

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210424001

http://www.yykxjz.cn/

李欣容, 廖梅杰, 李彬, 荣小军, 畅孟阳, 王印庚, 于永翔, 张正, 范瑞用, 刘清兵. 刺参响应灿烂弧菌侵染的基因组 DNA 甲基化水平和转录组差异及其关联分析. 渔业科学进展, 2022, 43(3): 176–185

LI X R, LIAO M J, LI B, RONG X J, CHANG M Y, WANG Y G, YU Y X, ZHANG Z, FAN R Y, LIU Q B. Genomic DNA methylation levels and transcriptome differences of *Apostichopus japonicus* in response to *Vibrio splendidus* infection and their association analysis. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(3): 176–185

刺参响应灿烂弧菌侵染的基因组 DNA 甲基化水平和转录组差异及其关联分析*

李欣容^{1,2} 廖梅杰^{2,3①} 李彬^{2,3} 荣小军^{2,3} 畅孟阳^{2,3}
王印庚^{2,3} 于永翔^{2,3} 张正^{2,3} 范瑞用⁴ 刘清兵⁴

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 山东 青岛 266071; 3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东 青岛 266071; 4. 青岛瑞滋集团有限公司 山东 青岛 266408)

摘要 为探讨病原菌胁迫下刺参(*Apostichopus japonicus*)基因组 DNA 甲基化水平和转录组表达的差异,本研究采用人工攻毒侵染胁迫,获得刺参化皮体壁组织,并以未攻毒组的健康体壁组织为对照,对刺参 2 种体壁组织进行全基因组甲基化测序(WGBS)和转录组高通量测序,解析刺参体壁基因组 DNA 甲基化差异,筛选响应病原胁迫的差异甲基化区域和差异表达基因。同时,通过基因组甲基化和转录组联合分析,筛选负相关关联基因,为解析刺参响应灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)侵染的分子机理提供基础数据。结果显示,刺参对照组和侵染组基因组总甲基化水平分别为(3.59±0.04)%和(3.87±0.27)%,侵染组甲基化水平显著升高;在发生甲基化的位点中,攻毒组和对照组的 mCpG 占比分别为 83.06%和 81.91%,mCpG 为最主要的甲基化形式。本研究共筛选出差异甲基化区域(DMRs) 626 677 个,注释到 23 706 个功能基因。转录组测序共检测到 29 290 个基因,筛选到差异表达基因 496 个,其中,上调基因 214 个,下调基因 282 个。在基因组甲基化与转录组的关联分析中,筛选到 180 个负相关关联基因,其中,差异甲基化区域位于启动子区域的负相关基因为 60 个。对负相关关联基因的 GO 和 KEGG 富集分析,筛选到相关通路和 *LRR*、*hsp20* 和 *CARD* 等关键基因。本研究将为解析刺参抗病的表观遗传调控机制提供数据,也为刺参抗病性状选育提供科学参考。

关键词 刺参; DNA 甲基化; 转录组; 关联分析

中图分类号 S968.9 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)03-0176-10

仿刺参又称刺参(*Apostichopus japonicus*), 具有重要的营养价值和药用价值, 是我国第五次海水养殖

* 国家重点研发计划(2018YFD0901603)、山东省农业良种工程课题(2020LZGC015)、中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2020TD40; 2021GH05)共同资助 [This work was supported by National Key R&D Program of China (2018YFD0901603), Agriculture Seed Improvement Project of Shandong Province (2020LZGC015), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD40; 2021GH05)].

李欣容, E-mail: 1123295662@qq.com

① 通讯作者: 廖梅杰, 研究员, E-mail: liaomj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2021-04-24, 收修改稿日期: 2021-04-27

浪潮的代表性物种之一,其养殖业为我国沿海经济结构调整和渔民增收开辟了一条新途径(王印庚等, 2014)。在人工养殖刺参过程中,刺参的病害问题日益凸显,给刺参养殖业造成了严重的经济损失,严重制约了该产业的稳定发展。开展刺参抗病机制解析对刺参良种选育和病害防控具有重要意义。DNA 甲基化是表观遗传修饰的主要方式,在不改变 DNA 序列的前提下,改变遗传表现在调控基因表达和染色质构象等方面发挥着重要作用(Moore *et al.*, 2013)。研究表明,刺参在肠道组织再生、夏眠、化皮及倍性等过程或现象中,相关组织均有显著的基因组甲基化水平差异变化,表明甲基化在刺参相关生理过程中发挥重要的调控作用(Yang *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2020; Han *et al.*, 2021; 高杉等, 2017; 李晓妮, 2018; 赵业, 2015)。本研究以刺参腐皮综合征重要致病原——灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)为病原对刺参苗种进行人工攻毒侵染实验,以攻毒后发病个体和未攻毒的健康个体的体壁组织为样本,采用全基因组甲基化测序技术(WGBS)和转录组高通量测序技术,分析灿烂弧菌胁迫下刺参体壁 DNA 甲基化水平变化及基因表达差异变化,并进一步对甲基化位点和转录组差异进行关联分析,筛选出关键位点及关联基因,为解析刺参响应灿烂弧菌侵染的分子机制提供基础数据,也有助于为刺参抗病性状选育提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所用健康苗种取自山东青岛瑞滋集团有限公司,选取活力良好、健康的个体,苗种规格为(50.0±2.0) g/只。苗种运回实验室后暂养 3 d,暂养水温为(13.0±0.5)℃,待苗种状态稳定后用于后续实验。

攻毒用菌株为本团队病原库中保存的分离自患腐皮综合征的刺参病样的灿烂弧菌菌株(AJ-Vb1801)。对该菌株用胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB)固体培养基复苏,然后用 TSB 液体培养基扩大培养。

1.2 实验样品的采集

灿烂弧菌人工攻毒侵染与取样:根据实验目的将实验分为 2 组,每组设 3 个平行,每个平行实验苗种数量为 30 头,实验水槽容积为 50 L。对照组(PT10H)为在水质良好的自然海水中养殖的健康苗种,侵染组(PT16S)按照水体体积在养殖水槽中添加培养的灿烂弧菌菌液至终浓度 1×10^6 CFU/mL (该浓度为灿烂弧菌对刺参苗种的半致死浓度)。养殖条件:温度(13.0±0.5)℃,盐度(28.0±0.5),每天换 1/3 水,换水后及时添加灿烂弧

菌菌液,使其维持在 1×10^6 CFU/mL。每天换水后定时投喂刺参配合饲料,投喂量为刺参苗种体重的 2%,养殖期间持续充气。实验期间,每天观察刺参苗种的生理状态,及时收集侵染组发生化皮的濒死个体,分别标记为 PT16S1、PT16S2 和 PT16S3,在相同时间节点采集对照组健康个体,分别标记为 PT10H1、PT10H2 和 PT10H3。剖取所采集样品的体壁组织,置于 2 mL 冻存管后迅速放入液氮罐中,送回实验室,−80℃保存,用于后期 DNA 和 RNA 的提取。

1.3 DNA 和 RNA 的提取

以对照组和侵染组的体壁组织为材料,分别采用 Omega 公司的 Mollusc DNA kit 和 QIAGEN RNeasy mini kit 提取各样品体壁基因组 DNA 和 RNA,1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 和 RNA 完整性,NanoDrop 核酸测定仪测定所提取核酸样品的纯度,检测合格的样品于−80℃保存备用。

1.4 全基因组 DNA 甲基化测序

将所提取的 6 个 DNA 样品送至杭州联川生物技术股份有限公司分别构建甲基化文库,并利用 HiSeq4000 测序平台 150PE 上机策略进行测序。

1.5 数据处理与比对

测序完成后对原始数据进行预处理,去除可能含有测序接头序列和低质量的测序数据(含有 N 的比例大于 5%,以及质量值 $Q \leq 10$ 的碱基数占整个 read 的 20%以上的 reads),得到有效数据,用于后续的生物信息学分析。

以本团队组装的刺参全基因组序列(数据待发表)为基础,对预处理后的有效测序数据使用 Bismark (Krueger *et al.*, 2011)进行参考基因组序列比对,统计基因组比对结果。

1.6 刺参体壁基因组 DNA 甲基化分布特征分析

根据基因组比对分析结果,统计所测样品各类型甲基化 C 位点(mCpG、mCHG 和 mCHH)的数目,及其在全部 mC 的位点中所占的比例,解析物种的全基因组 DNA 甲基化修饰特征。

1.7 差异甲基化区域分析

使用 R 语言程序包中的 methylKit 筛选差异甲基化区域(differentially methylated regions, DMRs),默认选择 1000 bp windows、500 bp overlap、FDR<0.05 为差异筛选阈值,进行 DMR 分析。统计差异表达分析中侵染组的甲基化水平显著性升高或下降的基因数

目。对筛选到的具有 DMR 的基因进行注释,按照基因结构绘制柱状统计图。

1.8 转录组中差异表达基因的筛选

将所采集的 6 个样品的 RNA 送至杭州联川生物技术股份有限公司分别构建 cDNA 文库,采用 Illumina Novaseq™ 6000 进行测序,测序读长为双端 2×150 bp (PE150)。使用 String Tie 软件计算不同样品间各基因表达定量的结果,以 FPKM (fragments per kilobase of exon model per million mapped reads)为单位对已知基因统计其在不同样本中的表达丰度,筛选差异表达基因(different expression genes, DEGs)。

1.9 DNA 甲基化与转录组联合分析

对转录组测序和基因甲基化测序数据进行联合分析,统计 DMRs 和 DEGs 注释的共有基因,检测这些共有基因的 DMR 甲基化水平与 DEG 表达水平之间的相关性,统计 DMR 甲基化水平与 DEG 表达水平存在负相关的基因,分别采用 GOseq 和 KOBAS 软件对筛选到的差异甲基化基因进行 GO 和 KEGG

pathway 富集分析,采用 ggplot2 软件绘制差异甲基化基因的 KEGG 散点图。

2 结果

2.1 甲基化测序结果统计

对实验获得的对照组(PT10H)和侵染组(PT16S)的 6 个样品的 WGBS 测序和数据统计分析结果见表 1。高通量测序平均每个样品产出 165 510 349 条的原始数据,对原始数据进行预处理后,截去测序数据的测序接头和去除低质量的数据,得到均值为 23.20 Gb 的有效数据,有效序列占比在 99.18%以上, Q30 以上的数据占比大于 91.96%,有 37.31%~39.81%的 mapped reads 可比对到刺参的参考基因组,说明测序数据的质量较好。

2.2 基因组中甲基化位点统计

根据基因组比对分析结果,表 2 统计了对照组和侵染组刺参体壁组织中 C 位点以及不同类型(CG、CHG 和 CHH)的平均甲基化水平。侵染组样品基因组

表 1 WGBS 测序数据统计
Tab.1 Statistics of the WGBS sequencing data

组别 Group	样品编号 Sample No.	原始数据序列数 Raw data reads	有效数据 Valid data		有效数据比例 Percentage of valid data /%	Q30/%	比对率 Mapping rate /%
			序列数 Reads	碱基数 Bases			
对照组 PT10H	PT10H1	176 325 924	176 033 898	25.21 G	99.83	92.26	37.31
	PT10H2	161 152 798	160 856 756	22.95 G	99.82	92.14	37.46
	PT10H3	166 891 706	166 500 024	23.53 G	99.77	92.67	38.28
侵染组 PT16S	PT16S1	162 682 240	161 584 352	22.61 G	99.33	92.94	39.81
	PT16S2	155 081 068	153 806 718	21.48 G	99.18	92.72	39.38
	PT16S3	170 928 362	170 077 824	23.44 G	99.50	91.96	39.40

表 2 不同类型 C 位点甲基化水平
Tab.2 Methylation level of different cytosine contexts

组别 Group	样品编号 Sample No.	mC 比例 mC percentage /%	mCpG 比例 mCpG percentage /%	mCHG 比例 mCHG percentage /%	mCHH 比例 mCHH percentage /%
对照组 PT10H	PT10H-1	3.55	24.06	0.53	0.45
	PT10H-2	3.57	24.13	0.54	0.46
	PT10H-3	3.65	24.23	0.61	0.51
	平均值 Mean	3.59±0.04*	24.14±0.07	0.56±0.04*	0.47±0.03*
侵染组 PT16S	PT16S-1	3.92	24.48	1.08	0.78
	PT16S-2	4.17	24.88	1.32	0.96
	PT16S-3	3.52	23.31	0.54	0.53
	平均值 Mean	3.87±0.27	24.22±0.67	0.98±0.33	0.76±0.18

注: *代表有显著差异($P<0.05$)。下同

Note: * represents a significant difference ($P<0.05$). The same as below

甲基化 C 位点占全部 C 位点数的(3.87±0.27)%, 对照组为(3.59±0.04)%, 说明在病原菌感染胁迫下, 基因组甲基化 C 位点占比显著升高($P<0.05$)。不同类型(CpG、CHG 和 CHH)的平均甲基化水平统计结果显示, 对照组 mCpG、mCHG 和 mCHH 占 CpG、CHG 和 CHH 的比例分别为 24.14%、0.56%和 0.47%, 而感染组的 mCpG、mCHG 和 mCHH 占 CpG、CHG 和 CHH 的比例分别为 24.22%、0.98%和 0.76%。由此可见, 对于刺参基因组来说, CpG 位点发生甲基化的比例显著高于 CHG 和 CHH。从对照组和感染组不同类型位点甲基化对比结果可以看出, 感染组的 mCHG 和 mCHH 比例显著高于对照组。

对照组和感染组基因组 DNA 不同形式甲基化 C 位点占总甲基化 C 位点的比例见图 1。如图 1 所示, 在总的 mC 位点中, 感染组和对照组 mCpG 占比分别为 83.06%和 81.91%, mCHH 占比分别为 13.41%和 14.28%, mCHG 占比分别为 3.53%和 3.81%, 说明甲基化位点主要集中在 CpG 二核苷酸序列的胞嘧啶上, CpG 甲基化是主要的甲基化形式。

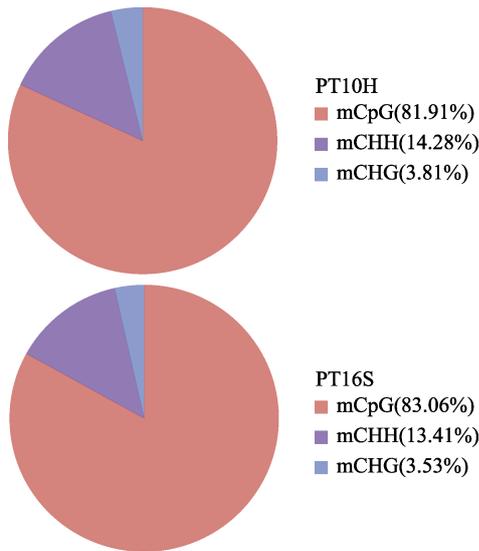


图 1 对照组(PT10H)和感染组(PT16S) mCpG、mCHG 和 mCHH 占总 mC 的百分比

Fig.1 Methylation percentage of mCpG, mCHG, and mCHH to total mC in PT10H and PT16S groups

2.3 差异甲基化区域分析

使用 R 语言程序包中的 methylKit 分析自对照组和感染组样品测序结果中筛选到的 626 677 个 DMRs。根据分组的差异比较结果, 对发生显著甲基化的基因数量的统计结果见图 2。从对照组和感染组共筛选到的启动子区域 DMRs 共有 40 329 个(6.44%), 其中, 甲基化水平升高的有 22 613 个, 下降的有

17 716 个;外显子区域存在 58 522 个 DMRs (9.34%), 其中, 升高的有 29 731 个, 下降的有 28 791 个; 内含子区域 DMRs 共有 109 635 个(17.49%), 其中, 升高的有 56 603 个, 下降的有 53 032 个; 基因间区 DMRs 共有 401 174 个(64.02%), 其中, 升高的有 216 152 个, 下降的有 185 022 个; CGI.CG 岛 DMRs 共有 17 017 个(2.72%), 其中, 升高的有 8877 个, 下降的有 8140 个。刺参基因间区的差异甲基化基因比例最高, CGI.CG 岛区域的差异甲基化比例最低。

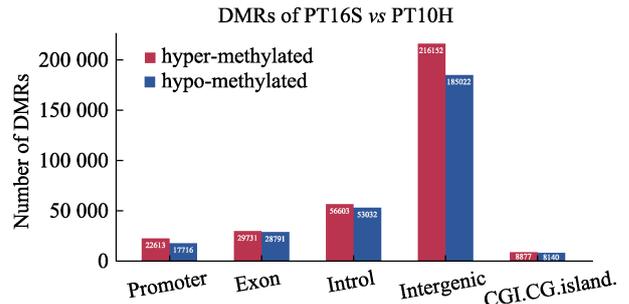


图 2 不同基因功能区域的 DMR 数量

Fig.2 The number of DMRs in different gene functional regions

2.4 转录组显著性差异基因表达分析

由对照组和感染组转录组测序分析共检测出 29 290 个基因, 对所检测的基因表达进行差异显著性分析, 共筛选到 496 个显著性差异表达基因(DEGs), 其中, 上调性基因 214 个, 下调性基因有 282 个(图 3)。从整体上来看, 下调基因数目多于上调基因数目。

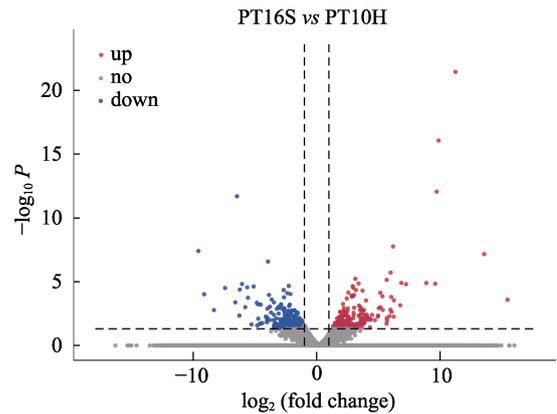


图 3 PT16S 与 PT10H 差异表达基因火山图

Fig.3 Volcano plot of DEGs between PT16S and PT10H

2.5 基因组甲基化与转录组关联分析

对 DMRs 功能基因注释筛选到的 23 706 个功能基因和 DEGs 筛选到的 496 个功能基因进行比对, 筛

选到 DMRs 和 DEGs 注释的共有基因有 261 个(图 4)。对这 261 个基因的 DMRs 差异和基因表达差异进行关联分析, 结果见表 3。共筛选到 180 个负相关关联基因, 其中, 甲基化水平高而基因表达下调的负相关关联基因有 58 个, 甲基化水平低而基因表达上调的负相关关联基因有 122 个。对所筛选的负相关关联基因差异甲基化区域进行统计, 差异甲基化区域位于启动子区域的负相关基因有 60 个。

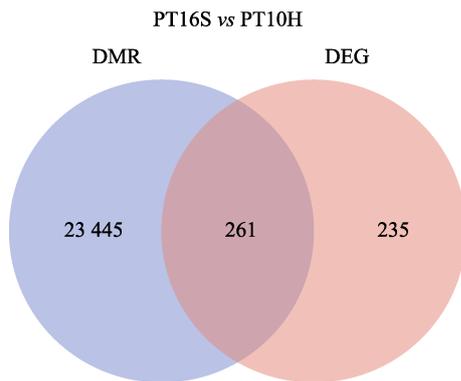


图 4 差异表达基因和差异甲基化区域共注释基因的韦恩图

Fig.4 Venn graph between the differentially expressed genes and the differentially methylated regions

对所筛选的甲基化和转录组负相关的 180 个基因进行 GO 富集分析, 结果显示(图 5), 甲基化水平与表达水平呈负相关的 180 个基因中, 有 124 个基因注释到 896 个 GO terms, 其中, 50 个 GO terms 显著富集($P < 0.05$)。富集到生物过程的 GO terms 主要包括细胞粘附、DNA 转录模板、先天性免疫应答、氧化还原过程、RNA 聚合酶 II 对转录的负调控等; 富集到细胞成分的 GO terms 主要包括膜的组成部分、细

胞质、细胞膜、细胞核等; 富集到分子功能的 GO terms 主要包括蛋白结合、金属离子结合、钙离子结合、ATP 结合、锌离子结合、DNA 结合、转运蛋白活性等。筛选到的功能基因包括免疫球蛋白、富含亮氨酸的重复序列(LRR)、有机阴离子转运蛋白多肽(OATP)、半胱天冬酶募集结构域(CARD)、黄素结合单加氧酶(almA)、CD36、血红素结合蛋白等。

利用 KEGG 数据库对差异表达基因进行 pathway 分析, 结果见图 6, 甲基化水平与基因表达水平呈负相关的有 180 个基因, 其中, 39 个富集基因注释到 112 个 KEGG 信号通路中, 有 20 个通路显著富集($P < 0.05$), 内质网中的蛋白质加工、破骨细胞分化、乙型肝炎、维生素消化吸收这 4 个通路注释基因最多, 均有 3 个负相关关联基因富集在相应通路上, 筛选到的功能基因包括 *hsp20* 和 *CD36* 等。

3 讨论

3.1 甲基化检测和基因组测序对检测效果的影响

DNA 甲基化是表观遗传学研究的重要内容, 是基因组 DNA 的一种重要修饰方式, 参与生物体或细胞的生物调控过程(Moore *et al*, 2013)。水生生物在响应温度、病原、饲料、倍性及杂种优势过程中 DNA 甲基化均发生了改变(吴彪等, 2016; 高杉等, 2017; 卓梅琴等, 2019; Han *et al*, 2021; 李炎璐等, 2019)。

目前, 水产动物研究中常用的 DNA 甲基化检测方法有基于限制性酶切预处理的甲基化敏感扩增多态性技术(MASP)和基于高通量测序的亚硫酸氢盐处理的全基因组 DNA 甲基化测序技术(WGBS)。MASP 技术具有简便、高效和可靠的特点。研究人员利用该技术探究了刺参不同群体(左之良等, 2016; 左闪等, 2021)、

表 3 基因组甲基化 DMRs 与转录组 DEGs 关联分析筛选基因统计

Tab.3 Statistics of gene number detected by association analysis between DMRs and DEGs

项目 Items	基因数目 Number of genes
差异基因总数 Total genes selected by correlation analysis	261
DNA 甲基化水平升高-基因表达下降的基因 Genes with higher DNA methylation level and decreased gene expression	58
DNA 甲基化水平降低-基因表达上升的基因 Genes with lower DNA methylation level and increased gene expression	122
启动子区域 DNA 甲基化水平升高-基因表达下降的基因 Genes with higher DNA methylation level and decreased gene expression in promoter region	25
启动子区域 DNA 甲基化水平降低-基因表达上升的基因 Genes with lower DNA methylation level and increased gene expression in promoter region	35

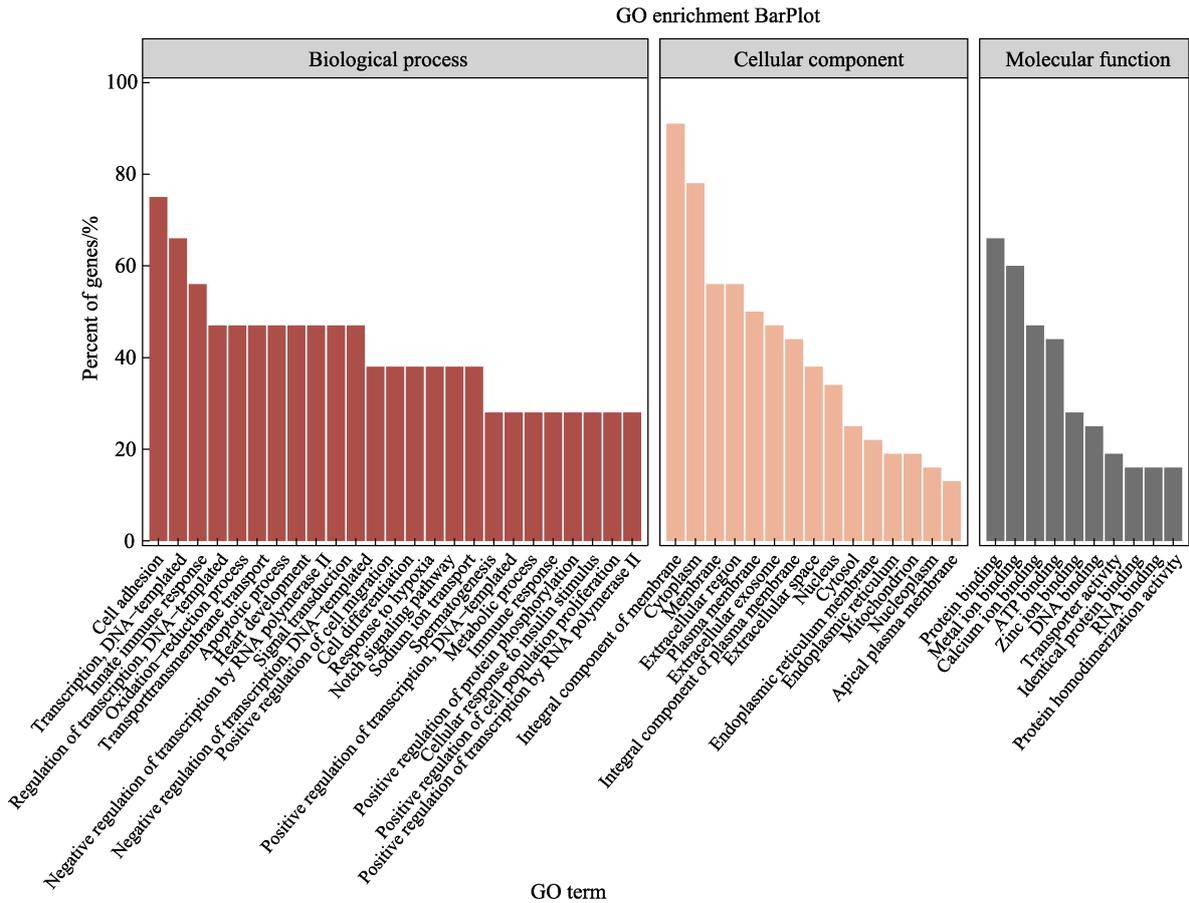


图 5 甲基化与基因表达负相关基因 GO 富集

Fig.5 GO enrichment of negative correlated genes detected by association analysis between DMRs and DEGs

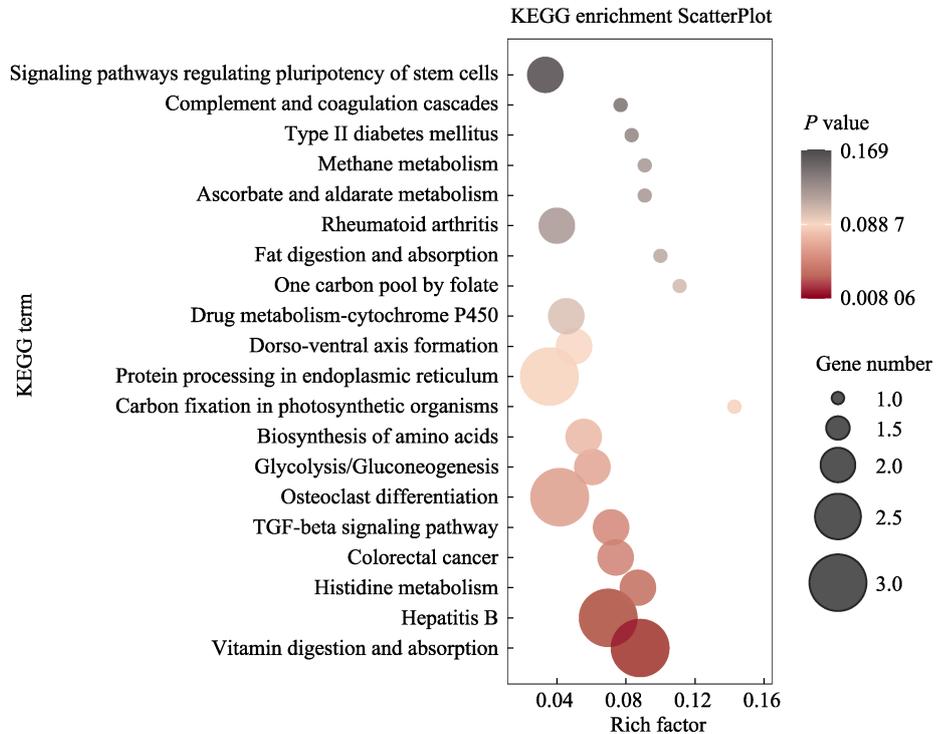


图 6 甲基化与基因表达负相关基因 KEGG 富集

Fig.6 KEGG enrichment of negative correlated genes detected by association analysis between DMRs and DEGs

不同组织(郭婷婷, 2013)、高温胁迫(李尚俊等, 2017)、夏眠(赵业, 2015)和化皮(高杉等, 2017)的甲基化水平差异。但 MASP 无法完全准确地显示基因组中甲基化情况的全貌及具体的甲基化位点的序列等信息。

随着高通量测序技术的发展, WGBS 成为检测 DNA 甲基化的最可靠技术之一, 该方法可以直观地反映全基因组 DNA 甲基化的详细信息, 可以直接提供筛选出的位点及其对应的信息序列。Yang 等(2020)运用该技术筛选到夏眠期刺参的 DMR 区域和关键功能基因; 温争争等(2021)利用 WGBS 技术完成了刺参高温胁迫下基因组 DNA 甲基化水平及模式的变化研究; Sun 等(2020)利用该技术筛选到了高浓度灿烂弧菌感染下刺参化皮组织 DMR 区域。全基因组序列信息是开展 WGBS 分析的关键, 参考基因组拼接的完整性对 DMR 区域的筛选和注释效果产生直接影响。Zhang 等(2017)和 Li 等(2018)获得 NCBI 数据库中的刺参基因组序列信息, 共包括 3821 个 Scaffolds (N50 为 786 kb)。Sun 等(2020)利用高浓度灿烂弧菌 (5×10^9 CFU/mL) 攻毒制备化皮实验材料, 利用 NCBI 中的全基因组数据比对筛选得到 116 522 个 DMRs。本团队于 2020 年采用纳米孔测序技术和染色体构象捕获技术(Hi-C)开展了刺参基因组精细图谱绘制, 拼接获得 911 Mb 的染色体水平的刺参基因组, 共定位到 23 条染色体, N50 为 39.61 Mb (相关数据未发表), 基因组拼接质量得到较大提升。

本研究利用灿烂弧菌半致死浓度(1×10^6 CFU/mL)制备化皮实验材料, 利用染色体水平基因组序列筛选得到的 DMRs 数目为 626 677 个, 显著高于 Sun 等(2020)筛选到的 116 522 个 DMRs, 所筛选的 DMRs 的差异数除了与实验条件差异有关外, 对比时所选用的基因组拼接质量是产生此差异的主要原因之一。

3.2 刺参基因组甲基化特征及其响应病原胁迫的变化

高通量测序获得的所有样品的基因组甲基化水平检测结果表明, 本研究所测定的刺参体壁组织甲基化水平为 3.52~4.17%。Yang 等(2020)测定的夏眠期刺参基因组甲基化水平在 3.5%左右; Sun 等(2020)检测刺参甲基化水平在 4%左右。可以看出, 刺参基因组整体甲基化水平较低, 这与 Tweedie 等(1997)发现的无脊椎动物基因组甲基化水平通常低于脊椎动物的结果相一致。

对刺参的不同类型 C 位点甲基化水平的统计结果可以看出, CG 类型位点的甲基化比例较高, 而 CHG 和 CHH 位点甲基化比例很低, 与目前已报道的其他海洋无脊椎动物 CG 类型甲基化水平范围(20%~

50%)相一致(曹哲明等, 2009; 于涛等, 2010; Sun *et al.*, 2014)。进一步对发生甲基化 C 位点的分型比例统计结果可以看出, mCpG 占甲基化位点的比例达到 80%以上, 表明 mCpG 是最主要的甲基化形式。与李玉强等(2018)利用 methylRAD-seq 技术对仿刺参的甲基化图谱研究结果相一致。这些结果表明海洋动物的 DNA 甲基化模式都有一定的相似性和保守性。

对病原感染刺激下基因组甲基化水平的变化可以看出, 感染组样本的甲基化水平显著高于对照组。虽然 CG 位点甲基化比例未发生显著变化, 但 CHH 和 CHG 的甲基化比例显著升高, 证明病原胁迫会引起基因组甲基化水平的升高。高杉等(2017)、Yang 等(2020)、Sun 等(2020)和温争争等(2021)研究结果也表明, 温度和高浓度病原刺激等外界胁迫会引起基因组甲基化水平的升高, 尤其是 CHH 和 CHG 的甲基化比例的升高。虽然 mCpG 是刺参最主要的甲基化形式, 但在不同刺激影响下的占比仍存在差异。本研究在病原半致死浓度刺激下, mCpG 的占比在 82%左右。Sun 等(2020)测定的在致死浓度病原刺激下, mCpG 的占比为 87%~89%, 但在温度刺激或夏眠状态下, mCpG 的占比达到 94%以上。相关对比分析证明, 不同的刺激形式造成的基因组甲基化存在差异。

3.3 刺参响应灿烂弧菌感染差异甲基化位点和差异表达基因分析

本研究利用染色体水平基因组为基础, 筛选得到 626 677 个 DMRs, 且在感染组中筛选到的高甲基化 DMR 数量大于低甲基化 DMR 数量, 这与感染组全基因组甲基化水平增高相一致。根据这些 DMR 所在的功能区域的位置统计结果可以看出, 基因间区的差异甲基化位点数量最高, 这与李玉强(2018)利用 methylRAD-seq 技术分析结果解释的甲基化标签较大比例分布于基因间区的结果相一致。对筛选的 DMR 区域进行功能基因注释得到 23 706 个功能基因, 所注释的功能基因数目也远高于 Sun 等(2020), 这可能也与实验条件的差异和比对所选用的基因组序列不同有关。转录组测序结果表明, 感染组筛选到的下调基因数目多于上调基因数目, 这个趋势与感染组筛选到高甲基化位点数目较多正好相反, 也从侧面验证了 Choy 等(2010)提出的甲基化水平的升高会抑制基因表达, 二者存在负调控关系。在所筛选到的 496 个差异表达基因中发现 DNA 甲基化转移酶的表达显著上调, 相关结果与 Yang 等(2020)和李尚俊等(2017)检测到的相关基因上调表达相一致, 也解释了该基因上调表达与基因组甲基化水平的升高直接相关。

3.4 刺参响应病原胁迫的基因组甲基化与基因表达的关联分析

基因组 DNA 甲基化作为基因的表达调控的重要方式, 在通常情况下, DNA 低甲基化会激活基因的转录, 而高甲基化则抑制基因的转录(Bird, 2002)。如早期的海胆(*Sphaerechinus granularis*)甲基化研究报告了 DNA 甲基化对于海胆发育具有重要意义(Tosi *et al.*, 1995)。本研究自甲基化和转录组关联分析中筛选到 261 个共同注释的基因, 其中 180 个为负相关基因, 占比为 68.97%, 说明所筛选到的基因其 DNA 甲基化对基因表达发挥了重要作用。这些负相关基因是后期解析刺参表观调控需要重点关注的对象。

本研究对所筛选的 180 个负相关基因进行 GO 和 KEGG 分析。在甲基化和转录组负相关的 180 个基因的 GO 富集分析中, 筛选到生物进程、细胞成分和分子功能多个 GO terms 中的富含亮氨酸的重复序列 LRR 基因, 该基因包含许多抗病基因, 能参与固有免疫(Gou *et al.*, 2010)。富集到的 CARD 蛋白参与先天性免疫应答、细胞质、ATP 结合、乙型肝炎、RIG-I 样受体信号通路、麻疹、甲型流感等通路, 进而参与包括炎症反应、免疫、分化、细胞生长、肿瘤发生和凋亡等许多生物过程(Beg *et al.*, 1994)。此外, 筛选到的免疫球蛋白能够避免免疫系统的过分激活, 降低炎症反应。虽然在 KEGG 通路中富集的负相关基因数量仅为 39 个, 但筛选到的 *Hsp20* 和 *CD36* 基因参与免疫调控、细胞粘附等多种生理和病理过程(Li *et al.*, 2015; 魏书磊等, 2013)。这些重要的功能基因将成为解析刺参响应病原侵染分子机理的重要关注点。

综上所述, 本研究以染色体水平的基因组序列为基础, 通过对病原侵染后化皮和健康样品体壁组织的 WGBS 和转录组测序分析, 筛选到相应的差异甲基化位点和差异表达基因, 进一步通过关联分析筛选到刺参响应病原侵染的关键基因及其甲基化特征, 相关结果将为解析刺参抗病调控机理奠定基础。

参 考 文 献

- BEG A A, BALDWIN A S. Activation of multiple NF-kappa B/Rel DNA-binding complexes by tumor necrosis factor. *Oncogene*, 1994, 9(5): 1487–1492
- BIRD A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes and Development*, 2002, 16(1): 6–21
- CAO Z M, YANG J. Analysis of the methylation in genome DNA from different tissues of *Anodonta woodiana*. *Ecology and Environmental Sciences*, 2009, 18(6): 2011–2016 [曹哲明, 杨健. 背角无齿蚌不同组织的基因组 DNA 甲基化分析. *生态环境学报*, 2009, 18(6): 2011–2016]
- CHOY M K, MOVASSAGH M, GOH H, *et al.* Genome-wide conserved consensus transcription factor binding motifs are hyper-methylated. *BMC Genomics*, 2010, 11(1): 519
- GAO S, YANG A F, DONG Y, *et al.* MSAP analysis of DNA methylation in the body wall of *Apostichopus japonicus*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, 41(3): 637–642 [高杉, 杨爱馥, 董颖, 等. 仿刺参“化皮病”体壁组织 DNA 甲基化的 MSAP 分析. *水生生物学报*, 2017, 41(3): 637–642]
- GOU X P, HE K, YANG H, *et al.* Genome-wide cloning and sequence analysis of leucine-rich repeat receptor-like protein kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, 2010, 11: 19
- GUO T T. The method to assess genome DNA methylation of *Apostichopus japonicus* by HPLC and MSAP analysis in different tissues. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2013 [郭婷婷. 刺参不同组织基因组 DNA 甲基化状态 MSAP 分析及 HPLC 方法的建立. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2013]
- HAN L S, SUN Y, CAO Y, *et al.* Analysis of the gene transcription patterns and DNA methylation characteristics of triploid sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*). *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 7564
- KRUEGER F, ANDREWS S R. Bismark: A flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. *Bioinformatics*, 2011, 27(11): 1571–1572
- LI J K, WU X W, TAN J, *et al.* Molecular cloning of the heat shock protein 20 gene from *Paphia textile* and its expression in response to heat shock. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2015, 33(4): 919–927
- LI S J, SUN G H, LI X Y, *et al.* Characteristics of epigenetic regulation of related genes under high temperature stress in sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(3): 470–476 [李尚俊, 孙国华, 李雪燕, 等. 高温胁迫下仿刺参表观遗传调控相关基因的表达特征. *中国水产科学*, 2017, 24(3): 470–476]
- LI X N. Analysis of DNA methylation regulation and function of candidate genes during intestinal regeneration in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, 2018 [李晓妮. 刺参肠道再生的 DNA 甲基化调控解析及再生候选基因的功能分析. 中国科学院大学(中国科学院海洋研究所)博士研究生学位论文, 2018]
- LI Y L, CHEN C, CHEN J G, *et al.* DNA methylation analysis of *Epinephelus moara*, *Epinephelus lanceolatus* and their F₁ hybrid. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(6): 98–104 [李炎璐, 陈超, 陈建国, 等. 文纹石斑鱼、鞍带石斑鱼及其杂交 F₁ 的 DNA 甲基化分析. *渔业科学进展*, 2019, 40(6): 98–104]
- LI Y Q, WANG R J, LI Y L, *et al.* Genome-wide profiling of

- DNA methylation in *Apostichopus japonicus* based on methylRAD-Seq. Periodical of Ocean University of China (Natural Science), 2018, 48(9): 41–50 [李玉强, 王睿甲, 李语丽, 等. 基于 MethylRAD-Seq 技术对仿刺参 DNA 甲基化图谱的研究. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2018, 48(9): 41–50]
- LI Y, WANG R, XUN X, *et al.* Sea cucumber genome provides insights into saponin biosynthesis and aestivation regulation. Cell Discovery, 2018, 4(1): 29
- MOORE L D, LE T, FAN G P. DNA methylation and its basic function. Neuropsychopharmacology, 2013, 38(1): 23–38
- SUN H J, ZHOU Z C, DONG Y, *et al.* Insights into the DNA methylation of sea cucumber *Apostichopus japonicus* in response to skin ulceration syndrome infection. Fish and Shellfish Immunology, 2020, 104: 155–164
- SUN Y, HOU R, FU X, *et al.* Genome-wide analysis of DNA methylation in five tissues of Zhikong scallop, *Chlamys farreri*. PLoS One, 2014, 9(1): e86232
- TOSI L, ANIELLO F, GERACI G, *et al.* DNA methyltransferase activity in the early stages of a sea urchin embryo-evidence of differential control. FEBS Letters, 1995, 361(1): 115–117
- TWEEDIE S, CHARLTON J, CLARK V, *et al.* Methylation of genomes and genes at the invertebrate-vertebrate boundary. Molecular and Cellular Biology, 1997, 17(3): 1469–1475
- WANG Y G, RONG X J, LIAO M J, *et al.* Sea cucumber culture and disease control technology. Beijing: China Agriculture Press, 2014 [王印庚, 荣小军, 廖梅杰, 等. 刺参健康养殖与病害防控技术丛解. 北京: 中国农业出版社, 2014]
- WEI S L. Expression and functional analysis of CD36 gene in zebrafish. Master's Thesis of China Ocean University, 2013 [魏书磊. 斑马鱼(*Danio rerio*)重组 CD36 基因的原核表达及功能研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2013]
- WEN Z Z, ZUO S, CHEN M, *et al.* DNA methylation level of genomic DNA of *Apostichopus japonicus* at different temperatures. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(3): 46–54 [温争争, 左闪, 陈梦, 等. 刺参基因组 DNA 甲基化水平及模式对温度变化的响应. 渔业科学进展, 2021, 42(3): 46–54]
- WU B, YANG A G, SUN X J, *et al.* Effects of acute temperature stress on genome-wide DNA methylation profiles in *Patinopecten yessoensis*. Progress in Fishery Sciences, 2016, 37(5): 140–146 [吴彪, 杨爱国, 孙秀俊, 等. 急性温度胁迫对虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)基因组 DNA 甲基化的影响. 渔业科学进展, 2016, 37(5): 140–146]
- YANG Y J, ZHENG Y Q, SUN L N, *et al.* Genome-wide DNA methylation signatures of sea cucumber *Apostichopus japonicus* during environmental induced aestivation. Genes, 2020, 11(9): 1020
- YU T, YANG A G, WU B, *et al.* Analysis of *Chlamys farreri*, *Patinopecten yessoensis* and their offspring using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). Journal of Fisheries of China, 2010, 34(9): 1335–1342 [于涛, 杨爱国, 吴彪, 等. 栉孔扇贝、虾夷扇贝及其杂交子代的 MSAP 分析. 水产学报, 2010, 34(9): 1335–1342]
- ZHANG X J, SUN L, YUAN J B, *et al.* The sea cucumber genome provides insights into morphological evolution and visceral regeneration. PLoS Biology, 2017, 15(10): e2003790
- ZHAO Y, CHEN M Y, STOREY K B, *et al.* DNA methylation levels analysis in four tissues of sea cucumber *Apostichopus japonicus* based on fluorescence-labeled methylation-sensitive amplified polymorphism (F-MSAP) during aestivation. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2015, 181: 26–32
- ZHAO Y. Study on gene expression patterns and basic characteristics of DNA methylation in *Apostichopus japonicus* (Selenka) during aestivation. Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2015 [赵业. 刺参 *Apostichopus japonicus* (Selenka) 夏眠期间基因表达模式及 DNA 甲基化基础特征研究. 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士研究生学位论文, 2015]
- ZHUO M Q, YANG S B, LING S C, *et al.* Effects of dietary lipid on lipid metabolism, methylation and expression of PI3KCa in the ovary of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). Journal of Fisheries of China, 2019, 43(10): 2186–2196 [卓梅琴, 杨水波, 凌仕诚, 等. 饲料脂肪对黄颡鱼卵巢脂类代谢以及 PI3KCa 甲基化和转录水平的影响. 水产学报, 2019, 43(10): 2186–2196]
- ZUO S, WEN Z Z, ZHOU H X, *et al.* Evaluation of epigenetic and genome sequence diversity in sea cucumber *Apostichopus japonicus* selected population based on MSAP technology. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(3): 38–45 [左闪, 温争争, 周红学, 等. 基于 MSAP 技术的刺参选育群体基因组表观与序列遗传多样性分析. 渔业科学进展, 2021, 42(3): 38–45]
- ZUO Z L, TAN J, WU B, *et al.* MSAP analysis of genomic DNA in the tissues of *Apostichopus japonicus* and white A. *japonicus*. Progress in Fishery Sciences, 2016, 37(3): 93–100 [左之良, 谭杰, 吴彪, 等. 普通刺参(*Apostichopus japonicus*)和白刺参不同组织基因组 DNA 的 MSAP 研究. 渔业科学进展, 2016, 37(3): 93–100]

Genomic DNA Methylation Levels and Transcriptome Differences of *Apostichopus japonicus* in Response to *Vibrio splendidus* Infection and Their Association Analysis

LI Xinrong^{1,2}, LIAO Meijie^{2,3①}, LI Bin^{2,3}, RONG Xiaojun^{2,3}, CHANG Mengyang^{2,3},
WANG Yingeng^{2,3}, YU Yongxiang^{2,3}, ZHANG Zheng^{2,3}, FAN Ruiyong⁴, LIU Qingbing⁴

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Sustainable and Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, Shandong 266071, China; 3. Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao, Shandong 266071, China; 4. Qingdao Ruizi Company, Qingdao, Shandong 266408, China)

Abstract DNA methylation is an important epigenetic modification that plays a key role in gene expression regulation. In this study, two groups of sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*) were prepared. One group had skin ulceration syndrome body wall (PT16S) under stress from *Vibrio splendidus* infection at a concentration of 1×10^6 CFU/mL (LD_{50}); the other group had a healthy body wall (PT10H). Genomic DNA methylation levels and gene expression differences between the two groups were detected using whole-genome bisulfite sequencing (WGBS) and transcriptome sequencing. The key gene ontology (GO) terms and KEGG terms engaged in the immune response were selected using association analysis. The results showed that the total methylation levels of the *A. japonicus* genome of PT10H and PT16S were $(3.59 \pm 0.04)\%$ and $(3.87 \pm 0.27)\%$, respectively. The methylation levels of the *A. japonicus* genome under pathogen challenge significantly increased; mCpG accounted for 83.06% and 81.91% of all the methylated sites in PT16S and PT10H, respectively, indicating that mCpG was the most important methylation form in the sea cucumber. A total of 626 677 differentially methylated regions (DMRs) were screened and annotated into 23 706 functional genes. A total of 496 differentially expressed genes were screened, including 214 up-regulated and 282 down-regulated genes. A total of 180 negatively correlated genes were isolated using association analysis between genomic methylation and transcriptome, of which 60 genes had DMRs located in promoter regions. Based on GO and KEGG enrichment of the 180 negatively correlated genes, key genes such as *LRR*, *Hsp20*, and *CARD* were selected to play a critical role in the immune response. The results would provide primary data for the epigenetic regulatory mechanisms of *A. japonicus* and provide a theoretical reference for *A. japonicus* breeding.

Key words *Apostichopus japonicus*; DNA methylation; Transcriptome; Association analysis

① Corresponding author: LIAO Meijie, E-mail: liaomj@ysfri.ac.cn