



## 巨须裂腹鱼水霉菌的分离鉴定及其对脾脏转录组的影响

孔庆辉<sup>1</sup>, 刘海平<sup>2</sup>, 刘锁珠<sup>1,3</sup>, 索朗斯珠<sup>1</sup>,  
徐业芬<sup>1</sup>, 赵晓玲<sup>1</sup>, 商振达<sup>1,3\*</sup>

(1. 西藏农牧学院动物科学学院, 西藏自治区 林芝 860000;

2. 西藏自治区农牧科学院水产科学研究所, 西藏自治区 拉萨 850002;

3. 西藏农牧学院, 西藏高原饲料加工工程研究中心, 西藏自治区 林芝 860000)

**摘要:** 为分析感染水霉菌对巨须裂腹鱼脾脏转录组的影响, 探索水霉菌感染巨须裂腹鱼的分子机制, 实验随机选取生活在同一水域中的 5 尾健康和 5 尾感染水霉菌的巨须裂腹鱼, 采用 PDA 琼脂培养基和分子生物学方法对巨须裂腹鱼水霉菌进行分离鉴定, 并采用 Illumina HiSeqTM 2000 高通量测序平台, 对健康和感染水霉菌的巨须裂腹鱼脾脏组织进行转录组测序, 并对测序数据进行拼接、注释和差异表达基因分析。结果显示, 从巨须裂腹鱼皮肤上分离鉴定得到 3 株水霉菌; 转录组数据显示, 健康组和感染水霉菌组分别获得 46 619 504 条和 43 912 876 条数据, 与健康组相比, 感染水霉菌组共有 1 889 个基因发生差异表达, 其中 1 414 个基因上调, 475 个基因下调, 随机选取 6 个差异表达基因进行实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 验证, 验证结果与转录组测序一致。对健康组和感染水霉菌组的差异表达基因进行 GO 功能富集发现, 上调基因主要富集于 241 个功能中, 下调基因主要富集于 60 个功能中, 上述基因主要涉及分子功能类、细胞组分类和生物过程类等生理功能; KEGG 通路富集分析发现, 差异表达基因主要富集在免疫疾病、内分泌和代谢疾病、病毒感染性疾病、消化系统及排泄系统等。研究表明, 感染水霉菌会影响巨须裂腹鱼脾脏组织多种基因的表达量, 实验结果为进一步探索巨须裂腹鱼水霉菌的感染机制奠定了基础。  
**关键词:** 巨须裂腹鱼; 水霉菌; 转录组测序; 脾脏组织; 差异表达基因

中图分类号: S 941.4

文献标志码: A

水霉属 (*Saprolegnia*) 隶属于茸鞭生物界 (Stramenopila) 卵菌门 (Oomycota), 而非传统上认为的真菌界 (Fungi)<sup>[1]</sup>。本属的大多数成员是腐生菌, 其中某些物种可能对鱼类具有致病性<sup>[2]</sup>。水霉病发病地域范围广, 感染的淡水鱼品种多<sup>[3-4]</sup>, 可以造成水生动物游动失常、食欲减退、身体消瘦、最终因体力衰竭而死亡<sup>[5]</sup>, 给淡水养殖造成了严重危害。其感染特征主要是在鱼卵或鱼的皮肤上

出现白色或灰色的棉状簇, 且会扩散并覆盖整个鱼体的 80%<sup>[3]</sup>。感染后可引起表皮破坏, 菌丝可到达皮肤下面的组织<sup>[6]</sup>和血管<sup>[7]</sup>, 导致渗透调节受损。感染后也会导致呼吸衰竭、行为的改变(包括嗜睡和失去平衡), 感染严重时会导致鱼死亡<sup>[2]</sup>。采用转录组测序 (RNA-Seq) 技术能够监测到巨须裂腹鱼 (*Schizothorax macropogon*) 感染水霉菌后免疫组织关键基因转录水平的变化趋势, 从整体水

收稿日期: 2021-06-05 修回日期: 2021-12-21

资助项目: 西藏自治区重点研发及转化计划项目 (XZ202001ZY0016N); 西藏高原饲料加工工程研究中心项目 (XZJYT2018GCZX)

第一作者: 孔庆辉 (照片), 从事高原动物适应生理学研究, E-mail: 770337011@qq.com

通信作者: 商振达, 从事高原动物营养学研究, E-mail: 446809464@qq.com



平研究基因功能结构和探索生物代谢途径。

巨须裂腹鱼为辐鳍鱼纲(Actinopterygii)鲤形目(Cypriniformes)鲤科(Cyprinidae)裂腹鱼属(*Schizothorax*)的一种鱼类<sup>[8]</sup>。主要分布于西藏自治区的雅鲁藏布江及其支流中,是青藏高原特有的经济鱼种和土著鱼种之一<sup>[9]</sup>,对高原河流生态平衡具有重要的保护价值。巨须裂腹鱼具有生长速率较慢、性成熟较晚、生命周期较长、繁殖力较低等<sup>[10-11]</sup>多种生物学特性。但近些年,由于生物入侵、过度捕捞、环境污染等因素,导致其生存环境发生变化,种群数量锐减,研究巨须裂腹鱼的人工养殖技术具有重要意义。但巨须裂腹鱼在人工养殖过程中,常常因捕捞方法的不当和养殖环境的变化而感染水霉菌,导致死亡率增高。对高原鱼类水霉病的相关报道较少,与水霉感染相关基因表达和调控的研究尚未见,对其发病机制尚不明确。因此,本实验对健康和感染水霉菌的巨须裂腹鱼进行转录组测序分析,揭示水霉菌对巨须裂腹鱼脾脏组织基因表达的影响,筛选出巨须裂腹鱼免疫和生长相关基因,为初步探索水霉菌的感染机制奠定基础,为西藏地区鱼类的抗病育种和健康养殖提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本实验所用巨须裂腹鱼采自西藏自治区农牧科学院水产研究所冷水鱼养殖基地,选取体重约0.3 kg的健康和感染水霉菌的巨须裂腹鱼各5尾(感染水霉菌的巨须裂腹鱼皮肤表面多处均有灰白色棉絮状覆盖物)。将2组鱼分别装入已消毒的鱼用氧气袋运回实验室,待解剖取样。本研究获得了西藏农牧学院动物科学学院实验动物管理和使用伦理委员会批准,实验过程中操作人员严格遵守西藏农牧学院动物科学学院实验动物管理和使用伦理规范,并按照西藏农牧学院动物科学学院伦理委员会制定的规章制度执行。

实验用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA培养基)、氨苄青霉素、RNAZap去污染溶液(AM9780)和RNAlater保存液(AM7020)采购于上海索莱宝生物科技有限公司;基因组DNA提取试剂盒、DNA聚合酶、组织总RNA提取试剂盒由天根生化科技(北京)有限公司生产;DNA凝胶回收试剂盒采购于北京擎科生物科技股份有限公司;NEB-Next<sup>®</sup> Ultra<sup>™</sup> RNA Library Prep Kit试剂盒采购于

NEB(北京)有限公司;Pico Green试剂盒采购于苏州宇恒生物科技有限公司。

### 1.2 实验方法

**样品采集** 将5尾健康的巨须裂腹鱼(HP组)和5尾感染水霉菌的巨须裂腹鱼(DP组)用间氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐(MS-222)进行麻醉。用无菌剪刀和镊子收集5尾病鱼水霉菌长势旺盛处的皮肤(背部和尾部),用70%乙醇冲洗20 s,再用无菌水冲洗2次,每次30 s,用接种环挑取水霉菌菌丝接种至含有氨苄青霉素的PDA培养基平板上(含氨苄青霉素100 mg/mL)分离鉴定;分别剪取适量的脾脏组织装入加有RNAhold组织保存液的冷冻管中,液氮保存。脾脏组织样品送至上海派森诺生物科技股份有限公司进行转录组测序。

**水霉菌菌株的分离与鉴定** 根据Ali等<sup>[12]</sup>的方法将接种水霉菌菌丝的PDA平板置于25 °C培养箱中培养3 d,随后挑取单菌落菌丝于新的无菌PDA平板(含氨苄青霉素)划线培养,重复以上步骤,至形成典型的菌落形态。将纯化后的水霉菌菌丝转接到含有5粒无菌油菜籽的PDA平板上,25 °C培养3 d,取出长有菌丝的油菜籽,取适量菌丝转移至2 mL的无菌离心管中,依次用生理盐水、20 mmol/L的EDTA和无菌水漂洗菌丝,用无菌滤纸将菌丝上的水分吸干。采用CTAB裂解法<sup>[13]</sup>提取基因组DNA,用真菌ITS通用引物进行扩增(ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATAT-3')<sup>[14]</sup>,反应体系为25 μL: 5×reaction buffer 5 μL, 5×GC buffer 5 μL, dNTP(2.5 mmol/L) 2 μL,上下游引物各1 μL, DNA模板 2 μL, ddH<sub>2</sub>O 8.75 μL, Q5 DNA Polymerase 0.25 μL;反应条件为98 °C 2 min; 98 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min,共35个循环; 72 °C 5 min。用1.2%的琼脂糖凝胶检测PCR产物并将目的条带切胶回收,送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

**转录组测序** 利用总RNA提取试剂盒提取2组巨须裂腹鱼脾脏组织总RNA,并采用RNA专用琼脂糖电泳检测其质量。通过mRNA特有的polyA结构来纯化总RNA中的mRNA,并利用NEBNext<sup>®</sup> Ultra<sup>™</sup> II RNA Library Prep Kit for Illumina<sup>®</sup>试剂盒,将mRNA打断到200~300 bp片段。以RNA为模板,用6碱基随机引物和逆转录酶合成cDNA第一链,并以第一链cDNA为模板

进行第二链的合成。PCR 富集文库片段, 并利用 Pico Green 试剂盒对文库进行质检, 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR) 检测有效文库浓度, 按片段大小为 350~650 bp, RT-qPCR 浓度大于等于 3 mol/L, 峰型单一、无宽峰、无杂峰、无大片段、无接头和无引物二聚体, 无不可溶沉淀或者浑浊带色、基线平整的标准选择合适文库。采用第二代测序技术 (Next-Generation Sequencing, NGS), 基于 Illumina HiSeq 测序平台, 对这些文库进行双末端测序 (上海派森诺生物科技有限公司)。

**转录组组装和基因功能注释** 对测序后的原始数据按照“去除原始数据中带接头的和碱基识别准确率在 99%(Q20) 以下的序列”的标准进行质检, 将质检后的序列使用 Trinity(2.5.1) 软件<sup>[15]</sup> 进行拼接得到转录本。提取每个基因最长的转录本作为该基因的代表序列。对拼接得到的基因序列利用常用蛋白数据库进行基因功能注释。基因功能注释所用到的数据库包括 NR、GO、KEGG、eggNOG、Swiss-Prot、Pfam。

**差异基因富集分析** 采用 RSEM(1.2.15) (RNA-Seq by Expectation-Maximization) 软件计算

基因表达量<sup>[16]</sup>; 并利用 DESeq 软件包 (1.39.0) 对基因进行差异分析<sup>[17]</sup>; 采用 R 语言 ggplots2(3.3.2) 软件包绘制差异表达基因的火山图<sup>[18]</sup>; 使用 topGO 软件包 (2.40.0) 对差异基因进行 GO 富集分析<sup>[19]</sup>; 通过 KOBAS 软件包 (3.0) 对差异基因进行 KEGG 通路富集分析<sup>[20]</sup> (显著性标准为  $P < 0.05$ )。

**RT-qPCR 验证** 随机挑选 6 个差异表达基因, 应用 Primer premier 5.0 软件设计引物, 进行 RT-qPCR 验证。采用 cDNA 一链合成试剂盒 (上海吉真生物科技有限公司) 对所提取的 RNA 进行逆转录处理, 以逆转录产物为模板, *gapdh* 为内参基因, 使用 AceQ qPCR SYBR Green Master Mix 试剂盒 (上海吉真生物科技有限公司), 在 CFX96 型 (BIO-RAD, 美国) RT-qPCR 仪上进行定量分析。反应体系为 10  $\mu$ L: 2 $\times$ SYBR Green Mix 5  $\mu$ L, 上下游引物 (表 1) 各 0.5  $\mu$ L, cDNA 模板 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 2  $\mu$ L; 反应程序: 预变性 95  $^{\circ}$ C 5 min, 变性 95  $^{\circ}$ C 10 s, 退火延伸 60  $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。每组样品的每个基因均重复 3 次, 采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法对 RT-qPCR 结果进行分析, 并与转录组测序结果相关基因表达量进行比较。

表 1 引物序列及信息

Tab. 1 The sequence and information of primers

引物 primers	上游引物 forward sequence	下游引物 reverse sequence	产物长度/bp product length
GAPDH	GTTCCACCTACGAGACGC	ATCCAGAATGGCAACAACCTACA	121
NK-lysin	CAAGCCCAGCACATTCCA	TCCTGACTGCCCTGCTGATA	136
somatostatin	TGTGGTCGCACTGCAAATT	TGGAAAGCAGGGAAAGGAG	142
preproinsulin	AACACTGCTCCACAATGCCT	TTTCCTTCCTCCAAAATCTGC	101
chymotrypsin	GTGCTGCTGGTGCCCTCCT	GGTGTCACAACGGCTGCTT	187
protein disulfide isomerase	AGCGACATCTTGTTAGTCTGGG	CGGTTGTGGAATATGGGAAAA	176
prolactin receptor	TTGAAATGGTCCAGTGCAGAA	CCAACAGAGGAGTCCAAAAAT	169

## 2 结果

### 2.1 巨须裂腹鱼水霉菌菌株的分离培养

分离菌株在 PDA 琼脂培养基上生长良好。根据形态分离出 3 株水霉菌, 分别命名为 6b、1b 和 2。其中 6b、1b 呈圆形, 边缘不整齐, 干燥致密, 正面灰白背面浅黄。2 呈圆形, 边缘整齐, 稀疏干燥, 正面雪白背面浅黄 (图 1)。

### 2.2 水霉菌菌株的 PCR 鉴定

以提取的巨须裂腹鱼水霉菌基因组 DNA 为模板, 用 ITS1 和 ITS4 为上下游引物进行 PCR 扩

增, 将 PCR 产物利用 1.2% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 获得大小约为 750 bp 的条带, 与预期水霉菌

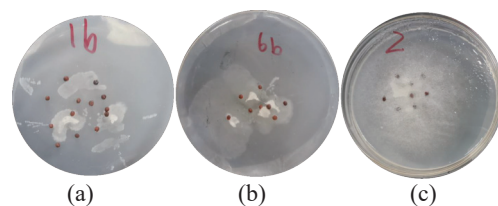


图 1 巨须裂腹鱼水霉菌菌株的分离形态

(a) 1b 菌株; (b) 6b 菌株; (c) 2 菌株。

Fig. 1 The isolation morphology of *S. strain* in *S. Macropogon*

(a) strain 1b; (b) strain 6b; (c) strain 2.



核酸片段大小相符。6b、1b 和 2 经测序后实际大小分别为 714、735 和 715 bp。测序后巨须裂腹鱼水霉菌 DNA 经 NCBI 网站 Blast 序列比对, 确定样品 6b、1b 和 2 为水霉菌。6b 与寄生水霉 (*S. parasitica*)(MK850072.1) 碱基相似性为 100%, 1b 与寄生水霉 (KT807577.1) 碱基相似性 99%, 2 与多子水霉 (*S. ferax*)(MH899094.1) 碱基相似性为

100%。通过 MEGA 5 软件对分离得到的水霉菌构建遗传进化树, 结果显示, 6b 与鲑鱼水霉菌 (*S. salmonis*)(EU551153.1) 聚在一支, 1b 与寄生水霉 (MK850072.1)、多子水霉 (*S. ferax*)(MH899094.1) 聚在一支, 2 与 *S. anomalies*(MH644832.1) 聚在一支, 亲缘关系较近(图 2)。

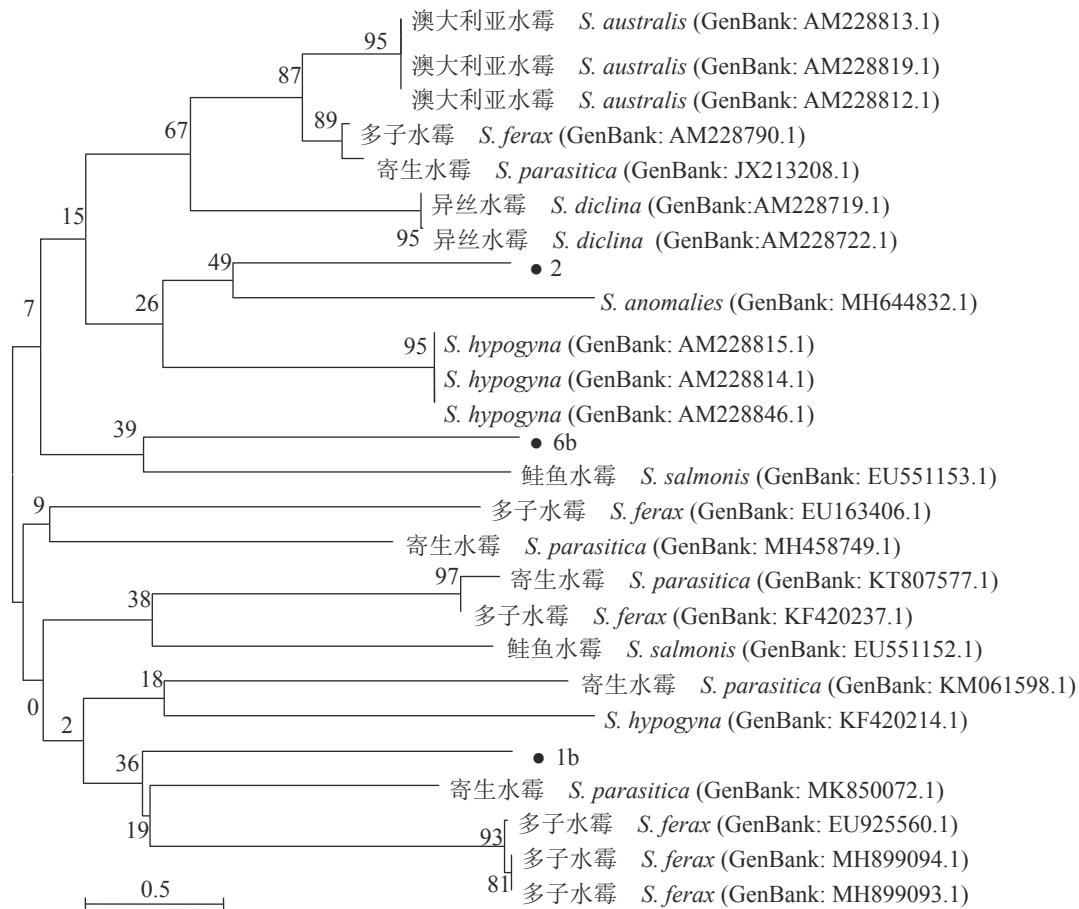


图 2 基于水霉菌基因氨基酸序列构建的巨须裂腹鱼水霉菌系统进化树

节点上数据表示 1 000 次重复的支持率; 比例尺表示每千碱基的替换数目。

Fig. 2 Phylogenetic tree of *S. macropogon* based on amino acid sequences *Saprolegnia*

Numbers at the nodes denote the bootstrap values of 1 000 replicates; scale represents the numbers of substitutions per 1 000 bases.

### 2.3 测序原始数据和转录本拼接结果

利用 Illumina 测序平台对 HP 组和 DP 组巨须裂腹鱼的脾脏组织进行转录组测序。HP 组和 DP 组平均每个样品分别获得 51 932 696 条和 50 599 255 条原始序列; 经过过滤处理后, HP 组和 DP 组平均每个样品的高质量序列分别为 46 619 504 条和 43 912 876 条。HP 组和 DP 组平均每个样品所获序列的碱基识别准确率在 99% 以上的碱基 (Q20) 所占百分比分别为 97.87% 和 97.59%, 碱基识别

准确率在 99.9% 以上的碱基 (Q30) 所占百分比分别为 94.46% 和 94.04%(表 2)。使用 Trinity 软件对高质量序列进行拼接后, 共得到 359 164 条转录本, 进一步去冗余后拼接得到 123 863 条基因, 序列平均长度为 982 bp, N50 和 N90 分别为 1 596 bp 和 395 bp(表 3)。结果表明, 2 组巨须裂腹鱼的转录组测序量大, 获得高质量序列的数量多、质量好, 符合进一步生物信息学分析要求。

表 2 各实验组转录组测序数据信息

**Tab. 2 Information of transcriptomic reads of each group**

样本 samples	健康组(HP) health group	水霉病组(DP) disease group
原始序列/条 raw reads	51 932 696	50 599 255
原始碱基/bp raw bases	7 789 904 400	7 589 888 340
高质量序列/条 clean reads	46 619 504	43 912 876
高质量碱基/bp clean bases	6 992 925 600	6 586 931 400
Q30碱基比率/% Q30 bases ratio	94.46	94.04
Q20碱基比率/% Q20 bases ratio	97.87	97.59

2.4 转录组序列注释和差异基因表达谱

利用 NR、GO、KEGG、Pfam、eggNOG 和 Swissprot 等 6 个数据库对巨须裂腹鱼转录组数据进行基因功能注释, 结果显示, GO 数据库中注释到 7 120 条基因, KEGG 数据库中注释到 19 265 条基因, 有 3 677 条基因在 6 个数据库中均获得注释。对 HP 组和 DP 组的差异表达基因绘制火山图 (图 3), 结果显示, 2 组间共有 1 889 个基因存在表达差异。与 HP 组相比, DP 组中有 1 414 个基因的表达量上升, 475 个基因的表达量下降。

表 3 各实验组组装结果统计

**Tab. 3 Statistics for the assembly of each group**

类别 category	数目/条 no.	序列总长度/bp total length	平均长度/bp mean length	N50/bp	N90/bp	GC%
转录本 transcript	359 164	475 496 934	1 323.90	2 206	514	41.92
基因 unigene	123 863	121 665 414	982.26	1 596	395	40.69

注: “N50/N90”为将所有序列从长到短排列, 将序列长度按照该顺序依次相加, 当相加的长度达到序列总长度的50%/90%时, 最后一条序列的长度。  
Notes: N50 or N90 is arranging all sequences from long to short, and adding the sequence lengths with this order; when the length reaches 50% or 90% of the total sequence length, the length of the last sequence.

2.5 差异表达基因的 GO 和 KEGG 富集

对 HP 组和 DP 组差异表达基因进行 GO 功能富集分析结果显示, 差异表达基因在分子功能类、细胞组分类和生物过程类中均有分布, 其中在生物过程类中富集到的差异表达基因最多。在生物过程类中, 主要包括肌肉收缩 (muscle contraction)、肌肉系统过程 (muscle system process) 和肌肉结构

发展 (muscle structure development); 细胞组分类中, 主要包括肌动蛋白细胞骨架 (actin cytoskeleton)、肌节 (sarcomere) 和肌原纤维 (myofibril); 分子功能类中主要包括肌动蛋白结合 (actinin binding)、肌肉  $\alpha$ -肌动蛋白结合 (muscle alpha-actinin binding) 和  $\alpha$ -肌动蛋白结合 (alpha-actinin binding) (图 4-a)。

对 HP 组和 DP 组的差异基因进行 KEGG 通路富集分析, 结果显示, 富集最显著的前 20 条 KEGG pathway 分别为吞噬体 (phagosome)、近端小管碳酸氢盐回收 (proximal tubule bicarbonate reclamation)、EB 病毒感染 (epstein-barr virus infection)、细胞黏附分子 (CAMs)、人 T 细胞白血病病毒感染 (human T-cell leukemia virus 1 infection)、类风湿关节炎 (rheumatoid or thritis)、胰腺分泌物 (pancreatic secretion)、蛋白质消化吸收 (protein digestion and absorption)、造血细胞谱系 (hematopoietic cell lineage)、精氨酸和脯氨酸代谢 (arginine and proline metabolism)、心肌收缩 (cardiac muscle contraction)、淀粉和蔗糖代谢 (starch and sucrose metabolism)、病毒性心肌炎 (viral myocarditis)、免疫性甲状腺疾病 (autoimmune thyroid disease)、异体移植排斥 (allograft rejection)、抗原加工和呈递 (antigen processing and presentation)、I 型糖尿病 (type I diabetes mellitus)、移植物抗宿主病 (graft-versus-

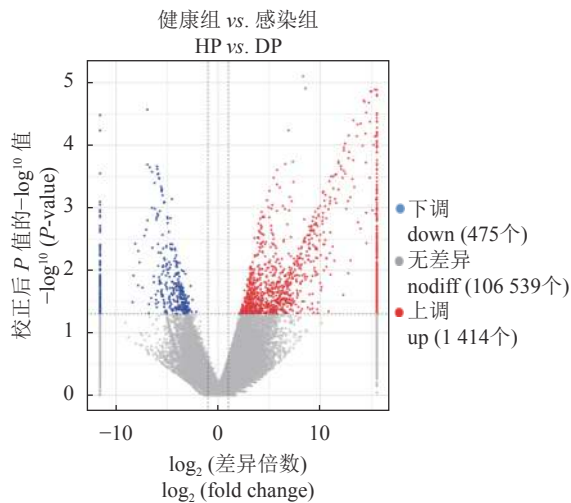


图 3 HP 组与 DP 组差异表达基因的火山图

图中横虚线为  $P$ -value=0.05 阈值。

**Fig. 3 The volcano plot of DEGs expression genes between HP group and DP group**

The horizontal dashed line is  $P$ -value=0.05 threshold.

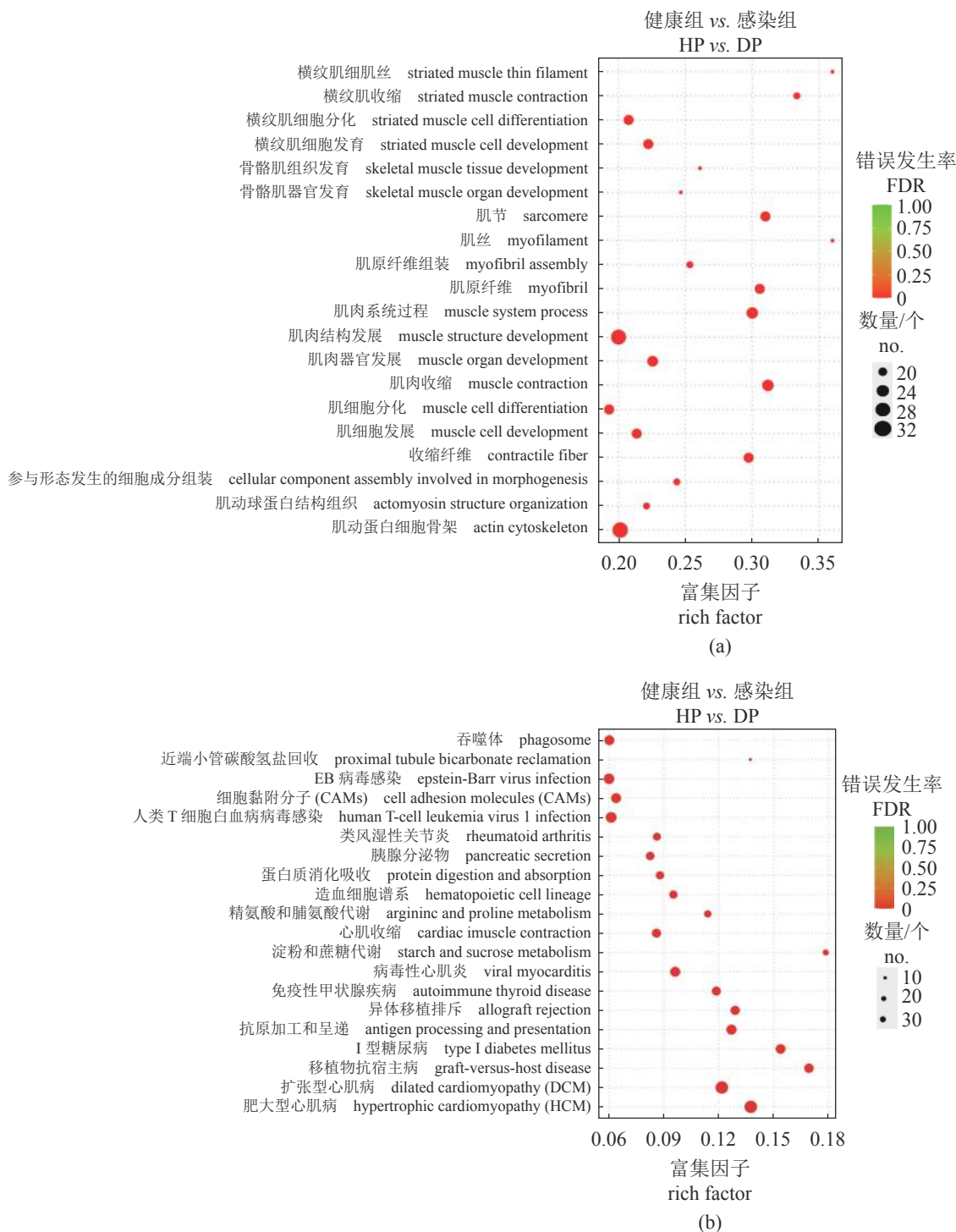


图 4 差异表达基因的 GO(a) 和 KEGG(b) 富集分布散点图  
Fig. 4 GO (a) and KEGG (b) enrichment scatters of the DEGs

host-disease)、扩张型心肌病 (dilated cardiomyopathy) 和肥厚型心肌病 (hypertrophic cardiomyopathy)(图 4-b)。

## 2.6 RT-qPCR 检测

根据转录组结果, 从 2 组巨须裂腹鱼中筛选

到 1 889 个差异表达基因, 随机选择 6 个差异表达基因, 利用 RT-qPCR 相对定量法检测感染水霉病组和健康组基因表达情况, 结果显示, 6 个差异表达基因的检测结果与转录组分析的结果相一致, 证实了转录组分析结果的准确性 (图 5)。

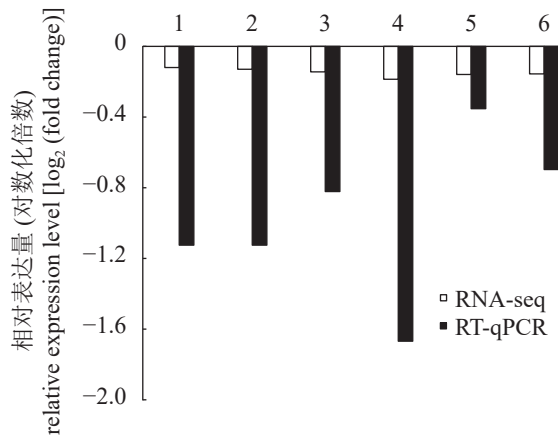


图5 RT-qPCR与转录组检测基因差异倍数的比较分析

1. 机体自然杀伤细胞基因, 2. 生长抑素基因, 3. 前胰岛素原基因, 4. 糜蛋白酶蛋白基因, 5. 蛋白质二硫键异构酶基因, 6. 催乳素受体基因。

Fig. 5 Comparative analysis of DEGs by RT-qPCR and transcriptome

1. natural killer cells-lysin gene, 2. somatostatin gene, 3. preproinsulin gene, 4. chymotrypsin gene, 5. protein disulfide isomerase gene, 6. prolactin receptor gene.

### 3 讨论

水霉病是水产动物病害中危害种类最多、危害最为严重的疾病之一, 每年给我国水产养殖业造成重大损失<sup>[3-4]</sup>。作为青藏高原的特种鱼类之一, 巨须裂腹鱼对保护高原的河流生态平衡具有重要意义<sup>[9]</sup>。但巨须裂腹鱼在人工饲养过程中, 经常因为水温变化、机械损伤等因素, 感染水霉病, 进而降低养殖成活率。因此, 利用高通量测序技术分析感染水霉病对巨须裂腹鱼脾脏组织转录组的影响, 对巨须裂腹鱼的健康养殖具有重要意义。

研究发现, GO 功能富集中 HP vs. DP 在肌肉收缩 (muscle contraction)、肌肉系统进程 (muscle system process)、肌肉结构发展 (muscle structure development) 和肌动蛋白细胞骨架 (actin cytoskeleton) 功能上 FDR 值较小, 表明 2 组巨须裂腹鱼在这些功能上的差异表达基因的富集较为显著, 这可能与水霉病会影响鱼类的正常游泳, 降低鱼类的食欲, 进而影响其生长发育有关<sup>[5]</sup>。肌动蛋白细胞骨架可以介导多种生物学功能, 与动物细胞的分裂、运动、黏附和吞噬等生理进程相关<sup>[21]</sup>。Porter 等<sup>[22]</sup>对植物肌动蛋白的研究发现, 肌动蛋白细胞骨架会对动物的免疫功能产生影响, 水霉病对巨须裂腹鱼的肌动蛋白细胞骨架方面显著富集的基因数量最多, 说明水霉病会严重影响巨须

裂腹鱼的免疫力。对差异表达基因进行 KEGG 富集分析发现, HP vs. DP 在心血管疾病、免疫疾病、内分泌和代谢疾病、免疫系统、碳水化合物代谢、循环系统、氨基酸代谢、消化系统、病毒传染病、信号分子、排泄系统等相关通路的差异表达基因富集最显著, 表明水霉病不仅可以导致巨须裂腹鱼的免疫能力下降, 患病风险提高, 还会影响巨须裂腹鱼的消化系统、循环系统和排泄系统。

Zhou 等<sup>[23]</sup>通过对大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 机体自然杀伤细胞溶素 (NK-lysin) 成熟肽活性的研究, 得到 NK-lysin 抗菌肽段具有抗菌活性; Zhang 等<sup>[24]</sup>通过对半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) NK-lysin 的研究发现, NK-lysin 具有抗菌活性, 在鱼的免疫系统中发挥重要作用, 其可以与细胞膜结合, 破坏细胞膜的完整性, 进而降解病毒和细菌的基因组。生长抑素 (somatostatin) 是一种神经肽, 广泛分布于整个中枢神经系统和周围组织中, 具有调节生长发育和新陈代谢等多种生物学功能<sup>[25]</sup>。Thán 等<sup>[26]</sup>通过对大鼠 (*Rattus norvegicus*) 生长抑素的研究发现, 生长抑素可以通过调节淋巴细胞和炎症反应参与免疫应答调节。前胰岛素原 (preproinsulin) 作为胰岛素合成过程中的前体物具有双重免疫活性, 既可与胰岛素抗体结合, 又可与 C 肽抗体结合<sup>[27]</sup>。本研究通过对巨须裂腹鱼免疫相关基因进行筛选发现, 抗菌肽基因 (NK-lysin)、生长抑素基因和前胰岛素原基因在感染水霉病巨须裂腹鱼脾脏组织中呈下调表达, 这可能与感染水霉病可以导致巨须裂腹鱼的免疫力下降有关。作为胰腺分泌的一种蛋白水解酶, 糜蛋白酶 (chymotrypsin) 主要具有酶解肽链的功能, 属于肽链内切酶。糜蛋白酶与胰蛋白酶具有类似功能, 但其分解能力强于胰蛋白酶<sup>[28]</sup>。蛋白质二硫键异构酶 (protein disulfide isomerase) 既可以促进蛋白间和蛋白内形成正确的二硫键, 又可以抑制氨基酸之间形成错误的二硫键。在辅助多肽段形成正确的空间构型方面具有重要功能, 其与由蛋白质折叠错误而引起的疾病关系密切<sup>[29-30]</sup>。本研究发现, 糜蛋白酶基因和蛋白质二硫键异构酶基因在健康组巨须裂腹鱼脾脏中的表达量高于感染水霉病组, 由此表明水霉病会影响巨须裂腹鱼的消化系统, 降低其对营养物质的消化能力。催乳素受体 (prolactin receptor) 是由脑垂体及某些垂体外组织器官所分泌的细胞因子受体超家族的成员, 在



免疫、生殖、代谢、生长及调节渗透压等生物学过程中具有重要作用<sup>[31]</sup>, 感染水霉病组中催乳素受体基因表达量低于健康组, 说明水霉病可以影响巨须裂腹鱼多种生理功能。

综上所述, 本研究采用 RNA-Seq 技术探究了水霉病对巨须裂腹鱼脾脏转录组的影响。研究发现感染水霉病会影响巨须裂腹鱼的免疫功能、生长发育、消化功能等方面, 这为巨须裂腹鱼水霉病的感染机制奠定了基础, 也为巨须裂腹鱼的健康养殖提供了理论基础。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

### 参考文献 (References):

- [1] 甄珍, 王荻, 刘红柏, 等. 山女鳟水霉病病原的分离鉴定及其生物学特性[J]. *江西农业大学学报*, 2015, 37(2): 333-338.
- Zhen Z, Wang D, Liu H B, *et al.* Identification and biological characteristics of a pathogenic *Saprolegnia* sp. from *Oncorhynchus masou masou*[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2015, 37(2): 333-338 (in Chinese).
- [2] Van West P. *Saprolegnia parasitica*, an oomycete pathogen with a fishy appetite: new challenges for an old problem[J]. *Mycologist*, 2006, 20(3): 99-104.
- [3] Van den Berg A H, McLaggan D, Diéguez-Urbeondo J, *et al.* The impact of the water moulds *Saprolegnia diclina* and *Saprolegnia parasitica* on natural ecosystems and the aquaculture industry[J]. *Fungal Biology Reviews*, 2013, 27(2): 33-42.
- [4] Steciow M M, Paul A, Bala K. *Saprolegnia bulbosa* sp. nov. isolated from an Argentine stream: taxonomy and comparison with related species[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 268(2): 225-230.
- [5] 欧仁建. 黄颡鱼卵致病性绵霉的分离鉴定与感染机制的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.
- Ou R J. Identification and pathogenesis mechanism of a pathogenic *Achlya klebsiana* strain from the eggs of *Pelteobagrus fulvidraco*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013 (in Chinese).
- [6] Pickering A D, Willoughby L G. *Saprolegnia* infections of salmonid fish[M]//Roberts R J. *Microbial Diseases of Fish*. London: Academic Press, 1982: 271-297.
- [7] Hatai K, Hoshiai G. Mass mortality in cultured coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) due to *Saprolegnia parasitica* Coker[J]. *Journal of Wildlife Diseases*, 1992, 28(4): 532-536.
- [8] 刘洁雅. 西藏巨须裂腹鱼个体生物学和种群动态研究[D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2016.
- Liu J Y. Study on biology and population dynamics of *Schizothorax macropogon* in the Yarlung Tsangpo River[D]. Alar: Tarim University, 2016 (in Chinese).
- [9] 西藏自治区水产局. 西藏鱼类及其资源[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995: 1-162.
- Fisheries Bureau of Tibet Autonomous Region. Fish and fishery in Xizang[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1995: 1-162 (in Chinese).
- [10] Huo B, Xie C X, Ma B S, *et al.* Age and growth of *Oxygymnocypris stewartii* (Cyprinidae: Schizothoracinae) in the Yarlung Tsangpo River, Tibet, China[J]. *Zoological Studies*, 2012, 51(2): 185-194.
- [11] Zhou X J, Xie C X, Huo B, *et al.* Age and growth of *Schizothorax waltoni* (Cyprinidae: Schizothoracinae) in the Yarlung Tsangpo River, China[J]. *Journal of Applied Animal Research*, 2017, 45(1): 346-354.
- [12] Ali F F, Al-Tae S K, Al-Jumaa Z M. Isolation, molecular identification, and pathological lesions of *Saprolegnia* spp. isolated from common carp, *Cyprinus carpio* in floating cages in Mosul, Iraq[J]. *Veterinary World*, 2020, 13(12): 2759-2764.
- [13] 可小丽, 汪建国, 顾泽茂, 等. 水霉菌总DNA提取方法研究[J]. *水生生物学报*, 2008, 32(1): 68-73.
- Ke X L, Wang J G, Gu Z M, *et al.* Study on total DNA extraction methods of *Saprolegnia*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, 32(1): 68-73 (in Chinese).
- [14] 可小丽, 汪建国, 顾泽茂, 等. 水霉菌的形态及ITS区分子鉴定[J]. *水生生物学报*, 2010, 34(2): 293-301.
- Ke X L, Wang J G, Gu Z M, *et al.* *Saprolegnia* identification based on their morphological characteristics and ITS rDNA region[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, 34(2): 293-301 (in Chinese).
- [15] Haas B J, Papanicolaou A, Yassour M, *et al.* *De novo* transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis[J]. *Nature Protocols*, 2013, 8(8): 1494-1512.
- [16] Li B, Dewey C N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome[J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12: 323.



- [17] Leng N, Dawson J A, Thomson J A, *et al.* EBSeq: an empirical Bayes hierarchical model for inference in RNA-seq experiments[J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(8): 1035-1043.
- [18] Trapnell C, Hendrickson D G, Sauvageau M, *et al.* Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(1): 46-53.
- [19] Conesa A, Götz S, García-Gómez J M, *et al.* Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research[J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(18): 3674-3676.
- [20] Moriya Y, Itoh M, Okuda S, *et al.* KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server[J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(S2): W182-W185.
- [21] Wang P W, Hawkins T J, Hussey P J. Connecting membranes to the actin cytoskeleton[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2017, 40: 71-76.
- [22] Porter K, Day B. From filaments to function: the role of the plant actin cytoskeleton in pathogen perception, signaling and immunity[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2016, 58(4): 299-311.
- [23] Zhou Q J, Wang J, Liu M, *et al.* Identification, expression and antibacterial activities of an antimicrobial peptide NK-lysin from a marine fish *Larimichthys crocea*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 55: 195-202.
- [24] Zhang M, Long H, Sun L. A NK-lysin from *Cynoglossus semilaevis* enhances antimicrobial defense against bacterial and viral pathogens[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2013, 40(3-4): 258-265.
- [25] Teitelbaum D H, Del Valle J, Reyas B, *et al.* Intestinal intraepithelial lymphocytes influence the production of somatostatin[J]. *Surgery*, 1996, 120(2): 227-233.
- [26] Thán M, Németh J, Szilvássy Z, *et al.* Systemic anti-inflammatory effect of somatostatin released from capsaicin-sensitive vagal and sciatic sensory fibres of the rat and guinea-pig[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2000, 399(2-3): 251-258.
- [27] 孔祥洁, 刘小林, 吴艳, 等. 鸭前胰岛素原基因多态性及其与屠体性状的关联分析[J]. *遗传*, 2008, 30(6): 760-764.
- Kong X J, Liu X L, Wu Y, *et al.* Genetic variance of duck preproinsulin gene and its correlations to the traits of carcasses[J]. *Hereditas (Beijing)*, 2008, 30(6): 760-764 (in Chinese).
- [28] Piovarci I, Hianik T, Ivanov I N. Detection of chymotrypsin by optical and acoustic methods[J]. *Biosensors*, 2021, 11(3): 63.
- [29] Yoo B C, Krapfenbauer K, Cairns N, *et al.* Overexpressed protein disulfide isomerase in brains of patients with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease[J]. *Neuroscience Letters*, 2002, 334(3): 196-200.
- [30] Conn K J, Gao W W, McKee A, *et al.* Identification of the protein disulfide isomerase family member PDip in experimental Parkinson's disease and Lewy body pathology[J]. *Brain Research*, 2004, 1002(1-2): 164-172.
- [31] Georgescu T, Ladyman S R, Brown R S E, *et al.* Acute effects of prolactin on hypothalamic prolactin receptor expressing neurones in the mouse[J]. *Journal of Neuroendocrinology*, 2020, 32(11): e12908.

## Isolation, identification and the effect of *Saprolegniasis* on the spleen transcriptome of *Schizothorax macropogon*

KONG Qinghui<sup>1</sup>, LIU Haiping<sup>2</sup>, LIU Suozhu<sup>1,3</sup>, SUO Langsizhu<sup>1</sup>,  
XU Yefen<sup>1</sup>, ZHAO Xiaoling<sup>1</sup>, SHANG Zhenda<sup>1,3\*</sup>

(1. College of Animal Science, Tibet Agricultural & Animal Husbandry University, Nyingchi 860000, China;

2. Institute of Fisheries Science, Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Lhasa 850002, China;

3. Tibetan Plateau Feed Processing Research Center, Tibet Agricultural & Animal Husbandry University, Nyingchi 860000, China)

**Abstract:** *Schizothorax macropogon* is one of the main economic fishes in Tibet area, only distributed in the upper and middle reaches of the Yarlung Tsangpo River and its tributaries. *Saprolegniasis* is one of the most difficult fish diseases in prevention and control, and brings huge economic losses to the aquaculture industry. This experiment was conducted to analyze the effects of *Saprolegniasis* on the spleen transcriptome of *S. macropogon* and understand the molecular mechanisms of *S. macropogon* infected by *Saprolegniasis*. A total of 5 healthy and 5 *Saprolegnia* infected *S. macropogon* living in the same aquatorium were randomly selected. The PDA agar medium and molecular biology methods were used for isolation and identification the *S.* strain from *S. Macropogon*. In addition to the transcriptomes of spleen tissues of healthy and fungus infection, *S. macropogon* were sequenced based on the Illumina HiSeq™ 2000 high-throughput sequencing platform and the data were analyzed by bioinformatics tools in this study. The research showed that we obtained 3 *S.* strains from the skin of *S. Macropogon*, including *S. parasitica* and *S. ferax*. A total of 46 619 504 and 43 912 876 clean reads were obtained in the healthy group and fungus infection group, respectively. 359 164 transcripts were assembled and 123 863 unigenes were spliced after removing redundancy. Compared with the healthy group, 1 889 unigenes showed differential expressions in the fungus infection group, 1 414 unigenes were up-regulated and 475 unigenes were down-regulated among these genes. Six differentially expressed unigenes (natural killer cells-lysin gene, somatostatin gene, preproinsulin gene, chymotrypsin gene, protein disulfide isomerase gene and prolactin receptor gene) were randomly selected for quantitative real-time PCR and the results were consistent with the RNA-seq. The results of GO functional enrichment showed that the up-regulated genes are mainly enriched in 241 terms, and down-regulated genes are mainly enriched in 60 terms. These genes involve molecular functions, cell components and biological processes. Besides, among these GO functions, the most differentially expressed genes were enrichment in biological processes, including muscle contraction, muscle system process and muscle structure development. KEGG pathway enrichment suggested that the unigenes were enriched in immune diseases, endocrine and metabolic diseases, viral infectious diseases, digestive system, excretory system and so on. Collectively, the results of above indicate that infection with *Saprolegnia* can affect genes expression in the spleen tissue of *S. macropogon*. The conclusion will provide important references for further exploration of the *S.* infection mechanism of *S. macropogon*.

**Key words:** *Schizothorax macropogon*; *Saprolegniasis*; RNA-Seq; spleen tissue; differentially expressed genes

**Corresponding author:** SHANG Zhenda. E-mail: 446809464@qq.com

**Funding projects:** Tibet Autonomous Region Science and Technology Plan Project-Key Research and Development Program (XZ202001ZY0016N); Tibetan Plateau Feed Processing Engineering Research Center (XZJYT2018GCZX)