



团头鲂 *Hox* 基因家族的鉴定、进化与表达分析

刘宁, 黄欣, 刘寒*, 王卫民

(华中农业大学水产学院, 农业农村部淡水生物繁殖重点实验室, 湖北 武汉 430070)

摘要: 为探究团头鲂 *Hox* 的分布、进化及表达调控, 实验基于团头鲂全基因组数据, 结合生物信息学分析方法对 *Hox* 基因家族进行鉴定、染色体分布、系统进化和表达分析。结果显示, 团头鲂基因组中鉴定有 49 个 *Hox*, 根据系统进化树聚集为 5 个亚类; 49 个 *Hox* 分属于 7 个基因连锁群 (*HoxAa*、*HoxAb*、*HoxBa*、*HoxBb*、*HoxCa*、*HoxCb* 和 *HoxDa*), 并且不均匀地分布在 5 条染色体上; 团头鲂 *Hox* 基因家族成员具有不同的表达模式, 在肌肉中的表达水平与斑马鱼所有 *Hox* 的表达存在显著差异; 团头鲂不同发育阶段及不同组织的转录组结果显示, 在 *HoxA* 基因群中, *HoxA2a* 和 *HoxA3a* 在幼鱼阶段高表达, 其他基因在肌肉、肌间刺及结缔组织中表达量低甚至不表达; *HoxB* 基因群中, *HoxB9a*、*HoxB3a*、*HoxB8a*、*HoxB1b*、*HoxB5a* 和 *HoxB5b* 在幼鱼阶段高表达, *HoxB7a*、*HoxB10a* 和 *HoxB9a* 在成鱼肌肉、结缔组织及肌间刺中高表达; *HoxC* 基因群中, *HoxC3a* 和 *HoxC4a* 在幼鱼阶段高表达, *HoxC3a* 和 *HoxC8a* 在成鱼的 3 个组织都有表达; *HoxD* 基因群中, *HoxD9a*、*HoxD10a* 和 *HoxD11a* 在胚胎 S2 期表达量较高。研究表明, *Hox* 在团头鲂早期胚胎时期和肌间刺的形成中有表达, 提示团头鲂肌间刺的形成可能受 *Hox* 基因家族调控。

关键词: 团头鲂; *Hox* 基因家族; 基因鉴定; 表达分析

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

同源异型盒基因 (homeobox genes), 简称 *Hox* 基因^[1], 是美国科学家 Lewis^[2] 在对黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 进行同源异位突变实验中发现。之后, 随着研究物种的不断深入和扩大, 研究者们以黑腹果蝇的同源异型盒基因为探针^[3], 发现 *Hox* 不仅在动物和人类组织中有表达, 在某些植物和酵母细胞中同样表达, 因而研究者们认为 *Hox* 应该存在于所有真核生物共同祖先的基因组中^[4-7]。基于此, *Hox* 也成为了进化和发育学家非常感兴趣的研究对象。

Hox 基因家族具有高度保守、成簇存在以

及空间共线性等特点^[8]。其高度保守是指 *Hox* 无论片断大小, 其序列中均含有一段由 180~183 个碱基组成的保守序列^[9]。这段保守序列进一步编码形成由 60~61 个氨基酸构成的螺旋转角多肽区域, 称为同源结构域。*Hox* 通常以染色体为单位成簇存在。例如, 头索动物的典型生物厦门白氏文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri*), 其 *Hox* 由一个基因簇组成^[10]。头索动物向脊椎动物进化的过程中发生过大规模的基因倍增, 导致 *Hox* 基因簇 4 倍化^[11], 因此哺乳动物的 *Hox* 有 4 个基因簇。目前研究发现, 斑马鱼 (*Danio rerio*) 有 7 个 *Hox* 基

收稿日期: 2019-12-06 修回日期: 2020-07-12

资助项目: 国家自然科学基金 (31702315); 国家大宗淡水鱼类产业技术体系建设项目 (CARS-45-08)

第一作者: 刘宁 (照片), 从事水产动物遗传与育种方面研究, E-mail: liuning1997@webmail.hzau.edu.cn

通信作者: 刘寒, E-mail: liuhan@mail.hzau.edu.cn



因簇, 因此推测, 鱼类在进化过程中伴随着多次基因组加倍现象^[12]。*Hox* 的表达具有时空共线性的特点^[13], 即 *Hox* 在染色体上的排列顺序与调控动物体轴发育的表达顺序是一致的。具体来讲, 就是在一条染色体上靠近 3'端的基因编码体前轴组织和器官的形成, 靠近 5'端的基因编码体后轴组织和器官的形成, 位于中间部位的则在中部表达^[14]。例如人类 (*Homo sapiens*) 位于 7 号染色体的 *HOXA* 基因簇, 靠近 3'端的 *HOXA1*、*HOXA2*、*HOXA3* 和 *HOXA4* 影响头部组织的形成, 靠近 5'端的 *HOXA9*、*HOXA10*、*HOXA11* 和 *HOXA13* 影响四肢的形成。另外研究发现, 小鼠 (*Mus musculus*) 第 3 平行同源家族, 也就是 *Hoxa3*、*Hoxb3* 与 *Hoxd3* 按照时空共线性表达原则, 其主要参与颈部脊椎骨的发生与形成^[15]。总而言之, *Hox* 基因家族是由一套结构相似的基因组成的遗传调控系统, 其作为动物胚胎指控中心, 在调控动物胚胎细胞发生、分化和成体组织器官的形成方面作用明显^[16], 是十分复杂且关键的调控基因。

团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 又称武昌鱼, 隶属于鲤形目 (Cypriniformes) 鲤科 (Cyprinidae) 鲂属 (*Megalobrama*), 主产于长江中下游。因其味道鲜香、肉质滑嫩、适应性强而成为我国重要的淡水经济养殖鱼类之一^[17]。鉴于 *Hox* 基因家族这类发育调控基因在动物体轴形成、形态发育以及组织器官发生中的重要作用, 本研究利用生物信息学的方法鉴定团头鲂 *Hox* 基因家族成员, 并进一步对其进化关系、染色体定位以及组织表达模式等进行研究分析, 为后续深入研究团头鲂 *Hox* 基因家族功能提供依据。

1 材料与方法

1.1 *Hox* 基因家族成员的鉴定

斑马鱼 (登录号: GCA_000002035.4)、大西洋鳕 (*Gadus morhua*) (登录号: GCA_000231765.1) 及半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) (登录号: GCA_000523025.1) 全基因组测序数据已公布, 团头鲂的全基因组测序已由本课题组完成^[18]。在团头鲂、斑马鱼、大西洋鳕和半滑舌鳎基因组中鉴定 *Hox* 基因家族, 即在 NCBI 数据库中下载已知的 *Hox* 序列, 通过 BLAST 软件比对到上述 4 种鱼的基因组数据中, 参数 E 值 $<10^{-10}$; 用 SOLOR 软件连接比对结果, 并筛选结果 (比对率 $\geq 70\%$, 相似度 $\geq 40\%$); 用软件 GENEWISE 进行结

果预测, 去除冗余基因, 过滤长度小于 250 个碱基或者单外显子的基因; 利用最大似然法对蛋白序列构建进化树, 并 P 排除非 HOX 的分支; 最后对鉴定出来的基因进行 NR 库注释, 根据 *Hox* 成簇分布的特性对 *Hox* 的分类进行手工校正。

1.2 *Hox* 基因家族结构及染色体定位分析

根据团头鲂基因组注释信息文件 (<http://gigadb.org/dataset/100305>) 确定 *Hox* 的染色体位置和结构信息, 使用 MapInspect 软件进行染色体定位作图。

1.3 团头鲂 *Hox* 基因家族系统进化分析

为研究斑马鱼、大西洋鳕、半滑舌鳎和团头鲂的 *Hox* 基因家族成员的系统进化关系, 利用 Clustal X 软件对这 4 种鱼进行蛋白序列比对, 使用 MEGA 5.0 邻近算法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建进化树, 并进行自展值 (bootstrap, 1 000-replicates) 检验。

1.4 *Hox* 在团头鲂和斑马鱼肌肉中的表达分析

利用团头鲂肌肉 (PRJNA343584) 和斑马鱼肌肉组织转录组测序数据 (SRR891510), 将获得过滤数据 (clean reads) 与团头鲂参考基因组进行比对, 通过计算 FPKM 值 (fragments per kilobase million) 做图来分析 *Hox* 表达水平, 并比对 *Hox* 在团头鲂和斑马鱼肌肉中的表达差异。

1.5 *Hox* 基因家族的表达分析

利用本课题组前期研究已发表的团头鲂的 3 个不同胚胎时期及 6 月龄团头鲂的肌肉、肌间刺及肌肉周围结缔组织的转录组测序结果 (PRJNA343584)^[18], 将获得的 clean reads 与团头鲂参考基因组 (<http://gigadb.org/dataset/100305>) 进行比对, 通过计算 FPKM 值绘制聚类热图并分析 *Hox* 表达水平, 并比较 *Hox* 在不同胚胎发育时期及不同组织中的表达差异。

2 结果

2.1 团头鲂 *Hox* 基因家族成员的鉴定与基因簇比较分析

在团头鲂基因组中共鉴定出 49 个 *Hox* 基因家族成员 (图 1)。根据团头鲂 *Hox* 基因簇中的基因的位置, 按 3'端至 5'端的顺序分别命名为 *HoxAa* 基因簇: *HoxA1a*、*HoxA2a*、*HoxA3a*、*HoxA4a*、*HoxA5a*、*HoxA9a*、*HoxA11a* 和 *HoxA13a*;

HoxAb 基因簇: *HoxA2b*、*HoxA9b*、*HoxA10b*、*HoxA11b* 和 *HoxA13b*。*HoxBa* 基因簇: *HoxB1a*、*HoxB2a*、*HoxB3a*、*HoxB4a*、*HoxB5a*、*HoxB6a*、*HoxB7a*、*HoxB8a*、*HoxB9a*、*HoxB10a* 和 *HoxB13a*;*HoxBb* 基因簇: *HoxB1b*、*HoxB5b* 和 *HoxB8b*。*HoxCa* 基因簇: *HoxC1a*、*HoxC3a*、*HoxC4a*、*HoxC5a*、*HoxC6a*、*HoxC8a*、*HoxC9a*、*HoxC10a*、*HoxC11a*、*HoxC12a* 和 *HoxC13a*;*HoxCb* 基因簇: *HoxC6b*、*HoxC11b*、*HoxC12b* 和 *HoxC13b*;*HoxDa* 基因簇: *HoxD3a*、*HoxD4a*、*HoxD9a*、*HoxD10a*、*HoxD11a*、*HoxD12a* 和 *HoxD13a*。之后利用相同方法, 在斑马鱼、大西洋鳕和半滑舌鳎基因组分别鉴定 *Hox* 基因家族。鉴定结果显示, 斑马鱼具有 49 个 *Hox* 基因家族成员, 大西洋鳕和半滑舌鳎各具有 43 个 *Hox* 基因家族成员。通过比较 4 种鱼的 *Hox* 基因家族发现, 团头鲂和斑马鱼的 *Hox* 类型和分布最为类似, 并且都缺失 *HoxDb* 基因簇; 大西洋鳕和半滑舌鳎 *Hox* 的类型和分布类似, 且都缺失 *HoxCb* 基因簇(图 1)。

2.2 团头鲂 *Hox* 基因家族的染色体定位分析

基于团头鲂的基因组数据, 提取团头鲂 49 个 *Hox* 基因的定位信息, 进行染色体定位。结果显示, 49 个 *Hox* 不均匀的分布在团头鲂 5 条

染色体和 2 条重叠群拼接组装的长序列片段 (scaffold) 上。其中, 1 号染色体和第 24 号染色体分布的基因数目最多, 各为 11 个; 分布在 3 号染色体上的基因数目最少, 共 5 个(图 2)。

2.3 团头鲂 *Hox* 基因家族系统进化分析

根据聚类结果, 团头鲂 *Hox* 分支成 5 个亚类, 分别命名为 Group A、Group B、Group C、Group D 和 Group E。其中, Group B 中团头鲂 *Hox* 成员最多, 为 18 个, 其次是 Group E 亚组, 有 15 个, Group D 亚组有 11 个, Group C 亚组有 3 个, Group A 最少, 有 2 个。根据聚类结果显示, 团头鲂的 *Hox* 最先与斑马鱼聚为一支, 之后和大西洋鳕聚为一支, 最后和半滑舌鳎聚为一支(图 3)。

2.4 团头鲂和斑马鱼 *Hox* 基因家族在肌肉中的表达模式比较

研究结果显示, *Hox* 在团头鲂和斑马鱼肌肉中的表达存在明显差异。在 *HoxA* 基因簇中, *HoxA10b*、*HoxA3a*、*HoxA2a* 和 *HoxA1a* 在团头鲂肌肉中高表达, 表达量高于斑马鱼; *HoxA13a* 和 *HoxA13b* 在团头鲂和斑马鱼肌肉中均不表达(图 4-a); *HoxB* 基因簇中, *HoxB10a*、*HoxB9a* 和 *HoxB7a* 在

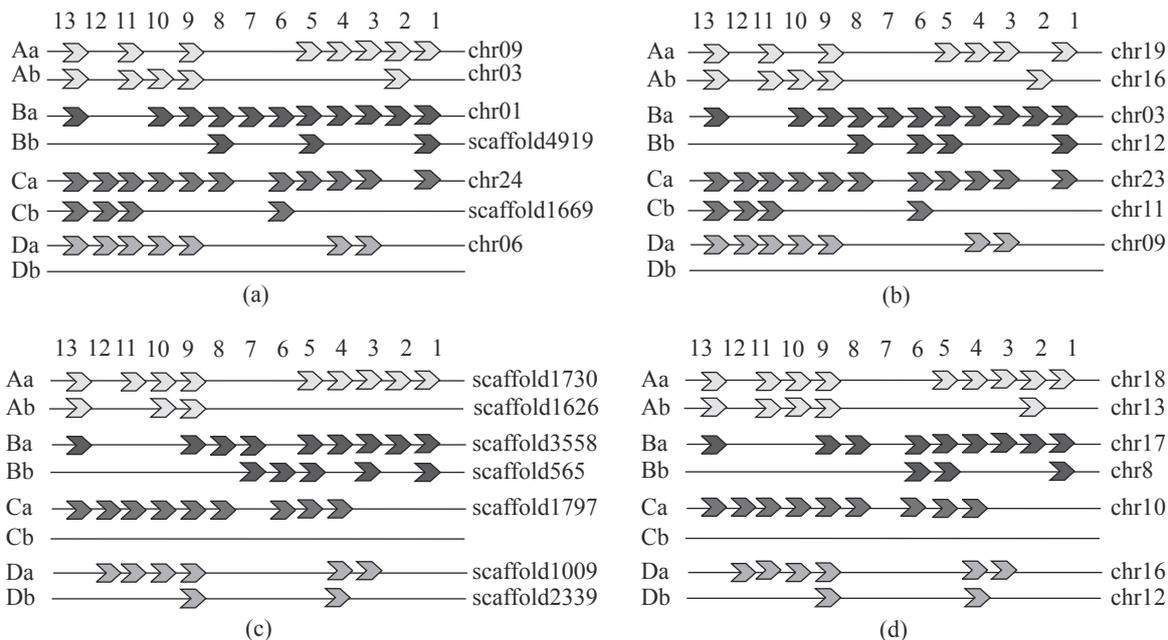


图 1 团头鲂 (a)、斑马鱼 (b)、大西洋鳕 (c) 和半滑舌鳎 (d) 基因组 *Hox* 基因簇的比较分析

Fig. 1 Comparative analysis of *Hox* clusters among *M. amblycephala* (a), *D. rerio* (b), *G. morhua* (c) and *C. semilaervis* (d) genome

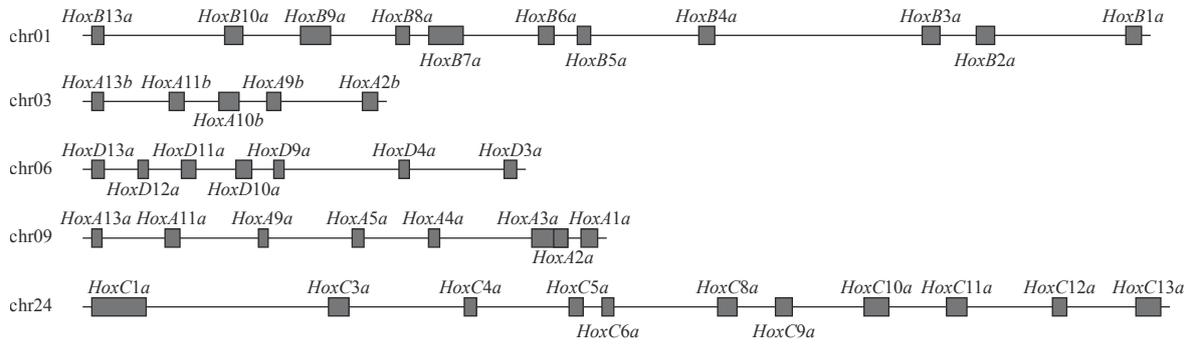


图 2 49 个团头鲂 *Hox* 在团头鲂染色体中的位置分布

Fig. 2 Position of *M. amblycephala* *Hox* clusters in the chromosomes

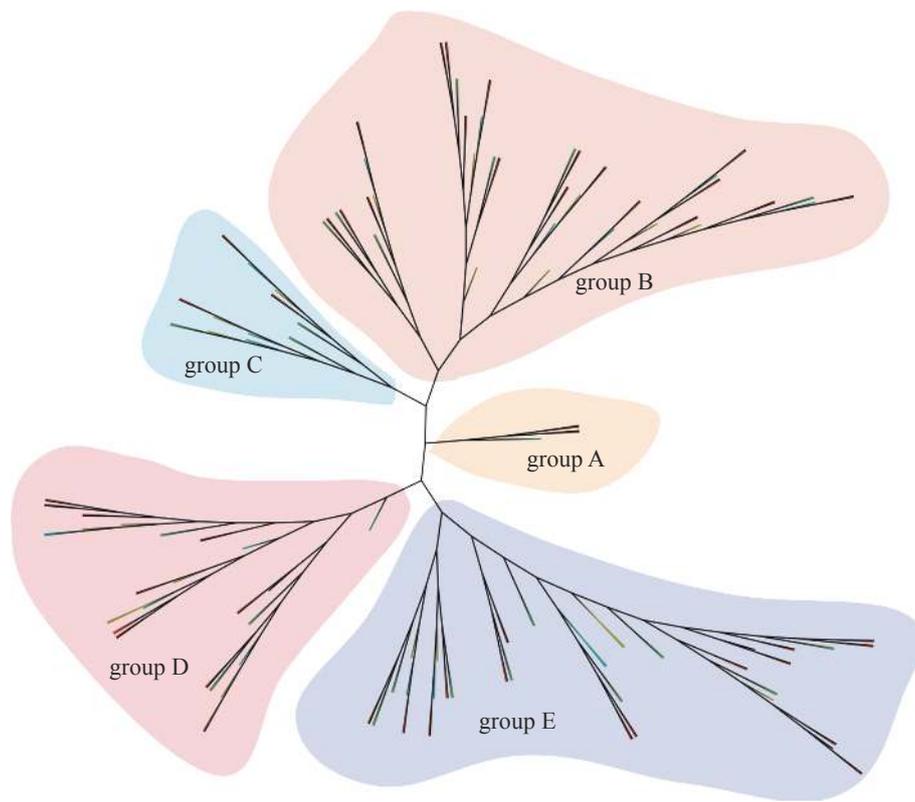


图 3 团头鲂 *Hox* 基因家族成员的系统发育树

不同颜色代表不同物种的 *Hox*: 黑色. 斑马鱼, 蓝色. 大西洋鳕, 绿色. 半滑舌鲷, 红色. 团头鲂

Fig. 3 The phylogenetic trees of the *Hox* gene family of *M. amblycephala*

Different colors represent *Hox* genes of different species; black. *D. rerio*, blue. *G. morhua*, green. *C. semilaevis*, red. *M. amblycephala*

团头鲂肌肉组织高表达, 而在斑马鱼肌肉组织高表达的有 *HoxB9a*、*HoxB8a*、*HoxB7a* 和 *HoxB6a* (图 4-b); *HoxB9a* 和 *HoxB7a* 在团头鲂肌肉组织中的表达量高于斑马鱼, *HoxB1a* 和 *HoxB5a* 在肌肉组织表达量极低; 在 *HoxC* 基因簇中, *HoxC9a*、*HoxC2a*、*HoxC3a* 和 *HoxC6b* 在团头鲂肌肉组织高表达, *HoxC8a* 和 *HoxC3a* 在斑马鱼肌肉组织

高表达, *HoxC13a*、*HoxC12a*、*HoxC11a*、*HoxC4a*、*HoxC1a*、*HoxC13b*、*HoxC12b* 及 *HoxC11b* 在 2 种鱼的肌肉组织中表达量极低甚至不表达(图 4-c); 在 *HoxD* 基因簇中, *HoxD10a*、*HoxD9a* 和 *HoxD3a* 在团头鲂肌肉组织高表达, *HoxD9a* 在斑马鱼肌肉组织高表达, *HoxD13a*、*HoxD12a* 和 *HoxD11a* 在团头鲂肌肉组织中不表达, *HoxD13a* 在斑马鱼

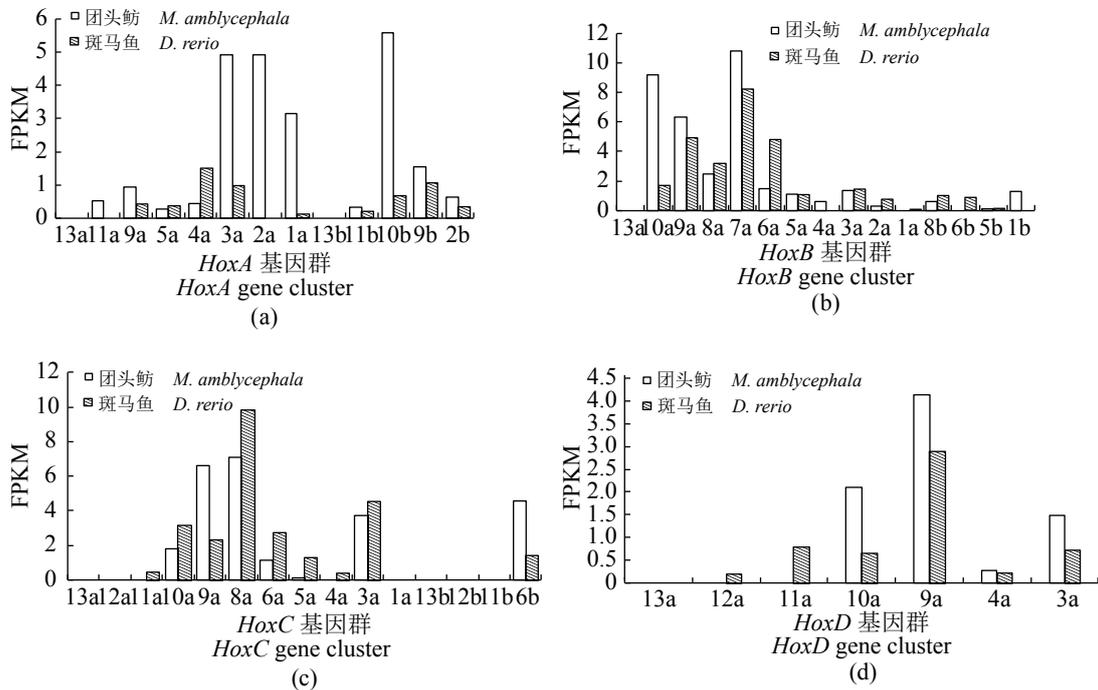


图4 团头鲂和斑马鱼 *HoxA* (a)、*HoxB* (b)、*HoxC* (c) 和 *HoxD* (d) 基因群在其肌肉组织中的表达模式

Fig. 4 Comparison of temporal expression patterns of *HoxA* (a), *HoxB* (b), *HoxC* (c) and *HoxD* (d) gene clusters in the muscle tissues of *M. amblycephala* and *D. rerio*

肌肉组织不表达(图4-d)。

2.5 团头鲂 *Hox* 基因家族在胚胎发育不同阶段及不同组织中的表达分析

研究结果显示,团头鲂 *Hox* 基因家族成员在3个组织和3个胚胎时期均有不同的表达模式,并且不同基因簇在不同组织和胚胎发育早期表达模式明显不同(图5)。根据表达热图, *HoxB7a* 在3个组织和3个胚胎时期中均有表达,且表达量最高。*HoxA13a*、*HoxA13b*、*HoxA2b*、*HoxA11a*、*HoxA9a*、*HoxA9b* 和 *HoxB8b*、*HoxB2a*、*HoxB13a*、*HoxB1a* 和 *HoxC1a*、*HoxC5a*、*HoxC6a*、*HoxC11b*、*HoxC13a*、*HoxC13b*、*HoxC12b* 以及 *HoxD4a*、*HoxD13a* 和 *HoxD12a* 共20个基因在3个组织和3个胚胎时期中表达量较低或不表达。在胚胎S1时期, *HoxA2a*、*HoxA3a*、*HoxB9a*、*HoxB3a*、*HoxB8a*、*HoxB1b*、*HoxB5a*、*HoxB5b*、*HoxC3a*、*HoxC4a* 及 *HoxD4a* 表达量较高。在胚胎S2时期, *HoxA2a*、*HoxA3a*、*HoxB7a*、*HoxC3a*、*HoxC10a*、*HoxC11a*、*HoxC12a*、*HoxC6b*、*HoxD9a*、*HoxD10a* 和 *HoxD11a* 表达量较高。在胚胎S3时期, *HoxB7a*、*HoxB10a*、*HoxB9a*、*HoxC3a*、*HoxC8a* 及 *HoxD9a* 表达量较高。6月龄团头鲂的肌肉、肌间刺和结缔组织表达结果显示,

HoxB7a、*HoxB10a*、*HoxB9a*、*HoxC3a* 及 *HoxC8a* 表达量高; *HoxD9a* 在结缔组织中表达,其他基因在3种组织中表达量很低或不表达。

3 讨论

目前国内外学者已在黑腹果蝇、家蚕 (*Bombyx mori*)^[19]、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)^[20]、红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*)^[21]、鲑科 (Salmonidae) 鱼类^[22] 等多个物种对 *Hox* 进行不同领域的研究。很多研究结果显示, *Hox* 在脊椎动物肢体形成过程中起重要作用^[23]。为了探究团头鲂 *Hox* 的分布与进化,以及可能调控团头鲂肌肉和肌间刺形成的 *Hox* 种类,本研究基于团头鲂的全基因组数据,结合生物信息学分析方法对其 *Hox* 基因家族进行鉴定、进化及表达模式分析。

在团头鲂基因组共鉴定出49个 *Hox*, 分布在7个聚类中,其中包括一个伪基因 *HoxA9b*。研究发现, *HoxA9b* 在斑马鱼中起作用,但在团头鲂中仅作为伪基因存在,并无实际的功能^[23]。49个基因不均匀地分布在7个聚类中, *Aa* 聚类中有8个,在 *Ab* 中有5个,在 *Ba* 聚类中有10个,在 *Bb* 聚类中有4个,在 *Ca* 中有11个,在 *Cb* 中

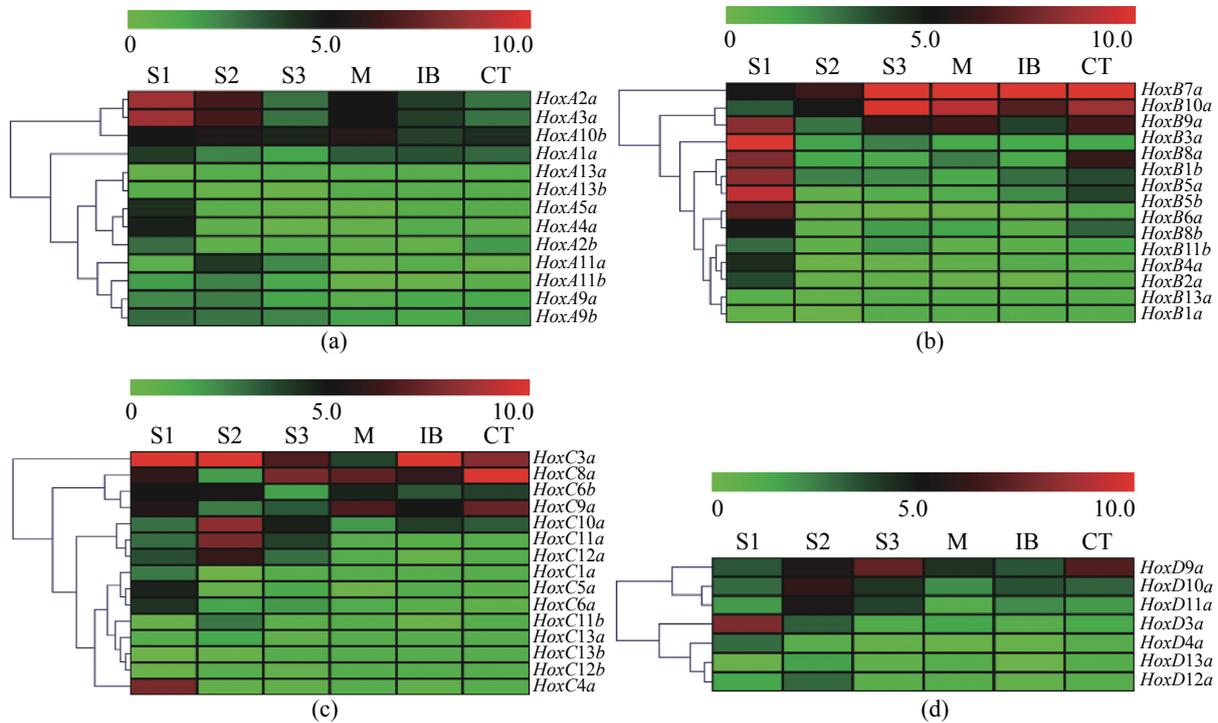


图5 团头鲂 49 个 *Hox* 在胚胎发育不同阶段及不同组织中的表达模式

(a) *HoxA* 基因簇, (b) *HoxB* 基因簇, (c) *HoxC* 基因簇, (d) *HoxD* 基因簇; S1(第1阶段: 幼鱼), S2(第2阶段: 躯干肌肉有部分肌间刺的团头鲂), S3(第3阶段: 躯干肌肉完成发育, 有完整的肌间刺的团头鲂), M(6月龄的团头鲂的背部白色肌肉), IB(6月龄的团头鲂的肌间刺), CT(6月龄的团头鲂结缔组织)

Fig. 5 Temporal expression pattern for 49 *Hox* genes in *M. amblycephala*

(a) *HoxA* cluster, (b) *HoxB* cluster, (c) *HoxC* cluster, (d) *HoxD* cluster; S1 (stage 1-juvenile), S2 (stage 2-*M. amblycephala* with partial intermuscular spiny trunk muscles), S3 (stage 3-*M. amblycephala* with complete intermuscular spiny muscles), M (the white muscles of the back of 6-month-old *M. amblycephala*), IB (the intermuscular bones of 6-month-old *M. amblycephala*), CT (the connective tissue of 6-month-old *M. amblycephala*)

有 4 个, 在 *Da* 聚类中有 7 个。同样方法在斑马鱼、大西洋鳕和半滑舌鳎基因组鉴定 *Hox*, 之后将 4 种鱼的 *Hox* 基因簇进行比较分析发现, 团头鲂和斑马鱼 *Hox* 基因家族的基因数量及基因簇的数量、类型一致, 具有 7 个基因簇且都丢失 *HoxDb* 基因簇。大西洋鳕和半滑舌鳎 *Hox* 基因家族的基因数量与团头鲂 *Hox* 基因家族相比较少, 但基因数量以及基因簇的数量、类型一致, 具有 7 个基因簇且都丢失 *HoxCb* 基因簇。团头鲂与斑马鱼相比少一个 *HoxA2a*, 多一个 *HoxB5b*, 推测团头鲂与斑马鱼的亲缘关系较近, 这与进化树分析结果一致。此外, 在团头鲂的 *HoxAa* 基因簇中未发现 *HoxA7a* 和 *HoxA10a*, 而这些基因在斑马鱼的 *HoxAa* 基因簇中同样也缺失或无功能^[24]; 与斑马鱼相似, 团头鲂也呈现出几乎完整的 *HoxBa* 基因簇。在比较分析的过程中, 还发现了一个有趣的现象, 即这 4 种鱼的 *Hox* 类型和基因簇都存在缺失, 根据二级进化学说推测

原因, 可能是在鱼类进化过程中存在着多次全基因加倍现象^[12], 导致 *Hox* 基因和 *Hox* 基因簇的数目也随之加倍, 其中一些功能冗余的基因以及整个基因簇会在进化过程中选择性丢失。通过研究发现, 在团头鲂与斑马鱼、大西洋鳕与半滑舌鳎 2 个谱系中, *HoxAa*、*HoxAb*、*HoxBa* 和 *HoxBb* 基因簇的基因差异率都较小, 分析可能原因是 *HoxA* 和 *HoxB* 复制拷贝发生在谱系分化之前, 这也说明 *Hox* 的丢失并不是随机产生的^[24]。

通过对 *Hox* 染色体定位, 发现团头鲂 *Hox* 基因家族同一个基因簇的基因分布在同一条染色体上, 不同基因簇上的基因数目和种类存在差异。有研究表明, 在一定的表达范围内, 异簇同源平行基因具有相同或类似的功能。即一个 *Hox* 可以部分或全部替代平行同源基因的功能。如研究者 Suemori 等^[25]在对缺失整簇 *HoxC* 的小鼠动物模型中研究发现, 一簇 *Hox* 就能完成调控整个胚胎发育过程。从定位图还观察到

分布在1号染色体上的 *HoxB7a* 不存在等位基因,说明团头鲂第7同源组没有平行同源基因。进一步与斑马鱼的 *Hox* 分布比较发现,分布缺失一致,推测团头鲂的 *HoxB7a* 功能与斑马鱼相同^[26],对团头鲂的整个 *Hox* 基因家族起调控作用。

聚类结果显示,团头鲂的 *Hox* 分为5个亚家族,其中 Group B 亚组拥有最多的 *Hox* 基因家族成员,为第13、12、11和10旁系的平行同源组。4种鱼 *Hox* 基因家族系统进化结果显示,相邻的 *Hox* 间先聚为一类,再与相隔的基因聚起,这与 *Hox* 来自于同一祖先的假设相符。此外,进化发育树结果显示,4种鱼类中斑马鱼首先分出一支,其与团头鲂最先聚为一支,表明亲缘关系最近,之后与大西洋鳕聚为一支,最后与半滑舌鳎聚为一支。

通过表达模式分析可为一些未知功能基因及基因预测奠定基础。本研究结果显示, *Hox* 在2种鱼的表达水平和表达模式不同,表明 *Hox* 在不同物种的相同组织表达存在差异。大部分 *Hox* 基因在团头鲂和斑马鱼肌肉组织均有表达,表明 *Hox* 在肌肉发育过程中起着重要的调节作用。Schwörer 等^[27]发现,小鼠 *Hox* 基因家族中的 *Hoxa9* 在老年时期会被重新启动, *Hoxa9* 会限制肌肉干细胞的功能从而导致骨骼肌的再生能力下降,因此对其抑制激活或 *Hoxa9* 的缺失可改善老年小鼠肌肉的再生水平。

根据转录组数据的聚类热图显示,团头鲂不同胚胎阶段、不同组织中 *Hox* 表达模式明显不同。多数 *Hox* 只在特定的胚胎时期表达而在其他组织和时期表达较低或不表达,表明这些基因在不同胚胎时期可能存在特异性表达。*HoxB7a* 在3个胚胎时期和3个组织均有表达,与其他学者在斑马鱼中的研究一致,即 *HoxB7a* 可能在整个 *Hox* 基因簇中起着重要的调控作用^[25];鱼类肌间刺的形成普遍认为是系统发育和生物力学决定的^[27],而 *Hox* 是系统发育及生物形成的调控指挥中心,其他学者通过对斑马鱼进行肌间刺分子水平研究,筛选出2个关键基因家族,即 *bmps* 和 *Col* 基因家族^[28],然而对 *Hox* 基因家族在肌间刺形成过程的研究很少。本研究在团头鲂肌肉、肌间刺和结缔组织的表达模式分析中发现, *HoxB7a*、*HoxB10a*、*HoxC3a*、*HoxC8a* 和 *HoxD9a* 等5个基因均表达,表明这5个基因

可能与团头鲂肌间刺发育形成有关,其表达模式与本课题组前期发表的结果一致^[17]。综上所述, *Hox* 在团头鲂早期胚胎时期和肌间刺的形成中有表达,提示团头鲂肌间刺的形成可能受 *Hox* 基因家族调控。虽然我们得到部分 *Hox* 基因确实在团头鲂肌间刺形成过程中有调控作用,但具体的调控模式以及信号通路还需进一步研究。

总之,本研究为进一步探究团头鲂 *Hox* 基因家族功能奠定基础,也为其他鱼类 *Hox* 研究提供参考数据,以期可以在不同鱼类之间进行 *Hox* 的分析比较。此外通过研究团头鲂肌间刺形成过程中 *Hox* 所起的作用,也为其他硬骨鱼类肌间刺的研究奠定了基础,以期实现无肌间刺、味道鲜美的鱼来到我们的餐桌之上。

参考文献 (References):

- [1] 李慧,花保祯. *Hox*基因及其进化机制的研究进展[J]. 动物学杂志, 2011, 46(1): 136-142.
Li H, Hua B Z. *Hox* genes and their evolutionary mechanisms[J]. Chinese Journal of Zoology, 2011, 46(1): 136-142(in Chinese).
- [2] Lewis E B. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*[J]. *Nature*, 1978, 276(5688): 565-570.
- [3] 李慧. 果蝇 *Hox* 基因系统进化关系分析 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2011.
Li H. The phylogenetic analysis of *Drosophila melanogaster Hox* genes[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2011 (in Chinese).
- [4] Vollbrecht E, Veit B, Sinha N, et al. The developmental gene *Knotted-1* is a member of a maize homeobox gene family[J]. *Nature*, 1991, 350(6315): 241-243.
- [5] Kappen C. The homeodomain: an ancient evolutionary motif in animals and plants[J]. *Computers & Chemistry*, 2000, 24(1): 95-103.
- [6] Gehring W J, Affolter M, Burglin T. Homeodomain proteins[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1994, 63: 487-526.
- [7] Derelle R, Lopez P, Le Guyader H, et al. Homeodomain proteins belong to the ancestral molecular toolkit of eukaryotes[J]. *Evolution & Development*, 2007, 9(3): 212-219.
- [8] 耿波,孙效文. 鱼类 *Hox* 基因簇结构、表达和进化方面研究进展[J]. 水产学报, 2012, 25(4): 60-64, 68.
Geng B, Sun X W. A review of composition, expression, and evolution in fish *Hox* gene cluster[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2012, 25(4): 60-64, 68(in Chinese).

- [9] Santini S, Boore J L, Meyer A. Evolutionary conservation of regulatory elements in vertebrate *Hox* gene clusters[J]. *Genome Research*, 2003, 13(6A): 1111-1122.
- [10] 辛明. 文昌鱼——进化的模式动物[J]. *生命科学仪器*, 2009, 8(2): 19-22.
Xin M. Amphioxus as evolutionary model animal[J]. *Life Science Instruments*, 2009, 8(2): 19-22(in Chinese).
- [11] Matsunami M, Sumiyama K, Saitou N. Evolution of conserved non-coding sequences within the vertebrate *Hox* clusters through the two-round whole genome duplications revealed by phylogenetic footprinting analysis[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2010, 71(5-6): 427-436.
- [12] Soshnikova N, Dewaele R, Janvier P, *et al.* Duplications of *Hox* gene clusters and the emergence of vertebrates[J]. *Developmental Biology*, 2013, 378(2): 194-199.
- [13] 王师, 杨志辉, 李语丽, 等. *Hox*基因及其在软体动物中的研究进展[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2017, 47(8): 23-30.
Wang S, Yang Z H, Li Y L., *et al.* *Hox* genes and their research progresses in molluscs[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2017, 47(8): 23-30(in Chinese).
- [14] Krumlauf R. *Hox* genes in vertebrate development[J]. *Cell*, 1994, 78(2): 191-201.
- [15] Greer J M, Puetz J, Thomas K R, *et al.* Maintenance of functional equivalence during paralogous *Hox* gene evolution[J]. *Nature*, 2000, 403(6770): 661-665.
- [16] Yu M, Zhan J, Zhang H Q. HOX family transcription factors: related signaling pathways and post-translational modifications in cancer[J]. *Cellular Signalling*, 2020, 66: 109469.
- [17] 曾聪. 团头鲂生长相关性状的形态和遗传分析 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2012.
Zeng C. Morphological and genetic analysis of the growth traits of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2012 (in Chinese).
- [18] Liu H, Chen C H, Gao Z X, *et al.* The draft genome of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) reveals the development of intermuscular bone and adaptation to herbivorous diet[J]. *GigaScience*, 2017, 6(7): 1-13.
- [19] 童晓玲, 代方银, 陈鹏, 等. *Hox* 基因调控家蚕体型模式的分子机制 [C]//中国遗传学会第九次全国会员代表大会暨学术研讨会论文集. 哈尔滨: 中国遗传学会, 2013: 303.
Tong X L, Dai F Y, Chen P, *et al.* The molecular mechanism of *Hox* genes regulating the body pattern in *Bombyx mori*[C]. Harbin: Chinese Society of Genetics, 2013: 303 (in Chinese).
- [20] 孙晓晴. 凡纳滨对虾 *Hox* 基因结构和表达的初步研究 [D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2015.
Sun X Q. The primary structure and expression study of *Hox* genes in pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2015 (in Chinese).
- [21] Amores A, Suzuki T, Yan Y L, *et al.* Developmental roles of pufferfish *Hox* clusters and genome evolution in ray-fin fish[J]. *Genome Research*, 2004, 14(1): 1-10.
- [22] Moghadam H K, Ferguson M M, Danzmann R G. Evolution of *Hox* clusters in Salmonidae: a comparative analysis between Atlantic Salmon (*Salmo salar*) and Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2005, 61(5): 636-649.
- [23] Zakany J, Duboule D. The role of *Hox* genes during vertebrate limb development[J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2007, 17(4): 359-366.
- [24] Zou S M, Jiang X Y, He Z Z, *et al.* *Hox* gene clusters in blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala* and comparison with those of zebrafish, fugu and medaka genomes[J]. *Gene*, 2007, 400(1-2): 60-70.
- [25] Suemori H, Noguchi S. *Hox C* cluster genes are dispensable for overall body plan of mouse embryonic development[J]. *Developmental Biology*, 2000, 220(2): 333-342.
- [26] 孟祥丽, 白金尊, 张绪帅, 等. 斑马鱼 *Hoxb7a* 基因在 *Hox* 基因簇中的作用研究[J]. *生物学杂志*, 2019, 36(5): 11-15.
Meng X L, Bai J Z, Zhang X S, *et al.* The function study of *hoxb7 a* in *hox* clusters in zebrafish[J]. *Journal of Biology*, 2019, 36(5): 11-15(in Chinese).
- [27] Schwörer S, Becker F, Feller C, *et al.* Epigenetic stress responses induce muscle stem-cell ageing by *Hoxa9* developmental signals[J]. *Nature*, 2016, 540(7633): 428-432.
- [28] 张绪. 基于斑马鱼肌间刺发育时间点的转录组分析探究其发育调控关键基因 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2019.
Zhang X. Transcriptome analysis of different developmental stages to explore the key intermuscular bone development[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019 (in Chinese).

Identification, evolution and expression pattern of *Hox* gene family in *Megalobrama amblycephala*

LIU Ning, HUANG Xin, LIU Han*, WANG Weimin

(Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: *Hox* gene clusters play an important role in the early embryonic development, tissue differentiation and morphogenesis in animals. *Megalobrama amblycephala*, also known as Wuchang fish, is an economically important freshwater fish and widely distributed in lakes in the middle and lower reaches of the Yangtze River in China. In order to explore the *Hox* distribution, evolution and expression patterns in *M. amblycephala*, we conducted a series of analyses based on the whole genome *M. amblycephala*. In the present study, we identified all the *Hox* clusters of *M. amblycephala* from the whole genome data. Combined with the multiple methods, we analyzed chromosome distribution and constructed the *Hox* phylogenetic tree based on protein sequences. In addition, the expression patterns of *Hox* in different tissues were further investigated by calculating the number of transcriptional fragments (FPKM). The results showed that 49 *Hox* genes were identified in the genome of *M. amblycephala*, and were divided into 7 groups: *HoxAa*, *HoxAb*, *HoxBa*, *HoxBb*, *HoxCa*, *HoxCb* and *HoxDa*. Transcriptome results indicated that *M. amblycephala* *Hox* gene family had different expression patterns. There were significant differences in the expression level of all *Hox* genes in the muscle of *M. amblycephala* and *Danio rerio*, while the expression pattern was similar. In the *HoxA* cluster, *HoxA10b*, *HoxA3a*, *HoxA2a* and *HoxA1a* were highly expressed in the muscles of *M. amblycephala*, and the expression level was higher than that of *D. rerio*; *HoxA13a* and *HoxA13b* are not expressed in the muscle of both of fishes; In the *HoxB* cluster, *HoxB10a*, *HoxB9a* and *HoxB7a* were highly expressed in muscle tissue of *M. amblycephala*, while *HoxB9a*, *HoxB8a*, *HoxB7a* and *HoxB6a* were highly expressed in muscle tissue of *D. rerio*. In the *HoxC* cluster, *HoxC9a*, *HoxC2a*, *HoxC3a* and *HoxC6b* are highly expressed in muscle tissue of *M. amblycephala* and *HoxC8a* and *HoxC3a* are highly expressed in *D. rerio*, while *HoxC13a*, *HoxC12a*, *HoxC11a*, *HoxC4a*, *HoxC1a*, *HoxC13b*, *HoxC12b* and *HoxC11b* are very low or even not expressed in muscle tissue of the two fish species; In the *HoxD* cluster, *HoxD10a*, *HoxD9a* and *HoxD3a* are highly expressed in muscle tissue of *M. amblycephala* and *HoxD9a* is highly expressed in *D. rerio*, while the expression levels of *HoxD13a*, *HoxD12a* and *HoxD11a* are not expressed in muscle tissue of *M. amblycephala* and *HoxD13a* is not expressed in muscle tissue of *D. rerio*. In addition, comparative transcriptome analysis of three embryonic stages and three tissues of *M. amblycephala* indicated that *HoxA2a*, *HoxA3a*, *HoxB9a*, *HoxB3a*, *HoxB8a*, *HoxB1b*, *HoxB5a*, *HoxB5b*, *HoxC3a* and *HoxC4a* were highly expressed at the juvenile fish, while others showed low or even no expression in muscle, intermuscular bone and connective tissues except *HoxB7a*, *HoxB10a* and *HoxB9a*, *HoxC3a* and *HoxC8a*. In the *HoxD* family, *HoxD9a*, *HoxD10a* and *HoxD11a* were expressed in the stage II of embryo. Taken together, these results may lay the foundation for further exploring the function of the *Hox* gene family of *M. amblycephala*, and may also provide reference data for other fish *Hox* studies. In addition, studying the expression patterns of *Hox* in the formation of intermuscular bone of *M. amblycephala* also provides reference and theoretical basis for the study of intermuscular bone in other bony fishes.

Key words: *Megalobrama amblycephala*; *Hox* gene family; genetic identification; expression analysis

Corresponding author: LIU Han. E-mail: liuhan@mail.hzau.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31702315); China Agriculture Research System (CARS-45-08)