

红鳍东方鲀及杂交鲀的脑和肾脏转录组比较分析

刘福君, 保明秀, 荆笛, 张钰渤, 王盛南, 王秀利* (大连海洋大学水产与生命学院基因工程实验室, 辽宁大连 116023)

摘要 为探究杂交鲀(红鳍东方鲀×菊黄东方鲀)与红鳍东方鲀差异的分子调节机制, 利用 Illumina 高通量测序技术对红鳍东方鲀及杂交鲀的脑、肾脏样本组织进行转录组测序, 筛选差异表达基因。结果表明: 通过 RNA-seq 技术共筛选到 2 207 个 DEGs (脑) 和 1 823 个 DEGs (肾脏)。其中在脑组织样本中有 1 068 个 DEGs 表达上调, 1 139 个 DEGs 表达下调, 肾脏组织样本中有 851 个 DEGs 表达上调, 972 个 DEGs 表达下调; 通过 GO 功能分类与 KEGG 富集分析, 将脑组织的差异基因区分为 60 个功能类别及 137 个代谢途径, 包括 G 蛋白偶联受体信号通路、跨膜转运、分子功能调节剂、钙离子结合等; 肾脏组织的差异基因被区分为 31 个功能类别及 142 个代谢途径, 包括氧化还原酶活性、肽酶活性、蛋白水解、细胞外区域等。该研究探讨了杂交鲀与红鳍东方鲀生长发育差异过程的相关分子调控机制, 可为后续相关研究提供初步理论参考与依据。

关键词 红鳍东方鲀; 转录组; 高通量测序; 功能注释

中图分类号 S917.4 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)08-0106-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.08.026



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Comparative Analysis of Brain and Kidney's Transcriptomes between *Takifugu rubripes* and Hybrid Puffer Fish

LIU Fu-jun, BAO Ming-xiu, JING Di et al (Genetic Engineering Laboratory, School of Fisheries and Life, Dalian Ocean University, Dalian, Liaoning 116023)

Abstract The study is to explore the molecular regulatory mechanism of the differences between the hybrid puffers fish (*Takifugu rubripes* × *Takifugu flavidus*) and *Takifugu rubripes*. In this study, Illumina high-throughput sequencing technology was used to sequence transcriptomes of the brain and kidney samples of *Takifugu rubripes* and hybrid puffers, screen differentially expressed genes. The results showed that 2 207 DEGs (brain) and 1 823 DEGs (kidney) were screened by RNA-seq technology. Among them, 1 068 DEGs were up-regulated and 1 139 DEGs were down-regulated in brain samples. And 851 DEGs were up-regulated and 972 DEGs were down-regulated in kidney samples. Through GO functional classification and KEGG enrichment analysis, the differential genes were divided into 60 functional categories and 137 metabolic pathways in the brain samples, which included G-protein coupled receptor signaling pathway, transmembrane transport, molecular function regulator and calcium ion binding, etc.. Differential genes in kidney tissue were divided into 31 functional categories and 142 metabolic pathways, which included oxidoreductase activity, peptidase activity, proteolysis and extracellular region, etc.. This study discussed the mechanism of molecular regulation in the process of growth and development differences between hybrid puffers fish and *Takifugu rubripes*, which can provide a preliminary theoretical reference and basis for the follow-up research.

Key words *Takifugu rubripes*; Transcriptome; High-throughput sequencing; Function notes

将带有不同遗传性状的两个亲本进行杂交, 产生的子代所具备的性状均优于双亲的生物学现象, 称为杂交优势 (heterosis, hybrid vigor), 比如杂交后代的抗逆性、早熟高产、品质优越等生物学现象。水产方面, 我国成功培育了许多杂交鲤, 如兴国红鲤与散鳞镜鲤杂交产生的丰鲤、荷包红鲤与沅江鲤杂交产生的荷沅鲤和建鲤、荷包红鲤与湘江野鲤杂交产生的岳鲤等, 研究发现杂交鲤产量至少增加 30%, 多者可达 2.5 倍以上^[1-3], 另外将鲫鱼与其远缘杂交的后代具有肉质鲜美、生长速度快、广食性等优点^[4-5]。

东方鲀属属于硬骨鱼纲 (Osteichthyes), 鲀形目 (Tetraodontiformes), 鲀亚目 (Tetraodontidei), 鲀科 (Tetraodontidae), 在我国主要分布于东海、黄海及渤海^[6], 周边地区主要分布在朝鲜半岛和北太平洋西部的日本, 代表物种是红鳍东方鲀和菊黄东方鲀, 其肉质营养丰富, 蛋白含量高, 是一种高经济价值的鱼类^[7]。但是菊黄东方鲀的生长速度较慢, 而红鳍东方鲀是东方鲀中生长速率最快、体型最大的种类^[8-9]。已有相关研究显示红鳍东方鲀和菊黄东方鲀的杂交后代, 具有养殖存活率高、生长速度快等优良性状, 可利用其杂交优势来

进行增产增效。

转录组 (transcriptome) 有广义与狭义上的解释。广义上转录组是指在特定条件下的细胞或组织的所有 RNA 总和, 包括非编码 RNA (non-coding RNA) 和信使 RNA (mRNA), 狭义上转录组是指细胞内全部转录出来的信使 RNA, 转录组具有空间与时间的限制, 通过提供相应基因的时空表达情况来进一步确定其生理调节机制, 具有高通量、高灵敏度、高准确性及成本相对较低等优势, 目前已广泛应用于各种生物转录组的研究^[10-12]。

该研究利用 Illumina 高通量测序技术对红鳍东方鲀及杂交鲀进行转录组测序及比较分析, 测序数据通过筛选、拼接和组装, 然后再进行功能分类、功能注释及代谢途径分析, 以期为后期深入研究杂交河鲀生长发育的分子调控机制提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料 试验用鱼为大连天正实业有限公司唐山咀东养殖场的红鳍东方鲀和杂交鲀 (红鳍东方鲀 × 菊黄东方鲀), 同一批孵化及同条件饲养情况下挑选活力较强、体格健壮、身体无损伤的成鱼各 10 条。采样所需的剪、咬骨钳、镊子、刀等器械均事先通过高压灭菌锅进行 121 °C, 2 h 灭菌, 采样前使用 75% 乙醇擦拭且经火焰消毒。将试验鱼现场解剖, 分别取全脑及肾脏组织储存于 10 倍体积的 RNA later

基金项目 国家海水鱼产业技术体系 (CARS-47)。

作者简介 刘福君 (1994—), 男, 贵州独山人, 硕士研究生, 研究方向: 水产养殖与分子生物学。* 通信作者, 教授, 硕士生导师, 从事分子生物学研究。

收稿日期 2019-12-31

中,以便后续总 RNA 提取。

1.2 总 RNA 提取 cDNA 文库构建和测序 利用 RNA 提取试剂盒提取红鳍东方鲀和杂交鲀(红鳍东方鲀×菊黄东方鲀)的总 RNA。为了保证试验数据的高质量,上述提取的总 RNA 需要进行琼脂糖凝胶电泳、紫外分光光度计和 Agilent 2100 方法检测,主要包括样品浓度、纯度及完整性, A_{260}/A_{280} 、 A_{260}/A_{230} 、28S/18S、RIN (RNA integrity number)。RNA 质量要求有如下指标:RIN = 7.0, A_{260}/A_{280} 为 1.8~2.0,28S/18S 为 1.5。通过完整性及纯度检测后,使用 Oligo(dT)磁珠纯化和进行 mRNA 的富集,随后进行 mRNA 的分离及片段化,合成一链和二链 cDNA。之后再行 3' 末端加 A,连接测序接头末端修复,而后用 AMPure XP beads 筛选 250~300 bp 的 cDNA,最后富集 cDNA 文库。将上述 cDNA 文库进行 Illumina 测序,首先过滤原始数据中低质量、末端质量低、含测序引物的 reads,得到 clean reads,然后再进行 de novo 拼接,最后通过 CAP3 软件拼接来获得最终 Unigene 序列集合^[13]。使用 DEG-seq 软件找寻筛选差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)时以 $P < 0.05$ 作为标准^[14]。

1.3 差异表达基因 GO 与 KEGG 富集分析 通过 FPKM (fragments per kilobase of transcript per million fragments

mapped)^[14]方法对 Unigenes 进行 DEGs 表达量计算。通过软件 cuffdiff 来分析转录本与基因水平上的差异表达,差异表达的基因和转录本需要满足以下标准:计算表达倍数变化 (fold change),需要 $|\log_2 \text{FoldChange}| > 1$; 2 个样本中 mapping reads 数之和 ≥ 10 ; 对 P 进行 FDR 校正得到 Q ,同时需要 $P \leq 0.05$ 及 $Q \leq 1$ 。最后将所得的差异表达基因单独进行聚类分析、Pathway 分析和 GO 功能分析。

2 结果与分析

2.1 转录组数据质控分析 分别取红鳍东方鲀脑组织(H_B1)、肾脏组织(H_L1),杂交鲀(红鳍东方鲀×菊黄东方鲀)的脑组织(Z_B2)和肾脏组织(Z_L2),利用 RNA-seq 技术对样品文库进行测序,分别得到 Raw reads 59 463 756、48 936 330、49 340 508 和 49 165 672 条;去除 N 含量超过 10% (containing N)、带有接头(adapter related)和低质量(low quality)的 reads 以后得到 Clean reads 分别为 58 214 792、48 236 284、48 530 284 和 47 363 626;Phred 值大于 20、30 的碱基比例(Q20, Q30)分别为 97.62%、98.20%、97.74%、98.12%(Q20)以及 93.56%、94.75%、93.78、94.60% (Q30);总碱基数中碱基 C 和 G 数量总和占比分别为 48.92%、53.79%、48.98% 和 52.56%(表 1)。

表 1 测序数据质量情况

Table 1 Quality evaluation of sequencing data

样品 Sample	未过滤 reads 数 Raw reads//条	经过滤 reads 数 Clean reads//条	Phred 值大于 20 的碱基比 例 Q20//%	Phred 值大于 30 的碱基比 例 Q30//%	C 和 G 数量总 和比例 CG content//%
H_B1	59 463 756	58 214 792	97.62	93.56	48.92
H_L1	48 936 330	48 236 284	98.20	94.75	53.79
Z_B2	49 340 508	48 530 284	97.74	93.78	48.98
Z_L2	49 165 672	47 363 626	98.12	94.60	52.56

2.2 差异基因的筛选 根据 FPKM 法^[15-16]对样品间差异进行分析,分别用红色、蓝色和绿色表示显著上调基因、显著下调基因和无显著性差异基因,结果显示共得到差异表达基因(DEGs)共 2 207 个(脑组织,图 1)和 1 823 个(肾脏组织,图 2)。其中杂交鲀的脑组织样本相对于红鳍东方鲀的脑组织样本表达上调的 DEGs 有 1 068 个,表达下调的有 1 139 个。各差异表达基因的水平不同($\log_2 \text{FoldChange}$ 高度不同),差异水平变化主要存在于 $>2 \sim \leq 7$ (上调基因占 48.36%, 下调基因占 51.64%),其次为 $>0 \sim \leq 2$ (上调基因占 45.23%, 下调基因占 54.77%),最后是 $>7 \sim \leq 15$ (上调基因占 71.33%, 下调基因占 28.67%);而杂交鲀的肾脏组织样本相对于红鳍东方鲀的肾脏组织样本表达上调的有 851 个,表达下调的有 972 个,同样主要集中在 $>2 \sim \leq 7$ (上调基因占 39.66%, 下调基因占 60.34%),其次为 $0 \sim \leq 2$ (上调基因占 55.14%, 下调基因占 44.86%),最后是 $>7 \sim \leq 15$ (上调基因占 49.36%, 下调基因占 50.64%) (表 2)。

2.3 差异基因 GO 分析 差异表达基因经过 GO 富集分析可分为三大类,分别是描述基因产物及个体基因的分子功能(molecular function, MF),描述亚细胞结构、位置及大分子复合体的细胞组成(cellular component, CC)与描述参与基因编

码的生物学过程(biological process, BP)。对筛选到的差异表达基因进行 GO 富集分析,结果显示在红鳍东方鲀和杂交鲀的脑组织样本中,差异表达基因可主要归纳于 35 个生物学过程、15 个细胞组成以及 10 个分子功能(图 3)。在生物学过程中以 G 蛋白偶联受体信号通路(G-protein coupled receptor signaling pathway) (70 个)和跨膜转运(transmembrane-

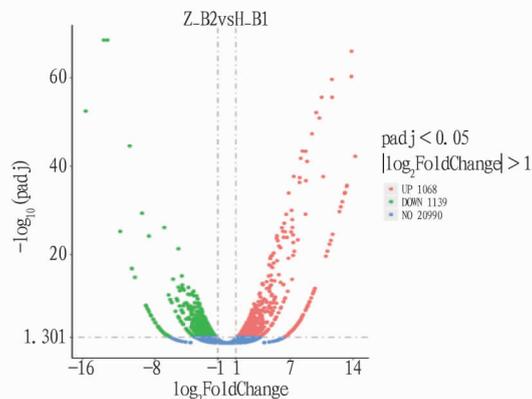


图 1 杂交鲀与红鳍东方鲀脑组织样品中的差异基因

Fig.1 Differential genes in brain tissue samples of hybrid puffers and *Takifugu rubripes*

transport) (66个)存在较多差异表达基因;在分子功能方面,差异表达基因集中于分子功能调节剂(molecular function regulator) (69个)以及钙离子结合(calcium ion binding) (66个)。

而在肾脏组织样本中,差异表达基因主要归纳于26个

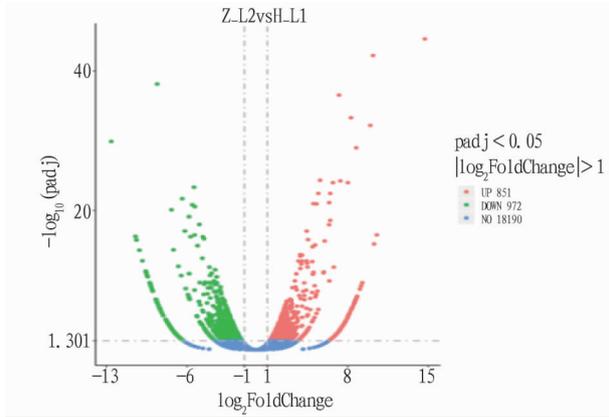


图2 杂交鲈与红鳍东方鲈肾脏组织样品中的差异基因

Fig.2 Differentially expressed genes in kidney tissue samples of hybrid puffer

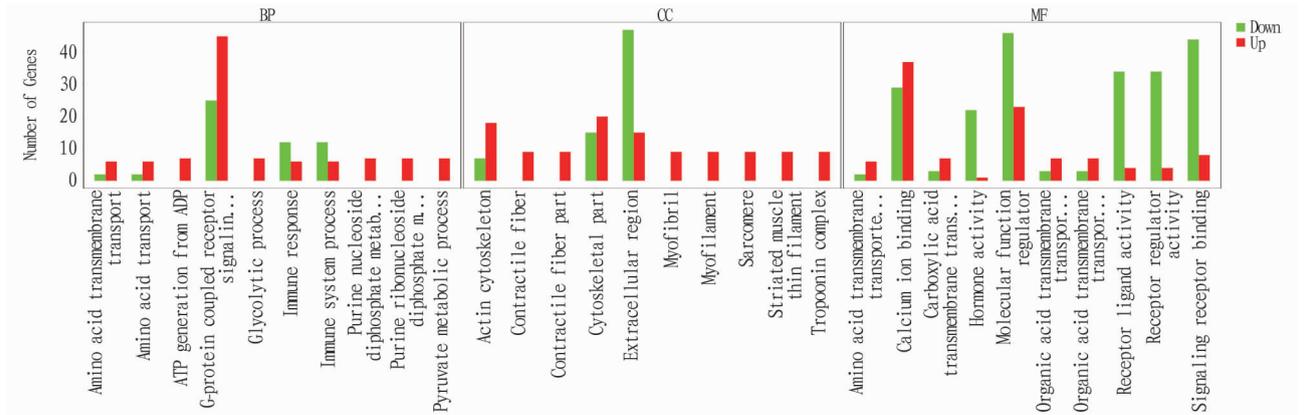


图3 杂交鲈与红鳍东方鲈脑组织样本差异表达基因 GO 富集分析

Fig.3 GO enrichment analysis of differentially expressed genes in brain tissue samples of hybrid puffers and *Takifugu rubripes*

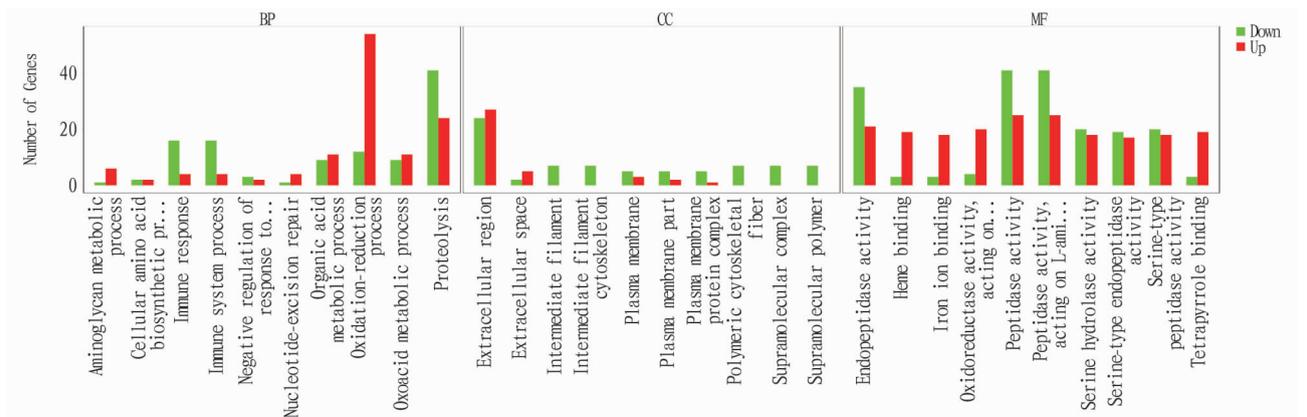


图4 杂交鲈与红鳍东方鲈肾脏组织样本差异表达基因 GO 富集分析

Fig.4 GO enrichment analysis of differentially expressed genes in kidney tissue samples of hybrid puffers and *Takifugu rubripes*

2.4 KEGG 代谢途径分析 选取 padj 值最小的前 20 条通路(pathway),以颜色来区分不同 padj 范围,点的大小来表示注释到 KEGG 通路编号上的差异基因数,从而绘制散点图。如图 5 所示,脑组织样品经过 KEGG 富集分析共建立了 137

分子功能,4个生物学功能和1个细胞组成(图4)。差异表达基因在分子功能中以氧化还原酶活性(oxidoreductase activity) (70个)和肽酶活性(peptidase activity) (66个)居多;生物学过程上集中在氧化还原过程(oxidation-reduction process) (66个)及蛋白水解(proteolysis) (65个);在细胞组成上则存在于细胞外区域(extracellular region) (51个)。结果表明红鳍东方鲈和菊黄东方鲈的杂交后代在生长发育上主要是通过以上富集途径的差异表达基因来调控的。

表2 差异表达基因数目统计

Table 2 Number of differentially expressed genes

样本 Sample	差异倍数对数值 \log_2 FoldChange	上调基因 (百分比//%)	下调基因 (百分比//%)
		Up-regulated gene (percentage)	Down-regulated gene (percentage)
脑 Brain	$0 \sim \leq 2$	465 (45.23)	563 (54.77)
	$>2 \sim \leq 7$	501 (48.36)	535 (51.64)
	$>7 \sim \leq 15$	102 (71.33)	41 (28.67)
肾脏 Kidney	$0 \sim \leq 2$	402 (55.14)	327 (44.86)
	$>2 \sim \leq 7$	372 (39.66)	566 (60.34)
	$>7 \sim \leq 15$	77 (49.36)	79 (50.64)

条 pathway,在神经活性配体-受体相互作用(neuroactive ligand-receptor interaction)中差异表达基因最多,共有 81 个;其次为钙信号通路(calcium signaling pathway),达 42 个;细胞黏附分子(cell adhesion molecules,CAMs)达 33 个。另一方面,肾

脏组织样品经 KEGG 富集分析共建立了 142 条 pathway, 其中神经活性配体-受体相互作用达 40 个; NOD 样受体信号通路 (NOD-like receptor signaling pathway) 达 30 个 (图 6)。这些通路的 padj 值较小, 说明这些通路的富集程度较高。结果表明红鳍东方鲀和杂交鲀的脑组织和肾脏组织样品中以神经活性配体-受体相互作用中相关差异基因的表达最为活跃。

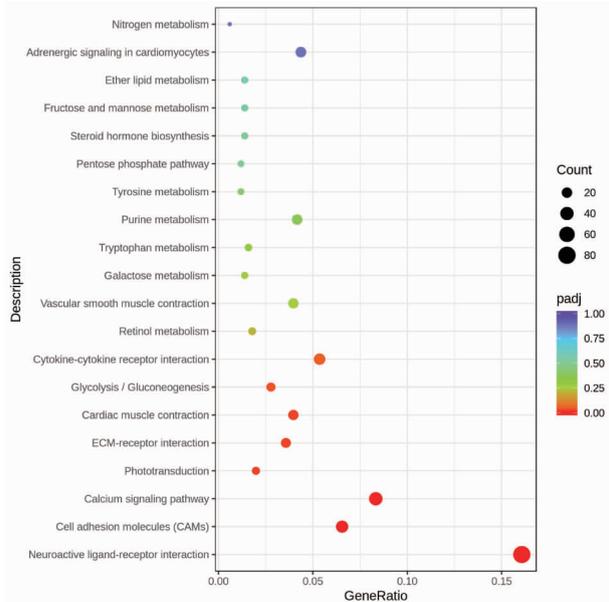


图 5 杂交鲀与红鳍东方鲀脑组织样本差异表达基因 KEGG 富集分析

Fig. 5 KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes in brain tissue samples of hybrid puffers and *Takifugu rubripes*

3 讨论与结论

通常情况下杂交后代会比亲本的抗逆性强、早熟高产、品质优越等。前期已有相关研究显示红鳍东方鲀和菊黄东方鲀的杂交后代在生长速率方面显著高于菊黄东方鲀, 但未超过红鳍东方鲀, 而在肉质方面, 杂交东方鲀和菊黄东方鲀保持了基本一致的极佳口感, 且对低水温、重金属离子、盐度的波动均有良好的抗逆性^[17-19]。

该研究应用 Illumina 高通量测序技术对红鳍东方鲀及杂交鲀 (红鳍东方鲀与菊黄东方鲀杂交后代 F₁) 脑和肾脏的转录组测序, 分别筛选到 2 207 个和 1 823 个差异表达基因进行 GO 富集分析和 KEGG 功能富集分析, 结果显示杂交鲀与红鳍东方鲀的差异表达基因主要富集在神经活性配体-受体相互作用过程、NOD 样受体信号通路和钙信号通路过程等, 且在神经活性配体-受体相互作用过程中存在生长激素 (growth hormone, GH) 和催乳素 (prolactin, PRL) 的调控。在鱼类的生长内分泌调控方面, 催乳素和生长激素都是较为重要的影响因素^[20], 其对鱼类的生长发育起到了重要作用, 如催乳素可以维持体内外电解质和水的平衡、调节内分泌与新陈代谢、脑功能和行为协调、免疫调节和保护、繁殖以及促进生长和发育^[21]; 而生长激素可以促进消化系统的氨基酸吸收及增加组织细胞的 RNA 合成进而促使鱼体蛋白质合成,

提高食物转化率, 还有调节鱼类生殖功能、促进体细胞分裂、增强鱼体免疫力和刺激骨骼肌肉组织发育等效果^[22-23]。因此初步推测神经活性配体-受体相互作用过程、NOD 样受体信号通路和钙信号通路过程可能是杂交鲀杂交优势的主要由来, 但还需要进一步研究证明。

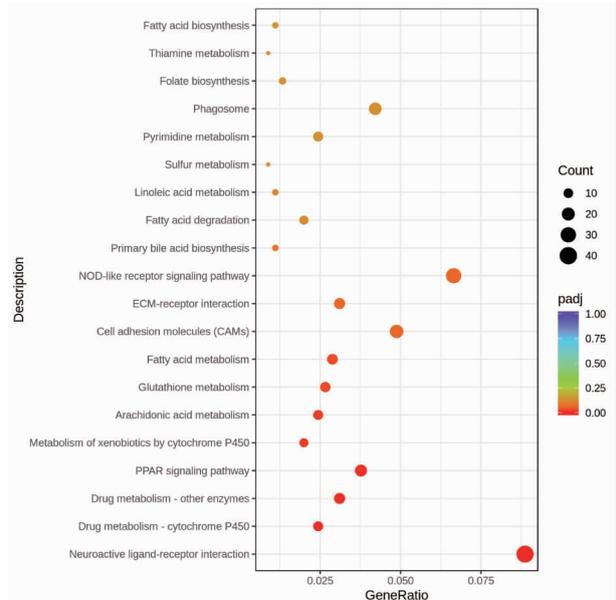


图 6 杂交鲀与红鳍东方鲀肾脏组织样本差异表达基因 KEGG 富集分析

Fig. 6 KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes in kidney tissue samples of hybrid puffers and *Takifugu rubripes*

该研究通过对红鳍东方鲀及杂交鲀的转录组比较分析, 揭示了神经活性配体-受体相互作用途径可能参与调控出了杂交鲀的杂交优势, 为后期继续进行杂交鲀和红鳍东方鲀生长发育差异过程的相关分子调控机制的研究提供了初步理论依据与参考, 有利于进一步提高杂交河鲀的经济价值。

参考文献

- [1] 马仲波, 唐刚胜, 张峰, 等. 鲤鱼三杂交 [(荷包红鲤♀×元江鲤♂)♀×镜鲤♂] 遗传改良与利用的研究[J]. 淡水渔业, 1984(6): 25-27.
- [2] 潘光碧, 唐刚胜, 杜森英, 等. 鲤鲫移核鱼与散鳞镜鲤杂交优势及遗传性状的研究[J]. 水产学报, 1989, 13(3): 230-238.
- [3] 佟雪红, 董在杰, 缪为民, 等. 建鲤与黄河鲤的杂交优势研究及主要生长性状的通径分析[J]. 大连水产学院学报, 2007, 22(3): 159-163.
- [4] 陈学年, 郭玉娟, 彭泽鲤与兴国红鲤杂交优势的研究与利用[J]. 淡水渔业, 2000(9): 14-16.
- [5] 陈林, 朱晓鸣, 韩冬, 等. 芙蓉鲤鲫幼鱼饲料适宜淀粉含量[J]. 水生生物学报, 2016, 40(4): 690-699.
- [6] 雷霖霖. 海水鱼类养殖理论与技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 683-702.
- [7] 韦众. 河鲀鱼的生物学特性及其养殖(综述)[J]. 安徽农业大学学报, 1999, 26(4): 436-439.
- [8] 万玉美, 赵海涛, 张福崇. 红鳍东方鲀、菊黄东方鲀及其杂交 F₁ 幼鱼耗氧率与窒息点研究[J]. 水产科学, 2013, 32(1): 21-25.
- [9] 赵海涛, 万玉美, 张福崇, 等. 菊黄东方鲀(♀)×红鳍东方鲀(♂) F₁ 代及其亲本肌肉营养成分的比较分析[J]. 大连海洋大学学报, 2013, 28(1): 77-82.
- [10] 刘伟, 王腾蛟, 唐海琳, 等. 高通量细菌鉴定方法研究进展[J]. 微生物学通报, 2014, 41(12): 2501-2509.
- [11] POLICHT F A, SONG M H, SITALO S, et al. Analysis of genetic copy number changes in cervical disease progression[J]. BMC Cancer, 2010, 10(1): 432-438.

大小排序为 $X_1 > X_4 > X_3 > X_5 > X_2$, 即坡向坡位、土壤容重、海拔、土壤有机质、坡度。

对油松年平均胸径生长量的影响因子大小排序为 $X_1 > X_5 > X_4 > X_3 > X_2$, 即坡向坡位、土壤容重、土壤有机质、海拔、坡度。

从关联序可以看出, 5种因子对油松高生长和胸径生长都有着不同程度的影响, 影响最大均是坡位坡向, 关联度分别是 0.603 5、0.484 4, 明显高于其他因子的关联度; 而对于树高来说, 其次是土壤容重, 影响作用比海拔稍大, 胸径则相反, 海拔的影响略逊于土壤容重; 再者是土壤有机质含量和坡度, 坡度对油松树高和胸径的影响最小, 因此, 影响西宁市油松人工林生长的主导因子为坡向坡位。

3 结论与讨论

研究表明, 对油松年平均树高生长量的影响因子排序是 $X_1 > X_4 > X_3 > X_5 > X_2$, 即坡向坡位、土壤容重、海拔、土壤有机质、坡度; 对油松年平均胸径生长量的影响因子排序 X_1 、 X_5 、 X_4 、 X_3 、 X_2 , 即坡向坡位, 土壤容重, 土壤有机质, 海拔, 坡度。所以, 影响西宁市油松人工林生长的主导因子是坡向坡位。

研究影响西宁市油松人工林生长的主导因子对西宁市油松的管护、造林以及对西宁市绿化都有十分重要的作用。西宁地区地处高原, 恶劣的环境条件对植被生长有很大影响, 而油松是西宁地区的主要造林树种, 在西宁地区, 已有科研人员研究了施肥对油松生长的促进作用^[10], 油松病害的原因以及改善方法^[11], 油松造林方法^[13], 油松育苗技术^[12], 而通过对影响其生长的主导因子的研究, 为油松人工林的培育打下了理论基础。该试验利用灰色关联度法分析影响西宁市油松人工林生长的主导因子, 该方法能将多种变量同时进行处理, 分析其对某几个变量的关联程度, 关联度最大的即为主导因子。灰色关联度法有利于多因子的分析, 并能在很大程度上减少由于信息不对称带来的损失。

由于西宁地区林场内油松纯林的面积较小, 分布较为稀疏, 多为混交林, 故选择树龄为 20~30 年的油松人工林, 以减少混交树种对其生长的影响。西宁地区油松主要生长在阳坡, 半阴半阳坡面较少, 阴坡最少, 此次调查未能找到符合试验要求的阴坡油松, 因此文中没有阴坡油松的调查数据。在实地调查中, 可能由于不同林场抚育管理方式和时间的不同, 近乎同龄的油松人工林在树高和胸径上有着较为明显的

差距, 但是年平均生长量相差不大, 对该试验的影响甚微。该试验同时分析了气候因子和立地因子对油松人工林的影响, 是目前西宁地区少有的研究。此前, 多数研究为单个因子对油松生长的影响, 相较而言该试验更加复杂, 考虑更加全面。由于条件的限制, 未调查其他龄级油松人工林, 因此该研究结论为初步结论且仅适用于青海地区。

根据研究得出, 不同的坡位坡向有着不同的温度和湿度, 如阳坡的湿度要低于半阴半阳坡, 但温度要高于半阴半阳坡; 上坡位温度要高于中坡位和下坡位, 而湿度要低于中坡位和下坡位。从分析结果看, 对树高和胸径生长影响最大的是坡向坡位, 即坡向坡位为影响西宁市油松人工林生长的主导因子。为保证高原地区城乡绿化造林质量, 提高西宁市油松林的造林成活率, 以生长因子不同的同龄油松人工林为研究对象。对油松在不同生境条件的生长状况进行调查, 分析不同因子对油松生长的影响程度, 可为西宁地区油松的合理栽培经营和抚育提供科学的理论依据。在此之后, 可通过对各龄级油松人工林进行全方位研究, 探讨各立地因子与气候因子对西宁市油松人工林各龄级阶段的具体影响。

参考文献

- [1] 贾春芳, 臧志, 谷鑫鑫, 等. 造林密度对西宁市油松人工林生长的影响[J]. 青海大学学报, 2018, 36(6): 9-13, 33.
- [2] 罗伟祥, 刘广全, 李嘉旺, 等. 西北主要树种培育技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 2007: 238-245.
- [3] 李裕元, 郑纪勇, 邵明安. 子午岭天然林与人工林群落特征比较研究[J]. 西北植物学报, 2005, 25(12): 2447-2456.
- [4] 焦醒, 刘广全. 陕西黄土高原油松生长状况及其影响因子分析[J]. 西北植物学报, 2009, 29(5): 1026-1032.
- [5] 沈国舫, 关玉秀, 周沛村, 等. 影响北京市西山地区油松人工林生长的立地因子[J]. 北京林业大学学报, 1979(00): 96-104.
- [6] 张康健, 薛德自, 孙长忠. 渭北黄土高原油松数量化立地质量得分表的编制及其应用[J]. 西北林学院学报, 1984(00): 60-71.
- [7] 王青山, 孙玉鹏, 李连江. 自然因子对油松撒播造林的影响及对策[J]. 防护林科技, 2006(S1): 41-42.
- [8] 刘明国, 殷有, 孔繁斌, 等. 辽西半干旱地区油松人工林天然更新的影响因子研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2014, 45(4): 418-423.
- [9] 汤雨宁. 朝阳地区油松天然更新规律及人工促进措施研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2007.
- [10] 袁小红. 西宁南山油松造林施肥对比试验[J]. 青海农林科技, 2009(3): 56-57.
- [11] 马文斌, 郭军. 西宁地区油松病害调查及防治初步研究[J]. 青海农林科技, 2010(1): 6-8, 21.
- [12] 张金善, 秦莲萍. 青海油松育苗技术[J]. 中国林业, 2010(12): 49.
- [13] 何占禧, 李宝章. 青海东部地区山地油松造林技术[J]. 现代农业科技, 2010(13): 240.

(上接第 109 页)

- [12] 张春兰, 秦孜娟, 王桂芝, 等. 转录组与 RNA-Seq 技术[J]. 生物技术通报, 2012(12): 51-56.
- [13] 李琳, 冯帅, 汪莹, 等. 鼠伤寒沙门菌 ATCC13311 诱导耐药株的转录组测序和分析[J]. 中国兽医学报, 2015, 35(7): 1088-1094, 1111.
- [14] ANDERS S, HUBER W. Differential expression analysis for sequence count data[J]. Genome Biol, 2010, 11: 1-12.
- [15] TRAPNELL C, WILLIAMS B A, PERTEA G, et al. Transcript assembly and quantification by RNA-seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation[J]. Nat Biotechnol, 2010, 28(5): 511-515.
- [16] TRAPNELL C, ROBERTS A, GOFF L, et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks[J]. Nat Protoc, 2012, 7(3): 562-578.
- [17] 范文涛, 刘海金, 赵文江, 等. 菊黄东方鲀♀×红鳍东方鲀♂ 杂交后代

- 早期形态特征及生长速度的比较[J]. 水产学报, 2011, 35(7): 1065-1071.
- [18] 张福崇, 王玉美, 方笑, 等. 盐度对杂交东方鲀存活和摄食的影响[J]. 河北渔业, 2012(12): 2-6.
- [19] 张福崇, 赵海涛, 王玉美. 杂交河鲀 F1 代苗种生产与养殖技术研究[J]. 河北渔业, 2011(10): 19-21, 32.
- [20] 于力群, 王厚鹏, 朱作言, 等. 生长激素/催乳素家族配体和受体成员在斑马鱼早期胚胎中的表达比较和交叉活性分析[J]. 水生生物学报, 2014, 38(5): 809-818.
- [21] 张耀, 郭定宗. 催乳素结构与功能研究进展[J]. 动物医学进展, 2007, 28(5): 49-52.
- [22] 匡刚桥, 刘臻, 鲁双庆. 鱼类生长激素基因的研究现状及展望[J]. 水利渔业, 2006(6): 1-3.
- [23] 徐斌, 李德尚, 张培军. 鱼类生长激素的分子生物学和应用研究的进展[J]. 海洋与湖泊, 1997(5): 553-557.