

海洋线虫 *Litoditis marina* 早期发育的转录组分析*

王彤彤^{1, 2, 3, 4} 张留所^{1, 2, 3①}

(1. 中国科学院海洋研究所 中国科学院实验海洋生物学重点实验室 山东青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋生物学与生物技术功能实验室 山东青岛 266237; 3. 中国科学院海洋大科学研究中心 山东青岛 266071; 4. 中国科学院大学 北京 100049)

摘要 全球气候和环境变化影响海洋动物的生长发育和繁殖等生命过程, 探究环境因子调控发育的分子机制, 需要深入了解海洋动物早期发育的生理和分子特征。以实验室驯化的潜在模式动物海洋线虫 *Litoditis marina* 为研究对象, 对其胚胎期和孵化后发育早期 2 h、4 h 和 6 h 的 L1 幼虫样品进行了转录组测序和分析。结果表明, 2 h、4 h 和 6 h 的 L1 幼虫间差异较小, 而三个 L1 幼虫样品与胚胎期相比, 基因表达发生了显著变化。通过 KEGG 富集分析, 发现与胚胎期相比, 三个 L1 幼虫样品的多个通路如核糖体、核糖体生物发生、糖酵解/糖原异生、TCA 循环和氧化磷酸化通路相关基因发生了显著上调。另外还发现多个神经递质和神经肽受体基因如 *dop-*和 *npr-*等在 L1 期转录水平显著上调。与胚胎期相比, L1 幼虫的多个 DNA 复制和修复相关、Notch、Hippo 和 Hedgehog 信号和剪切体等通路相关基因发生了显著下调。发现的 *L. marina* 早期发育转录组变化模式与已经发表的陆生模式生物秀丽线虫 *Caenorhabditis elegans* 从胚胎期到 L1 幼虫的转录组变化特征非常相似, 但同一上调或下调通路中具体发生表达变化的基因有些不同。另外, L1 幼虫显著上调的核糖体生物发生通路相关基因在秀丽线虫中发生了显著下调。进一步通过基因编辑等技术和方法深入研究发育调控关键基因的功能将为海陆近缘线虫间的发育进化机制、海洋线虫对潮间带环境适应以及全球气候变化应答的分子机制研究提供新认知。
关键词 海洋线虫; *Litoditis marina*; 早期发育; 核糖体; 能量; 代谢; 神经受体; DNA 复制和修复
中图分类号 Q344+.1 doi: 10.11693/hyhz20220300057

全球气候变化影响海洋动物的生长发育、繁殖和代谢等生命过程, 变化的海洋环境如何影响海洋动物发育的分子机制还不清楚。本研究团队构建了潜在的海洋线虫 *Litoditis marina* 模式动物研究体系和平台 (Xie *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2021), 动物早期发育阶段对环境变化非常敏感 (丛岩懿等, 2020; Xie *et al.*, 2021), 但海洋线虫早期发育的分子调控网络还不清楚。

秀丽线虫 *Caenorhabditis elegans* 的发育起始于受精卵, 经过多轮的细胞分裂和分化, 孵化为幼虫, 依次经历 L1、L2、L3 和 L4 共四个幼虫阶段发育成为具有多种组织和细胞类型的成虫 (Zhang *et al.*, 2015)。在 20 °C 的条件下, 秀丽线虫从 L1 幼虫发育到成虫约需

3 d (Zhang *et al.*, 2015)。Sulston 等科学家首次绘制出了秀丽线虫从受精卵到成体的完整细胞谱系, 在 20 °C 下, 从受精卵孵化为 L1 约需 16 h, 刚孵化的 L1 幼虫含 558 个细胞, 幼虫通过细胞分裂和分化并最终发育成具有 959 个体细胞的成体, 不同个体间细胞发育谱系高度一致 (Sulston *et al.*, 1977, 1983)。

研究发现约 3 千万年前分化的两种同属线虫 *C. elegans* 和 *C. briggsae* 在发育过程中 mRNA 和蛋白质的变化高度保守, 但同一物种内 mRNA 和蛋白质的变化关联较弱, 该报道也对秀丽线虫胚胎期和 L1 幼虫间的转录组变化特征进行了详细描述 (Grün *et al.*, 2014)。另一项研究报道胚胎时期几乎一半的基因表

* 国家重点研发项目, 2018YFD0901301 号; 青岛创业创新领军人才项目, Grant 16-8-3-19-zhc 号; 中国科学院海洋大科学研究中心重点部署项目, 2019.11~2022.11。王彤彤, 硕士研究生, E-mail: wangtongtong19@mails.ucas.ac.cn

通信作者: 张留所, 博士生导师, 研究员, E-mail: lzhang@qdio.ac.cn

收稿日期: 2022-03-10, 收修改稿日期: 2021-04-05

达参与 DNA 复制和染色质形成, 以实现快速的细胞分裂和细胞类型增加(Boeck *et al*, 2016)。通过单细胞转录组测序, 已有报道量化了 16 细胞期前基因表达变化, 发现胚胎期转录本多样性随着时间推移而增加(Tintori *et al*, 2016)。通过全长转录组测序分析, 研究报道秀丽线虫胚胎转录本比幼虫阶段的转录本长, 进一步揭示了秀丽线虫发育过程中转录组的动态变化(Li *et al*, 2020)。

我们团队聚焦的海洋线虫 *L. marina* 与陆生模式动物秀丽线虫同属线虫动物门小杆线虫科, 属于海-陆线虫近缘物种(Xie *et al*, 2020; Zhao *et al*, 2021)。秀丽线虫发育机制研究已经比较深入, 而海洋线虫早期发育阶段的研究基本处于未知阶段。海洋线虫 *L. marina* 为雌雄异体, 其发育起始于受精卵, 受精卵在线虫子宫内完成早期胚胎发育, 产出体外的胚胎(eggs)孵化后为 L1 幼虫, 20 °C 下, 从 L1 幼虫发育为成体约需 4~5 d (Xie *et al*, 2020, 2021)。*L. marina* 从 L1 幼虫发育为成体依次经过 L2、L3 和 L4 幼虫阶段, 从 L1 幼虫发育为 L2 约需 46 h, 从 L2 幼虫发育为 L3 约需 19 h, 从 L3 幼虫发育为 L4 约需 16 h, 而从 L4 幼虫发育为成体约需 15 h (Zhao *et al*, 2021)。研究人员通过绘制 *L. marina* 的胚胎发育细胞谱系, 发现 *L. marina* 与秀丽线虫胚胎细胞谱系同源性高达 95.5%, 但末端细胞分化命运的相似度只有 76.4%, 表明了细胞分化和发育命运决定机制在海陆线虫近缘种间既有相似性又有物种特异性(Houthoofd *et al*, 2003)。为了初步探究海洋线虫与秀丽线虫早期发育的异同, 本研究对 *L. marina* 胚胎时期和孵化后 L1 发育阶段 2 h、4 h 和 6 h 的样品进行了转录组测序和分析, 研究结果表明, 海洋线虫与秀丽线虫早期发育过程中的调控机制高度相似, 秀丽线虫作为一种优秀的模式生物, 具有丰富的研究资源, 这些资源将极大地辅助海洋线虫的基础生物学研究。同时进一步通过基因编辑和转基因营救等技术和方法深入比较研究 *L. marina* 和 *C. elegans* 发育调控关键基因的功能将为海-陆近缘线虫间的发育进化机制、海洋线虫对潮间带环境适应以及全球气候变化应答的分子机制研究提供新认知。

1 材料与方法

1.1 品系的获得与培养

本研究所用的海洋线虫 *L. marina* 野生型品系 HQ1 采集自青岛汇泉湾潮间带的表层泥沙, 已在实

验室连续培养 5 年, 在 20 °C 的条件下, 将其培养于 90 mm SW-NGM 平板(Xie *et al*, 2020)上, 以大肠杆菌 *E. coli* OP50 为食物。

1.2 海洋线虫大规模同步化

将海洋线虫在 20 °C 下扩大培养到 30 个板以上, 待其生长至成虫且交配产生了大量的卵时, 将平板上的全部线虫、卵以及菌用灭菌海水洗脱至 15 mL 离心管中, 静置 5 min 使大虫自然沉降, 卵及细菌在上清中, 将上清转移至新的 15 mL 离心管中, 3 000 g 离心 1 min, 弃上清。加入灭菌水, 混匀, 1 300 g 离心 1 min, 弃上清, 重复三次。加入 3 mL 灭菌水 + 3 mL 裂解液[4 mL 高乐式®漂白水(6.25%的次氯酸钠溶液) + 1 mL 10 mol/L NaOH + 5 mL 灭菌水], 充分震荡 75~90 s, 再加入灭菌水到 12 mL, 1 300 g 离心, 弃上清, 重复 3 次。此时得到大量的卵, 将其转移至海水中孵化 18~20 h 得到大量同步化的幼虫 L1。

1.3 RNAseq 样本制备

将同步化后孵化前得到的卵通过 400 目网筛过滤, 转移至 1.5 mL EP 管, 8 000 g 离心, 弃上清, 置于液氮中速冻 30 min 后保存在-80 °C, 得到胚胎样品。将同步化的 L1 依次通过 450 目和 500 目网筛过滤后, 置于 OP50 的 SW-NGM 板上分别培养 2 h、4 h、6 h 后, 将平板上的 L1 用灭菌海水洗脱至 15 mL 离心管, 600 g 离心 1 min, 弃上清。加入灭菌水, 600 g 离心 2.5 min, 弃上清, 重复 3 次。将 L1 转移至 1.5 mL 离心管中, 加入灭菌水, 3 000 g 离心 1 min, 弃上清, 置于液氮中速冻 30 min 后保存至-80 °C, 得到 L1 期 2 h、4 h 和 6 h 的样品。

1.4 RNAseq 建库及分析

提取样本 RNA, 并使用 NanoDrop 2000 测量 RNA 浓度和纯度, 使用 Agilent 生物分析仪 2100 系统的 RNA Nano 6000 检测试剂盒对 RNA 完整性进行评估。使用 Illumina 的 NEBNext Ultra™ RNA Library Prep Kit (NEB, USA) 试剂盒生成测序文库。使用 TruSeq PE Cluster Kit v4-cBot-HS (Illumina) 在 cBot Cluster Generation System 上对指标编码的样本进行聚类, 然后在 Illumina 平台上对文库进行测序生成双端 reads, 最终获得文库。

原始 fastq 数据过滤掉含接头和低质量的 reads 后, 得到高质量 Clean Data。使用 HISAT2 (Kim *et al*, 2015) 将其比对到参考基因组得到 Mapped reads, 然后利用 String Tie (Pertea *et al*, 2015) 将比对上的 reads 进行组装和定量。对各样品中的 Mapped reads 的数目和转录本长度进行归一化, 采用 FPKM (Florea *et al*,

2013)作为衡量基因表达水平的指标,对每个样本分别进行基因表达水平定量。使用 DESeq2 (Love *et al.*, 2014)对两组样品进行差异表达分析,将 Fold Change 1.5 且 FDR 0.05 作为差异表达基因筛选标准[差异倍数(Fold Change)表示两样品(组)间表达量的比值;错误发现率(False Discovery Rate, FDR)是使用 Benjamini 和 Hochberg 的方法通过对差异显著性 P 值 (P -value)进行校正得到的]。将差异表达基因注释到 KEGG (Kanehisa *et al.*, 2008)数据库(<http://www.genome.jp/kegg/>),使用 KOBAS (Mao *et al.*, 2005)软件来检测 KEGG 通路中差异表达基因的统计富集,筛选出两个样本间 FDR 0.05 的显著性差异通路。

1.5 实时荧光定量 PCR 分析

本研究以 EVM0015995_esy1-2 为内参基因,随机选择 11 个关键基因(表 1)进行 qPCR 验证。使用 ReverTra Ace™ qPCR RT Master Mix with gDNA Remover 试剂盒将 RNA 样品反转录为 cDNA。cDNA 中加入 SYBR Green Realtime PCR Master Mix 试剂和正反向引物,在 QuantStudio™ 6 Flex 荧光实时定量 PCR 系统中检测,每个样品设三个生物学重复。算出每个比较组合的 $\Delta\Delta C_t$ 后取平均, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 即为该基因在两个比较组合之间的倍数变化。使用 Graphpad 对 qPCR 和 RNAseq 数据进行相关性分析和 T 检验,得到两组数据的皮尔逊相关系数和 P 值。

表 1 qPCR 验证基因的引物序列
Tab.1 The primer sequences of genes verified by qPCR

基因名	正向引物	反向引物
EVM0015995_esy1-2	TTTCGTTTCGTCATCCGGAAG	GTGAGCATGAAGGTGGTTTG
EVM0011486_aco-2	TAGCTCAGGAAGCCGAGAAT	CGCGTTATCACCCAGTTTGT
EVM0011693_sdhb-1	TGCCGACAAATATCTCGGTC	GGTGTGACATTTGAATGCGG
EVM0006431_lars-1	ACCACTACGGGAGAAGTATG	CCTTCTTAGCCTCTTCCAGT
EVM0000938_nol-58	TGCTGTTGCTCACTCACTTG	TCTCTGCAGCGCATGACATA
EVM0004991_asg-1	ATGCCCTTGTAAAGCCGA	GACGACCAATCATTCTCCG
EVM0015536_mcm-6	CAAGACAGAAGGAACAACCC	CAGCAGCTGAAGAGGCTTTT
EVM0002773_rpa-2	CGCTACGATGTAATGGAGA	CGAATCAGCAGTACCCGATT
EVM0002807_hda-3	CACCACGCAAAGAAAAGCGA	CACCCATCGGTGGTGTAAA
EVM0006558_skp-1	CCTCTCCATGCCTTATCGTA	TTCCGAGAAGATCGTGCTTG
EVM0008737_rnp-2	AAGAGAACTTGTGGGCGG	CCAAGGGAACGTACGTTGAA
EVM0013266_bcas-2	GTTCCAACCTCCTCAACTGG	AAAAGGAGTTGACCGAAGCC

2 结果与分析

2.1 海洋线虫 *L. marina* 转录组分析

选取 *L. marina* 胚胎期(Embryo, EM)和 L1 幼虫 2 h、4 h、6 h 四个阶段,每个阶段设三个生物学重复,使用二代 Illumina 技术对其进行转录组测序。通过 PCA 主成分分析,发现相同发育阶段的生物学重复高度相关,不同发育阶段能够清晰区分(图 1)。

通过分析不同样品间的差异表达基因数目,发现 L1 期 2 h、4 h 和 6 h 三个发育时期相较于 EM,均有超过 9 000 个基因的表达发生了显著变化,而 L1 2 h、4 h 和 6 h 间的差异基因数目较少(表 2)。通过 KEGG 通路富集分析,发现 L1 幼虫 2 h、4 h 和 6 h 相较于 EM 有超过 30 个通路发生显著上调(图 2),而超过 20 个通路发生了显著下调(图 3)。

2.2 相较于 EM, L1 幼虫核糖体和核糖体发生相关基因的转录水平显著上调

通过 KEGG 富集分析发现,与胚胎期相比, L1 发

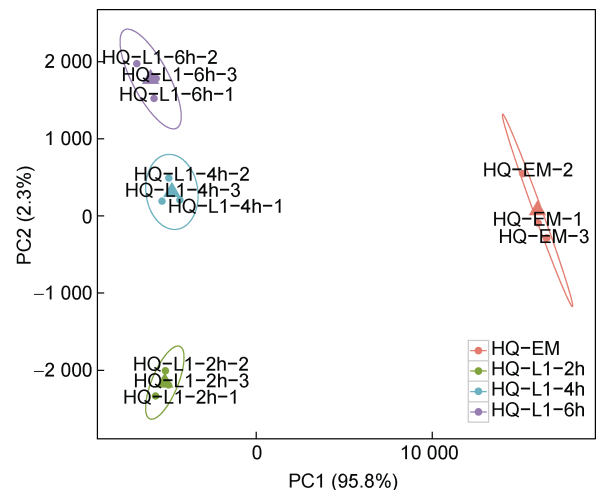


图 1 海洋线虫 *L. marina* 早期发育转录组主成分分析 (PCA)

Fig.1 Principal component analysis of marine nematode *L. marina* in early developmental stages

注:采用线性代数的计算方法,对所有样本数以万计的基因表达量(FPKM)进行降维及主成分提取。横坐标为第一主成分,纵坐标为第二主成分,每个点代表一个样本,每种颜色代表一个处理组

表 2 不同组间差异基因数目
Tab.2 The number of differentially expressed genes between groups

不同比较组合	差异表达基因数目	上调基因数目	下调基因数目
L1-2 h VS EM	9 701	5 004	4 697
L1-4 h VS EM	9 581	4 933	4 648
L1-6 h VS -EM	9 462	4 851	4 611
L1-4 h VS L1-2 h	280	139	141
L1-6 h VS L1-2 h	1 219	600	619
L1-6 h VS L1-4 h	103	57	46

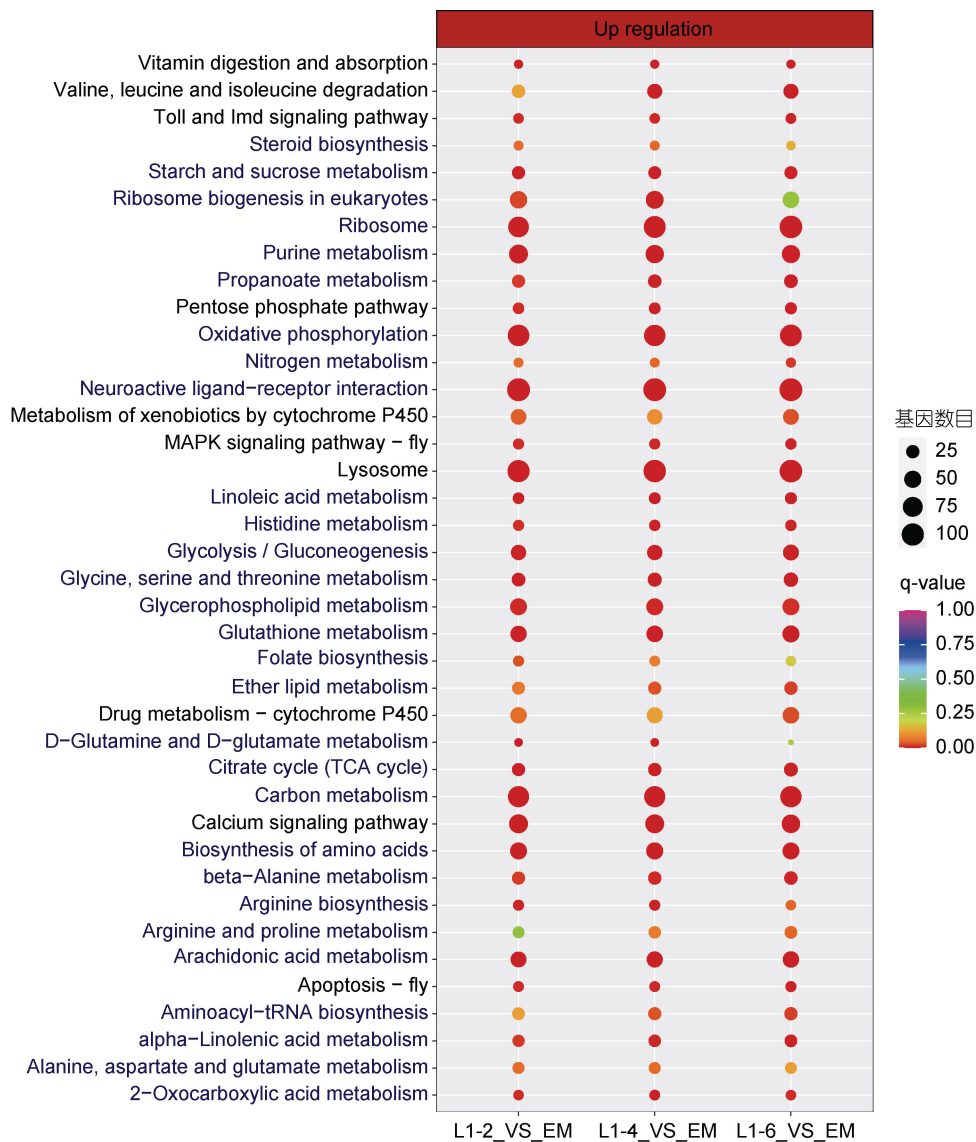


图 2 海洋线虫 *L. marina* 各比较组合中上调基因的 KEGG 富集情况

Fig.2 KEGG enrichment of up-regulated genes in the marine nematode *L. marina* in each combination
注: 横坐标为不同比较组合, 纵坐标为通路名称, 点的大小表示基因数目, 点的颜色表示显著性差异 q-value 值

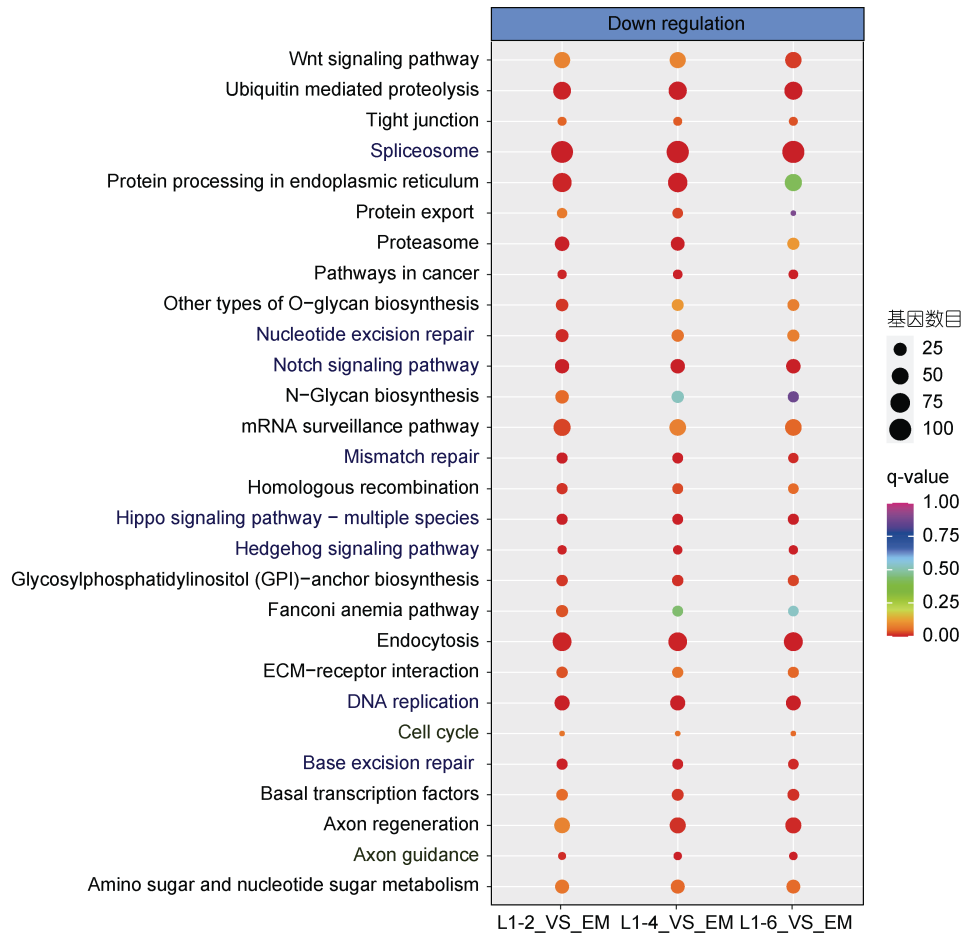


图3 海洋线虫 *L. marina* 各比较组合中下调基因的 KEGG 富集情况

Fig.3 KEGG enrichment of down-regulated genes in the marine nematode *L. marina* in each combination
注: 横坐标为不同比较组合, 纵坐标为通路名称, 点的大小表示基因数目, 点的颜色表示显著性差异 q-value 值

育时期 2 h、4 h 和 6 h 的多个核糖体蛋白大亚基编码基因(如 EVM0009601_ *rpl-1* 和 EVM0014298_ *rpl-3*)和多个核糖体蛋白小亚基编码基因(EVM0000892_ *rps-1* 和 EVM0013684_ *rps-7* 等)的表达均发生了显著上调(图 4a), 核糖体发生通路中的 52 个基因(如核仁蛋白 EVM0010210_ *nol-6*, Rio 激酶 EVM0005680_ *riok-1*, 核糖体 RNA 加工蛋白质 EVM0015730_ *rrp-8*)在 L1 幼虫期发生了显著上调(图 4b), 氨酰基-rRNA 生物合成通路中多个氨酰基-tRNA 合成酶(如丙氨酰基 tRNA 合成酶 EVM0006554_ *aars-2*, 天冬氨酸氨酰基 tRNA 合成酶 EVM0015786_ *dars-1*, 精氨酸氨酰基 tRNA 合成酶 EVM0008023_ *rars-1*)在 L1 幼虫期发生了显著上调(图 4c)。

2.3 糖酵解/糖原异生、TCA 循环和氧化磷酸化通路中相关基因转录水平在 L1 期显著上调

通过 KEGG 富集分析发现, 与胚胎期相比, 糖酵解和糖原异生通路中的多个基因(如醛脱氢酶

EVM0001434_ *alh-4* 和二氢硫辛酰胺脱氢酶 EVM0004862_ *dld-1*)在 L1 发生显著上调(图 5a)。柠檬酸(TCA)循环通路中的多个基因(如顺乌头酸酶 EVM0011486_ *aco-2*、柠檬酸合成酶 EVM0011427_ *cts-1*)在 L1 期发生显著上调(图 5b)。氧化磷酸化通路中的多个基因(如 ATP 合成酶 EVM0008198_ *atp-1*、液泡型 H⁺ ATP 酶 EVM0002567_ *yha-2*)在 L1 发生显著上调(图 5c)。

2.4 多个神经递质受体基因在 L1 期转录水平显著上调

通过 KEGG 分析, 发现 L1 期相较于 EM, 超过 100 个基因在神经活性配体-受体相互作用通路中上调(图 6)。EVM0000190_ *dop-1* 和 EVM0009467_ *dop-2* 等多个多巴胺受体相关基因在 L1 期表达量上调(图 6a), GABA β 受体相关基因如 EVM0013292_ *gbb-2*, EVM0015297_ *gbb-1* 和 GABA 受体基因 EVM0014833_ *gab-1* (图 6b), 多个神经肽受体家族基因如

EVM0011355_npr-29 和 EVM0012055_npr-34 等(图 6c), FMRamide 肽受体家族基因 EVM0006577_frpr-3、EVM0008649_frpr-14 等也在 L1 期表达量上调(图 6d)。

2.5 DNA 复制和修复相关通路基因的表达在 L1 期显著下调

通过 KEGG 分析, 发现 DNA 复制、错配修复、碱基切除修复和核苷酸切除修复通路在 L1 期下调。DNA 复制通路中多个相关基因(如 DNA 解旋酶/核酸内切酶 EVM0005762_dna-2、DNA 连接酶 EVM0006442_pri-1)。错配修复通路中多个相关基因(DNA 复制因子 EVM0005944_rfc-1、复制蛋白 A EVM0007970_rpa-1)。碱基切除修复通路中多个相关基因(如 DNA 聚合酶 EVM0014593_pole-1、无嘌呤/无嘧啶核糖内

切酶 EVM0009978_apn-1)和核苷酸切除修复通路中多个相关基因(如复制蛋白 A EVM0002773_rpa-2、DNA 复制因子 EVM0013177_rfc-4)在 L1 时期显著下调(图 7)。

2.6 Notch、Hippo 和 Hedgehog 等重要发育相关信号通路基因在 L1 期显著下调

Notch 信号通路中 30 个基因(如 EVM0011417_lag-1, EVM0004706_bir-1, EVM0008121_hda-1)的转录水平在 L1 期显著下调(图 8a), Hippo 信号通路中 10 多个基因(如 EVM0004098_yap-1, EVM0016569_zyx-1)的转录水平在 L1 期显著下调(图 8b), Hedgehog 信号通路中 10 个基因(如 EVM0004427_ptc-3, EVM0015926_wrt-8)的转录水平在 L1 期显著下调(图 8c)。

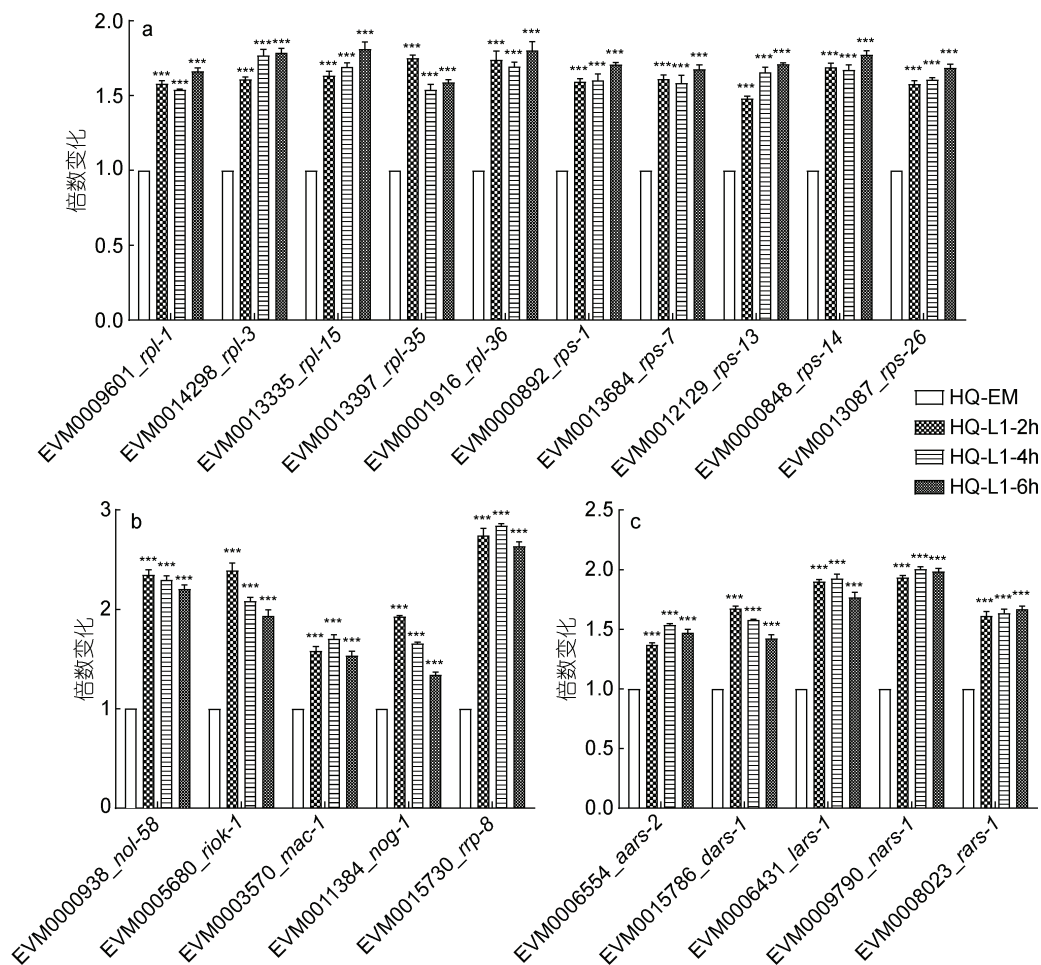


图 4 核糖体相关通路基因表达变化情况

Fig.4 Changes in gene expression of ribosomal related pathway

注: a. 核糖体蛋白大亚基 RPL 和核糖体蛋白小亚基 RPS 的转录水平; b. 核糖体发生通路中相关基因的表达水平; c. 氨酰基-tRNA 生物合成通路中相关基因的转录水平。倍数变化表示处理组(L1 期 2 h、4 h 和 6 h)与对照组(EM)的基因表达量的比值(处理组 FPKM 值/对照组 FPKM 值)。误差条代表 3 次重复实验的标准误差。*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

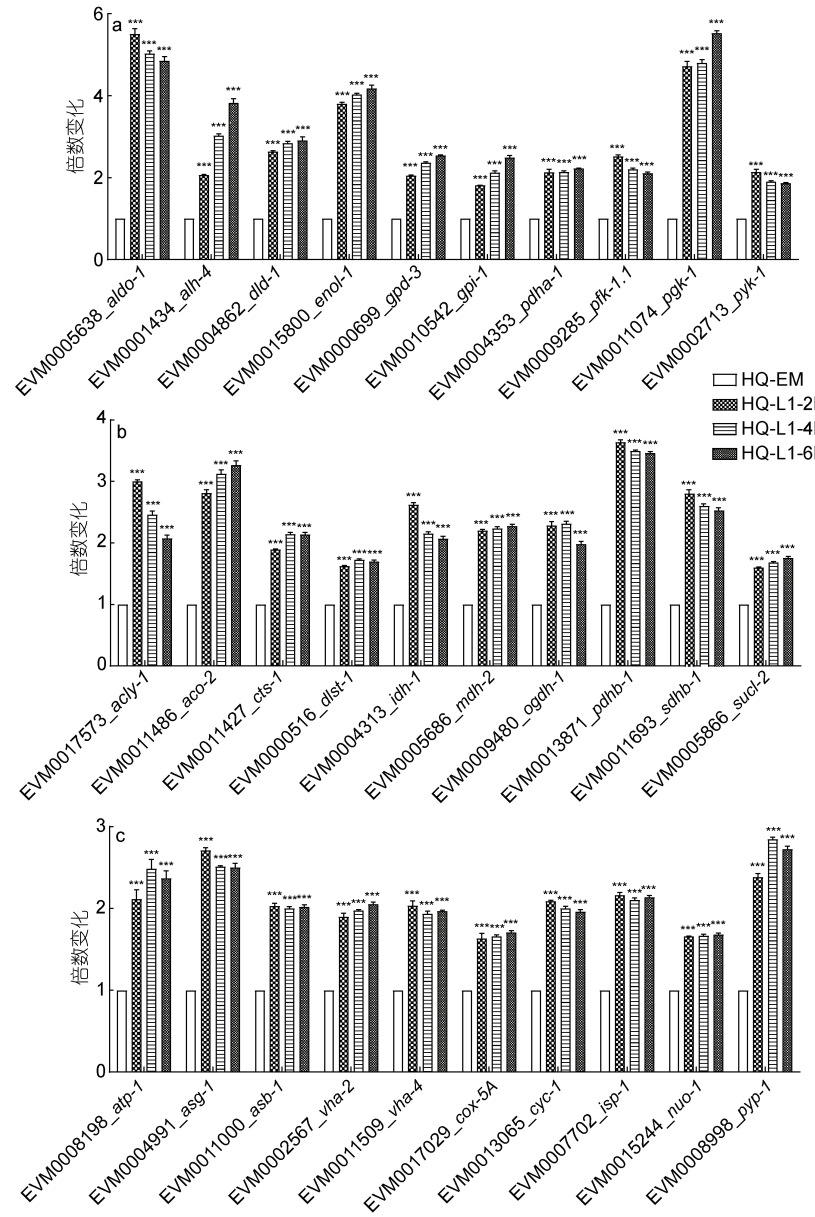
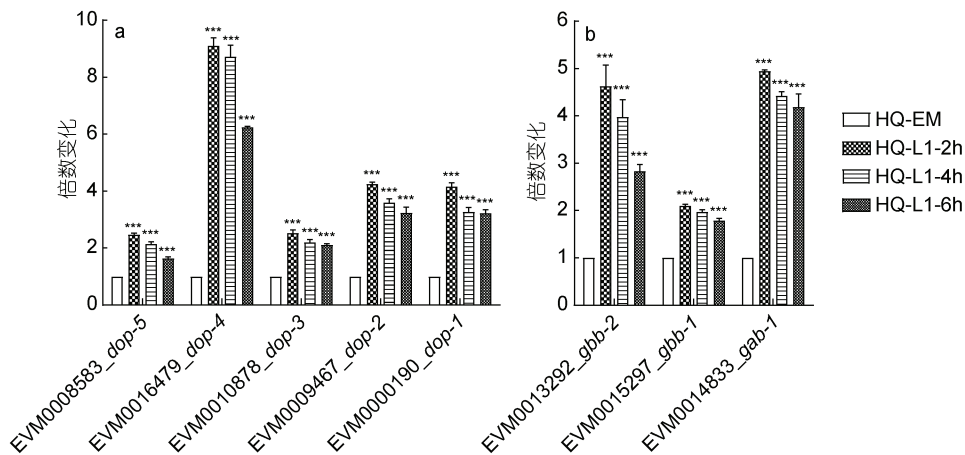


图 5 糖酵解/糖原异生(a)、TCA 循环(b)和氧化磷酸化通路(c)中相关基因的表达变化情况

Fig.5 Changes in expression of related genes in glycolysis / gluconeogenesis (a), citrate cycle (b), and oxidative phosphorylation (c)



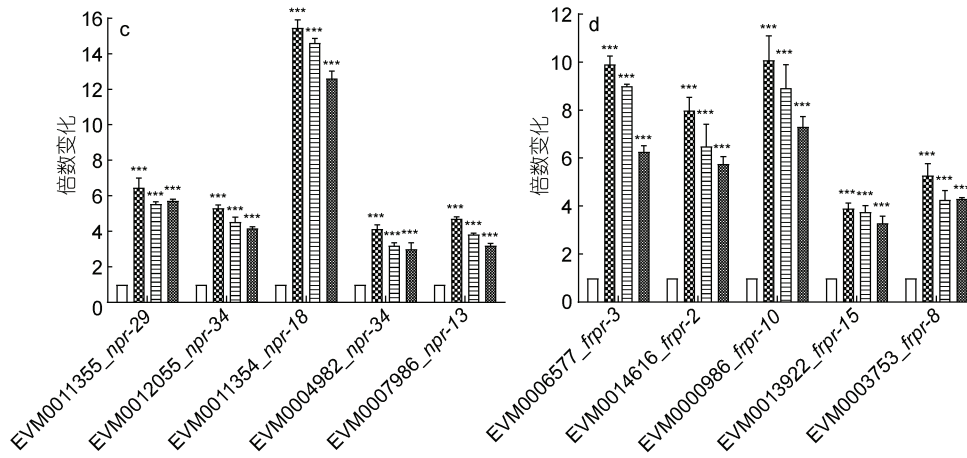


图 6 不同神经递质的基因表达变化情况

Fig.6 Changes in gene expression of different neurotransmitters

注: a. 多巴胺受体相关基因的转录水平; b. GABA 受体相关基因的转录水平; c. 神经肽受体相关基因的转录水平; d. FMRFamide 肽受体家族相关基因的转录水平

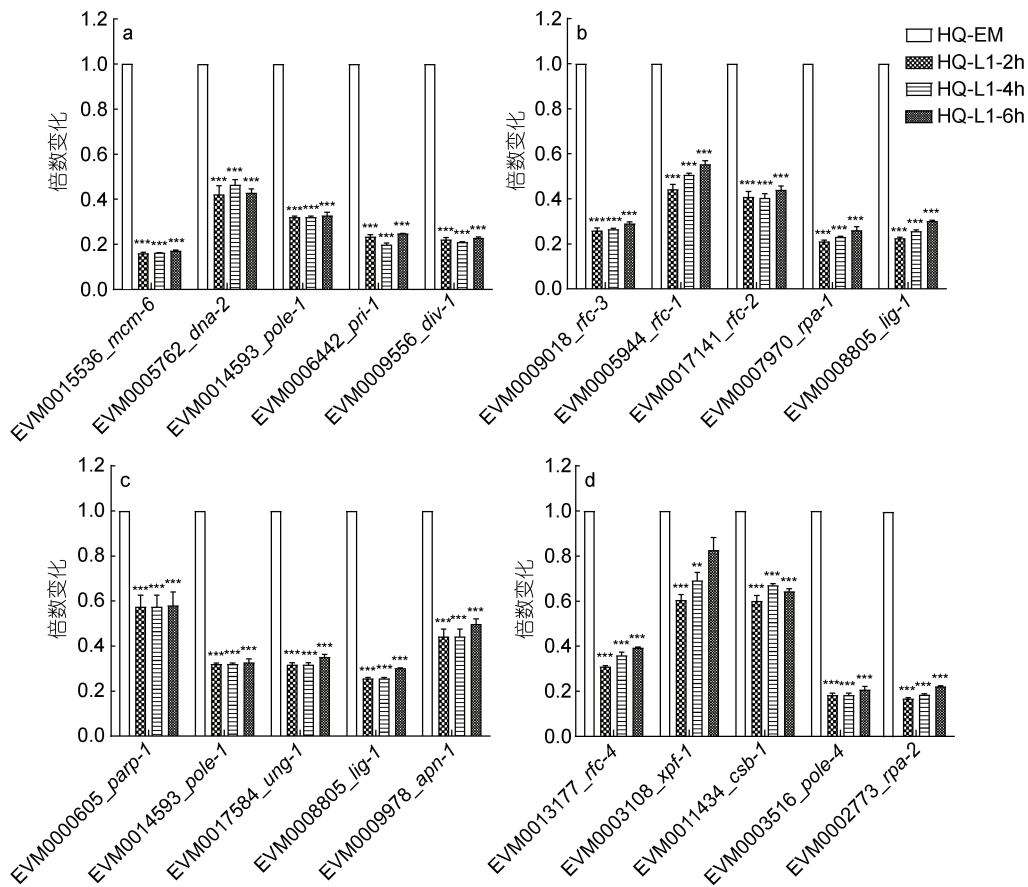


图 7 DNA 复制(a)、错配修复(b)、碱基切除修复(c)和核苷酸切除(d)修复通路中相关基因表达变化情况

Fig.7 Changes in expression of related genes in DNA replication (a), mismatch repair (b), base excision repair (c) and nucleotide excision repair (d)

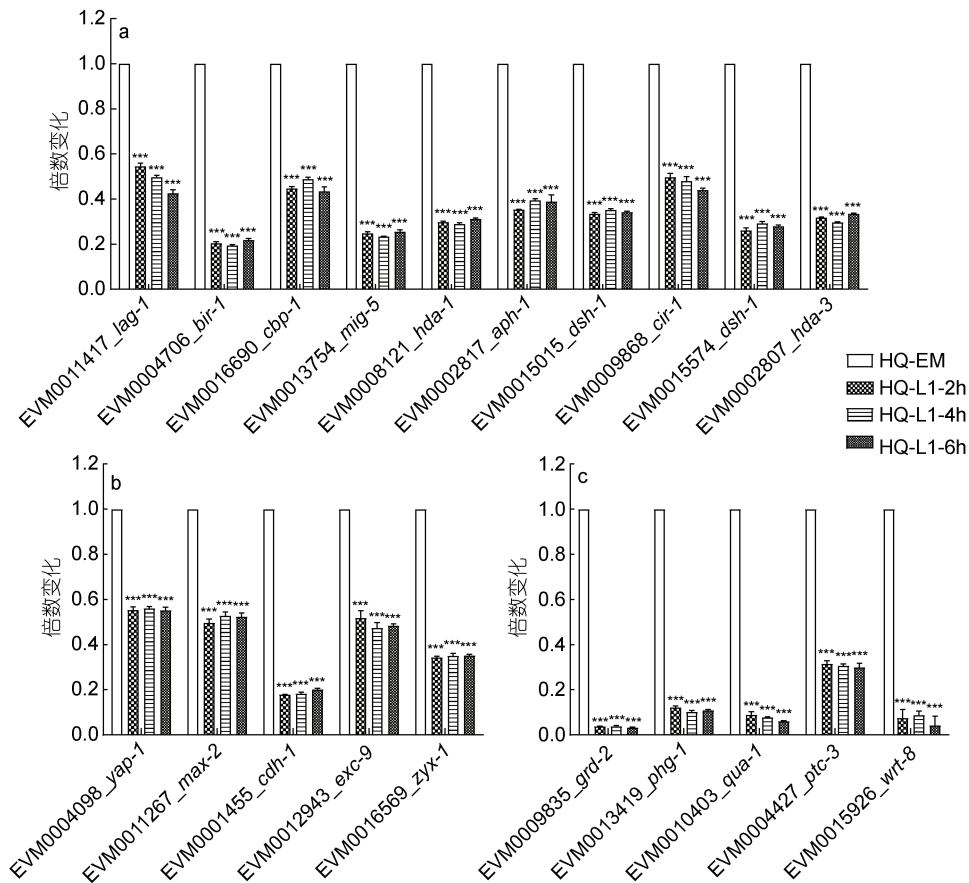


图 8 重要发育通路-Notch 信号通路(a)、Hippo 信号通路(b)和 Hedgehog 信号通路(c)的相关基因表达变化情况
Fig.8 Changes in gene expression of important developmental pathways-Notch signaling pathway (a), Hippo signaling pathway (b), and Hedgehog signaling pathway (c)

2.7 剪切体通路中多个剪切因子基因在 L1 期显著下调

剪切因子对于 RNA 的加工至关重要(Morton *et al.*, 2011)。本研究中, 多个剪切因子(如 BCAS 剪切因子 EVM0013266_bcas-2、DBI1 剪切因子 EVM0005825_dib-1、RSP 蛋白 EVM0003635_rsp-6、PRP 剪切因子 EVM0016298_prp-6、剪切因子 3B 亚基 EVM0010128_sftb-1 和 EVM0009161_sftb-2、SLU7 剪切因子 EVM0000329_sluh-7 在 L1 期下调(图 9)。

2.8 qPCR 验证组学分析结果

本研究随机选择 11 个基因进行 qPCR 验证, 得出倍数变化(图 10a)。采用皮尔逊相关系数 r 作为衡量转录组数据和 qPCR 数据相关性的指标, r 越接近 1, 相关性越好。通过 Graphpad 分析, 得出转录组测序结果和 qPCR 的结果相关性 r 为 0.961 6, 显著性 P 值小于 0.000 1 (图 10b), 结果显示两者相关性很高。

3 讨论

3.1 海洋线虫 *L. marina* L1 幼虫发育需要更多的蛋白合成、能量供应与代谢活力

核糖体是蛋白质合成的场所, 与细胞生长和分裂密不可分(Fromont-Racine *et al.*, 2003; Thomson *et al.*, 2013), 对秀丽线虫全基因组 RNAi 筛查发现核糖体编码基因如 *rpl-4*、*rpl-35*、*rps-7*、*rps-13* 等基因的敲降会导致发育速率减慢(Sönnichsen *et al.*, 2005)。研究发现 RNAi 敲降 *rps-14* 导致秀丽线虫生长缓慢和不育(Chan *et al.*, 2009)。通过 GFP 标记秀丽线虫 *nog-1* (编码核仁 GTP 酶)启动子, 发现 *nog-1* 在胚胎早期到成虫均有表达, 使用 RNAi 抑制 *nog-1* 的功能导致秀丽线虫孵化数减少、生长减慢、寿命增加和脂肪储存增加(Kim *et al.*, 2014)。秀丽线虫 *riok-1* 编码 RIO 激酶, RNAi 抑制 *riok-1* 的功能会导致性腺形态异常, 从而

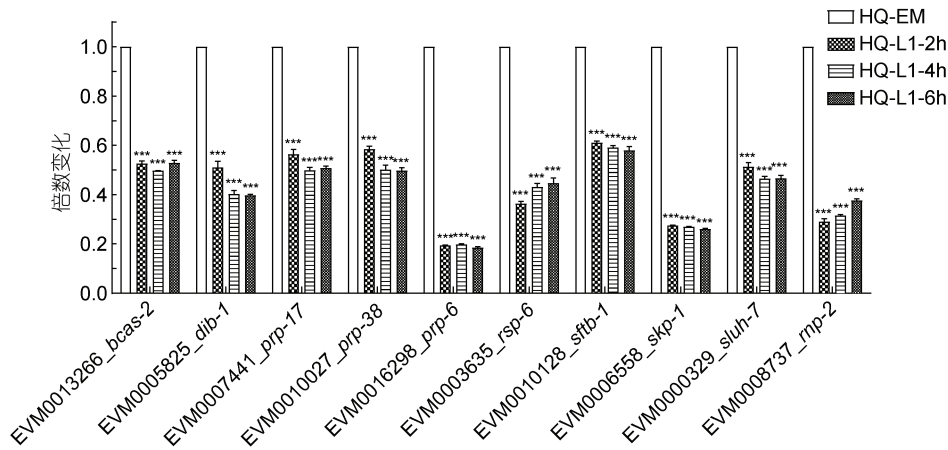


图 9 剪切体相关基因表达变化情况

Fig.9 Changes in expression of spliceosomal related genes

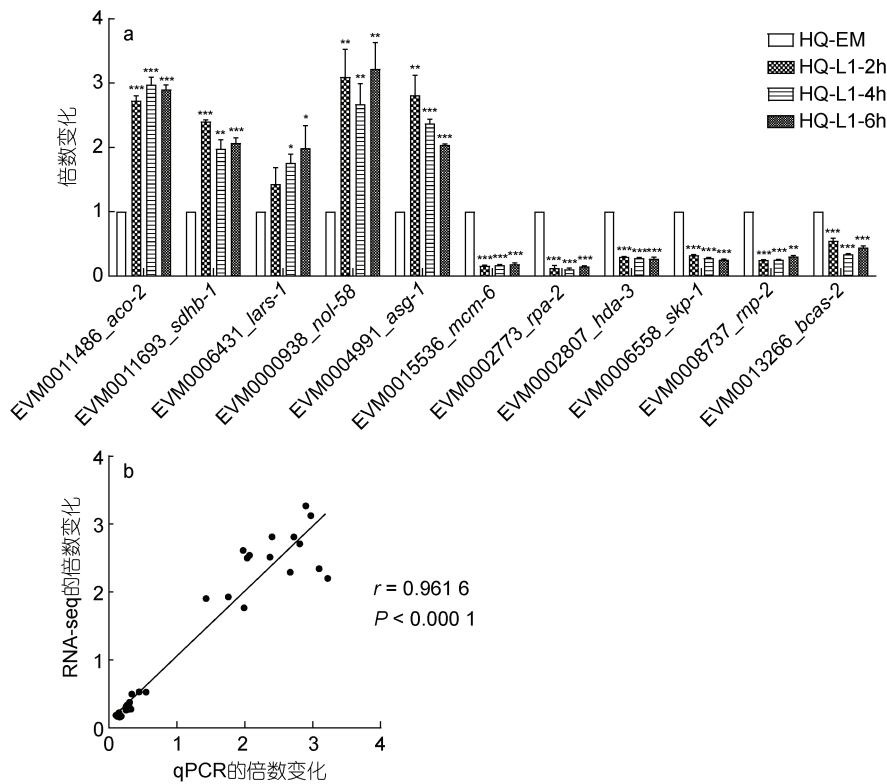


图 10 qPCR 验证结果

Fig.10 Verification results through qPCR analysis

注: a. qPCR 得到的 L1 (2 h、4 h、6 h)与胚胎期(EM)的表达倍数变化; b. qPCR 和转录组分析间相关基因表达倍数变化的相关性分析

使卵数量减少(Weinberg *et al*, 2014)。通过 EMS 化学诱变和核糖体图谱分析,发现秀丽线虫 *rrp-8* (编码核糖体 RNA 加工蛋白)参与核糖体 RNA 加工,对于核糖体的生物发生具有重要作用(Wu *et al*, 2018)。氨酰基-tRNA 生物合成通路中的氨酰基-tRNA 合成酶催化氨基酸与其同源 tRNA 的共价连接,在翻译过程中具有至关重要的作用(Rajendran *et al*, 2018)。*rrt-1*

(*rars-1*)编码精氨酰 tRNA 合成酶,通过 RNAi 抑制其功能发现,*rrt-1* 对于秀丽线虫的发育、运动速度、缺氧敏感性、寿命有至关重要的作用(Fröhlich *et al*, 2017)。本研究发现多个核糖体、核糖体发生和氨酰基-tRNA 生物合成通路相关基因在 L1 时期的表达相较于胚胎期发生了显著上调(图 4),意味着在 *L. marina* 中,相较于胚胎时期,L1 期的发育可能需要更

多蛋白质合成。据报道,在秀丽线虫中,相较于胚胎时期,L1期的多个核糖体编码基因 *rpl*-和 *rps*-发生了显著上调(Grün *et al*, 2014; Boeck *et al*, 2016; Li *et al*, 2020),这种变化模式与本研究海洋线虫 *L. marina* 中发现的一致。然而在秀丽线虫中,相比于胚胎期,核糖体发生通路多个基因在 L1 期下调,氨酰基 tRNA 合成通路中的基因在秀丽线虫 EM 和 L1 期之间变化不明显(Grün *et al*, 2014),总之,我们发现秀丽线虫这两个通路相关基因的表达变化特征和 *L. marina* 不同,推测可能和两种线虫细胞发育过程存在的差异相关。

核糖体的生物发生是所有细胞中对能量要求最高的生命过程之一(Kressler *et al*, 2010; Thomson *et al*, 2013)。本研究中,L1期相较于胚胎期,糖酵解/糖原异生通路、TCA 循环通路和氧化磷酸化通路等与能量相关的通路中多个基因在 L1 期显著上调(图 5)。在糖酵解/糖原异生通路中,*alh-4* 编码醛脱氢酶,通过正向遗传筛选发现其缺失会增加脂肪醛,减少脂肪的储存(Zeng *et al*, 2021)。RNAi 抑制秀丽线虫中 *dld-1* (编码二氢硫辛酰胺脱氢酶)的功能,可改变能量代谢,激活与蛋白酶体降解相关的通路,改善细胞间信号传导,延长寿命(Ahmad *et al*, 2021)。TCA 循环中,*cts-1* 编码的柠檬酸合成酶是 TCA 循环的起始酶和限速酶,RNAi 抑制秀丽线虫中 *cts-1* 的功能,会导致早期发育停滞(Hada *et al*, 2019)。秀丽线虫 *aco-2* 编码乌头酸酶,*idha-1* 编码异柠檬酸脱氢酶,RNAi 抑制两者的功能会导致柠檬酸的积累,并延迟秀丽线虫的生长和发育(Yang *et al*, 2022)。氧化磷酸化通路中:*vha-8* 和 *vha-19* 编码液泡型 H⁺ ATP 酶,*vha-8* 是 PH 动态平衡和幼虫发育所必需的,*vha-19* 是胚胎发生所必需的,RNAi 抑制秀丽线虫 *vha-8* 或 *vha-19* 的功能会致死(Ji *et al*, 2006; Knight *et al*, 2012)。因此,我们推测在 L1 期,这些与能量相关的基因转录水平的增加,为核糖体的生物合成提供了必要的能量,同时也为 L1 幼虫的发育提供了充足的能量供应。研究发现秀丽线虫从胚胎期发育到 L1 期,上述三个能量通路中的多个基因的表达均发生显著上调(Grün *et al*, 2014; Boeck *et al*, 2016; Li *et al*, 2020)。因此,我们推测 *L. marina* 早期发育的能量供应机制与秀丽线虫高度相似。

本研究通过 KEGG 富集分析,发现在 L1 期,17 个代谢通路在 L1 期显著上调,相关的通路是碳代谢,嘌呤代谢,花生四烯酸代谢,亚油酸代谢,淀粉和蔗糖代谢,甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢,D-谷氨酰胺

和 D-谷氨酸代谢,谷胱甘肽代谢,2-氧代羧酸代谢,甘油磷脂代谢代谢,组氨酸代谢,亚麻酸代谢,β-丙氨酸代谢,丙酸酯代谢,氮代谢(图 2)。4 个生物合成通路在 L1 期显著上调,相关的通路是氨基酸的生物合成,精氨酸的生物合成,叶酸的生物合成,类固醇的生物合成(图 2)。与海洋线虫相似,这些通路中的大部分基因在秀丽线虫 L1 期表达量也显著高于胚胎期(Grün *et al*, 2014; Boeck *et al*, 2016; Li *et al*, 2020),据此推测 *L. marina* 早期发育的代谢调控机制与秀丽线虫高度保守。

3.2 海洋线虫 *L. marina* L1 幼虫神经受体基因表达显著上调

通过 KEGG 富集分析,发现 L1 期相较于 EM,超过 100 个基因在神经活性配体-受体相互作用通路中上调,大多是神经递质或神经肽受体,可能与 L1 幼虫的觅食和运动等行为调控相关。多巴胺受体和 GABA 受体在 L1 表达量较胚胎期显著上调(图 6a, 6b)。多巴胺和谷氨酸-氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)对于线虫的基本运动功能至关重要(Jorgensen, 2005; Omura *et al*, 2012),研究发现编码多巴胺受体的 *dop-2* 在多巴胺能神经元中表达,可以调节多巴胺的合成和释放(Suo *et al*, 2004),多巴胺能神经元在感觉到细菌食物时释放多巴胺从而引发运动减慢反应(Suo *et al*, 2004; Nagashima *et al*, 2016)。研究发现多巴胺受体编码基因 *dop-3* 缺失会导致秀丽线虫运动缺陷(Chase *et al*, 2004)。GABA 是一种重要的抑制性神经递质,在线虫运动和觅食时,起到放松身体肌肉的作用(Jorgensen, 2005)。研究发现通过 RNAi 抑制 *gbb-1* (编码代谢型 GABA β 受体)的功能增强抗氧化能力并延长秀丽线虫寿命(Yuan *et al*, 2019)。

多个神经肽受体家族基因在 L1 期表达量显著上升(图 6c, 6d)。在秀丽线虫中,目前已鉴定出 113 个神经肽基因,对于感觉和运动至关重要(Li *et al*, 2008)。比如,通过 RNAi 敲降实验发现,秀丽线虫运动和感觉唤醒需要 *frpr-3* (编码 FMRFamide 肽受体)(Chew *et al*, 2018)。在食物充足的情况下,*npr-1* (编码神经肽受体)可以导致秀丽线虫在进食过程中聚集,并在细菌边缘聚集(Li *et al*, 2008)。因此,随着线虫孵化后开始运动,这些神经递质表达量显著升高。除此之外,速激肽受体家族 TKR, 胆囊收缩素受体 CKR, 神经调节肽 NMUR, NMDA 类谷氨酸受体 NMR, 代谢型谷氨酸受体家族 MGL 等神经递质在 L1 期表达量较 EM 均发生显著上调。在秀丽线虫中,相比于胚胎期,多

种神经递质和神经肽受体基因也均在 L1 期转录水平上调(Grün *et al*, 2014; Boeck *et al*, 2016; Li *et al*, 2020)。据此推测, 海洋线虫和秀丽线虫在 L1 幼虫发育阶段神经受体调控方面可能具有类似的机制。

3.3 海洋线虫 *L. marina* 胚胎期复制与修复和细胞分化调控相关基因表达显著上调

DNA 复制是细胞分裂周期的一个重要方面, 发生在细胞周期的合成阶段(S 期), 准确无误的 DNA 复制对于保持基因组的完整性必不可少(Bell *et al*, 2002; Arias *et al*, 2007)。在海洋线虫中 DNA 复制、错配修复、碱基切除修复和核苷酸切除修复通路中的多个基因, 与胚胎期相比, 在 L1 幼虫期显著下调(图 7)。研究发现秀丽线虫 RPA 蛋白(编码复制蛋白 A)参与有丝分裂复制、减数分裂、同源重组和修复等多个过程, 对于 DNA 复制过程至关重要, CRISPR/Cas9 敲除 *rpa-1* 会导致秀丽线虫早期幼虫致死(Hefel *et al*, 2021)。在酵母和哺乳动物中, RFC 蛋白(编码 DNA 复制因子)参与将某些 DNA 聚合酶加工因子加载到单链 DNA 上, 调控 DNA 复制过程(Venclovas *et al*, 2000; Griffith *et al*, 2002; Bermudez *et al*, 2003)。秀丽线虫中, 6 个 *mcm*-基因(*mcm-2*、*mcm-3*、*mcm-4*、*mcm-5*、*mcm-6* 和 *mcm-7*)编码的 6 个 MCM 蛋白(微小染色体维持蛋白)形成六聚体复合体, 作为 DNA 复制前起始复合体的关键组分, 在 DNA 复制中起到 DNA 解旋酶的作用(Korzelius *et al*, 2011)。RNAi 抑制秀丽线虫 *dna-2* 的功能会降低胚胎发育速率、缩短寿命, 其编码的 DNA 解旋酶/核酸内切酶可以维持基因组的稳定性, 在细胞分裂和 DNA 复制中都具有非常重要的作用(Lee *et al*, 2011)。秀丽线虫 *div-1*、*pola-1*、*pri-1* 和 *pri-2* 编码的 DNA 聚合酶 α -引发酶复合物启动增殖细胞的 DNA 复制, RNAi 抑制这些基因的功能会使得胚胎致死率升高, 此外, 增殖细胞命运的维持需要 *pola-1*、*pri-1*、*pri-2* (Yoon *et al*, 2018)。我们推测, 与之相关基因在胚胎期的高表达可能反映了胚胎期较高的 DNA 复制率和细胞分裂, 因此, 相较于 L1, 胚胎期细胞分裂速度可能更快, 从而需要复制与修复相关基因的高表达。这些基因在秀丽线虫中, 相较于胚胎期, 其转录水平在 L1 期也均显著下降(Rün *et al*, 2014; Boeck *et al*, 2016; Li *et al*, 2020), 因此 *L. marina* 和秀丽线虫类似, 胚胎时期复制和修复等多个通路基因表达显著上调可能用以支持快速、精准的细胞分裂和增殖。

KEGG 富集分析发现海洋线虫在 L1 期, Notch、

Hippo 和 Hedgehog 信号通路中多个基因, 与胚胎期相比, 在 L1 期转录水平显著下调。*lag-1* 编码 Notch 信号通路中的重要转录因子 LAG-1, 在发育过程中介导细胞间的相互作用, RNAi 敲降 *lag-1* 会导致孵化后的 L1 秀丽线虫发育停滞(Maicas *et al*, 2021)。Hippo 信号通路中, *yap-1* (编码 Yes 相关蛋白)参与秀丽线虫 Wnt 介导的神经元极化(Lee *et al*, 2018), 也与秀丽线虫的耐热性和衰老有关(Iwasa *et al*, 2013)。通过秀丽线虫 EMS 诱变发现, *zyx-1* (编码含 LIM 结构域的黏着斑蛋白)调节秀丽线虫突触维持(Luo *et al*, 2014)。Hedgehog 信号通路中, *ptc-3* (编码 PTC 蛋白)在秀丽线虫中的表达是高度动态的, 通过 RNAi 抑制秀丽线虫 *ptc-3* 基因的功能会导致致死、不完全蜕皮、体型缩小、vulva 发育缺陷等(Soloviev *et al*, 2011)。秀丽线虫 *wrt-8* (编码 Hedgehog 相关蛋白)的过度表达会导致轴突缺陷(Riveiro *et al*, 2017)。三个通路中在秀丽线虫中的大多数同源基因, 相较于胚胎期, L1 期的转录表达也均发生了显著下调(Grün *et al*, 2014; Boeck *et al*, 2016; Li *et al*, 2020)。因此, 我们推测海洋线虫和秀丽线虫在胚胎期均需要更高的发育和细胞分化调控因子表达水平。

KEGG 富集分析表明, 相比于胚胎期, 海洋线虫在 L1 期多个剪切体通路相关基因的转录水平显著下降。剪切因子对于 RNA 的加工过程至关重要(Morton *et al*, 2011)。研究表明 *prp-40* 调控秀丽线虫可变剪切, 其编码的 PRP-40 mRNA 前体加工因子是剪接体的重要组成之一(Choudhary *et al*, 2021)。通过 RNAi 抑制 *prp-8* 的功能导致秀丽线虫剪切异常, 其对于维持整个胚胎发生过程中的细胞分裂周期调控起重要作用(Hebeisen *et al*, 2008)。*sftb-1* 编码剪切因子 3B 亚基, mCherry 标记秀丽线虫 *sftb-1* 发现其是一种普遍表达的发育必需基因(Serrat *et al*, 2019)。在秀丽线虫中, 这些剪切因子的基因 L1 期表达量也均低于胚胎期(Grün *et al*, 2014; Boeck *et al*, 2016; Li *et al*, 2020)。最近报道发现秀丽线虫胚胎转录本的平均长度比胚胎后幼虫阶段的较长(Li *et al*, 2020), 因此推测海洋线虫与秀丽线虫在胚胎发育的过程中, 需要更高的剪切因子相关基因表达, 可能与胚胎期较长的转录本特征维持和细胞的快速分裂和分化等相关。

4 结论

我们的研究表明, 与胚胎期相比, 孵化后早期 *L. marina* L1 幼虫的多个通路如核糖体、核糖体生

物发生、糖酵解/糖原异生、TCA 循环和氧化磷酸化通路相关基因发生了显著上调; 多个神经递质和神经肽受体基因如 *dop-*、*npr-*和 *frpr-*等在 L1 期转录水平也显著上调。与胚胎期相比, L1 幼虫 DNA 复制和修复相关、Notch、Hippo 和 Hedgehog 信号通路和剪切体调控相关基因发生了显著下调。本研究发现的海洋线虫早期发育转录组变化模式与陆生模式生物秀丽线虫高度相似, 但同一上调或下调通路中具体发生表达变化的基因有些不同。另外, *L. marina* L1 幼虫显著上调的核糖体生物发生通路相关基因在秀丽线虫中发生了显著下调。因此, *L. marina* 与秀丽线虫早期发育的表达调控机制高度保守, 秀丽线虫丰富的生物信息学和突变体库等资源 and 成熟的分子生物学和遗传学等研究手段将极大地辅助海洋线虫的基础生物学研究, 并推动模式海洋线虫体系和平台构建。结合秀丽线虫成熟的研究方法, 在 *L. marina* 中进一步优化基因编辑等遗传操作将会为海-陆近缘线虫间的发育进化机制, 海洋线虫对潮间带环境适应以及海洋动物如何应答和适应全球气候变化的分子机制研究提供新认知, 也可为蜕皮类经济物种如虾蟹的遗传育种与产业发展提供重要理论和技术支持。

参 考 文 献

- 丛岩懿, 谢玉素, 张留所, 2020. 海洋线虫 *Litoditis marina* 酸性 pH 胁迫响应的转录组分析[J]. 海洋与湖沼, 51(6): 1472-1482.
- AHMAD W, EBERT P R, 2021. Suppression of a core metabolic enzyme dihydrolipoamide dehydrogenase (*dld*) protects against amyloid beta toxicity in *C. elegans* model of Alzheimer's disease [J]. *Genes & Diseases*, 8(6): 849-866.
- ARIAS E E, WALTER J C, 2007. Strength in numbers: preventing rereplication via multiple mechanisms in eukaryotic cells [J]. *Genes & Development*, 21(5): 497-518.
- BELL S P, DUTTA A, 2002. DNA replication in eukaryotic cells [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 71: 333-374.
- BERMUDEZ V P, LINDSEY-BOLTZ L A, CESARE A J, *et al*, 2003. Loading of the human 9-1-1 checkpoint complex onto DNA by the checkpoint clamp loader hRad17-replication factor C complex *in vitro* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(4): 1633-1638.
- BOECK M E, HUYNH C, GEVIRTZMAN L, *et al*, 2016. The time-resolved transcriptome of *C. elegans* [J]. *Genome Research*, 26(10): 1441-1450.
- CHAN S P, SLACK F J, 2009. Ribosomal protein RPS-14 modulates *let-7* microRNA function in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Developmental Biology*, 334(1): 152-160.
- CHASE D L, PEPPER J S, KOELLE M R, 2004. Mechanism of extrasynaptic dopamine signaling in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature Neuroscience*, 7(10): 1096-1103.
- CHEW Y L, TANIZAWA Y, CHO Y, *et al*, 2018. An afferent neuropeptide system transmits mechanosensory signals triggering sensitization and arousal in *C. elegans* [J]. *Neuron*, 99(6): 1233-1246.e6.
- CHOUDHARY B, MARX O, NORRIS A D, 2021. Spliceosomal component PRP-40 is a central regulator of microexon splicing [J]. *Cell Reports*, 36(5): 109464.
- FLOREA L, SONG L, SALZBERG S L, 2013. Thousands of exon skipping events differentiate among splicing patterns in sixteen human tissues [J]. *F1000Research*, 2: 188.
- FRÖHLICH D, SUCHOWERSKA A K, SPENCER Z H T, *et al*, 2017. *In vivo* characterization of the aspartyl-tRNA synthetase DARS: homing in on the leukodystrophy HBSL [J]. *Neurobiology of Disease*, 97: 24-35.
- FROMONT-RACINE M, SENGHER B, SAVEANU C, *et al*, 2003. Ribosome assembly in eukaryotes [J]. *Gene*, 313: 17-42.
- GRIFFITH J D, LINDSEY-BOLTZ L A, SANCAR A, 2002. Structures of the human Rad17-replication factor C and checkpoint Rad 9-1-1 complexes visualized by glycerol spray/low voltage microscopy [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 277(18): 15233-15236.
- GRÜN D, KIRCHNER M, THIERFELDER N, *et al*, 2014. Conservation of mRNA and protein expression during development of *C. elegans* [J]. *Cell Reports*, 6(3): 565-577.
- HADA K, HIROTA K, INANOBE A, *et al*, 2019. Tricarboxylic acid cycle activity suppresses acetylation of mitochondrial proteins during early embryonic development in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 294(9): 3091-3099.
- HEBEISEN M, DRYSDALE J, ROY R, 2008. Suppressors of the *cdc-25.1(gf)*-associated intestinal hyperplasia reveal important maternal roles for *prp-8* and a subset of splicing factors in *C. elegans* [J]. *RNA*, 14(12): 2618-2633.
- HEFEL A, HONDA M, CRONIN N, *et al*, 2021. RPA complexes in *Caenorhabditis elegans* meiosis; unique roles in replication, meiotic recombination and apoptosis [J]. *Nucleic Acids Research*, 49(4): 2005-2026.
- HOUTHOOFD W, JACOBSEN K, MERTENS C, *et al*, 2003. Embryonic cell lineage of the marine nematode *Pellioditis marina* [J]. *Developmental Biology*, 258(1): 57-69.
- IWASA H, MAIMAITI S, KUROYANAGI H, *et al*, 2013. Yes-associated protein homolog, YAP-1, is involved in the thermotolerance and aging in the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *Experimental Cell Research*, 319(7): 931-945.
- JI Y J, CHOI K Y, SONG H O, *et al*, 2006. VHA-8, the E subunit of V-ATPase, is essential for pH homeostasis and larval development in *C. elegans* [J]. *FEBS Letters*, 580(13): 3161-3166.
- JORGENSEN E M, 2005. GABA [J]. *WormBook: the Online Review of C. elegans Biology*, 1-13.
- KANEHISA M, ARAKI M, GOTO S, *et al*, 2008. KEGG for linking genomes to life and the environment [J]. *Nucleic Acids Research*, 36(S1): D480-D484.

- KIM Y I, BANDYOPADHYAY J, CHO I, *et al*, 2014. Nucleolar GTPase NOG-1 regulates development, fat storage, and longevity through insulin/IGF signaling in *C. elegans* [J]. *Molecules and Cells*, 37(1): 51-57.
- KIM D, LANGMEAD B, SALZBERG S L, 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements [J]. *Nature Methods*, 12(4): 357-360.
- KNIGHT A J, JOHNSON N M, BEHM C A, 2012. VHA-19 is essential in *Caenorhabditis elegans* oocytes for embryogenesis and is involved in trafficking in oocytes [J]. *PLoS One*, 7(7): e40317.
- KORZELIUS J, THE I, RUIJTENBERG S, *et al*, 2011. *C. elegans* MCM-4 is a general DNA replication and checkpoint component with an epidermis-specific requirement for growth and viability [J]. *Developmental Biology*, 350(2): 358-369.
- KRESSLER D, HURT E, BABLER J, 2010. Driving ribosome assembly [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1803(6): 673-683.
- LEE M H, HOLLIS S E, YOO B H, *et al*, 2011. *Caenorhabditis elegans* DNA-2 helicase/endonuclease plays a vital role in maintaining genome stability, morphogenesis, and life span [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 407(3): 495-500.
- LEE H, KANG J S, LEE J, 2018. Involvement of YAP-1, the homolog of yes-associated protein, in the wnt-mediated neuronal polarization in *Caenorhabditis elegans* [J]. *G3: Genes|Genomes|Genetics*, 8(8): 2595-2602.
- LI C, KIM K, 2008. Neuropeptides [J]. *WormBook: the Online Review of C. elegans Biology*, 1-36.
- LI R S, REN X L, DING Q T, *et al*, 2020. Direct full-length RNA sequencing reveals unexpected transcriptome complexity during *Caenorhabditis elegans* development [J]. *Genome Research*, 30(2): 287-298.
- LOVE M I, HUBER W, ANDERS S, 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 [J]. *Genome Biology*, 15(12): 550.
- LUO S, SCHAEFER A M, DOUR S, *et al*, 2014. The conserved LIM domain-containing focal adhesion protein ZYX-1 regulates synapse maintenance in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Development*, 141(20): 3922-3933.
- MAICAS M, JIMENO-MARTÍN Á, MILLÁN-TREJO A, *et al*, 2021. The transcription factor LAG-1/CSL plays a Notch-independent role in controlling terminal differentiation, fate maintenance, and plasticity of serotonergic chemosensory neurons [J]. *PLoS Biology*, 19(7): e3001334.
- MAO X Z, CAI T, OLYARCHUK J G, *et al*, 2005. Automated genome annotation and pathway identification using the KEGG Orthology (KO) as a controlled vocabulary [J]. *Bioinformatics*, 21(19): 3787-3793.
- MORTON J J, BLUMENTHAL T, 2011. RNA processing in *C. elegans* [J]. *Methods in Cell Biology*, 106: 187-217.
- NAGASHIMA T, OAMI E, KUTSUNA N, *et al*, 2016. Dopamine regulates body size in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Developmental Biology*, 412(1): 128-138.
- OMURA D T, CLARK D A, SAMUEL A D T, *et al*, 2012. Dopamine signaling is essential for precise rates of locomotion by *C. elegans* [J]. *PLoS One*, 7(6): e38649.
- PERTEA M, PERTEA G M, ANTONESCU C M, *et al*, 2015. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads [J]. *Nature Biotechnology*, 33(3): 290-295.
- RAJENDRAN V, KALITA P, SHUKLA H, *et al*, 2018. Aminoacyl-tRNA synthetases: structure, function, and drug discovery [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111: 400-414.
- RIVEIRO A R, MARIANI L, MALMBERG E, *et al*, 2017. JMJD-1.2/PHF8 controls axon guidance by regulating Hedgehog-like signaling [J]. *Development*, 144(5): 856-865.
- SERRAT X, KUKHTAR D, CORNES E, *et al*, 2019. CRISPR editing of *sftb-1/SF3B1* in *Caenorhabditis elegans* allows the identification of synthetic interactions with cancer-related mutations and the chemical inhibition of splicing [J]. *PLoS Genetics*, 15(10): e1008464.
- SOLOVIEV A, GALLAGHER J, MARNEF A, *et al*, 2011. *C. elegans patched-3* is an essential gene implicated in osmoregulation and requiring an intact permease transporter domain [J]. *Developmental Biology*, 351(2): 242-253.
- SÖNNICHSEN B, KOSKI L B, WALSH A, *et al*, 2005. Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 434(7032): 462-469.
- SULSTON J E, HORVITZ H R, 1977. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans* [J]. *Developmental Biology*, 56(1): 110-156.
- SULSTON J E, SCHIERENBERG E, WHITE J G, *et al*, 1983. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *Developmental Biology*, 100(1): 64-119.
- SUO S, ISHIURA S, VAN TOL H H M, 2004. Dopamine receptors in *C. elegans* [J]. *European Journal of Pharmacology*, 500(1/3): 159-166.
- THOMSON E, FERREIRA-CERCA S, HURT E, 2013. Eukaryotic ribosome biogenesis at a glance [J]. *Journal of Cell Science*, 126(Pt 21): 4815-4821.
- TINTORI S C, NISHIMURA E O, GOLDEN P, *et al*, 2016. A transcriptional lineage of the early *C. elegans* embryo [J]. *Developmental Cell*, 38(4): 430-444.
- VENCLOVAS C, THELEN M P, 2000. Structure-based predictions of Rad1, Rad9, Hus1 and Rad17 participation in sliding clamp and clamp-loading complexes [J]. *Nucleic Acids Research*, 28(13): 2481-2493.
- WEINBERG F, SCHULZE E, FATOUROS C, *et al*, 2014. Expression pattern and first functional characterization of *riok-1* in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Gene Expression Patterns*, 15(2): 124-134.
- WU J Y, JIANG X, LI Y M, *et al*, 2018. PHA-4/FoxA senses nucleolar stress to regulate lipid accumulation in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature Communications*, 9(1): 1195.
- XIE Y S, ZHANG P C, XUE B N, *et al*, 2020. Establishment of a marine nematode model for animal functional genomics, environmental adaptation and developmental evolution [J].

- bioRxiv, doi: 10.1101/2020.03.06.980219.
- XIE Y S, ZHANG P C, ZHANG L S, 2021. Genome-wide transcriptional responses of marine nematode *Litoditis marina* to hyposaline and hypersaline stresses [J]. *Frontiers in Physiology*, 12: 672099.
- YANG R D, LI Y M, WANG Y L, *et al*, 2022. NHR-80 senses the mitochondrial UPR to rewire citrate metabolism for lipid accumulation in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Cell Reports*, 38(2): 110206.
- YOON D S, CHA D S, ALFHILI M A, *et al*, 2018. Subunits of the DNA polymerase alpha-primase complex promote Notch-mediated proliferation with discrete and shared functions in *C. elegans* germline [J]. *The FEBS Journal*, 285(14): 2590-2604.
- YUAN F L, ZHOU J J, XU L X, *et al*, 2019. GABA receptors differentially regulate life span and health span in *C. elegans* through distinct downstream mechanisms [J]. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 317(5): C953-C963.
- ZENG L D, LI X S, PREUSCH C B, *et al*, 2021. Nuclear receptors NHR-49 and NHR-79 promote peroxisome proliferation to compensate for aldehyde dehydrogenase deficiency in *C. elegans* [J]. *PLoS Genetics*, 17(7): e1009635.
- ZHANG L S, GUALBERTO D G, GUO X Y, *et al*, 2015. TMC-1 attenuates *C. elegans* development and sexual behaviour in a chemically defined food environment [J]. *Nature Communications*, 6: 6345.
- ZHAO L, GAO F, GAO S, *et al*, 2021. Biodiversity-based development and evolution: the emerging research systems in model and non-model organisms [J]. *Science China Life Sciences*, 64(8): 1236-1280.

TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF MARINE NEMATODE *LITODITIS MARINA* IN EARLY DEVELOPMENTAL STAGES

WANG Tong-Tong^{1,2,3,4}, ZHANG Liu-Suo^{1,2,3}

(1. CAS Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China; 3. Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 4. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Global climate and environmental changes affect the development, reproduction, and other life processes of marine animals. To explore the molecular mechanism underlying how environmental factors regulate animal development, it is necessary to know the physiological and molecular nature of marine animals in early developmental stages. Transcriptome sequencing of samples taken from the embryonic stage and 2 h, 4 h and 6 h of L1 larvae of *Litoditis marina*, a potential model animal domesticated in our laboratory for about five years, were analyzed. Results showed small differences in gene expression among L1 larvae at 2 h, 4 h and 6 h, but significant difference from that of the embryonic stage. Multiple pathways such as ribosome, ribosome biogenesis, glycolysis/gluconeogenesis, TCA cycle, and oxidative phosphorylation related genes were significantly up-regulated in the three L1 larval samples compared to that of the embryonic stage, as shown in KEGG enrichment analysis. In addition, several neurotransmitter and neuropeptide receptor genes, such as *dop-* and *npr-*, were also significantly increased in L1 larvae. Several genes that are related to DNA replication and repair, Notch, Hippo, and Hedgehog signaling and spliceosome pathways were significantly down-regulated in L1 larvae compared with the embryonic stage. Therefore, the change pattern of the early developmental transcriptome of *L. marina* is very similar to that of the terrestrial model organism *Caenorhabditis elegans*. However, the specific genes expressed in the same up-regulated or down-regulated pathway were somewhat different. In addition, genes related to the ribosome biogenesis pathway that were significantly up-regulated in *L. marina* L1 larvae, were instead significantly decreased in *C. elegans* L1 larvae, compared to the embryos. In the future, the functions of key candidate genes regulating development through gene editing shall be studied, which will provide new insights into mechanisms underlying evolutionary developmental regulation between marine and terrestrial nematode relatives, the adaptation to the intertidal environments, and how marine animals response and adapt to the global climate change.

Key words marine nematode; *Litoditis marina*; early development; ribosome; energy; metabolism; neuronal receptors; DNA replication and repair