

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210412001

http://www.yykxjz.cn/

李哲, 李雨, 敬庭森, 刘小莉, 闫卉果, 陆安帅, 周剑, 罗辉, 叶华. 长吻鲢单核苷酸多态性标记与生长性状关联分析. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 127-135
LI Z, LI Y, JING T S, LIU X L, YAN H G, LU A S, ZHOU J, LUO H, YE H. Correlation analysis of SNP markers and growth traits of *Leiocassis longirostris*. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(4): 127-135

长吻鲢单核苷酸多态性标记与生长性状关联分析*

李 哲¹ 李 雨¹ 敬庭森¹ 刘小莉¹ 闫卉果¹
陆安帅¹ 周 剑² 罗 辉¹ 叶 华^{1①}

(1. 西南大学水产学院 重庆 402460; 2. 四川省水产研究所 四川 成都 611731)

摘要 为开发长吻鲢(*Leiocassis longirostris*)生长性状相关的分子标记, 为其分子辅助育种提供基础资料, 以 115 尾长吻鲢为研究对象, 运用 57 个单核苷酸多态性标记(SNPs)位点与体重、全长、体长和头高进行关联分析。结果显示, 有 10 个 SNPs 位点与生长性状显著相关, 其中 3 个 SNPs 位点(*Cluster-65_137265*、*Cluster-65_111833* 和 *Cluster-65_137642*)对所测量的 4 个生长性状均有显著影响($P<0.05$); 3 个 SNPs 位点(*Cluster-65_120392*、*Cluster-65_5592_0* 和 *Cluster-65_105077*)对体重、全长和体长有显著影响($P<0.05$); *Cluster-65_110382* 对全长、体长和头高有显著影响($P<0.05$); *Cluster-65_19497* 和 *Cluster-24304_1* 对全长和体长有显著影响($P<0.05$); *Cluster-65_130153* 对体长和头高有显著影响($P<0.05$)。此外, *Cluster-65_137265*、*Cluster-65_111833*、*Cluster-65_110382* 和 *Cluster-65_137642* 分别与阴离子交换蛋白 2 样亚型 X1 (anion exchange protein 2-like isoform X1)神经突起导向因子 4 样(*netrin-4-like*)、酪氨酸蛋白激酶 Tec 亚型 X2 (tyrosine-protein kinase Tec isoform X2)和氨甲酰磷酸合成酶 1 (carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial, CPS1)相似度最高, 表明这 4 个基因可能参与调控了长吻鲢的生长。对与生长相关的 10 个 SNPs 位点进行多态性检测, 平均观测杂合度和平均期望杂合度分别为 0.537 和 0.467, 平均多态信息含量为 0.357。本研究为长吻鲢的遗传改良和选择育种提供了基础资料, 并首次发现了 4 个可能与长吻鲢生长相关的基因。

关键词 长吻鲢; SNP; 生长性状; 关联分析

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)04-0127-09

长吻鲢(*Leiocassis longirostris*)俗称鲢鱼, 属鲢形目(Siluriformes)、鲢科(Bagridae)、鲢属(*Leiocassis*), 因其吻部较一般鱼长, 故名长吻鲢(邓楠楠等, 2018)。长吻鲢肉质细嫩, 口感爽滑, 且肌间刺少, 非常鲜美,

民间素有“不食江团, 不知鱼味”之说, 特别是长吻鲢的鳔十分肥厚, 干制成“鱼肚”是享誉中外的珍肴(Liang *et al*, 2016; 吴清江, 1975)。长吻鲢背部呈黑色, 腹部灰白色, 是一种温水型鱼类, 多分布于我国

* 国家自然科学基金资助项目(31402302)、中央高校基本科研业务费资助项目(XDJK2017B008)和西南大学荣昌校区青年基金资助项目(20700938)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31402302), Fundamental Research Funds for the Central Universities (XDJK2017B008), and Youth Fund Project of Southwest University Rongchang Campus (20700938)]. 李 哲, E-mail: 2892500707@qq.com

① 通信作者: 叶 华, 教授, E-mail: yhlh2000@126.com

收稿日期: 2021-04-12, 收修改稿日期: 2021-05-12

长江干流、通江湖泊和各大支流的下游水域(Shen *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2005)。但由于人工捕捞、水利工程建设等影响,野生长吻鮠资源急剧衰减,从而影响了长吻鮠生态资源的保存(Yang *et al.*, 2012; Xiao *et al.*, 2012; Shen *et al.*, 2011)。因此,为保证长吻鮠养殖产业的可持续发展,开展长吻鮠的良种选育刻不容缓。

研究表明,相对于传统育种,分子标记辅助育种可以提高育种速度近 11% (Gomez-Raya *et al.*, 1999)。单核苷酸多态性(SNPs)是第 3 代分子标记技术,具有高遗传稳定性、高密度、便于自动化分析等优点,已被广泛应用于群体遗传学、遗传图谱构建、个体识别、亲缘关系鉴定和分子标记辅助育种的研究中(Vignal *et al.*, 2002)。关联分析能将分子标记的遗传变异与生长性状联系起来,是实现分子标记辅助育种的有效方法(董玉等, 2016)。目前,运用关联分析筛选与生长性状相关联的 SNPs 标记已在农作物(李兆波等, 2010)和家畜(石磊等, 2007)中广泛开展,也在水产动物中得到了广泛应用,多位学者先后进行了 SNP 标记与中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)(李纯, 2017)、建鲤(*Cyprinus carpio* var. Jian)(陶文静等, 2011)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)(王春晓等, 2015)、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)(张猛, 2016)、大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)(李胜杰等, 2018)、刺参(*Apostichopus japonicus*)(刘安然等, 2019)等水产动物生长性状的关联分析。

本研究随机挑选同批繁殖的长吻鮠作为研究对象,从本实验室构建的长吻鮠肝脏转录组数据库中随机挑选 57 个 SNP,并分析这些 SNPs 位点与长吻鮠生长性状(体重、全长、体长和头高)的相关性,以期为长吻鮠分子辅助育种和遗传改良提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所用材料取自四川省农科院水产研究所的四川岷江中游珍稀鱼类保护基地,随机选取 115 尾同批次人工繁殖且饲养条件一致的 14 月龄的长吻鮠,经浓度为 100 mg/L 的丁香酚溶液麻醉后,测定其体重、全长、体长和头高,并剪取部分背鳍保存于无水乙醇中备用。

1.2 SNP 标记开发

本研究所用的 SNP 来自本实验室从长吻鮠肝脏转录组数据开发的 SNP(未发表),随机挑选 57 个与氨基酸代谢、发育、内分泌系统、能量代谢、碳水化

合物代谢、细胞生长与死亡和消化系统等相关基因的 SNP 用于基因分型。

1.3 实验方法

1.3.1 基因组 DNA 提取 剪取 20 mg 左右的鳍条,采用上海生工 Ezup 柱式动物基因组 DNA 抽取试剂盒提取基因组 DNA,操作参照说明进行。采用浓度为 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量,并在 4℃ 保存。

1.3.2 SNPs 分型检测 根据 SNP 位点序列信息,使用 Sequenom 公司的引物设计软件 Assay design 3.1,设计 PCR 反应和单碱基扩展引物合成。PCR 反应体系为 5 μ L: 1.75 μ L 超纯水, 0.625 μ L 10 \times PCR buffer (含 15 mmol/L 的 MgCl₂), 0.1 μ L dNTP Mix, 0.325 μ L MgCl₂, 1 μ L Primer Mix, 0.2 μ L HotStar Taq, 1 μ L DNA。PCR 反应程序: 94℃ 预变性 2 min; 94℃ 变性 20 s, 退火温度 56℃ 30 s, 72℃ 延伸 60 s, 共 45 个循环; 72℃ 终延伸 3 min, 4℃ 保存。为了消除 PCR 扩增产物中多余的 dNTP 和引物,进行 SAP 消化,反应体系为 2 μ L: 1.53 μ L 超纯水, 0.17 μ L 的 10 \times SAP buffer, 0.3 μ L 浓度为 1.7 U/ μ L 的 SAP。SAP 反应程序: 37℃ 消化 40 min, 最后 85℃ 灭活 5 min, 保存于 4℃。采用延伸反应对 SNP 进行多重单碱基延伸,反应体系为 2 μ L: 0.76 μ L 超纯水, 0.2 μ L 10 \times iPLEX buffer plus, 0.2 μ L iPLEX terminator, 0.8 μ L Primer Mix, 0.04 μ L iPLEX 酶。延伸反应程序: 94℃ 预变性 30 s; 94℃ 变性 5 s; 退火温度 52℃ 5 s, 80℃ 延伸 5 s, 按 1 次变性循环 5 次退火和延伸循环的方式,共 45 个循环; 72℃ 终延伸 3 min, 于 4℃ 保存。最后将反应产物(共 9 μ L)稀释 3 倍,树脂脱盐,将脱盐后的样品点在样品靶上,自然结晶,MassARRAY 质谱仪进行质谱检测,采用 MassARRAY typer4 对 SNP 进行分型检测。

1.4 数据处理

1.4.1 遗传特性分析 采用 POPGENE 3.2 计算观测杂合度、期望杂合度和表示 Hardy-Weinberg 平衡(HWE)偏差的 *P* 值。多态性信息含量(PIC)由 Botstein 等(2014)提出的公式计算。

1.4.2 SNPs 与性状的关联分析 采用 SPSS 20.0 对长吻鮠体重、全长、体长和头高进行正态分布检验与相关性检测。然后进行其生长性状的主成分分析,按累计贡献率 85%提取主成分。采用 *T* 检验分析各 SNP 位点与生长性状的相关性,并用 Duncan 法进行多重比较分析,在 0.05 水平下检测显著性。

2 结果与分析

2.1 生长性状分布

运用 SPSS 20.0 对 115 尾长吻鲢体重、全长、体长和头高进行正态分布检验。本研究所用实验鱼平均体重为 154.107 g, 平均全长、体长和头高分别为 26.431、21.316 和 3.668 cm。正态分布检验结果显示各性状的 P 值均大于 0.05, 符合正态分布, 均具有连续遗传变异的特点(表 1)。

2.2 各性状相关性和主成分分析

对 115 尾长吻鲢的生长性状进行降维处理, 结果如表 2 所示。按照选择 k 个较大特征值来满足主成分的累计贡献率大于 85% 的要求, 长吻鲢提取 1 个主成分便满足了入选主成分的条件。长吻鲢生长的第一主

成分的特征值是 3.665, 累计贡献率为 91.617%。由性状的第一主成分的成份矩阵可知, 第一主成分可称为增长、增重因子(表 3)。

对长吻鲢体重、全长、体长和头高进行相关性检验。结果显示, 体长和全长的相关系数最高, 达到 0.964; 体长和头高的相关系数最低, 为 0.827。各性状之间具有极显著的相关性($P < 0.01$)(表 3)。

2.3 SNPs 位点与生长性状的相关性

运用 SPSS 20.0 对 57 个 SNPs 位点与体重、全长、体长和头高进行连锁显著性分析, T 检验结果以及与生长性状相关的 SNP 位点引物信息如表 4 所示。在随机挑选的 57 个 SNPs 中, 共有来自氨基酸代谢、发育、内分泌系统、碳水化合物代谢、细胞生长与死亡和消化系统等基因的 10 个 SNPs 位点对生长性状

表 1 长吻鲢体重、全长、体长和头高的正态分布检验

Tab.1 Normal distribution of body weight, total length, body length, and head height of *L. longirostris*

性状 Traits	平均值±标准差 Mean±SD	偏度 Skewness	峰度 Kurtosis	最小值 Minimum value	最大值 Maximum value	P 值 P value
体重 Body weight /g	154.107±47.111	0.267	-0.501	54.900	285.300	0.169
全长 Total length /cm	26.431±2.579	-0.299	-0.369	19.800	31.300	0.200
体长 Body length /cm	21.316±2.234	-0.392	-0.236	15.700	25.400	0.200
头高 Head height /cm	3.668±0.440	0.003	-0.482	2.600	4.700	0.200

表 2 长吻鲢生长性状的主成分分析

Tab.2 Principle component analysis on growth traits of *L. longirostris*

成份 Component	初始特征值 Initial component			提取平方和载入 Sum of squares of extracted component		
	合计 Total	方差百分比 Variance ratio /%	累积方差百分比 Accumulative variance ratio /%	合计 Total	方差百分比 Variance ratio /%	累积方差百分比 Accumulative variance ratio /%
1	3.665	91.617	91.617	3.665	91.617	91.617
2	0.221	5.529	97.146			
3	0.079	1.974	99.120			
4	0.035	0.880	100.000			

表 3 长吻鲢体重、全长、体长和头高的相关性检验及性状的成份矩阵

Tab.3 Correlation test on body weight, total length, body length, and head height and component matrix on growth traits of *L. longirostris*

性状 Traits	体重 Body weight	全长 Total length	体长 Body length	头高 Head height	成份矩阵 Component matrix
体重 Body weight	1.000	0.936**	0.926**	0.839**	0.968
全长 Total length		1.000	0.964**	0.831**	0.976
体长 Body length			1.000	0.827**	0.972
头高 Head height				1.000	0.911

注: **表示两两性状之间差异极显著($P < 0.01$)。

Note: ** indicates significant correlation between two traits at 0.01 level.

产生了显著影响($P<0.05$)。

消化系统相关基因的 SNP 位点 *Cluster-65_137265*、发育相关基因的 SNP 位点 *Cluster-65_111833* 和氨基酸代谢相关基因的 SNP 位点 *Cluster-65_137642* 对所测量的 4 个生长性状均有显著影响($P<0.05$)。内分泌系统相关基因的 SNP 位点 *Cluster-65_120392*、发育相关基因的 SNP 位点 *Cluster-65_105077* 和细胞生长与死亡相关基因的 SNP 位点 *Cluster-65_5592_0* 对体重、全长和体长有显著影响($P<0.05$)。发育相关基因的 SNP 位点 *Cluster-65_110382* 对全长、体长和头高有显著影响($P<0.05$)。氨基酸代谢相关基因的 SNP 位点 *Cluster-65_19497* 和消化系统相关基因的 SNP 位点 *Cluster-24304_1* 对全长和体长有显著影响($P<0.05$)。碳水化合物代谢相关基因的 SNP 位点 *Cluster-65_130153* 对体长和头高有显著影响($P<0.05$)。

在这 10 个 SNPs 位点中, 5 个 SNPs 位点(*Cluster-65_137265*、*Cluster-65_5592_0*、*Cluster-65_130153*、*Cluster-65_137642* 和 *Cluster-65_19497*) 的纯合突变基因型个体在体重、全长、体长和头高的均值均大于杂合突变基因型和未发生突变的个体。此外, 在 2 个 SNPs 位点(*Cluster-65_110382* 和 *Cluster-24304_1*) 中, 未发生突变的个体在体重、全长、体长和头高的均值均大于杂合突变基因型和纯合突变基因型的个体。

2.4 SNPs 位点多态性分析及注释信息

10 个 SNPs 位点的多态性检测结果及所在基因序列注释信息见表 5。10 个 SNPs 位点的观测杂合度范围为 0.350~0.781, 期望杂合度范围为 0.411~0.502, 平均值分别为 0.537 和 0.467。在 10 个 SNPs 位点中, *Cluster-65_120392*、*Cluster-24304_1*、*Cluster-65_110382* 和 *Cluster-65_19497* 这 4 个位点出现极显著偏离哈代-温伯格平衡的现象($P<0.01$), *Cluster-65_130153* 出现显著偏离哈代-温伯格平衡的现象($P<0.05$)。此外, 10 个 SNPs 位点均具有中度多态性($0.25 \leq \text{PIC} < 0.5$)。将 10 个与生长性状显著关联的 SNPs 位点所处基因的序列在 NCBI 在线数据库中进行 BLASTn 分析, 详细的 unigene 注释信息见表 5。

3 讨论

3.1 长吻鲢 SNP 标记开发

SNPs 是基因组中分布最稳定的点突变, 且它比微卫星等重复序列多态标记具有更高的遗传稳定性。研究表明, 使经济性状产生差异的 SNPs 位点对分子

标记辅助育种具有重要意义(Feng *et al*, 2008), 这也使得 SNPs 与生长性状的关联分析广泛应用于分子标记辅助育种。曹婷婷等(2012)分析与草鱼消化能力相关的羧肽酶 A 部分片段中的 2 个 SNPs 的多态性, 发现 *A36C* 位点与增重具有显著相关性。陈雪峰等(2010)分析吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)中控制生长和脂肪沉积的胰岛素生长因子 2 中的 SNPs 的多态性, 发现外显子 *3161 nt* 在雄鱼中与增重显著相关。杨月静等(2018)基于转录组测序得到的 SNPs 位点, 随机挑选了 26 个 SNPs 位点, 结果表明 4 个 SNPs 位点对齐裂腹鱼(*Schizothorax prenanti*)的生长性状有显著影响, SNP 标记准确率为 15.38%, 其中, *ug25050-0-1678* 和 *ug22712-0-2452* 对增重有显著影响。本研究从本实验室开发的 SNPs 位点, 随机挑选 57 个 SNPs 位点, 结果表明, 10 个 SNPs 位点对长吻鲢生长性状有显著影响, SNP 标记准确率为 17.54%, 这高于杨月静等(2018)和李胜杰等(2018)的研究结果, 这是因为在挑选 SNPs 位点时, 存在不确定性和随机性。

遗传杂合度和多态信息含量是测量和评价遗传标记效用的参数, 一般认为, PIC 是衡量基因变异程度高低的较好指标(Beacham *et al*, 2004; Kalinowski *et al*, 2002)。本研究筛选得到 10 个与生长性状相关的 SNPs 位点, 均达到中度多态性。这一结果与在齐裂腹鱼(杨月静等, 2018)、大菱鲂(*Scophthalmus maximus*) (王婷等, 2014)、大口黑鲈(李胜杰等, 2018) 中的研究结果一致, 即 SNPs 位点的 PIC 均属于低度多态性和中度多态性。这是因为 SNP 标记是一种典型的两等位基因标记, 不具有微卫星标记的高多态性特点, 但 SNP 在基因组中广泛存在, 弥补了多态性较低的不足(Emahazion *et al*, 1999; Wang *et al*, 1998)。

3.2 SNP 标记与长吻鲢生长性状的相关性

SNP 标记与长吻鲢生长性状的相关性分析显示, 有 9 个 SNPs 位点和长吻鲢全长显著相关, 表明长吻鲢的全长受多个基因(位点)控制, 存在基因连锁或多因一效的现象, 符合同一数量性状是由多对基因控制的理论(董玉等, 2016; 喻树迅等, 2002)。此外, 本研究选取了与氨基酸代谢、发育、内分泌系统、能量代谢、碳水化合物代谢、细胞生长与死亡和消化系统等相关基因的 SNP, 在最终结果中, 来自氨基酸代谢、发育、内分泌系统、细胞生长与死亡和消化系统相关基因的 6 个 SNPs 位点对长吻鲢体重显著相关, 符合鱼类的生长是由多种生理途径调控的理论(Santis *et al*, 2007)。同时, 本研究中, 10 个 SNPs 位点均与长吻鲢

表 4 长吻鲮 SNPs 位点基因型与生长性状的关联分析及引物信息
 Tab.4 The primer information and correlation analysis between genotypes of SNPs and growth traits of *L. longirostris*

编号 No.	突变碱基 SNP	序列 Primer sequence (5'~3')	分型 Genotype	数目 Number	体重 Body weight/g	全长 Total length/cm	体长 Body length/cm	头高 Head height/cm
Cluster-65_105077	A/G	F: ACGTTGGATGAGAAACCAAGTCCGAACCCAC	GG	39	137.641±42.242 ^a	25.482±2.577 ^a	20.700±2.226 ^a	3.574±0.433 ^a
		R: ACGTTGGATGTGATAAGCCGGTTCGATCC	AG	62	161.995±48.224 ^b	26.932±2.529 ^b	21.616±2.295 ^b	3.718±0.440 ^a
		E: AACCCACCACCACGGTAC	AA	14	165.043±45.777 ^{ab}	26.857±2.195 ^{ab}	21.700±1.693 ^{ab}	3.707±0.446 ^a
Cluster-65_120392	C/T	F: ACGTTGGATGGACATTAACATCCCTGTGCC	CC	20	155.775±45.057 ^{ab}	26.780±2.667 ^a	21.705±2.085 ^a	3.645±0.438 ^a
		R: ACGTTGGATGGTGTCTAAAGTTAGCGTCTCC	TT	15	127.807±44.920 ^a	24.673±2.496 ^b	19.947±2.091 ^b	3.507±0.509 ^a
		E: TGAGCCACCTTTGCGTAAC	TC	66	158.327±45.066 ^b	26.620±2.482 ^a	21.397±2.258 ^a	3.686±0.423 ^a
Cluster-65_137265	G/T	F: ACGTTGGATGAAAGGTGCATGCGTAGAGTG	GT	43	138.214±46.964 ^a	25.465±2.674 ^a	20.495±2.165 ^a	3.549±0.449 ^a
		R: ACGTTGGATGATGATGCTGCTTCTGTATGCC	TT	61	164.256±44.144 ^b	27.080±2.386 ^b	21.979±1.972 ^b	3.749±0.411 ^b
		E: TCCAAAATATCACCCGGACCAT	GG	11	159.955±50.930 ^{ab}	26.609±2.241 ^{ab}	20.845±2.842 ^{ab}	3.682±0.494 ^{ab}
Cluster-65_19497	C/T	F: ACGTTGGATGCTATCGCTCACCTCCTCAG	CT	86	154.512±46.150 ^a	26.513±2.608 ^a	21.402±2.206 ^a	3.676±0.455 ^a
		R: ACGTTGGATGTATGACTGAAGAGCTCGGTG	CC	15	135.087±42.340 ^a	25.067±2.203 ^b	20.033±2.202 ^b	3.520±0.388 ^a
		E: TCTCTCCTGAGAGCTCAGCAGT	TT	9	165.511±36.877 ^a	27.356±2.043 ^a	22.122±1.686 ^a	3.733±0.255 ^a
Cluster-24304_1	T/C	F: ACGTTGGATGCGGTAATGACAGGACCAAAAC	CC	18	143.722±39.081 ^a	25.578±1.943 ^a	20.439±1.956 ^a	3.572±0.468 ^a
		R: ACGTTGGATGCAGATGTGCAGGGTAAGAAC	TC	87	153.584±48.810 ^b	26.408±2.660 ^a	21.340±2.275 ^{ab}	3.671±0.436 ^a
		E: GTGGTCTGTGCTGGAGACC	TT	10	177.350±40.552 ^a	28.170±2.170 ^b	22.680±1.711 ^b	3.810±0.420 ^a
Cluster-65_110382	T/C	F: ACGTTGGATGAACTCTGACCTGATGTCTCC	CC	33	163.209±45.108 ^a	26.748±2.305 ^{ab}	21.670±1.900 ^{ab}	3.770±0.409 ^a
		R: ACGTTGGATGCTTGGCCATGCCACCATTTG	TC	74	147.618±47.763 ^a	26.072±2.679 ^a	20.972±2.358 ^a	3.586±0.441 ^b
		E: TGGCCATCTACATCACACAC	TT	8	176.588±40.496 ^b	28.450±1.645 ^b	23.038±1.272 ^b	4.000±0.334 ^a
Cluster-65_111833	A/G	F: ACGTTGGATGGCCATTCTGATCAGTGTGTG	GG	13	164.677±56.700 ^{ab}	26.785±2.546 ^{ab}	21.262±2.584 ^{ab}	3.746±0.489 ^{ab}
		R: ACGTTGGATGACTTGGCCATGCCACCATTTG	AG	40	139.888±43.220 ^a	25.478±2.482 ^a	20.445±2.136 ^a	3.513±0.401 ^a
		E: CCTGGCCACACCCCAATC	AA	62	161.065±45.994 ^b	26.973±2.510 ^b	21.889±2.066 ^b	3.752±0.433 ^b
Cluster-5592_0	C/T	F: ACGTTGGATGAGTGTGGTGAGACCTTTGAC	CT	56	145.905±45.270 ^a	25.939±2.608 ^a	20.909±2.191 ^a	3.600±0.414 ^a
		R: ACGTTGGATGGCAGCAGTGAACACAACAAC	CC	28	160.579±44.968 ^{ab}	26.593±2.005 ^{ab}	21.404±1.993 ^{ab}	3.718±0.443 ^a
		E: CAGTAGGAGCTTTCATGCACAGAGA	TT	28	168.257±50.247 ^b	27.321±2.764 ^b	22.086±2.363 ^b	3.746±0.467 ^a
Cluster-65_137642	A/G	F: ACGTTGGATGACAGTGGTGAACCCACAA	AA	53	144.709±45.839 ^a	26.040±2.645 ^a	20.974±2.317 ^a	3.581±0.473 ^a
		R: ACGTTGGATGGCGTCACTCCTCGAAATAG	AG	47	157.257±46.915 ^{ab}	26.521±2.498 ^{ab}	21.368±2.143 ^{ab}	3.721±0.418 ^{ab}
		E: AACCAACAACCCAGAGAC	GG	14	184.393±38.275 ^b	27.957±1.823 ^b	22.714±1.509 ^b	3.864±0.259 ^b
Cluster-65_130153	G/T	F: ACGTTGGATGCAGCTCACTGGAACAATAATG	GT	17	139.429±42.790 ^a	25.535±2.255 ^a	20.341±2.186 ^a	3.471±0.409 ^a
		R: ACGTTGGATGGATTAGCCATTTCCACAAAAGG	GG	41	152.153±47.713 ^a	26.278±2.430 ^a	21.273±2.030 ^{ab}	3.654±0.434 ^{ab}
		E: CTTTAAAGCAAAATTACATGCTGTATA	TT	57	159.889±47.111 ^a	26.809±2.732 ^a	21.637±2.336 ^b	3.737±0.440 ^b

注: 同列中不同的小写字母表示差异显著 (P<0.05)。

Note: The different superscript lowercase letters within the same column mean significantly difference at 0.05 level.

表5 长吻鲢10个SNPs位点的特征及注释信息

Tab.5 The features and gene annotation prediction of 10 SNPs of *L. longirostris*

编号 No.	观测杂合度 H_O	期望杂合度 H_E	H-W 平衡 P_{HWE}	多态信息含量 PIC	预测基因名称 Predicted gene name
Cluster-65_105077	0.542	0.477	0.134	0.362	Semaphorin-4C-like
Cluster-65_120392	0.657	0.502	0.001	0.375	G2/mitotic-specific cyclin-B3-like isoform X1
Cluster-65_137265	0.375	0.411	0.330	0.326	Anion exchange protein 2-like isoform X1
Cluster-24304_1	0.758	0.499	0.000	0.374	Collagen alpha-1(VII) chain-like
Cluster-65_110382	0.642	0.477	0.000	0.362	Tyrosine-protein kinase Tec isoform X2
Cluster-65_111833	0.350	0.415	0.085	0.328	Netrin-4-like
Cluster-65_19497	0.781	0.500	0.000	0.374	N-acetylglutamate synthase, mitochondrial
Cluster-5592_0	0.513	0.502	0.817	0.375	Putative ATP-dependent RNA helicase an3-like isoform X1
Cluster-65_137642	0.403	0.448	0.273	0.347	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial
Cluster-65_130153	0.350	0.441	0.024	0.343	6-Phosphofructokinase, liver type-like
均值 Mean	0.537	0.467	0.166	0.357	

2个及以上的生长性状显著相关,例如,3个SNPs位点(*Cluster-65_137265*、*Cluster-65_111833*和*Cluster-65_137642*)对所测量的4个生长性状均有显著影响,表明体重、全长、体长和头高4种生长性状之间存在一定的相关性,这对长吻鲢不同生长性状的间接良种选育具有重要意义(董玉等,2016)。其次,对长吻鲢生长性状的主成分分析结果表明,体重是长吻鲢生长性状的第1主成分,且累计贡献率超过92%,表明直接运用对长吻鲢体重产生显著影响的SNPs位点可以在保证标记准确性的前提下有效节约成本。本研究中对长吻鲢生长性状产生显著影响的SNPs位点有10个,但仅有6个SNPs位点(*Cluster-65_137265*、*Cluster-65_111833*、*Cluster-65_137642*、*Cluster-65_120392*、*Cluster-65_5592_0*和*Cluster-65_105077*)对长吻鲢的体重产生显著性影响,在实际应用中可利用这6个SNPs标记对长吻鲢进行良种选育。

目前,利用SNPs位点与生长性状关联分析发掘与生长相关的基因也得到了应用。在李胜杰等(2018)的研究中,发现*CL1452.Contig9_All-847*标记所处的基因序列与RILP like protein相似,并推测RILP基因是大口黑鲈生长相关的功能基因。本研究中,*Cluster-65_110382*标记所处的基因序列与酪氨酸蛋白激酶Tec亚型X2 (tyrosine-protein kinase Tec isoform X2)相似度最高。钟明贵等(2006)的研究表明,在小鼠(*Mus musculus*)的肝脏中,Tec和Stat3同时发生活化,提示Tec可能参与了HGF介导的Ras-MPAK-REK1/2信号转导途径,从而影响细胞分裂增殖、分化及离散等变化。在本研究中,该标记的TT基因型

在体重、全长、体长和头高的均值均高于TC和CC基因型,表明该标记的突变可能影响了基因表达产物对细胞的分裂增殖的调控,从而调控了长吻鲢的生长。此外,*Cluster-65_137265*、*Cluster-65_111833*和*Cluster-65_137642*位点对所测量的4个生长性状均有显著影响($P<0.05$)。经序列分析发现,*Cluster-65_137265*标记所处的基因序列与羧甲酰磷酸合成酶1 (carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial)相似度最高。研究表明,CPS1编码的线粒体酶能催化氨和碳酸氢盐合成羧甲酰磷酸,在尿素循环中扮演重要的角色(林雅宁,2011)。通过GO分析发现,CPS1富集到机体的尿素循环、氮化合物代谢过程和蛋白水解等生物过程。可能表明*Cluster-65_137265*标记的突变影响了基因表达产物对氨的去除以及对蛋白质水解的调控,从而影响长吻鲢的生长。*Cluster-65_111833*标记所处的基因序列与神经突起导向因子4样(netrin-4-like)相似度最高。研究发现,敲除斑马鱼HT080细胞中的netrin-4后,HT080细胞的增殖能力增强(贾茵,2014),可能表明该基因通过调节细胞的增殖来影响长吻鲢的生长。*Cluster-65_137265*标记所处的基因序列与阴离子交换蛋白2样亚型X1 (anion exchange protein 2-like isoform X1)相似度最高,Pathway network显示SLC4A3的相关途径包括葡萄糖和其他糖类的转运,胆盐和有机酸,金属离子和胺化合物以及肝ABC转运蛋白的转运,可能揭示该基因在长吻鲢中通过参与其他相关途径影响了长吻鲢的生长。推测这4个基因可能是与长吻鲢生长相关的功能基因,对生长发挥调控作用。

参 考 文 献

- BEACHAM T D, LAPOINTE M, CANDY J R, *et al.* DNA in action: Rapid application of DNA variation to sockeye salmon fisheries management. *Conservation Genetics*, 2004, 5(3): 411–416
- BOTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, *et al.* Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics*, 2014, 32: 314–331
- CAO T T, BAI J J, YU L Y, *et al.* Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of carboxypeptidase A1 gene (*CPA1*) segments and their association with the growth traits of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2012, 20(3): 301–307 [曹婷婷, 白俊杰, 于凌云, 等. 草鱼羧肽酶 A1 基因(*CPA1*)部分片段的单核苷酸多态性(SNP)多态性及其与生长性状的关联分析. *农业生物技术学报*, 2012, 20(3): 301–307]
- CHEN X F, YANG G L, YU J H, *et al.* Isolation of *IGF2* gene and correlation of its SNPs with fish sharp and weight gain in GIFT strain Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Chinese Journal of Zoology*, 2010, 45(2): 109–116 [陈雪峰, 杨国梁, 俞菊华, 等. 吉富罗非鱼 *IGF2* 基因分离及其单核苷酸多态性与体型、增重相关性. *动物学杂志*, 2010, 45(2): 109–116]
- DENG N N, WANG R L, XU Z L. A preliminary study on imitating ecological breeding of *Leiocassis longirostris*. *Journal of Aquaculture*, 2018, 39(12): 33–34 [邓楠楠, 王荣林, 徐志良. 长吻鮠仿生态养殖初探. *水产养殖*, 2018, 39(12): 37–38]
- DONG Y, LI Q. Correlation analysis between SNPs and growth traits of *Apostichopus japonicus*. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2016(2): 49–58 [董玉, 李琪. 刺参 SNP 标记与生长性状的关联分析. *海洋湖沼通报*, 2016(2): 49–58]
- EMAZHATION T, JOBS M, HOWELL W M, *et al.* Identification of 167 polymorphisms in 88 genes from candidate neurodegeneration pathways. *Gene*, 1999, 238(2): 315–324
- FENG H, WEN H S, DONG S L, *et al.* Identification of single nucleotide polymorphism cytochrome P450-C19a and its relation to reproductive traits in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 2008, 279(1/2/3/4): 181
- GOMEZ-RAYA L, KLEMETS DAL G. Two-stage selection strategies utilizing marker-quantitative trait locus information and individual performance. *Journal of Animal Science*, 1999, 77(8): 2008
- JIA Y. Roles and mechanism of Netrin4 and Neogenin in fibrosarcoma cell HT1080. Master's Thesis of Xiamen University, 2014 [贾茵. Netrin4 和 Neogenin 在成纤维肉瘤细胞 HT1080 中的作用及其机制探讨. 厦门大学硕士学位论文, 2014]
- KALINOWSKI S T. How many alleles per locus should be used to estimate genetic distances? *Heredity*, 2002, 88(1): 62–65
- LI C. SNPs detection and its association with growth traits in Chinese soft-shell turtle (*Pelodiscus sinensis*). Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2017 [李纯. 中华鳖 SNPs 的筛选及生长性状的关联分析. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2017]
- LI S J, BAI J J, ZHAO L, *et al.* Development of Est-Snps in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) and analysis of their correlation with growth traits. *Marine Fisheries*, 2018, 40(1): 38–46 [李胜杰, 白俊杰, 赵萃, 等. 大口黑鲈 EST-SNP 标记开发及其与生长性状的相关性分析. *海洋渔业*, 2018, 40(1): 38–46]
- LI Z B, WU Y, WANG Y, *et al.* On the SNP technology and its application in crops breeding. *Journal of Liaoning Agricultural College*, 2010(3): 12–13 [李兆波, 吴禹, 王岩, 等. SNP 标记技术及其在农作物育种中的应用. *辽宁农业职业技术学院学报*, 2010(3): 12–13]
- LIANG H, GUO S, LUO X, *et al.* Molecular diagnostic markers of *Tachysurus fulvidraco* and *Leiocassis longirostris* and their hybrids. *SpringerPlus*, 2016, 5(1): 2115
- LIN Y N. Studies on the key genes of the urea cycle induced by aflatoxin B1 and the candidate gene *CPS1*. Master's Thesis of Fujian Agriculture and Forestry University, 2011 [林雅宁. 黄曲霉毒素 B1 致毒中尿素循环关键基因的研究和 *CPS1* 的生物学研究. 福建农林大学硕士研究生学位论文, 2011]
- LIU A R, LIAO M J, LI B, *et al.* Validation of SNPs associated with important economic traits of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(1): 101–109 [刘安然, 廖梅杰, 李彬, 等. 刺参 (*Apostichopus japonicus*) 重要经济性性状相关 SNP 标记的验证分析. *渔业科学进展*, 2019, 40(1): 101–109]
- SANTIS C D, JERRY D R. Candidate growth genes in finfish: Where should we be looking? *Aquaculture*, 2007, 272(1/2/3/4): 22–38
- SHEN T, HE X, LEI M, *et al.* Cloning and structure of a histocompatibility class Iia Gene (Lelo-Daa) in Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris*). *Genes and Genomics*, 2014, 36(6): 745–753
- SHEN T, XU S Y, YANG M, *et al.* Molecular cloning, expression pattern, and 3D structural analysis of the *Mhc* class Iib gene in the Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2011, 141(1/2): 33–45
- SHI L, YUE W B. Advance in single nucleotide polymorphism and its application in livestock. *Livestock and Poultry Industry*, 2007(3): 2–4 [石磊, 岳文斌. SNP 的研究进展及其在家畜育种中的应用. *畜禽业*, 2007(3): 2–4]
- TAO W J, MA L J, RUAN R X, *et al.* SNP loci associated with weight gain on growth hormone receptor genes in *Cyprinus carpio* var. Jian. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, 35(4):

- 622–629 [陶文静, 马龙俊, 阮瑞霞, 等. 建鲤 GHR 基因多态性及与增重相关的 SNP 位点的筛选. 水生生物学报, 2011, 35(4): 622–629]
- VIGNAL A, MILAN D, SANCRISTOBAL M, *et al.* A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution*, 2002, 34(3): 275–275
- WANG C X, LU M X, GAO F Y, *et al.* Screening of single nucleotide polymorphisms (SNPs) related with growth in growth hormone secretagogue receptor gene (GHSR) of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2015, 23(6): 762–771 [王春晓, 卢迈新, 高凤英, 等. 尼罗罗非鱼生长激素促分泌素受体基因 (GHSR) 生长相关单核苷酸多态性 (SNPs) 位点的筛选. 农业生物技术学报, 2015, 23(6): 762–771]
- WANG G D. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*, 1998, 280(5366): 1077–1082
- WANG T, HUANG Z H, MA A J, *et al.* Development and polymorphic analysis of SNP markers in *Scophthalmus maximus* based on transcriptome database. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, 45(6): 1300–1307 [王婷, 黄智慧, 马爱军, 等. 基于转录组数据的大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) SNP 标记开发及多态性分析. 海洋与湖沼, 2014, 45(6): 1300–1307]
- WU Q J. Population ecology of [*Leiocassis longirostris* (Günther)] (Pisces, Bagridae) with reference to the problem of maximum sustained yield. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1975, 5(3): 387–409 [吴清江. 长吻鲶 (*Leiocassis longirostris* (Günther)) 的种群生态学及其最大持续渔获量的研究. 水生生物学集刊, 1975, 5(3): 387–409]
- XIAO M S, XIA H W, MA Y H. Genetic variation of the Chinese longsnout catfish *Leiocassis longirostris* in the Yangtze River revealed using mitochondrial DNA cytochrome B sequences. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(6): 305–313
- YANG G, XIAO M, YU Y, *et al.* Genetic variation at mtDNA and microsatellite loci in Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris*). *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(4): 4605–4617
- YANG Y J, XIANG M B, YE X Y, *et al.* Association analysis between SNP markers and growth-related traits in *Schizothorax prenanti*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(2): 278–285 [杨月静, 向梦斌, 叶祥益, 等. 齐口裂腹鱼 SNP 标记与生长性状的关联分析. 中国水产科学, 2018, 25(2): 278–285]
- YU S X, YUAN Y L. New progress of genetic study on quantitative traits. *Cotton Science*, 2002(3): 180–184 [喻树迅, 袁有禄. 数量性状遗传研究的新进展. 棉花学报, 2002(3): 180–184]
- ZHANG M. Development of SNP markers and their association with growth traits in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2016 [张猛. 草鱼 SNP 标记开发及与生长性状关联分析. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2016]
- ZHONG M G, LI F F, ZHENG H, *et al.* Tissue distribution and signal transduction of Tec tyrosine kinase in rats. *World Chinese Journal of Digestology*, 2006, 14(19): 1874–1877 [钟明贵, 李菲菲, 郑红, 等. Tec 酪氨酸蛋白激酶的大鼠组织分布及参与的信号途径. 世界华人消化杂志, 2006, 14(19): 1874–1877]
- ZHU X, XIE S, WU L, *et al.* Compensatory growth in the Chinese longsnout catfish, *Leiocassis longirostris* following feed deprivation: Temporal patterns in growth, nutrient deposition, feed intake and body composition. *Aquaculture*, 2005, 248(1/2/3/4): 307–314

(编辑 冯小花)

Correlation Analysis of SNP Markers and Growth Traits of *Leiocassis longirostris*

LI Zhe¹, LI Yu¹, JING Tingsen¹, LIU Xiaoli¹, YAN Huiguo¹,
LU Anshuai¹, ZHOU Jian², LUO Hui¹, YE Hua¹①

(1. Fisheries Breeding and Healthy Cultivation Research Centre, Southwest University, Chongqing 402460, China;
2. Fisheries Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu, Sichuan 611731, China)

Abstract In this study, a correlation analysis of 57 single nucleotide polymorphism (SNP) markers and growth-related traits of *Leiocassis longirostris* was conducted using 115 samples under the same growth conditions. The results showed that 10 loci were related to growth-related traits. Among them, three (cluster-65_137265, cluster-65_111833, and cluster-65_137642) loci had a significant influence on growth-related traits (body weight, total length, body length, and head height) ($P < 0.05$). Cluster-65_120392, cluster-65_105077, and cluster-65_5592_0 had significant influences on body weight, total length, and body length ($P < 0.05$). Cluster-65_110382 significantly influenced total length, body length, and head height ($P < 0.05$). Cluster-65_19497 and cluster-24304_1 had a significant influence on the total length and body length ($P < 0.05$). Cluster-65_130153 significantly influenced body length and head height ($P < 0.05$). We also estimated the genetic diversity parameters for the 10 loci. The mean observed heterozygosity, expected heterozygosity, and the polymorphism information content (PIC) were 0.537, 0.467, and 0.357, respectively. In addition, cluster-65_137265, cluster-65_111833, cluster-65_110382, and cluster-65_137642 were associated with anion exchange protein 2-like isoform X1, Netrin-4-like, Tec isoform X2, anion exchange protein 2-like isoform X1, and carbamoyl-phosphate synthase [ammonia] have the highest similarity, respectively. This finding indicates that these four genes may be involved in the regulation of *L. longirostris* growth. The study provides primary data for the genetic improvement and selective breeding of *L. longirostris*.

Key words *Leiocassis longirostris*; SNP markers; Growth traits; Correlation analysis

① Corresponding author: YE Hua, E-mail: yhlh2000@126.com