

文章编号: 1000-0615(2018)11-1684-09

DOI: 10.11964/jfc.20171010987

基于转录组测序的大口黑鲈驯食相关SNP开发及其与生长性状的关联分析

马冬梅*, 全迎春, 樊佳佳, 胡婕, 白俊杰*, 刘浩

(中国水产科学研究院珠江水产研究所,
农业部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室, 广东广州 510380)

摘要: 大口黑鲈为肉食性鱼类, 传统养殖过程中使用大量的冰鲜鱼为饵料, 冰鲜鱼的使用不仅增加了养殖成本, 而且多余的冰鲜鱼残饵还会给环境带来严重的污染。为了保护环境并降低养殖成本必须减少冰鲜鱼的使用量, 本实验以选育适合人工配合饲料饲喂大口黑鲈为研究目标, 用人工配合饲料作为饵料驯化大口黑鲈幼鱼, 在驯食后14和16 d, 测定其体质量、全长、体高等生长指标。同时在大口黑鲈转录组测序分析获得的SNP位点中, 选择其所在序列的基因功能与能量代谢有相关性的7个SNP位点进行SNaPshot分型, 用SPSS 19.0进行卡方分析标记与生长性状的相关性。结果发现, 序列Unigene 031044中的C1332G位点、Unigene085384中的A741G位点和Unigene022319中的A284G位点在体质量、全长及体高性状上存在显著差异。这3个SNP位点所在的基因经预测分别与雌二醇17 β 脱氢酶12B (*hsd17b12b*)基因、长链酰基辅酶A合成酶家族成员1(*acs1l*)基因和琥珀酸脱氢酶组装因子2(*sdhaf2*)基因具有很高的同源性, 推测上述3个SNP位点的变异可能影响了基因表达产物对脂肪酸代谢或三羧酸循环的调节功能, 与大口黑鲈对人工配合饲料的利用能力存在密切的相关性。本研究筛选得到的与驯食相关的SNP位点为大口黑鲈功能基因多态性的进一步研究, 及加快大口黑鲈食性改良与驯化育种的遗传研究提供了科学的参考依据。

关键词: 大口黑鲈; 单核苷酸多态(SNPs); 转录组测序(RNA-Seq); 人工配合饲料; 驯食; 生长性状

中图分类号: Q 785; S 965.211

文献标志码: A

大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)是一种淡水的广温性肉食性鱼类。从20世纪80年代开始广泛在珠江三角洲地区开展养殖生产, 在“十二五”期间已成为我国重要的淡水养殖品种之一。目前许多省市均有养殖, 年总产量达34万t^[1]。但由于大口黑鲈为肉食性鱼类, 在养殖过程中需要利用冰鲜鱼作为饲料的主要蛋白源, 而冰鲜鱼只能依靠海洋捕捞加工, 随着对海洋资源的过度开发, 冰鲜鱼的供应量日趋紧张^[2], 且在储存过

程中容易腐败产生生物胺等有毒有害物质^[3], 比投喂人工饲料产生更多的有机污染物^[4]。另一方面, 对养殖户来说, 冰鲜鱼投喂的前处理需花费更多的人力, “以鱼养鱼”的养殖模式亟待改变。以人工饲料代替冰鲜鱼一直是大口黑鲈养殖产业中需要解决的问题之一, 要解决这一问题, 一方面要开发适合大口黑鲈的优良配合饲料^[5], 另一方面要选育与之相适应的生长快、品质优的适合食人工配合饲料的新品种^[6]。

收稿日期: 2017-10-01 修回日期: 2017-12-05

资助项目: 中国水产科学研究院基本科研业务费专项(2017HY-ZC04);国家自然科学基金(31001107);广东省公益研究与能力建设专项(2017A0303002)

通信作者: 马冬梅, E-mail: mdm@prfri.ac.cn; 白俊杰, E-mail: jjbai@163.net

第二代测序技术的出现和快速发展, 使得利用高通量测序的方法快速高效地筛选SNPs成为可能^[7]。利用RNA-Seq (RNA sequencing)技术对喂食冰鲜鱼和配合饲料的2组大口黑鲈的转录组进行高通量测序, 共获得8 681个SNPs (single nucleotide polymorphisms)标记^[8], 通过对测得序列的注释和表达量的分析初步筛选潜在的与大口黑鲈驯食和利用人工配合饲料难易程度相关的SNP位点, 可作为适合饲喂人工配合饲料大口黑鲈新品种育种的候选标记。

本实践通过分析从仔鱼到稚幼鱼这个食性转化期(即从摄食天然活体饵料转为摄食人工配合饲料2周后的鱼苗)大口黑鲈的生长性状指标, 分析这些性状与7个来自转录组测序的SNPs标记的相关性, 以期找到与驯食相关的优势基因和基因型, 用于大口黑鲈品种与饲料的配套优选, 有利于在可控环境中生产高品质大口黑鲈产品, 从而促进大口黑鲈养殖产业发展。

1 材料与方法

1.1 实验鱼及其驯食情况的统计分析

实验在中国水产科学研究院珠江水产研究所高要基地进行, 驯食选育组的幼鱼为适合食人工配合饲料选育大口黑鲈F₂幼鱼, 适合饲喂人工配合饲料鱼的选育方法为基础群体在幼鱼期经过驯食人工配合饲料后, 一直投喂饲料长至成鱼, 选择群体中生长速度快, 无畸形的个体作为亲本, 选择强度为10%。按照此方法选择大口黑鲈F₁作为亲本, 按照1:1配组, 人工催产繁殖, 繁殖得到的F₂。大口黑鲈F₂幼鱼从鱼苗开口第1个星期, 每天喂4次轮虫, 逐日有所增加; 1星期后加喂剑水蚤; 10 d后又加入少量水蚯蚓, 减少剑水蚤; 20 d后当鱼苗平均全长2.5 cm时, 在水蚯蚓团中混入少量鲜鱼浆, 以后逐日增加鲜鱼浆比例, 直至全部使用鱼浆为止; 大约需10 d, 随机选择鱼苗(全长3.5 cm)进行驯食试验, 分为3组: ①未经过食性选育的大口黑鲈“优鲈1号”(简称未选育组 I); ②本研究团队进行驯食选育的大口黑鲈F₂(2个平行实验组, 简称选育组 II、III)。3组鱼苗各1万尾, 分3个网箱, 进行驯食人工配合饲料。具体驯食过程: 鲜鱼浆→4/5鲜鱼浆+1/5人工饲料(3 d)→3/5鲜鱼浆+2/5人工饲料(3 d)→2/5鲜鱼浆+3/5人工饲料(3 d)→1/5鲜鱼浆+4/5人工饲料(3 d)→人工饲料, 每日投喂

4次, 喂食至鱼不再抢食为止。为了提高试验的准确性, 分别在驯食后14和16 d的早上, 在喂食后每组随机取鱼苗各100尾左右, 测体质量、全长、体高等生长指标。同时, 剪鳍条样品, 70%酒精保存备用。

1.2 转录组SNPs分子标记获得

采用前期通过RNA-Seq技术获得的与大口黑鲈食性及生长相关的转录组测序数据^[8], 通过软件筛选、随机群体验证获得7个在不同食性处理组间具有表达差异的SNPs位点, 分别为Unigene-022436的C297T、Unigene031044的C1332G、Unigene049173的A1334G、Unigene053128的A1995G、Unigene085384的A741G、Unigene022319的A284G和Unigene059323的C604G。

1.3 基因组DNA提取

鳍条样本的基因组DNA抽提采用天根生化科技(北京)有限公司的“血液/细胞/组织基因组DNA提取试剂盒”, 提取方法参考试剂盒说明书。用0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测DNA的完整性和纯度并用紫外分光光度计估计其浓度, 用无菌双蒸水稀释至浓度为50 ng/L, -20 °C保存备用。

1.4 驯食样本的统计分析

用SPSS 19.0软件统计分析各组样本生长指标的平均值与标准误, 进行多重比较, 评价仔鱼驯食后在生长上是否具有显著差异, 以评价3组鱼驯食的难易程度。

1.5 SNPs分型

取驯食选育组样本中体质量极大与极小个体各60尾以上, 利用混合群体分组分析法(bulked segregate analysis, BSA), 组成BSA群体, 进行SNaPshot分型, 进一步分析其生长性状与SNPs标记的相关性。SNaPshot分型的方法, 首先是根据SNP位点上下游的序列设计引物, 长度在200~500 bp, 用于含有SNP目的片段的扩增, 用多重PCR的方法对模板进行扩增, 反应程序采用Touch-down方法, 95 °C预变性3 min; 94 °C变性15 s, 60 °C退火15 s, 72 °C延伸30 s, 11个循环, 每个循环的退火温度降0.5 °C; 然后进入下一个循环程序, 94 °C变性15 s, 54 °C退火15 s, 72 °C延伸30 s, 24个循环; 最后72 °C延伸3 min。将扩增到的目的片段用ExoI和FastAP进行纯化, 去除反应产物中的剩余引物和dNTP。用SNaP-

shot试剂盒(ABI公司, 美国)中的SNAPSHOT Mix试剂与纯化后的PCR产物混合, 对PCR产物进行延伸反应, 延伸引物的设计是在SNP位点的上游或是反向的下游位置, 延伸产物温度变性后在ABI 3730全自动测序仪上进行测序。

1.6 SNPs与生长性状的关联分析

统计时采用SPSS 19.0软件的一般线性模型(general linear model, GLM)中的多元方差分析(multivariate)进行基因型与数量性状的相关性分析。其中, SNPs位点的不同基因型为固定因子(F), 体质量、全长、体高等生长性状为因变量(D), 进行不同标记基因型之间数量性状指标差异显著性检验, 并进行最小显著差法(least-significant difference, LSD)的多重比较, 进而分析等位基因的效应。

2 结果

2.1 大口黑鲈样本的驯食结果分析

驯食结束后随机抽样, 共计检测大口黑鲈幼鱼573尾(平均体质量为1.20 g), 测量体质量、全长、体高等生长指标, SPSS 19.0软件统计分析均值与标准误, 并进行多重比较, 并做成箱状图(图1), 结果发现, 在驯食开始后的14和16 d选育组体质量、全长和体高均比未选育组高, 并存在显著($P \leq 0.05$)或极显著($P \leq 0.01$)差异, 说明本研究团队的食性选育组在驯食效果上显著优于未选育的大口黑鲈。

2.2 驯食样本的性状与SNPs标记的关联分析

由驯食选育组样本中体质量极大与极小个体129尾鱼组成的BSA群体, 经SNAPshot分型, SPSS 19.0进行方差分析与多重比较结果表明, 大口黑鲈幼鱼的体质量、全长及体高与3个SNPs位点的基因型存在显著($P \leq 0.05$)或极显著相关性($P \leq 0.01$)(表1)。

在Unigene031044的C1332G位点, GG为优势基因型, 其次为CC基因型, CG为劣势基因型, 且GG基因型在体质量与全长上显著优于CG基因型, 在体高上GG基因型极显著的优于CG基因型。

在Unigene085384的A741G位点, AA为优势基因型, 其次为AG基因型, GG为劣势基因型, 且AA基因型在体质量与体高上显著优于GG基因型, 在全长上则AA基因型显著优于AG和GG基因型。

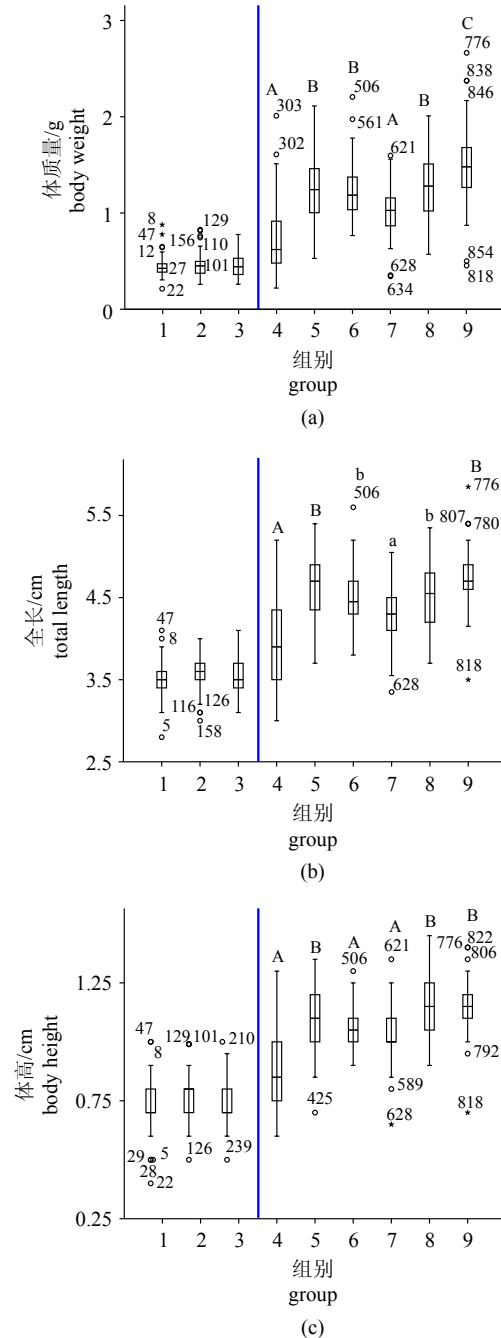


图1 驯食人工配合饲料对驯食选育组与非驯食选育组大口黑鲈体质量、全长和体高的影响
横坐标1~3, 代表3个未选育组, 4~6和7~9, 代表平行的2个选育组; 不同小写字母代表差异显著($P \leq 0.05$), 不同大写字母代表差异极显著($P \leq 0.01$)

Fig. 1 The effects of formulated feed on the body weight, total length and body height of largemouth bass between breeding groups and non-breeding group

The numbers of 1-3 indicate non-breeding group, 4-6 and 7-9 mean parallel two breeding groups. The different superscript lowercase letters within a panel indicate significant difference ($P \leq 0.05$) and the different superscript capital letters show highly significant difference ($P \leq 0.01$)

表 1 SNPs位点与生长性状的相关关系

Tab. 1 Correlation analysis between SNPs and growth traits

SNP-ID	基因型 genotype	数目 number	体质量/g body weight	全长/cm total length	体高/cm body height
Unigene022436 C297T	CC	26	1.172 0±0.443 0	4.366 7±0.570 1	1.032 0±0.195 0
	CT	70	1.223 0±0.438 0	4.458 2±0.521 6	1.087 0±0.193 0
	TT	33	1.335 0±0.412 0	4.572 4±0.512 1	1.107 0±0.174 0
Unigene031044 C1332G	CC	9	1.278 6±0.251 8 ^{ab}	4.494 3±0.322 3 ^{ab}	1.135 7±0.149 2 ^{ABb}
	CG	31	1.123 5±0.473 6 ^a	4.335 4±0.587 1 ^a	0.980 0±0.178 0 ^{Aa}
	GG	89	1.290 1±0.412 9 ^b	4.530 8±0.498 8 ^b	1.115 5±0.179 4 ^{Bb}
Unigene049173 A1334G	AA	30	1.217 6±0.458 1	4.395 8±0.554 6	1.070 5±0.208 5
	AG	62	1.299 7±0.422 1	4.557 2±0.504 8	1.111 2±0.185 2
	GG	37	1.196 2±0.395 0	4.430 0±0.493 2	1.064 8±0.162 2
Unigene053128 A1995G	AA	15	1.403 3±0.387 5	4.640 0±0.368 8	1.142 9±0.139 7
	AG	58	1.326 1±0.437 3	4.582 3±0.545 1	1.108 7±0.193 6
	GG	56	1.227 0±0.388 3	4.462 2±0.455 9	1.089 7±0.168 3
Unigene085384 A741G	AA	14	1.529 2±0.202 3 ^a	4.872 2±0.255 1 ^a	1.250 0±0.040 8 ^a
	AG	36	1.298 2±0.350 7 ^{ab}	4.530 8±0.413 5 ^b	1.102 0±0.155 1 ^{ab}
	GG	79	1.259 6±0.451 1 ^b	4.496 8±0.533 2 ^b	1.088 1±0.191 9 ^b
Unigene022319 A284G	AA	51	1.307 9±0.388 3 ^{ab}	4.585 4±0.468 4 ^a	1.108 3±0.192 9 ^a
	AG	56	1.316 6±0.411 1 ^a	4.553 1±0.467 2 ^a	1.128 3±0.149 7 ^a
	GG	22	1.047 1±0.396 1 ^b	4.240 0±0.533 3 ^b	0.996 4±0.171 5 ^b
Unigene059323 A604G	CC	35	1.282 4±0.444 7	4.514 0±0.500 5	1.102 2±0.193 9
	CG	61	1.314 6±0.357 1	4.555 7±0.446 5	1.110 5±0.166 7
	GG	33	1.202 8±0.483 3	4.450 0±0.555 7	1.078 1±0.184 4

注: 上标为平均值的差异显著性(最小显著差数法, LSD), 同一列数值中, 上标含相同字母表示2种基因型之间差异不显著($P>0.05$), 不同小写字母代表差异显著($P\leq 0.05$), 不同大写字母代表差异极显著($P\leq 0.01$)

Notes: the superscript letters indicates the significant of the difference analysis (Least significant difference, LSD) Within a column, the same superscript letters indicate no significant difference ($P>0.05$); the different superscript lowercase letters within a column indicate significant difference ($P\leq 0.05$) and the different superscript capital letters show highly significant difference ($P\leq 0.01$)

在Unigene022319的A284G位点, AG为优势基因型, 其次为AA基因型, GG为劣势基因型, 且AG基因型在体质量上显著优于GG基因型, 在全长和体高上AA和AG基因型显著优于GG基因型, AA与AG基因型之间不存在显著差异。

2.3 驯食相关SNP及其所在基因的序列分析

通过NCBI在线的BLAST和ORFfinder分析, 显示Unigene031044的C1332G、Unigene085384的A741G和Unigene022319的A284G这3个位点的碱基突变并未改变编码的氨基酸序列(表2)。有学者推测这种同义突变的SNPs可能影响mRNA

的剪切从而会影响蛋白质的功能^[9]。对Unigene进行BLAST序列比对结果表明, Unigene0031044推测的氨基酸序列与尖吻鲈(*Lates calcarifer*)、深裂眶锯雀鲷(*Stegastes partitus*)、多刺棘光鳃鲷(*Acanthochromis polyacanthus*)和贝氏隆头鱼(*Labrus bergylta*)的雌二醇17 β 脱氢酶12B氨基酸序列(Hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 12-B, HSD17B12B)同源性均在90%以上(图2-a), 该酶与必需长链脂肪酸的延伸反应相关; Unigene085384推测的氨基酸序列与深裂眶锯雀鲷、高体鲷(*Seriola dumerili*)、贝氏隆头鱼和尖吻鲈的酰基辅酶A合成酶长链家族成员1(Acyl-CoA synthetase

表 2 与SNP基因型相对应个体的生长性状的差异显著性分析

Tab. 2 Significant difference analysis of the growth traits corresponding to the SNP genotypes

SNP-ID	基因型 genotype	P值 P value		
		体质量/g body weight	全长/cm total length	体高/cm body height
Unigene022436 C297T	CC-CT	0.646	0.507	0.309
	CT-TT	0.344	0.499	0.685
	TT-CC	0.261	0.250	0.238
Unigene031044 C1332G	CC-CG	0.235	0.278	0.060
	CG-GG	0.032	0.034	0.005
	GG-CC	0.947	0.870	0.785
Unigene049173 A1334G	AA-AG	0.370	0.183	0.413
	AG-GG	0.230	0.245	0.319
	GG-AA	0.840	0.825	0.919
Unigene053128 A1995G	AA-AG	0.816	0.976	0.656
	AG-GG	0.248	0.285	0.645
	GG-AA	0.399	0.590	0.494
Unigene085384 A741G	AA-AG	0.070	0.048	0.064
	AG-GG	0.629	0.732	0.754
	GG-AA	0.027	0.021	0.030
Unigene022319 A284G	AA-AG	0.603	0.963	0.626
	AG-GG	0.039	0.049	0.020
	GG-AA	0.100	0.061	0.055
Unigene059323 C604G	CC-CG	0.957	0.883	0.868
	CG-GG	0.313	0.444	0.567
	GG-CC	0.387	0.567	0.701

注：黑体数值表示2种基因型之间具有显著($P \leq 0.05$)或极显著差异($P \leq 0.01$)，其他数值表示两种基因型之间差异不显著($P > 0.05$)

Notes: numbers in bold means significant difference ($P \leq 0.05$) or highly significant difference ($P \leq 0.01$) between the two genotypes, and numbers without bold means no significant difference ($P > 0.05$)

long-chain family member 1, ACSL1)同源性均在88%以上(图2-b)，该酶在生物体脂肪代谢中起着重要作用；Unigene022319推测的氨基酸序列与高体鲈、多刺棘光鳃鲷、尖吻鲈和大黄鱼(*Larimichthys crocea*)的琥珀酸脱氢酶组装因子2(Succinate dehydrogenase complex assembly factor 2, SDHAF2)同源性均在90%以上(图2-c)，该因子可调节琥珀酸脱氢酶的合成与稳定。

3 讨论

大口黑鲈为肉食性鱼类，有种内相食的习性，选育在驯食人工配合饲料这一阶段能快速

生长的鱼可提高其存活率，并可为其在接下来继续用人工配合饲料喂食的养殖条件下能快速生长奠定良好的基础。通过分子标记定向选育易驯食大口黑鲈并使用人工配合饲料大规模养殖，可以有效解决大口黑鲈养殖中食用冰鲜鱼而对资源造成破坏、投喂后水体污染严重、病害多发等问题，具有广泛的应用前景。本实验通过比较饲喂人工配合饲料选育组和未选育组鱼在驯食时间段的体质量、全长和体高的变化，发现选育组鱼在驯食人工配合饲料时生长速度的均值比未选育组大，并存在显著或极显著差异，说明本研究团队经过人工配合饲料食

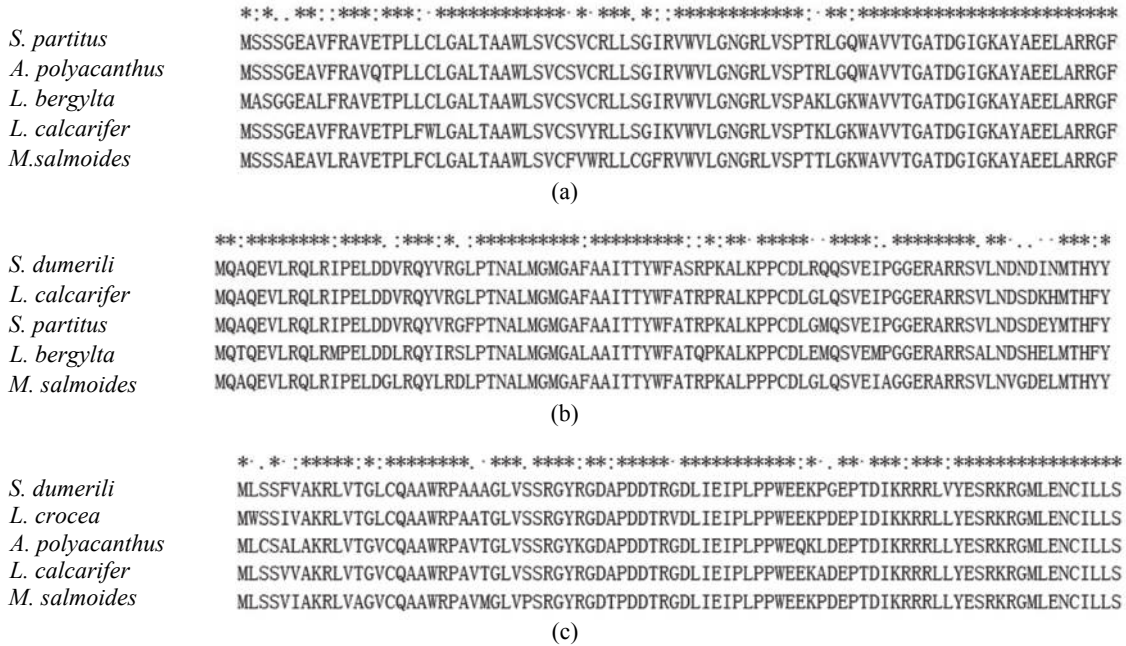


图 2 SNP位点所在Unigene序列推测的部分氨基酸序列比对图

(a)Unigene0031044推测的部分氨基酸序列与4种鱼类的HSD17B12B比对图; (b)Unigene085384推测的部分氨基酸序列与4种鱼类的ACSL1比对图; (c)Unigene022319推测的部分氨基酸序列与4种鱼类的SDHAF2比对图; 星号表示相同的氨基酸残基

Fig. 2 Multiple alignment of partial predicted amino acid sequences from the unigenes with the SNPs

(a)multiple alignment of partial predicted amino acid sequences of unigene0031044 and HSD17B12B from four teleosts; (b)multiple alignment of partial predicted amino acid sequences of unigene085384 and ACSL1 from four teleosts; (c)multiple alignment of partial predicted amino acid sequences of unigene022319 and SDHAF2 from four teleosts; identical amino acid residues in all sequences are marked with star

性改良选育的大口黑鲈F₂比未经过食性选育大口黑鲈更易适应人工配合饲料, 在幼鱼驯食工人饲料时能较快速生长。

本研究对已测得的大口黑鲈转录组数据进行深入挖掘, 从潜在的与其喂食人工配合饲料后表达有差异且与代谢相关的基因序列中找到7个具有SNP位点的基因序列, 对一个来自于选育组BSA群体中的样本进行SNaPshot分型, 结果7个SNPs中的3个位点与体质量、全长和体高性状显著相关, 推测这3个SNPs位点所在基因(unigene031044、unigene085384和unigene022319)与大口黑鲈吸收和利用人工配合饲料能力存在相关。其中Unigene031044的C1332G SNP位点所在的基因序列经比对预测为雌二醇17β脱氢酶12B基因(hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 12-B, hsd17b12b), 编码的蛋白对于雌二醇的生物合成至关重要^[10], 另外该基因参与了必需长链脂肪酸的合成反应^[11]。在医学方面的研究表明, 其基因序列的SNP多态性与子宫内膜异位和乳腺癌的发生率有显著相关性^[12-13]。对人类非酒精性脂肪性

肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)的研究表明, 该病的特征是脂肪颗粒在肝细胞中的大量积累, 而hsd17b13基因编码的蛋白与脂肪粒形成密切相关^[14]。有研究表明, 在喂食人工配合饲料的大口黑鲈成鱼群体中, 该SNP位点与成鱼的生长性状之间存在显著的相关性^[8]。本实验发现, hsd17b12b基因与大口黑鲈幼鱼对人工配合饲料的适应能力也有相关性, 进一步证实了该SNP位点具有影响大口黑鲈适应人工配合饲料的能力。推测大口黑鲈hsd17b12b基因的SNP可能引起不同基因型个体之间的基因表达水平差异, 从而造成了不同个体之间对人工配合饲料的适应能力的差异。

Unigene085384的A-741G位点所在的基因序列经比对预测为长链脂酰辅酶A合成酶1基因(Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1, acs11), 该酶以长链脂肪酸、辅酶A (CoA)和ATP作为底物, 催化合成长链脂酰辅酶A酯, 通过调节脂肪酸的酯化反应, 进而调控整个机体脂肪酸代谢^[15-16]。人(Homo sapiens)的acs11基因中

的SNPs与空腹血糖水平、糖尿病、亚临床动脉硬化存在相关性^[17]。在猪(*Sus scrofa*)*acs11*基因的5'侧翼区有4个SNP位点,可以作为区分猪不同品系的标志,且与不同品系猪的脂肪沉积能力及肉质有相关性^[18]。有研究表明,文蛤(*Meretrix meretrix*)*acs11*基因中的5个SNP位点与文蛤的生长性状显著相关^[19]。*acs11*基因在鱼类中也已经有研究报道,在斑马鱼(*Danio rerio*)^[19]和草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)中都发现有2个*acs11*同源基因*acs11a*和*acs11b*,且草鱼在投喂鱼油含量为3%、6%和9%实验组与对照组相比,*acs11*基因mRNA在鱼体内的表达量水平显著降低^[20]。但对鱼类*acs11*基因的SNP研究还较少,本研究中发现*acs11*基因中的SNPs与大口黑鲈的驯食性状具有相关性,推测该SNP位点通过对饲喂人工配合饲料大口黑鲈的脂肪代谢进行调节,从而实现对幼儿生长的影响。

Unigene022319的A284G位点所在基因序列经比对预测为琥珀酸脱氢酶组装因子2基因(*Succinate dehydrogenase complex assembly factor 2, sdhaf2*),琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase,简称SDH)作为参与三羧酸循环的关键酶,是连接氧化磷酸化与电子传递的枢纽之一。琥珀酸脱氢酶组装因子2对于SDH的组装和稳定性起到至关重要的作用。*sdhaf2*基因的SNP与遗传性副神经节瘤综合征有显著的相关性^[21-22]。但目前对鱼类*sdhaf2*基因中SNP的研究目前还未见报道,本实验发现了*sdhaf2*基因上的SNP位点与驯食人工配合饲料大口黑鲈幼鱼的生长具有显著的相关性,推测该SNP位点可能通过对*sdhaf2*基因或其上下游基因表达的调控从而实现SDH酶合成或活性的调节,从而影响三羧酸循环的反应效率,进而影响鱼对饲料的利用能力。

本研究表明,3个SNP位点与食性转化期喂食人工配合饲料幼鱼的生长速度相关,可以作为大口黑鲈易驯食人工配合饲料和大口黑鲈生长相关的分子标记,用于大口黑鲈的分子辅助育种选择。

参考文献:

- [1] 农业部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴2014[M]. 北京: 中国农业出版社, 2014.
Fisheries and Fisheries Administration Bureau of the Ministry of Agriculture. Chinese fishery statistical year-book 2014[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2014(in Chinese).
- [2] 雷霖霖. 中国海水养殖大产业架构的战略思考[J]. 中国水产科学, 2010, 17(3): 600-609.
Lei J L. Strategy consideration for industry construction of Chinese marine culture[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(3): 600-609(in Chinese).
- [3] Babji Y, Murthy T R K, Anjaneyulu A S R. Microbial and sensory quality changes in refrigerated minced goat meat stored under vacuum and in air[J]. *Small Ruminant Research*, 2000, 36(1): 75-84.
- [4] 王广军, 吴锐全, 谢骏, 等. 大口黑鲈投喂两种不同饲料对水质指标的影响[J]. 水产学杂志, 2009, 22(1): 35-37, 46.
Wang G J, Wu R Q, Xie J, et al. Effects of feeding two kinds of feed on the water quality in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) aquarium[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2009, 22(1): 35-37, 46(in Chinese).
- [5] Krishnankutty N. Plant proteins in fish feed: An additional analysis[J]. *Current Science*, 2005, 89(6): 934-936.
- [6] Overturf K, Bullock D, LaPatra S, et al. Genetic selection and molecular analysis of domesticated rainbow trout for enhanced growth on alternative diet sources[J]. *Environmental Biology of Fishes*, 2004, 69(1-4): 409-418.
- [7] Al-Shahib A, Underwood A. Snp-search: Simple processing, manipulation and searching of SNPs from high-throughput sequencing[J]. *BMC Bioinformatics*, 2013, 14: 326.
- [8] 全迎春, 马冬梅, 白俊杰, 等. 大口黑鲈转录组SNPs筛选及其与生长的关联分析[J]. *水生生物学报*, 2016, 40(6): 1128-1134.
Quan Y C, Ma D M, Bai J J, et al. SNPs identification in RNA-SEQ data of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) fed on formulated feed and association analysis with growth trait[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, 40(6): 1128-1134(in Chinese).
- [9] 李延恩, 周艳红. SNP功能分析的生物信息学方法及其资源[J]. 计算机仿真, 2007, 24(4): 297-300.
Li Y E, Zhou Y H. Bioinformatics methods and resources for SNP functional analysis[J]. Computer Simulation, 2007, 24(4): 297-300(in Chinese).
- [10] Luu-The V, Tremblay P, Labrie F. Characterization of

- type 1217 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, an isoform of type 317 β -hydroxysteroid dehydrogenase responsible for estradiol formation in women[J]. *Molecular Endocrinology*, 2006, 20(2): 437-443.
- [11] Moon Y A, Horton J D, Identification of two mammalian reductases involved in the two-carbon fatty acyl elongation cascade[J]. Identification of two mammalian reductases involved in the two-carbon fatty acyl elongation cascade[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(9): 7335-7343.
- [12] Tsuchiya M, Nakao H, Katoh T, *et al.* Association between endometriosis and genetic polymorphisms of the estradiol-synthesizing enzyme genes *HSD17B1* and *CYP19*[J]. *Human Reproduction*, 2005, 20(4): 974-978.
- [13] Plourde M, Ferland A, Soucy P, *et al.* Analysis of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase types 5, 7, and 12 genetic sequence variants in breast cancer cases from French Canadian Families with high risk of breast and ovarian cancer[J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 116(3): 134-153.
- [14] Su W, Wang Y, Jia X, *et al.* Comparative proteomic study reveals 17 β -HSD13 as a pathogenic protein in non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 2014, 111(31): 11437-11442.
- [15] Soupene E, Kuypers F A. Multiple erythroid isoforms of human long-chain acyl-CoA synthetases are produced by switch of the fatty acid gate domains[J]. *BMC Molecular Biology*, 2006, 7: 21.
- [16] 李庆岗, 陶著, 杨玉增, 等. 长链脂酰CoA合成酶(ACSL)的研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2012, 39(6): 137-140.
- [17] Li Q G, Tao Z, Yang Y Z, *et al.* Research progress of long chain Acyl-CoA synthetase[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2012, 39(6): 137-140(in Chinese).
- [18] Manichaikul A, Wang X Q, Zhao W, *et al.* Genetic association of long-chain acyl-CoA synthetase 1 variants with fasting glucose, diabetes, and subclinical atherosclerosis[J]. *Journal of Lipid Research*, 2016, 57(3): 433-442.
- [19] Li Q G, Tao Z, Shi L H, *et al.* Expression and genome polymorphism of *ACSL1* gene in different pig breeds[J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(9): 8787-8792.
- [20] Lopes-Marques M, Cunha I, Reis-Henriques M A, *et al.* Diversity and history of the long-chain acyl-CoA synthetase (*Acs1*) gene family in vertebrates[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2013, 13: 271.
- [21] Cheng H L, Chen S, Xu J H, *et al.* Molecular cloning and nutrient regulation analysis of long chain acyl-CoA synthetase 1 gene in grass carp, *Ctenopharyngodon idella* L[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, 204: 61-68.
- [22] Hao H X, Khalimonchuk O, Schraders M, *et al.* *SDH5*, a gene required for flavination of succinate dehydrogenase, is mutated in paraganglioma[J]. *Science*, 2009, 325(5944): 1139-1142.
- [23] Bayley J P, Kunst H P M, Cascon A, *et al.* *SDHAF2* mutations in familial and sporadic paraganglioma and pheochromocytoma[J]. *The Lancet Oncology*, 2010, 11(4): 366-372.

Development of SNPs related to bait domestication based on largemouth bass (*Micropterus salmoides*) transcriptome and association analysis with growth traits

MA Dongmei^{*}, QUAN Yingchun, FAN Jiajia, HU Jie, BAI Junjie^{*}, LIU Hao

(Key Laboratory of Tropical and Subtropical Fish Breeding and Cultivation, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

Abstract: *Micropterus salmoides* is a species of carnivorous teleost. Annually, a large amount of forage fish were used as food for *M. salmoides*. The residual forage fish not only increase the culture costs, but also pollute environment seriously. In order to protect the environment and cut down culture costs, it is necessary to breed the strain which can digest and absorb formulated feed efficiently to reduce the utilization of forage fish. In this study, for promoting selective breeding of the *M. salmoides* strain suitable for formulated feeds, bait domestication was carried out in juvenile *M. salmoides* of breeding group and non-breeding group. On the 14th day and the 16th day after bait domestication, the growth traits including body weight, total length and body height were measured. At the same time, seven candidate Unigenes related to energy metabolism with SNPs were selected from the transcriptome of *M. salmoides*. The SNP sites were genotyped by using of SNaPshot in a bulked segregate analysis (BSA) population with 129 minimax individuals, and the association analysis between genotypes and growth traits were detected. After analysis by using of SPSS 19.0 software, the results showed that, among the seven SNP sites, C1332G in Unigene031044, A741G in Unigene085384, A284G in Unigene022319, were significantly associated with body weight, full length and body height. By BLAST analysis, Unigene031044, Unigene085384 and Unigene022319 were predicted as *hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 12-B (hsd17b12b)*, *Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1 (acsl1)* and *Succinate dehydrogenase complex assembly factor 2 (sdhaf2)*. The results indicated that the SNP sites in above three genes probably play the roles of regulating lipid metabolism and three carboxylic acid cycle, and help *M. salmoides* to improve the capacity to digest, absorb and utilize formulated feed. The current three SNPs can be used as candidate markers for breeding *M. salmoides* suitable for formulated feeds.

Key words: *Micropterus salmoides*; single nucleotide polymorphisms (SNPs); RNA sequencing (RNA-Seq); formulated feed; bait domestication; growth trait

Corresponding author: MA Dongmei. E-mail: mdm@prfri.ac.cn; BAI Junjie. E-mail: jjbai@163.net

Funding projects: Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2017HY-ZC04); National Natural Science Foundation of China (31001107); Special Fund for Scientific Research in Public Welfare and Capacity Building of Guangdong Province (2017A030303002)