

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20201218002

http://www.yykxjz.cn/

吴碧银, 许建, 曹顶臣, 徐鹏, 张瀚元, 朱优秀, 江炎亮, 赵紫霞. 鲤低氧适应性性状的全基因组关联分析. 渔业科学进展, 2022, 43(2): 98–106

WU B Y, XU J, CAO D C, XU P, ZHANG H Y, ZHU Y X, JIANG Y L, ZHAO Z X. Genome-wide association analysis of hypoxia adaptation traits in common carp (*Cyprinus carpio*). Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(2): 98–106

鲤低氧适应性性状的全基因组关联分析*

吴碧银^{1,2#} 许建^{2#} 曹顶臣³ 徐鹏⁴ 张瀚元²
朱优秀^{1,2} 江炎亮² 赵紫霞^{2①}

(1. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院 农业农村部水生动物基因组学重点实验室 北京 100141; 3. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所 黑龙江 哈尔滨 150070; 4. 厦门大学海洋与地球学院 福建省海洋生物资源开发利用协同创新中心 福建 厦门 361102)

摘要 低氧适应是水产养殖物种的重要性状, 筛选用于改良低氧适应性性状的分子标记及候选基因有助于鱼类耐低氧品种选育。在数量性状和质量性状的遗传研究中, 全基因组关联分析(GWAS)广泛应用于性状相关标记和基因的发掘。本研究对鲤(*Cyprinus carpio*)养殖群体开展了低氧胁迫实验, 选取了低氧敏感和低氧耐受的极端性状个体作为研究对象, 应用鲤鱼 250K 高通量分型芯片进行单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点分型, 经过数据质控后获得 90 个样本的 87 222 个多态性位点的分型结果。通过 GWAS, 筛选到 4 个低氧适应性性状关联的位点: carp229220、carp195901、carp001519 和 carp063890, 在关联位点附近注释到 *traf4* 等 23 个可能与低氧适应性性状关联的候选基因; 此外, 还筛选到 7 个潜在关联的 SNP 位点。本研究初步获得了鲤低氧适应性性状相关联的基因组区间, 为后续效应基因精细定位奠定了基础。

关键词 鲤; 低氧适应; 单核苷酸多态性分型芯片; 全基因组关联分析

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)02-0098-09

鲤(*Cyprinus carpio*)是驯化历史较为悠久的物种, 出土的新石器时代早期鱼骨比较分析显示, 我国鲤鱼养殖历史可追溯到距今 8000 年以前(Nakajima *et al*, 2019)。如今, 鲤已成为世界性的养殖品种, 养殖地域遍布欧亚大陆, 年产量达 418.95 万 t (FAO, 2020), 为保障人类粮食安全和营养安全发挥了重要作用。在水生环境中, 氧饱和和浓度仅为同体积空气中的 1/30, 且扩散速度缓慢, 空间分布不均匀, 为适应聚集性养殖条件下的氧供应不足, 低氧成为鱼类驯化

过程中的高强度选择压力之一, 如何从遗传角度解析鲤低氧适应驯化的机制, 对于基础研究和育种应用都有重要的意义。

近年来, 研究者对多种鱼类开展了低氧适应性性状相关研究, 从表观遗传、基因表达差异等角度揭示了鱼类在低氧胁迫下的不同应答模式, 以及低氧对鱼类生长、发育、繁殖、免疫等生理过程的影响(肖武汉, 2014; Abdel-Tawwab *et al*, 2019)。多种不同成因和程度的低氧均可导致摄食下降、生长停滞和疾病易感

* 国家重点研发计划(2018YFD0900102)和中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD24; 2015C007)共同资助 [This work was supported by the National Key Research and Development Program (2018YFD0900102), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD24; 2015C007)].

#共同第一作者: 吴碧银, E-mail: wuby1619@126.com; 许建, E-mail: xuj@cafs.ac.cn

① 通讯作者: 赵紫霞, 副研究员, E-mail: zhaozx@cafs.ac.cn

收稿日期: 2020-12-18, 收修改稿日期: 2021-01-25

(Fitzgibbon *et al.*, 2007; Portner, 2010; Abdel-Tawwab *et al.*, 2014; Araújo-Luna *et al.*, 2018)。以海洋青鳉 (*Oryzias melastigma*) 为对象的研究显示, 低氧通过甲基化调控造成跨世代的生殖损伤, 即使子代及其生殖细胞从未暴露于低氧环境下, 也会因亲代的低氧暴露史而出现性腺发育迟缓(Wang *et al.*, 2016; Lai *et al.*, 2019)。在低氧胁迫下, 鱼类鳃丝原有的规则形态发生改变, 板层排列紊乱和扭曲, 细胞异常增生和坏死并存, 同时, 伴随着渗透压调节的紊乱, 离子平衡和酸碱平衡均被打破, 进而导致一系列血液生化指标的波动(Cadiz *et al.*, 2017; Araújo-Luna *et al.*, 2018; Abdel-Tawwab *et al.*, 2019)。大量转录组研究(Zhang *et al.*, 2017; Qi *et al.*, 2018; Ding *et al.*, 2020; Qi *et al.*, 2020)表明, 低氧诱导因子(hypoxia inducible factor, *hif*)通路是最主要的低氧应答信号通路, 典型的差异表达基因还包括促红细胞生成素(erythropoietin, *epo*), 血红素加氧酶(heme oxygenase, *ho*)属于负责氧分子转运的珠蛋白家族, 参与糖酵解/糖异生、乳酸代谢、丙酮酸代谢、三羧酸循环以及活性氧(reactive oxygen species, ROS)清除等。

为将低氧适应的研究结果应用于分子辅助育种, 需要在全基因组层面筛选性状差异群体的特异性分子标记和基因。全基因组关联分析(genome wide association study, GWAS)是近年来对性状的遗传机制进行解析的重要方法, 其基本原理是利用逻辑或线性回归方法, 筛选出与目标性状关联的单核苷酸多态性位点(single nucleotide polymorphism, SNP), 并对这些遗传变异和目标性状的关系进行验证及相关功能研究。近年来, 已有许多水生生物的 GWAS 研究报道, 刘占江团队应用斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*) 250K SNP 芯片开展抗病(Geng *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2017)和耐低氧(Zhong *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017)性状的 GWAS 分析。鲤 250K SNP 芯片被应用于头长(Chen *et al.*, 2018)、脂肪酸含量(Zheng *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019)性状的 GWAS 分析。Zhou 等(2019)采用基因组重测序数据对半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)抗病性状进行 GWAS 分析, 并结合基因表达和甲基化分析, 筛选出疾病抗性相关候选基因。基于简化基因组测序技术, 高进等(2021)对大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)体重和体尺性状开展了联合 GWAS 分析。崔爱君等(2020)对黄条鲷(*Seriola lalandi*)体重和全长等生长性状进行了 GWAS 分析, 为鱼类种质资源可持续利用和良种培育提供了参考。

本研究聚焦于解析鲤低氧适应性状驯化的遗传机制, 应用鲤 250K 高通量 SNP 芯片(Xu J *et al.*, 2014;

Xu P *et al.*, 2014), 对鲤养殖群体低氧适应性状开展 GWAS 分析, 定位性状关联位点及其效应基因, 旨在为培育鱼类耐低氧品种提供参考。

1 材料与方 法

1.1 实验用 鱼

松荷鲤(*C. carpio Songhe*)实验群体来源于中国水产科学研究院黑龙江水产研究所呼兰试验场。实验个体同批孵化、同池饲养至 3 月龄[平均体重(107 ± 20) g, 平均体长(16.5 ± 2.3) cm], 移入室内暂养缸中, 25℃暂养 7 d 使之适应环境。暂养期间, 气泵充氧, 控制溶解氧浓度 >6.0 mg/L, 每天早、中、晚各投饵 1 次。

1.2 低氧胁迫实验

暂养结束后, 选取体质健康、体重相近、无外伤、无感染、能够正常游泳和摄食的个体用于低氧胁迫实验。实验鱼分 5 组, 分别置于 500 L 的塑料缸中, 每组 260 尾个体。实验开始前使用气泵充氧, 控制溶解氧浓度 >6.0 mg/L, 禁食 24 h 后停止充氧, 使溶解氧浓度持续自然下降。使用 ORION STAR A223 型溶解氧测量仪(Thermo Scientific, 美国), 每隔 15 min 记录溶解氧浓度值, 实验开始 3 h 后, 溶解氧浓度降至 0.43 mg/L, 个体陆续缺氧昏迷, 按昏迷顺序对实验个体进行编号, 移出实验缸。实验开始 5 h 后, 溶解氧浓度稳定在 0.27 mg/L, 将剩余个体移入 50 L 封闭玻璃缸, 通过调节水量控制溶解氧浓度继续缓慢下降。实验开始 10 h 后, 实验鱼全部昏迷, 溶解氧浓度降至 0.12 mg/L。

1.3 样本采集与处理

实验鱼按缺氧昏迷顺序编号, 记录个体信息并采集静脉血样本, 剔除出现外伤或感染的个体, 共采集到 1243 尾有效个体样本。使用动物基因组 DNA 提取试剂盒(天根 DP324-03, 中国), 提取 100 尾极端性状个体的血液 DNA。其中, 每组最早昏迷的 10 尾个体归为低氧敏感组, 5 组共计 50 尾; 最晚昏迷的 10 尾个体归为低氧耐受组, 5 组共计 50 尾。

1.4 基因分型和数据质控

挑选电泳条带清晰无拖尾、 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 在 1.8~2.0 之间、浓度大于 100 ng/ μL 的高质量 DNA 样本用于 SNP 分型, 满足要求的样本共 91 个, 包括低氧敏感样本 43 个, 低氧耐受样本 48 个。使用鲤 250K 高通量 SNP 芯片(赛默飞世尔 Axiom™ carp genotyping array, 美国)进行分型检测, 分型实验由组

勤生物科技(上海)有限公司完成,使用 Affymetrix Power Tools 和 SNPolisher 软件读取分型数据。分型数据质控标准设置为探针质量 ≥ 0.85 , SNP 分型成功率 $\geq 95\%$, 样本分型成功率 $\geq 90\%$, 最小等位基因频率 $\geq 5\%$ 。

1.5 全基因组关联分析

使用 PLINK 软件进行鲤低氧适应性状 GWAS 分析,使用“--logistic”和“--adjust”参数,显著性关联位点标准为 FDR 校正后的 $P < 0.05$, 提示性关联位点标准为 $0.05 \leq \text{FDR}$ 校正后 $P < 0.1$ 。对相关 SNP 位点的 50 kb 侧翼区域进行基因注释。使用 R 语言的 CMplot 软件包绘制曼哈顿图和 Q-Q 图。

2 结果

2.1 SNP 分型

应用鲤鱼 250K 高通量分型芯片进行 SNP 分型,分型及质控结果见表 1。基因分型结果显示,91 个样本中共获得 199 577 个 SNPs 原始分型数据,通过质控的样本共 90 个,包括低氧耐受样本 48 个,低氧敏感样本 42 个。质控后得到 90 个样本的 87 222 个 SNPs 位点的分型数据进行后续 GWAS 分析。

表 1 基因分型和数据质控结果

Tab.1 Genotyping and data quality control

项目 Items	质控前 Before quality control	质控后 After quality control
低氧耐受样本 Hypoxia-tolerant samples	48	48
低氧敏感样本 Hypoxia-sensitive samples	43	42
SNPs 位点 SNPs loci	199 577	87 222

2.2 全基因组关联分析

考虑到群体分层因素对 GWAS 的影响,首先对低氧敏感和耐受样本进行主成分分析(图 1),可以看出,实验样本中不存在显著的群体分层,群体分层对本研究的影响很小,并在后续关联分析中引入了主成分分析结果进行校正。通过 PLINK 进行 GWAS 分析,关联分析结果见表 2 和表 3,包括 4 个关联位点(carp229220、carp195901、carp001519 和 carp063890)和 7 个提示性关联位点(carp000442、carp088568、carp195897、carp188137、carp110811、carp001038

和 carp051623)。使用 R 语言的 CMplot 软件包生成鲤低氧适应性状 GWAS 分析的 Q-Q 图和曼哈顿图(图 2 和图 3),比较 Q-Q 图观测值和期望值的一致性,散点分布与趋势线吻合度较高,可以推测关联分析结果较可靠。从图 3 可以看出,4 个显著性关联位点与 7 个提示性关联位点成簇分布,大部分位于 41 号染色体上,表明该基因组区域可能存在与低氧适应性状密切关联的基因。

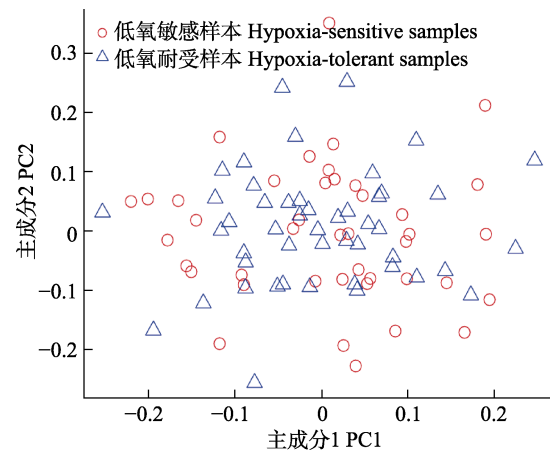


图 1 鲤实验群体主成分分析

Fig.1 Principal component analysis of experimental population of common carp

2.3 低氧适应性状关联基因注释

为了定位低氧适应性状相关的基因,针对筛选的 4 个显著关联的 SNP 位点 carp229220、carp195901、carp001519 和 carp063890,在每个 SNP 位点的 50 kb 上下游区域进行基因注释,筛选出 23 个候选基因(*prdx5*、*tsc1*、*nxf1*、*vtn*、*gtf3c4*、*barhl1*、*cpd*、*cryba1*、*unc119*、*slc13a2*、*aldh3a2*、*traf4*、*kcnk4*、*hcea*、*esrrg*、*bscl2*、*gng3*、*banf1*、*slc3a2*、*calm1*、*pyc*、*tapbp* 和 *la36*)。

3 讨论

本研究应用鲤 250K 高通量 SNP 芯片对鲤养殖群体低氧适应性状开展 GWAS 分析,筛查低氧适应性状的显著性关联 SNP 位点,定位低氧适应性状的关联基因。该芯片是本课题组于 2014 年开发完成的,是鲤的第一个高通量基因分型平台。经过鲤的多个品系的评估,25 万个 SNP 位点中有近 3/4 (199 577 个)被证明在鲤中是多态性的。此外,鲤 SNP 芯片还在近缘物种中进行了验证,获得了 2 万~5 万个多态性位点。该 SNP 芯片对鲤及其近缘物种的性状解析和多态性评估等研究具有重要价值(Xu J *et al.*, 2014)。

表 2 低氧性状关联位点与基因

Tab.2 Associated SNPs and genes for hypoxia adaptation

SNP	P 值 P-value	染色体 Chromosome	位置 Location	等位基因 1 Allele 1	等位基因 2 Allele 2	基因 ID Gene ID	起始位置 Start	结束位置 End	基因名称 Gene Name	基因缩写 Gene Symbol
carp229220	1.95×10^{-8}	LG41	7915847	A	G	HHLG41g0287	7860648	7872600	Hamartin	<i>tsc1</i>
						HHLG41g0288	7912434	7918480	General transcription factor 3C polypeptide 4	<i>gff3c4</i>
						HHLG41g0290	7945752	7949342	BarH-like 1 homeobox protein	<i>barhl1</i>
carp195901	2.26×10^{-7}	LG41	17933797	T	C	HHLG41g0685	17875830	17884815	Carboxypeptidase D	<i>cpd</i>
						HHLG41g0686	17885916	17888266	Beta-crystallin A3	<i>cryba1</i>
						HHLG41g0687	17890980	17912330	Protein unc-119 homolog A	<i>unc119</i>
						HHLG41g0688	17915005	17922373	Solute carrier family 13 member 2	<i>slc13a2</i>
						HHLG41g0689	17927332	17938557	Vitronectin	<i>vn</i>
						HHLG41g0690	17945892	17950523	Fatty aldehyde dehydrogenase	<i>aldh3a2</i>
carp001519	7.67×10^{-7}	LG41	12631805	T	C	HHLG41g0691	17953946	17963151	TNF receptor-associated factor 4	<i>traf4</i>
						HHLG41g0490	12586361	12592441	Potassium channel subfamily K member 4	<i>kank4</i>
						HHLG41g0491	12594057	12596710	High choriolytic enzyme 1	<i>hcea</i>
						HHLG41g0492	12605138	12615582	Estrogen-related receptor gamma	<i>esrrg</i>
						HHLG41g0493	12620783	12623805	Peroxiredoxin-5	<i>prdx5</i>
						HHLG41g0494	12624695	12637453	Nuclear RNA export factor 1	<i>nxf1</i>
						HHLG41g0495	12638608	12646851	Seipin	<i>bsc12</i>
						HHLG41g0496	12650917	12651845	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-3	<i>gng3</i>
						HHLG41g0497	12653566	12653926	Barrier-to-autointegration factor	<i>banf1</i>
						HHLG41g0498	12658801	12661808	4F2 cell-surface antigen heavy chain	<i>slc3a2</i>
						HHLG41g0499	12663470	12665151	Calmodulin	<i>calm1</i>
						HHLG41g0500	12672232	12780186	Pyruvate carboxylase	<i>pyc</i>
carp063890	1.77×10^{-6}	scaffold1133	18816	T	C	HHUNg0128	18011	20303	Tapasin	<i>tapbp</i>
						HHUNg0129	29178	38440	HLA class I histocompatibility antigen	<i>la36</i>

表3 低氧性提示性关联位点与基因
Tab.3 Suggestively associated SNPs and genes for hypoxia adaptation

SNP	P-value	染色体	位置	等位基因1	等位基因2	Gene ID	起始位置	结束位置	基因名称	基因缩写
		chromosome	Location	Allele 1	Allele 2	Gene ID	Start	End	Gene Name	Gene Symbol
carp000442	3.65×10^{-6}	LG41	18972216	T	C	HHLG41g0714	18963646	18991306	Clathrin interactor 1	<i>clini1</i>
						HHLG41g0715	18995257	18998033	Transcription factor SOX-30	<i>sox30</i>
						HHLG41g0716	19001830	19023074	Transcription elongation regulator 1-like protein	<i>icerl1</i>
carp088568	3.75×10^{-6}	LG5	4248461	T	C	HHLG5g0116	4186392	4205144	Voltage-dependent calcium channel gamma-4 subunit	<i>cacng4</i>
						HHLG5g0117	4210275	4212553	Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 2	<i>aimp2</i>
						HHLG5g0118	4228241	4229723	Parvalbumin	<i>prvu</i>
						HHLG5g0119	4233776	4234412	Parvalbumin beta	<i>prvb</i>
						HHLG5g0120	4236748	4239027	Parvalbumin beta	<i>prvb</i>
						HHLG5g0121	4241556	4244905	Parvalbumin beta	<i>prvb</i>
						HHLG5g0122	4247978	4275395	Serine/threonine-protein kinase LMTK2	<i>lmtk2</i>
						HHLG5g0123	4278059	4301670	Tectonin beta-propeller repeat-containing protein 1	<i>tecp1</i>
carp195897	6.17×10^{-6}	LG41	17927247	G	A	HHLG41g0685	17875830	17884815	Carboxypeptidase D	<i>cpd</i>
						HHLG41g0686	17885916	17888266	Beta-crystallin A3	<i>cryba1</i>
						HHLG41g0687	17890980	17912330	Protein unc-119 homolog A	<i>unc119</i>
						HHLG41g0688	17915005	17922373	Solute carrier family 13 member 2	<i>slc13a2</i>
						HHLG41g0689	17927332	17938557	Vitronectin	<i>vtn</i>
						HHLG41g0690	17945892	17950523	Fatty aldehyde dehydrogenase	<i>aldh3a2</i>
						HHLG41g0691	17953946	17963151	TNF receptor-associated factor 4	<i>traf4</i>
carp188137	8.60×10^{-6}	LG41	19624104	T	C	HHLG41g0732	19577486	19593597	RNA-binding protein 27	<i>rhm27</i>
						HHLG41g0733	19594591	19620960	Leucine--tRNA ligase	<i>sylc</i>
						HHLG41g0734	19623709	19628553	PLA8-like protein 1	<i>plac8l1</i>
						HHLG41g0735	19647903	19653880	Glutaredoxin domain-containing cysteine-rich protein 2	<i>grxcr2</i>
carp110811	9.41×10^{-6}	LG41	9710319	A	G	HHLG41g0356	9650026	9720162	Ankyrin-1	<i>ank1</i>
						HHLG41g0357	9729836	9733173	Putative tRNA (cytidine(32)/guanosine(34)-2'-O)-methyltransferase	<i>fts1</i>
						HHLG41g0358	9734679	9758775	Rapamycin-insensitive companion of mTOR	<i>riCTOR</i>
carp001038	9.87×10^{-6}	LG41	14441570	A	G	HHLG41g0575	14394024	14490911	Collagen alpha-1(XXIII) chain	<i>col23a1</i>
carp051623	9.94×10^{-6}	LG41	20892648	G	A	HHLG41g0763	20844695	20848673	5-hydroxytryptamine receptor 2A	<i>htr2a</i>
						HHLG41g0764	20857611	20869927	Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 3	<i>wasf3</i>
						HHLG41g0765	20879201	20889480	G-protein coupled receptor 12	<i>gpr12</i>
						HHLG41g0766	20889822	20892857	NHS-like protein 2	<i>nhs12</i>
						HHLG41g0767	20897560	20902481	Insulin receptor substrate 2-A	<i>irs2-a</i>
						HHLG41g0768	20906412	20914371	Cysteine protease ATG4A	<i>atg4a</i>
						HHLG41g0769	20915184	20917402	Ankyrin repeat domain-containing protein 46	<i>ankrd46</i>
						HHLG41g0770	20918768	20927537	Transmembrane protein 185-like	<i>t185l</i>
						HHLG41g0771	20931575	20950880	Serine/threonine-protein kinase 26	<i>stk26</i>

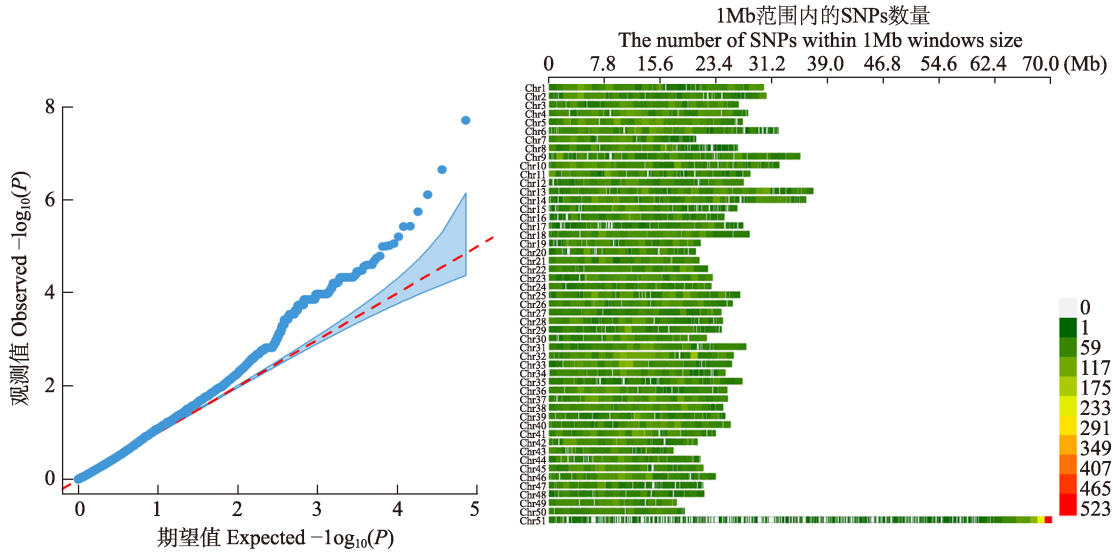


图 2 鲤低氧适应性状 GWAS 关联分析的 Q-Q 图和密度图

Fig.2 Q-Q plot and SNP-density plot of genome-wide association of hypoxia adaptation trait of common carp

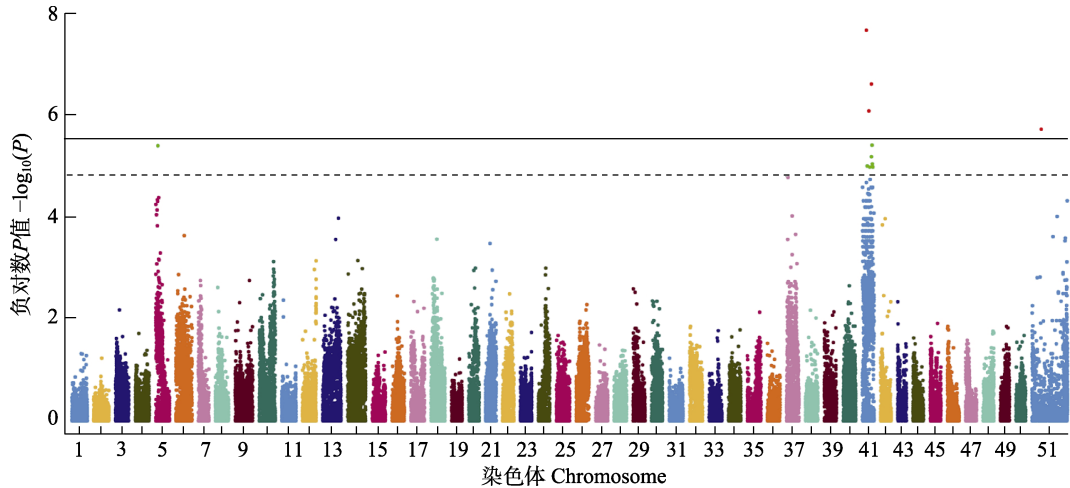


图 3 鲤低氧适应性状 GWAS 关联分析的曼哈顿图

Fig.3 Manhattan plot of the genome-wide association analysis for hypoxia adaptation trait of common carp

在 GWAS 分析中，如果样本中存在不同的群体分层结构，会对关联分析的结果产生显著影响，造成基因组膨胀系数(genomic inflation factor, GIF)的增加和假阳性的出现。主成分分析可以通过对群体的基因分型结果降维，提取主要的几个主成分，并直观地观察到群体内部的分层现象。本研究中主成分分析结果显示，群体分层对关联分析结果影响很小。使用 PLINK 软件进行 GWAS 分析时，由于本研究的低氧适应性状为二项式性状(敏感和耐受)，所以，采用逻辑(logistic)回归分析，并将主成分分析的结果(前 5 个主成分)作为辅因子，进行结果的校正。对于 GWAS 分析后原始 P 值的分布，通过绘制 Q-Q 图分析 P 值的观测值和期望值的一致性，如果偏离趋势线太多，则提示可能有群体分层等因素影响分析的准确性，本

研究的 Q-Q 图提示研究的可靠性较高，SNP 密度图也显示分析用的 8 万多个位点较均匀地分布在 50 个染色体上。

在自然群体数量性状 GWAS 的研究报道中，通常会筛选到几十个到数百个关联位点，而本研究只定位到 4 个 SNP 位点，这与所采用的实验群体有关。实验用鱼为松荷鲤养殖群体，这一品种是利用多元杂交选育技术培育的鲤鱼品种，选育亲本来源包括镜鲤(*C. carpio var. specularis*)、荷包红鲤(*C. carpio Red var vuyuanensis*)和黑龙江野鲤(*C. carpio haematopterus Tem.etSchl*)，主要选育目标为抗寒和生长(石连玉等, 2012)。由于其亲本品种间存在低氧适应性状的明显差异，特别是历经长期高强度驯化的镜鲤为低氧耐受品种，而荷包红鲤为地方原种，低氧耐受能力相对较

弱(赵紫霞等, 2014), 在新品种松荷鲤个体间存在低氧适应性状的显著差异, 其遗传基础为来源于镜鲤基因组的少量低氧适应驯化位点。

在已发表的有限几项养殖鱼类低氧 GWAS 研究结果中, 也呈现出类似的特点, 即显著性关联位点较少, 可能起源于家养驯化选择。Wang 等(2017)利用斑点叉尾鲷 250K SNP 芯片对来自 6 个品系的斑点叉尾鲷群体进行全基因组关联研究, 鉴定出 1 个品系间显著 QTL, 在品系内鉴定到 6 个显著的 QTL。6 个品系的 QTL 之间重叠很少, 证实了斑点叉尾鲷低氧适应遗传机制的复杂性, 这些 QTL 中的许多基因具有调节氧代谢和参与低氧应答的功能(Zhong *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017)。Li 等(2017)应用双酶切限制性位点测序技术, 在尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)中鉴定出低氧适应性状的 4 个显著 QTL, 并得到 2 个基因表达结果的验证。

通过全基因组关联分析筛查到的 4 个显著性关联位点中, carp229220 和 carp001519 为同义突变, carp195901 为非编码区突变, carp063890 位于一个抗原提呈相关转运蛋白 Tapasin 编码序列内, 可能并非真正的效应位点。目前, 在显著性关联位点附近注释到 23 个功能基因, 肿瘤坏死因子受体相关因子(TNF receptor associated factors, *trafs*)编码一类具有胞内信号转导功能的蛋白, 它们介导了多种生物学功能, 包括先天性和获得性免疫应答、胚胎发育、应激反应和骨代谢(胡宸曦, 2020)。肿瘤坏死因子受体相关因子 4 (TNF receptor associated factor 4, *traf4*)是 *trafs* 家族中比较特殊的一员, 生物学功能多且复杂, 参与调控 nuclear factor kappa B (NF- κ B)、c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)等低氧相关信号通路(王沂等, 2015)。韩雪晴等(2019)通过亚细胞定位和双荧光素酶报告基因研究发现, *traf4* 在 293T 细胞中主要定位于细胞质, 可增强 NF- κ B 活性。过氧化物氧化还原酶(peroxiredoxin, *prdx*)基因家族编码具有过氧化氢酶活性的抗氧化蛋白, 在生物体中参与多个与活性氧相关的信号通路, 参与氧活性物质清除和细胞保护(丁婷婷等, 2020)。朱珍珍(2017)利用 CRISPR/Cas9 技术对斑马鱼(*Danio rerio*) *prdx* 家族进行敲除, 分别获得 *prdx1*、*prdx5* 和 *prdx6* 缺陷突变体, 使用 15 mmol/L 的 H₂O₂ 处理发现, 斑马鱼 *prdx5* 缺陷的胚胎耐受胁迫能力降低。此外, 脂肪醛脱氢酶(fatty aldehyde dehydrogenase, *aldh3a2*)基因产物参与无氧代谢, 候选基因中还包含多个具体功能未知的信号转导分子(如 *esrrg*、*eng3* 和 *gpr12*)和转录调控因子

(如 *gtf3c4*、*sox30* 和 *tcerg11*), 均与低氧应答或低氧损伤修复相关, 可能贡献于低氧适应表型。此外, 除了 carp063890 位于 scaffold1133, 未能装配至特定染色体, 其余 3 个位点均定位于 41 号染色体, 表明该染色体区域存在与低氧适应性状密切关联的基因。

本研究初步筛选了低氧适应性状的关联位点, 注释了这些位点附近可能参与低氧适应调控通路的基因, 为下一步开展区域内效应基因精细定位、基因表达和功能分析等研究奠定了基础, 后续将通过低氧转录组分析、QTL 定位等手段, 筛查导致性状差异的效应基因及基因型, 开展深入功能分析, 为探索鲤低氧适应性状的分子机理和鱼类耐低氧品种选育提供借鉴。

参 考 文 献

- ABDEL-TAWWAB M, HAGRAS A E, ELBAGHDADY H M, *et al.* Dissolved oxygen level and stocking density effects on growth, feed utilization, physiology, and innate immunity of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Applied Aquaculture*, 2014, 26(4): 340–355
- ABDEL-TAWWAB M, MONIER M N, HOSEINIFAR S H, *et al.* Fish response to hypoxia stress: Growth, physiological, and immunological biomarkers. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2019, 45(3): 997–1013
- ARAÚJO-LUNA R, RIBEIRO L, BERGHEIM A, *et al.* The impact of different rearing condition on gilthead seabream welfare: Dissolved oxygen levels and stocking densities. *Aquaculture Research*, 2018, 49(12): 3845–3855
- CADIZ L, ZAMBONINO-INFANTE J L, QUAZUGUEL P, *et al.* Metabolic response to hypoxia in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) displays developmental plasticity. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, 215: 1–9
- CHEN L, PENG W Z, KONG S N, *et al.* Genetic mapping of head size related traits in common carp (*Cyprinus carpio*). *Frontiers in Genetics*, 2018, 9: 448
- CUI A J, XU Y J, WANG B, *et al.* Genome-wide association analysis of growth traits in yellow tail kingfish (*Seriola lalandi*). *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(2): 71–79 [崔爱君, 徐永江, 王滨, 等. 黄条鲷生长性状全基因组关联分析. *渔业科学进展*, 2020, 41(2): 71–79]
- DING J, LIU C, LUO S, *et al.* Transcriptome and physiology analysis identify key metabolic changes in the liver of the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) in response to acute hypoxia. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020, 189: 109957
- DING T T, ZHANG H, FENG J H, *et al.* Advances in research on mechanism of action of PRDXs family in colorectal cancer. *Chinese Journal of Immunology*, 2020, 36(23): 2938–2942 [丁婷婷, 张红, 冯继红, 等. PRDXs 家族在结

- 直肠癌中作用机制的研究进展. 中国免疫学杂志, 2020, 36(23): 2938–2942]
- FITZGIBBON Q P, STRAWBRIDGE A, SEYMOUR R S. Metabolic scope, swimming performance and the effects of hypoxia in the mullet, *Argyrosomus japonicus* (Pisces: Sciaenidae). *Aquaculture*, 2007, 270(1): 358–368
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. The state of world fisheries and aquaculture, 2020
- GAO J, YANG R Q. Joint genome-wide association study of body mass and morphological traits in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(2): 63–70 [高进, 杨润清. 大菱鲆体重和体尺性状联合 GWAS 分析. 渔业科学进展, 2021, 42(2): 63–70]
- GENG X, SHA J, LIU S K, *et al.* A genome-wide association study in catfish reveals the presence of functional hubs of related genes within QTLs for columnaris disease resistance. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 196
- HAN X Q, GAO F Y, LU M X, *et al.* Cloning, expression and functional analysis of TRAF4 gene in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2019, 27(3): 381–392 [韩雪晴, 高风英, 卢迈新, 等. 尼罗罗非鱼 TRAF4 基因的克隆、表达及功能分析. 农业生物技术学报, 2019, 27(3): 381–392]
- HU C X. Cloning of TRAF gene family in *Hyriopsis cumingii* and their interaction with β -Arrestin. Master's Thesis of Nanchang University, 2020, 99 [胡宸曦. 三角帆蚌 TRAF 家族基因的克隆及与 β -arrestin 蛋白互作. 南昌大学硕士研究生学位论文, 2020, 99]
- LAI K P, WANG S Y, LI J W, *et al.* Hypoxia causes transgenerational impairment of ovarian development and hatching success in fish. *Environmental Science and Technology*, 2019, 53(7): 3917–3928
- 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. *Marine Biotechnology*, 2017, 19(5): 441–453
- NAKAJIMA T, HUDSON M J, UCHIYAMA J, *et al.* Common carp aquaculture in Neolithic China dates back 8,000 years. *Nature Ecology and Evolution*, 2019, 3(10): 1415–1418
- PORTNER H O. Oxygen- and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate related stressor effects in marine ecosystems. *Journal of Experimental Biology*, 2010, 213(6): 881–893
- QI D, CHAO Y, WU R, *et al.* Transcriptome analysis provides insights into the adaptive responses to hypoxia of a schizothoracine fish (*Gymnocypris eckloni*). *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 1326
- QI M, WU Q, LIU T, *et al.* Hepatopancreas transcriptome profiling analysis reveals physiological responses to acute hypoxia and reoxygenation in juvenile qingtian paddy field carp *Cyprinus carpio var qingtianensis*. *Frontiers in Physiology*, 2020, 11: 1110
- SHI L Y, LI F, JIA Z Y, *et al.* Study on genetic diversity and structure in songhe carp. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2012(4): 104–112 [石连玉, 李飞, 贾智英, 等. 选育品种松荷鲤遗传结构研究. 海洋湖沼通报, 2012(4): 104–112]
- WANG S Y, LAU K, LAI K P, *et al.* Hypoxia causes transgenerational impairments in reproduction of fish. *Nature Communications*, 2016, 7: 12114
- WANG X Z, LIU S K, JIANG C, *et al.* Multiple across-strain and within-strain QTLs suggest highly complex genetic architecture for hypoxia tolerance in channel catfish. *Molecular Genetics and Genomics*, 2017, 292(1): 63–76
- WANG Y, ZHAO J J, HAN X Y, *et al.* Structure and biological function of TRAF4. *Life Science Research*, 2015, 19(2): 169–175 [王沂, 赵俊曦, 韩晓燕, 等. TRAF4 的结构与生物学功能. 生命科学研究, 2015, 19(2): 169–175]
- XIAO W H. Hypoxia signal transduction pathway and fish adaptation to hypoxia. *Scientia Sinica (Vita)*, 2014, 44(12): 1227–1235 [肖武汉. 低氧信号传导途径与鱼类低氧适应. 中国科学: 生命科学, 2014, 44(12): 1227–1235]
- XU J, ZHAO Z X, ZHANG X F, *et al.* Development and evaluation of the first high-throughput SNP array for common carp (*Cyprinus carpio*). *BMC Genomics*, 2014, 15: 307
- XU P, ZHANG X F, WANG X M, *et al.* Genome sequence and genetic diversity of the common carp, *Cyprinus carpio*. *Nature Genetics*, 2014, 46(11): 1212–1219
- ZHANG G S, ZHAO C, WANG Q T, *et al.* Identification of HIF-1 signaling pathway in *Pelteobagrus vachelli* using RNA-Seq: Effects of acute hypoxia and reoxygenation on oxygen sensors, respiratory metabolism, and hematology indices. *Journal of Comparative Physiology B*, 2017, 187(7): 921–943
- ZHANG H Y, XU P, JIANG Y L, *et al.* Genomic, transcriptomic, and epigenomic features differentiate genes that are relevant for muscular polyunsaturated fatty acids in the common carp. *Frontiers in Genetics*, 2019, 10: 217
- ZHAO Z X, CAO D C, KUANG Y Y, *et al.* Analysis of common carp neuroglobin gene sequence and hypoxia expression. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(3): 325–332 [赵紫霞, 曹顶臣, 匡友谊, 等. 鲤神经球蛋白基因序列与低氧表达分析. 水产学报, 2014, 38(3): 325–332]
- ZHENG X H, KUANG Y Y, LÜ W H, *et al.* Genome-wide association study for muscle fat content and abdominal fat traits in common carp (*Cyprinus carpio*). *PLoS One*, 2016, 11(12): e0169127
- ZHONG X X, WANG X Z, ZHOU T, *et al.* Genome-wide association study reveals multiple novel QTL associated with low oxygen tolerance in hybrid catfish. *Marine Biotechnology*, 2017, 19(4): 379–390
- ZHOU Q, SU Z C, LI Y Z, *et al.* Genome-wide association mapping and gene expression analyses reveal genetic

mechanisms of disease resistance variations in *Cynoglossus semilaevis*. *Frontiers in Genetics*, 2019, 10: 1167

ZHOU T, LIU S K, GENG X, *et al.* GWAS analysis of QTL for enteric septicemia of catfish and their involved genes suggest evolutionary conservation of a molecular mechanism of disease resistance. *Molecular Genetics and Genomics*,

2017, 292(1): 231–242

ZHU Z Z. Study on zebrafish *rsph3* gene in early development and preparation of zebrafish *prdx* mutants. Master's Thesis of Shandong University, 2017, 87 [朱珍珍. 斑马鱼 *rsph3* 基因在早期发育中的研究及斑马鱼 *prdx* 突变体的制备. 山东大学硕士研究生学位论文, 2017, 87]

(编辑 冯小花)

Genome-Wide Association Analysis of Hypoxia Adaptation Traits in Common Carp (*Cyprinus carpio*)

WU Biyin^{1,2#}, XU Jian^{2#}, CAO Dingchen³, XU Peng⁴, ZHANG Hanyuan², ZHU Youxiu^{1,2}, JIANG Yanliang², ZHAO Zixia^{2①}

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Aquatic Genomics, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141, China; 3. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin, Heilongjiang 150070, China; 4. College of Ocean and Earth Sciences, Xiamen University, Fujian Collaborative Innovation Center for Exploitation and Utilization of Marine Biological Resources, Xiamen, Fujian 361102, China)

Abstract To reveal the genetic mechanism underlying hypoxia adaptation, it is important to identify the molecular markers and candidate genes associated with hypoxia adaptation traits. Genome-wide association studies (GWSA) are frequently used in the genetic dissection of both quantitative traits and qualitative traits, while a large number of molecular markers and samples are needed. In this study, the GWSA of the hypoxia adaptation traits of common carp (*Cyprinus carpio*) was conducted. A total of 1243 samples were collected for the hypoxia stress experiment, and individuals with extreme traits in the hypoxia experiment were selected as the preliminary screening samples. The Carp 250 K single nucleotide polymorphism (SNP) array was used for genotyping, generating genotypes of 199 577 SNPs for 91 samples. After quality control with a genotyping call rate of over 95% and a sample call rate of 90%, a total of 87 222 SNPs and 90 samples were obtained for the association analysis. A principal component analysis (PCA) showed no population stratification in the samples from both the sensitive and tolerant groups. Taking the PCA results as a covariance, a logistic regression was used for the association test with a threshold of the false discovery rate value of 0.05. Four associated SNPs for hypoxia adaptation traits (carp229220, carp195901, carp001519, and carp063890) were identified, and 23 genes were found in the neighboring regions of the four SNPs, including TNF receptor-associated factor 4 (*traf4*), fatty aldehyde dehydrogenase (*aldh3a2*), peroxiredoxin 5 (*prdx5*), estrogen-related receptor gamma (*esrrg*), guanine nucleotide-binding protein subunit gamma-3 (*eng3*), G-protein coupled receptor 12 (*gpr12*), general transcription factor 3C polypeptide 4 (*gtf3c4*), transcription factor SOX-30 (*sox30*), and transcription elongation (*tcerg1l*). Additionally, seven SNPs passed the suggestive line, which could be validated in future research with larger samples. Putative genomic regions related to hypoxia adaptation for domesticated common carp were obtained in this study, which shed new light on the fine mapping and identification of causative genes and the underlying mechanisms of hypoxia adaptation.

Key words Common carp *Cyprinus carpio*; Hypoxia adaptation; SNP array; Genome-wide association study

① Corresponding author: ZHAO Zixia, E-mail: zhaozx@cafs.ac.cn