

文章编号: 1000-0615(2019)08-1714-09

DOI: 10.11964/jfc.20180811419

基于转录组测序技术筛选花鲢卵巢发育相关基因

刘慧芬, 卢良盛, 王静, 周传江, 顾钱洪,
马晓, 冯军厂, 聂国兴, 李学军*

(河南师范大学水产学院, 河南省水产动物养殖工程技术研究中心, 河南新乡 453007)

摘要: 为筛选影响花鲢卵巢发育相关的基因, 采用Illumina Hiseq技术对花鲢脑、卵巢和肝脏组织进行高通量转录组测序。结果显示, 3个组织分别产生了49 484 132、47 540 538和50 622 304个clean reads, 组装后共获得了99 878个unigenes, 平均长度为1 430 bp。DE seq分析发现, 在脑vs.卵巢组中特异性表达的基因数为2 305个, 脑vs.肝脏组中特异性表达的基因数为839个, 卵巢vs.肝脏组中特异性表达的基因数为1 474个, 3个比较组共有的差异表达基因数为860个。GO分析发现, 上述差异表达基因主要集中在初级代谢过程(primary metabolic process)、单细胞过程(single-organism process)、有机物代谢过程(organic substance metabolic process)等生物学过程中。KEGG pathway分析显示, 一些与卵巢发育和减数分裂相关的信号通路得到了显著富集, 如GnRH信号通路、类固醇激素合成、TGF- β 信号通路、卵母细胞减数分裂等代谢通路。本研究结果丰富了花鲢的基因资源, 可为花鲢的繁殖生物学研究提供基础数据。

关键词: 花鲢; 卵巢发育; 转录组

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

鱼类的繁殖是生物学领域研究热点。大部分硬骨鱼类都是卵生动物, 在雌性生殖系统中产生卵黄, 同时伴随着卵母细胞的生长和分化。鱼类的卵子发育过程可分为卵原细胞增殖期、初级卵母细胞生长期、卵黄生成期及卵母细胞成熟期^[1]。在卵子发生的不同阶段, 一些特定的基因和激素对卵母细胞的发育起到关键的调控作用。卵巢作为卵子形成的部位, 是鱼类繁殖活动的基础, 对维持种群的繁衍具有重要的意义。

以往关于雌性动物生殖的研究多集中在模式生物中, 且这些研究多聚焦在少数基因中, 如cyp19^[2]、wnt4^[3-4]、foxl2^[5]和R-spondin1^[6-7]等。在非模式生物中, 传统方法对基因的克隆是基于同源基因的保守序列进行PCR扩增, 这种方法费时费力, 限制了大量基因的功能研究。近年

来, 转录组学技术的应用为动物性腺分化与发育研究提供了宝贵的研究方法, 如在鸡(*Gallus gallus*)^[8]、鸿雁(*Anser cygnoides*)^[9]、金枪鱼(*Thunnus thynnus*)^[10]、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[11]、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[12]、皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)^[13]中采用转录组学研究, 筛选出大量生殖相关候选基因。

花鲢(*Hemibarbus maculatus* Bleeker)是我国淡水养殖中较为名贵的经济鱼类之一, 广泛分布于南北各大水系。因其肉质细嫩、出肉率高、刺少, 而且蛋白质和多不饱和脂肪酸(PUFA)的含量要高于其他鲤科名优养殖鱼类, 具有较好的保健功能, 因此深受广大消费者的喜爱^[14]。有关花鲢的养殖和人工繁殖技术已有较多的报道^[15-16]。在繁殖生物学方面, 也对其胚胎发育^[17]、性腺发

收稿日期: 2018-08-22 修回日期: 2018-11-07

资助项目: 河南省创新型科技团队支持计划(CXTD2016043); 河南省科技攻关重点项目(162102110147; 182102110383); 农业农村部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室开放课题; 河南师范大学博士科研启动课题(qd15186); 河南师范大学校青年基金

通信作者: 李学军, E-mail: xjli@htu.cn

育^[18]等进行过研究,但在分子水平上的研究还比较少。目前,公共数据库中关于花鲮基因序列信息非常少,只有100多条核苷酸序列,其中大部分为线粒体基因序列。由于基因信息不足而限制了对花鲮卵巢分化与发育机制的了解。为研究花鲮卵巢发育信号通路,本实验通过高通量测序技术构建花鲮卵巢转录组文库。考虑到鱼类生殖活动受下丘脑-垂体-性腺轴(hypothalamic-pituitary-ovary axis,简称HPG轴)调控,同时还受肝脏内性激素合成及卵黄物质积累的影响^[1,19],因此,本实验构建了花鲮脑、卵巢和肝脏的转录组文库,通过RNA-seq测序筛选出与卵巢发育相关的基因与信号通路,为提高花鲮雌性繁殖能力提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用鱼为本实验室人工繁殖,随机挑选30尾同一批次,且饲养条件一致的1龄花鲮,测定其全长、体长、体高和体质量,并快速分离脑、肝脏和卵巢组织,贮存于液氮中备用。

1.2 文库构建与测序

将样本等量混合,抽提RNA并质检合格后,用带有Oligo(dT)的磁珠富集mRNA,并加入fragmentation buffer将mRNA处理成大小约200 bp的短片段。随后以mRNA为模板,分别合成第一链和第二链cDNA。第二链cDNA用AMPure XP beads纯化,经末端修复、加接头后进行PCR扩增,最后用AMPure XP beads纯化产物,完成文库构建工作。文库质检合格后,上机进行Illumina HiSeq测序。

1.3 数据拼接和功能注释

Illumina HiSeq测序得到原始数据(raw reads)。由于刚下机的数据包括接头和一些低质量片段,首先对raw reads进行测序数据质量评估,将带接头的、低质量的reads过滤得到clean reads,最后将获得的clean reads用Trinity^[20]软件进行序列拼接。为获得全面的基因功能信息,将拼接所得的unigene与NR、NT、PFAM、KOG、KO、Swiss Prot、GO和KEGG等数据库进行比对注释。

1.4 差异表达基因的筛选

采用Bowtie将测序得到的unigene进行比对,

基因表达量用FPKM结合RSEM进行估算,FPKM计算公式: $FPKM = \frac{cDNA \text{ fragments}/mapped \text{ fragments (millions)}}{transcript \text{ lengths (kb)}}$ 。利用DEGseq对脑vs.卵巢、脑vs.肝脏以及卵巢vs.肝脏样品组间的差异表达分析,获得不同组织间的差异表达基因。在筛选过程中,以 $qvalue < 0.005$ 且 $\log_2 |fold_change| > 1$ 为筛选阈值。

2 结果

2.1 转录组序列

对花鲮脑、卵巢和肝脏进行转录组测序,分别得到了49 484 132、47 540 538和50 622 304条clean reads。用Trinity软件拼接得到的转录组作为参考序列,共获得了99 878个unigenes,长度范围在201~27 528 bp,平均长度1 430 bp。其中脑中有35 442 818条reads有比对结果(71.62%),卵巢中有34 980 768条reads有比对结果(73.58%),肝脏中有39 653 926条reads有比对结果(78.33%)。

2.2 转录组序列注释

将unigene与NR、NT、PFAM、KO、KOG、Swiss-Prot和GO等7个数据库进行比对,7个数据库都有注释的基因数为13 032,注释率为13.04%。其中比对到NR库的基因数为51 568,注释率为51.63%;比对到NT库的基因数为82 201,注释率为82.30%;比对到PFAM库的基因数为43 829,注释率为43.88%;比对到KO库的基因数为26 557,注释率为26.58%;比对到KOG库的基因数为21 824,注释率为21.85%;比对到Swiss Prot库基因数为45 535,注释率为45.59%;比对到GO库基因数为45 040,注释率为45.09%(图1)。

GO分析覆盖3个ontology,分别描述基因的分子功能(molecular function)、细胞组分(cellular component)以及生物学过程(biological progress)。对花鲮转录组进行GO分析,共有45 040个unigenes/得到注释,其中注释到生物学过程的unigenes/最多,有144 261个;其次为细胞组分,有83 634个;注释到分子功能的unigenes/有57 931个。在分子功能富集的条目中,结合功能(GO: 0005488 binding)和催化活性(GO: 0003824 catalytic activity)占主要的功能类型;在细胞组分中,与细胞(GO: 0005623 cell)、细胞组分(GO: 0044464 cell part)相关的基因富集较多;在生物学过程中,与细胞过程(GO:

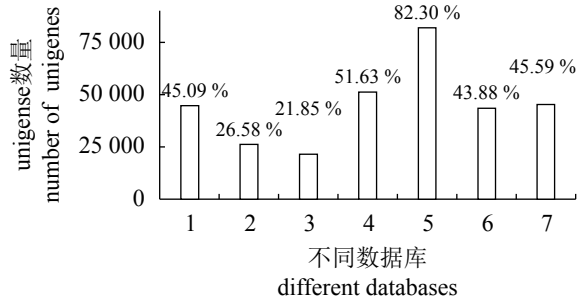


图1 花鲷序列在7个数据库中的注释情况

1. GO数据库, 2. KO数据库, 3. KOG数据库, 4. NR数据库, 5. NT数据库, 6. PFAM数据库, 7. Swiss Prot数据库

Fig. 1 The annotation of spotted steed unigenes among 7 database

1. annotated in GO, 2. annotated in KO, 3. annotated in KOG, 4. annotated in NR, 5. annotated in NT, 6. annotated in PFAM, 7. annotated in Swiss Prot

0009987 cellular process)和单细胞过程(GO: 0044699 single-organism process)相关的基因较多。

注释到KEGG数据库中的unigene有26 557条, 分类至32个代谢通路, 其中注释序列数量最多的代谢途径有信号转导(signal transduction, 4 894条)、内分泌系统(endocrine system, 2 390条)、免疫系统(immune system, 1 960条)、细胞群体(cellular community, 1 839条)和神经系统(nervous system, 1 764条)。

2.3 脑、卵巢和肝脏组织差异表达基因筛选

DEseq分析发现16 963个基因在脑vs.卵巢组间差异表达, 12 090个基因在脑vs.肝脏组间差异表达, 10 323个基因在卵巢vs.肝脏组间差异表达(筛选条件 $\log_2|\text{fold_change}| > 1$ 且 $q \text{ value} < 0.005$)。其中, 在脑vs.卵巢中特异表达基因数为2 305个, 脑vs.肝脏中特异表达基因数为839个, 卵巢vs.肝脏中特异表达基因数为1 474个, 3个比较组共有的差异表达基因为860个(图2)。

对差异基因进行GO分析发现, 脑vs.卵巢组显著富集的GO条目为初级代谢过程(primary metabolic process), 有5 975条, 占45.25%; 富集到细胞代谢过程(cellular metabolic process)的GO条目有5 927条, 占44.89%, 富集到高分子代谢过程(macromolecule metabolic process)的序列有5 056条, 占38.29%; 脑vs.肝脏组显著富集的GO条目为单组织过程(single-organism process), 有5 038条, 占54.33%; 富集到膜(membrane)的序列有3 229条, 占34.82%, 富集到有机氮化合物代谢过程(organoni-

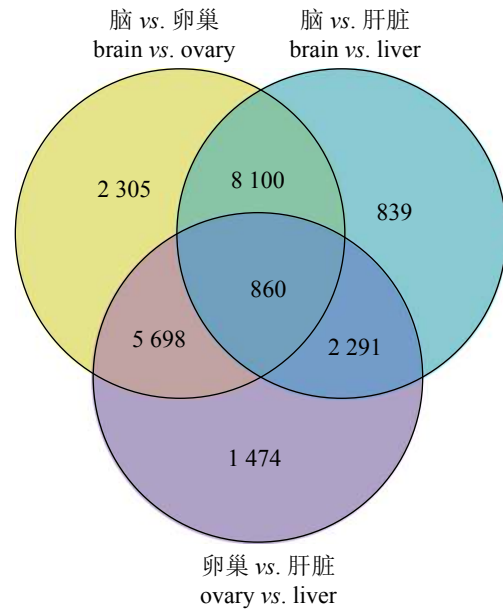


图2 花鲷转录组差异表达基因Venn图

Fig. 2 Venn diagrams summarizing the distribution of genes between tissue types in *H. maculatus*

trogen compound metabolic process)的序列有1 636条, 占17.64%; 卵巢vs.肝脏组显著富集的GO条目为有机物代谢过程(organic substance metabolic process), 有3 277条, 占50.11%; 富集到初级代谢过程(primary metabolic process)的序列有3 149条, 占48.15%, 富集到细胞代谢过程(cellular metabolic process)的序列有3 127条, 占47.81%。在这些差异表达基因中存在一些与卵巢发育相关的基因, 如P450芳香化酶基因(P450 aromatase gene, *cyp19a*)、叉头转录因子2基因(forkhead transcription L2 gene, *foxl2*)、*dax1*、*gdf-9*、骨形态发生蛋白基因(*bmp15*)、胰岛素样生长因子基因(*igf*)、*vasa*等。还有一些类固醇激素合成酶基因, 例如类固醇激素合成急性调节蛋白基因(steroidogenic acute regulatory protein gene, *StAR*)、17- β -羟基类固醇脱氢酶1基因(17-beta-hydroxysteroid type 1 gene, *HSD17 β 1*)以及17- β -羟基类固醇脱氢酶-12基因(estradiol-17-beta-dehydrogenase 12 gene, *HSD17 β 12*)。另外, 也检测到*CYP46a*、*CYP7a*、*CYP27a*和*CYP8b*等胆汁酸合成的关键酶基因(图3)。

2.4 差异表达基因KEGG代谢通路分析

3个比较组的差异基因在KEGG代谢通路中出现不同程度的富集。脑vs.卵巢组富集到297条代谢通路, 发生显著富集的KEGG条目为谷氨酸能突触(glutamatergic synapse)、昼夜节律牵引(cir-

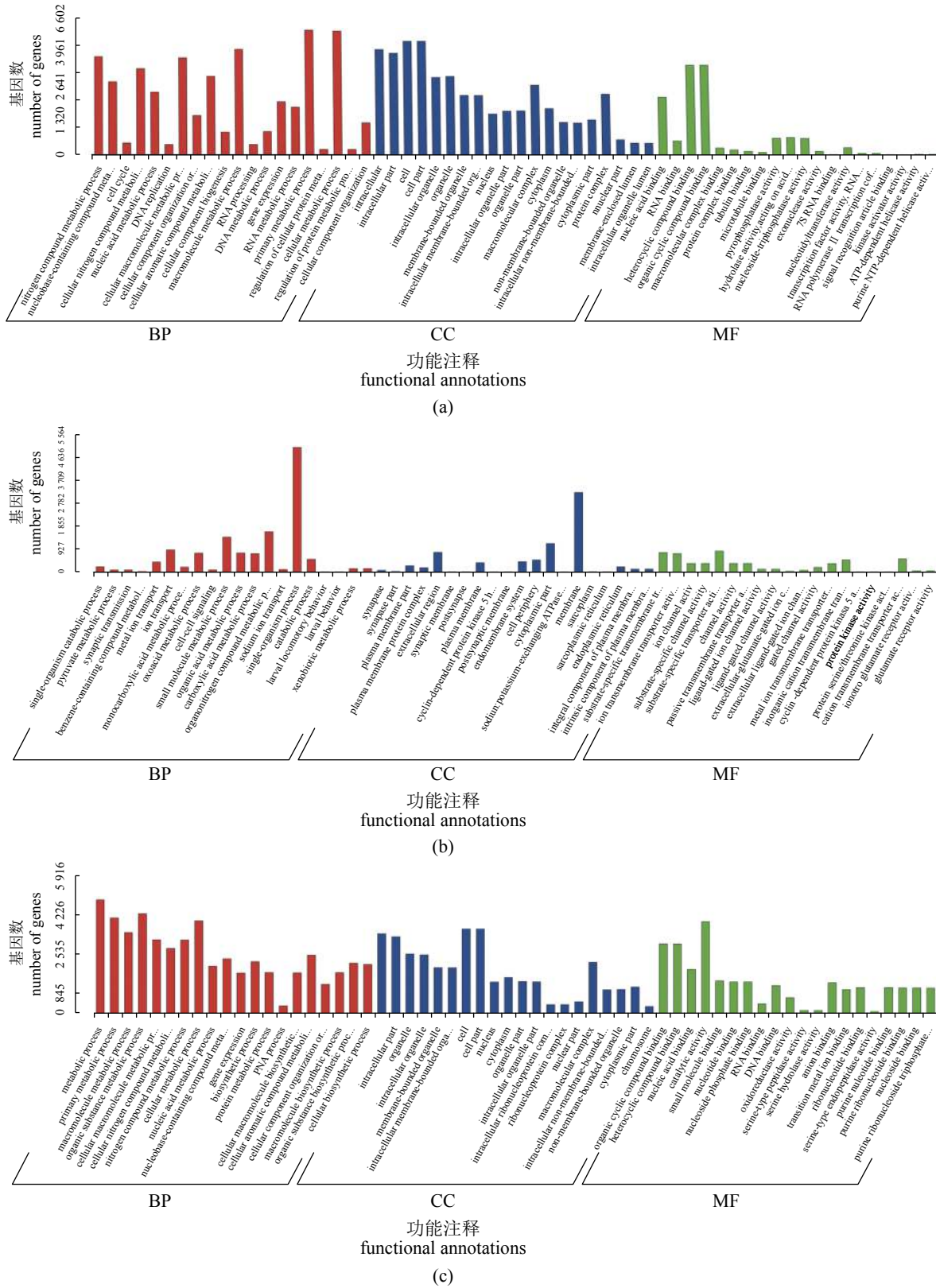


图 3 花鲮转录组序列GO注释

(a) 脑 vs. 卵巢; (b) 脑 vs. 肝脏; (c) 卵巢 vs. 肝脏; 下同

Fig. 3 Gene ontology terms for transcriptomic sequences of spotted steed

(a) brain vs. ovary; (b) brain vs. liver; (c) ovary vs. liver; the same below

cadian entrainment)、内源性大麻素逆行性信号转导通路(retrograde endocannabinoid signaling)、剪接体信号通路(spliceosome signaling pathway)(图4);部分差异表达基因注释到卵母细胞减数分裂(oocyte meiosis)、p53信号通路(p53 signaling pathway)、Ras信号通路(Ras signaling pathway)、胰岛素信号通路(insulin signaling pathway)、催产素信号通路(oxytocin signaling pathway)、血管内皮生长因子信号通路(VEGF signaling pathway)、促性腺激素释放激素信号通路(GnRH signaling pathway)、钙离子信号通路(calcium signaling pathway)、mTOR信号通路、Wnt信号通路、类固醇激素合成(steroid biosynthesis)、TGF- β 信号通路、甾体激素生物合成(steroid hormone biosynthesis)、视黄醇代谢(retinol metabolism)及PI3K-Akt信号通路。脑vs.肝脏组富集到293条代谢通路上,主要富集到突触囊泡循环(synaptic vesicle cycle)、谷氨酸能突触(glutamatergic synapse)、多巴胺突触(dopaminergic synapse)、内分泌和其他因素调节钙的再吸收(endocrine and other factor-regulated calcium reabsorption)、胰岛素分泌(insulin secretion)、cAMP信号通路及钙离子信号通路等;部分差异表达基因富集到类固醇合成、胰岛素信号通路、催产素信号通路、GnRH信号通路、卵母细胞减数分裂、雌激素信号通路(estrogen signaling pathway)、cGMP-PKG信号通路、Ras信号通路、MAPK信号通路、甾体激素生物合成、VEGF信号通路、卵巢类固醇生成(ovarian steroidogenesis)、PPAR信号通路、PI3K-Akt等通路。卵巢vs.肝脏组的差异基因则富集到298条代谢通路上,多数与RNA转运、泛素介导的蛋白质降解、脂肪消化和吸收及类固醇激素合成有关;部分差异表达基因注释到p53信号通路、胰岛素信号通路、雌激素信号通路、PPAR通路、mTOR通路、卵母细胞减数分裂、TGF- β 信号通路、Toll样受体信号通路(Toll-like receptor signaling pathway)、Notch信号通路、卵巢类固醇生成、PI3K-Akt信号通路、MAPK信号通路、GnRH信号通路、cAMP信号通路。

3 讨论

3.1 花鲮转录组测序分析

作为一种重要淡水经济鱼类,花鲮的生殖模式为雌雄异体,雌雄个体形态差异不明显^[21]。而

与花鲮性腺发育及生殖相关的分子信息较少,因此需要挖掘相关的基因与信号通路。本研究利用RNA-seq技术对花鲮的脑、卵巢和肝脏进行转录组测序,得到了unigene序列99 878条,平均长度为1 430 bp。花鲮属于鲤科、鲮属鱼类,目前,由于公共数据库中还没有其他鲮属鱼类全基因组信息,我们以斑马鱼(*Danio rerio*)基因序列为参考进行生物学功能注释。13 032条unigene被注释,占总基因数的13.04%,未得到注释的基因高达86.96%。出现这种注释率低的情况可能是因为花鲮相近物种的基因注释信息在公共基因数据库中收录较少,缺乏可靠的参考依据。这种现象在其他水产动物中也有类似报道,例如三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)转录组分析中只有26.87%的unigene被注释^[22],盘鲍中有24.9%的序列被注释^[13]。

3.2 卵巢发育相关基因的初步鉴定

为了筛选与卵巢发育相关的候选基因,我们利用FPKM计算unigene的表达量,比较脑、卵巢和肝脏组织间的基因表达差异。在获得的差异表达基因中,3个比较组共有的差异性表达基因为860个,在脑vs.卵巢组中特异表达基因数为2 305个,脑vs.肝脏组中特异性差异表达基因数为839个,卵巢vs.肝脏组中特异性差异表达基因数为1 474个。从Venn图分析中可以很方便的查找到不同基因在脑、卵巢和肝脏间的组织分布。

将差异表达基因富集至KEGG数据库,一些代谢通路如甾体激素生物合成、GnRH信号通路、TGF- β 信号通路、PI3K-Akt信号通路、Wnt信号通路、雌激素信号通路等与鱼类卵巢发育有关。众所周知,鱼类的生殖活动受HPG轴的调控,下丘脑分泌产生的促性腺激素释放激素(GnRH)在鱼类性腺发育中具有重要的调控作用。脊椎动物中GnRH主要有2种不同的存在方式:GnRH-I和GnRH-II,在日本七鳃鳗(*Lampetra japonica*)中发现鱼类特有的GnRH-III^[23]。在花鲮转录组数据中,我们发现了GnRH-I和GnRH-II 2个亚型。

性类固醇激素在动物的性腺分化、发育及繁殖中起重要作用。在硬骨鱼类卵母细胞生长阶段,垂体分泌的促卵泡激素(FSH)刺激滤泡细胞合成类固醇激素。在类固醇激素合成通路中,胆固醇由类固醇激素合成快速调节蛋白(Star)携带进入细胞,经过胆固醇侧链裂解酶(cholesterol-

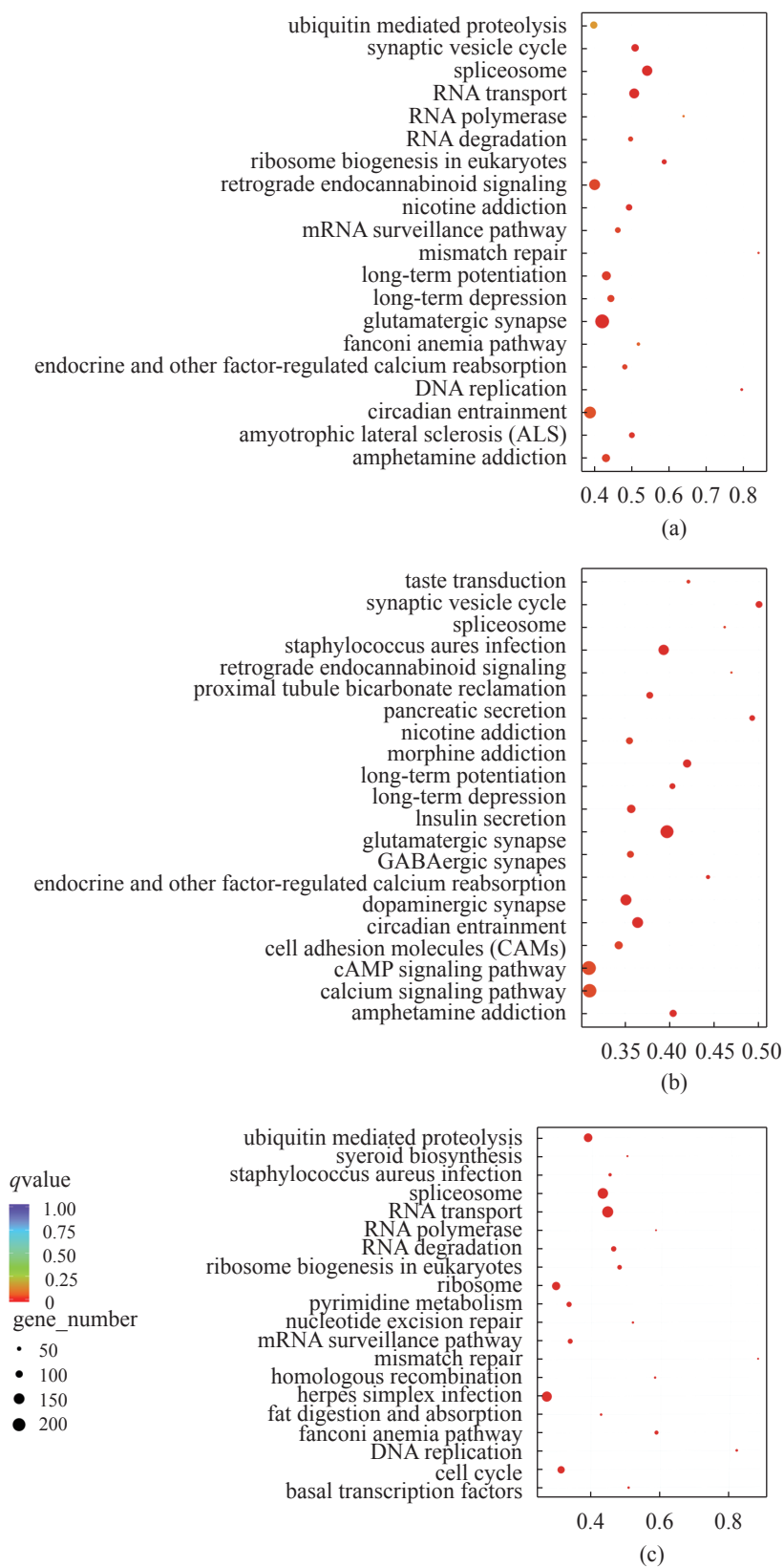


图 4 花鲮转录组差异表达基因KEGG图

Fig. 4 KEGG pathway for transcriptomic sequences of spotted steed

side-chain cleavage enzyme, P450scc)转换成孕酮,再经过一些列的芳香化反应合成雄激素和雌激素。芳香化酶(P450arom)是类固醇合成通路中的关键酶,它能够催化一些雄激素如睾酮、雄烯二酮等转化为雌激素。在大多数哺乳动物中,芳香化酶是由cyp19单基因编码,鱼类中存在2种不同的形式,分别为卵巢芳香化酶(cyp19a)和脑芳香化酶(cyp19b)。我们发现花鲢转录组数据中同样存在2种芳香化酶,与其他鱼类报道结果一致。生殖周期中,类固醇激素,尤其是雌二醇-17 β (Estradiol-17 β)也可以通过调节肝脏中卵黄蛋白原的合成来控制卵母细胞的生长^[2,24-25]。

有研究报道TGF- β 信号通路与卵泡发育密切相关。转化生长因子- β (TGF- β)属于TGF- β 家族,这一家族除TGF- β 外,还有生长分化因子(gdf)、骨形态发生蛋白(bmp15)、激活素(Activin)、抑制素(inhibin)和抗缪勒氏管激素(AMH)。许多研究结果已经证实,TGF- β 家族成员对调控卵母细胞发育和成熟也起重要作用^[26-27]。在小鼠(*Mus musculus*)中TGF- β 信号通路可以通过调控TSC/mTROC信号通路进而调控小鼠卵巢原始卵泡库的维持与激活^[28]。此外,在转录组差异表达基因中也发现了与卵母细胞减数分裂相关的基因。鱼类性成熟后,卵母细胞需要完成减数分裂程序才能产生具有受精能力的配子,因此,这些差异表达基因可能参与花鲢卵母细胞发育过程。综上所述,花鲢的脑、卵巢和肝脏转录组测序组装后共获得了99 878个unigenes,其中13 032个unigenes得到注释。从3个比较组的差异表达基因中筛选出卵母细胞生长、卵黄蛋白原合成、类固醇激素合成以及卵母细胞减数分裂相关的基因及信号通路。本文通过对花鲢的脑、卵巢和肝脏转录组测序,筛选出卵母细胞发育相关的基因,为花鲢的卵巢发育及卵母细胞成熟的研究提供基础资料。

参考文献:

- [1] Colli-Dula R C, Martyniuk C J, Kroll K J, *et al.* Dietary exposure of 17- α ethinylestradiol modulates physiological endpoints and gene signaling pathways in female largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. *Aquatic Toxicology*, 2014, 156: 148-160.
- [2] Guiguen Y, Fostier A, Piferrer F, *et al.* Ovarian aromatase and estrogens: a pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 165(3): 352-366.
- [3] Hu Q M, Zhu Y, Liu Y, *et al.* Cloning and characterization of *wnt4a* gene and evidence for positive selection in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 7167.
- [4] Chen J H, Li Y L, Zhang J B, *et al.* Identification and expression analysis of two *Wnt4* genes in the spotted scat (*Scatophagus argus*)[J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2016, 20: 20-27.
- [5] Yang Y J, Wang Y, Li Z, *et al.* Sequential, divergent, and cooperative requirements of *Foxl2a* and *Foxl2b* in ovary development and maintenance of zebrafish[J]. *Genetics*, 2017, 205(4): 1551-1572.
- [6] Zhou L Y, Charkraborty T, Yu X G, *et al.* R-spondins are involved in the ovarian differentiation in a teleost, medaka (*Oryzias latipes*)[J]. *BMC Developmental Biology*, 2012, 12: 36.
- [7] Wu L M, Yang P, Luo F, *et al.* R-spondin1 signaling pathway is required for both the ovarian and testicular development in a teleosts, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2016, 230-231: 177-185.
- [8] Ayers K L, Lambeth L S, Davidson N M, *et al.* Identification of candidate gonadal sex differentiation genes in the chicken embryo using RNA-Seq[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 1-19.
- [9] Xu Q, Zhao W M, Chen Y, *et al.* Transcriptome profiling of the goose (*Anser cygnoides*) ovaries identifying laying and broodiness phenotypes[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e55496.
- [10] Gardner L D, Jayasundara N, Castilho P C, *et al.* Microarray gene expression profiles from mature gonad tissues of Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus* in the Gulf of Mexico[J]. *BMC Genomics*, 2012, 13: 530.
- [11] Tao W J, Yuan J, Zhou L Y, *et al.* Characterization of gonadal transcriptomes from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reveals differentially expressed genes[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e63604.
- [12] Ma D Y, Ma A J, Huang Z H, *et al.* Transcriptome analysis for identification of genes related to gonad differentiation, growth, immune response and marker discovery in the turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0149414.

- [13] Yu L Y, Xu D D, Ye H, *et al.* Gonadal transcriptome analysis of Pacific abalone *Haliotis discus discus*: identification of genes involved in germ cell development[J]. *Marine Biotechnology*, 2018, 20(4): 467-480.
- [14] 顾若波, 闻海波, 徐钢春. 花鲢的肌肉营养成分与品质评价[J]. *大连水产学院学报*, 2006, 21(4): 378-382.
Gu R B, Wen H B, Xu G C. Evaluation of nutritive quality and nutritional components in *Hemibarbus maculatus* Bleeker muscle[J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2006, 21(4): 378-382(in Chinese).
- [15] 陆红法, 李智强, 方美娟, 等. 花鲢的生物学特性和人工繁殖初步研究[J]. *浙江海洋学院学报(自然科学版)*, 2004, 23(3): 211-213.
Lu H F, Li Z Q, Fang M J, *et al.* A primary study on the biological characteristics and artificial breeding of *Hemibarbus maculatus* Bleeker in pond[J]. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2004, 23(3): 211-213(in Chinese).
- [16] 虞云, 刘小高, 郭冬生, 等. 袁河花鲢驯化及人工繁殖试验[J]. *宜春学院学报*, 2013, 35(3): 111-113.
Tuo Y, Liu X G, Guo D S, *et al.* Study on domestication and artificial propagation of *Hemibarbus maculatus* in Yuanhe River[J]. *Journal of Yichun College*, 2013, 35(3): 111-113(in Chinese).
- [17] 顾若波, 闻海波, 徐钢春, 等. 花鲢胚胎发育及卵黄囊仔鱼形态的初步观察[J]. *浙江海洋学院学报(自然科学版)*, 2006, 25(4): 373-378.
Gu R B, Wen H B, Xu G C, *et al.* Preliminary observation on the embryonic development and morphology of the yolk-sac larva of *Hemibarbus maculatus* Bleeker[J]. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2006, 25(4): 373-378(in Chinese).
- [18] 汪若彭. 丰溪河花鲢繁殖生物学研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
Wang R P. Study on reproductive biology of *Hemibarbus maculatus* Bleeker in the Fengxi river[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2008 (in Chinese).
- [19] Mode A, Gustafsson J Å. Sex and the liver—a journey through five decades[J]. *Drug Metabolism Reviews*, 2006, 38(1-2): 197-207.
- [20] Grabherr M G, Haas B J, Yassour M, *et al.* Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome[J]. *Nature Biotechnology*, 2011, 29(7): 644-652.
- [21] 林植华, 雷焕宗, 林植云, 等. 花鲢的两性异形和雌性繁殖输出[J]. *上海交通大学学报(农业科学版)*, 2005, 23(3): 284-288.
Lin Z H, Lei H Z, Lin Z Y, *et al.* Sexual dimorphism and female reproductive output of *Hemibarbus maculatus*[J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science)*, 2005, 23(3): 284-288(in Chinese).
- [22] 毛媛媛, 郑荣泉, 张启鹏, 等. 转录组测序研究三角帆蚌珍珠颜色相关基因[J]. *水产学报*, 2018, 42(3): 322-333.
Mao Y Y, Zheng R Q, Zhang Q P, *et al.* Transcriptome sequencing analysis on pearl color related genes in *Hyriopsis cumingii*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(3): 322-333(in Chinese).
- [23] Lovejoy D A, Michalec O M, Hogg D W, *et al.* Role of elasmobranchs and holocephalans in understanding peptide evolution in the vertebrates: lessons learned from gonadotropin releasing hormone (GnRH) and corticotropin releasing factor (CRF) phylogenies[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2018, 264: 78-83.
- [24] Nagahama Y, Yamashita M. Regulation of oocyte maturation in fish[J]. *Development, Growth & Differentiation*, 2008, 50(suppl 1): S195-S219.
- [25] Tokarz J, Möller G, de Angelis M H, *et al.* Steroids in teleost fishes: a functional point of view[J]. *Steroids*, 2015, 103: 123-144.
- [26] Halm S, Ibañez A J, Tyler C R, *et al.* Molecular characterisation of growth differentiation factor 9 (*gdf9*) and bone morphogenetic protein 15 (*bmp15*) and their patterns of gene expression during the ovarian reproductive cycle in the European sea bass[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2008, 291(1-2): 95-103.
- [27] Patnaik S, Mohanty M, Bit A, *et al.* Molecular characterization of activin receptor type IIA and its expression during gonadal maturation and growth stages in rohu carp[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B-Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, 203: 1-10.
- [28] Wang Z P, Mu X Y, Guo M, *et al.* Transforming growth factor- β signaling participates in the maintenance of the primordial follicle pool in the mouse ovary[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(12): 8299-8311.

Transcriptome analysis of spotted steed (*Hemibarbus maculatus* Bleeker) to identify genes related to ovary development

LIU Huifen, LU Liangsheng, WANG Jing, ZHOU Chuanjiang, GU Qianhong,
MA Xiao, FENG Junchang, NIE Guoxing, LI Xuejun*

(Engineering Technology Research Center of Henan Province for Aquatic Animal Cultivation, College of Fisheries,
Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: In order to identify candidate genes involved in ovary development, Illumina Hiseq technology was used to define the transcriptome of spotted steed brain, ovary and liver. A total of 49 484 132, 47 540 538 and 50 622 304 clean reads were generated from brain, ovary and liver, and then assembled into 99 878 Unigenes with an average length of 1 430 bp. DEseq analysis revealed that 2 305 were found only in the expression of brain vs. ovary group, 839 were found only in the expression of brain vs. liver group, 1 474 were found only in the expression of ovary vs. liver group, and 860 genes were found to be co-expressed in the three comparison groups. Gene ontology analysis indicated that many of these genes encoded proteins involved in primary metabolic process, single-organism process, organic substance metabolic process. Based on KEGG pathway analysis, putative genes are novel candidate regulators of oocyte development and meiosis, such as GnRH signaling pathway, Steroid hormone biosynthesis, TGF-beta signaling pathway and Oocyte meiosis. The spotted steed transcriptome data reported here will provide valuable new data to increase genomic resources of this species. The data will also provide a valuable basis for further reproductive molecular biology studies of this commercial species.

Key words: *Hemibarbus maculatus*; ovary development; transcriptome

Corresponding author: LI Xuejun. E-mail: xjli@htu.cn

Funding projects: Technicians Troop Construction Projects of Henan Province (CXTD 2016043); Key Technology Research Project of Henan Province (162102110147; 182102110383); Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application and Cultivation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; The Doctoral Fund of Henan Normal University (qd15186); Youth Fund of Henan Normal University