

文章编号: 1674 - 5566(2016)06 - 0801 - 06

DOI:10.12024/jsou.20160401732

细锯脂鲤背鳍和脂鳍的发育观察和转录组比较分析

刘小玉, 刘志伟, 鲍宝龙

(上海海洋大学 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

摘要: 观察了细锯脂鲤背鳍和背鳍形态和骨骼发育, 在此基础上比较了脂鳍、背鳍原基和背鳍共 3 个组织的转录组, 发现细锯脂鲤背鳍原基 28 DAH (Day After Hatch, DAH) 出现, 30 DAH 仔鱼背鳍鳍条已出现分化, 35 DAH 背鳍鳍条已硬骨化, 脂鳍在 32 DAH 开始出现。背鳍原基、背鳍和脂鳍这 3 个组织共同表达基因有 14 115 条, 分别占背鳍原基转录组的 84.01%、背鳍的 83.19%、脂鳍的 84.14%, 提示脂鳍发育的主要调控机制与背鳍发育较为相似。相同基因表达水平差异方面, 相比脂鳍, 背鳍原基和背鳍之间的基因表达模式要更为相似。发现有些与鳍发育相关的基因在背鳍和脂鳍转录组中存在差异。这些研究结果为进一步深入了解脂鳍发育奠定了基础。

关键词: 细锯脂鲤; 背鳍原基; 背鳍; 脂鳍; 转录组
中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

脂鳍位于背鳍和尾鳍之间, 往往缺少鳍条等骨骼支撑^[1-2], 广泛分布在水珍鱼目 (Argentiniformes)、仙女鱼目 (Aulopiformes)、脂鲤目 (Characiformes)、灯笼鱼目 (Myctophiformes)、胡瓜鱼目 (Osmeriformes)、鲑鲈目 (Percopsiformes)、鲑形目 (Salmoniformes)、鲑形目 (Siluriformes) 和巨口鱼目 (Stomiiformes) 等 9 个目的 75 科的六千多种鱼类^[3]。鲑形目鲑科的脂鳍, 主要由表皮组织、结缔组织和角质组成^[4], 鲑形目鲑科的脂鳍由表皮层、胶原纤维层和脂肪层组成^[5]。有些脂鲤目和鲑形目的脂鳍中存在鳍条状结构^[6], 尼罗双背鳍鲳 (*Mochokus niloticus*) 脂鳍中的鳍条和其他奇鳍的鳍条非常相似^[7]。有些种类的脂鳍中有鳍条, 也有相应的支持结构, 如一些灯笼鱼目和胡瓜鱼目鱼类的脂鳍基底存在小软骨^[1]。此外, 一些巨口鱼目种类在腹部也有脂鳍^[8]。

脂鳍发育有两种模式: 一种是鲑形目类型, 脂鳍和奇鳍一样, 同时在鳍褶尚未完全退化的基础上发育而成; 另一种是脂鲤目类型, 脂鳍是在

鳍褶完全退化后, 再在已形成的背鳍与尾鳍之间发育为脂鳍。鲑形目类型脂鳍发育和背鳍的前期发育类似^[8]。背鳍发育被认为分为 3 个阶段: 第一阶段是鳍褶从鱼类头部后到肛门沿中轴线形成一层膜; 第二阶段是在背鳍发生的位置出现背鳍原基, 随着发育, 鳍褶消失; 第三阶段是背鳍原基继续分化至出现了支鳍骨和真皮骨骼, 背鳍发育完成^[9]。如衰白鲑 (*Coregonus maraena*) 脂鳍的发育, 有类似背鳍发育的第一和第二阶段, 但缺少第三阶段^[8], 脂鳍发育和背鳍前期的发育机制是否相似, 目前尚不清楚。脂鲤目类型的脂鳍发育模式, 是在鳍褶完全退化后再发育而成的, 相比鲑形目类型脂鳍, 其似乎与背鳍发育模式相差较大。

为了解脂鲤目鱼类脂鳍发育和背鳍发育的关系, 本文观察了脂鲤目的细锯脂鲤 (*Pristella maxillaris*) 的脂鳍和背鳍发育, 并利用高通量测序技术比较了细锯脂鲤的背鳍原基、背鳍鳍条分化和脂鳍的转录组, 为理解脂鳍与背鳍发生的异同提供了分子信息。

收稿日期: 2016-04-18 修回日期: 2016-06-23

基金项目: 国家自然科学基金(31072201)

作者简介: 刘小玉(1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为鱼类发育生物学。E-mail: 670939618@qq.com

通信作者: 鲍宝龙, E-mail: blbao@shou.edu.cn

1 材料和方法

1.1 材料来源

细锯脂鲤饲养在上海海洋大学水产与生命学院实验室。筛选成熟度好的亲鱼进行人工繁殖,受精后 24 h 仔鱼出膜,在 28 °C 恒温光照箱饲养,出膜后第 3 天开始投喂轮虫,到 8 DAH (Day After Hatch, DAH) 开始投喂卤虫无节幼体。

1.2 骨骼染色

所取样本用 4% 的多聚甲醛固定过夜,再转移到 95% 乙醇中保存,用作骨骼染色。对 28、30、32 和 35 DAH 的细锯脂鲤骨骼进行了染色。详细骨骼染色方法参考文献 [10] ~ [12]。先用 95% 乙醇和去离子无菌水 3:1、1:1、1:3 漂洗样本各 30 min,以去除甲醛;用 TBST (50 mmol/L Tris, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 体积分数为 0.1% 的 Triton-100) 温和震荡漂洗 2 次,每次 30 min,用去离子水洗 30 min,以去除残余的 TBST 溶液;漂洗完后直接转移至新鲜配置的阿利新蓝溶液 [10 mg 阿利新蓝,70 mL 无水乙醇,30 mL 冰乙酸 (pH ≤ 1.0) 过滤,4 °C] 中,进行软骨染色,染色 20 min。染色后转移至 1% KOH 溶液,漂洗后转移至胰蛋白酶消化液 [100 mL 体系: 65 mL 去离子水, 35 mL 饱和四硼酸钠盐 (Na₂B₄O₇ · 10H₂O) 上清液, 1 g 胰蛋白酶] 消化直至头部肌肉组织透明;将透明的标本转移至新配置的 1% KOH 溶液中,滴加茜素红染色液进行染色,后以 1% KOH 溶液洗去组织中残余的染色液;经含 15%、75%、50%、30%、90% 和 100% 的甘油梯度脱水,最后保存在含少许麝香草酚的甘油中。取样本和骨骼染色后的样本用 SMZ1500 (Nikon) 解剖显微镜拍照。

1.3 总 RNA 提取及 mRNA 分离

分别取 28、30 和 35 DAH 细锯脂鲤各 50 尾,MS-222 麻醉之后在解剖镜下剪取背鳍原基、背鳍和脂鳍组织,分别抽取总 RNA。总 RNA 提取按照 Invitrogen 公司的 Trizol Reagent 说明书进行。用 Dynabeads[®] Oligo (dT) 25 (Life, 美国) 进行 mRNA 纯化。

1.4 cDNA 文库构建和转录组测序

cDNA 文库构建方法主要参考魏利斌等 [13]。取 100 ng 纯化的 mRNA,用 RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB, 美国) 构建文库。首先加入破

碎缓冲液将 mRNA 随机打断成片段,以这些 RNA 片段为模板,先合成第 1 条 cDNA 链,再合成第 2 条 cDNA 链。末端修复 cDNA 后加 poly(A) 并连接测序接头,得到 300 ~ 500 bp 范围的 ligated cDNA,最后进行 PCR 扩增得到可测序的文库。取 10 μg 的文库在 Illumina HiSeq[™] 2500 中进行双向测序。

1.5 序列分析和注释

利用 Illumina 平台将测序所得的图像数据转化为相应的核苷酸序列数据,对所产生的原始序列文件进行质量评估和可信度分析,并去除测序过程中低质量的序列和不确定的序列 (Q < 20)。Clean data 通过 Trinity 软件 (版本 2.0.6, 参数 min_kmer_cov 2 其他默认参数) 完成组装。通过 Trinity 将测序数据组装成转录本,取用每个 transcript cluster 中最长的转录本作为 Unigene,作为后续分析的参考序列。将预测得到的蛋白编码序列与 NR、KEGG、GENES、KOG 等数据库进行 blastp 比对,获得最佳注释 (E value < 1e-5)。

2 结果

2.1 细锯脂鲤的背鳍和脂鳍的发育

细锯脂鲤的背鳍在鳍褶完全退化之后开始发育。28 DAH 的细锯脂鲤在后来背鳍形成的位置出现了一个背鳍原基,即在背鳍发育出来的位置长出一个小小的透明凸起 (图版-A2),通过阿利新蓝染色发现,尾鳍已经发育出少许鳞质鳍条,支鳍骨形成,臀鳍原基也发育出来,支鳍骨形成。到 30 DAH 仔鱼背鳍发育成形,可以观察到支鳍骨和鳞质鳍条都已经形成。同时尾鳍和臀鳍的支鳍骨和鳞质鳍条也发育完善。

细锯脂鲤的脂鳍也是在鳍褶完全退化之后开始发育。32 DAH 的仔鱼,在背鳍与尾鳍之间出现小小的脂鳍,一层透明薄膜,类似于背鳍原基 (图版-A4),此时,背鳍也已发育完成。与背鳍不同的是,脂鳍的下方并没有支鳍骨形成。

2.2 背鳍原基、背鳍、脂鳍三者转录本基因的差异

在细锯脂鲤中,脂鳍组织有 16 775 个基因表达,背鳍原基组织有 16 800 个基因表达,背鳍组织基因表达数相对高一些,共有 16 967 个基因表达 (图 1)。背鳍原基、背鳍、脂鳍这 3 个组织共同表达基因有 14 115 条,分别占背鳍原基转录组的

84.01%、背鳍的 83.19%、脂鳍的 84.14%。背鳍原基和背鳍共有 15 113 个基因表达,分别占背鳍原基转录组的 89.95%,背鳍转录组的 89.07%;脂鳍和背鳍原基共有 15 117 个基因表达,分别占脂鳍转录组的 90.12%,占背鳍原基转录组的 89.98%;脂鳍和背鳍共有 15 287 个基因表达,分别占脂鳍转录组的 91.13%,占背鳍转录组的 90.1%。

脂鳍单独拥有的基因有 426 条占 2.24%,背鳍原基单独拥有的基因有 625 条占 3.28%,背鳍单独拥有的基因有 682 条占 3.30%。

2.3 背鳍原基、背鳍、脂鳍三者转录本基因的表达水平差异

背鳍原基、背鳍、脂鳍三者转录本基因的表达水平差异见图版。图版中纵轴树对这些基因作了一个聚类,同一类的基因可能在一条信号通路上;横轴是 3 个转录样本,脂鳍和背鳍的相似度小于背鳍和背鳍原基,和背鳍相对背鳍原基要近一些。图版中每一行代表一个基因,显示红色表示基因在该组织表达量高,显示绿色表示基因在该组织表达量低。从图版中能够直观地看出,背鳍基因表达水平总体表现较高。相比脂鳍,背鳍原基和背鳍之间的基因表达模式更为相似。通过统计和比较 3 个转录本信息,脂鳍和背鳍原基相比,上调基因有 186 个,下调基因有 239 个;脂鳍与背鳍相比,上调基因有 134 个,下调基因有 336 个;背鳍原基与背鳍相比,上调基因有 86 个,下调基因有 148 个。

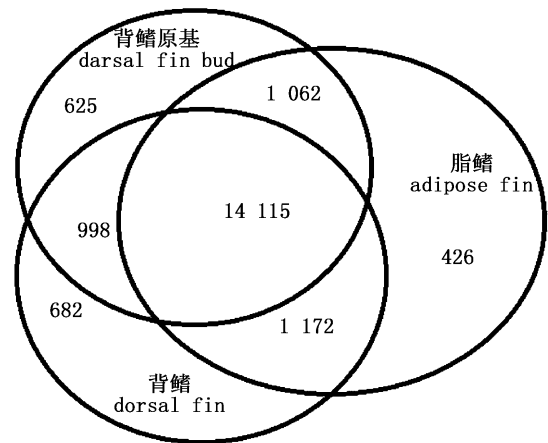


图 1 背鳍原基、背鳍、脂鳍的基因异同分析

Fig. 1 Comparison of the gene numbers of dorsal fin bud, dorsal fin and adipose fin

圈内交叉的部分是它们两两或 3 个共有的基因数量

Circle cross section is both of the two or three common unigene number

2.4 已知与鱼类鳍发育相关基因在 3 个样本中的差别

已知与鳍发育相关的基因,有 105 个基因在背鳍原基、背鳍和脂鳍组织都有表达,而少数与鳍发育相关的基因,在此 3 个组织转录组表达不一样。如 *bmp4* 只在背鳍有表达,在背鳍原基和脂鳍里不表达;成对附肢发育中关键的一个基因 *tbx5* 在脂鳍中有表达,而在背鳍和背鳍原基中没有表达;而 *Sall4* 基因在脂鳍和背鳍的转录本中有,而在背鳍原基处没有(表 1)。

表 1 已知鱼类鳍发育相关基因在 3 个样本转录组的差异分布

Tab. 1 Difference distribution of known fish fin development related genes in three samples of the transcriptomes

基因序号 gene ID	NR 功能注释 NR function	KOG 注释 KOG annotation	转录本 samples transcription	长度/bp length
TR137861	PREDICTED: T-box transcription factor TBX5-like	-	脂鳍	298
TR129772	PREDICTED: bone morphogenetic protein 4-like	-	背鳍原基、背鳍	275
TR106866	PREDICTED: sal-like protein 4	Transcriptional repressor SALM	背鳍、脂鳍	242

3 讨论

3.1 细锯脂鲤背鳍和脂鳍发育顺序

细锯脂鲤的脂鳍发育模式属于典型的脂鳍目类型,出膜后由鳍褶从头部到肛门,随后鳍褶退化之后再发育出脂鳍。脂鳍在鳍褶完全退化

后再发育出来,也间接提示我们脂鳍不应该是痕迹器官,虽然其目前的功能尚不清楚^[2,14-15]。虹鳉鱼脂鳍基部存在肌肉结构,以及脂鳍在鱼类进化过程中多次进化的现象,也提示脂鳍不应该是痕迹器官^[3,16]。细锯脂鲤背鳍条硬骨化的时间持续较短,从 32 DAH 到 35 DAH,鳍条和支鳍骨骨

化已经完成。与背鳍形成相比,细锯脂鲤脂鳍没有鳍条形成,也没有相应的支鳍骨。比较有趣的是,在 28 DAH 背鳍原基出现的时候,鳍褶已经完全退化,这在其他鱼类中是不多见的^[6]。

3.2 脂鳍和背鳍转录组比较分析

3 个样本的转录组分析表明,脂鳍和背鳍原基,或脂鳍和背鳍都有近似 90% 相同表达的基因,表明脂鳍发育的主要调控机制应该与背鳍发育非常相似。比较有趣的是,根据共有基因的相互比较,脂鳍和背鳍共有基因数,不但多于脂鳍和背鳍原基的共有基因数,而且多于背鳍原基和背鳍的共有基因数,表明虽然从发育过程上,脂鳍与背鳍原基发育非常相似,但可能在组成脂鳍的性质上,虽然没有鳍条,但具备了形成鳍条的成分,只是不能形成鳍条的形态。例如,鲑形目鲑科的脂鳍,其中已有角质成分存在^[4]。背鳍原基、背鳍、脂鳍三者转录本基因的表达水平差异表明,相比脂鳍,背鳍原基与背鳍之间的基因表达模式要更为相似,和背鳍原基与背鳍之间相比,脂鳍与背鳍原基或背鳍之间的上调和下调的基因数变化更大,表明在基因表达水平上也较多体现了脂鳍与背鳍发育的差异。

tbx5 基因可以诱导腹鳍以及前附肢的发育,在附肢发育中有很重要的作用^[17-18]。*tbx5* 只有在细锯脂鲤脂鳍中表达,而没有在背鳍和背鳍原基中表达,提示我们 *tbx5* 基因可能与脂鳍的出现密切相关。此外, *Sal* 基因与鳍形成发育相关,可以诱导胸鳍的发育^[19],而 *Sall4* 基因只在细锯脂鲤脂鳍和背鳍的转录本中有,而在背鳍原基处没有,提示我们其可能与角质成分形成有关。*bmp4* 基因只在背鳍有表达,在原基和脂鳍里是不表达的。但在鳍条分化阶段,*bmp4* 不管是胸鳍还是背鳍,都发挥着重要的作用^[20-21],提示我们,脂鳍没有鳍条和支鳍骨可能与 *bmp4* 没有表达有关。

总之,转录组比较分析发现,无论在基因相似性还是基因表达水平方面,都说明了脂鳍与背鳍发育调控方面存在高度相关性,个别基因在脂鳍和背鳍上的差异表达,也为下一步的功能验证提供了候选基因,为更好地理解脂鳍发育的调控打下了基础。

参考文献:

- [1] MATSUOKA M, IWAI T. Adipose fin cartilage found in some teleostean fishes[J]. Japanese Journal of Ichthyology, 1983, 30(1): 37-46.
- [2] STEWART T A, HALE M E. First description of a musculoskeletal linkage in an adipose fin: innovations for active control in a primitively passive appendage [J]. Proceeding of the Royal Society B, 2013, 280 (1750): 20122159.
- [3] STEWART T A, SMITH W L, COATES M I. The origins of adipose fins: an analysis of homoplasy and the serial homology of vertebrate appendages [J]. Proceeding of the Royal Society B, 2014, 281(1781): 20133120.
- [4] WEISEL G F. The Salmonoid adipose fin [J]. Copeia, 1968(3): 626-627.
- [5] 钟明超, 罗泉堃, 叶华. 大鳍鱮臀鳍和脂鳍的比较组织学研究[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 1996, 21(2): 168-171.
- [6] ZHONG M C, LUO Q S, YE H. Comparative and histological studies on the anal and adipose fins in freshwater catfish *Mystus macropterus* (Bleeker) [J]. Journal of Southwest China Normal University (Natural Science), 1996, 21(2): 168-171.
- [6] NORMAN J R. A history of fishes[M]. New York: A A Wyn, 1949:463.
- [7] VIGLIOTTA T R. A phylogenetic study of the African catfish family Mochokidae (Osteichthyes, Ostariophysii, Siluriformes), with a key to genera[J]. Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia, 2008, 157(1): 73-136.
- [8] BENDER A, MORITZ T. Developmental residue and developmental novelty-different modes of adipose-fin formation during ontogeny [J]. Zoosystematics and Evolution, 2013, 89(2): 209-214.
- [9] MABEE P M, CROTWELL P L, BIRD N C, et al. Evolution of median fin modules in the axial skeleton of fishes [J]. Journal of Experimental Zoology, 2002, 294(2): 77-90.
- [10] 柯中和, 张炜, 蒋燕, 等. 鲢肌间小骨发育的形态学观察[J]. 动物学杂志, 2008, 43(6): 88-96.
- [10] KE Z H, ZHANG W, JIANG Y, et al. Developmental morphology of the intermuscular bone in *Hypophthalmichthys molitrix* [J]. Chinese Journal of Zoology, 2008, 43(6): 88-96.
- [11] 姚文杰, 龚小玲, 吕耀平, 等. 日本鳗鲡肌间小骨的骨化过程[J]. 上海海洋大学学报, 2014, 23(6): 810-813.
- [11] YAO W J, GONG X L, LÜ Y P, et al. The ossificational process of the intermuscular bones in *Anguilla japonica* [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2014, 23(6): 810-813.

- [12] 吕耀平, 陈洁, 鲍宝龙, 等. 唇鳍肌间小骨的骨化过程[J]. 上海海洋大学学报, 2012, 21(4): 549–553.
LÜ Y P, CHEN J P, BAO B L, et al. The ossificational process of the intermuscular bones in *Hemibarbus labeo* [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2012, 21(4): 549–553.
- [13] 魏利斌, 苗红梅, 张海洋. 芝麻发育转录组分析[J]. 中国农业科学, 2012, 45(7): 1246–1256.
WEI L B, MIAO H M, ZHANG H Y. Transcriptomic analysis of sesame development [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2012, 45(7): 1246–1256.
- [14] 宋洪建, 刘伟, 王继隆, 等. 大麻哈鱼卵黄囊期仔鱼异速生长及其生态学意义[J]. 水生生物学学报, 2013, 37(2): 329–335.
SONG H J, LIU W, WANG J L, et al. Allometric growth during yolk-sac larvae of chum salmon (*Oncorhynchus Keta* Walbaum) and consequent ecological significance [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2013, 37(2): 329–335.
- [15] REIMCHEN T E, TEMPLE N F. Hydrodynamic and phylogenetic aspects of the adipose fin in fishes [J]. Canadian Journal of Zoology, 2004, 82(6): 910–916.
- [16] MCMAHON A P, INGHAM P W, TABIN C J. Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling [J]. Current Topics in Developmental Biology, 2003, 53: 1–14.
- [17] AHN D G, KOURAKIS M J, ROHDE L A, et al. T-box gene *tbx5* is essential for formation of the pectoral limb bud [J]. Nature, 2002, 417(6890): 754–758.
- [18] RALLIS C, BRUNEAU B G, DEL BUONO J, et al. *Tbx5* is required for forelimb bud formation and continued outgrowth [J]. Development, 2003, 130(12): 2741–2751.
- [19] MARÍ-BECCA M, MURCIANO C. Dermoskeleton morphogenesis in zebrafish fins [J]. Developmental Dynamics, 2010, 239(11): 2779–2794.
- [20] BASTIDA M F, SHETH R, ROS M A. A BMP-Shh negative-feedback loop restricts Shh expression during limb development [J]. Development, 2009, 136(22): 3779–3789.
- [21] SIMTH A, AVARON F, GUAY D, et al. Inhibition of BMP signaling during zebrafish fin regeneration disrupts fin growth and scleroblast differentiation and function [J]. Developmental Biology, 2006, 299(2): 438–454.

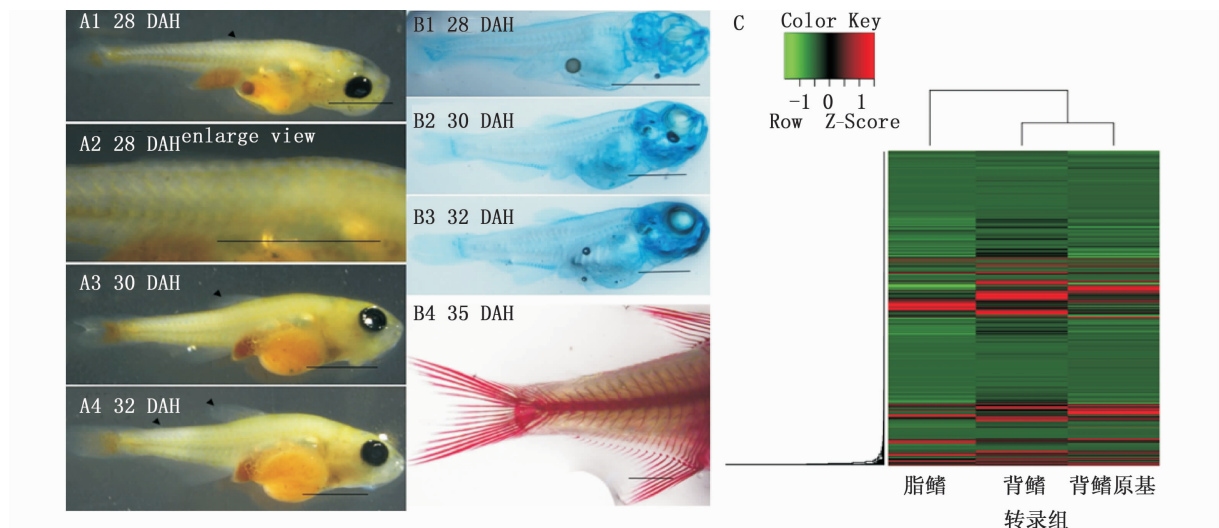
Observation and transcriptomic analysis of the development of dorsal fin and adipose fin in *Pristella maxillaris*

LIU Xiaoyu, LIU Zhiwei, BAO Baolong

(Exploration and Utilization of Aquatic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: So far we have no clear understanding on the adipose fin development. In order to find out the differences between the adipose fin and dorsal fin developments, we investigated the developing process and ossification process of dorsal fin and adipose fin in *Pristella maxillaris*. We found that the dorsal fin bud showed up from the larva fish dorsal at 28 DAH (day after hatch), dorsal fin ray could be seen at 30 DAH, and dorsal fin rays ossified at 35 DAH, whereas, the adipose fin could be found from 32 DAH. Based on this observation, we sequenced the transcriptoms of the dorsal fin bud at 28 DAH, dorsal fin at 30 DAH and adipose fin at 35 DAH in *P. maxillaris*. A series of bioinformatic analysis showed that all three tissues had 14 115 same genes, accounting for 84.01% of the dorsal fin bud's transcriptome, 83.19% of the dorsal fin's transcriptome, and 84.14% of the adipose fin's transcriptome, indicating that there might be similar molecular mechanism of the development process of adipose fin and dorsal fin in *P. maxillaris*. At gene expression level, compared with adipose fin, dorsal fin bud and dorsal fin expression was more similar. Furthermore, we found that some genes relative to the fin development such as *tbx5*, *bmp4* etc, were expressed differently in adipose fin and dorsal fin. These information provided by the comparative transcriptomic analysis may help us to understand the development of adipose fin betterly.

Key words: *Pristella maxillaris*; dorsal fin bud; dorsal fin; adipose fin; transcriptome



图版 细锯脂鲤背鳍和脂鳍发育及转录组差异的分析

Plate Dorsal fin and adipose fin development of *P. maxillaris* and their comparative transcriptome analysis

A1 - A4. 不同孵化天数细锯脂鲤的背鳍和脂鳍的形态。箭头显示背鳍和脂鳍。B1 - B4. 不同孵化天数的细锯脂鲤整体骨骼染色。绿色为阿利新蓝染色的软骨,红色为茜素红染色的硬骨。所有标尺都是500 μm 。C. 细锯脂鲤脂鳍、背鳍原基和背鳍转录组差异分析

A1 - A4. Dorsal fin and adipose fin in *P. Maxillaris* at different days after hatch (DAH), arrows show dorsal fin or adipose fin. B1 - B4. Skeletal staining of *P. Maxillaris* at different days after hatching. Green color shows cartilage, red color shows bone. All bars are 500 μm . C. Comparative transcriptome analysis of adipose fin, dorsal fin bud and dorsal fin in *P. Maxillaris*