



长期饥饿胁迫下厚壳贻贝的生理生化响应及性腺转录组

孙闻婧¹, 陈传悦^{1,2}, 梁泽玮¹, 廖智¹,
严小军^{1,2}, 张晓林^{1*}

(1. 浙江海洋大学海洋科学与技术学院, 浙江 舟山 316022;

2. 宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 为探究贻贝在饥饿胁迫下的生理生化响应及分子适应机制, 本研究以 2 龄厚壳贻贝为对象, 开展了正常投喂(对照组)和饥饿处理(饥饿组)条件下的存活率统计、能量代谢相关酶活性测定以及性腺转录组测序及分析。结果显示, 厚壳贻贝在 90 d 的饥饿处理下存活率高达 86%。饥饿胁迫下贻贝性腺中磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK)活性显著增加, 己糖激酶(HK)、磷酸果糖激酶(PFK)、琥珀酸脱氢酶(SDH)、苹果酸脱氢酶(MDH)活性均显著降低。通过 Illumina HiSeq ×10 高通量测序平台对对照组和饥饿组厚壳贻贝性腺组织进行转录组测序, 分别获得 31 596 762 和 26 810 506 个在其基因组上具有唯一注释的有效数据, 并筛选出 4 130 个差异表达基因, 包括 2 082 个上调和 2 048 个下调表达基因。GO 功能分析结果显示, 差异基因主要在富集在代谢过程、细胞器组织以及酶活性等功能。KEGG 富集分析结果表明, 差异基因显著富集在 DNA 复制、错配修复、碱基切除修复等与细胞分裂有关的代谢通路上。研究表明, 贻贝在饥饿下通过降低细胞的能量代谢以及减缓细胞分裂等生理活动来维持饥饿胁迫下的生存。本研究初步揭示了厚壳贻贝在饥饿胁迫下的生理生化响应和分子调控机制, 为今后深入解析贻贝应对饥饿胁迫的分子策略提供重要的理论依据, 同时为揭示其适应饥饿胁迫的能量利用和再分配以及生理对策提供新的思路。

关键词: 厚壳贻贝; 长期饥饿; 存活率; 能量代谢酶活; 性腺转录组

中图分类号: S 968.31

文献标志码: A

厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) 是我国重要的海产贝类养殖品种, 个体大, 肉肥味美, 营养价值高^[1]。其主要分布于我国黄、渤海和东海沿岸, 以浙江省资源量最大。位于浙江北部的嵊泗县枸杞岛是我国最大的厚壳贻贝养殖区, 该海域厚壳贻贝养殖面积约 1 500 hm², 产量高达 20 余万 t^[2-3]。然而, 随着日益增长的市场需求和经济利益的驱使, 为了提高产量, 厚壳贻贝的养殖密度不断增加, 海域资源无法满足贻贝快速生长的需求, 再

加上季节变化等自然因素的影响, 养殖海区经常出现食物严重缺乏的现象, 导致厚壳贻贝遭受短期或长期饥饿的胁迫^[4-5]。已有相关研究显示厚壳贻贝在饥饿胁迫下足丝蛋白合成减少, 导致附着强度减弱^[6], 此外, 长期饥饿胁迫也会导致肥满度下降, 空壳率增加, 肉质降低, 严重影响贻贝养殖产业的经济效益和高品质发展。因此, 探究厚壳贻贝饥饿下的生理生化响应和分子适应机制对合理规划贻贝养殖密度, 有效利用海区饵料资

收稿日期: 2023-02-22 修回日期: 2023-04-06

资助项目: 浙江省自然科学基金(LQ23D060002); 国家自然科学基金(42020104009)

第一作者: 孙闻婧(照片), 从事贝类生理和基因功能研究, E-mail: sunwenjing@zjou.edu.cn

通信作者: 张晓林, 从事海洋生物功能基因和活性蛋白研究, E-mail: zhangxiaolin@zjou.edu.cn



源, 促进厚壳贻贝养殖业的健康高效发展提供参考。

有研究发现, 饥饿胁迫对水生生物的生长发育和代谢均有一定影响, 饥饿会引起水生生物的卵细胞和精子数量降低, 严重影响性腺的发育和成熟, 如日本大鲍 (*Haliotis gigantea*) 在摄食水平较低的情况下, 随着性腺成熟度的降低, 卵子数目也会显著下降^[7]。雄性斑马鱼 (*Danio rerio*) 的性腺组织结构在饥饿胁迫下严重受损, 精子发生受阻, 精原细胞和精母细胞比例增加, 成熟精子比例显著降低^[8]。此外, 饥饿也会导致动物组织的生理状态的改变, 如光倒刺鲃 (*Spinibarbus hollandi*) 在饥饿胁迫下细胞分裂处于完全停滞状态, 尽可能地维持当下的状态而减少过多的能量损耗^[9]。虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 肝脏中的己糖激酶活性在饥饿 14 d 后显著降低^[10]。草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 在长期饥饿下其丙酮酸激酶和磷酸果糖激酶的活性均极显著下降^[11]。异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 在饥饿期间与葡萄糖异生有关的酶 (PEPCK、FBPase 和 G6Pase) 的表达量均上调^[12]。目前关于饥饿胁迫对水生生物的影响研究主要集中在鱼类, 而对具有重要经济价值贝类的研究较缺乏。因此, 探究饥饿胁迫下贻贝的代谢变化对于解析贝类等软体动物对饥饿胁迫的生理响应和调控机制具有积极的指导意义。

性腺组织是贻贝生殖发育最为关键的器官, 也是贻贝体内最大的可食用部分, 性腺的饱满度直接关系到贻贝的品质和繁育。贻贝短期饥饿下的代谢变化和分子响应已有研究。本实验室前期研究发现, 贻贝在短期饥饿下首先通过消耗自身储存的葡萄糖提供能量, 然后激活细胞自噬途径加强能量的回收能力, 从而提高贻贝体内平衡和稳定^[4]。长期饥饿胁迫下的生存代谢和分子调控机制尚不清楚。因此, 探究长期饥饿胁迫对贻贝代谢和基因表达调控的影响有利于揭示其饥饿胁迫下的分子适应机制, 以提供有效的应对饥饿策略, 从而提高贻贝产品的品质和经济价值。

本研究以厚壳贻贝为对象, 在实验室条件下进行长达 90 d 的饥饿处理, 处理结束后首先统计厚壳贻贝在饥饿 90 d 的存活率, 然后取其性腺组织进行能量代谢相关酶 [己糖激酶 (HK)、磷酸果糖激酶 (PFK)、琥珀酸脱氢酶 (SDH)、苹果酸脱氢酶 (MDH) 和磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (PEPCK) 等] 活性的测定, 以明确饥饿状态下其能量代谢的变化, 最后通过 Illumina HiSeq X10 高通量测序

技术分析饥饿处理下性腺组织的转录组变化, 以期揭示厚壳贻贝饥饿胁迫下的基因表达差异及其调控通路的改变, 阐明其饥饿胁迫下的分子调控机制。本实验的结果可为厚壳贻贝适应饥饿胁迫的能量分配机制与生理对策提供参考数据, 同时也为合理有效地规划贻贝养殖密度、促进贻贝产业的高质量发展提供思路。

1 材料与方法

1.1 样本采集与处理

成年 2 龄厚壳贻贝采集自舟山市嵊泗县枸杞岛养殖基地, 体长 (10±2) cm, 于充分曝气的人工海水中暂养 1 周, 控制温度为 (18±2) °C, 盐度 28±1, 每天换水 1 次。贻贝随机分为两组: 饥饿组和对照组, 每组 200 只。对照组每日正常喂养螺旋藻 2 次, 换水 1 次, 饥饿组在实验期间不进行任何投喂, 仅每日换水 1 次^[13]。实验 90 d 后参考 Liu 等^[14]采用混样的方法消除个体间的差异进行取样, 饥饿组和对照组各取 6 个性腺组织样品, 每 2 个样品等量混合为一管, 液氮速冻后置于 -80 °C 冰箱保存备用, 每组 3 个生物学重复。本研究获得了浙江海洋大学动物伦理委员会批准 (审批号: 2023030), 实验过程中操作人员严格遵守浙江海洋大学动物伦理委员会伦理规范, 并按照浙江海洋大学动物伦理委员会制定的规章制度执行。

1.2 存活率的计算

观察贻贝壳是否张开, 若发现贝壳张开, 用手指触碰贻贝无闭合反应, 判定为已经死亡。为准确记录实验过程中饥饿组和对照组贻贝的存活率, 本次使用样本数两组各 200 只。按下式计算贻贝存活率 (R_S , %):

$$R_S = (n_1 - n_2) / n_1 \times 100\% \quad (1)$$

式中, n_1 为初始贻贝数 (只), n_2 为死亡数 (只)^[15]。

1.3 酶活性测定

取饥饿组和对照组贻贝性腺组织, 加入预冷的 PBS 缓冲液 (0.01 mol/L, pH 7.4), 经冰浴匀浆后, 4 °C 1 000×g 离心 10 min, 取上清液用于酶活性检测, 使用 BCA 试剂盒 (TaKaRa, 货号: T9300A) 测定其中的蛋白浓度。HK、SDH、PFK、MDH 和 PEPCK 活性均采用南京建成生物工程研究所试剂盒测定, 具体测定方法参照试剂盒说明书进行。

1.4 总 RNA 提取、文库构建和测序

从 -80°C 的冰箱中取出保存的性腺组织, 剪碎, 研钵提前预冷, 加入液氮和组织一并研磨成粉末状。根据 Total RNA Extractor (Trizol) 试剂盒(上海生工生物工程股份有限公司)使用说明, 对所取性腺样品进行总 RNA 提取。用超微量核酸蛋白定量仪检测 RNA 浓度, 琼脂糖凝胶检测 RNA 完整性以及基因组污染情况。并且通过 Agilent 2100 bioanalyzer 对 RNA 样品进行质控, 检测 RNA 完整性。

由北京诺禾致源科技股份有限公司完成 cDNA 文库构建以及测序, 建库用试剂盒为 NEB-Next[®] Ultra[™] RNA Library Prep Kit for Illumina[®]。文库构建完成后, 先使用 Qubit 2.0 Fluorometer 软件进行初步定量, 稀释文库至 $1.5\text{ ng}/\mu\text{L}$, 随后使用 Agilent 2100 bioanalyzer 对文库的 insert size 进行检测, insert size 符合预期后, qRT-PCR 对文库有效浓度进行准确定量(文库有效浓度高于 2 nmol/L), 以保证文库质量。库检合格后, 把不同文库按照有效浓度及目标下机数据量的需求 pooling 后进行 Illumina 测序。测序平台使用 Illumina HiSeq $\times 10$ (Illumina, 美国), S4 套组组件。测序片段被高通量测序仪测得的图像数据经 CASAVA 碱基识别转化为序列数据 (reads), 文件为 fastq 格式, 其中主要包含测序片段的序列信息以及其对应的测序质量信息。

1.5 转录组数据预处理和注释

测序获得的原始数据去除带接头的、无法确定碱基信息的以及低质量的 reads, 以保证数据分析的质量和可靠性。使用 HISAT2 软件将 clean reads 与厚壳贻贝参考基因组进行快速精确比对, 获取 Reads 在参考基因组上的定位信息。参考基因和基因组注释文件下载自 NCBI 网站 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_011752425.2/)。所获得的 clean reads 用 StringTie 软件进行组装拼接。将贻贝参考基因组转录本序列分别与 GO、KEGG、KO 和 PPI 等数据库进行比对注释, 从而全面获得注释信息。

1.6 差异表达基因

使用 subread 软件中的 Feature Counts 工具对基因进行定量分析。根据基因比对在参考基因组上的位置信息, 从而统计每个基因(包括新预测基因)从起始到终止范围内覆盖的 reads 数。分别过

滤掉比对质量值低于 10 的 reads, 非成对比对上的 reads, 比对到基因组多个区域的 reads。通过 DESeq2 软件在 $P < 0.05$ 且 $|\log_2(\text{Fold Change})| \geq 1$ 、 $P_{\text{adj}} \leq 0.05$ 条件下进行饥饿胁迫的差异显著性分析^[16]。采用 Cluster Profiler 软件对差异基因集进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析, 以 $P_{\text{adj}} < 0.05$ 作为显著性富集的阈值。

1.7 实时荧光定量 PCR 验证

随机选取 14 个显著差异表达的基因进行荧光定量 PCR 验证, 包括 5 个上调和 9 个下调基因。荧光定量 PCR 引物设计和合成均由上海生工生物工程股份有限公司完成。基因名称和引物序列见表 1, β -actin 作为内参基因。每个基因进行 3 次平行实验, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量法计算基因的相对表达量。

1.8 数据分析

所有实验数据均以平均值 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示。使用 SPSS 22.0 软件进行数据的统计学分析, 并使用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 中的 Duncan 氏进行多重比较, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 长期饥饿下贻贝的存活率

与对照组相比, 饥饿组贻贝的存活率随饥饿时间的延长呈不断下降趋势。在实验的 0~8 d, 两组贻贝存活率均为 100%, 饥饿组从实验第 9 天开始出现死亡, 且实验第 9~35 天饥饿组贻贝存活率显著下降 ($P < 0.05$), 最低值达到 87%。在实验第 36~90 天, 饥饿组贻贝存活率变化不显著 ($P > 0.05$), 第 60 天时饥饿组存活率达到最低 86%, 随后保持不变直至实验结束。对照组存活率呈下降趋势, 但差异不显著 ($P > 0.05$), 在实验第 60 天时, 存活率达到最低值 96% 后保持稳定 (图 1)。

2.2 转录组数据的统计及参考基因组比对

通过对对照组和饥饿组的厚壳贻贝性腺组织进行转录组测序, 分别平均获得 46 519 559 和 46 310 607 条原始数据。碱基质量及组成分析显示, GC 含量区间为 36.49%~37.45%, 各样品 Q20 碱基百分比均超过 97.6%, Q30 碱基百分比超过 92.76%。对原始数据过滤, 即去除含有带接头的、低质量的序列, 分别平均获得 43 496 069 和 46 310 607

表 1 qRT-PCR 引物序列
Tab. 1 Primer sequences used in qRT-PCR

基因编号 gene ID	基因名称 gene name	引物序列 (5'-3') primer sequence
<i>M. coruscus</i> _chr11_2647	Serpin	F: TGCCAAATGCTGGTGTAGGACTC R: TGTGTCTTCAGACCGCTTACAAGTG
<i>M. coruscus</i> _chr5_2607	F5_F8_type_C	F: TGTCTGTCAACTCACTGCGTCAAC R: GTTGTGCGTTGTGGTGGTGGTAGTAG
<i>M. coruscus</i> _chr10_0674	CUB	F: CGAGAAGGAGATGTGGCGATGC R: TTCGTTTCACTCATGTCCCCTTTGG
<i>M. coruscus</i> _chr2_2711	Unknown	F: ACTTTGAAGGGGATGGCAGTAAACC R: CGGCAACAAGAATGGCGATGATTG
<i>M. coruscus</i> _chr2_0359	I-set	F: GGTCAAGACTGCCTCCAGATGTG R: TCTTCATCACCACGCTGACAACCTG
<i>M. coruscus</i> _chr4_0952	HSP70	F: GTCTCCACCGCCGTACACATTAC R: GCCCATCATTGTCCCTTCTCTTC
<i>M. coruscus</i> _chr11_2374	Lectin_C	F: ACAGGAAGAAGTGGACACCGTAAAC R: CATCACTCGGCGGCAGATTACG
<i>M. coruscus</i> _chr10_1607	Unknown	F: GATGTGCTGTATCGGTGTGTAGGAG R: AGGTCGGGTCTGTATCACTCAG
<i>M. coruscus</i> _chr13_1607	Lectin_C	F: GTCACGATCCAATGGGTGTCCTG R: TTCGCTTCTTCCACGATTCTCAG
<i>M. coruscus</i> _chr13_1410	Unknown	F: TCGATGGACTGCCAGGAGTTACG R: TCTGTCTGATCCACGCAGTACCTC
<i>M. coruscus</i> _chr1_1650	MFS_1	F: GGCAGGATTTCACTACAGTGGATGG R: CTGTCGTAGACGCCAGAGAATTCTG
<i>M. coruscus</i> _chr3_0740	Mcm5	F: AGGGAAGTAGTGTCTGCTGGTCTC R: ACACCTCCGTCTGCTAGAACCATAG
<i>M. coruscus</i> _chr4_1819	RPA3	F: GGTCAGGTGGATGGACAGAACAAC R: TGGACATAAGTCTGTGGAAGTCTGC
<i>M. coruscus</i> _chr8_1745	glucose-6-phosphatase	F: TTCACCCAACAACGCACAAACAAG R: ACATTTGCCCTGCCCGTTCTTC
β -actin	β -actin	F: ATGAAACCACCTACAACAGT R: TAGACCCACCAATCCAGACG

条的 clean reads。将 clean reads 与参考基因组进行精确比对, 获取 reads 在参考基因组上的定位信息后, 对照组和饥饿组各获得平均为 26 810 506 和 31 596 762 的唯一比对上的数据 (表 2)。所有样本转录组测序的原始数据已上传至 NCBI 的 SRA 数据库 (<https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/subs/sra>), 登录号为 PRJNA930147。

2.3 差异表达基因分析

通过 DESeq2 软件在 $P < 0.05$ 且 $|\log_2(\text{Fold Change})| \geq 1$ 、 $P_{\text{adj}} \leq 0.05$ 条件下进行基因的差异表

达分析^[16], 饥饿组和对照组相比较, 共有 4 130 个显著差异表达基因, 其中显著上调的基因有 2 082 个, 显著下调的基因有 2 048 个 (图 2)。显著上调表达的基因主要有 C 型凝集素、过氧化物酶、热休克蛋白 70、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶以及 *wnt* 等。显著下调的基因主要包括微小染色体维持蛋白 (*mcm*) 家族、DNA 连接酶、6-磷酸葡萄糖酶、*mtorc1* 以及复制蛋白 A 等。

2.4 差异表达基因 GO 功能注释和富集分析

GO 功能注释结果表明, 共有 13 383 个基因

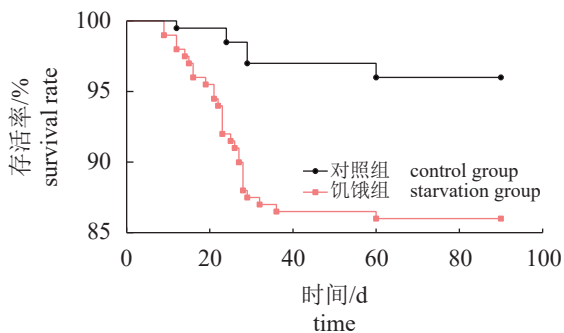


图 1 不同饥饿时间下饥饿组和对照组厚壳贻贝的存活率

Fig. 1 Survival rate of *M. coruscus* in starvation and control group at different starvation times

注释到 847 个 GO term 中, 其中包括: 生物过程 481 个、细胞组分 98 个、分子功能 268 个。通过差异基因的富集分析, 差异基因最显著富集的 GO 功能主要包括蛋白质复合物、细胞器部分、细胞内细胞器部分、非膜性细胞器、细胞内膜结合细胞器、酸酐水解酶活性、水解酶活性、脱氧核糖核酸代谢过程、细胞器组织、应激反应等(图 3)。

2.5 差异表达基因的 KEGG 功能注释和富集分析

KEGG 代谢通路注释分析显示, 共有 8 119 个差异表达基因被分类到 128 条 KEGG 代谢通路中。本实验选取了前 20 个最显著富集代谢通路, 依次是泛素介导性蛋白酶解、吞噬体、DNA 复制、剪接体、氨基糖和核苷酸糖代谢、Fanconi 贫血通路、蛋白酶体、核苷酸切除修复、真核生物的核糖体生物合成、错配修复、氨基酸的生物合成、同源重组、甘氨酸和丝氨酸以及苏氨酸代谢、基底切除修复、半乳糖代谢、AGE-RAGE 信号通路、甘油脂代谢、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢、叶酸合成和叶酸-碳库代谢通路(图 4)。在饥饿胁迫下, DNA 复制、错配修复、碱基切除修复等与细胞分裂有关的代谢通路显著富集, 相关基因的表达量显著下降。

迫下, DNA 复制、错配修复、碱基切除修复等与细胞分裂有关的代谢通路显著富集, 相关基因的表达量显著下降。

2.6 荧光定量 PCR 验证

从显著差异表达基因中随机挑选 14 个进行 qRT-PCR 验证(图 5)。结果显示, 被测基因的表达变化与转录组测序结果一致, 表明转录组数据分析是真实可信的。

2.7 贻贝性腺组织中能量代谢相关酶活性

饥饿胁迫处理对厚壳贻贝性腺组织中 HK、PFK、SDH、MDH 和 PEPCK 的活性变化见图 6。结果显示, 与对照组相比, 饥饿胁迫 90 d 后, 厚壳贻贝性腺组织中 HK、PFK、MDH 和 SDH 活性均显著降低 ($P < 0.05$), 而 7PEPCK 活性显著升高 ($P < 0.05$)。

3 讨论

厚壳贻贝因其营养价值高、养殖周期短、抗病能力强而成为我国沿海地区重要的经济贝类之一, 特别是在浙江省嵊泗县, 贻贝养殖已成为该地区经济发展的支柱产业^[1]。由于贻贝自稚贝包苗开始就全部依靠海域的天然饵料摄食生长, 因此, 海域饵料的分布不均和寒冷季节的饵料不足严重影响贻贝的生长和育肥^[17]。而目前关于饥饿胁迫对贻贝影响的研究较少, 对贻贝的饥饿耐受力以及适应机制并不清楚。贻贝体内的性腺是最大的可食用部分, 也是育肥和繁殖后代最为关键的组织, 饥饿胁迫下性腺的生理变化和分子调控直接影响到贻贝的品质。目前已有研究表明, 在短期饥饿状态下贻贝通过激活自噬途径以及能量代谢方面的调控来调节代谢水平和能量分配^[4], 以适应食物短缺对机体造成的威胁。本项目以厚

表 2 转录组数据统计情况

Tab. 2 Data statistics of transcriptome

样本 samples	原始数据 raw reads	Clean 数据 Clean reads	total map	unique map	GC 含量/% GC content
饥饿组1	46 346 068	43 854 810	31 816 716	29 784 429	36.77
饥饿组2	47 174 704	44 757 772	32 276 963	30 313 500	36.49
饥饿组3	45 411 048	43 562 532	30 696 606	28 680 840	37.08
对照组1	45 400 312	42 993 324	27 108 186	25 340 174	37.45
对照组2	48 900 244	45 089 842	26 782 786	25 105 701	36.77
对照组3	45 258 122	42 405 040	26 540 545	25 050 605	37.09

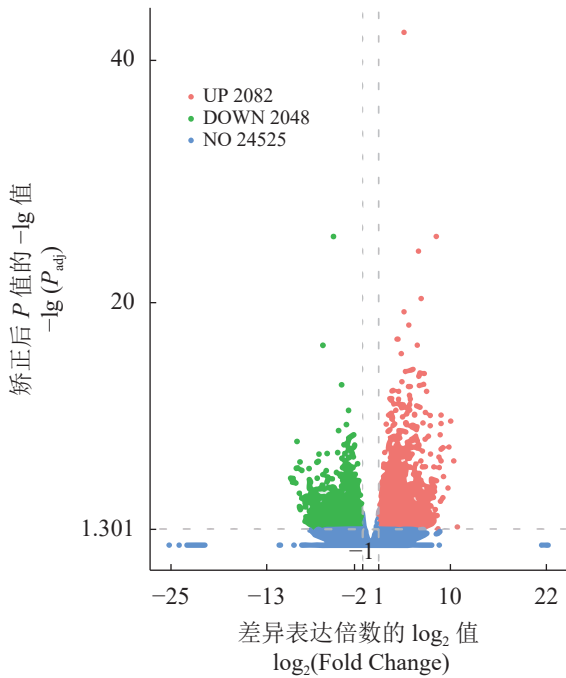


图2 饥饿组和对照组差异表达基因火山图

火山图中的点代表有显著表达差异的基因, 红色点代表上调差异表达基因, 绿色点代表下调差异表达基因, 蓝色点代表非差异表达基因。

Fig. 2 Volcano plot of differentially expressed genes between starvation and control groups

Each dot in the volcano plot represents a gene, where red dots represent up-regulated differentially expressed genes, green dots represent down-regulated differentially expressed genes, and blue dots represent non-differentially expressed genes.

壳貽贝为研究对象, 探究其长期饥饿下的存活状况并进行性腺组织的转录组测序分析, 结合性腺中能量代谢相关酶活性的变化, 全面解析厚壳貽贝在长期饥饿下的生存策略以及能量调控和代谢响应机制。

本研究的结果显示, 厚壳貽贝在 90 d 的饥饿胁迫下存活率为 86%, 相较于鱼类和其他软体动物类而言, 貽贝具有较强的饥饿耐受性。如管角螺 (*Hemifusus tuba*) 在饥饿 40 d 后存活率为 100%^[18], 但随着饥饿时间的延长, 其存活率是否下降并没有可参考数据。仿刺参 (*Apostichopus japonicus*) 在饥饿 40 天后存活率下降至 32%^[19]。马氏珠母贝 (*Pinctada martensi*) 在饥饿 12 d 后存活率为 89.9%^[20]。雪蟹 (*Chionopectes opilio*) 在饥饿 119 d 时存活率仅为 40%^[21]。由此可见, 貽贝在软体动物中对长期饥饿具有一定的耐受力, 这种饥饿耐受的背后必然存在一定的生理响应和分子调控机制。

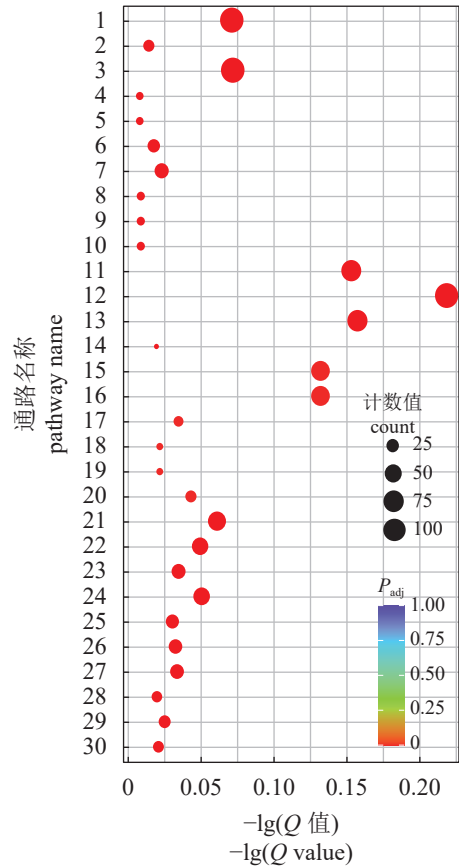


图3 厚壳貽贝性腺组织差异表达基因的GO功能富集分析结果

1. 水解酶活性, 2. DNA 催化作用, 3. 酸酐水解酶活性, 4. ATP 依赖性微管运动活动, 5. 微管, 6. 微管动力活性, 7. 运动活性, 8. 肿瘤坏死因子受体, 9. 肿瘤坏死因子受体结合, 10. 细胞因子受体结合, 11. 细胞内细胞器部分, 12. 蛋白质复合物, 13. 细胞器部分, 14. 蛋白酶体核心复合物, 15. 细胞内膜结合细胞器, 16. 非膜性细胞器, 17. 染色体部分, 18. 内肽酶复合物, 19. 蛋白酶体复合物, 20. 染色体, 21. 脱氧核糖核酸代谢过程, 22. 应激反应, 23. 微管过程, 24. 细胞器组织, 25. 微管运动, 26. 细胞或亚细胞成分的运动, 27. 染色体组织, 28. 免疫反应, 29. DNA 复制, 30. 免疫系统过程。

Fig. 3 GO functional enrichment statistics chart of differentially expressed genes of gonad tissue

1. hydrolase activity, 2. catalytic activity, acting on DNA, 3. hydrolase activity, acting on acid anhydrides, 4. ATP-dependent microtubule motor activity, 5. microtubule, 6. microtubule motor activity, 7. motor activity, 8. tumor necrosis factor receptor, 9. tumor necrosis factor receptor binding, 10. cytokine receptor binding, 11. intracellular organelle part, 12. protein-containing complex, 13. organelle part, 14. proteasome core complex, 15. intracellular non-membrane-bounded organelle, 16. non-membrane-bounded organelle, 17. chromosomal part, 18. endopeptidase complex, 19. proteasome complex, 20. chromosome, 21. DNA metabolic process, 22. response to stress, 23. microtubule-based process, 24. organelle organization, 25. microtubule-based movement, 26. movement of cell or subcellular component, 27. chromosome organization, 28. immune response, 29. DNA replication, 30. immune system process.

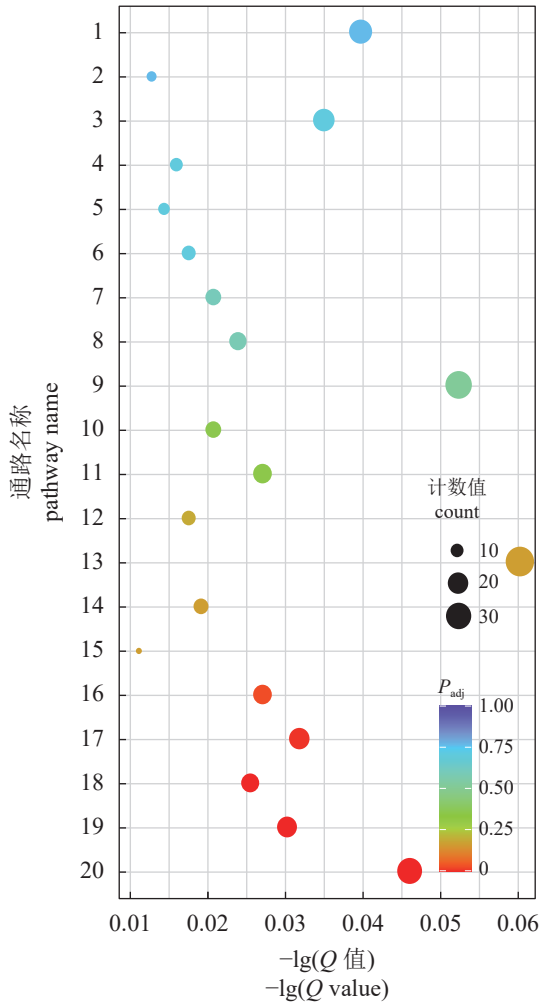


图 4 厚壳贻贝性腺组织差异表达基因的 KEGG 功能富集分析结果

1. 剪接体, 2. 叶酸合成, 3. 氨基糖和核苷酸糖代谢, 4. 甘油脂代谢, 5. 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢, 6. AGE-RAGE 信号通路, 7. 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢, 8. 氨基酸的生物合成, 9. 吞噬体, 10. 同源重组, 11. 真核生物核糖体合成, 12. 半乳糖代谢, 13. 泛素介导蛋白水解, 14. 碱基切除修复, 15. 叶酸-碳库代谢通路, 16. 核酸切除修复, 17. 范可尼贫血通路, 18. 错配修复, 19. 蛋白酶体, 20. DNA 复制。

Fig. 4 KEGG functional annotation statistics of differentially expressed genes of gonad tissue

1. spliceosome, 2. folate biosynthesis, 3. amino sugar and nucleotide sugar metabolism, 4. glycolipid metabolism, 5. alanine, aspartate and glutamate metabolism, 6. AGE-RAGE signaling pathway, 7. glycine, serine and threonine metabolism, 8. biosynthesis of amino acids, 9. phagosome, 10. homologous recombination, 11. ribosome biogenesis in eukaryotes, 12. galactose metabolism, 13. ubiquitin mediated proteolysis, 14. base excision repair, 15. one carbon pool by folate, 16. nucleotide excision repair, 17. Fanconi anemia pathway, 18. mismatch repair, 19. proteasome, 20. DNA replication.

为深入解析贻贝长期饥饿下的生理变化和调控机制, 对饥饿 90 d 的厚壳贻贝性腺组织进行了

转录组测序和分析, 结果显示与细胞增殖有关的 DNA 复制通路显著富集, 该通路上的相关基因表达量均显著下降 (图 7)。DNA 复制是细胞有丝分裂过程中的重要环节, 有丝分裂细胞周期是一个受多种因素调控的复杂过程, 其中细胞周期蛋白是控制细胞周期的重要因素, 可被细胞周期蛋白依赖的激酶激活^[22]。如 Wee1 作为一种核激酶, 可以通过抑制细胞周期蛋白 CDK 的活性来阻止细胞进行有丝分裂, CDK 则在细胞分裂过程中维持正常的有丝分裂, 发挥着关键作用^[23]。长期饥饿下性腺的转录组数据表明, 细胞周期蛋白依赖性蛋白 1 (CDK1) 和细胞周期蛋白依赖性蛋白 2 (CDK2) 的表达均显著下调, 由此说明贻贝通过调节细胞周期蛋白依赖性蛋白表达来调控细胞周期, 减少细胞分裂过程以维持饥饿过程。

此外, E2F3 在细胞周期调控中也到起关键作用^[24], CDC6 和 MCM 蛋白等大量编码 DNA 复制活性基因的转录受细胞生长调节, 并依赖于 E2F3^[25], CDC6 是 DNA 复制的重要调节因子, 在细胞周期进程从 S 期到 M 期的转变中发挥重要作用^[26]。MCM 是一种由 6 个亚基组成的 DNA 解旋酶, 是基因组 DNA 复制所必需的^[27]。CDC20 对于细胞分裂的调节也是必不可少的, 此外它另一个重要的功能是促进染色单体的分离^[28]。本研究显示, 在饥饿胁迫下贻贝性腺中 *e2f3*、*cdc20* 和 *mcm5* 基因的表达量均显著下调, 转录组数据进一步显示, 长期饥饿下贻贝性腺中的 *mcm2*、*mcm3*、*mcm4*、*mcm5*、*mcm6* 和 *mcm7* 的表达量均显著下调, 而复制蛋白 A (RPA) 在饥饿时也显著下调, 它是一种普遍存在的 ssDNA 结合蛋白, 在许多 DNA 加工途径中起作用, 以维持基因组完整性^[29]。

有丝分裂是细胞周期的一部分, 其中复制的姐妹染色单体被分成两条染色体, 本研究中与有丝分裂相关的基因 (*ncapd2*、*ncapg*、*smc2* 和 *smc4*) 表达也均显著下调, 而 NCAPD2、NCAPG、SMC2 和 SMC4 参与染色体凝聚^[26-27, 30]。已有的研究显示, 细胞增殖可以使水生生物因饥饿而无法生存^[31]。而在饥饿胁迫下贻贝下调的基因多与细胞周期、DNA 复制、有丝分裂等相关, KEGG 代谢通路富集结果进一步显示细胞周期显著富集。由此可推断, 当贻贝遭受长期饥饿胁迫时, 其细胞生长几乎处于停滞状态, 细胞内的 DNA 复制均处于较低的水平, 以尽可能地维持细胞稳态, 从而减少能量消耗, 最大程度延长生命和代谢。

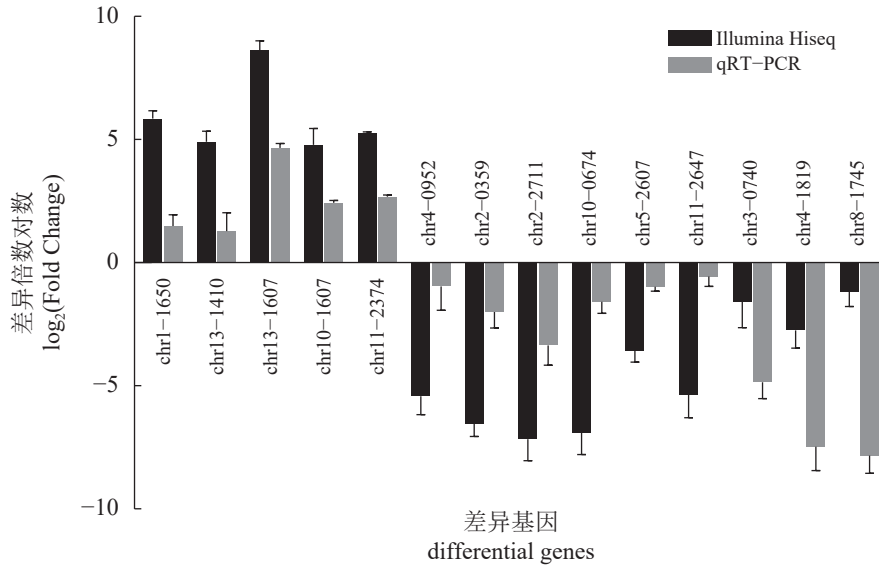


图 5 差异表达基因的 qRT-PCR 及转录组的比较分析

Fig. 5 Comparison of DEGs by qRT-PCR and transcriptome analysis

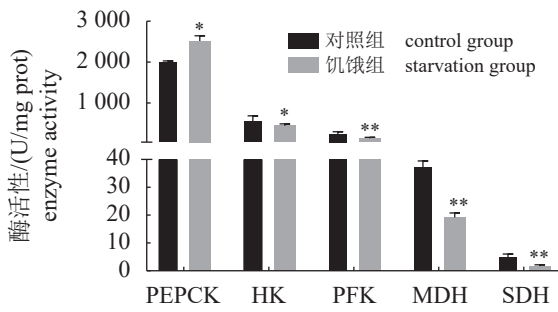


图 6 饥饿胁迫下贻贝性腺组织中能量代谢相关酶活性变化

PEPCK.磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶, HK.己糖激酶, PFK.磷酸果糖激酶, MDH.苹果酸脱氢酶, SDH.琥珀酸脱氢酶, 下同“*”代表显著差异, $P < 0.05$; “**”代表极显著差异, $P < 0.01$ 。

Fig. 6 Changes of enzyme activities related to energy metabolism in gonad tissue under starvation

PEPCK. phosphoenolpyruvate carboxykinase, HK. hexokinase, PFK. phosphofructokinase, MDH. malate dehydrogenase, SDH. succinate dehydrogenase, the same below. “*” represents significant difference, $P < 0.05$; “**” represents very significant difference, $P < 0.01$.

此外, 在贻贝转录组的差异表达基因中也筛选到多个与糖酵解和糖异生等能量代谢相关的差异表达基因。糖酵解和糖异生是碳水化合物合成和分解的重要代谢途径^[32], 在饥饿状态下, 水生动物一般会通过抑制糖酵解和磷酸戊糖相关酶和激活糖异生相关酶活性来调节糖代谢从而维持血糖平衡^[33]。葡萄糖是许多组织所必需的能量来源, 为了在长期饥饿中满足代谢要求并保持稳定的葡萄糖水平, 水生动物会激活糖原分解或从头合成

葡萄糖的过程(糖异生)^[34]。因此, 促进非碳水化合物前体从头合成葡萄糖的糖异生作用对水生动物的葡萄糖动态平衡至关重要^[35]。饥饿胁迫会引起大多数水生动物的糖异生的增加和与糖异生相关的基因的 mRNA 水平的上调。在本研究中, 饥饿 3 个月的贻贝葡萄糖异生酶 PEPCK 的表达显著上调, PEPCK 能催化草酰乙酸脱羧转变为磷酸烯醇式丙酮酸, 是糖异生途径的关键限速酶。控制 PEPCK 活性对维持正常血糖水平有着重要意义, PEPCK 的上调意味着饥饿胁迫下贻贝的糖异生速率增加, 通过糖异生作用的促进来维持饥饿期间的葡萄糖动态平衡, 类似的结果在异育银鲫^[11]和中华蛸 (*Octopus sinensis*)^[36]中也有报道。此外, 饥饿胁迫也会抑制葡萄糖利用率。糖酵解途径的主要限速酶是 PFK 和 HK, 其中 PFK 是衡量碳水化合物利用的重要代谢酶^[37], HK 催化葡萄糖生成 6-磷酸葡萄糖^[38]。本研究中, 与对照组相比, 饥饿胁迫组的 PFK 和 HK 活性均显著下调, 说明贻贝在饥饿状态下通过抑制糖酵解来调节葡萄糖代谢。生物在遭受饥饿胁迫时, 需要降低能量的消耗来维持基本生存, 糖酵解限速酶的下调意味着与葡萄糖转化相关的信号通路受到抑制。如虹鳟的葡萄糖激酶编码基因表达水平和酶活性在禁食 14 d 后下降^[9], 与本研究的结果一致。另外, SDH 和 MDH 是三羧酸循环途径中调控脱氢反应的关键酶^[39], 可在一定程度上反映水生动物的有氧代谢水平^[40], 研究表明, 贻贝在饥饿后性腺组织 SDH 活性和 MDH 活性显著降低, 说明在饥

饿状态下尽可能减少葡萄糖的消耗以维持血糖浓度, 这也是贻贝面对饥饿胁迫时的能量代谢生理响应对策^[41]。由此可见, 贻贝在饥饿状态下通过调节能量代谢有关的酶活性来维持血糖水平从而维持基本生存。

综上所述, 贻贝对饥饿胁迫的响应是受一系

列的生理活动的调节和能量代谢的调控而实现的, 与细胞周期相关的代谢通路 DNA 复制、能量代谢相关的基因表达以及相关酶活性的改变构成了贻贝长期饥饿下的复杂的代谢调控网络(图 7), 而该代谢网络图上的相关基因功能的验证还有待进一步研究。

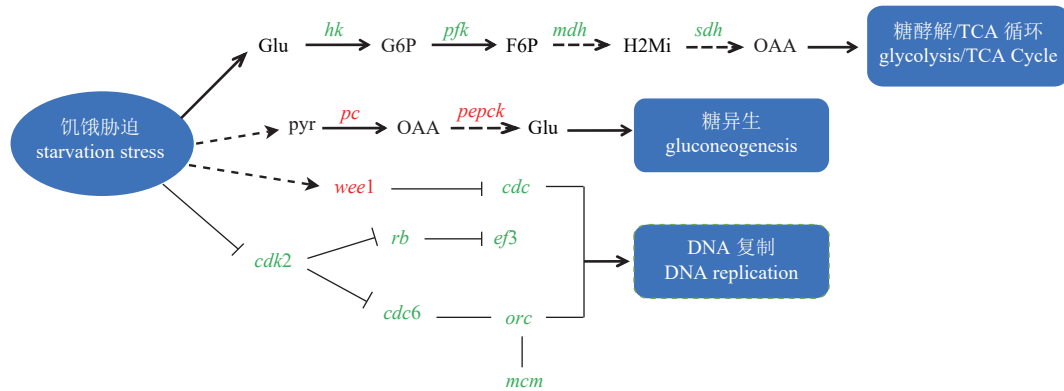


图 7 饥饿胁迫下葡萄糖代谢和 DNA 复制相关差异表达基因网络图

红色字体为显著上调表达基因, 绿色字体为显著下调基因。

Fig. 7 Network diagram of differentially expressed genes related to glucose metabolism and DNA replication under starvation stress

Significantly up-regulated genes are marked in red, significantly down-regulated genes are in green.

4 结论

本实验探究了长期饥饿下贻贝的存活率和性腺的转录组变化以及能量代谢相关酶活性的变化, 全面解析贻贝对长期饥饿的生理响应策略和分子调控机制。研究结果显示, 厚壳贻贝在饥饿 90 d 时的存活率为 86%, 相较于鱼类和其他软体动物而言, 贻贝具有较强的饥饿耐受性。通过比较饥饿组和对照组的转录组, 发现贻贝通过调控能量代谢相关基因以及 DNA 复制相关通路来应对长期饥饿造成的损伤。转录组鉴定到一些参与贻贝能量代谢相关酶的基因 (*hk*、*pfk*、*mdh*、*sdh*、*pepck* 和 *pc* 等), 表明贻贝在长期饥饿胁迫下通过调控相关的能量代谢酶来满足代谢要求, 并保持稳定的葡萄糖水平, 从而维持自身生存。此外在饥饿胁迫下, DNA 复制、错配修复、碱基切除修复等与细胞分裂有关的代谢通路显著富集, 相关基因的表达量显著下降, 从而减少不必要的能量消耗, 最大程度地延长生命和代谢。本研究为深入解析贻贝饥饿胁迫下的生理生化响应和分子机制提供重要的理论依据, 同时为揭示其适应饥饿胁迫的能量利用和分配策略提供有效的途径。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

[1] 叶莹莹, 徐梅英, 吴常文. 几种环境因子对厚壳贻贝浮游幼虫生长与存活的影响[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2011, 30(4): 292-296.
Ye Y Y, Xu M Y, Wu C W. Influences of some environmental factors on growth and survival of *Mytilus coruscus* Gould larvae[J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science Edition), 2011, 30(4): 292-296 (in Chinese).

[2] 李斯远, 何治江, 吕泓玥, 等. 厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)养殖海域与天然生长海域的微生物群落比较研究[J]. 海洋与湖沼, 2021, 52(1): 196-205.
Li S Y, He Z J, Lü H Y, et al. Comparative study on microbial community in mussel *Mytilus coruscus* body and seawater of its natural and cultural sea area in Zhoushan, Zhejiang[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2021, 52(1): 196-205 (in Chinese).

[3] 李一峰, 杨金龙, 王冲, 等. 厚壳贻贝早期幼虫低温保存的影响研究[J]. 水产学报, 2012, 36(1): 73-77.
Li Y F, Yang J L, Wang C, et al. Study on refrigeration of the early larvae of the mussel *Mytilus coruscus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(1): 73-77 (in Chinese).

- [4] Xie B, Chen C Y, Zhang X L, *et al.* Response of the metabolic and autophagy pathways in *Mytilus* under starvation[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2022, 9: 1014336.
- [5] 林小涛, 周小壮, 于赫男, 等. 饥饿对南美白对虾生化组成及补偿生长的影响[J]. 水产学报, 2004, 28(1): 47-53.
- Lin X T, Zhou X Z, Yu H N, *et al.* The effects of starvation on biochemical composition and compensatory growth in *Penaeus vannamei*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2004, 28(1): 47-53 (in Chinese).
- [6] Zheng Y, Yang Y M, Xu Y F, *et al.* Starvation shrinks the mussel foot secretory glands and impairs the byssal attachment[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2022, 9: 1046466.
- [7] Kiyomoto S, Murakami K, Kimura R, *et al.* Influence of food availability on gonad volumes in abalone *Haliotis gigantea*[J]. *Fisheries Science*, 2016, 82(3): 315-320.
- [8] Fan X T, Cui L, Hou T T, *et al.* Stress responses of testicular development, inflammatory and apoptotic activities in male zebrafish (*Danio rerio*) under starvation[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2021, 114: 103833.
- [9] 杨扬. 光倒刺鲑饥饿应激的转录组分析及其生长相关基因的克隆 [D]. 广州: 广州大学, 2018.
- Yang Y. Transcriptome analysis reveals effect of fasting and refeeding on growth of *Spinibarbus hollandi* and characterization of growth-related genes in *S. hollandi*[D]. Guangzhou: Guangzhou University (in Chinese).
- [10] Soengas J L, Polakof S, Chen X, *et al.* Glucokinase and hexokinase expression and activities in rainbow trout tissues: changes with food deprivation and refeeding[J]. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2006, 291(3): R810-R821.
- [11] 李锐鑫, 刘泓宇, 谭北平, 等. 饥饿及再投喂处理对草鱼生长、葡萄糖代谢和转运蛋白1表达的影响[J]. *中国水产科学*, 2018, 25(1): 74-85.
- Li Y X, Liu H Y, Tan B P, *et al.* Effects of starvation and refeeding on growth performance, glucose metabolism, and expression of glucose transporter 1 in *Ctenopharyngodon idella*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(1): 74-85 (in Chinese).
- [12] Li H Y, Xu W J, Jin J Y, *et al.* Effects of starvation on glucose and lipid metabolism in gibel carp (*Carassius auratus gibelio* var. CAS III)[J]. *Aquaculture*, 2018, 496: 166-175.
- [13] Mahapatra E, Dasgupta D, Bhattacharya N, *et al.* Sustaining immunity during starvation in bivalve mollusc: a costly affair[J]. *Tissue and Cell*, 2017, 49(2): 239-248.
- [14] Liu S K, Wang X L, Sun F Y, *et al.* RNA-Seq reveals expression signatures of genes involved in oxygen transport, protein synthesis, folding, and degradation in response to heat stress in catfish[J]. *Physiological Genomics*, 2013, 45(12): 462-476.
- [15] 温敬敬, 王蕾, 王金厢, 等. 珍珠龙胆石斑鱼有水保活中肌肉品质及生理生化指标的变化 [J]. *水产科学*, 2022, 42(6): 945-954.
- Wen J J, Wang L, Wang J X, *et al.* Changes of muscle quality and physiochemical properties of pearl gentian[J]. *Fisheries Science*, 2022, 42(6): 945-954 (in Chinese).
- [16] 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.
- [17] Chen C Y, Xie B, Sun W J, *et al.* Examination of the role of resveratrol in attenuating oxidative damage induced by starvation stress in the marine mussel, *Mytilus coruscus*, through regulation of the sirt1-mediated signaling pathway[J]. *Aquaculture*, 2023, 564: 739047.
- [18] 王双健, 丁玉惠, 江茂旺, 等. 饥饿时间对管角螺生长、生化组成、消化酶活性和抗氧化指标的影响[J]. *动物营养学报*, 2018, 30(1): 138-146.
- Wang S J, Ding Y H, Jiang M W, *et al.* Effects of starvation time on growth, biochemical composition, enzyme activities and antioxidant indexes of *Hemifusus tuba* Gmelin[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2018, 30(1): 138-146 (in Chinese).
- [19] 田青, 荣小军, 李彬, 等. 饥饿胁迫对刺参(*Apostichopus japonicus*)免疫和生长的影响[J]. *渔业科学进展*, 2014, 35(4): 71-76.
- Tian Q, Rong X J, Li B, *et al.* Starvation stress effect on the immunity and growth of sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(4): 71-76 (in Chinese).
- [20] 何毛贤, 袁涛, 黄良民. 马氏珠母贝饥饿补偿生长的初步研究[J]. *热带海洋学报*, 2010, 29(6): 143-146.
- He M X, Yuan T, Huang L M. Preliminary study on compensatory growth in pearl oyster *Pinctada martensi* Dunker, following starvation[J]. *Journal of Tropical*

- Oceanography, 2010, 29(6): 143-146 (in Chinese).
- [21] Hardy D, Dutil J D, Godbout G, *et al.* Survival and condition of hard shell male adult snow crabs (*Chionoecetes opilio*) during fasting at different temperatures[J]. *Aquaculture*, 2000, 189(3-4): 259-275.
- [22] Nigg E A. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle[J]. *BioEssays*, 1995, 17(6): 471-480.
- [23] Den Haese G J, Walworth N, Carr A M, *et al.* The Wee1 protein kinase regulates T14 phosphorylation of fission yeast Cdc2[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 1995, 6(4): 371-385.
- [24] Dai X X, Duan X, Liu H L, *et al.* Chk2 regulates cell cycle progression during mouse oocyte maturation and early embryo development[J]. *Molecules and Cells*, 2014, 37(2): 126-132.
- [25] Leone G, DeGregori J, Yan Z, *et al.* E2F3 activity is regulated during the cell cycle and is required for the induction of S phase[J]. *Genes & Development*, 1998, 12(14): 2120-2130.
- [26] Liu J, Smith C L, DeRyckere D, *et al.* Structure and function of Cdc6/Cdc18: implications for origin recognition and checkpoint control[J]. *Molecular cell*, 2000, 6(3): 637-648.
- [27] Yang Y, Zhou H Q, Shu H, *et al.* Effect of fasting and subsequent refeeding on the transcriptional profiles of brain in juvenile *Spinibarbus hollandi*[J]. *PLoS One*, 2019, 14(3): e0214589.
- [28] Weinstein J, Jacobsen F W, Hsu-Chen J, *et al.* A novel mammalian protein, p55CDC, present in dividing cells is associated with protein kinase activity and has homology to the *Saccharomyces cerevisiae* cell division cycle proteins Cdc20 and Cdc4[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1994, 14(5): 3350-3363.
- [29] Wieser T A, Wuttke D S. Replication protein a utilizes differential engagement of its DNA-binding domains to bind biologically relevant ssDNAs in diverse binding modes[J]. *Biochemistry*, 2022, 61(22): 2592-2606.
- [30] Schmiesing J A, Ball Jr A R, Gregson H C, *et al.* Identification of two distinct human SMC protein complexes involved in mitotic chromosome dynamics[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(22): 12906-12911.
- [31] Rescan P Y, Montfort J, Ralli re C, *et al.* Dynamic gene expression in fish muscle during recovery growth induced by a fasting-refeeding schedule[J]. *BMC Genomics*, 2007, 8(1): 438.
- [32] Jitrapakdee S. Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2012, 44(1): 33-45.
- [33] Nordlie R C, Foster J D, Lange A J. Regulation of glucose production by the liver[J]. *Annual Review of Nutrition*, 1999, 19(1): 379-406.
- [34] Caruso G, Denaro M G, Caruso R, *et al.* Response to short term starvation of growth, haematological, biochemical and non-specific immune parameters in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and blackspot sea bream (*Pagellus bogaraveo*)[J]. *Marine Environmental Research*, 2011, 72(1-2): 46-52.
- [35] Moon T W. Adaptation, constraint, and the function of the gluconeogenic pathway[J]. *Canadian Journal of Zoology*, 1988, 66(5): 1059-1068.
- [36] Sun Y L, Yao C J, Zhu Y F, *et al.* Metabolism response of fasting in *Octopus sinensis* paralarvae revealed by RNA-seq[J]. *Aquaculture*, 2022, 550: 737859.
- [37] Al Hasawi N, Alkandari M F, Luqmani Y A. Phosphofructokinase: a mediator of glycolytic flux in cancer progression[J]. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2014, 92(3): 312-321.
- [38] Laiz-Carri n R, Sangiao-Alvarellos S, Guzm n J M, *et al.* Energy metabolism in fish tissues related to osmoregulation and cortisol action[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2002, 27(3-4): 179-188.
- [39] Min rik P, Tom skov  N, Koll rov  M, *et al.* Malate dehydrogenases-structure and function[J]. *General Physiology and Biophysics*, 2002, 21(3): 257-265.
- [40] 庄平, 贾小燕, 冯广朋, 等. 盐度对中华绒螯蟹雌性亲蟹代谢的影响[J]. *中国水产科学*, 2012, 19(2): 217-222.
- Zhuang P, Jia X Y, Feng G P, *et al.* Effect of salinity on the metabolism of female Chinese crabs, *Eriocheir sinensis*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(2): 217-222 (in Chinese).
- [41] Novak C M, Jiang X L, Wang C F, *et al.* Caloric restriction and physical activity in zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Neuroscience Letters*, 2005, 383(1-2): 99-104.

Physiological and biochemical responses and gonad transcriptome analysis of *Mytilus coruscus* under long-term starvation

SUN Wenjing¹, CHEN Chuanyue^{1,2}, LIANG Zewei¹, LIAO Zhi¹,
YAN Xiaojun^{1,2}, ZHANG Xiaolin^{1*}

(1. College of Marine Science and Technology, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China;

2. College of Oceanology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Food is the main source of energy for animals, and food abundance affects animal bioenergetics in terms of how energy is allocated among growth, maturation, and reproduction. However, food resources are sometimes insufficient for mussel because of weather conditions, specific periods of their reproductive cycles and food restriction. Marine mussels are one of the most important marine genera globally and are widely distributed in estuarine and marine environments, as well as in the subtidal and intertidal zones, and are commercially important. In order to explore the physiological and biochemical responses and molecular adaptation mechanism of mussels under starvation stress, the survival rate statistics, energy metabolism related enzyme activity determination and gonad transcriptome sequencing and analysis were carried out on two-year *Mytilus coruscus* under normal feeding (control group) and starvation treatment (starvation group). The results showed that the survival rate of *M. coruscus* reached 86% after 90 days of starvation. Under starvation stress, the activities of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) were significantly increased, but the activities of hexokinase (HK), phosphofructokinase (PFK), succinate dehydrogenase (SDH) and malate dehydrogenase (MDH) were significantly decreased ($P < 0.05$). By Illumina HiSeq X10 high-throughput sequencing platform, 31 596 762 and 26 810 506 effective data with unique annotation on the genome of the control group and the starvation group were obtained, and 4 130 differentially expressed genes were screened. There were 2 082 up-regulated and 2 048 down-regulated genes. GO functional analysis showed that differential genes were mainly enriched in metabolic process, organelle tissue and enzyme activity. KEGG enrichment analysis showed that differential genes were significantly enriched in metabolic pathways related to cell division, such as DNA replication, mismatch repair and base excision repair. The results of this experiment showed that mussels could maintain their survival under starvation stress by reducing energy metabolism and slowing down cell division. This study preliminarily reveals the physiological and biochemical responses and molecular regulation mechanism of *M. coruscus* under starvation stress, which provides important theoretical basis for further analysis of the molecular strategies of mussels in response to starvation stress, and also provides new ideas for revealing their energy utilization and redistribution and physiological countermeasures to adapt to starvation stress.

Key words: *Mytilus coruscus*; long-term starvation; survival rate; energy metabolism enzyme activity; gonad transcriptome

Corresponding author: ZHANG Xiaolin. E-mail: zhangxiaolin@zjou.edu.cn

Funding projects: Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (LQ23D060002); National Natural Science Foundation of China (42020104009)