 4B)。

2.5 DEGs 的 KEGG 富集分析 通过试验组和对照组样本中基因表达水平比较以及 KEGG 数据库分析,发现有 545 个 DEGs 参与 KEGG 信号通路,其中包括 215 个上调表达基因和 330 个下调表达基因。上调表达基因主要富集于内质网中的蛋白质加工(protein processing in endoplasmic reticulum)、抗原加工和呈现(antigen processing and presentation)和雌激素信号通路(esterogen signaling pathway)等 KEGG 通路(图 5A);下调表达基因主要富集于细胞因子-细胞因子受体相互作用(cytokine-cytokine receptor interaction)、细胞黏附分子(cell adhesion molecules)和 jak-STAT 信号通路(jak-STAT signaling pathway)等 KEGG 通路(图 5B)。

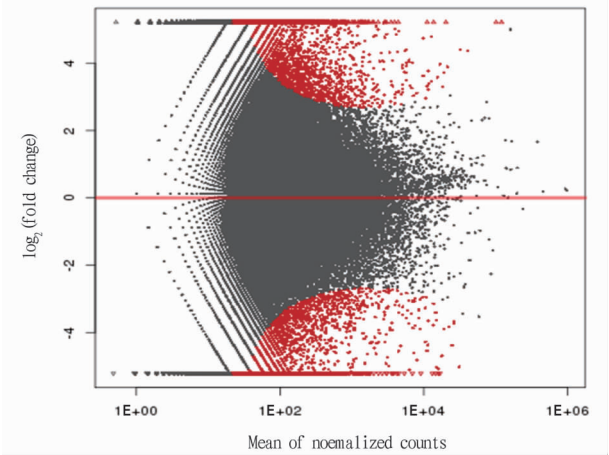
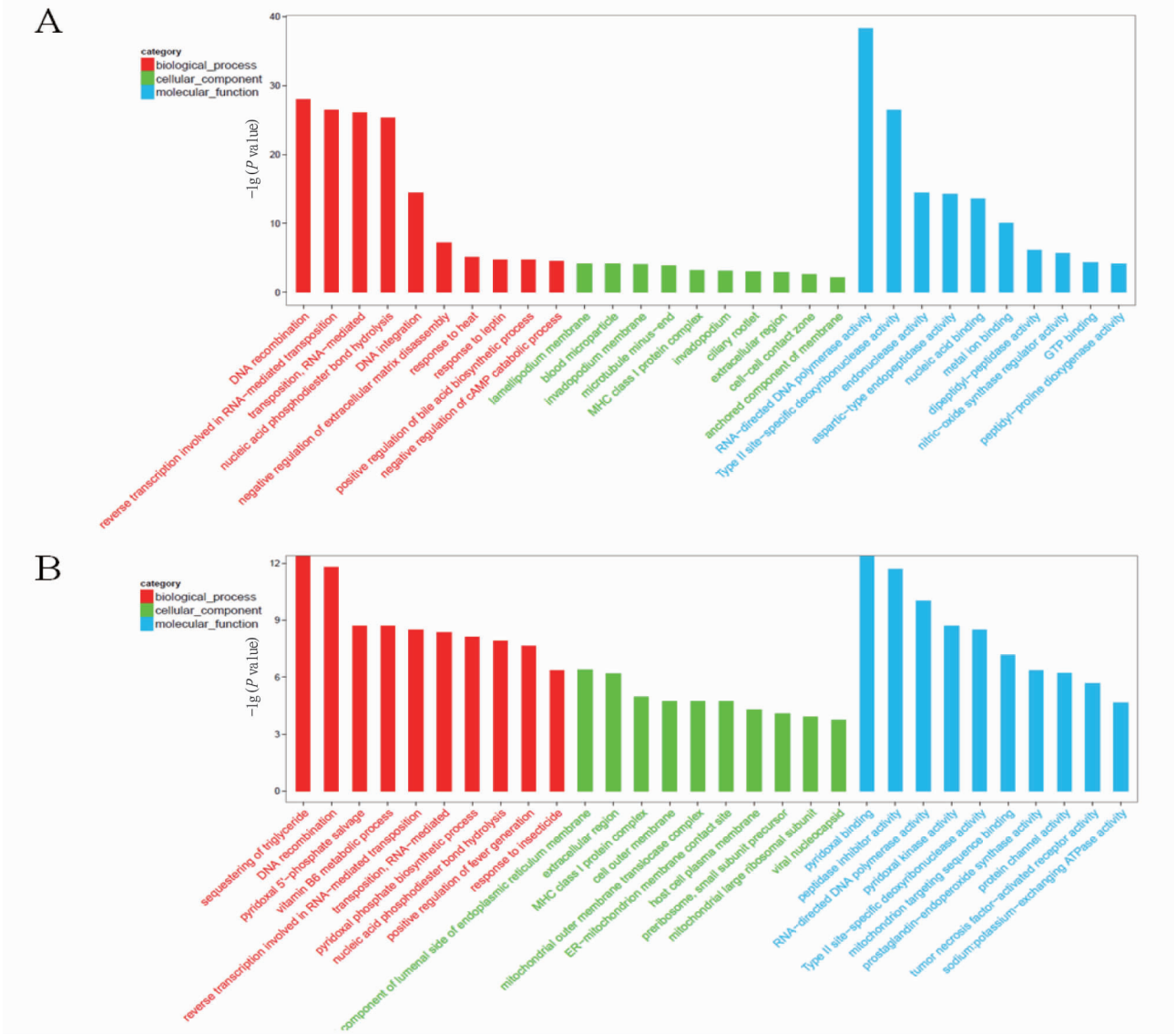


图 3 试验组和对照组样本中 DEGs 火山图

Fig.3 DEGs volcano map in the samples of test group and control group

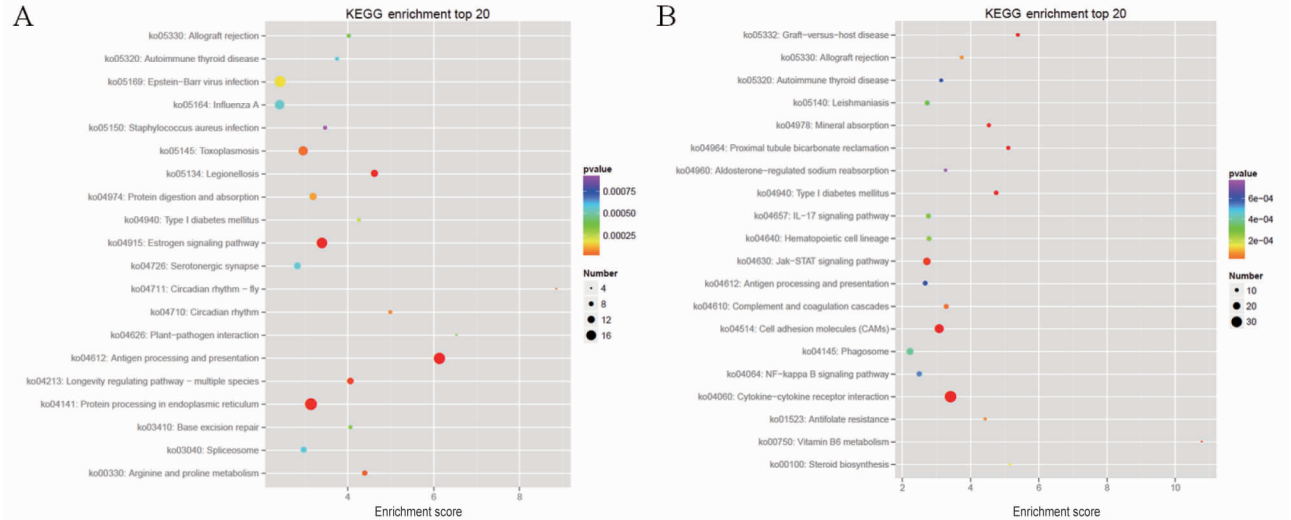


注:A. 上调表达基因 GO 注释分析;B. 下调表达基因 GO 注释分析

Note: A. GO annotation analysis of upregulated genes; B. GO annotation analysis of downregulated genes

图 4 DEGs 的 GO 注释分析(Top30)

Fig.4 GO annotation analysis of DEGs(top30)



注:A.上调表达基因的 KEGG 富集分析;B. 下调表达基因的 KEGG 富集分析
Note:A. KEGG enrichment analysis of up-regulated expressed genes;B. KEGG enriched analysis of down-regulated expressed genes

图5 DEGs 的 KEGG 富集分析 (Top20)

Fig. 5 KEGG enrichment analysis of DEGs (Top20)

2.6 Real-time PCR 验证 为了验证 RNA-sequencing 数据的可靠性,随机选取 5 个基因(IL-11、C 型溶菌酶、类胰岛素生长因子受体、白细胞介素-13 受体和 toll 样受体-9 基因)进行 Real-time PCR 验证,结果显示 Real-time PCR 结果与 RNA-sequencing 数据的变化趋势相一致(图 6)。

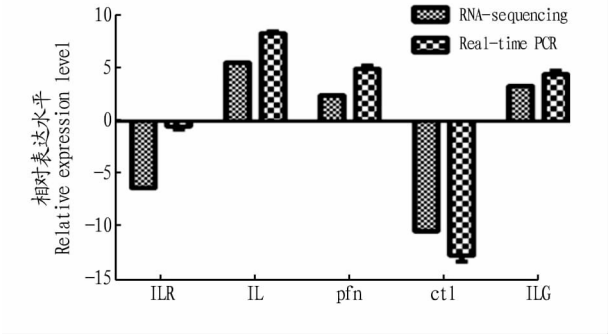


图6 Real-time PCR 验证
Fig. 6 Real-time PCR verification

3 讨论

鲫鱼养殖过程中遭受多种病原菌的感染,维氏气单胞菌是其中的一种,此类细菌的感染会造成鲫鱼出血性败血症,严重损伤肾脏组织,造成坏死和解体等病理现象。该研究利用维氏气单胞菌感染异育银鲫肾脏组织进行比较转录组分析,以期从基因表达调控方面明晰异育银鲫对维氏气单胞菌感染的免疫应答。由于异育银鲫的遗传背景中的基因组信息不清楚,利用 *de novo* 测序技术,拼接完成了异育银鲫的转录组水平遗传信息,并在此基础上开展了维氏气单胞菌感染和未感染异育银鲫之间的差异转录组分析,所获得的异育银鲫转录组水平的遗传信息和维氏气单胞菌感染后的基因表达差异情况,为后续的解析异育银鲫对维氏气单胞菌感染的发病机制提供参考数据。

de novo 测序和序列拼接结果显示共发现 220 374 个 uni-

gene,其中 57 200 条 unigene 来源于维氏气单胞菌,163 174 条 unigene 来源于异育银鲫。通过对 163 174 条 unigene 进行 GO 注释和 KEGG 分析,发现这些 unigene 涉及异育银鲫的生长发育、环境适应及免疫等;KEGG 分析结果也显示这些 unigene 参与重要的信号通路(如信号转导、先天免疫和后天免疫信号通路等),说明低等脊椎动物异育银鲫也具备完整的免疫系统。

嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)是水产养殖中最常见的且也是危害严重的病原体。目前,利用 *A. hydrophila* 感染各种鱼类研究宿主的免疫应答的研究较多,认识也比较的清晰。Song 等^[20]利用高通量测序技术比较了 *A. hydrophila* 感染和未感染的草鱼肠道组织中基因表达差异情况,共检测到 315 个上调表达基因和 234 个下调表达基因;在感染 *A. hydrophila* 的大黄鱼中,利用高通量测序技术共检测到 727 个基因表达上调和 489 个基因表达下调^[21]。利用转录组测序技术检测温和气单胞菌(*A. sobria*)感染的鲤鱼,结果显示在感染的肌肉组织中共检测到 7 749 个 DEGs,其中 6 300 个上调表达基因和 1 449 个下调表达基因;在脾脏组织中共检测到 7 846 个 DEGs,其中 5 111 个上调表达基因和 2 735 个下调表达基因^[22]。该研究中转录组测序维氏气单胞菌感染的异育银鲫肾脏组织,共发现 11 567 个 DEGs,其中 5 634 个上调表达基因和 5 933 个下调表达基因。这些研究结果表明不同种类的鱼在细菌感染后,其基因转录模式发生了明显变化。Li 等^[23]利用转录组测序技术分析维氏气单胞菌感染非洲鲶鱼(*Clarias gariepinus*)后不同时间时相脾脏组织基因表达模式情况,共发现 2 482 个 DEGs,其明显低于维氏气单胞菌感染异育银鲫中的 DEGs 数量,也说明不同种类的鱼对 *A. veronii* 感染的基因表达水平差异及应答反应存在明显不同。Maekawa 等^[24]利用不同种类的鱼感染不同种类的细菌,研究其基因表达差异,发现 39 个 DEGS 存在于所检测的加州鲈(*Mi-*

cropterus salmoides)、鲮 (*Mugil cephalus*)、点带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 和鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 中;不同鱼类中发现的总 DEGs 也存在显著差异,这些研究结果表明不同种类的鱼可能存在特定的免疫应答相关通路。

免疫相关基因 *irg1l*、补体因子 D 和 *cfld* (NM_001020532.1) 在感染中参与应答反应。Hartig 等^[25] 研究斑马鱼感染沙门氏菌 1 h 后就可检测到 *irg1l* 上调表达,表明该基因对沙门氏菌感染存在一定的迅速应答机制。补体因子 D 在宿主防御中起重要作用^[26]。*cfld* 在牙鲆的各组织中均有表达,感染病毒性出血性败血症病毒 (VHSV) 和海豚链球菌 (*Streptococcus iniae*) 后牙鲆肝脏、肾脏、脾脏中的 *cfld* 均表达上调升高^[26]。该研究中 *irg1l* 在维氏气单胞菌感染肾脏组织后下调至 0.006 8 倍;*cfld* 在维氏气单胞菌感染肾脏组织后上调 9.885 1 倍。因此,推测 *irg1l* 和 *cfld* 在异育银鲫免疫应答和防御过程中扮演重要角色。

为了能够了解异育银鲫对维氏气单胞菌感染的应答,将筛选出的 DEGs 进行富集分析。KEGG 富集分析显示维氏气单胞菌感染后的上调表达基因主要富集于内质网中的蛋白质加工 (protein processing in endoplasmic reticulum)、抗原加工和呈现 (antigen processing and presentation) 和雌激素信号通路 (estrogen signaling pathway) 等 KEGG 通路;下调表达基因富集通路主要富集于细胞因子-细胞因子受体相互作用 (cytokine-cytokine receptor interaction)、细胞黏附分子 (cell adhesion molecules) 和 jak-STAT 信号通路 (jak-STAT signaling pathway) 等 KEGG 通路,研究结果表明 *A. veronii* 感染异育银鲫后引起了强烈的免疫应答反应。Rodríguez 等^[27] 利用转录组测序技术分析斑马鱼感染 *A. hydrophila* 后皮肤的应答模式,发现差异表达基因主要富集于 MAPK、p53、Wnt、TGF-β、Notch、ErbB、JAK-STAT、VEGF、mTOR 和钙信号等通路。维氏气单胞菌感染会的最主要的病理症状就是引起异育银鲫的全身性出血,推测其可能与 VEGF 信号通路相关。

综上所述,笔者对异育银鲫感染维氏气单胞菌感染后的应答模式进行了分析,比较了异育银鲫对病原体感染的免疫应答模式,维氏气单胞菌感染异育银鲫中发现多个显著差异表达基因,这些基因参与了重要的信号通路,尤其是免疫信号通路。这些结果为探索异育银鲫对维氏气单胞菌的感染应答机制提供了线索,为细菌性出血性败血症综合防治奠定了理论基础。

参考文献

- [1] 农业部渔业渔政管理局. 2017 中国渔业统计年鉴[M]. 北京:中国农业出版社,2017:25.
- [2] LIU M, WU T, LI S, et al. Combined transcriptomic/proteomic analysis of crucian carp *Carassius auratus gibelio* in cyprinid herpesvirus 2 infection [J]. Fish Shellfish Immunol, 2018, 82: 386-399.
- [3] GAO T M, CUI B J, KONG X, et al. Investigation of bacterial diversity and pathogen abundances in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) ponds during a cyprinid herpesvirus 2 outbreak [J]. Microbiology open, 2019, 8 (10): 1-16.
- [4] XIA S Y, WANG H, HONG X P, et al. Identification and characterization of a type I interferon induced by cyprinid herpesvirus 2 infection in crucian carp *Carassius auratus gibelio* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2018, 76: 35-40.

- [5] SHI M J, HUANG R, DU F K, et al. RNA-seq profiles from grass carp tissues after reovirus (GCRV) infection based on singular and modular enrichment analyses [J]. Mol Immunol, 2014, 61 (1): 44-53.
- [6] WU R H, SHENG X Z, TANG X Q, et al. Transcriptome analysis of flounder (*Paralichthys olivaceus*) gill in response to lymphocystis disease virus (LCDV) infection: Novel insights into fish defense mechanisms [J]. International journal of molecular sciences, 2018, 19 (1): 1-19.
- [7] DETTLEFF P, MOEN T, SANTI N, et al. Transcriptomic analysis of spleen infected with infectious salmon anemia virus reveals distinct pattern of viral replication on resistant and susceptible Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2017, 61: 187-193.
- [8] DIOS S, BALSEIRO P, COSTA M M, et al. The involvement of cholesterol in sepsis and tolerance to lipopolysaccharide highlighted by the transcriptome analysis of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Zebrafish, 2014, 11 (5): 421-433.
- [9] GAO C B, FU Q, SU B F, et al. Transcriptomic profiling revealed the signatures of intestinal barrier alteration and pathogen entry in turbot (*Scophthalmus maximus*) following *Vibrio anguillarum* challenge [J]. Dev Comp Immunol, 2016, 65: 159-168.
- [10] TRAN N T, GAO Z X, ZHAO H H, et al. Transcriptome analysis and microsatellite discovery in the blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) after challenge with *Aeromonas hydrophila* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2015, 45 (1): 72-82.
- [11] KUMAR R, SAHOO P K, BARAT A. Transcriptome profiling and expression analysis of immune responsive genes in the liver of Golden mahseer (*Tor putitora*) challenged with *Aeromonas hydrophila* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2017, 67: 655-666.
- [12] ZHU R, LIU X X, LV X, et al. deciphering transcriptome profile of the yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) in response to *Edwardsiella ictaluri* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2017, 70: 593-608.
- [13] GRABHERR M G, HAAS B J, YASSOUR M, et al. Trinity: Reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data [J]. Nature biotechnology, 2011, 29 (7): 644-652.
- [14] PERTEA G, HUANG X Q, LIANG F, et al. TIGR Gene Indices clustering tools (TGICL): A software system for fast clustering of large EST datasets [J]. Bioinformatics, 2003, 19 (5): 651-652.
- [15] LANGMEAD B, SALZBERG S L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 [J]. Nature methods, 2012, 9 (4): 357-359.
- [16] ROBERTS A, PACHTER L. Streaming fragment assignment for real-time analysis of sequencing experiments [J]. Nature methods, 2013, 10 (1): 71-73.
- [17] 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.
- [18] ANDERS S, HUBER W. Differential expression of RNA-Seq data at the gene level-the DESeq package [M]. Heidelberg: European Molecular Biology Laboratory, 2012.
- [19] KANEHISA M, ARAKI M, GOTO S, et al. KEGG for linking genomes to life and the environment [J]. Nucleic acids research, 2008, 36: D480-D484.
- [20] SONG X H, HU X L, SUN B Y, et al. A transcriptome analysis focusing on inflammation-related genes of grass carp intestines following infection with *Aeromonas hydrophila* [J]. Scientific reports, 2017, 7: 1-12.
- [21] MU Y N, DING F, CUI P, et al. Transcriptome and expression profiling analysis revealed changes of multiple signaling pathways involved in immunity in the large yellow croaker during *Aeromonas hydrophila* infection [J]. BMC Genomics, 2010, 11 (1): 1-14.
- [22] OMKAR B, YAO-CHUNG C, SHUN M, et al. Immune-related functional differential gene expression in koi carp (*Cyprinus carpio*) after challenge with *Aeromonas sobria* [J]. International journal of molecular sciences, 2018, 19 (7): 1-15.
- [23] LI Z Z, WANG X M, CHEN C X, et al. Transcriptome profiles in the spleen of African catfish (*Clarias fariensis*) challenged with *Aeromonas veronii* [J]. Fish & shellfish immunology, 2019, 86: 858-867.
- [24] MAEKAWA S, WANG P C, CHEN S C. Comparative study of immune reaction against bacterial infection from transcriptome analysis [J/OL]. Frontiers in immunology, 2019, 10: 153 [2020-04-13]. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00153.

续表 3

序号 No.	系号 Clones No.	叶量 Leaf quantity//片	叶面积 Leaf area//cm ²	叶长 Leaf length//cm	叶宽 Leaf width//cm
27	S27	34.00±8.89 h	8.44±1.33 cde	3.72±0.19 fghij	2.30±0.04 abcd
28	S28	50.00±5.57 bcdefgh	7.09±0.16 ef	3.42±0.18 ijk	2.16±0.18 abcde
29	S29	42.33±4.62 cdefgh	7.70±0.93 def	3.46±0.32 ijk	2.25±0.53 abcde
30	S30	49.00±8.18 bcdefgh	7.46±0.73 def	3.69±0.38 fghij	2.27±0.37 abcde
31	D31	43.33±8.39 cdefgh	7.18±0.38 def	3.55±0.36 hij	2.22±0.26 abcde
32	D32	50.00±3.61 bcdefgh	7.19±0.39 def	3.40±0.31 ijk	2.18±0.49 abcde
33	D33	48.33±6.81 bcdefgh	8.06±0.14 def	3.63±0.34 ghij	2.24±0.45 abcde
34	D34	56.67±4.51 abcdefg	7.45±0.59 def	3.51±0.13 hij	2.28±0.39 abcde
35	T35	61.67±12.70 abcd	10.36±0.87 ab	4.53±0.34 bed	2.37±0.27 abc
36	T36	58.67±11.01 abcdef	10.40±0.87 ab	4.51±0.34 bcde	2.39±0.31 abc
37	T37	48.67±11.59 bcdefgh	8.39±0.69 cde	3.94±0.78 defghij	2.22±0.26 abcde
38	T38	46.00±13.00 cdefgh	8.53±0.79 cde	4.17±0.06 cdefgh	2.30±0.08 abcde
39	T39	62.33±6.11 abc	9.83±1.13 bc	4.82±0.43 b	2.12±0.02 abcde
40	T40	61.33±13.61 abcde	8.57±0.70 cde	4.29±0.31 bcdefg	2.33±0.06 abcd
41	T41	43.67±3.05 cdefgh	8.37±1.27 cde	3.79±0.42 fghij	2.34±0.28 abcd
42	T42	69.33±1.53 ab	11.44±0.96 a	5.62±0.35 a	2.27±0.22 abcde
43	T43	71.00±2.00 a	11.39±2.76 a	4.37±0.42 bcdef	2.59±0.41 a
44	G44	44.67±5.86 cdefgh	7.19±0.92 def	3.78±0.21 fghij	1.29±0.12 abcde
45	G45	42.00±3.00 cdefgh	8.07±0.88 def	3.85±0.19 fghij	2.10±0.06 abcde
46	G46	38.33±11.37 fgh	7.21±0.77 def	3.58±0.04 hij	1.94±0.19 bcde
47	G47	37.67±3.06 fgh	7.68±0.47 def	3.69±0.13 fghij	1.91±0.05 cde
48	G48	47.33±16.50 cdefgh	7.56±0.65 def	3.59±0.43 hij	1.85±0.17 cde
49	G49	34.00±2.65 h	7.68±0.62 def	3.33±0.33 jk	2.21±0.27 abcde
50	G50	35.67±6.81 gh	7.43±0.62 def	3.73±0.09 fghij	1.81±0.12 de

注:同列数据后小写字母不同表示差异显著($P<0.05$)
Note: Different small letters within the same column mean significant differences ($P<0.05$)

3 结论与讨论

小叶杨不同优树无性系的成活率均在 50% 以上,各无性系间存在显著差异,其中 T43、T42、G49、D31、T38、T35 成活率都达 80%,说明这些无性系对试验地的土壤条件和祁连县的气候环境有较高的适应性,且繁殖能力强。

通过对 50 个无性系生长指标的比较分析得出各无性系间的苗高与地径均具有显著差异,其中 T43、T42、S15、S3、S26 的苗高均高于 85 cm;无性系 T39、T43、T38、S21、S13、T42 地径显著大于其他无性系,说明这些无性系速生能力强。

通过对 50 个无性系叶片性状指标的比较分析后得出,各无性系间存在显著差异,叶量排序为 T43、T42、T39、T35、T40、S26;叶面积排序依次是 T42、T43、T36、T35、T39;叶长排序依次为 T42、T39、S21、T35、T36、T43;叶宽排序依次为 T43、S18、S10、T36、T35、S22。由此可知,这些无性系的生理活动要比其他无性系旺盛,且光合作用强,积累的有机物多,观赏价值高。

从成活率、生长指标和叶片性状指标的测定结果可以得出:T43 和 T42 号无性系的苗木成活率为 90.00% 和 86.67%,显著高于其他无性系,结合苗高、地径、叶量、叶面积、叶长、叶宽等指标筛选出 T43 和 T42 这 2 个小叶杨优良无性系,其适应性强、成活率高、速生繁殖能力强、观赏价值高,可作为

青海省绿化造林和重点育种对象。

此次试验由于时间等因素的影响,仅对各无性系进行了 1 年的生长特性研究,其生长性状是否稳定还需持续研究。该试验用无性系的苗高、地径、叶面积、叶量、叶长、叶宽等指标作为选优的依据,但仅以这些指标作为选优的评价指标略显单薄,应当结合苗木的光合特性以及根系生长性状、材性等指标,为无性系选优作出全面的评价。

参考文献

[1] 沈松,蔡伯阳,杨代忠,等. 杨树多品系区域造林试验[J]. 林业科技开发,2002,16(S1):44-46.
[2] 马成侠,杨桑吉,李媛娜. 干旱胁迫对不同小叶杨无性系生理特性的影响[J]. 青海大学学报,2019,37(5):15-19.
[3] 王燕,吕文,张卫东,等. 国内外小叶杨研究进展分析初报[J]. 林业科技通讯,2000(12):23-25.
[4] 王静洁. 青海省兴海县野生小叶杨资源调查与评价[J]. 安徽农业科学,2018,46(35):105-107.
[5] 刘建军. 青海省同德县野生小叶杨资源调查[J]. 陕西林业科技,2018(5):36-39.
[6] 张更权. 青海省祁连县野生小叶杨资源调查与评价[J]. 安徽农业科学,2018,46(30):134-136.
[7] 周国斌. 浅谈小叶杨良种扦插育苗技术[J]. 科技信息,2013(16):390.
[8] 殷光晶,陶雅琴,梁媛娜. 3 种小叶杨无性系田间栽培对比试验[J]. 安徽农业科学,2019,47(11):119-120,124.
[9] 刘彦彬,赵鹏华. 小叶杨栽培特性及造林应用[J]. 现代农村科技,2013(16):60.
[10] 梁媛娜. 小叶杨的优良特性和推广应用意见[J]. 青海农林科技,2017(3):31-32.

(上接第 137 页)

[25] HARTIG E I,ZHU S S,KING B L,et al. Cortisol-treated zebrafish embryos develop into pro-inflammatory adults with aberrant immune gene regulation[J]. Biology open,2016,5(8):1134-1141.
[26] HARBOE M,ULVUND G,VIEN L,et al. The quantitative role of alterna-

tive pathway amplification in classical pathway induced terminal complement activation[J]. Clinical and experimental immunology,2004,138(3):439-446.
[27] RODRÍGUEZ I,NOVOA B,FIGUERAS A. Immune response of zebrafish (*Danio rerio*) against a newly isolated bacterial pathogen *Aeromonas hydrophila*[J]. Fish Shellfish Immunol,2008,25(3):239-249.