

关素华, 黄欣, 刘宁, 等. 团头鲂嗅觉受体基因 $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ 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*)和褐牙鲂(*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 $\beta$ 亚型; 食性; 基因表达

**中图分类号** Q959.46<sup>+</sup>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<sup>[1]</sup>。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<sup>[2]</sup>。 $ORs$ 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<sup>[3]</sup>。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<sup>[4-6]</sup>。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<sup>[7]</sup>。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<sup>[7]</sup>。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<sup>[8]</sup>。Niimura等<sup>[7]</sup>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 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\zeta$ 、 $\eta$ 、 $\theta 1$ 、 $\theta 2$ 、 $\kappa$ 和 $\lambda$  11个亚型, 其中 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\zeta$ 和 $\eta$ 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,  $\beta$ 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<sup>[9]</sup>, 在陆生动物和水生动物中具有重要的作用, 因此,  $\beta$ 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 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\zeta$ 、 $\eta$ 、 $\gamma$ 、 $\beta$ 、 $\kappa$ 和 $\theta$ ,每个亚型分别有113、13、43、29、3、20、1和1个ORs<sup>[10]</sup>。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<sup>[11]</sup>,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( $300 \pm 50$ ) g,24月龄团头鲂平均体质量( $600 \pm 100$ ) g。试验前将团头鲂暂养在养殖基地循环水中,溶氧为( $8 \pm 3$ ) mg/L、水温为( $24 \pm 4$ ) °C。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 °C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*)和褐牙鲈(*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<sup>[12]</sup>,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<sup>[13]</sup>。

### 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-2.0/>)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Datamonkey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<sup>[13]</sup>。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 $\beta$ -actin为内参基因,程序设置:95 °C 30 s;95 °C 5 s,60 °C 30 s;95 °C 15 s,60 °C 60 s,95 °C 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
$\beta$ -1	F: GGGGAATGGAGGCCCTTTT	300
	R: CAGTGCCATCCACAAAAGCA	
$\beta$ -2	F: TTGTGGATGGCACTGGATCG	204
	R: TGCCATGTGCTCACAAAAACA	
$\beta$ -7	F: CCTGGTGGTCATTACGGTCTC	110
	R: CCCACATGCTAACTGAACCA	
$\beta$ -8	F: GTGGATGGCACTGGATCGTTA	147
	R: TTTCCAGCCAGAGAGACTGTG	
$\beta$ -9	F: GCTTTTGTGGATGGCACTGG	287
	R: AGTCTGCAGTTGGGATCAGA	
$\beta$ -10	F: GGCTTTAGATCGCTTTGCGG	215
	R: CACAGGCCAGGCTTACAAGA	
$\beta$ -11	F: CCGTAACTTGCTTTGTGTTGT	246
	R: GACTCACCAGAAGGAGAGCG	
$\beta$ -12	F: TCCACCATCTTGCTTGGGAT	157
	R: CAACTAGGCCAACCATGGCA	
$\beta$ -15	F: GAGCACATGGCATTGGTTCA	169
	R: AGGCCTTCACGTGAGCTTT	
$\beta$ -18	F: CACGTTTTGCCAGGCTTAC	202
	R: GCGCCATGTGCTCACAAAAA	
$\beta$ -actin	F: ACCACACCCGTGCCCATCTA	152
	R: CGGACAATTTCTCTTTTCGGCTG	

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

物种 Species	食性 Feeding habits	ORs	OR- $\beta$	OR- $\beta$ / ORs
团头鲂 <i>M. amblycephala</i>	植食性 Herbivorous	223	20	0.089 7
草鱼 <i>C. idellus</i>		196	14	0.071 4
半滑舌鲷 <i>C. semilaevis</i>		90	1	0.011 1
大西洋鲑 <i>G. morhua</i>	肉食性 Carnivorous	83	1	0.012 0
三刺鱼 <i>G. aculeatus</i>		125	1	0.008 0
大黄鱼 <i>L. crocea</i>		120	2	0.016 7
褐牙鲈 <i>P. olivaceus</i>	杂食性 Omnivorous	42	1	0.023 8
斑马鱼 <i>D. rerio</i>		159	7	0.044 0
罗非鱼 <i>O. niloticus</i>		173	6	0.034 7
青鳉 <i>O. latipes</i>		68	2	0.029 4
金线鲃 <i>S. grahami</i>		120	5	0.041 7
花斑剑尾鱼 <i>X. maculatus</i>		61	1	0.016 4

性鱼类的 OR- $\beta$  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,半滑舌鲷、大西洋鲑、三刺鱼和褐牙鲈均只有 1 个 OR- $\beta$ ;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  $\beta$  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- $\beta$  的序列特征分析

用 Jalview 软件对团头鲂 OR- $\beta$  的序列进行比对,结果显示团头鲂 OR- $\beta$  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- $\beta$  序列跨膜结构进行预测,发现团头鲂 OR- $\beta$  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- $\beta$  数量较多、结构相似,因此以 OR- $\beta$ -10 为例进行结果展示(图 2A);对团头鲂 OR- $\beta$  序列的 motif 位点进行预测,结果显示团头鲂 OR- $\beta$  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)。

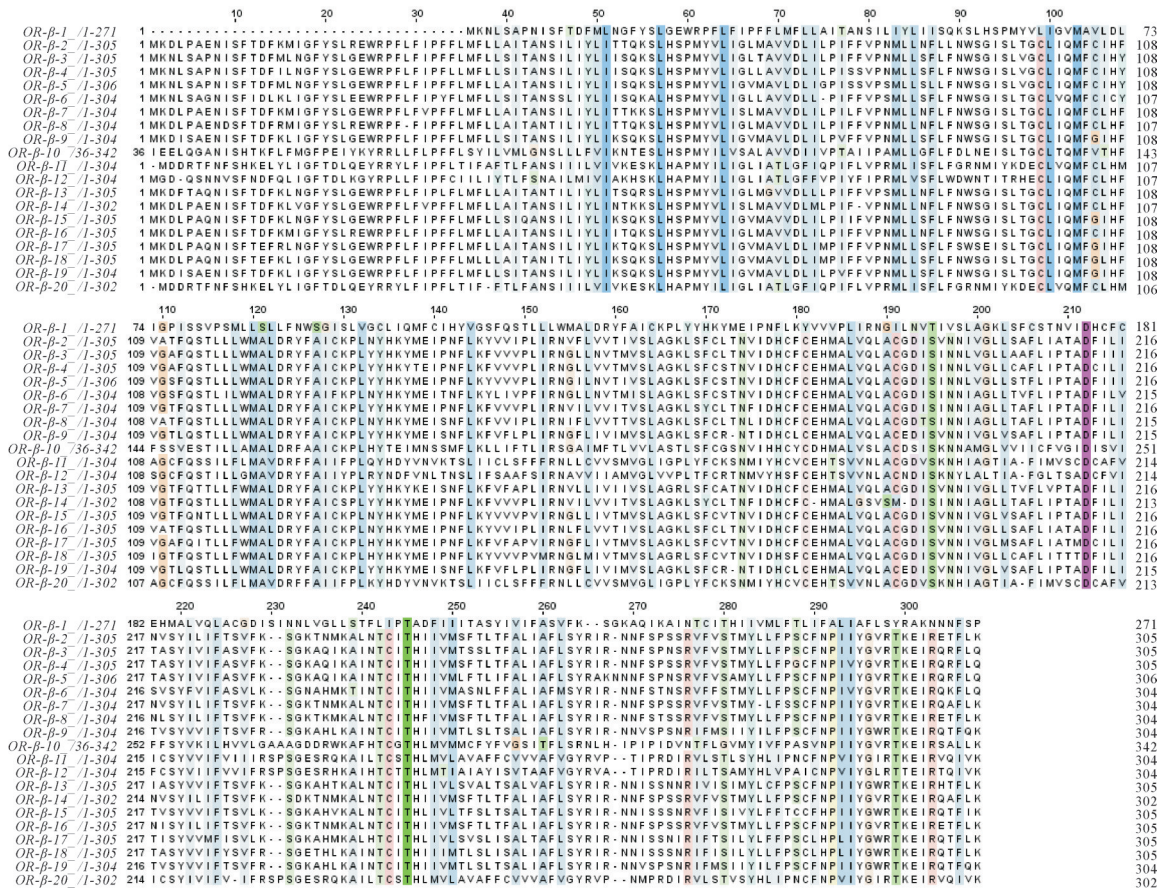
2.3 12 种鱼 OR- $\beta$  的选择压力分析

对鉴定出的 61 个 OR- $\beta$  基因进行选择压力分析,发现不同食性的 12 种鱼类的 OR- $\beta$  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- $\beta$ ,包括团头鲂的 6 个 OR- $\beta$  基因(OR- $\beta$ -1、OR- $\beta$ -2、OR- $\beta$ -3、OR- $\beta$ -4、OR- $\beta$ -5、OR- $\beta$ -16)和草鱼的 5 个 OR- $\beta$ (OR- $\beta$ -1、OR- $\beta$ -2、OR- $\beta$ -3、OR- $\beta$ -5、OR- $\beta$ -7);另一支主要是鲤科鱼类 OR- $\beta$  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- $\beta$ -6、OR- $\beta$ -7、OR- $\beta$ -8、OR- $\beta$ -9、OR- $\beta$ -10、OR- $\beta$ -11、OR- $\beta$ -12、OR- $\beta$ -14、OR- $\beta$ -20,草鱼的 OR- $\beta$ -11、OR- $\beta$ -12、OR- $\beta$ -13、OR- $\beta$ -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- $\beta$  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(图 3C 和图 3D);在鲤科鱼类进化分支中,a、b、c、d 和 e 5 个分支受到强烈的正选择(图 3B),包括团头鲂特异扩张的 OR- $\beta$ -6、OR- $\beta$ -8、OR- $\beta$ -9、OR- $\beta$ -11 和草鱼特异扩张的 OR- $\beta$ -11、OR- $\beta$ -14;表 3 为团头鲂 OR- $\beta$ -4、OR- $\beta$ -14 和鲤科鱼类 5 个正选择分支的选择压力结果。

2.4 OR- $\beta$  在 12 月龄和 24 月龄团头鲂组织中的表达模式

OR- $\beta$  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- $\beta$ -1、OR- $\beta$ -2、OR- $\beta$ -7、OR- $\beta$ -8、



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

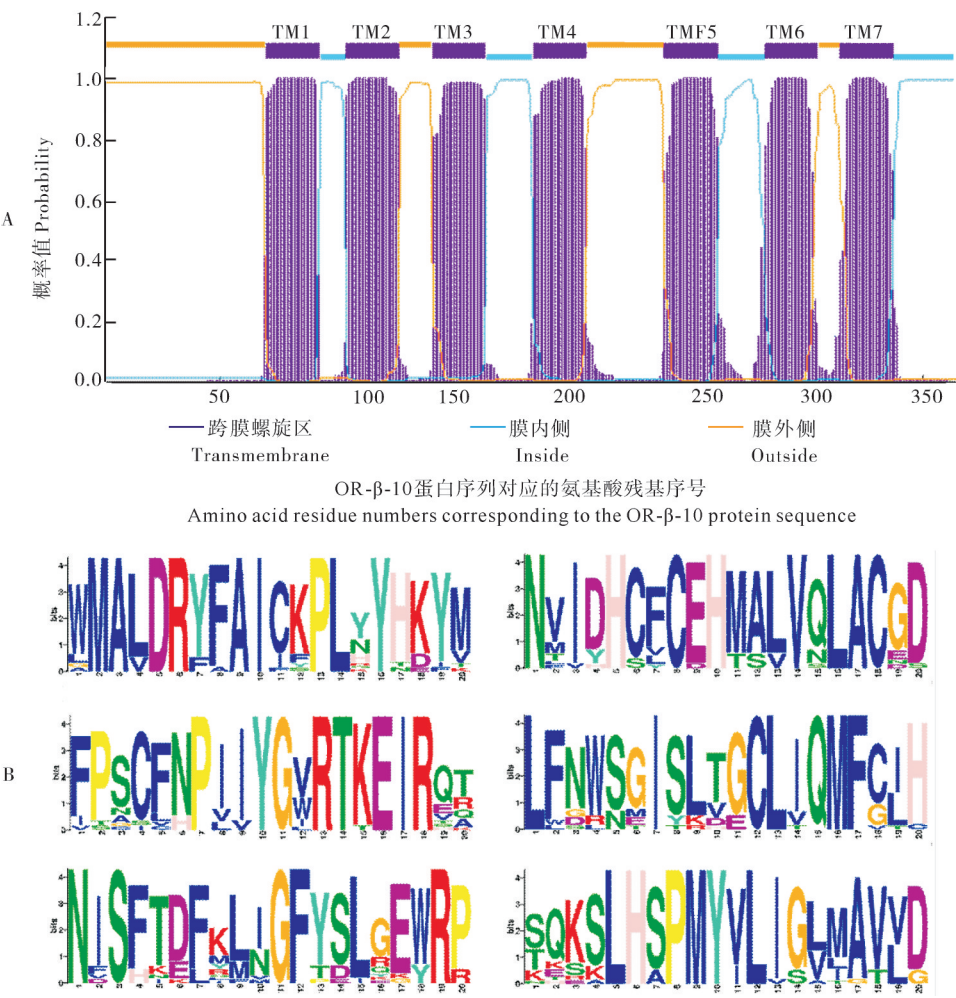
$OR-\beta-9$ 、 $OR-\beta-10$ 、 $OR-\beta-11$ 、 $OR-\beta-12$ 、 $OR-\beta-15$ 、 $OR-\beta-18$ 的表达模式总体相似,均在嗅囊中高表达;在12月龄团头鲂组织中以上 $OR-\beta$ 基因均在嗅囊中的表达量最高,与肌肉组织相比差异极显著( $P < 0.01$ ),同时 $OR-\beta-9$ 在12月龄团头鲂的嗅球和脑组织中高表达( $P < 0.01$ )、 $OR-\beta-10$ 在12月龄团头鲂的脑中也有较高表达( $P < 0.05$ );在24月龄团头鲂中,除 $OR-\beta-7$ 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<sup>[14]</sup>,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”<sup>[7]</sup>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<sup>[15]</sup>。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 with 嗅觉受体结合<sup>[16]</sup>,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<sup>[15]</sup>,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<sup>[17]</sup>。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. amblycephala*, 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. amblycephala*

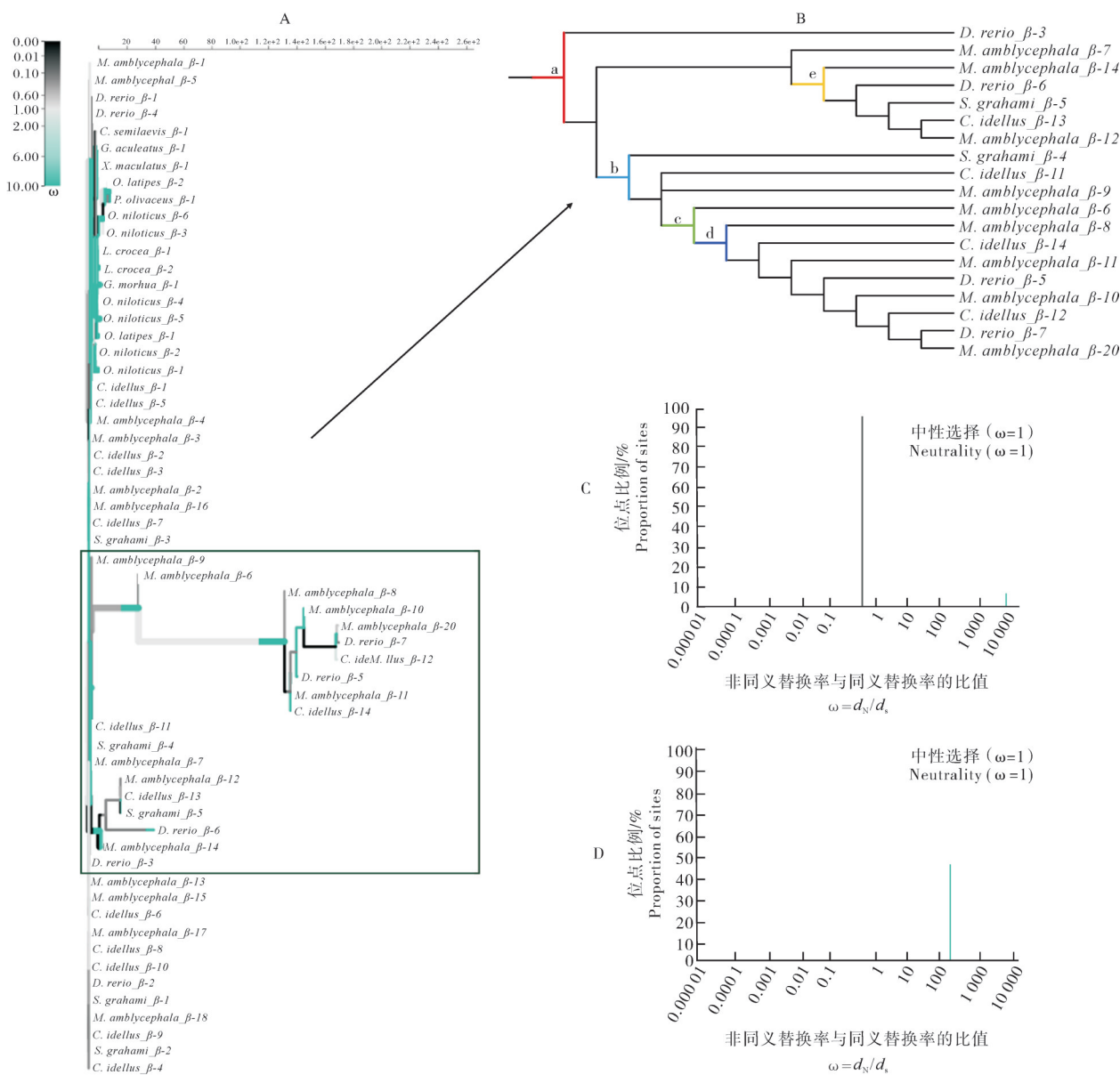
表 3 选择压力分析结果

Table 3 Detailed results of clade selection pressure analysis

分支 Branch	似然比 检验 LRT	检验 <i>P</i> 值 Test <i>P</i> -value	未校正 <i>P</i> 值 Uncorrected <i>P</i> -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. amblycephala</i> β-4	18.275 8	0.003 5	0.000 0	0.380 (98%)	3 850 (1.7%)
<i>M. amblycephala</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<sup>[18]</sup>。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<sup>[19]</sup>, 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





A. 12 种鱼类的 OR- $\beta$  选择压力结果, 绿色代表  $\omega$  值; B. 鲤科鱼类 OR- $\beta$  的进化树; C. 团头鲂 OR- $\beta$ -4 的选择压力结果; D. 团头鲂 OR- $\beta$ -14 的选择压力结果。A. The results of OR- $\beta$  selection pressure in 12 fish species, green indicates the  $\omega$  value; B. Phylogenetic tree of OR- $\beta$  in the family carps; C. Selective pressure of OR- $\beta$ -4 in *M. amblycephala*; D. Selective pressure of OR- $\beta$ -14 in *M. amblycephala*.

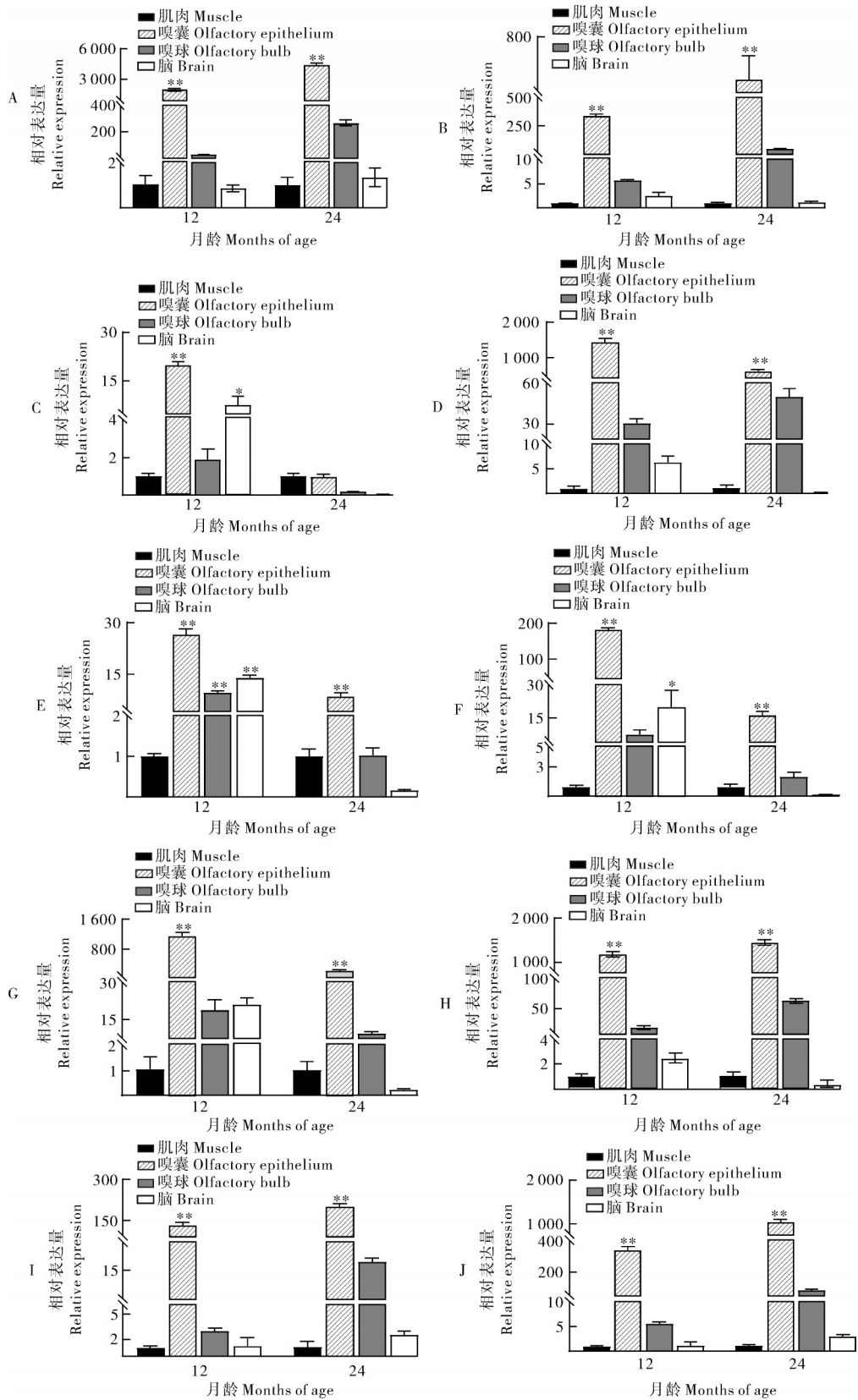
图 3 12 种鱼类 OR- $\beta$  基因分子进化

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<sup>[20]</sup>,其中一个重要的原因是 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<sup>[21-22]</sup>,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-β-1*; B: *OR-β-2*; C: *OR-β-7*; D: *OR-β-8*; E: *OR-β-9*; F: *OR-β-10*; G: *OR-β-11*; H: *OR-β-12*; I: *OR-β-15*; J: *OR-β-18*. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

图4 *OR-β*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-β* 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. 青鲮与三刺鱼嗅觉受体(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 $\beta$ 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  $\beta$  subtype ( $OR-\beta$ ) in the evolution of feeding adaptation in fish, we analyzed the  $OR-\beta$  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 graham* and *Xiphophorus maculatus*. We also detected the expression patterns of the  $OR-\beta$  in the muscle, olfactory epithelium, olfactory bulb and brain of *M. amblycephala*. The results of evolutionary analysis showed that the number of  $OR-\beta$  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  $OR-\beta$  genes and 10 branch sites. Among them, the  $OR-\beta-4$  and  $OR-\beta-14$  gene of *M. amblycephala* ( $P < 0.01$ ) experienced strong positive selection. In addition, the  $OR-\beta$  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  $OR-\beta$  genes of *M. amblycephala*. The results of qPCR showed that 10  $OR-\beta$  genes were highly expressed in the olfactory epithelium of *M. amblycephala* at 12-months of age and 24-months of age.  $OR-\beta-9$  and  $OR-\beta-10$  were also expressed in the olfactory bulb and brain tissue, while other  $OR-\beta$  genes were not expressed. Taken together, these results showed that the  $OR-\beta$  genes of the two herbivorous fish were specifically expanded and highly expressed in the olfactory epithelium, suggesting that  $OR-\beta$  might play potential crucial role in adapting the diets of herbivores.

**Keywords** *Megalobrama amblycephala*;  $OR-\beta$ ; feeding habits; gene expression

(责任编辑:边书京)