



蓝色七彩神仙鱼虹彩细胞呈色相关基因的发掘

李中军^{1,2,3}, 温彬^{1,2,3,4*}, 马腾飞^{1,2,3}, 刘鑫^{1,2,3},
高建忠^{1,2,3,4}, 陈再忠^{1,2,3,4*}

- (1. 上海海洋大学, 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306;
2. 上海海洋大学, 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;
3. 上海海洋大学, 上海水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306;
4. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

摘要: 为发掘蓝色体色中与虹彩细胞呈色相关的基因, 实验选取全蓝、白化全蓝七彩神仙鱼分别与全白七彩神仙鱼的皮肤组织, 进行比较转录组学分析。结果显示, 全蓝与全白七彩神仙鱼皮肤组织转录组序列比对, 共有 2 192 个差异表达基因 (DEGs), 其中 1 270 个基因上调, 922 个基因下调, DEGs 主要富集至嘌呤核苷酸生物合成过程、肌动蛋白结构组织、嘌呤化合物生物合成过程、氧化磷酸化和柠檬酸循环等代谢通路。白化全蓝与全白七彩神仙鱼转录组序列比对结果显示, 共有 3 168 个 DEGs, 其中 1 859 个基因上调, 1 309 个基因下调, 主要富集在氧化磷酸化、核糖核苷二磷酸代谢过程、ADP 代谢过程、阳离子结合和甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢等通路。为进一步发掘与虹彩细胞呈色相关的候选基因, 通过数据库比对分析, 在全蓝与全白七彩神仙鱼筛选出 32 个 DEGs, 在白化全蓝与全白七彩神仙鱼筛选出 38 个 DEGs, 其中 *alkal2b*、*gpnmb*、*fhl2*、*pka* 与虹彩细胞发育相关, *pgam*、*prtfdc1*、*pnp*、*slc23a1*、*slc2a9*、*rab38*、*rdh10*、*psat1*、*paics* 与虹彩细胞中鸟嘌呤合成及运输相关。本研究为深入解析鱼类蓝色结构色的形成和调控机制奠定基础。

关键词: 鱼类; 虹彩细胞; 结构色; 蓝色

中图分类号: Q 781; S 965.8

文献标志码: A

体色作为脊椎动物最主要的表型之一, 在其生命过程中发挥着重要的适应性功能^[1]。鱼类体色主要由皮肤色素细胞迁移堆积形成, 包括黑色素细胞、黄色素细胞、红色素细胞、白色素细胞、虹彩细胞和蓝色素细胞^[2-4]。鱼类体色着色类型分为色素色和结构色, 以及 2 种类型的结合^[5]。色素色由胞内色素颗粒对特定波长的入射光选择性吸收形成, 例如黑色素细胞内黑色素、黄色素与红色素细胞内类胡萝卜素^[6]。结构色则是由胞内物对光线干涉和散射形成, 例如虹彩细胞内鸟嘌呤

晶体使鱼体呈现银色、蓝色或金属色泽^[7-9]。

七彩神仙鱼 (*Symphysodon haraldi*) 属鲈形目 (Perciformes) 慈鲷科 (Cichlidae) 盘丽鱼属 (*Symphysodon*), 原产于亚马孙河流域, 体色艳丽, 姿态优美, 有“热带观赏鱼之王”美称^[10-12]。七彩神仙鱼有 3 个野生种, 经人工培育已衍生出几十种体色各异的品种^[13], 成为研究体色形成的良好模型。宋雪璐^[14]发现虾青素、叶黄素和牛磺胆酸钠可显著改善七彩神仙鱼红黄色体色。王磊等^[15]发现饵料中添加雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 可提

收稿日期: 2022-01-02 修回日期: 2022-04-18

资助项目: 上海市自然科学基金 (20ZR1423600); 上海扬帆人才计划 (19YF1419400)

第一作者: 李中军 (照片), 从事观赏鱼养殖研究, E-mail: 956276524@qq.com

通信作者: 温彬, 从事观赏鱼类品质性状形成与调控研究, E-mail: bwen@shou.edu.cn;

陈再忠, 从事水生动物繁殖生物学、观赏鱼养殖研究, E-mail: chenzz@shou.edu.cn



高七彩神仙鱼皮肤虾青素含量。蓝色体色主要与虹彩细胞分布相关, 其增殖、扩散和形态转变在蓝色形成中起着重要作用^[16-18]。关于鱼类虹彩细胞呈色相关基因的研究较少。Salis 等^[19]通过对不同颜色眼斑双锯鱼 (*Amphiprion ocellaris*) (俗称小丑鱼) 皮肤组织进行转录组分析, 发现 *apod1a*、*gpnmb*、*fh12a* 和 *fh12b* 与虹彩细胞发育相关。Bian 等^[20]发现, *hprt*、*eno*、*aldo*、*pgam1* 和 *gart* 可能参与大颚细锯脂鲤 (*Pristella maxillaris*) 虹彩细胞增殖分化进而影响皮肤透明度。本实验采用 3 种纯色七彩神仙鱼 (全蓝、白化全蓝、全白) 为研究模式系统进行比较转录组分析, 挖掘蓝色体色形成中虹彩细胞呈色相关基因, 为鱼类蓝色结构色的形成和调控研究提供基础。

1 材料与方 法

1.1 实验用鱼与样品采集

实验所用全蓝七彩神仙鱼 (由野生七彩突变选育, 体呈深蓝色)、白化全蓝七彩神仙鱼 (由全蓝七彩自交选育, 瞳孔为红色, 体呈浅蓝绿色) 和全白七彩神仙鱼 (由野生七彩突变选育, 体呈透明白色) 均可稳定遗传 (图 1)。实验鱼 1 龄, 体型体色发育良好, 全长 8~10 cm, 来自上海海洋大学观赏水族良种培育与健康养殖实验室。根据体色各选取 10 尾饲养至不同鱼缸, 饲养期间保持稳定养殖条件, 水温 28 °C, 溶解氧 7 mg/L 以上, pH 6.2~6.8, 光照 12 L:12 D。每天以牛心汉堡喂食 3 次, 三分之一换水量, 喂养 1 个月。

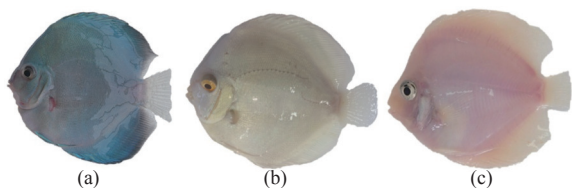


图 1 全蓝七彩神仙鱼 (a)、白化全蓝七彩神仙鱼 (b) 和全白七彩神仙鱼 (c)

Fig. 1 Blue (a), albino blue (b) and white (c) discus fish

采样前 24 h 停食, 随机取不同体色七彩神仙鱼各 3 尾, 经 MS-222 麻醉, 无菌低温采集鱼体中间侧线部位的皮肤组织用于透射电镜观察分析, 另取一部分皮肤组织冷冻保存于 -80 °C 用于 RNA 提取分析。

1.2 透射电镜观察

将皮肤 (约 1 mm³) 置于 2.5% 戊二醛固定液,

4 °C 过夜。磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 浸泡清洗 3 次, 每次 15 min; 2% 磷钨酸固定 3 h 后, 再次清洗 3 次; 30%~100% 丙酮相继脱水处理, 之后环氧丙烷置换 10 min, 最后 Epon812 环氧树脂包埋。使用切片机 (Leica EM KMR3) 切片, 3% 醋酸铀-枸橼酸铅染色, 置于透射电子显微镜观察分析。

1.3 RNA 提取

采用 TRIzol 试剂 (Invitrogen, 美国) 提取皮肤总 RNA, 通过 DNase I (TaKaRa) 去除基因组 DNA, 利用琼脂糖凝胶电泳、Qubit 3.0 荧光计和安捷伦 4150 TapeStation 系统对 RNA 浓度和完整性进行检测评估。每样本总 RNA 量为 1 μg, RNA 完整性数 >7.0。

1.4 测序、组装和注释

使用适用于 Illumina (美国) 的 NEB Next-UltraTM RNA 文库制备试剂盒生成皮肤的测序文库, 所得代码添加到每样本的属性序列中。在 Illumina HiSeq 2500 平台上对所有 9 个文库进行测序, 并生成成对的末端读码。原始数据采用 fastp 和 Sickle 软件进行第一质量过滤, 使用 Trinity 软件重新组装所有高质量、干净的读取序列 (clean data), 对 Trinity 拼装的转录本进行去冗余, 获取后续分析的单基因 (unigene)。将拼接好的数据用 BLAST 软件分别与 GO、KEGG、Nr、COG、Pfam、Swiss-Prot 数据库进行比对, 获得 unigene 的注释信息。

1.5 差异基因表达筛选和功能富集分析

采用 RSEM 软件将基因表达标准化为每千个碱基的转录每百万映射读取的片段 (FPKM), 基因表达量可直接用于比较不同样品间的基因表达差异。使用 DEG-seq 软件将全蓝、白化全蓝分别与全白七彩神仙鱼进行对比鉴定, $|\log_2\text{FoldChange}| > 1$ ($P\text{-adjust} < 0.05$) 作为筛选标准获取差异表达基因 (DEGs), 对差异表达基因集进行 GO 功能注释、富集和 KEGG 代谢通路分析。

1.6 荧光定量 PCR (qRT-PCR) 验证

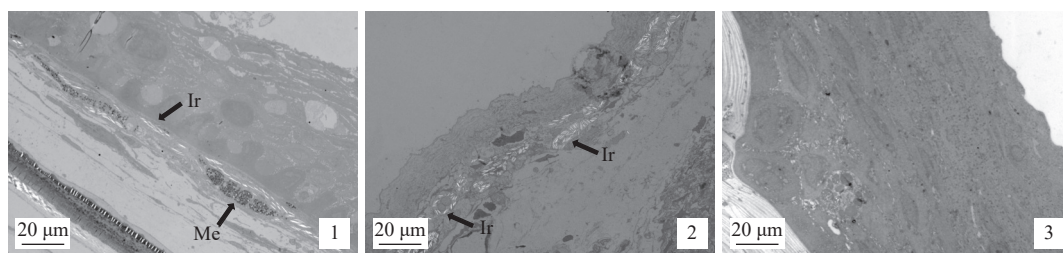
随机选取 6 个 DEGs, 利用 Primer premier 5.0 软件设计开放阅读框区特异性引物 (表 1), 合成引物序列。使用与转录组测序同一批次的 RNA, 根据 PrimeScript™ RT Master Mix 试剂盒 (TaKaRa) 说明书合成 cDNA。qRT-PCR 反应体系 20 μL: 2×T5 Fast qPCR Mix (TsingKe) 10 μL,

cDNA 模板 1.6 μL , 正反向引物各 0.8 μL , ddH₂O 6.8 μL 。反应条件: 95 °C 1 min; 95 °C 10 s, 56 °C 5 s, 72 °C 10 s, 40 个循环; 95 °C 5 s, 65 °C 5 s, 95 °C 15 s。以 β -actin 为内参, 用作标准化对照。每基因 3 个生物学重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对表达量。

2 结果

2.1 七彩神仙鱼皮肤超微结构鉴定

透射电镜结果显示, 全蓝七彩皮肤组织中存在黑色素细胞和虹彩细胞, 黑色素细胞呈圆形或椭圆形, 内含密集分布的黑色素小体; 虹彩细胞呈纺锤状, 内含大量整齐排列的鸟嘌呤晶体(图版-1)。在白化全蓝七彩中只观察到虹彩细胞的存在(图版-2)。在全白七彩神仙鱼中没有观察到色素细胞的存在(图版-3)。



图版 全蓝、白化全蓝和全白七彩神仙鱼皮肤组织超微结构

1. 全蓝七彩神仙鱼, 2. 白化全蓝七彩神仙鱼, 3. 全白七彩神仙鱼; Me. 黑色素细胞, Ir. 虹彩细胞。

Plate Skin ultrastructure of blue, albino blue and white discus fish

1. blue discus fish, 2. albino blue discus fish, 3. white discus fish; Me. melanophore, Ir. iridophore.

2.2 测序质控与组装结果

利用 Illumina HiSeq 2500 测序平台技术完成了全蓝、白化全蓝和全白七彩神仙鱼皮肤组织共 9 个样品的转录组分析, 总共获得 63.92 Gb clean data, 各样品 clean data 均达到 6.05 Gb 以上, Q20 碱基百分比在 97.84 % 以上, Q30 碱基百分比在 93.84 % 以上, 这表明测序数据属于高质量, 适合进一步分析。

2.3 基因注释分析

共检测到表达基因 27 742 个, 其中已知基因 22 994 个, 新基因 4 748 个。COG 和 NR 数据库注释基因数最多, 分别为 21 622 个和 22 722 个, 占 94.13% 和 98.89%; GO 和 KEGG 数据库注释基因数最少, 分别为 15 582 个和 15 838 个, 占 67.94% 和 68.74%; Swiss-Prot 和 Pfam 注释基因数

表 1 差异表达基因引物序列
Tab. 1 Primer sequences of differentially expressed genes

引物 primers	序列 (5'→3') sequences (5'→3')
<i>pmp</i>	F: CTTGCTGACACCCTGAAGTG R: ATACATGTGGAAGCGACCCT
<i>apod</i>	F: AAACCCTGCCAGAGTCCAC R: ATCTGCCTGCTGGGAATCAT
<i>crem</i>	F: GATGACGTGCCAGTTTCCAG R: CCTGTAGGCCTTGAACCTCCA
<i>icap</i>	F: CAGAGACAGACAGCATTCCGC R: TGTGGTGTTCATCCACCTCTC
<i>psmb8</i>	F: AGAAACAACCAGCGCATCTC R: AGACCAGGACCCTGTTTGTCT
<i>tieg</i>	F: GCGAGCAGTCTGTCTCTAGT R: GGAGTCCGAAGCTGGAGTAA

为 20 641 个和 21 277 个, 占 89.82% 和 92.71%。

2.4 差异表达基因分析

对七彩神仙鱼皮肤差异表达基因分析显示, 全蓝、白化全蓝与全白七彩神仙鱼对比, 分别鉴定出 2 192 和 3 168 个 DEGs (图 2-a)。全蓝与全白七彩神仙鱼 DEGs 中, 上调基因数 1 270 个, 下调 922 个; 白化全蓝与全白七彩神仙鱼 DEGs 中, 上调基因数 1 859 个, 下调 1 309 个 (图 2-b)。

2.5 差异表达基因 GO 和 KEGG 富集分析

全蓝与全白七彩神仙鱼 DEGs 的 GO 和 KEGG 全蓝与全白七彩神仙鱼 DEGs 的 GO 功能注释显示, 在生物过程大类, 与代谢作用、生物调节、细胞转化有关的基因居多; 在细胞组成大类, 与膜周期、细胞周期有关的基因居多; 在分子功能大类, 与结合、催化活性有关的基因居多 (图 3)。

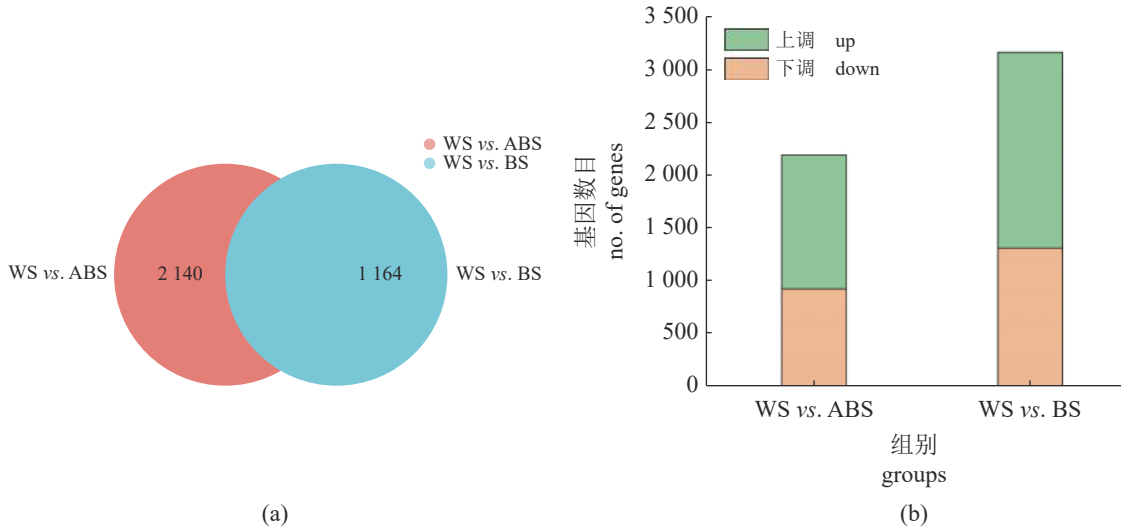


图 2 七彩神仙鱼皮肤差异表达基因维恩图 (a) 和统计分析 (b)

BS、ABS 和 WS 分别表示全蓝、白化全蓝和全白七彩神仙鱼；下同。

Fig. 2 Venn diagram (a) and statistical analysis (b) of differentially expressed genes in discus skin

BS, ABS and WS indicate blue, albino blue and white discus fish, respectively; the same below.

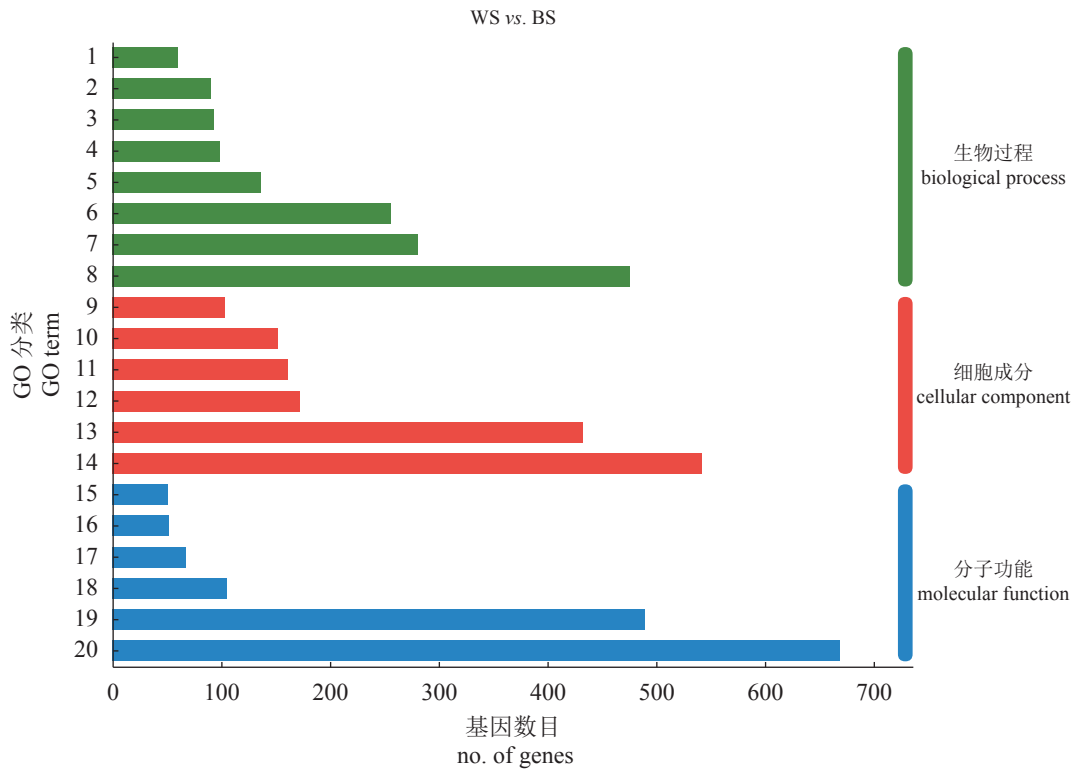


图 3 全蓝与全白七彩神仙鱼皮肤差异表达基因 GO 功能注释

1. 多细胞生物进程, 2. 定位, 3. 刺激反应, 4. 细胞成分组织或生物发生, 5. 发育过程, 6. 代谢作用, 7. 生物调节, 8. 细胞转化, 9. 膜, 10. 细胞器成分, 11. 含蛋白质复合物, 12. 细胞器, 13. 细胞周期, 14. 膜周期, 15. 分子功能调节剂, 16. 转录调节活性, 17. 分子转导活性, 18. 转运活性, 19. 催化活性, 20. 结合。

Fig. 3 GO functional annotation of differentially expressed genes in skins of blue and white discus fish

1. multicellular organismal process, 2. localization, 3. response to stimulus, 4. cellular component organization or biogenesis, 5. developmental process, 6. metabolic process, 7. biological regulation, 8. cellular process, 9. membrane, 10. organelle part, 11. protein-containing complex, 12. organelle, 13. cell part, 14. membrane part, 15. molecular function regulator, 16. transcription regulator activity, 17. molecular transducer activity, 18. transporter activity, 19. catalytic activity, 20. binding.

全蓝与全白七彩神仙鱼 DEGs 的 GO 功能富集分析显示, DEGs 主要富集在氧化还原酶复合物、嘌呤核苷酸生物合成过程、肌动蛋白结构组织、嘌呤化合物生物合成过程、嘌呤核糖核苷酸生物合成过程、肌动蛋白结构、核糖核苷酸生物合成过程、肌动蛋白纤维过程等功能 (图 4-a)。KEGG 代谢通路富集分析显示, DEGs 主要富集在氧化磷酸化、产热、柠檬酸循环、趋化因子信号通路、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解、丙酸代谢、丙酮酸代谢等通路 (图 4-b)。

白化全蓝与全白七彩神仙鱼 DEGs 的 GO 功能注释显示, 生物过程大类, 与代谢作用、生物

调节、细胞转化有关的基因居多; 在细胞组成大类, 与膜周期、细周期有关的基因居多; 在分子功能大类, 与结合、催化活性有关的基因居多 (图 5)。

白化全蓝与全白七彩神仙鱼 DEGs 的 GO 功能富集分析显示, DEGs 主要富集在核糖核苷二磷酸代谢过程、ADP 代谢过程、细胞氨基酸代谢过程、线粒体内膜蛋白复合物、含氧酸代谢过程、小分子代谢等过程 (图 6-a)。KEGG 代谢通路富集分析显示, DEGs 主要富集在甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、ECM-受体相互作用、氧化磷酸化、酪氨酸代谢、精氨酸和脯氨酸代谢等通路 (图 6-b)。

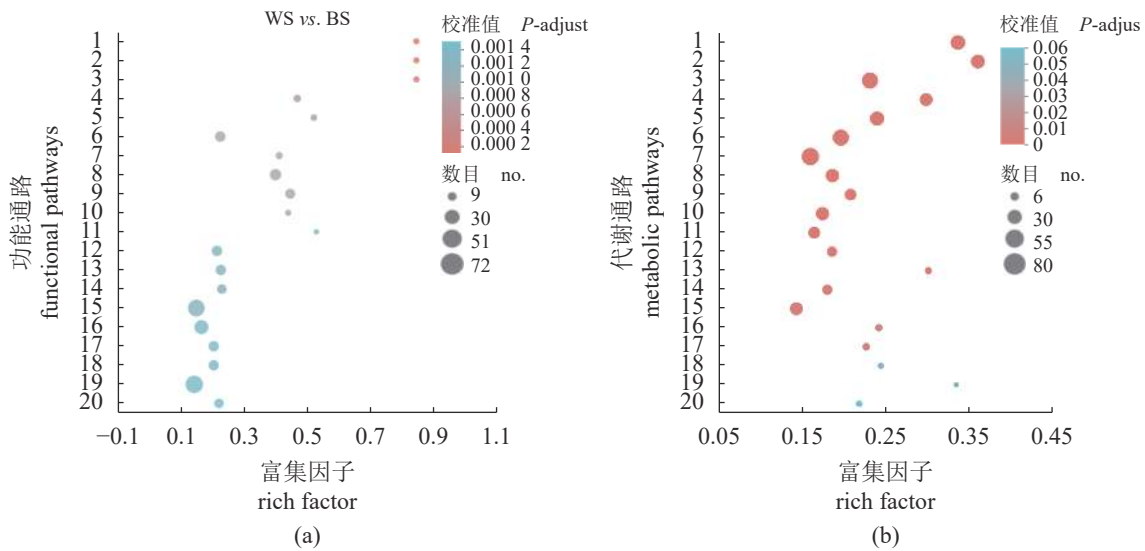


图 4 全蓝与全白七彩神仙鱼皮肤差异表达基因 GO 功能 (a) 和 KEGG 代谢通路 (b) 富集分析

(a) 1. NADH 脱氢酶复合物, 2. 线粒体呼吸链复合体 1, 3. 呼吸链复合体 1, 4. 氧化还原酶复合物, 5. 呼吸链复合体, 6. 嘌呤核苷酸生物合成过程, 7. 肌动蛋白结构, 8. 线粒体蛋白复合物, 9. 线粒体内膜蛋白复合物, 10. 电子传递链, 11. 呼吸电子传递链, 12. 嘌呤化合物生物合成过程, 13. 嘌呤核糖核苷酸生物合成过程, 14. 肌动蛋白细胞骨架组织, 15. 有机氮化合物的生物合成过程, 16. 免疫系统过程, 17. 核糖核苷酸生物合成过程, 18. 磷酸核糖生物合成过程, 19. 膜蛋白复合物, 20. 肌动蛋白纤维过程; (b) 1. 帕金森综合征, 2. 氧化磷酸化, 3. 生热作用, 4. 心肌收缩, 5. 非酒精性脂肪肝 (NAFLD), 6. 亨廷顿病, 7. 阿尔茨海默病, 8. 扩张型心肌病 (DCM), 9. 肥厚型心肌病 (HCM), 10. 心肌细胞中的肾上腺素传导, 11. 逆行内源性大麻素信号, 12. 致心律失常性右心室心肌病 (ARVC), 13. 柠檬酸循环 (TCA 循环), 14. 病毒蛋白与细胞因子及细胞因子受体的相互作用, 15. 趋化因子信号通路, 16. 脂肪酸降解, 17. 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解, 18. 丙酸代谢, 19. 昼夜节律, 20. 丙酮酸代谢。

Fig. 4 GO functional (a) and KEGG pathway (b) enrichment analysis of differentially expressed genes in skins of blue and white discus fish

(a) 1. NADH dehydrogenase complex, 2. mitochondrial respiratory chain complex 1, 3. respiratory chain complex 1, 4. oxidoreductase complex, 5. respiratory chain complex, 6. purine nucleotide biosynthetic process, 7. actomyosin structure organization, 8. mitochondrial protein complex, 9. inner mitochondrial membrane protein complex, 10. electron transport chain, 11. respiratory electron transport chain, 12. purine-containing compound biosynthetic process, 13. purine ribonucleotide biosynthetic process, 14. actin cytoskeleton organization, 15. organonitrogen compound biosynthetic process, 16. immune system process, 17. ribonucleotide biosynthetic process, 18. ribose phosphate biosynthetic process, 19. membrane protein complex, 20. actin filament-based process; (b) 1. Parkinson disease, 2. oxidative phosphorylation, 3. thermogenesis, 4. cardiac muscle contraction, 5. non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), 6. Huntington disease, 7. Alzheimer disease, 8. dilated cardiomyopathy (DCM), 9. hypertrophic cardiomyopathy (HCM), 10. adrenergic signaling in cardiomyocytes, 11. retrograde endocannabinoid signaling, 12. arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, 13. citrate cycle (TCA cycle), 14. viral protein interaction with cytokine and cytokine receptor, 15. chemokine signaling pathway, 16. fatty acid degradation, 17. valine, leucine and isoleucine degradation, 18. propanoate metabolism, 19. circadian rhythm-fly, 20. pyruvate metabolism.

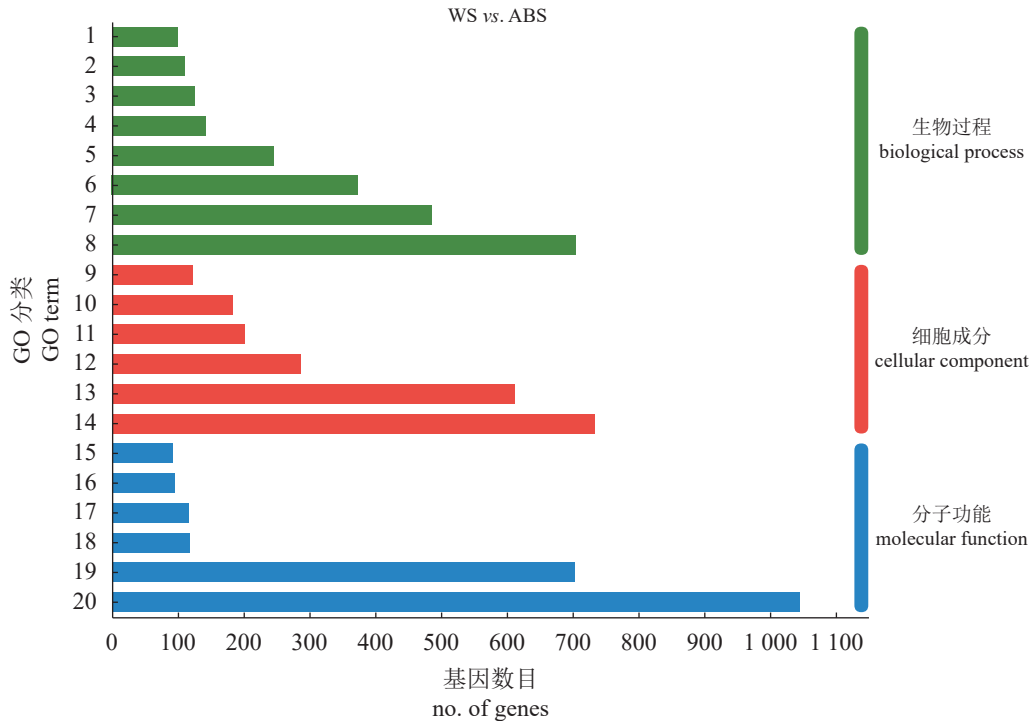


图5 白化全蓝与全白七彩神仙鱼皮肤差异表达基因 GO 功能注释分析

1. 多细胞生物进程, 2. 定位, 3. 细胞成分组织或生物发生, 4. 刺激反应, 5. 发育过程, 6. 代谢作用, 7. 生物调节, 8. 细胞转化, 9. 膜, 10. 细胞器成分, 11. 含蛋白质复合物, 12. 细胞器, 13. 细胞周期, 14. 膜周期, 15. 分子功能调节剂, 16. 转录调节活性, 17. 分子转导活性, 18. 转运活性, 19. 催化活性, 20. 结合。

Fig. 5 GO functional annotation of differentially expressed genes in skins of albino blue and white discus fish

1. multicellular organismal process, 2. localization, 3. cellular component organization or biogenesis, 4. response to stimulus, 5. developmental process, 6. metabolic process, 7. biological regulation, 8. cellular process, 9. membrane, 10. organelle part, 11. protein-containing complex, 12. organelle, 13. cell part, 14. membrane part, 15. molecular function regulator, 16. transcription regulator activity, 17. molecular transducer activity, 18. transporter activity, 19. catalytic activity, 20. binding.

2.6 虹彩细胞呈色候选基因筛选

为筛选蓝色七彩神仙鱼虹彩细胞呈色候选基因, 将全蓝、白化全蓝与全白七彩神仙鱼的 DEGs 与 NCBI 数据库中斑马鱼 (*Danio rerio*) 及已报道的鱼类皮肤虹彩细胞呈色基因进行比对, 同时采用 GO 和 KEGG 数据库将 DEGs 与蓝色体色相关术语 (“虹彩细胞”、“嘌呤”、“鸟嘌呤”) 及代谢通路 (“嘌呤合成”、“嘌呤代谢”) 进行比对。结果显示, 全蓝与全白七彩神仙鱼对比筛选出 32 个 DEGs, 上调 27 个, 下调 5 个 (图 7-a); 白化全蓝与全白七彩神仙鱼对比筛选出 38 个 DEGs 中, 上调 24 个, 下调 14 个 (图 7-b)。

2.7 qRT-PCR 验证分析

为验证转录组测序的可靠性, 实验对 6 个 DEGs (*pnp*、*apod*、*tcap*、*crem*、*psmb8*、*tieg*) 进行 qRT-PCR 分析。结果显示, 3 种七彩神仙鱼皮

肤组织 DEGs 表达趋势与 RNA-seq 结果一致 (图 8), 因此, 本研究转录组测序结果是可靠的。

3 讨论

色素细胞的组合、扩散和细胞形态的转变在体色形成中起着重要作用。通过对 3 种七彩神仙鱼皮肤色素细胞组成分析, 发现全蓝七彩神仙鱼包含黑色素细胞和虹彩细胞, 白化全蓝只有虹彩细胞, 而在全白并未发现色素细胞的存在, 表明 3 种表型鱼体在色素细胞组成上存在明显差异, 造成体色的分化。在泰国斗鱼 (*Betta splendens*) 皮肤中大量晶体小板和黑色素颗粒规律排列, 共同作用使鱼体形成了深蓝色的结构色^[21]。斑马鱼皮肤蓝色条纹中虹彩细胞晶体小板通过形成微细多层结构, 产生了蓝色的结构色^[18]。全蓝七彩神仙鱼呈深蓝色可能是虹彩细胞中反光的晶体小板与

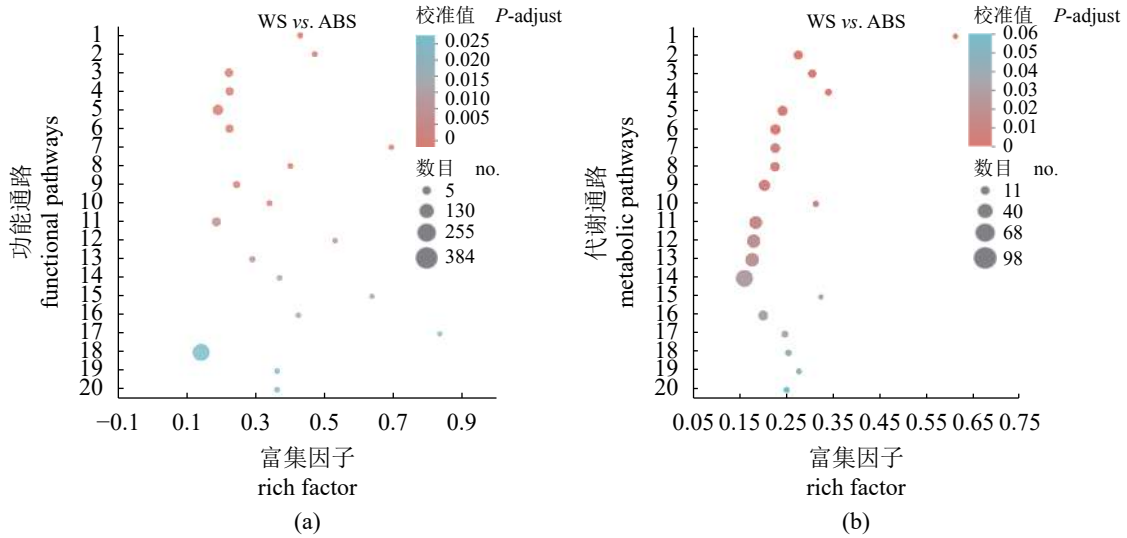


图 6 白化全蓝与全白七彩神仙鱼皮肤差异表达基因 GO 功能 (a) 和 KEGG 代谢通路 (b) 富集分析

(a) 1. 胶原三聚体, 2. 类胰岛素生长结合因子, 3. 含氧酸代谢过程, 4. 有机酸代谢过程, 5. 小分子代谢过程, 6. 羧酸代谢过程, 7. 细胞外基质结构成分, 8. 生长因子结合, 9. 细胞氨基酸代谢过程, 10. 线粒体内膜蛋白复合物, 11. 有机氮化合物生物合成过程, 12. 骨化, 13. α -氨基酸代谢过程, 14. 核糖核苷二磷酸代谢过程, 15. 基因表达的昼夜节律调节, 16. 生理节奏, 17. 光周期, 18. 阳离子结合, 19. ADP 代谢过程, 20. 核苷二磷酸代谢过程; (b) 1. 昼夜节律, 2. 补体和凝血级联, 3. 嘧啶代谢, 4. 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢, 5. 病毒蛋白与细胞因子及细胞因子受体的相互作用, 6. 蛋白质消化吸收, 7. ECM-受体相互作用, 8. 氧化磷酸化, 9. 非酒精性脂肪肝 (NAFLD), 10. 昼夜节律, 11. 生热作用, 12. 细胞因子受体相互作用, 13. 癌症中的蛋白多糖, 14. PI3K-Akt 信号通路, 15. 叶酸生物合成, 16. 帕金森综合征, 17. 谷胱甘肽代谢, 18. 膀胱癌, 19. 酪氨酸代谢, 20. 精氨酸和脯氨酸代谢。

Fig. 6 GO functional (a) and KEGG pathway (b) enrichment analysis of differentially expressed genes in skins of albino blue and white discus fish

(a) 1. collagen trimer, 2. insulin-like growth factor binding, 3. oxoacid metabolic process, 4. organic acid metabolic process, 5. small molecule metabolic process, 6. carboxylic acid metabolic process, 7. extracellular matrix structural constituent, 8. growth factor binding, 9. cellular amino acid metabolic process, 10. inner mitochondrial membrane protein complex, 11. organonitrogen compound biosynthetic process, 12. ossification, 13. α -amino acid metabolic process, 14. nucleoside diphosphate metabolic process, 15. circadian regulation of gene expression, 16. circadian rhythm, 17. photoperiodism, 18. cation binding, 19. ADP metabolic process, 20. ribonucleoside diphosphate metabolic process; (b) 1. circadian rhythm-fly, 2. complement and coagulation cascades, 3. pyrimidine metabolism, 4. glycine, serine and threonine metabolism, 5. viral protein interaction with cytokine and cytokine receptor, 6. protein digestion and absorption, 7. ECM-receptor interaction, 8. oxidative phosphorylation, 9. non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), 10. circadian rhythm, 11. thermogenesis, 12. cytokine-cytokine receptor interaction, 13. proteoglycans in cancer, 14. PI3K-Akt signaling pathway, 15. folate biosynthesis, 16. Parkinson disease, 17. glutathione metabolism, 18. bladder cancer, 19. tyrosine metabolism, 20. arginine and proline metabolism.

吸光的黑色素颗粒互作结果, 而白化全蓝七彩神仙鱼呈浅蓝绿色可能是由虹彩细胞中晶体小板规律排列反射光线导致。红点绿七彩神仙鱼在刺激下黑色素细胞色素颗粒向周围扩散, 使虹彩细胞被掩盖, 体色明显加深^[22], 这与本研究相一致。

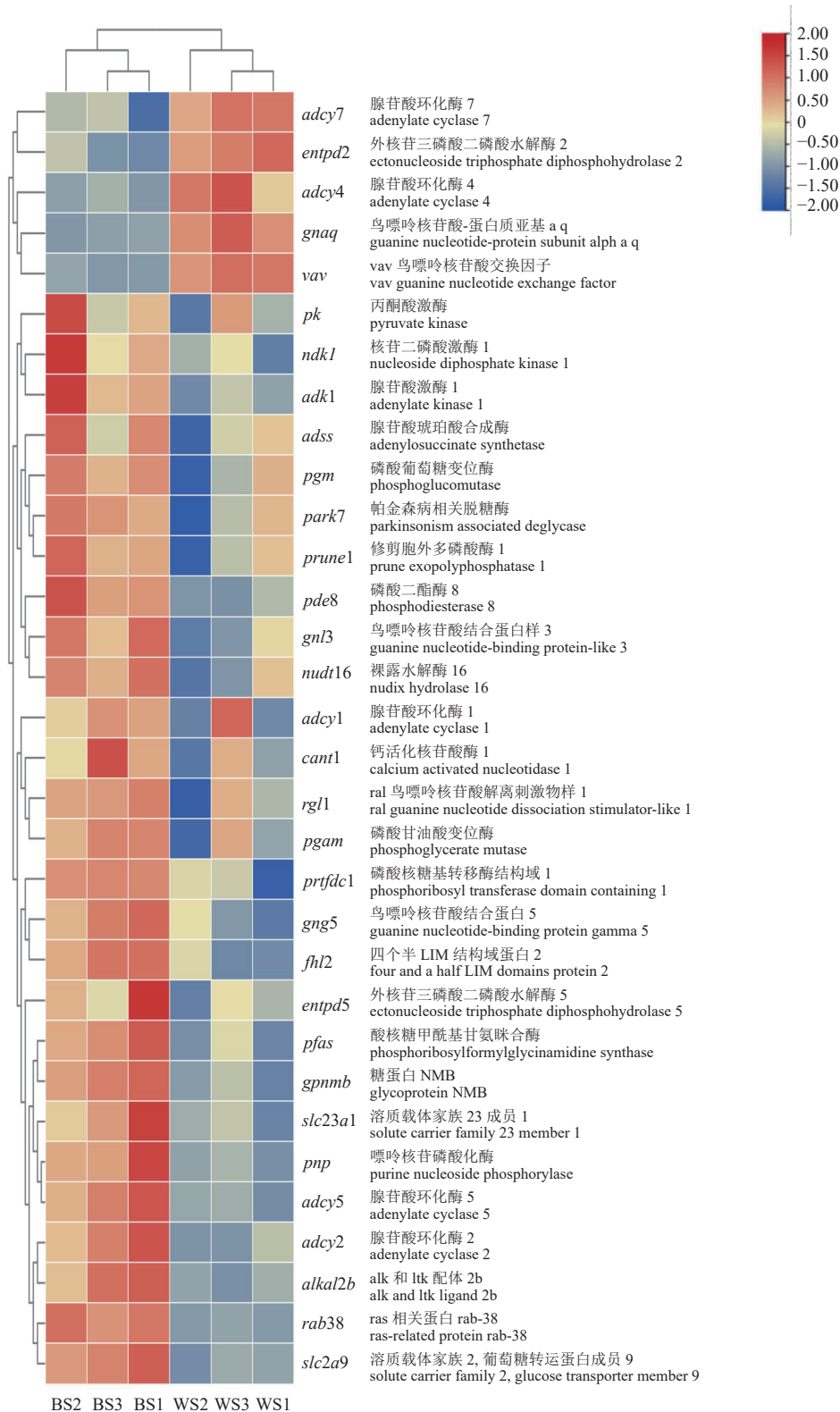
全蓝与全白七彩神仙鱼 DEGs 主要富集在嘌呤核苷酸生物合成过程、肌动蛋白结构组织、嘌呤化合物生物合成过程、嘌呤核糖核苷酸生物合成过程、肌动蛋白细胞骨架组织、氧化磷酸化、柠檬酸循环等代谢通路, 这与虹彩细胞的结构和功能相一致^[23]。蓝色皮肤虹彩细胞中晶体小板主要成分是鸟嘌呤, 鸟嘌呤与水结合形成鸟嘌呤晶体, 可折射一定波长的光从而产生颜色^[24]。Yang

等^[25]对全蓝、全黄、全白七彩神仙鱼皮肤进行了代谢组学分析, 也发现嘌呤在蓝色结构色呈色中具有重要作用。这些 DEGs 可能与虹彩细胞中鸟嘌呤合成或转移过程有关, 而虹彩细胞的转运也与肌动蛋白等相关^[26]。刘肖莲等^[27]对透明和不透明草金鱼 (*Carassius auratus*) 皮肤转录组分析现, 虹彩细胞相关 DEGs 主要富集在肌动蛋白结合、鸟嘌呤核苷酸结合等通路, 这与本研究结果一致。

与全白七彩神仙鱼相比, *alkal2b*、*prtfdc1*、*pgam*、*pnp*、*slc23a1*、*slc2a9*、*rab38*、*gpnmb*、*fh12* 基因在全蓝中显著上调。*alkal2b* 是间变性淋巴瘤激酶和白细胞酪氨酸激酶生理配体, *alkal2b* 表达缺陷会导致斑马鱼胚胎和成体虹彩细胞的严

重损伤^[28]。全蓝七彩神仙鱼 *alkal2b* 表达上调, 表明其可能参与了蓝色结构色的形成。Higdon 等^[29]指出 *pgam* 编码酶在糖酵解到鸟嘌呤合成中发挥

着催化作用, *prtfdc1* 编码酶在鸟嘌呤单磷酸 (GMP) 合成鸟嘌呤过程中催化最后一步。在斑纹双锯鱼体色研究中发现, *prtfdc1* 可能对虹彩细胞



(a)

(图 7 Fig. 7)

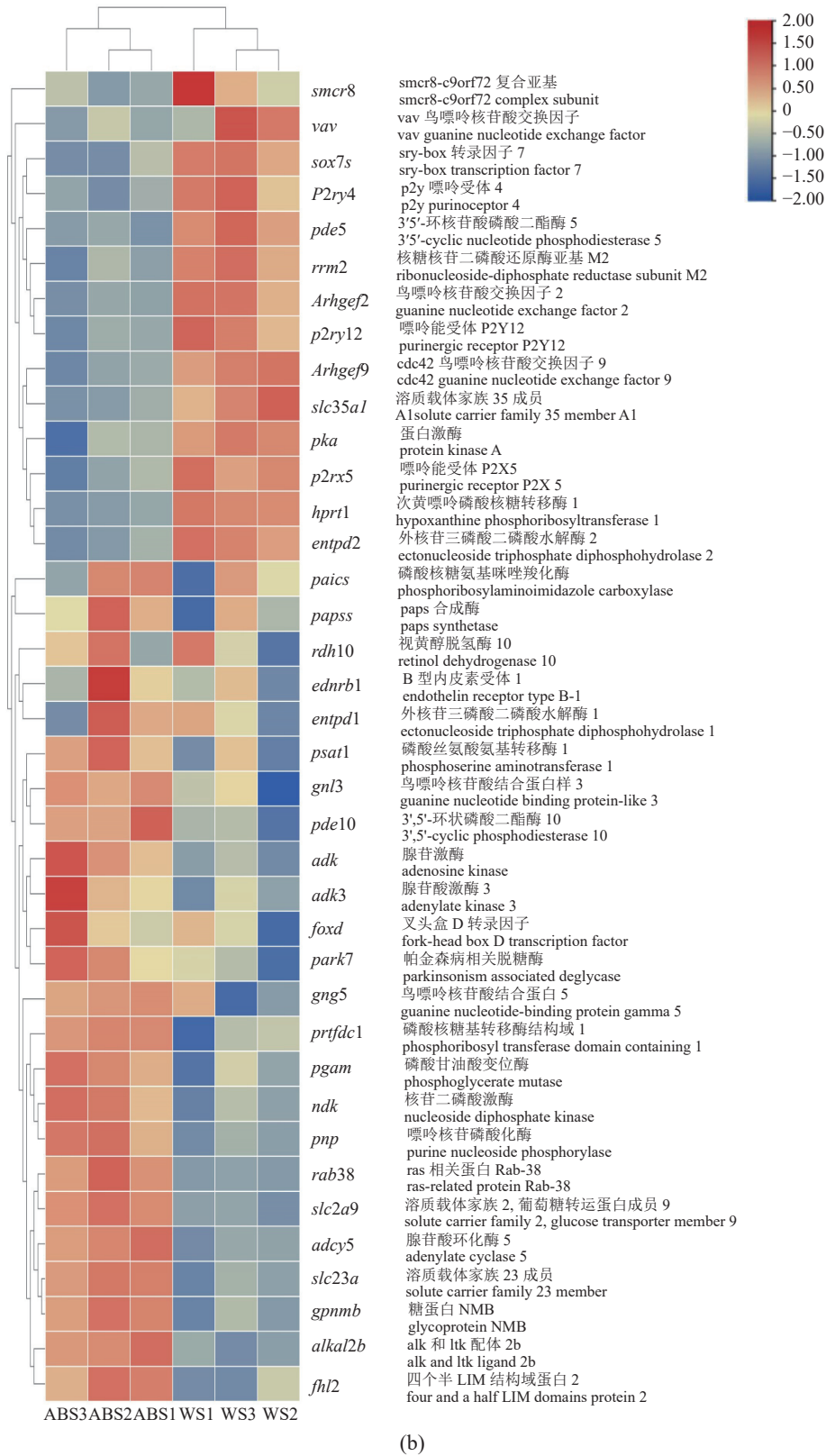


图 7 全蓝 (a) 和白化全蓝 (b) 七彩神仙鱼皮肤虹彩细胞呈色候选基因

红色和蓝色分别表示上调和下调基因。

Fig. 7 Candidate genes of iridophore coloration in skin of blue (a) and albino blue (b) discus fish

red and blue indicate up-regulated and down-regulated genes, respectively.

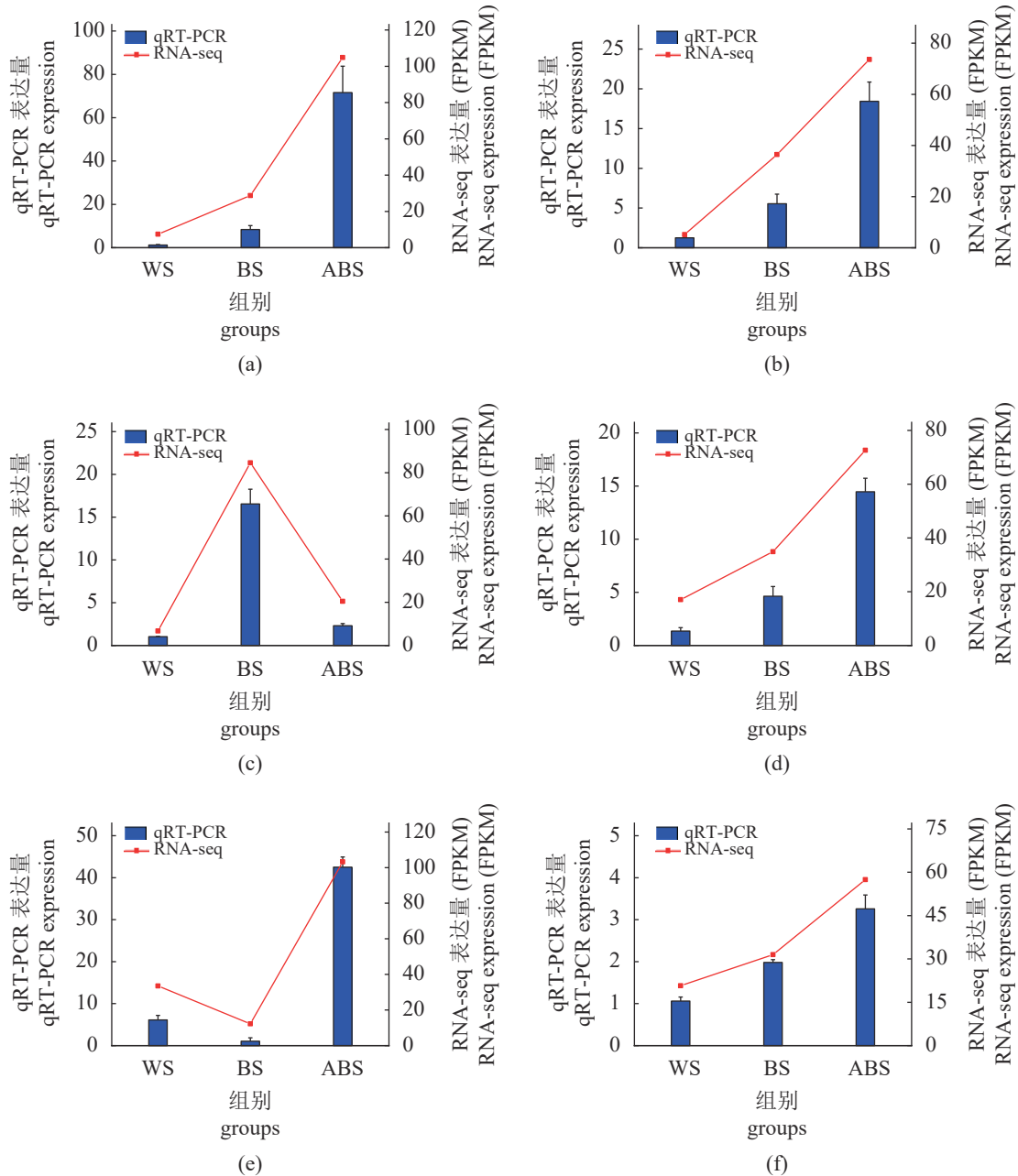


图 8 差异表达基因 qRT-PCR 与 RNA-Seq 比较分析

Fig. 8 Comparative analysis of differentially expressed genes by qRT-PCR and RNA-Seq

(a) *pnp*, (b) *apod*, (c) *tcap*, (d) *crem*, (e) *psmb8*, (f) *tieg*.

的发育或功能具有重要作用^[19]。*prtfdc1* 在迷彩箭毒蛙 (*Dendrobates auratus*) 个体中高表达, 在黑色个体中表达非常低, 蓝色个体皮肤上有可见的蓝白色“闪光”, 这可能是由虹彩细胞产生的^[30]。全蓝七彩神仙鱼中 *pgam* 和 *prtfdc1* 的表达可能在鸟嘌呤合成中起正向催化, 进一步促进虹彩细胞的形成。*pnp* 在嘌呤代谢中发挥着重要作用, 可能参与了鸟嘌呤的合成^[31], 且其配体 *pnp4a* 突变会导致虹彩细胞的缺失^[32]。高表达的 *pnp* 可能对蓝

色七彩神仙鱼虹彩细胞形成具有重要作用。在哺乳动物中, *slc23* 基因家族能够运输碱基包括鸟嘌呤^[33]。*slc23a1* 和 *slc2a9* 基因在全蓝七彩神仙鱼中高表达, 表明其可能参与了鸟嘌呤的转运进而对虹彩细胞形成产生影响。*rab38* 相关癌基因家族成员对虹彩细胞具有调节膜形成和运输的作用, 且可能操纵其组织和结构^[34]。全蓝七彩神仙鱼 *rab38* 的高表达可能参与虹彩细胞的产生及运输, 通过虹彩细胞的聚集和扩散进一步影响体色的呈

现。*gpnmb* 被认为与哺乳动物虹彩细胞中晶体小板形成有关^[35]。*gpnmb* 在斑马鱼虹彩细胞中表达显著高于黑色素细胞^[29]。全蓝七彩神仙鱼中 *gpnmb* 高表达可能与虹彩细胞中晶体小板的形成相关。Santos 等^[36] 鉴定了 2 个色素相关基因 *fh12a* 和 *fh12b*, 发现 *fh12b* 与慈鲷的卵斑形成有关, 利用转基因斑马鱼证明 *fh12b* 顺式调控区在虹彩细胞中显示出特定的增强子活性。*fh12* 在全蓝七彩中高表达, 表明其可能是影响蓝色七彩神仙鱼体色形成的重要候选基因。

白化全蓝与全白七彩神仙鱼差异表达基因主要富集在氧化磷酸化、核糖核苷二磷酸代谢、ADP 代谢、细胞氨基酸代谢、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、ECM-受体相互作用。类似地, Yang 等^[25] 发现氧化磷酸化、甘氨酸、丝氨酸与苏氨酸等代谢通路在蓝色七彩神仙鱼皮肤中显著富集。*alkal2b*、*prtfdc1*、*pgam*、*pnp*、*slc23a1*、*slc2a9*、*rab38*、*gpnmb*、*fh12*、*rdh10*、*psat1*、*paics* 基因在白化全蓝七彩神仙鱼中显著上调, 其中 *alkal2b*、*prtfdc1*、*pgam*、*pnp*、*slc23a1*、*slc2a9*、*rab38*、*gpnmb*、*fh12* 在全蓝七彩神仙鱼中也上调。在草莓箭毒蛙 (*Oophaga pumilio*) 蓝色个体中 *rdh10* 和 *psat1* 表达上调, 通过将丝氨酸、甘氨酸途径重新连接回嘌呤合成, 对虹彩细胞的生成产生影响^[37]。*rdh10* 和 *psat1* 在白化全蓝神仙鱼中同样表达上调, 推测其可能对嘌呤合成及虹彩细胞的生成具有重要作用。*paics* 参与单磷酸肌苷 (IMP) 的合成, IMP 是嘌呤核苷酸腺苷单磷酸 (AMP) 和 GMP 的前体, 对嘌呤合成及虹彩细胞产生具有重要作用。斑马鱼 *paics* 表达抑制会造成虹彩细胞的缺失^[38], 白化全蓝七彩神仙鱼 *paics* 的高表达可能预示着对结构呈色的重要性。*pka* 在白化全蓝七彩神仙鱼中表达下调, 但在全白七彩上调。Cooper 等^[39] 发现 *pka* 激活会抑制斑马鱼虹彩细胞的分化, 而 H89 抑制 *pka* 可增加虹彩细胞的数量, 与本研究相一致。综上所述, 呈色基因在不同物种中序列和功能具保守性, 但同时需进一步研究了解这些基因如何共同调节蓝色结构色的形成。

4 结论

通过对全蓝、白化全蓝与全白七彩神仙鱼皮肤组织进行比较转录组分析, 发现差异表达基因主要富集到氧化磷酸化、柠檬酸循环、嘌呤合成、肌动蛋白组织等信号通路。其中 *alkal2b*、*gpnmb*、

fh12、*pka* 与虹彩细胞发育相关, *pgam*、*prtfdc1*、*pnp*、*slc23a1*、*slc2a9*、*rab38*、*rdh10*、*psat1*、*paics* 与虹彩细胞中鸟嘌呤合成及运输有关。这些基因可能在蓝色七彩神仙鱼结构色呈色中具有重要作用。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Rodgers G M, Kelley J L, Morrell L J. Colour change and assortment in the western rainbowfish[J]. *Animal Behaviour*, 2010, 79(5): 1025-1030.
- [2] Lorin T, Brunet F G, Laudet V, et al. Teleost fish-specific preferential retention of pigmentation gene-containing families after whole genome duplications in vertebrates[J]. *G3 Genes| Genomes| Genetics*, 2018, 8(5): 1795-1806.
- [3] Scharl M, Larue L, Goda M, et al. What is a vertebrate pigment cell?[J]. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2016, 29(1): 8-14.
- [4] Irion U, Singh A P, Nüsslein-Volhard C. Chapter Eight - The developmental genetics of vertebrate color pattern formation: lessons from zebrafish[J]. *Current Topics in Developmental Biology*, 2016, 117: 141-169.
- [5] Luo M K, Lu G Q, Yin H R, et al. Fish pigmentation and coloration: molecular mechanisms and aquaculture perspectives[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2021, 13(4): 2395-2412.
- [6] Sköld H N, Aspöngren S, Wallin M. Rapid color change in fish and amphibians—function, regulation, and emerging applications[J]. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2013, 26(1): 29-38.
- [7] Maan M E, Sefc K M. Colour variation in cichlid fish: developmental mechanisms, selective pressures and evolutionary consequences[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2013, 24(6-7): 516-528.
- [8] Gur D, Palmer B A, Leshem B, et al. The mechanism of color change in the neon tetra fish: a light-induced tunable photonic crystal array[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2015, 54(42): 12426-12430.
- [9] Salis P, Lorin T, Laudet V, et al. Magic traits in magic fish: understanding color pattern evolution using reef fish[J]. *Trends in Genetics*, 2019, 35(4): 265-278.
- [10] Chong A S C, Hashim R, Chow-Yang L, et al. Partial characterization and activities of proteases from the digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*)[J]. *Aquaculture*, 2002, 203(3-4): 321-333.
- [11] 鲁凯, 高建忠, 温彬, 等. 黑格尔 (*Symphysodon discus* Heckel) × 松石七彩神仙鱼 (*Symphysodon discus* Turquoise) 杂交后代的遗传变异[J]. *基因组学与应用生物*

- 学, 2019, 38(11): 4951-4960.
- Lu K, Gao J Z, Wen B, *et al.* Genetic variation of heckel (*Symphysodon discus* Heckel) and turquoise discus (*Symphysodon discus* Turquoise) hybrid progeny[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2019, 38(11): 4951-4960 (in Chinese).
- [12] 周建桥. 七彩神仙鱼 (*Symphysodon haraldi*) 繁殖期间体表“乳汁”成分的初步研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2019.
- Zhou J Q. A preliminary study of discus fish (*Symphysodon haraldi*) epidermal milk in the breeding period[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019 (in Chinese).
- [13] Wen B, Chen Z Z, Qu H C, *et al.* Growth and fatty acid composition of discus fish *Symphysodon haraldi* given varying feed ratios of beef heart, duck heart, and shrimp meat[J]. *Aquaculture and Fisheries*, 2018, 3(2): 84-89.
- [14] 宋雪璐. 虾青素、叶黄素和牛磺胆酸钠在七彩神仙鱼饲料中的应用研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.
- Song X L. The application of astaxanthin, xanthophyll and sodium taurocholate in the feed of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2017 (in Chinese).
- [15] 王磊, 陈再忠, 冷向军, 等. 饲料中添加雨生红球藻对七彩神仙鱼生长、体色及抗氧化力的影响[J]. *淡水渔业*, 2016, 46(6): 92-97.
- Wang L, Chen Z Z, Leng X J, *et al.* Effect of *Haematococcus pluvialis* on growth, body color and antioxidation capacity of discus fish *Symphysodon haraldi*[J]. *Freshwater Fisheries*, 2016, 46(6): 92-97 (in Chinese).
- [16] 张永勤. 红鲷体色发育的分子调控机制研究 [D]. 长沙: 湖南师范大学, 2018.
- Zhang Y Q. Molecular regulation mechanism of body color development in red crucian carp (*carassius auratus, red var.*)[D]. Changsha: Hunan Normal University, 2018 (in Chinese).
- [17] Braasch I, Scharlt M, Volf J N. Evolution of pigment synthesis pathways by gene and genome duplication in fish[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2007, 7(1): 74.
- [18] Gur D, Bain E J, Johnson K R, *et al.* In situ differentiation of iridophore crystalloids underlies zebrafish stripe patterning[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 6391.
- [19] Salis P, Lorin T, Lewis V, *et al.* Developmental and comparative transcriptomic identification of iridophore contribution to white barring in clownfish[J]. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2019, 32(3): 391-402.
- [20] Bian F F, Yang X F, Ou Z J, *et al.* Morphological characteristics and comparative transcriptome analysis of three different phenotypes of *Pristella maxillaris*[J]. *Frontiers in Genetics*, 2019, 10: 698.
- [21] Amiri M H, Shaheen H M. Chromatophores and color revelation in the blue variant of the Siamese fighting fish (*Betta splendens*)[J]. *Micron*, 2012, 43(2-3): 159-169.
- [22] 刘晓东, 陈再忠. 七彩神仙鱼皮肤色素细胞观察及类胡萝卜素组分分析[J]. *上海水产大学学报*, 2008, 17(3): 339-343.
- Liu X D, Chen Z Z. Study on the chromatophores and the carotenoid components in the skin of discus fish (*Symphysodon* spp.)[J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2008, 17(3): 339-343 (in Chinese).
- [23] Li X M, Song Y N, Xiao G B, *et al.* Gene expression variations of red-white skin coloration in common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(9): 21310-21329.
- [24] Fujii R. Cytophysiology of fish chromatophores[J]. *International Review of Cytology*, 1993, 143: 191-255.
- [25] Yang B T, Wen B, Ji Y, *et al.* Comparative metabolomics analysis of pigmentary and structural coloration in discus fish (*Symphysodon haraldi*)[J]. *Journal of Proteomics*, 2021, 233: 104085.
- [26] 刘晓东, 陈再忠. 鱼类色素细胞及体色调控[J]. *水产科技情报*, 2008, 35(1): 13-18.
- Liu X D, Chen Z Z. Pigment cells and body color regulation of fish[J]. *Fisheries Science & Technology Information*, 2008, 35(1): 13-18 (in Chinese).
- [27] 刘肖莲, 李春艳, 白晓慧, 等. 透明草金鱼的皮肤转录组分析[J]. *水产科学*, 2022, 41(1): 110-115.
- Liu X L, Li C Y, Bai X H, *et al.* Transcriptome analysis of transparent skin in grass goldfish *Carassius auratus*[J]. *Fisheries Science*, 2022, 41(1): 110-115 (in Chinese).
- [28] Mo E S, Cheng Q N, Reshetnyak A V, *et al.* Alk and Ltk ligands are essential for iridophore development in zebrafish mediated by the receptor tyrosine kinase Ltk[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(45): 12027-12032.
- [29] Higdon C W, Mitra R D, Johnson S L. Gene expression analysis of zebrafish melanocytes, iridophores, and retinal pigmented epithelium reveals indicators of biological function and developmental origin[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e67801.
- [30] Stuckert A M M, Moore E, Coyle K P, *et al.* Variation in pigmentation gene expression is associated with distinct aposematic color morphs in the poison frog *Dendrobates auratus*[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2019, 19(1): 85.
- [31] Stuckert A M M, Chouteau M, McClure M, *et al.* The genomics of mimicry: gene expression throughout development provides insights into convergent and divergent phenotypes in a Müllerian mimicry system[J]. *Molecular Ecology*, 2021, 30(16): 4039-4061.
- [32] Kimura T, Takehana Y, Naruse K. *Pnp4a* is the causal gene of the medaka iridophore mutant guanineless[J]. G3

- Genes| Genomes| Genetics, 2017, 7(4): 1357-1363.
- [33] Bürzle M, Suzuki Y, Ackermann D, *et al.* The sodium-dependent ascorbic acid transporter family SLC23[J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 2013, 34(2-3): 436-454.
- [34] Grosshans B L, Ortiz D, Novick P. Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(32): 11821-11827.
- [35] Tomihari M, Hwang S H, Chung J S, *et al.* Gpnmb is a melanosome-associated glycoprotein that contributes to melanocyte/keratinocyte adhesion in a RGD-dependent fashion[J]. *Experimental Dermatology*, 2009, 18(7): 586-595.
- [36] Santos M E, Braasch I, Boileau N, *et al.* The evolution of cichlid fish egg-spots is linked with a *cis*-regulatory change[J]. *Nature Communications*, 2014, 5(1): 5149.
- [37] Rodríguez A, Mundy N I, Ibáñez R, *et al.* Being red, blue and green: the genetic basis of coloration differences in the strawberry poison frog (*Oophaga pumilio*)[J]. *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 301.
- [38] Ng A, Uribe R A, Yieh L, *et al.* Zebrafish mutations in *gart* and *paics* identify crucial roles for de novo purine synthesis in vertebrate pigmentation and ocular development[J]. *Development*, 2009, 136(15): 2601-2611.
- [39] Cooper C D, Erickson S D, Yin S, *et al.* Protein kinase A signaling inhibits iridophore differentiation in zebrafish[J]. *Journal of Developmental Biology*, 2018, 6(4): 23.

Exploration of candidate genes related to iridophore presenting blue skin in discus fish (*Symphysodon haraldi*)

LI Zhongjun^{1,2,3}, WEN Bin^{1,2,3,4*}, MA Tengfei^{1,2,3}, LIU Xin^{1,2,3},
GAO Jianzhong^{1,2,3,4}, CHEN Zaizhong^{1,2,3,4*}

(1. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

4. National Demonstration Centre for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The comparative transcriptomic analysis was performed on natural and albino blue discus with white discus fish (*Symphysodon haraldi*) respectively to excavate genes related to iridophores in blue skin. It was found a total of 2, 192 different expression genes (DEGs) in natural blue fish, including 1, 270 up-regulated and 922 down-regulated genes. The DEGs were primarily enriched in purine nucleotide biosynthetic process, actomyosin structure organization, purine-containing compound biosynthetic process, oxidative phosphorylation, citrate cycle and other functions. For the albino blue discus fish compared to white one, there were 1, 859 up-regulated and 1, 309 down-regulated DEGs. Similarly, the dominant enriched pathways of these genes were oxidative phosphorylation, ribonucleoside diphosphate metabolic process, ADP metabolic process, cation binding, glycine, serine and threonine metabolism and other functions. In order to further explore candidate genes participating in iridophores appearing color, by comparing the database, a total of 32 and 38 DEGs were screened out in natural blue and albino blue discus, respectively. It could be predicted that *alkal2b*, *gpnmb*, *fh12* and *pka* were associated with the development of iridophores, and *pgam*, *prtfdc1*, *pnp*, *slc23a1*, *slc2a9*, *rab38*, *rdh10*, *psat1*, and *paics* might attend guanine synthesis and transportation in iridophores. This study might ground for in-depth analysis of the formation and regulation mechanism of blue structural color in fish.

Key words: fish; iridophore; structure color; blue color

Corresponding authors: WEN Bin. E-mail: bwen@shou.edu.cn;

CHEN Zaizhong. E-mail: chenzz@shou.edu.cn

Funding projects: Natural Science Foundation of Shanghai (20ZR1423600); Shanghai Sailing Program (19YF1419400)