

学校编码: 10384

密级\_\_\_\_\_

学 号: 22420111151380

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

海洋酸化对福建牡蛎幼体基因表达的影响

Effects of Ocean Acidification on Gene Expression of

Fujian Oyster(*Crassostrea angulata*) Larvae

濮 菲

指导教师姓名: 柯才焕教授

专业名称: 海洋生物

论文提交日期: 2014年05月

论文答辩时间: 2014年05月

2014年05月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版)，允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

(        )1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于  
年    月    日解密，解密后适用上述授权。

(        )2.不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人(签名)：

年    月    日

目录

摘要 .....	1
Abstract .....	3
<b>第一章 绪论</b> .....	<b>6</b>
1.1 海洋酸化的过程和影响.....	6
1.2 贝壳形成和生长相关基因的研究现状.....	9
1.3 本论文研究内容和意义.....	16
<b>第二章 海洋酸化对福建牡蛎幼体贝壳生长的影响</b> .....	<b>19</b>
2.1 不同发育阶段福建牡蛎幼体贝壳的形态参数变化.....	19
2.1.1 材料和方法.....	19
2.1.2 结果.....	21
2.1.3 讨论.....	24
2.2 海洋酸化条件下福建牡蛎幼体贝壳扫描电镜观察.....	26
2.3.1 材料和方法.....	26
2.3.2 结果.....	27
2.3.3 讨论.....	30
<b>第三章 海洋酸化条件下福建牡蛎幼体数字基因表达谱分析</b> .....	<b>32</b>
3.1 材料和方法.....	33
3.1.1 实验动物.....	33
3.1.2 酸化暴露后福建牡蛎幼体总 RNA 的提取.....	33
3.1.3 酸化暴露下福建牡蛎幼体的数字基因表达谱.....	33
3.1.4 酸化暴露下福建牡蛎幼体基因表达谱的生物信息学分析.....	34

3.1.5 qRT-PCR 验证 .....	37
3.2 结果 .....	40
3.2.1 福建牡蛎幼体酸化暴露表达谱测序质量分析 .....	40
3.2.2 福建牡蛎幼体酸化暴露差异表达基因分析 .....	41
3.2.3 福建牡蛎幼体酸化暴露差异表达基因筛选 .....	42
3.2.4 福建牡蛎幼体酸化暴露差异基因 GO 功能显著性富集分析 .....	43
3.2.5 福建牡蛎幼体酸化暴露差异基因 Pathway 途径分析 .....	49
3.2.6 福建牡蛎幼体酸化暴露后加权基因共表达分析 .....	52
3.2.7 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 验证 .....	55
3.3 讨论 .....	56
<b>第四章 海洋酸化条件下福建牡蛎幼体贝壳形成和生长相关基因的初步研究 .....</b>	<b>59</b>
4.1 福建牡蛎早期胚胎发育相关基因的功能研究 .....	60
4.1.1 材料和方法 .....	60
4.1.2 结果 .....	69
4.1.3 讨论 .....	72
4.2 海洋酸化对福建牡蛎幼体早期发育相关基因的影响 .....	73
4.2.1 材料与方法 .....	73
4.2.2 结果 .....	75
4.2.3 讨论 .....	79
<b>第五章 论文的主要结论和创新点 .....</b>	<b>81</b>
5.1 论文的主要结论 .....	81
5.2 创新点 .....	81
5.3 不足与展望 .....	81

参考文献.....	83
致谢.....	96
在学期间发表的论文.....	98

厦门大学博硕士论文摘要库

**Table of Contents**

Abstract in Chinese .....	1
Abstract in English.....	3
Chapter 1 Introduction .....	6
1.1 The processing and influences of ocean acidification.....	6
1.2 The research status of genes involved in shell formation and development.....	9
1.3 The objective and significant of this study.....	16
Chapter 2 The impacts of ocean acidification on <i>Crassostrea angulata</i> larvae shell development .....	19
2.1 Variations in shell morphological parameters in <i>C. angulata</i> during different development stages .....	19
2.1.1 Materials and methods.....	19
2.1.2 Results .....	21
2.1.3 Discussion.....	24
2.2 Scanning electron microscope observation of <i>C. angulata</i> larvae shell under ocean acidification.....	26
2.3.1 Materials and methods.....	26
2.3.2 Results .....	27
2.3.3 Discussion.....	30
Chapter 3 Digital gene expression profiles of <i>C. angulata</i> larvae after ocean acidification exposure.....	32
3.1 Materials and methods .....	33
3.1.1 Animals.....	33

---

3.1.2 Total RNA extraction .....	33
3.1.3 DGE profiles.....	33
3.1.4 Information .....	34
3.1.5 qRT-PCR verification.....	37
3.2 Results .....	40
3.2.1 Sequence quality assessment .....	40
3.2.2 Analysis of differentially expressed genes .....	41
3.2.3 Screening of differentially expressed genes .....	42
3.2.4 GO functional enrichment analysis for DGEs.....	43
3.2.5 Pathway enrichment analysis for DGEs .....	49
3.2.6 The coexpression-network analysis for DGEs .....	52
3.2.7 qRT-PCR verification.....	55
3.3 Discussion .....	56
Chapter 4 The preliminary study of genes involved in <i>C. angulata</i> larvae shell formation and development under ocean acidification .....	59
4.1 The functional study of genes involved in <i>C. angulata</i> early embryonic development .....	60
4.1.1 Materials and methods.....	60
4.1.2 Results .....	69
4.1.3 Discussion.....	72
4.2 The impacts of ocean acidification on genes involved in <i>C. angulata</i> larvae early development .....	73
4.2.1 Materials and methods.....	73
4.2.2 Results .....	74



4.2.3 Discussion.....	79
Chapter 5 General conclusions and innovations.....	81
5.1 General conclusion.....	81
5.2 Innovations.....	81
5.3 Perspectives.....	81
References.....	83
Acknowledgements.....	96
Projects and publications.....	98

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 摘要

随着人为排放到大气中的 CO<sub>2</sub> 持续增加,由 CO<sub>2</sub> 驱动的海洋酸化将导致海水 pH 值在本世纪显著下降,并很可能对海洋生物,特别是对钙质无脊椎动物及生态系统造成严重负面影响。越来越多的研究表明,海洋酸化会影响海洋钙质无脊椎动物的存活、发育和生理机能。然而,目前关于海洋酸化对福建牡蛎 (*Crassostrea angulata*) 幼体影响的研究报道还比较少。本文通过实验室内模拟未来海洋环境,研究了短期高 CO<sub>2</sub> 暴露对我国重要经济水产养殖种类—福建牡蛎幼体发育的影响(对照组 CO<sub>2</sub> 浓度 400 ppm,实验组分别为 1500 ppm 和 3000 ppm)。利用形态学和分子生物学方法对酸化暴露后的幼体进行相关研究,主要结果如下:

### 1. 海洋酸化对福建牡蛎幼体贝壳生长的影响

通过对福建牡蛎幼体贝壳形态参数的测量分析,发现 1500 ppm 实验组较对照组贝壳形态无显著性差异,3000 ppm 实验组中幼体个体较对照组偏小,贝壳增长速度慢,畸形率升高。进一步采用扫描电镜联用 EDS 能谱法分析技术分析酸化暴露后 D 型幼体贝壳元素成分,发现海洋酸化对幼体钙元素沉积有一定的抑制作用,而且发现福建牡蛎幼体对 1500 ppm 酸化程度有一定的耐受性。

### 2. 海洋酸化条件下福建牡蛎幼体数字基因表达谱分析

通过对正常条件下和海洋酸化条件下的福建牡蛎担轮幼体、D 型初期幼体和 D 型 2d 幼体进行高通量测序,分别两两比较后获得差异基因 5317 个、74 个和 2641 个。差异基因的 GO 功能显著性富集分析和 Pathway 显著性富集分析结果显示,海洋酸化主要抑制了胚胎发育、能量代谢、基础生物学过程和钙离子传导相关基因和通路的作用,从而导致幼体生长延迟。

### 3. 海洋酸化对福建牡蛎幼体贝壳形成和生长相关基因的影响

通过全胚原位杂交技术发现 Tyr3、TGF- $\beta$  信号通路和 BMP 信号通路均参与福建牡蛎幼体 InCaS 生物发生。在酸化条件下, TGF- $\beta$  信号通路相关基因表达受到抑制,而 Tyr3 基因和 BMP 信号通路相关基因表达上调。形态学研究结果显示,在海洋酸化条件下福建牡蛎面盘幼体贝壳生长缓慢且个体偏小,畸形率高,因此,我们推测 Tyr3 和 BMP 信号通路相关基因上调表达后仍不能补偿海洋酸化对幼体造成的损伤,所以福建牡蛎在海洋酸化条件下贝壳虽仍能持续生长但大小

形状都较对照组有变化。

本研究通过扫描电镜联用 EDS 能谱法分析技术分析福建牡蛎幼体贝壳元素成分，发现海洋酸化对钙元素沉积有一定抑制作用；利用 RNA-Seq 技术探究海洋酸化对福建牡蛎幼体早期生长发育影响，结果显示，海洋酸化抑制早期胚胎发育、能量代谢和钙离子传导相关信号通路作用，从而导致幼体生长延迟；利用成熟的 WISH 方法探究 Tyr3、TGF- $\beta$  信号通路和 BMP 信号通路相关基因的功能，并用 qRT-PCR 技术研究了海洋酸化条件下它们的表达情况，结果显示，它们与 InCaS 生物发生和贝壳生长有关，在酸化条件下，TGF- $\beta$  信号通路相关基因表达受到抑制，而 Tyr3 基因和 BMP 信号通路相关基因上调表达，结合形态学研究结果推测，海洋酸化条件下，某些基因和信号通路上调表达仍不能补偿酸化对幼体造成的损伤而导致幼体贝壳生长缓慢，畸形率升高。

关键词：海洋酸化；福建牡蛎；扫描电镜；表达谱；全胚原位杂交；差异表达

## Abstract

Nowadays anthropogenic CO<sub>2</sub> emissions are acidifying the world's oceans. A growing body of researches on calcifying marine invertebrates demonstrate that ocean acidification can impact survival, growth, development and physiology. However, limited information was available concerning the impacts of ocean acidification on Fujian oyster *Crassostrea angulata* larvae. In laboratory experiments designed to mimic seawater chemistry in future oceans, we tested the impacts of short-term exposure to elevated pCO<sub>2</sub> (1500 ppm and 3000 ppm, compared to control 400 ppm) on *Crassostrea angulata*, one of the most important economic aquaculture varieties. In this study, we use morphology technology and molecular technology to study the *Crassostrea angulata* larvae after exposed to ocean acidification. The main results are as follows:

1. The influence of ocean acidification on shell development of *Crassostrea angulata* larvae

We found that 1500 ppm pCO<sub>2</sub> exposure had no significant influence on *Crassostrea angulata* larvae, while the larvae exposed to 3000 ppm pCO<sub>2</sub> were smaller than those cultured in control, and the shell growth was slower. In addition, the aberration rate of larvae was increased. Further we found that ocean acidification certainly inhibited the calcium deposition of *Crassostrea angulata* 4 days D-veligers using Scanning electron microscope combined with energy dispersive spectroscopy analysis. Furthermore we concluded that *Crassostrea angulata* larvae can tolerate the impact of ocean acidification at 1500 ppm pCO<sub>2</sub>.

2. The digital gene expression profiles analysis of *Crassostrea angulata* larvae after exposed to ocean acidification

Digital gene expression profiles of *Crassostrea angulata* trochophores, early D-veligers and 4 days D-veligers after ocean acidification exposure were assessed. After comparing with controls we respectively got 5317, 74 and 2641 differentially expressed genes. Gene ontology enrichment analysis and Pathway enrichment analysis for the differentially expressed genes showed that ocean acidification mainly

inhibited the genes and pathways participated in embryonic development, energy metabolism and calcium ion conduction, thus leading to the delay of larvae growth.

3. The preliminary study on the genes involved in the formation and development of *Crassostrea angulata* larvae shell after exposed to ocean acidification

Through the whole mount *in situ* hybridization (WISH) we found Tyr3, TGF- $\beta$  signalling pathway and BMP signalling pathway are involved in the biogenesis of *Crassostrea angulata* larvae InCaS. Under ocean acidification, the expression of genes involved in TGF- $\beta$  signalling pathway was restrained, while Tyr3 and genes participated in BMP signalling pathway upregulated their expression. However, the results of the morphological study released that larvae shells can still grow in a slower rate, and the aberration rate was increased. Therefore, we suggested that the upregulation of Tyr3 and BMP signalling pathway cannot compensate the damage of ocean acidification.

We use Scanning electron microscope combined with energy disperse spectroscopy analysis to study the impacts of ocean acidification on the shell elements. The results released that the calcium deposition was inhibited by ocean acidification. We took good advantages of RNA-Seq technology to evaluate the influences of ocean acidification on *Crassostrea angulata* larvae during early development. We found that ocean acidification mainly inhibited the function of signalling pathways which involved in the early embryonic development, energy metabolism and calcium ion conduction, thus led to the delay in larvae growth. Using the whole mount *in situ* hybridization to explore the function of Tyr3 and genes involved in TGF- $\beta$  and BMP signalling pathways. The results showed that these genes were concerned with InCaS biogenesis and shell development. Further we used qRT-PCR to explore the gene expression patterns under ocean acidification. We found that the genes involved in the TGF- $\beta$  signalling pathway were downregulated their expression, while the expression of Tyr3 and genes involved in BMP signalling pathway were increased. Considering the results of morphology researches, we supposed that after exposed to ocean acidification, the upregulated expression of some genes and signaling pathways cannot compensate the damage of ocean acidification to larvae, so that the growth of

larvae shell was decreased and the abnormality was elevated.

Key Words: ocean acidification; *Crassostrea angulata*; Scanning Electron Microscope; Digital gene expression profiles; whole mount in situ hybridization; differential expression

厦门大学博硕士论文摘要库

## 第一章 绪论

牡蛎属软体动物门 (Mollusca)、双壳纲 (Bivalvia)、珍珠贝目 (Pterioidea)、牡蛎科 (Osteridae), 是一种十分重要的海洋生物资源。其肉质鲜美, 营养价值较高, 素有“海洋牛奶”之美誉。牡蛎地理分布广、生长快、产量高, 具有很高的经济价值, 是世界各国重要的海水养殖对象。据联合国粮农组织统计, 在 1950~2007 年间世界牡蛎产量由 20 万吨增至 439.7 万吨。1980 年以后, 中国牡蛎养殖产量迅猛增加, 尤其是近 10 年来中国牡蛎年产量均在 300 万吨以上, 约占世界牡蛎产量的 80% (FAO, 2009)。我国牡蛎养殖以福建养殖面积最大, 产量最高, 养殖品种以福建牡蛎为主 (Cai et al., 2008; 曾志南等, 2011)。

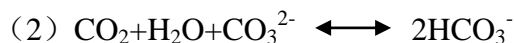
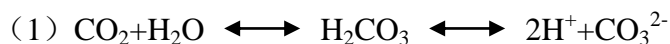
众所周知, CO<sub>2</sub> 等温室气体排放导致全球变暖, 而海水会通过吸收 CO<sub>2</sub> 缓解这一状况。据 IPCC 预测, 到 21 世纪末, 大气 CO<sub>2</sub> 含量将达到近 1000 ppm, 相当于海水 pH 下降 0.45 个单位; 预计在接下来的三个世纪, 若大气 CO<sub>2</sub> 不加抑制地增加将导致大气 CO<sub>2</sub> 含量达到近 2000 ppm, 使海洋 pH 下降 0.77 单位。已有文献报告, 海洋酸化会导致海洋钙质生物 (包括海洋双壳类) 幼体和稚贝的死亡率增加、生长率下降, 并且会抑制它们的生物矿化作用, 增加基础生理功能的消耗等。

目前, 全球海洋都在遭受海洋酸化的影响, 海洋酸化也冲击着牡蛎养殖业, 美国西北部海滨牡蛎养殖场由于酸化海水上涌而几近崩溃, 这给美国的牡蛎养殖业也带来了不小的经济损失 (Barton et al., 2012)。牡蛎养殖业稳定、持续发展必须依赖于优质、充足的苗种供应, 而对牡蛎幼体如何响应海洋酸化的研究是保持苗种生产稳定发展的基础。

### 1.1 海洋酸化的过程和影响

由于人类活动, 导致大量温室气体释放到环境中, 其中含量最大的是 CO<sub>2</sub>, 对大气来说最显著的是温室效应, 但这个效应由于海洋的存在而得到延缓, 据估计, 迄今排放到大气中的 30% 的 CO<sub>2</sub> 被海洋所吸收 (Doney et al., 2009)。海洋的存在延缓了由 CO<sub>2</sub> 导致的全球变暖的速度, 可同时也引起了海洋自身的酸化。据统计, 大气 CO<sub>2</sub> 的全球平均浓度从工业革命前的 280 ppm 增加到目前的 380 ppm 左右, 到本世纪末将会增加至 500-1000 ppm (Meehl et al., 2007; Wise et al., 2009)。

对应大气CO<sub>2</sub>浓度的上升，海洋的pH值较工业革命前下降了0.1个单位，并且到2100年，海洋酸化可能使海洋表层海水pH值下降0.14~0.35个单位（Meehl et al., 2007; Orr et al., 2005），到2250年则会下降0.7个单位。相较于气候变化，海洋酸化是个相对简单的化学动态平衡过程：



海洋吸收CO<sub>2</sub>的直接后果就是H<sup>+</sup>含量增加，pH值降低；另一个后果则是增加了CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>和HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>的浓度。作为平衡式（1）的产物——CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>，在pCO<sub>2</sub>增大的时候，会导致平衡式（2）向右移动，从而降低CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>的浓度，长此以往，海洋酸化会减少海洋中碳酸盐沉积，而且也会影响几乎所有海洋生物。

首先，海洋酸化不仅导致海水pH值降低，同时也会影响海洋生物组织液pH值，这就使海洋生物面临环境和细胞外液pH值下降的双重压力。虽然很多生物具备一定的酸碱调节能力，但是从能量学角度看，长期处于酸碱调节状态，势必会减少对其它生理功能运作的供能，尤其是对那些高能耗的特殊种类和生物发育时期。海洋酸化本身是一种环境压力，与极端温度、缺氧、污染等其它环境压力一样，对生物体生长发育中的各个时期，包括早期发育、成体阶段、性成熟以及繁殖都会产生巨大影响。对皱纹盘鲍（*Haliotis discus hannai*）早期发育研究中发现，海洋酸化会导致鲍胚胎孵化延迟，畸形率升高和附着变态率下降（Li et al., 2013）。Talmage等人通过对两种双壳贝类（*Mercenaria mercenaria*和*Argopecten irradians*）在工业革命前、现在和未来（21世纪和22世纪）CO<sub>2</sub>浓度下（分别为250 ppm、390 ppm和1500 ppm）的生长和存活研究发现，工业革命前条件下生长的幼体的生长率、变态率、存活率和脂质积累率都显著高于当下CO<sub>2</sub>浓度下生存的幼体，并且贝壳更厚更健康；在预测的未来环境下生长的幼体的贝壳畸形难看且被腐蚀。这些结果表明了过去两个世纪发生的海洋酸化可能已经抑制了贝类幼体的存活和生长发育，并且促使一些双壳贝类全球种群退化（Talmage et al., 2010）。美国LiveScience网站报道，新近研究发现，到2300年海洋酸化将导致南部海洋的南极磷虾产量崩溃，这不仅意味着严重的经济影响，还会给整个生态系统中以磷虾为食的动物造成严重后果。还有研究表明，海洋酸化会降低珊瑚虫的钙化速率，并使成体珊瑚虫生长速度减慢，珊



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

廈門大學博碩士論文摘要庫