

DOI: 10.12264/JFSC2023-0295

长吻鲢雌雄性腺转录组比较分析

樊佳慧^{1,2}, 叶欢², 宋信华³, 岳华梅², 黄玲², 阮瑞², 郜卫华¹, 李创举²

1. 长江大学动物科学学院, 湖北 荆州 434024;

2. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 农业农村部淡水生物多样性保护重点实验室, 湖北 武汉 430223;

3. 湖北省长吻鲢良种场, 湖北 石首 434400

摘要: 长吻鲢(*Leiocassis longirostris*)是淡水特色经济鱼类, 其雄性生长速度快于雌性, 培育全雄苗种可显著提高养殖效益。为加快长吻鲢全雄苗种培育进程, 需深入了解长吻鲢性别分化及性腺发育的调控机制。本研究通过 Illumina 高通量测序平台对长吻鲢卵巢和精巢进行转录组测序分析。结果显示, 共有 10872 个雌雄差异表达基因, 其中上调基因 9375 个, 下调基因 1497 个。通过功能注释, 筛选出 71 个与性别相关的重要候选基因, 包括 50 个精巢高表达基因(*dmrt1*、*cyp17a1*、*samd7*、*wnt6*、*wt1* 等)和 21 个卵巢高表达基因(*foxl2*、*gdf9*、*zp3*、*zp1*、*figla*、*bmp15* 等)。KEGG 通路富集分析发现, 差异表达基因显著富集到 16 条与性别决定与分化及性腺发育相关的信号通路, 包括 Wnt 信号通路、TGF- β 信号通路、MAPK 信号通路、卵巢类固醇通路、GnRH 信号通路等。本研究筛选出与长吻鲢性别决定和分化相关差异表达基因, 揭示参与其雌雄个体性腺发育的信号通路, 为今后长吻鲢性别决定和分化机制的研究积累重要数据, 从而为其全雄苗种的培育提供理论支撑。

关键词: 长吻鲢; 转录组; 性腺发育; 差异表达基因

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)02-0129-15

鱼类性别异形包括个体大小异形、形态异形、颜色异形、生理和行为差异异形^[1]。性别大小二态性(sexual size dimorphism, SSD)表型明显, 已在多种鱼类发现这种现象^[2]。蓝鳃太阳鱼(*Lepomis macrochirus*)^[3]、黄颡鱼(*Tachysurus fulvidraco*)^[4]、罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)^[5]、河川沙塘鳢(*Odontobutis potamophilus*)^[6]等经济鱼类, 雄性个体生长速度明显快于雌性。与之相反, 鲤(*Cyprinus carpio*)^[7]、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)^[8]、金钱鱼(*Scatophagus argus*)^[9]、军曹鱼(*Rachycentron canadum*)^[10]等, 雌性生长速度显著快于雄性。在具有性别大小二态性的鱼类中, 控制鱼类种群性别比例乃至产生单性种群可以提高

水产养殖的产量和经济效益。

长吻鲢属鲢形目(Siluriformes), 鲢科(Bagridae), 广泛分布于长江、淮河、辽河、闽江、珠江等地^[11]。长吻鲢无鳞和肌间刺、肉质鲜美、营养丰富, 深受人们喜爱^[12]。《中国渔业统计年鉴》显示, 近年来长吻鲢养殖总重维持在 2 万 t 左右^[13]。长吻鲢生长存在明显的两性异形, 雄性比雌性生长快, 培育全雄苗种可以提高养殖总产量, 降低养殖成本, 提高养殖效益。近年, 通过 2b-RAD 测序和基因组重测序分别鉴定得到长吻鲢性别特异的 DNA 片段及潜在的连锁基因^[11,13]。然而, 目前有关长吻鲢性别分化、性腺发育及相关调控机制的研究较少, 阻碍了长吻鲢全雄苗种培育的进程。

收稿日期: 2023-11-14; 修订日期: 2023-12-11.

基金项目: 国家重点研发计划子课题(2022YFD400101); 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助(2022XT03 和 2023TD03); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助(YFI202206); 贵州省科技计划项目([2020]4Y027).

作者简介: 樊佳慧(1999–), 女, 硕士研究生, 研究方向为水生动物遗传育种与分子生物学. E-mail: fanjiahui1999@yeah.net

通信作者: 李创举, 研究员, 研究方向为鱼类分子遗传学. E-mail: lcj@yfi.ac.cn

转录组测序是发现功能基因和遗传标记强大、有效的方法之一,能够全面快速地获得特定组织或器官在某一状态下的几乎所有转录本序列信息。性腺是不可缺少的生殖器官,其发育通常受多种性别相关基因和途径的控制。通过雌雄性腺转录组分析,筛选出大量雌雄差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs),并从中探索出多种鱼类性别关键基因及相关信号通路,为鱼类生殖发育及相关机制的阐明奠定基础。Tao 等^[14]利用转录组测序分析罗非鱼不同时期性腺基因表达水平,初步将基因表达及性别分化与性腺发育联系起来,形成一个发育时期及基因表达的动态网络。根据性腺发育后期基因表达量筛选多个参与性腺分化和配子发生的 DEGs,进行加权基因相关网络分析(WGCNA)。挖掘出与已知性别分化基因(*foxl2*、*cyp19a1*、*gsdf*、*dmrt1*、*amh*)表达相关的多个基因,包括 *borealin*、*gtsfl*、*teskl*、*zar1*、*cdn15*、*rpl*。对胡子鲶(*Clarias fuscus*)^[15]性腺转录组进行比较分析,挖掘 5750 个精巢高表达 DEGs 和 6991 个卵巢高表达 DEGs,这些 DEGs 富集在卵母细胞成熟、雄激素分泌、性腺发育和类固醇生物合成等性别相关途径。Guan 等^[16]通过比较大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)体组织、卵巢组织、精巢组织三者 DEGs,鉴定出 22 个性别关键基因,其中精巢特异性基因 *dmrt1* 与精巢高表达量 DEGs (*cyp11b1*、*spata4*)和卵巢高表达量 DEGs (*foxl2*、*gdf9*、*zp3*、*sox3*、*cyp19a* 和 *bmp15*)建立互作关系,与斑马鱼相同基因互作关系对比,表明 *dmrt1* 基因在性别发育存在保守性和物种差异性。

本研究通过高通量测序分析长吻鮠卵巢和精巢的转录组表达特征,筛选与其性别决定和分化相关差异表达基因,揭示参与长吻鮠雌雄个体性腺发育的信号通路,为今后其性别决定和分化机制的研究积累重要数据,从而为长吻鮠全雄苗种的培育提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料取样

本实验所用实验鱼均来自湖北长吻鮠良种场

(湖北,石首)。实验鱼采用 MS-222 (Sigma-aldrich, 美国)麻醉,取精巢和卵巢组织分别置于 Bouin's 固定液(Phygene, 中国)和 RNAlater (VivaCell, 中国)保存,用于后续性腺组织学特征分析、总 RNA 提取及测序。4 尾雄鱼平均全长为(13.23±0.93) cm,平均体重为(20.19±3.69) g,4 尾雌鱼平均全长为(12.1±0.22) cm,平均体重为(13.33±0.51) g。采样过程遵守了中国水产科学研究院长江水产研究所实验动物福利和相关制度。

1.2 石蜡切片

将性腺组织保存于 Bouin's 溶液,按性腺大小固定 2~6 h,转移至 70%乙醇长期保存。石蜡切片样品需经过 Bouin's 固定、乙醇梯度脱水、二甲苯透化、石蜡浸蜡、包埋等步骤处理。对石蜡样品连续切片,切片厚度为 4.5 μm,苏木精-伊红(HE)染色(Biosharp, 中国),中性树脂(Biosharp, 中国)封片,正置显微镜(Leica, 德国)下观察性腺形态结构并拍照。

1.3 总 RNA 提取和检测

按照 RNeasy Plus Mini Kit 试剂盒说明书(Qiagen, 德国)提取长吻鮠精巢和卵巢组织总 RNA,采用 Nano Drop™ Lite 超微量分光光度计(Thermo, 美国)检验样品浓度和纯度,利用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,选取 A260/A280 比值于 1.8~2.0,琼脂糖凝胶电泳条带 28S : 18S rRNA 比值接近 2 : 1 的 RNA 样品,置于-80 °C 保存备用。

1.4 转录组文库构建以及测序

确保 RNA 质量合格后,使用 Oligo (dT)珠粒富集真核 mRNA,然后用片段缓冲液将富集的 mRNA 片段化为大小约 200 bp 短片段,并使用 NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs, 美国)反向转录成 cDNA。使用 AMPure XP Beads (1.8X)磁珠纯化双链 cDNA,末端修复、添加 poly(A)、拼接测序接头,并连接到 Illumina 测序适配器上。通过琼脂糖凝胶电泳选择连接产物的大小,PCR 扩增,并由广州基迪奥生物科技有限公司使用 Illumina Novaseq6000 测序。

1.5 转录组的组装和注释

为了确保后续信息分析的数据质量,对从测

序机获得的含有适配器或低质量碱基的原始 reads 进一步过滤, 获得高质量 clean reads。首先使用 fastp (版本 0.18.0)对 reads 进行筛选, 移除包含接头(adapters)的 reads、含 N 比例超过 10%的 reads、含有 50%以上低质量(Q 值 ≤ 20) reads、全部都是 A 碱基的 reads 以及被污染的 reads。然后用 Bowtie2 (version 2.2.8)将得到 reads 与 Ribosome RNA (rRNA) 数据库进行比对去除映射读取, 最后利用 HISAT2^[17]技术将配对的末端 clean reads 与参考长吻鮠基因建立参考基因组索引, 进行后续注释。

1.6 基因表达水平和差异富集分析

利用 StringTie v1.3.1 软件和 RSEM 软件组装每个样本的映射读数并计算 FPKM (fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments), 量化基因表达丰度。利用表达量信息开展样, 品间主成分分析(principal component analysis, PCA)和相关性分析(Pearson correlation analysis), 使用 DEseq2^[18]软件进行标准化及差异表达基因检测, 设置差异倍数 $|\log_2 \text{ fold change}| \geq 1$ 且 FDR (false discovery rate) ≤ 0.05 为差异基因筛选阈

值, 筛选出雌雄性腺组间差异表达基因(卵巢组: O1、O2、O3、O4; 精巢组: T1、T2、T3、T4), 并对差异表达基因进行 GO 功能注释和 KEGG 通路富集。

1.7 性别关键差异表达基因的蛋白质互作网络 (PPI)分析

利用 STRING 数据库和 Cytoscape 软件进行性别关键差异表达基因的蛋白质互作网络分析 (protein-protein interaction networks, PPI)^[19]。将目标基因集中的序列应用 blastx 比对到 STRING 数据库(www.string-db.org)包含的参考物种蛋白质序列, 并利用比对上的该参考物种的蛋白质互作关系构建互作网络。PPI 网络图中的点为基因, 线表示蛋白(基因)和蛋白(基因)之间存在相互作用关系。

1.8 实时荧光定量 PCR

利用 Primer Premier 5 软件(Premier, 加拿大)设计性腺发育相关差异表达基因特异引物(表 1), 由武汉天一华煜基因科技有限公司合成。8 个测序性腺各取 1 μg RNA 作为模板, 参照 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Takara, 日本)试

表 1 实时荧光定量 PCR 所用引物序列
Tab. 1 Primers of the genes used for real-time RT-PCR

序号 serial number	引物名称 primer name	正向引物序列(5'–3') forward primer sequences (5'–3')	反向引物序列(5'–3') reverse primer sequences (5'–3')	扩增效率/% amplification efficiency
1	<i>cdc20</i>	AGGAGGAACCAGCGACAGAC	CCACTTTAGCGAGTGAGGGATAT	106.44
2	<i>figla</i>	TGAAGGCGGCGACCGAATACA	GAGGCGAAACTGATAAAGATGGACT	99.07
3	<i>foxl2</i>	GCCGACGAGCAGGACAA	CGCGGATGCACACAGGAA	98.81
4	<i>slbp2</i>	CAAGGCTCCGATGGCGTTCT	AAACCCAGGGATGCGAAAA	96.94
5	<i>spata6</i>	AAACAAGAACACGACGAAAAGC	GCAAAAGAGGGAAGGCAGAGGA	93.32
6	<i>zar</i>	CTGCGTAAAGCCAACACCAA	CAAACACCGGGGAGTAAATCG	99.95
7	<i>zp1</i>	TGATTAGGGCATCTGCTGGTTA	TGCACTTCCAGGTACAATGGTTT	90.07
8	<i>zp3</i>	ATGGGTGTGAACCAAGTAGGGC	TGGGCAGGAACAGGATCAGAAT	104.97
9	<i>cyp11a1</i>	CTTGACCGACTGTCCATTGAGG	GTGCCGTGCCAGTTCATAGAGG	95.04
10	<i>cyp17a1</i>	AACCAGAGCGTTTCTGAATGA	GGCACCTCCAGAGTGAACCTTT	103.46
11	<i>dmrt1</i>	ATGAGCGACGACGAGCAAAGCA	TGACAATCCCGCCAGTTACAGA	106.44
12	<i>gata4</i>	AGAGTGTGTGAAGTGTGGGGC	CAGAGTGGTGGTTGTGGTGTG	104.91
13	<i>meioc</i>	CCCAAAGTCCAGAAGGAGAAC	CCATTACAGGTGGAAAAAAGCC	103.11
14	<i>nanos1</i>	GGAACGACTATCTGGGCCTG	AGATCTTGGGCTCCTGCTTG	92.24
15	<i>pnpla7</i>	GTGGTGACCTGTCCTAATGCCT	CGTATCGCCAGTGTGAGCCGTCTCA	95.06
16	<i>shoc2</i>	GCAAAATGTCGTGATGAGAATG	GCTGTAAAGGTAGAGCTCGGTG	101.12
17	<i>smad7</i>	TACAACCGCAGCCGATACCC	GCACTGACCCAGCCCTTAA	104.93
18	<i>tesk2</i>	ATGGAGAGGAGCAAGCGAAAC	GCAGGAGAAGGCACTGATGAG	103.17
19	<i>wnt6</i>	GGAGTGGGGTGGTTGTGGAGAT	GGTCGATGAGAGTGCGGATGTC	108.35
20	<i>ddx4</i>	AGGACGGGATGAGGAGGTGTTT	GATTGCTCTGGGTGGATTGGTT	101.37
21	<i>piwil1</i>	ACGCTGACATCGCTCACTCCCTG	ACCATTTGAACCTGTTGCCCCAC	100.51
22	<i>β-actin</i>	GCTACAGCTTCACTACCACA	GCCAATGGTGATGACCTGTC	98.51

剂盒说明书逆转录为 cDNA。 β -actin 作为内参基因,采用 RT-qPCR 对 21 个性别相关基因进行验证。RT-qPCR 根据 PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix 试剂盒(Applied Biosystems, 美国)说明书操作步骤,在 ABI QuantStudio6 FLEX Q6 实时荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems, 美国)上进行 RT-qPCR 反应。荧光定量反应程序为:预变性 50 ℃ 2 min, 95 ℃ 10 min; 三步法扩增 40 个循环, 95 ℃ 15 s, 58 ℃ 反应 15 s, 熔解曲线: 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 60 s, 95 ℃ 15 s。样品设立 3 个技术重复。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析基因相对表达水平^[20]。实验数据采用 SPSS 21.0 (IBM, 美国)统计分析,数据以平均值±标准差($\bar{x}\pm SD$)表示,采用 t 检验

方法,差异显著性水平为 $P<0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 长吻鲢性腺的组织学特征

通过石蜡切片分析长吻鲢性腺的组织学特征,明确样品性腺发育时期。组织学研究发现,全长为 12 cm 左右长吻鲢已完成性别分化,精巢组、卵巢组性腺样品发育时期一致。卵巢样品(O1、O2、O3、O4)发育至 II 期,该时期为单层滤泡期,生殖细胞主要为初级卵母细胞,处于小生长期,呈现不规则圆形(图 1a);精巢样品(T1、T2、T3、T4)只含有大量的精原细胞,未出现初级精母细胞等其他精巢生殖细胞(图 1b)。

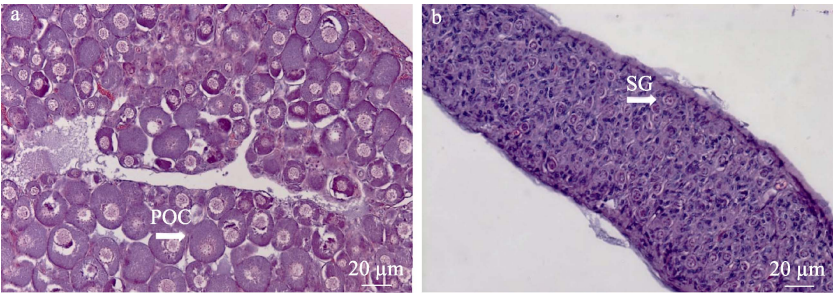


图 1 长吻鲢性腺组织学特征
a. 卵巢; b. 精巢; POC. 初级卵母细胞; SG. 精原细胞. 标尺: 20 μ m.
Fig. 1 Histological characterization of *Leiocassis longirostris* gonads
a. ovary; b. testis; POC. primary oocyte; SG. spermatogonia. Scale bars are 20 μ m.

2.2 转录组 reads 测序结果及质量检测

高通量测序共获得 358048456 个 raw data, 其中 clean reads 序列数目为 356168472, clean reads 比率达 99.47%。测序结果显示, 过滤后 Q20 碱基比例均超过 97%, Q30 碱基比例超过 93%, GC 含量占比 47.1%~49.01%, 数据完整性较高, 质检合格可进行后续分析(表 2)。将 8 个样本的 clean reads 分别比对到参考基因组序列, 卵巢和精巢样品的平均有效测序数据 reads 总条数分别为 39647876 和 49256062, 样品总对比率分别为 96.45%和 92.01%。同组样品间对比率较稳定, 组间对比率相差不超过 0.45%和 0.72%。采取层级比对策略, 进一步将不同长度的 reads 和 spliced reads 比对到参考基因组, 样品基因组 reads 中, 平均有 76.32%定位到外显子区域, 共检测出

24661 个基因, 其中有 92.18%与参考基因组对应, 基因注释和参考基因组较完善(表 3)。

表 2 转录组测序数据信息
Tab. 2 Information of transcriptomic reads

组别 sample	原始数据 raw reads	有效数据 clean reads	Q20 碱基 比例/% Q20 content	Q30 碱基 比例/% Q30 content	GC 碱基 比例/% GC content
O1	45385634	45170914	97.92	94.18	48.89
O2	38620176	38452316	98.06	94.50	48.87
O3	37845418	37678122	97.89	94.14	48.86
O4	37512854	37380302	97.93	94.22	49.01
T1	52741090	52410466	97.47	93.35	46.60
T2	42457772	42221356	97.50	93.41	47.43
T3	54467574	54132404	97.53	93.46	47.42
T4	49017938	48722592	97.57	93.55	47.10

注: 卵巢组包括 O1、O2、O3、O4; 精巢组包括 T1、T2、T3、T4。
Note: The ovary group includes O1, O2, O3 and O4. The testis group includes T1, T2, T3 and T4.

表 3 有效测序数据与参考基因组对比表

Tab. 3 Comparison of valid sequencing data with reference genome

项目 item	O1	O2	O3	O4	T1	T2	T3	T4
有效数据 total reads	45153660	38429376	37644612	37363856	52374912	42114862	53965654	48568818
定位到基因组有效数据 total mapped reads	43477283 (96.29%)	37145106 (96.66%)	36219211 (96.21%)	36110014 (96.64%)	48270295 (92.16%)	38818953 (92.17%)	49582787 (91.88%)	44603145 (91.83%)
定位到基因组外显子比例 percent of reads mapped to exon of genome	87.32%	87.46%	86.49%	87.67%	62.12%	66.59%	66.85%	87.32%

注: 卵巢组包括 O1、O2、O3、O4; 精巢组包括 T1、T2、T3、T4。
Note: The ovary group includes O1, O2, O3 and O4. The testis group includes T1, T2, T3 and T4.

2.3 长吻鮠性腺样品组间分析

主成分分析和相关性分析结果显示, 长吻鮠卵巢和精巢组内样品组成相似且相关性高, 而组间样品组成相似度低且相关性系数极低。说明长吻鮠性

腺雌雄分组, 组间基因表达存在较大差异, 组内差异则较小。同时, 根据基因表达量信息对所有样品进行层次聚类分析, 结果显示卵巢和精巢样品各聚为一支, 与主成分分析及相关性分析结果一致(图 2)。

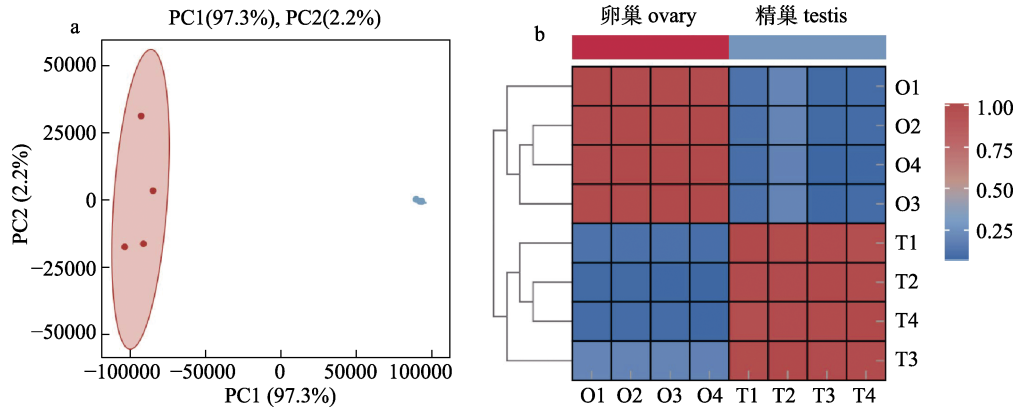


图 2 长吻鮠性腺样品主成分和相关性分析

a. 主成分分析; b. 相关性分析。

卵巢组包括 O1、O2、O3、O4; 精巢组包括 T1、T2、T3、T4

Fig. 2 Principal component analysis and correlation analysis between gonads samples of *Leiocassis longirostris*
a. Principal component analysis; b. Correlation analysis.
The ovary group includes O1, O2, O3 and O4. The testis group includes T1, T2, T3 and T4.

2.4 差异表达基因分析

长吻鮠性腺转录组测序共注释 24461 个基因, 17243 个基因丰度大于 1。其中 10701 个基因在卵巢表达, 16858 个基因在精巢表达, 10316 个基因在卵巢和精巢共表达。设置差异阈值: $|\log_2 \text{fold change}| \geq 1$ 且 $\text{FDR} \leq 0.05$, 对全部基因进行筛选。长吻鮠性腺差异表达基因统计结果显示(图 3), 精巢和卵巢差异表达基因共有 10872 个, 与卵巢相比, 精巢上调基因有 9375 个(86%), 下调基因有 1497 个(14%)。

2.5 GO 和 KEGG 富集分析

将差异表达基因在 Nr、GO、KEGG 数据库比对分析。GO 分析将 10872 个 DEGs 富集到分子功能(molecular function, MF)、细胞组分(cellular component, CC)和生物过程(biological process, BP)的 58 个二级条目上(图 4)。在生物过程大类的 25 个二级条目中, 富集差异表达基因最多的条目依次为生物学过程(cellular process)、单组织过程(single-organism process)、代谢过程(metabolic process)等; 分子功能的 12 个二级条目中, 富集

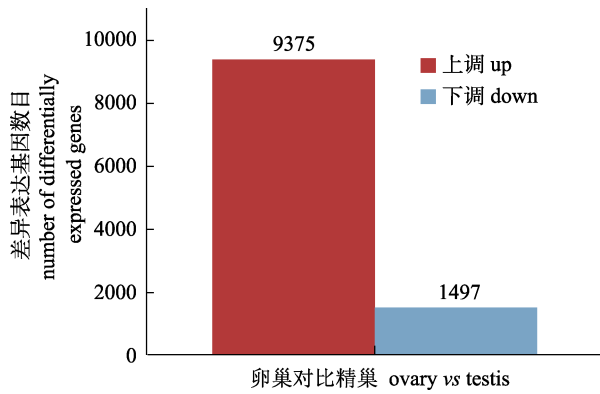


图 3 长吻鲩性腺差异表达基因分析

Fig. 3 Differential expressed gene analysis of *Leiocassis longirostris* gonadas

差异表达基因最多的条目依次为结合(binding)、催化活性(catalytic activity)、分子转导活性(molecular transducer activity)等;细胞组分的 21 个二级条目中,富集差异表达基因最多的条目依次为细胞(cell)、细胞组分(cell part)、细胞器(organelle)等。利用 KEGG 数据库进行 KO 富集分析,DEGs 富集到 5 大类共 338 条 KEGG 通路(图 5)。从中筛选出 16 个雌雄性腺间存在显著差异($P<0.05$)的性别相关通路,共 1400 个 DEGs 注释到这些通路。富集到显著差异表达基因最多的通路是 MAPK 信号通路(MAPK signaling pathway)

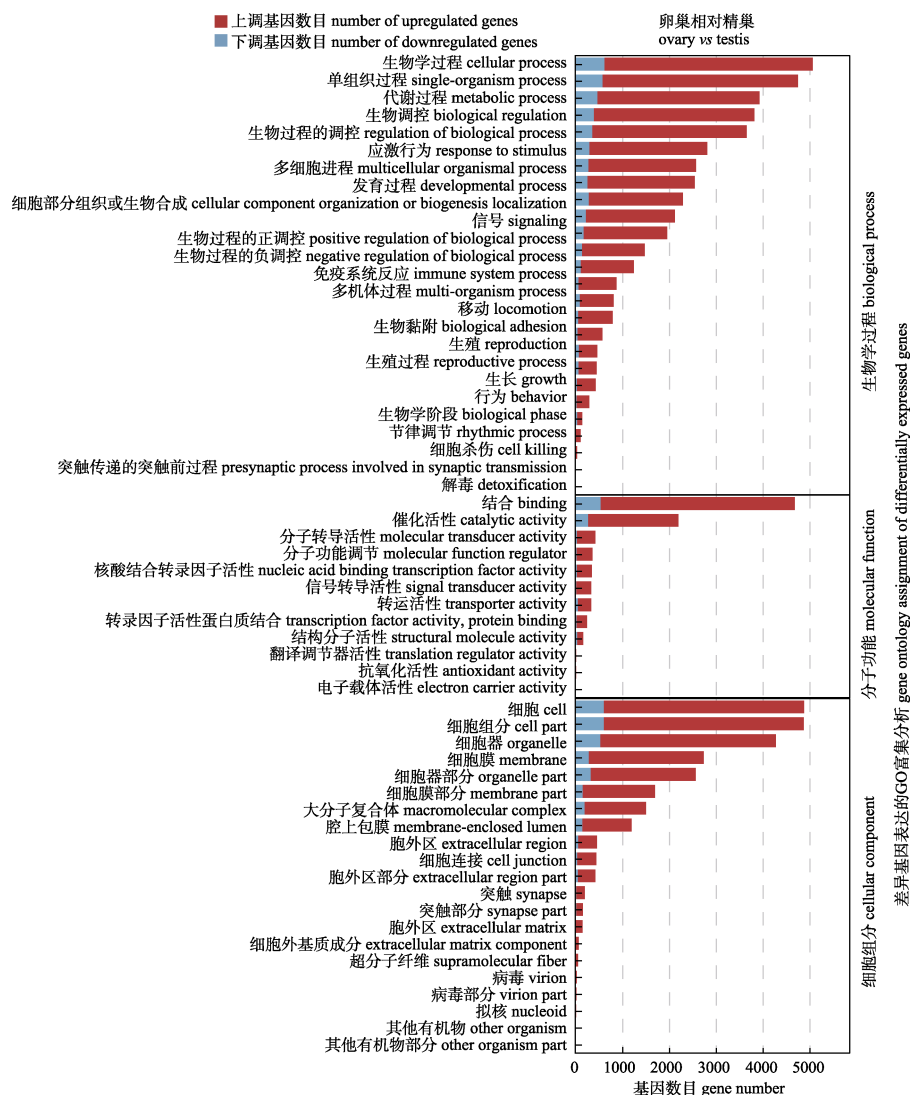


图 4 长吻鲩性腺差异表达基因 GO 富集分析

横轴为基因数目,纵轴为条目名称。

Fig. 4 Gene ontology enrichment of differentially expressed genes in the gonads of *Leiocassis longirostris*. The horizontal axis indicates numbers of genes, and the vertical axis indicates gene names in each term.

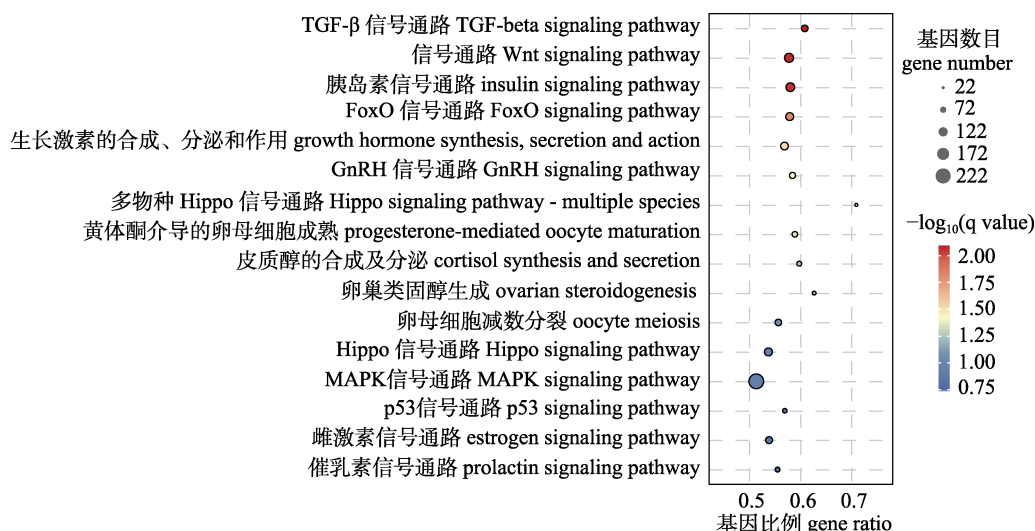


图 5 长吻鮠性腺发育调控相关的 KEGG 通路

横轴为基因比例, 纵轴为条目名称。

Fig. 5 KEGG pathways relevant to sex regulation enriched in gonads of *Leiocassis longirostris*. The horizontal axis indicates ratio of genes, and the vertical axis indicates gene names in each term.

(432 个基因位于该通路, 其中有 222 个基因在雌雄性腺的表达水平存在显著差异); 富集比例最高的通路是 Hippo 信号通路(Hippo signaling pathway-multiple species), 其中 71%基因表达量存在性别二态性。

2.6 性别关键 DEGs 筛选及分析

通过 GO、KEGG 富集分析及相关研究, 筛选出 71 个性别关键 DEGs, 其中包括经典的性别调控基因家族, 如 DMRT 基因家族(*dmrt1*、*dmrt1a*、*dmrt2*、*dmrt3a*)、SOX 基因家族(*sox4*、*sox5*、*sox6*、*sox8*、*sox9*、*sox9-b*、*sox18*)、卵透明带蛋白家族(*zp1*、*zp2*、*zp3*、*zp4*)、TGF- β 超家族(*gdf9*、*gdf10*、*inhbb*、*inha*、*bmp15*)、细胞色素 P450 基因家族(*cyp11a1*、*cyp11b1*、*cyp11a1*、*cyp17a1*、*cyp26a1*)、17 β -雌二醇脱氢酶家族(*hsd3b*、*hsd3b7*、*hsd17b4*、*hsd17b7*、*hsd17b10*)。此外, 还包括与生殖及调控相关的基因: 性激素受体(*pgr*、*esr1*、*esr2*、*fshr*、*lhcg*、*pgrmc1*、*prl*)、激素调节因子(*figla*、*fem1b*、*piwil1*、*sarg*、*wtl*、*fgf7*、*igfbp5*、*igfbp3*)、Rspo1/Wnt/ β 连环蛋白信号通路(*wnt6*、*rspo1*、*rspo3*)、DEAD-box 家族(*vasa*、*p68*)、精子形成及发育相关基因(*spata2*、*spata14*、*spata17*、*spata21*、*spaca9*、*shoc2*)、TKL 家族(*tesk1*、*tesk2*)、转录因子(*gata4*、

foxl2、*foxn5*)等。对筛选性别关键 DEGs 进行基因表达分析, 有 50 个精巢高表达基因和 21 个卵巢高表达基因(图 6)。

2.7 性别关键 DEGs 蛋白质-蛋白质互作(PPI)网络分析

利用 STRING 数据库和 Cytoscape 软件对 71 个性别相关 DEGs 进行蛋白互作网络分析, 构建出一个包含 67 个节点、478 个蛋白作用关系对的互作关系网络图(图 7)。对 STRING 数据库中蛋白(基因)-蛋白(基因)相互作用可靠性总得分(combined score)排序, 并选择前 200 对互作关系进行下一步分析(combined score>340)。前两百对相互作用涉及 56 个基因节点, 包括 *Dmrt1*、*Foxl2*、*Cyp17a1*、*Sox9*、*Zp3*、*Smad6*、*Cdc20*、*Figla*、*Bmp15* 等。值得注意的是, *Foxl2*、*Cyp17a1* 和 *Sox9*、*Esr1* 与 18 个以上性别关键 DEGs 对应蛋白之间存在相互作用, 产生的互作关系居首位。*Dmrt1* 蛋白与卵巢高表达 DEGs 蛋白(*Foxl2*、*Figla*、*Bmp1* 等)以及精巢高表达 DEGs 蛋白(*Sox9*、*Wt1*、*Cyp17a1*、*Rspo1*、*Gata4*、*Hsd3b* 等)均存在相互作用, 与 *Foxl2* 相互作用关系可靠性总得分高达 909, 说明 *Foxl2* 与 *Dmrt1* 存在强互作关系。另外, 存在 *Zp1* 与 *Zp3*、*Cyp17a1* 与 *Hsd3b*、*Sox9*

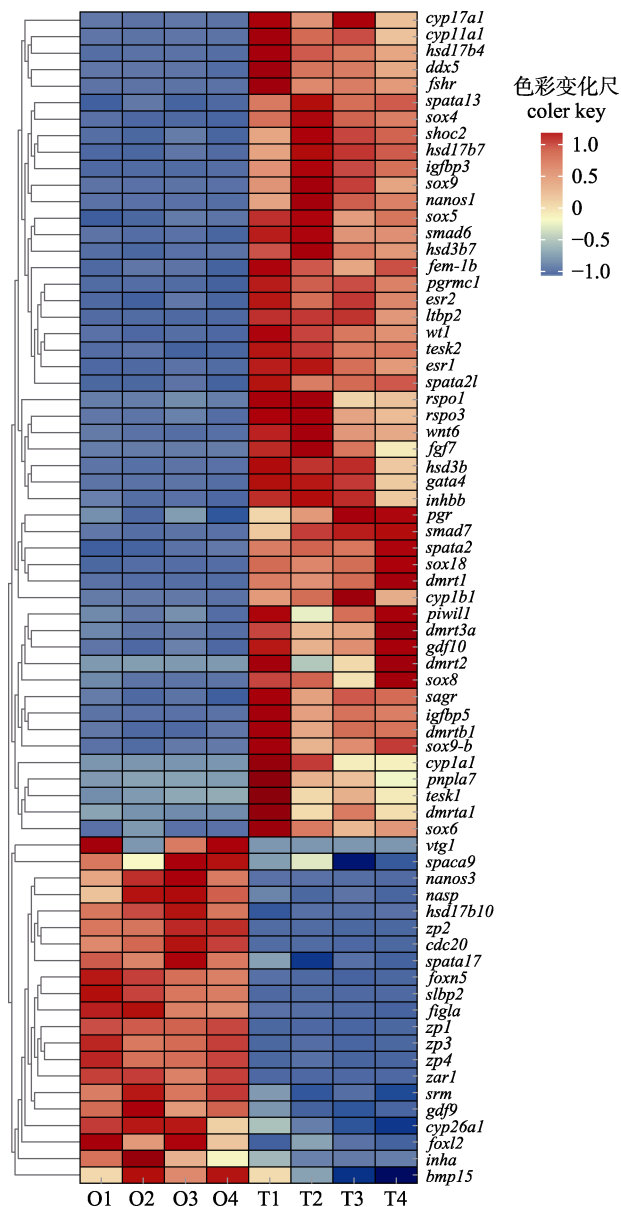


图 6 长吻鲢性腺中性别相关 DEGs 的聚类分析热图

图中每一行对应一个基因；红色到蓝色表示由高到低的表达水平。卵巢组包括 O1、O2、O3、O4；

精巢组包括 T1、T2、T3、T4。

Fig. 6 Cluster analysis heat map of sex-related DEGs in the gonads of *Leiocassis longirostris*

Each row in the graph represents a gene, and different colors represent different gene expression levels; the color from red to blue indicates high to low expression levels, respectively.

The ovary group includes O1, O2, O3 and O4.

The testis group includes T1, T2, T3 and T4.

与 Wt1、Sox9 与 Foxl2、Foxl2 与 Rspo1、Cyp11b1 与 Hsd17b7、Cyp11a1 与 Hsd3b 等 40 个强相互关系(combined score>900), 为后续研究长吻鲢性别相关基因及作用机制提供思路。

2.8 RT-qPCR 验证结果

本研究从上述差异表达基因中, 选取了 19 个性别差异表达基因和 2 个无显著差异性别有关基因进行 RT-qPCR 验证, 分别是 *zp1* (zona pellucida sperm-binding protein 4-like)、*zp3* (zona pellucida sperm-binding protein 3-like)、*zar1* (zygote arrest protein 1-like isoform X1)、*slbp2* (oocyte-specific histone RNA stem-loop-binding protein 2-like)、*cdc20* (cell division cycle 20)、*spata6* (spermatogenesis-associated protein 6)、*figla* (factor in the germline alpha)、*foxl2* (homo sapiens forkhead box L2)、*nanos1* (nanos homolog 1-like)、*dmrt1* (doublesex and mab-3 related transcription factor 1)、*cyp11a1* (cytochrome P450 family 11 subfamily A member 1)、*cyp17a1* (cytochrome P450 family 17 subfamily A member 1)、*gata4* (transcription factor GATA-4)、*shoc2* (leucine-rich repeat protein SHOC-2)、*tesk2* (dual specificity testis-specific protein kinase 2)、*smad7* (mothers against decapentaplegic homolog 7)、*wnt6* (wingless-type MMTV integration site family, member 6)、*piwil1* (piwi-like protein 1 isoform X1)、*pnpla7* (patatin-like phospholipase domain-containing protein 7)、*meioc* (meiosis-specific coiled-coil domain-containing protein MEIOC isoform X1) 和 *ddx4* (probable ATP-dependent RNA helicase DDX4 isoform X1)。经验证, 选取基因的 RT-qPCR 结果与转录组分析结果一致, 转录组测序结果可靠(图 8)。

3 讨论

3.1 长吻鲢雌雄性腺生殖相关 DEGs

在长吻鲢雌雄性腺 DEGs 中进一步筛选出 *dmrt1*、*foxl2*、*sox9*、*zp1*、*figla* 等 71 个性别关键基因, 作为长吻鲢性别决定候选研究基因, 以此为中心展开进一步分析。性别决定基因(sex determining gene, SD)是控制性别分化的重要调控因子, 是广泛关注的焦点。脊椎动物中, 性别决定基因呈现出多样性, 不同物种甚至同一物种不同群体可能呈现不同的性别决定基因。迄今, 多个生物类群的研究发现多种性别决定基因, 包括哺

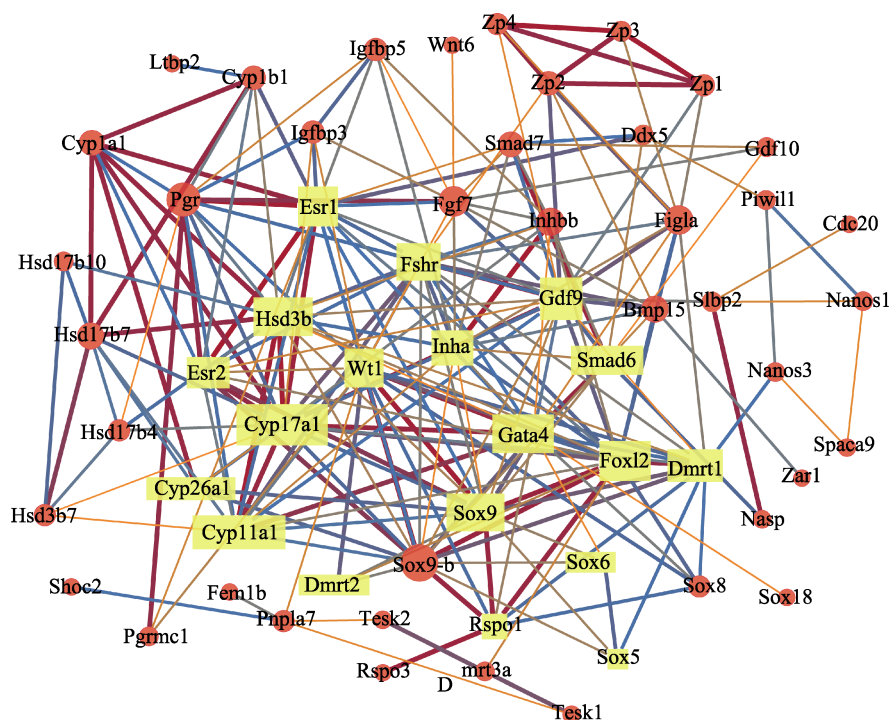


图 7 长吻鲈性别相关 DEGs 推断蛋白的 PPI 网络

黄色方块和红色圆形代表互作网络节点;黄色方块代表与 Dmrt1 互作蛋白;红色圆形代表不与 Dmrt1 互作蛋白;线条代表蛋白-蛋白间互作关系;红色到蓝色表示互作水平由高到低。

Fig. 7 PPI networks of the deduced proteins of sex-related DEGs in *Leiocassis longirostris*

Yellow squares and red circles represent interacting network nodes; yellow squares represent proteins that interact with Dmrt1; red circles represent proteins that not interact with Dmrt1; lines represent protein-protein interaction; the color from red to blue indicates high to low level of interactions.

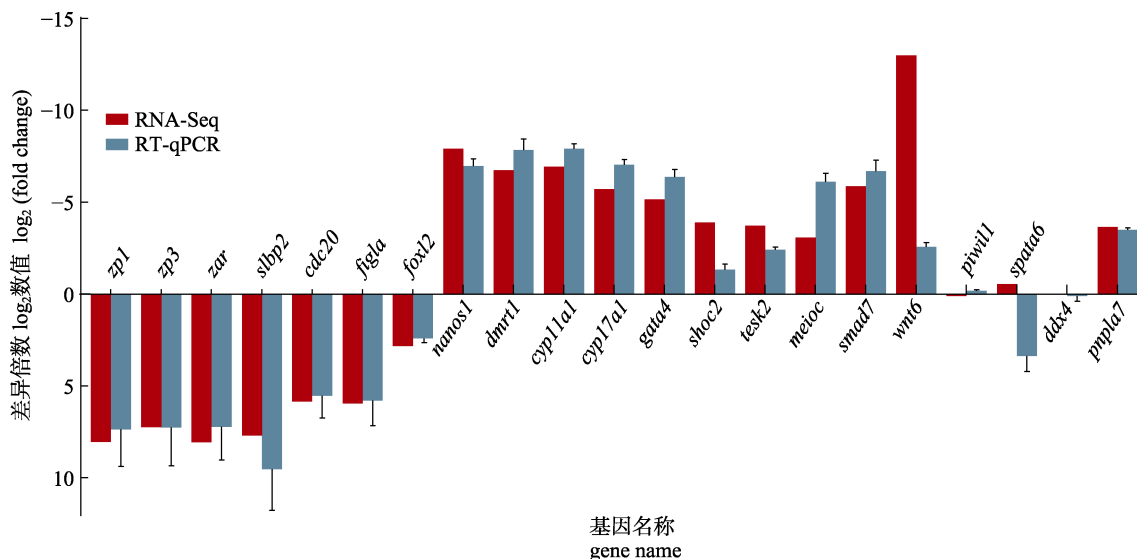


图 8 长吻鮠差异表达基因的 RT-qPCR 验证

Fig. 8 Validation of differentially expressed genes in *Leiocassis longirostris* by RT-qPCR

乳动物的 *sry*^[21]、鸟类和爬行动物的 *dmrt1*、两栖动物的 *dmw*^[22]、以及鱼类的 *dmy/dmrt1by*^[23]、

amhy^[24-25]、*amhr2*^[26]、*gsdfy*^[27]、*sox3*^[28]、*sdv*^[29]、*gdf6v*^[30]、*bmpr1ba*^[31]、*bmpr1bbv*^[32]和*hsd17b1*^[33]。

目前为止,发现的鱼类性别决定基因主要归为 3 类: 转录因子、TGF- β 家族相关基因和类固醇激素合成相关基因,为其他鱼类性别决定基因的研究提供了线索。

dmrt1 转录因子最早在无脊椎动物中被发现,已证实其在鱼类性别决定及分化过程发挥重要作用^[34]。通过 TALEN 敲除尼罗罗非鱼 *foxl2* 和 *dmrt1* 基因^[35],发现 *dmrt1* 缺失个体雄性精巢退化,精原细胞退化,甚至生殖细胞完全缺失。Webster 等^[36]研究发现斑马鱼(*Danio rerio*) *dmrt1* 突变体发育为可育雌性及不育雄性个体,缺失 *dmrt1* 基因对雌雄个体产生不同影响: 雌性发育正常; 雄性个体性腺分化异常,无法正常分化出精巢结构及产生精子。以上结果暗示 *dmrt1* 在斑马鱼幼鱼卵巢向精巢转化过渡时期以及雄性生殖细胞发育过程起重要作用。类似的结果还在其他研究中被发现,半滑舌鳎^[37]和青鳉(*Oryzias latipes*)^[38]的 *dmrt1* 突变体同样出现精巢发育受阻现象。除此,迄今已对多种鱼类性腺 *dmrt1* 基因表达量进行研究,大多鱼类性腺中 *dmrt1* 基因在精巢高表达或特异表达,如牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[39]、湖栖鳍虾虎鱼(*Gobiopterus lacustris*)^[40]和红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)^[41]精巢组织 *dmrt1* 表达量显著高于卵巢组织,表明 *dmrt1* 基因在精巢发育过程中必不可少。本研究长吻鲢性腺转录组测序共注释到 6 个 DM 结构域基因,均在精巢高表达,其中 *dmrt1*、*dmrt2*、*dmrt3a*、*dmrt1* 和 *dmrtb1* 在精巢和卵巢的表达量存在显著差异($P < 0.05$)。蛋白互作 PPI 网络分析显示, *dmrt1* 与精巢高表达 DEGs (*sox9*、*wtl*、*cyp17a1*、*rspo1*、*gata4*、*hsd3b*)和卵巢高表达 DEGs (*foxl2*、*figla*、*bmp15*)存在直接相互作用,表明 *dmrt1* 在精巢发育过程中可能通过诱导精巢相关基因高表达,同时抑制卵巢相关基因表达而发挥作用。

叉头框 L2 (*foxl2*)转录因子被认为鱼类卵巢分化的标志基因,通过抑制精巢特异基因表达促进卵巢分化与发育^[42-43]。本研究中, *foxl2* 主要在长吻鲢卵巢高表达,意味其与长吻鲢雌性性腺分化及发育相关。同时, *foxl2* 是芳香化酶 *cyp19a1a* 的上游调控基因。之前的研究表明, *foxl2* 不仅可以

直接结合 *cyp19a1a* 的启动子区,而且可以与 *ad4bp/sf-1* 形成异二聚体^[44],通过激活转录、调节雌激素合成发挥功能。*cyp19a1a* 基因在脊椎动物中表达高度保守,通常高表达于卵巢组织,可编码性腺芳香化酶,将雄激素转化为雌激素。长吻鲢 *cyp19a1a* 在卵巢表达量显著高于精巢,与金钱鱼^[45]、叉尾斗鱼(*Macropodus opercularis*)^[46]、红鳍东方鲀^[47]中的研究结果相一致,表明 *cyp19a1a* 在卵巢中发挥重要作用,是卵巢分化及发育的关键因素。除了 *cyp19a1a*, CYP 家族还有多个基因在性别分化及性腺发育上发挥重要作用。*cyp17a1* 参与睾酮和 17 α -羟孕酮合成,为雌二醇(E2)和 17 α 、20 β -双羟孕酮(17 α 、20 β -DHP)合成提供前体物质;参与孕激素合成,在精子成熟中起重要作用。斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)^[48]不同发育时期 *cyp17a1* 基因表达水平存在明显差异,卵巢发育后期 *cyp17a1* 基因表达量达到峰值。*cyp11a1* 参与胆固醇转化为孕烯醇酮过程,是唯一将胆固醇转化为孕烯醇酮的酶,是进入类固醇生成全过程的唯一途径^[49]。Zhu 等^[50]使用 17 α -甲基睾酮诱导雌性(XX)未分化鳊(*Siniperca chuatsi*)雄性化,诱导过程中 *cyp11a1* 和 *cyp11b* 基因在精巢表达上调, *cyp19a1* 等雌性发育相关基因表达量下调。表明发育早期雌激素合成相关基因的表达可能对鳊鱼性别分化的方向起决定性作用。本研究发现长吻鲢 *cyp19a1a* 和 *cyp26a1* 基因在卵巢高表达,而 *cyp17a1*、*cyp11a1* 和 *cyp11a1* 基因在精巢高表达,预示着芳香化酶 P450 家族多个基因可能参与长吻鲢性腺发育及调节类固醇激素合成。

SOX 家族成员氨基酸序列在 HMG-box 区高度保守,在精巢及其他组织分化中起重要作用。本研究共注释了 16 个 SOX 基因家族成员,其中 *sox9*、*sox4*、*sox8*、*sox5*、*sox10*、*sox6*、*sox11*、*sox18*、*sox7* 和 *sox17a-a* 在精巢高表达, *sox19* 和 *sox13* 主要在卵巢表达,而 *sox1a*、*sox2*、*sox14*、*sox21b* 和 *sox3* 在精巢和卵巢的表达水平无显著差异,暗示 SOX 家族成员在长吻鲢性别分化及发育过程中起到复杂作用。值得注意的是, *sox9* 基因主要在性腺分化时期精巢表达,可促进精巢支持细

胞和间质细胞分化、精巢发育等,它被认为是哺乳动物性别决定与性腺发育的关键基因^[51]。张梦等^[52]克隆大黄鱼(*Larimichthys crocea*) *sox9a*、*sox9b* 氨基酸序列,并进行不同组织各发育时期基因表达量分析。结果显示 *sox9a*、*sox9b* 基因在精巢表达量最高,显著高于卵巢等组织,且性腺发育前期 *sox9a/b* 基因表达量低于发育后期。表明 *sox9* 基因表达水平具有性别二态性,在性腺发育过程中可能起重要作用。Klüver 等^[53]研究发现 *sox9a* 基因在青鳉卵巢组织高表达, *Sox9b* 在精巢表达量高。与之相反, *sox9a*、*sox9b* 基因分别在斑马鱼精巢、卵巢高表达。说明 *sox9* 的两个拷贝基因在不同鱼类中表达模式存在差异,研究 *sox9* 基因表达模式是有必要的。除了 *sox9* 基因,还有一些 SOX 家族成员被证明与性别分化及性腺发育有关。比如, *sox3* 是青鳉的性别决定基因^[28]; *sox4*、*sox5*、*sox6* 和 *sox8* 基因在精子发生过程中起作用; *sox2* 和 *sox3* 分别参与精巢、卵巢发育^[54-56]。总之,SOX 基因家族在性别决定、性腺分化与发育过程发挥着重要作用

除此以外,研究还发现许多性别关键基因,可能也在长吻鮠性别调控及性腺发育起到重要作用(图4)。透明带蛋白家族(ZP)是组成硬骨鱼卵母细胞周围透明包膜的主要成分。已有研究证实 ZP 蛋白在精卵识别、诱发顶体反应、卵母细胞成熟、防止多精、受精等方面有重要作用^[57]。之前的研究表明,鱼卵包膜通常包含 2~4 种 ZP 家族基因,与哺乳动物 *zp1*、*zp3*、*zp4* 同源^[58]; *zp2* 在卵母细胞包膜早期形成中起重要作用; *zp3* 参与顶体反应等生殖活动,是鱼类卵壳主要构成蛋白^[59]; 鱼类 *zp4* 基因研究较少,人类 *zp4* 可诱导顶体反应并抑制精子与透明带结合。本研究中,4 种 ZP 家族基因(*zp1*、*zp2*、*zp3* 和 *zp4*)在长吻鮠卵巢的表达水平高于精巢,表明它们在卵泡发生过程中发挥重要作用。*figla* 与 *dmrt1* 在雌性鱼类的内分泌系统调节过程存在相互作用。在大鳞海猪鱼(*Halichoeres Poecilopterus*)性别分化后, *figla* 表达量持续降低,而 *dmrt1* 表达量随之增加^[60]。*rspo1* 可激活参与哺乳动物雌性性别分化的 Wnt/ β -连环蛋白信号通路;尼罗罗非鱼中, *rspo1* 过表达导致

wnt4b 和 β -catenin 表达量上调以及 *dmy*、*gsdf*、*dmrt1* 表达量下降^[61]。这些 DEGs 可能构成了一个调控性腺发育、配子形成的级联网络。

3.2 长吻鮠性腺生殖调控相关的信号通路

根据功能预测和分类,笔者发现了 16 条雌雄间差异显著 KEGG 通路,包括卵巢类固醇生成、Wnt 信号通路、MAPK 信号通路、TGF- β 信号通路等(图5)。众所周知,鱼类通过下丘脑-垂体-性腺轴(HPG 轴)参与生殖控制过程。GnRH 信号通路能够调控性腺的发育和成熟,对促性腺激素生成、性类固醇激素激活起调控作用^[62]。类固醇激素主要由性腺合成和分泌,通过与核受体(如雌激素受体和雄激素受体)结合。本研究中,该通路上多种类固醇激素合成酶表达量存在显著差异, *cyp17a1*、*cyp11a1*、*cyp11a1*、*hsd3b* 与 *hsd17b7* 基因均在精巢中高度表达,体现了它对雌雄个体正常繁殖的重要调控作用。卵巢类固醇则是雌性生物体卵巢内的重要性激素,如孕酮、17 β -雌二醇等。在卵巢类固醇生成通路中发现了许多发育相关差异表达基因,3 β -羟基类固醇脱氢酶(*hsd3b*),骨形态发生蛋白 15 (*bmp15*),17 β -羟基类固醇脱氢酶 7 型(*hsd17b7*),促卵泡激素受体(*fshr*)等。这些基因通过调节卵巢类固醇的产生和神经分布,参与性成熟、性腺发育和生殖的调控^[63]。MAPK 通路在调节促性腺激素相关基因表达等方面也起重要作用^[64]。

4 结论

本研究首次对长吻鮠雌雄性腺进行转录组测序,共检测出 24661 个基因,其中 23708 个基因与参考基因组对应。比较分析雌雄转录组基因表达水平,获得 10872 个 DEGs,进行 GO 富集分析、KEGG 通路分析。差异表达基因显著富集在 Wnt 信号通路、TGF- β 信号通路、MAPK 信号通路、卵巢类固醇通路、GnRH 信号通路等 16 条与性别决定与分化以及性腺发育相关的信号通路。进一步并筛选 71 个性别决定候选的关键基因(51 个精巢高表达量基因: *dmrt1*、*cyp17a1*、*sox9*、*rspo1*、*wnt6* 等;20 个卵巢高表达量基因: *foxl2*、*zp1*、*zp3*、*zar1*、*figla* 等)进行 PPI 分析,揭示基因间存在多

种互作关系。这些结果将为长吻鮠性别决定和分化机制的研究积累重要数据,从而为其全雄苗种的培育提供理论支撑。

参考文献:

- [1] Mei J, Gui J F. Genetic basis and biotechnological manipulation of sexual dimorphism and sex determination in fish[J]. Science China Life Sciences, 2015, 58(2): 124-136.
- [2] Wang H P, Gao Z X, Rapp D, et al. Effects of temperature and genotype on sex determination and sexual size dimorphism of bluegill sunfish *Lepomis macrochirus*[J]. Aquaculture, 2014, 420-421(S1): 64-71.
- [3] Zhang J, Ma W G, He Y, et al. Sex biased expression of ghrelin and GHSR associated with sexual size dimorphism in yellow catfish[J]. Gene, 2016, 578(2): 169-176.
- [4] Tao W J, Zhu X, Cao J M, et al. Screening and characterization of sex-linked DNA markers in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*)[J]. Aquaculture, 2022, 557: 738331.
- [5] Zhu W X, Wang T, Zhao C, et al. Evolutionary conservation and divergence of *Vasa*, *Dazl* and *Nanos1* during embryogenesis and gametogenesis in dark sleeper (*Odontobutis potamophila*)[J]. Gene, 2018, 672: 21-33.
- [6] Zhai G, Shu T T, Chen K X, et al. Successful production of an all-female common carp (*Cyprinus carpio* L.) population using *cyp17a1*-deficient neomale carp[J]. Engineering, 2022, 8(1): 181-189.
- [7] Wang N, Wang R K, Wang R Q, et al. Transcriptomics analysis revealing candidate networks and genes for the body size sexual dimorphism of Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. Functional & Integrative Genomics, 2018, 18(3): 327-339.
- [8] Molina W F, Benetti D D, Fiorentino J N, et al. Early sex shape dimorphism (SShD) in *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766) and its applications for monosex culture[J]. Aquaculture, 2018, 495: 320-327.
- [9] Mustapha U F, Peng Y X, Huang Y Q, et al. Comparative transcriptome analysis of the differentiating gonads in *Scatophagus argus*[J]. Frontiers in Marine Science, 2022, 9: 962534.
- [10] Zhao W, Zhou J, Li Z, et al. Characterization of 55 SNP markers in Chinese longsnout catfish *Leriocassis Longirostris*[J]. Conservation Genetics Resources, 2020, 12(3): 427-432.
- [11] Dai S M, Zhou Y L, Guo X F, et al. Sex-specific markers developed by genome-wide 2b-RAD sequencing confirm an XX/XY sex determination system in Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris*)[J]. Aquaculture, 2022, 549: 737730.
- [12] Fisheries and Fisheries Administration of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. 2023 China fisheries statistical yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2023: 45-45. [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2023 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2023: 45-45.]
- [13] Luo H, Li Y, Zheng S Q, et al. Identification of male sex-specific markers using genome resequencing in the Chinese longsnout catfish *Leiocassis longirostris*[J]. Aquaculture, 2022, 558: 738392.
- [14] Tao W J, Chen J L, Tan D J, et al. Transcriptome display during tilapia sex determination and differentiation as revealed by RNA-Seq analysis[J]. BMC Genomics, 2018, 19(1): 363.
- [15] Lin X H, Zhou D Y, Zhang X M, et al. A first insight into the gonad transcriptome of Hong Kong catfish (*Clarias fuscus*)[J]. Animals, 2021, 11(4): 1131.
- [16] Guan W Z, Jiang K, Lai X L, et al. Comprehensive transcriptome analysis of gonadal and somatic tissues for identification of sex-related genes in the largemouth bass *Micropterus salmoides*[J]. Marine Biotechnology, 2022, 24(3): 588-598.
- [17] Pertea M, Kim D, Pertea G M, et al. Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown[J]. Nature Protocols, 2016, 11(9): 1650-1667.
- [18] Niedziela G, Szabelska-Beręsewicz A, Zypych-Walczak J, et al. Application of edgeR and DESeq2 methods in plant experiments based on RNA-seq technology[J]. Biometrical Letters, 2022, 59(2): 127-139.
- [19] Micale G, Continella A, Ferro A, et al. GASOLINE: A Cytochrome app for multiple local alignment of PPI networks[J]. F1000 Research, 2014, 3(2): Article No.140.
- [20] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-DDCt method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [21] Kuroki S, Tachibana M. Epigenetic regulation of mammalian sex determination[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2018, 468: 31-38.
- [22] Wright S M, Carroll C, Walters A, et al. Genome sequence of *Leuconostoc citreum* DmW_111, isolated from wild *Drosophila*[J]. Genome Announcements, 2017, 5(24): e00507-e00517.
- [23] Matsuda M, Sato T, Toyazaki Y, et al. *Oryzias latipes* has DMY, a gene that is required for male development in the medaka, *O. latipes*[J]. Zoological Science, 2003, 20(2): 159-161.

- [24] Hattori R S, Murai Y, Oura M, et al. A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(8): 2955-2959.
- [25] Hattori R S, Tashiro S, Zhang Y, et al. Demonstration of viability and fertility and development of a molecular tool to identify YY supermales in a fish with both genotypic and environmental sex determination[J]. Ecology and Evolution, 2018, 8(15): 7522-7528.
- [26] Kamiya T, Kai W, Tasumi S, et al. A trans-species missense SNP in *Amhr2* is associated with sex determination in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes* (fugu)[J]. PLoS Genetics, 2012, 8(7): e1002798.
- [27] Myosho T, Otake H, Masuyama H, et al. Tracing the emergence of a novel sex-determining gene in medaka, *Oryzias luzonensis*[J]. Genetics, 2012, 191(1): 163-170.
- [28] Takehana Y, Matsuda M, Myosho T, et al. Co-option of *Sox3* as the male-determining factor on the Y chromosome in the fish *Oryzias dancena*[J]. Nature Communications, 2014, 5(1): Article No.4157.
- [29] Komrakova M, Knorr C, Brenig B, et al. Sex discrimination in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using various sources of DNA and different genetic markers[J]. Aquaculture, 2018, 497: 373-379.
- [30] Reichwald K, Petzold A, Koch P, et al. Insights into sex chromosome evolution and aging from the genome of a short-lived fish[J]. Cell, 2015, 163(6): 1527-1538.
- [31] Jasonowicz A J, Simeon A, Zahm M, et al. Generation of a chromosome-level genome assembly for Pacific halibut (*Hippoglossus stenolepis*) and characterization of its sex-determining genomic region[J]. Molecular Ecology Resources, 2022, 22(7): 2685-2700.
- [32] Rafati N, Chen J F, Herpin A, et al. Reconstruction of the birth of a male sex chromosome present in Atlantic her-ring[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2020, 117(39): 24359-24368.
- [33] Koyama T, Nakamoto M, Morishima K, et al. A SNP in a steroidogenic enzyme is associated with phenotypic sex in *Seriola* fishes[J]. Current Biology, 2019, 29(11): 1901-1909.
- [34] Matson C K, Zarkower D. Sex and the singular DM domain: Insights into sexual regulation, evolution and plasticity[J]. Nature Reviews Genetics, 2012, 13(3): 163-174.
- [35] Li M H, Yang H H, Li M R, et al. Antagonistic roles of *dmrt1* and *foxl2* in sex differentiation via estrogen production in *Tilapia* as demonstrated by TALENs[J]. Endocrinology, 2013, 154(12): 4814-4825.
- [36] Webster K A, Schach U, Ordaz A, et al. *Dmrt1* is necessary for male sexual development in zebrafish[J]. Developmental Biology, 2017, 422(1): 33-46.
- [37] 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(3): Article No.42213.
- [38] Masuyama H, Yamada M, Kamei Y, et al. *Dmrt1* mutation causes a male-to-female sex reversal after the sex determination by *dmy* in the medaka[J]. Chromosome Research, 2012, 20(1): 163-176.
- [39] Wen A Y, You F, Sun P, et al. CpG methylation of *dmrt1* and *cyp19a* promoters in relation to their sexual dimorphic expression in the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Journal of Fish Biology, 2014, 84(1): 193-205.
- [40] Dong Z D, Li X Y, Huang C Q, et al. Comparative transcriptome analysis of the gonad of the lacustrine goby (*Gobiop-terus lacustris*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2021, 45(3): 365-380. [董忠典, 黎学友, 黄承勤, 等. 湖栖鳉虎鱼性腺转录组比较分析[J]. 水产学报, 2021, 45(3): 365-380.]
- [41] Zhou H, Zhuang Z X, Sun Y Q, et al. Changes in DNA methylation during epigenetic-associated sex reversal under low temperature in *Takifugu rubripes*[J]. PLoS One, 2019, 14(8): e0221641.
- [42] Uhlenhaut N H, Jakob S, Anlag K, et al. Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation[J]. Cell, 2009, 139(6): 1130-1142.
- [43] Georges A, Auguste A, Bessière L, et al. FOXL2: A central transcription factor of the ovary[J]. Journal of Molecular Endocrinology, 2013, 52(1): R17-R33.
- [44] Wang H, Li X, Zhang Y H. Advances in research on regulation factors of CYP19 gene expression and aromatase activity[J]. Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2010, 19(3): 304-308. [王慧, 李霞, 张育辉. CYP19 基因表达与芳香化酶活性调控因子的研究进展[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2010, 19(3): 304-308.]
- [45] He F X, Jiang D N, Huang Y Q, et al. Comparative transcriptome analysis of male and female gonads reveals sex-biased genes in spotted scat (*Scatophagus argus*)[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2019, 45(6): 1963-1980.
- [46] Liu F, Zhang X L, Wei X K, et al. Gonadal transcriptome analysis of paradise fish *Macropodus opercularis* to reveal sex-related genes[J]. Comparative Biochemistry and Physio-

- logy Part D, Genomics & Proteomics, 2023, 48: 101125.
- [47] Yan H W, Shen X F, Cui X, et al. Identification of genes involved in gonadal sex differentiation and the dimorphic expression pattern in *Takifugu rubripes* gonad at the early stage of sex differentiation[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2018, 44(5): 1275-1290.
- [48] Kumar R S, Ijiri S, Trant J M. Changes in the expression of genes encoding steroidogenic enzymes in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) ovary throughout a reproductive cycle[J]. Biology of Reproduction, 2000, 63(6): 1676-1682.
- [49] Tokarz J, Möller G, de Angelis M H, et al. Steroids in teleost fishes: A functional point of view[J]. Steroids, 2015, 103: 123-144.
- [50] Zhu Q Y, Han C, Liu S Y, et al. Development and gene expression analysis of gonad during 17 α -methyltestosterone-induced sex reversal in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)[J]. Aquaculture Reports, 2022, 23: 101049.
- [51] Zheng Y, Wang Z Z, Chen J C. Progresses on the study of sex differentiation genes in fish[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2015, 39(4): 798-810. [郑尧, 王在照, 陈家长. 调控鱼类性腺分化基因的研究进展[J]. 水生生物学报, 2015, 39(4): 798-810.]
- [52] Zhang M, Zhu Y Y, Li W B, et al. Cloning and expression of *sox9a/b* gene in the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(8): 1691-1705. [张梦, 朱阳阳, 李完波, 等. 大黄鱼 *sox9a/b* 基因的克隆与表达分析[J]. 水产学报, 2019, 43(8): 1691-1705.]
- [53] Klüver N, Kondo M, Herpin A, et al. Divergent expression patterns of *sox9* duplicates in teleosts indicate a lineage specific subfunctionalization[J]. Development Genes and Evolution, 2005, 215(6): 297-305.
- [54] Xu Y, Zhong Z W, Feng Y, et al. Expression pattern analysis of anti-Mullerian hormone in testis development of pearlscale angelfish (*Centropyge vrolikii*)[J]. Journal of Fish Biology, 2023, 102(5): 1067-1078.
- [55] Yu H Y, Wang Y J, Li X J, et al. The evolution and possible role of two *sox8* genes during sex differentiation in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Molecular Reproduction and Development, 2019, 86(5): 592-607.
- [56] Hu Y C, Wang B Z, Du H J. A review on sox genes in fish[J]. Reviews in Aquaculture, 2021, 13(4): 1986-2003.
- [57] Lü C, Huang H L, Yi D J, et al. Mutant *zp1* impedes incorporation of *zp3* and *zp4* in the zona pellucida, resulting in zona absence and female infertility in rats[J]. Biology of Reproduction, 2021, 104(6): 1262-1270.
- [58] Litscher E S, Wassarman P M. The fish egg's zona *Pellucida*[J]. Current Topics in Developmental Biology, 2018, 130: 275-305.
- [59] Sasaki K, Takaoka S, Obata Y. Oocyte-specific gene knock-down by intronic artificial microRNAs driven by *zp3* transcription in mice[J]. The Journal of Reproduction and Development, 2021, 67(3): 229-234.
- [60] Miyake Y, Sakai Y, Kuniyoshi H. Molecular cloning and expression profile of sex-specific genes, *figla* and *dmrt1*, in the protogynous hermaphroditic fish, *Halichoeres poecilopterus*[J]. Zoological Science, 2012, 29(10): 690-710.
- [61] Wu F R, Wu L M, Wu Q Q, et al. Duplication and gene expression patterns of β -catenin in Nile tilapia[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2018, 44(2): 651-659.
- [62] Sower S A. Landmark discoveries in elucidating the origins of the hypothalamic-pituitary system from the perspective of a basal vertebrate, sea lamprey[J]. General and Comparative Endocrinology, 2018, 264: 3-15.
- [63] 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.
- [64] Li S D, Wang Q M, Yu H, et al. Polystyrene microplastics induce blood-testis barrier disruption regulated by the MAPK-Nrf2 signaling pathway in rats[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2021, 28(35): 47921-47931.

Comparative transcriptomic analysis of male and female gonads of the Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris*)

FAN Jiahui^{1,2}, YE Huan², SONG Xinhua³, YUE Huamei², HUANG Ling², RUAN Rui², GAO Weihua¹, LI Chuangju²

1. School of Animal Science, Yangtze University, Jingzhou 434024, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs of China; Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China;

3. Hubei Product Farm of *Leiocassis longirostris*, Shishou 434400, China

Abstract: The Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris*) is an economically important freshwater fish in China; males grow faster than the females, suggesting that all-male production is economically desirable in aquaculture. However, their sex determination, sex differentiation genes, and the related regulatory mechanisms remain unknown. In this study, transcriptome sequencing of the ovaries and testes of Chinese longsnout catfish was performed using an Illumina high-throughput sequencing platform. We obtained 358048456 raw reads and 356168472 clean reads from the transcriptome. In total, 24661 genes were annotated, of which 23708 genes were aligned with the reference genome. Gene expression patterns in the ovaries and testes were compared. The results showed that there were 10872 differentially expressed genes (DEGs) between the ovary and testis, including 9375 up-regulated genes and 1497 down-regulated genes. 21 functional DEGs were selected for RT-qPCR analysis and the results confirmed the reliability of the transcriptome analysis. The DEGs were annotated using the Nr, KEGG, and GO databases, where they were enriched in 58 GO functional annotation components and 338 KEGG secondary branching metabolic systems. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis revealed that the differentially expressed genes were significantly enriched in 16 pathways related to sex determination and differentiation and gonadal development, including the Wnt signaling, TGF- β signaling, MAPK signaling, ovarian steroid signaling, and GnRH signaling pathways. Through functional annotation, 71 important sex-related candidate genes were screened, including 50 highly expressed genes (such as *dmrt1*, *cyp17a1*, *samd7*, *wnt6*, and *wt1*) and 21 highly expressed ovarian genes (such as *foxl2*, *gdf9*, *zp3*, *zp1*, *figla*, and *bmp15*). Protein-protein interaction (PPI) network analysis revealed that the testis specificity gene *dmrt1* interacts with the testis-biased DEGs (*sox9*, *wt1*, *cyp17a1*, *rspo1*, *gata4*, and *hsd3b*) and the ovary-biased DEGs (*foxl2*, *figla*, and *bmp1*), suggesting that *dmrt1* as a sex-determining gene can play a role by inducing the testis-biased DEGs and inhibiting the ovary-biased DEGs during testicular development. In this study, the differentially expressed genes related to sex determination and differentiation of Chinese longsnout catfish were identified and the signaling pathways involved in gonadal development in both males and females were revealed. These findings provide important data for future research on the mechanisms of sex determination and differentiation of Chinese longsnout catfish and thus provide theoretical support for all-male seed production in Chinese longsnout catfish.

Key words: *Leiocassis longirostris*; transcriptome; gonadal development; differentially expressed genes

Corresponding author: LI Chuangju. E-mail: lcj@yfi.ac.cn