

DOI: 10.12264/JFSC2025-0009

## 青田田鱼早期发育转录组分析

曹姜伟<sup>1,2,3</sup>, 温远林<sup>1,2,3</sup>, 陆俊杰<sup>1,2,3</sup>, 李志力<sup>1,2,3</sup>, 程向兵<sup>1,2,3</sup>, 何旭盟<sup>1,2,3</sup>,  
孙佳敏<sup>1,2,3</sup>, 刘其根<sup>1,2,3</sup>

1. 上海海洋大学, 农业农村部鱼类营养与环境生态研究中心, 上海 201306;
2. 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;
3. 上海海洋大学, 农业农村部稻渔综合种养生态重点实验室, 上海 201306

**摘要:** 青田田鱼(*Cyprinus carpio* var. *qingtianensis*)作为青田稻鱼共生系统的核心元素, 其早期发育尚缺乏系统研究, 限制了对其早期生物学过程的深入理解。本研究利用转录组测序技术, 对青田田鱼从原肠期(TS1)、6肌节期(TS2)、眼色素期(TS3)、孵化(TS4)、孵化后12h(TS5)、孵化后24h(TS6)进行了转录组测序。差异表达分析共鉴定出31153个差异表达转录本。GO和KEGG富集分析表明, TS2vsTS1阶段的差异表达基因主要富集于核酸代谢和细胞周期相关通路, 表明胚胎从囊胚期向体节形成过渡时细胞增殖活跃; TS3vsTS2中, 上调基因显著参与骨骼肌形成和有氧代谢过程, 提示肌肉和能量代谢系统开始建立; TS4vsTS3中, 心肌收缩、神经发育及感知功能相关通路显著激活, 反映出从器官形成到孵化前的功能完善过程; TS5vsTS4与TS6vsTS5阶段的差异基因相对较少, 主要涉及应激响应及免疫功能, 表明孵化后转向环境适应阶段。研究发现, 青田田鱼在早期发育中采用“先构架、后加速”策略, 在合子基因激活后, 母源因子仍持续调控发育。能量代谢方面, 青田田鱼通过降低氧化磷酸化并激活HIF-1信号适应稻田低氧环境。在cluster6中鉴定出16个与编码HCE表达相关的转录本, 其中除一个未被注释外, 其余均对应于*hce1*和*hce2*基因, 表明青田田鱼的孵化过程可能主要依赖于高卵壳裂解酶(high choriolytic enzyme, HCE)的作用。本研究为理解青田田鱼早期发育的分子机制提供了重要数据支持, 揭示了其在稻田生态系统中的独特发育特征, 并为进一步探索其调控机制奠定了基础。

**关键词:** 青田田鱼; 早期发育; 转录组测序; 稻鱼共生

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2025)06-0766-20

鱼类的早期发育是一个高度动态且复杂的过程<sup>[1]</sup>, 涉及特定细胞的增殖和分化, 涵盖胚胎发生、幼鱼发育及生长的关键方面<sup>[2]</sup>, 对种群的繁衍和补充起着决定性作用。尽管鱼类的早期发育遵循相似的模式, 不同物种在组织、器官及系统的发育时序和进程上仍存在显著差异<sup>[3-7]</sup>。因此, 深入解析鱼类早期发育的生物学规律和动态变化, 一直是生命科学研究的重要内容之一。

过去, 关于鱼类早期发育的研究主要依赖于形态学、组织学观察、生理生化分析以及实验生态学等技术手段。高小强等<sup>[1]</sup>通过组织学观察, 对

鱼类早期发育阶段的各类组织、器官及系统进行了系统归纳与概括。柳琪等<sup>[8]</sup>综述了鱼类早期发育阶段的摄食行为研究, 探讨了摄食行为与生理节律及环境因子的关系。平洪领等<sup>[9]</sup>结合光学显微镜技术与实验生态学方法, 研究了斑鱮(*Konosirus punctatus*)的早期形态发育特征、异速生长模式及其生态学意义。近20年来, 随着分子生物学技术的发展, RT-qPCR、RNA-Seq、基因编辑技术及表观遗传学等手段为揭示鱼类早期发育规律及其调控提供了更为深入的科学依据。傅建军等<sup>[10]</sup>通过对鱮(*Hypophthalmichthys nobilis*)早期发育6个阶

收稿日期: 2025-03-27; 修订日期: 2025-04-08.

基金项目: 国家自然科学基金项目(32172995); 国家重点研发计划项目(2023YFD2401801).

作者简介: 曹姜伟(1999-), 男, 硕士研究生, 研究方向为稻田综合种养. E-mail: cjw19991225@163.com

通信作者: 刘其根, 教授, 博士生导师, 研究方向为湖泊生态和稻田综合种养. E-mail: qgliu@shou.edu.cn

段的动态转录组测序, 解析了胚胎发生与孵化前基因表达的动态变化以及母体-合子转变过程中的分子调控机制。王兰梅等<sup>[11]</sup>利用 RNA-Seq 技术, 研究了鲤(*Cyprinus carpio*)早期发育 6 个阶段的 lncRNA 和 mRNA 表达特征, 探讨了它们在胚胎发育中的功能及调控作用。崔中凯等<sup>[12]</sup>运用 TALEN 基因编辑技术研究了半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*), 发现 *dmrt1* 是其雄性性别决定的关键基因, 并揭示了该基因在性腺发育和性别分化中的重要作用。王湘秀等<sup>[13]</sup>探讨了表观遗传调控在斑马鱼(*Danio rerio*)合子基因组激活(ZGA)过程中的作用, 涵盖 DNA 甲基化、组蛋白修饰和核小体定位等机制, 并分析了其对胚胎发育及全能性形成的影响。这些研究成果为理解鱼类早期发育的分子机制、关键基因调控网络及其生态适应性提供了重要科学依据。但这些研究都是对池塘驯化鱼类所作的早期发育研究, 而稻田养殖环境在水深、水温、溶解氧等多方面都与池塘存在显著差异, 鱼类自身的食性(如动物食性转向杂食)、运动方式(不再能做垂直运动和长距离迅游)等也都存在适应性进化, 因此稻田鱼类的早期发育是否与其他鱼类存在差异非常值得关注。

鲤被认为是人类最早驯化的鱼类之一, 在中国以池塘养殖为主的驯化历史已有 2600 多年<sup>[14]</sup>, 而稻田驯化的历史最长在 1300 年左右, 由此形成青田田鱼(*Cyprinus carpio* var. *qingtianensis*)这一独特地方品种, 因其丰富的体色以及与水稻共生养殖的模式, 受到广泛关注<sup>[15]</sup>。当前, 稻田养鱼不仅为显著减少化肥和农药的使用<sup>[16]</sup>、缓解农业非点源污染提供了重要解决方案<sup>[17]</sup>, 也为增加种植业效益、减少农田抛荒和增加农民收益以及提高食品安全等多方面发挥了重要的作用, 因此被认为是中国未来农业可持续发展的重要模式之一。

近年来, 青田田鱼的研究主要聚焦于其在稻田环境中的适应机制。研究表明, 该鱼类在高温条件下能够通过热休克蛋白和内质网蛋白加工通路调控热应激响应, 从而提高耐热性<sup>[18-19]</sup>; 在缺氧及复氧条件下, 则通过调控能量代谢和抗氧化机制来缓解生理酸中毒, 并促进生长发育<sup>[20-21]</sup>。但

有关其早期发育过程尚未得到系统性的研究, 这在一定程度上限制了对其生物学特征及适应机制的深入理解, 也导致在其苗种繁育和新品种选育等必须环节缺少理论指导。因此, 系统阐明青田田鱼早期发育阶段的分子调控机制具有重要的理论与实践意义。

本研究采用转录组测序技术, 对青田田鱼 6 个早期发育关键阶段: 原肠期(TS1)、6 肌节期(TS2)、眼色素期(TS3)、初孵(TS4)、孵化后 12 h (TS5)、孵化后 24 h (TS6)进行了全面分析。通过对不同阶段基因表达模式及潜在生物学变化的解析, 探讨青田田鱼早期发育的分子调控机制, 为增进对其生态适应性的认识及共生养殖模式中苗种繁育、良种选育等苗种生产过程的优化提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验亲鱼及受精卵的获得

在浙江省青田县方山乡根头村田鱼研究中心开展繁育实验, 实验亲鱼由浙江丽水市青田县愚公生态农业科技有限公司提供, 采用人工催产的方式获得鱼卵, 催产剂使用绒毛膜促性腺激素类似物(HCG)与促黄体素释放激素类似物(LRH-A2)混合注入鱼体, 催产剂剂量为雌鱼 1000 IU/kg HCG+5  $\mu$ g/kg LRH-A2, 雄鱼剂量减半<sup>[22]</sup>。亲鱼产卵结束后, 将受精卵收集到孵化桶中孵化。在亲鱼产卵后至受精卵孵化期间使用带有 AxioCam 相机(Zeiss, Jena, 德国)的奥林巴斯 BX51 显微镜(日本京都)进行成像, 每 0.5 h 观察 1 次受精卵发育情况, 选择原肠期(TS1)、6 肌节期(TS2)、眼色素期(TS3)、初孵(TS4)、孵化后 12 h (TS5)、孵化后 24 h (TS6) 6 个早期生长发育阶段进行样本收集。试验共收集了 18 个样本, 其中 9 个样本在胚胎发育阶段, 9 个样本在幼鱼发育阶段, 每个发育阶段有 3 个重复。使用磷酸盐缓冲盐水(PBS)冲洗所有样品, 然后立即保存于 RNAlater 试剂(Ambion, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, 美国)中, 并在 -80  $^{\circ}$ C 下冷冻, 直到在实验室中提取 RNA。

### 1.2 RNA 提取和 cDNA 文库构建和测序

以常规 Trizol 法提取总 RNA, 利用 Nanodrop 2000 对所提 RNA 的浓度和纯度进行检测, 琼脂

糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, Agilent 2100 测定 RIN 值。构建测序文库仅使用高质量的 RNA 样本 (OD260/280 $\geq$ 1.9, OD260/230 $\geq$ 1.5, RIN $\geq$ 8.0)。经质量控制后, RNA 逆转录为 cDNA, 在 Illumina Novaseq6000 平台上测序, 本次研究的文库构建和测序由上海美吉生物科技有限公司完成。

### 1.3 原始数据处理与序列比对

在 Illumina Novaseq6000 平台输出序列的图像信号, 经 CASAV A 碱基调用后转换为文本数据, 以 FASTQ 格式储存为原始数据(raw reads)。使用 SeqPrep 和 Sickle 软件从 raw reads 中去除序列末端(3'端)低质量(质量值小于 20)的碱基和含 N(模块碱基)的 reads, 舍弃去 adapter 及质量修剪后长度小于 30 bp 的序列, 获得 clean reads。质控后计算 clean reads 的错误率、Q20、Q30 和 GC 含量以评价测序质量。将质控后的原始数据, 即 clean data (reads), 使用 HISAT v.2.1.0 与 2014 年公布的鲤基因组信息<sup>[23]</sup>(*Cyprinus carpio*, GCF\_000951615.1 [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF\\_000951615.1/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000951615.1/)) 进行比对获得比对序列(mapped reads), 转录组测序所得数据集合已上传至 NCBI 数据库。

### 1.4 转录组组装与注释

以鲤基因组为参考基因, 使用 Stringtie v.2.1.2 软件将获得的 mapped reads 进行拼接, 最终组装成转录本(Unigene)将获得的转录本序列与 NR、GO、Swiss-Prot、Pfam、COG 和 KEGG 数据库 6 大公共数据库进行比对, 使用 BLAST+ v.2.9.0 对已组装的转录组进行注释。

### 1.5 差异转录本表达和富集分析

用 RESM v.1.3.3 软件中的 TPM (Transcripts

Per Million Reads)定量标准(每百万读段中来自于某转录本的读段数)计算转录本表达水平。DEseq2 v.1.10.1 可以通过一次缩放对因子进行归一化, 用于调整三组文库的读数。在差异表达的统计计算过程中, 通过 BH 一步校正法对  $P$  值进行校正, 得到调整后的  $P$  值。然后鉴定出  $P < 0.05$  且  $|\log_2(\text{foldchange})| \geq 2$  的差异表达转录本(DETs)。

分别使用 Goatools v.0.6.5 和 KOBAS v.2.1.1 对 DETs 进行个体水平的 GO 富集分析和 KEGG 富集分析,  $P < 0.05$  为显著的 GO 功能和 KEGG 通路。

### 1.6 时序差异分析

使用 MaSigPro 分析方法对青田田鱼 6 个早期发育时期进行时序差异分析, 将相邻各时间点的 DETs 根据 hclust 算法聚类。

### 1.7 qPCR 分析

我们从 TS1、TS2、TS3 和 TS4 组中随机选择了 7 个 DEGs 进行 RT-qPCR 验证, 以评估转录组测序结果的准确性。根据鲤的 mRNA 序列, 使用 Primer Premier v.6.0 设计 DEGs 引物。为了统一不同组 DEGs 的基因表达水平, 选择了  $\beta$ -actin 作为内参基因。根据实时荧光定量 PCR 仪(ABI 7300, 美国)的实验要求, 使用 20  $\mu$ L 溶液[16.4  $\mu$ L ChamQ SYBR Colour qPCR Master Mix(2 $\times$ )、0.8  $\mu$ L 引物(5  $\mu$ mol/L)和 2 L 模板(cDNA)]。PCR 反应条件如下: 95  $^{\circ}$ C 5 min, 然后进行 40 个循环: 95  $^{\circ}$ C 5 s、55  $^{\circ}$ C 30 s 和 72  $^{\circ}$ C 30 s。通过比较  $C_t(2^{-\Delta\Delta C_t})$  值来估计不同组间的相对表达量。RT-qPCR 实验进行了 3 次生物重复和 3 次技术重复。用 GraphPad Prism 8.0 分析 RT-qPCR 和 RNA-seq 中基因差异表达的结果, 并用图形显示结果。引物序列如表 1 所示。

表 1 实时荧光定量 PCR 所用引物序列

Tab 1 Primers used for real-time polymerase chain reactions (RT-PCR)

| 引物名称<br>primer name | 正向引物序列(5'-3')<br>forword primer sequences(5'-3') | 反向引物序列(5'-3')<br>reverse primer sequences(5'-3') |
|---------------------|--|--|
| Rho                 | TTCAGTACATCCAGCGAGT                              | AACAAAGCCAGTATAAGGAGT                            |
| IGF1                | CGTGGATGAATGCTGCTT                               | GGACTGTCTGTGTGCCGTT                              |
| Tpm2                | TCTCACAGCACACTAAGCTC                             | TTAATGACTGCTGGCTTCG                              |
| sox17               | CCATAACCACCAAGAGCACCA                            | ATTAAACTGTGTATTGCCGGAA                           |
| Pax6                | GAAGAGCAAAATGGAGGAGG                             | AGGATACTGGCGTTGTGGG                              |
| Wnt8a               | CCTATATTATGGCTTTCTCGTTC                          | TGATCTAATGTCGATAACCGAA                           |
| nanog               | CTCCACAAACGCCTTCT                                | GCATTGTGCCATCACG                                 |
| $\beta$ -actin      | CTCTGTCTGGATCGGAGGTT                             | GACGATGGATGGTCCAGACT                             |

## 2 结果与分析

### 2.1 转录组测序数据的质量评估

使用 Illumina Novaseq6000 测序平台对青田田鱼的 6 个早期发育阶段(每个阶段 3 个重复)构建了 18 个 cDNA 文库进行初步测序后共获得 866716564 个 raw reads (130.87 Gb), 过滤后获得 824820314 个 clean reads (122.00 Gb)。对 18 个样品质量分析显示, 质控数据对应的测序碱基平均错误率为 0.0255%~0.0269%, GC 含量区间为 47.01%~49.84%, 各样品碱基质量值 Q20 比值均不小于 97.22%, 碱基质量值 Q30 比值均不小于 92.64% (表 2)。

将质控后的 clean reads 与鲤基因组进行序列比对, 18 个样品的序列总比对率(total mapped)为 79.38%~80.41%。使用 Stringtie v.2.1.2 软件将获得的 mapping reads 组装成 143836 条拼接转录本(unigenes), 其中长度大于 1800 bp 的数目为 52973

条(约占 36.83%), 长度在 1001~1800 bp 的数目为 39207 条(约占 27.26%), 长度在 201~1000 bp 的数目为 49314 条(约占 34.28%), 长度小于 200 bp 的数目为 2342 条(约占 1.63%)(图 1)。

### 2.2 差异表达转录本分析

在本研究中, 对相邻时期进行两两差异比较 (TS2<sub>vs</sub>TS1、TS3<sub>vs</sub>TS2、TS4<sub>vs</sub>TS3、TS5<sub>vs</sub>TS4、TS6<sub>vs</sub>TS5)(差异倍数大于 2,  $P < 0.05$  且  $|\log_2(\text{foldchange})| \geq 2$ ), 一共发现 31153 个差异表达转录本(DETs), 其中在 TS2<sub>vs</sub>TS1 组发现 10472 个 DETs, 5458 个 DETs 表达上调, 5014 个 DETs 表达下调; TS3<sub>vs</sub>TS2 组发现 6845 个 DETs, 4689 个 DETs 表达上调, 2156 个 DETs 表达下调; TS4<sub>vs</sub>TS3 组发现 11767 个 DETs, 7968 个 DETs 表达上调, 3799 个 DETs 表达下调; TS5<sub>vs</sub>TS4 组发现 1000 个 DETs, 473 个表达 DETs 上调, 527 个 DETs 表达下调; TS6<sub>vs</sub>TS5 组发现 1069 个 DETs, 481 个 DETs 上调, 588 个 DETs 下调(图 2、图 3)。

表 2 青田田鱼 RNA-seq 文库原始序列和质控序列的统计

Tab. 2 Statistics of raw and clean sequence from the RNA-seq library of Qingtian field paddy fish, *Cyprinus carpio* var. *qingtianensis*

| 样品名称<br>sample | 原始序列<br>raw reads | 质控序列<br>clean reads | Error rate/% | Q20/% | Q30/% | GC 含量/% |
|----------------|-------------------|---------------------|--------------|-------|-------|---------|
| TS6_3          | 45046814          | 42642062            | 0.0261       | 97.48 | 93.22 | 48.68   |
| TS6_2          | 54403106          | 51614148            | 0.0261       | 97.51 | 93.19 | 49.56   |
| TS6_1          | 57161962          | 55194182            | 0.0259       | 97.62 | 93.47 | 49.30   |
| TS5_3          | 52347706          | 50096192            | 0.0265       | 97.38 | 92.92 | 49.84   |
| TS5_2          | 42303700          | 40771700            | 0.026        | 97.55 | 93.3  | 48.83   |
| TS5_1          | 47511352          | 45406268            | 0.0259       | 97.59 | 93.41 | 49.72   |
| TS4_3          | 47278750          | 45028486            | 0.0264       | 97.4  | 92.98 | 49.91   |
| TS4_2          | 54208490          | 51791518            | 0.0268       | 97.26 | 92.65 | 49.74   |
| TS4_1          | 51790544          | 49685090            | 0.0263       | 97.46 | 93.09 | 49.26   |
| TS3_3          | 42326574          | 40489944            | 0.0261       | 97.52 | 93.2  | 49.29   |
| TS3_2          | 46485862          | 44469406            | 0.0263       | 97.46 | 93.09 | 49.25   |
| TS3_1          | 48126842          | 46051180            | 0.0265       | 97.36 | 92.84 | 49.40   |
| TS2_3          | 45595368          | 42401548            | 0.0266       | 97.33 | 92.86 | 47.93   |
| TS2_2          | 42700158          | 40654000            | 0.0269       | 97.2  | 92.51 | 49.11   |
| TS2_1          | 46969232          | 44623044            | 0.0255       | 97.75 | 93.74 | 48.60   |
| TS1_3          | 45723410          | 42898938            | 0.0261       | 97.5  | 93.29 | 48.00   |
| TS1_2          | 49592546          | 47055640            | 0.0264       | 97.4  | 92.99 | 47.85   |
| TS1_1          | 47144148          | 43946968            | 0.0268       | 97.22 | 92.64 | 47.01   |

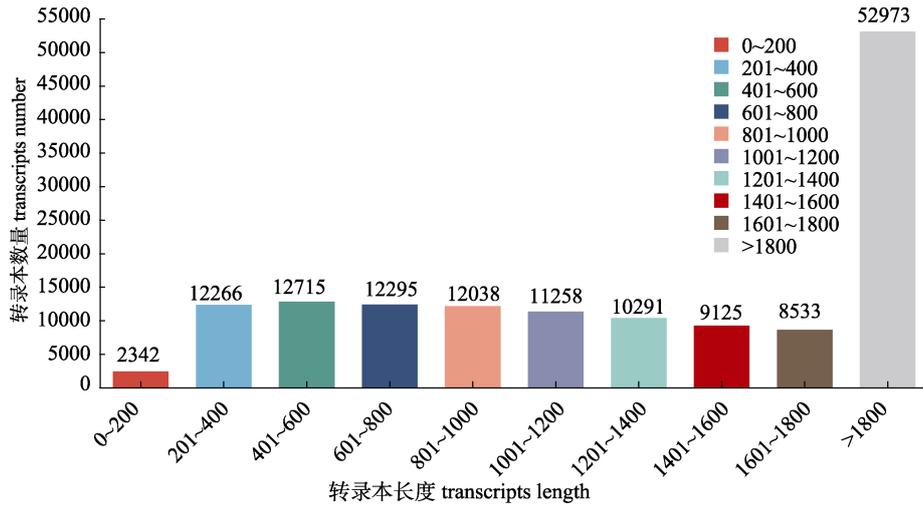


图 1 转录本长度分布图

Fig. 1 Length distribution of transcripts

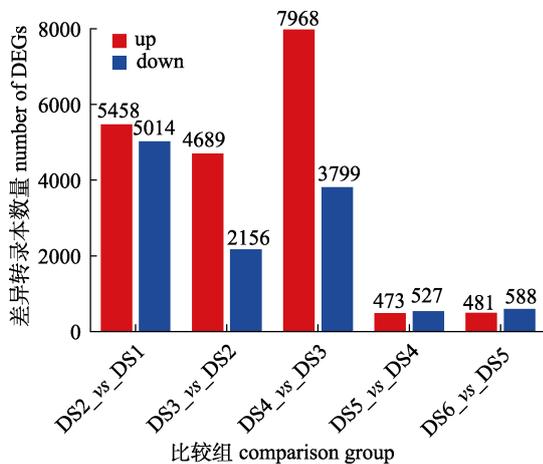


图 2 各比较组差异表达转录本统计数据柱形图

Fig. 2 Statistical data histogram of differentially expressed transcripts comparison groups

### 2.3 GO 富集分析

在本研究中,对 DETs 进行 GO 功能富集分析。结果发现,TS2vsTS1 组上下调 DETs 分别有 714 个、460 个被显著富集的生物学过程,上调的主要有内侧鳍形态发生、上皮-间质转化、分支结构的形态发生等,下调的主要有 DNA 甲基化的调节、内胚层形成、卵衣形成等;TS3vsTS2 组中上下调 DETs 分别有 687 个、637 个被显著富集的生物学过程,上调的主要有肌酸代谢过程、核酸碱基分解代谢过程、骨骼肌抽动收缩等,下调的主要有多细胞生物过程、上皮细胞顶端/基底极性的建立、细胞分化等;TS4vsTS3 组上下调 DETs 分别有 858 个、812 个被显著富集的生物学过程,上

调的主要有神经系统过程、化学突触传递的调节、跨突触信号传导的调节,下调的主要有有丝分裂细胞周期过程、有机酸结合、脊索细胞发育等;TS5vsTS4 上调和下调 DETs 分别有 160 个、11 个被显著富集的生物学过程,上调的主要有热休克蛋白结合、对光刺激的反应、昼夜节律的夹带等,下调的主要有内肽酶活性、肠胚形成涉及细胞迁移、肽酶活性等生物学过程;TS6vsTS5 上调和下调 DETs 分别有 62 个、126 个被显著富集的生物学过程,上调的主要有对光刺激的反应、感光器活性、视紫红质介导的信号通路,下调的主要有热休克蛋白结合、对缺氧的反应、对热的响应。这些生物学过程在不同发育时期表现出特异性上下调表达,在一定程度上反映了青田田鱼早期发育动态变化(图 4、图 5)。

### 2.4 KEGG 富集分析

本实验 DETs 在 TS2vsTS1 和 TS4vsTS3 中达到高峰,TS2 和 TS4 是发育过程中转录组变化的关键节点,TS2 涉及胚胎分化和轴建立,TS4 涉及神经网络的形成,为孵化前做准备。TS5vsTS4 和 TS6vsTS5 阶段变化幅度较小。进行 KEGG Pathway 富集分析,结果显示,TS2vsTS1 中上调的 DETs 有 45 个被显著富集的代谢通路,主要有 ECM-受体相互作用(ECM-receptor interaction)、蛋白质消化和吸收(protein digestion and absorption)、黏着斑(focal adhesion)、甲状腺激素信号通路

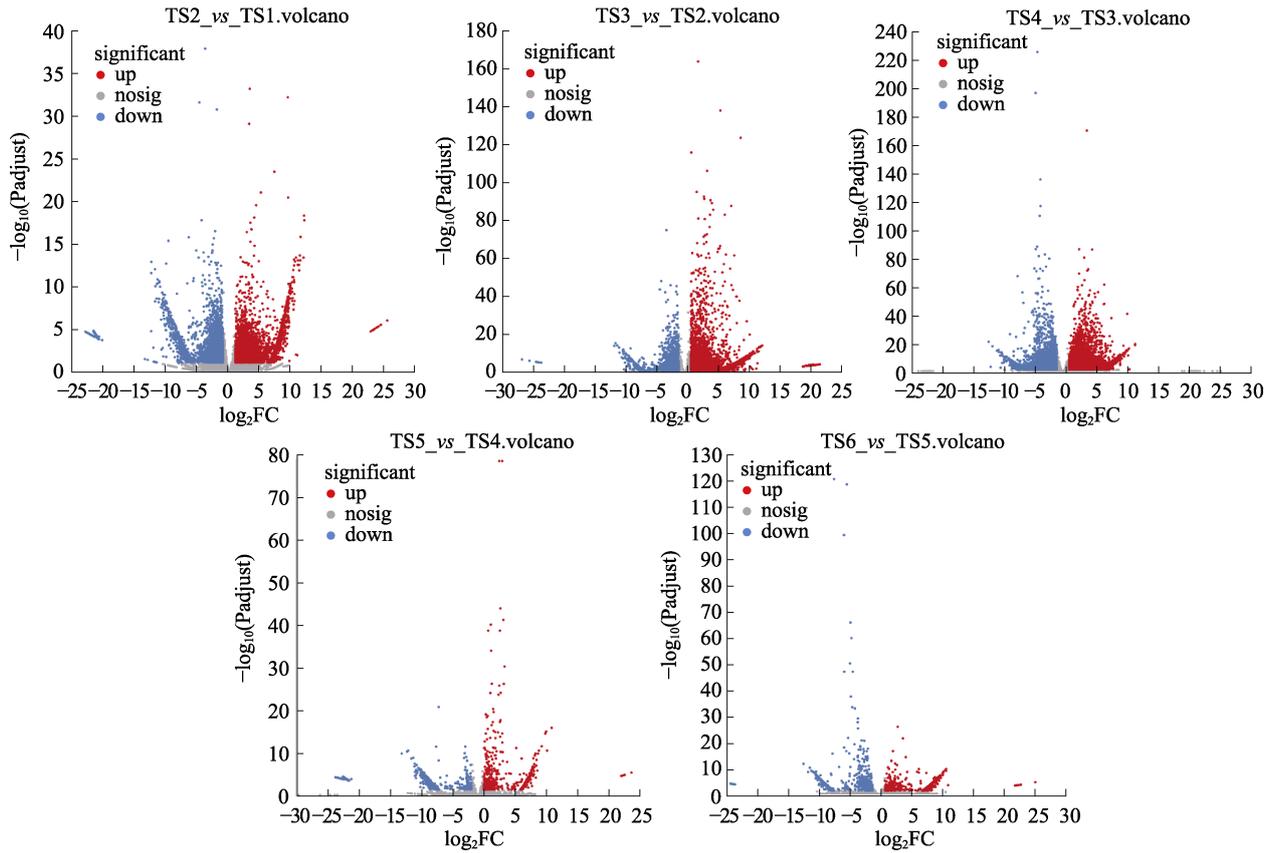
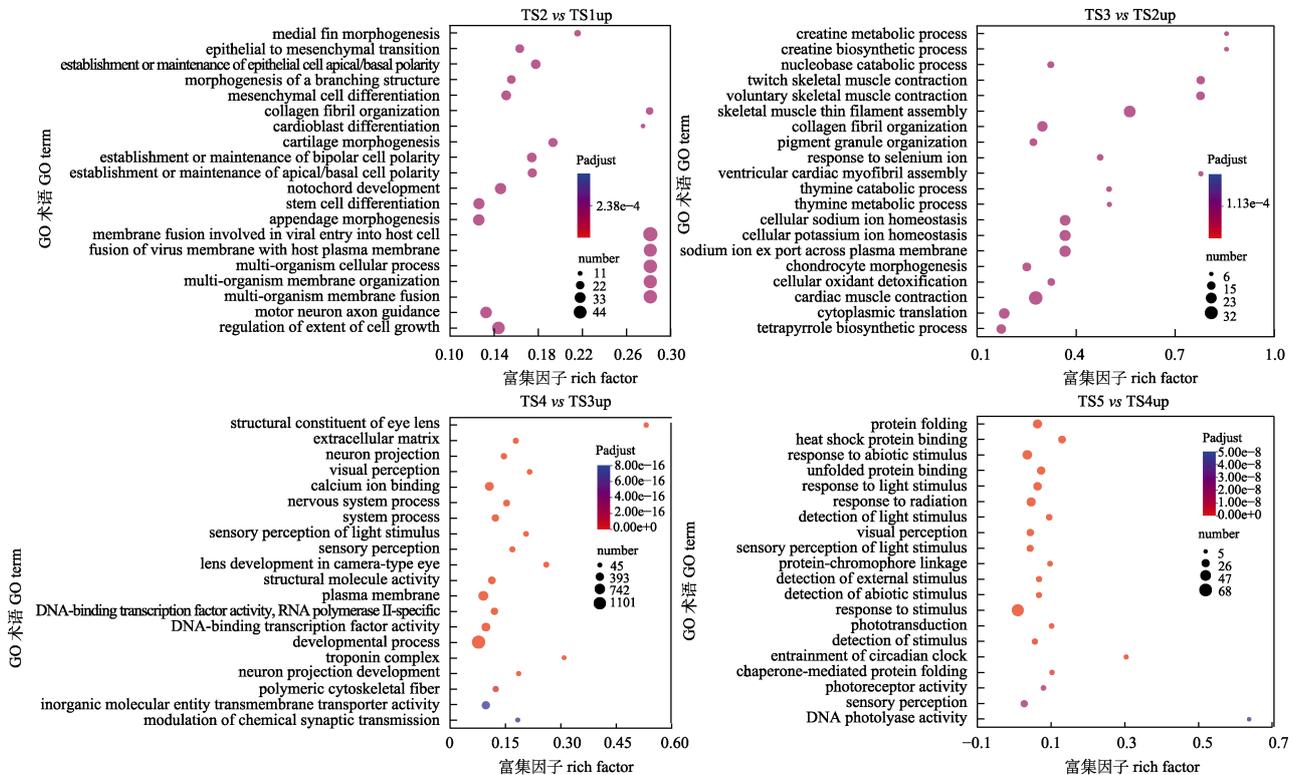


图 3 各比较组差异表达转录本(DETs)统计数据火山图

Fig. 3 Volcano Plot showing statistical data of differentially expressed transcripts in each comparison group



(待续 to be continued)

(续图 4 Fig. 4 continued)

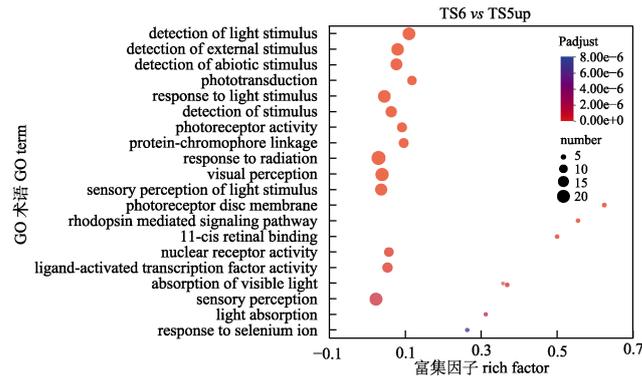


图 4 各比较组上调差异表达转录本的 GO 功能富集分析 Top 20

Fig. 4 Top 20 of GO enrichment analysis of up-regulated differentially expressed transcripts in each comparison group

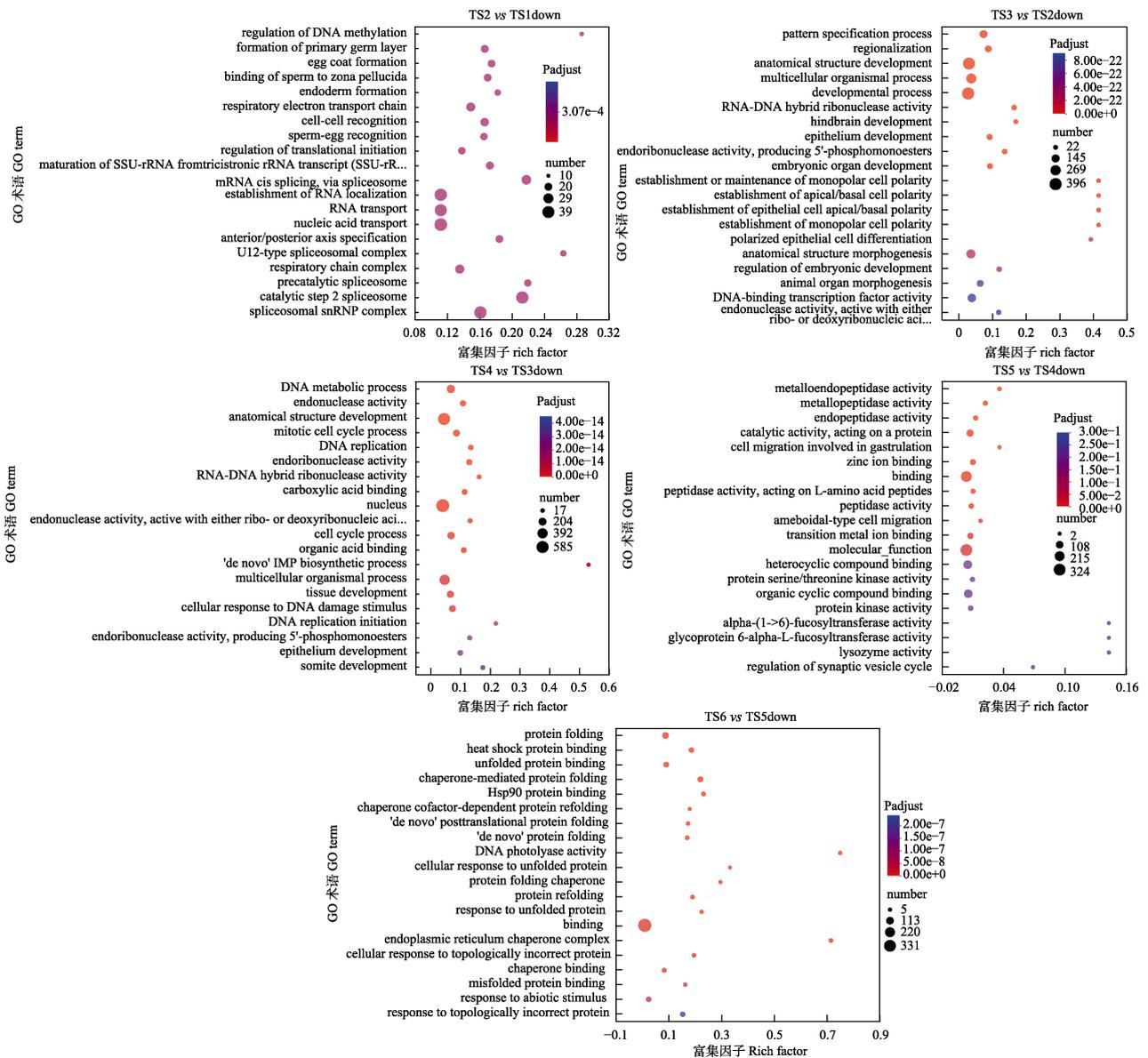


图 5 各比较组下调差异表达转录本的 GO 功能富集分析 Top 20

Fig. 5 Top 20 of GO enrichment analysis of down-regulated differentially expressed transcripts in each comparison group

(thyroid hormone signaling pathway)、轴突引导(axon guidance)调节干细胞多能性的信号通路(signaling pathways regulating pluripotency of stem cells)等(图 6); 下调的 DETs 有 31 个代谢通路被显著富集, 包括剪接体(spliceosome)、RNA 转运(RNA transport)、真核细胞核糖体生物发生(ribosome biogenesis in eukaryotes)、氧化磷酸化(oxidative phosphorylation)、卵母细胞减数分裂(oocyte meiosis)、内质网中的蛋白质加工(protein processing in endoplasmic reticulum)等(图 7)。

TS3vsTS2 中上调的 DETs 有 61 个被显著富集的代谢通路, 主要包括心肌收缩(cardiac muscle contraction)、蛋白质消化和吸收(protein digestion and absorption)、ecm-受体相互作用(ecm-receptor interaction)、甲状腺激素信号通路(thyroid hormone signaling pathway)等(图 8); 下调的 DETs 有 39 个代谢通路被显著富集, 主要有 PI3K-Akt 信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)、脂肪酸生物合成(fatty acid biosynthesis)、黏着(spliceosome)、剪接体(focal adhesion)等(图 9)。

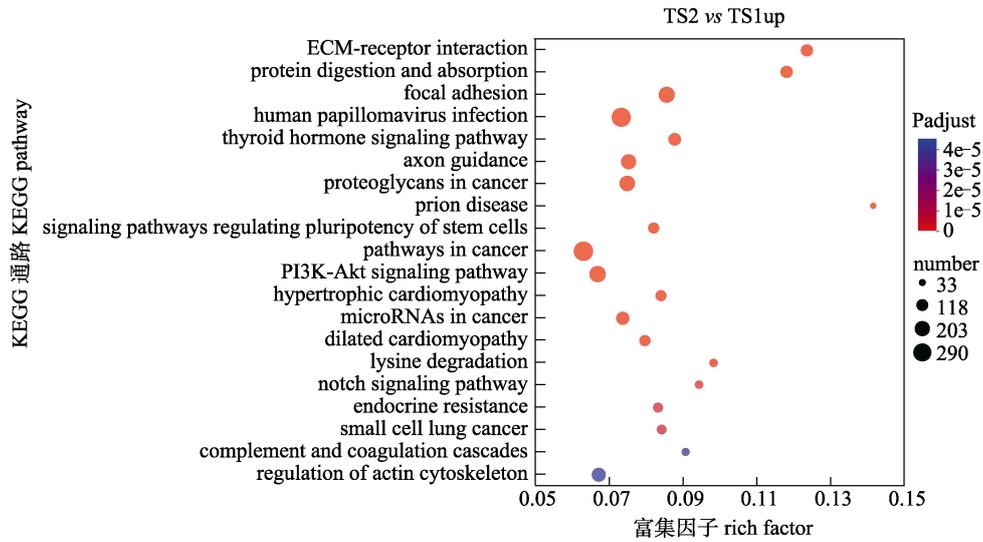


图 6 TS2vsTS1 组上调差异表达转录本 KEGG 富集分析前 20 的代谢途径

Fig. 6 The top 20 metabolic pathways in KEGG enrichment analysis of up-regulated differential expression transcripts in TS2vsTS1 group

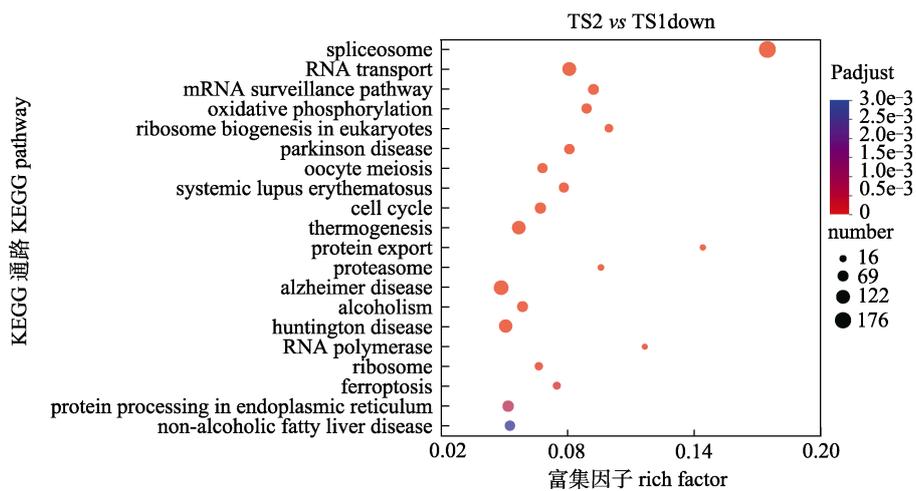


图 7 TS2vsTS1 组下调差异表达转录本 KEGG 富集分析前 20 的代谢途径

Fig. 7 The top 20 metabolic pathways in KEGG enrichment analysis of down-regulated differential expression transcripts in TS2vsTS1 group

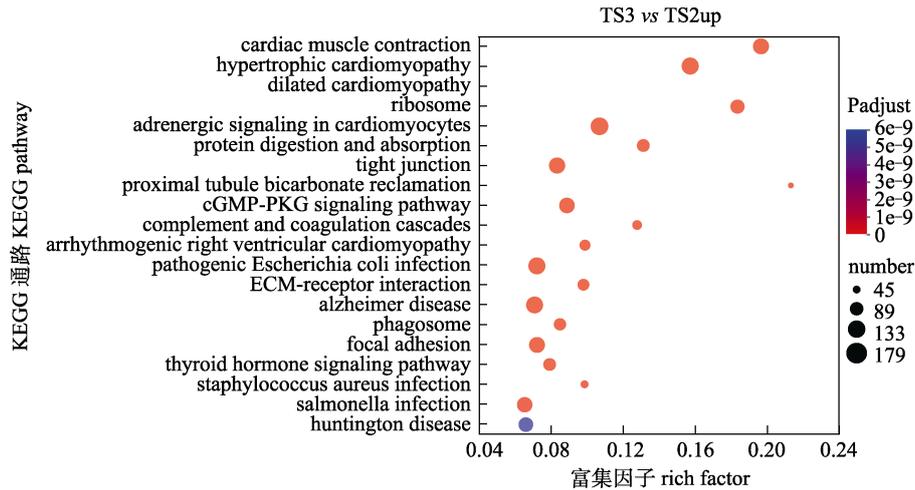


图 8 TS3vsTS2 组上调差异表达转录本 KEGG 富集分析前 20 的代谢途径

Fig. 8 The top 20 metabolic pathways in KEGG enrichment analysis of up-regulated differential expression transcripts in TS3vsTS2 group

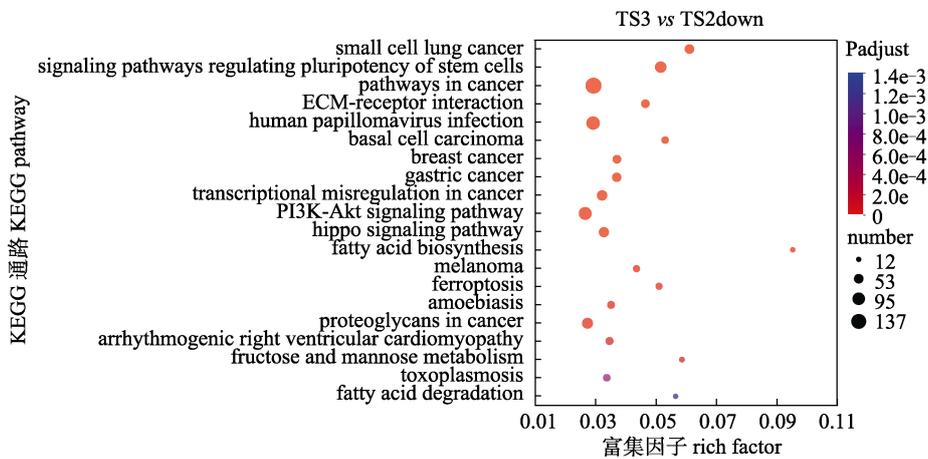


图 9 TS3vsTS2 组下调差异表达转录本 KEGG 富集分析前 20 的代谢途径

Fig. 9 The top 20 metabolic pathways in KEGG enrichment analysis of down-regulated differential expression transcripts in TS3vsTS2 group

TS4vsTS3 中上调的 DETs 有 63 个被显著富集的代谢通路, 主要包括突触囊泡周期(Synaptic vesicle cycle)、蛋白质消化和吸收(protein digestion and absorption)、心肌收缩(cardiac muscle contraction)、近端小管碳酸氢盐回收(proximal tubule bicarbonate reclamation)、胰岛素分泌(insulin secretion)等(图 10); 下调的 DETs 有 42 个代谢通路被显著富集, 主要有 DNA 复制(DNA replication)、细胞周期(cell cycle)、卟啉与叶绿素代谢(porphyrin and chlorophyll metabolism)、基底切除修复(base excision repair)、雌激素信号通路(estrogen signaling pathway)、同源重组(homolo-

gous recombination)等(图 11)。

TS5vsTS4 中上调的 DETs 有 17 个被显著富集的代谢通路, 主要包括生理节律(circadian rhythm)、光转导(phototransduction)、内质网中的蛋白质加工(protein processing in endoplasmic reticulum)、昼夜节律(circadian rhythm)等(图 12); 下调的 DETs 未有代谢通路被显著富集。

TS6vsTS5 中上调的 DETs 有 4 个被显著富集的代谢通路, 包括光转导(phototransduction)、紧密连接(tight junction)、沙门氏菌感染(salmonella infection)、致病性大肠埃希菌感染(pathogenic escherichia coli infection)(图 13)。下调的 dets 有

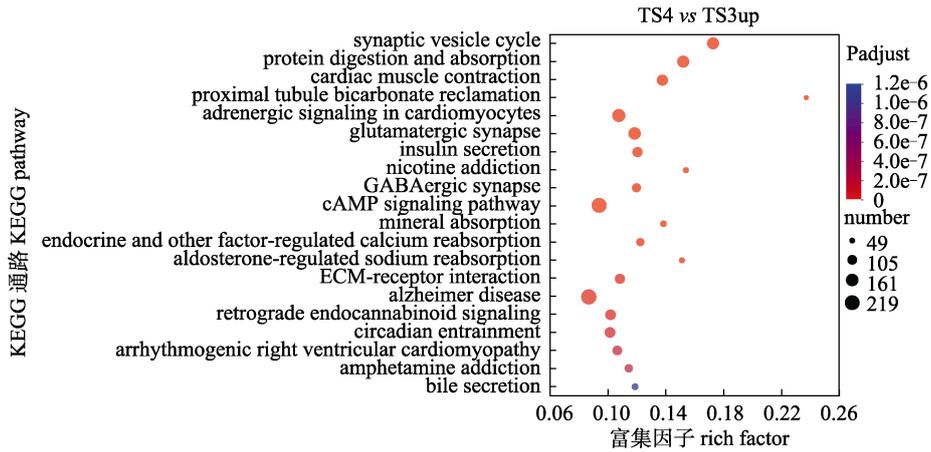


图 10 TS4vsTS3 组上调差异表达转录本 KEGG 富集分析前 20 的代谢途径  
 Fig. 10 The top 20 metabolic pathways in KEGG enrichment analysis of up-regulated differential expression transcripts in TS4vsTS3 group

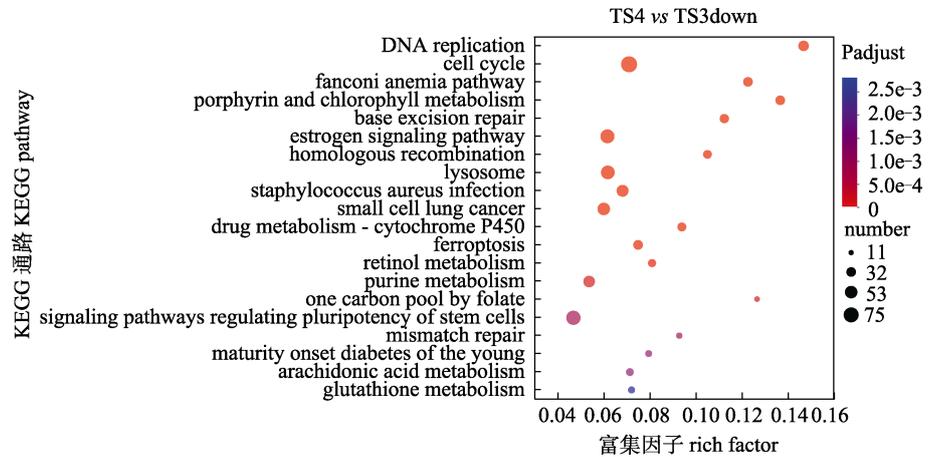


图 11 TS4vsTS3 组下调差异表达转录本 KEGG 富集分析前 20 的代谢途径  
 Fig. 11 The top 20 metabolic pathways in KEGG enrichment analysis of down-regulated differential expression transcripts in TS4vsTS3 group

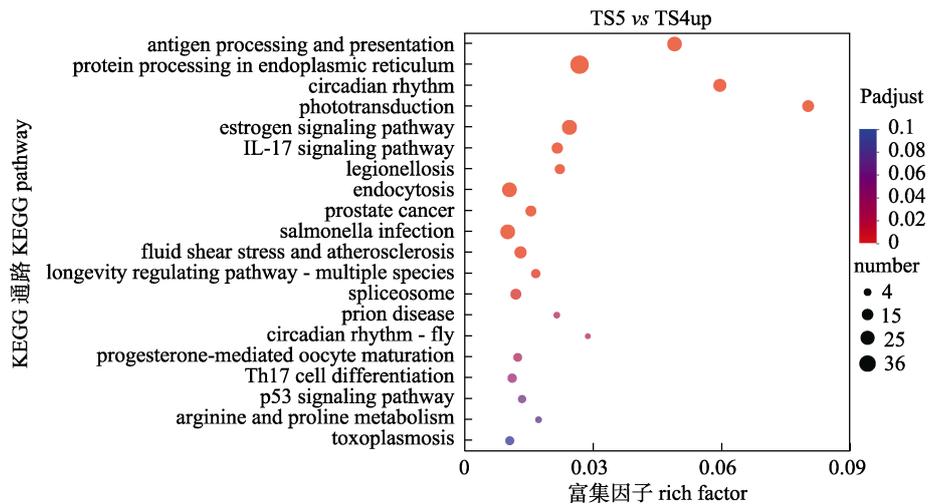


图 12 TS5vsTS4 组上调差异表达转录本 KEGG 富集分析前 20 的代谢途径  
 Fig. 12 The top 20 metabolic pathways in KEGG enrichment analysis of up-regulated differential expression transcripts in TS5vsTS4 group

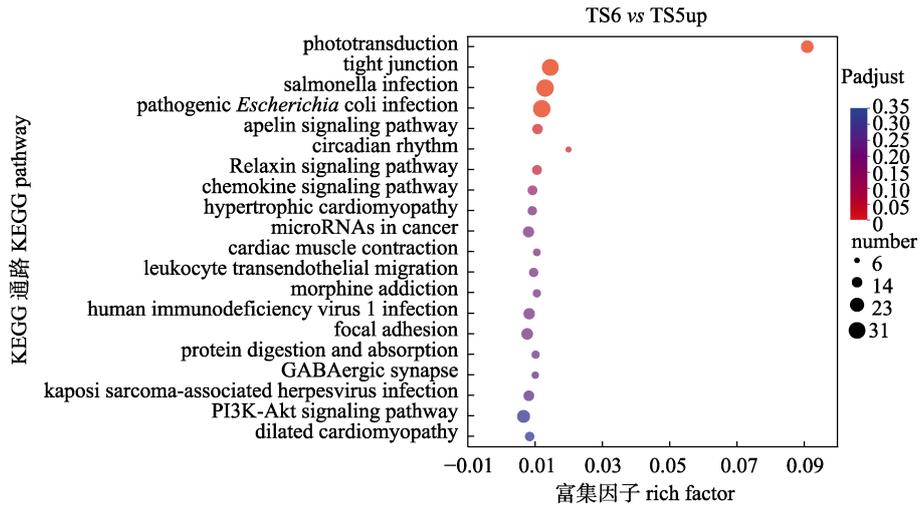


图 13 TS6vsTS5 组上调差异表达转录本 KEGG 富集分析前 20 的代谢途径  
 Fig. 13 The top 20 metabolic pathways in KEGG enrichment analysis of up-regulated differential expression transcripts in TS6vsTS5 group

21 个代谢通路被显著富集, 主要包括内质网中的蛋白质加工 (protein processing in endoplasmic reticulum)、雌激素信号通路 (estrogen signaling pathway)、剪接体 (spliceosome)、孕激素介导的卵母细胞成熟 (progesterone-mediated oocyte maturation) 等 (图 14)。

2.5 时序差异分析

本研究中, 使用 MaSigPro 分析方法对青田田鱼 6 个早期发育时期进行时序差异分析。将相邻各时间点的 DETs 根据 hclust 算法聚类, 结果显示有 2734 个 DETs 富集在 6 个簇 (cluster) 中 (图 15)。

发现在第 6 个簇 (cluster6) 中转录本的表达在出膜前呈持续上升趋势, 而在出膜后呈持续下降的趋势, 猜测 cluster6 中的转录本与青田田鱼孵化的调控有关。因此, 通过 spearman 相关性分析 ( $R^2 > 0.9, P < 0.05$ ) 构建了 cluster 6 中转录本的相关性表达网络 (见图 16), 图中每个节点 (node) 代表一个转录本, 节点间连线代表转录本间表达存在相关性。随后将其中转录本数目最多 (16 个 unigenes) 的表达网络与 NR 数据库比对, 发现其中有 11 个 (MSTRG.31019.1、MSTRG.31019.3、MSTRG.31019.4、MSTRG.44866.11、MSTRG.44866.4、

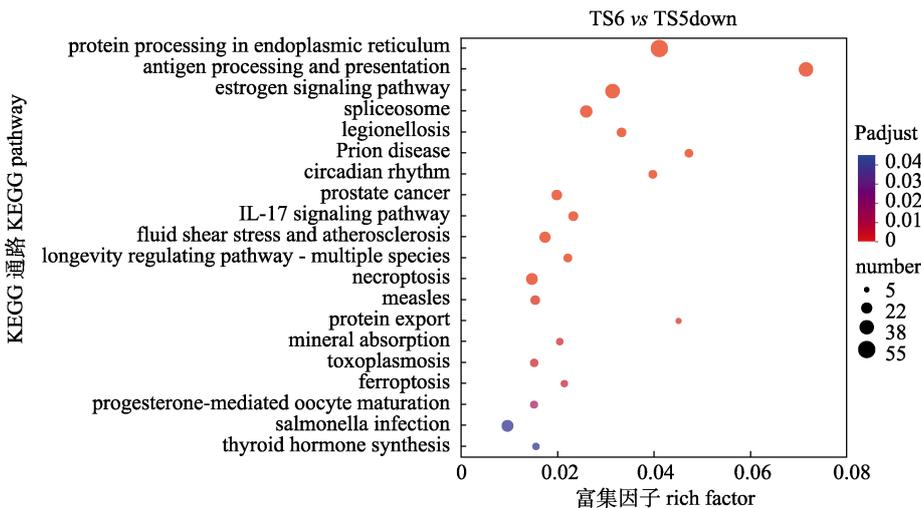


图 14 TS6vsTS5 组下调差异表达转录本 KEGG 富集分析前 20 的代谢途径  
 Fig. 14 The top 20 metabolic pathways in KEGG enrichment analysis of down-regulated differential expression transcripts in TS6vsTS5 group

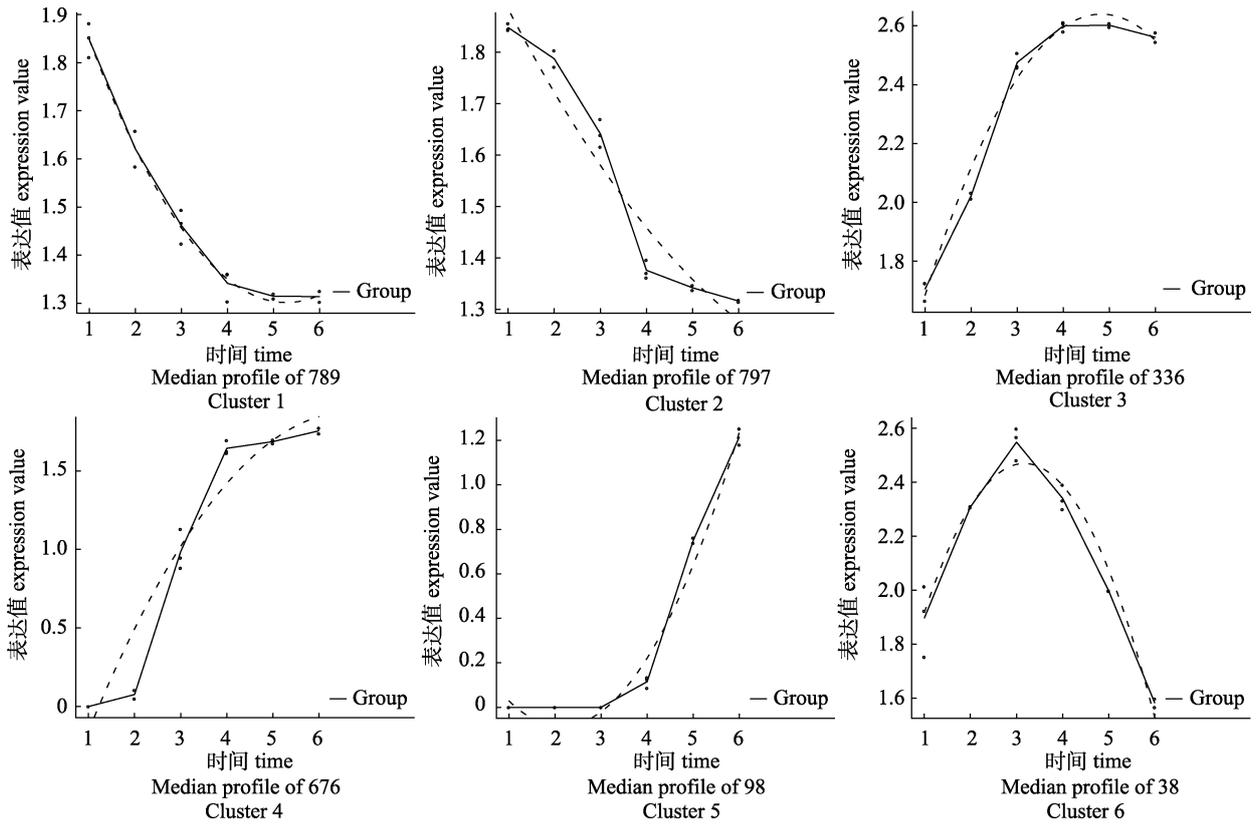
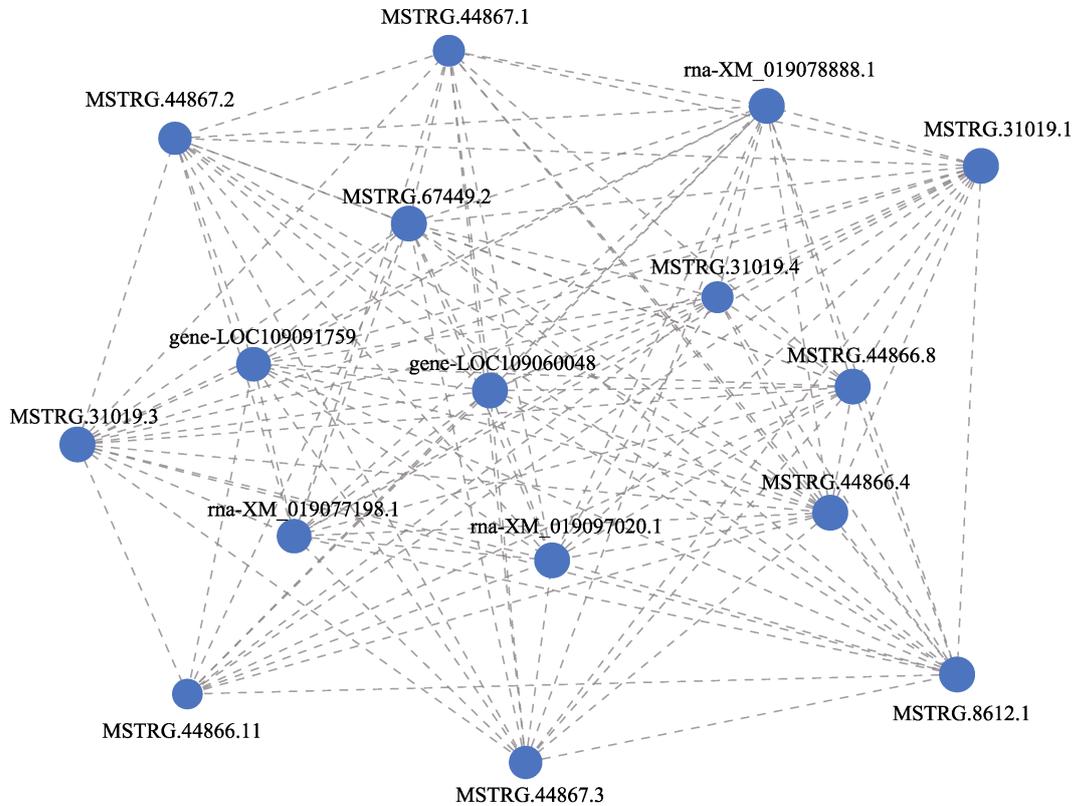


图 15 差异转录本的时序表达模式图  
 Fig. 15 Sequence expression pattern of differential transcripts



(待续 to be continued)

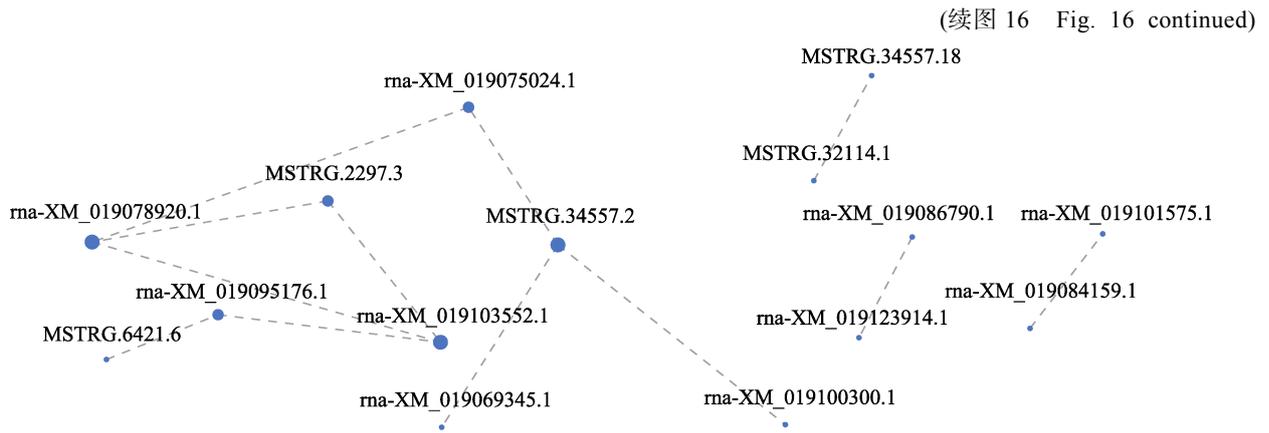


图 16 Cluster 6 中转录本的相关性表达网络图

Fig. 16 Transcript correlation expression network in cluster 6

MSTRG.44866.8、gene-LOC109091759、rna-XM\_019078888.1、rna-XM\_019078920.1)被注释为 *hce1* 基因, 4 个(MSTRG.44867.1、MSTRG.44867.2、MSTRG.44867.3、rna-XM\_019077198.1)被标注为 *hce2* 基因。*hce1*、*hce2* 均为调控孵化酶分泌的基因, 可以一定程度上反映青田田鱼早期胚胎发育

的孵化机制。

## 2.6 通过 RT-qPCR 验证 RNA-seq

笔者将 RT-qPCR 的结果与 RNA-Seq 分析获得的表达水平进行了比较。结果显示, qPCR 和 RNA-Seq 数据具有一致性, 随机选取的 7 个 DEGs 的上调和下调模式具有相似性(图 17)。

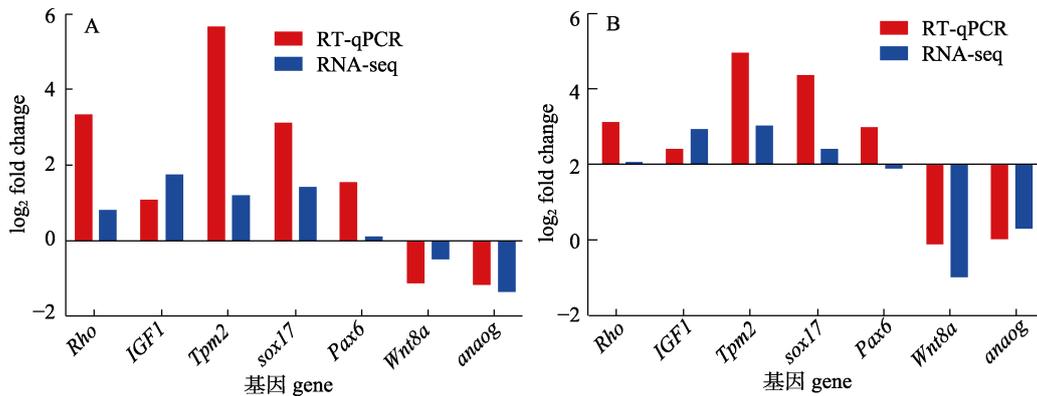


图 17 TS2 vs TS1(A)和 TS4 vs TS3(B)中使用比较转录组分析和 RT-qPCR 获得的基因表达模式比较  
用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  和 TPM 分别计算了 RT-qPCR 和 RNA-Seq 检测到的 7 个基因的表达折叠变化。

这些基因的 qPCR 和 RNA-seq 对折变化值分别用红色和蓝色表示。

Fig. 17 Comparison of gene expression patterns obtained using comparative transcriptome analysis and qRT-PCR in TS2 vs TS1 (A) and TS4 vs TS3 (B).

The fold changes in the expression of the seven genes detected by qPCR and RNA-Seq were calculated using  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  and TPM. The fold change values from RT-qPCR and RNA-Seq are represented in red and blue.

## 3 讨论

### 3.1 青田田鱼转录本表达差异与富集分析

本研究对青田田鱼胚胎发育过程中的差异表达转录本进行分析, 鉴定出孵化前(TS1-TS4) 29084 个 DETs, 显著高于孵化后(TS5-TS6)2069

个, 表明胚胎期基因调控机制更为活跃和复杂。这是因为孵化阶段涉及细胞快速分裂、分化及器官形成, 这些都要依赖高度精确的时序性基因表达及信号通路协同调控, 同时需对环境变化保持高度敏感, 以适应发育需求, 故需要有大量基因参与表达。而孵化后个体生理过程趋于稳定, 基

因调控简化, 活跃基因逐渐减少。该类似趋势也见于鳙的转录组分析<sup>[10]</sup>。但与以往研究不同的是, 本研究发现, 青田田鱼在早期发育中展现出“先构架、后加速”的独特策略: 肌节期通过快速激活 ECM(extracellular matrix)、甲状腺激素、mTOR 和 HIF-1 等通路, 优先完成体节和神经系统等关键结构的构建, 并通过降低氧化代谢以适应低氧环境; 而在孵化阶段, 突触小泡循环、心肌收缩和代谢通路迅速上调, 推动运动和觅食能力的提升, 助力幼鱼快速适应稻田环境。

鱼类的 ECM 在胚胎细胞黏附、迁移和组织形态建构过程中具有重要作用<sup>[24-25]</sup>。本研究发现, 不同鱼类的 ECM 仍存在一定的差异, 如 TS2vsTS1 组中整合素及其结合的 ECM 蛋白(纤连蛋白、层粘连蛋白、胶原蛋白等)显著上调, 表明 ECM 介导的信号在体节排列、细胞附着及肌节-脊索形成过程中发挥关键作用。 $\alpha 5 \beta 1$ -纤连蛋白信号的增强可能促进体节前体有序排列, 而  $\alpha v \beta 3$ -骨桥蛋白信号的活跃提示青田田鱼在肌肉前体细胞分化方面可能具有特定调控模式。此外, HA-CD44 介导的神经管发育信号在 TS2 阶段显著增强, 可能有助于优化神经调控与运动能力, 以适应稻田复杂的水动力环境。锦鲤(*Cyprinus carpio* var. *koi*) ECM 受体信号通路活性可持续至孵化后 7 d<sup>[2]</sup>, 鳙在早期发育阶段的 ECM 通路激活程度较低<sup>[10]</sup>, 这也再次印证了青田田鱼可能加速体节建构, 以优化孵化后环境适应性, 提高生存竞争力。

以往研究证明, 甲状腺激素在鱼类胚胎发育、肌肉生长、能量代谢等方面具有重要作用<sup>[26]</sup>。本研究发现, 甲状腺激素(T3,T4)信号显著上调, 通过核受体(TR $\alpha$ /TR $\beta$ )介导基因转录, 并通过整合素(ITGA/ITGB)激活 MAPK 及 PI3K-Akt 信号, 调控细胞增殖、分化及代谢适应性, 表明它们在田鱼胚胎期的重要作用。此外, mTOR 信号及 HIF-1 通路在青田田鱼胚胎期高度活跃。mTOR 主要调控蛋白合成、能量代谢及细胞生长, 在青田田鱼早期发育阶段促进高效蛋白合成及葡萄糖利用, 而在鳙<sup>[10]</sup>及斑点叉尾鲷<sup>[27]</sup>(*Ictalurus*

*punctatus*)研究中, 该信号主要活跃于孵化后, 表明青田田鱼早期保持较高生长速率以尽早适应稻田环境。HIF-1 信号的早期激活可能增强青田田鱼对稻田生态系统低氧环境的耐受性, 相较鳙<sup>[10]</sup>及大西洋鲟<sup>[28]</sup>(*Acipenser oxyrinchus*), 青田田鱼 HIF-1 通路对低氧刺激更敏感且活跃时间更早, 以应对稻田低氧条件。而高原鱼类如高原鳅(*Triplophysa dalaica*)<sup>[29]</sup>的研究也验证了 HIF- $\alpha$  和 EGLN1 等基因在缺氧环境中的调节作用。

氧化磷酸化是线粒体电子传递链(ETC)介导 ATP 合成的关键过程, 对于能量供应、细胞增殖和代谢调控至关重要<sup>[30]</sup>。在 TS2vsTS1 组, 胚胎通过降低线粒体氧化磷酸化(OXPHOS,oxidative phosphorylation)通路的活性, 来减少对氧气的依赖, 提示胚胎代谢向无氧途径转向。在低氧条件下 HIF-1 被稳定激活, 可促使细胞代谢由氧化磷酸化转向糖酵解。这一转换不仅保证了低氧下基本的 ATP 供给, 还将葡萄糖碳流引向磷酸戊糖途径等合成支路, 为快速分裂的细胞提供核苷酸、氨基酸等构建块。因此, 可以推测青田田鱼胚胎在低氧信号(如 HIF-1)的作用下抑制 OXPHOS, 上调无氧代谢途径, 从而既满足能量和合成需求又减少活性氧累积, 以应对稻田的低氧环境。这种机制虽然在 Radka 的胚胎和成人心脏研究中也发现有发现<sup>[31]</sup>, 但在鱼类中却是首次发现。相比之下, 一些发育迅速的鱼类如斑马鱼<sup>[32]</sup>在相同阶段维持较高的代谢率, 通过上调 OXPHOS 和糖酵解来满足细胞大量增殖和分化的双重需求。青田田鱼选择在 TS2 阶段暂时降低氧化代谢强度, 可能是其特有的发育策略, 确保在有限能量和低氧条件下重点完成胚胎关键结构的构建。这种策略使胚胎发育更为稳健, 一旦基本组织分化完成, 再在后续阶段(如眼色素期以后)逐步提高代谢来加速生长。青田田鱼胚胎早期快速激活细胞外基质(ECM)相关通路, 促进细胞迁移和组织重塑, 也印证了其将资源优先投入形态建成的策略。相反, 锦鲤<sup>[2]</sup>等鱼类的 ECM 作用更持续而平缓(延续至孵化后 1 周), 对应其可能更稳定绵长的发育进程。由此可见, 不同鱼类在早期发育中能量代谢

的调控与其发育节奏相协调:青田田鱼倾向于“先构架、后加速”,而其他鱼类则可能“持续高能驱动快速发育”。同时核糖体生物发生速率下降也可以说明此阶段细胞增殖速率降低、更多资源被分配到特定组织的分化和功能调控,而非单纯的蛋白合成需求。

TS3vsTS2 阶段是青田田鱼早期发育中从基础形态构建转向功能特化,尤其是肌肉和代谢系统的快速发育过渡的关键时期,通过激活心肌、肌肉和代谢相关通路,胚胎为后续的孵化及环境适应做好了充分准备。GO 富集分析显示上调的 DETs 主要参与肌酸代谢、核酸碱基分解代谢及骨骼肌收缩等生物学过程,而下调的 DETs 则与多细胞生物过程、上皮细胞极性和细胞分化相关。这一结果提示,TS3 阶段青田田鱼开始从基础形态构建转向功能特化,尤其是肌肉和代谢系统的快速发育。KEGG 富集分析进一步揭示了 TS3 阶段的代谢通路特征。上调通路包括心肌收缩、蛋白质消化与吸收、ECM-受体相互作用以及甲状腺激素信号通路。其中,心肌收缩相关基因(如肌钙蛋白 T 家族基因)的显著上调,表明心脏功能在此阶段逐步成熟,为胚胎提供更高效率的血液循环支持。ECM-受体相互作用的持续活跃则暗示细胞外基质的动态重塑仍在进行,可能与后续器官(如眼睛和神经系统)的形态发生密切相关。此外,甲状腺激素信号通路的激活进一步调控了能量代谢和细胞分化,为胚胎的快速生长提供了必要的分子基础。相比之下,下调的通路如 PI3K-Akt 信号和脂肪酸生物合成,可能反映了胚胎从依赖母源营养向自主代谢的过渡,同时资源分配从增殖转向特定功能组织的分化。

TS3 阶段骨骼肌收缩相关基因的显著上调与青田田鱼的运动能力初步形成相关。这一特征可能为其孵化后的稻田环境适应奠定基础,因为稻田水体的低氧和复杂结构要求幼鱼具备快速运动能力以应对捕食和觅食需求。与其他鱼类相比,青田田鱼在 TS3 阶段即表现出较强的肌肉发育倾向,例如斑点叉尾鲷<sup>[27]</sup>的肌肉分化主要发生在孵化后,而青田田鱼的提前启动可能与其对稻田环境的快速适应策略有关。

突触小泡循环是神经递质释放、回收和神经信号传递的关键过程。本实验 TS4vsTS3 阶段,突触小泡循环(synaptic vesicle cycle)通路显著富集并上调,特别是 SNARE 复合体相关蛋白(如 VAMP、SNAP25)、囊泡酸化(V-ATPase)、突触素(SYT)及相关钙离子通道(VGCC)的富集,表明神经递质释放机制已趋于成熟。这一特点与金头鲷(*Sparus aurata*)<sup>[33]</sup>的早期发育研究相似,金头鲷在胚胎期的 3 dpf(孵化后第 3 天)和 5 dpf(孵化后第 5 天)时,神经系统和肌肉的发育显著,特别是在细胞外基质信号的激活下,推动了神经系统和肌肉组织的初步构建。相比之下,其他一些鱼如斑点叉尾鲷<sup>[27]</sup>的研究表明,其在孵化后第 2 天神经胶质开始引导的神经元迁移,而在孵化后 5~6 天才迎来神经系统相关基因的大幅上调,主要涉及轴突生长和神经投射形成。表明斑点叉尾鲷在孵化时神经回路尚未完全成熟,随后几天内才明显发育。三斑慈鲷(*Amphilophus trimaculatus*)<sup>[34]</sup>的神经系统发育在 3~5 dpf(胚胎和卵黄吸食期)阶段,神经系统的相关基因表现出较低的表达,而在 13 dpf(外营养期)时,神经系统的发育才逐渐加速,特别是在神经元的迁移和神经投射的形成方面。斑马鱼<sup>[32]</sup>在原肠期,神经系统发育的关键调控基因开始大规模上调,涉及神经板形成、细胞迁移和神经系统初步结构的建立。锦鲤<sup>[2]</sup>作为青田田鱼的近缘种,其神经胚期(Ne)是神经系统初步形成和神经嵴细胞分化的关键时期,而器官发生期(Oc)则是神经系统结构完善和功能成熟的重要阶段。大西洋鳕(*Gadus morhua*)<sup>[35]</sup>神经发育主要发生在体节形成阶段。总的来看,各鱼类神经发育通路的激活顺序有所差异:青田田鱼倾向于在孵化时就具备较强的神经传递功能。

除神经发育外,心脏和肌肉功能相关通路也同步上调。上调的心肌特异基因(如心肌肌钙蛋白 TNNT)标志心脏发育进入关键阶段。Troponin T 是心肌收缩复合物的重要组分,上调的 TNNT 提高心肌纤维对 Ca<sup>2+</sup> 的敏感性,促进有力的收缩与舒张。胰岛素分泌信号通路的上调表明内分泌代谢系统也在激活。胰岛素信号通过 PI3K-AKT 和 MAPK 等途径作用于靶组织(肝脏、肌肉),促进葡

葡萄糖摄取和糖原合成, 并调节蛋白质脂质代谢。因此, 胰岛素通路的激活为孵化时迅速生长的组织提供充足能量和物质支持。同时富集的“蛋白质消化与吸收”通路提示消化道功能开始启动, 胚胎在孵化前已为从卵黄营养过渡到自主摄食做好准备。TS4 阶段的转录激活表现为多系统协同成熟: 神经系统、肌肉运动和心血管以及内分泌代谢共同发育, 为即将孵出的仔鱼赋予运动、觅食和环境应答能力。青田田鱼在孵化阶段上调的心肌收缩和胰岛素等通路, 在其他鱼类的对应阶段也很常见。斑马鱼胚胎在 24~48 hpf (孵化后第 24-48 小时) 时心脏开始跳动、胰腺开始分化, 此时心肌和胰岛相关基因表达上升, 支持循环和代谢需求。清头冰鱼 (*Protosalanx chinensis*)<sup>[36]</sup>在开口前夕氧化代谢增强, 也涉及心肌功能提高以供应氧气。黄尾金枪鱼 (*Seriola lalandi*)<sup>[37]</sup>肌肉发育和骨骼发育相关基因在 15~20 dph 变形阶段中逐渐上调, 出现了背脊弯曲、鳍条初步显现等形态变化。远洋鲷(*Coryphaena hippurus*)<sup>[38]</sup>在 48~96 hpf 期间, 心肌和胰岛相关基因的表达上升, 与青田田鱼存在类似趋势。

在孵化后, 青田田鱼展现出“先感知、后稳态”的发育策略。孵化后 12 h (TS5vsTS4), 基因调控逐渐平息, 差异表达通路减少, 但环境刺激响应和应激平衡相关基因上调, 尤其是光感受机制和昼夜节律通路, 表明幼鱼迅速建立生物钟并加快视觉系统发育, 为日后觅食和行为节律做好准备。孵化后 24 h (TS6vsTS5), 视觉功能和昼夜节律进一步加强, 而对环境应激的基因反应减弱, 显示幼鱼已逐步稳定并适应外部环境。这种策略使青田田鱼能够在孵化后初期迅速提升感知能力, 及时投入捕食和规避风险的生存竞争中。相比之下, 其他鱼类如清头冰鱼<sup>[36]</sup>在孵化后 1 周才逐步强化视觉和光信号通路, 表明青田田鱼在稻田生态中选择了更快的感知成熟路径, 以提升早期生存优势。

### 3.2 青田田鱼胚胎发育早期的母源因子作用与机制

母源性 RNA 和蛋白质在胚胎发育初期发挥

关键作用, 调控细胞分裂、合子基因激活以及组织与器官的分化<sup>[39-40]</sup>。本研究发现, 在原肠期 (TS1) 至 6 肌节期 (TS2), 核糖体生物发生和氧化磷酸化途径显著下调, 表明此阶段蛋白质合成和线粒体活性受抑, 同时细胞外基质重塑在 TS2 显著上调, 暗示胚胎已开始调控体节形成和细胞迁移。基于这些变化, 我们推测母源因子在此阶段被逐步降解, 合子基因组 (ZGA) 开始激活, 并逐步取代母源基因发挥主导作用。这与锦鲤<sup>[2]</sup>和斑马鱼<sup>[32]</sup>等模式鱼类相似, 但相比斑点叉尾鲷<sup>[27]</sup>等发育较慢的物种, 青田田鱼合子基因激活发生时间略有提前。

在进一步的发育阶段, 从眼色素期 (TS3) 到孵化出膜 (TS4), 下调的 DETs 显著富集于与母源基因相关的雌激素信号通路, 表明尽管合子基因已被激活, 母源因子仍未完全降解, 并在一定程度上继续调控胚胎发育。母源因子在早期发育阶段作为初始调控者, 确保胚胎的正常发育, 而随着合子基因的激活, 基因表达的控制逐渐从母源因子向合子基因转移。这种转变不仅是基因表达调控的关键环节, 也是胚胎正常发育的必要条件。青田田鱼在这个过程中表现出的特异性调控机制, 可能为理解鱼类发育调控网络提供新的研究视角。此外, 在这些转录本中, 涉及初生生殖层的形成、卵膜形成、精子与透明带的结合等生物学过程显著下调, 提示这些过程可能与母源因子的功能有关。Mommens 等<sup>[41]</sup>对大西洋大比目鱼 (*Hippoglossus hippoglossus* L.) 的研究表明, 母源 mRNA 会影响其孵化成功率, 而 Giraldez 等<sup>[42]</sup>在斑马鱼的研究中则发现, 母源 mRNA 表达受到抑制时, 会导致胚胎发育异常, 进一步强调了母源 mRNA 在胚胎早期发育中的关键作用。

### 3.3 时序差异分析

本研究揭示了青田田鱼在 6 个早期发育阶段内基因表达的动态变化。特别是在第六簇 (cluster 6) 中的转录本, 其在孵化前的持续上升, 而在孵化后的持续下降的趋势, 表明这些转录本可能在孵化过程中发挥关键作用。进一步利用 Spearman 相关性分析构建的转录本表达网络验证了这一

点。这些转录本在与 NR 数据库进行比对后,发现多个与调控孵化酶分泌的 *hce1* 和 *hce2* 基因相关。

孵化酶是鱼类胚胎破膜孵化的关键因子,其活性和分泌受 *hce1* 和 *hce2* 基因的直接调控。这些基因的表达模式与青田田鱼的孵化进程高度相关,与 Cluster 6 中观察到的转录本表达趋势一致。高卵壳裂解酶(high choriolytic enzyme, HCE)卵生动物中起关键作用,能够通过水解卵壳中的蛋白质和多糖,帮助胚胎突破卵膜,并实现顺利孵化<sup>[43]</sup>。HCE 的活性通常在胚胎发育的特定阶段增强,并受到甲状腺激素等内分泌信号的调控,为胚胎的快速分裂和发育提供必要的支持。此外,HCE 通过调控卵膜的裂解,确保胚胎顺利破膜,为后续的生长发育奠定基础。Yasumasu 等<sup>[44]</sup>对青鳉(*Oryzias latipes*)的研究发现,其孵化过程依赖 HCE 和低卵壳裂解酶(low choriolytic enzyme, LCE)共同作用完成。然而,本研究通过转录本表达相关性分析及 NR 数据库注释发现,在 cluster 6 中有 16 个与编码 HCE 表达有关的转录本,其中 15 个转录本成功注释到了 *hce1* 和 *hce2*,而其余转录本未能对应 LCE 相关基因。这一结果表明,青田田鱼的孵化过程可能仅依赖 HCE 介导的卵壳降解机制,而非 HCE 和 LCE 的协同作用。这一发现与 Sano 等<sup>[45]</sup>对斑马鱼的研究结果一致。

#### 4 总结与展望

本研究基于转录组测序解析了青田田鱼早期发育的分子调控机制,发现其采用“先构架、后加速”的策略,TS1 至 TS2 阶段优先完成体节与细胞外基质重塑,TS4 阶段提前启动神经、运动及昼夜节律调控。合子基因激活发生在 TS1-TS2,母源因子在 ZGA 后仍发挥作用。胚胎期通过降低氧化磷酸化并激活 HIF-1 信号适应低氧环境,孵化机制主要依赖 HCE 酶(*hce1*、*hce2*)。孵化后 12 h (TS5)即上调光感受和昼夜节律信号,确保快速适应环境。研究为青田田鱼的苗种繁育及生态养殖优化提供了分子依据,但仍存在蛋白水平验证不足、基因功能研究有待深入、环境适应性分析尚不全面等问题。未来可结合蛋白质组学、基因编辑及不同生态条件下的研究,进一步解析关键基因的

具体功能,为青田田鱼的资源保护及生态养殖模式优化提供更多理论支撑。

#### 参考文献:

- [1] Gao X, Huang B, Guan C, et al. Study on fish organogenesis and development[J]. Open Journal of Fisheries Research, 2018, 5(2): 51-63.
- [2] Luo M K, Shi X L, Guo J, et al. Deep spatiotemporal transcriptome analysis provides new insights into early development of koi carp (*Cyprinus carpio* var. koi)[J]. Aquaculture, 2023, 575: 739767.
- [3] Guo H Y, Liu M J, Gao J, et al. Development of vertebral column and appendicular skeleton in larvae and juveniles of *Platax teira*[J]. South China Fisheries Science, 2022, 18(6): 93-99.
- [4] Alix M, Chardard D, Ledoré Y, et al. An alternative developmental table to describe non-model fish species embryogenesis: Application to the description of the Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L. 1758) development[J]. EvoDevo, 2015, 6: 39.
- [5] Fuhrmann J F, Buono L, Adelman L, et al. Genetic developmental timing revealed by inter-species transplantations in fish[J]. Development, 2020, 147(22): dev192500.
- [6] Álvarez-Hernán G, Andrade J P, Escarabajal-Blázquez L, et al. Retinal differentiation in syngnathids: Comparison in the developmental rate and acquisition of retinal structures in altricial and precocial fish species[J]. Zoomorphology, 2019, 138(3): 371-385.
- [7] Evans B I, Browman H I. Variation in the Dev ariation in the Dev ariation in the Development of the F elopment of the F elopment of the Fish Retina ish Retina[C]. American Fisheries Society Symposium, 2004: 145-166.
- [8] Liu Q, Ou Y J. Present status on feeding behavior studies in early development of fishes[J]. South China Fisheries Science, 2006, 2(1): 71-75. [柳琪, 区又君. 鱼类早期发育阶段摄食行为研究现状[J]. 南方水产, 2006, 2(1): 71-75.]
- [9] Ping H L, Yu F P, Zhang T, et al. Morphological development and allometric growth pattern of *Konosirus punctatus* at larvae and juvenile stages[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2019, 43(5): 1021-1033. [平洪领, 余方平, 张涛, 等. 斑鱓仔、稚鱼形态发育及异速生长模式研究[J]. 水生生物学报, 2019, 43(5): 1021-1033.]
- [10] Fu J J, Zhu W B, Wang L M, et al. Dynamic transcriptome sequencing and analysis during early development in the bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*)[J]. BMC Genomics, 2019, 20(1): 781.
- [11] Wang L M, Song F B, Zhu W B, et al. The stage-specific long non-coding RNAs and mRNAs identification and

- analysis during early development of common carp, *Cyprinus carpio*[J]. Genomics, 2021, 113(1): 20-28.
- [12] Cui Z K, Liu Y, Wang W W, et al. Genome editing reveals *dmrt1* as an essential male sex-determining gene in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 42213.
- [13] Wang X X, Liu G F. Advances on the epigenetic regulation during zygotic genome activation in zebrafish[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2017, 29(2): 146-152. [王湘秀, 刘桂芬. 斑马鱼合子基因组激活过程中表观遗传调控的研究进展[J]. 生命科学, 2017, 29(2): 146-152.]
- [14] Fabrice T. Fish domestication: an overview[M]. Animal domestication, 2018.
- [15] Chenghui W, Sifa L, Shuming Z. Mitochondrial DNA genetic diversity, origin and evolution of four populations of red common carps in China[J]. Shuichan Xuebao, 2004, 28(6): 640-644.
- [16] Xie J, Hu L L, Tang J J, et al. Ecological mechanisms underlying the sustainability of the agricultural heritage rice-fish coculture system[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(50): E1381-E1387.
- [17] Hu W J, Gao Y, He X M, et al. Origin of domesticated Qingtian paddy-field carp and its genetic differentiation from wild common carp populations[J]. Aquaculture, 2023, 565: 739117.
- [18] Cheng X B, Li F C, Lu J J, et al. Transcriptome analysis in gill reveals the adaptive mechanism of domesticated common carp to the high temperature in shallow rice paddies[J]. Aquaculture, 2024, 578: 740107.
- [19] Cheng X B, Li F C, Kumilamba G, et al. Transcriptome analysis in hepatopancreases reveals the response of domesticated common carp to a high-temperature environment in the agricultural heritage rice-fish system[J]. Frontiers in Physiology, 2023, 14: 1294729.
- [20] Qi M, Wu Q Q, Liu T, et al. Hepatopancreas transcriptome profiling analysis reveals physiological responses to acute hypoxia and reoxygenation in juvenile Qingtian paddy field carp *Cyprinus carpio* var *qingtianensis*[J]. Frontiers in Physiology, 2020, 11: 1110.
- [21] Jiang Y H, Qi M, Zhang J P, et al. Metabolomic profiling analysis of physiological responses to acute hypoxia and reoxygenation in juvenile Qingtian paddy field carp *Cyprinus carpio* var *qingtianensis*[J]. Frontiers in Physiology, 2022, 13: 853850.
- [22] Zhi Y, Liu Q G, Wu J M, et al. Morphologic and genetic analysis of the artificially induced gynogenesis in Qingtian paddy field carp[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2022, 31(4): 839-848. [支宇, 刘其根, 吴嘉敏, 等. 人工诱导青田田鱼雌核发育子代形态和遗传分析[J]. 上海海洋大学学报, 2022, 31(4): 839-848.]
- [23] Xu P, Zhang X F, Wang X M, et al. Genome sequence and genetic diversity of the common carp, *Cyprinus carpio*[J]. Nature Genetics, 2014, 46(11): 1212-1219.
- [24] Rozario T, DeSimone D W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: A dynamic view[J]. Developmental Biology, 2010, 341(1): 126-140.
- [25] Wolfenson H, Iskratsch T, Sheetz M P. Early events in cell spreading as a model for quantitative analysis of biomechanical events[J]. Biophysical Journal, 2014, 107(11): 2508-2514.
- [26] Heijlen M, Houbrechts A M, Darras V M. Zebrafish as a model to study peripheral thyroid hormone metabolism in vertebrate development[J]. General and Comparative Endocrinology, 2013, 188: 289-296.
- [27] Ma X L, Su B F, Tian Y, et al. Deep transcriptomic analysis reveals the dynamic developmental progression during early development of channel catfish (*Ictalurus punctatus*)[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(15): 5535.
- [28] Kaitetzidou E, Ludwig A, Gessner J, et al. Expression patterns of Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) during embryonic development[J]. G3, 2017, 7(2): 533-542.
- [29] Wang Y, Yang L D, Wu B, et al. Transcriptome analysis of the plateau fish (*Triplophysa dalaica*): Implications for adaptation to hypoxia in fishes[J]. Gene, 2015, 565(2): 211-220.
- [30] Timón-Gómez A, Nývltová E, Abriata L A, et al. Mitochondrial cytochrome c oxidase biogenesis: Recent developments[J]. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2018, 76: 163-178.
- [31] Cerychova R, Pavlinkova G. HIF-1, metabolism, and diabetes in the embryonic and adult heart[J]. Frontiers in Endocrinology, 2018, 9: 460.
- [32] Vesterlund L, Jiao H, Unneberg P, et al. The zebrafish transcriptome during early development[J]. BMC Developmental Biology, 2011, 11: 30.
- [33] Sarropoulou E, Tsalafouta A, Sundaram A M, et al. Transcriptomic changes in relation to early-life events in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*)[J]. BMC Genomics, 2016, 17: 506.
- [34] Hilerio-Ruiz A, Toledo-Solís F J, Peña E, et al. Nutrigenomic markers identified by *de novo* RNAseq during the early ontogeny of the three spot cichlid *Amphilophus trimaculatus*

- [J]. *Aquaculture*, 2021, 530: 735654.
- [35] Lanes C F C, Bizuayehu T T, de Oliveira Fernandes J M, et al. Transcriptome of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) early embryos from farmed and wild broodstocks[J]. *Marine Biotechnology*, 2013, 15(6): 677-694.
- [36] Tang X M, Jiang S L, Wang H L, et al. Transcriptome sequencing analysis reveals dynamic changes in major biological functions during the early development of clearhead icefish, *Protosalanx chinensis*[J]. *Fishes*, 2022, 7(3): 115.
- [37] Patel A, Dettleff P, Hernandez E, et al. A comprehensive transcriptome of early development in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*)[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2016, 16(1): 364-376.
- [38] Xu E G, Mager E M, Grosell M, et al. Developmental transcriptomic analyses for mechanistic insights into critical pathways involved in embryogenesis of pelagic mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*)[J]. *PLoS One*, 2017, 12(7): e0180454.
- [39] Sun J W, Yan L, Shen W M, et al. Maternal Ybx1 safeguards zebrafish oocyte maturation and maternal-to-zygotic transition by repressing global translation[J]. *Development*, 2018, 145(19): dev166587.
- [40] Feitosa N M, Calderon E N, da Silva R N, et al. Brazilian silverside, *Atherinella brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1825) embryos as a test-species for marine fish ecotoxicological tests[J]. *PeerJ*, 2021, 9: e11214.
- [41] Mommens M, Fernandes J M, Bizuayehu T T, et al. Maternal gene expression in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) and its relation to egg quality[J]. *BMC Research Notes*, 2010, 3: 138.
- [42] Giraldez A J, Cinalli R M, Glasner M E, et al. microRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish[J]. *Science*, 2005, 308(5723): 833-838.
- [43] Yasumasu S, Iuchi I, Yamagami K. Purification and partial characterization of high choriolytic enzyme (HCE), a component of the hatching enzyme of the teleost, *Oryzias latipes*[J]. *The Journal of Biochemistry*, 1989, 105(2): 204-211.
- [44] Yasumasu S, Yamada K, Akasaka K, et al. Isolation of cDNAs for LCE and HCE, two constituent proteases of the hatching enzyme of *Oryzias latipes*, and concurrent expression of their mRNAs during development[J]. *Developmental Biology*, 1992, 153(2): 250-258.
- [45] Sano K, Inohaya K, Kawaguchi M, et al. Purification and characterization of zebrafish hatching enzyme—an evolutionary aspect of the mechanism of egg envelope digestion[J]. *The FEBS Journal*, 2008, 275(23): 5934-5946.

## Transcriptome analysis of early development in *Cyprinus carpio* var. *qingtianensis*

CAO Jiangwei<sup>1,2,3</sup>, WEN Yuanlin<sup>1,2,3</sup>, LU Junjie<sup>1,2,3</sup>, LI Zhili<sup>1,2,3</sup>, CHENG Xiangbing<sup>1,2,3</sup>, HE Xumeng<sup>1,2,3</sup>, SUN Jiamin<sup>1,2,3</sup>, LIU Qigen<sup>1,2,3</sup>

1. Centre for Research on Environmental Ecology and Fish Nutrition, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. Key Laboratory of Rice-Fishery Integrated Planting and Breeding Ecology of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

**Abstract:** *Cyprinus carpio* var. *qingtianensis*, commonly known as the Qingtian paddy field carp, is a key species in the Qingtian rice-fish co-culture system. However, the early developmental process has not been sufficiently studied, limiting a comprehensive understanding of its biological mechanisms. In this study, transcriptome sequencing was used to analyze the gene expression dynamics at six key developmental stages: gastrula (TS1), 6-somite (TS2), eye pigmentation (TS3), hatching (TS4), 12 h post-hatching (TS5), and 24 h post-hatching (TS6). In total, 31153 differentially expressed transcripts (DETs) were identified. GO and KEGG enrichment analyses revealed that differentially expressed genes (DEGs) in the TS2vsTS1 stage were mainly enriched in nucleic acid metabolism and cell cycle-related pathways, indicating active cell proliferation during the transition from the blastula stage to somite formation. In TS3vsTS2, upregulated genes were significantly involved in skeletal muscle development and aerobic metabolic processes, suggesting the establishment of muscular and energy metabolism systems. In TS4vsTS3, pathways related to cardiac muscle contraction, neural development, and sensory functions were prominently activated, reflecting functional maturation from organ formation to the pre-hatching stage. The number of DEGs in TS5vsTS4 and TS6vsTS5 was relatively low, mainly involving stress responses and immune functions, indicating a shift toward environmental adaptation after hatching. These results indicated that *C. carpio* var. *qingtianensis* follows a "framework first, acceleration later" developmental strategy, in which maternal factors continue to regulate embryonic development even after zygotic genome activation (ZGA). In terms of energy metabolism, Qingtian paddy field carp adapted to the hypoxic rice field environment by downregulating oxidative phosphorylation (OXPHOS) and activating the HIF-1 signaling pathway. Additionally, 16 transcripts related to hatching enzyme (HCE) expression were identified in cluster 6, with all but one annotated as *hce1* and *hce2*, suggesting that hatching in the Qingtian paddy field carp is primarily mediated by HCE activity. This study provides new molecular insights into the early developmental regulation of *C. carpio* var. *qingtianensis* revealed its unique adaptations to the rice-fish ecosystem and lays a foundation for further investigation into its regulatory mechanisms.

**Key words:** *Cyprinus carpio* var. *qingtianensis*; early development; RNA-seq; rice-fish co-culture

**Corresponding author:** LIU Qigen. E-mail: qgliu@shou.edu.cn