

关素华,黄欣,刘宁,等.团头鲂嗅觉受体基因 β 亚型的进化与表达模式分析[J].华中农业大学学报,2024,43(1):194-202.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2024.01.022

团头鲂嗅觉受体基因 β 亚型的进化与表达模式分析

关素华,黄欣,刘宁,王卫民,刘寒

华中农业大学水产学院/农业农村部淡水生物繁殖重点实验室,武汉 430070

摘要 为探索鱼类嗅觉受体基因 β 亚型($OR-\beta$)与食性的关系,对不同食性的12种鱼类,包括植食性的团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)和草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*),肉食性的半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)、大西洋鳕(*Gadus morhua*)、三刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)和褐牙鲆(*Paralichthys olivaceus*),杂食性的斑马鱼(*Danio rerio*)、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、青鳉(*Oryzias latipes*)、金线鲃(*Sinocyclocheilus grahami*)和花斑剑尾鱼(*Xiphophorus maculatus*)的 $OR-\beta$ 在其基因组中的拷贝数和分子进化进行系统分析,并对植食性团头鲂的 $OR-\beta$ 在12月龄和24月龄鱼不同组织中的表达模式进行qPCR检测。进化分析结果显示,不同食性鱼类 $OR-\beta$ 拷贝数差异较大,植食性团头鲂和草鱼分别有20和14个拷贝,而5种肉食性鱼类基因组中平均仅有1个,杂食性的5种鱼类平均有4个;选择压力分析结果显示,共有19个分支受到正选择,包括9个 $OR-\beta$ 基因和10个分支位点,其中团头鲂的 $OR-\beta-4$ 和 $OR-\beta-14$ ($P<0.01$)受到强烈的正选择。此外,团头鲂、草鱼、斑马鱼和金线鲃4种鲤科鱼类的 $OR-\beta$ 聚为一支,这一支受到正选择,其中包括团头鲂的9个 $OR-\beta$ 基因;qPCR结果显示,在12月龄和24月龄团头鲂的肌肉、嗅囊、脑及嗅球组织中,10个 $OR-\beta$ 均在嗅囊中高表达;除 $OR-\beta-9$ 和 $OR-\beta-10$ 外,其他 $OR-\beta$ 在嗅球和脑组织均不表达。以上结果表明,植食性团头鲂的 $OR-\beta$ 基因与其他食性鱼类相比发生明显的特异性扩张,且在嗅囊组织中高表达,推测 $OR-\beta$ 在团头鲂植食性适应性进化中可能起重要作用。

关键词 团头鲂; 嗅觉受体 β 亚型; 食性; 基因表达

中图分类号 Q959.46⁺⁸ **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2024)01-0194-09

嗅觉是脊椎动物感受外界环境的重要感觉系统之一,在觅食、寻偶和避敌等方面具有重要作用^[1]。鱼类作为脊椎动物中数量最大、种类最多的一个类群,大部分鱼类都具有较为完善的嗅觉感受系统,它们可通过嗅觉受体(olfactory receptors, ORs)基因识别水体中大量的气味分子,经过一系列的信号转导,最终形成嗅觉^[2]。 ORs 是脊椎动物中最大的G蛋白偶联受体家族(G protein-coupled receptor, GPCR),具有7个跨膜结构,主要在嗅上皮中表达^[3]。哺乳动物中, ORs 的数目占整个基因组基因总数的5%,但不同物种中完整 ORs 的数量存在较大差异^[4-6]。有研究表明,哺乳动物的嗅觉识别能力与功能性 ORs 的比例呈正相关,功能性 ORs 的占比越高,嗅觉能力越强^[7]。与哺乳动物相比,鱼类的 ORs 数量较少,但

分化程度更高,具有较多的 ORs 亚型^[7]。在脊椎动物基因组中, ORs 拷贝数较多,按照功能可分为2种类型,即Ⅰ型和Ⅱ型,Ⅰ型通常识别水溶性气味分子(water-soluble odorants),主要存在于鱼类,Ⅱ型识别挥发性气味分子,主要存在于陆生动物^[8]。Niimura等^[7]对23种脊椎动物 ORs 家族进行了分类和进化研究,将所有的 ORs 分为 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ 、 η 、 $\theta1$ 、 $\theta2$ 、 κ 和 λ 11个亚型,其中 δ 、 ϵ 、 ζ 和 η 亚型主要存在于鱼类基因组中,在两栖类及哺乳动物中完全缺失,所以被划分为水溶性气味分子, β 亚型的嗅觉分子既存在于水生动物中又存在于陆生动物中,可同时感知水溶性和挥发性2种气味分子^[9],在陆生动物和水生动物中具有重要的作用,因此, β 亚型是 ORs 中较为特殊的一个亚型。

收稿日期: 2022-10-29

基金项目:国家自然科学基金项目(32273109);中央高校基本科研业务费专项(2662020SCQD002)

关素华,E-mail: 18438615396@163.com

通信作者:刘寒, E-mail: liuhan@mail.hzau.edu.cn

团头鲂(*Megalobrama amblycephala*),俗称武昌鱼,是我国特有的优良植食性经济鱼类。笔者所在研究室前期研究发现,团头鲂基因组中有223个完整的 ORs ,明显多于其他食性鱼类。这些 ORs 可分为8个亚型,分别为 δ 、 ϵ 、 ζ 、 η 、 γ 、 β 、 κ 和 θ ,每个亚型分别有113、13、43、29、3、20、1和1个 $ORs^{[10]}$ 。这一发现引起我们的关注。目前鱼类 ORs 研究主要集中在斑马鱼、青鳉和三刺鱼等模式物种中^[11],在经济鱼类中的研究较为有限。基于此,笔者以团头鲂为研究对象,结合其他不同食性的11种鱼类,对 $OR-\beta$ 在基因组中的拷贝数、进化规律及选择压力进行系统分析,探讨 $OR-\beta$ 在12月龄和24月龄团头鲂肌肉、嗅囊(olfactory epithelium, OE)、嗅球(olfactory bulb, OB)和脑中的表达模式,旨在为研究 $OR-\beta$ 在团头鲂植食性适应性进化中的作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用团头鲂来自华中农业大学鄂州水产养殖基地,12月龄团头鲂平均体质量(300±50)g,24月龄团头鲂平均体质量(600±100)g。试验前将团头鲂暂养在养殖基地循环水中,溶氧为(8±3)mg/L、水温为(24±4)℃。采集样品前用MS-222麻醉试验鱼,断尾去血,75%乙醇消毒,冰上分别采集3尾12月龄和24月龄团头鲂肌肉、嗅囊、嗅球、脑4种组织于液氮中保存,之后转移至-80℃备用。

1.2 不同食性鱼类 $OR-\beta$ 基因的鉴定

食性分类根据世界鱼类数据库(fish base),主要包括:植食性的团头鲂和草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*);肉食性的半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)、大西洋鳕(*Gadus morhua*)、三刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)和褐牙鲆(*Paralichthys olivaceus*);杂食性的斑马鱼(*Danio rerio*)、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、青鳉(*Oryzias latipes*)、金线鲃(*Sinocyclocheilus grahami*)和花斑剑尾鱼(*Xiphophorus maculatus*)。在NCBI数据库中下载已有鱼类的 $OR-\beta$ 蛋白序列作为比对序列,采用TBLASTN将比对序列分别比对到12种鱼的基因组中(E 值<1e-10),之后将比对上的序列进行过滤(覆盖度大于70%,蛋白序列相似性高于40%的序列);利用Genewise软件,预测完整的编码区,再利用MEGA 11构建进化树^[12],排除非 $OR-\beta$ 基因,最后采用TMHMM Server 2.0对鉴定到的序列进行跨膜结

构预测,最终确认每个物种的 $OR-\beta$ 基因^[13]。

1.3 团头鲂 $OR-\beta$ 序列特征分析

应用多序列比对软件 Jalview 对团头鲂 $OR-\beta$ 氨基酸序列进行比对分析;采用 TMHMM Server 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.O/>) 对团头鲂 $OR-\beta$ 序列进行跨膜结构预测;利用在线软件 MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) 对团头鲂 $OR-\beta$ 序列的 motif 位点进行预测。

1.4 不同食性鱼类 $OR-\beta$ 基因的选择压力分析

使用 Datamonitor 在线分析平台中的 aBSREL (adaptive Branch-Site Random Effects Likelihood) 方法对12种鱼类的 $OR-\beta$ 进行选择压力分析,通过“分支-位点”模型及似然比检验(likelihood ratio test, LRT)($\alpha=0.05$)检测某些分支是否发生了正向选择^[13]。非同义替换率(nonsynonymous, d_N)和同义替换率(synonymous, d_s)的比值($\omega=d_N/d_s$)是衡量选择压力的重要指标,其中 $\omega<1$ 、 $\omega=1$ 和 $\omega>1$ 分别意味着基因受纯化选择(purify selection)、中性选择(neutral selection)和正选择(positive selective)。

1.5 团头鲂 $OR-\beta$ 的组织表达模式

用TRIZOL裂解法提取12月龄和24月龄团头鲂的肌肉、嗅囊、嗅球和脑组织的总RNA。通过1.5%琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性,同时使用 Nanodrop 2000 分光光度计(Thermo Scientific, 美国)检测RNA的浓度。参照 TaKaRa 公司的反转录试剂盒操作说明合成cDNA。根据团头鲂 $OR-\beta$ 的序列特征和进化关系,利用Primer 5.0软件根据CDS区设计团头鲂 $OR-\beta-1$ 、 $OR-\beta-2$ 、 $OR-\beta-7$ 、 $OR-\beta-8$ 、 $OR-\beta-9$ 、 $OR-\beta-10$ 、 $OR-\beta-11$ 、 $OR-\beta-12$ 、 $OR-\beta-15$ 和 $OR-\beta-18$ 的特异性引物(表1),使用 TaKaRa 试剂盒进行 qPCR 扩增反应,以 β -actin 为内参基因,程序设置:95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 30 s; 95℃ 15 s, 60℃ 60 s, 95℃ 15 s; 40个循环。每个样品设置3个技术重复。以在肌肉中的表达量为对照,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法来计算基因相对表达量,采用 SPSS 软件中的 Duncan's Multiple Range Test 比较12月龄和24月龄团头鲂组织中基因相对表达量的差异, $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 12种鱼类 $OR-\beta$ 鉴定和拷贝数

对12种不同食性鱼类 $OR-\beta$ 基因进行鉴定,结果如表2所示。12种鱼类共有61个 $OR-\beta$ 基因,植食

表1 研究中用到的PCR引物

Table 1 PCR primers used in the present study

引物名称 Name	引物序列 Sequence(5'-3')	长度/bp Size
β -1	F: GGGGAATGGAGGCCCTTTT	
	R: CAGTGCCATCCACAAAAGCA	300
β -2	F: TTGTGGATGGCACTGGATCG	
	R: TGCCATGTGCTCACAAAAACAA	204
β -7	F: CCTGGTGGTCATTACGGTCTC	
	R: CCCCACATGCTAACTGAACCA	110
β -8	F: GTGGATGGCACTGGATCGTTA	
	R: TTTCCAGGCCAGAGAGACTGTG	147
β -9	F: GCTTTGTGGATGGCACTGG	
	R: AGTCTGCAGTTGGGATCAGA	287
β -10	F: GGCTTAGATCGCTTGC	
	R: CACAGGCCAGGCTTACAAGA	215
β -11	F: CCGTAACCTGCTTGTGTTG	
	R: GACTCACAGAGAGAGCG	246
β -12	F: TCCACCATCTGCTTGGAT	
	R: CAACTAGGCCAACCATGGCA	157
β -15	F: GAGCACATGGCATTGGTTCA	
	R: AGGCCTTCACGTGAGCTTT	169
β -18	F: CACGTTTGCCCAGGCTTAC	
	R: GCGCCATGTGCTCACAAAAA	202
β -actin	F: ACCCACACCGTGCCCCATCTA	
	R: CGGACAATTCTCTTCGGCTG	152

表2 不同食性12种鱼类OR- β 的拷贝数Table 2 Copy number of OR- β in 12 fish species with different feeding

物种 Species	食性 Feeding habits	ORs	OR- β	OR- β / ORs
团头鲂 <i>M. amblycephala</i>	植食性	223	20	0.0897
草鱼 <i>C. idellus</i>	Herbivorous	196	14	0.0714
半滑舌鳎 <i>C. semilaevis</i>		90	1	0.0111
大西洋鳕 <i>G. morhua</i>	肉食性 Carnivorous	83	1	0.0120
三刺鱼 <i>G. aculeatus</i>		125	1	0.0080
大黄鱼 <i>L. crocea</i>		120	2	0.0167
褐牙鲆 <i>P. olivaceus</i>		42	1	0.0238
斑马鱼 <i>D. rerio</i>		159	7	0.0440
罗非鱼 <i>O. niloticus</i>	杂食性 Omnivorous	173	6	0.0347
青鳉 <i>O. latipes</i>		68	2	0.0294
金线鲃 <i>S. grahami</i>		120	5	0.0417
花斑剑尾鱼 <i>X. maculatus</i>		61	1	0.0164

性鱼类的OR- β 拷贝数最多,团头鲂有20个,草鱼有14个;而5种肉食性鱼类中仅大黄鱼有2个,半滑舌鳎、大西洋鳕、三刺鱼和褐牙鲆均只有1个OR- β ;5种杂食性鱼类平均有4个,斑马鱼7个,罗非鱼6个,金线鲃5个,青鳉2个,剑尾鱼1个;其中,植食性

鱼类的 β 亚型拷贝数在ORs中的比例最高,且团头鲂的比例高于草鱼。

2.2 团头鲂OR- β 的序列特征分析

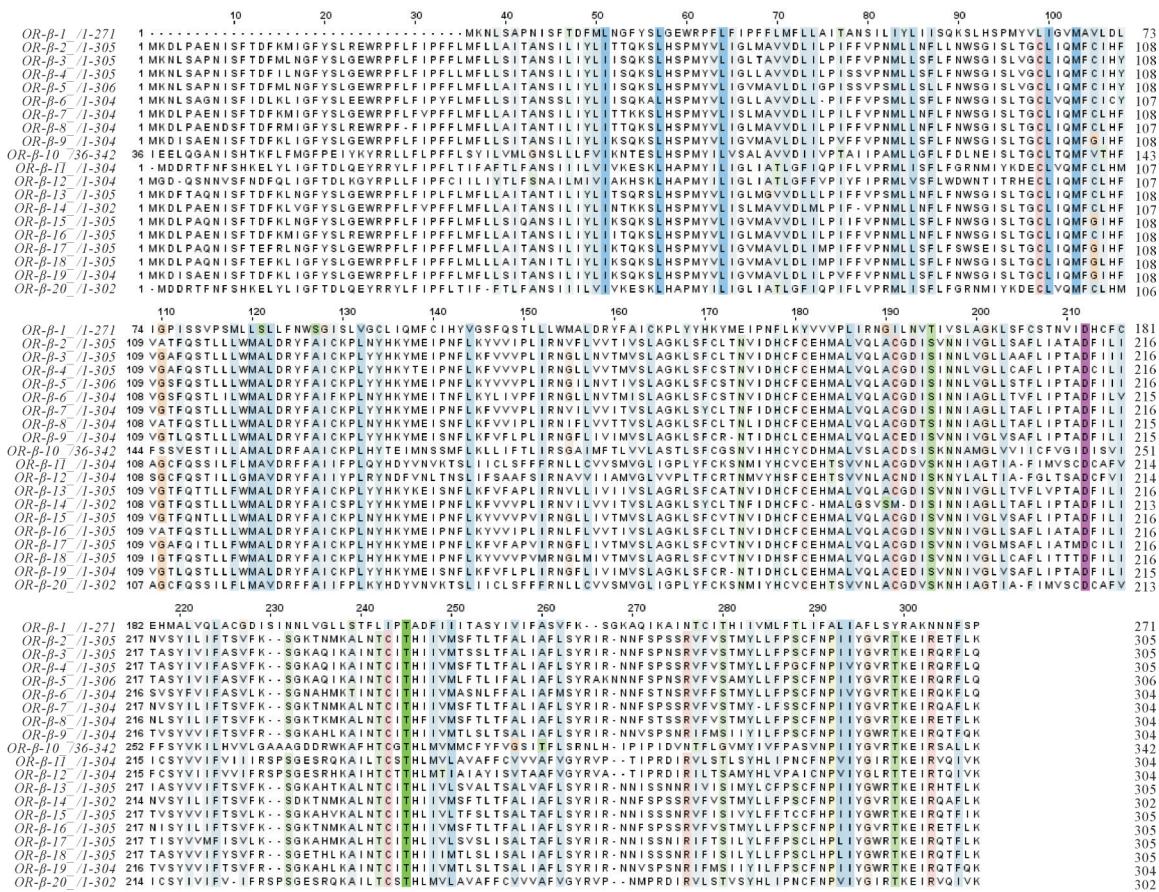
用Jalview软件对团头鲂OR- β 的序列进行比对,结果显示团头鲂OR- β 均为单外显子结构,与其他鱼类的结构相似,具有高度保守氨基酸序列,当氨基酸的保守程度达到40%以上时,根据软件中Colour下的Clustal X参数对不同氨基酸用不同颜色进行标注,阈值以下为白色(图1);对团头鲂OR- β 序列跨膜结构进行预测,发现团头鲂OR- β 序列均有7次跨膜结构,符合GPCRs特征,在跨膜区和胞内区域保守性最高,胞外区保守性较低,团头鲂OR- β 数量较多、结构相似,因此以OR- β -10为例进行结果展示(图2A);对团头鲂OR- β 序列的motif位点进行预测,结果显示团头鲂OR- β 序列保守性高,本研究选择保守性最高的6个motif位点进行展示(图2B)。

2.3 12种鱼OR- β 的选择压力分析

对鉴定出的61个OR- β 基因进行选择压力分析,发现不同食性的12种鱼类的OR- β 在进化中主要分为两大支(图3A),其中一支包含3种食性鱼类的OR- β ,包括团头鲂的6个OR- β 基因(OR - β -1、 OR - β -2、 OR - β -3、 OR - β -4、 OR - β -5、 OR - β -16)和草鱼的5个OR- β (OR - β -1、 OR - β -2、 OR - β -3、 OR - β -5、 OR - β -7);另一支主要是鲤科鱼类OR- β 的进化,其中包括植食性的团头鲂和草鱼,杂食性的斑马鱼和金线鲃。在这一支中,植食性鱼类发生显著性扩张,如团头鲂的OR- β -6、OR- β -7、OR- β -8、OR- β -9、OR- β -10、OR- β -11、OR- β -12、OR- β -14、OR- β -20,草鱼的OR- β -11、OR- β -12、OR- β -13、OR- β -14;选择压力分析结果显示,共有19个分支受到正选择(图3A),包括9个OR- β 基因和10个分支位点,其中团头鲂的OR- β -4和OR- β -14($P<0.01$)受到强烈的正选择(图3C和图3D);在鲤科鱼类进化分支中,a、b、c、d和e5个分支受到强烈的正选择(图3B),包括团头鲂特异扩张的OR- β -6、OR- β -8、OR- β -9、OR- β -11和草鱼特异扩张的OR- β -11、OR- β -14;表3为团头鲂OR- β -4、OR- β -14和鲤科鱼类5个正选择分支的选择压力结果。

2.4 OR- β 在12月龄和24月龄团头鲂组织中的表达模式

OR- β 在12月龄和24月龄团头鲂组织表达情况如图4所示,12月龄和24月龄团头鲂的肌肉、嗅囊、嗅球、脑组织中 OR - β -1、 OR - β -2、 OR - β -7、 OR - β -8、

图1 团头鲂 $OR-\beta$ 序列比对Fig.1 Sequence alignment of $OR-\beta$ in *M. ambycephala*

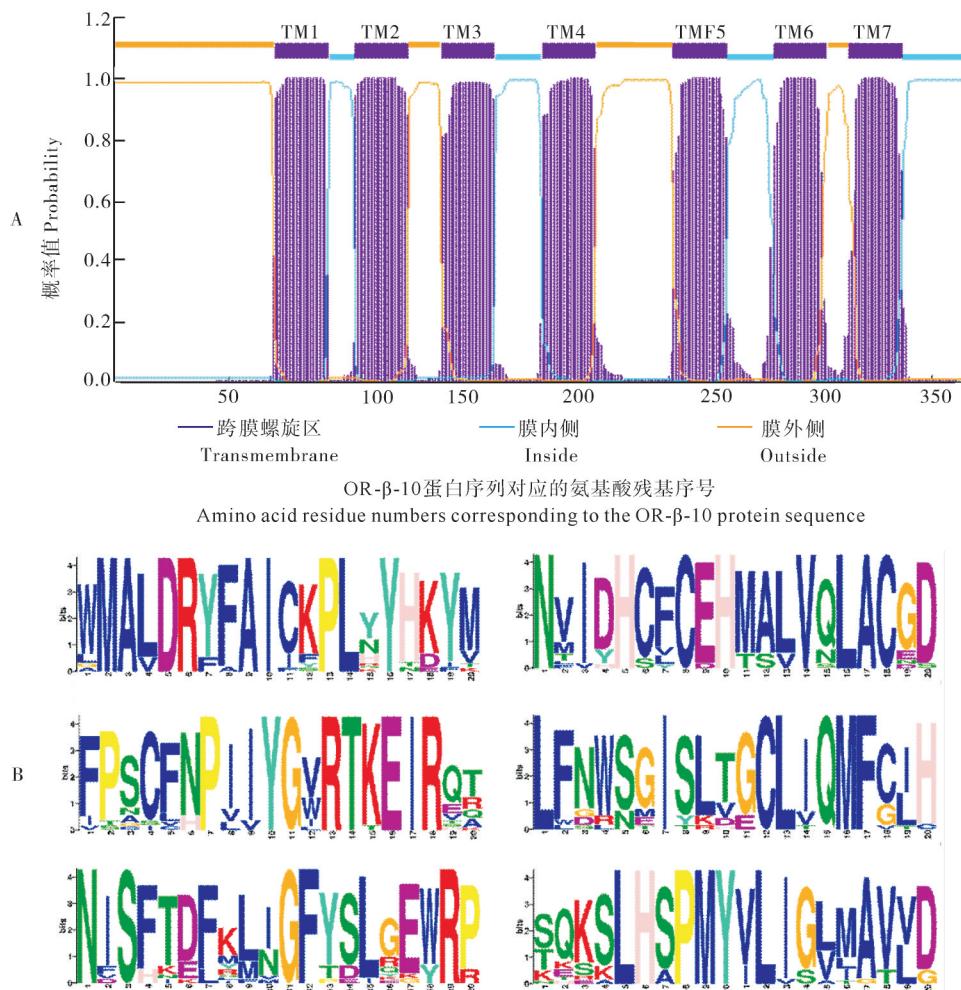
$OR-\beta-9$ 、 $OR-\beta-10$ 、 $OR-\beta-11$ 、 $OR-\beta-12$ 、 $OR-\beta-15$ 、 $OR-\beta-18$ 的表达模式总体相似,均在嗅囊中高表达;在12月龄团头鲂组织中以上 $OR-\beta$ 基因均在嗅囊中的表达量最高,与肌肉组织相比差异极显著($P<0.01$),同时 $OR-\beta-9$ 在12月龄团头鲂的嗅球和脑组织中高表达($P<0.01$)、 $OR-\beta-10$ 在12月龄团头鲂的脑中也有较高表达($P<0.05$);在24月龄团头鲂中,除 $OR-\beta-7$ 外其他基因在嗅囊中高表达($P<0.01$),而 $OR-\beta-7$ 在嗅囊中的表达量较低,且在其他组织中均不表达。

3 讨论

本研究中,植食性的团头鲂有20个 $OR-\beta$ 、草鱼有14个 $OR-\beta$ 。相比之下,5种肉食性的鱼类平均仅有1个 $OR-\beta$,而5种杂食性鱼类平均有5个 $OR-\beta$,先前的研究发现,鲤科鱼类的 ORs 拷贝数发生了扩张,这可能与它们的食性及栖息环境有关^[14],而团头鲂 $OR-\beta$ 也表现出明显的扩张趋势。团头鲂 $OR-\beta$ 的数量大约是斑马鱼的3倍,若哺乳动物的“嗅觉能力与其功能性 OR 基因的比例呈正相关”^[7]这一假说在鱼

类中同样成立,那么相比于斑马鱼等其他食性的鱼类,团头鲂 $OR-\beta$ 基因可能对其生命活动更加重要,尤其是团头鲂 $OR-\beta$ 大量扩增现象更加支持这一观点。鱼类的 ORs 在进化中整体受纯化选择,但功能域通常会出现较多的正选择^[15]。有研究认为,气味分子是在跨膜区TM3、TM5、TM6形成的口袋结构中与嗅觉受体结合^[16],TM4主要负责连接TM3和TM5,也具有较为重要的作用。也有研究表明,青鳉的 ORs 在跨膜区TM4、TM5和TM6的平均 d_N/d_s 值较高^[15],而该编码序列却受到纯化选择,推测在检测编码序列时有较多位点受到纯化选择,掩盖了正选择位点的信号^[17]。本研究选择“分支-位点”模型进行选择压力分析,发现大部分团头鲂特异扩张的 $OR-\beta$ 都处于正选择分支中($P<0.01$),例如团头鲂的 $OR-\beta-6$ 、 $OR-\beta-8$ 、 $OR-\beta-9$ 、 $OR-\beta-14$,同时位于3种食性鱼类进化分支的 $OR-\beta-4$ 也受到正选择,因此推测团头鲂的 $OR-\beta$ 在进化过程中发生了适应性扩张。

对团头鲂 $OR-\beta$ 基因的相对表达量分析发现, $OR-\beta$ 在团头鲂嗅囊组织中相对表达量较高,不同



A. TMHMM 预测团头鲂 *OR-β-10* 的跨膜结构预测; B. 团头鲂 *OR-β* 基因家族 motif 位点预测,选取保守型最高的 6 个。A. TMHMM posterior probabilities for *OR-β-10*; B. Prediction of motif sites in the *OR-β* of *M. ambycephala*, the 6 most conservative types are selected.

图2 团头鲂 *OR-β* 基因结构分析

Fig.2 Structural analysis of *OR-β* in *M. ambycephala*

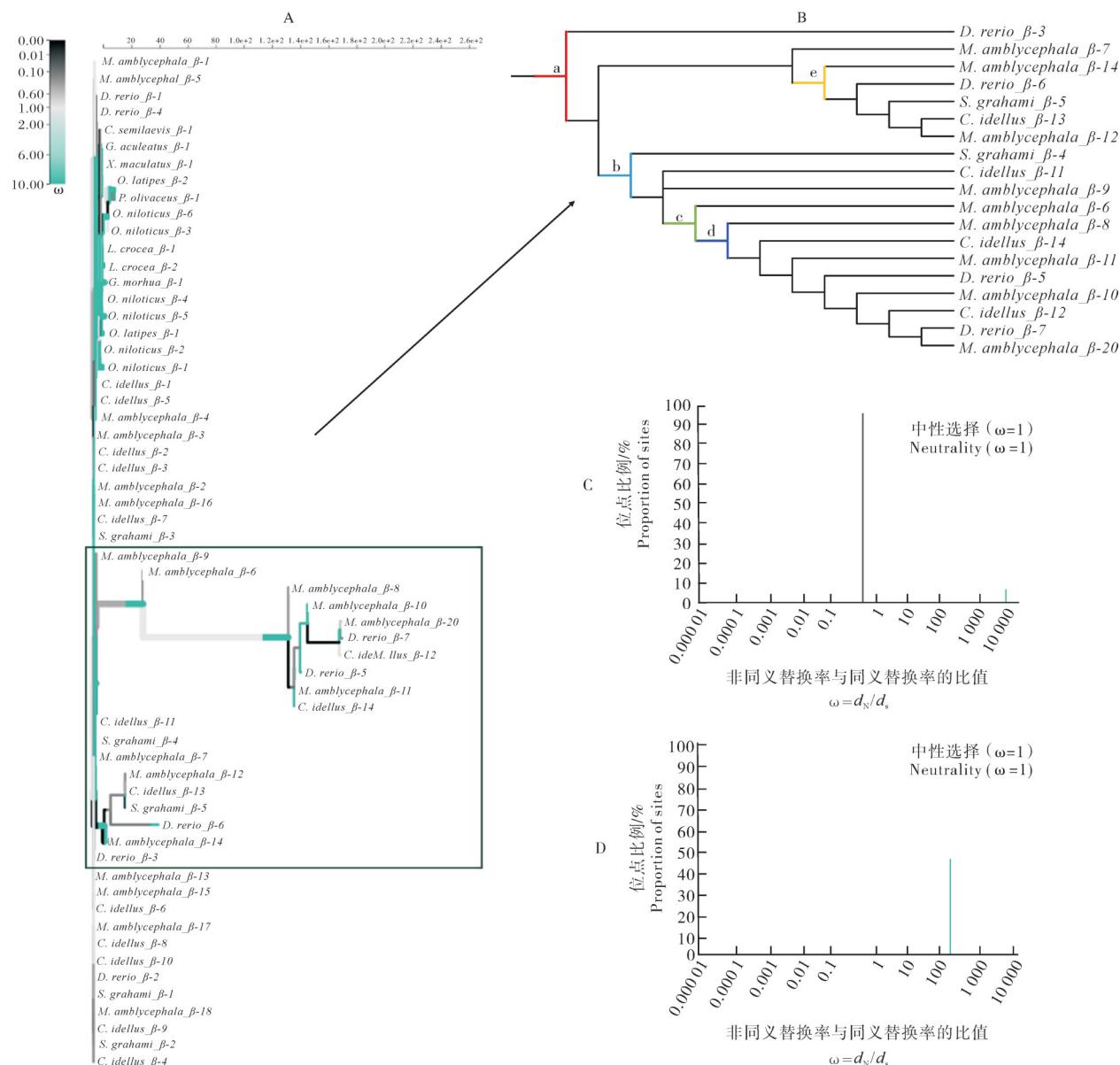
表3 选择压力分析结果

Table 3 Detailed results of clade selection pressure analysis

分支 Branch	似然比 检验 LRT	检验 P 值 Test P-value	未校正 P 值 Uncorrected P-value	ω 位点分布(占比) ω site distribution(percentage)	
				ω1	ω2
a	144.505 0	0.000 0	0.000 0	1.00 (89%)	100 000 (11%)
b	107.197 0	0.000 0	0.000 0	0.272 (65%)	82.1 (35%)
c	84.969 6	0.000 0	0.000 0	0.337 (63%)	1 560 (37%)
d	60.835 2	0.000 0	0.000 0	1.00 (82%)	100 000 (18%)
e	84.926 9	0.000 0	0.000 0	0.00 (39%)	100 000 (61%)
<i>M. ambycephala</i> β-4	18.275 8	0.003 5	0.000 0	0.380 (98%)	3 850 (1.7%)
<i>M. ambycephala</i> β-14	20.325 3	0.001 3	0.000 0	0.00 (61%)	37.8 (39%)

OR-β 在 12 月龄和 24 月龄团头鲂组织中相对表达量有所差异,但表达趋势相似。此外,已有研究表明,随着体长的增加,鲤科鱼类的嗅基板数目也会增加^[18]。由于鱼类主要通过在嗅基板表达的 *ORs* 识别

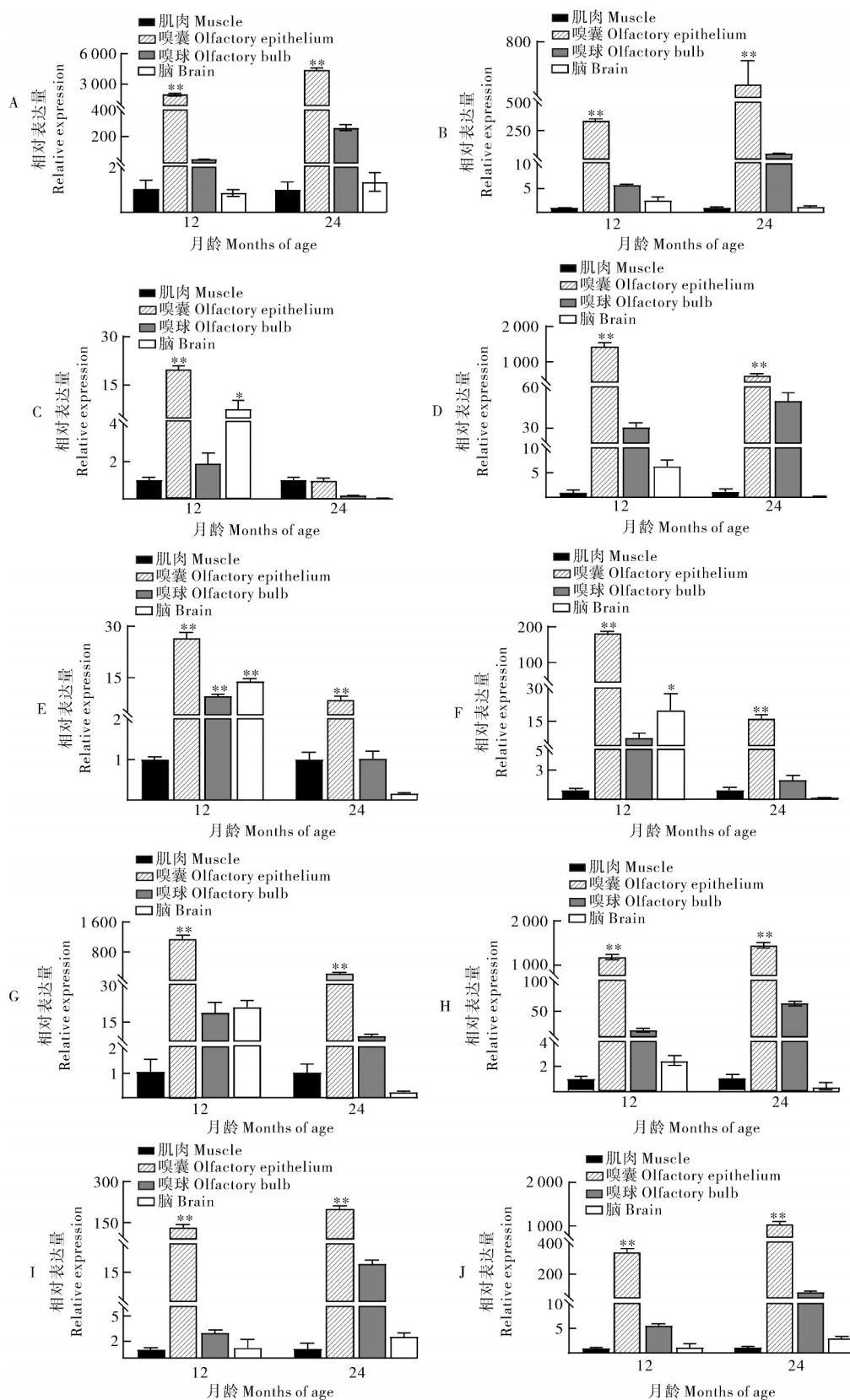
水环境中的氨基酸、类固醇、前列腺素和胆汁酸等气味分子,并在摄食和繁殖等活动中发挥作用^[19],因此,推测在 12 月龄和 24 月龄团头鲂中,*OR-β* 的相对表达量差异可能与不同生长阶段嗅基板的数量以及

图3 12种鱼类 $OR-\beta$ 基因分子进化Fig.3 Molecular evolution of $OR-\beta$ in 12 fish species

所需要识别的气味分子有关。目前,在脊椎动物中仍然存在许多 ORs 未“脱孤”问题^[20],其中最重要的原因是 ORs 克隆难度较大,序列相似度高。有关 ORs 功能研究的报道中大部分都采用RACE技术和染色体步移技术进行扩增^[21-22],这在实际操作过程中存在较多不确定性因素,增加了在异源表达系统中进行配体与受体筛选的难度,而团头鲂的 $OR-\beta-1$, $OR-\beta-8$ 和 $OR-\beta-10$ 在嗅囊中的表达量高,这为后续

研究团头鲂 $OR-\beta$ 的功能带来便利。

综上所述,植食性团头鲂的 $OR-\beta$ 拷贝数较多,在团头鲂嗅囊中表达量高,其 $OR-\beta-4$ 和 $OR-\beta-14$ 在进化中受到强烈的正选择,特异性扩张的植食性 $OR-\beta$ 大多处于正选择分支中,推测团头鲂 $OR-\beta$ 在分子进化过程中发生适应进化,这些发现可为深入研究 $OR-\beta$ 在鱼类食性适应性进化中的作用及机制奠定基础。



A: $OR-\beta$ -1; B: $OR-\beta$ -2; C: $OR-\beta$ -7; D: $OR-\beta$ -8; E: $OR-\beta$ -9; F: $OR-\beta$ -10; G: $OR-\beta$ -11; H: $OR-\beta$ -12; I: $OR-\beta$ -15; J: $OR-\beta$ -18.* $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图4 $OR-\beta$ 在12月龄和24月龄团头鲂不同组织中的表达模式
Fig.4 The expression patterns of $OR-\beta$ in different tissues of *M. amblycephala*

参考文献 References

- [1] NIIMURA Y. Olfactory receptor multigene family in vertebrates: from the viewpoint of evolutionary genomics [J]. Current genomics, 2012, 13(2): 103-114.
- [2] LABERGE F, HARA T J. Neurobiology of fish olfaction: a review [J]. Brain research reviews, 2001, 36(1): 46-59.
- [3] VAN DER LINDEN C, JAKOB S, GUPTA P, et al. Sex separation induces differences in the olfactory sensory receptor repertoires of male and female mice [J/OL]. Nature communications, 2018, 9: 5081 [2022-10-29]. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07120-1>.
- [4] ZHANG X M, FIRESTEIN S. The olfactory receptor gene superfamily of the mouse [J]. Nature neuroscience, 2002, 5(2): 124-133.
- [5] NIIMURA Y, NEI M. Evolution of olfactory receptor genes in the human genome [J]. PNAS, 2003, 100(21): 12235-12240.
- [6] NIIMURA Y, MATSUI A, TOUHARA K. Extreme expansion of the olfactory receptor gene repertoire in African elephants and evolutionary dynamics of orthologous gene groups in 13 placental mammals [J]. Genome research, 2014, 24(9): 1485-1496.
- [7] NIIMURA Y, NEI M. Evolutionary dynamics of olfactory and other chemosensory receptor genes in vertebrates [J]. Journal of human genetics, 2006, 51(6): 505-517.
- [8] HOOVER K C. Evolution of olfactory receptors [M]// WALKER J M. Methods in molecular biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2013: 241-249.
- [9] NIIMURA Y. On the origin and evolution of vertebrate olfactory receptor genes: comparative genome analysis among 23 chordate species [J]. Genome biology and evolution, 2009, 1: 34-44.
- [10] LIU H, CHEN C H, LÜ 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.
- [11] 朱国利, 唐文乔, 刘东. 鱼类嗅觉受体基因研究进展 [J]. 水产学报, 2015, 39(6): 916-927. ZHU G L, TANG W Q, LIU D. Research progress of olfactory receptor genes in fishes [J]. Journal of fisheries of China, 2015, 39(6): 916-927 (in Chinese with English abstract).
- [12] TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11 [J]. Molecular biology and evolution, 2021, 38(7): 3022-3027.
- [13] SMITH M D, WERTHEIM J O, WEAVER S, et al. Less is more: an adaptive branch-site random effects model for efficient detection of episodic diversifying selection [J]. Molecular biology and evolution, 2015, 32(5): 1342-1353.
- [14] 刘寒. 基于基因组学的团头鲂植食性机制研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2016. LIU H. Based on the genomics of *Megalobrama amblycephala* reveals the adaption to herbivorous diet [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016 (in Chinese with English abstract).
- [15] 陈明, 彭作刚, 何舜平. 青鳉与三刺鱼嗅觉受体(OR)基因的鉴定与进化分析 [J]. 中国科学(C辑:生命科学), 2009, 39(11): 1057-1068. CHEN M, PENG Z G, HE S P. Identification and evolutionary analysis of olfactory receptor (OR) gene in medaka and stickleback [J]. Scientia sinica (vitae), 2009, 39(11): 1057-1068 (in Chinese with English abstract).
- [16] MAN O, GILAD Y, LANCET D. Prediction of the odorant binding site of olfactory receptor proteins by human-mouse comparisons [J]. Protein science: a publication of the protein society, 2004, 13(1): 240-254.
- [17] YANG Z H. Inference of selection from multiple species alignments [J]. Current opinion in genetics & development, 2002, 12(6): 688-694.
- [18] 陈星玉. 中国鲤科鱼类嗅觉器官的研究 [J]. 动物分类学报, 1988(2): 82-94. CHEN X Y. Studies on the olfactory organs of cyprinidae in China [J]. Zoological systematics, 1988(2): 82-94 (in Chinese with English abstract).
- [19] YAMAMOTO Y, HINO H, UEDA H. Olfactory imprinting of amino acids in lacustrine sockeye salmon [J/OL]. PLoS One, 2010, 5 (1) : e8633 [2022-10-29]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008633>.
- [20] MAINLAND J D, LI Y R, ZHOU T, et al. Human olfactory receptor responses to odorants [J/OL]. Scientific data, 2015, 2: 150002 [2022-10-29]. <https://doi.org/10.1038/sdata.2015.2>.
- [21] 王晓梅, 朱国利, 唐文乔. 刀鲚嗅觉受体基因MOR-5II2克隆、序列分析及组织表达 [J]. 水生生物学报, 2017, 41(1): 33-42. WANG X M, ZHU G L, TANG W Q. Cloning, sequence analysis and tissues expression of *Coilia nasus* olfactory receptor gene MOR-5II2 [J]. Acta hydrobiologica sinica, 2017, 41(1): 33-42 (in Chinese with English abstract).
- [22] 王聪, 朱国利, 唐文乔, 等. 刀鲚MOR-2AK2的克隆、序列分析及组织表达 [J]. 水产学报, 2016, 40(1): 11-23. WANG C, ZHU G L, TANG W Q, et al. Cloning, sequence analysis and tissue expression of *Coilia nasus* olfactory receptor gene MOR-2AK2 [J]. Journal of fisheries of China, 2016, 40(1): 11-23 (in Chinese with English abstract).

Evolution and expression patterns of olfactory receptors β subtype in *Megalobrama amblycephala*

GUAN Suhua, HUANG Xin, LIU Ning, WANG Weiming, LIU Han

College of Fisheries, Huazhong Agricultural University/Key Lab of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Wuhan 430070, China

Abstract To explore the potential role of olfactory receptors β subtype (*OR- β*) in the evolution of feeding adaptation in fish, we analyzed the *OR- β* genes from 12 fish species with different feeding habits including *Megalobrama amblycephala*, *Ctenopharyngodon idellus*, *Cynoglossus semilaevis*, *Gadus morhua*, *Gasterosteus aculeatus*, *Larimichthys crocea*, *Paralichthys olivaceus*, *Danio rerio*, *Oreochromis niloticus*, *Oryzias latipes*, *Sinocyclocheilus grahami* and *Xiphophorus maculatus*. We also detected the expression patterns of the *OR- β* in the muscle, olfactory epithelium, olfactory bulb and brain of *M. amblycephala*. The results of evolutionary analysis showed that the number of *OR- β* varied greatly among fish species with different feeding habits. Herbivorous *M. amblycephala* and *C. idellus* had 20 copies and 14 copies, respectively, while carnivorous and omnivorous fish had an average of 1 and 4 copies, respectively. The results of selection pressure analysis showed that a total of 19 branches undergo positive selection, including 9 *OR- β* genes and 10 branch sites. Among them, the *OR- β -4* and *OR- β -14* gene of *M. amblycephala* ($P < 0.01$) experienced strong positive selection. In addition, the *OR- β* of several Cyprinidae species, such as *M. amblycephala*, *C. idellus*, *D. rerio* and *S. grahami*, were clustered into one brand, which was positively selected and included 9 *OR- β* genes of *M. amblycephala*. The results of qPCR showed that 10 *OR- β* genes were highly expressed in the olfactory epithelium of *M. amblycephala* at 12-months of age and 24-months of age. *OR- β -9* and *OR- β -10* were also expressed in the olfactory bulb and brain tissue, while other *OR- β* genes were not expressed. Taken together, these results showed that the *OR- β* genes of the two herbivorous fish were specifically expanded and highly expressed in the olfactory epithelium, suggesting that *OR- β* might play potential crucial role in adapting the diets of herbivores.

Keywords *Megalobrama amblycephala*; *OR- β* ; feeding habits; gene expression

(责任编辑:边书京)