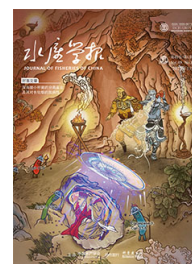


DOI: 10.11964/jfc.20240514529

鳙体型差异个体转录组与 miRNA 的联合分析



邓玉婕¹, 朱文彬², 傅建军², 罗明坤², 王兰梅², 梁政远³,
董在杰^{1,2*}

1. 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;
2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业农村部淡水渔业与种质资源利用
重点实验室, 江苏 无锡 214081; 3. 无锡瑞顺水产养殖科技有限公司, 江苏 无
锡 214000

摘要:

【目的】探究影响鳙体型差异的分子机制。

【方法】本实验以正常鳙个体(CK组)和缩骨鳙个体(PG组)为研究对象, 进行转录组和 miRNA 测序分析。

【结果】共获得 25 327 个 Unigenes 和 8 325 个 miRNA, 鉴定到 930 个差异表达基因(DEGs)和 146 个差异表达 miRNA(DEMs), 包括 473 个上调和 457 个下调基因, 44 个上调和 102 个下调 miRNA。对 DEGs 和 DEMs 的靶基因联合分析, 获得了 140 个重复基因, 功能富集到细胞周期(ko04110)、DNA 复制(ko03030)、黏着斑(ko04510)和 ECM 受体相互作用(ko04512)等信号通路。其中, 鉴定到如 *exo1*、*mcm4*、*ccna2*、*smc2* 和 *ccna2* 等 16 个参与骨骼形成发育的基因, 推测可能与鳙的体型差异形成有关。此外, 通过 mRNA-miRNA 网络互作分析, 挖掘到如 *apob*、*tgfr2a* 和 *col2a1b* 等基因, miR-34a-5p、miR-252a 和 miR-6547-5p 等 miRNAs; 分析上述基因可能在调控和维持鳙的体型中发挥作用。实时荧光定量 PCR(qPCR) 实验发现, 表达差异趋势与 RNA-Seq 和 sRNA-Seq 数据结果一致。

【结论】研究发现的 DEGs、DEMs 和富集到的代谢通路可能与鳙的缩骨体型差异存在关联, 实验结果可为后续深入揭示鳙影响体型差异的分子机制提供基础数据。

关键词: 鳙; 体型; 骨骼发育; 差异表达基因; 差异表达 miRNA

鳙 (*Hypophthalmichthys nobilis*) 是我国大宗淡水鱼之一, 在我国淡水养殖业中占据重要的地位^[1], 2022 年我国鳙养殖产量达到 326.85 万 t, 占淡水鱼类养殖产量的 12.1%, 位于淡水养殖鱼类第 3 位^[2]。鳙的鱼头肉质细嫩, 营养丰富, 富含蛋白质和不饱和脂肪酸, 广受消费者青睐^[3]。为了提升养殖效益, 挑选出体型差异, 尤其是头部占比存在差异的个体, 可为后续鳙的选育提供一定的基础资料。

鱼的头长、体高、全长等生长性状, 不仅与鱼类进化发育有关,

第一作者: 邓玉婕, 从事鱼类遗传育种研究, E-mail: dengyvj@163.com



通信作者: 董在杰, 从事鱼类遗传育种、繁殖及分子生物学研究, E-mail: dongzj@ffrc.cn

资助项目: 国家大宗淡水鱼产业技术体系专项(CARS-45); 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心基本科研业务费专项(2023JBFZ02, 2023JBFM07)

收稿日期: 2024-05-23

修回日期: 2024-08-17

文章编号:

1000-0615(2025)01-019604-13

中图分类号: Q 786; S 961.6

文献标志码: A

作者声明本文无利益冲突

©《水产学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)
Copyright © Editorial Office of Journal of Fisheries of China (CC BY-NC-ND 4.0)



还与养殖环境、技术等密不可分, 且对养殖的经济效益也非常重要。相比于其他鱼类, 鳙头部具有更高的经济价值。近年来, 缩骨鳙因其鱼头占鱼身的比例存在更高的优势, 在水产养殖业中逐渐受到关注。缩骨鳙是鳙鱼苗阶段因生态环境等因素突变而引起的生理变化, 其脊椎骨被压缩, 致使缩骨鳙比常见的鳙身体短, 鱼头比例大大增加, 因而鱼价也比普通鳙高^[4-5]。由于缩骨鳙是在苗种阶段通过特定的缩骨技术获得, 因此, 该性状并不能遗传, 需要每年进行处理。为获得可遗传的缩骨性状, 必须对形成缩骨的分子机理进行解析。目前, 国内外学者已对鱼类头部性状和体型变异种质开展了相关研究, 如 Chen 等^[6]将全基因组关联分析 (GWAS) 和数量性状位点 (QTL) 定位相结合对不同家系的黄河鲤 (*Cyprinus carpio haematoperus*) 的头部性状进行分析, 鉴定出了 12 个单核苷酸多态性 (SNP) 和 18 个 QTL 与头型存在显著关联, 筛选出了影响头部性状的候选基因 *srpk2*、*igf1* 和 *grb10* 等。Luo 等^[7]对来自鳙雌核发育家系内体型正常和畸形的个体进行了转录组比较, 鉴定出 20 个关键的差异表达基因, 如 *lrp2*、*bmp2b*、*col4a1* 等, 并发现了 12 条关键的代谢通路。李强等^[8]对鲫 (*Carassius auratus*) 不同群体开展了线粒体 *Cyt b* 基因和控制区的遗传分析, 发现缩骨鲫与淇河鲫、红鲫和野鲫的亲缘关系较近, 推测可能属于野鲫的一个地方种群。杨扬等^[9]对缩骨鲫的 *mc4r* 基因进行克隆表达分析, 在 *mc4r* 的编码区内发现了 6 个与生长相关的 SNPs。上述研究, 为鱼类体型变异的遗传解析和调控机制奠定了基础。然而, 针对鳙体型差异个体的解析工作还有待开展。

现阶段, 高通量测序因其在基因水平表达差异和调控机制研究中的便利优势, 已广泛应用于鱼类表型和环境适应的分子机制研究^[10]。高通量测序在鱼类生长、发育、免疫和营养代谢等方面, 特别是在经济性状相关功能基因和调控网络的挖掘方面被广泛应用^[11-12]。已有研究进行了全州禾花鲤 (*C. carpio* var. *quanzhounensis*)、建鲤 (*C. carpio* var. *jian*) 和团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 肌间刺的信使 RNA (mRNA) 和小 RNA (miRNA) 联合分析, 探究了骨形成过程中关键基因和调控机制^[13-14]。本研

究通过高通量技术对鳙的正常体型和缩骨体型个体进行了转录组和 miRNA 测序, 探索影响鳙体型差异的关键通路和候选基因, 为揭示鳙的生长与骨骼发育的分子机制提供数据支持, 为鳙的体型优势改良提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验鱼的采集

实验鱼取自无锡瑞顺水产养殖科技有限公司, 随机挑选 20 日龄、体长为 (2.0±0.5) cm 的正常鳙仔鱼 15 尾 (CK 组) 和缩骨鳙仔鱼 15 尾 (PG 组), 每组 5 尾鱼混样为 1 管, 共各取 3 管, 液氮速冻后置于 -80 °C 冰箱中保存。取样后剩余的实验鱼养至鱼种阶段即体长 10.5~13.0 cm 时, 拍照对比两种鱼体型的差异 (图 1)。实验过程中操作人员严格遵守动物福利伦理规范, 并按照中国水产科学研究院淡水渔业研究中心学术伦理委员会制定的规章制度执行。

1.2 RNA 提取、文库构建和测序

采用 TRIzol 试剂 (Invitrogen, 美国) 提取实验鱼的总 RNA, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop 2000 微量分光光度计 (Thermo Fisher Scientific, BRIMS, Cambridge, 美国) 检测 RNA 的纯度, Agilent 2100 Bioanalyzer 精确检测 RNA 的完整性。RNA 样品检测合格后, 进行 cDNA 文库的构建, 库检合格后进行测序, 测序平台为 Illumina NovaSeq 6000, 测序读长为 PE150, 测序原始结果已提交到 NCBI SRA 数据库 (SRP468011)。

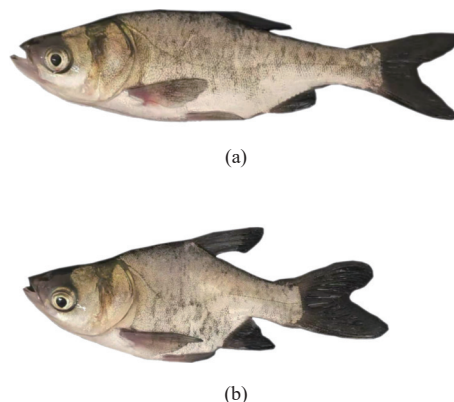


图 1 实验所用的正常体型 (a) 和缩骨体型 (b) 鳙
Fig. 1 *H. nobilis* individuals with normal body shape (a) and shortened body shape (b) used in the experiment

以总 RNA 为起始样品, 使用 small RNA Sample Pre Kit 试剂盒构建文库, 文库构建完成后, 使用 Qubit 2.0 对文库的浓度进行检测, 使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 对 Insert Size 进行检测, 使用荧光定量 PCR (qPCR) 方法对文库的有效浓度进行准确定量, 以保证文库质量。库检合格后, 用 NovaSeq 2500 平台进行高通量测序, 测序读长为 single-end (SE) 50 bp。所有数据已提交到 NCBI SRA 数据库 (PRJNA1205518)。

1.3 转录组组装、功能注释和 miRNA 测序质量评估

对原始数据 (Raw Data) 进行过滤, 去除其中的接头序列及低质量读本 (Reads), 获得高质量的净数据 (Clean Data)。用 HISAT2 软件^[15] 将过滤后的测序片段与鳙参考基因组 (<https://ftp.cngb.org/pub/CNSA/data3/CNP0000974/CNS0209134/CNA0019189/>) 进行序列比对, 然后使用 StringTie 软件^[16] 组装转录本。使用 7 个数据库对接接所获得的 Unigene 序列进行功能注释, 包括 COG、GO、KEGG、KOG、Pfam、Swiss-prot 和 Nr 数据库。

使用 Cutadapt (v2.10)^[17] 软件对测序序列进行质量控制及处理, 去除接头和低质量序列后, 得到后续分析使用的高质量 Clean Read 序列。利用 Bowtie (v1.2.2)^[18] 软件, 将 Clean Data 与 miRBase (v21) 数据库、Rfam (v14.1) 数据库和 Rепbase 数据库进行序列比对, 筛选出核糖体 RNA (rRNA)、转运 RNA (tRNA)、核内小 RNA (snRNA)、核仁小 RNA (snoRNA) 等非编码 RNA (ncRNA) 以及重复序列, 最后鉴定出已知的 miRNAs。用 Mireap (v0.2)^[19] 软件对前体序列进行 miRNA 结构预测, 获得新的 miRNA。

1.4 差异表达基因和差异 miRNA 的鉴定及靶基因预测

采用 FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript per Million fragments mapped)^[20] 作为衡量转录本或基因表达水平的指标, 通过对不同实验组间进行显著性差异基因筛选, 可获得差异表达基因, 根据两组样品之间的相对高低, 差异表达基因可以划分为上调基因和下调基因。采用 DESeq2^[21] 软件进行差异筛选, 将 $|\log_2\text{Fold Change}| \geq 1$ 且 $\text{FDR} \leq 0.05$ 作为筛选标准。利用 Perl 脚本对差异基因进行 GO 数据库聚类分析

和 KEGG 通路富集分析。

对各样本中 miRNA 进行表达量统计, 并用 TPM 算法对表达量进行归一化处理。处理公式: 比对到某一 miRNA 的 Reads 数目 $\times 10^6$ 比对参考序列上的 Reads 数目, 采用 DESeq2 软件进行差异筛选, 以 $|\log_2\text{Fold Change}| \geq 1$ 且 $\text{FDR} \leq 0.05$ 为标准。根据发现的 miRNA 与对应物种的基因序列信息, 使用软件 Miranda (v3.3a)^[22] 进行靶基因预测。然后, 使用 BLAST (2.10.1)^[23] 软件将靶基因序列与 NR、Swiss-Prot、GO、COG、KOG、KEGG、Pfam 数据库比对, 获得靶基因的注释信息。

1.5 qPCR 验证

为了验证测序结果的准确性, 从转录组数据分析结果中随机挑选 20 个差异表达基因 (DEGs) 和 10 个差异表达 miRNA (DEMs) 进行验证。通过 Primer Premier 6.0 软件设计 mRNA 荧光定量 PCR 引物, miRprimer2 软件设计 miRNA 引物 (表 1), 并由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。分别以 $\beta\text{-actin}$ 和 U6 作为 DEGs 和 DEMs 相对表达量计算的内参, qPCR 在 ABI PRISM 7500 Real-time PCR 系统 (美国) 上进行。mRNA 荧光定量反应体系为 10 μL : 2 \times TB Green Premix Taq II 5 μL , 上、下游引物各 0.4 μL , cDNA 0.8 μL , RNase Free ddH₂O 3.4 μL 。反应程序: 95 $^\circ\text{C}$ 5 min 预变性; 95 $^\circ\text{C}$ 15 s 变性, 60 $^\circ\text{C}$ 45 s 退火, 共 40 个循环。miRNA 荧光定量反应体系为 25 μL : 2 \times TB Green Premix Taq II 12.5 μL , miRNA Specific Primer 0.5 μL , mRQ3' Primer 0.5 μL , cDNA 2.5 μL , RNase Free ddH₂O 9 μL 。反应程序: 95 $^\circ\text{C}$ 15 s 预变性, 95 $^\circ\text{C}$ 5 s 变性, 60 $^\circ\text{C}$ 20 s 退火, 共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[24] 计算基因相对表达量。

2 结果

2.1 转录组测序和差异表达基因的鉴定

通过测序组装, 共获得 83.01 Gb Clean Reads, Q30 碱基百分比在 93.91% 以上 (表 2), 说明组装和测序质量较好, 可用于后续分析。在 COG、GO、KEGG、KOG、Pfam、Swiss-prot、Nr 数据库中对获得的 25 371 个基因进行搜索和功能注释 (图 2-a)。其中, 通过 KEGG 和 Pfam 数据比对库的 Unigenes 数最高, 分别

表 1 mRNA 和 miRNA 的 qPCR 引物序列

Tab. 1 Sequences of qPCR primers for mRNAs and miRNAs

基因名称 gene name	正向引物序列(5'-3') forward primer sequence (5'-3')	反向引物(5'-3') reverse primer sequence (5'-3')
<i>krt18a.1</i>	ATGAAGCAGTCACAGCGAAGA	TTTCAAGTCTGTGGTGCTGGT
<i>si:dkey-183i3.5</i>	ATTTCGAGCTTGCGTATCAGT	CCAGCCCCAAAACCTACACC
<i>gys2</i>	TACTATGAACCATGGGGCTAC	TCAGCTGGTTACACGACTC
<i>p2ry1</i>	ACATTGCCTTTCAAATCAAACCC	CCCCTGTTTTAAAGGTAATTCCA
<i>enam</i>	ACAGCCCTGCAGTTGATGGA	TGAGCACCAGTAGGAACAACACC
<i>rho</i>	AGAATATCATCAATGCCGACT	GCAAACAGTGTGATGCCAAA
<i>si:dkey-91i10.3</i>	ATCTTCGCTGCTTTTGCCACA	ACCTCTTTGATCACGCAGTCC
<i>fkbp10b</i>	TCCGCTACCACTACAATGCC	CCTGCAAGCCTTTATCTATGCC
<i>krtt1c19e</i>	GCAGGTAAGAACACAGTCCAC	CCATCTCCTCATTGAGCCCTT
<i>zgc:136930</i>	GCAGGTAAGAACACAGTCCAC	CCATCTCCTCATTGAGCCCTT
<i>agt</i>	CTTGACTGCTGTGACTGACCT	TCCCTCTGCCATCTCAAACAC
<i>grb10a</i>	GTTCTTGCGCCGTTCTGG	TCTTCTGCCCGTCGTCA
LOC125276551	TGATGCTTCTCTCCTCCCA	TGCCACAGGTAAACCCTCTC
<i>hpda</i>	GAGGAAATGGGGGAGCATCTT	GTGGGTGTGTCTCCGTAAGT
<i>scarb1</i>	TGAAGTAAGGATGGCGGTGTC	GGAGAGTTCGTTCTCGGGTT
<i>apoeb</i>	CAAGGACACTGAGGAGATCCG	ATGGCTCTAAACGGTCCTTCG
<i>abhd4</i>	CGTCTACGTCTTTGACCTGCT	ATAGGATCATGCGTTCCAGCC
<i>c7b</i>	AATGGGCTGGATCAGTGAAGG	CAGTGCCTCTTTAGGTGGAG
<i>si:ch211-153b23.3</i>	GTGGGCCTTAGTGGTCTC	TTTAGCACGTAGCGTTGG
<i>acs11b</i>	GACTCGCACATCTCTTACC	ACGAATGTCACCCTGGAA
<i>β-actin</i>	CTCTGCTATGTGGCTCTTGAC	ATGGAGTTGAAGGTGGTCTC
miR-5119	CGCAGCATCTCATCCTG	TGGAACGCTTCACGAATTTGCG
miR-223	CGCAGGAGTATTTGACAGAC	TGGAACGCTTCACGAATTTGCG
miR-5108	GCAGGTAGAGCACTGGATG	TGGAACGCTTCACGAATTTGCG
miR-6547-5p	TGGGATGTGGGGACG	TGGAACGCTTCACGAATTTGCG
m2059-3p	CGCAGAGTGGAATATTCTGA	TGGAACGCTTCACGAATTTGCG
miR-7446-3p	CAGGCGGACGTGTGA	TGGAACGCTTCACGAATTTGCG
miR-200b-5p	GCATCTTACTGGGCAGCA	TGGAACGCTTCACGAATTTGCG
miR-252b-5p	GCTAAGTAGTACTGCCGA	TGGAACGCTTCACGAATTTGCG
miR-34a-5p	CAGTGGCAGTGTGGATAG	TGGAACGCTTCACGAATTTGCG
U6	GGAACGATACAGAGAAGATTAGC	TGGAACGCTTCACGAATTTGCG

为 25 327 个和 21 390 个, 占比为 99.83% 和 84.31%。只有 403 条 Unigenes 注释到 COG 数据库, 占比 1.59%。

表 2 样品 mRNA 测序数据统计

Tab. 2 Sample mRNA sequencing data statistics

样品编号 sample ID	条目数/条 read no.	碱基数/个 base no.	GC 含量/% GC	质控 Q30/% Q30
CK1	45 868 459	1.376 1E+10	47.97	94.00
CK2	51 212 092	1.536 4E+10	50.09	94.26
CK3	47 371 564	1.421 1E+10	48.19	94.06
PG1	43 656 851	1.309 7E+10	50.26	93.91
PG2	42 670 830	1.280 1E+10	47.69	94.42
PG3	45 930 915	1.377 9E+10	46.84	94.31

基于表达量对样本相关性分析结果显示, 重复样品之间的相关系数较高 (0.86~0.99), 说明样品采集合理。此外, 样品间基于基因表达进行的主成分分析结果显示, 2 组实验样本能获得有效区分; 检测到差异表达基因 930 个, 其中 473 个上调, 457 个下调 (图 2-b, c)。其中, 观察到一些和生长、骨骼发育相关的基因, 如骨形态发生蛋白 2 (*bmp2*)、*col2a1b*、胰岛素样生长因子结合蛋白 1 (*igfbp1*) 和转化生长因子 β 受体 2a (*tgfbr2a*) 等。

2.2 差异表达基因的 GO 和 KEGG 通路富集分析

对差异表达基因进行 GO 功能注释分析, 在分子功能方面, 主要富集在病毒粒子结合

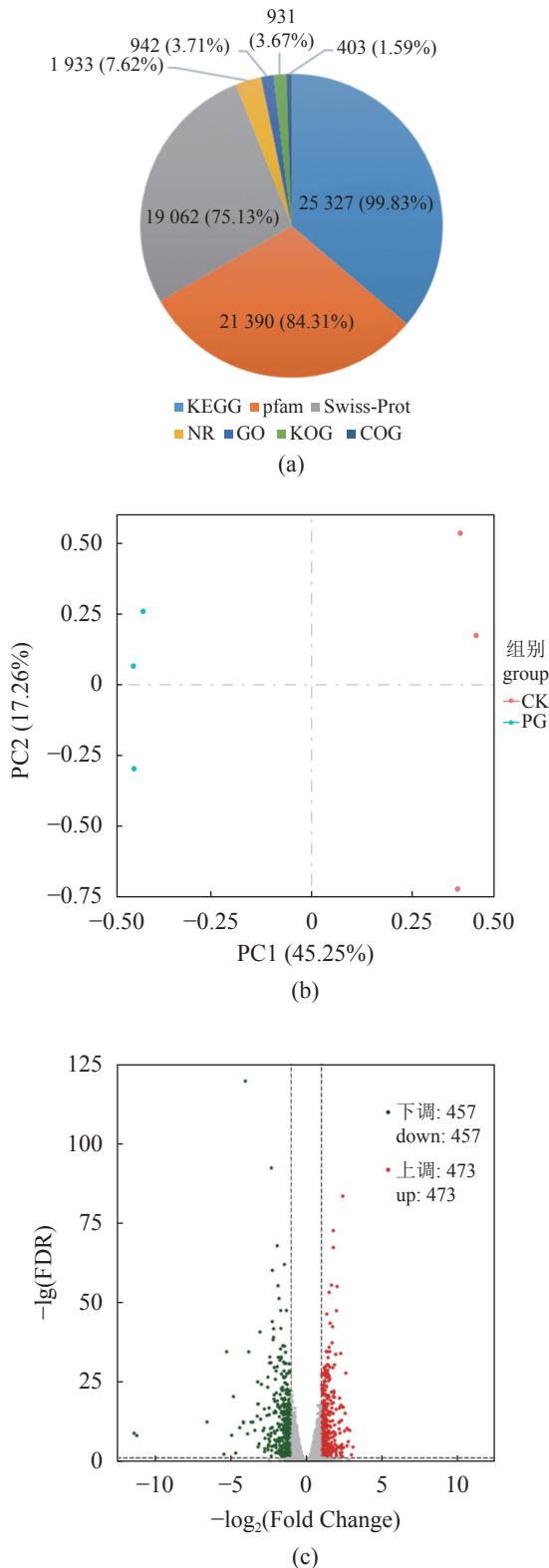


图 2 公共数据库中 Unigenes 注释统计的饼状图 (a)、样品间 PCA 分析 (b) 和差异表达基因火山图 (c)
 Fig. 2 Pie chart of Unigenes annotation statistics in public databases (a), inter-sample PCA analysis (b) and the volcano plot (c)

(GO:0046790)、岩藻糖结合 (GO:0042806) 等通路; 在生物学过程中, 大部分富集在巨噬细胞活化参与免疫应答 (GO:0002281)、肠道胆固醇吸收 (GO:0030299)、胆固醇稳态 (GO:0042632) 等通路; 在细胞组分方面, 主要注释在中间纤维 (GO:0005882)、细胞外空间 (GO:0005615) 等通路 (图 3-a)。此外, KEGG 通路富集分析结果显示, 差异表达基因显著富集在嘧啶代谢、DNA 复制、PPAR 信号通路、错配修复、FoxO 信号通路等 15 条代谢通路上 (图 3-b)。经过研究发现, 一些差异基因富集在与生长、骨骼发育相关的通路上, 如 FoxO 信号通路、MAPK 信号通路、TGF- β 信号通路、钙信号通路、Wnt 信号通路和肌动蛋白细胞骨架信号通路, 这些通路中的关键基因值得进一步研究。

2.3 miRNA 测序和差异表达 miRNA 的鉴定

共获得 7 755.98 Mb Raw Data, Q30 碱基百分比在 95.70% 以上 (表 3)。通过与 NR、Swiss-Prot、GO、COG、KOG、KEGG、Pfam 数据库比对, 获得靶基因注释信息。其中, 通过 NR 和 Pfam 数据库比对的靶基因数最高, 分别为 5 791 和 5 164 个, 占比为 99.93% 和 89.11% (图 4-a)。样品间的主成分分析结果表明, 2 组实验样本能获得有效区分 (图 4-b)。共检测到 8 325 个 miRNA, 其中 5 610 个为已知, 2 715 个为新发现。筛选出 146 个差异表达 miRNA, 其中 44 个上调, 102 个下调 (图 4-c)。

2.4 差异表达 miRNA 靶基因的 GO 和 KEGG 通路富集分析

对差异表达 miRNA 靶基因的 GO 和 KEGG 通路富集分析发现, 生物学过程中显著富集的是细胞黏附 (GO:0007155)、神经系统发育 (GO:0007399) 和 rRNA 加工 (GO:0006364) 等通路; 细胞组分中显著富集的是细胞骨架 (GO:0005856)、胶原蛋白三聚体 (GO:0005581) 和黏着斑 (GO:0005925) 等通路; 分子功能中显著富集的是转录因子结合 (GO:0008134)、ATP 结合 (GO:0005524) 和 DNA 结合转录因子 (GO:0003700) 的活性等通路 (图 5-a)。KEGG 注释显著富集在 Notch 信号通路、ECM 与受体的相互作用、Wnt 信号通路、黏着斑、黏附连接等 11 条代谢通路上 (图 5-b)。其中, Notch 信号通路、ECM 与受体的相互作用、Wnt 信号通路、

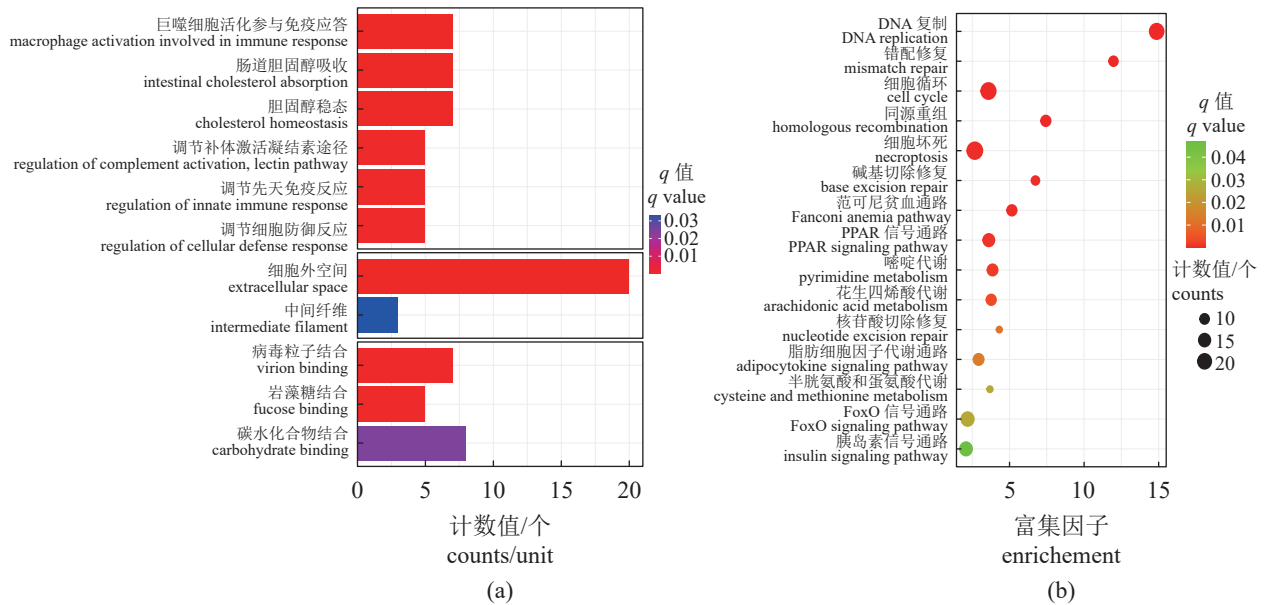


图3 差异表达基因 GO 富集条形图 (a) 和 KEGG 通路富集散点图 (b)

Fig. 3 GO enrichment bar graphs (a) and KEGG pathway enrichment scatter diagram (b) of differentially expressed genes

表3 样品 miRNA 测序数据统计

Tab. 3 Sample miRNA sequencing data statistics

样品编号 sample ID	条目数/条 read no.	碱基数/个 base no.	GC含量/% GC	质控Q30/% Q30
CK1	12 632 478	644 256 378	54.51	95.70
CK2	30 993 626	1 580 674 926	54.06	96.24
CK3	35 345 207	1 802 605 557	55.12	96.31
PG1	22 286 008	1 136 586 408	53.41	95.86
PG2	32 338 800	1 649 278 800	53.1	96.38
PG3	18 481 829	942 573 279	53.56	96.54

VEGF 信号通路、MAPK 信号通路、黏着斑通路、黏附连接、Apelin 信号通路与生长、骨骼发育相关。

2.5 miRNA-mRNA 联合分析

为了预测 mRNA 与差异表达 miRNA 间的调控关系, 在发现的 191 个靶基因对中选取连通性较高的 21 个关键基因和 25 个关键 miRNA, 构建了 miRNA-mRNA 互作网络, 这些 mRNA 和 miRNA 可能与生长和骨骼发育相关。每个 miRNA 可能靶向单个或多个基因, 每个基因可能受单个或多个 miRNA 调控。结果显示, *apob*、*tgfbr2a*、*col2a1b*、*mcm2* 受到 miR-34a-5p、m0774-5p、m0920-5p、m2125-5p、m2320-3p 等

负调控 (图 6-a)。差异 miRNA 靶基因和差异基因共获得 140 个共同基因, 选取前 16 个关键基因绘制互作网络 (图 6-b), 其中, *mcm4*、*ccna2*、*smc2* 和 *chek2* 都富集在细胞周期信号通路上。

2.6 qPCR 验证

为了验证 sRNA-Seq 和 RNA-Seq 测序的准确性, 分别随机挑选了 10 个 miRNAs 和 20 个 mRNAs 进行 qPCR 验证, 结果与 sRNA-Seq 和 RNA-Seq 数据一致, 说明 sRNA-Seq 和 RNA-Seq 数据具有较高的可信度 (图 7)。

3 讨论

为探究鳙的生长与骨骼发育的分子机制, 本研究通过高通量测序分析比较鳙正常体型和缩骨体型个体的调控差异, 获得了 83.01 Gb 的转录本序列和 7 755.98 Mb 的 miRNA 序列, Q30 碱基百分比分别在 93.91% 和 95.70% 以上, 对样品间的基因表达进行了主成分分析, 能有效区分 2 组样品, qPCR 验证结果与转录组数据一致, 说明本研究具有较高的可信度, 可以为缩骨鳙形成机制提供分子数据支撑, 为进一步开展鳙体型优势改良提供参考。

鱼类的体型差异主要受遗传和环境因素决定^[25]。本研究在相同的养殖环境下, 探究鳙体

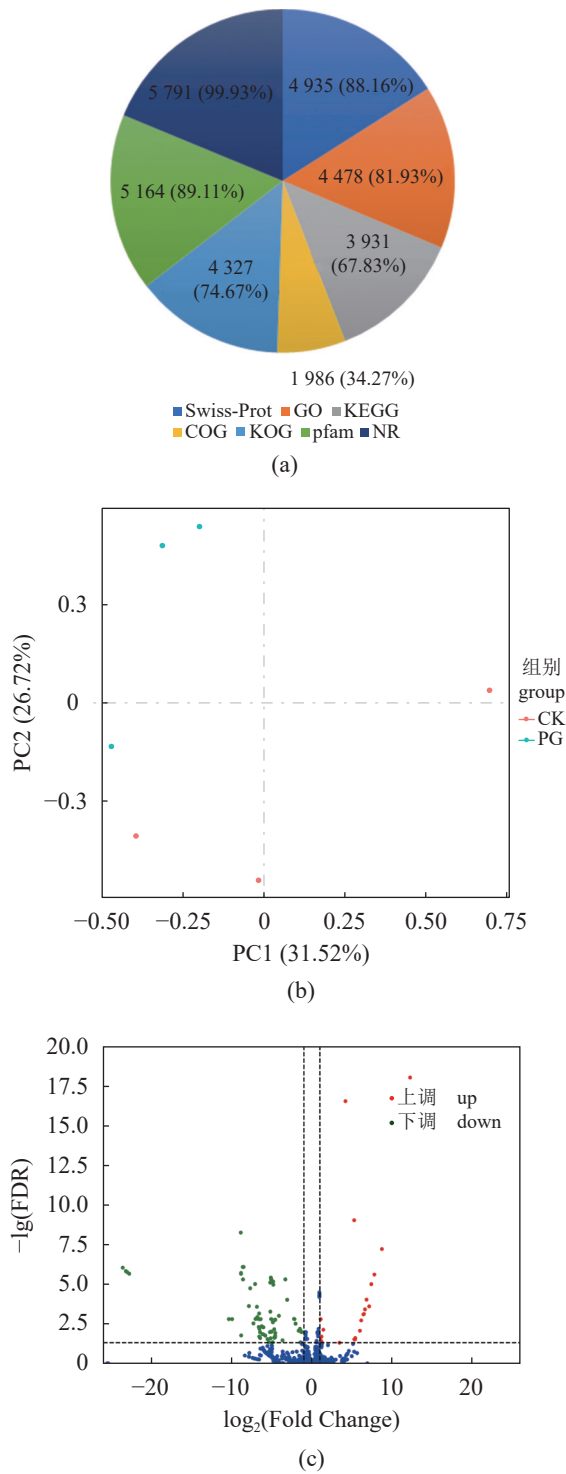


图 4 公共数据库中 miRNA 靶基因注释统计的饼状图 (a)、样品间 PCA 分析 (b) 和差异表达 miRNA 火山图 (c)

Fig. 4 Pie chart of annotation statistics of miRNA target genes in public databases (a), inter-sample PCA analysis (b) and differentially expressed miRNA volcano plot (c)

型差异个体的基因表达情况, 研究中共得到了 930 个差异表达基因和 146 个差异表达 miRNA, 其中发现了与生长和骨骼发育相关的基因, 如 *tgfbr2a*、*grb10*、*igfbp1*、*fgf19*、*col2a1b* 和 *ccna2* 等。基于现有研究报道, 这些基因可能与鱼类的头部形态和大小有关。例如, 在对黄河鲤进行 QTL 定位研究中, *grb10* 和 *igf1* 已经被鉴定为与头型大小相关的候选基因^[6]。对鲃 (*Silurus asotus*) 的头长、头宽和头高进行研究, 发现 *igf1*、*itga11b* 和 *fgf5* 基因控制头骨的形态和大小^[26]。本实验在鳊中筛选到上述与体型相关基因的同源基因, 如 *itga11b*、*igfbp1* 和 *fgf19*。此外, *col2a1b* 是软骨发育和软骨质骨化的关键调节蛋白, 是编码 I 型胶原 $\alpha 1$ 、 $\alpha 3$ 和 $\alpha 2$ 链的关键基因^[27], *col2a1b* 在鱼类背侧肌肉的表达水平显著, 尤其在鱼类肌间刺全部出现时期表达水平达到最高^[28]。在本研究筛选出与生长和骨骼发育相关基因中下调倍数最大的是 *col2a1b*, 说明缩骨鱼在肌肉生长和骨形成过程中受到了抑制。*tgfbr2a* 是 TGF- β 家族中的一员, 作为一种多功能调节蛋白, 同时参与 FoxO 信号通路、MAPK 信号通路和 TGF- β 信号通路, 在水产动物免疫防御、生长发育以及生殖调节过程中发挥重要作用^[29]。研究表明, *tgfbr2a* 等差异表达基因可能与缩骨鱼形成和维持存在联系。

对差异 miRNA 的靶向基因和转录组测序的 DEGs 的联合分析鉴定到一些关键基因, 如 *mcm2*、*mcm4*、*mcm10*、*exol*、*ccna2*。*mcm2*、*mcm4*、*mcm10* 都是 MCM 家族成员, 对 DNA 复制至关重要, 具有多种生化活性, 尤其是细胞分化和增殖。*mcm2* 具有促进细胞凋亡的作用, *mcm2* 的高表达会导致骨髓细胞的增殖^[30], *mcm4* 可能与成骨细胞的形成有关^[31-32], *mcm10* 是 DNA 复制中重要的蛋白质, 可以在遗传水平上调节软骨细胞的产生和凋亡^[33]。*exol* 是核酸外切酶, 在 DNA 修复中起到关键作用, 与癌症有关, *exol* 表达与骨肉瘤致病机制相关^[34]。*ccna2* 是细胞周期蛋白, 在骨生成和软骨生成中起到重要作用^[35]。*apob* 在 DEGs 与差异表达 miRNA 间的调控关系中连通性较高, 前人研究发现 *apob* 是载脂蛋白 B, 参与脂蛋白代谢过程, 与骨密度存在联系, 可能会导致骨质疏松症^[36]。通过分析得到了 19 个关键的 miRNA, 包含 6

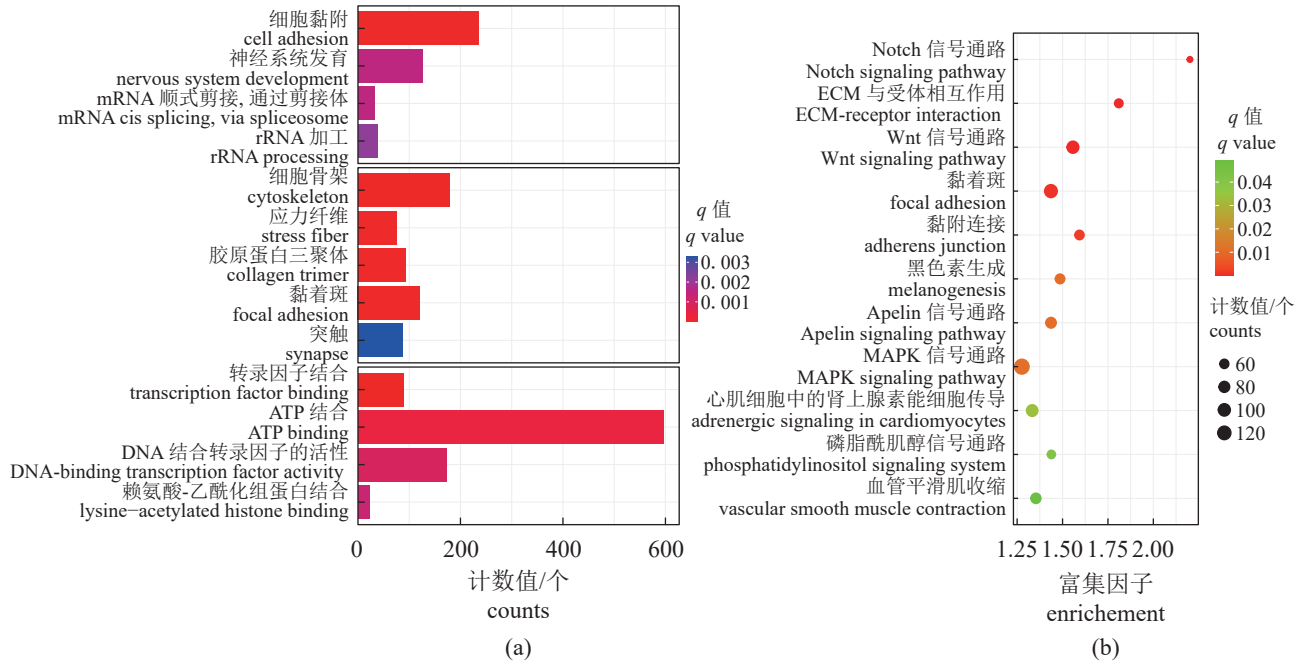


图 5 miRNA 靶基因 GO 富集条形图 (a) 和 KEGG 通路富集散点图 (b)

Fig. 5 GO enrichment bar graphs (a) and KEGG pathway enrichment scatter diagram (b) of miRNA target genes

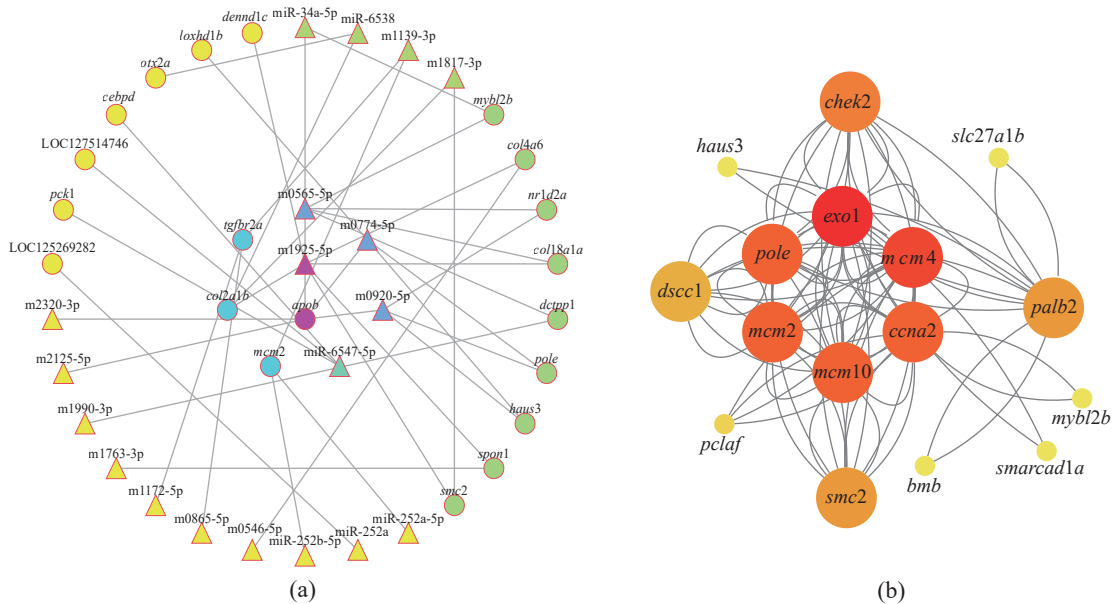


图 6 miRNA 和 mRNA 之间相互作用网络 (a) 以及 miRNA 靶基因与差异表达 mRNAs 重复前 16 个关键基因互作网络 (b)

颜色越深代表重要程度越高, 不同形状代表不同基因。

Fig. 6 Interaction networks between miRNAs and mRNAs (a) and between 16 first key genes of miRNA target genes coincident with differentially expressed mRNAs (b)

Darker colors represent higher importance, different shapes represent different genes.

个已知的 miRNA 和 13 个未知的 miRNA。miR-34a-5p 是促进间充质干细胞的增殖和成骨细胞的分化的关键调节因子, 可以通过靶向 mRNA 促进细胞增殖, 阻碍细胞凋亡^[37]。本研究中

miR-34a-5p 靶向 *apob* 和 *mybl2b*, 可能在鳙的头部发育过程中起到重要作用。miR-252 家族可以调节细胞分化、生物体发育和氧化应激等, Sun 等^[38] 发现 miR-252 家族在仿刺参 (*Stichopus*

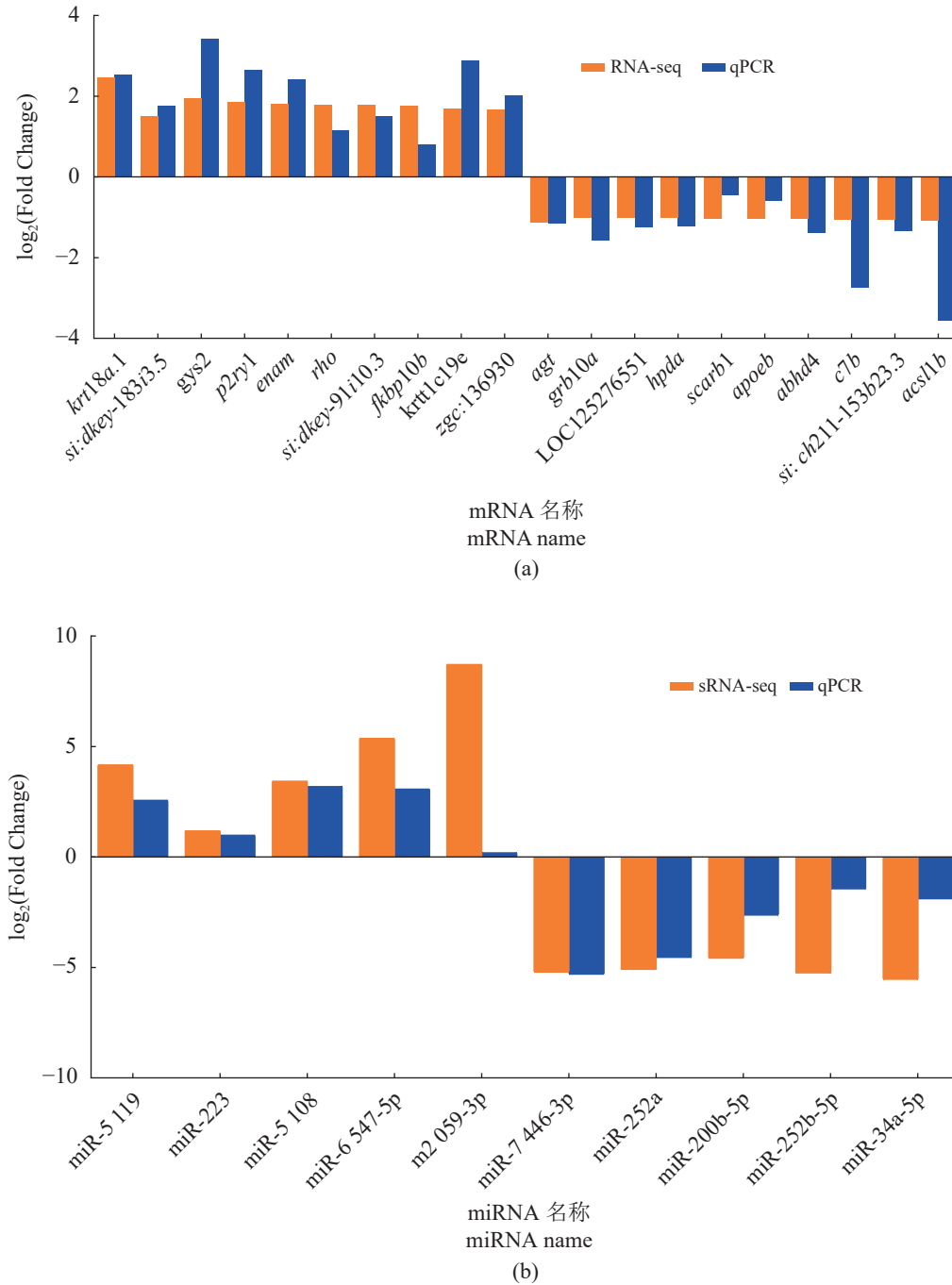


图 7 qPCR 验证结果

(a) mRNA 验证结果, (b) miRNA 验证结果。

Fig. 7 qPCR validation results

(a) mRNA validation results, (b) miRNA validation results.

japonicus) 的肠道再生中发挥重要作用。miR-6538 参与蛋白质的合成, 可能与患糖尿病小鼠的心肌细胞存活^[39]、肝损伤^[40]密切相关。通过对不同体型的鳙进行差异表达分析, 发现的关键差异基因和差异 miRNA 参与生长、发育、代谢和免疫等多种生命活动, 对鳙体型有重要的影响,

有望为后续的研究筛选分子标记, 基于基因编辑手段调控骨骼发育过程, 创制新种质。

基因的表达往往存在互作效应, 并通过代谢通路对表型和生命过程发挥作用。本研究检测所得的差异表达基因和差异表达 miRNA, 存在于诸多代谢通路, 可能在鳙的生长与骨骼形

成等过程中发挥作用, 从而影响鳙的体型差异。本研究发现的 MAPK 信号通路、ECM 受体相互作用和 TGF- β 信号通路与 Luo 等^[7]的研究结果一致。通过 KEGG 分析发现, 显著富集的通路可能与生长和骨骼发育相关, 如 FoxO 信号通路、MAPK 信号通路、ECM 受体相互作用、Wnt 信号通路和 Notch 信号通路等 8 条代谢通路, FoxO 是一类重要的转录因子, 参与了多个生物学过程的调控, FoxO1 家族成员还是成骨细胞增殖分化的关键转录因子, 与 mTOR 信号通路和 VEGF 信号通路相互作用, 调节骨骼发育^[41]。MAPKs 是一种丝氨酸-苏氨酸激酶, 是一类高度保守的蛋白激酶家族, 参与细胞增殖、分化、衰老和凋亡等生命活动, 诱导蛋白质合成并促进骨骼肌生长^[42-43]。此外, p38 作为 MAPKs 家族的一员, 激活后在骨骼增殖和分化中发挥重要作用^[44]。ECM 受体相互作用和黏着斑信号通路在生长发育中也发挥重要的作用^[45], 黏着斑是具有整合素的多蛋白组装体, 通过细胞骨架连接着周围细胞外基质 (ECM) 的质膜, 可以通过影响细胞信号转导, 调节肌肉细胞与骨骼细胞的形成^[46]。Wnt 信号通路在骨骼发育和内环境平衡中发挥核心作用, 促进成骨细胞分化, 诱导破骨细胞的形成, 调控软骨的生成^[47]。鱼类的体型形成可能与骨骼的形成和发育有关, Notch 信号通路对骨骼发育和骨骼重塑至关重要, 是破骨细胞发育的调节因子^[48], Notch 是一种跨膜受体, 在未成熟的骨细胞中通过抑制 Wnt 信号传导阻碍成骨细胞形成, 在成熟的骨细胞中抑制细胞分化功能^[49]。综上, 本研究发现的关键基因和代谢通路可为鳙生长和骨骼发育调控相关候选基因挖掘提供依据, 为开展基于体型优势的遗传改良和品种创制提供参考。

参考文献 (References):

- [1] 董在杰, 赵永锋. 鳙种质资源保护与利用 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2023.
Dong Z J, Zhao Y F. Protection and utilization of *Hypophthalmichthys nobilis* germplasm resources[M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 2023 (in Chinese).
- [2] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2023 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2023.
Bureau of Fisheries and Aquaculture Administration, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. 2023 China fishery statistical yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2023 (in Chinese).
- [3] Peng B, Xie Y W, Zhang L, et al. Changes of fatty acid compositions, volatile compounds, and microbial flora of bighead carp (*Aristichthys nobilis*) heads during the simulated fresh logistics transportation[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2023, 2023(1): 8336322.
- [4] 高晓霞. 缩骨大头: 成本和普通鳙鱼相当, 鱼价翻倍 [J]. 海洋与渔业, 2016(3): 43.
Gao X X. Bighead carp with shortened body shape: cost same as normal bighead carp, but price doubled[J]. Ocean and Fishery, 2016(3): 43 (in Chinese).
- [5] 陈崎凤, 缪凌鸿, 梁政远. 江苏地区缩骨大头两种养殖模式试验比较 [J]. 科学养鱼, 2016(10): 23-24.
Chen Q F, Miao L H, Liang Z Y. Comparison of two culture models of bighead carp with shortened body shape in Jiangsu province[J]. Scientific Fish Farming, 2016(10): 23-24 (in Chinese).
- [6] Chen L, Peng W Z, Kong S N, et al. Genetic mapping of head size related traits in common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Frontiers in Genetics*, 2018, 9: 448.
- [7] Luo W W, Wang J R, Yu X M, et al. Comparative transcriptome analyses and identification of candidate genes involved in vertebral abnormality of bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2020, 36: 100752.
- [8] 李强, 郑鹏, 黄文炜, 等. 缩骨鲫 *Cyt b* 基因和控制区序列克隆及系统进化分析 [J]. 湖南农业科学, 2023(10): 7-10,25.
Li Q, Zheng P, Huang W W, et al. Sequence cloning and phylogenetic analysis of *Cyt b* gene and control region in mtDNA of *Carassius auratus* var. *Suogu*[J]. Hunan Agricultural Sciences, 2023(10): 7-10,25 (in Chinese).
- [9] 杨扬, 周惠强, 舒璇, 等. 缩骨鲫 (*Carassius auratus sogu* var.) MC4R 克隆、组织分布以及与生长相关 SNPs 的筛选 [J]. 海洋与湖沼, 2017, 48(4): 830-837.
Yang Y, Zhou H Q, Shu H, et al. Clone, expression, and screening of growth associated SNPs of *Carassius auratus sogu* var.[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2017, 48(4): 830-837 (in Chinese).
- [10] Yang J X, Chen X L, Bai J, et al. The *Sinocyclocheilus* cavefish genome provides insights into cave adaptation[J]. *BMC Biology*, 2016, 14(1): 1.
- [11] 罗辉, 叶华, 肖世俊, 等. 转录组学技术在水产动物研究中的

- 运用[J]. 水产学报, 2015, 39(4): 598-607.
- Luo H, Ye H, Xiao S J, *et al.* Application of transcriptomics technology to aquatic animal research[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(4): 598-607 (in Chinese).
- [12] 曾爽, 刘宣歌, 王鹏飞, 等. 全同胞家系中生长差异翘嘴鳊肌肉转录组分析[J]. 中国水产科学, 2020, 27(1): 53-61.
- Zeng S, Liu X G, Wang P F, *et al.* Muscle transcriptome of *Siniperca chuatsi* with different weights from a full-sib family[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(1): 53-61 (in Chinese).
- [13] Peng J X, Zeng D G, He P P, *et al.* mRNA and microRNA transcriptomics analyses in intermuscular bones of two carp species, rice flower carp (*Cyprinus carpio* var. *Quanzhounensis*) and Jian carp (*Cyprinus carpio* var. *Jian*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part D: Genomics and Proteomics*, 2019, 30: 71-80.
- [14] Wan S M, Yi S K, Zhong J, *et al.* Dynamic mRNA and miRNA expression analysis in response to intermuscular bone development of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 31050.
- [15] Kim D, Paggi J M, Park C, *et al.* Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(8): 907-915.
- [16] Perteu M, Kim D, Perteu G M, *et al.* Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown[J]. *Nature Protocols*, 2016, 11(9): 1650-1667.
- [17] Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads[J]. *EMBnet journal*, 2011, 17(1): 10-12.
- [18] Langmead B. Aligning short sequencing reads with Bowtie[J]. *Current Protocols in Bioinformatics*, 2010, 32(1): 11.7. 1-11.7. 14.
- [19] Li Y, Wan L Q, Bi S Y, *et al.* Identification of drought-responsive microRNAs from roots and leaves of alfalfa by high-throughput sequencing[J]. *Genes*, 2017, 8(4): 119.
- [20] 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]. *Nature Biotechnology*, 2010, 28(5): 511-515.
- [21] Love M I, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-Seq data with DESeq2[J]. *Genome Biology*, 2014, 15(12): 550.
- [22] Erickson S L, Salekin K L, Johnson L N, *et al.* The predictive power of intelligence: miranda abilities of individuals with intellectual disability[J]. *Law and Human Behavior*, 2020, 44(1): 60-70.
- [23] Altschul S F, Madden T L, Schäffer A A, *et al.* Gapped blast and psi-blast: a new generation of protein database search programs[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(17): 3389-3402.
- [24] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [25] Costa C, Vandeputte M, Antonucci F, *et al.* Genetic and environmental influences on shape variation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)[J]. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2010, 101(2): 427-436.
- [26] Geng X, Liu S K, Yao J, *et al.* A genome-wide association study identifies multiple regions associated with head size in catfish[J]. *G3 Genes| Genomes| Genetics*, 2016, 6(10): 3389-3398.
- [27] Gistelink C, Gioia R, Gagliardi A, *et al.* Zebrafish collagen type I: molecular and biochemical characterization of the major structural protein in bone and skin[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 21540.
- [28] 廖青, 万世明, 王旭东, 等. 鱼类 I 型与 II 型胶原蛋白基因系统进化及其在有/无肌间骨代表鱼中的表达比较分析[J]. 水生生物学报, 2021, 45(2): 318-326.
- Liao Q, Wan S M, Wang X D, *et al.* Phylogeny and comparative expression analysis of type I and type II collagen genes in the representative fish species with and without intermuscular bones[J]. *Journal of Hydrobiology*, 2021, 45(2): 318-326 (in Chinese).
- [29] Zhan X L, Ma T Y, Wu J Y, *et al.* Cloning and primary immunological study of TGF- β 1 and its receptors T β R I /T β R II in tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2015, 51(1): 134-140.
- [30] Suzuki S, Kurata M, Abe S, *et al.* Overexpression of MCM2 in myelodysplastic syndromes: association with bone marrow cell apoptosis and peripheral cytopenia[J]. *Experimental and Molecular Pathology*, 2012, 92(1): 160-166.
- [31] Shi Q X, Li S H, Lyu Q, *et al.* Hypoxia inhibits cell cycle progression and cell proliferation in brain microvascular endothelial cells via the miR-212-3p/MCM2 axis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(3): 2788.
- [32] Sauer T, Facchinetti G, Kohl M, *et al.* Protein expression of AEBP1, MCM4, and FABP4 differentiate osteogenic, adipogenic

- genic, and mesenchymal stromal stem cells[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(5): 2568.
- [33] Liu X Z, Xiao H M, Peng X T, *et al.* Identification and comprehensive analysis of circRNA-miRNA-mRNA regulatory networks in osteoarthritis[J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 13: 1050743.
- [34] Lu Y, Huang P P, Li Y L, *et al.* The FBXO32/ATR/ATM axis acts as a molecular switch to control the sensitivity of osteosarcoma cells to irradiation through its regulation of EXO1 expression[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2023, 55(5): 842-852.
- [35] Liu F X, Dong J, Zhang P, *et al.* Transcriptome sequencing reveals key genes in three early phases of osteogenic, adipogenic, and chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in rats[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2022, 8: 782054.
- [36] Zhu R J, Xu Y, Wang Z F, *et al.* Higher serum apolipoprotein B level will reduce the bone mineral density and increase the risk of osteopenia or osteoporosis in adults[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2022, 10: 1054365.
- [37] Sun D W, Chen Y H, Liu X C, *et al.* miR-34a-5p facilitates osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells and modulates bone metabolism by targeting *hdac1* and promoting ER- α transcription[J]. *Connective Tissue Research*, 2023, 64(2): 126-138.
- [38] Sun L N, Sun J C, Li X N, *et al.* Understanding regulation of microRNAs on intestine regeneration in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* using high-throughput sequencing[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part D: Genomics and Proteomics*, 2017, 22: 1-9.
- [39] Wang T, Yuan L L, Chen Y X, *et al.* Expression profiles and bioinformatic analysis of microRNAs in myocardium of diabetic cardiomyopathy mice[J]. *Genes & Genomics*, 2023, 45(8): 1003-1011.
- [40] Zheng W J, Wang T, Liu C X, *et al.* Liver transcriptomics reveals microRNA features of the host response in a mouse model of dengue virus infection[J]. *Computers in Biology and Medicine*, 2022, 150: 106057.
- [41] Zhang X, Yalcin S, Lee D F, *et al.* FOXO1 is an essential regulator of pluripotency in human embryonic stem cells[J]. *Nature Cell Biology*, 2011, 13(9): 1092-1099.
- [42] Chen J Q, Long F X. mTOR signaling in skeletal development and disease[J]. *Bone Research*, 2018, 6: 1.
- [43] Kim E K, Choi E J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2010, 1802(4): 396-405.
- [44] He H R, Yin H D, Yu X K, *et al.* PDLIM5 affects chicken skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation via the p38-MAPK pathway[J]. *Animals*, 2021, 11(4): 1016.
- [45] Wu P F, Zhang X C, Zhang G X, *et al.* Transcriptome for the breast muscle of Jinghai yellow chicken at early growth stages[J]. *PeerJ*, 2020, 8: e8950.
- [46] Chen S, He T L, Zhong Y M, *et al.* Roles of focal adhesion proteins in skeleton and diseases[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2023, 13(3): 998-1013.
- [47] D'Souza D G, Rana K, Milley K M, *et al.* Expression of Wnt signaling skeletal development genes in the cartilaginous fish, elephant shark (*Callorhynchus milii*)[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 193: 1-9.
- [48] Bai S T, Kopan R, Zou W, *et al.* NOTCH1 regulates osteoclastogenesis directly in osteoclast precursors and indirectly via osteoblast lineage cells[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(10): 6509-6518.
- [49] Zanotti S, Canalis E. Notch signaling and the skeleton[J]. *Endocrine Reviews*, 2016, 37(3): 223-253.

Integrated analysis of transcriptome and miRNA expression in *Hypophthalmichthys nobilis* individuals with different body shapes

DENG Yujie¹, ZHU Wenbin², FU Jianjun², LUO Mingkun², WANG Lanmei²,
LIANG Zhengyuan³, DONG Zaijie^{1,2*}

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

2. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resource Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs,
Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081;

3. Wuxi Raysun Fishery Science and Technology Co., Ltd., Wuxi 214000

Abstract: To explore the molecular mechanisms affecting the body shape differences in *Hypophthalmichthys nobilis*, morphological different *H. nobilis* individuals with normal body shape (CK group) and with shortened body (PG group) were collected for transcriptome and miRNA sequencing analysis in this study. The results showed that a total of 25 327 unigenes and 8 325 miRNAs were obtained. 930 differentially expressed genes (DEGs) and 146 differentially expressed miRNAs (DEMs) were identified, including 473 up-regulated genes and 457 down-regulated genes, as well as including 44 up-regulated miRNAs and 102 down-regulated miRNAs, respectively. By comparing the DEGs and target genes of DEMs, 140 overlapped genes were obtained, which were mostly enriched in cell cycle (ko04110), DNA replication (ko03030), adhesion plaques (ko04510), and ECM receptor interaction (ko04512) signaling pathways. Additionally, 16 overlapped DEGs were identified to be involved in bone formation and development, such as *exo1*, *mcm4*, *ccna2*, *smc2* and *ccna2*, which were hypothesized to be associated with *H. nobilis* body shape differences. In addition, through mRNA-miRNA interaction network analysis, DEGs including *apob*, *tgfbr2a* and *col2a1b* as well as DEMs including miR-34a-5p, miR-252a and miR-6547-5p were detected as core members in the network; these DEGs and DEMs may play important roles in regulating and maintaining the morphologically in *H. nobilis*. Validation experiments using qPCR revealed that the trends of relative expression differences between CK with PG groups were consistent with the RNA-Seq and sRNA-Seq data. These DEGs, DEMs, and enriched metabolic pathways identified in this study may be associated with *H. nobilis* body shape difference. This study may provide basic data for further exploration of the molecular mechanisms affecting body shape differences in *H. nobilis*.

Key words: *Hypophthalmichthys nobilis*; body shape; skeletal development; differentially expressed genes; differentially expressed miRNAs

Corresponding author: DONG Zaijie. E-mail: dongzj@ffrc.cn

Funding projects: Earmarked Fund China Agriculture Research System (CARS-45); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, Chinese Academy of Fishery Sciences (2023JBFZ02, 2023JBFM07)