

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2020.19133

鳊 *pep* 和 *gh* 基因 SNP 标记与驯食性状的关联分析

窦亚琪^{1,2}, 梁旭方¹, 高俊杰¹, 何珊¹, 石林杰¹, 史登勇³

1. 华中农业大学水产学院, 华中农业大学鳊鱼研究中心; 农业农村部鳊鱼育种创新基地, 农业农村部淡水生物繁育重点实验室, 湖北 武汉 430070;
2. 湖北省水产技术推广总站(湖北省水产良种引进繁育中心), 湖北 武汉 430070;
3. 湖北省水产良种试验站, 湖北 武汉 430070

摘要: 以鳊(*Siniperca chuatsi*)选育群体为实验材料, 在易驯食与不易驯食鳊转录组 Unigene 数据库中共预测到 4809 个 SNP 位点, 其中胃蛋白酶基因 (*pepsinoge*, *pep*)和生长激素基因(*growth hormone*, *gh*)均为转录组筛选获得的鳊驯食性状候选基因, 本研究将候选基因上的多态 SNP 位点在易驯食和不易驯食鳊群体中进行基因分型, 并与鳊驯食性状进行关联分析。在易驯食与不易驯食的鳊群体中共发现 5 个单核苷酸(SNP)多态性位点, 有效等位基因(N_e)在 1.1959~1.7001, 观测杂合度(H_o)和期望杂合度(H_e)分别分布于 0.1800~0.3585 和 0.1655~0.4160, 多态信息含量(PIC)为 0.2477, 全部位点都属于中度多态性位点。结果表明 SNP 位点 *pep*-A T/C 中 2 种基因型 TT 和 CT 与鳊驯食性状呈高水平显著相关($P<0.05$), 组合得到的 3 种基因型 Genotype1 (CT, CC/CT/TT, AA, AA, TT)、Genotype2 (TT, CC/CT/TT, AA, AA, TT)和 Genotype3(TT, CC, AA, AA, TT)也与鳊驯食性状呈高水平显著相关($P<0.05$), 显著影响鳊驯食性状表型, 其中 Genotype2 相关性最高, 可作为最优基因型个体进行选育。本研究在鳊 *pep* 和 *gh* 基因中鉴定出与驯食性状呈显著关联的 SNP 分子标记, 为加快易驯食鳊新品种的基因辅助选育提供有效的 SNP 分子标记。

关键词: 翘嘴鳊; 驯食性状; 单核苷酸多态性(SNP); 关联分析

中图分类号: S963

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2020)05-0485-09

经长期饲养、驯化和选育, 动物体型外貌、生活习性、生产性能等发生改变, 形成新的表型特征即驯化性状。随着不同食性鱼类基因组的成功破译, 其食物摄取和能量代谢、食性转变、生态适应及驯化等食性相关分子机理与遗传基础研究已取得重要进展。虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)是最早被成功驯化的典型肉食性鱼类, 经过多年的驯化, 虹鳟已形成一系列可摄食利用人工配合饲料的优良品系, 基因组中重要调控基因的冗余结构, 极可能是其快速适应人类驯化的遗传基础^[1]。大西洋与地中海不同地理种群狼鲈(*Dicentrarchus labrax*)基因组具有丰富的遗传多样性, 是其适应

环境以及品系分化的遗传基础^[2]。基于对鳊(*Siniperca chuatsi*)捕食行为、摄食的感觉原理、生理特性及其对捕食习性适应的研究, 开发了鳊驯食人工饲料技术^[3], 不同地理区域野生和养殖鳊群体的驯食性状差异较大, 对易驯食的鳊群体进行 5 代选育后, 少部分鳊易接受配合饲料且生长速度快, 多数鳊不易接受配合饲料, 生长速度慢, 疾病高发而影响其他鳊^[4]。鳊驯食性状与种群遗传多样性密切相关, 其驯食过程还存在对摄食人工饲料的学习记忆及适应现象^[5], 鳊不同个体对人工饲料的驯化摄食存在很大差异, 筛选鉴定鳊驯食候选基因的单核苷酸多态性(single nucleotide poly-

收稿日期: 2019-05-08; 修订日期: 2019-12-12.

基金项目: 农业农村部现代农业产业技术体系专项资金资助项目(CARS-46); 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”项目(2018YFD0900400); 武汉市青年科技晨光计划项目(2017050304010318).

作者简介: 窦亚琪(1989-), 女, 博士, 研究方向鱼类遗传育种. E-mail: douyuaqi@outlook.com

通信作者: 梁旭方(1965-), 博士, 教授. E-mail: xufang_liang@hotmail.com

morphism, SNP)位点并进行其与驯食性状的关联分析,揭示影响其驯食性状的分子机理,对最终解决鳊人工饲料问题具有重要的理论价值与生产意义,对阐明鳊驯食人工饲料个体差异及易驯食鳊新品系的培育均非常重要。

胃蛋白酶(pepsinogen, PEP)是消化系统中的主要消化酶,在呈酸性的胃液中具活性,水解消化食物中的蛋白质^[6]。动物摄食习惯不同,胃蛋白酶含量不同,草食性动物高于杂食性、肉食性动物。在酸性条件下,一般鱼类消化道最适 pH 介于 2 到 3 之间,胃蛋白酶将蛋白质分解为蛋白胨及少量氨基酸(酪氨酸、苯丙氨酸等),剪切时具氨基酸序列特异性。水产养殖生产上将酸性蛋白酶添加到饲料中,补充水产动物内源酶的不足,促进饲料的消化吸收,进而促进鱼类生长^[7]。最早在 1970 年,人们在猪胃组织中发现了 4 种胃蛋白酶原^[8]:胃蛋白酶原 A、胃蛋白酶原 B、胃蛋白酶原 C 和胃蛋白酶原 Y;在鳕(*Gadus morhua*)、金枪鱼(*Thunnus thynnus*)、美洲黄盖鲈(*Pleuronectes americanus*)、美洲红点鲑(*Salvelinus fontinalis*)等有胃真骨鱼类中也发现了有多种形式的胃蛋白酶原^[9]。胃蛋白酶原的多样性在很多脊椎动物中已经得到了证实,其分泌量的多少与胃黏膜的功能有直接的关系,Venkateshwari 等^[10]发现胃蛋白酶其中一个基因型和单倍型的频率分布在印度人群中特别高,推测此基因型和单倍型多态性可能与十二指肠溃疡有关联。

硬骨鱼类生长激素(growth hormone, GH)受下丘脑分泌的神经内分泌生长因子调控而合成,调节鱼类生长代谢水平,在营养吸收、代谢、生长发育、繁殖、渗透调节、免疫和行为等过程中起重要作用^[11-12]。倪静等^[13]分析了牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)生长激素基因(gh)序列中微卫星标记与生长性状的关联性,发现基因型 AC 为生长性状优势等位基因型。王海芳^[14]对湖南鳊 F₂ 群体 gh 基因分析时发现两个 SNP 位点与该群体生长性状指标呈显著性相关。王桂兴等^[15]在牙鲈 gh 基因中发现 7 个 SNP 多态位点,其中在内含子与外显子区域各有一个位点与其生长性状显著相

关。在对黄颡鱼(*Pseudobagrus fulvidraco*) gh 基因的研究中,也发现 3 个与生长性状显著关联的 SNP 位点^[16]。在虹鳊(*Oncorhynchus mykiss*)中,食欲控制相关基因,如神经肽 Y 基因(npy)、POMC 等,在维持葡萄糖收支平衡中发挥了重要作用^[17]。神经肽基因序列差异与生长性能差异相关的研究尚未发现,有待进一步研究。

分子标记辅助选择(molecular marker-assisted selection, MAS)是指在育种中应用与目标性状基因紧密连锁的分子标记对目标性状进行间接选择,该选择是 DNA 水平上的,不受环境影响,结果可靠,其前提是确定候选标记与目标性状表型间的高关联性^[18]。SNP 具有共显性遗传、基因组分布广泛、多态性高、精确度高等遗传特性,广泛应用于水产动物经济性性状关联分析等方面,可加速选育工作^[19]。在 npy、丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶 1 基因(serine/threonine protein phosphatase 1, pp1)的亚型 pp1ca 和 pp1cb 中检测到与翘嘴鳊驯食性状显著关联的 SNP 位点^[20-21],脂蛋白脂酶基因(lpl)SNP 位点的双倍型与翘嘴鳊驯食性状显著关联^[22-23]。在牙鲈、黄颡鱼、翘嘴鳊的 gh 基因中均发现与生长性状显著关联的 SNP 位点^[14-16]。鱼类生长激素促进鱼类日摄食量的增加^[24-25],鱼类生长激素与食欲调节密切相关,可促使机体食欲增加^[26],但 gh 基因 SNP 位点与摄食的相关性尚未可知。本研究通过直接测序法筛选 pep 基因和 gh 基因的 SNP 位点并进行驯食性状关联分析,旨在为分子标记辅助培育易驯食鳊新品系提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

本实验用鳊种苗是湖北省武汉市四汇水产科技有限公司的繁殖场人工繁育苗种,3 月龄,系同批次鳊,鱼苗大小均匀。实验开始前,筛选规格为全长 18~22 cm 的鳊,易驯食鳊 50 尾,不易驯食鳊 53 尾,共计 103 尾,暂养在华中农业大学水产学院养殖实验基地的养殖缸中(350 L),使用循环水系统,暂养 2 周使其适应实验环境,每天早晚饱

食投喂 2 次麦鲮(*Cirrhinus mrigala*), 每天排污 1 次, 换新曝气水 1/3, 实验期间保持不同月龄间养殖管理条件(溶氧 7.26~7.86 mg/L, 水温 26 ℃, pH 7.11~7.59)一致。麦鲮低温冷冻处理为冰鲜饵料鱼, 草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)背部切块低温冷冻处理为冰鲜鱼块, 草鱼鱼块搅碎制作成鱼糜, 添加到鳊人工饲料^[27]。

1.2 鳊食性驯化方法

2 周后开始鳊驯食实验, 驯食前 3 d 停止投喂饵料鱼麦鲮苗, 使鳊处于严重饥饿状态(达到一投喂饵料鱼即出现鳊抢食现象), 按照梁旭方等^[28]描述的鳊驯食程序进行食性驯化训练, 具体操作步骤为: (1) 第 1 天, 过量投喂活饵料鱼; (2) 第 2~4 天, 驯化训练中逐渐减少投喂活饵料鱼的量; (3) 第 5~8 天, 驯化训练中逐渐用死饵料鱼(完全解冻)替代活饵料鱼; (4) 第 9~12 天, 驯化训练中逐渐用冰鲜鱼块(完全解冻)替代死饵料鱼; (5) 第 13~16 天, 驯化训练中逐渐用人工饲料替代冰鲜鱼块; (6) 第 17~20 天, 仅投喂人工饲料。注意事项: 投喂均采取少量抛投, 定时定点定手势(保证抛投角度一致)的方法, 早晚各 1 次。抛投死饵料鱼、鱼

块和人工饲料时要缓慢放投, 延长沉落时间, 以适应鳊伏击的捕食特征。食性驯化训练结束后, 根据观察到腹部呈现饱腹或空瘪的状态, 判别为易驯食或不易驯食鳊^[5, 27]两组, 每组随机挑选 50 尾左右。

1.3 基因组 DNA 提取

剪取每尾实验鱼鳍条组织约 0.5 mg, 浸泡于 95% 酒精中, 储存在 -20 ℃ 条件下备用。根据 DNA 提取试剂盒(天根, 北京)所示方法和步骤提取基因组 DNA, 用多功能酶标仪检测 DNA 浓度, 1% 琼脂糖凝胶检测 DNA 纯度。调整 DNA 浓度为 100 ng/μL 后于 -20 ℃ 条件下保存。

1.4 引物设计

根据 GenBank 数据库中已发表鳊 *npv* 基因(序列号: EF554595), *pep* 基因(序列号: EU908271), *lpl* 基因(序列号: FJ811962)和 *gh* 基因(序列号: EF205280)的全序列来设计引物, 运用 Primer Premier 5.0 引物设计软件对 *npv* 的侧翼序列区, *pep* 的编码序列区, *lpl* 的编码序列区和 *gh* 的编码序列及侧翼序列区分别设计 1 对特异引物(表 1), 引物合成工作由上海生工生物技术有限公司完成。

表 1 鳊 *npv*、*pep*、*lpl* 和 *gh* 基因 SNPs 位点分析引物信息
Tab. 1 Primers for the identification of SNPs in the *npv*, *pep*, *lpl* and *gh* genes in *Siniperca chuatsi*

引物 primer	产物大小/bp PCR size	引物序列(5'-3') primer sequence	退火温度/℃ <i>T_m</i>	基因位置信息 location along the gene
npv-1	225	F: TGGGTTTCTTGGAGATTGGGC R: TATGACGACGCTTCGGGTGAT	58	part of 5'-UTR
pep-E7	1077	F: TGC GTGCTGATGGTATTC R: CTGCTGAAGATGGAATAG	51	part of exon 5, intron 6, exon 6, intron 7, exon 7, intron 8, exon 8, intron 9, part of exon 9
lpl-E7	1350	F: CAAGACCCGTGAAATGATG R: GTGGTGATGAGGAAGGAC	51	part of exon 6, intron 7, exon 7, intron 8, part of exon 8
gh-G3	516	F: GAGTTTCCCAGTCGTTCT R: GCGTGGCTTCACAGTAG	52	part of exon 4, intron 5, exon 5, intron 6, exon 6, part of 3'-UTR

1.5 SNP 位点的筛选与分型

随机选取样品中最易驯化的 10 个个体和最不易驯化的 10 个个体的基因组为模板, 利用 npv-1、pep-E7、lpl-E7 和 gh-G3 共 4 对引物进行扩增, PCR 反应体系为: 总体积 20.0 μL, 其中含有 DNA 模板 0.4 μL (50~100 ng), 上下游引物各 0.8 μL(工作液浓度为 10 μmol/L), 2×Taq Master Mix 10.0 μL(诺唯赞, 南京), 灭菌 ddH₂O 8.0 μL。

PCR 反应程序为: 94 ℃ 预变性 3 min; 94 ℃ 变性 30 s, 退火(退火温度见表 1) 30 s, 72 ℃ 延伸 40~80 s(约 1 kb/min), 35 个循环; 72 ℃ 延伸 5 min; 最后降温至 12 ℃ 保持 10 s。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 获得特异明亮条带后, 将其 PCR 产物纯化后混合, 送上海生工生物技术有限公司, 使用 ABI 3730XL 测序仪(ABI, 美国) 测序。确定潜在的 SNPs 位点在随机选择的各 10 个

个体中存在差异后,将剩下的 40 个个体也进行各引物的 PCR 扩增,并测序分析其个体的 SNP 基因型。将获得的序列信息用 SeqMan 软件进行峰值读图,用 Clustal W 软件进行序列多重比对分析,用 DNASTar 软件记录每个群体中各个个体的位点的基因型并记录。

1.6 SNP 位点与鳊驯食性状的相关性分析

使用 PopGene32 软件^[29]在易驯食和不易驯食群体中分析计算有效等位基因(effective allele numbers, N_e)、观测杂合度(observed heterozygosity, H_o)、期望杂合度(expected heterozygosity, H_e)和哈迪-温伯格平衡(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)。位点的多态信息含量(polymorphism information content, PIC)根据 Bostein 等^[30]的方法计算,

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n q_i^2 \right) - \left(\sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2q_i^2 q_j^2 \right)$$

式中 q_i 、 q_j 分别为第 i 个和第 j 个等位基因的频率, n 为等位基因频率数目。其中, $PIC > 0.5$ 为高度多态, $0.25 < PIC < 0.5$ 为中度多态, $PIC < 0.25$ 为低度多态。使用 SPSS19.0 软件进行数据处理,采用卡方检验分析 SNP 基因型与鳊食性驯化个体差异的相关性,检验结果 $P < 0.05$ 表示显著相关。当 $n \geq 40$ 且所有 $T \geq 5$ 时,用普通的卡方检验;当 $n \geq 40$ 但有 $1 \leq T < 5$ 时,用 Yates 连续性校正的卡方检验;当 $T < 1$ 或 $n < 40$ 时,用 Fisher 确切概率法直接计算概率。皮尔逊卡方值(Pearson χ^2)大于 2.706/3.841/6.635/10.828,有 90%/95%/99%/99.9%的可能性证明二者相关, $P < 0.05$ 表示显著相关。

2 结果与分析

2.1 鳊食性驯化结果

经过驯食后,筛选得到鳊易驯食群体 50 尾和鳊不易驯食群体 53 尾。驯食结束后,可凭鳊外观状态进行区分:易驯食鳊在投喂人工饲料 0.5 h 后,腹部呈饱食状态,不易驯化鳊在投喂人工饲料/冰鲜饵料鱼 0.5 h 后,腹部由于拒食人工饲料/冰鲜死饵呈干瘪状态。本实验选取鳊个体较大、驯食时间较短。实验过程无鳊因饥饿、病害死亡。

2.2 SNP 位点筛选

鳊基因组 DNA 的电泳结果如图 1 所示, DNA

条带明亮,大多数 DNA 无拖尾现象,仅少数样品有拖尾现象,检测 OD_{260}/OD_{280} 均在 1.60~1.80 之间, DNA 符合实验要求。通过 4 对引物对随机选择的鳊易驯食群体 10 尾和鳊不易驯食群体 10 尾进行 PCR 扩增,每对引物在相同食性群体内测得 10 个 PCR 产物,将每 5 个 PCR 产物进行混合测序,检测测序结果中预测的 SNP 多态位点处测序峰图的形态特征。纯合子 SNP 位点的测序峰为单峰,较高峰值,杂合子 SNP 位点的测序峰为双峰,较低峰值。测序分析结果显示,在本研究不同食性鳊群体中共有 5 个预测的 SNP 位点具有多态性的潜力(图 1)。在 *pep* 基因中发现 2 个 SNP 多态位点: *pep*-A 位点位于外显子 7,仅检测到 2 种基因型, TT 和 TC(图 1a),编码丝氨酸,为同义突变; *pep*-B 位点同样位于外显子 7,检测到 3 种基因型, CC、CT 和 TT(图 1b),编码异亮氨酸,为同义突变。在 *GH* 基因中发现 3 个 SNP 多态位点: *gh*-A 位点位于内含子 4,检测到 3 种基因型, AA、AC 和 CC(图 1c); *gh*-B 位点位于内含子 4,检测到 3 种基因型, AA、AT 和 TT(图 1d); *gh*-C 位点位于外显子 5,检测到 3 种基因型, CC、CT 和 TT(图 1e),编码天冬氨酸,为同义突变。本实验待检测鳊群体中,在 *npv* 和 *lpl* 基因中未检测到 SNP 多态位点。

2.3 SNP 位点群体遗传分析

5 个 SNP 位点在 2 个不同驯食性状的鳊群体中的遗传多样性参数分析见表 2,有效等位基因(N_e)在 1.1959~1.7001,观测杂合度(H_o)和期望杂合度(H_e)分别分布于 0.1800~0.3585 和 0.1655~0.4160,平均多态信息含量(PIC)为 0.2477,全部位点都属于中度多态性位点($0.25 < PIC < 0.5$ 时为中度多态性位点),3 个位点显著偏离哈迪-温伯格平衡(HWE)($P < 0.05$)。

2.4 SNP 位点与驯食性状的关联分析

根据基因频率分析结果可知,在鳊易驯食和鳊不易驯食群体中 SNP 位点 *pep*-A T/C、*pep*-B C/T、*gh*-A A/C、*gh*-B A/T 和 *gh*-C C/T 的优势等位基因分别是 A、A、T、T 和 C。仅 SNP 位点 *pep*-A 在鳊易驯食和鳊不易驯食群体中只有 2 种基因型 TT 和 CT,其他所有位点均为 3 种不同的基因型(表 3)。表 3 列出了各个 SNP 位点的不同基因单

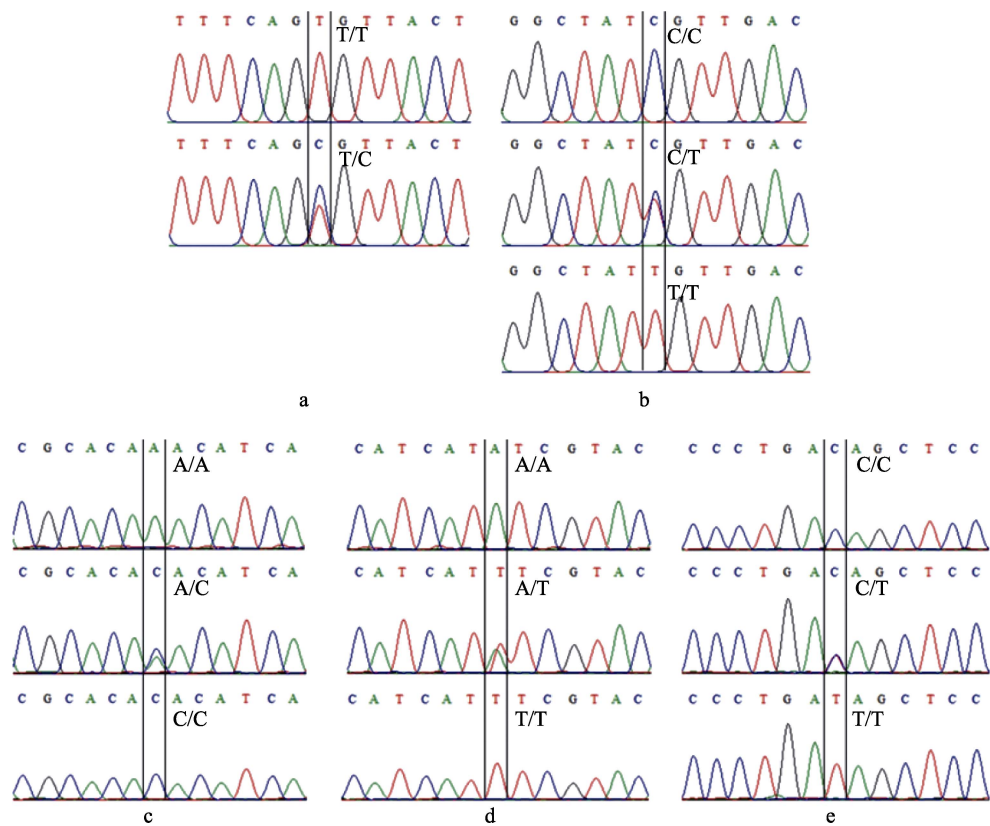


图 1 鳊 *pep* 和 *gh* 基因 SNP 位点不同基因型的测序峰图
a. *pep*-A, b. *pep*-B, c. *gh*-A, d. *gh*-B, e. *gh*-C.
Fig. 1 The sequencing peak chart of different genotypes of SNP loci in *pep* and *gh* genes of *Siniperca chuatsi*
a. *pep*-A, b. *pep*-B, c. *gh*-A, d. *gh*-B, e. *gh*-C.

表 2 鳊 *pep* 和 *gh* 基因 SNP 位点的遗传多样性参数
Tab. 2 Diversity parameters of SNP loci in *pep* and *gh* genes of *Siniperca chuatsi*

位点 locus	易驯/不易驯数 feeder/non-feeder no.	有效等位基因 N_e	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	多态信息含量 PIC	P 值(哈德温伯格平衡) P -value (HWE)
<i>pep</i> -A T/C	F=50	1.1959	0.1800	0.1655	0.1504	0.431
	NF=53	1.4169	0.3585	0.2970	0.2509	2.377
<i>pep</i> -B C/T	F=50	1.7001	0.3400	0.4160	0.3270	1.717
	NF=53	1.5392	0.3396	0.3536	0.2889	0.086
<i>gh</i> -A A/C	F=50	1.3172	0.2400	0.2432	0.2118	0.009*
	NF=53	1.4902	0.3019	0.3321	0.2748	0.456
<i>gh</i> -B A/T	F=50	1.3172	0.2400	0.2432	0.2118	0.009*
	NF=53	1.4902	0.3019	0.3321	0.2748	0.456
<i>gh</i> -C C/T	F=50	1.3172	0.2400	0.2432	0.2118	0.009*
	NF=53	1.4902	0.3019	0.3321	0.2748	0.456
平均 mean		1.4274	0.2844	0.2958	0.2477	

注: * 表示显著偏离哈德温伯格平衡(HWE)($P<0.05$).
Note: * indicates significantly deviate from the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) ($P<0.05$).

倍型在不同鳊驯食性状群体中的基因型频率, 对不同基因型与鳊不同驯食性状做卡方检验(四格表卡方检验法), 结果显示 SNP 位点 *pep*-A T/C 中 2 种基因型 TT(4.141)和 CT (4.141)与鳊驯食性状之间显著相关($P<0.05$).推测这 2 种基因型可显著影响鳊驯食性状。

在本实验研究群体中, 两个基因中不同 SNP 位点组成不同的基因型, 将每一种基因型与不同驯食性状进行关联分析, 结果显示有 3 种基因型与驯食性状存在显著相关($P<0.05$), 分别为 Genotype1、Genotype2 和 Genotype3, 皮尔逊卡方值分别为 4.212、7.044 和 3.949, 均为高相关水平, Genotype2 (TT, CC/CT/TT, AA, AA, TT) 的皮尔逊卡方值最高, 相关性水平最高(表 4), 没有显著性差异的基因型在表中忽略显示。推测这 3 种基因型可显著影响鳊不同驯食性状。

表 3 鳊 *pep* 和 *gh* 基因 SNP 位点的基因型频率及其与驯食性状的关联分析
Tab. 3 Association analysis between genotype frequency of SNP and feeding preference traits in *Siniperca chuatsi*

位点 locus	基因型 genotype	基因型频率(个体数) genotypic frequency (no.)		皮尔逊卡方值 Pearson χ^2
		易驯食 F (50)	不易驯食 NF (53)	
<i>pep</i> -A T/C	TT	0.820 (41)	0.642 (34)	4.141*
	TC	0.180 (9)	0.358 (19)	4.141*
	CC	0.540 (27)	0.604 (32)	0.428
<i>pep</i> -B C/T	CT	0.340 (17)	0.340 (18)	0.000
	TT	0.120 (6)	0.057 (3)	1.297
	AA	0.740 (37)	0.642 (34)	1.165
<i>gh</i> -A A/C	AC	0.240 (12)	0.302 (16)	0.498
	CC	0.020 (1)	0.057 (3)	0.924
	AA	0.740 (37)	0.642 (34)	1.165
<i>gh</i> -B A/T	AT	0.240 (12)	0.302 (16)	0.498
	TT	0.020 (1)	0.057 (3)	0.924
	CC	0.020 (1)	0.057 (3)	0.924
<i>gh</i> -C C/T	CT	0.240 (12)	0.302 (16)	0.498
	TT	0.740 (37)	0.642 (34)	1.165

注: * 表示显著相关($P<0.05$).
Note: * denotes significant correlation ($P<0.05$).

表 4 鳊 SNP 位点不同双倍型和多倍型的基因型频率及不同基因型与驯食性状的关联分析
Tab. 4 Genotype frequency of different SNP diplotypes and polytypes and association analysis between SNP and feeding preference traits in *Siniperca chuatsi*

位点 locus	<i>pep</i> -A T/C 基因型 <i>pep</i> -A T/C genotype	<i>pep</i> -B C/T 基因型 <i>pep</i> -B C/T genotype	<i>gh</i> -A A/C 基因型 <i>gh</i> -A A/C genotype	<i>gh</i> -B A/T 基因型 <i>gh</i> -B A/T genotype	<i>gh</i> -C C/T 基因型 <i>gh</i> -C C/T genotype	基因型频率(个体数) genotypic frequency (no.)		皮尔逊 卡方值 Pearson χ^2
						易驯食 F (50)	不易驯食 NF (53)	
Genotype1	CT	CC/CT/TT	AA	AA	TT	0.120 (6)	0.283 (15)	4.212*
Genotype2	TT	CC/CT/TT	AA	AA	TT	0.620 (31)	0.358 (19)	7.044*
Genotype3	TT	CC	AA	AA	TT	0.340 (17)	0.170 (9)	3.949*

注: * 表示显著相关($P<0.05$).
Note: * denotes significant correlation ($P<0.05$).

3 讨论

3.1 鳊驯食性状相关 SNP 位点

本研究在鳊 *pep* 和 *gh* 基因中共发现 5 个多态 SNP 位点, 所有多态位点都是同义突变, 翻译后氨基酸无变化。同义突变可能导致蛋白质高级结

构的改变, 以及影响蛋白质修饰、运输和信号传导效率, 使得其空间构象发生变化, 进而影响其功能^[31]。鳊转录组研究发现, 易驯食和不易驯食鳊中分别预测到 4768、41 个 SNP 位点, 易驯食鳊 SNP 位点较多, 具有更高的食性关联分析价值^[5]。已有研究报道, 在鳊 *npv* 基因中检测到 3 个多态

SNP 位点^[20]; 在鳊 *pp1caa* 和 *pp1cb* 基因中共检测到 2 个多态 SNP 位点^[21]; 在鳊 *pep* 基因中检测到 2 个多态 SNP 位点^[23], 与本文一致; 在鳊 *lpl* 基因中检测到 3 个多态 SNP 位点^[22]; 在鳊 *gh* 基因中共检测到 5 个多态 SNP 位点^[14, 32], 其中 3 个多态位点与本文一致。本研究 5 个 SNP 位点均处于中等多态水平(平均 PIC=0.2477), 群体杂合度均较大, 遗传变异水平较高, 具较优选育潜力。HWE 检验表明 5 个 SNP 位点在选育群体中受到较小选择压力。

3.2 SNP 位点与驯食性状关联分析

鳊自开口起终生摄食活鱼虾, 拒食死饵或人工饲料, 且不同鳊个体、群体驯食性状差异大。可通过开发驯食差异基因的 SNP 位点, 筛选与驯食性状显著相关的 SNP 位点, 应用于分子辅助选育, 以期加快易驯食鳊品种的培育。研究发现鳊 *npv* 基因 5'侧翼区中存在 1 个驯食性状候选 SNP 位点, 基因型为 AC 时与驯食性状显著相关^[20]。在鳊 *pp1caa* 和 *pp1cb* 基因中各鉴定出 1 个候选 SNP 位点, 当基因型各为 AA/AG 和 CC/CG 时与驯食性状显著相关^[21], 但对 *pp1caa* 中 SNP 位点进行关联分析时, 注意到 AG 基因型在易驯化鳊中频数小于 5, 可扩大检测群体进一步确定其卡方检验显著性。在鳊 *pep* 基因中检测到与本研究一致的多态 SNP 位点, 但在其研究群体中均与驯食性状无显著相关, 双倍型 *Dip1* (CTCC)和 *Dip5* (TTTT)才与驯食性状显著相关^[23], 这与本研究结果不太一致, 可能原因是选育群体的遗传基础不同, 或者鳊驯食性状的是由多个数量性状位点共同控制的, 数量性状由多个微效基因或基因多个位点共同调控。*gh* 可促进食欲和生长^[33], 在 *gh* 基因中已开发较多与生长相关的 SNP 位点^[14, 32, 34], 但未见其与驯食性状关联分析的研究。

本研究将 *pep* 和 *gh* 基因中多态 SNP 位点与鳊驯食性状进行关联分析, SNP 位点 *pep*-A T/C 中 2 种基因型 TT 和 CT 的皮尔逊卡方值均为 4.141, 即表示有 95% 的可能性证明该基因型与鳊驯食性状显著相关。在本研究使用的鳊群体中发现, *gh* 基因的 3 个 SNP 位点仅具有 AAAATT、ACATCT 和 CCTTCC 这 3 种基因型, 这可能与选择的鳊群

体有关, 本实验中鳊群体来自长江流域野生翘嘴鳊亲本在本地进行人工繁育得到的后代。进一步分析两个基因中不同 SNP 位点组成的基因型与驯食性状的关联, 发现 Genotype1 (CT, CC/CT/TT, AA, AA, TT)、Genotype2 (TT, CC/CT/TT, AA, AA, TT) 和 Genotype3 (TT, CC, AA, AA, TT) 这 3 种基因型与驯食性状表型呈显著相关($P<0.05$), 其中 Genotype2 (TT, CC/CT/TT, AA, AA, TT) 相关性最高。这 3 种基因型与鳊驯食性状成高水平显著相关, 影响鳊驯食性状表型, 其中 Genotype2 相关性最高, 可作为最优基因型个体进行选育, 本研究为加快易驯食鳊品种的选育提供了有效的 SNP 分子标记, 有助于实现易驯食鳊新品种的快速分子辅助选育。

参考文献:

- [1] Berthelot C, Brunet F, Chalopin D, et al. The rainbow trout genome provides novel insights into evolution after whole-genome duplication in vertebrates[J]. Nature Communications, 2014, 5: 3657.
- [2] Tine M, Kuhl H, Gagnaire P A, et al. European sea bass genome and its variation provide insights into adaptation to euryhalinity and speciation[J]. Nature Communications, 2014, 5: 5770.
- [3] Liang X F, Zheng W Y, Wang Y L. Visual characteristics of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) in relation to its feeding habit: I. Photo-sensitivity and spectral sensitivity of electroretinogram[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1994, 18(3): 247-253. [梁旭方, 郑微云, 王艺磊. 鳊鱼视觉特性及其对捕食习性适应的研究 I. 视网膜电图光谱敏感性和适应性[J]. 水生生物学报, 1994, 18(3): 247-253.]
- [4] Liang X F. Studies on the artificial diet for mandarin fish *Siniperca chuatsi*[J]. Fisheries Science & Technology Information, 2002, 29(2): 64-67. [梁旭方. 鳊鱼人工饲料的研究[J]. 水产科技情报, 2002, 29(2): 64-67.]
- [5] He S, Liang X F, Sun J, et al. Insights into food preference in hybrid F1 of *Siniperca chuatsi* (♀) × *Siniperca scherzeri* (♂) mandarin fish through transcriptome analysis[J]. BMC Genomics, 2013, 14: 601.
- [6] Prudence M, Moal J, Boudry P, et al. An amylase gene polymorphism is associated with growth differences in the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas*[J]. Animal Genetics, 2006, 37(4): 348-351.
- [7] Qi L L, Wang J B. Study on the zymological properties of protease in aquatic feedstuff[J]. Journal of Hydroecology, 2009, 30(3): 73-76. [齐莉莉, 王进波. 2 种水产饲料用蛋白酶的主要酶学性质研究[J]. 水生态学杂志, 2009, 30(3): 73-76.]
- [8] Ryle A P. The porcine pepsins and pepsinogens[J]. Methods in Enzymology, 1970, 19: 316-336.
- [9] Wu X F, Zhao J L. Cloning and sequencing of the full-length cDNA of pepsinogen gene from the mandarin fish, *Siniperca*

- chuatsi[J]. Journal of Fisheries of China, 2008, 32(6): 971-976. [吴雪峰, 赵金良. 鳊胃蛋白酶原基因 cDNA 全长的克隆与序列分析[J]. 水产学报, 2008, 32(6): 971-976.]
- [10] Venkateshwari A, Vidyasagar A, Prasad R, et al. Pepsinogen polymorphism in the Indian population and its association with duodenal ulcer[J]. Human Genetics, 1997, 101(2): 201-204.
- [11] Li W S, Lin H R. The endocrine regulation network of growth hormone synthesis and secretion in fish: Emphasis on the signal integration in somatotropes[J]. Science China Life Sciences, 2010, 53: 462-470. [李文笙, 林浩然. 鱼类生长激素合成与分泌的内分泌调控网络: 垂体生长激素分泌细胞中的信号整合[J]. 中国科学: 生命科学, 2010, 40(2): 149-158.]
- [12] Xiao D, Lin H R. Advance in neuroendocrine regulation of food intake and growth in fish[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2000, 7(3): 102-106. [肖东, 林浩然. 鱼类摄食和生长的神经内分泌调控途径研究进展[J]. 中国水产科学, 2000, 7(3): 102-106.]
- [13] Ni J, You F, Liu S S, et al. Correlation analysis of microsatellite DNA marker in the GH exon 1 region with growth traits of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Chinese Journal of Zoology, 2011, 46(5): 108-113. [倪静, 尤锋, 刘思思, 等. 牙鲆 GH 基因第 1 外显子区微卫星标记与幼鱼生长性状的相关分析[J]. 动物学杂志, 2011, 46(5): 108-113.]
- [14] Wang H F. SNPs identification of growth-related genes and correlation analysis on growth traits in siniperid species[D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2014. [王海芳. 鳊生长相关基因的 SNPs 及其与生长性状的相关性研究[D]. 广州: 中山大学, 2014.]
- [15] Wang G X, Liu Y X, Wang Y F, et al. Identification of SNPs in growth hormone gene and association with growth traits in *Paralichthys olivaceus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(2): 347-352. [王桂兴, 刘永新, 王玉芬, 等. 牙鲆 GH 基因的 SNPs 与生长性状关系的初步研究[J]. 中国水产科学, 2015, 22(2): 347-352.]
- [16] Li M J. Correlation between the polymorphism of growth hormone gene with the growth traits in the yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016. [李美娟. 黄颡鱼生长激素基因多态性与生长性状的关联性研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.]
- [17] Polakof S, Panserat S, Plagnes-Juan E, et al. Altered dietary carbohydrates significantly affect gene expression of the major glucosensing components in Brockmann bodies and hypothalamus of rainbow trout[J]. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2008, 295(4): R1077-R1088.
- [18] Leal S M. Genetics and analysis of quantitative traits[J]. The American Journal of Human Genetics, 2001, 68(2): 548-549.
- [19] Tang L Q, Xiao C L, Wang W P. Research and application progress of SNP markers[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(12): 154-158. [唐立群, 肖层林, 王伟平. SNP 分子标记的研究及其应用进展[J]. 中国农学通报, 2012, 28(12): 154-158.]
- [20] Sun J, He S, Liang X F, et al. Identification of SNPs in *NPY* and *LEP* and the association with food habit domestication traits in mandarin fish[J]. Journal of Genetics, 2015, 94(S1): 118-122.
- [21] Cheng X Y. Molecular cloning, expression and single nucleotide polymorphisms of protein phosphatase 1 (PP1) in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016. [程小燕. 鳊鱼蛋白磷酸酶 (PP1) 基因家族的克隆、表达特征和 SNP 多态性分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.]
- [22] Yang Y H, Liang X F, Fang R, et al. Polymorphism of SNPs in the lipoprotein lipase (*LPL*) in *Siniperca chuatsi* and their association with feed habit domestication[J]. Hereditas (Beijing), 2011, 33(9): 996-1002. [杨宇晖, 梁旭方, 方荣, 等. 鳊脂蛋白脂酶基因 SNP 及其与食性驯化相关性分析[J]. 遗传, 2011, 33(9): 996-1002.]
- [23] Fang R, Liang X F, Yang Y H, et al. Association of polymorphism detection of SNPs in exon 7 of pepsinogen (*PEP*) and feeding behavior domestication in *Siniperca chuatsi*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(5): 992-999. [方荣, 梁旭方, 杨宇晖, 等. 鳊胃蛋白酶基因外显子 7 上 SNP 检测及其与食性驯化相关分析[J]. 中国水产科学, 2011, 18(5): 992-999.]
- [24] Fu C, Cui Y, Hung S S O, et al. Growth and feed utilization by F₄ human growth hormone transgenic carp fed diets with different protein levels[J]. Journal of Fish Biology, 1998, 53(1): 115-129.
- [25] Rahman M A, Ronyai A, Engidaw B Z, et al. Growth and nutritional trials on transgenic Nile tilapia containing an exogenous fish growth hormone gene[J]. Journal of Fish Biology, 2001, 59(1): 62-78.
- [26] Guan B, Hu W, Zhang T L, et al. Metabolism traits of 'all-fish' growth hormone transgenic common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. Aquaculture, 2008, 284(1-4): 217-223.
- [27] Liang X F, Oku H, Ogata H Y, et al. Weaning Chinese perch *Siniperca chuatsi* (Basilewsky) onto artificial diets based upon its specific sensory modality in feeding[J]. Aquaculture Research, 2001, 32: 76-82.
- [28] Liang X F, Lin X T. Study on the dietary domestication of *Siniperca chuatsi*[J]. Reservoir Fisheries, 2002, 23(3): 4-5. [梁旭方, 林小涛. 鳊食性驯化的研究[J]. 水利渔业, 2002, 23(3): 4-5.]
- [29] Yeh F C, Yang R C, Boyle T B J, et al. PopGene32, Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis, version 1.32[Z]. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada, 2000.
- [30] Bostein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. American Journal of Human Genetics, 1980, 32(3): 314-331.
- [31] Kang J H, Lee S J, Park S R, et al. DNA polymorphism in the growth hormone gene and its association with weight in olive flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Fisheries Science, 2002, 68(3): 494-498.
- [32] Tian C X, Yang M, Lv L, et al. Single nucleotide polymorphisms in growth hormone gene and their association with growth traits in *Siniperca chuatsi* (Basilewsky)[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(4): 7029-7036.
- [33] Quik E H, van Dam P S, Kenemans J L. Growth hormone and selective attention: A review[J]. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 2010, 34(8): 1137-1143.
- [34] Ni J, You F, Xu J H, et al. Single nucleotide polymorphisms in intron 1 and intron 2 of *Larimichthys crocea* growth hormone gene are correlated with growth traits[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2012, 30(2): 279-285.

Single nucleotide polymorphisms in pepsinogen gene, growth hormone gene and their association with food habit domestication traits in *Siniperca chuatsi*

DOU Yaqi^{1,2}, LIANG Xufang¹, GAO Junjie¹, HE Shan¹, SHI Linjie¹, SHI Dengyong³

1. College of Fisheries, Chinese Perch Research Center, Huazhong Agricultural University; Innovation Base for Chinese Perch Breeding, Key Lab of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Wuhan 430070, China;
2. Hubei Aquaculture Technology Extension Center (Hubei Aquatic Breeds Introduction and Breeding Center), Wuhan 430070, China;
3. Hubei Province Aquatic Stains Testing Station, Wuhan 430070, China

Abstract: Mandarin fish is one of the most commercially important freshwater fish in Chinese aquaculture. Once the fry of mandarin fish start feeding, in the wild they exclusively eat live prey fish; therefore in cultivation they refuse dead prey fish or artificial diets, contributing to the challenges of breeding this fish. Currently, the source of live feed for the intensively cultured mandarin fish is also cultivated. The challenges in cultivating live feed for mandarin fish include extremely high cultivation costs, difficulties in maintaining stock supply all year round, and disease prevention, which is very difficult in the cultivation process. Therefore introducing artificial diets in domesticated mandarin fish could resolve these challenges. Based on the existing research, this study analyzed the transcriptome data of mandarin fish, and the differences in expression of pepsinogen (*pep*) gene and growth hormone (*gh*) gene were detected. Genes *pep* and *gh* are considered as candidate genes for food habit traits in domesticated mandarin fish. In this study, single nucleotide polymorphisms (SNPs) on candidate genes were sequenced and typed in a feeder group fed dead prey fish diets and a non-feeder control group, and evaluated for associations with food habit domestication traits in 103 mandarin fish. The feeder means the fish accepts dead prey fish, and the non-feeder means the fish refuses to eat dead prey fish. In total, five SNPs were identified in *pep* and *gh* genes. The effective allele numbers ranged from 1.1959 to 1.7001, with a mean of 1.4274 alleles per locus. The observed (H_o) and expected heterozygosities (H_e) values ranged from 0.1800 to 0.3585, and from 0.1655 to 0.4160, respectively. The value of polymorphism information content (PIC) was 0.2477, which is a classification of the median polymorphism level in the mandarin fish population. These results showed that the two genotypes TT and CT in the *pep*-A T/C of the SNP locus were significantly correlated with the high level of the food habit domestication traits in mandarin fish ($P < 0.05$). The three genotypes of genotype 1 (CT, CC/CT/TT, AA, AA, TT), genotype 2 (TT, CC/CT/TT, AA, AA, TT) and genotype 3 (TT, CC, AA, AA, TT) were also significantly associated with high levels of food habit domestication traits ($P < 0.05$). These genotypes affect the food habit domestication traits in mandarin fish, and genotype 2 had the highest correlation, which can be selected as the optimal genotype among individuals. In conclusion, our results demonstrated that these effective SNP molecular markers in *pep* and *gh* genes could influence food habit traits in domestication of mandarin fish and could be used for accelerating the molecular marker-assisted selective breeding in mandarin fish. Based on the study of the SNPs association analysis of candidate genes with food habit domestication traits in mandarin fish, our findings could provide theoretical foundation and methodology for selectively breeding mandarin fish with increased tolerance to dead prey fish or artificial diets.

Key words: *Siniperca chuatsi*; food habit domestication traits; single nucleotide polymorphism (SNP); correlation analysis

Corresponding author: LIANG Xufang. E-mail: xufang_liang@hotmail.com