# 我国近海龟足 3 个地理群体比较转录组及环境适应性研究

毛宁[①②] 蔡月凤[①②*] 张宇[①] 姬南京[①②] 申欣[①②*]

① 江苏海洋大学，江苏省海洋生物资源与环境重点实验室/江苏省海洋生物技术重点实验室 连云港 222005；

② 江苏省海洋生物产业技术协同创新中心 连云港 222005

**摘要：**龟足（*Capitulum mitella*）隶属于节肢动物门（Arthropoda）指茗荷科（Pollicipedidae）龟足属，广泛分布于亚热带及热带近海沿岸中高潮地带。由于龟足生存环境复杂多变，可能导致其不同地理群体形成与其生境相适应的特征。本研究基于高通量测序技术对浙江舟山、福建宁德和广东珠海 3 个典型海域的龟足进行比较转录组分析，并利用生物信息学方法探究 3 个地理群体对环境的适应机制。结果表明，3 个地理群体间存在 651 个（广东珠海和福建宁德群体间）至 3 738 个（浙江舟山和福建宁德群体间）数量不等的差异表达基因（DEGs），主要涉及核糖体合成、抗原加工与递呈、分子伴侣代谢通路。基因序列的非同义替换率（$K_a$）和同义替换率（$K_s$）之间的比例 $K_a/K_s$，如果其超过 1，则认为有正选择压力作用于该基因，基因正在快速进化。3 个地理群体间龟足直系同源基因正选择压力分析结果显示，254 个直系同源基因中有 7 个基因受到正选择压力，包括 D-天冬氨酸酶基因（$K_a/K_s$ = 2.076）、GTP 结合核蛋白基因（$K_a/K_s$ = 1.001）、凋亡抑制蛋白基因（$K_a/K_s$ = 1.008）、真核起始因子 2B 基因（$K_a/K_s$ = 1.001）、RNA 聚合酶介体 II 基因（$K_a/K_s$ = 2.867）、吡咯啉-5-羧酸还原酶基因（$K_a/K_s$ = 1.131）和组蛋白去乙酰化酶基因（$K_a/K_s$ = 1.145），它们是参与龟足免疫系统调节、生长发育等生物过程的关键基因。本研究的开展有助于初步了解龟足对外界多重环境的适应机制，为研究龟足这 3 个地理群体的遗传多样性、种质资源保护和开发利用提供了基础数据。

**关键词：**龟足；地理群体；比较转录组；环境适应性

**中图分类号：**Q958 **文献标识码：**A **文章编号：**0250-3263（2023）04-563-16

# Comparative Transcriptome and Adaptation to Environmental Analysis of Different Geographical *Capitulum mitella* Groups in Offshore China

MAO Ning[①②] CAI Yue-Feng[①②*] ZHANG Yu[①] JI Nan-Jing[①②] SHEN Xin[①②*]

① *Jiangsu Ocean University, Jiangsu Key Laboratory of Marine Biological Resources and Environment/Jiangsu Key*

**基金项目** 江苏省杰出青年基金项目（No. BK20190048），国家自然科学基金项目（No. 41876147），江苏省重点学科发展计划和研究生研究与实践创新计划项目（No. KYCX21_3136）；

* 通讯作者，E-mail: yuefengcai@jou.edu.cn；shenthin@163.com；

**第一作者介绍** 毛宁，男，硕士研究生；研究方向：海洋生物多样性研究；E-mail: maobanxianpro@126.com。

收稿日期：2022-11-10，修回日期：2023-04-14 DOI: 10.13859/j.cjz.202304009

*Laboratory of Marine Biotechnology, Lianyungang* 222005; ② *Jiangsu Marine Biological Industry Technology Collaborative Innovation Center, Lianyungang* 222005, *China*

**Abstract: [Objectives]** *Capitulum mitella* belongs to the Arthropoda, Pollicipedidae, and *Capitulum*, which is similar in size to the Tortoise's foot. *C. mitella* is widely distributed in subtropical and tropical coastal high tide zone, mainly distributed in the sea area south of the Yangtze Estuary. Due to the great environmental differences in the sea areas where they live, different geographical populations of *C. mitella* will have different environmental adaptability under multiple environmental stresses. This study for the first time applied high-throughput sequencing to *C. mitella* in the Yangtze River estuary offshore of Zhoushan, Zhejiang Province, the southeast coast of Ningde, Fujian Province, and Zhuhai, Guangdong Province in the South China Sea to compare transcriptomic analysis. Differentially expressed genes (DEGs) among three geographical populations of *C. mitella* were screened to explore how the different geographic populations adapted to the environment. **[Methods]** The *C. mitella* samples were collected from intertidal reefs in Ningde, Fujian Province (120°04′04″ E, 26°52′34″ N), Zhoushan, Zhejiang Province (122°27′04″ E, 30°43′32″ N), and Zhuhai, Guangdong Province (114°02′33″ E, 22°05′55″ N) from September to November 2021. Morphological identification and mitochondrial molecular marker cytochrome *c* oxidase subunit I (*CO*I) amplification analysis showed that all of them were *C. mitella*. RNA was extracted for library construction and transcriptome sequencing. Clean reads were obtained after raw data quality control. Trinity (v2.4.0) was used to assemble clean reads to obtain Unigenes, and the functional cluster analysis of Unigenes was conducted. Screening of differentially expressed genes (DEGs) and significant differences in expression of the threshold for $P < 0.05$ and $|\log_2 \text{FoldChange}|$ over 1 using DESeq2 (1.6.3). To analyze the functional characteristics and physiological and biochemical metabolic pathways involved in DEGs, GO and KEGG enrichment analysis of DEGs was conducted using GOseq (1.10.0) and KOBAS (v2.0.12), and the threshold of significant enrichment in DEGs was $q < 0.05$. Orthologs were identified to analyze the environmental adaptability of different geographical *C. mitella* populations using OrthoMCL (v2.0.3). Then, the $K_a/K_s$ values of orthologs genes were calculated by the Branch Site model. If $K_a/K_s > 1$, the genes were evolving rapidly; if $K_a/K_s = 1$, the genes were under neutral selection; if $0 < K_a/K_s < 1$, the gene is selected for purification. GO and KEGG enrichment for genes under positive selection pressure, and gene function and metabolic pathway were annotated, the threshold of significant enrichment was $P < 0.05$. **[Results]** In this study, a total of 60.9 Gb of clean reads were obtained from three *C. mitella* populations, and 61 899 Unigenes were assembled (Table 1). A total of 651 Unigenes were significantly expressed between Zhuhai and Ningde populations, there were 3 738 DEGs between Zhoushan and Ningde populations, and 3 619 DEGs between Zhoushan and Zhuhai populations (Fig. 4). Functional annotation analysis showed that DEGs were significantly enriched in ribosome biogenesis (GO0042254, $q = 8.26 \times 10^{-53}$) and structural constituent of ribosome (GO0003735, $q = 9.14 \times 10^{-52}$) between Zhoushan and Zhuhai populations (Fig. 5). DEGs were further enriched in protein processing in endoplasmic reticulum (ko04141, $q = 2.88 \times 10^{-4}$), antigen processing and presentation (ko04612, $q = 1.16 \times 10^{-35}$) and ECM-receptor interaction (ko04512, $q = 4.16 \times 10^{-2}$) (Fig.6). Among them, genes such as agrin ($q = 1.72 \times 10^{-3}$) and solute carrier family 8 ($q = 3.93 \times 10^{-5}$) may be involved in regulating osmolality balance. Compared with Zhoushan and Zhuhai populations, DEGs function involved in

antigen processing and presentation (ko04612) and protein processing in endoplasmic reticulum (ko04141), among which cathepsin B ($q$ = 6.36 × $10^{-3}$) and high temperature protein G ($q$ = 9.97 × $10^{-6}$) were significantly expressed. Heat shock protein family, including *HSP*70 ($q$ = 1.45 × $10^{-6}$) and *HSP*40 ($q$ = 4.58 × $10^{-7}$) were also significantly expressed in the Zhoushan population (Table 2). Analysis of positive selection pressure among different geographical populations by orthologs screening showed that 7 genes under positive selection pressure were obtained from 254 orthologs including D-aspartate oxidase ($K_a/K_s$ = 2.076), histone deacetylase ($K_a/K_s$ = 1.145), baculoviral IAP resting-containing protein ($K_a/K_s$ = 1.008), GTP-binding nuclear protein Ran ($K_a/K_s$ = 1.001), mediator of RNA polymerase II transcription subunit ($K_a/K_s$ = 2.867), translation initiation factor 2B ($K_a/K_s$ = 1.001), and pyrroline-5-carboxylate reductase ($K_a/K_s$ = 1.131) (Table 3). They are all involved in growth hormone, reproductive, nutritional, nervous, immune system regulation, and neuronal protection. They also participate in physiological processes such as growth and development, tissue differentiation, metabolism, and anti-apoptosis. **[Conclusion]** This study will help to understand the adaptation mechanism of *C. mitella* to multiple external environments and provide a basic foundation of genetic diversity, germplasm resources protection, and the development of different geographical populations of *C. mitella*.

**Key words:** *Capitulum mitella*; Geographical population; Comparative transcriptome; Environmental adaptability

龟足（*Capitulum mitella*）隶属于节肢动物门（Arthropoda）指茗荷科（Pollicipedidae）龟足属（刘瑞玉等 2007），因其形态与龟类的爪子较为相似而得名，部分沿海渔民亦习惯称之为笔架或佛手螺。龟足广泛分布于亚热带及热带近海海域、中高潮地带，在我国主要集中分布在长江口以南的海区，属于热带和亚热带物种（张殿彩等 2009）。龟足作为一种重要的潮间带海洋生物资源，在海洋生态系统中占据重要的生态地位（Yuan et al. 2016），同时也是一种典型的附着生活生物，具有一定程度上的污损作用，危害近岸蟹类、牡蛎等贝类的养殖，以及损坏船体和海洋工程设施（陈长春等 2012）。

近年来，研究者对龟足的基础生物学和系统地理结构进行了一定的研究，主要涉及遗传多样性（Lim et al. 2006，Song et al. 2013，Yoon et al. 2013）、发育生物学（林岗等 1994a，邱文仁等 1994，林岗等 2003）、营养学（陈宁等 2009）及人工养殖技术（林岗等 1994b，饶小珍等 2010）等基础研究。在龟足遗传多样性的研究中，Song 等（2013）通过单个 DNA 片段分析发现韩国统营、丽水和晚才岛不同龟足种群之间存在显著的遗传和形态差异。Yoon 等（2013）利用线粒体 DNA 控制区基因研究了韩国南部、东部沿海和济州岛 6 个岩石海岸的龟足种群遗传结构，发现种群之间发生了大量的基因流动，龟足种群之间有显著的遗传分化。Tian 等（2020）利用龟足的线粒体基因组在分子水平上探究其系统发育关系，发现龟足与指茗荷科聚类，指茗荷科为单系群。早期研究发现，龟足胚胎发育、无节幼虫的生长和变态对温度及盐度的敏感性有所不同（饶小珍等 2010）。一般来说，水生生物的大小、种类、形态特征和遗传特性会根据其生活的水环境（水温、水深、浊度等）和营养环境等环境因素而变化。我国近海不同地理群体龟足可能会受到多重环境胁迫，外部环境（盐度和温度）会对龟足的生长发育产生影响（Rao et al. 2020），开展其环境适应机制等方面的研究尤为重要。Yuan 等（2016）利用线粒体 DNA 探究中国杭州湾以南 8 个潮间带岩石海岸龟足的遗传多样性和群体结构差异，结果发现中国南部海域的龟足虽然有高度的遗传多样性，但是却没有发

现显著不同的种群结构，并认为种群扩张和现代洋流可能会促进龟足幼虫的远距离扩散。然而，由于线粒体基因组 DNA 拷贝数多，且具有较高突变性，想要探讨不同地理群体龟足的遗传多样性和环境适应性，还需要进一步将研究集中到对环境更敏感的转录组水平上。

转录组学可以在 mRNA 和非编码 RNA 转录的水平上研究基因的表达情况（Wilhelm et al. 2009），可以挖掘与环境适应或生理功能等相关的功能基因。Ma 等（2016）利用转录组数据，综合分析了西藏不同海拔的鱼类适应性进化，确定了高海拔鱼类适应性遗传的候选基因。Wang 等（2022a）对潮间带不同地理群体的齿纹蜒螺（*Nerita yoldii*）的生理和遗传特征研究发现，不同群体对适应热环境有不同的转录和生理反应，在热休克蛋白和糖代谢相关基因的作用下，不同地理群体的响应模式存在差异，这可能是由于不同地理种群具有局域适应性。此外，Jahan 等（2022）还研究了菲律宾蛤仔（*Ruditapes philippinarum*）低纬度和高纬度群体的潜在遗传差异以及对温度变化的适应机制，确定了过氧化物酶体和细胞色素 P450 等关键基因，有助于预测温度变化下的生物多样性趋势。而目前关于龟足转录组水平的研究仅限于利用数据鉴定龟足幼虫时期部分基因（李惠莲 2020），其种群环境适应机制尚不清楚。

在我国近岸海域，海表温度南高北低，东海的海表温度随季节变化明显，长江口近岸海域温度变化趋势最为显著，极端高温和低温的出现频率高，东南沿海和南海北部也会出现极端高温环境，这些地理环境变化可能会对各海域生物生态系统造成较大影响（齐庆华等 2019）。本文以我国近岸海域的龟足为研究对象，广泛采集长江口近岸海域、东南沿海和南海海域的 3 个地理群体样品，利用转录组测序技术和适应性进化分析对龟足群体间的相关变异和适应进化做了较为系统的分析和研究，揭示龟足 3 个地理群体的适应进化机制，以期为龟足遗传多样性的研究奠定基础，为我国龟足种质资源的保护和开发利用提供基础数据。

## 1　材料与方法

### 1.1　样品采集及总 RNA 的提取

实验样品于 2021 年 9 月至 11 月分别采自福建宁德（120°04′04″ E，26°52′34″ N，东南沿海海域群体）、浙江舟山（122°27′04″ E，30°43′32″ N，长江口近岸海域群体）和广东珠海（114°02′33″ E，22°05′55″ N，南海海域群体）3 个海域的潮间带礁石上（图 1）。采集样品经形态鉴定和线粒体细胞色素 *c* 氧化酶亚基 I 基因分子标记，扩增鉴定分析，比对结果均为龟足。取低温保存的各地理群体龟足（$n = 6$）软组织样品各 100 mg，经液氮速冻研磨成粉状，使用 Trizol Reagent（Invitrogen, USA）试剂盒提取样品总 RNA。

**图 1　龟足生态照**

**Fig. 1　Photos of *Capitulum mitella***

### 1.2　3 个地理群体龟足转录组文库构建与注释分析

总 RNA 样品检测合格后，经 Oligo（dT）

磁珠富集出 mRNA，采用 NanoPhotometer® spectrophotometer（IMPLEN，CA，USA）进行纯化并质控。取质控合格的 3 μg mRNA 样品，采用 NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit（NEB，USA）构建文库，后经 Illumina Hiseq 2500 测序平台进行双端测序，测序读长 150 bp。原始数据经质控后获得 clean reads。采用 Trinity（v2.4.0）软件（Grabherr et al. 2011）对 clean reads 进行混池拼接获得 Unigenes，并进行 Unigenes 的功能聚类分析。

### 1.3　3 个地理群体龟足的差异表达基因筛选与功能注释

采用 RSEM（Li et al. 2011）中 Bowtie2 软件预测 Unigenes 表达水平，以每百万 fragments 中来自某一基因每千碱基长度的 fragments 数目（expected number of fragments per kilobase of transcript sequence per millions base pairs sequenced，FPKM）表示，FPKM 值大于 0.3 为最低可信表达阈值。采用 DESeq2（1.6.3）软件（Love et al. 2014）筛选差异表达基因（differentially expressed genes，DEGs），显著差异表达阈值为 $P < 0.05$ 且 $|\log_2 \text{FoldChange}|$ 值大于 1。

为分析差异表达基因的功能特性和参与的生理生化代谢途径，采用 GOseq（1.10.0）（Young et al. 2010）和 KOBAS（v2.0.12）软件（Mao et al. 2005）对差异表达基因（DEGs）进行基因本体论（gene ontology，GO）和京都基因与基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）富集分析，其展现了物种差异基因序列在两数据库中的分布状况，在 DEGs 中显著富集的阈值（$q$）不超过 0.05。

### 1.4　3 个地理群体龟足直系同源基因的选择压力分析

为分析 3 个地理群体龟足的环境适应性，采用 OrthoMCL（v2.0.3）软件（Li et al. 2003）鉴定 3 个不同地理群体龟足间编码基因的同源基因簇（orthogroups），筛选获得一一对应的直系同源基因。应用 PAML（4.7）软件（Yang 2007）中的枝位点模型计算直系同源基因的非同义替换率（$K_a$）和同义替换率（$K_s$）之间的比例 $K_a/K_s$ 值，如果 $K_a/K_s > 1$，则认为有正选择压力作用于该基因，基因正在快速进化；如果 $K_a/K_s = 1$，则存在中性选择；如果 $0 < K_a/K_s < 1$，基因则受到纯化选择。对受正选择压力的基因进行 GO 和 KEGG 功能富集，注释基因功能和代谢途径，显著富集的阈值为 $P < 0.05$。

## 2　结果

### 2.1　3 个地理群体龟足转录组构建与注释分析

对来自 3 个不同地理群体的龟足进行外部形态特征观察。各地理群体外部形态特征相似，均具有由 8 块壳板形成的壳室，柄部被小鳞片规则覆盖，上唇脊缘无齿，大颚有 5 齿，小颚呈叶瘤状。对不同群体分别进行 *COI* 基因的分子鉴定，来自浙江舟山、福建宁德和广东珠海龟足群体的 *COI* 基因与 NCBI 数据库中的龟足的同源基因序列（GenBank 登录号：ON495538.1）相似度均达到 99.71%以上。3 个不同地理群体龟足转录组文库包含 raw reads 共 62.5 Gb（SRA 数据库登录号为 PRJNA856037）。质控后分别获得 19.6 Gb、19.8 Gb 和 21.5 Gb 的 clean reads。各组数据的 Q20 数值均大于 97.5%，且 GC 含量在 59.10%～60.92%之间。混池拼接组装后，获得 125 458 个 Transcript，平均长度为 1 390 bp，N50 长度为 2 353 bp；去除冗余后获得 61 899 个 Unigenes，平均长度为 1 068 bp 且 N50 长度为 1 821 bp（表 1）。

将我国近海龟足转录组文库注释到 7 大数据库，其中 27 916 个 Unigenes（45.09%）至少注释到一个数据库中，有 3 310 个 Unigenes（5.34%）在所有数据库中均被注释（表 1）。GO 功能聚类分析表明，21 311 个 Unigenes 在 GO 数据库的 3 大功能分类（43 个功能条目）中成功聚类，占所有 Unigenes 的比例为 34.42%。在生物过程大类中，基因在细胞过程（12 164 个 Unigenes）和代谢过程（10 656 个

**表 1　3 个不同地理群体龟足的转录组文库基本信息表**

**Table 1　Transcriptome library basic information of three geographic populations of *Capitulum mitella***

| 项目 Term | 地理群体 Geographic population | | |
|---|---|---|---|
| | 浙江舟山 Zhoushan, Zhejiang | 福建宁德 Ningde, Fujian | 广东珠海 Zhuhai, Guangdong |
| 原始数据过滤后的碱基数 Clean bases (Gb) | 19.6 | 19.8 | 21.5 |
| Phred 数值大于 20 的碱基占总碱基的百分比 The percentage of bases with Phred values greater than 20 in total bases (Q20) (%) | 97.92 | 97.54 | 97.99 |
| 过滤后的原始数据中 G 与 C 占四种碱基的百分比 Percentage of G and C in the four bases in clean reads (%) | 60.47 | 59.10 | 60.92 |
| Transcript 数量 Number of Transcript (bar) | 125 458 | | |
| Unigene 数量 Number of Unigene (bar) | 61 899 | | |
| Transcript 平均长度 Mean length of Transcript (bp) | 1 390 | | |
| Unigene 平均长度 Mean length of Unigene (bp) | 1 068 | | |
| 从长到短累加 Transcript 的长度，到不小于总长 50%的 Transcript 的长度 The length of the Transcript from long to short shall be accumulated to the length of not less than 50% of the total length of the Transcript (N50 of Transcripts) (bp) | 2 353 | | |
| 从长到短累加 Unigene 的长度，到不小于总长 50%的 Unigene 的长度 The length of the Unigene from long to short shall be accumulated to the length of not less than 50% of the total length of the Unigene (N50 of Unigenes) (bp) | 1 821 | | |
| NR 注释的基因数目及其占总基因数的比例 Unigenes annotated in NR and its proportion to the total numbers | 20 718 (33.47%) | | |
| NT 注释的基因数目及其占总基因数的比例 Unigenes annotated in NT and its proportion to the total numbers | 6 758 (10.91%) | | |
| KEGG 注释成功的基因数目及其占总基因数的比例 Unigenes annotated in KEGG and its proportion to the total numbers | 10 893 (17.59%) | | |
| SwissProt 注释成功的基因数目及其占总基因数的比例 Unigenes annotated in SwissProt and its proportion to the total numbers | 16 540 (26.72%) | | |
| PFAM 注释成功的基因数目及其占总基因数的比例 Unigenes annotated in PFAM and its proportion to the total numbers | 21 313 (34.43%) | | |
| GO 注释成功的基因数目及其占总基因数的比例 Unigenes annotated in GO and its proportion to the total numbers | 21 311 (34.42%) | | |
| KOG 注释成功的基因数目及其占总基因数的比例 Unigenes annotated in KOG and its proportion to the total numbers | 9 539 (15.41%) | | |
| 在所有数据库注释成功的基因数及其占总基因数的比例 Annotated in all Databases and its proportion to the total numbers | 3 310 (5.34%) | | |
| 至少在一个数据库注释成功的基因数及其占总基因数的比例 Annotated in at least one Database and its proportion to the total numbers | 27 916 (45.09%) | | |

Unigenes）等条目聚类较多；在细胞组分中，细胞解剖实体（10 056 个 Unigenes）、细胞内质（5 588 个 Unigenes）和蛋白复合物（3 747 个 Unigenes）等条目聚类较多；结合（10 637 个 Unigenes）和催化活性（8 171 个 Unigenes）等分子功能条目聚类较多（图 2）。

KEGG 功能聚类分析表明，在我国近海龟足转录组文库中共有 10 893 个 Unigenes 被聚类成 5 个功能大类，其中内分泌系统、碳水化合物代谢、翻译、信号转导和转运及代谢分解过程条目涉及的 Unigenes 最多，分别有 697 个、603 个、1 213 个、1 395 个和 960 个 Unigenes 被聚类（图 3）。

### 2.2　3 个地理群体龟足的差异表达基因筛选与功能注释

为了比较 3 个不同地理群体龟足间基因表

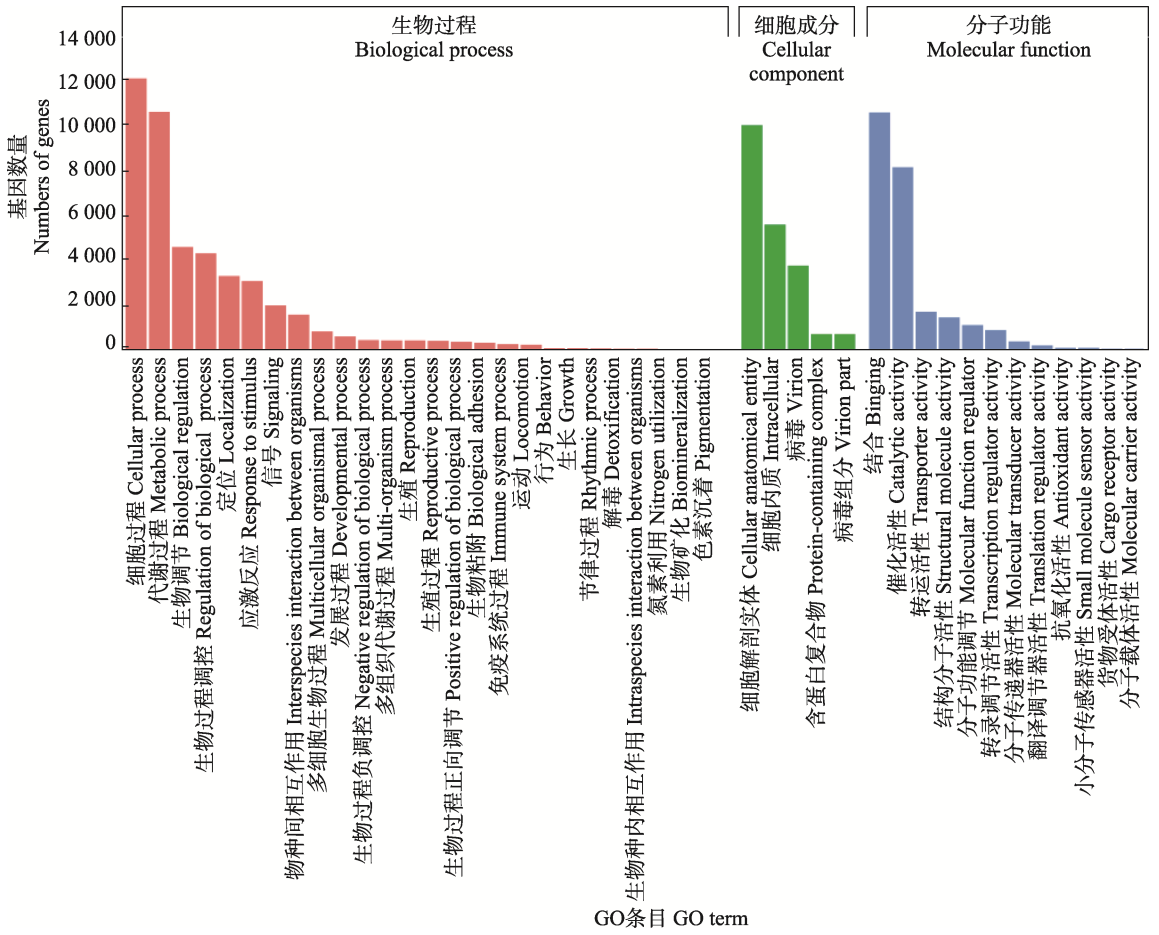


**图 2　3 个不同地理群体龟足的转录组 Unigenes GO 功能注释**

**Fig. 2　GO function annotation of Unigenes in three geographic populations of *Capitulum mitella***

达的差异，进行 DEGs 的筛选分析。东南沿海海域（福建宁德）群体和南海海域（广东珠海）群体之间有 651 个 DEGs，其中 452 个下调表达，199 个上调表达；长江口近岸海域（浙江舟山）群体和东南沿海海域群体间有 3 738 个 DEGs，其中 1 397 个下调表达，2 341 个上调表达；长江口近岸海域群体和南海海域群体间有 3 619 个 DEGs，其中 1 560 个下调表达，2 059 个上调表达（图 4）。我国 3 个不同海域龟足群体间存在不同的基因表达模式，东南沿海海域群体与南海海域群体表达差异较小，而长江口近岸海域群体具有特异性较大的表达模式。

对 DEGs 进行 GO 和 KEGG 富集分析，东南沿海海域群体与南海海域群体间 DEGs 的功能富集较少，仅显著富集到跨膜转运活性过程（基因注释得到对应的 GO 号为 GO0022857，$q = 2.61 \times 10^{-2}$）。长江口近岸海域群体与东南沿海海域群体间富集的 DEGs 在分子功能分类中聚类 2 个条目、细胞组分分类 2 个条目、生物学过程分类 2 个条目。其中显著富集的分类条目有核糖体生物发生（GO0042254，$q = 4.44 \times 10^{-15}$）、结构分子活性（GO0005198，$q = 1.65 \times 10^{-14}$）和核糖体结构组成（GO0003735，$q = 6.04 \times 10^{-14}$）。而长江口近岸海域群体与南海海域群体间 DEGs 显著富集的 GO 功能条目共有 14 条，其中细胞组分和生物学过程较多（各有 5 条），细胞组分次之（4 条）。显著富集的分类条目同样有核糖体生物发生（GO0042254，$q =$

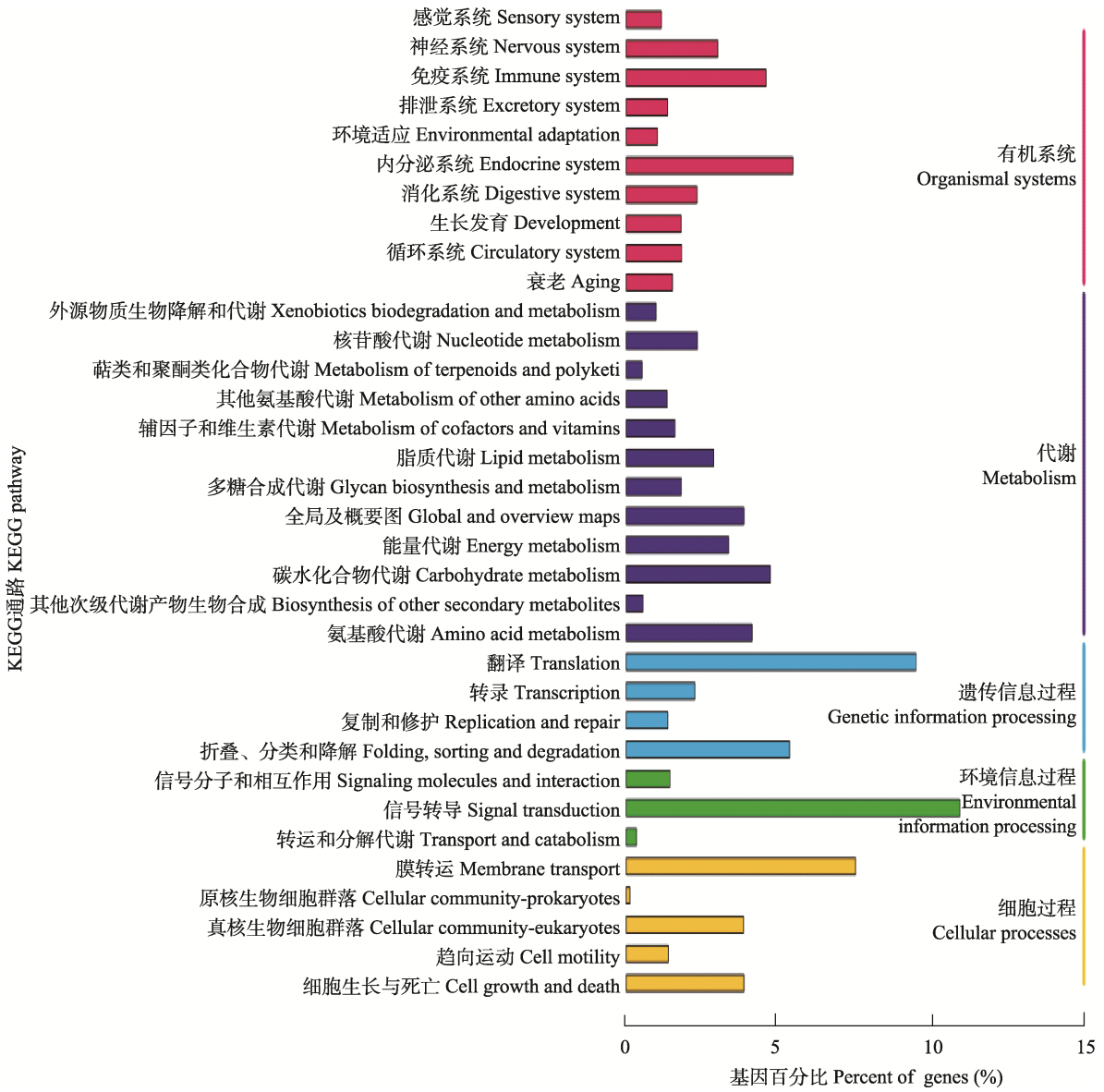


**图 3　3 个不同地理群体龟足的转录组 Unigenes KEGG 代谢通路**

**Fig. 3　KEGG metabolic pathway of Unigenes in three geographic populations of *Capitulum mitella***

$8.26 \times 10^{-53}$）、核糖体结构组成（GO0003735，$q = 9.14 \times 10^{-52}$）和翻译（GO0006412，$q = 9.67 \times 10^{-46}$）等，这些均与核糖体与核糖体生物构成相关（图 5）。

长江口近岸海域群体与东南沿海海域群体间的 DEGs 功能显著富集的 5 条通路分别是核糖体（基因注释到的 KO 号为 ko03010，$q = 4.39 \times 10^{-16}$）、内质网蛋白质加工（ko04141，$q = 2.88 \times 10^{-4}$）、核糖体生物发生（ko03008，$q = 1.16 \times 10^{-3}$）、抗原呈递加工（ko04612，$q = 1.16 \times 10^{-35}$）和 ECM 受体相互作用（ko04512，$q = 4.16 \times 10^{-2}$）。长江口近岸海域群体与南海海域群体间的 DEGs 功能，除了与人类疾病相关的军团杆菌病通路外，富集最显著的 3 条通路分别是核糖体（ko03010，$q = 1.55 \times 10^{-50}$）、抗原呈递加工（ko04612，$q = 1.26 \times 10^{-4}$）和核

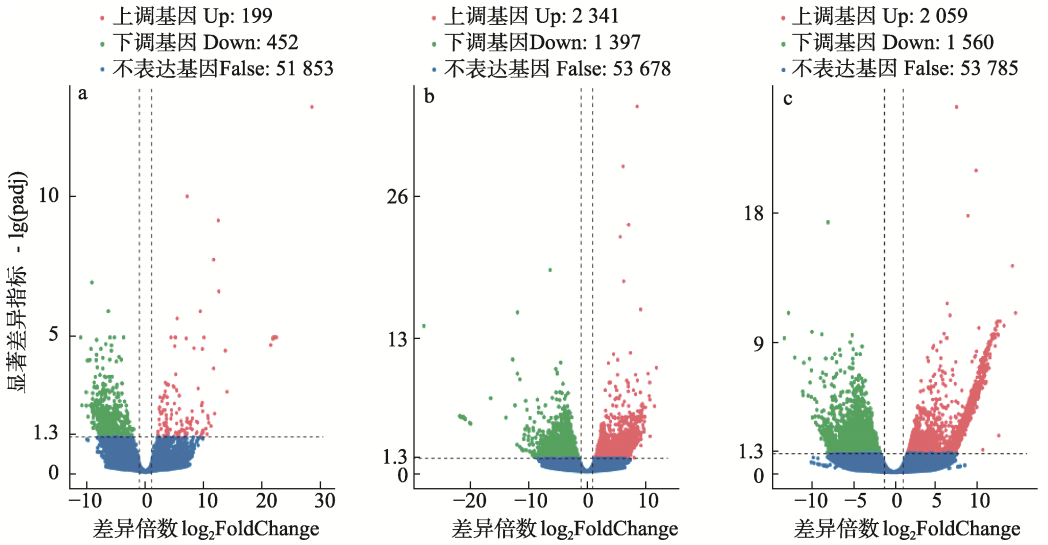


**图 4　3 个不同地理群体龟足间差异表达基因数目火山图**

**Fig. 4　Volcanoplot of differential expressed gene numbers in three geographic populations of *Capitulum mitella***

a. 宁德与珠海群体；b. 舟山与宁德群体；c. 舟山与珠海群体。纵坐标的虚线代表基因差异表达的阈值为 1.3，横坐标的两条虚线外侧代表差异表达倍数超过 1。

a. Ningde and Zhuhai population; b. Zhoushan and Ningde population; c. Zhoushan and Zhuhai population. The dashed line of the ordinate represents a threshold of 1.3 for differential expression of genes, and the two dashed lines outside the abscissa represent fold change over 1.

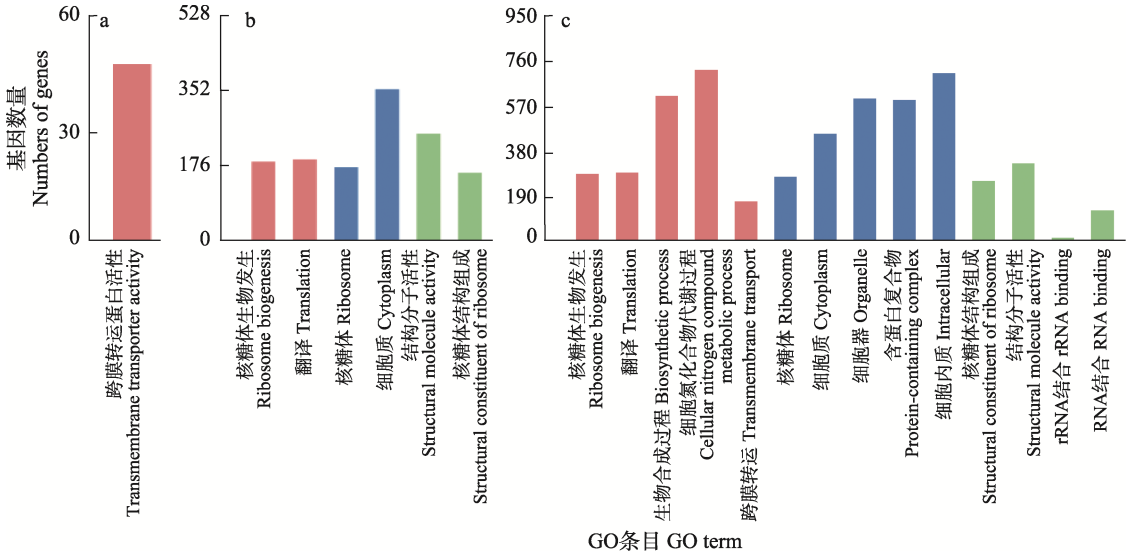


**图 5　3 个不同地理群体龟足差异表达基因 GO 富集**

**Fig. 5　Enrichment analysis of the gene ontology (GO) terms of differentially expressed genes of three geographic populations of *Capitulum mitella***

a. 宁德与珠海群体；b. 舟山与宁德群体；c. 舟山与珠海群体。红色代表生物过程条目，蓝色代表细胞成分条目，绿色代表分子功能条目。

a. Ningde and Zhuhai population; b. Zhoushan and Ningde population; c. Zhoushan and Zhuhai population. Red represents biological process term, blue represents cellular component term and green represents molecular function term.

糖体生物发生（ko03008，$q = 6.68 \times 10^{-4}$）。此外，还富集到雌激素信号通路（ko04915，$q = 2.28 \times 10^{-3}$）和 MAPK 信号通路（ko04010，$q = 1.92 \times 10^{-2}$）等信号通路（图 6）。

在长江口近岸海域（舟山）群体与南海海域（珠海）群体中以及长江口近岸海域（舟山）群体与东海海域（宁德）群体间富集到 ECM 受体相互作用通路、核糖体生物发生通路、抗原呈递加工通路和内质网蛋白质加工通路中的 DEGs 见表 2。

### 2.3　3 个地理群体龟足直系同源基因的选择压力分析

在筛选的 254 个直系同源基因中，有 7 个基因受到正选择压力作用（表 3）。

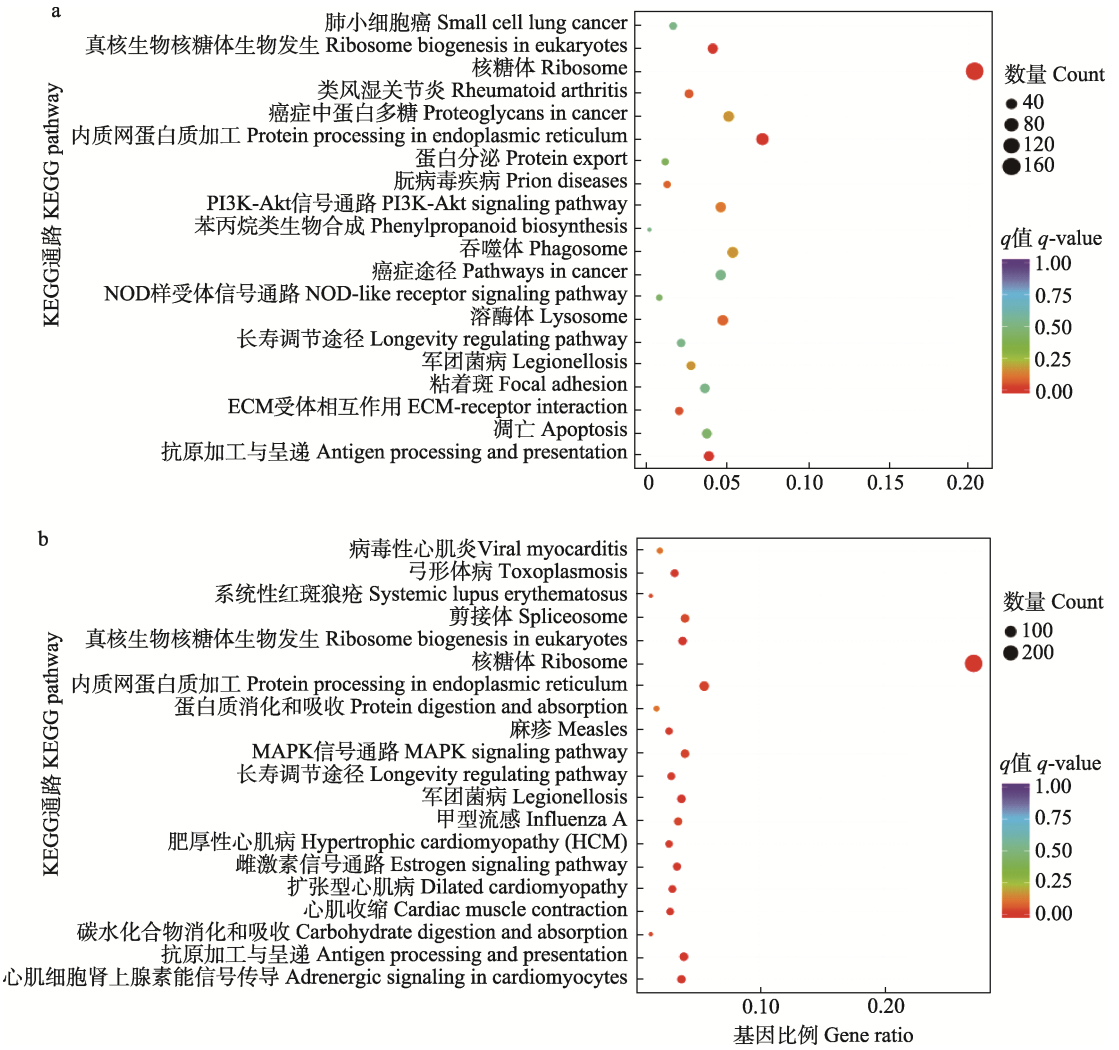


**图 6　龟足舟山与宁德群体（a）和舟山与珠海群体（b）差异表达基因的 KEGG 通路富集**

**Fig. 6　KEGG pathway enrichment for DEGs of Zhoushan population *vs.* Ningde population (a), and Zhoushan population *vs.* Zhuhai population (b) of *Capitulum mitella***

点的颜色表示 $q$ 值的大小，点的大小表示基因数量。

The $q$-value is shown in color, and the size of the point represents the number of genes.

**表 2　龟足舟山与宁德群体和舟山与珠海群体差异表达基因 KEGG 通路显著富集的基因列表**

**Table 2　List of significant enriched genes in the KEGG pathway for DEGs of Zhoushan population *vs.* Ningde population, and Zhoushan population *vs.* Zhuhai population of *Capitulum mitella***

| 通路/基因名称 Pathway/Gene name | 上下调 Up/Down | 舟山与宁德群体 Zhoushan population *vs.* Ningde population | | 舟山与珠海群体 Zhoushan population *vs.* Zhuhai population | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 差异倍数 $\log_2$FoldChange | *q* 值 *q*-value | 差异倍数 $\log_2$FoldChange | *q* 值 *q*-value |
| ECM 受体相互作用 ECM-receptor interaction (ko04512) | | | | | |
| 聚集蛋白 *Agrin* | 下调 Down | - 3.092 4 | $1.39 \times 10^{-5}$ | - 2.704 3 | $1.72 \times 10^{-3}$ |
| 溶质载体家族 8 Solute carrier family 8, *SLC8A* | 下调 Down | - 2.677 2 | $1.98 \times 10^{-4}$ | - 3.470 2 | $3.93 \times 10^{-5}$ |
| 电压门控钾离子通道蛋白 Voltage-gated Potassium channel protein, *KCNN*4 | 下调 Down | - 4.981 7 | $2.81 \times 10^{-2}$ | - 6.168 5 | $9.50 \times 10^{-4}$ |
| 真核生物核糖体生物发生 Ribosome biogenesis in eukaryotes (ko03008) | | | | | |
| 烟碱乙酰胆碱受体 Nicotinic acetylcholine receptor, *nAChR* | 下调 Down | - 3.788 5 | $4.46 \times 10^{-2}$ | - 2.847 8 | $4.83 \times 10^{-2}$ |
| 神经肽受体 Y1 Neuropeptide Y receptor type 1, *NPY*1*R* | 下调 Down | - 3.840 3 | $3.12 \times 10^{-3}$ | - 3.631 5 | $8.50 \times 10^{-5}$ |
| 抗原呈递加工 Antigen processing and presentation (ko04612) | | | | | |
| 热休克蛋白 70 Heat shock 70kDa protein, *HSP*70 | 上调 Up | 2.125 2 | $7.37 \times 10^{-3}$ | 1.838 2 | $3.69 \times 10^{-2}$ |
| 组织蛋白酶 B Cathepsin B, *Cath B* | 上调 Up | 6.175 5 | $2.70 \times 10^{-2}$ | 6.520 2 | $6.36 \times 10^{-3}$ |
| 组织蛋白酶 L Cathepsin L, *Cath L* | 上调 Up | 7.098 0 | $2.95 \times 10^{-2}$ | 7.521 6 | $2.43 \times 10^{-3}$ |
| 内质网蛋白质加工 Protein processing in endoplasmic reticulum (ko04141) | | | | | |
| 热休克蛋白 40 Heat shock 40kDa protein, *HSP*40 | 上调 Up | 3.198 6 | $3.24 \times 10^{-6}$ | 2.881 7 | $4.58 \times 10^{-7}$ |
| 热休克蛋白 70 Heat shock 70kDa protein, *HSP*70 | 上调 Up | 4.627 7 | $4.39 \times 10^{-2}$ | 9.319 0 | $1.45 \times 10^{-6}$ |
| 分子伴侣高温蛋白 High temperature protein G, *HtpG* | 上调 Up | 4.604 3 | $2.35 \times 10^{-2}$ | 8.520 0 | $9.97 \times 10^{-6}$ |
| 转内质网 ATP 酶 Transitional endoplasmic reticulum ATPase, *TERATPase* | 上调 Up | 6.659 3 | $2.25 \times 10^{-2}$ | 7.025 7 | $2.92 \times 10^{-3}$ |
| 含硫氧还蛋白 Thioredoxin domain-containing protein, *TXNDC* | 上调 Up | 6.728 8 | $1.86 \times 10^{-3}$ | 8.015 7 | $2.06 \times 10^{-5}$ |

**表 3　我国近海 3 个地理群体龟足间受正选择压力基因列表**

**Table 3　List of genes subject to positive selection pressure among three geographic populations of *Capitulum mitella* in Offshore China**

| 基因名称 Gene name | 直系同源基因 Orthologs | $K_a/K_s$ 值 $K_a/K_s$-value |
|---|---|---|
| D-天冬氨酸基因 D-aspartate oxidase, *DDO* | OG03832 | 2.076 |
| GTP 结合核蛋白基因 GTP-binding nuclear protein, *Ran* | OG00690 | 1.001 |
| 组蛋白去乙酰化酶基因 Histone deacetylase 4/5, *HDAC*4_5 | OG02099 | 1.145 |
| 真核起始因子 2B 基因 Eukaryotic initiation factor 2B, *EIF*2*B* | OG03021 | 1.001 |
| 凋亡抑制蛋白基因 Baculoviral IAP repeat-containing protein, *BIRC* | OG03088 | 1.008 |
| RNA 聚合酶介体 II 基因 Baculoviral mediator of RNA polymerase II, *MED* | OG03715 | 2.867 |
| 吡咯啉-5-羧酸还原酶基因 Pyrroline-5-carboxylate reductase, *PYCR* | OG03557 | 1.131 |

## 3　讨论

气候变化的影响遍布全球，气候变暖导致沿海水域和大陆架的水温升高，这在许多方面影响着海洋生物的分布（Poloczanska et al. 2016）。早期研究发现，北海海洋鱼类和底栖无脊椎动物物种的分布变化受到气候变化的影响（Hiddink et al. 2015）。Kumagai 等（2018）通

过研究日本群岛热带至接近北极地区大约 3 000 km 的大型藻类和珊瑚范围迁移，发现由于气候变暖等原因，热带珊瑚扩张加速，导致大型藻类转变为珊瑚群落。同样，在温度等环境因子变化的驱动下会对纹藤壶（*Balanus amphitrite*）和指茗荷（*Pollicipes polymerus*）胚胎发育和幼虫生存产生影响，也可能会影响其物种的分布特征（Lewis et al. 1975，Anil et al. 2001）。之前的一项研究也发现温度和盐度交互作用会对龟足生长发育影响极为显著，并探讨了福建龟足发育及幼虫生长的最适温度及盐度（饶小珍等 2010）。在本研究中，东南沿海海域群体和南海海域群体之间有 651 个 DEGs，其中 452 个下调表达，199 个上调表达；长江口近岸海域群体和东南沿海海域群体间有 3 738 个 DEGs，其中 1 397 个下调表达，2 341 个上调表达；长江口近岸海域群体和南海海域群体间有 3 619 个 DEGs，其中 1 560 个下调表达，2 059 个上调表达。因此，我国近岸海域不同地理群体龟足间在转录组水平上存在显著的差异，且 3 个不同海域龟足群体间存在不同的基因表达模式，东南沿海海域群体与南海海域群体表达差异较小，推测这两个地理群体间环境变化因素较小，特别是温度和盐度等的变化梯度较小。相较而言，长江口近岸海域龟足群体明显具有特异性较大的转录表达模式，其受到海域环境因素变化的影响更显著。对 3 组不同地理群体龟足间筛选出的 DEGs 分别进行 KEGG 富集分析，发现它们均参与了核糖体生物发生、离子交换、代谢和免疫等相关通路。

甲壳类在其自然栖息地总是暴露在不同的盐度下，由于缺乏某些有效的渗透调节因子，当面临生境盐度波动时，甲壳类可能无法表现出快速渗透调节能力（Chen et al. 2015）。另外，外部环境引起的温度升高和海水盐度变化也将直接影响甲壳类的渗透调节功能（Marshall 2005），造成渗透失衡，这会损害甲壳类的新陈代谢、免疫、生殖和其他生理过程（Nurdiani et al. 2007）。长江口近岸海域龟足群体也可能受到多重强烈的外界环境压力，导致其渗透调节能力下降，相较于南海海域群体，在其 ECM-受体相互作用通路中，*Agrin*、*SLC8A* 和 *KCNN4* 相关基因均呈下调表达模式。当盐度变化时，海洋动物可以通过调节离子与环境交换的不同生化机制来实现渗透平衡（Velotta et al. 2017），*SLC8A* 通过对离子的主动运输维持离子梯度，而离子通道设定膜电位，利用膜电化学梯度特异性地将离子和溶质移入或移出细胞，控制生物 pH 值和渗透压（Romero et al. 2009）。在高盐度条件下，龟足必须排出从高渗环境中获得的多余离子，有研究发现溶质载体基因家族可能会增加 $Na^+$和 $HCO^{3-}$的共同转运，从而将更多的 $Na^+$输送进血浆（Furukawa et al. 2011），同时，该家族基因也可以促进 $Cl^-$的摄取和 $HCO^{3-}$的分泌（Lam et al. 2014），为了驱动 $Na^+$离开血浆，长江口近岸海域龟足 DEGs 中显著富集的 *SLC8A* 可能会将部分 $Na^+$、$K^+$和 $Cl^-$输送到细胞内。同样，*Agrin* 基因的表达可能会增加细胞膜 $Ca^{2+}$通过电压门控钙离子通道转运能力，从而引起神经元的兴奋性增加（Ramseger et al. 2009）。电压门控钾离子通道也表现出强烈的离子选择性和电压依赖性，类似于其他电压门控离子通道，包括电压门控钠、钾和钙通道（Brown et al. 2011）。另外，在内质网蛋白质加工通路中，ATP 酶和热休克蛋白基因在长江口近岸海域龟足群体中显著上调表达，推测 *TERATPase* 直接参与了该龟足群体细胞内离子反应和体内渗透压平衡，该酶利用 ATP 水解的能量，使离子通过细胞质进入内质网，维持细胞内离子含量，保持渗透压平衡（Vieira et al. 2015）。我们观察到与离子吸收相关的几个基因的显著表达，因此推测在盐度变化的环境下，龟足总能主动吸收和排出生存环境中的离子，离子相关基因在龟足主动吸收环境中的离子减少盐分损失方面发挥重要作用。

不同温度变化会影响龟足的生长发育，也是龟足在不同生活环境下所需适应的环境压力，我们筛选出了抵御温度变化的相关基因，

为龟足在应对不同生境温度变化时的压力适应提供潜在的分子机制。在抗原加工与呈递通路中，与南海海域龟足群体相比，*Cath B*、*Cath L* 和 *HSP* 基因在长江口近岸海域龟足群体中显著上调表达，表明这些基因在抵御温度变化时起作用。*Cath B* 基因参与发育过程中的蛋白水解活性和应激反应（Shindo et al. 2008），还有研究表明，其参与了生物体在慢性应激下的调控，并在造成损伤和行为缺陷时有显著的高表达（Zhang et al. 2022），也对物种的冷损伤耐受性具有调节作用（Chen et al. 2021）。同时，具有蛋白水解功能的重组 *Cath L* 还可以调节免疫相关关键基因的转录表达，研究发现，其通过减少细胞凋亡来提高正常细胞的冷冻抵抗力（Chiang et al. 2022，Wang et al. 2022b）。应激蛋白可以通过结合和重新折叠受损的蛋白质来帮助细胞在有害条件下存活，在不同的热休克蛋白家族中，*HSP*70 的保守度最高（Carnevali et al. 2003）。有研究通过热休克蛋白 *HSP*70 的表达变化推测出贝类（*Limecola balthica*）利用有效防御和补偿机制提高对不利环境条件的广泛耐受性和较强的适应能力（Sokołowski et al. 2018）。*HtpG* 是真核生物热休克蛋白 *HSP*90 的原核同系物，具有 ATP 酶活性，可以发挥分子伴侣作用和辅助新合成蛋白的折叠。有研究发现沙门氏菌（Salmonella）在盐胁迫和冷胁迫下，*HtpG* 参与了应激反应且基因表达都有所增加（Pasqua et al. 2013）。由于这些基因在长江口近岸海域龟足群体中显著表达上调，我们推测相较于南海海域龟足群体，龟足可能在长江口近岸海域遭受温差大等不利环境因素时，热休克蛋白、分子伴侣和组织蛋白酶基因共同作用，抵御环境温度胁迫。温度变化不仅会扰乱水生生物的能量代谢，还会减缓脂肪代谢，这两者最终都可能导致水生动物的抗应激和能量利用机制失效（Sun et al. 2019），*nAChR* 最初被描述为配体门控离子通道蛋白，其功能涉及调节线粒体通道的形成，释放促凋亡物质，如细胞色素 c 或活性氧等（Gergalova et al. 2012）。线粒体为细胞提供能量，并通过控制内部细胞凋亡途径来调节其存活，其中多种 *nAChR* 亚型协同作用并参与了多种信号传导途径来调节凋亡机制（Skok 2021）。我们推测在长江口近岸海域龟足群体受到环境高低温压力后，新陈代谢降低，ATP 能量消耗增加，相应的通路基因表达也会提高，来应对不利的环境压力。这些基因在通路中的显著富集，表明龟足在遭受温度胁迫时，可能通过相关基因调控，产生抗应激反应，以保证正常的新陈代谢过程。

代谢紊乱和过度免疫可能会引发细胞凋亡，从而移除老化、过剩、受损、坏死或具有潜在危险的细胞（Jin et al. 2017）。在我们的研究中与抑制细胞凋亡相关的基因有 *TXNDC* 和 *NPY*1*R*。*TXNDC* 对入侵病原体具有先天的免疫调节，而且对生物体具有抗氧化和抗凋亡作用（Udayantha et al. 2021）。*NPY*1*R* 是参与动物许多生理过程的多样化信号分子，通过其偶联受体和信号通路调节吞噬作用，并有研究发现其参与了拟穴青蟹（*Scylla paramamosain*）的免疫过程（Hökfelt et al. 2003，Xu et al. 2022）。还有研究表明神经肽 mRNA 主要集中在长牡蛎（*Crassostrea gigas*）的内脏神经节、消化盲囊和血细胞组织中，不仅能对免疫刺激做出反应，还能调节免疫因子和凋亡相关基因的表达，从而有效地参与牡蛎病原体的清除并维持其生长发育（Li et al. 2019）。此外，热休克蛋白基因 *HSP*40 和 *HSP*70 在长江口近岸海域龟足群体中上调表达，表明 *HSP* 基因可能是龟足细胞凋亡的负调控因子，可以延缓细胞凋亡（Polier et al. 2008）。

对 3 个不同地理群体龟足的选择压力分析筛选到 7 个受到正选择压力的基因，对其功能注释分析发现，涉及对生长激素、生殖、营养、神经和免疫系统的调节以及神经元保护，还参与生长发育、组织分化、代谢和抗细胞凋亡等生理过程。其中包括 D-天冬氨酸基因（*DDO*），其广泛存在于动物组织中，主要作为一种神经递质，在生长、繁殖、神经和内分泌介导功能

中发挥重要作用（Li et al. 2018）。有研究发现，通过诱导凋亡抑制蛋白基因（*BIRC*）表达量的增加可以抑制 HepG2 细胞的凋亡（Chuturgoon et al. 2015）。推测龟足为了适应多重环境胁迫，这些基因受到正选择压力，促进了龟足在损失 ATP 后脂质补充，生长发育调节和抵御不利因素时的免疫调节和细胞抗凋亡过程。

本文对我国近岸海域的长江口近岸海域、东南沿海和南海海域的 3 个不同地理群体龟足进行转录组特异性和适应性进化分析，研究了不同地理群体龟足之间的不同途径和基因在环境变化下差异表达，筛选出了与离子交换、新陈代谢失衡和免疫应答相关的基因，初步探究不同地理群体龟足环境适应策略的分子机制，为龟足种群分布特征、遗传多样性的研究奠定基础，为我国龟足种质资源的保护和开发利用提供基础数据。

## 参 考 文 献


Anil A C, Desai D, Khandeparker L. 2001. Larval development and metamorphosis in *Balanus amphitrite* Darwin (Cirripedia; Thoracica): Significance of food concentration, temperature and nucleic acids. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 263(2): 125–141.

Brown E R, Piscopo S. 2011. Ion channels in key marine invertebrates; their diversity and potential for applications in biotechnology. Biotechnology Advances, 29(5): 457–467.

Carnevali O, Maradonna F. 2003. Exposure to xenobiotic compounds: Looking for new biomarkers. General and Comparative Endocrinology, 131(3): 203–208.

Chen G, Zhang D, Pan J, et al. 2021. Cathepsin B-like cysteine protease ApCathB negatively regulates cryo-injury tolerance in transgenic Arabidopsis and Agapanthus praecox. Plant Science, 308: 110928.

Chen K, Li E, Li T, et al. 2015. Transcriptome and molecular pathway analysis of the hepatopancreas in the Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei* under chronic low-salinity stress. Public Library of Science One, 10(7): e0131503.

Chiang Y, Wang L, Lin H, et al. 2022. Bioactivity of Orange-spotted Grouper (*Epinephelus coioides*) cathepsin L: Proteolysis of bacteria and regulation of the innate immune response. Fish & Shellfish Immunology, 122: 399–408.

Chuturgoon A A, Phulukdaree A, Moodley D. 2015. Fumonisin B1 inhibits apoptosis in HepG2 cells by inducing Birc-8/ILP-2. Toxicology Letters, 235(2): 67–74.

Furukawa F, Watanabe S, Inokuchi M, et al. 2011. Responses of gill mitochondria-rich cells in *Mozambique tilapia* exposed to acidic environments (pH 4.0) in combination with different salinities. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 158(4): 468–476.

Gergalova G, Lykhmus O, Kalashnyk O, et al. 2012. Mitochondria express α7 nicotinic acetylcholine receptors to regulate $Ca^{2+}$ accumulation and cytochrome c release: Study on isolated mitochondria. Public Library of Science One, 7(2): e31361.

Grabherr M G, Haas B J, Yassour M, et al. 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. Nature Biotechnology, 29(7): 644–652.

Hiddink J G, Burrows M T, Molinos J G. 2015. Temperature tracking by North Sea benthic invertebrates in response to climate change. Global Change Biology, 21(1): 117–129.

Hökfelt T, Bartfai T, Bloom F. 2003. Neuropeptides: Opportunities for drug discovery. The Lancet Neurology, 2(8): 463–472.

Jahan K, Nie H, Yin Z, et al. 2022. Comparative transcriptome analysis to reveal the genes and pathways associated with adaptation strategies in two different populations of Manila Clam (*Ruditapes philippinarum*) under acute temperature challenge. Aquaculture, 552(15): 737999.

Jin J, Wang Y, Wu Z, et al. 2017. Transcriptomic analysis of liver from Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*) exposed to high environmental ammonia reveals the activation of antioxidant and apoptosis pathways. Fish & Shellfish Immunology, 63: 444–451.

Kumagai N H, Molinos J G, Yamano H, et al. 2018. Ocean currents and herbivory drive macroalga-to-coral community shift under climate warming. Proceedings of the National Academy of Sciences, 115(36): 8990–8995.

Lam S H, Lui E Y, Li Z, et al. 2014. Differential transcriptomic analyses revealed genes and signaling pathways involved in

iono-osmoregulation and cellular remodeling in the gills of euryhaline *Mozambique tilapia*, *Oreochromis mossambicus*. BMC Genomics, 15(1): 1–23.

Lewis C. 1975. Some observations of factors affecting embryonic and larval growth of *Pollicipes polymerus* (Cirripedia: Lepadomorpha) *in vitro*. Marine Biology, 32(2): 127–139.

Li B, Dewey C N. 2011. RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. BMC Bioinformatics, 12(1): 1–16.

Li L, Stoeckert C J, Roos D S. 2003. OrthoMCL: Identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. Genome Research, 13(9): 2178–2189.

Li M, Wang M, Wang W, et al. 2019. The immunomodulatory function of invertebrate specific neuropeptide FMRFamide in Oyster *Crassostrea gigas*. Fish & Shellfish Immunology, 88: 480–488.

Li Y, Han H, Yin J, et al. 2018. Role of D-aspartate on biosynthesis, racemization, and potential functions: A mini-review. Animal Nutrition, 4(3): 311–315.

Lim J T, Hwang U W. 2006. The complete mitochondrial genome of *Pollicipes mitella* (Crustacea, Maxillopoda, Cirripedia): Non-monophylies of Maxillopoda and Crustacea. Molecules and Cells, 22(3): 314–322.

Love M I, Huber W, Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biology, 15(12): 1–21.

Ma X, Dai W, Kang J, et al. 2016. Comprehensive transcriptome analysis of six catfish species from an altitude gradient reveals adaptive evolution in Tibetan Fishes. G3-Genes Genomes Genetics, 6(1): 141–148.

Mao X, Cai T, Olyarchuk J G, et al. 2005. Automated genome annotation and pathway identification using the KEGG Orthology (KO) as a controlled vocabulary. Bioinformatics, 21(19): 3787–3793.

Marshall W. 2005. The Physiology of Fishes. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press, 177–230.

Nurdiani R, Zeng C. 2007. Effects of temperature and salinity on the survival and development of Mud Crab, *Scylla serrata* (Forsskål), larvae. Aquaculture Research, 38(14): 1529–1538.

Pasqua D R, Mauriello G, Mamone G, et al. 2013. Expression of DnaK, HtpG, GroEL and Tf chaperones and the corresponding encoding genes during growth of Salmonella Thompson in presence of thymol alone or in combination with salt and cold stress. Food Research International, 52(1): 153–159.

Polier S, Dragovic Z, Hartl F U, et al. 2008. Structural basis for the cooperation of Hsp70 and Hsp110 chaperones in protein folding. Cell, 133(6): 1068–1079.

Poloczanska E S, Burrows M T, Brown C J, et al. 2016. Responses of marine organisms to climate change across oceans. Frontiers in Marine Science, 3: 62.

Ramseger R, White R, Kröger S. 2009. Transmembrane form agrin-induced process formation requires lipid rafts and the activation of Fyn and MAPK. Journal of Biological Chemistry, 284(12): 7697–7705.

Rao X, Lin G. 2020. Effects of age, salinity and temperature on the metamorphosis and survival of *Capitulum mitella* cyprids (Cirripedia: Thoracica: Scalpellomorpha). Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 100(1): 55–62.

Romero M F, Chang M H, Mount D B. 2009. Physiology and Pathology of Chloride Transporters and Channels in the Nervous System. London: Academic Press, 43–79.

Shindo T, Hoorn R A L V D. 2008. Papain-like cysteine proteases: Key players at molecular battlefields employed by both plants and their invaders. Molecular Plant Pathology, 9(1): 119–125.

Skok M. 2021. Mitochondrial nicotinic acetylcholine receptors: Mechanisms of functioning and biological significance. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 143(1): 106138.

Sokołowski A, Brulińska D. 2018. The effects of low seawater pH on energy storage and heat shock protein 70 expression in a bivalve *Limecola balthica*. Marine Environmental Research, 140: 289–298.

Song Y J, Yoon J M. 2013. Genetic differences of three *Pollicipes mitella* populations identified by PCR analysis. Development & Reproduction, 17(3): 199–205.

Sun J L, Zhao L L, Cui C, et al. 2019. Influence of long-term temperature stress on respiration frequency, Na+/K+–ATPase activity, and lipid metabolism in Common Carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Thermal Biology, 83: 165–171.

Tian M, Chen P, Song J, et al. 2020. The first mitochondrial genome

of *Capitulum mitella* (Crustacea: Cirripedia) from China: Revealed the phylogenetic relationship within Thoracica. Mitochondrial DNA Part B, 5(3): 2573–2575.

Udayantha H, Samaraweera A V, Nadarajapillai K, et al. 2021. Molecular characterization and immune regulatory, antioxidant, and antiapoptotic activities of thioredoxin domain-containing protein 17 (TXNDC17) in Yellowtail Clownfish (*Amphiprion clarkii*). Fish & Shellfish Immunology, 115: 75–85.

Velotta J P, Wegrzyn J L, Ginzburg S, et al. 2017. Transcriptomic imprints of adaptation to fresh water: Parallel evolution of osmoregulatory gene expression in the Alewife. Molecular Ecology, 26(3): 831–848.

Vieira S M, Oliveira V H D, Valente R D C, et al. 2015. Chelerythrine inhibits the sarco/endoplasmic reticulum $Ca^{2+}$-ATPase and results in cell $Ca^{2+}$ imbalance. Archives of Biochemistry and Biophysics, 570(1): 58–65.

Wang J, Cheng Z Y, Dong Y W. 2022a. Demographic, physiological and genetic factors linked to the poleward range expansion of the Snail *Nerita yoldii* along the shoreline of China. Molecular Ecology, 31(17): 4510–4526.

Wang X, Liu D, Liu F, et al. 2022b. Cathepsin L involved in the freezing resistance of murine normal hatching embryos and dormant embryos. Reproductive Biology, 22(1): 100612.

Wilhelm B T, Landry J R. 2009. RNA-Seq-quantitative measurement of expression through massively parallel RNA-sequencing. Methods, 48(3): 249–257.

Xu Z, Wei Y, Huang H, et al. 2022. Immunomodulatory role of short neuropeptide F in the Mud Crab *Scylla paramamosain*. Developmental & Comparative Immunology, 126: 104260.

Yang Z. 2007. PAML 4: Phylogenetic analysis by maximum likelihood. Molecular Biology and Evolution, 24(8): 1586–1591.

Yoon M, Jung J Y, Kim D S. 2013. Genetic diversity and gene flow patterns in *Pollicipes mitella* in Korea inferred from mitochondrial DNA sequence analysis. Fisheries and Aquatic Sciences, 16(4): 243–251.

Young M D, Wakefield M J, Smyth G K, et al. 2010. Gene ontology analysis for RNA-seq: Accounting for selection bias. Genome Biology, 11(2): 1–12.

Yuan T P, Huang Y P, Miao S Y, et al. 2016. Genetic diversity and population structure of *Capitulum mitella* (Cirripedia: Pedunculata) in China inferred from mitochondrial DNA sequences. Biochemical Systematics and Ecology, 67(10): 22–28.

Zhang H, Wang J, Ruan C, et al. 2022. Co-exposure of chronic stress and alumina nanoparticles aggravates hippocampal microglia pyroptosis by activating cathepsin B/NLRP3 signaling pathway. Journal of Hazardous Materials, 436: 129093.

陈宁, 林岗, 饶小珍, 等. 2009. 龟足营养成分分析及评价. 热带海洋学报, 28(6): 117–122.

陈长春, 项凌云, 刘汉奇. 2012. 海洋污损生物藤壶的附着与防除. 海洋环境科学, 31(4): 621–624.

李惠莲. 2020. 龟足幼虫变态的形态学观察及相关基因分析. 福建: 福建师范大学硕士学位论文.

林岗, 齐秋贞, 邱文仁. 1994b. 龟足幼虫的室内培育条件. 水产学报, 18(3): 249–252.

林岗, 邱文仁, 齐秋贞. 1994a. 福州沿海龟足的繁殖附着与生长. 海洋学报, 16(6): 108–115, 143.

林岗, 饶小珍, 陈文列, 等. 2003. 龟足精子发生和成熟精子的超微结构. 应用与环境生物学报, 9(4): 417–421.

刘瑞玉, 任先秋. 2007. 中国动物志: 无脊椎动物 (甲壳动物亚门, 蔓足下纲, 围胸目). 北京: 科学出版社, 217–219.

齐庆华, 蔡榕硕. 2019. 中国近海海表温度变化的极端特性及其气候特征研究. 海洋学报, 41(7): 36–51.

邱文仁, 林岗, 齐秋贞. 1994. 龟足（*Pollicipes mitella*）的胚胎发育. 福建师范大学学报, 10(1): 95–100.

饶小珍, 林岗, 张殿彩, 等. 2010. 温度, 盐度对龟足胚胎发育和幼虫生长的联合影响. 生态学报, 30(23): 6530–6537.

张殿彩, 饶小珍, 林岗, 等. 2009. 温度对龟足胚胎和幼虫发育的影响. 福建师范大学学报, 25(3): 94–100.