

DOI: 10.12264/JFSC2023-0106

紫贻贝产卵前后转录组分析与相关基因的筛选

姚荣辉¹, 叶莹莹², 马颜雯², 董震宇¹, 郭锋², 王伟峰¹, 郭宝英¹

1. 浙江海洋大学海洋科学与技术学院, 浙江 舟山 316022;
2. 国家海洋设施养殖工程技术研究中心, 浙江 舟山 316022

摘要: 为探究紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)雌性生殖相关基因在产卵过程中发挥的功能及其参与产卵活动的调控机制, 对紫贻贝产卵前后的性腺组织进行了转录组测序分析。结果显示, 紫贻贝产卵前后存在的差异表达基因为 4060 个, 其中上调的基因数目为 1488 个, 下调的基因数目为 2572 个。GO 富集分析显示, 这些差异基因主要参与生长、发育过程、生殖、生殖过程等生殖相关的生物学途径。KEGG 富集分析显示, 与产卵、生殖相关的信号通路包括 TCA 循环、GnRH 信号通路、卵巢类固醇生成、雌激素信号通路、催产素信号通路、类固醇生物合成等能够被显著富集。荧光定量分析结果显示, 促黄体生成激素 β (*LH β*)和基质金属蛋白酶 14 (*MMP14*)基因表达水平显著升高, 促性腺激素释放激素受体(*GnRHR*)、细胞色素 P4503A 酶(*CYP3A*)、细胞色素 P45017A 酶(*CYP17A*)基因表达水平显著下降。本研究利用转录组学分析了紫贻贝在产卵前后性腺组织转录水平的差异, 揭示了紫贻贝性腺组织中参与调节产卵过程的主要途径和候选基因, 为进一步阐明紫贻贝产卵活动的内在调控机制提供数据支撑, 也为紫贻贝苗种繁育提供理论支持。

关键词: 紫贻贝; 转录组测序; 性腺; 产卵; 差异表达基因

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005–8737–(2023)08–0953–12

紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)隶属于软体动物门(Mollusca), 贻贝科(Mytilidae), 贻贝属, 广泛分布于世界各地的近海海域, 在我国多分布于北方沿海地区, 东海、南海也有少量分布^[1]。因其具有繁殖能力强、生长速度快、经济效益高等特点, 已成为贻贝中重要的经济品种, 其养殖产业呈现出良好的发展态势。在水产养殖行业中, 苗种繁育是制约养殖产业规模化的关键因素之一。而由于对紫贻贝生长和生殖相关理论知识的缺乏, 其人工养殖产业逐渐暴露出苗源不稳定和养殖效率低等缺点^[2]。因此, 对紫贻贝进行生殖相关的研究不仅可以加深对紫贻贝生殖分子机制的认识, 也可以为其苗种的规模化繁育提供理论支持。

近年来, 转录组测序技术被广泛应用于水生生物基因表达模式研究^[3], 并取得显著成果。在鱼类生殖相关的研究中, 刘慧芬等^[4]对花鲢(*Hemibarbus maculatus*)的脑、卵巢和肝脏等组织进行了转录组测序分析, 筛选出与卵巢发育相关的基因; Ge 等^[5]通过转录组测序以及生物信息学分析了低温条件对斑马鱼(*Danio rerio*)产卵过程的影响, 并筛选出相关的调控基因、中枢通路和重要的生物学过程, 这对深入了解激素分泌对斑马鱼产卵的调控具有重要意义; 此外, Chen 等^[6]利用转录组测序技术, 揭示了铅点东方鲀(*Takifugu alboplumbeus*)产卵行为与月球周期同步的内在机制, 并验证了在产卵过程中前列腺素 E2 能够触发周围个体同步的产卵行为。同时, 转录组测序技术也被应用于软

收稿日期: 2023-06-01; 修订日期: 2023-07-20.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(42076119); 浙江省“三农九方”科技协作计划“揭榜挂帅”项目(2023SNJF065).

作者简介: 姚荣辉(1997–), 女, 硕士研究生, 研究方向为海洋生物学. E-mail: 1593017932@qq.com

通信作者: 郭宝英, 教授, 研究方向为海洋生物遗传与分子生物学. E-mail: guobaoying@zjou.edu.cn

体动物性别分化、性腺发育等相关的研究中。赵丹^[7]通过转录组测序分析,筛选出与虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)性别分化相关的关键基因 *Dmrt1* 和 *Foxl2*, 并研究了 *Dmrt1* 和 *Foxl2* 基因在虾夷扇贝性腺发育的不同阶段的时空表达模式。杨梅^[8]通过转录组数据揭示了长牡蛎(*Crassostrea gigas*)发育过程中 *Fox* 基因的表达模式。尽管转录组测序技术在包括贝类在内的水生动物中应用广泛,但是关于贝类产卵机制的转录组学研究却鲜有报道。

性腺是产生配子和性激素的重要器官,具有调控卵母细胞发育、成熟和释放的作用,对软体动物繁殖具有重要意义^[9-11]。软体动物性腺生长和产精产卵过程易受到环境因素的影响,如水温、海流剧烈变化、空气湿度等^[12-14]。因此,温度刺激、阴干刺激、流水刺激是诱导贝类卵子和精子排放的常用方法^[15-16]。在紫贻贝生长和繁殖的关键环节进行阴干刺激可以加快紫贻贝品种选育的进度和效率,进而影响紫贻贝产业的发展。

为了深入了解紫贻贝生殖系统的潜在机制,探索与生殖相关的功能基因并了解其表达模式,本研究利用转录组学研究技术,建立了紫贻贝产卵前后的转录文库,并通过生物信息学分析筛选出与雌性紫贻贝生殖过程相关的基因和信号通路,为阐明紫贻贝雌性繁殖过程相关的调控机制提供理论基础。

1 实验方法

1.1 样本采集

本研究所用的紫贻贝于 2021 年 11 月采自大连市长海县獐子岛(122°30'E, 39°0'N), 体重约为 (30±2.5) g。催产前,所有紫贻贝在 13~15 °C、盐度为 30 的海水中驯化 1 周。每天投喂小球藻粉两次,每天更换 40%~50%的海水。挑选 6 只未发生排卵现象、性腺饱满的雌性紫贻贝,随机分为两组:对照组(C)、实验组(E)。将 E 组紫贻贝放置于托盘中,放置于阴冷干燥的环境中阴干刺激 6 h,放入水中催产;C 组不做阴干处理。待 E 组排放卵子后,收集 C、E 组卵巢组织于 RNA Store 中,然后保存在-80 °C 备用。

1.2 RNA 提取文库构建

使用 Trizol (Solarbio, China)提取总 RNA, 并使用 Nano Drop 紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳对总 RNA 浓度及完整性进行鉴定,-80 °C 保存备用。本研究中的转录组文库制备和测序等过程由深圳华大基因生物技术公司完成,所有样本在 HiSeq 4000 平台进行上机测序。

1.3 数据拼接、功能注释以及差异基因筛选与聚类

为了确保本研究数据分析的质量和可靠性,首先使用 SOA Pnuke^[17]工具过滤去除原始数据(raw reads)中含有衔接子、低质量和未知碱基 N 含量过高的 reads 以获得可靠的 clean reads。使用 HISAT2^[18]将过滤得到的 clean reads 比对至紫贻贝的参考基因组(NCBI 登录号: GCA_025277285.1)。使用 Bowtie2^[19]将 clean reads 与参考编码基因集对齐,通过 RSEM^[20]计算基因的表达水平。最后使用 DESeq2^[21]进行差异表达分析获得差异表达基因(参数设置为 $FDR \leq 0.05$ 和 $|\log_2 \text{FoldChange}| \geq 1.00$)。

使用软件 Phyper (https://en.wikipedia.org/wiki/Hypergeometric_distribution)对筛选的差异表达基因进行 GO (<http://www.geneontology.org/>)和 KEGG (<https://www.kegg.jp/>)功能注释和富集分析,设置 Q 值 ≤ 0.05 为显著富集^[22]。根据差异表达基因的 GO 和 KEGG 富集分析结果,挑选出富集程度较高的通路和 GO 类别,筛选出与产卵和生殖相关的差异表达基因进行聚类分析。

1.4 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)验证

关键酶和限速酶的代谢产物在代谢途径中具有重要作用,本研究在差异表达基因中筛选出促性腺激素释放激素受体(*GnRHR*)、促黄体生成激素 β (*LH β*)、基质金属蛋白酶 14 (*MMP14*)、细胞色素 P450 3A 酶(*CYP3A*)和细胞色素 P450 17A 酶(*CYP17A*)等基因进行表达水平分析。根据本研究中的转录本序列,使用 Primer 5.0 设计特异性扩增引物(表 1),以 β -肌动蛋白(β -actin)作为内参,所有引物委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。采用 Go ScriptTM Reverse Transcription System 试剂盒(Promega, USA)将提取的 RNA 反转录为 cDNA, 然后使用 TB Green[®] Fast qPCR Mix

表 1 用于 RT-qPCR 的引物序列
Tab. 1 Primer sequences for RT-qPCR

基因 gene	全名 full name	引物序列(5'-3') sequence (5'-3')	片段/bp size
<i>GnRHR</i>	促性腺激素释放激素受体	F: AAACGCTCATGTAAGAACCT	294
	gonadotropin releasing hormone receptor	R: GCTTCATCGGGTAGTTTTTG	
<i>LHβ</i>	促黄体生成激素 β	F: CACTGGGAAAGCTCACGATA	168
	luteinizing hormone	R: AATTGTTTCGGTAAGCCAGG	
<i>MMP14</i>	基质金属蛋白酶 14	F: GTCAATTTTGCGTTTGTGAGC	245
	matrix metalloproteinases 14	R: TCTGTCTAAAGGGGATTTGC	
<i>CYP17A</i>	细胞色素 P450 17A 酶	F: CAAAGCTGATTTTGCTGACA	262
	cytochrome P450 17A	R: GCTCCATTTCTTTTGCCAT	
<i>CYP3A</i>	细胞色素 P450 3A 酶	F: CTTTCAGTTGCTCAGGTAGT	245
	cytochrome P450 3A	R: AAGGATACCATGTCCAAACC	

(TaKaRa, China) 试剂盒, 以紫贻贝催产前后 cDNA 为模板, 在 Applied Biosystems 7500 系统中进行 RT-qPCR 检测。每个样本重复 3 次, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析基因的转录水平。使用 SPSS 19.0 和 GraphPad Prism 8.0 进行数据统计分析和可视化绘图。

2 结果与分析

2.1 测序结果概述

本研究共检测 6 个独立样品, 每个样品平均

产出 6.38 Gb 数据, raw reads 过滤后平均得到 42.42 M clean reads。每个样本中 Q20 均大于 97%, Q30 大于 91% (表 2), 平均 clean reads ratio 为 95.4%。每个样本的总对比率均值为 53.3%, 唯一对比率为 24.3%, 匹配率在 92% 以上, 表明所选择的参考基因组组装能够满足信息分析的要求。将 clean reads 对比到参考基因组, 共检测出 42396 个新转录本, 33509 个属于已知基因具有蛋白编码潜力的转录本, 8887 个属于新基因具有蛋白编码潜力的转录本。

表 2 紫贻贝产卵前后性腺转录组测序产量统计

Tab. 2 Statistics of gonadal transcriptome sequencing yield before and after ovulation in *Mytilus galloprovincialis*

样本 sample	原始读段数量/M total raw reads	过滤读段数量/M total clean reads	过滤碱基数量/Gb total clean bases	过滤读段质控 Q20/% clean reads Q20	过滤读段质控 Q30/% clean reads Q30	过滤读段占比/% clean reads ratio
CM1	47.33	45.04	6.76	97.96	94.44	95.16
CM2	41.05	38.24	5.74	97.3	92.91	93.17
CM3	43.69	42.21	6.33	97.2	91.56	96.6
EM1	43.69	42.19	6.33	97.27	91.72	96.56
EM2	45.44	43.35	6.5	97.15	91.38	95.41
EM3	45.57	43.54	6.53	97.8	93.78	95.53

2.2 差异结果分析

本研究发现产卵前的贻贝中有 12697 个基因特异性表达, 而在产卵后的贻贝中有 5291 个基因特异性表达(图 1)。产卵前后相比较, 共获得 4060 个显著差异表达基因, 其中上调基因 1488 个, 下调基因为 2572 个(图 2)。

2.3 GO 和 KEGG 功能注释和富集分析

2.3.1 GO 注释和富集分析 对紫贻贝产卵前后

的差异表达基因进行 GO 分析显示, 注释结果分为生物过程、细胞组分和分子功能 3 大功能类(图 3), 其中生物过程功能类包括 1460 个子类别, 细胞组分功能类注释到 383 个子类别, 分子功能亚类包括 833 个子类别。在生物过程类别中, 细胞过程 (cellular process) 和生物调节 (biological regulation) 包含较多的差异表达基因, 其差异基因数目分别为 655 和 282。此外, 在生物过程类别中差异基因



图 1 紫贻贝产卵前后性腺组间基因表达 Venn 图
C 组: 紫贻贝产卵前基因表达量; E 组: 紫贻贝产卵后基因表达量.

Fig. 1 Venn diagram of gene expression between gonad groups before and after ovulation in *Mytilus galloprovincialis*

Group C: gene expression of *Mytilus galloprovincialis* before spawning; Group E: gene expression of *Mytilus galloprovincialis* after spawning.

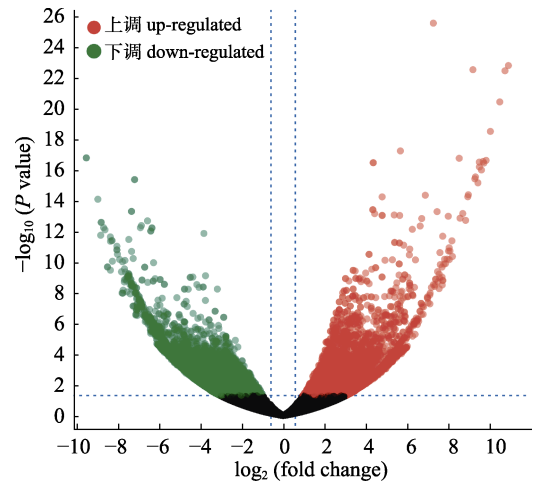


图 2 紫贻贝产卵前后性腺间差异表达基因火山图
Fig. 2 Volcanic map of the differentially expressed genes between gonads of *Mytilus galloprovincialis* before and after ovulation

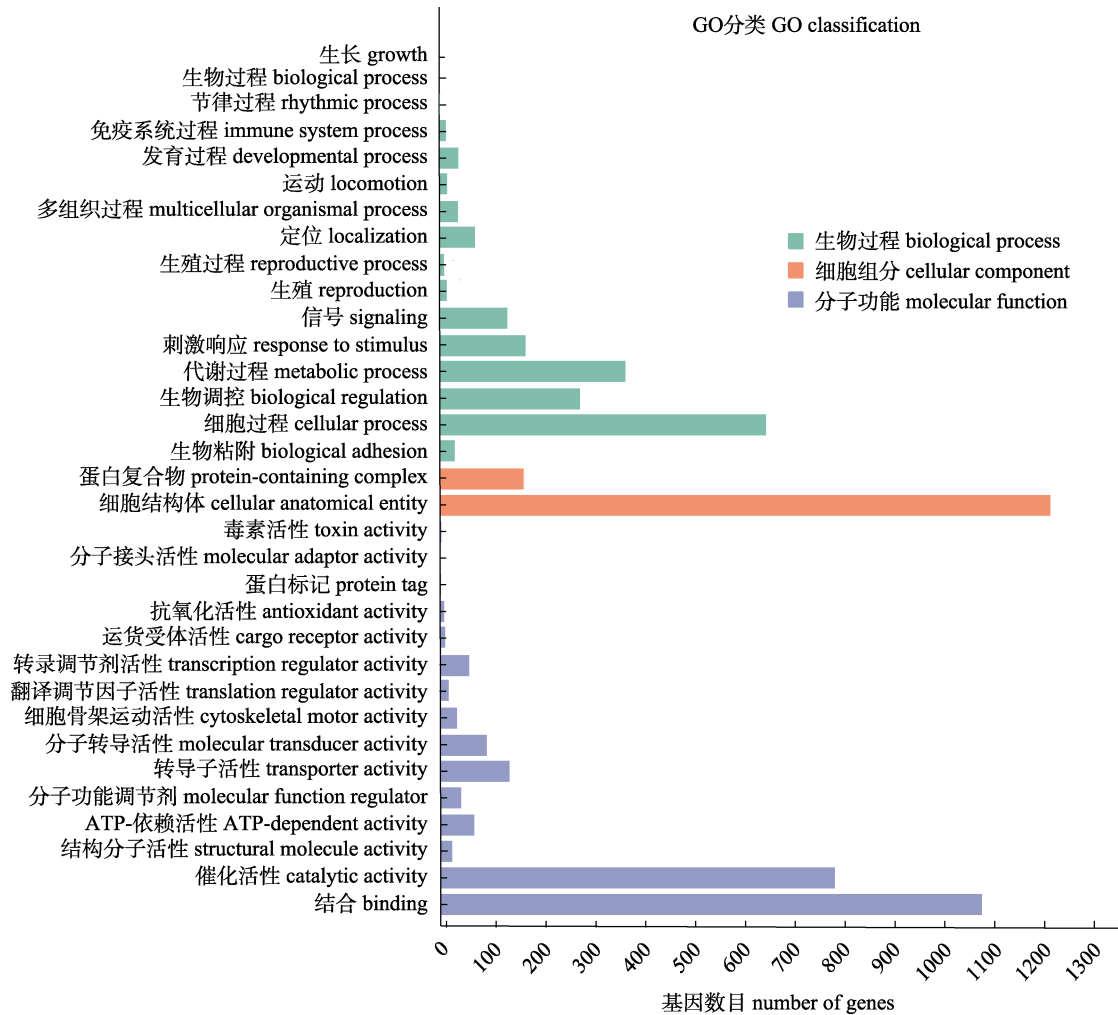


图 3 紫贻贝产卵前后性腺转录组差异表达基因 GO 功能分类图

Fig. 3 GO functional classification of differentially expressed genes in gonadal transcriptome of *Mytilus galloprovincialis* before and after ovulation

被富集到生长(growth)、发育过程(development process)、生殖过程(reproductive process)以及生殖(reproduction)等与贻贝产卵活动相关的 GO 条目; 在细胞组分类别中, 细胞结构体 (cellular anatomical entity) 包含的差异表达基因数目最大, 为 1224 个; 在分子功能类别中, 富集基因数目最多的生物学过程为 DNA 连接过程(binding)和催化活性(catalytic activity), 其分别包含 1085 和 790 个差异表达基因。

2.3.2 KEGG 注释和富集分析 本研究的差异表达基因共富集到 256 个代谢通路, 将所有 KEGG 代谢通路分为代谢、细胞过程、环境信息处理、遗传信息处理、有机系统 5 个大类(图 4)。其中, 发生显著富集的 KEGG 通路有 TCA 循环 (citrate cycle)、卵母细胞减数分裂(oocyte meiosis) 和 黄体酮介导的卵母细胞成熟 (progesterone-

mediated oocyte maturation)等(图 5), 部分差异表达基因注释到 FoxO 信号通路(FoxO signaling pathway)、促性腺激素释放激素信号通路(GnRH signaling pathway)、卵巢类固醇生成(ovarian steroidogenesis)、雌激素信号通路(estrogen signaling pathway)、催产素信号通路(oxytocin signaling pathway)、类固醇生物合成(steroid biosynthesis)和甾体激素生物合成(steroid hormone biosynthesis)。

为了更好地了解产卵前后差异基因表达的关系, 本研究选取了 11 个与产卵相关的差异基因进行聚类分析, 以显示差异基因的表达模式。结果表明大多数基因产卵前后存在差异表达(图 6), 例如电压依赖性钙通道 $\alpha 1A$ 亚基(*CACNA1A*)、*LH β* 、*MMP14*、丝裂原活化蛋白激酶(*MKK7*)、蛋白激酶 A (*PKA*)和钙调蛋白(*CALM*)等在产卵前低表达, 但在产卵后高表达; 而 *CYP3A*、*CYP17A*、*GnRHR*、

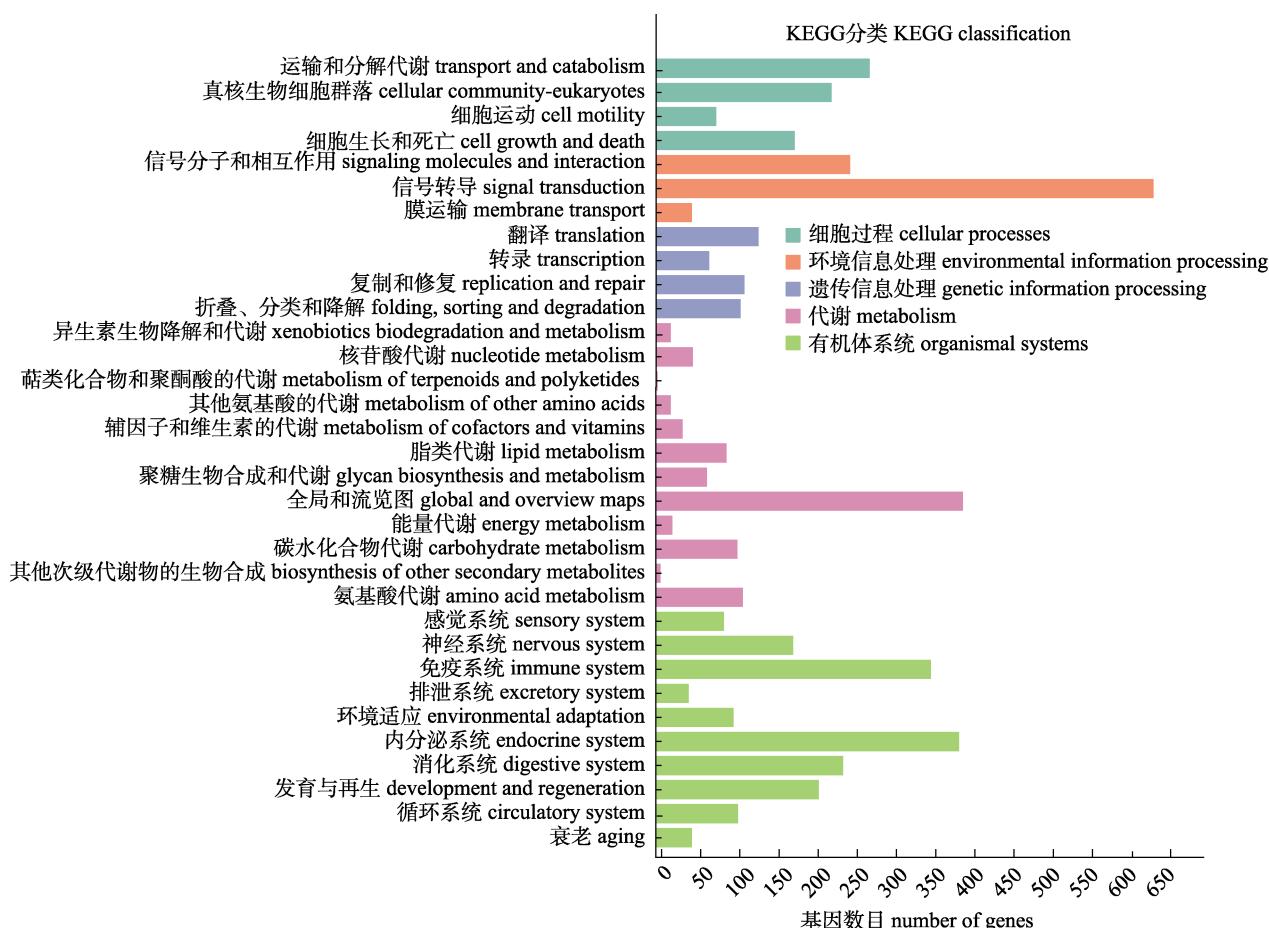


图 4 紫贻贝产卵前后性腺转录组差异表达基因 KEGG 信号通路分类图

Fig. 4 Classification map of KEGG signaling pathway of differentially expressed genes in gonadal transcriptome of *Mytilus galloprovincialis* before and after ovulation

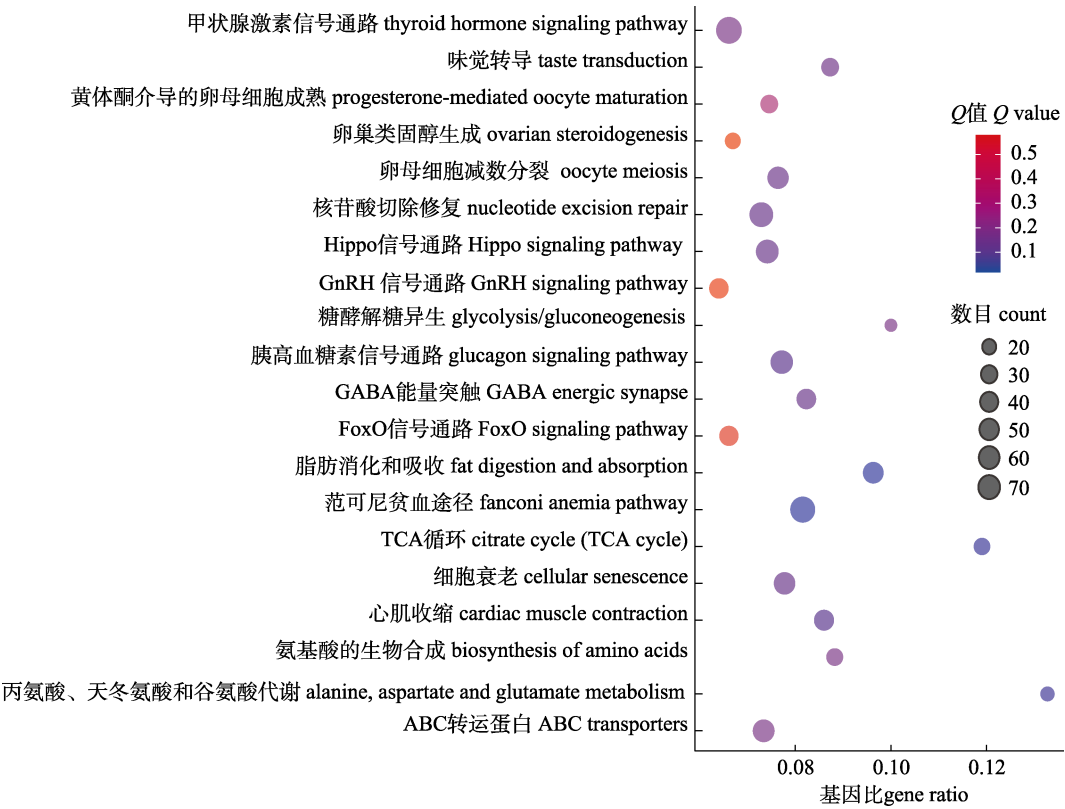


图 5 紫贻贝产卵前后性腺转录组差异表达基因 KEGG 信号通路富集分析图
Fig. 5 Enrichment analysis of KEGG signal of differentially expressed genes in gonadal transcriptome of *Mytilus galloprovincialis* before and after ovulation

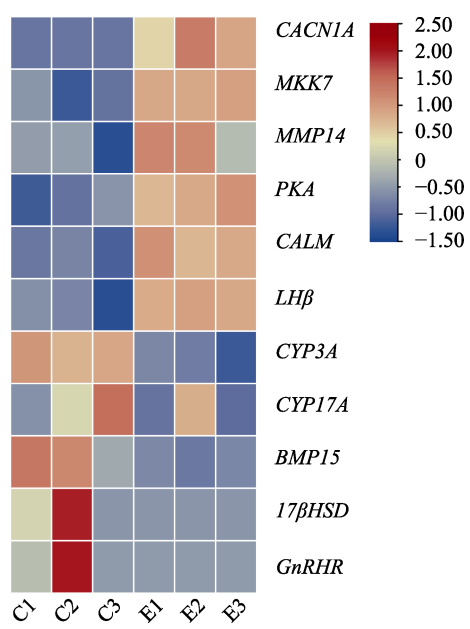


图 6 紫贻贝产卵前后差异表达基因热图分析
Fig. 6 Heat map analysis of differentially expressed genes of *Mytilus galloprovincialis* before and after ovulation

骨形态发生蛋白 15 (*BMP15*)和 17β 羟基类固醇脱

氢酶(*17β HSD*)等基因在产卵后较产卵前低表达。

2.4 差异表达水平验证

本研究在参与性腺发育和生殖相关的代谢途径中，筛选出 5 个关键基因用于 RT-qPCR 检测以验证转录组数据的可靠性。其中 *GnRHR*、*CYP3A* 和 *CYP17A* 等 3 个基因的表达趋势与转录组测序结果表现一致，产卵后均为下调表达，且 *CYP17A* 基因的下调差异倍数最大；同时，*MMP14* 和 *LHB* 基因均表现为上调表达，与转录组中分析的调节趋势相同。RT-qPCR 检测结果与转录组中相应基因的表达趋势基本一致，证实了转录组数据的可靠性(图 7)。

3 讨论

3.1 性腺发育相关的通路分析

产卵过程是一个涉及多个调节基因和调控过程的复杂生物学过程。本研究通过 KEGG 富集分析筛选到了与卵巢生殖发育相关的信号传导途径，

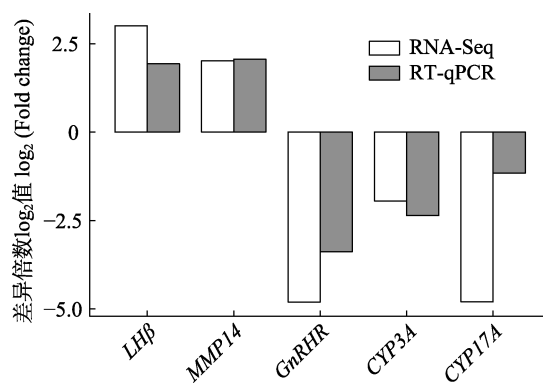


图 7 RT-qPCR 验证 RNA-Seq 结果
Fig. 7 Validation of the RNA-seq data by RT-qPCR detection

包括 TCA 循环、卵母细胞减数分裂、GnRH 信号通路、雌激素信号通路、孕酮介导的卵母细胞成熟和类固醇激素生物合成等生物途径。TCA 循环是细胞能量代谢的中心生化途径^[23], 负责为线粒体呼吸链提供还原性分子, 促进 ATP 形成, 是获得能量的有效方式之一^[24]。本研究发现, TCA 循环通路中的基因在产卵前后出现差异性表达, 这说明 TCA 循环可能在紫贻贝排卵过程中为生物体提供必需的能量, 以维持繁殖过程以及基础的生理平衡。GnRH 通路在脊椎动物 HPG 轴的生殖调节中起重要作用^[25], 该通路可以促进 LH 的合成, 并刺激卵子和精子释放。近年来, GnRH 通路在软体动物生殖内分泌调控中的作用引起了人们的广泛关注。在 GnRH 信号通路中促性腺激素释放激素(GnRH)是主要调控者, 通过激活 GnRH 受体调节促性腺激素的表达, 刺激性腺发育、类固醇激素合成、配子合成以及产卵过程。在 GnRH 信号通路中, CALM、CACNA1A 以及 AMP 依赖性蛋白激酶(APKA)与细胞信号转导有关, 这些蛋白通过细胞核信息途径向细胞或细胞核传递细胞外信号, 调节生物效应, 影响细胞生长、发育、分化和增殖^[2]。本研究发现, 上述蛋白基因的表达量在产卵后呈现出显著增加的趋势, 这表明 GnRH 通路可能参与了紫贻贝产卵活动以及生殖调节过程。

类固醇激素合成途径能够生成重要的生物活性物质, 并在性腺成熟、生殖细胞增殖和性行为等生理过程中发挥着重要作用^[26-28]。在软体动物

中存在着与类固醇激素合成与代谢相关的酶和激素, 例如 CYP17A 和 17β 雌二醇等^[29], 其中, 17β 雌二醇对卵黄的形成、卵母细胞的大小以及性腺的分化均有影响, 也可诱导肝脏营养物质向卵巢转移, 加速卵巢营养物质积累, 促进卵巢发育^[30-31]。CYP17A 在性类固醇生成以及代谢过程中负责调控卵母细胞成熟期间类固醇激素的产生^[32], 这也暗示了类固醇合成在生殖过程中的作用。在紫贻贝产卵前后阶段, 类固醇生物合成途径中的 CYP17A、17β 雌二醇以及 CYP3A 基因表达水平存在显著差异, 表明类固醇合成通路可能参与调控相关激素的分泌, 进一步调控紫贻贝产卵以及生殖过程。

3.2 卵巢发育相关基因的初步鉴定

在紫贻贝产卵相关的 KEGG 通路中筛选到 5 个与性腺生殖发育相关的基因, 它们分别是 *GnRHR*、*LHβ*、*MMP14*、*CYP3A*、*CYP17A*。其中, *GnRHR* 在 GnRH 通路中具有重要作用, 它能够接收 GnRH 的信号促进 LH 和 FSH 的释放^[33], 是卵子和精子排放过程中的重要枢纽。*GnRHR* cDNA 已经在海兔(*Aplysia californica*)、章鱼(*Octopus vulgaris*)、长牡蛎等软体动物中均有发现^[34], 其在诱导性腺成熟、产卵、调节性类固醇生成和一系列产卵活动相关的过程中起到至关重要的作用^[35]。Nagasawa 等^[33]利用 qPCR 技术验证了 *GnRHR* 基因在虾夷扇贝性腺的成熟早期和成熟期都有表达, 未成熟的性腺中 *GnRHR* 的表达水平要高于成熟和完全成熟性腺, 这进一步证实了 *GnRHR* 在虾夷扇贝性腺细胞成熟过程中的必需性, 可以调节虾夷扇贝精原细胞以及卵母细胞的增殖。在雄性长牡蛎性腺中 *GnRHR* mRNA 表达水平从休止期到性成熟期逐渐增加, 而在雌性长牡蛎中则呈下降的趋势^[36], 这说明 *GnRHR* 在双壳贝类的繁殖周期过程中具有规律性变化。本研究中 *GnRHR* 在地中海贻贝产卵前的性腺组织中的表达量显著高于产卵后, 表明 *GnRHR* 随着产卵活动的进行出现了差异性表达, 其很可能参与调节紫贻贝的生殖过程。

脊椎动物中 GnRH 可刺激 FSH 和 LH 的释放, 从而调节性激素的合成以及排卵活动^[37]。在鱼类

中, LH β 在性腺发育和生殖过程中扮演着重要角色^[38-40], 其分泌的水平和频率增加标志着动物获得生殖能力^[41]。在模式生物斑马鱼的研究中发现, LH β 能够促进斑马鱼卵巢的分化, 刺激排卵期卵泡的产生^[38]。在无脊椎动物中, 已经证实在双脐螺(*Biomphalaria alexandrine*)脑神经节的神经元中有 LH β 免疫反应性的存在^[42]。LH β 能够刺激褐虾(*Crangon crangon*)卵巢体细胞数量增加和配子减数分裂^[43]。LH β 基因在紫贻贝产卵前后存在显著的差异性表达, 这表明 LH β 可能在调控紫贻贝产卵和繁殖过程中发挥着重要作用。

基质金属蛋白酶(MMPs)是一类细胞外蛋白酶, 能够在生理和病理过程中发挥作用。在排卵期, MMPs 能够引起卵泡壁和周围基质的破裂从而有助于卵母细胞的排出, 因此 MMPs 被认为是排卵过程和后期黄体形成的重要介质^[44]。有报道称, 排卵过程中由于促性腺激素的激增导致 *MMP14* mRNA 及其活性增加, 这有利于激活其他 MMPs 进而调节排卵过程^[45]。类似地, 本研究中发现 *MMP14* 基因在排卵后表达水平上调, 说明 *MMP14* 基因可能参与了紫贻贝的排卵过程。

性类固醇激素在动物性腺的发育以及生殖过程中具有重要作用^[4], 且越来越多的研究发现性类固醇广泛存在于软体动物中^[46]。*CYP17A* 是在性激素生成过程中发挥重要作用的酶^[47], 在一些鱼类如青鳉(*Oryzias latipes*)^[48]、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[49]和日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)^[50]中 *CYP17A* 具有 17 α -羟化酶和 17, 20-裂解酶的活性, 并在性类固醇激素合成中起到主导作用^[51-53]。此外, 卵巢芳香酶随着卵母细胞生长及卵黄生成而趋向于下调的趋势^[52-54]。在栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)性腺发育周期的研究中, *CYP17A* 的表达量随着卵母细胞的生长与成熟发生差异表达, 这可能表示 *CYP17A* 调节了卵母细胞的生长和成熟^[55]。本研究中 *CYP17A* 基因在排卵前表达量要高于排卵后, 推测 *CYP17A* 基因表达的差异在卵黄后卵母细胞的最终成熟阶段、排卵以及受精过程中发挥着重要作用。细胞色素 P450 酶家族的 *CYP3A* 被认为是 *CYP19* 的祖先基因, 在雄激素转化为雌激素过程中发挥潜在作

用^[56]。*CYP3A* 样蛋白主要在哺乳动物和其他脊椎动物中存在^[55-56], 与脊椎动物特异性抗体交叉反应中发现 *CYP3A* 样蛋白存在于厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)和紫贻贝的消化腺中^[57-58]。在棘皮动物的研究中, *CYP3A* mRNA 在雌性海参(*Holothuria scabra*)性腺发育的早期阶段表达较高, 但其他晚期阶段不表达^[56]。本研究结果显示, *CYP3A* 基因在产卵前的表达量要高于产卵后的表达量, 表明 *CYP3A* 可能通过参与性类固醇的转化途径调节紫贻贝产卵过程。综上所述, *CYP17A* 和 *CYP3A* 基因的表达水平与产卵之间存在着一定的相关性。产卵前后的差异性表达结果表明, *CYP17A* 和 *CYP3A* 基因很可能参与紫贻贝的生殖过程, 是贻贝繁殖过程所必需的调节因子。

4 结论

本研究通过转录组学测序技术对产卵前后的紫贻贝性腺组织进行转录组学分析, 揭示了产卵过程中可能参与的关键通路(卵母细胞减数分裂、类固醇生物合成、GnRH 信号通路等), 这些途径主要涉及激素调节、性腺细胞增殖和能量代谢等生物学过程。此外, 一些关键基因如 *GnRHR*、*LH β* 、*MMP14*、*CYP3A* 和 *CYP17A* 等可能与紫贻贝的性腺发育调控、激素代谢、配子发生和卵黄积累等生殖相关过程有关。本研究获得了紫贻贝产卵前后性腺组织的转录组学数据, 丰富了与紫贻贝性腺发育和生殖活动相关的基因表达数据, 为进一步研究紫贻贝产卵过程和生殖活动的内在分子调节机制提供了理论基础。

参考文献:

- [1] Liu M K, Que H Y, Zhang G F, et al. The Current standing of the Mediterranean mussel industry, the obstacles posed and its potential restoration[J]. Marine Sciences, 2022, 46(3): 135-144. [刘明坤, 阙华勇, 张国范, 等. 紫贻贝养殖产业的现状、问题与对策[J]. 海洋科学, 2022, 46(3): 135-144.]
- [2] Lin C Y, Guo C Y, Zhu X J, et al. Ovarian transcriptome analysis of *Mactra chinensis* provides insights into genes expressed during the intermediate and ripening stages[J]. Animal Reproduction Science, 2019, 208: 106078.
- [3] Zhong Z X, Chen G Z, Tu H H, et al. Transcriptomic analysis and functional gene expression in different stages of

- gonadal development of *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Fishes, 2023, 8(2): 94.
- [4] Liu H F, Lu L S, Wang J, et al. Transcriptome analysis of spotted steed (*Hemibarbus maculatus* Bleeker) to identify genes related to ovary development[J]. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(8): 1714-1722. [刘慧芬, 卢良盛, 王静, 等. 基于转录组测序技术筛选花鲢卵巢发育相关基因[J]. 水产学报, 2019, 43(8): 1714-1722.].
- [5] Ge G D, Long Y, Song G L, et al. Transcriptomic profiling revealed signaling pathways associated with the spawning of female zebrafish under cold stress[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(14): 7494.
- [6] Chen J F, Katada Y, Okimura K, et al. Prostaglandin E2 synchronizes lunar-regulated beach spawning in grass puffers[J]. Current Biology: CB, 2022, 32(22): 4881-4889.
- [7] Zhao D. Expression characteristics and function of genes *Dmrt1* and *Foxl2* in the scallop *Patinopekten yessoensis*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2021: 6. [赵丹. 虾夷扇贝 *Dmrt1* 和 *Foxl2* 基因表达特征及功能分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2021: 6.]
- [8] Yang M. Evolution and expression analysis of Fox gene family and classical Wnt signaling pathway-related genes in long oysters (*Crassostrea gigas*)[D]. Beijing: Chinese Academy of Sciences, 2014. [杨梅. 长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) Fox 基因家族和经典 Wnt 信号通路相关基因的进化和表达分析[D]. 北京: 中国科学院, 2014.]
- [9] Chung E Y. Ultrastructural studies of oogenesis and sexual maturation in female *Chlamys (Azumapekten) farreri farreri* (Jones & Preston, 1904) (Pteriomorpha: Pectinidae) on the western coast of Korea[J]. Malacologia, 2008, 50(1): 279-292.
- [10] Erkan M. Ultrastructure of ovary and oogenesis in *Chamelea gallina* (Linné, 1758) (bivalvia, Veneridae)[J]. Invertebrate Reproduction & Development, 2009, 53(4): 201-209.
- [11] Doucet-Beaupré H, Breton S, Chapman E G, et al. Mitochondrial phylogenomics of the Bivalvia (Mollusca): Searching for the origin and mitogenomic correlates of doubly uniparental inheritance of mtDNA[J]. BMC Evolutionary Biology, 2010, 10: 50.
- [12] Yamaguchi A, Lee K H, Fujimoto H, et al. Expression of the DMRT gene and its roles in early gonadal development of the Japanese pufferfish *Takifugu rubripes*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part D, Genomics & Proteomics, 2006, 1(1): 59-68.
- [13] García-Corona J L, Rodríguez-Jaramillo C, Saucedo P E, et al. Internal energy management associated with seasonal gonad development and oocyte quality in the horse mussel *Modiolus capax* (Bivalvia; Mytilidae)[J]. Journal of Shellfish Research, 2018, 37(3): 475-483.
- [14] Yu D L. Omics studies on the toxicological effects of cadmium and arsenic in different developmental stages of the mussel *Mytilus galloprovincialis*[D]. Yantai: Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, 2017: 19. [于德良. 镉和砷对不同发育阶段紫贻贝毒理效应的组学研究[D]. 烟台: 中国科学院烟台海岸带研究所, 2017: 19.]
- [15] Li K J, Gu C B. Artificial breeding techniques of mussel in Northern China[J]. Journal of Aquaculture, 2015, 36(8): 35-37. [李慷均, 顾成柏. 厚壳贻贝的北方人工繁育技术[J]. 水产养殖, 2015, 36(8): 35-37.]
- [16] Pu L Y, Wang G F, Yang M Q, et al. Study on artificial ripening cultivation and oxytocin technology of *Meretrix axyridis*[J]. Hebei Fisheries, 2022(9): 15-18. [蒲利云, 王国福, 杨明秋, 等. 斧文蛤人工促熟培育与催产技术研究[J]. 河北渔业, 2022(9): 15-18.]
- [17] Li R Q, Li Y R, Kristiansen K, et al. SOAP: Short oligonucleotide alignment program[J]. Bioinformatics, 2008, 24(5): 713-714.
- [18] Kim D, Langmead B, Salzberg S L. HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements[J]. Nature Methods, 2015, 12(4): 357-360.
- [19] Langmead B, Salzberg S L. Fast gapped-read alignment with bowtie 2[J]. Nature Methods, 2012, 9(4): 357-359.
- [20] Li B, Dewey C N. RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome[J]. BMC Bioinformatics, 2011, 12: 323.
- [21] Love M I, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. Genome Biology, 2014, 15(12): 550.
- [22] Abdi H. The Bonferroni and Šidák corrections for multiple comparisons[J]. Encyclopedia of Measurement & Statistics, 2007, 1: 1-9.
- [23] Fernie A R, Carrari F, Sweetlove L J. Respiratory metabolism: Glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2004, 7(3): 254-261.
- [24] Zheng J B, Cao J W, Mao Y, et al. Comparative transcriptome analysis provides comprehensive insights into the heat stress response of *Marsupenaeus japonicus*[J]. Aquaculture, 2019, 502: 338-346.
- [25] Falcón J, Migaud H, Muñoz-Cueto J A, et al. Current knowledge on the melatonin system in teleost fish[J]. General and Comparative Endocrinology, 2010, 165(3): 469-482.
- [26] Lassiter C S, Kelley B, Linney E. Genomic structure and

- embryonic expression of estrogen receptor beta a (ERbetaa) in zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Gene*, 2002, 299(1-2): 141-151.
- [27] Pepe G J, Billiar R B, Leavitt M G, et al. Expression of estrogen receptors alpha and beta in the baboon fetal ovary[J]. *Biology of Reproduction*, 2002, 66(4): 1054-1060.
- [28] Fernandes D, Loi B, Porte C. Biosynthesis and metabolism of steroids in molluscs[J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 127(3-5): 189-195.
- [29] Thitiphuree T, Nagasawa K, Osada M. Molecular identification of steroidogenesis-related genes in scallops and their potential roles in gametogenesis[J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2019, 186: 22-33.
- [30] Wang C D, Croll R P. Effects of sex steroids on gonadal development and gender determination in the sea scallop, *Placopecten magellanicus*[J]. *Aquaculture*, 2004, 238(1-4): 483-498.
- [31] Matsumoto T, Osada M, Osawa Y, et al. Gonadal estrogen profile and immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes in the oyster and scallop during sexual maturation[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1997, 118(4): 811-817.
- [32] Xu R Y, Pan L Q, Yang Y Y, et al. Characterizing transcriptome in female scallop *Chlamys farreri* provides new insights into the molecular mechanisms of reproductive regulation during ovarian development and spawn[J]. *Gene*, 2020, 758: 144967.
- [33] Nagasawa K, Muroi K, Thitiphuree T, et al. Cloning of invertebrate gonadotropin-releasing hormone receptor (GnRHR)-like gene in Yesso scallop, *Patinopecten yessoensis*[J]. *Agri Gene*, 2017, 3: 46-56.
- [34] Zhang M W, Wei H L, Liu T, et al. Potential GnRH and steroidogenesis pathways in the scallop *Patinopecten yessoensis*[J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2020, 204: 105756.
- [35] Minakata H, Shigeno S, Kano N, et al. Octopus gonadotrophin-releasing hormone: A multifunctional peptide in the endocrine and nervous systems of the cephalopod[J]. *Journal of Neuroendocrinology*, 2009, 21(4): 322-326.
- [36] Rodet F, Lelong C, Dubos M P, et al. Molecular cloning of a molluscan gonadotropin-releasing hormone receptor orthologue specifically expressed in the gonad[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, 1730(3): 187-195.
- [37] Bliss S P, Navratil A M, Xie J J, et al. GnRH signaling, the gonadotrope and endocrine control of fertility[J]. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 2010, 31(3): 322-340.
- [38] Tang H P, Wang L, Chen Y, et al. Ovulation is associated with the LH-dependent induction of pla2g4a in zebrafish[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2018, 473: 53-60.
- [39] Santos E M, Rand-Weaver M, Tyler C R. Follicle-stimulating hormone and its alpha and beta subunits in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Purification, characterization, development of specific radioimmunoassays, and their seasonal plasma and pituitary concentrations in females[J]. *Biology of Reproduction*, 2001, 65(1): 288-294.
- [40] Breton B, Govoroun M, Mikolajczyk T. GTH I and GTH II secretion profiles during the reproductive cycle in female rainbow trout: Relationship with pituitary responsiveness to GnRH-a stimulation[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1998, 111(1): 38-50.
- [41] Chen W T, Ge W. Ontogenic expression profiles of gonadotropins (*FSH β* and *LH β*) and growth hormone (Gh) during sexual differentiation and puberty onset in female zebrafish [J]. *Biology of Reproduction*, 2012, 86(3): 73.
- [42] el-S O N. Testosterone, gonadotropins and androgen receptor during spermatogenesis of *Biomphalaria alexandrina* snails (Pulmonata: Basommatophora)[J]. *Reproductive Biology*, 2012, 12(3): 301-308.
- [43] Żukowska-Arendarczyk M. Effect of hypophyseal gonadotropins (FSH and LH) on the ovaries of the sand shrimp *Crangon crangon* (Crustacea: Decapoda)[J]. *Marine Biology*, 1981, 63(3): 241-247.
- [44] Puttabyatappa M, Jacot T A, Al-Alem L F, et al. Ovarian membrane-type matrix metalloproteinases: Induction of MMP14 and MMP16 during the periovulatory period in the rat, macaque, and human[J]. *Biology of Reproduction*, 2014, 91(2): 34.
- [45] Bakke L J, Dow M P D, Cassar C A, et al. Effect of the preovulatory gonadotropin surge on matrix metalloproteinase (MMP)-14, MMP-2, and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 expression within bovine periovulatory follicular and luteal tissue[J]. *Biology of Reproduction*, 2002, 66(6): 1627-1634.
- [46] Janer G, Porte C. Sex steroids and potential mechanisms of non-genomic endocrine disruption in invertebrates[J]. *Ecotoxicology*, 2007, 16(1): 145-160.
- [47] Xiang F S, Xu G F, Gu W, et al. Expression of cytochrome genes during the early gonadal development in triploid female rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(5): 949-957. [相福生, 徐革锋, 谷伟, 等. 三倍体雌性虹鳟性腺发育阶段细胞色素相关基因的表达[J]. *中国水产科学*, 2018, 25(5): 949-957.]
- [48] Mills L J, Gutjahr-Gobell R E, Zaroogian G E, et al.

- Modulation of aromatase activity as a mode of action for endocrine disrupting chemicals in a marine fish[J]. *Aquatic Toxicology*, 2014, 147: 140-150.
- [49] Böhne A, Heule C, Boileau N, et al. Expression and sequence evolution of aromatase cyp19a1 and other sexual development genes in East African cichlid fishes[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(10): 2268-2285.
- [50] Rashid H, Kitano H, Lee K H, et al. Fugu (*Takifugu rubripes*) sexual differentiation: CYP19 regulation and aromatase inhibitor induced testicular development[J]. *Sexual Development: Genetics, Molecular Biology, Evolution, Endocrinology, Embryology, and Pathology of Sex Determination and Differentiation*, 2007, 1(5): 311-322.
- [51] Moore R K, Scott A P, Collins P M. Circulating C-21 steroids in relation to reproductive condition of a viviparous marine teleost, *Sebastes rastrelliger* (grass rockfish)[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2000, 117(2): 268-280.
- [52] Kime D E. 'Classical' and 'non-classical' reproductive steroids in fish[J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 1993, 3(2): 160-180.
- [53] Kohli G, Clelland E, Peng C. Potential targets of transforming growth factor-beta1 during inhibition of oocyte maturation in zebrafish[J]. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 2005, 3: 53.
- [54] Lubzens E, Young G, Bobe J, et al. Oogenesis in teleosts: How eggs are formed[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 165(3): 367-389.
- [55] Mu X J. Sequence characteristics and expression analysis of FTZ-F1、CYP17A1 and CYP17A2 genes in *Chlamys farreri* [D]. Yantai: Yantai University, 2021: 2. [慕雪娇. 栉孔扇贝 FTZ-F1、CYP17A1、CYP17A2 基因的序列特征及表达分析[D]. 烟台: 烟台大学, 2021: 2.]
- [56] Thongbuakaew T, Suwansa-ard S, Chaiyamoorn A, et al. Sex steroids and steroidogenesis-related genes in the sea cucumber, *Holothuria scabra* and their potential role in gonad maturation[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 2194.
- [57] Shaw J P, Peters L D, Chipman J K. CYP1A- and CYP3A-immunopositive protein levels in digestive gland of the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Mediterranean Sea[J]. *Marine Environmental Research*, 2004, 58(2-5): 649-653.
- [58] Peters L D, Nasci C, Livingstone D R. Immunochemical investigations of cytochrome P450 forms/epitopes (CYP1A, 2B, 2E, 3A and 4A) in digestive gland of *Mytilus* sp. [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C, Pharmacology, Toxicology & Endocrinology*, 1998, 121(1-3): 361-369.

Transcriptome analysis and screening of related genes before and after spawning of *Mytilus galloprovincialis*

YAO Ronghui¹, YE Yingying², MA Yanwen², DONG Zhenyu¹, GUO Feng², WANG Weifeng¹, GUO Baoying¹

1. Marine Science and Technology College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China;

2. National Engineering Research Center for Marine Aquaculture, Zhoushan 316022, China

Abstract: The aim of this study was to identify functional genes associated with the oviposition of *Mytilus galloprovincialis* and to elucidate the underlying mechanisms of oviposition. Transcriptomic analysis of female *Mytilus galloprovincialis* gonads was conducted before and after spawning. Pairwise comparisons of sequencing libraries from tissue samples were also performed. Before and after spawning, there were 4060 differential genes, with 1488 up-regulated and 2572 down-regulated genes. The GO functional enrichment terms are grouped into three functional categories: biological process, cellular component, and molecular function. Some genes were annotated by GO terms such as growth, developmental process, reproduction, and reproductive process. KEGG enrichment analysis revealed signaling pathways associated with oviposition and reproduction, including the TCA cycle, GnRH signaling pathway, ovarian steroidogenesis, estrogen signaling pathway, oxytocin signaling pathway, and steroid biosynthesis. In conjunction with GO and KEGG enrichment results, we identified five potential genes associated with reproduction: gonadotropin-releasing hormone receptor (*GnRHR*), luteinizing hormone β (*LH β*), matrix metalloproteinase 14 (*MMP14*), cytochrome P4503A enzyme (*CYP3A*), and cytochrome P45017A enzyme (*CYP17A*). The expression levels of *LH β* and *MMP14* genes increased, whereas the expression levels of *GnRHR*, *CYP3A*, and *CYP17A* genes decreased. These findings were validated using real-time quantitative PCR (RT-qPCR). The differential expression of the five genes mentioned above is crucial in regulating the synthesis of sex hormones and reproductive process during the spawning of *Mytilus galloprovincialis*, which is consistent with the results of transcriptome sequencing. In this study, we utilized transcriptome sequencing technology to analyze the differences in the gonad transcriptome of female *Mytilus galloprovincialis* before and after spawning. The aim was to identify the key pathways and candidate genes involved in spawning, which could provide valuable data for the breeding of *Mytilus galloprovincialis*.

Key words: *Mytilus galloprovincialis*; transcriptome sequencing; spawning; gonad; differentially expressed genes

Corresponding author: GUO Baoying. E-mail: guobaoying@zjou.edu.cn