



四带小鲃的长鳍表型及其转录组分析

杨继辉^{1,2}, 燕男^{1,2}, 崔文耀^{1,2}, 熊加奉^{1,2}, 黄嵘³, 任建峰^{1,2*}

(1. 上海海洋大学, 科技部海洋生物科学国际联合研究中心, 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. 广东省水族协会, 广东 广州 510375)

摘要: 为了了解野生型和长鳍突变型四带小鲃的体长、尾鳍长、尾鳍分节数目和分节长度, 实验利用转录组学方法和 *t* 检验统计方法对上述指标进行了分析。结果显示, 6 月龄野生型 ($n=30$) 与突变型 ($n=30$) 成鱼体长之间没有显著差异, 但二者尾鳍长、尾鳍分节数目和分节长度 3 个指标间存在显著差异。同时, 对不同体长野生型 ($n=80$) 和突变型 ($n=80$) 四带小鲃尾鳍长度、分节数目和分节长度进行了线性回归分析。结果显示, 相对于野生型, 突变型四带小鲃尾鳍长度增加速率更快 (野生型: $k=0.28$, 突变型: $k=0.62$), 尾鳍分节数目增加频率基本一致 (野生型: $k=0.79$, 突变型: $k=0.82$), 尾鳍分节长度更长 (野生型: $k=0.0004$, 突变型: $k=0.0068$)。野生型和突变型成鱼尾鳍组织的转录组分析结果显示, 转录组从头组装共获得 56 271 个 unigene, 野生型组 ($n=3$) 和突变型组 ($n=3$) 之间共有 1 304 个差异表达基因, 其中 971 个基因上调, 333 个基因下调。差异表达基因 KEGG 通路显著富集到细胞周期和 DNA 复制等与细胞增殖相关的信号通路, 其中细胞周期蛋白基因 (*cycA*、*cycB* 和 *cycE*) 和细胞周期依赖性激酶基因 (*cdk1*) 等显著上调。最后, 对 *ckap2l*、*ki-67*、*cdc20*、*prc1*、*urgcp* 和 *cdk1* 共 6 个基因的表达水平进行了实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析, 其结果与转录组分析结果基本一致。研究表明, 长鳍四带小鲃突变基因引起细胞周期相关基因表达量上升, 造成尾鳍分节片段的细胞增殖速率加快, 尾鳍分节长度增加, 呈现为长尾鳍表型。

关键词: 四带小鲃; 长鳍突变型; 尾鳍; 转录组测序; 差异表达基因; 细胞增殖

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

四带小鲃 (*Puntius tetrazona*) 体呈纺锤形, 身体侧扁, 成鱼全长 5~7 cm, 体表浅黄色, 上覆 4 条垂直的浓黑色条纹, 又名四间鲃, 因其体色似虎皮而俗称虎皮鱼。四带小鲃隶属于鲤科 (Cyprinidae) 鲃亚科 (Barbinae) 小鲃属 (*Puntius*), 原产于印度尼西亚的加里曼丹岛、苏门答腊岛和马来西亚的内陆水域。四带小鲃因其活泼好动、颜色艳丽和易饲养等特点受到市场的广泛欢迎, 是一种

具有较高经济价值的小型热带观赏鱼^[1]。

鳍是鱼类运动和维持身体平衡的重要器官, 包括成对的偶鳍和不成对的奇鳍。鱼类在进化和人工选择的过程中出现了形态多样的鳍, 如丹凤金鱼 (*Carassius auratus*) 和龙凤锦鲤 (*Cyprinus carpio*) 的鳍显著增长。在模式鱼类斑马鱼 (*Danio rerio*) 中, 已报道了多种长鳍突变型: *Dhi2059* 突变型具有分节不明显的长尾鳍^[2]; *alf* 突变型具有

收稿日期: 2021-04-11 修回日期: 2021-07-05

资助项目: 观赏鱼斗鱼遗传改良技术开发 (D-8006-19-0166)

第一作者: 杨继辉 (照片), 从事水产养殖学研究, E-mail: yangjihuishou@163.com

通信作者: 任建峰, 从事鱼类性状的遗传和发育机制研究, E-mail: jfren@shou.edu.cn



增长的鳍和须^[3]; *schleier* 突变型具有片段化条纹的长鳍和变形的长须^[4]; *lof* 突变型具有豹纹色的长尾鳍^[5]; *rapunzel* 突变型所有鳍全部增长^[6]。研究人员对这些突变型的表型和突变基因进行了详细分析, 结果显示, 长鳍表型主要表现为鳍条分节长度增长和(或)分节数目增多 2 种形式, 控制突变型长鳍表型的基因主要是钾离子通道蛋白家族基因。

目前, 对四带小鲃的研究主要集中在养殖与繁殖^[7]、病理观察^[8]和毒性胁迫^[9]等方面, 而遗传发育机制方面的研究较少。目前市场上出现了一种四带小鲃长鳍突变型, 本实验对野生型和突变型四带小鲃的体长、尾鳍长、尾鳍分节数目和分节长度 4 个指标进行了统计分析。为进一步揭示四带小鲃长鳍性状形成的分子机制, 实验对野生型和突变型成鱼尾鳍组织进行了转录组分析, 鉴定出可能与鳍增长相关的信号通路及基因。本研究结果为四带小鲃长鳍突变基因鉴定及其调控长鳍形成的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所用的野生型和突变型四带小鲃均购自上海市青浦区淀山湖农业示范园。

1.2 尾鳍测量及数据分析

使用电子游标卡尺(ResTure IP67, 哈尔滨量具刃具集团有限责任公司)测量四带小鲃的体长, 精确至 0.01 mm。使用体视显微镜(ZEISS, Stereo Discovery. V20, 德国)观察不同体长四带小鲃尾鳍的发育情况, 并对尾鳍进行拍照, 用 ZEN2012 软件对尾鳍 V3 鳍条(尾鳍腹叶第 3 根鳍条是最长的鳍条^[10], 其长度代表尾鳍的长度)长度进行测量。利用 Excel 2016 和 GraphPad Prism 8.0 软件对数据进行 *t* 检验分析并作图。

1.3 RNA 提取与质量评估

挑选体长约 3 cm 的野生型和突变型四带小鲃各 3 尾, 快速剪取其尾鳍, 置于液氮中研磨, 使用 TRIzol 试剂(Invitrogen, Cat No. 15596018)提取总 RNA。利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 使用 NanoDrop 2000 对 RNA 的浓度和纯度进行检测, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值处于 1.8~2.0 为合格。利用 Agilent 2100 测定 RNA 完整值, 完整值越接

近 10.0, RNA 质量越好。

1.4 文库构建与高通量测序

转录组文库的构建及测序由天津诺禾致源生物信息科技有限公司完成。将总 RNA 通过 Oligo(dT) 的磁珠富集带有 polyA 尾的 mRNA, 随后利用二价阳离子片段化缓冲液将 mRNA 随机打断。以片段化的 mRNA 为模版, 随机寡核苷酸为引物, 利用 M-MuL V 逆转录酶体系合成 cDNA 第一条链。随后用 RNase H 降解 RNA 链, 并利用 DNA 聚合酶 I 合成 cDNA 第二条链。纯化后的双链 cDNA 经过末端修复、加 A 尾并连接测序接头, 用 AMPure XP 磁珠筛选约 250~300 bp 的片段, 然后进行 PCR 扩增; 产物再次使用 AMPure XP 磁珠纯化, 最后获得野生型和突变型 cDNA 文库各 3 个。

文库构建完成后, 先使用荧光定量仪 Qubit 2.0 Fluorometer 对 cDNA 样品进行定量, 并稀释至 1.5 ng/μL, 随后使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 对文库的插入片段长度进行检测。合格的文库利用 Illumina HiSeqX Ten 程序平台进行测序。

1.5 从头组装和功能注释

将测序获得的原始读段去除低质量碱基和接头, 从而得到干净的读段, 随后用 Trinity^[11] 软件进行从头组装, 拼接成转录本, 接着用 Corset^[12] 程序将转录本进行层次聚类, 获得 unigene。使用 TransDecoder^[13] 软件对 unigene 的编码区序列及其对应的氨基酸序列进行预测。为获得基因的功能信息, 使用 BLAST 软件将 unigene 序列与 GO、KO、KOG、Nr、Nt、Pfam 和 Swiss-Prot 共 7 个数据库进行比对, 从而获得 unigene 的注释信息。

1.6 差异表达基因分析

利用 Bowtie^[14] 软件将干净读段比对到 unigene 参考序列上, 根据比对结果, 利用 RSEM 软件^[15] 进行 unigene 表达水平估计, 以 FPKM (fragments per kilobase per million reads) 值表示^[16]。然后, 利用 DEGSeq^[17] 软件进行样品组间差异表达分析, 从而获得突变型和野生型尾鳍间差异表达基因。差异基因筛选标准为 $|\log_2(\text{FoldChange})| > 1$ 且 $\text{padj} < 0.05$; 对差异表达基因进行 GO 和 KEGG 通路富集分析, 筛选的标准为 $\text{padj} < 0.05$ 。

1.7 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析

从差异表达基因中挑选 6 个上调基因, 利用 Primer premier 5 软件设计引物(表 1), 进行 qRT-

表 1 实时荧光定量 PCR 引物
Tab. 1 Primers used for qRT-PCR

序号 number	基因名称 gene names	正向引物序列(5'-3') forward primer (5'-3')	反向引物序列(5'-3') reverse primer (5'-3')
1	类细胞骨架相关蛋白2基因 <i>ckap2l</i>	GAGGAGATCAAGAGCACCACT	TTTACGCCGAGACCACT
2	增殖标记蛋白Ki-67基因 <i>ki-67</i>	TTGGGTGATGCTCTTGTGG	CGACGCAGTTTGGGTCTTT
3	细胞分裂周期蛋白20基因 <i>cdc20</i>	GAACGGCAAAACCCAGAA	TCTTCGCTTCCTCAATGTCA
4	胞质分裂调节蛋白1基因 <i>prc1</i>	CATCTCATCCATCAGGCTCC	GTGCGCTACACCATATTACATC
5	细胞增殖上调因子 <i>urgcp</i>	TTAATTTGGACCAGGCTTCC	AAATAATCAGCGGTGCTACAC
6	细胞周期蛋白依赖性激酶 <i>cdk1</i>	GTAGCAAGTTCAGCAAAGATGG	TGGTGCCCGGTCAGAGTATA
7	甘油醛-3-磷酸脱氢酶 <i>g3pd</i>	AGACTCCGGTAGACTCGACT	TATGATCCACTCACGGACG

PCR 分析。取野生型和突变型各 3 尾，利用 TRIzol 试剂提取尾鳍总 RNA，然后取 1 μ g RNA，使用 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (RR047A, TaKaRa, 日本) 试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA，保存于 -20 °C 备用。

以甘油醛-3 磷酸脱氢酶基因 (*g3pd*)^[18] 为内参，利用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 酶 (Q711-02, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司)，在 LightCycler[®] 480 II 检测系统 (Roche, 德国) 进行荧光定量检测。每个基因 3 个重复，反应程序：95 °C, 5 min; 95 °C, 15 s, 55 °C, 15 s, 72 °C, 15 s, 40 个循环。根据 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法^[19] 计算基因相对表达量，使用 SPSS 20.0 软件对结果进行单因素方差分析， $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 四带小鲃野生型与长鳍突变型的形态比较

相对于野生型成鱼 (约 6 月龄)，突变型成鱼所有鱼鳍都表现出明显增长的现象 (图 1-a, b)。本实验对野生型 ($n=30$) 和突变型 ($n=30$) 成鱼的体长、尾鳍长、尾鳍分节数目和尾鳍分节长度共 4 个指标进行了统计分析。结果显示，野生型与突变型四带小鲃成鱼群体间体长没有显著差异 [野生型体长为 (33.98 \pm 1.77) mm; 突变型体长为 (33.92 \pm 1.69) mm; $P > 0.05$] (图 1-c)。但二者在尾鳍长 [野生型尾鳍长为 (11.31 \pm 0.66) mm; 突变型尾鳍长为 (20.33 \pm 1.15) mm; $P < 0.000 1$]、尾鳍分节数目 (野生型尾鳍分节数目为 30.4 \pm 1.2; 突变型尾鳍分节

数目为 32.8 \pm 1.3; $P < 0.000 1$) 和尾鳍分节长度 [野生型尾鳍分节长度为 (0.37 \pm 0.01) mm; 突变型尾鳍分节长度为 (0.62 \pm 0.02) mm; $P < 0.000 1$] 3 个指标方面均存在显著差异 (图 1-d, f)。野生型尾鳍各分节长度均一，而突变型尾鳍各分节长度变化明显 (图 1-g, h)。实验又对不同月龄 (1~6 月龄，体长为 1.0~3.5 cm) 四带小鲃 (野生型: $n=80$; 突变型: $n=80$) 体长、尾鳍长、尾鳍分节数目和分节长度 4 个指标进行了测量，并对尾鳍长、尾鳍分节数目、尾鳍分节长度与体长的关系进行了回归分析。分析结果显示，突变型尾鳍长线性回归方程斜率显著大于野生型 (野生型: $y=0.284 6x+0.787 9$, $k=0.28$, $R^2=0.97$; 突变型: $y=0.616 9x+0.963 3$, $k=0.62$, $R^2=0.99$; $P < 0.000 1$)。突变型尾鳍分节数目线性回归方程斜率与野生型相近 (野生型: $y=0.791 8x+3.227 6$, $k=0.79$, $R^2=0.98$; 突变型: $y=0.818 6x+5.023$, $k=0.82$, $R^2=0.99$; $P=0.006$)。突变型尾鳍分节长度线性回归方程斜率显著大于野生型 (野生型: $y=0.000 4x+0.332 2$, $k=0.000 4$, $R^2=0.043$; 突变型: $y=0.006 8x+0.384 9$, $k=0.006 8$, $R^2=0.87$; $P < 0.000 1$) (图 1-i, k)。

2.2 转录组测序和组装

利用 Illumina 测序平台分别对四带小鲃野生型和突变型成鱼的尾鳍进行了转录组测序，分别获得 22.93、23.83、20.71 M 和 20.34、23.38、23.30 M 个原始读段。经过质控处理后，分别得到 22.25、22.94、20.05 M 和 19.79、22.79、22.67 M 个干净读段，获得的干净碱基数分别为 6.67、

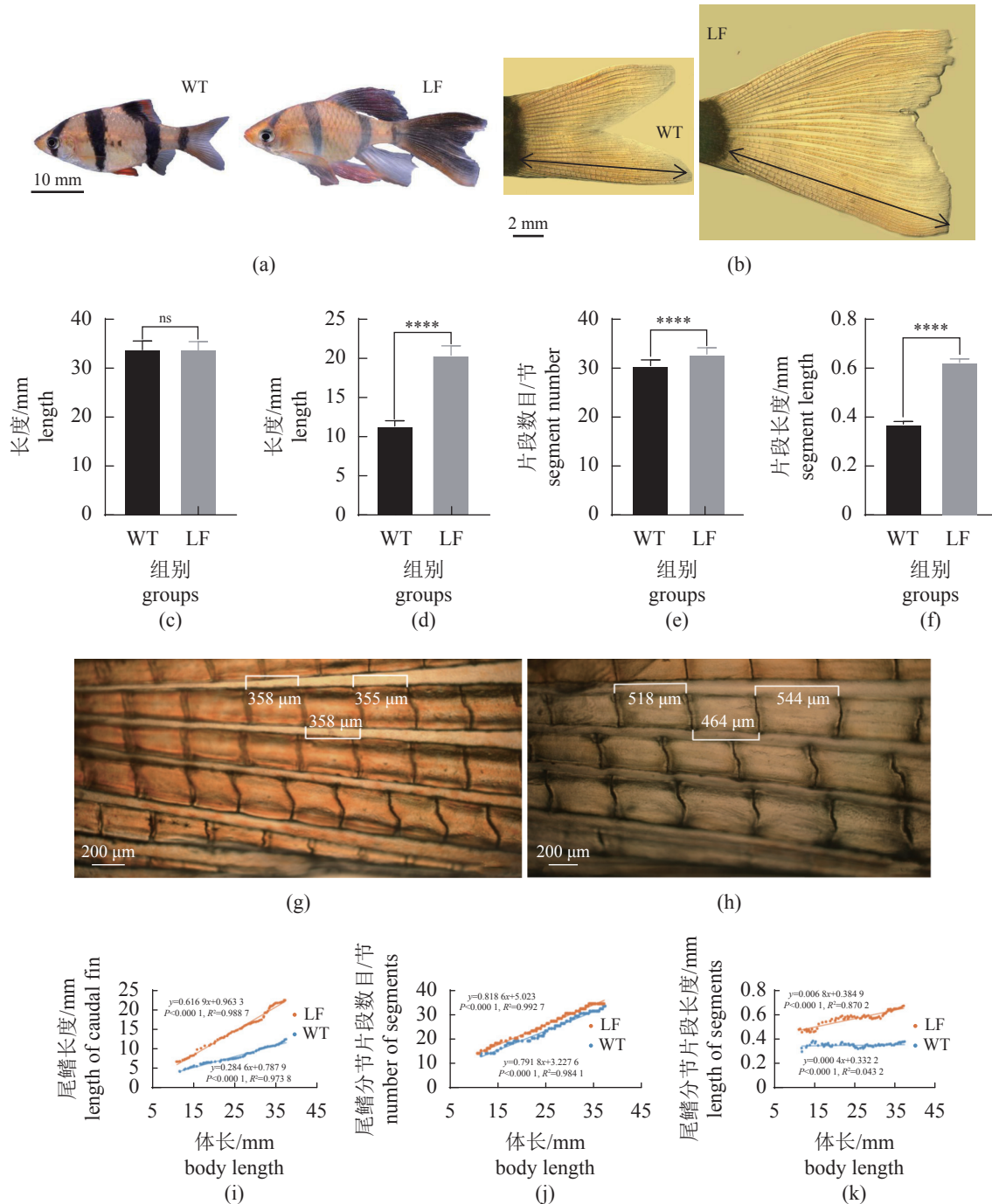


图 1 四带小鲃野生型与长鳍突变型形态比较

(a) 野生型和突变型四带小鲃; (b) 野生型和突变型尾鳍, 箭头指示尾鳍 V3 鳍条的位置; (c)~(f) 野生型与突变型四带小鲃平均体长、平均尾鳍长度、平均尾鳍分节数目和平均尾鳍分节长度的比较, WT, 野生型, LF, 突变型, ns, 不显著, ****, $P < 0.0001$, 下同; (g) 野生型四带小鲃尾鳍分节长度; (h) 突变型四带小鲃尾鳍分节长度; (i)~(k) 野生型与突变型四带小鲃尾鳍、尾鳍分节片数数和尾鳍分节片长度比较

Fig. 1 Morphological comparison between the wide type and long fin of *P. tetrazona*

(a) wide type (left) and long fin (LF) of *P. tetrazona*; (b) caudal fin of WT and LF, the arrow indicates the location of V3 ray; (c)~(f) comparison of average body length, average caudal fin length, average number of segments and average segment length between WT and LF, ns, not significant, ****, $P < 0.0001$, the same below; (g) segment length of the WT caudal fin; (h) segment length of the LF caudal fin; (i)~(k) comparison of the length of caudal fin, number of segments and length of segments between WT and LF

6.88、6.01 Gb 和 5.94、6.84、6.80 Gb, 共 39.14 Gb。碱基质量及组成分析显示, 各样品碱基质量

值 Q20 以上比例均不小于 97.34 %, 样品碱基 GC 含量区间为 47.65%~48.10% (表 2)。

表 2 测序数据统计表

Tab. 2 Statistics of sequencing data

样本 samples	原始读段/bp raw reads	干净读段/bp clean reads	干净碱基/Gb clean bases	Q20碱基/% Q20 base	GC含量/% GC content
野生型1 WT1	22 929 005	22 249 269	6.67	97.43	48.07
野生型2 WT2	23 825 014	22 936 567	6.88	97.34	47.74
野生型3 WT3	20 707 206	20 049 632	6.01	97.49	47.84
突变型1 LF1	20 339 135	19 787 532	5.94	97.36	47.74
突变型2 LF2	23 382 183	22 789 415	6.84	97.36	48.10
突变型3 LF3	23 301 838	22 674 530	6.80	97.58	47.65

2.3 转录组组装及基因功能注释

将测序获得的干净读段用 Trinity^[11] 软件从头组装后, 并利用 Corset^[12] 程序进行聚类, 最终获得 56 271 个 unigene。利用 GO、KEGG、KOG、Nr、Nt、Pfam 和 Swiss-Prot 共 7 个数据库对 unigene 进行功能注释。其中比对到 GO 数据库的基因数为 20 839 个, 注释率为 37.0%。比对到 KEGG 数据库的基因数为 13 697 个, 注释率为 24.3%。比对到 KOG 数据库的基因数为 9 273 个, 注释率为 16.5%。比对到 Nr 数据库的基因数为 25 303 个, 注释率为 45.0%。比对到 Nt 数据库的基因数为 48 421 个, 注释率为 86.0%。比对到 Pfam 库的基因数为 20 843 个, 注释率为 37.0%。比对到 Swiss-Prot 数据库的基因数为 20 659 个, 注释率

为 36.7%。在 7 个数据库中, Nt 数据库的注释率最高 (图 2-a)。

将 unigene 与 Nr 蛋白数据库比对的结果进行统计, 将序列相似性最高的比对结果进行分析, 其中 5 130 条序列对上犀角金线鲃 (*Sinocyclocheilus rhinoceros*), 占序列总数 20.3%。4 473 条序列对上鲤, 占序列总数 17.7%。4 268 条序列对上安水金线鲃 (*S. anshuiensis*), 占序列总数 16.9%。3 032 条序列对上滇池金线鲃 (*S. grahami*), 占序列总数 12.0%。2 822 条序列对上金鱼, 占序列总数 11.2%, 比对上其他物种的序列占 21.9% (图 2-b)。

2.4 差异表达基因鉴定及功能富集分析

利用 56 271 个 unigenes 作为参考序列, 对野

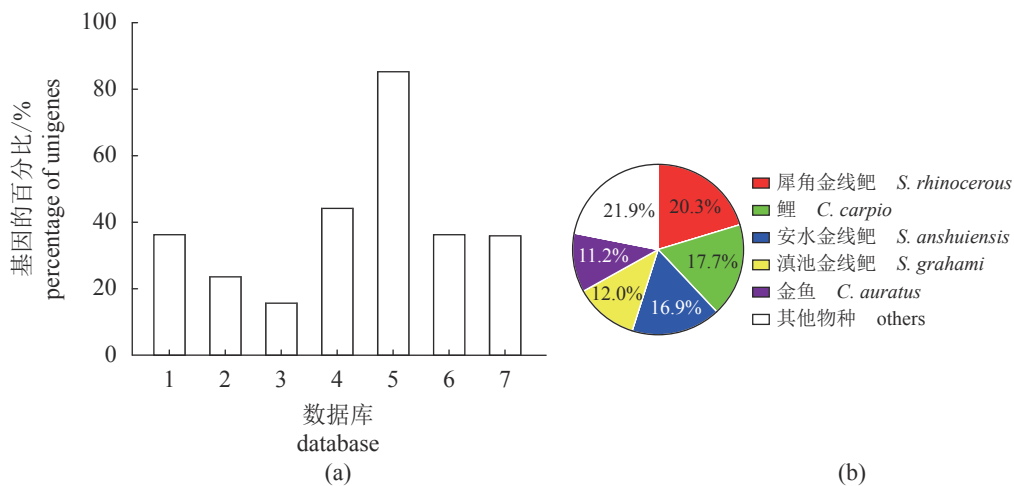


图 2 unigene 功能注释统计

(a) 不同数据库基因注释量统计柱形图, (b) Nr 数据库注释物种分布饼图; 1.GO, 2. KEGG, 3. KOG, 4. Nr, 5. Nt, 6. Pfam, 7. Swiss-Prot

Fig. 2 Statistics of unigene functional annotation

(a) bar chart showed the percentage of the genes annotated in different databases, (b) pie chart showed the species distribution and its proportion of the genes annotated with Nr database; 1.GO, 2. KEGG, 3. KOG, 4. Nr, 5. Nt, 6. Pfam, 7. Swiss-Prot

生型和突变型转录组数据进行基因表达定量, 然后进行差异表达基因的统计分析。相对于野生型, 突变型显著差异表达的基因共有 1 304 个, 占基因总数的 2.32%, 其中上调基因 971 个, 下调基因 333 个 (图 3-a)。

对差异表达的基因进行 GO (gene ontology) 功能富集, 共 921 个基因得到分类注释。GO 共有 3 个二级分类, 包括生物过程 (biological process, BP)、细胞组分 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF)。BP 本体类别中, 基于微管移动过程 (microtubule-based movement) 富集最显著, 差异基因有 14 个上调和 3 个下调, 分别占分类注释基因总数的 1.52% 和 0.33%; 其次显著富集在染色体组织 (chromosome organization) 过程中, 差异基因有 39 个上调和 7 个下调, 分别占分类注释基因总数的 4.23% 和 0.76% (图 3-b)。CC 本体类别中, 微管蛋白复合物 (tubulin complex) 富集最显著, 且所占比例最高, 有 17 个上调和 12 个下调, 分别占分类注释基因总数的 1.85% 和 1.30% (图 3-c)。

对差异表达的基因进行 KEGG 富集, 结果显示, 差异表达基因主要富集在细胞周期 (cell cycle)、抗原加工和呈递 (antigen processing and presentation)、谷胱甘肽代谢 (glutathione metabolism)、p53 信号通路 (p53 signaling pathway) 和 DNA 复制 (DNA replication) 等通路 (图 3-d)。在细胞周期信号通路中, *cycA*、*cycB1*、*cycB2*、*cycB3*、*cycE* 和 *cdk1* 等基因表达显著上调 (图 3-e)。

2.5 qRT-PCR 验证上调表达基因

为进一步验证转录组测序结果的可靠性, 本实验利用 qRT-PCR 对 6 个上调表达的基因进行了验证 (表 2)。结果显示, 相对于野生型, *ckap2l* 在突变型中的表达量上调了 9.7 倍, 与 RNA-seq 差异倍数 (10.0) 接近。*ki-67*、*prc1* 和 *urgcp* 在突变型中相对表达量上调倍数分别为 8.7、6.0 和 5.7 倍, 略低于 RNA-seq 结果 (分别为 9.8、7.8 和 6.8 倍)。而 *cdc20* 在突变型中的表达量上调倍数 (12.6) 略高于 RNA-seq 的结果 (9.9)。*cdk1* 的差异倍数最大, qRT-PCR 结果显示, 该基因在突变型中的表达量上调了 5.9 倍, RNA-seq 结果上调 11.7 倍。qRT-PCR 结果与转录组结果基本一致 (图 4)。

3 讨论

3.1 四带小鲃尾鳍发育模式

动物生长发育过程中, 身体各器官间的大小比例受到严格的调控, 呈现等速生长现象。在发育过程中, 如果某个器官的生长速率与身体其他器官的生长速率不同, 呈现异速生长时, 将造成器官大小比例发生变化, 最终导致生物幼体和成体形态的不同^[3]。鳍条主要有角质鳍条和鳞质鳍条 2 种^[20], 鳞质鳍条由鳞片衍生而来, 为硬骨鱼类所特有。在硬骨鱼中, 鳍的生长是通过在每根鳍条远端顺序地添加新的分节片段来实现的^[21]。目前, 在斑马鱼中已经获得多个鳍突变体, 一些突变体表现出鳍条片段的异速生长, 其中 *lof*^[10] 和 *rapunzel*^[22] 突变体的鳍条分节数目增加, 而 *alf*^[3]、*Dhi2059*^[2] 和 *schleier*^[4] 突变体鳍条分节长度增加, 导致长鳍表型。

四带小鲃发育过程中, 野生型与突变型在相对体长没有差异的前提下, 突变型尾鳍长度线性回归方程斜率显著大于野生型 (野生型: $k=0.28$, 突变型: $k=0.62$, $P<0.0001$), 表明突变型四带小鲃的尾鳍生长速率更快。突变型尾鳍分节数目线性回归方程斜率与野生型基本一致 (野生型: $k=0.79$, 突变型: $k=0.82$, $P=0.006$), 表明突变型与野生型尾鳍分节数目增加频率基本一致。突变型尾鳍分节长度线性回归方程斜率显著大于野生型 (野生型: $k=0.0004$, 突变型: $k=0.0068$, $P<0.0001$), 因此可知突变型四带小鲃的尾鳍分节长度更长 (图 1-i-k)。综合以上结果表明, 相对于野生型, 成年突变型四带小鲃尾鳍显著增长, 表现为其尾鳍分节数目显著增多, 并且尾鳍的分节长度也显著增加。四带小鲃突变型尾鳍变长的表型由分节数目增多和分节长度增加 2 种因素共同决定, 其中分节长度增加为主要影响因素。

3.2 四带小鲃转录组测序分析与长鳍形成机制

器官生长受到器官内部信号以及来自靶器官外的生长因子和激素的调节, 它们的相对贡献可能因物种, 甚至是同一生物体内不同的结构而变化^[23-24]。胚胎移植实验表明, 大多数动物器官在自主控制下生长至特定大小, 但激素和营养物质等系统因素最终决定器官的大小^[25]。越来越多的证据表明, 内源性生物电信号协调着器官的发育模式和生长^[26]。而 TOR 通路的激活会刺激细胞生

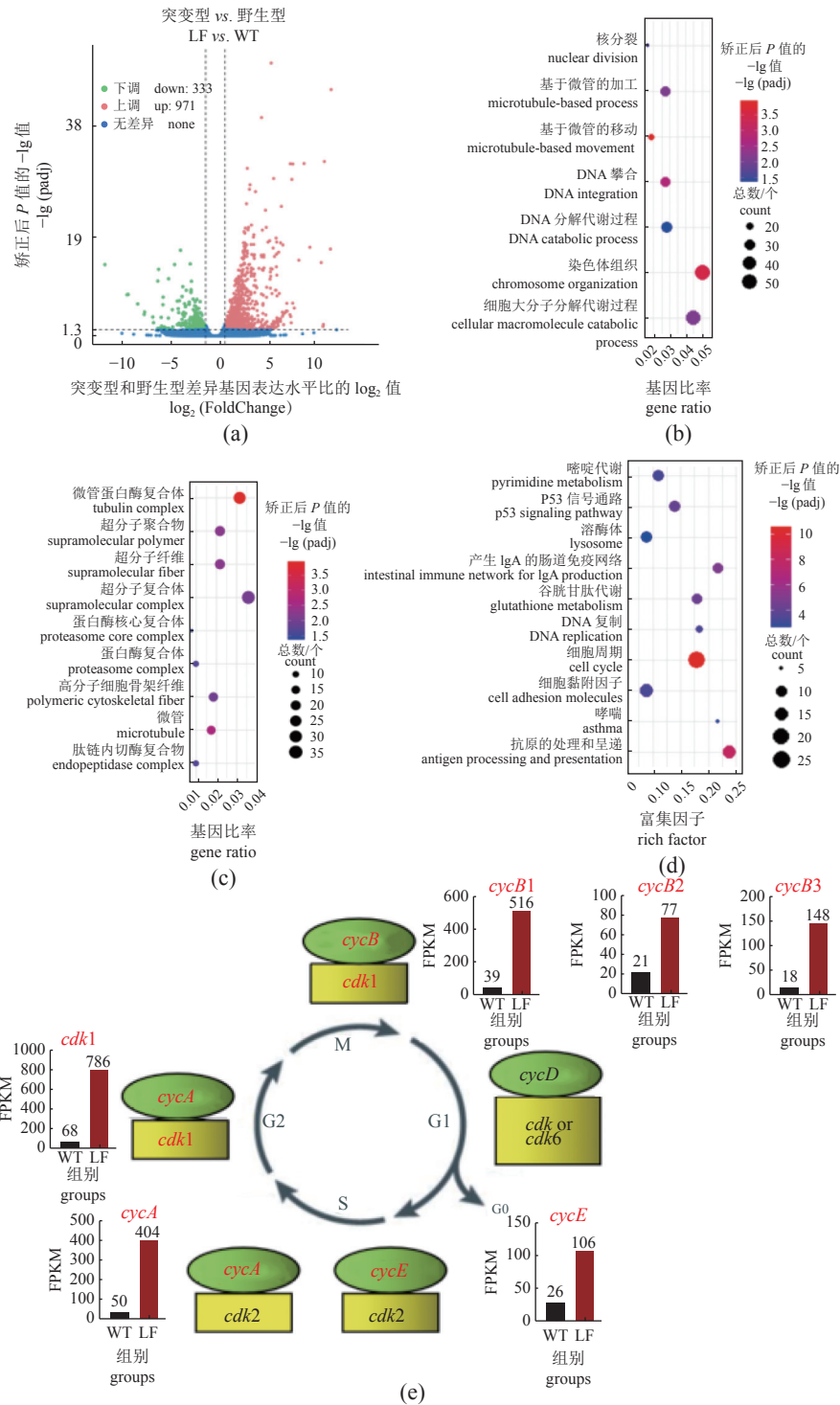


图 3 差异表达基因鉴定及功能富集分析

(a) 野生型和突变型间差异表达基因火山图; (b) 差异表达基因在生物学过程中的 GO 富集条目; (c) 差异表达基因在细胞组分中的 GO 富集条目; (d) 差异表达上调基因富集的前 10 条 KEGG 信号通路; (e) 细胞周期信号通路中部分显著上调表达的基因, G1. DNA 合成前期, S. DNA 合成期, G2. DNA 合成后期, M. 有丝分裂期, 红色代表基因表达上调, 黑色代表基因表达无明显差异

Fig. 3 Identification of differentially expressed genes (DEGs) and their functional enrichment analysis

(a) volcano plot of DEGs between WT group and LF group; (b) GO enrichment terms of DEGs in biological process; (c) GO enrichment terms of DEGs in cellular component; (d) the top ten KEGG signaling pathways enriched for up-regulated DEGs; (e) partial genes up-regulated, G1. pre-synthesis of DNA, S. DNA synthesis stage, G2. late DNA synthesis, M. mitosis, red represents up-regulated gene expression and black represents no significant difference in gene expression in cell cycle signaling pathway

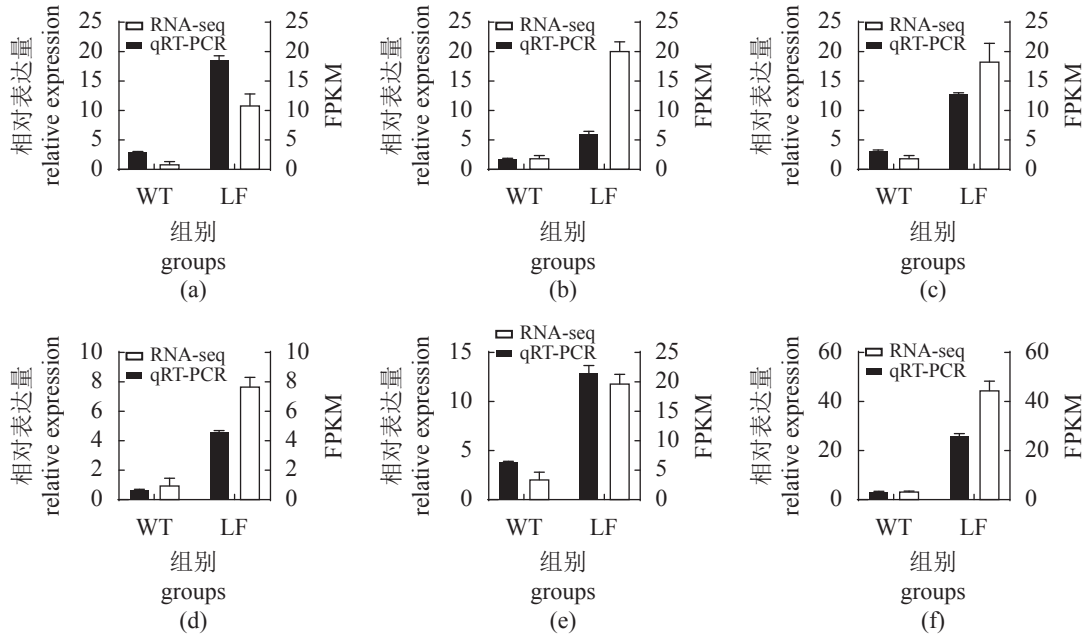


图 4 6 个差异表达基因的 qRT-PCR 结果与转录组结果的比较 (n=3)

Fig. 4 Comparison between expression levels of six DEGs determined via qRT-PCR and RNA-seq (n=3)

(a) *ckap2l*; (b) *ki-67*; (c) *cdc20*; (d) *prc1*; (e) *urgcp*; (f) *cdk1*

长, 并能触发细胞进入分裂周期^[27]。

四带小鲃尾鳍转录组分析结果显示, 野生型与突变型间差异基因在 GO 分类和 KEGG 代谢通路中出现不同程度的富集。GO 富集分析显示, 差异表达基因显著富集在生物过程的微管移动、染色体组织以及细胞组成的微管蛋白复合物等功能条目。KEGG 信号通路富集分析显示, 差异表达上调基因在细胞周期信号通路中富集程度最高, 实验进一步在该信号通路中筛选到了细胞周期蛋白基因 (*cyca*、*cycb1-3*、*cycb1-3*) 和细胞周期依赖性激酶 1 基因 (*cdk1*) 等, 这些调控细胞周期的基因可能与长鳍的形成密切相关。

综合以上结果, 推测长鳍四带小鲃很可能是由于某个关键基因突变引起了 DNA 复制和细胞周期信号通路中的基因显著上调表达, 造成鳍分节片段细胞的增殖速率加快, 鳍分节长度增加, 呈现为长鳍表型。本研究结果为进一步鉴定突变基因和揭示四带小鲃长鳍形成的分子机制奠定了基础。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

[1] 崔文耀, 周丽青, 杨继辉, 等. 四带小鲃胚胎发育及系统进化分析[J]. 水产学报, 2020, 44(8): 1286-1295.
Cui W Y, Zhou L Q, Yang J H, et al. Embryonic development and phylogenetic analysis of *Puntius tetrazona*[J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(8): 1286-1295 (in Chinese).

[2] Silic M R, Wu Q Y, Kim B H, et al. Potassium channel-associated bioelectricity of the dermomyotome determines fin patterning in zebrafish[J]. *Genetics*, 2020, 215(4): 1067-1084.

[3] Perathoner S, Daane J M, Henrion U, et al. Bioelectric signaling regulates size in zebrafish fins[J]. *PLoS Genetics*, 2014, 10(1): e1004080.

[4] Lanni J S, Peal D, Ekstrom L, et al. Integrated K⁺ channel and K⁺Cl⁻ cotransporter functions are required for the coordination of size and proportion during development[J]. *Developmental Biology*, 2019, 456(2): 164-178.

[5] Stewart S, Le Bleu H K, Yette G A, et al. Longfin causes cis-ectopic expression of the *kcnh2a ether-a-go-go* K⁺ channel to autonomously prolong fin outgrowth[J]. *Development*, 2021, 148(11): 199384.

[6] Green J, Taylor J J, Hindes A, et al. A gain of function mutation causing skeletal overgrowth in the *rapunzel* mutant[J]. *Developmental Biology*, 2009, 334(1): 224-234.

[7] 洪松柏, 巫绍明, 刘顺字. 不同繁殖条件对虎皮鱼受精卵数量的影响[J]. 现代农业科技, 2012(12): 251-252, <https://www.china-fishery.cn>

- 255.
- Hong S B, Wu S M, Liu S Z. Influences of different reproduction factors on quantity of *Barbus tetrazona's* spawns[J]. *Modern Agricultural Sciences and Technology*, 2012(12): 251-252, 255 (in Chinese).
- [8] Li K B, Chang O Q, Wang F, *et al.* Identification of a transparent mutant tiger barb *Puntius tetrazona* and its use for *in vivo* observation of a *Pleistophora* sp. (Microsporidia) infection[J]. *Journal of Fish Biology*, 2012, 80(7): 2393-2404.
- [9] Domínguez-Castanedo O, Toledano-Olivares Á, Martínez-Espinosa D, *et al.* Morphological changes in gametes of tiger barb *Puntius tetrazona* (Cypriniformes: Cyprinidae) and the implementation of *in vitro* fertilization[J]. *Revista De Biología Tropical*, 2014, 62(4): 1353-1363.
- [10] Lovine M K, Johnson S L. Genetic analysis of isometric growth control mechanisms in the zebrafish caudal fin[J]. *Genetics*, 2000, 155(3): 1321-1329.
- [11] 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.
- [12] Davidson N M, Oshlack A. Corset: enabling differential gene expression analysis for *de novo* assembled transcriptomes[J]. *Genome Biology*, 2014, 15(7): 410.
- [13] Loannidis P, Lu Y, Kumar N, *et al.* Rapid transcriptome sequencing of an invasive pest, the brown marmorated stink bug *Halyomorpha halys*[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 738.
- [14] Chen G, Wang C, Shi T L, *et al.* Overview of available methods for diverse RNA-Seq data analyses[J]. *Science China Life Sciences*, 2011, 54(12): 1121-1128.
- [15] Li B, Dewey C N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome[J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12(1): 323.
- [16] Mortazavi A, Williams B A, McCue K, *et al.* Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(7): 621-628.
- [17] Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data[J]. *Genome Biology*, 2010, 11(10): 106.
- [18] 刘丽丽, 王晓雯, 朱建亚, 等. 虎皮鱼热激蛋白PtHsp70 基因序列与低温表达分析[J]. *水产科学*, 2019, 38(6): 774-782.
- Liu L L, Wang X W, Zhu J Y, *et al.* Sequence cloning and cold-induced tissue-specific expression analysis of PtHsp70 in tiger barb *Puntius tetrazona*[J]. *Fisheries Science*, 2019, 38(6): 774-782 (in Chinese).
- [19] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method[J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [20] Freitas R, Gómez-Skarmeta J L, Rodrigues P N. New frontiers in the evolution of fin development[J]. *Journal of Experimental Zoology-Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 2014, 322(7): 540-552.
- [21] Haas H J. Studies on mechanisms of joint and bone formation in the skeleton rays of fish fins[J]. *Developmental Biology*, 1962, 5(1): 1-34.
- [22] Goldsmith M I, Fisher S, Waterman R, *et al.* Saltatory control of isometric growth in the zebrafish caudal fin is disrupted in *long fin* and *rapunzel* mutants[J]. *Developmental Biology*, 2003, 259(2): 303-317.
- [23] Metcalf D. The autonomous behaviour of normal thymus grafts[J]. *The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 1963, 41(S1): 437-447.
- [24] Metcalf D. Restricted growth capacity of multiple spleen grafts[J]. *Transplantation*, 1964, 2: 387-392.
- [25] Conlon L, Raff M. Size control in animal development[J]. *Cell*, 1999, 96(2): 235-244.
- [26] Levin M. Large-scale biophysics: ion flows and regeneration[J]. *Trends in Cell Biology*, 2007, 17(6): 261-270.
- [27] Tumaneng K, Russell R C, Guan K L. Organ size control by Hippo and TOR pathways[J]. *Current Biology*, 2012, 22(9): 368-379.

Phenotypic and transcriptomic analysis of long fins of tiger barb (*Puntius tetrazona*)

YANG Jihui^{1,2}, YAN Nan^{1,2}, CUI Wenyao^{1,2}, XIONG Jiafeng^{1,2}, HUANG Rong³, REN Jianfeng^{1,2*}

(1. International Research Center for Marine Biosciences, Ministry of Science and Technology, 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. Guangdong Aquarium Association, Guangzhou 510375, China)

Abstract: *Puntius tetrazona* is a small tropical ornamental fish with high economic value. Through the method of t-test, the body length (BL), caudal fin length (CL), segment number (SN) and segment length (SL) of caudal fin of *P. tetrazona* (wild type, WT) and (long fin, LF) were statistically analyzed. The results showed that there was no significant difference in BL between the WT ($n=30$) and LF ($n=30$) ($P>0.05$), but there were significant differences in CL ($P<0.0001$), SN ($P<0.0001$) and SL ($P<0.0001$). At the same time, linear regression analyses were performed on the caudal fin length, segment number and length of caudal fin of WT ($n=80$) and LF ($n=80$) *P. tetrazona* with different body length. The results showed that compared to WT, the caudal fin of LF *P. tetrazona* grew more rapidly (WT: $k=0.28$, LF: $k=0.62$, $P<0.0001$), the increasing frequency of the segment number of caudal fin was similar (WT: $k=0.79$, LF: $k=0.82$, $P=0.006$), and the segment length of caudal fin was much greater (WT: $k=0.0004$, LF: $k=0.0008$, $P<0.0001$). Transcriptome analysis of caudal fin of WT and LF adults showed that 56 271 unigenes were obtained from *de novo* transcriptome assembly. There were 1 304 differentially expressed genes between WT group ($n=3$) and LF group ($n=3$), of which 971 genes were up-regulated and 333 genes were down-regulated. The KEGG pathway enrichment analysis showed that the differentially expressed genes were significantly enriched into cell cycle and DNA replication signal pathways related to cell proliferation ($P<0.05$), in which *cyclin* (*cycA*, *cycB*, and *cycE*) and cyclin-dependent kinase 1 genes were significantly up-regulated. Finally, we determined the expression level of cytoskeleton associated protein 2-like, proliferation marker protein Ki-67, cell division cycle protein 20, protein regulator of cytokinesis 1, up-regulator of cell proliferation and cyclin-dependent kinase 1 by qRT-PCR. The results of qRT-PCR were consistent with those of RNA-seq. The above results showed that a mutated gene in LF *P. tetrazona* caused the up-regulated expression of cell cycle related genes, which accelerated the cell proliferation rate of caudal fin and resulted in increase of caudal fin segment length, showing the phenotype with a long caudal fin.

Key words: *Puntius tetrazona*; long fin mutant; caudal fin; transcriptome sequencing; differentially expressed gene; cell proliferation

Corresponding author: REN Jianfeng. E-mail: jfren@shou.edu.cn

Funding projects: Development of Genetic Improvement Technique for Ornamental Fish (D-8006-19-0166)