

DOI: 10.12264/JFSC2023-0322

## 鳊体色图案区转录组和酪氨酸酶家族基因在发育过程中的表达

谢金洋<sup>1,2,3</sup>, 李帅帅<sup>1,2,3</sup>, 薛文博<sup>1,2,3</sup>, 蔡康宁<sup>1,2,3</sup>, 赵金良<sup>1,2,3</sup>, 赵岩<sup>1,2,3</sup>

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. 上海海洋大学水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心, 上海 201306;
3. 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:** 鳊(*Siniperca chuatsi*)复杂的体色图案兼具生态意义和经济价值。为探究鳊色彩图案形成的分子机制, 对鳊体侧的图案区、非图案区以及腹部的皮肤进行转录组分析, 并利用荧光定量 PCR 技术测定酪氨酸酶家族基因在鳊胚胎至出膜后 30 d 内表达变化。结果显示, 3 处皮肤区域间差异表达基因主要富集在 ECM-受体相互作用、紧密连接、黏着等通路, 且以 MAPK 通路为核心通路。紧密连接蛋白(tight junction protein 1a, *tjp1a*)基因在非图案区的表达量显著高于图案和腹部区, 酪氨酸酶相关蛋白 1 (tyrosinase-related protein 1, *tyrp1*)、多巴色素异构酶(dopachrome tautomerase, *dct*)、小眼畸形相关转录因子 a (melanocyte inducing transcription factor a, *mitfa*)等基因在图案区的表达量显著高于非图案区和腹部区, 刺鼠信号蛋白 1 (agouti signaling protein 1, *asip1*)基因在腹部区的表达量要显著高于图案和非图案区。鳊在早期发育中, 酪氨酸酶(tyrosinase, *tyr*)和 *dct* 基因在原肠期开始显著增加( $P<0.05$ ), *tyrp1* 基因在出膜后 1 d 表达开始显著增加( $P<0.05$ ), *tyr*、*tyrp1*、*dct* 基因在出膜 7 d 左右表达显著下降, 到出膜 25 d 维持一定水平。综上, 细胞间通讯基因(*tjp1a*)和色素沉着基因(*tyrp1*、*dct*、*mitfa*、*asip1*)对鳊体色图案的形成发挥重要作用, 鳊胚胎早期黑色素的合成主要依赖 *tyr*、*dct* 基因, 出膜后黑色素的合成由 *tyr*、*tyrp1*、*dct* 基因共同作用。

**关键词:** 鳊; 体色图案; 转录组; 酪氨酸酶家族

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)05-0501-12

体色图案是鱼类最丰富的表型之一, 受到遗传<sup>[1]</sup>、环境<sup>[2]</sup>等多方面因素的影响, 对鱼类的生存、繁衍等具有重要意义<sup>[3-4]</sup>。鱼类体色图案的形成主要由色素细胞的数量、分布, 以及合成的色素所决定<sup>[5-6]</sup>。

近年来, 组学技术广泛应用于鱼类体色图案研究。其中以比较具有不同体色图案的个体或品种的研究较多, 如 Fang 等<sup>[7]</sup>、Zhu 等<sup>[8]</sup>、Hao 等<sup>[9]</sup>分别发现红罗非鱼(*Oreochromis* spp.)和石斑鱼(*Plectropomus leopardus*)中有红色图案的个体的皮肤对类胡萝卜素摄取、运输的能力较强于黑色个体, 且伴随着脂质代谢基因显著差异表达。Du 等<sup>[10]</sup>发现能量代谢基因会影响瓯江彩鲤(*Cyprinus*

*carpio* var. *color*)体色图案的形成。而利用组学比较同一个体不同体色图案区域的研究相对较少, 如 Lin 等<sup>[11]</sup>比较金钱鱼(*Scatophagus argus*)黑斑和非黑斑区域发现, 差异基因富集在色素沉着(如 MAPK 信号通路、酪氨酸代谢)和细胞间通讯(如黏着斑、ECM-受体相互作用)等通路。鱼类体色图案差异较大, 其形成过程中涉及到的通路、基因有待更广泛的研究。目前对鱼类形成某种颜色(如黑色、黄色等)或某种图案(如斑纹)的关键基因、通路了解比较清楚, 且可以通过对关键基因、通路进行操作改变个体体色图案, 但对特定位置的特定颜色或特定图案的形成机制尚待研究, 利用组学比较同一个体不同体色图案区域有助于研

收稿日期: 2023-12-26; 修订日期: 2024-04-08.

基金项目: 现代农业产业技术体系专项(CARS-46).

作者简介: 谢金洋(1998-), 男, 硕士研究生, 研究方向为鱼类遗传育种. E-mail: 1282882987@qq.com

通信作者: 赵岩, 副教授, 研究方向为水产种质资源与遗传育种. E-mail: y\_zhao@shou.edu.cn

究其作用机制。

翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*)是我国传统的淡水经济鱼类,其背部及体侧以黄色为底色,有头部过眼条纹、背鳍的第 5 至第 6 枚棘的下方有一条较宽的暗棕色垂直带纹(位置相对特定),体侧有斑块,腹部为白色。作为一种凶猛性鱼类,鲌喜藏于水底的石块或繁茂的草丛之中,而拥有上述较暗的花纹和配色图案,有利于其隐蔽捕食和躲避敌害。鲌皮肤存在 4 种色素细胞,主要处于表皮层和色素层,表皮层所含色素细胞较少,色素层所含色素细胞较多,由外向内排列为黄色素、红色素、黑色素和虹彩细胞<sup>[12]</sup>。研究表明,鲌体色图案与黑色素细胞、虹彩细胞关系密切<sup>[12-13]</sup>。而鲌体色图案形成过程中基因调控黑色素合成的方式和作用还有待深入研究。

本研究取 1 龄鲌体侧皮肤的图案、非图案和腹部区域进行转录组测序,取早期不同发育时期鲌观察体色图案发育并测定酪氨酸酶家族中 *tyr*、*tyrp1*、*dct* 基因的表达,从空间和时间两个维度上了解鲌体色图案形成过程中的基因表达,以期探究鲌体色图案形成的分子机制和进化适应研究提供理论资料。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

2023 年 2 月在上海海洋大学滨海基地,随机挑选 3 尾身体健康且体长(21.72±0.56) cm、体色正常的 1 龄鲌。取体侧图案(B)、非图案(Y)和腹部(W)皮肤组织(图 1)放置实验室-80 °C 保存。鲌胚胎和仔鱼于 2023 年 5 月取自于安徽省池州市秋浦特种水产开发有限公司养殖基地。收集鲌受精期、囊胚期、原肠期、体节期、咽囊期共 5 个时期的胚胎(20 颗卵为一个样本),以及出膜后 1、3、5、7、10、15、20、25、30 d(5 尾鱼为一个样本)的仔鱼。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 RNA 的提取与检测** 将 1 龄鲌体侧图案、非图案和腹部皮肤组织送北京百迈客生物科技有限公司,样品检测合格后使用 Illumina NovaSeq6000 测序平台进行转录组测序。使用

Trizol 试剂(TaKaRa, 北京)对 1 龄鲌体侧图案、非图案和腹部皮肤组织,以及鲌胚胎和仔鱼(全鱼)进行总 RNA 提取,利用 1%琼脂糖凝胶电泳、Nanodrop 微量分光光度计、Agilent 2100 等仪器检测样品 RNA 质量。

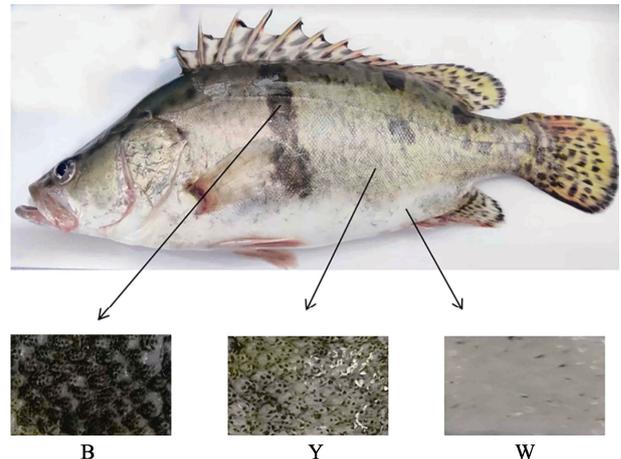


图 1 鲌图案(B)、非图案(Y)和腹部(W)皮肤组织  
Fig. 1 Pattern (B), non-pattern (Y) and abdomen (W) skin tissue of *Siniperca chuatsi*

**1.2.2 转录组数据分析** 利用 HISAT 2<sup>[14]</sup>软件将 clead reads 和鲌基因组(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/119488/>) 比对。利用 StringTie 对比对上的 reads 进行组装。使用 DESeq 软件进行差异基因分析,以|Fold Change|≥2 且 FDR<0.05 作为标准筛选差异表达基因,并通过 KEGG 数据库进行富集分析。

**1.2.3 荧光定量分析** 选择 5 个差异表达显著基因(*tyrp1*、*dct*、*mitfa*、*asip1*、*tjp1a*)来验证转录组测序结果,检测 *tyr*、*tyrp1*、*dct* 基因在鲌早期发育过程中的表达。使用 NCBI 的 Primer-blast(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) 程序设计引物(表 1),每个样本设置 3 个重复。按照 Prime Script RT 试剂盒(TaKaRa, Tokoy, Japan)说明书操作,实时荧光定量 PCR 反应体系 20 μL: 2×SYBR Green Prc Taq HS Premix, 10 μL; Primer F, 0.4 μL; Primer R, 0.4 μL; cDNA 模板, 1.0 μL; RNase free water, 8.2 μL。PCR 反应程序: 预变性 95 °C, 30 s; 变性 95 °C, 8 s, 退火 57.5 °C, 30 s, 共 40 个循环。采用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>法<sup>[15]</sup>分析基因的相对表达量。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Tab. 1 Primer sequence of real-time quantitative PCR

引物名称 primer	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')
<i>tyr</i> -F	G TTCCTGACGCCCTACCTCC
<i>tyr</i> -R	TCTGAGCTGCTTTGCAGTAGT
<i>tyrp1</i> -F	GAGGATCTCTGTGGTAAGGAGG
<i>tyrp1</i> -R	ATGTTCTCAAACCTGCGGGGT
<i>dct</i> -F	AGGTCGTCCATTCAAAGCCA
<i>dct</i> -R	TGCCGGTCAGTCTCTGTAGC
<i>mitfa</i> -F	TCGATGTGTACGGCAACCAA
<i>mitfa</i> -R	GCACGAACCTCAGCCTCTACT
<i>asip1</i> -F	GCCCAGGAACCACAGAGAAAAG
<i>asip1</i> -R	ATAACCACAGGAGGTGAGCC
<i>tjp1a</i> -F	GGA CTCCAGACGGCTTTT
<i>tjp1a</i> -R	TCTGAGCTGCTTTGCAGTAGT
$\beta$ -actin-F	GTGCGTGACATCAAGGAGAAG
$\beta$ -actin-R	GGAAGGAAGGCTGGAAGAGG

### 1.3 数据处理

利用 SPSS 26.0 统计软件进行方差齐性检验和单因素方差分析(one-way ANOVA), 以  $P < 0.05$  为差异显著。使用 Graphpad Prism 8.0 软件进行绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 转录组测序数据组装和比对

通过对 9 个样品进行转录组测序, 共获得 63.08 Gb clean data, 各样品 clean data 均达到 6.13 Gb。分别将各样品的 clean reads 与参考基因组进行比对, 比对效率为 94.29%~95.10%, GC 含量为 47.13~48.07, Q30 碱基百分比在 92.32%以上(表 2),

表明测序与组装质量较好。

**2.1.1 样本相关性分析及差异表达基因统计** 3 个重复组间去除相关性较差的一组。图案组 1、2 样本相关系数处于 0.851~1; 非图案组 1、3 样本相关系数处于 0.982~1; 腹部组 2、3 样本相关系数处于 0.932~1。图案组和非图案组相关系数处于 0.292~0.674; 图案组和腹部组相关系数处于 0.252~0.686; 非图案组和腹部组相关系数处于 0.813~0.884 (图 2a)。

3 种区域间共获得差异表达基因 4644 个, 各比较组别间共同差异基因 61 个(图 2b)。图案组和非图案组相比, 显著差异表达基因共 3175 个, 其中 1301 个基因上调, 1874 个基因下调; 图案组和腹部组相比, 显著差异表达基因共 3253 个, 其中 1501 个基因上调, 1752 个基因下调; 非图案组和腹部组相比, 显著差异表达基因共 708 个, 其中 411 个基因上调, 297 个基因下调。差异基因中存在细胞间通讯(如 *tjp1a*)和色素沉着(如 *tyrp1*、*dct*)等基因(表 3)。

**2.1.2 差异表达基因的 KEGG 通路富集分析** 图案组和非图案组的差异表达基因参与 212 个代谢通路中, 其中 43 个显著富集( $P < 0.05$ ); 图案组和腹部组的差异表达基因参与 222 个通路中, 其中 33 个显著富集( $P < 0.05$ ); 非图案组和腹部组的差异表达基因参与 147 个通路中, 其中 19 个显著富集( $P < 0.05$ )。按照  $P$  值从低到高排序, 选择排列靠前的显著富集通路( $\leq 30$  个)制作 KEGG 通路富集图(图 3)。结果显示, 图案组和非图案

表 2 鳊皮肤转录组测序数据统计

Tab. 2 Transcriptome sequencing data statistics of *Siniperca chuatsi* skin

样本 sample	有效数据 effective reads	定位到基因组的有效数据 mapped reads	GC 碱基比例/% GC count	Q30 碱基比例/% $\geq Q30$
B1	45018114	42445338 (94.29%)	47.75	93.50
B2	49545710	47101453 (95.07%)	48.05	95.34
B3	53263618	50638090 (95.07%)	47.93	94.73
Y1	42486334	40307757 (94.87%)	47.78	94.75
Y2	41021046	38998038 (95.07%)	47.57	94.37
Y3	53248924	50642074 (95.10%)	47.43	95.16
W1	41752978	39523123 (94.66%)	48.07	94.07
W2	43897408	41482882 (94.50%)	48.06	92.32
W3	52096470	49490383 (95.00%)	47.13	95.21

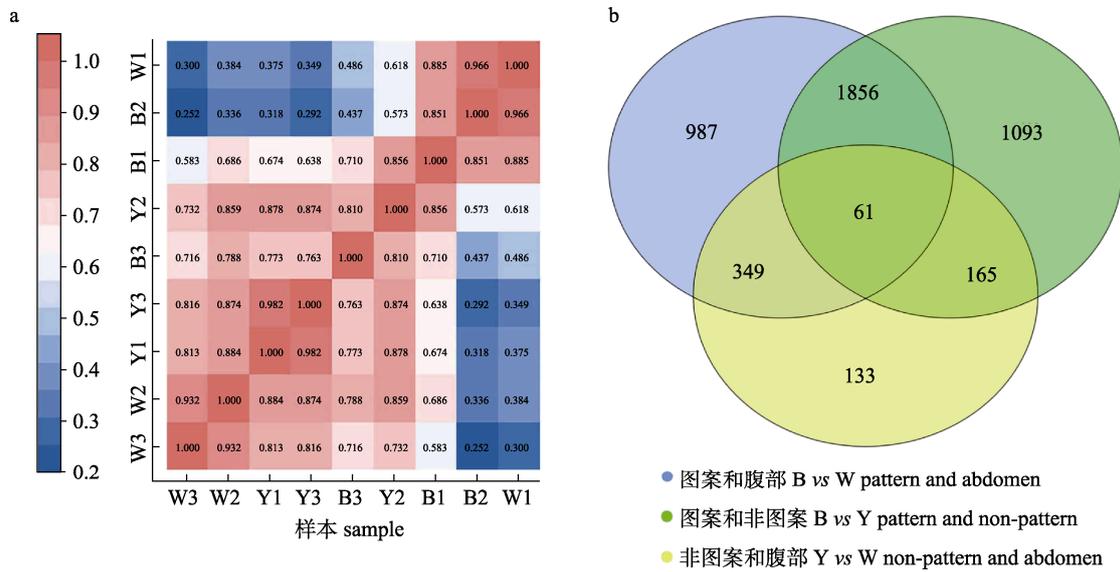


图 2 鳊不同区域皮肤组织间样本相关性分析热图(a)和差异表达基因韦恩图(b)

B: 图案皮肤组织; Y: 非图案皮肤组织; W: 腹部皮肤组织.

Fig. 2 Sample correlation analysis heat map (a) and differential expression gene Wayne map (b) of skin tissue in different regions of *Siniperca chuatsi*

B: pattern skin tissue; Y: non-pattern skin tissue; W: abdomen skin tissue.

表 3 鳊不同区域皮肤组织间细胞间通讯和色素沉着的差异表达基因

Tab. 3 Differentially expressed genes of intercellular communication and pigmentation in skin tissues of different regions of *Siniperca chuatsi*

基因名称 gene name	描述 description	FPKM 基因读数		
		图案(B)	非图案(Y)	腹部(W)
<i>tyrp1</i>	酪氨酸相关蛋白 1 tyrosinase-related protein 1	5.31324	1.76218	1.26563
<i>dct</i>	多巴色素互变异构酶 dopachrome tautomerase	1.72530	0.44584	0.09137
<i>mitfa</i>	小眼畸形相关转录因子 a melanocyte inducing transcription factor a	2.11617	0.56719	0.33466
<i>asip1</i>	刺鼠信号蛋白 1 agouti signaling protein 1	0.06009	0.48783	4.57802
<i>pmela</i>	前黑体素蛋白 a premelanosome protein a	13.61340	4.23566	4.72614
<i>mlpha</i>	嗜黑素 a melanophilin a	10.58490	2.72494	0.46046
<i>ltk</i>	白细胞受体酪氨酸激酶 leukocyte receptor tyrosine kinase	1.42322	2.25221	6.56281
<i>tjp1a</i>	紧密连接蛋白 1a tight junction protein 1a	14.06780	26.04090	13.37309

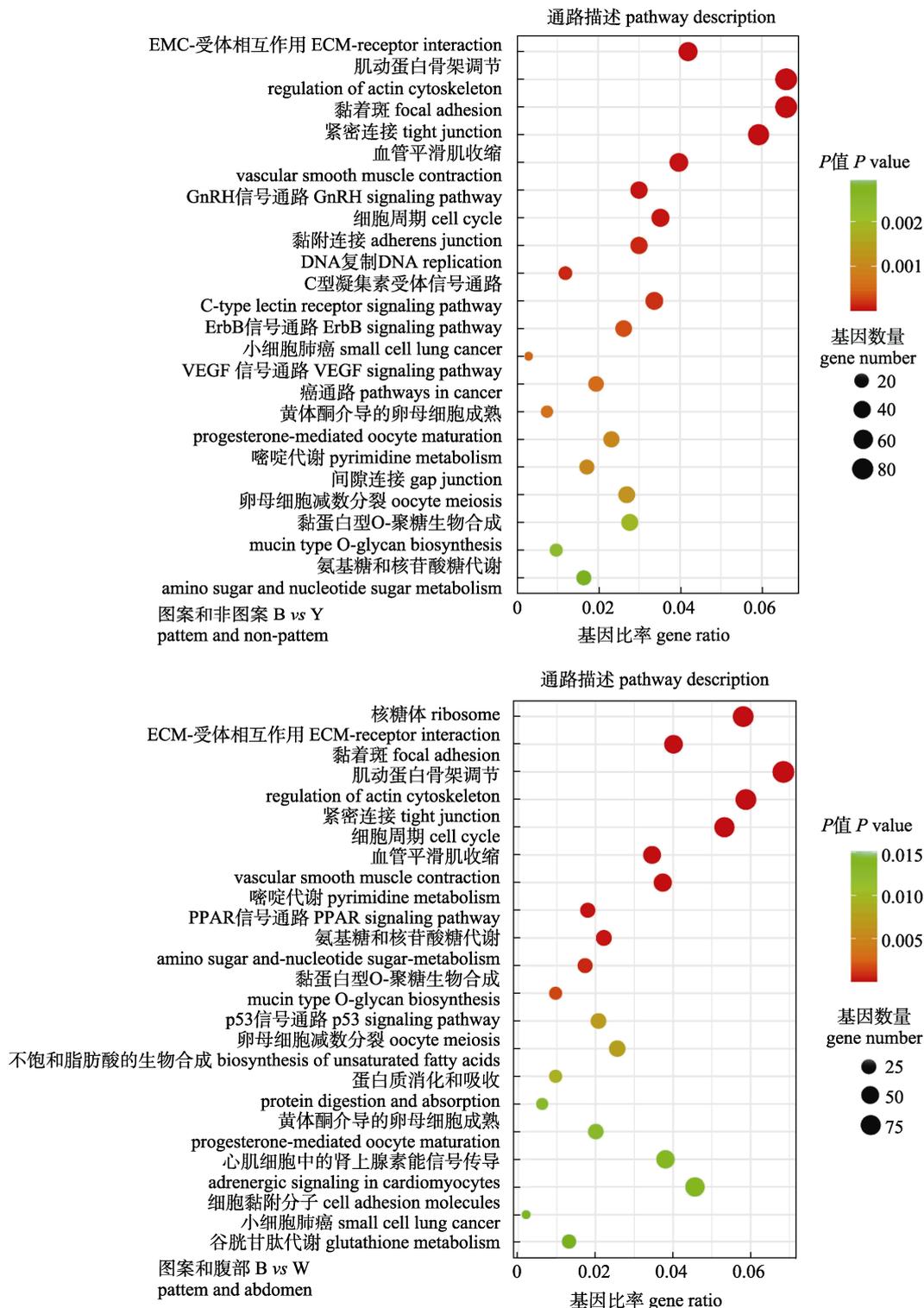
组的差异表达基因显著富集在黏着通路、紧密连接通路、ECM-受体相互作用通路、肌动蛋白细胞骨架调节通路、间隙连接通路、黑色素合成通路、MAPK 信号通路、黏着连接等通路(图 3a)。图案组和腹部组的差异表达基因显著富集在黏着连接通路、肌动蛋白细胞骨架调节通路、紧密连接通路、ECM-受体相互作用通路、嘌呤代谢通路、谷胱甘肽代谢等通路(图 3b); 非图案组和腹部组的差异表达基因显著富集在细胞因子-细胞因子受体相互作用、ECM-受体相互作用通路、黏着通路、Wnt 信号等通路(图 3c)。利用基迪奥生信云工具

(www.omicshare.com/tools/home/report/kegg\_senior\_network)对 KEGG 通路进行网络分析,发现图案组和非图案组间比较、图案组和腹部组间比较、非图案组和腹部组间比较的核心通路均为 MAPK 通路,且在细胞周期、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢等通路与其他通路有较多的连接(图 4)。

**2.1.3 关键(Hub)基因筛选** 使用 cytoscape 软件的 Degree 算法对差异表达基因进行 Hub 基因分析,并对所筛的前 10 基因进行绘图(图 5)。图案组和非图案组间差异基因间相互作用最多的是微型染色体维持蛋白(minichromosome maintenance

complex component 4, *mcm4*), 该基因在非图案组呈下调趋势( $\log_2|FC|=-2.720$ )(图 5a); 图案组和腹部组间差异基因间相互作用最多的是核糖体蛋白 S27a (ribosomal protein S27a, *rps27a*), 该基因在

腹部组呈上调趋势( $\log_2|FC|=1.675$ )(图 5b); 非图案组和腹部组间差异基因间相互作用最多的是 Wnt 家族成员 5a (Wnt family member 5a, *wnt5a*), 该基因在腹部组呈下调趋势( $\log_2|FC|=-1.812$ )(图 5c)。



(待续 to be continued)

(续图 3 Fig. 3 continued)

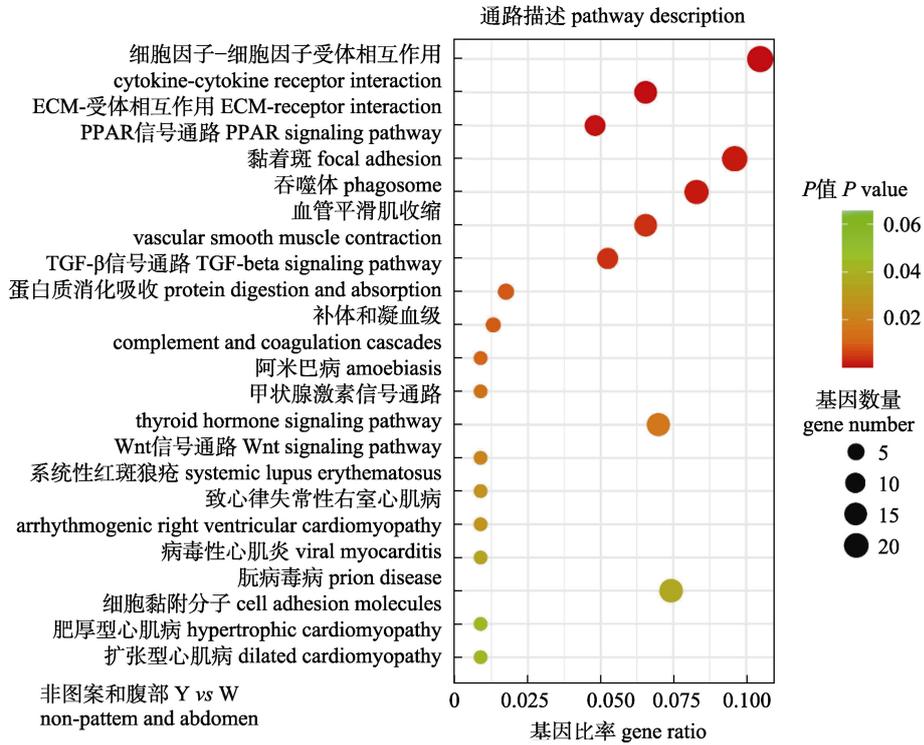


图 3 鳊不同区域皮肤组织间差异表达基因的 KEGG 富集结果

a. 图案(B)和非图案(Y)皮肤组织相比; b. 图案(B)和腹部(W)皮肤组织相比; c. 非图案(Y)和腹部(W)皮肤组织相比。

Fig. 3 KEGG enrichment results of differentially expressed genes between skin tissues in different regions of *Siniperca chuatsi*  
a. Pattern (B) vs non-pattern (Y) skin tissue; b. Pattern (B) vs abdomen (W) skin tissue;  
c. Non-pattern (Y) vs abdomen (W) skin tissue.

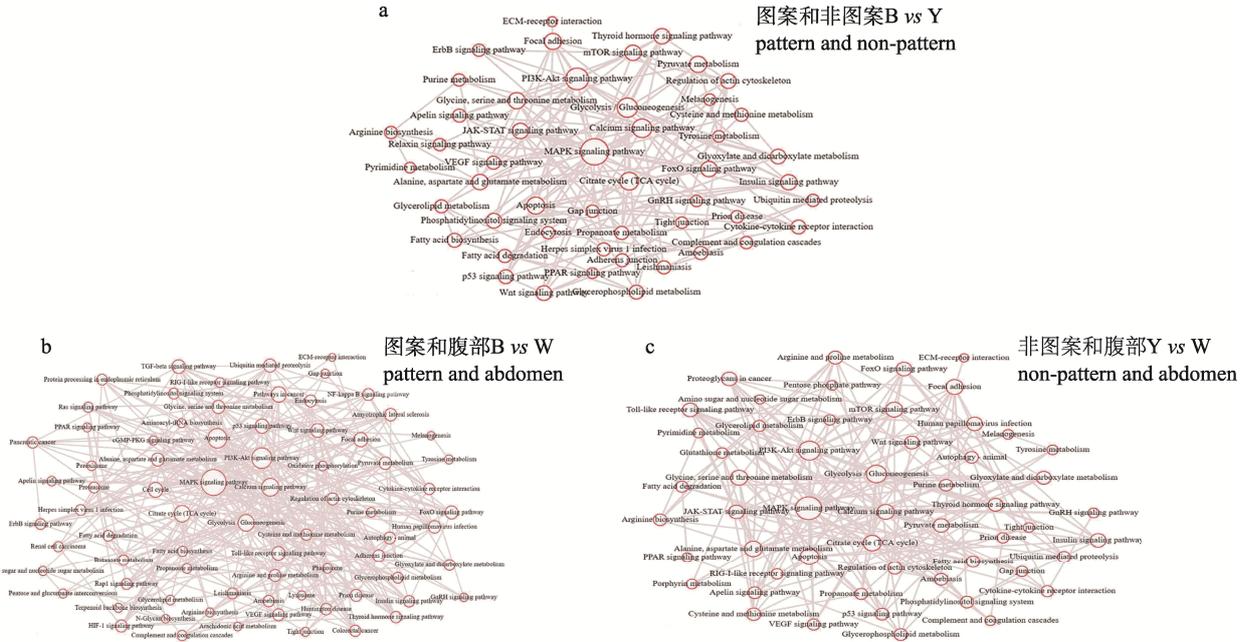


图 4 鳊不同区域皮肤组织间差异表达基因的 KEGG 核心通路

a. 图案(B)和非图案(Y)皮肤组织相比; b. 图案(B)和腹部(W)皮肤组织相比; c. 非图案(Y)和腹部(W)皮肤组织相比。

Fig. 4 KEGG core pathway of differentially expressed genes between skin tissues in different regions of *Siniperca chuatsi*  
a. Pattern (B) vs non-pattern (Y) skin tissue; b. Pattern (B) vs abdomen (W) skin tissue; c. Non-pattern (Y) vs abdomen (W) skin tissue.

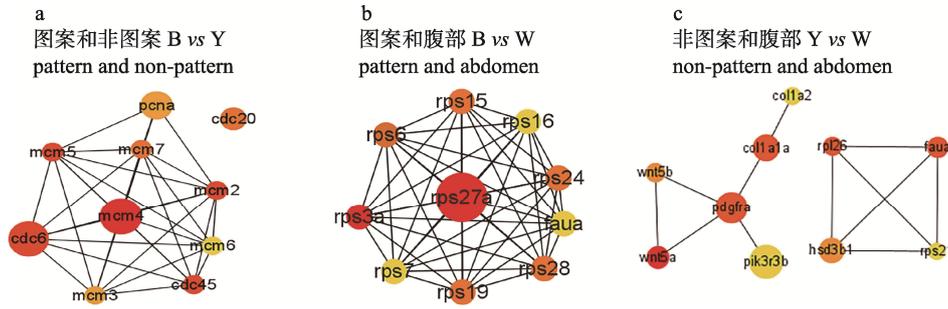


图 5 鳅不同区域皮肤组织间差异表达基因的 Hub 基因网络图

a. 图案(B)和非图案(Y)皮肤组织相比; b. 图案(B)和腹部(W)皮肤组织相比; c. 非图案(Y)和腹部(W)皮肤组织相比。

Fig. 5 Hub gene network map of differentially expressed genes between skin tissues in different regions of *Siniperca chuatsi*

a. Pattern (B) vs non-pattern (Y) skin tissue; b. Pattern (B) vs abdomen (W) skin tissue; c. Non-pattern (Y) vs abdomen (W) skin tissue.

2.1.4 测序结果荧光定量验证 *tyrp1*、*dct*、*mitfa*、*asip1*、*tip1a* 这 5 个基因的荧光定量表达趋势与转录组测序结果相同(图 6), 表明转录组分析结果准确可靠。

2.2 鳅早期体色观察及 *tyr*、*tyrp1*、*dct* 基因的表达

2.2.1 鳅早期体色图案发育 鳅黑色素细胞在咽囊期大量增加(图 7e)。出膜后 1~5 d (图 7f, g, h)。鳅背鳍基部、腹部上方的黑色素增多, 黄色素和

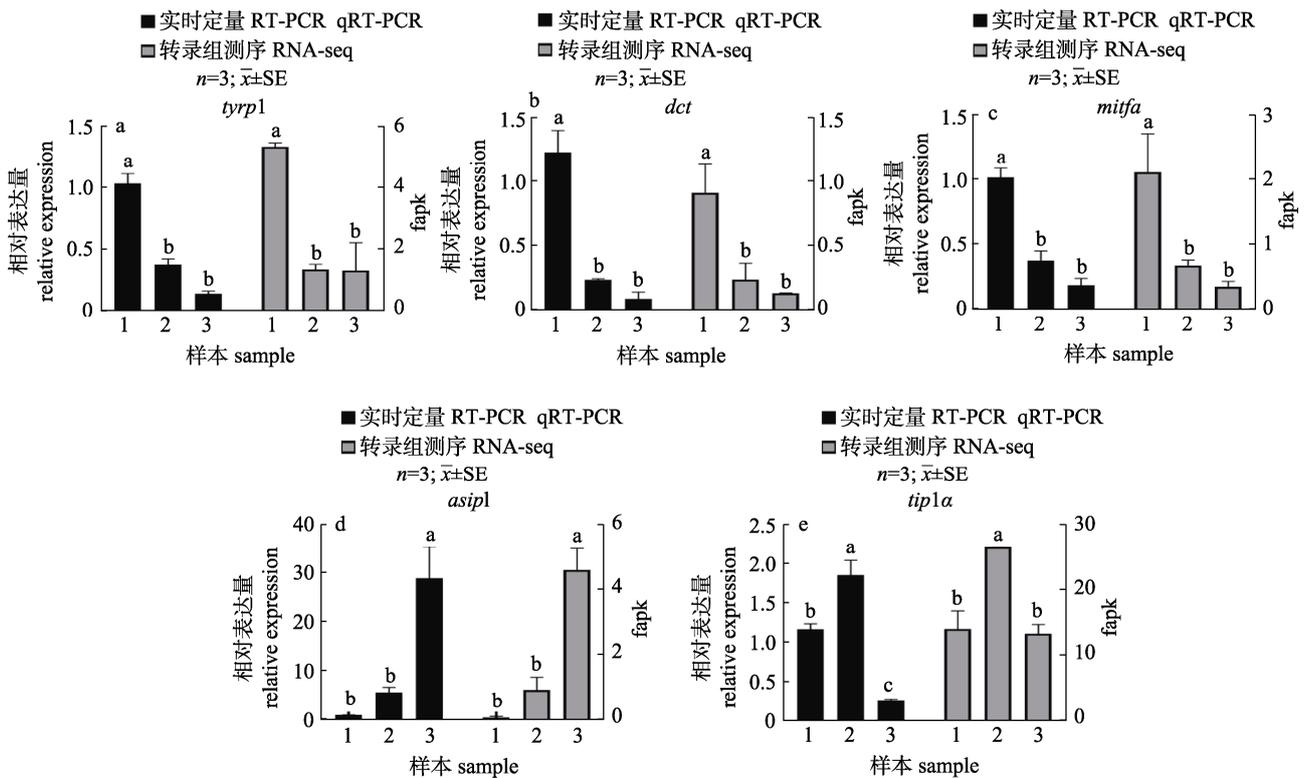


图 6 鳅不同区域皮肤组织间差异表达基因的 qRT-PCR 和 RNA-seq 验证

不同字母表示各组间差异显著( $P < 0.05$ )

1: 图案皮肤组织; 2: 非图案皮肤组织; 3: 腹部皮肤组织。

Fig. 6 qRT-PCR (black) and RNA-seq (gray) validation of differentially expressed genes between different skin tissues in different regions of *Siniperca chuatsi*

Different letters indicate significant differences among groups ( $P < 0.05$ ).

1: pattern skin tissue; 2: non-pattern skin tissue; 3: abdomen skin tissue.

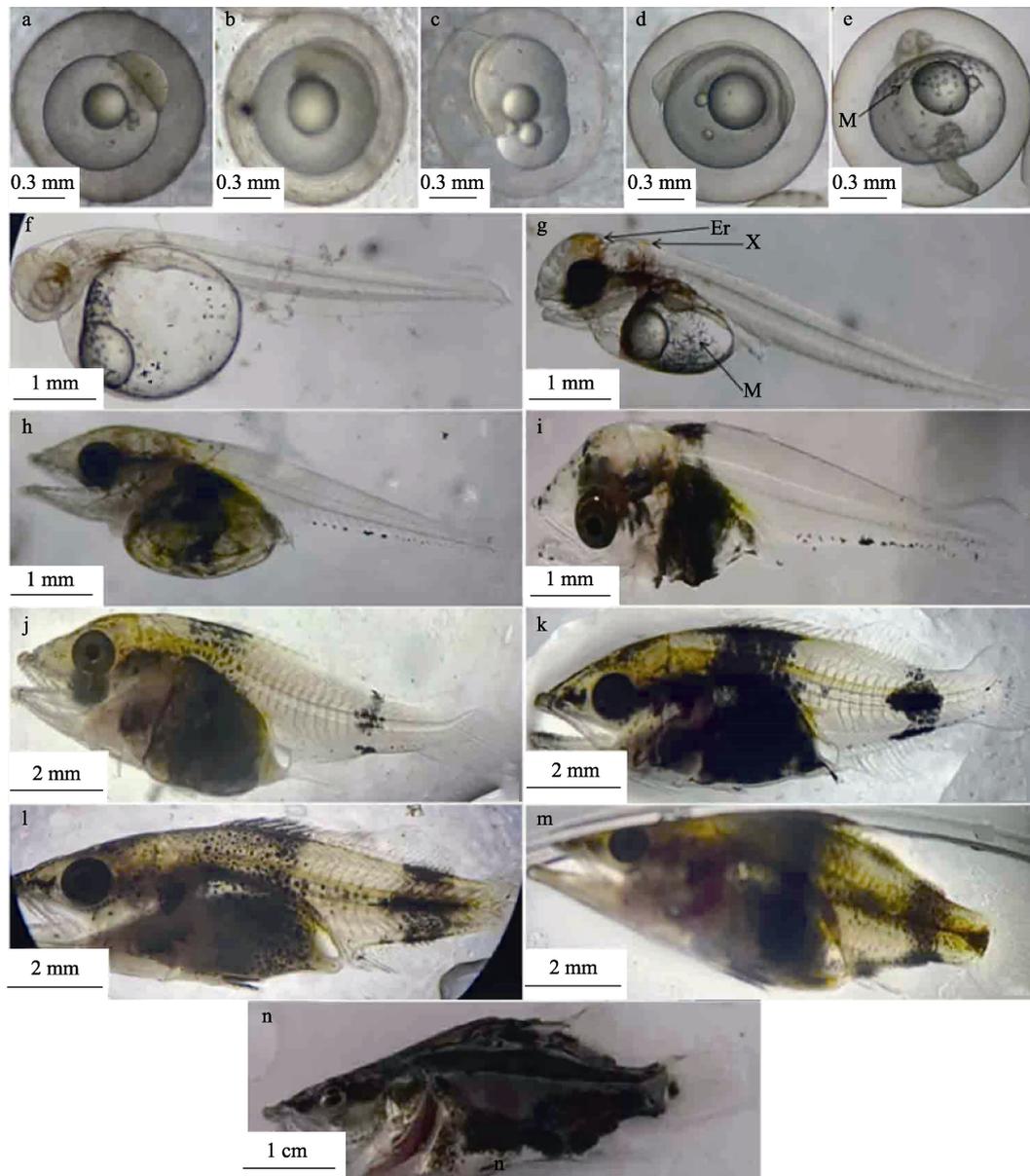


图 7 鳊胚胎及仔鱼期色素分布

a. 受精期; b. 囊胚期; c. 原肠期; d. 体节期; e. 咽囊期; f. 出膜后 1 d; g. 出膜后 3 d; h. 出膜后 5 d; i. 出膜后 7 d; j. 出膜后 10 d; k. 出膜后 15 d; l. 出膜后 20 d; m. 出膜后 25 d; n. 出膜后 30 d. M: 黑色素细胞; X: 黄色素细胞; Er: 红色素细胞.

Fig. 7 The pigmentation formation in embryos and larvae stages of *Siniperca chuatsi*

a. Fertilization stage; b. Blastocyst stage; c. Gastrula stage; d. Somite stage; e. Pharyngeal sac stage; f. 1 dph; g. 3 dph; h. 5 dph; i. 7 dph; j. 10 dph; k. 15 dph; l. 20 dph; m. 25 dph; n. 30 dph; M: Melanophores; X: Xanthophores; Er: Erythrophores.

红色素较为明显。出膜后 7~15 d (图 7i, 7j, 7k)。背鳍基部和腹部上方的黑色素逐渐相连, 并最先形成体侧纵带, 尾部底端出现黑色素细胞, 并逐渐向上端延伸; 黄色素细胞与黑色素细胞重叠, 并逐渐向尾部延伸; 红色素细胞数量较少, 与黑色素细胞和黄色素细胞重叠。出膜后 20~25 d (图

7l, 7m)。尾部黑斑开始出现, 黄色素细胞基本覆盖全身。出膜后 30 d (图 7n)。鳊体色图案完全形成。  
**2.2.2 *tyr*、*tyrp1*、*dct* 基因在鳊不同发育时期的表达** qRT-PCR 检测结果显示, *tyr*、*tyrp1*、*dct* 基因在鳊受精期、囊胚期、原肠期、体节期、咽囊期、出膜后 1、3、5、7、10、15、20、25、30 d

的各时期均有表达。*tyr* 基因在受精期、囊胚期极少表达, 其表达量在原肠期显著增加, 体节期达到顶峰( $P<0.05$ ) (图 8a), 咽囊期开始逐渐降低; *tyrp1* 基因在出膜前极少表达, 其表达量在出膜后

1 d 显著增加, 之后逐渐降低( $P<0.05$ ) (图 8b); *dct* 基因在受精期、囊胚期极少表达, 其表达量在原肠期显著增加, 咽囊期达到顶峰( $P<0.05$ ), 出膜后 1 d 后开始逐渐降低(图 8c)。

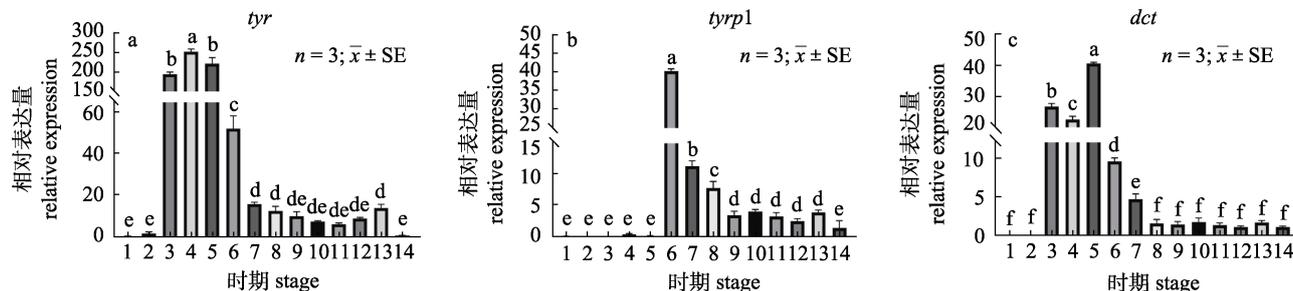


图 8 *tyr*、*tyrp1*、*dct* 基因在鳃早期不同发育时期的表达  
不同字母表示各时期间差异显著( $P<0.05$ )。

1. 受精期; 2. 囊胚期; 3. 原肠期; 4. 体节期; 5. 咽囊期; 6. 出膜后 1 d; 7. 出膜后 3 d; 8. 出膜后 5 d; 9. 出膜后 7 d;
10. 出膜后 10 d; 11. 出膜后 15 d; 12. 出膜后 20 d; 13. 出膜后 25 d; 14. 出膜后 30 d.

Fig. 8 The expression of *tyr*, *tyrp1* and *dct* genes in different developmental stages of *Siniperca chuatsi*. Different letters indicate significant differences among different stages ( $P<0.05$ ).

1. Fertilization stage; 2. Blastocyst stage; 3. Gastrula stage; 4. Somite stage; 5. Pharyngeal sac stage; 6. 1 dph; 7. 3 dph;
8. 5 dph; 9. 7 dph; 10. 10 dph; 11. 15 dph; 12. 20 dph; 13. 25 dph; 14. 30 dph.

### 3 讨论

#### 3.1 体色形成相关通路

鳃图案、非图案和腹部皮肤在视觉上存在明显差异, 图案区黑色素细胞大量聚集, 非图案和腹部区处黑色素细胞呈现点状分布或不分布。鱼类体色的形成和维持涉及到色素沉着和色素细胞间相互作用<sup>[16-17]</sup>。ECM-受体相互作用、紧密连接、黏着等细胞间通讯虽然不参与色素沉着, 但是可以通过色素细胞间的相互作用影响体色图案<sup>[18]</sup>。本研究中, 图案、非图案和腹部皮肤间的差异表达基因主要富集在 ECM-受体相互作用等细胞间通讯通路, 说明不同区域间的色素细胞数量、位置变化和细胞间通讯通路有关, 这一点与对金钱鱼皮肤斑点和非斑点区域的组学研究比较类似<sup>[13]</sup>。很多对鱼类颜色图案的组学比较研究都发现差异基因富集于 MAPK 信号通路。MAPK 信号通路可以和黑色素合成通路、Wnt 信号通路共同影响色素沉着<sup>[19-20]</sup>。本研究中也发现 MAPK 信号通路是不同区域间比较的核心通路, 充分说明 MAPK 信号通路在鱼类体色图案形成中的重要作用。

#### 3.2 体色形成相关基因

本研究中, 非图案和腹部间差异基因数量(708 个)要远远低于图案和非图案间差异基因数量(3175 个)、图案和腹部间差异基因数量(3253 个)。图案和非图案、腹部相关系数差距较大, 分别为 0.292~0.674 和 0.252~0.686, 非图案和腹部相关系数差距较小, 为 0.813~0.884, 表明非图案和腹部的样本相关性较强, 与图案区的样本相关性较弱。

*tjp1* 基因(tight junction protein 1, 也被称为 zo-1)编码一种紧密连接蛋白, 参与细胞间的相互连接。*tjp1* 基因在密集的虹彩细胞中高表达, 在松散的虹彩细胞中以及在黑色素、黄色素细胞中低表达, *tjp1a* 基因通过影响虹彩细胞的数量及类型进而改变鱼类体色图案<sup>[11,18]</sup>。鳃虹彩细胞分为长型和短型, 长型虹彩细胞存在于图案区的黑色素细胞下方, 短型虹彩细胞存在于非图案区的黄、红色素细胞下方<sup>[12]</sup>。本研究中, *tjp1a* 基因在非图案区的表达量要显著高于图案、腹部区, 推测 *tjp1a* 基因的高表达能促使虹彩细胞大量聚集并限制黑色素细胞在特定位置, 从而形成条带或斑

点图案。

*tyrp1*、*dct*、*mitfa*、*asip1* 基因属于色素沉着相关基因。*tyrp1*、*dct* 基因具有稳定酪氨酸酶的功能,能促进黑色素细胞增殖<sup>[21]</sup>。*mitfa* 基因作为黑色素合成通路的中枢基因,影响黑色素的合成和黑色素细胞的存活<sup>[22]</sup>。*asip1* 基因可抑制 *mitfa* 基因的表达水平<sup>[23]</sup>。本研究中,*tyrp1*、*dct*、*mitfa* 基因在图案区的表达量要高于非图案和腹部区,*asip1* 基因在腹部区的表达量要显著高于图案、非图案区,这与比较毕加索小丑鱼 (*Amphiprion percula*) 3 种色彩图案区(黑色,黄色,白色)的转录组结果相类似<sup>[24]</sup>,但不同于对黑、白乌鳢 (*Channa argus*) 的研究,其中 *dct* 基因表达无显著差异<sup>[25]</sup>。

### 3.3 不同颜色区域间比较的 *Hub* 基因

通过对 *Hub* 基因筛选发现,在图案和非图案区之间,*mcm4* 是核心基因,参与 DNA 的复制、延长、转录及修复,还能够影响真核基因组复制的启动<sup>[26]</sup>。在图案和腹部区之间,*rps27a* 是核心基因,能够促进细胞增殖、调节细胞周期进程<sup>[27]</sup>。在非图案和腹部区之间,*wnt5a* 是核心基因,可以抑制经典 Wnt 信号通路,降低黑色素的合成表达<sup>[28]</sup>。

### 3.4 酪氨酸酶家族基因在发育过程中表达变化

色素基因的表达与体色图案的形成密切相关。研究表明,酪氨酸在酪氨酸酶的作用下形成多巴色素,其中大部分经 *tyr* 基因的作用直接形成真黑素,小部分先经 *dct* 基因的催化形成 5,6-二羟基吲哚羧酸 (5,6-dihydroxyindole carboxylic acid, DHICA),再由 *tyrp1* 基因催化最终形成真黑素<sup>[6]</sup>。本研究中,黑色素细胞在咽囊期大量增加,*tyr*、*dct* 基因在胚胎的不同发育时期均存在表达,其中在原肠期到咽囊期的表达量较高。*tyrp1* 基因的表达明显滞后 *tyr*、*dct* 基因,其在出膜后 1 d 表达显著增加。推测鳃胚胎早期真黑素的合成主要依赖 *tyr* 基因和 *dct* 基因,*tyrp1* 基因受到 DHICA 浓度的影响<sup>[29]</sup>,参与出膜后黑色素的合成。此外,*tyr*、*tyrp1*、*dct* 的表达水平在出膜 7 d 左右显著下降,在出膜 25 d 前维持在这一水平,而相应时期鳃已在体表鳃后至全长约 1/2 处和尾柄前附近出现黑色图案,其余部分几乎透明,说明这一时期

黑色素形成相对稳定,图案区的形成可能和色素细胞间的作用和运动有关。

综上所述,本研究在空间和时间两个维度上分析了鳃体色图案形成过程中的基因表达。3 处皮肤区域间差异表达基因主要富集在 ECM-受体相互作用、紧密连接、黏着等通路。细胞间通讯基因(*tjp1a*)和色素沉着基因(*tyrp1*、*dct*、*mitfa*、*asip1*)对鳃体色图案的形成发挥重要作用。*tyr*、*tyrp1*、*dct* 基因表达在鳃胚胎发育中存在时序性差异。此外,组学分析中发现大量差异基因不属于细胞间通讯基因或色素沉着基因,这些基因在体色形成过程的作用有待进一步研究。

### 参考文献:

- [1] Kottler V A, Schartl M. The colorful sex chromosomes of teleost fish[J]. *Genes*, 2018, 9(5): 233-249.
- [2] Yang T S, Kasagi S, Takahashi A, et al. Effects of background color and feeding status on the expression of genes associated with body color regulation in the goldfish *carassius auratus*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2021, 312: 113860.
- [3] Pawluk R J, de Leaniz C G, Cable J, et al. Colour plasticity in response to social context and parasitic infection in a self-fertilizing fish[J]. *Royal Society Open Science*, 2019, 6(7): 181418.
- [4] 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.
- [5] Patterson L B, Parichy D M. Zebrafish pigment pattern formation: insights into the development and evolution of adult form[J]. *Annual Review of Genetics*, 2019, 53(1): 505-530.
- [6] Osuna I, Dolinska M B, Sergeev Y V. In vitro reconstitution of the melanin pathway's catalytic activities using tyrosinase nanoparticles[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(1): 639-654.
- [7] Fang W Y, Huang J R, Li S Z, et al. Identification of pigment genes (melanin, carotenoid and pteridine) associated with skin color variant in red tilapia using transcriptome analysis[J]. *Aquaculture*, 2022, 547: 737429.
- [8] Zhu X W, Hao R J, Tian C X, et al. Integrative transcriptomics and metabolomics analysis of body color formation in the leopard coral grouper (*plectropomus leopardus*)[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2021, 8: 726102.
- [9] Hao R J, Zhu X W, Tian C X, et al. Integrated analysis of the

- role of mirna-mrna in determining different body colors of leopard coral grouper (*Plectropomus leopardus*)[J]. *Aquaculture*, 2022, 548: 737575.
- [10] Du J X, Chen X W, Wang J, et al. Comparative skin transcriptome of two oujiang color common carp (*Cyprinus carpio* var. color) varieties[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2019, 45(1): 177-185.
- [11] Lin X Z, Tian C X, Huang Y, et al. Comparative transcriptome analysis identifies candidate genes related to black-spotted pattern formation in spotted scat (*Scatophagus argus*)[J]. *Animals*, 2021, 11(3): 765-775.
- [12] Liu W. Preliminary study on skin pattern formation and the gene expression of two connexins cx39.4 and cx41.8 in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020. [刘伟. 鳊皮肤图案形成与Cx39.4、Cx41.8基因表达的初步研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.]
- [13] Wu M L, Chen X W, Cui K, et al. Pigmentation formation and expression analysis of tyrosinase in *Siniperca chuatsi*[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2020, 46(4): 1279-1293.
- [14] Kim D, Langmead B, Salzberg S L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements[J]. *Nature Methods*, 2015, 12(4): 357-360.
- [15] 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.
- [16] Liu L L, Wang X W, Zhang R, et al. Cell junction and vesicle trafficking-mediated melanosome/melanin transfer are involved in the dynamic transformation of goldfish *Carassius auratus* skin color[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(20): 12214.
- [17] McKeown S J, Wallace A S, Anderson R B. Expression and function of cell adhesion molecules during neural crest migration[J]. *Developmental Biology*, 2013, 373(2): 244-257.
- [18] Djurdjević I, Furmanek T, Miyazawa S, et al. Comparative transcriptome analysis of trout skin pigment cells[J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 359-374.
- [19] Song F B, Wang L, Yang Z H, et al. Transcriptome analysis reveals the complex regulatory pathway of background color in juvenile *Plectropomus leopardus* skin color variation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(19): 11186.
- [20] Li R N, Wang S S, Tian Z, et al. Comparative transcriptome analysis of body color change in red celestial goldfish *Carassius auratus*[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2022, 37(2): 191-201. [李荣妮, 王赛赛, 田仲, 等. 红望天眼金鱼皮肤变色机制的转录组学分析[J]. *大连海洋大学学报*, 2022, 37(2): 191-201.]
- [21] Rad H H, Yamashita T, Jin H Y, et al. Tyrosinase-related proteins suppress tyrosinase-mediated cell death of melanocytes and melanoma cells[J]. *Experimental Cell Research*, 2004, 298(2): 317-328.
- [22] Jiang B J, Wang L M, Luo M K, et al. Molecular and functional analysis of the microphthalmia-associated transcription factor (*mitf*) gene duplicates in red tilapia[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2022, 271: 111257.
- [23] Cal L, Suarez-Bregua P, Comesaña P, et al. Countershading in zebrafish results from an *asip1* controlled dorsoventral gradient of pigment cell differentiation[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 3449-3462.
- [24] He L B, Huang Z, Wu S Q, et al. Transcriptome analysis identifies candidate genes related to albinism mechanism in the skin of the *Picasso clownfish*[J]. *Haiyang Xuebao*, 2022, 44(2): 67-76. [何丽斌, 黄镇, 吴水清, 等. 基于转录组测序技术对调控毕加索小丑鱼(*Picasso clownfish*)白化体征关键基因的研究[J]. *海洋学报*, 2022, 44(2): 67-76.]
- [25] Li Y, Zhou Y, Lei L, et al. Exploration of molecular mechanism of skin albinism in albino northern snakehead *Channa argus* var. (*teleostei: channidae*) based on transcriptome sequencing[J]. *Fisheries Science*, 2022, 41(5): 715-726. [李岩, 周燕, 雷骆, 等. 基于转录组测序探究乌鳢皮肤白化的分子机制[J]. *水产科学*, 2022, 41(5): 715-726.]
- [26] Champasa K, Blank C, Friedman L J, et al. A conserved *mcm4* motif is required for *mcm2-7* double-hexamer formation and origin DNA unwinding[J]. *eLife*, 2019, 8: e45538.
- [27] Luo J S, Zhao H, Chen L X, et al. Multifaceted functions of *rps27a*: an unconventional ribosomal protein[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2023, 238(3): 485-497.
- [28] Lin X R, Meng X M, Lin J R. The possible role of *wnt/β-catenin* signalling in vitiligo treatment[J]. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 2023, 37(11): 2208-2221.
- [29] Tian X, Pang X L, Wang L Y, et al. Expression of *mitfa* and *tyr* gene in body color formation in red color koi carp *Cyprinus carpio* at different stages[J]. *Fisheries Science*, 2017, 36(2): 197-201. [田雪, 庞小磊, 王良炎, 等. MITFa及TYR基因在红色锦鲤体色发生不同阶段的表达分析[J]. *水产科学*, 2017, 36(2): 197-201.]

## Transcriptome analysis of body color pattern regions and expression analysis of tyrosinase family genes during development in *Siniperca chuatsi*

XIE Jinyang<sup>1,2,3</sup>, LI Shuaishuai<sup>1,2,3</sup>, XUE Wenbo<sup>1,2,3</sup>, CAI Kangning<sup>1,2,3</sup>, ZHAO Jinliang<sup>1,2,3</sup>, ZHAO Yan<sup>1,2,3</sup>

1. Key Laboratory of Freshwater Fishery Germplasm Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Shanghai Collaborative Innovation for Aquatic Animal Genetics and Breeding, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

**Abstract:** *Siniperca chuatsi* is an economically important freshwater fish in China that prefers to hide near stones or lush grass at the bottom of water bodies. The back and body sides were yellow with dark brown markings, with a white abdomen. Such a unique skin pattern is conducive to hidden predation and avoiding enemies. Research on the formation of different color patterns in mandarin fish skin is mainly based on observing the types and distribution of pigment cells, while research on the corresponding molecular regulation mechanism is relatively scarce. In recent years, omics technology has been applied to the study of fish body color patterns, which can identify candidate pathways and genes related to body color formation. The complex body color pattern of *Siniperca chuatsi* has ecological significance and economic value. To explore the molecular mechanism of the color pattern formation of *Siniperca chuatsi*, transcriptome analysis was carried out on the pattern area, non-pattern area, and abdominal skin of the body side of *Siniperca chuatsi*. The expression changes of tyrosinase family genes in *Siniperca chuatsi* from the embryo to 30 dph were determined using fluorescence quantitative PCR; this showed that the differentially expressed genes between the three skin regions were mainly enriched in ECM-receptor interaction, tight junction, adhesion, and other pathways, and the MAPK pathway was the core pathway. The expression of tight junction protein 1a (*tjp1a*) in the non-patterned area was significantly higher than in the patterned and abdominal areas. The expression levels of tyrosinase-related protein 1 (*tyrp1*), dopachrome tautomerase (*dct*), and melanocyte-inducing transcription factor a (*mitfa*) in the patterned areas were significantly higher than those in the non-patterned and abdominal areas. The expression of the agouti signaling protein 1 (*asip1*) gene in the abdominal region was significantly higher than in the patterned and non-patterned regions. In the early development of *Siniperca chuatsi*, the expression of the tyrosinase (*tyr*) and *dct* genes began to increase significantly at the gastrula stage ( $P < 0.05$ ). The *tyrp1* gene began to increase significantly at 1 dph ( $P < 0.05$ ). The expression of the *tyr*, *tyrp1*, and *dct* genes decreased significantly at approximately 7 dph and was maintained at a certain level at 25 dph. In summary, *tjp1a*, *tyr*, *tyrp1*, *dct*, *mitfa*, and *asip1* help form the body color pattern of *Siniperca chuatsi*. The expression of *tyrp1* lags behind *tyr* and *dct* in melanin synthesis during the early development of *Siniperca chuatsi*. The expression of *tyr*, *tyrp1*, and *dct* tended to be stable after high expression to maintain pattern formation.

**Key words:** *Siniperca chuatsi*; body color; transcriptome; tyrosinase family

**Corresponding author:** ZHAO Yan. E-mail: y\_zhao@shou.edu.cn