

引用格式:

杨斯婷, 唐杨欣, 皮杰, 王旭, 刘林巍, 刘新华, 向建国, 李德亮. 沅江河蚬性腺差异的转录组学分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2026, 52(1): 122–130.

YANG S T, TANG Y X, PI J, WANG X, LIU L W, LIU X H, XIANG J G, LI D L. Transcriptomic analysis of gonadal differences in *Corbicula fluminea* from the Yuanjiang River[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2026, 52(1): 122–130.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



沅江河蚬性腺差异的转录组学分析

杨斯婷¹, 唐杨欣¹, 皮杰^{1,2}, 王旭¹, 刘林巍¹, 刘新华¹, 向建国¹, 李德亮^{1*}

(1. 湖南农业大学水产学院, 湖南 长沙 410128; 2. 湖南应用技术学院农林科技学院, 湖南 常德 415100)

摘要: 采用RNA-seq技术, 对湖南沅江的三性异体群体(雄性、雌性和雌雄同体共存)河蚬(*Corbicula fluminea*)的性腺进行转录组测序, 基于 P_{adj} (校正后 P) <0.05 和 $|\log_2FC|>1$ (FC为差异倍数)的条件筛选差异基因(DEGs), 通过GO和KEGG富集分析, 筛选相关候选基因并利用qRT-PCR完成表达验证。结果表明: 对3种性别的9个性腺转录组进行比较分析, 共获得562 386个高质量转录本, 鉴定出213 504个DEGs; DEGs主要富集于运动纤毛、微管、细胞分裂、微管结合等GO条目, 主要富集于细胞衰老、p53信号通路、卵母细胞减数分裂、孕酮介导的卵母细胞成熟、细胞周期等KEGG通路; 从转录组数据中鉴定出9个与性腺发育和性别分化相关的候选基因*Vom1*、*Tssk*、*Fem-1*、*Spag17*、*Spata7*、*Spag8*、*Tepp*、*Sfp2*和*Spag6*, 其中, *Tssk*、*Spag17*、*Spata7*、*Spag8*、*Tepp*、*Sfp2*、*Spag6*和*Fem-1*在雄性性腺中的表达量显著高于雌性性腺的, 对其中7个候选基因进行qRT-PCR验证, 结果与转录组数据基本一致。推测*Fem-1*可能在性别决定或分化中发挥作用, *Tssk*、*Spag17*、*Spata7*、*Tepp*、*Sfp2*、*Spag6*和*Spag8*可能参与精子发生, *Vom1*可能参与卵巢发育。

关键词: 河蚬; 双壳类; 三性异体; 雌雄同体; 性腺转录组

中图分类号: S917.4; Q786

文献标志码: A

文章编号: 1007–1032(2026)01–0122–09

Transcriptomic analysis of gonadal differences in *Corbicula fluminea* from the Yuanjiang River

YANG Siting¹, TANG Yangxin¹, PI Jie^{1,2}, WANG Xu¹, LIU Linwei¹, LIU Xinhua¹, XIANG Jianguo¹, LI Deliang^{1*}

(1. College of Fisheries, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2. College of Agriculture and Forestry Science and Technology, Hunan Applied Technology University, Changde, Hunan 415100, China)

Abstract: Gonadal transcriptome sequencing was performed using RNA-seq technology on the trioecy population of *Corbicula fluminea*(male, female, and hermaphrodite) collected from the Yuanjiang River in Hunan Province. Differentially expressed genes(DEGs) were screened under the P_{adj} (adjusted P) <0.05 and $|\log_2FC|>1$ (FC as fold change). After Gene Ontology(GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG) functional enrichment analyses, candidate genes related to gonadal development were selected and further validated by quantitative real-time PCR(qRT-PCR). The results showed that a total of 562 386 high-quality transcripts were obtained, and 213 504 differentially expressed genes(DEGs) were identified through comparative analysis of nine gonadal transcriptome libraries from three sexual phenotypes. GO enrichment analysis indicated that these DEGs were related to motile cilia, microtubules, cell division, and microtubule binding. KEGG pathway analysis revealed that the DEGs were primarily enriched in cellular senescence, the p53 signaling pathway, oocyte meiosis, progesterone-mediated oocyte maturation, and cell cycle. From the transcriptome dataset, nine candidate genes associated with gonadal development and sex differentiation were identified, including *Vom1*, *Tssk*, *Fem-1*, *Spag17*, *Spata7*, *Spag8*, *Tepp*, *Sfp2* and *Spag6*. Among them, *Tssk*, *Spag17*, *Spata7*, *Spag8*, *Tepp*, *Sfp2*, *Spag6* and *Fem-1*

收稿日期: 2025–04–07

修回日期: 2025–05–12

基金项目: 国家自然科学基金项目(3172832); 国家重点研发计划项目(2023YFD2400900); 湖南省水产产业技术体系项目(HARS-07)

作者简介: 杨斯婷(2001—), 女, 吉林四平人, 硕士研究生, 主要从事渔业资源与环境研究, Ysting2025@163.com; *通信作者, 李德亮, 博士, 教授, 主要从事渔业资源与环境研究, lidl@hunau.edu.cn

exhibited significantly higher expression levels in male gonads than those in female gonads. Seven of the eight candidate genes were verified by qRT-PCR, and the expression trends were generally consistent with the transcriptome results. It is speculated that *Fem-1* may play a regulatory role in sex determination or differentiation, while *Tssk*, *Spag17*, *Spata7*, *Tepp*, *Sfp2*, *Spag6* and *Spag8* are potentially involved in spermatogenesis, and *Vom1* may be involved in ovarian development.

Keywords: *Corbicula fluminea*; bivalve; trioecy; hermaphroditism; gonadal transcriptome

双壳类动物群体的性别组成十分多样,包括雌雄同体、雌雄异体(单独的雄性和雌性)、雌全异体(雌性和雌雄同体共存)、雄全异体(雄性和雌雄同体共存)以及罕见的三性异体(雄性、雌性和雌雄同体共存)^[1]。三性异体在植物中较为常见,但在水产动物中的研究相对匮乏^[2-3]。在海洋及淡水双壳类物种中,均发现了三性异体的性别组成^[4-6],这也为研究三性异体中的雌雄同体创造了更多可能性。OYARZÚN等^[3]在智利7个*Semimytilus algosus*种群中发现,该物种的三性异体性别组成比例十分稳定,雄性占1.1%、雌性占3.6%、雌雄同体占95.3%,推测三性异体可能是转化为雌雄异体或雌雄同体的过渡阶段。DÍAZ-MARTÍNEZ等^[7]研究发现,分布在墨西哥太平洋的*Toxopneustes roseus*群体为三性异体,且性别组成稳定,其中,雌雄同体个体表现出与雌性和雄性个体相似的配子发生。ROMO PIÑERA等^[8]研究发现*Megapitaria squalida*在墨西哥南下加利福尼亚州的Bahía de La Paz和Bahía Magdalena地区的群体中全年存在雌雄同体,分别占群体总数的21.8%和23.5%。目前,关于双壳类中雌雄同体性别在三性异体群体中的作用机制尚不明确,因此,深入探究贝类的三性异体现象及雌雄同体的性腺发育机制具有重要意义。

目前, RNA-Seq已被广泛用于贝类性别决定或分化及性腺发育相关基因的研究。LIU等^[9]利用转录组测序技术分析了青蛤(*Cyclina sinensis*)的性别相关基因,结果显示*Sox9*、*Dmrt1*、*Follistatin*、*Fem-1*在雄性性腺中的表达量均高于雌性性腺中的表达量, *Stpg1*和*Spag6*在雄性性腺中主要参与精子发生过程。SANTERRE等^[10]对长牡蛎(*Crassostrea gigas*)的*β-catenin*和*SoxE*进行了研究,经qRT-PCR检测发现,这2个基因在早期生殖细胞、精母细胞和卵黄前卵母细胞中均有表达,且可能在体细胞中表达。SHI等^[11]通过转录组学分析,在*Gigantidas haimaensis*中发现了几个与卵巢相关的基因,包括*β-catenin*、*Fem-1*和*Foxl2*,这些基因在雌性性腺中

的表达水平明显高于雄性的,猜测这些基因可能参与了雄性性腺向雌性性腺的转化过程。

河蚬(*Corbicula fluminea*)隶属软体动物门(Mollusca)、瓣鳃纲(Bivalvia)、帘蛤目(Veneroidea)、蚬科(Corbiculidae)、蚬属(*Corbicula*),主要营底栖生活,广泛分布于我国的江河、湖泊、水库、沟渠和池塘等水域^[12]。河蚬群体的性别组成多样化,我国的河蚬群体存在上述双壳类动物群体的所有性别组成,且在三性异体群体中雌雄同体的个体占比较高。河蚬雌雄异体种群主要分布在上海,其性别比例接近1:1;其次是江苏省,其河蚬雌、雄性别比例接近2:1^[13-14]。据报道,河蚬雌全异体群体仅分布在香港,其雌性、雌雄同体性别比接近1:1^[15]。河蚬雌雄同体群体在四川省安岳县已有相关报道^[16]。已有研究^[17]报道,湖南资江流域有河蚬雄全异体的存在,其雄性、雌雄同体性别比接近1:9。裴宏谦等^[18]证实,在湖南沅江流域存在河蚬三性异体群体,该群体以雌雄同体为主,且性别组成相对稳定,雄性、雌性、雌雄同体的性别比接近1:1:6。WU等^[5]在鄱阳湖也发现了三性异体群体的存在,雄性、雌性、雌雄同体的性别比接近13:6:81。ISHIBASHI等^[19]研究发现,河蚬中的雌雄同体个体可产生双鞭毛精子,并进行雄核生殖。但关于河蚬三性异体群体中3种性别的性腺发育机制仍缺乏深入研究。本研究中,以湖南沅江河蚬三性异体群体为研究对象,选取雄性、雌性和雌雄同体3种性别的性腺进行转录组测序及分析,初步筛选湖南沅江河蚬三性异体中与性腺发育和性别决定或分化相关的潜在基因,并对河蚬性腺发育和性别决定的可能机制进行探讨,以期阐明河蚬性别差异的遗传学基础及研究双壳类的性别决定机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集与前处理

供试河蚬取自湖南省常德市沅江下游水域(28°59'34.11"N, 111°41'57.66"E),在野外固定地点

采样,选取壳长 ≥ 2 cm的性成熟个体,经实验室短期人工驯养后用于试验。驯养用水为经过滤及曝气48 h的自来水。驯养时每日投喂3次富含硅藻、螺旋藻与小球藻的混合藻类,并使用虹吸法将残饵及粪便吸出。驯养7 d后,使用解剖刀撬开河蚬贝壳,暴露内脏团后使用尖头镊去除鳃,在消化腺和斧足中间精准分离性腺组织,并将性腺组织切成两部分。一部分固定在多聚甲醛中,参照PI等^[12]的方法鉴定样品的性别;另一部分用于RNA-Seq。经显微镜观察,选取相同批次且壳长相近的雌性(F组,标记为F1、F2、F3)和雄性(M组,标记为M1、M2、M3)及雌雄同体(H组,标记为H1、H2、H3)共9个样本,将解剖的9个性腺放入液氮中速冻,-80 °C保存备用。

1.2 总RNA提取及转录组测序

采用Trizol法从每个性腺中提取总RNA。使用NanoDrop One微量紫外-可见分光光度计、Qubit 3.0荧光计和琼脂糖凝胶电泳分别验证RNA的质量、浓度和完整性。

使用MGI Easy RNA Library Prep Kit for BGI[®]试剂盒构建9个cDNA文库。采用oligo(dT)磁珠富集mRNA,合成第一链cDNA和第二链cDNA。经末端修复、加A尾、接头连接、cDNA纯化和PCR扩增,完成cDNA文库的构建,并使用Agilent 2100 Bioanalyzer对文库进行质量评价。在DNBSEQ-T7 (BGI)平台上对构建的cDNA文库进行测序。将转录组原始数据上传至NCBI,登录号为PRJNA1187173。

1.3 序列组装及注释

使用fastp软件(版本0.21.0)^[20]对原始FASTQ数据进行过滤,得到高质量的clean reads(质控后有效数据);使用FastQC软件(版本0.11.9)^[21]对原始数据与clean reads进行质量控制评估。将9份样本的clean reads组合作为参考数据库,并使用Trinity软件(版本2.11.0,参数-Min-mer cov 2)^[22]进行转录组从头组装。采用CD-HIT软件(版本4.6.5)^[23]对所有转录本序列进行聚类去冗余处理,得到Unigene序列。使用BUSCO(Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs),利用单拷贝直系同源基因,评估组装的完整性。为了获得完整的转录本功能信息,使用UniProt、Pfam、GO、KEGG、KOG、Nr等数据库对转录本进行注释。

1.4 差异表达分析

运用Bowtie 2软件^[24]比较clean reads与参考转录本。使用RSEM软件^[25]计算每个样本与参考转录本的reads数。运用FPKM(fragments per kilobase of transcript per million mapped reads)估计基因表达水平。采用DESeq2(版本1.26.0)^[26],设定显著性阈值为 P_{adj} (校正后 P) < 0.05 和 $|\log_2FC| > 1$ (FC为差异倍数)的条件,识别H组与F组(H vs. F)、H组与M组(H vs. M)、M组与F组(M vs. F)之间的差异表达基因(DEGs)。运用clusterProfiler^[27]对所有差异表达的Unigene进行GO功能与KEGG通路富集分析,并采用 P_{adj} 控制多重检验误差,以 $P_{adj} \leq 0.05$ 为阈值判定功能条目及代谢通路的显著富集水平。

1.5 实时定量PCR(qRT-PCR)验证

为了验证差异表达基因的表达谱,选择7个DEGs进行qRT-PCR,使用Primer Premier 6软件设计引物(表1)。内参基因为 β -actin。反应体系总体积为12.5 μ L,包括正向和反向引物各0.5 μ L、6 μ L qRT-PCR预混液、0.5 μ L cDNA和5 μ L H₂O。反应程序:95 °C预变性5 min;95 °C变性10 s,60 °C退火延伸30 s,40次循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 定量分析方法测定基因的相对表达水平,每个样本重复3次。

表1 qRT-PCR验证的基因引物

Table 1 The primers for genes validated by qRT-PCR	
基因名称	引物序列(5'-3')
<i>Tepp</i>	ATATGGACACCGCCGGACACAA
	ATGCGTCTCTTCGGAGGCTCAA
<i>Spag17</i>	AAGGCAGACAAGAGTCAAC
	AGAAGTATGGAAGGCAGGTC
<i>Sfp2</i>	CAAAGCCCTCAAGTTCTCT
	TCCCTCCTTAGACTCGGTAT
<i>Spata7</i>	TACAACAAACTTCTCCAAA
	TCTGTGCTACCCTCATCC
<i>Spag6</i>	CGAGGCTGAAATCTTCCC
	CCACTGCGGCTACACCT
<i>Spag8</i>	GCAGAGTTGTTCCGTGAT
	GCTCTTATTGCCCTTCCAG
<i>Fem-1</i>	TCTCTTATGGGTGTTGCTACGG
	CACCTTTGGGTATCTTCAGCAG
β -actin	CGCCATCCAGGCTGTGCTTTCA
	ATGGCGTGTGGAAGGCGCTA

2 结果与分析

2.1 转录组数据拼接与注释结果

从表2可知, M组分别生成39 820 198、39 834 092、39 790 218个clean reads; F组分别生成39 832 446、39 790 218、39 807 548个clean reads; H组分别生成39 833 856、39 818 688、39 838 908个clean reads。9个样品clean reads的Q20比例(测序错误率小于1%)均大于97%, Q30比例(测序错误率小于0.1%)均大于93%, 这说明本试验数据质量较好, 过滤后的数据GC含量为37.99%~41.31%。

表2 河蚬性腺转录组测序结果统计

Table 2 Statistics of gonadal transcriptome sequencing results of *Corbicula fluminea*

样品	原始测序数据	clean reads	Q20比例/%	Q30比例/%	GC含量/%
F1	40 047 076	39 832 446	97.82	93.60	38.54
F2	40 000 416	39 790 218	97.74	93.32	37.99
F3	40 016 716	39 807 548	97.67	93.11	41.31
H1	40 019 108	39 833 856	97.78	93.50	39.71
H2	40 008 138	39 818 688	97.86	93.67	38.54
H3	40 042 982	39 838 908	97.63	93.01	38.36
M1	40 018 802	39 820 198	97.70	93.33	39.50
M2	40 039 472	39 834 092	97.83	93.65	39.71
M3	40 005 304	39 790 218	98.22	94.62	38.68

对3种性别的9个性腺转录组进行比较分析, 共获得562 386个高质量转录本, BUSCO评估的完整性为98.6%。运用Nr、Pfam、UniProt、KEGG、GO及KOG等数据库分别对转录本进行了功能注释, 结果如表3所示, 其中, 121 279个转录本(占21.57%)获得至少一种功能注释; GO数据库注释到70 514个转录本, 占总转录本的12.54%; KEGG数据库注释到58 987个转录本, 占总转录本的10.49%。对3种性

表3 数据库的转录本功能注释结果统计

Table 3 Statistics of functional annotation results of transcripts based on databases

项目	转录本数量/个	占比/%
Annotation	121 279	21.57
UniProt	99 894	17.76
Pfam	103 731	18.44
GO	70 514	12.54
KEGG	58 987	10.49
Pathway	32 742	5.82
KOG	1 645	0.29
Nr	100 962	17.95

注: Annotation为至少有一种注释的转录本序列。

别的9个性腺转录组进行比较分析, 共鉴定出213 504个差异表达基因(DEGs)。

2.2 不同性别组河蚬性腺差异表达基因的GO功能和KEGG通路富集分析结果

2.2.1 雌性和雄性河蚬性腺差异表达基因分析结果

通过比较M(雄性)组和F(雌性)组(M vs. F)的数据, 共鉴定出4 467个差异表达基因, 其中958个基因表达上调, 3 509个基因表达下调(表4)。对差异表达基因进行GO功能富集分析, 按照 P_{adj} 从小到大排序, 分别列举生物学过程、细胞组分、分子功能排名前5的功能条目, 结果如图1所示。从图1(a)可知, 差异基因在生物学过程中主要富集在基于微管的运动、纤毛组装、细胞分裂等条目中; 在细胞组分中主要富集在微管、纤毛、运动纤毛、动力蛋白复合物、轴丝动力蛋白复合物等条目中; 在分子功能中主要富集在微管负端导向运动活性、微管结合、微管马达活性等条目中。KEGG富集分析结果显示, 这些差异表达基因显著富集在7条通路中, 其中 P_{adj} 最小的通路为范可尼贫血通路, 其次为亨廷顿病、细胞衰老、肌萎缩侧索硬化症、嘌呤代谢、p53信号通路(表5)等。其中, p53信号通路参与生殖细胞的增殖、分化、筛选和程序性死亡的调控, 维持性腺稳态。

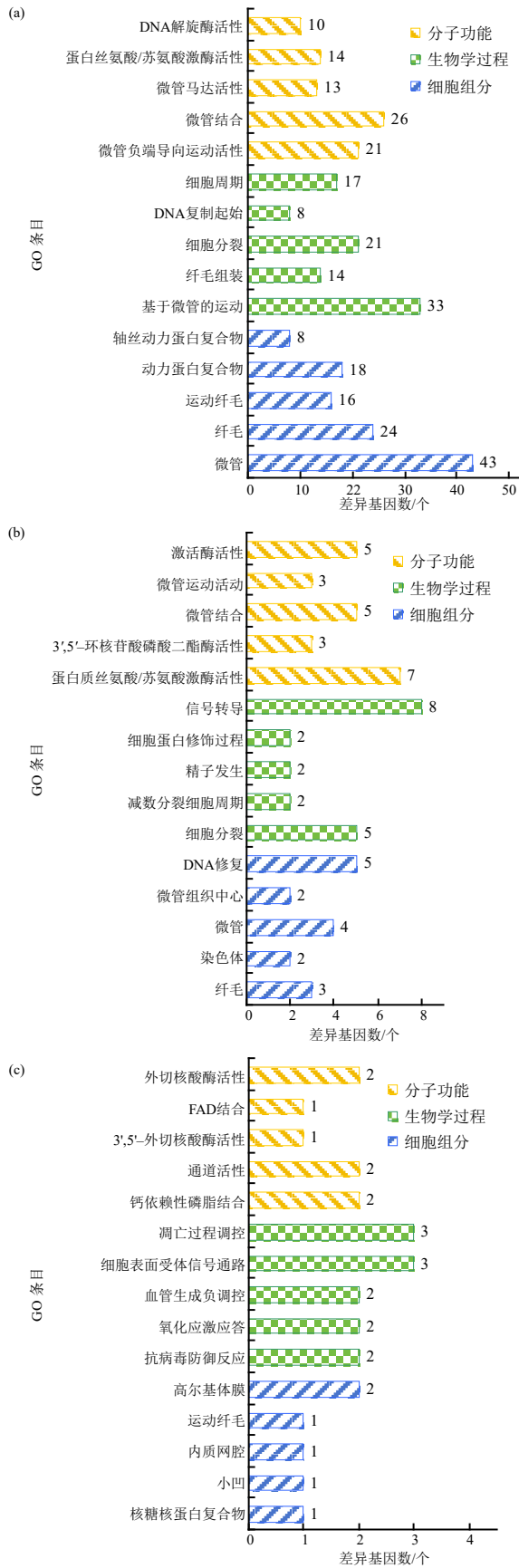
2.2.2 雌性和雌雄同体河蚬性腺差异表达基因分析结果

通过比较H(雌雄同体)组和F(雌性)组(H vs. F)的数据, 共鉴定出902个差异表达基因, 其中258个基因表达上调, 644个基因表达下调(表4)。从图1(b)可知, 差异基因在生物学过程中主要富集在细胞分裂、减数分裂细胞周期、精子发生等条目中; 在细胞组分中主要富集在纤毛、染色体、微管、微管组织中心等条目中; 在分子功能中主要富集在蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性、3',5'-环核苷酸磷酸二酯酶活性、微管结合等条目中。KEGG富集分析结果

表4 河蚬性腺中不同比较组的DEGs结果统计

Table 4 Statistics of results for DEGs in gonads of *Corbicula fluminea* among different comparison groups

比较组	DEGs总数/个	上调基因数/个	下调基因数/个
M vs. F	4 467	958	3 509
H vs. F	902	258	644
H vs. M	511	292	219



图中每一大类内GO条目自下而上 P_{adj} 依次增大。

(a) M vs. F; (b) H vs. F; (c) H vs. M

图1 不同性别组河蚬性腺DEGs富集的前5条GO条目

Fig. 1 Top 5 GO terms enriched by gonadal DEGs among different sexual groups of *Corbicula fluminea*

表5 不同性别组河蚬性腺DEGs富集的前7条KEGG通路

Table 5 Top 7 KEGG pathways enriched by gonadal DEGs among different sexual groups of *Corbicula fluminea*

组别	KEGG通路	差异基因数/个	P_{adj}
M vs. F	范可尼贫血通路	14	2.58E-04
	亨廷顿病	41	3.39E-04
	细胞衰老	25	4.06E-04
	肌萎缩侧索硬化症	45	4.06E-04
	嘌呤代谢	20	5.06E-03
	p53信号通路	13	9.63E-03
	硫胺素代谢	5	3.51E-02
H vs. F	卵母细胞减数分裂	8	1.97E-02
	细胞衰老	8	1.97E-02
	孕酮介导的卵母细胞成熟	5	1.97E-02
	细胞周期	6	2.46E-02
	NOD样受体信号通路	10	3.84E-02
	细胞凋亡	9	1.04E-01
	帕金森病	8	1.83E-01
H vs. M	NF- κ B信号通路	5	0.311 7
	cGMP-PKG信号通路	5	0.311 7
	TGF- β 信号通路	3	0.311 7
	Th1和Th2细胞分化	3	0.311 7
	内分泌抵抗	3	0.453 4
	甲状腺激素信号通路	3	0.564 7
	胞质DNA感知通路	2	0.564 7

显示, 这些差异表达基因显著富集在5条通路中, 其中 P_{adj} 最小的通路是卵母细胞减数分裂、细胞衰老和孕酮介导的卵母细胞成熟, 其次是细胞周期、NOD样受体信号通路(表5)。

2.2.3 雄性和雌雄同体河蚬性腺差异表达基因分析结果

通过比较H(雌雄同体)组和M(雄性)组(H vs. M)的数据, 共鉴定出511个差异表达基因, 其中292个基因表达上调, 219个基因表达下调(表4)。从图1(c)可知, 差异基因在生物学过程主要富集在抗病毒防御反应、氧化应激应答、血管生成负调控等条目; 在细胞组分中主要富集在核糖核蛋白复合物、小凹、内质网腔、运动纤毛等条目; 在分子功能中主要富集在钙依赖性磷脂结合、通道活性、3',5'-外切核酸酶活性等条目。KEGG富集分析结果显示, 这些差异表达基因共富集到183条通路中, 但所有通路均不显著富集, 其中值得注意的通路是NF- κ B信号通路、cGMP-PKG信号通路、TGF- β 信号通路、Th1和Th2细胞分化通路(表5)等, 这些通路主要参与调控性别分化、配子发生、性腺周期发育、细胞分化等, 可

能参与生殖细胞的增殖和分化过程。

2.3 河蚬性别相关基因筛选结果

基于差异表达分析结果,根据已有文献报道,进一步从差异表达基因中筛选出9个与性别分化和性腺发育相关的候选基因,结果如表6所示。其中,*Fem-1*可能在性别决定或分化中发挥重要作用,而*Vmol*、*Spag17*、*Spata7*、*Tepp*、*Tssk*、*Sfp2*、*Spag6*

和*Spag8*可能参与配子发生。在M vs. F组中,*Spag17*、*Spata7*、*Spag8*、*Tepp*、*Sfp2*、*Tssk*、*Spag6*和*Fem-1*在雄性性腺中的表达量显著高于雌性性腺中的;在H vs. F组中,*Vmol*的表达量显著上调, \log_2FC 为10.98,*Tssk*的表达量显著下调, \log_2FC 为-10.92;在H vs. M组中,*Vmol*的表达量显著上调, \log_2FC 为8.11。

表6 河蚬性别相关候选基因

Table 6 Sex-related candidate genes of *Corbicula fluminea*

功能类别	差异表达基因ID	基因名称	注释信息	\log_2FC		
				M vs. F	H vs. F	H vs. M
卵巢发育	Unigene40568	<i>Vmol</i>	卵黄膜外层蛋白1	2.81	10.98*	8.11*
精子发生	Unigene8107	<i>Tepp</i>	睾丸/前列腺/胎盘表达蛋白	-3.67*	-1.93	1.66
	Unigene362	<i>Spag17</i>	精子相关抗原17	-4.34*	-2.40	1.87
	Unigene652	<i>Sfp2</i>	精子鞭毛蛋白2	-5.29*	-3.08	2.15
	Unigene8717	<i>Spata7</i>	精子发生相关蛋白7	-5.16*	-3.31	1.78
	Unigene8679	<i>Spag6</i>	精子相关抗原6	-4.09*	-1.68	2.33
	Unigene43163	<i>Spag8</i>	精子相关抗原8	-3.10*	-0.73	2.29
	Unigene8666	<i>Tssk</i>	睾丸特异性丝氨酸/苏氨酸激酶	-13.13*	-10.92*	2.07
	性别决定/分化	Unigene16690	<i>Fem-1</i>	性别决定蛋白FEM-1	-7.70*	-5.17

注: *表示 $P_{adj} < 0.05$ 。

2.4 河蚬性别相关基因的qRT-PCR验证结果

为了验证沅江河蚬性腺转录组测序数据的真实可靠性,挑选*Fem-1*、*Spag17*、*Spag6*、*Spata7*、*Spag8*、*Tepp*、*Sfp2*等7个差异表达基因和内参基因(*β -actin*)进行qRT-PCR验证。从图2可知,转录组测序中各基因表达量的 $\log_2FC_{(RNA-seq)}(y)$ 与qRT-PCR结果中各基因表达量的 $\log_2FC_{(qRT-PCR)}(x)$ 回归分析的

决定系数(R^2)为0.822 1,这表明两者的结果基本一致,转录组数据可靠。

3 结论与讨论

本研究采用RNA-seq技术,对湖南沅江三性异体的河蚬群体的性腺发育和性别决定或分化相关的候选基因进行研究,结果显示,共生成562 386个高质量转录本,鉴定出213 504个DEGs;在此基础上,进一步筛选出9个与性腺发育和性别分化相关的候选基因,其中*Fem-1*可能参与性别决定或分化,*Spag17*、*Spata7*、*Tepp*、*Tssk*、*Sfp2*、*Spag6*和*Spag8*可能与精子发生有关,*Vmol*可能参与卵巢发育。

*Fem-1*在雄性性腺中产生雄性激素,是雄性和雌雄同体个体产生精子所必需的基因^[28]。*Fem-1a*、*Fem-1b*和*Fem-1c*都是*Fem-1*基因家族^[29]的成员。在缢蛏(*Sinonovacula constricta*)^[30]中,*Fem-1b*和*Fem-1c*在雄性性腺中均被检测到,且其表达水平在雄性性腺中最高,推测其在性别决定或分化中可能发挥作用。在池蝶蚌(*Hyriopsis schlegelii*)^[31]中,雄性性腺中*Fem-1a*的表达水平显著高于雌性性腺的,

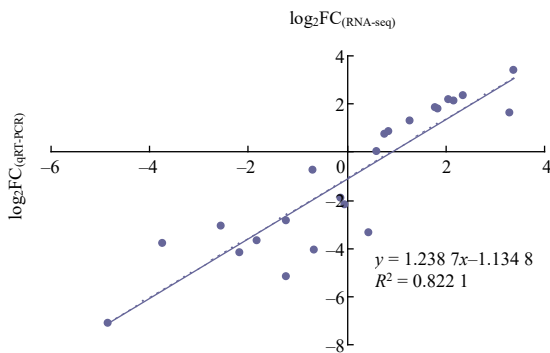


图2 转录组测序中各基因表达量的 $\log_2FC_{(RNA-seq)}$ 与qRT-PCR结果中各基因表达量的 $\log_2FC_{(qRT-PCR)}$ 的回归分析结果

Fig. 2 Regression analysis of \log_2FC values from RNA-seq and qRT-PCR for gene expression levels

其表达量随着雄性性腺的发育而增加,推测*Fem-1a*可能在雄性性腺发育或精子发生中起着至关重要的作用。与前人的研究结果相似,本研究中也发现雄性性腺中*Fem-1*的表达量显著高于雌性性腺的。因此,推测*Fem-1*可能在河蚬的性别分化和早期精子发生中起作用。

精子发生是一个包含有丝分裂增殖、减数分裂和精子形成的复杂过程,许多基因可能与这一过程有关^[32]。研究^[33]证实,SPAG6蛋白是精子尾轴突结构完整性或正常组装的必需蛋白,同时也是纤毛和鞭毛运动的关键调控蛋白。对青蛤的研究^[9]表明,雄性性腺中*Spag6*的表达水平高于雌性性腺中的,这表明*Spag6*在青蛤精子发生过程中发挥重要作用。*Spag17*和*Sfp2*对于雄性生殖和精子活力十分重要^[34-36],在小鼠中*Spag17*突变可导致小鼠精子活力下降^[35]。在虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)^[36]中,*Sfp2*和*Spag17*在雄性性腺中的表达量高于雌性的,推测其可能与精子发生有关。在鳞砗磲(*Tridacna squamosa*)^[34]中,*Spata17*和*Spata8*被证实参与调控精子发生过程。本研究中,河蚬雄性性腺中*Spag17*、*Spata7*、*Tepp*、*Sfp2*、*Spag6*和*Spag8*的表达水平高于雌性的,推测这些基因可能参与河蚬的精子发生。TSSK家族的5个成员*Tssk1*、*Tssk2*、*Tssk3*、*Tssk4*、*Tssk5*参与贝类精子发生过程,通过磷酸化鞭毛相关蛋白来调控鞭毛组装^[37-38]。LI等^[39]在*Atrina pectinata*中发现*Tssk1*只在雄性性腺中表达,在成熟精巢中表达量最高,表明*Tssk1*可能参与其精子发生。KIM等^[38]比较了皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)二倍体和三倍体雄性个体*Tssk1*的表达,发现*Tssk1*主要在减数分裂后阶段表达。本研究中,*Tssk*在雄性性腺中的表达水平高于雌性的,在雌雄同体中的表达水平也高于雌性的,推测*Tssk*可能参与河蚬的精子发生。而在雄性和雌性组的比较中,差异基因富集到运动纤毛、轴丝动力蛋白复合物、纤毛、微管等参与精子和纤毛运动的GO条目;在雄性和雌雄同体组的比较中,差异基因同样富集到运动纤毛等相关GO条目;在雄性雌雄同体和雌性组的比较中,差异基因同样富集到纤毛、微管、微管运动活性等相关GO条目,这也可推测上述这些基因可能参与精子发生。

VMO1是一种外源性蛋白质,在鸟类卵黄和蛋

清的分离过程中具有重要作用^[40],其mRNA的表达目前还局限于雌性卵生动物的某些组织和细胞,而不是在卵巢中^[41]。CHEN等^[42]克隆了凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的*Vmol*的同源物*Lv-Vmol*,发现*Lv-Vmol*在未成熟和成熟雌虾的肝胰腺中均有表达,但在卵巢中几乎没有表达。*Lv-VMO1*是一种来源于肝胰腺的分泌蛋白,分布于肝胰腺细胞和卵巢卵母细胞的细胞质中,在凡纳滨对虾的血淋巴中循环并转运到卵巢。本研究中,*Vmol*在河蚬的性腺中表达,且在雌性和雄性性腺中的表达水平均显著高于雌雄同体的,这与凡纳滨对虾中报道的结果不同,推测*Vmol*可能与河蚬的卵巢发育有关。目前,有关*Vmol*在水生双壳类中的功能尚不清楚,其具体作用机制仍有待在河蚬和其他双壳类中进一步研究。

尽管转录组测序数据能够提供基因表达水平的全局信息,并有助于筛选潜在的关键调控基因,但基因表达量的变化无法直接证实其功能机制。因此,后续可通过RNA干扰等技术构建基因敲除或敲低模型,并结合免疫共沉淀等分子互作研究,进一步验证候选基因的功能,以更全面地解析这些基因的调控网络及其在生殖系统中的生物学意义。

参考文献:

- [1] TEJIMA K, YAMADA M, HOUKI S, et al. Coexistence of hermaphrodites and males in androgenetic clam *Corbicula fluminea* Müller in Shirakawa River, Kyoto, Japan[J]. Journal of Shellfish Research, 2020, 39(2): 337.
- [2] GODIN V N. Trioecy in flowering plants[J]. Doklady Biological Sciences, 2022, 507(1): 301-311.
- [3] OYARZÚN P A, NUÑEZ J J, TORO J E, et al. Trioecy in the marine mussel *Semimytilus algosus* (Mollusca, Bivalvia): stable sex ratios across 22 degrees of a latitudinal gradient[J]. Frontiers in Marine Science, 2020, 7: 348.
- [4] 王梅芳, 余祥勇, 刘永, 等. 马氏珠母贝雌雄同体和自体受精的研究[J]. 水生生物学报, 2006, 30(4): 420-424.
- [5] WU R W, CHEN T H, ZANATTA D T, et al. Reproductive traits of nine freshwater mussel species (Mollusca: Unionidae) from Poyang Lake, China[J]. Journal of Molluscan Studies, 2018, 84(3): 324-332.
- [6] SHI Y, LIU W G, HE M X. Proteome and transcriptome analysis of ovary, intersex gonads, and testis reveals potential key sex reversal/differentiation genes and mechanism in scallop *Chlamys nobilis* [J]. Marine

- Biotechnology, 2018, 20(2): 220–245.
- [7] DÍAZ-MARTÍNEZ J P, MEJÍA-GUTIÉRREZ L M, ISLAS-VILLANUEVA V, et al. Trioecy is maintained as a time-stable mating system in the pink sea urchin *Toxopneustes roseus* from the Mexican Pacific[J]. Scientific Reports, 2022, 12(1): 21408.
- [8] ROMO PIÑERA A K, CEBALLOS- VÁZQUEZ B P, GARCÍA-DOMÍNGUEZ F, et al. Unusual high frequency of hermaphroditism in the gonochoric bivalve *Megapitaria squalida*(Sowerby, 1835)(Veneridae) [J]. Journal of Shellfish Research, 2009, 28(4): 785–789.
- [9] LIU M M, NI H W, RONG Z C, et al. Gonad transcriptome analysis reveals the differences in gene expression related to sex-biased and reproduction of clam *Cyclina sinensis*[J]. Frontiers in Marine Science, 2023, 9: 1110587.
- [10] SANTERRE C, SOURDAINE P, ADELIN B, et al. Cg-SoxE and Cg-β-catenin, two new potential actors of the sex-determining pathway in a hermaphrodite lophotrochozoan, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2014, 167: 68–76.
- [11] SHI Y, YAO G Y, ZHANG H, et al. Proteome and transcriptome analysis of gonads reveals intersex in *Gigantidas haimaensis*[J]. BMC Genomics, 2022, 23(1): 174.
- [12] PI J, TANG Y X, COUGHLAN N E, et al. Temperature drives reproductive activity in a rare trioecy population of *Corbicula clams*[J]. Hydrobiologia, 2025, 852(5): 1215–1229.
- [13] 吴丛迪. 洪泽湖河蚬繁殖特性及黑黄壳色遗传差异分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2019.
- [14] 占江凡. 长江中下游湖泊蚬的遗传结构与性别特征[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2020.
- [15] MORTON B. The sexuality of *Corbicula fluminea* (Müller) in lentic and lotic waters in Hong Kong[J]. Journal of Molluscan Studies, 1983, 49(1): 81–83.
- [16] QIU A D, SHI A J, KOMARU A. Yellow and brown shell color morphs of *Corbicula fluminea*(Bivalvia: Corbiculidae) from Sichuan Province, China, are triploids and tetraploids[J]. Journal of Shellfish Research, 2001, 20: 323–328.
- [17] PI J, WANG X, COUGHLAN N E, et al. Reproductive activity of an androdioecious population of clams of the genus *Corbicula*[J]. Journal of Molluscan Studies, 2024, 90(2): eyae017.
- [18] 裴宏谦, 占江凡, 秦玲, 等. 洞庭湖流域沅江河蚬属贝类的倍性研究[J]. 生命科学研究, 2020, 24(6): 452–458, 465.
- [19] ISHIBASHI R, OOKUBO K, AOKI M, et al. Androgenetic reproduction in a freshwater diploid clam *Corbicula fluminea*(Bivalvia: Corbiculidae)[J]. Zoological Science, 2003, 20(6): 727–732.
- [20] CHEN S F, ZHOU Y Q, CHEN Y R, et al. Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor[J]. Bioinformatics, 2018, 34(17): i884–i890.
- [21] BROWN J, PIRRUNG M, MCCUE L A. FQC Dashboard: integrates FastQC results into a web-based, interactive, and extensible FASTQ quality control tool[J]. Bioinformatics, 2017, 33(19): 3137–3139.
- [22] GRABHERR M G, HAAS B J, YASSOUR M, et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome[J]. Nature Biotechnology, 2011, 29(7): 644–652.
- [23] FU L M, NIU B F, ZHU Z W, et al. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data[J]. Bioinformatics, 2012, 28(23): 3150–3152.
- [24] LANGMEAD B, SALZBERG S L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2[J]. Nature Methods, 2012, 9(4): 357–359.
- [25] LI B, DEWEY C N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome[J]. BMC Bioinformatics, 2011, 12(1): 323.
- [26] 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.
- [27] YU G C, WANG L G, HAN Y Y, et al. ClusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters[J]. OMICS: A Journal of Integrative Biology, 2012, 16(5): 284–287.
- [28] DONIACH T, HODGKIN J. A sex-determining gene, *fem-1*, required for both male and hermaphrodite development in *Caenorhabditis elegans*[J]. Developmental Biology, 1984, 106(1): 223–235.
- [29] 周祖阳, 李琪, 于红, 等. 长牡蛎*Fem-1*基因cDNA克隆和表达分析[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2018, 48(6): 45–54.
- [30] YAO H H, LIN Z H, DONG Y H, et al. Gonad transcriptome analysis of the razor clam(*Sinonovacula constricta*) revealed potential sex-related genes[J]. Frontiers in Marine Science, 2021, 8: 725430.
- [31] 方磊. 池蝶蚌性别相关基因*feminization-1a*基因的分子特征及表达分析[D]. 南昌: 南昌大学, 2016.
- [32] DE KRETZER D M, LOVELAND K L, MEINHARDT A, et al. Spermatogenesis[J]. Human Reproduction, 1998, 13(S1): 1–8.
- [33] ZHENG D F, WANG Q, WANG J P, et al. The emerging role of sperm-associated antigen 6 gene in the microtubule function of cells and cancer[J]. Molecular Therapy: Oncolytics, 2019, 15: 101–107.
- [34] LI J, ZHOU Y Y, ZHOU Z H, et al. Comparative transcriptome analysis of three gonadal development

- stages reveals potential genes involved in gametogenesis of the fluted giant clam(*Tridacna squamosa*)[J]. *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 872.
- [35] KAZARIAN E, SON H, SAPAO P, et al. SPAG17 is required for male germ cell differentiation and fertility[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(4): 1252.
- [36] YANG D, YIN C, CHANG Y Q, et al. Transcriptome analysis of male and female mature gonads of Japanese scallop *Patinopecten yessoensis*[J]. *Genes & Genomics*, 2016, 38: 1041–1052.
- [37] LI Y, SOSNIK J, BRASSARD L, et al. Expression and localization of five members of the testis-specific serine kinase(Tssk) family in mouse and human sperm and testis[J]. *Molecular Human Reproduction*, 2011, 17(1): 42–56.
- [38] KIM E J, KIM S J, PARK C J. Characterization of testis-specific serine/threonine kinase 1-like(*TSSK1-like*) gene and expression patterns in diploid and triploid Pacific abalone(*Haliotis discus hannai*; Gastropoda: Mollusca) males. *PLoS One*, 14(12): e0226022.
- [39] LI H H, KONG L F, YU R H, et al. Characterization, expression, and functional analysis of testis-specific serine/threonine kinase 1(Tssk1) in the pen shell *Atrina pectinata*[J]. *Invertebrate Reproduction & Development*, 2016, 60(2): 118–125.
- [40] LEE S I, JI M R, JANG Y J, et al. Characterization and miRNA-mediated posttranscriptional regulation of vitelline membrane outer layer protein I in the adult chicken oviduct[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology: Animal*, 2015, 51(3): 222–229.
- [41] LIM W, SONG G. Differential expression of vitelline membrane outer layer protein 1: hormonal regulation of expression in the oviduct and in ovarian carcinomas from laying hens[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2015, 399: 250–258.
- [42] CHEN X L, YANG H, RUAN Y, et al. Pacific white shrimp(*Litopenaeus vannamei*) vitelline membrane outer layer protein 1(VMO1) is produced in the hepatopancreas and transported into ovarian oocytes during vitellogenesis[J]. *Gene*, 2023, 851: 147027.

责任编辑: 邹慧玲

英文编辑: 罗维

(上接第73页)

- [21] 尹韬. 冰糖橙果实大小形成的生理结构分析[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2023.
- [22] SADKAA, SHLIZERMAN L, KAMARA I, et al. Primary metabolism in citrus fruit as affected by its unique structure[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 1167.
- [23] MAUXION J P, CHEVALIER C, GONZALEZ N. Complex cellular and molecular events determining fruit size[J]. *Trends in Plant Science*, 2021, 26(10): 1023–1038.
- [24] 刘春卫. 果实生长的细胞学基础[J]. *生物学通报*, 1990, 25(1): 11.
- [25] DEVOGHALAERE F, DOUCEN T, GUITTON B, et al. A genomics approach to understanding the role of auxin in apple(*Malus × domestica*)fruit size control[J]. *BMC Plant Biology*, 2012, 12(1): 7.
- [26] CHENG G W, BREEN P J. Cell count and size in relation to fruit size among strawberry cultivars[J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 1992, 117(6): 946–950.
- [27] 张波, 张杰, 张颜, 等. GA信号因子SIMYB33对番茄开花时间及果实大小的影响[J]. *西北农业学报*, 2020, 29(12): 1859–1866.
- [28] GUAN H L, YANG X L, LIN Y X, et al. The hormone regulatory mechanism underlying parthenocarpic fruit formation in tomato[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2024, 15: 1404980.
- [29] 张溃珍, 刘焕. 赤霉素对‘摩尔多瓦’葡萄花序长短及果粒大小的影响[J]. *中国园艺文摘*, 2015, 31(11): 61, 174.
- [30] 刘静, 董阳, 农慧兰, 等. GA₃处理下葡萄果形变化及其生理和分子机制[J]. *江苏农业科学*, 2023, 51(2): 153–159.
- [31] 闫国华, 甘立军, 孙瑞红, 等. 赤霉素和细胞分裂素调控苹果果实早期生长发育机理的研究[J]. *园艺学报*, 2000, 27(1): 11–16.

责任编辑: 伍锦花

英文编辑: 张承平