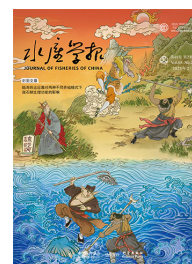


DOI: 10.11964/jfc.20221013748



## 罗氏沼虾胚胎发育过程中的转录组

黄光华<sup>1,2</sup>, 彭敏<sup>1,2</sup>, 杨春玲<sup>1,2</sup>, 冯鹏霏<sup>1,2</sup>, 曾地刚<sup>1,2</sup>,  
陈秀荔<sup>1,2</sup>, 刘青云<sup>1,3</sup>, 李强勇<sup>1,3</sup>, 张永德<sup>1,2</sup>, 朱威霖<sup>1,2</sup>,  
郁二蒙<sup>4</sup>, 赵永贞<sup>1,3\*</sup>

1. 广西壮族自治区水产科学研究院, 广西水产遗传育种与健康养殖重点实验室, 广西南宁 530021; 2. 广西壮族自治区水产科学研究院, 农业农村部中国(广西)-东盟水产种质资源综合开发与利用重点实验室(部省共建), 广西南宁 530021; 3. 广西壮族自治区水产科学研究院, 广西虾类繁育工程技术研究中心, 广西南宁 530021; 4. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东广州 510010

### 摘要:

**【目的】**为了探索罗氏沼虾胚胎发育的分子调控机制。

**【方法】**本研究对罗氏沼虾胚胎的卵裂期Ⅰ、卵裂期Ⅱ、囊胚期、原肠胚期、前无节幼体、无节幼体、前蚤状幼体、蚤状幼体 8 个发育阶段进行转录组测序。

**【结果】**本研究共得到 156.37 Gb clean data, 预测得到 22 964 个 unigenes。对罗氏沼虾 8 个不同发育阶段的胚胎样品的 unigenes 进行两两比较分析, 获得各个时期之间的差异表达基因数量为 587~8 620。对差异表达基因进行 GO 富集分析, 上调表达基因主要富集在与细胞发育、生长、运动相关的 GO 功能类别, 下调表达基因主要富集在与细胞的翻译调控、趋化、抗氧化、排毒活性相关的 GO 功能类别。KEEG 富集分析发现, 差异表达基因的 pathway 主要富集在与细胞的生长发育以及正常的生理生化过程相关的代谢途径。

**【结论】**本研究获得了罗氏沼虾胚胎的大量转录本信息, 发现了与胚胎发育相关的差异表达基因及其主要富集功能和途径, 为罗氏沼虾胚胎研究提供了有用的转录组信息资源。

**关键词:** 罗氏沼虾; 胚胎发育; 转录组; 基因表达

罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 是一种淡水虾类, 主要分布在热带和亚热带内陆水域中<sup>[1]</sup>。由于罗氏沼虾具有生长速率快、个体大、食性广、病害少、营养丰富、味美等特点, 已经成为很多亚洲国家的淡水养殖品种<sup>[2]</sup>。胚胎发育是罗氏沼虾生活史中最重要的阶段之一。近年来, 已经有一些关于罗氏沼虾胚胎发育相关的研究工作报道, 研究内容涉及胚胎发育的形态学<sup>[3]</sup>, 胚胎的主要消化酶和同工酶活性<sup>[4]</sup>, 胚胎发育初期可溶蛋白的组成及含量变化<sup>[5]</sup>, 胚胎发育过程中的脂类变化<sup>[6]</sup>, 以及温度对胚胎发育的影响<sup>[7]</sup>等。然而, 人们对罗氏沼虾胚胎发育过程中基因表达的研究很有限, 至今还缺乏罗氏沼虾胚胎的转录组信息。

第一作者: 黄光华, 从事罗氏沼虾良种选育研究, E-mail: 929536159@qq.com

通信作者: 赵永贞, 从事虾遗传育种研究, E-mail: fisher1152002@126.com



资助项目: 广西重点研发计划(桂 AB19245033); 国家现代农业产业技术体系(nycytxgxcxtd-14-01)

收稿日期: 2022-10-17

修回日期: 2023-02-13

文章编号:

1000-0615(2025)02-029105-09

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

作者声明本文无利益冲突

©《水产学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)  
Copyright © Editorial Office of Journal of Fisheries of China (CC BY-NC-ND 4.0)



转录组是细胞在某种状态下转录出来的所有 RNA 的总和, 通常包括信使 RNA (mRNA)、小 RNA (small RNA) 和非编码 RNA (ncRNA) 等<sup>[8-9]</sup>。随着高通量测序技术的快速发展, Illumina、454 焦磷酸测序、SOLiD、Oxford 纳米孔测序、PacBio 纳米孔测序等技术提供了快速、有效和高通量的转录组测序 (RNA sequencing) 工具<sup>[10]</sup>。与传统芯片技术相比, RNA 测序具有灵敏度高、分析范围广、成本低等优势, 能够高深度、灵敏可靠地分析基因表达量、基因结构和发掘新基因<sup>[11]</sup>。转录组测序技术已经被广泛应用在水产动物的研究中<sup>[12]</sup>。有关罗氏沼虾在病原体感染<sup>[13-15]</sup> 和不同环境因子暴露后<sup>[16-17]</sup> 的转录组测序研究工作已经有报道。然而至今还没有罗氏沼虾胚胎的转录组研究报道。

本研究采用 Illumina 转录组测序技术对罗氏沼虾胚胎发育的 8 个不同阶段进行转录组分析, 鉴定和注释与胚胎发育相关的基因, 并了解胚胎不同发育时期的基因表达变化情况, 为研究罗氏沼虾胚胎发育的分子调控机制提供转录组信息资源和参考。

## 1 材料与方法

本研究获得了广西壮族自治区水产科学研究院实验动物管理和使用伦理委员会批准 (审批号: GAFS2023005), 实验过程中操作人员严格按照广西壮族自治区水产科学研究院实验动物管理和使用伦理委员会制定的规章制度执行。

### 1.1 实验材料

罗氏沼虾由广西水产科学研究院罗氏沼虾养殖场提供。罗氏沼虾亲虾正常交配后, 将 30 尾雌虾 [平均体长 (15.22±0.23) cm, 平均体重 (120.05±1.64) g] 转移到 3 m×1 m×1 m 室内水池中饲养, 水温保持在 28 °C, 盐度 15, 每日投喂饲料 2 次。受精卵开始发育后, 每天随机取 1 尾雌虾, 用镊子从抱卵亲虾上取少许受精卵置于载玻片上, 加少许水用吸管缓缓打散, 在体视解剖镜 (OLYMPUS SZX16) 和显微镜 (OLYMPUS CX23) 下观察, 放大倍数为 4~10 倍, 根据文献的方法<sup>[3]</sup> 划分不同的胚胎发育阶段, 每个发育阶段取 3 份胚胎 (分别取自 3 尾雌虾) 样品放入液氮中保存。

### 1.2 RNA 提取

首先, 将胚胎样品放入研钵中, 加入液氮,

快速研磨成粉末。然后将粉末放入离心管中, 向其中加入 Trizol 试剂 (Invitrogen, 美国), 根据说明书的步骤进行处理, 提取总 RNA。使用 DNase I (Invitrogen, 美国) 除去潜在的残留污染 DNA。使用 1.3% 琼脂糖凝胶电泳评估 RNA 完整性, 并使用分光光度计 (nanodrop, 美国) 测定 RNA 浓度。

### 1.3 构建 cDNA 文库

构建测序文库包括以下步骤: ①使用带有寡核苷酸 (dT) 的磁珠收集和纯化总 RNA 中的 mRNA。②用片段化缓冲液将 mRNA 随机片段化。③以 mRNAs 为模板, 使用随机六聚体引物合成第一条 cDNA 链, 然后加入 dNTP、DNA 聚合酶 I、RNase H 和缓冲液合成第二条 cDNA 链, 并使用 Ampure XP 珠子纯化双链 cDNA。④对纯化的 cDNA 进行末端修复, 添加尾部, 连接测序接头, 并使用 Ampure XP 珠子选择长度约为 300 bp 的片段。⑤最后通过 PCR 扩增得到 cDNA 文库。

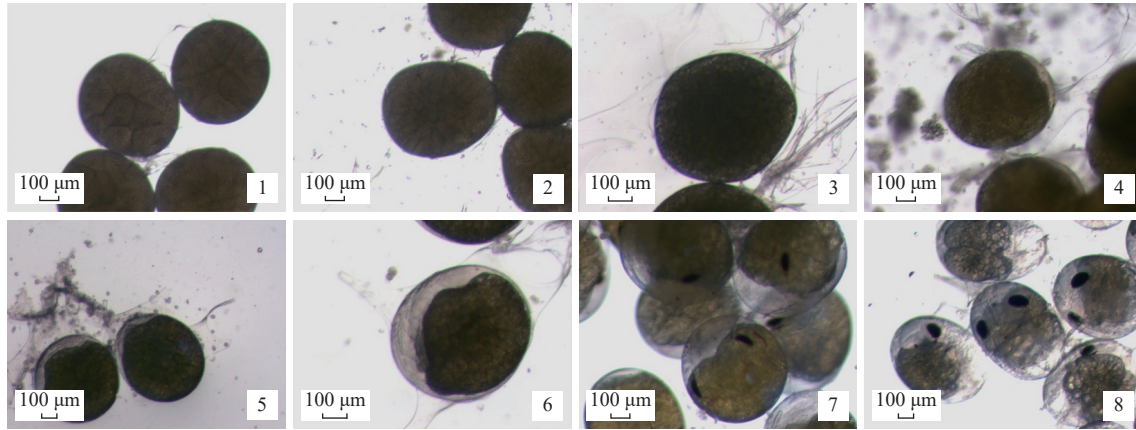
### 1.4 cDNA 文库测序和数据分析

在 Illumina HiSeq X10 平台上对文库进行测序, 以生成 150 bp 的双末端 reads, 删除接头序列和低质量 reads, 留下 clean reads 以供进一步分析。首先, 使用 hisat2 软件<sup>[18]</sup> 将 clean reads 与罗氏沼虾基因组 (NCBI 登录号: JANFXF000000000) 进行匹配, 并使用 Stringtie 软件<sup>[19]</sup> 组装匹配的 clean reads。然后将基因与 GO、KEGG、Pfam、Swiss-Prot、eggNOG、NR、COG 数据库匹配进行功能注释。随后使用 Stringtie 软件的最大流量算法计算基因表达量。用 FKPM 量化基因表达水平, 计算样本组之间的差异表达水平。然后使用 deseq2 软件<sup>[20]</sup> 鉴定两组之间的差异表达基因。差异表达基因的筛选标准: 基因表达水平差异倍数 ≥2 和错误发现率 (FDR) < 0.01。用 Spearman 相关系数 (r) 评估生物学重复之间的对应关系。

## 2 结果

### 2.1 罗氏沼虾胚胎的显微观察、样品采集和 RNA 提取

在罗氏沼虾的受精卵发育期间, 用解剖镜和显微镜观察胚胎发育期 (图版), 根据文献的方法<sup>[3]</sup> 将发育期划分为卵裂期 I、卵裂期 II、



图版 罗氏沼虾胚胎发育显微照片

(a) 卵裂期 I, (b) 卵裂期 II, (c) 囊胚期, (d) 原肠胚期, (e) 前无节幼体, (f) 无节幼体, (g) 前蚤状幼体, (h) 蚤状幼体, 下同。

### Plate Micrograph of embryonic development of *M. rosenbergii*

(a) cleavage stage I, (b) cleavage stage II, (c) blastocyst stage, (d) gastrula stage, (e) pre-nauplii, (f) nauplii, (g) pre-flea larvae, (h) flea larvae, the same below.

囊胚期、原肠胚期、前无节幼体、无节幼体、前蚤状幼体、蚤状幼体8个阶段, 胚胎的细胞结构显微形态与文献<sup>[3]</sup>的描述基本一致。每个阶段取3份胚胎样品, 一共24份样品, 提取RNA。电泳结果表明提取的RNA完整性好、无污染, 符合构建cDNA文库的要求。

## 2.2 转录组测序和基因注释

提取的RNA样品经过mRNA分离纯化后, 构建cDNA文库, 再进行Illumina高通量测序。测序获得的原始数据经过质量控制, 共得到156.37 Gb clean data (包含522 609 342条clean reads), 平均每个样品的clean data为6.07 Gb, 各样品的平均Q30碱基百分比(质量值大于或等于30的碱基所占的百分比)都超过94.23%, 表明测序的质量很好。测序数据已提交至NCBI的SRA数据库(登录号: PRJNA890910)。

将各样品的Clean Reads与罗氏沼虾基因组(NCBI登录号: JANFXF000000000)进行序列比对, 匹配率为86.75%~93.03%。基于比对结果预测得到22 964个unigenes。将unigenes与Swiss-Prot、eggNOG、GO、KEGG、NR、Pfam、COG数据库进行比对, 分别有7 583、16 142、17 187、16 726、18 594、18 431、4 469个unigenes得到注释, 在这7个数据库中单独得到注释的unigenes数量分别为10、40、48、529、903、969、18个, 在7个数据库中都被注释的unigenes有2 630个(图1)。物种同源性

分析显示, 罗氏沼虾的unigenes与NR数据库中的凡纳滨对虾同源序列比例最高, 达到10.22%, 其次是与海七鳃鳗的同源序列比例, 为3.19%(图2)。

## 2.3 罗氏沼虾胚胎不同发育阶段的差异表达基因及GO、pathway富集

对罗氏沼虾8个不同时期的胚胎转录组测序获得的unigenes集进行两两比较分析, 根据基因表达水平差异倍数 $\geq 2$ 和错误发现率(FDR) $< 0.01$ 的阈值获得各时期之间的差异表达基因。各时期之间的差异表达基因数量为587~8 620, 一般地, 两个不同时期之间的时间间隔越长, 差异表达基因的数量越大, 而且大多数时期上调表达基因的数量大于下调表达基因的数量(图2)。

对差异表达基因进行GO富集分析, 并根据GO富集的频率绘制热图(图3), 发现上调表达基因较多地富集在化学排斥活性、金属伴侣活性、电子载体活性、细胞杀伤、趋化活性、形态发生素活性、涉及化学突触传递的突触前过程、突触、细胞连接、生物黏附、运动、信号传递、周期过程、突触部分、生长、行为等GO分类功能, 这些功能大多数与细胞发育、生长、运动相关。

下调表达基因主要富集在翻译调控活性、蛋白质标签、类核素、金属伴侣活性、趋化活性、电子载体活性、抗氧化活性、排毒等GO

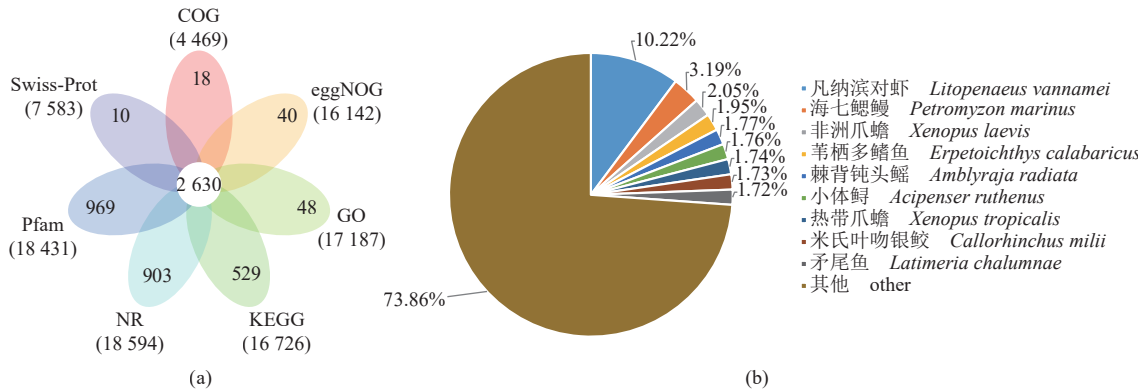


图 1 罗氏沼虾胚胎转录组基因注释的统计

(a) 在不同数据库中注释的基因数量的花瓣图, 数据库名称下方括号中的数字表示在该数据库中得到注释的基因数, 花瓣中的数字表示单独在该数据库中得到注释的基因数; (b) 在 Nr 数据库中注释的基因的同源物种分布比例。

Fig. 1 Statistics of gene annotation of embryonic transcriptome of *M. rosenbergii*

(a) petal map of the number of genes annotated in different databases. The number in brackets below the database name represents the number of genes annotated in the database, and the number in petals represents the number of genes annotated in the database alone; (b) distribution proportion of homologous species of genes annotated in Nr database.

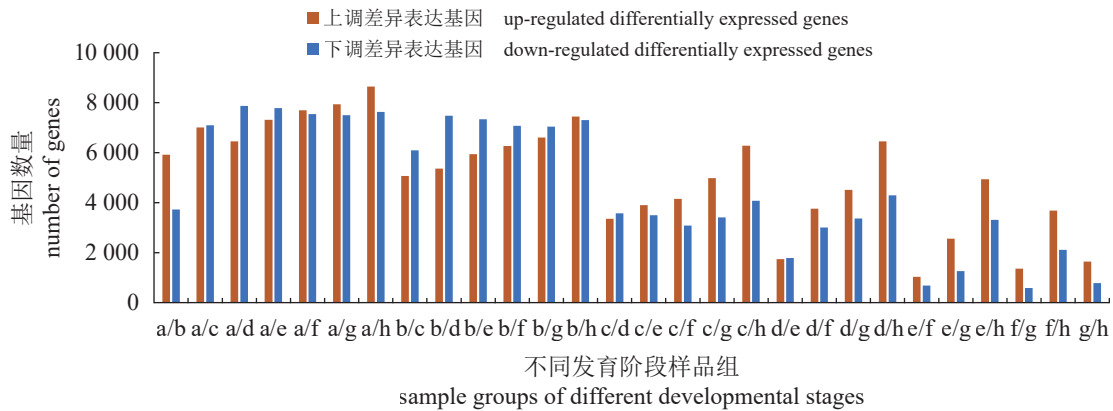


图 2 罗氏沼虾胚胎不同发育阶段样品两两比较的差异表达基因数量

a, b, c, d, e, f, g, h 分别代表卵裂期 I, 卵裂期 II, 囊胚期, 原肠胚期, 前无节幼体, 无节幼体, 前蚤状幼体, 蚤状幼体。a/b 表示 b 组与 a 组对比获得的差异表达基因, 其余类推, 下同。

Fig. 2 Numbers of pairwise comparison of differentially expressed genes in samples at different developmental stages of *M. rosenbergii* embryos

a, b, c, d, e, f, g, and h represent cleavage stage I, cleavage stage II, blastocyst stage, gastrula stage, pre-nauplii, nauplii, pre-flea larvae, and flea larvae, respectively. a/b represents differentially expressed genes obtained by comparing group b with group a, and so on, the same below.

分类功能 (图 4), 这些功能主要与细胞的翻译调控、趋化、抗氧化、排毒活性等功能相关。

对差异表达基因进行 KEGG 富集分析, 并根据 pathway 富集的频率绘制热图, 发现上调表达基因较多地富集在溶酶体、噬菌体、核糖体、神经活性配体受体相互作用、嘌呤代谢、RNA 转运等代谢途径 (图 5, 显示富集最多的 30 个 pathway), 它们与细胞的生长发育以及正常的生理生化过程密切相关。

下调表达基因主要富集在内分泌细胞增生、溶酶体、自噬-动物、内质网中的蛋白质加工、

赖氨酸降解、RNA 转运等代谢途径 (图 6, 显示富集最多的 30 个 pathway), 这些代谢途径同样也与细胞的生长发育以及正常的生理生化过程密切相关。

### 3 讨论

胚胎发育是罗氏沼虾生长发育中重要的过程。然而在人工培养过程中, 经常出现罗氏沼虾幼体死于胚胎发育异常的情况, 造成了育苗生产的严重经济损失<sup>[21]</sup>。转录组研究有助于理

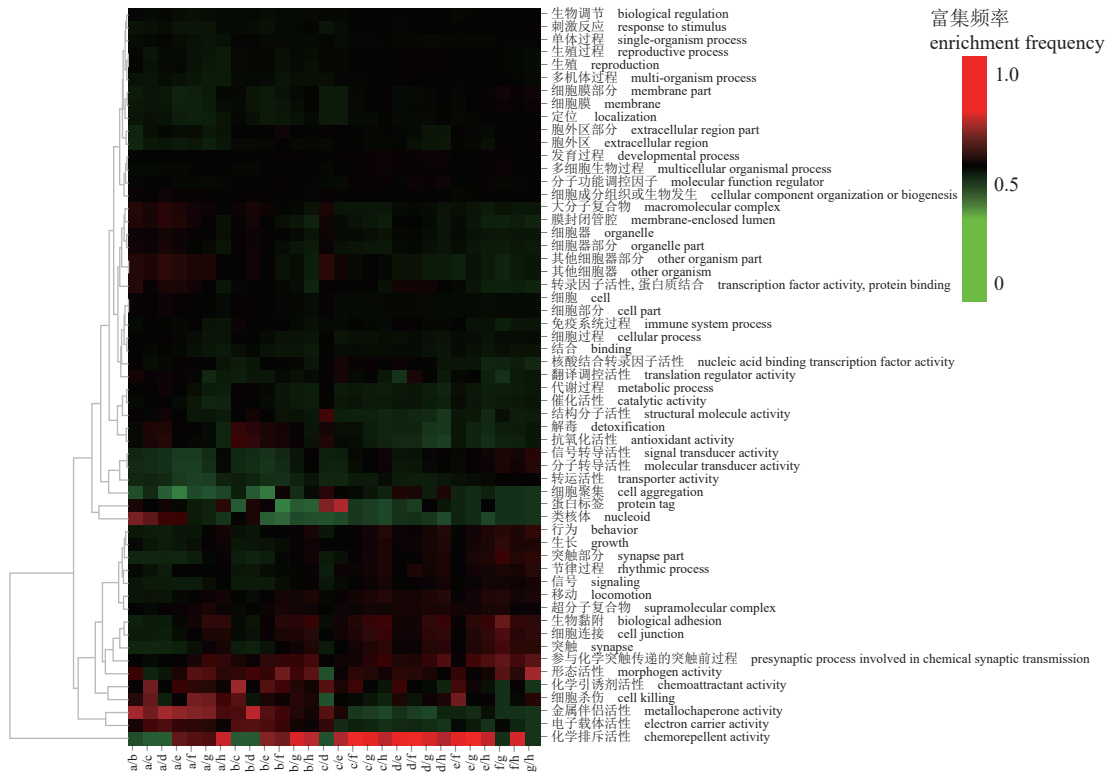


图 3 罗氏沼虾胚胎不同发育阶段样品两两比较的上调表达基因 GO 功能富集热图

Fig. 3 Heat map of GO function enrichment of up-regulated genes in pairwise comparison of samples at different developmental stages of *M. rosenbergii* embryos

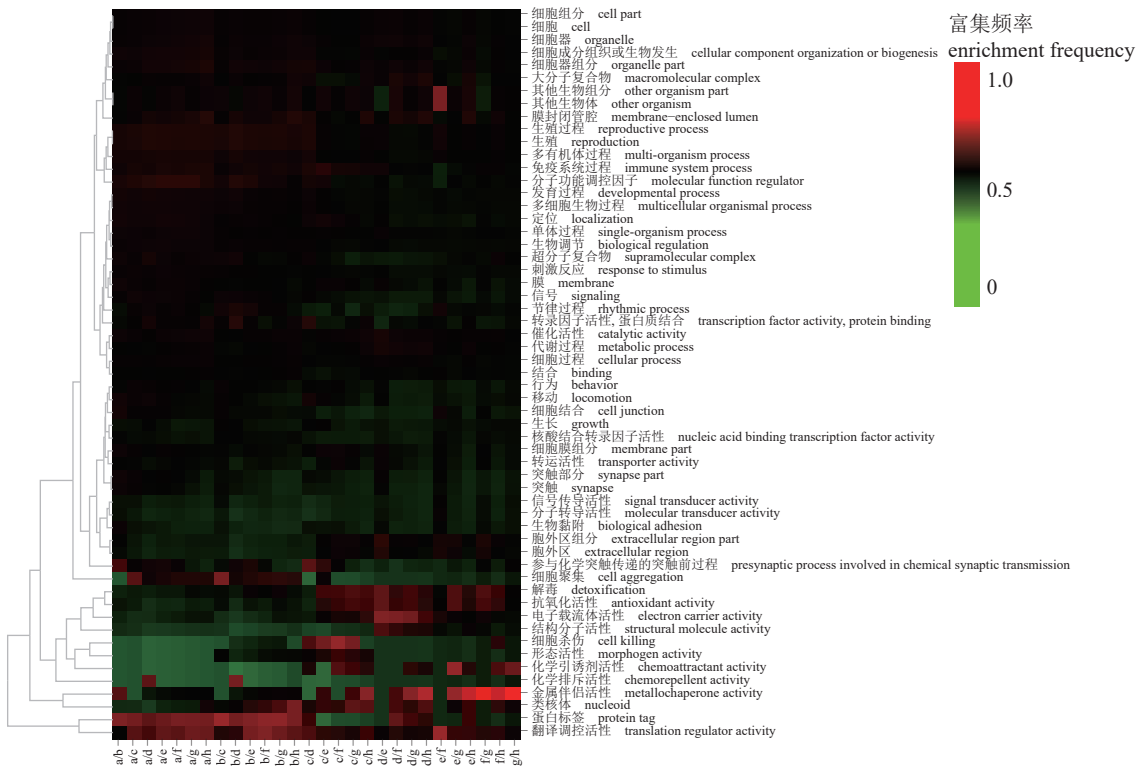


图 4 罗氏沼虾胚胎不同发育阶段样品两两比较的下调表达基因 GO 功能富集热图

Fig. 4 Heat map of GO function enrichment of down-regulated genes in pairwise comparison of samples at different developmental stages of *M. rosenbergii* embryos

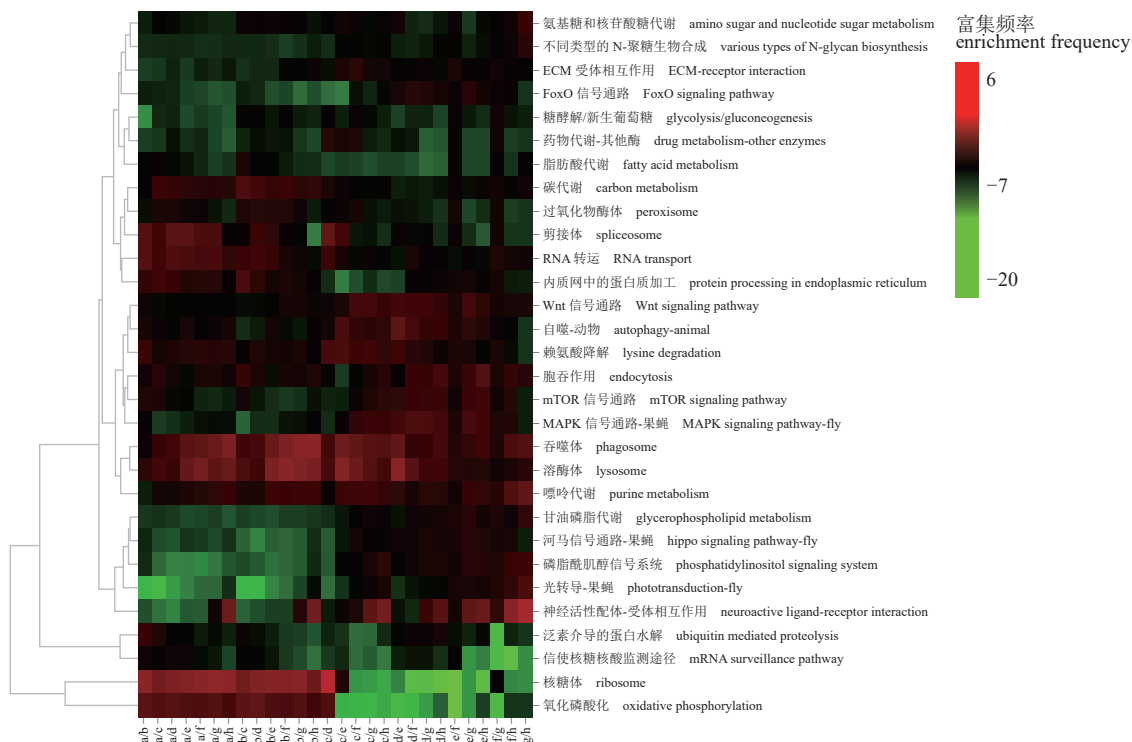


图 5 罗氏沼虾胚胎不同发育阶段样品两两比较的上调表达基因 pathway 富集热图

Fig. 5 Heat map of pathways enrichment of up-regulated genes in pairwise comparison of samples at different developmental stages of *M. rosenbergii* embryos

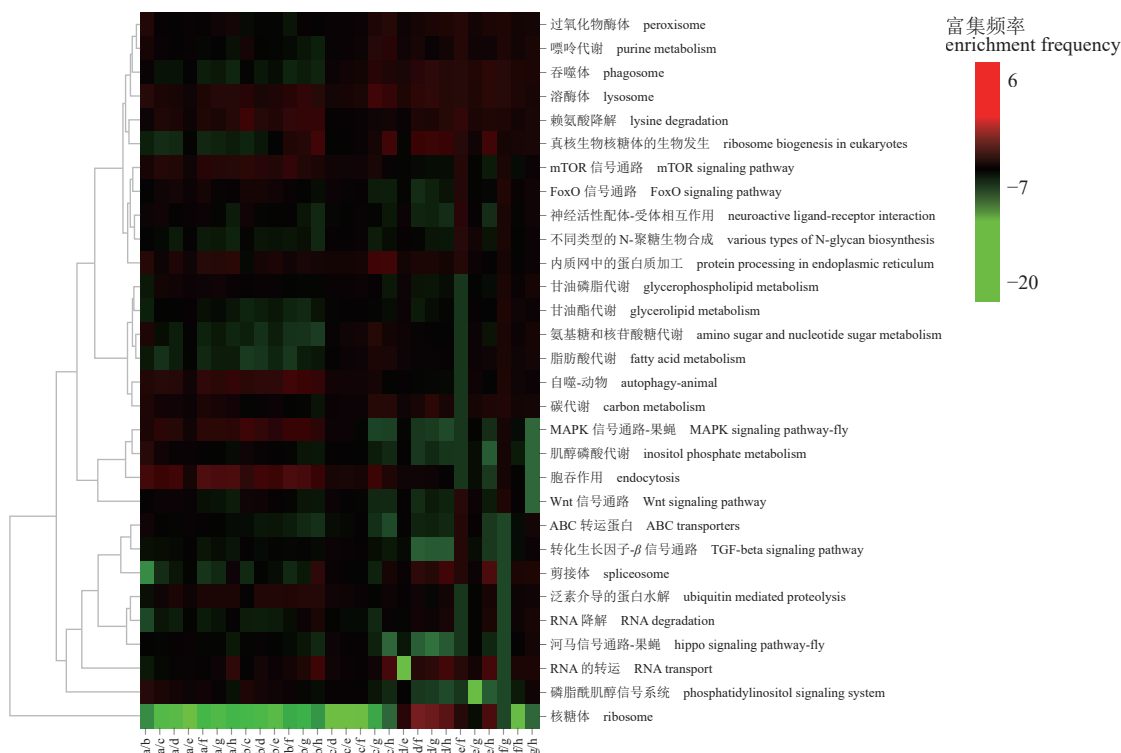


图 6 罗氏沼虾胚胎不同发育阶段样品两两比较的下调表达基因 pathway 富集热图

Fig. 6 Heat map of pathways enrichment of down-regulated genes in pairwise comparison of samples at different developmental stages of *M. rosenbergii* embryos

解胚胎发育的分子机制, 对于研究罗氏沼虾胚胎发育和指导育苗生产有重要的意义。然而, 目前还没有罗氏沼虾胚胎的转录组研究报道。

为了进行罗氏沼虾胚胎的转录组测序, 本研究连续采集了罗氏沼虾胚胎不同发育时间的样品, 通过显微观察, 根据文献把它们分为卵裂期 I、卵裂期 II、囊胚期、原肠胚期、前无节幼体、无节幼体、前蚤状幼体、蚤状幼体 8 个阶段<sup>[3]</sup>。罗氏沼虾是以抱卵的方式进行胚胎发育的, 罗氏沼虾的抱卵数大约为几千粒到数万粒, 在 28 °C 的水温其胚胎发育时间约为 20 d。因此, 罗氏沼虾胚胎的采集和发育阶段的划分相对比较容易, 实验通过显微镜观察到的罗氏沼虾胚胎发育的形态也和文献<sup>[3]</sup>的描述基本一致。Illumina 高通量测序技术是一个功能强大的发现新基因和研究基因表达模式的方法<sup>[22]</sup>。本研究使用了 Illumina 测序来研究罗氏沼虾胚胎不同发育阶段的转录组差异。共鉴定了 22 964 个 unigenes, 数量明显少于其他一些文献报道的成年罗氏沼虾组织的转录组测序获得的 unigenes 数量 (59 050~96 362)<sup>[23-26]</sup>, 其主要原因可能是其他文献报道的转录组测序没有将 clean reads 与罗氏沼虾的基因组进行比对, 另一方面原因可能是胚胎的基因表达量比成年罗氏沼虾组织少, 因此检测到的转录本相对较少。将获得的 unigenes 与 Swiss-Prot、eggNOG、GO、KEGG、NR、Pfam、COG 数据库进行比对, 大多数的 unigenes 得到了注释。物种同源性分析显示, 罗氏沼虾的 unigenes 与 NR 数据库中的凡纳滨对虾同源序列比例最高, 达到 10.22%, 说明这两个物种的亲缘关系比较接近。

本研究对罗氏沼虾胚胎 8 个不同时期的转录组进行两两比较, 获得了各比较组之间的差异表达基因。分析发现不同发育阶段的基因表达差异较大, 上调表达和下调表达基因的数量都较大, 差异表达基因数量为 587~8 620, 说明随着胚胎发育的进程, 有一部分基因的表达逐渐增加, 而有一部分基因的表达逐渐减少。随后实验对差异表达基因进行 GO 富集分析。GO 是一个标准化的基因功能分类系统, 它提供了一个动态更新的功能类别和严格定义的分类术语, 全面描述生物组织的基因及其产物的性质<sup>[27]</sup>。为了探索罗氏沼虾胚胎不同发育阶段转录组代表的功能类别的概况, 本研究用 GO 来分类各个阶段差异表达基因的功能。研究发现

上调表达基因较多地富集在与细胞发育、生长、运动相关的 GO 功能类别, 这可能是由于胚胎从受精卵发育成蚤状幼体的过程中, 细胞在不断分裂生长, 各组织的机能逐渐形成和完善, 因此与细胞生长发育以及运动相关的基因逐渐表达。而下调表达基因主要富集在与细胞的翻译调控、趋化、抗氧化、排毒活性等功能相关的 GO 功能类别, 随着胚胎的发育, 这些功能在细胞中的活跃程度逐渐降低。本研究还对差异表达基因进行 pathway 富集分析。结果显示差异表达基因较多地富集在与细胞的生长发育以及正常的生理生化过程相关的代谢途径, 说明随着胚胎的不断发育, 这些代谢过程的活跃程度的差异比较大。

胚胎发育是多细胞生物个体生命活动的起点, 通过对罗氏沼虾胚胎发育的转录组测序, 获得了大量的胚胎转录本信息, 为今后进一步研究罗氏沼虾胚胎的发育生物学和生理学奠定了基础。

#### 参考文献 (References):

- [1] Wowor D, Muthu V, Meier R, et al. Evolution of life history traits in Asian freshwater prawns of the genus *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) based on multilocus molecular phylogenetic analysis[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2009, 52(2): 340-350.
- [2] 陈雪峰, 王春琳, 李荣华, 等. 罗氏沼虾转录组 SSR 标记筛选及其与体质量相关性分析 [J]. *水生生物学报*, 2022, 46(8): 1150-1159.  
Chen X F, Wang C L, Li R H, et al. Screening of transcriptome SSR marker of *Macrobrachium rosenbergii* and analysis of its correlation with body weight[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2022, 46(8): 1150-1159 (in Chinese).
- [3] 赵云龙, 王群, 堵南山, 等. 罗氏沼虾胚胎发育的研究: I. 胚胎外部结构形态发生 [J]. *动物学报*, 1998, 44(3): 249-256.  
Zhao Y L, Wang Q, Du N S, et al. Embryonic development of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (Crustacea: Decapoda): I. Morphogenesis of external structures of embryo[J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1998, 44(3): 249-256 (in Chinese).
- [4] 姚俊杰, 赵云龙. 罗氏沼虾胚胎发育期主要消化酶和同工酶特性 [J]. *水产科学*, 2006, 25(12): 595-600.  
Yao J J, Zhao Y L. Characteristics of several digestive enzymes and isozyme during embryonic development in prawn, *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Fisheries Science*, 2006, 25(12): 595-600 (in Chinese).

- [5] 姚俊杰, 赵云龙, 周忠良, 等. 两种沼虾胚胎发育中可溶蛋白的组成及含量变化 [J]. 动物学杂志, 2006, 41(2): 9-14.  
Yao J J, Zhao Y L, Zhou Z L, *et al.* Variation in soluble protein composition and content during embryonic development of two kinds of prawns[J]. Chinese Journal of Zoology, 2006, 41(2): 9-14 (in Chinese).
- [6] 姚俊杰, 赵云龙. 罗氏沼虾胚胎发育过程中的脂类变化 [J]. 华东师范大学学报 (自然科学版), 2006(4): 103-109.  
Yao J J, Zhao Y L. Changes of lipid content and fatty acid composition during embryonic development of *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Journal of East China Normal University (Natural Science Edition), 2006(4): 103-109 (in Chinese).
- [7] 徐慈浩, 肖锐媛, 木亮亮, 等. 罗氏沼虾胚胎发育观察及温度对胚胎发育的影响 [J]. 广东农业科学, 2015, 42(20): 112-117.  
Xu C H, Xiao R Y, Mu L L, *et al.* Observation on development of *Macrobrachium rosenbergii* embryos and influence of temperature on embryonic development[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2015, 42(20): 112-117 (in Chinese).
- [8] 张春兰, 秦孜娟, 王桂芝, 等. 转录组与 RNA-Seq 技术 [J]. 生物技术通报, 2012(12): 51-56.  
Zhang C L, Qin Z J, Wang G Z, *et al.* Transcriptome and RNA-Seq technology[J] Biotechnology Bulletin, 2012(12): 51-56 (in Chinese).
- [9] Reuter J A, Spacek D V, Snyder M P. High-throughput sequencing technologies[J]. Molecular Cell, 2015, 21;58(4): 586-597.
- [10] Ambardar S, Gupta R, Trakroo D, *et al.* High throughput sequencing: an overview of sequencing chemistry[J]. Indian Journal of Microbiology, 2016, 56(4): 394-404.
- [11] Liu L, Li Y H, Li S L, *et al.* Comparison of next-generation sequencing systems[J]. BioMed Research International, 2012, 2012: 251364.
- [12] Tan M P, Wong L L, Razali S A, *et al.* Applications of next-generation sequencing technologies and computational tools in molecular evolution and aquatic animals conservation studies: a short review[J]. Evolutionary Bioinformatics, 2019, 15: 1176934319892284.
- [13] Ou J T, Chen H, Liu Q, *et al.* Integrated transcriptome analysis of immune-related mRNAs and microRNAs in *Macrobrachium rosenbergii* infected with *Spiroplasma eriocheiris*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2021, 119: 651-669.
- [14] Gao X J, Jiang Z Y, Zhang S M, *et al.* Transcriptome analysis and immune-related genes expression reveals the immune responses of *Macrobrachium rosenbergii* infected by *Enterobacter cloacae*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 101: 66-77.
- [15] Rao R, Bhassu S, Bing R Z Y, *et al.* A transcriptome study on *Macrobrachium rosenbergii* hepatopancreas experimentally challenged with white spot syndrome virus (WSSV)[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2016, 136: 10-22.
- [16] Guo H, Deng M Y, Liang J R, *et al.* Gill transcriptome alterations in *Macrobrachium rosenbergii* under copper exposure[J]. Chemosphere, 2019, 233: 796-808.
- [17] Liu X, Jiang H C, Ye B Q, *et al.* Comparative transcriptome analysis of the gills and hepatopancreas from *Macrobrachium rosenbergii* exposed to the heavy metal cadmium (Cd<sup>2+</sup>)[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 16140.
- [18] Kim D, Langmead B, Salzberg S L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements[J]. Nature Methods, 2015, 12(4): 357-360.
- [19] Perteu M, Perteu G M, Antonescu C M, *et al.* StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads[J]. Nature Biotechnology, 2015, 33(3): 290-295.
- [20] 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.
- [21] 叶星, 祁宝伦, 潘德博. 广东罗氏沼虾育苗中幼体大量死亡原因初探 [J]. 中国水产科学, 1998, 5(3): 119-121.  
Ye X, Qi B L, Pan D B. A preliminary study on the mass mortality of *Macrobrachium rosenbergii* larvae in Guangdong[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 1998, 5(3): 119-121 (in Chinese).
- [22] Hosseini P, Tremblay A, Matthews B F, *et al.* An efficient annotation and gene-expression derivation tool for Illumina Solexa datasets[J]. BMC Research Notes, 2010, 3: 183.
- [23] Rao R, Zhu Y B, Alinejad T, *et al.* RNA-seq analysis of *Macrobrachium rosenbergii* hepatopancreas in response to *Vibrio parahaemolyticus* infection[J]. Gut Pathogens, 2015, 7: 6.
- [24] Pasookhush P, Hindmarch C, Sithigorngul P, *et al.* Transcriptomic analysis of *Macrobrachium rosenbergii* (giant fresh water prawn) post-larvae in response to *M. rosenbergii* nodavirus (MrNV) infection: de novo assembly and functional annotation[J]. BMC Genomics, 2019, 20(1): 762.
- [25] Ding Z F, Jin M, Ren Q. Transcriptome analysis of *Macrobrachium rosenbergii* intestines under the white spot syndrome virus and poly (I: C) challenges[J]. PLoS One, 2018, 13(9): e0204626.
- [26] Cao J, Wu L, Jin M, *et al.* Transcriptome profiling of the *Macrobrachium rosenbergii* lymphoid organ under the white spot syndrome virus challenge[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 67: 27-39.
- [27] Ye J, Fang L, Zheng H K, *et al.* WEGO: a web tool for plotting GO annotations[J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(S2): 293-297.



## Transcriptome analysis during the development of *Macrobrachium rosenbergii* embryos

HUANG Guanghua<sup>1,2</sup>, PENG Min<sup>1,2</sup>, YANG Chunling<sup>1,2</sup>, FENG Pengfei<sup>1,2</sup>, ZENG Digang<sup>1,2</sup>,  
CHEN Xiuli<sup>1,2</sup>, LIU Qingyun<sup>1,3</sup>, LI Qiangyong<sup>1,3</sup>, ZHANG Yongde<sup>1,2</sup>,  
ZHU Weilin<sup>1,2</sup>, YU Ermeng<sup>4</sup>, ZHAO Yongzhen<sup>1,3\*</sup>

1. Guangxi Key Laboratory of Aquatic Genetic Breeding and Healthy Aquaculture,  
Guangxi Academy of Fishery Sciences, Nanning 530021, China;

2. Key Laboratory of Comprehensive Development and Utilization of Aquatic Germplasm Resources of China (Guangxi) and  
ASEAN (Co-construction by Ministry and Province), Ministry of Agriculture and Rural Affairs,  
Guangxi Academy of Fisheries Sciences, Nanning 530021, China;

3. Guangxi Shrimp Breeding Engineering Technology Research Center,  
Guangxi Academy of Fisheries Sciences, Nanning 530021, China;

4. Chinese Academy of Fishery Sciences, Pearl River Fisheries Research Institute, Guangzhou 510010, China

**Abstract:** Transcriptome sequencing was performed on eight developmental stages of *Macrobrachium rosenbergii* embryos, including cleavage stage I, cleavage stage II, blastocyst stage, gastrula stage, naupliusproprionalis, naupliusproprionalis, and flea like larva to explore the molecular regulatory mechanism of embryonic development of *M. rosenbergii*. A total of 156.37 Gb clean data was obtained, and 22 964 unigenes were predicted. A two-by-two comparative analysis of the embryonic samples from eight developmental stages of *M. rosenbergii* was performed, and the number of differentially expressed genes in eight embryonic samples of *M. rosenbergii* at different development stages were between 587 and 8 620. GO enrichment analysis of differentially expressed genes showed that up-regulated expressed genes were mainly enriched in GO functional categories related to cell development, growth, and motility. Meanwhile, the down-regulated expressed genes were mainly enriched in GO functional categories related to translational regulation, chemotaxis, antioxidant, and detoxification activities of cells. KEEG enrichment analysis found that differentially expressed genes pathways were mainly enriched in metabolic pathways related to cell growth and normal physiological and biochemical processes. This study obtained a large amount of transcriptome information on *M. rosenbergii* embryo and discovered differentially expressed genes related to embryonic development and their main enrichment functions and pathways, providing useful transcriptome resources for the embryo research of *M. rosenbergii*.

**Key words:** *Macrobrachium rosenbergii*; embryonic development; transcriptome; gene expression

**Corresponding author:** ZHAO Yongzhen. E-mail: [fisher1152002@126.com](mailto:fisher1152002@126.com)

**Funding projects:** Guangxi Key R & D Plan Project (Guangxi AB19245033); Guangxi Innovation Team Project of National Modern Agricultural Industrial Technology System (nycytxgxcxtd-14-01)