

团头鲂低氧耐受相关 SNPs 标记的开发

陈柏湘^{1,2} 王伟峰¹ 王卫民¹ 王焕岭¹

1. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070; 2. 广东佛山市南海百容水产良种有限公司, 佛山 528216

摘要 为寻找耐低氧相关 SNPs 分子标记辅助团头鲂优良品种选育, 利用团头鲂低氧耐受和敏感群体的转录组数据, 进行 SNPs 位点的开发和鉴定, 获得 52 623 个可能的 SNPs 位点, 其中碱基转换和颠换型位点分别占 57.4% (30 192 个) 和 31.9% (16 802 个); 同义 SNPs 占编码区总 SNPs 的 99.7%, 非同义 SNPs 仅有 32~35 个; 使用 PCR-RFLP 技术对筛选出的 5 个非同义的多态性 SNPs 进行耐低氧性状关联分析。结果显示, Plin2-A1157G 和 Hif-3 α -A2917G 位点的 SNPs 在团头鲂亲本群体中与低氧耐受性状显著相关, 但在子代群体中却与低氧耐受性状无显著相关性。这说明亲代中筛选出的分子标记并不一定适用于子代群体, 在利用分子标记辅助育种时需要考虑标记在子代中的有效性。

关键词 团头鲂; 低氧; SNP; 性状关联分析

中图分类号 S 917: Q 959.46⁺8

文献标识码 A

文章编号 1000-2421(2019)02-0023-07

分子标记辅助选择育种是利用分子标记与目标性状决定基因紧密连锁的特点, 基于杂交后代不同个体基因型的检测结果, 进行辅助选择的一种育种技术。该方法通过检测分子标记, 将基因型与表型相结合。由于其具有快速、准确、不受环境条件干扰的特点, 在育种过程中可显著提高育种的准确性和效率, 目前已广泛应用于动植物育种工作中, 如水稻、玉米、猪、牛等物种^[1-3]。水产中抗淋巴囊肿病毒牙鲈、全雄黄颡鱼和耐寒大菱鲈新品系的培育等都是基于该方法获得的^[4-6]。

筛选出有效的动植物重要性状相关的分子标记是开展分子标记辅助育种的前提。国内外开展了大量关于水产养殖动物重要性状尤其是性别和抗病相关分子标记的筛选工作并获得了一些有效的分子标记, 如斑点叉尾鲷、半滑舌鳎、黄颡鱼、条石鲷等性别特异的分子标记以及虹鳟、大菱鲈、牙鲈及斑节对虾等抗病相关标记^[7]。关于鱼类耐低氧性状相关分子标记的研究, 已在罗非鱼、斑点叉尾鲷及杂交鲷中基于全基因组分析筛选出低氧耐受相关的 QTLs (quantitative trait locus)^[8-10], Zhang 等^[11] 基于候选基因法筛选出团头鲂 3 个低氧耐受相关 SNPs 标记。但这些标记并没有应用到分子辅助育种中, 并

且同一标记也不一定适合于其他群体或物种。

团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*), 俗称武昌鱼, 因其食性广、生长快、成活率高、规格适中等优点而成为市场的畅销品种。为了克服和弥补草鱼品质不高、易发病等方面的不足, 一些养殖者加大了团头鲂良种的引进力度和养殖规模, 在一定程度上调整了渔业结构, 降低了养殖成本和风险^[12]。因此, 团头鲂养殖产量呈现不断上升的趋势, 2016 年全国养殖总产量达到 82.6 万 t (FAO)。然而相对于鲤、鲫等鲤科鱼类, 团头鲂不耐低氧和运输, 养殖过程中常常由于不良环境因素产生应激, 影响团头鲂产业的可持续发展^[13]。虽然人们对团头鲂的低氧应激机制进行了研究, 鉴定了多个低氧相关基因^[14-19], 但团头鲂中关于与低氧相关分子标记的报道仍非常有限。本研究基于耐低氧程度不同的团头鲂个体的肌肉组织转录组高通量测序结果筛选 SNPs 位点, 对部分 SNPs 位点建立合适的 PCR-RFLP 分型技术, 并通过性状关联分析进行鉴定, 以期获得与团头鲂低氧耐受性状显著相关的 SNPs, 为团头鲂耐低氧品系的遗传选育、分子辅助育种技术等提供一定理论依据。

收稿日期: 2018-11-05

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31872542); 中央高校基本业务费专项 (2013PY067)

陈柏湘, 博士研究生, 研究方向: 遗传育种. E-mail: 155290338@qq.com

通信作者: 王焕岭, 博士, 副教授. 研究方向: 水产动物遗传育种. E-mail: huanlingok@mail.hzau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

1) 转录组测序的样品。团头鲂各群体样本来源于湖北百容水产良种有限公司。随机选取规格为 (430 ± 20) g 的 1 龄半个体 600 尾, 在水泥池中暂养 3 周后, 根据文献描述的方法进行低氧处理^[20], 选取低氧处理后最早出现严重浮头、身体翻转的个体为低氧敏感个体 (MS, $n=5$), 待低氧处理持续至最后浮头的鱼作为低氧耐受个体 (MT, $n=5$), 鱼浮头翻身后立即将其麻醉 (40 mg/L MS-222), 然后取背部的肌肉组织, 加入 Trizol 后干冰保存送北京诺禾致源科技股份有限公司进行 RNA 抽提并建库测序, 其中每个处理组的 5 尾鱼肌肉组织混合建库。同时选取未经低氧处理的个体作为对照 (MC, $n=5$)。

2) 性状关联分析样本的亲本群体的构建。通过鳍条和荧光标记相结合的方法对来自 39 个家系的幼鱼 (约 100 g/尾, 每个家系 50 尾) 分别进行标记, 暂养 2 d 后每个家系随机选取 40 尾个体混合到一个池中, 适应 2 d 后, 进行耐低氧测试, 根据各家系累积身体失衡和腹部翻转率的变化情况, 分别筛选出 5 个低氧耐受能力最强和最弱的家系作为低氧耐受和敏感群体的基础群。然后对 2 个群体的鱼体注射电子芯片, 进行亲鱼的培育。本研究用于 SNPs 分型和相关性分析的样品分别为低氧耐受群体 25 尾, 敏感群体 50 尾。

3) 性状关联分析样本的子代群体的构建。从低氧耐受群体中选取健康的个体, 雌雄各 5 尾采用 5×5 的繁育方式进行人工繁殖, 获得低氧耐受的子代群体, 同样的方式获得低氧敏感的子代群体, 每个群体的子代分别放在 3 个平行水泥池养殖。当规格达到 20 g 左右时, 从每个水泥池中随机选取 40 尾鱼, 并通过剪部分尾鳍和胸鳍方式对 2 个群体进行标记, 混合放入 1 000 L 的桶中适应 2 d 后进行低氧处理, 根据浮头时间先后确定低氧耐受和敏感的 2 个群体共约 240 尾, 采集不同个体的鳍条组织放入 95% 乙醇中用于基因组 DNA 提取。

1.2 SNPs 的筛选及引物设计

根据转录组测序结果从低氧耐受和低氧敏感个体间的差异基因中筛选基因编码区非同义突变位点, 为了排除测序错误、提高 SNPs 的有效性, 研究筛选的 SNPs 位点应符合转录本覆盖度之和大于 20 的 contigs, 次要等位基因频率大于 30%, 覆盖度大

于 500 时 SNPs 的突变频率应大于 10%。确定候选 SNPs 后, 利用 Primer 5.0 软件设计引物, 引物由武汉天一辉远生物科技有限公司合成。

在团头鲂低氧耐受和敏感群体中进行 PCR 扩增, PCR 体系 (10 μ L) 为 $1 \times$ Buffer, 0.20 mmol/L 的 dNTPs, 1 U 的 *Taq* 酶, 0.25 μ mol/L 引物, 0.25 μ g 模板 DNA。5 个 SNPs 位点检测的 PCR 引物如下:

plin2, F: 5'-CACACTGACCATTCGCTAC-3', R: 5'-CGGACCTACCAGCCAATT-3'; *nr4a1*, F: 5'-CCAAGTTCAAGCGATGTAA-3', R: 5'-TTGTCT-GAGAAGGAGGATG-3'; *hif-3a*, F: 5'-CTGA-CAAACGCAACAAATAC-3', R: 5'-ATTGGAAGT-GACACGAACA-3'; *obs1*, F: 5'-ACTCCATTGTCCT-GCTGTT-3', R: 5'-GCCACGCTTCCTCATTAAAG-3'; *csnrp2*, F: 5'-AGGCTGCTCAATGACAAC-3', R: 5'-ATACTGTTCTGCTCTGATCC-3'。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 32 个 PCR 循环 (94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s), 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。扩增产物通过 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并将其送武汉天一辉远生物科技有限公司测序。

1.3 PCR-RFLP 检测

利用 Primer 5.0 软件对 SNPs 突变前后序列进行分析, 如果突变前后的序列改变了限制性内切酶的识别位点, 则利用相应的限制酶对扩增序列进行酶切, 酶切体系按照不同限制酶的说明书进行, 酶切产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 数据分析

基于 PCR-RFLP 的检测结果计算出各位点的基因频率和基因型频率, 并利用 Popgen32 软件进行相关遗传多样性参数的统计, 如有效等位基因数 (effective number of alleles, N_e)、期望杂合度 (expected heterozygosity, H_e)、观测杂合度 (observed heterozygosity, H_o) 以及多态信息含量 (polymorphism information content, PIC) 等, 并分析各个位点是否符合哈迪-温伯格平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)。

其中 $N_e = 1 / \sum P_i^2$, $H_e = 1 - \sum P_i^2$, P_i 为该位点上第 i 个等位基因的频率; $H_o =$ 杂合子观察数 / 观察个体总数。

采用卡方检验对各 SNPs 位点在低氧敏感群体和低氧耐受群体中的基因频率和基因型频率进行相关性分析。

2 结果与分析

2.1 基于转录组的分子标记信息

本研究基于转录组数据共获得 15 909 个 SSRs (simple sequence repeat, 简单重复序列, 也称微卫星), 占序列比例为 27.76%。SSRs 中 1~6 碱基重复都存在, 其中单碱基重复类型有 10 085 个, 占总 SSRs 的比例(63%)最大, 其次是二碱基重复、三碱基重复、四碱基重复, 比例分别为 23%、12%、2%,

而五碱基重复和六碱基重复类型最少; 在二碱基重复和三碱基重复类型中 AC/GT 类型以及 ATC/ATG 和 AAT/ATT 类型在同类型中所占比例相对较高(图 1A)。同时, 本研究发现 SNPs 标记 52 623 个, 突变发生率为 0.081%。其中 5 629 个插入/缺失 SNP (IndelSNP), 发生碱基转换的 SNPs 有 30 192 个, 而颠换位点有 16 802 个; 其中发生 A/G 和 C/T 转换的 SNPs 最多, 分别为 15 025 个和 15 167 个(图 1B)。

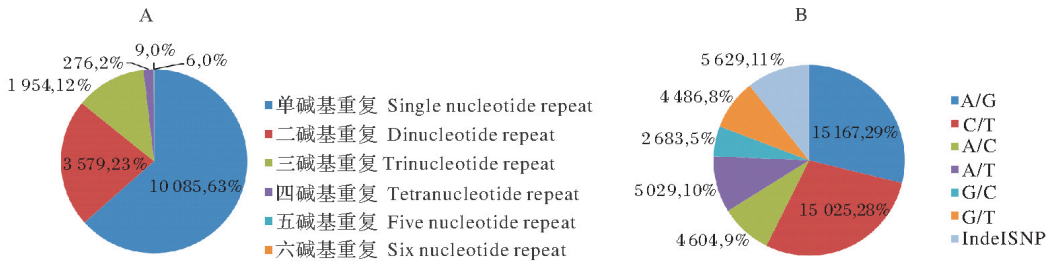


图 1 SSRs(A)和 SNPs(B)突变类型及分布频率

Fig.1 Nucleotide variation types and frequency of SSRs (A) and SNPs (B)

2.2 非同义 SNPs 的筛选及其与低氧耐受性状的关联分析

经分析发现在低氧敏感群体、耐受群体以及对照组中检测到总 SNPs 分别为 33 677、34 555 及 34 684 个, 其中位于非编码区的 SNPs 占多数 (67.9%~68.9%), 分别有 22 859、23 819、23 848 个; 而编码区 SNPs 所占比例为 31.07%~31.24%。进一步对编码区的突变位点进行分析发现, 同义 SNPs 分别为 10 786、10 701、10 802 个, 非同义 SNPs 所占比例很小, 仅为 0.3%(32~35 个)。最终对来自 16 个基因的 28 个非同义 SNPs 进行分析, 考虑到引物设计的难易及后期所采用的检测方法, 对其中 5 个 RFLP 突变位点进行了检测, 其中 5 个 SNPs 位点所采用的限制性内切酶以及产物的片段大小分别为 Plin2-A1157G (*Bgl* II, 73-213-286), Nr4a1-C2188T (*Afa* I, 68-101-169), Hif-3 α -A2917G (*Afa* I, 93-118-211), Obsl1-C10761G (*Hae* III, 282-164-446), Csrnp2-C1568T (*Ava* II, 41-154-195)。

对这 5 个 SNPs 位点利用 PCR-RFLP 方法在低氧耐受和低氧敏感亲本群体中检测, 根据 PCR-RFLP 的分型结果计算出 5 个 SNPs 位点在 2 个群体中的基因频率和基因型频率, 结果如表 1 所示。卡方检验结果表明 Plin2-A1157G 和 Hif-3 α -A2917G 位点在 2 个群体中分布频率差异显著

($P<0.05$), 其优势等位基因型均为 AA 型。进一步关联分析显示这 2 个 SNPs 与团头鲂低氧耐受性状显著相关。

2.3 基于 SNPs 的遗传多样性分析

根据分型结果统计各 SNPs 位点的基因型, 利用 PopGen32 软件分析遗传多样性相关指标。结果显示, 低氧耐受和敏感群体中 5 个位点的观测等位基因数均为 2 个, 平均有效等位基因数分别为 1.651 (1.438~1.930) 和 1.530 (1.185~1.807), 平均观测杂合度分别为 0.401 和 0.276, 期望杂合度的范围分别为 0.311~0.494 和 0.157~0.451。Shannon 信息指数分布范围分别为 0.483~0.675 和 0.291~0.639。PIC 分析显示这 2 个群体都属于中度多态 (表 2)。除了 Nr4a1-C2188T 在低氧敏感群体中偏离哈迪-温伯格平衡外, 其他位点在这 2 个群体中都符合哈迪-温伯格平衡。

团头鲂低氧耐受和敏感群体间的近交系数 (F_{it}) 和群体内近交系数 (F_{is}) 平均分别为 0.068 和 0.056, 群体间基因分化系数 (F_{st}) 为 0.003~0.034 (平均为 0.013), 基因流 (N_m) 为 7.050~94.453 (平均为 19.636) (表 3)。另外, 分析显示两群体的遗传相似度高达 0.991, 遗传距离仅为 0.009, 说明群体间遗传分化程度很低。

表 1 5 个 SNPs 的基因和基因型频率在低氧耐受群体和敏感群体中的卡方检验结果
Table 1 Chi-square test of 5 SNPs gene and genotype frequencies in hypoxia tolerant and sensitive populations

SNP 位点 SNP locus	基因型 Genotype	耐受群 MT	敏感群 MS	χ^2	P	SNP 位点 SNP locus	等位基因 Allele	耐受群 MT	敏感群 MS	χ^2	P
Plin2-A1157G	AA	11 (50.00%)	38 (79.17%)	6.700	0.035 *	Plin2-A1157G	A	32 (72.72%)	84 (87.50%)	4.636	0.031 *
	AG	10 (45.45%)	8 (16.67%)				G	12 (27.27%)	12 (12.50%)		
	GG	1 (4.55%)	2 (4.17%)								
Nr4a1-C2188T	CC	8 (38.10%)	26 (57.78%)	2.691	0.260	Nr4a1-C2188T	C	25 (59.52%)	63 (70.00%)	1.414	0.234
	CT	9 (42.86%)	11 (24.44%)				T	17 (40.47%)	27 (30.00%)		
	TT	4 (19.05%)	8 (17.78%)								
Hif-3 α -A2917G	AA	15 (62.50%)	39 (82.98%)	6.659	0.036 *	Hif-3 α -A2917G	A	39 (81.25%)	86 (91.48%)	4.161	0.035 *
	AG	9 (37.50%)	8 (17.02%)				G	9 (18.75%)	8 (8.51%)		
	GG	0 (0.00%)	0 (0.00%)								
Obsl1-C10761G	CC	10 (40.00%)	23 (46.00%)	0.983	0.612	Obsl1-C10761G	C	30 (71.43%)	66 (67.34%)	0.227	0.634
	CG	10 (40.00%)	20 (40.00%)				G	12 (28.57%)	32 (32.65%)		
	GG	1 (4.00%)	6 (12.00%)								
Csrnp2-C1568T	CC	14 (63.64%)	24 (52.17%)	1.280	0.527	Csrnp2-C1568T	C	34 (77.27%)	67 (72.83%)	0.308	0.579
	CT	6 (27.27%)	19 (41.30%)				T	10 (22.73%)	25 (27.17%)		
	TT	2 (9.09%)	3 (6.52%)								

表 2 5 个 SNPs 位点的遗传多样性
Table 2 Genetic diversity for five SNPs

群体 Population	SNP 位点 SNP locus	多态信息 含量 PIC	观测杂 合度 H_o	期望杂 合度 H_e	有效等位 基因数 N_e	Shannon 信息指数 I	哈-温 平衡 H-W
低氧耐受群体 Hypoxia tolerant group	Plin2-A1157G	0.318	0.455	0.406	1.658	0.586	ns
	Nr4a1-C2188T	0.366	0.429	0.494	1.930	0.675	ns
	Hif-3 α -A2917G	0.258	0.375	0.311	1.438	0.483	ns
	Obsl1-C10761G	0.325	0.476	0.418	1.690	0.598	ns
	Csrnp2-C1568T	0.290	0.273	0.359	1.541	0.536	ns
低氧敏感群体 Hypoxia sensitive group	Plin2-A1157G	0.195	0.167	0.221	1.280	0.377	ns
	Nr4a1-C2188T	0.332	0.244	0.425	1.724	0.611	**
	Hif-3 α -A2917G	0.144	0.170	0.157	1.185	0.291	ns
	Obsl1-C10761G	0.347	0.388	0.451	1.807	0.639	ns
	Csrnp2-C1568T	0.317	0.413	0.400	1.655	0.585	ns

注:ns:差异不显著($P>0.05$); **:差异极显著($P<0.01$)。Note:ns;No significant difference ($P>0.05$) ; **:Significant difference ($P<0.01$).

2.4 子代群体中 SNPs 与低氧耐受性状相关性的验证

为了在低氧耐受和敏感群体的子代群体中检测 Plin2-A1157G 和 Hif-3 α -A2917G 位点与耐低氧性

状的相关性,对这 2 个 SNPs 标记在子代群体中的基因型进行了分析(表 4),结果显示这 2 个 SNPs 位点的优势等位基因型和在亲代中的结果类似,然而卡方检验的结果却显示在子代群体中这 2 个 SNP

表 3 低氧耐受和低氧敏感群体遗传分化指数

Table 3 Genetic differentiation between hypoxia tolerant and sensitive populations

SNP 位点 SNP locus	群体内近交系数 F_{is}	总群体近交系数 F_{it}	遗传分化系数 F_{st}	基因流 N_m
Plin2-A1157G	0.009	0.025	0.034	7.050
Nr4a1-C2188T	0.254	0.263	0.012	20.543
Hif-3 α -A2917G	0.184	0.158	0.022	10.979
Obsl1-C10761G	0.011	0.008	0.003	82.100
Csrnp2-C1568T	0.082	0.084	0.003	94.453
平均值 Mean	0.056	0.068	0.012 6	19.636

表 4 2 个 SNPs 标记在低氧耐受和敏感子代群体中的基因型分布情况

Table 4 Genotype distribution of two SNPs in offspring populations from hypoxia tolerant and sensitive parents

SNP 标记 SNP locus	群体 Population	低氧耐受性 Hypoxia tolerance	基因型(频率/%) Genotype(Frequency)			χ^2	P
			AA	AG	GG		
Plin2-A1157G	A	敏感 Sensitive	36(90.00)	4(10.00)	0(0.00)	2.425	0.119
		耐受 Tolerant	50(78.13)	14(21.87)	0(0.00)		
	B	敏感 Sensitive	58(93.55)	2(3.23)	2(3.23)	4.957	0.084
		耐受 Tolerant	25(80.65)	5(16.13)	1(3.22)		
Hif-3 α -A2917G	A	敏感 Sensitive	34(80.95)	7(16.67)	1(2.38)	1.698	0.428
		耐受 Tolerant	57(85.07)	10(14.93)	0(0.00)		
	B	敏感 Sensitive	49(64.47)	26(34.21)	1(1.32)	0.543	0.762
		耐受 Tolerant	22(68.75)	10(31.25)	0(0.00)		

注:A:低氧耐受(♀×♂)杂交子代,B:低氧敏感(♀×♂)杂交子代。Note:Population A:Hypoxia tolerance (♀×♂) offspring; Population B:Hypoxia sensitivity (♀×♂) offspring.

位点与低氧耐受性状无显著相关($P>0.05$)。

3 讨 论

SNPs 作为一种分子遗传标记,对动植物的遗传选育非常重要。而随着测序技术及相关生物信息学技术的快速发展,测序成本逐渐降低,不管在模式生物还是非模式生物中大量的 SNPs 标记被筛选出来,用于构建遗传连锁图、分析群体结构和性状关联、开展标记辅助育种等方面。通过高通量测序大规模开发 SNPs 的最好途径是基因组测序,但成本较高;其次是通过数据库中原有 ESTs 序列的比对分析获得,但标记开发效率低、目的性弱且难以验证。而基于转录组测序获得的 SNPs 来自转录区,也就是突变以后可能会导致氨基酸的变化,进而会影响基因的功能,且测序成本较低^[21],因此,在动植物分子进化分析、QTL 定位等方面得到了广泛应用。本研究基于高通量转录组测序从团头鲂低氧耐受和敏感个体中筛选到了 52 623 个可能的 SNPs 位点,可为鱼类低氧耐受机制研究提供依据。然而进一步分析发现编码区非同义 SNPs 仅有 32~35 个,这主要是由于非同义 SNPs 位点常常受到较强的选择压力进而会影响生物的表型。而利用 PCR-RFLP 分型技术从 28 个候选非同义 SNPs 位点中筛选出 5 个多态性 SNPs,比例为 17.8%,显著低于

栉孔扇贝、中国对虾及大菱鲆中的比例^[22-25]。这可能与群体数量及其遗传多样性等有关,也与 PCR-RFLP 分型方法的使用范围有关。

在团头鲂低氧耐受和敏感群体中所检测的 5 个 SNPs 位点的多态信息含量大多数都在 0.25~0.50,为中度多态。由于 SNPs 标记大多为双态,中度多态即可满足分子标记的要求,并且 SNPs 广泛分布于物种的整个基因组中,遗传稳定易分型检测,因此,在实际应用中为了弥补多态性低的缺陷,通过增加 SNPs 位点的数量来提高群体的遗传多样性。团头鲂低氧耐受和敏感群体间的遗传分化系数和遗传相似度分别为 0.126 和 0.991,说明这 2 个群体间没有发生明显的遗传分化,即在选育过程中团头鲂低氧耐受性的差异未引起群体间遗传分化。该结果与在中国对虾抗病性状^[26]、褐牙鲷耐热性状^[27]中的研究类似,在短期内群体单一表型性状的选育并不会引起群体间的遗传分化^[28]。

关联分析显示,在亲代群体中仅仅 Hif-3 α -A2917G 和 Plin2-A1157G 位点与团头鲂低氧耐受性状显著相关,即这 2 个 SNP 分别位于 *hif-3 α* (hypoxia inducible factor, 低氧诱导因子) 和 *plin2* (perilipin, 脂滴表面蛋白) 基因中。Hif 是细胞在低氧环境下调控与低氧应激相关基因表达的重要调节因子,包括 Hif-1、Hif-2 和 Hif-3,每个成员又由 α 和

β 组成^[29-30]。关于 Hif-3 α 的功能,人们认为其作为负调控因子通过与 Hif-1 α 和 Hif-2 α 竞争 Hif-1 β 参与低氧调控^[31]。后来有研究证实 Hif-3 α 也可以与 HRE 结合,促进一些基因的转录以应对低氧胁迫^[32]。PLIN2 又称脂肪分化相关蛋白,分布在脂滴表面,参与脂质代谢,可促进胞内脂滴形成,保护三酰甘油免受脂解^[33]。另外研究也发现低氧可以显著激活 *plin2* mRNA 和蛋白质的表达,敲除该基因可以促进滋养层细胞凋亡,说明 PLIN2 在脂质调控和滋养层防御凋亡性细胞死亡过程中具有重要作用^[34]。这些研究表明 *hif-3 α* 和 *plin2* 基因在低氧胁迫中发挥作用。

为了在子代群体中进一步验证 Plin2-A1157G 和 Hif-3 α -A2917G 位点是否仍然与低氧耐受性状显著相关,本研究在低氧耐受和敏感亲本的子代群体中分析了 Plin2-A1157G 和 Hif-3 α -A2917G 与低氧耐受性状的关联,结果显示这 2 个 SNPs 标记与低氧耐受性能无显著相关,说明亲代中筛选出的分子标记并不一定适用于子代群体,无法进行分子标记辅助选择。关于分子标记有效性的问题在不同的研究中结果也不相同。黄智慧^[6]筛选出 2 个与大菱鲂耐高温性状相关的分子标记,并在子代中对其进行评估,发现子代的耐高温性能也得到了显著提高,认为利用分子标记辅助选择耐高温品系亲本是有效的。而 Wang 等^[5]却发现筛选出的 2 对与黄颡鱼 XY 染色体连锁的 SCAR 标记在其他种群中不起作用。同样地,卢钟磊等^[35]筛选出的 2 个 SSR 标记分别与褐牙鲂耐热性状呈极显著的正相关和负相关,但在另一研究中却没有检测到相应的基因位点^[28]。这些研究均表明分子标记或引物存在一定的特异性。另外,低氧耐受性状是微效多基因和环境因素共同控制的复杂数量性状,每个基因对性状表现的影响较小。因此,在育种实践中筛选出的目标性状相关的基因或分子标记,需要在多种养殖环境或群体中进行性状测试,以保障其在性状辅助选择中的有效性。

参 考 文 献

- [1] 陈秀华,于丽娟,罗黎明,等.玉米分子标记辅助育种及标记开发研究进展[J].中国农业科技导报,2016,18(1):26-31.
- [2] 鲁绍雄,吴常信.动物遗传标记辅助选择研究及其应用[J].遗传,2002,24(3):359-362.
- [3] 孙永建,田永宏,余华强,等.利用分子标记辅助选择改良水稻恢复系 R997 对稻瘟病的抗性[J].湖北农业科学,2016,55(1):20-23.
- [4] FUJI K, HASEGAWA O, HONDA K, et al. Marker-assisted breeding of a lymphocystis disease-resistant Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Aquaculture, 2007, 272: 291-295.
- [5] WANG D, MAO H L, CHEN H X, et al. Isolation of Y- and X-linked SCAR markers in yellow catfish and application in the production of all-male populations[J]. Anim Genet, 2009, 40: 978-981.
- [6] 黄智慧.大菱鲂耐高温性状选育及遗传机理研究[D].青岛:中国海洋大学,2014.
- [7] 陈松林,邵长伟,徐鹏.水产生物技术发展战略研究[J].中国工程科学,2016,18(3):49-56.
- [8] LI H L, GU X H, LI B J, et al. Genome-wide QTL analysis identified significant associations between hypoxia tolerance and mutations in the GPR132 and ABCG4 genes in Nile tilapia[J]. Mar Biotechnol (NY), 2017, 19(5):441-453.
- [9] ZHONG X, WANG X, ZHOU T, et al. Genome-wide association study reveals multiple novel QTL associated with low oxygen tolerance in hybrid catfish[J]. Mar Biotechnol (NY), 2017, 19(4):379-390.
- [10] WANG X, LIU S, JIANG C, et al. Multiple across-strain and within-strain QTLs suggest highly complex genetic architecture for hypoxia tolerance in channel catfish[J]. Mol Genet Genomics, 2017, 292(1):63-76.
- [11] ZHANG B, CHEN N, HUANG C H, et al. Molecular response and association analysis of *Megalobrama amblycephala* *hif-1* with hypoxia[J]. Mol Genet Genomics, 2016, 291(4):1615-1624.
- [12] 王卫民.团头鲂养殖产业现状[J].科学养鱼,2009(4):49-50.
- [13] 陈汝丽.团头鲂养殖产业现状与发展趋势[J].科学养鱼,2015(2):4-5.
- [14] CHEN N, HUANG C H, CHEN B X, et al. Alternative splicing transcription of *Megalobrama amblycephala* HIF prolyl hydroxylase PHD3 and up-regulation of PHD3 by HIF-1 α [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 469(3):737-742.
- [15] CHEN N, HUANG C X, HUANG C H, et al. The molecular characterization, expression pattern and alternative initiation of *Megalobrama amblycephala* Hif prolyl hydroxylase Phd1[J]. Gene, 2018, 678:219-225.
- [16] LIU Z, ZHAO X, JIANG X, et al. Transcription of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) HIF3 α and its localization in the nucleus under both normoxic and hypoxic conditions [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 500(2):443-449.
- [17] SHEN R J, JIANG X Y, PU J W, et al. HIF-1 α and 2 α genes in a hypoxia-sensitive teleost species *Megalobrama amblycephala*: cDNA cloning, expression and different responses to hypoxia[J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2010, 157(3):273-280.
- [18] SUN Y, GUO H H, GUO D D, et al. Divergence of genes encoding CITED1 and CITED2 in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) and their transcriptional responses to hypoxia[J]. Front Physiol, 2018, 9:186.
- [19] WANG H, HUANG C, CHEN N, et al. Molecular character-

- ization and mRNA expression of HIF-prolyl hydroxylase-2 (phd2) in hypoxia-sensing pathways from *Megalobrama amblycephala*[J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2015,186:28-35.
- [20] CHEN B X, YI S K, WANG W F, et al. Transcriptome comparison reveals insights into muscle response to hypoxia in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. Gene, 2017,624:6-13.
- [21] 周华,张新,刘腾云,等.高通量转录组测序的数据分析与基因发掘[J].江西科学,2012,30(5):607-611.
- [22] 李纪勤.栉孔扇贝(*Chlamys farreri*) EST-SNP 的开发及其应用[D].青岛:中国海洋大学,2012.
- [23] 逢锦菲.“黄海2号”中国对虾高通量 SNP 筛选及其与抗 WSSV 性状的关联分析[D].上海:上海海洋大学,2013.
- [24] 王婷.基于高通量转录组数据的大菱鲆 SNP 标记筛选及相关功能基因的研究[D].大连:大连海洋大学,2014.
- [25] 张建勇.中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)基因组 SNP 标记的开发与应用[D].青岛:中国海洋大学,2011.
- [26] 李素红,张天时,孔杰,等.中国对虾抗病性状遗传标记筛选及遗传多样性分析[J].渔业科学进展,2009,30(2):54-59.
- [27] 李三磊,徐冬冬,楼宝,等.褐牙鲈耐热相关分子标记筛选及遗传多样性分析[J].上海海洋大学学报,2012,21(4):516-523.
- [28] WRIGHT S. Evolution and the genetics of populations: variability within and among natural populations[M]. Chicago: University of Chicago Press,1978:24.
- [29] XIAO W. The hypoxia signaling pathway and hypoxic adaptation in fishes[J]. Sci China Life Sci,2015,58(2):148-155.
- [30] 鹿辉,尹强,王荣,等.低氧诱导因子-3 α 的研究进展[J].中国药理学通报,2014,30(3):318-321.
- [31] HARA S, HAMADA J, KOBAYASHI C, et al. Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3 α in human kidney: suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3 α [J]. Biochem Biophys Res Commun,2001,287(4):808-813.
- [32] ZHANG P, YAO Q, LU L, et al. Hypoxia-inducible factor 3 is an oxygen-dependent transcription activator and regulates a distinct transcriptional response to hypoxia[J]. Cell Rep,2014,6(6):1110-1121.
- [33] 胡瀛月,黄英,杨明华,等. PLIN2 对脂类代谢的调控研究[J]. 中国医药科学,2018,8(15):40-43.
- [34] BILDIRICI I, SCHAIF W T, CHEN B, et al. PLIN2 is essential for trophoblastic lipid droplet accumulation and cell survival during hypoxia[J]. Endocrinology, 2018, doi: 10.1210/en.2018-00752.
- [35] 卢钟磊,池信才,王义权,等.褐牙鲈耐热性状相关的微卫星分子标记筛选[J].厦门大学学报(自然科学版),2007,46(3):396-402.

Isolation of SNP markers associated with hypoxia tolerance in *Megalobrama amblycephala*

CHEN Boxiang^{1,2} WANG Weifeng¹ WANG Weimin¹ WANG Huanling¹

1.College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2.Foshan Nanhai Bairong Improved Aquatic Seed Co., Ltd, Guangdong Province, Foshan 528216, China

Abstract In order to obtain SNP markers associated with hypoxia tolerance trait for applying in molecular marker-assisted breeding of *Megalobrama amblycephala*, in the present study, based on the constructed transcriptome data in hypoxia tolerant and sensitive *M. amblycephala*, 52 623 potential SNPs including transition type of 30 192 (57.4%) and transversion type of 16 802 (31.9%) were found. Synonymous SNPs accounted for 99.7% of total SNPs located in the coding region, while only 32~35 (0.3%) nonsynonymous SNPs were found. Five nonsynonymous and polymorphic SNPs were obtained using PCR-RFLP method. Analysis showed that two SNPs, Plin2-A1157G and Hif-3 α -A2917G, were significantly associated with hypoxia tolerance trait in the parental populations. But further analysis revealed that no significant association existed between the two SNPs and hypoxia tolerance trait in the offspring populations. It is indicated that molecular markers isolated in the parent populations may be inappropriate in their offspring, therefore, the effectiveness of markers in offspring needs to be considered in molecular marker assisted breeding.

Keywords *Megalobrama amblycephala*; hypoxia; SNP; trait association analysis