

DOI: 10.12264/JFSC2023-0050

白斑狗鱼早期发育阶段的耐热性及耐热性状关联 SNP 筛选

海萨·艾也力汗¹, 贺疆滔¹, 张钰¹, 李晓东¹, 沈玉帮²

1. 新疆维吾尔自治区水产科学研究所 新疆维吾尔自治区 乌鲁木齐 830000;

2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306

摘要: 为了解白斑狗鱼(*Esox lucius*)早期不同发育阶段的热耐受性, 为其耐热性状的改良提供合适的分子标记, 本研究首先采用耐热性(upper thermal tolerance, UTT)作为评定指标, 对 UTT 进行方差分析, 比较分析了白斑狗鱼不同发育阶段的热耐受性。使用 GBS (genotyping-by-sequencing) 技术获得两个极端组的耐热性状相关简化基因组测序数据集, 进而对耐热性状进行全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS), 发掘白斑狗鱼耐热性状关联的 SNP 标记。结果发现, 白斑狗鱼早期不同发育阶段的耐热性有极显著的差异($P < 0.01$), 幼鱼期的耐热性最高, 其次为稚鱼期, 仔鱼期耐热性最低。联合 FarmCPU 和 Blink 模型进行了 GWAS 分析, 发现 5 个 SNPs 与白斑狗鱼耐热性状的关联性均达到了极显著水平(FDR P -value <0.01), 分别位于 *clstn2*、*MAPK14*、*VAPA* 等基因的内含子和 *ANKS1B* 基因 5'端非翻译区。这些基因直接或间接与刺激和应激反应相关。本研究初步筛选出与白斑狗鱼耐高温性状关联的候选 SNPs 和相关基因, 为今后研究白斑狗鱼在应对高温胁迫时的生理机制和分子机制提供参考, 为白斑狗鱼耐高温性状的改良提供了科学依据。

关键词: 白斑狗鱼; 早期发育阶段; 耐热性; GWAS; SNPs

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2023)06-0677-08

白斑狗鱼(*Esox lucius*)属鲑形目(Salmoniforme), 狗鱼亚目(Esocoidei), 狗鱼科(Esocidae), 狗鱼属(*Esox*)。分布于亚洲、欧洲和北美洲的北极圈周边地区^[1], 在中国境内仅分布于额尔齐斯河流域。白斑狗鱼仔幼鱼阶段的最适生长温度为 16~18 °C, 当水温超过 18 °C 时, 成活率下降^[2]。幼鱼阶段(平均体重 20 g)最适生长水温为 23~24 °C, 当环境水温超过 27 °C 时, 幼鱼活动加剧, 性情不稳定^[3]。在天津、浙江、江苏等地, 夏季高温季节水温超出白斑狗鱼生长的适宜温度时, 其成活率、养殖成本及养殖周期均受到直接影响, 养殖池塘均采取降温措施以保证其安全度夏。白斑狗鱼自身的热敏感性一定程度上已成为制约其产业化可持续发展的瓶颈。同时, 全球气候变暖已影响到白斑

狗鱼种群资源, 其生存可能会面临新的挑战。联合国政府间气候变化专门委员会(IPCC)第五次评估报告称, 1901—2012 年, 全球地表温度升高了 0.89 °C。早在 1990 年的研究结果显示, 成年白斑狗鱼会主动躲避表面温度超过 25 °C 的水域, 且随着空气温度的上升这种行为将更频繁^[4]。在俄罗斯已经发现由于气候变暖导致白斑狗鱼等鱼类分布向北移动的证据^[5]。随着全球气候的变暖, 极端天气出现频率增加, 加之中国境内的白斑狗鱼自然分布区位于该物种自然分布区域的南界, 中国境内白斑狗鱼的自然种群和养殖群体很可能最先受到全球气候变暖带来的不利影响。因此, 白斑狗鱼热耐受性研究和耐高温性状的遗传改良已成为白斑狗鱼种质资源保护和产业化可持续发展

收稿日期: 2023-03-10; **修订日期:** 2023-05-16.

基金项目: 国家自然科学基金项目(32060826).

作者简介: 海萨·艾也力汗(1972–), 男, 正高级农艺师, 研究方向为水产动物种质资源保护与遗传育种. E-mail: hbahjan@126.com

通信作者: 沈玉帮, 副教授, 研究方向为鱼类种质资源与遗传育种. E-mail: ybshen@shou.edu.cn

亟待解决的问题。

温度变化对鱼类早期发育阶段的生长和生存会产生较大的影响,尤其是仔、稚、幼鱼期对水温的变化特别敏感^[6]。国内关于温度对白斑狗鱼胚胎发育、早期发育阶段影响,仔鱼热耐受性,温度对养殖密度影响等研究已有报道^[2-3,7-8]。耐热性(upper thermal tolerance, UTT)是基于耐受温度和耐受时间综合反映的耐热性状评定指标^[9],已在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[9]、大鳞鲂(*Tarphops oligolepi*)^[10]等鱼类的耐热性状评价和遗传改良中应用。但尚未发现白斑狗鱼早期不同发育阶段耐热性比较的相关报道。

全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS)最早应用于人类疾病,是用于解析复杂性状的重要研究手段^[11]。随着高通量测序技术不断发展和测序成本的降低, GWAS 也成为了揭示鱼类复杂性状的数量遗传变异规律、分析关键基因遗传调控和分子辅助育种的有力工具。已在大西洋鲑(*Salmo salar*)、虹鳟、斑点叉尾鮰(*Ictalurus punctatus*)、鲤(*Cyprinus caprio*)、银大马哈鱼(*Oncorhynchus kisutch*)、欧洲鲈(*Dicentrarchus labrax*)、亚洲鲈(*Lates calcarifer*)等鱼类的生长、抗逆性、低氧耐受性、头骨形态、性别决定等复杂性状遗传研究中得到了应用^[11]。

本研究以 UTT 为耐热性状的评定指标,对白斑狗鱼仔鱼期、稚鱼期和幼鱼期的耐热性进行比较研究。以幼鱼期的 UTT 值为表型数据,联合 FarmCPU 和 Blink 模型进行 GWAS 分析,筛选出与白斑狗鱼耐热性状关联的 SNPs,并对这些 SNPs 进行验证。为白斑狗鱼早期发育阶段的培育和耐热性状的遗传改良提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验材料

白斑狗鱼亲本来自额尔齐斯河(47°41'59"N, 86°51'47"E)及乌伦古湖(47°40'42" N, 87°34'45"E)。2021 年 4 月 10—13 日人工采卵,在循环系统中进行受精卵孵化和苗种培育。在仔鱼后期、稚鱼期和幼鱼期各随机筛选苗种 200 尾以上作为早期发育阶段耐热性测定的实验鱼。2022 年 4 月通过人

工繁育获得受精卵,在同一循环系统中培育至幼鱼期。

1.2 热胁迫实验

每个发育阶段耐热性观测实验均设 3 个平行组,在 3 个长×宽×高为 120 cm×60 cm×80 cm 的水族箱中进行。实验全过程连续充气,利用 800 W 的智能 PID 变频加热棒控温,每天换 1/3 相同温度的水,根据实验鱼摄食情况随时投喂鲜活饵料。实验初期 26 °C 水温驯养 3 d,此后逐渐升高水温,30 °C 前以 2 °C/d 的速度升温,水温达到 30 °C 后以 1 °C/d 升温速率升温至实验结束,每隔 2 h 测水温和溶解氧,及时捞取死亡鱼并记录全长和存活时间。

1.3 数据分析

1.3.1 早期发育阶段的耐热性分析 耐热性计算

公式为 $UTT = \sum_{i=1}^k (T_i - T_0)$, 式中 UTT 为耐热性, i

为实验天数, T_i 为在第 i 天的温度(°C), T_0 为实验初始温度(22 °C), k 为存活的天数。例如,一尾鱼在 23 °C 存活 1 d, 在 24 °C 存活 1 d 之后死亡, $UTT = (23 - 22) \times 1 + (24 - 22) \times 1 = 3$ °C·d。实验数据利用 Excel 进行处理,采用平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示。利用 SPSS19.0 软件进行耐热性的单因素方差分析(one-way ANOVA)。采用方差同质性检验法检验方差齐性,因变量不满足方差齐性时以耐热性为因变量,用 Tamhane's T2 法进行多重比较,差异显著水平为 $P < 0.05$,极显著水平为 $P < 0.01$ 。

1.3.2 SNP 标记筛选 本项目组前期通过热胁迫从 445 尾幼鱼期白斑狗鱼实验鱼中选取最先死亡的 110 尾作为热敏感组,最后死亡的 110 尾作为耐高温组,通过 GBS (genotyping-by-sequencing) 技术获得热敏感组 109 尾、耐高温组 103 尾的耐高温性状相关简化基因组测序数据集^[12]。本研究基于以上简化基因组数据集,利用 PLINK 2.0 软件对 25 条染色体中的 77478 个位点进行质量质控。过滤 10% 的缺失个体和基因缺失率大于 10% 的 SNP,删除次要等位基因频率(minor allele frequency, MAF)小于 0.01 和哈迪-温伯格平衡值(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)小于 0.00001 的 SNP,设置窗宽 500,删除 LD 大于 0.2 的 SNP

对中的一个。质量控制后的 SNP 数据利用 TASSEL5.2.80 软件转换格式后, 用基于 R 语言环境的 GAPIT3 程序包进行关联分析。白斑狗鱼耐高温性状记录为二元表型数据, 分别为 0=耐高温组和 1=热敏感组。前 3 个 PCA 为协变量, 以 FarmCPU 和 Blink 模型进行 GWAS 分析, 以假阳性检出率(false discovery rate, FDR)校正的 P -value<0.05 为阈值, 筛选显著的 SNP 位点。选择两种模型中均与耐热性状显著相关的 SNPs 进行下一步的验证分析。以白斑狗鱼基因组 Eluc_v4 版本为参考基因组, 利用 IGV2.10 软件查找与耐热性状显著相关 SNPs 所在的基因和前后序列。

2 结果与分析

白斑狗鱼早期不同发育阶段的高温耐受性有明显的差别。稚鱼期开始死亡水温为 30℃, 死亡高峰水温为 32℃, UTT 值为(8.7037±3.3408)℃·d。稚鱼后期开始死亡水温为 30℃, 死亡高峰水温为 34℃, UTT 值为(19.0491±9.5037)℃·d。幼鱼期开始死亡水温为 33℃, 死亡高峰水温为 34℃, UTT 值为(25.6629±4.0625)℃·d (表 1)。

白斑狗鱼早期不同发育阶段的耐热性方差分析结果显示, 不同发育阶段间的差异均达到极显著水平($P<0.01$); 进一步方差同质性检验结果显示, 变量不满足方差齐性($P<0.05$)(表 2); Tamhane's T2 法多重比对结果显示, 两组间的均值均有极显著性的差异($P<0.01$)(表 1)。

使用 PLINK 软件对 109 尾热敏感个体和 103 尾耐高温个体的 25 条染色体上 77478 个 SNPs 质量控制, 获得 184 尾个体的 9523 个 SNPs。对质量控制后的 SNPs 利用 Blink 和 FarmCPU 模型进行了 GWAS 分析。结果显示 FarmCPU 模型分析中 12 个 SNPs 与白斑狗鱼耐热性状显著关联(FDR P -value<0.05), 其中位于 3 号染色体 RS27886188 位点的表型方差解释百分比(phenotypic variance explained, PVE)最高(16.6406%), 且与性状极显著相关(FDR P -value<0.01)。而 Blink 模型中 7 个 SNPs 与白斑狗鱼耐热性状显著关联(FDR P -value<0.05), 其中位于 23 号染色体的 RS15054920 位点的 PVE 值最高(2.5051%), 与性状极显著相关(FDR P -value<0.01)。5 个 SNPs 在两个模型中与耐热性状的关联性均达到了极显著水平(FDR P -value<0.01)(表 3)。

表 1 白斑狗鱼不同发育阶段的高温耐受性
Tab. 1 High temperature tolerance in different developmental stages of *Esox lucius*

$\bar{x} \pm SD$					
发育时期 development stage	样本数量 sample size	平均全长/mm average total length	开始死亡水温/℃ temperature for initial mortality	死亡高峰水温/℃ temperature for climax mortality	耐热性/(℃·d) UTT
仔鱼期 larval fish	201	22.8697±2.1319	30	32	8.7037±3.3408 ^a
稚鱼期 juvenile fish	250	40.8350±5.3327	30	34	19.0491±9.5037 ^b
幼鱼期 young fish	222	100.9225±10.8238	33	34	25.6629±4.0625 ^c

注: 具有不同字母的各项间差异极显著($P<0.01$).
Note: Numbers with different letters are extremely significantly different ($P<0.01$).

表 2 白斑狗鱼早期发育阶段高温耐受性的方差分析
Tab. 2 Analysis of variance of high temperature tolerance in early developmental stage of *Esox lucius*

变异来源 variation source	平方和 sum of square	自由度 df	均方 mean square	F	P
组间 between groups	30668.438	2	15334.219	362.150	0.000
组内 within group	28369.227	670	42.342		
总数 total	59037.665	672			

两种模型的曼哈顿图呈现元分析的 GWAS 结果中 9523 个 SNPs 所在的染色体位置和 FDR P -value 大小, 实线分割线为 FDR 校正后的阈值 FDR P -value<0.01 (绿色横线), 5 个 SNPs 通过阈值检验, 表现出与耐热性状的极显著相关性(图 1a)。两种模型的 QQ 图均显示: 当 P -value<10⁻³ 时, 元分析的 GWAS 结果与均匀分布明显分离并升高, 说明元分析 GWAS 结果的有效性和代表性(图 1b)。

表 3 两种模型 GWAS 分析与耐热性状显著关联的 SNP 位点

Tab. 3 SNP sites significantly associated with heat tolerance traits in GWAS analysis of the two models

SNP	染色体 chromosome	位置 position	等位基 因 A1 alleleA1	等位基 因 A2 alleleA2	Blink 模型 Blink model				FarmCPU 模型 FarmCPU model			
					<i>P</i> 值 <i>P</i> -value	MAF 值 MAF-value	PVE/%	FDR	<i>P</i> 值 <i>P</i> -value	MAF 值 MAF-value	PVE/%	FDR
RS38735511	2	38735511	C	A	2.76E-05	0.4674	0.6201	0.037510				
RS9018913	3	9018913	C	T	4.00E-07	0.3071	2.3249	0.000763	6.49E-06	0.3071	0.7324	0.006960
RS27886188	3	27886188	G	T	7.12E-13	0.4837	0.7339	6.78E-09	8.33E-13	0.4837	16.6406	7.93E-09
RS8416193	6	8416193	C	G	4.65E-06	0.0761	0.6822	0.007381				
RS20843675	14	20843675	A	C					2.27E-07	0.0924	0.2968	0.00072
RS2602441	15	2602441	A	C					6.57E-06	0.1196	0.2577	0.00696
RS9331536	17	9331536	A	G	2.35E-08	0.1440	1.3724	9.56E-05	2.40E-06	0.1440	2.3846	0.00381
RS22363670	21	22363670	C	A	3.01E-08	0.0870	0.5768	9.56E-05	4.02E-06	0.0870	1.3141	0.00547
RS15054920	23	15054920	T	G	7.19E-08	0.1277	2.5051	0.000171	9.18E-07	0.1277	1.1153	0.00219
RS34050703	4	34050703	C	A					8.20E-10	0.1413	0.3836	3.90E-06
RS25936968	9	25936968	G	A					1.32E-06	0.1658	0.1737	0.00251
RS10911354	10	10911354	A	T					1.95E-05	0.0870	1.3250	0.01690
RS21854686	10	21854686	G	T					3.05E-05	0.1984	0.4274	0.02421
RS11461859	13	11461859	T	G					1.25E-05	0.4158	1.0341	0.01193

注: PVE 为表型方差解释百分比; FDR 为 FDR 矫正后的 *P* 值。
Note: PVE is phenotypic variance explained; FDR is FDR adjusted *P*-value.

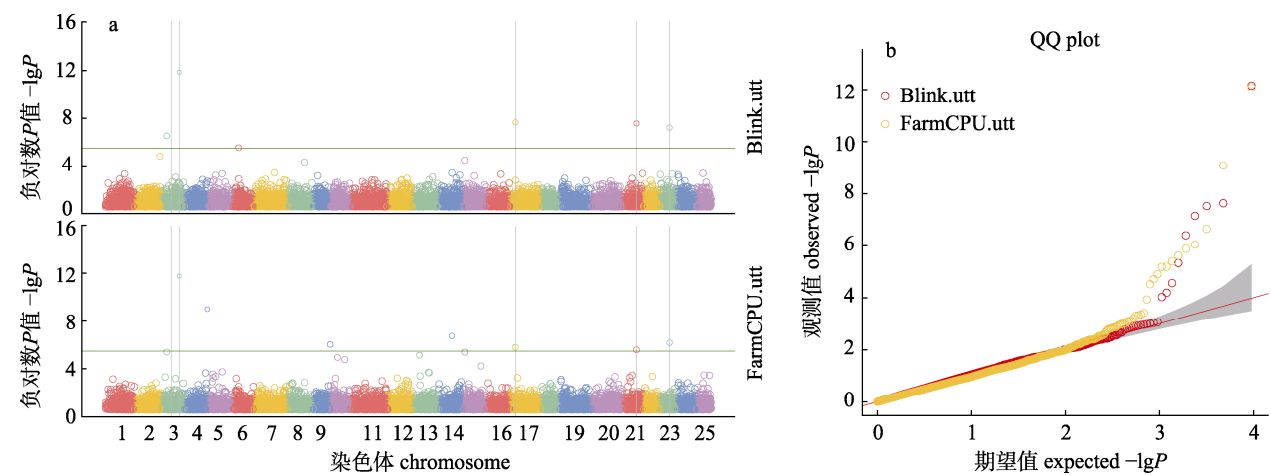


图 1 白斑狗鱼耐热性状两种模型关联分析结果的曼哈顿图(a)与 QQ 图(b)

QQ 图中的红线为标准直线, 代表 GWAS 分析中均匀分布的期望 SNP 位点, 近似于基因组上的随机漂变。

曼哈顿图绿色横线为 FDR=0.01, 五条竖线是 FDR<0.015 个位点对应染色体位置。

Fig. 1 Manhattan diagram (a) and QQ diagram (b) of the results of the correlation analysis of two models of heat tolerance traits in *Esox lucius*

The red line in the QQ diagram is a standard straight line, representing the expected SNP sites uniformly distributed in GWAS analysis, which is similar to random drift on the genome. The green horizontal line in the Manhattan map shows FDR=0.01, with five vertical lines indicate the corresponding chromosomal positions of the five loci with FDR<0.01.

3 讨论

温度是影响鱼类存活、生长和繁殖的主要环境因子。在进化过程中, 硬骨鱼类形成了适应温度变化或波动的行为和生理适应机制。但不同种

类或不同个体, 甚至同一个体的不同生长发育阶段对环境温度变化的耐受范围各不相同^[13]。白斑狗鱼早期不同发育阶段的耐热性有极显著的差异 ($P<0.01$), 幼鱼期的热耐受性最高, 其次为稚鱼期, 仔鱼期耐热性最低, 与四川华鲮(*Sinibrama*

taeniatus)仔鱼期对温度敏感, 稚鱼期对温度已逐步适应^[14], 斑马鱼(*Danio rerio*)仔鱼耐高温能力弱于幼鱼相似^[15]。首先这可能与白斑狗鱼在进化过程中对生活环境的长期适应性进化有关。白斑狗鱼自然分布于北纬45°以北的水域中^[1], 属喜冷水性鱼类, 额尔齐斯河流域的白斑狗鱼产卵温度在8~15℃^[7], 胚胎发育有效积温为100~120℃·d, 卵黄囊仔鱼期有效积温为110~130℃·d^[16], 额尔齐斯河干流5月水温在5.0~19.0℃, 平均水温11.1℃, 7月水温在14.0~25.1℃, 平均水温21.7℃, 由此推断额尔齐斯河流域白斑狗鱼仔、稚鱼发育期为5—6月^[17]。其次, 白斑狗鱼仔鱼期到幼鱼期发育过程中, 随着各器官系统和生理机能不断发育完善, 对外界环境的适应能力不断增强。UTT为量化耐热性状的指标, 是评价热耐受性和耐热性状遗传参数估算的基础。由于白斑狗鱼早期不同发育阶段的UTT有极显著的差异, 在白斑狗鱼耐热性状遗传改良过程中, 基于早期发育阶段的UTT估算遗传参数时, 尤其是不同世代间比较研究时, 应利用同一发育阶段的UTT值。由于仔鱼期和稚鱼期个体各器官和生理机能不断完善和变化之中, 而幼鱼期各器官基本发育完善, 生理机能也相对稳定, 因此对白斑狗鱼耐高温性状进行评价和估算遗传参数时, 采用幼鱼期的UTT值是一个很好的选择。

GWAS分析的ANOVA、GLM、MLM、CMLM、ECMLM、SUPER、MLMM、FarmCPU 8种模型中, FarmCPU在关联准确性和控制假阳性和假阴性方面都优于其他模型^[18], FarmCPU是在兼顾运算速度与检测效力的前提下, 基于固定模型和随机模型循环迭代关联分析的方法。而BLINK是FarmCPU的优化模型, 在检测能力和运算速度方面均优于FarmCPU^[19]。为了确保与性状关联的SNP位点的准确性和可靠性, 已有学者采用多个模型来进行GWAS分析, 经比较筛选获得复杂性状关联的SNPs^[20-21]。本研究结合FarmCPU和BLINK模型进行GWAS分析, 发现5个位点在两个模型中均与耐热性状极显著关联。其中RS90-18913位于未知基因, RS27886188位点位于*clstn2* (calsyntenin 2)基因内含子中。CLSTN2是

一类跨膜胞内转运蛋白, 属于细胞黏附分子钙黏素(Cadherin)超家族CLSTN2, 积极参与海马区、双侧尾状核、前皮质区的功能链接^[22]。是一种对Ca²⁺有高度亲和性的蛋白质, 其能够通过Ca²⁺结合参与Ca²⁺的运输、吸收与分泌^[23], 苯丙胺诱导*clstn2*基因的表达升高^[24]。而热应激可使动物部分细胞内钙离子浓度升高^[25-27], 细胞内钙离子动态平衡的破坏可能对细胞的死亡起着重要作用^[28]。RS9331536位点位于MAPK14 (mitogen-activated protein kinase14)基因内含子中, 该基因是p38 MAPK亚家族4种异构体中的一个。p38 MAPK亚家族能被热、渗透和氧化应激、电离辐射、炎症细胞因子和TNF受体诱导^[29], 参与鱼类刺激和应激反应^[30], 对花鲈(*Lateolabrax maculatus*)的低氧和盐度胁迫实验中p38 MAPK信号通路在保护生物体、控制大脑发育、神经可塑性和细胞死亡中发挥着关键作用^[31]。RS22363670位点位于VAPA (VAMP Associated Protein A, VAPA)基因内含子, VAPA是一种II型膜蛋白, 位于质膜和细胞内囊泡中^[32], 在囊泡运输、膜融合、蛋白质复合物组装和细胞运动中发挥作用^[33]。VAPA通过激活MAPK信号通路参与多种生物过程的调控, 包括致癌基因的激活和肿瘤的发生^[34], 而MAPK基因参与鱼类刺激和应激反应^[30]。RS15054920位于ANKS1B (ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing1B, ANKS1B)基因5'端非翻译区。ANKS1B编码一种主要在大脑和睾丸中表达的多结构域蛋白^[35], 已有研究显示ANKS1B基因单倍剂量不足能导致神经发育综合征^[36]。虽然本研究结果未能在热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)等与热胁迫相关的基因中找到SNPs, 但所筛选出的耐高温性状显著关联的5个SNPs中的4个位点所在的基因直接或间接与刺激和应激反应相关。同时, 这些基因直接或间接与神经元可塑相关。而热应激引起的兴奋毒性和神经炎症可能使神经元受损或死亡^[37]。

研究结果为今后研究白斑狗鱼在应对热胁迫时的生理机制和分子机制提供了参考, 为白斑狗鱼耐高温性状的改良提供了科学依据。

参考文献:

- [1] Берг Л С. Рыбы пресных вод СССР и сопредельных

- стран[M]. Москва, 1948, 4.1, 1-466.
- [2] Qi Z L, Zhang X W, Han X. The effect of temperature on early development and growth in northern Pike *Esox lucius*[J]. Fisheries Science, 2010, 29(12): 708-710. [齐遵利, 张秀文, 韩叙. 温度对白斑狗鱼早期发育和生长的影响[J]. 水产科学, 2010, 29(12): 708-710.]
- [3] Huang N Y, Xia L J, Yao Z L. The influence of stocking density and water temperature on growth in juvenile *Esox lucius* raised in greenhouse[J]. Journal of Fisheries of China, 2006, 30(1): 76-80. [黄宁宇, 夏连军, 么宗利. 养殖密度和温度对白斑狗鱼在设施养殖中生长的影响[J]. 水产学报, 2006, 30(1): 76-80.]
- [4] Schindler D W, Beaty K G, Fee E J, et al. Effects of climatic warming on lakes of the central boreal forest[J]. Science, 1990, 250(4983): 967-970.
- [5] Kasyanov A. Personal communication[Z]. Institute of Inland Waters, Russian Academy of Science, 2004.
- [6] Ch S, Shailender M, Sarmal K P, et al. Effects of temperature and salinity on growth, hatching rate and survival of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) under captive conditions[J]. International Journal of Bioassays, 2012, 1: 150-155.
- [7] Zhang Y, Haysa-Ayelhan, Rabigul-Sawut, et al. Analysis of high temperature tolerance in early development of *Esox lucius*[J]. Biotechnology Bulletin, 2021, 37(5): 76-83. [张钰, 海萨·艾也力汗, 热比古丽·沙吾提, 等. 白斑狗鱼早期发育阶段的高温耐受性分析[J]. 生物技术通报, 2021, 37(5): 76-83.]
- [8] Casseman J M. Effects of environmental factors on growth, survival, activity, and exploitation of northern pike[J]. Am Fish Soc Sepc Publ. 1978, 11: 114-118.
- [9] Perry G M L, Martyniuk C M, Ferguson M M, et al. Genetic parameters for upper thermal tolerance and growth-related traits in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Aquaculture, 2005, 250(1-2): 120-128.
- [10] Cao B X, Zhang T S, Liu B S, et al. Comparative analysis on growth and heat tolerance of turbot family[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(6): 1001-1007. [曹宝祥, 张天时, 刘宝锁, 等. 大菱鲆家系生长和耐热性状对比分析[J]. 中国水产科学, 2012, 19(6): 1001-1007.]
- [11] Zheng X H, Kuang Y Y, Lü W H, et al. Progress and perspective of the genome research in aquatic organisms[J]. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(1): 15-35. [郑先虎, 匡友谊, 吕伟华, 等. 水产生物基因组研究进展与趋势[J]. 水产学报, 2019, 43(1): 15-35.]
- [12] Jiang Y C, Guo J M, Haisa A, et al. Genome-wide association analysis of heat tolerance in the northern Pike (*Esox lucius*)[J]. Aquaculture, 2022, 559: 738459.
- [13] Pérez E, Díaz F, Espina S. Thermoregulatory behavior and critical thermal limits of the angelfish *Pterophyllum scalare* (Lichtenstein)(Pisces: Cichlidae)[J]. Journal of Thermal Biology, 2003, 28(8): 531-537.
- [14] Wang Y L, Liu Y, Tian J J, et al. Effects of different temperatures on the growth and survival rate of *Sinibrama taeniatus* larvae and juveniles[J]. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(5): 47-54. [王亚利, 刘玥, 田佳佳, 等. 温度对四川华鲮仔、稚鱼生长发育及存活率的影响[J]. 渔业科学进展, 2021, 42(5): 47-54.]
- [15] Wang G Q, Xia J G. Effects of constant and diel-fluctuating temperature on thermal tolerance of zebrafish at different life-history stages[J]. Chinese Journal of Ecology, 2019, 38(7): 2133-2137. [王国强, 夏继刚. 恒温与变温对不同生活史阶段斑马鱼热耐受性的影响[J]. 生态学杂志, 2019, 38(7): 2133-2137.]
- [16] Qiao D L, Li S F, Ling Q F, et al. Development of embryo and yolk-sac stage larva of white spot pike, *Esox lucius*[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2005(1): 12-18. [乔德亮, 李思发, 凌去非, 等. 白斑狗鱼胚胎和卵黄囊期仔鱼的发育[J]. 上海水产大学学报, 2005(1): 12-18.]
- [17] Xie S X, Guo Y, Li Y F, et al. Investigation on aquatic environment and fishery resources of cross-border rivers in Xinjiang: Ertix River[M]. Beijing: Science Press, 2021, 19-147. [谢从新, 郭焱, 李云峰, 等. 新疆跨境河流水生环境与渔业资源调查: 额尔齐斯河[M]. 北京: 科学出版社, 2021, 19-147.]
- [18] Kaler A S, Gillman J D, Beissinger T, et al. Comparing different statistical models and multiple testing corrections for association mapping in soybean and maize[J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 10: 1794.
- [19] Zhao Y H, Li X X, Chen Z, et al. An overview of genome-wide association studies in plants[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2020, 55(6): 715-732. [赵宇慧, 李秀秀, 陈倬, 等. 生物信息学分析方法 I: 全基因组关联分析概述[J]. 植物学报, 2020, 55(6): 715-732.]
- [20] Zhang Y M, Jia Z Y, Dunwell J M. Editorial: The applications of new multi-locus GWAS methodologies in the genetic dissection of complex traits[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 100.
- [21] Peng Y C, Liu H B, Chen J, et al. Genome-wide association studies of free amino acid levels by six multi-locus models in bread wheat[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 1196.
- [22] Jacobsen L K, Picciotto M R, Heath C J, et al. Allelic variation of calyptenin 2 (CLSTN2) modulates the impact of developmental tobacco smoke exposure on mnemonic

- processing in adolescents[J]. *Biological Psychiatry*, 2009, 65(8): 671-679.
- [23] Ma X. Physiological characteristics mining and key gene identification of litter size variation in Erhualian pigs[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2019. [马翔. 二花脸猪产仔数变异的生理特征挖掘和关键基因鉴别[D]. 南京: 南京农业大学, 2019.]
- [24] Gallegos D A, Minto M, Liu F, et al. Cell-type specific transcriptional adaptations of nucleus accumbens interneurons to amphetamine[J]. *Mol Psychiatry*. 2022 Feb 16. doi: 10.1038/s41380-022-01466-1.
- [25] Calderwood S K, Stevenson M A, Hahn G M. Effects of heat on cell calcium and inositol lipid metabolism[J]. *Radiation Research*, 1988, 113(3): 414.
- [26] Mikkelsen R B, Reinlib L, Donowitz M, et al. Hyperthermia effects on cytosolic[Ca²⁺]: Analysis at the single cell level by digitized imaging microscopy and cell survival[J]. *Cancer Research*, 1991, 51(1): 359-64.
- [27] Tseng J K, Ju J C. Calcium release of heat-shocked porcine oocytes induced by thimerosal or inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP3)[J]. *Animal Reproduction Science*, 2009, 111(1): 41-53.
- [28] Fowler B A. Intracellular compartmentation of metals in aquatic organisms: Roles in mechanisms of cell injury[J]. *Environmental Health Perspectives*, 1987, 71: 121-128.
- [29] Al-Lahham R, Deford J H, Papaconstantinou J. Mitochondrial-generated ROS down regulates insulin signaling via activation of the p38MAPK stress response pathway[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2016, 419: 1-11.
- [30] Carlin C M, Peacock A J, Welsh D J. Fluvastatin inhibits hypoxic proliferation and p38 MAPK activity in pulmonary artery fibroblasts[J]. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2007, 37(4): 447-456.
- [31] Tian Y, Wen H S, Qi X, et al. Identification of mapk gene family in *Lateolabrax maculatus* and their expression profiles in response to hypoxia and salinity challenges[J]. *Gene*, 2019, 684: 20-29.
- [32] Nishimura Y, Hayashi M, Inada H, et al. Molecular cloning and characterization of mammalian homologues of vesicle-associated membrane protein-associated (VAMP-associated) proteins[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999, 254(1): 21-26.
- [33] Shi H J, Yuan Y Y, Guo Y T, et al. Regulation of bovine viral diarrhea virus replication by vesicle-associated membrane protein A[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(2): 635-644. [史慧君, 袁圆圆, 郭妍婷, 等. 囊泡相关膜蛋白 A 调控牛病毒性腹泻病毒复制[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(2): 635-644.]
- [34] Deng Q, Zhang J W, Wang Z, et al. Vesicle-associated membrane protein-associated protein A is involved in androgen receptor trafficking in mouse Sertoli cells[J]. *International Journal of Endocrinology*, 2018, 2018: 1-6.
- [35] Ghersi E, Vito P, Lopez P, et al. The intracellular localization of amyloid β protein precursor (A β PP) intracellular domain associated protein-1 (AIDA-1) is regulated by A β PP and alternative splicing[J]. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2004, 6(1): 67-78.
- [36] Carbonell A U, Cho C H, Tindi J O, et al. Haploinsufficiency in the AKS1B gene encoding AIDA-1 leads to a neurodevelopmental syndrome[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 3529.
- [37] Xu X. Composition and mechanism of nutrient and foodborne functional compound formulations for improving cognitive function in heat stress mice[D]. Shanghai: Naval Medical University, 2022. [徐昕. 改善热应激小鼠认知功能的营养素及食源性功能化合物配方组成及其机制的初步研究[D]. 上海: 海军军医大学, 2022.]

Heat resistance and screening of heat resistance-associated SNPs in the early development stage of *Esox lucius*

HAYSA · Ayelhan¹, HE Jiangtao¹, ZHANG Yu¹, LI Xiaodong¹, SHEN Yubang²

1. Xinjiang Fishery Research Institute, Urumqi 830000, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: To understand the heat tolerance of *Esox lucius* across different stages of early development and to elucidate appropriate molecular markers for the improvement of heat tolerance traits, this study used upper thermal tolerance (UTT) as an evaluation index, conducted variance analysis of UTT, compared and analyzed the thermal tolerance of *Esox Lucius* at different developmental stages, and used genotyping-by-sequencing (GBS) to obtain heat tolerance traits that were related to simplified genome sequencing data sets of two extreme groups. We then evaluated heat resistance using a genome wide association study to explore the SNP markers that are associated with heat tolerance traits in *Esox lucius*. The corresponding results showed that there were significant differences in heat tolerance at different developmental stages during the early development of *Esox lucius* ($P < 0.01$). Heat tolerance was highest at the young stage, followed by the juvenile stage, with the lowest heat tolerance being observed at the larval stage. GWAS analysis, combined with FarmCPU and Blink models, showed that the correlations between the five SNPs and the heat tolerance traits of *Esox lucius* were highly significant (FDR P -value < 0.01); these SNPs were located in the introns of *clstn2*, *MAPK14*, and *VAPA* genes, and the untranslated region at the 5' end of the *ANKS1B* gene. These genes are directly or indirectly associated with stimulus and stress responses. In this study, candidate SNPs and genes associated with high temperature tolerance traits were preliminarily screened in *Esox Lucius*. These results provide a reference for future studies regarding the physiological and molecular mechanisms of high temperature stress tolerance in *Esox Lucius*, and therefore provide a scientific basis for the improvement of high temperature tolerance in *Esox lucius*.

Key words: *Esox lucius*; early development stage; heat resistance; GWAS; SNPs

Corresponding author: SHEN Yubang. E-mail: ybshen@shou.edu.cn