

DOI: 10.12264/JFSC2022-0392

刀鲚内皮素 1 基因 SNP 多态性及其与颌骨性状关联分析

高俊¹, 周琳², 聂志娟¹, 王耀辉³, 徐钢春¹

1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业农村部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081;
2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;
3. 南通龙洋水产有限公司, 江苏 南通 226634

摘要: 为探究刀鲚(*Coilia nasus*)内皮素 1 (endothelin 1, *Edn1*)基因对刀鲚上颌骨长度的影响, 根据此前的基因组重测序结果以及刀鲚基因组数据库, 通过 PCR 扩增得到刀鲚 *Edn1* 基因序列, 并使用直接测序法筛选并分析单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点, 分析各位点的基因型, 并计算各位点的基本遗传参数、基因型频率和基因频率, 将筛选出的 SNP 位点与刀鲚上颌骨长度性状进行关联分析、连锁不平衡分析和双倍型分析。结果表明, 在刀鲚 *Edn1* 基因中共挖掘出 5 个 SNP 位点, 分别为 *T134C*、*A418C*、*G1322A*、*C1607T*、*A1636C*。*G1322A* 与 *A1636C* 两个位点之间处于连锁不平衡状态。关联分析结果显示, *T134C* 位点和 *A418C* 位点与上颌骨长度性状之间存在显著相关性; 双倍型分析结果显示, *T134C* 位点和 *A418C* 位点组成的双倍型中, D3 (杂合 TC 和纯合 AA)的上颌骨长度显著长于 D1 (纯合 TT 和杂合 AC)和 D2 (纯合 TT 和纯合 CC)。此外, 刀鲚开口高度/头长和上颌骨长/头长的皮尔逊相关系数 $r=0.41$, 属中等正相关。研究结果表明, *T134C* 位点和 *A418C* 位点是刀鲚上颌骨长度的优势位点, 双倍型 D3 为优势基因型。本研究可为刀鲚长颌骨分子标记辅助选育的候选标记提供科学依据。

关键词: 刀鲚; *Edn1* 基因; 性状关联分析; 双倍型分析; 连锁不平衡

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2023)03-0259-09

刀鲚(*Coilia nasus*)上颌骨的长度作为最直观的表型, 一直被认为是区别刀鲚不同生态类群的主要特征。随着越来越多的刀鲚定居型种群的发现, 如“江鲚鱼”、“海鲚鱼”, 长颌和短颌刀鲚在生态上的差异变得模糊。目前, 越来越多的研究表明, 短颌鲚仅为刀鲚的淡水生态型, 并非有效物种, 如程起群^[1]基于线粒体 DNA 上的 *Cyt b*、12S rRNA 和 16S rRNA 基因片段序列进行的分子系统发育分析发现, 刀鲚、湖鲚构成一个单系类群。类似的, 陈迪^[2]研究发现长江水系的舟山、飞云江及太湖刀鲚和洞庭湖短颌鲚等群体间无明显的分化。目前, 野生刀鲚资源上颌骨长度性状分化已得到证实, 溯河洄游产卵刀鲚群体和溯海洄游育

肥幼鱼群体都存在长、短颌的不同比例且存在过渡型, 且在不同时间、不同江段都存在差异^[3-5]; 此外, 太湖、菜子湖甚至池塘养殖的刀鲚群体也存在同样的上颌骨长度性状分化的现象。这种情况不仅出现在野生型, 养殖刀鲚也存在这种现象。虽然学术界对于刀鲚、湖鲚和短颌鲚的定义和区分存在分歧, 但消费者区分这 3 个刀鲚种群的标准仍然主要依据颌骨长度, 即颌骨超过胸鳍基部的为刀鲚, 颌骨未超过鳃盖骨的为短颌鲚。众所周知, 长颌刀鲚与短颌鲚的价格具有天壤之别。然而颌骨性状的分化以及短颌养殖刀鲚的出现, 降低了长颌养殖刀鲚的产出效率, 间接地增加了养殖成本, 而培育具有长颌性状的刀鲚是今

收稿日期: 2022-11-07; 修订日期: 2022-12-01.

基金项目: 江苏省自然科学基金面上项目(BK20191145); 江苏省种业振兴“揭榜挂帅”项目(JSQS[2021]134).

作者简介: 高俊(1992-), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向为水产动物苗种繁育及健康养殖. Email: gaojun@ffrc.cn

通信作者: 徐钢春, 研究员, 博导, 研究方向为水生动物苗种繁育及生态养殖. Email: xugc@ffrc.cn

后刀鲚养殖的发展趋势。

内皮素 1 (endothelin 1, Edn1)是 3 种已知的内皮素肽之一, 每种肽可以合成为较大的前肽前体, 随后被 Furin 蛋白酶和内皮素转化酶(endothelin converting enzymes, ECE)修饰成成熟配体。这些信号通过两种 G 蛋白偶联受体 Ednra 和 Ednrb 调节神经嵴以及颌骨的发育^[6-7]。目前在小鼠(*Mus musculus*)和斑马鱼(*Danio rerio*)中, 颌骨发育相关的分子机制已经阐明。在小鼠和斑马鱼中, 分泌肽内皮素 1 是颌骨发育以及第二或舌骨咽弓的骨骼元素所必需的^[8-10]。Edn1 受体 Ednra 的靶向失活产生和 Edn1 失活均能够导致小鼠颌骨发育障碍和其他咽部骨骼元素的严重畸形^[11]。鸡胚中 Ednra 的药理学失活同样能够导致类似的颌骨形成中断^[12]。在斑马鱼中, 通过 Edn1 反义吗啉代寡核苷酸(Edn1-MOs)逐步减少 Edn1, 发现腹侧咽软骨形成逐步减少^[10]。Edn1-Ednra 信号传导对于颌骨发育形成至关重要。而有关内皮素 1 基因多态性对其他鱼类颌骨形成的影响则尚无报道。因此, 本研究结合此前基因组重测序结果, 查询并验证内皮素 1 基因单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点, 并将筛选的 SNP 位点与刀鲚颌骨长度形状进行关联分析, 以期阐释刀鲚颌骨长短不一的分子机制以及为长颌骨刀鲚选育提供候选标记。

1 材料与方法

1.1 实验样品的采集

用于本实验的刀鲚取自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心扬中科研实验基地(中国, 扬中)。随机选取 200 尾同批繁殖、同塘饲养的健康无畸形的刀鲚用于 *Edn1* 基因 SNP 的鉴定筛选以及颌骨性状关联分析。测量体重、体长、头长、上颌骨长以及开口高度(两颌张开的最大高度), 并取肌肉和尾鳍, 立即放入液氮中, 带回实验室后-80 ℃保存。

1.2 基因组 DNA 提取

使用 universal genomic DNA kit (康为世纪, 江苏, 泰州)提取刀鲚尾鳍 DNA, DNA 质量和浓度分别通过 1.0%琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光

度计测定。

1.3 SNP 筛选

根据此前的基因组重测序结果以及刀鲚基因组数据库(GenBank assembly accession: GCA_007927625.1)获得刀鲚内皮素 1 基因序列, 并使用 Primer Premier 5.0 设计 3 对引物(表 1)。从 200 个刀鲚 DNA 样本中随机挑选 30 个 DNA 样本通过 PCR 扩增 3 对引物的产物。PCR 反应体系(25.0 μL): DNA 模板 1.0 μL; 上下游引物(10.0 μmol/L)各 1.0 μL; 2×Taq Plus Master Mix (Vazyme, 南京, 中国) 12.5 μL; ddH₂O 9.5 μL。PCR 扩增程序: 94 ℃预变性 5 min; 94 ℃变性 30 s, 60 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 1 min, 共进行 40 个循环; 最后 72 ℃延伸 10 min, 4 ℃保存。扩增后的产物交由金唯智生物科技有限公司(苏州, 中国)进行 Sanger 测序。测序后序列通过 ClustalX 2.1 (<http://www.clustal.org/clustal2/>)软件进行序列比对, 筛选 SNP 位点。

表 1 本研究中所使用的引物
Tab. 1 Primers used in present study

名称 name	序列(5'-3') sequence (5'-3')	产物长度/bp products length	退火温度 T _m /℃
1F	CGAAGGCGATGGCGGTGTCA	780	59.77
1R	TTTTGGCGGTGGTGCTGCCT		50.76
2F	TGTGCAGCGCTGGCATGGAG	719	60.32
2R	AGGGACCGCAGAAGCCGTCA		60.18
3F	TCGGAATCCTCACCCTGGCGT	727	59.64
3R	AGGCCACGTGCAACCTATGCC		59.71

1.4 SNP 分型

去除 1 个质量不合格的刀鲚尾鳍 DNA 样本后, 对 199 个刀鲚尾鳍 DNA 进行测序, 每个样品的 DNA 浓度为 400 ng/μL。通过直接测序法对序列进行分析, 运用 SnapGene Viewer 6.0.2 软件(www.snapgene.com)查看测序结果峰图, 查看已知位点的基因型, 确定 SNP 位点。

1.5 数据统计

使用 Excel 2019 计算各 SNP 位点的基因频率、基因型频率、纯合度、杂合度、多态信息含量、有效等位基因数。运用 SPSS 22.0 软件中的一般线性模型进行最小二乘方差对基因中的不同基因型与颌骨性状相关联分析, 一般线性模型为:

$Y_{ij}=\mu+G_i+e_{ij}$, 其中 Y_{ij} 表示某个性状第 i 基因型的第 j 个个体的生长性状测定值; μ 是样本均值; G_i 是基因型 i 的有效值; e_{ij} 为残差效应。结果使用平均值 $\pm$ 标准误($\bar{x}\pm SE$)表示, $P<0.05$ 认为显著相关。

2 结果与分析

2.1 刀鲚 *Edn1* 基因序列扩增和 SNP 位点筛选

去除两端低质量碱基后, 3 对引物在 30 个

DNA 样本中分别扩增得到 730 bp、660 bp 和 680 bp 左右的片段。通过 ClustalX 2.1 软件进行序列比对, 共筛选出 5 个 SNP 位点。从起始密码子 ATG 开始分别为 *T134C*、*A418C*、*A1322G*、*C1697T*、*A1636C*(图 1)。其中, *A418C* 和 *C1697T* 为外显子突变, *A418C* 为同义突变, *C1697T* 为错义突变; *T134C*、*A1322G* 和 *A1636C* 为内含子突变(图 2)。

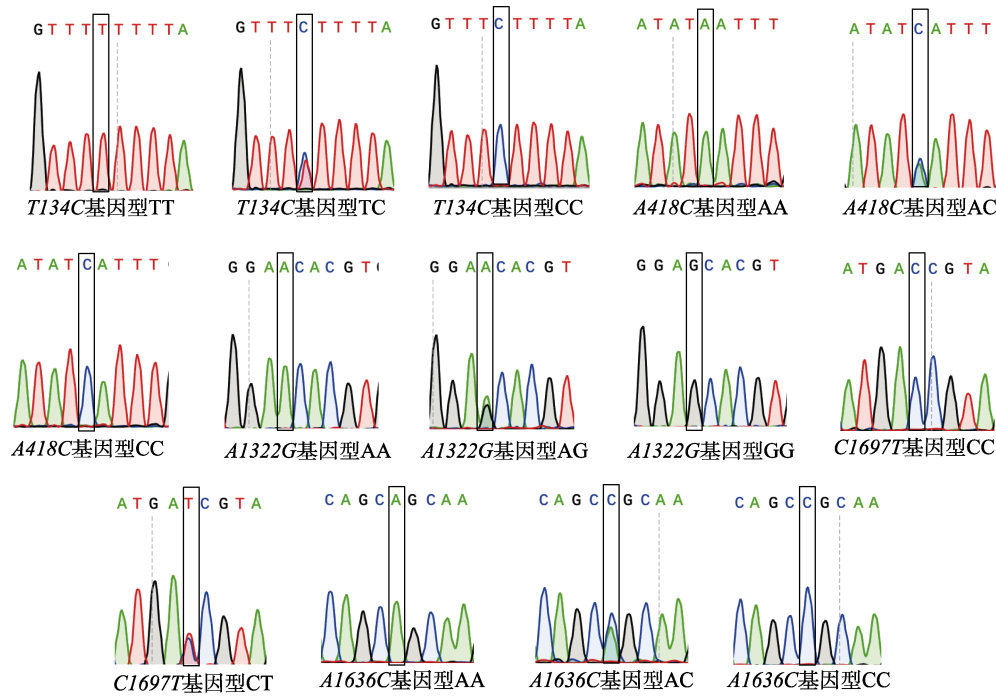


图 1 刀鲚 *Edn1* 基因 5 个 SNP 位点基因型

Fig. 1 The five SNP locus genotypes of *Edn1* gene in *Coilia nasus*

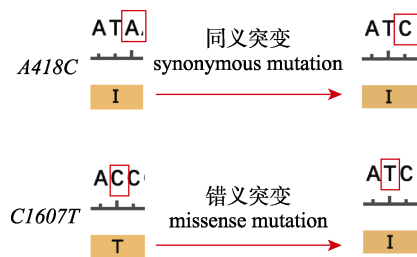


图 2 刀鲚 *Edn1* 基因 2 个外显子 SNP 氨基酸变化

I: 异亮氨酸, T: 苏氨酸.

Fig. 2 Amino acid changes of 2 exon SNPs of *Edn1* gene in *Coilia nasus*

I: isoleucine, T: threonine.

2.2 刀鲚 *Edn1* 基因 SNPs 在刀鲚群体中的多态性

通过直接测序和 Snap Gene 软件处理后, 得到的刀鲚 *Edn1* 基因的 5 个 SNP 位点的遗传参数

如表 2 所示。PIC>0.5 时, 该位点为高度多态; 0.25<PIC<0.5 时, 该位点为中度多态; PIC<0.25 时, 该位点为低度多态^[13]。刀鲚 *Edn1* 基因 5 个 SNP 位点中, 除 *C1607T* 为低度多态外, 其余位点均为中度多态。

刀鲚 *Edn1* 基因 5 个 SNP 位点的基因型、基因型频率和基因频率如表 3 所示。在 199 个刀鲚 DNA 样本中, *T134C* 的杂合基因型 TC 频率最高, 纯和基因型 CC 次之, 纯和基因型 TT 最低; 等位基因 C 的基因频率显著高于等位基因 T。*A418C* 的杂合基因型 AC 频率最高, 纯和基因型 AA 次之, 纯和基因型 CC 最低; 等位基因 A 的基因频率显著高于等位基因 C。*G1322A* 的杂合基因型 AG 频

率最高, 纯和基因型 AA 次之, 纯和基因型 GG 最低; 等位基因 A 的基因频率显著高于等位基因 G。*A1636C* 的杂合基因型 AC 频率最高, 纯和基因型 AA 次之, 纯和基因型 CC 最低; 等位基因 A 的基因频率显著高于等位基因 C。值得注意的是, 在 199 个刀鲚 DNA 样本中, *C1607T* 位点仅存在两种基因型 CC 和 CT, 并未发现纯合基因型 TT。*C1607T* 的纯合基因型 CC 频率最高, 杂合基因型 CT 最低; 等位基因 C 的基因频率显著高于等位基因 T。

表 2 刀鲚 *Edn1* 基因 5 个 SNP 位点的遗传参数
Tab. 2 The polymorphic parameters of five SNP sites of *Edn1* gene in *Coilia nasus*

SNP 位点 SNP locus	纯合度 H_o	杂合度 H_e	多态信息 含量 PIC	有效等位 基因数 N_e
<i>T134C</i>	46.3	53.7	0.48555	2.16
<i>A418C</i>	53.3	46.7	0.49255	1.87
<i>G1322A</i>	48.2	51.8	0.48555	2.07
<i>C1607T</i>	80.9	19.1	0.17195	1.24
<i>A1636C</i>	49.2	50.8	0.49020	2.03

表 3 刀鲚 *Edn1* 基因突变点基因型频率和等位基因频率
Tab. 3 Genotype and allele frequency of SNP sites of *Edn1* gene in *Coilia nasus*

SNP 位点 SNP locus	样本总数 total number	基因型频率/% (样本数) genotype frequency (sample number)		等位基因频率/% frequency of alleles	
<i>T134C</i>	199	TT	14.6 (29)	T	41.5
	199	TC	53.7 (107)	C	58.5
	199	CC	31.6 (63)		
<i>A418C</i>	199	AA	32.7 (65)	A	56.1
	199	AC	46.7 (93)	C	43.9
	199	CC	20.6 (41)		
<i>G1322A</i>	199	AA	32.6 (65)	A	58.5
	199	AG	51.8 (103)	G	41.5
	199	GG	15.6 (31)		
<i>C1607T</i>	199	CC	80.9 (161)	C	90.5
	199	CT	19.1 (38)	T	9.5
	199	TT	0 (0)		
<i>A1636C</i>	199	AA	31.6 (63)	A	56.9
	199	AC	50.8 (101)	C	43.1
	199	CC	17.6 (35)		

2.3 刀鲚 *Edn1* 基因 SNP 位点的连锁不平衡分析
通过 R 语言软件包 LDheatmap 对刀鲚 *Edn1*

基因 5 个 SNP 位点进行连锁不平衡分析(图 3)。图中颜色的深浅代表 r^2 的大小。 $r^2=0$ 时, 处于完全连锁平衡状态; $r^2=1$ 时, 处于完全连锁不平衡状态。 r^2 越接近于 1 表示连锁不平衡系数越大。由图可知, *G1322A* 与 *A1636C* 两个位点的 r^2 最高 ($r^2>0.8$), *T134C* 与 *G1322A* 和 *T134C* 与 *A1636C* 的 r^2 ($r^2<0.8$) 次之。

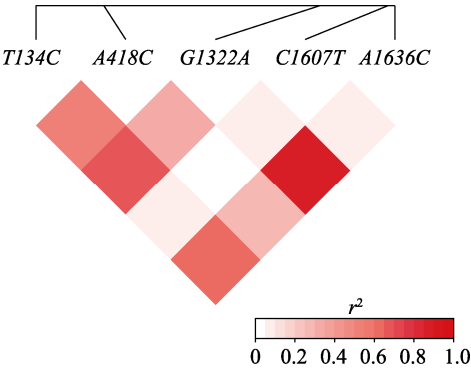


图 3 刀鲚 *Edn1* 基因 5 个 SNP 位点连锁不平衡分析
Fig. 3 Analysis of linkage disequilibrium of five SNP sites in *Edn1* gene of *Coilia nasus*

2.4 刀鲚 *Edn1* 基因 SNP 位点与颌骨性状关联分析

关联分析结果显示, *T134C* 位点和 *A418C* 位点的不同基因型对应的上颌骨长度之间存在显著差异($P<0.05$)(表 4)。其他位点的不同基因型对应的上颌骨长度之间无显著差异($P>0.05$)(表 4)。此外, 各个位点的不同基因型对应的上颌骨长度/头长之间无显著差异($P>0.05$)(表 4)。

生物性状的调控不只受单一位点影响, 而是多个位点或多个基因共同调控的结果, 仅分析某一位点并不能准确地得到相关性。因此, 笔者选择 *T134C* 位点和 *A418C* 位点组成双倍型, 进而进行刀鲚 *Edn1* 基因 *T134C* 位点和 *A418C* 位点双倍型与上颌骨长度性状的关联分析。关联分析结果显示, 在 *T134C* 位点和 *A418C* 位点组成的 5 个双倍型(去除掉 4 个频率小于 5% 的双倍型)在上颌骨长度性状上存在显著差异($P<0.05$)(表 5)。其中, D3 (杂合 TC 和纯合 AA)与 D1 (纯合 TT 和杂合 AC)之间, D3 与 D2 (纯合 TT 和纯合 CC)之间存在显著差异($P<0.05$)(表 5)。

表 4 刀鲚 *Edn1* 基因 5 个 SNP 位点与上颌骨长度性状的关联分析

Tab. 4 Association of five SNP loci of *Edn1* gene with maxilla length of *Coilia nasus*

SNP 位点 SNP locus	总数 total number	基因型 genotype	样本数 sample number	上颌骨长/mm maxilla length	上颌骨长/头长 maxilla length/head length
<i>T134C</i>	199	TT	29	20.10±1.38 ^b	1.04±0.21
	199	TC	107	22.75±1.21 ^a	1.03±0.10
	199	CC	63	22.88±1.12 ^a	0.98±0.11
<i>A418C</i>	199	AA	65	21.42±1.15 ^b	1.04±0.09
	199	AC	93	22.07±0.78 ^{ab}	1.03±0.06
	199	CC	41	23.40±1.28 ^a	0.98±0.12
<i>G1322A</i>	199	AA	65	21.16±1.44	0.99±0.13
	199	AG	103	21.27±1.26	1.04±0.14
	199	GG	31	21.13±1.21	1.04±0.09
<i>C1607T</i>	199	CC	161	21.14±1.78	1.03±0.08
	199	CT	38	21.52±1.32	1.04±0.16
	199	TT	0		
<i>A1636C</i>	199	AA	63	21.33±1.41	0.99±0.07
	199	AC	101	21.24±0.87	1.04±0.08
	199	CC	35	21.05±1.07	1.03±1.18

注: 同一位点不同字母代表基因型之间差异显著 ($P<0.05$).
Note: The different letters on the same locus represent significant difference among different genotypes ($P<0.05$).

表 5 刀鲚 *Edn1* 基因 *T134C* 位点和 *A418C* 位点双倍型与上颌骨长度性状的关联分析

Tab. 5 Association of *Edn1* gene diplotypes of *T134C* and *A418C* loci with maxilla length of *Coilia nasus*

双倍型 diplotype	<i>T134C</i> 基因型	<i>A418C</i> 基因型	样本数 sample number	频率/% radio	上颌骨长/mm maxilla length
D1	TT	AC	34	17.1	21.18±1.08 ^b
D2	TT	CC	25	12.5	21.45±1.32 ^b
D3	TC	AA	24	12.1	23.24±0.97 ^a
D4	TC	AC	61	30.0	22.47±0.89 ^{ab}
D5	CC	AA	33	16.6	21.60±0.93 ^{ab}

注: 不同字母代表双倍型间差异显著 ($P<0.05$).
Note: The different letters represent significant difference among different diplotypes ($P<0.05$).

2.5 颌骨长度与开口高度的相关性分析

为探究刀鲚开口高度和上颌骨长的相关性, 通过 Excel 绘制开口高度/头长和上颌骨长/头长的散点图(图 4), 并通过 SPSS 22.0 软件计算开口高度/头长和上颌骨长/头长的皮尔逊相关系数。 $r=0.41$ ($P<0.05$), 属中等程度正相关。

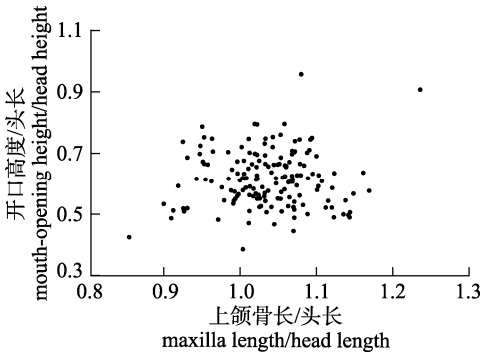


图 4 刀鲚开口高度/头长和上颌骨长/头长散点图

Fig. 4 Scatter diagram of mouth-opening height/head length and maxilla length/head length of *Coilia nasus*

3 讨论

Edn1 是 3 种已知的内皮素肽之一, 通过两种 G 蛋白偶联受体 *Ednra* 和 *Ednrb* 调节颌骨的发育^[6-7]。在小鼠和斑马鱼中, *Edn1* 是颌骨发育所必需的^[8-10]。刀鲚的上颌骨长度问题一直悬而未决。本研究基于此前基因组重测序结果, 筛选并验证了刀鲚 *Edn1* 基因的 SNPs 位点, 并将其与上颌骨长度性状进行关联分析, 首次发现刀鲚 *Edn1* 基因突变与上颌骨长度性状之间的关联关系。

利用基因遗传标记(SNPs 和微卫星等)进行辅助选育可大大提高选育效率^[14]。在本研究中, 通过 ClustalX 2.1 软件进行序列比对, 在刀鲚 *Edn1* 基因中共筛选出 5 个 SNP 位点。从起始密码子 ATG 开始分别为 *T134C*、*A418C*、*G1322A*、*C1607T*、*A1636C*。其中, *A418C* 和 *C1607T* 为外显子突变, 其中 *A418C* 为同义突变, *C1607T* 为错义突变; *T134C*、*G1322A* 和 *A1636C* 为内含子突变。通过 Snap Gene 软件对 5 个位点的基因型进行观察发现, *C1607T* 位点仅存在两种基因型 CC 和 CT, 并未发现纯合基因型 TT。这可能与纯合致死效应有关。错义突变导致翻译的氨基酸序列发生改变, 进而改变蛋白质的结构, 使其丧失相应的生物学功能, 最终导致个体死亡。卢氏绿壳蛋鸡位于 3 号染色体上的突变位点 *n.100005430 T>G*, 只存在野生纯合型(TT)和突变杂合型(TG)两种基因型, 推测该位点存在突变纯合致死现象^[15]。与其他基因型相比较, 纯合 *FAM122A* 缺失组织中凋亡细胞明显增多, 推测该位点存在突变

纯合致死现象^[16]。连锁不平衡(linkage disequilibrium, LD)是群体中不同位点等位基因的非随机关联现象,通常使用参数 D' 和 r^2 来评估连锁不平衡程度^[17]。然而 D' 值严格依赖于样本量的大小。如果样本量太小, D' 值的实际含义很容易被“夸大”^[18]。因此,本研究采用 r^2 值来评估连锁不平衡程度。 $r^2=0$ 时,处于完全连锁平衡状态; $r^2=1$ 时,处于完全连锁不平衡状态。 r^2 越接近于 1 表示连锁不平衡系数越大。本研究中,刀鲚 *Edn1* 基因 *G1322A* 与 *A1636C* 两个位点的 r^2 最高($r^2>0.8$),表明这两个位点连锁不平衡程度较高,处于连锁不平衡状态,猜测这两个位点可能存在连锁遗传。

通过关联分析,笔者发现 *T134C* 位点和 *A418C* 位点的不同基因型对应的上颌骨长度之间存在显著差异($P<0.05$)。SNPs 在各种生物基因组中广泛存在,编码区基因突变可能会造成蛋白结构变化,进而影响蛋白功能。刀鲚 *Edn1* 基因 *T134C* 位点位于内含子。传统观念认为,基因内含子与翻译氨基酸无关,被认为是无用序列。但最近的研究指出,内含子突变可导致 mRNA 的剪切(splicing)异常,进而引起蛋白产物的功能异常^[19-22]。*T134C* 位点位于内显子,属于同义突变。同样,传统观点认为同义突变未改变氨基酸序列,是良性突变。但最近的研究表明,同义突变未必是良性突变^[23]。目前,鱼类上尚无 *Edn1* 基因 SNP 的研究。藏猪与大约克猪 *Edn1* 基因的 5 个 SNP 位点负向调控脂肪沉积性状^[24]。蒋冬冬等^[25]研究发现 *Edn1* 基因 *rs5370* 位点上 TT 基因型与增生性糖尿病性视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)易感性呈正相关。以上研究结果表明, *Edn1* 基因 SNP 的突变能够影响生物某些性状。本研究首次发现刀鲚 *Edn1* 基因 *T134C* 位点和 *A418C* 位点的突变影响了刀鲚上颌骨长度,推测可能是这两个位点的突变导致刀鲚 *Edn1* 蛋白重要结构域发生改变,因而影响了 *Edn1* 蛋白功能障碍,但具体机制仍须探究。生物性状的调控不只受单一位点影响,而是多个位点或多个基因共同调控的结果,仅分析某一位点并不能准确地得到基因与性状间的相关性^[26-27]。*T134C* 位点和 *A418C* 位点组成的 5 个双倍型关联分析结果显示, D3 (杂合 TC

和纯合 AA)与 D1 (纯合 TT 和杂合 AC)间, D3 与 D2 (纯合 TT 和纯合 CC)间存在显著差异($P<0.05$),这表明双倍型对性状的影响比单倍型的影响更大。樊佳佳等^[28]对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)柠檬酸合酶基因 SNP 位点及其组成的双倍型与草鱼生长性状进行关联分析的结果显示,不同双倍型在进行生长性状关联分析时,比单个位点的不同基因型对草鱼生长性状的影响更大。相似的结果同样出现在杨晓等^[29]对红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)*B-FABP* 基因 SNPs 与生长性状的关联分析的结果中。因此,笔者推测本研究得的 2 个与上颌骨长度显著相关的位点可以作为刀鲚的分子标记辅助选育的位点。

从食性分析来看,长颌刀鲚属肉食性鱼类,成鱼主要以大型甲壳动物如虾类和其他鱼类如银鱼、梅童鱼和黄鱼等为食^[30];而短颌刀鲚食物中优势类群为蓝藻、桡足类和枝角类等^[31]。由此可见,长颌刀鲚的食物个体大于短颌刀鲚。因此,笔者猜测上颌骨长度可能与开口高度相关。为验证此猜想,本研究计算了刀鲚开口高度/头长和上颌骨长/头长的皮尔逊相关系数,得到刀鲚开口高度/头长和上颌骨长/头长的皮尔逊相关系数 $r=0.41$ ($P<0.05$),属于中等正相关($0.4<r<0.6$)。鱼类的食性受嗅觉^[32-33]、季节、栖息地等因素的影响。此外,鱼类的摄食器官的结构形态与其食性相对应,二者相互统一^[34]。上颌骨较长的长颌刀鲚开口高度也较大,捕食对象的个体也较大;上颌骨较短的短颌刀鲚开口高度较小,因此捕食对象的个体也较小。因此,笔者推测刀鲚的上颌骨长短与其捕食对象大小呈正相关。

4 结论

本研究通过直接测序法挖掘出刀鲚 *Edn1* 基因 5 个 SNP 位点,其中 *C1607T* 位点仅存在两种基因型 CC 和 CT,存在纯合致死效应; *G1322A* 与 *A1636C* 两个位点处于连锁不平衡状态。关联分析结果表明, *T134C* 位点和 *A418C* 位点是刀鲚上颌骨长度的优势位点,双倍型 D3 为优势基因型。刀鲚开口高度/头长和上颌骨长/头长呈中等正相关。本研究可为刀鲚长颌骨选育提供候选标记。

参考文献

- [1] Cheng Q Q. Study on morphological variation, genetic diversity and phylogenesis of silver carp in China[D]. Shanghai: Fudan University, 2005. [程起群. 中国鲚鱼的形态变异、遗传多样性及系统发育研究[D]. 上海: 复旦大学, 2005.]
- [2] Chen D. Analysis of genetic structure in mitochondrial cytochrome b of *Coilia ectenes* in the Yangze River[D]. Guangzhou: Jinan University, 2006. [陈迪. 长江刀鲚遗传多样性的细胞色素 b 基因序列分析[D]. 广州: 暨南大学, 2006.]
- [3] Guo H Y. Morphological characteristics and application of sagittal otoliths in the lower reaches of the Yangtze River and the East China Sea[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2006. [郭弘艺. 长江下游及东海沿岸鲚属鱼类矢耳石的形态特征及其应用[D]. 上海: 上海海洋大学, 2006.]
- [4] Chen Y C. Morphological and genetic study on *Coilia ectenes* and *C. nasus*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2007. [陈艳翠. 刀鲚(*Coilia ectenes*)与日本鲚(*C. nasus*)群体的形态学、遗传学研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2007.]
- [5] Xu G C, Gu R B, Liu H B, et al. Fluctuation of Sr/Ca in otoliths of *Coilia nasus* in the Yangtze River and the validation for the anadromous migratory history[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(7): 939-945. [徐钢春, 顾若波, 刘洪波, 等. 长江短颌鲚耳石 Sr/Ca 值变化特征及其江海洄游履历[J]. 水产学报, 2014, 38(7): 939-945.]
- [6] Lehner R, Vance D E. Cloning and expression of a cDNA encoding a hepatic microsomal lipase that mobilizes stored triacylglycerol[J]. The Biochemical Journal, 1999, 343(1): 1-10.
- [7] Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwat Y, et al. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor[J]. Nature, 1990, 348(6303): 732-735.
- [8] Kurihara Y, Kurihara H, Suzuki H, et al. Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1[J]. Nature, 1994, 368(6473): 703-710.
- [9] Miller C T, Schilling T F, Lee K, et al. Sucker encodes a zebrafish Endothelin-1 required for ventral pharyngeal arch development[J]. Development (Cambridge, England), 2000, 127(17): 3815-3828.
- [10] Miller C T, Kimmel C B. Morpholino phenocopies of endothelin 1 (sucker) and other anterior arch class mutations[J]. genesis, 2001, 30(3): 186-187.
- [11] Clouthier D E, Hosoda K, Richardson J A, et al. Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-a receptor-deficient mice[J]. Development (Cambridge, England), 1998, 125(5): 813-824.
- [12] Kempf H, Linares C, Corvol P, et al. Pharmacological inactivation of the endothelin type A receptor in the early chick embryo: A model of mispatterning of the branchial arch derivatives[J]. Development (Cambridge, England), 1998, 125(24): 4931-4941.
- [13] Cao T T, Bai J J, Yu L Y, et al. Polymorphisms of SNPs in ALDO B gene and association analysis with growth traits in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(4): 481-488. [曹婷婷, 白俊杰, 于凌云, 等. 草鱼醛缩酶B基因部分序列的SNP多态性及其与生长性状的关联分析[J]. 水产学报, 2012, 36(4): 481-488.]
- [14] Yin S W, Huang H, Lei C G, et al. Application of DNA molecular markers in genetics and breeding of fish[J]. Fisheries Science, 2005, 24(11): 42-45. [尹绍武, 黄海, 雷从改, 等. DNA 标记技术在鱼类遗传育种中的应用[J]. 水产科学, 2005, 24(11): 42-45.]
- [15] Le Y X. Genetic analysis of lethal locus and identification of candidate gene in Gushi chicken genome[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2021. [乐雅馨. 固始鸡基因组致死位点遗传规律分析及其候选基因鉴定[D]. 郑州: 河南农业大学, 2021.]
- [16] Fan L. The functional study of newly identified cellular PP2A inhibitor FAM122A[D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2016. [范莉. 内源性 PP2A 抑制蛋白—FAM122A 的生物学功能研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2016.]
- [17] Wang Z Y, Gou P P, Yang J, et al. Correlation analysis between single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *GHRH* gene and growth traits of tiger puffer *Takifugu rubripes*[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2022, 37(1): 34-41. [王梓祎, 苟盼盼, 杨金, 等. 红鳍东方鲀生长激素释放激素(*GHRH*)基因多态性及其与生长性状的关联分析[J]. 大连海洋大学学报, 2022, 37(1): 34-41.]
- [18] Slatkin M. Linkage disequilibrium—Understanding the evolutionary past and mapping the medical future[J]. Nature Reviews Genetics, 2008, 9(6): 477-485.
- [19] Rhine C L, Cygan K J, Soemedi R, et al. Hereditary cancer genes are highly susceptible to splicing mutations[J]. PLoS Genetics, 2018, 14(3): e1007231.
- [20] Li J Y, Li Y Y, Ni H C, et al. A novel splice-site mutation in *MSH2* is associated with the development of lynch syndrome[J]. Frontiers in Oncology, 2020, 10: 983.
- [21] Montalban G, Bonache S, Moles-Fernández A, et al. Screening of *BRCA1/2* deep intronic regions by targeted gene sequencing identifies the first germline *BRCA1* variant causing pseudoexon activation in a patient with

- breast/ovarian cancer[J]. *Journal of Medical Genetics*, 2019, 56(2): 63-74.
- [22] Wang Y F, Bernhardt A J, Nacson J, et al. BRCA1 intronic Alu elements drive gene rearrangements and PARP inhibitor resistance[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 1-12.
- [23] Shen X K, Song S L, Li C, et al. Synonymous mutations in representative yeast genes are mostly strongly non-neutral[J]. *Nature*, 2022, 606(7915): 725-731.
- [24] Wei M B, Duan M Q, Luo B, et al. Analysis of polymorphism and expression difference of *EDNI* gene between Tibetan pig and Yorkshire pig[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2022, 58(3): 79-83. [韦明邦, 段梦琪, 罗布白珍, 等. 藏猪与大约克猪 *EDNI* 基因多态性与表达差异分析[J]. *中国畜牧杂志*, 2022, 58(3): 79-83.]
- [25] Jiang D D, Jin H, Zheng L, et al. Association of *EDNI* and *CFH* gene polymorphisms with proliferative diabetic retinopathy in type 2 diabetes mellitus[J]. *Eye Science*, 2022, 37(5): 374-382. [蒋冬冬, 靳荷, 郑柳, 等. *EDNI* 和 *CFH* 的基因多态性与 2 型糖尿病增生性视网膜病变的相关性[J]. *眼科学报*, 2022, 37(5): 374-382.]
- [26] de Camargo G M F, Costa R B, de Albuquerque L G, et al. Polymorphisms in *TOX* and *NCOA2* genes and their associations with reproductive traits in cattle[J]. *Reproduction, Fertility, and Development*, 2015, 27(3): 523-528.
- [27] Li S J, Liu H, Bai J J, et al. Transcriptome assembly and identification of genes and SNPs associated with growth traits in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. *Genetica*, 2017, 145(2): 175-187.
- [28] Fan J J, Liu X X, Bai J J, et al. Detection of SNP incitrate synthase gene and association analysis with growth traits in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2014, 33(3): 84-89. [樊佳佳, 刘小献, 白俊杰, 等. 草鱼柠檬酸合酶基因 SNP 筛选及与生长性状的关联分析[J]. *华中农业大学学报*, 2014, 33(3): 84-89.]
- [29] Yang X, Ma W C, Yang J, et al. SNPs screening of B-*FABP* gene and their association with growth traits in *Takifugu rubripes*[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2021, 41(5): 28-34. [杨晓, 马文超, 杨金, 等. 红鳍东方鲀 B-*FABP* 基因 SNPs 筛选及其与生长性状关联分析[J]. *广东海洋大学学报*, 2021, 41(5): 28-34.]
- [30] Liu Y L, Wu Z Q, Hu M L. Advances on tapertail anchovy *Coilia ectenes* in China[J]. *Fisheries Science*, 2008, 27(4): 205-209. [刘引兰, 吴志强, 胡茂林. 我国刀鲚研究进展[J]. *水产科学*, 2008, 27(4): 205-209.]
- [31] Hu M Q. Study on the feeding ecology of upper fishes in Qili Lake, Anqing[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2021. [胡敏琦. 安庆七里湖中上层鱼类摄食生态研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2021.]
- [32] Hughes G M, Boston E S M, Finarelli J A, et al. The birth and death of olfactory receptor gene families in mammalian niche adaptation[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1390-1406.
- [33] Liu H, Chen C H, Lv M L, et al. A chromosome-level assembly of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) genome reveals an expansion of olfactory receptor genes in freshwater fish[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38(10): 4238-4251.
- [34] Zhang A Q, Zhao W. Morphological characterization of feeding apparatus and feeding habits of[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2019(1): 154-158. [张安琪, 赵文. 五种典型鲢形目鱼类摄食器官形态与食性研究[J]. *海洋湖沼通报*, 2019(1): 154-158.]

SNP polymorphisms in *Edn1* gene and their associated maxilla length traits in *Coilia nasus*

GAO Jun¹, ZHOU Lin², NIE Zhijuan¹, WANG Yaohui³, XU Gangchun¹

1. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214128, China;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. Nantong Longyang Aquatic Products Co., Ltd., Nantong 226634, China

Abstract: As the most intuitive phenotype, the length of the maxilla of *Coilia nasus* has always been considered as the main feature that distinguishes different ecological groups of *C. nasus*. Endothelin 1 (*Edn1*) plays an essential role in jaw development. Based on the previous genome re-sequencing results and the *C. nasus* genome database, the *Edn1* gene sequence was isolated using PCR amplification to investigate the effect of *Edn1* gene on the maxilla length in *C. nasus*. The direct sequencing method was used to screen and analyze single nucleotide polymorphism (SNP) loci, analyze the genotype of each locus, and calculate the basic genetic parameters, genotype frequency, and gene frequency of each locus. Subsequently, association, linkage disequilibrium, and diplotype analyses were performed between these screened SNP loci and *C. nasus* maxillary length traits. The results showed that a total of five SNP loci were excavated in the *Edn1* gene of *C. nasus*, including *T134C*, *A418C*, *G1322A*, *C1607T*, and *A1636C*. The two loci *G1322A* and *A1636C* are in linkage disequilibrium. Association analysis results showed that there was a significant correlation between *T134C* and *A418C* loci and maxilla length traits. Diplotype analysis showed that *T134C* and *A418C* loci formed diplotype D3 (heterozygous TC and Homozygous AA), which had significantly longer maxilla lengths than D1 (homozygous TT and heterozygous AC) and D2 (homozygous TT and homozygous CC). In addition, the Pearson correlation coefficient $r=0.41$ for the mouth-opening height/head length and maxilla length/head length of *C. nasus*. These findings indicate that the *T134C* and *A418C* loci were the dominant loci for the maxilla length of *C. nasus*, and the diploid D3 was the dominant genotype. This study can provide a scientific foundation for the candidate markers for molecular marker-assisted selection of the *C. nasus* with long maxilla.

Key words: *Coilia nasus*; *Edn1* gene; association analysis, diplotype analysis; linkage disequilibrium

Corresponding author: XU Gangchun. E-mail: xugc@ffrc.cn