唐智慧, 殷艳慧, 潘晓赋, 等. 软鳍新光唇鱼 *MC4R* 基因多态性与生长性状关联性分析[J]. 渔业研究, 2025, 47(1): 1 – 10. Tang Z H, Yin Y H, Pan X F, *et al.* Polymorphisms of *MC4R* gene and its association with growth traits in *Neolissochilus benasi*[J]. Journal of Fisheries Research, 2025, 47(1): 1 – 10.

软鳍新光唇鱼 MC4R 基因多态性与 生长性状关联性分析



唐智慧^{1,2,3},殷艳慧¹,潘晓赋¹,吴安丽¹,张源伟¹,王 茉^{1,2,3*},王晓爱^{1*}

- (1. 中国科学院昆明动物研究所,遗传资源与进化国家重点实验室, 云南省高原鱼类育种重点实验室,云南 昆明 650201;
- 2. 西南林业大学,国家林业和草原局西南地区生物多样性保育重点实验室,云南 昆明 650224;
 - 3. 西南林业大学,云南生物多样性研究院,云南 昆明 650224)

摘要:【背景】软鳍新光唇鱼(Neolissochilus benasi)是重要的水产种质资源,但在培育过程 中存在个体间生长速度差异较大的问题。【目的】筛选与软鳍新光唇鱼生长性状显著相关的分 子标记,推动其生长性状的改良。【方法】本研究对与摄食、能量代谢、生长发育密切相关 的黑素皮质素受体-4(MC4R)基因开展研究,通过PCR-Sanger测序技术进行单核苷酸多态 性(SNP)检测和分型,并将SNP位点与其生长性状进行关联性分析,挖掘软鳍新光唇鱼生 长性状关联的 SNP 标记。【结果】MC4R 基因 2 个拷贝共存在 15 个 SNP 位点,其中第 1 个 拷贝有 1 个 SNP 位点, 第 2 个拷贝有 14 个 SNP 位点。15 个 SNP 位点中仅 G227A 为错义 突变,氨基酸类型由缬氨酸(V)变为异亮氨酸(I),其余位点均为同义突变;群体遗传分 析结果显示,除第1个拷贝 SNP 位点 G669C 遗传参数值较低外, MC4R 基因第2个拷贝的 SNP 位点期望杂合度 (H_a) 和观测杂合度 (H_a) 分别为 0.860 ± 0.027 和 0.503 ± 0.001 , 多态 信息含量(PIC)为 0.373~0.375,属于中度多态性,表明该群体的遗传多样性处于中上水平; 关联性分析显示, MC4R基因 2 个拷贝 15 个 SNP 位点中, 13 个位点对软鳍新光唇鱼的生长 性状具有不同程度的影响: 位点 G227A、A322G、C364T、G403A、T451C、G457A、G472A、 T484C、G520A、T583C、G736A、C775G 与体长、体质量显著相关 (P<0.05), 且均以纯合 子为优势基因型,分别为 AA、GG、TT、AA、CC、AA、AA、CC、AA、CC、AA、GG 型; 位点 C664T 仅检测到 CC 和 CT 两种基因型, 并以杂合子 CT 型为优势基因型, 与体质量显著 相关 (P<0.05)。【结论】本研究初步筛选了 15 个与软鳍新光唇鱼生长性状相关联的候选 SNP 位点,为今后其生长相关机制和分子标记的进一步解析,以及生长性状的改良提供了科学依据。

关键词: 软鳍新光唇鱼; 黑素皮质素受体-4; SNP; 性状关联

中图分类号: S917.4 文献标识码: A 文章编号: 2096-9848 (2025) 01-0001-10

软鳍新光唇鱼(Neolissochilus benasi)隶属于 鲤形目(Cypriniformes)、鲤科(Cyprinidae)、新 光唇鱼属(Neolissochilus),是红河水系特有珍稀 鱼类,在中国主要分布于元江、李仙江流域^[1]。由于大规模水利建设、鱼类资源利用强度增加、保护意识薄弱等原因,软鳍新光唇鱼野外种群数量急剧

收稿日期: 2024-11-01 修回日期: 2024-12-05

基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项(XDA24030505); 云南省科技厅重点研发计划(202303AC100011); 云南省"兴滇英才支持计划"青年人才专项(XDYC-QNRC-2023-0542、152301198408141020); 云南省基础研究专项(202201AT070046)

第一作者: 唐智慧, 女, 研究方向为水生生物学。 E-mail: chihTowne@outlook.com

通信作者: 王 荣, 女, 副教授, 博士, 研究方向为湿地生物进化与保护。E-mail: wangmo139@live.cn 王晓爱, 女, 正高级工程师, 博士, 研究方向为鱼类保护与利用。E-mail: xueaiw@126.com

^{©《}渔业研究》编辑部。本文为使用 CC BY-NC-ND 4.0 许可协议的开放获取作品。

[©] Editorial Office of Journal of Fisheries Research. This is an open access article under the CC BY-NC-ND 4.0 license.

下降^[2],目前仅在云南江城县和西畴县保留有较大种群^[3]。中国科学院昆明动物研究所经过长期努力,突破了软鳍新光唇鱼的精子超低温冷冻保存^[4]和人工繁殖技术^[5],有效避免了该物种的灭绝,且人工繁殖的成功,为其可持续利用奠定了坚实的基础。在人工繁育的基础上,经过4代群体选育,复杂肌间刺弱化的软鳍新光唇鱼"墨龙1号"于2022年获得农业农村部的新品种认证,为云南乃至中国水产养殖业的发展提供了良好的种质资源。

然而,养殖过程中个体间生长速度差异大等问题仍然对产业化发展具有较大制约作用^[6]。因此,选育生长速度快的稳定品系是推动其产业化发展的重要环节。近年来,分子生物学技术的飞速发展,促使分子辅助育种成为当前选择育种的热门方法^[7],而获取高效、可识别性强的分子标记是分子辅助育种的前提。已有研究表明,生长是典型的数量性状,受多种基因的共同调控,并且不同物种生长相关调控机制、主效调控基因和关键调控元件不尽相同^[8]。因此,对特定物种开展生长相关分子标记的筛选是推动优良品种选育的前提。

黑素皮质素受体-4(Melanocortin-4 receptor, MC4R)是下丘脑腹内侧核分泌的一种肽类物质[9], 可与垂体分泌的内源性激动剂 α-促黑素细胞激素 (Alpha melanocyte stimulating hormone, α-MSH) 及其拮抗剂 agouti 相关蛋白(Agouti related protein, AGRP)结合,以调节食欲和摄食行为、控制能量 稳态[10-11]。作为重要的食欲调节基因, MC4R 在中 枢神经系统高度表达,对动物生长发育具有重要调 控作用[12-14]。动物 MC4R 基因多态性研究已发现多 个单核苷酸多态性 (Single nucleotide polymorphism, SNP)位点,与动物体长、体质量等生长表型显著 相关[15-16], 但其在软鳍新光唇鱼生长发育中的调控 作用研究尚未报道,与其相关的显著分子标记仍有 待挖掘。因此,本研究通过 PCR-Sanger 测序技术 对软鳍新光唇鱼 MC4R 基因进行 SNP 位点检测, 并进行关联性分析, 筛选出与软鳍新光唇鱼生长性 状显著相关的 SNP 位点及其优势基因型,旨在为 软鳍新光唇鱼的良种培育发掘具有较高应用潜力 的 SNP 位点,同时为鱼类 MC4R 基因的进一步研 究提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 样品采集与数据测量

实验所用样本为养殖于中国科学院昆明动物

研究所珍稀鱼类繁殖基地,于相同饲养环境和管理方法下长成的同一家系的 6 月龄软鳍新光唇鱼。通过对该家系所有样本进行体长、全长、体质量的测量,表型数据呈正态分布。选择分布于两端的 50 尾极端大个体 [平均体长为(107.80±4.72)mm,体质量为(25.48±3.37)g],50 尾极端小个体 [平均体长为(56.84±3.16)mm、体质量为(3.45±0.55)g],剪取鳍条组织浸泡于无水乙醇中,放置在−20 ℃冰箱中保存,用于后续实验。体长、全长采用游标卡尺(精度 0.01 mm)测量,体质量采用电子天平(精度 0.01 g)测量。

1.2 实验方法

1.2.1 组织 DNA 提取

取出鱼鳍组织样品,使用异丙醇 DNA 提取 法^[17-18] 提取 100个鱼鳍样品的 DNA, 并于 4 ℃ 溶解过夜后,放置在-20 ℃ 冰箱中保存。中国科学院 昆明动物研究所生命科学伦理委员会批准动物实验,批准编号为 SMKX-SQ-2021-111。

1.2.2 引物设计与 PCR 扩增

根据软鳍新光唇鱼基因组中 MC4R 基因编码 区序列(Coding sequence,CDS)(NCBI 序列号: PQ682452,PQ682453),采用 Primer Premier 5.0 (Premier Biosoft International)软件设计引物,引物送至昆明擎科生物有限公司合成。通过筛选并选取 5 个样本进行预实验,以验证引物的特异性,最终确定 M1、M2 两对引物用于 MC4R 基因 2 个拷贝的扩增,扩增目的片段度分别为 1 027、1 050 bp。引物序列详情见表 1。扩增反应总体系为 25 μ L,包括基因组 DNA 模板 1 μ L,上下游引物各 1 μ L,包括基因组 DNA 模板 1 μ L,上下游引物各 1 μ L,power POL 2 PCR mix(爱博泰克生物科技有限公司,武汉)12.5 μ L,dH₂O(无菌去离子水)9.5 μ L;PCR 反应程序:94 $^\circ$ 预变性 3 min,30 个扩增循环(94 $^\circ$ 变性 30 s;55 $^\circ$ 退火 30 s;72 $^\circ$ 延伸 1 min),最后 72 $^\circ$ 延伸 5 min。

1.3 统计分析

1.3.1 SNP 位点筛选及分型

扩增产物送至昆明擎科生物有限公司进行测序,本研究采用直接测序法。将返回产物序列用DNAStar 7.1 软件包中的 SeqMan 7.1.0^[19] 软件进行剪切、拼接,根据测序峰图确定 SNP 位点并按照单双峰型划分各位点的基因型,并通过 Emboss transeq 在线工具(https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/)对 *MC4R* 基因 2 个拷贝的 SNP 位点进行氨基酸突变分析。

表 1 软鳍新光唇鱼 PCR 引物信息

Tab. 1 Primers used in the amplification of N. benasi

目标基因 Gene of interest	引物 Primers	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	退火温度/℃ Annealing temperature	产物长度/bp Product length
1/C/D	M1	F: AAACCACTGACTACGGATAT R: CGTCAAACAGAAACAAGC	55	1 027
MC4R	M2	F: AAACCACTGACTACGGATAT R: TTGCTTAGTGTTGTCTTGC	55	1 050

1.3.2 群体遗传学分析

统计不同基因型的样本数量,并利用 Popgene $1.32^{[20]}$ 、Power Marker [21] 软件进行群体遗传学分析,包括计算各基因位点的基因型频率、等位基因频率、有效等位基因数(Effective number of alleles, N_e)、期望杂合度(Expected heterozygosity, H_e)、观测杂合度(Observed heterozygosity, H_o)、多态信息含量(Polymorphism information content,PIC)、固定指数(Fixation index, F_{is}),以及通过 X^2 分析进行哈代温伯格(Hardy-Weinberg,HWE)平衡检验, X^2 <5.991为 HWE 平衡, X^2 >5.991为偏离 HWE 平衡。

1.3.3 生长性状关联性分析

运用 SPSS 26.0^[22] 统计软件将各样本基因型与 生长性状进行关联分析,对符合 Levene's test 和正 态分布的位点进行单因素方差分析,事后检验通 过 Duncan's test 进行;反之,则采取非参数检验,事后多重比较通过 Kruskal-Wallis test 进行,以分析各基因型相关的表型间的差异显著性。结果均采用平均值±标准差表示。

2 结果与分析

2.1 SNP 位点检测

对 PCR 扩增产物测序后, MC4R 基因 2 个 拷贝各有 82 条和 69 条序列用于多态性检测。结果显示: MC4R 第 1 个拷贝有 1 个 SNP 位点,为位于 669 bp 处的 G669C;第 2 个拷贝有 14 个 SNP 位点,分别是位于 227、322、403、457、472、520、736 bp 处的 G/A 突变,位于 364、451、484、583、664、742 bp 处的 C/T 突变,以及位于775 bp 处的 C/G 突变;各位点测序峰图结果见图 1。

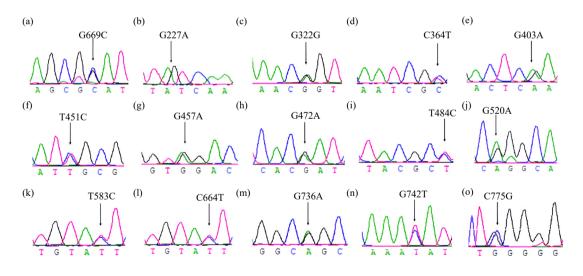


图 1 软鳍新光唇鱼 MC4R 基因两个拷贝 15 个 SNP 位点测序峰图

Fig. 1 Sequence peak diagram of 15 SNP loci in two copies of MC4R gene of N. benasi

注:图 a 为第 1 个拷贝 SNP 位点;图 b~图 o 为第 2 个拷贝 SNP 位点。

Notes: Figure a shows SNP loci of 1st copy; figure b-figure o show SNP loci of 2nd copy.

氨基酸突变分析结果显示:第1个拷贝序列中 G669C 突变点为同义突变,编码氨基酸为精氨酸(R);第2个拷贝发现的14个 SNP 位点中,

仅位点 G227A 为错义突变,氨基酸类型由缬氨酸 (V)变为异亮氨酸 (I),其余位点均为同义突变,未发生氨基酸改变,具体信息见表 2。

表 2 MC4R 基因两个拷贝 SNP 位点的氨基酸突变
Tab. 2 Amino acid mutations at various SNP loci in two copies of the MC4R gene

位点 Loci	突变序列 Mutant sequences		突变氨基酸类型 Types of mutant amino acid	
G669C	CGG→CGC	R-R	精氨酸	exon
G227A	GTC→ATC	V-I	缬氨酸-异亮氨酸	exon
A322G	$ACA \rightarrow ACG$	T-T	苏氨酸	exon
C364T	CGC→CGT	R-R	精氨酸	exon
G403A	TCG→TCA	S-S	丝氨酸	exon
T451C	$ATT \rightarrow ATC$	I-I	异亮氨酸	exon
G457A	GTG→GTA	V-V	缬氨酸	exon
G472A	ACG→ACA	T-T	苏氨酸	exon
T484C	GCT→GCC	A-A	丙氨酸	exon
G520A	GCG→GCA	A-A	丙氨酸	exon
T583C	$TAT \rightarrow TAC$	Y-Y	酪氨酸	exon
C664T	CAC→CAT	Н-Н	组氨酸	exon
G736A	GCG→GCA	A-A	丙氨酸	exon
C742T	$AAC \rightarrow AAT$	N-N	天冬酰胺	exon
C775G	CTC→CTG	L-L	亮氨酸	exon

2.2 SNP 位点的遗传多样性分析

MC4R 基因筛选出 15 个 SNP 位点在软鳍新光唇鱼群体中的遗传参数结果见表 3。第 1 个拷贝 SNP 位点 G669C 总体遗传参数值在 15 个 SNP 位点中较低,其 N_e 为 1.443, H_e 和 H_o 分别为 0.309 和 0.351,PIC 为 0.260;第 2 个拷贝 14 个 SNP 位点有效等位基因数为 1.981~2.000,各位点有效等位基因数与观测值接近,表明软鳍新光唇鱼种群各等位基因分布均匀[23], H_o 和 H_e 分别为 0.860±0.027、

 0.503 ± 0.001 ,PIC 为 $0.373\sim0.375$,根据Botstein 等²⁴的标准,当0.25<PIC<0.50,为中度多态性,因此15个 SNP 位点均处于中度多态。 X^2 检测结果显示,除第1个拷贝 G669C 位点外,第2个拷贝所有位点均显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡(P<0.05)。各位点基因型频率结果显示,突变点 G669C 以纯合子 GG 占比更高, F_{is} 值为-0.145,剩余位点均以杂合型个体占比更高, F_{is} 值范围为 $-0.841\sim-0.625$ 。

2.3 SNP 位点与生长性状关联性分析

MC4R 基因 2 个拷贝检测出的 15 个 SNP 位点 与软鳍新光唇鱼生长性状的关联性分析结果见 表 4。第1个拷贝 G669C 位点有3种基因型, CC 型个体的质量、体长和全长均高于 GC 型与 GG 型 个体,但未达到显著性水平(P>0.05)。第2个拷 贝 C664T、C742T 位点仅具有 CC、CT 两种基因 型,关联性分析结果显示, CT杂合型的体长、体 质量、全长均优于 CC 纯合型, C664T 处不同基 因型个体的体质量呈显著差异(P<0.05), 而体长 与全长差异不显著;位点 C742T 不同基因型个体 之间性状差异均不显著。第2个拷贝中G227A、 C364T、G403A、G472A、T484C、T583C 位点均 有3种基因型,不同基因型个体体长、全长、 体质量间存在显著差异(P<0.05),分别以纯合 子 AA、TT、AA、AA、CC、CC为优势基因型; 位点 A322G、T451C、G457A、G520A、G736A、 C775G 也存在三种基因型,并以纯合型的性状 指标高于杂合型,但未在全长上表现出显著差异 $(P>0.05)_{\circ}$

表 3 MC4R 基因两个拷贝各 SNP 位点群体遗传信息

Tab. 3 Population genetic information of each SNP locus of two copies of MC4R gene

							•		
位点 Loci	样本数 Number	基因型(频率) Genotypes (frequency)	等位基因(频率) Aelles (frequency)	HWE	N_e	H_o	H_e	F_{is}	PIC
G669C	74	GG (0.635) GC (0.351) CC (0.014)	C (0.189) G (0.811)	$X^2=1.443$ ($P=0.230$)	1.443	0.351	0.309	-0.145	0.260
G227A	65	AA (0.064) GG (0.095) GA (0.841)	G (0.516) A (0.484)	$X^2=28.813$ ($P=0.000$)	1.998	0.841	0.504	-0.684	0.375
A322G	65	AA (0.077) GG (0.062) GA (0.861)	G (0.492) A (0.507)	$X^2=33.300$ ($P=0.000$)	2.000	0.862	0.504	-0.724	0.375
C364T	53	CC (0.113) TT (0.076) CT (0.811)	C (0.519) T (0.481)	$X^2=20.077$ ($P=0.000$)	1.997	0.811	0.504	-0.625	0.375
G403A	66	GG (0.106) AA (0.061) GA (0.833)	C (0.508) A (0.492)	$X^2=28.970$ ($P=0.000$)	1.996	0.833	0.503	-0.670	0.375
T451C	65	CC (0.062) TT (0.077) CT (0.861)	C (0.476) A (0.524)	$X^2=33.300$ ($P=0.000$)	2.000	0.862	0.504	-0.724	0.375

									续表3
位点 Loci	样本数 Number	基因型(频率) Genotypes (frequency)	等位基因(频率) Aelles (frequency)	HWE	N_e	H_o	H_{e}	F_{is}	PIC
G457A	66	GG (0.076) GA (0.864) AA (0.060)	G (0.508) A (0.492)	$X^2=34.220$ ($P=0.000$)	2.000	0.864	0.504	-0.728	0.375
G472A	62	GG (0.081) GA (0.855) AA (0.064)	G (0.508) A (0.492)	$X^2=30.555$ ($P=0.000$)	2.000	0.855	0.504	-0.841	0.373
T484C	64	CC (0.062) TT (0.078) CT (0.860)	C (0.492) T (0.508)	$X^2=32.383$ ($P=0.000$)	2.000	0.859	0.504	-0.719	0.375
G520A	63	GG (0.063) AA (0.080) GA (0.857)	G (0.508) A (0.492)	$X^2=31.468$ ($P=0.000$)	2.000	0.857	0.504	-0.715	0.375
T583C	59	CC (0.068) TT (0.085) CT (0.847)	C (0.492) T (0.508)	$X^2=27.837$ ($P=0.000$)	1.999	0.848	0.504	-0.695	0.375
C664T	62	CC (0.097) CT (0.903)	C (0.548) T (0.452)	$X^2=41.238$ ($P=0.000$)	1.981	0.903	0.499	-0.824	0.373
G736A	66	GG (0.076) AA (0.061) GA (0.863)	G (0.492) A (0.508)	$X^2=34.220$ ($P=0.000$)	2.000	0.864	0.504	-0.728	0.375
C742T	66	CC (0.076) CT (0.924)	C (0.540) T (0.460)	$X^2=47.867$ ($P=0.000$)	1.989	0.924	0.501	-0.826	0.374
C775G	66	CC (0.076) GG (0.061) GC (0.863)	C (0.508) G (0.492)	$X^2=34.220$ ($P=0.000$)	2.000	0.864	0.504	-0.728	0.375

注:HWE 为哈代温伯格平衡; H_e 为期望杂合度; H_o 为观测杂合度; N_e 为有效等位基因数;PIC 为多态信息含量; F_{is} 为固定指数。

Notes: HWE indicates Hardy-Weinberg equilibrium; H_e indicates expected heterozygosity; H_o indicates observed heterozygosity; N_e indicates effective number of alleles; PIC indicates polymorphism information content; F_{is} indicates fixation index.

表 4 MC4R 基因两个拷贝 SNP 位点各基因型与生长性状关联性分析

Tab. 4 Association analysis between different genotypes of loci of two copies of SNP MC4R gene and growth traits

	, ,	. 3 3		,
位点 Loci	基因型(样本量) Genotype(n)	体质量/g Body mass	体长/mm Body length	全长/mm Total length
G669C	GC (26) GG (47) CC (1)	$\begin{array}{c} 8.55 \pm 9.55^{a} \\ 14.25 \pm 10.97^{a} \\ 27.84 \pm 0.00^{a} \end{array}$	68.78±22.35 ^a 82.89±26.30 ^a 106.90±0.00 ^a	85.66±26.87 ^a 101.69±30.29 ^a 132.73±0.00 ^a
G227A	GG (6) AA (4) GA (53)	3.59 ± 0.46^{b} 26.13 ± 2.13^{a} 13.77 ± 10.93^{b}	58.73±2.02 ^b 109.92±5.41 ^a 81.06±25.56 ^b	$74.12{\pm}2.89^{b} \\ 134.23{\pm}5.46^{a} \\ 100.71{\pm}30.81^{b}$
A322G	AA (5) GG (4) GA (56)	3.57 ± 0.51^{b} 26.13 ± 2.13^{a} 13.67 ± 10.96^{b}	59.02±2.12 ^b 109.92±5.41 ^a 80.81±25.52 ^b	74.38 ± 3.15^{a} 134.23 ± 5.46^{a} 100.44 ± 30.72^{a}
C364T	CC (6) CT (43) TT (4)	3.58 ± 0.46^{b} 14.82 ± 10.96^{b} 26.13 ± 2.13^{a}	59.00 ± 1.90^{b} 83.70 ± 25.32^{b} 109.92 ± 5.41^{a}	$74.42\pm2.82^{b} \\ 103.80\pm30.42^{b} \\ 134.23\pm5.46^{a}$
G403A	GG (7) GA (55) AA (4)	3.66 ± 0.45^{b} 13.85 ± 10.98^{b} 26.13 ± 2.13^{a}	59.29±1.81 ^b 81.19±25.60 ^b 109.92±5.41 ^a	74.60 ± 2.64^{b} 100.88 ± 30.82^{b} 134.23 ± 5.46^{a}
T451C	TT (5) CT (56) CC (4)	3.57 ± 0.51^{b} 13.31 ± 10.94^{b} 26.13 ± 2.13^{a}	59.02±2.12 ^b 79.98±25.44 ^b 109.92±5.41 ^a	74.38±3.15 ^a 99.43±30.63 ^a 134.23±5.46 ^a
G457A	GG (5) GA (57) AA (4)	3.57 ± 0.51^{b} 13.50 ± 10.94^{b} 26.13 ± 2.13^{a}	59.02 ± 2.12^{b} 80.44 ± 25.45^{b} 109.92 ± 5.41^{a}	74.38±3.15 ^a 99.98±30.64 ^a 134.23±5.46 ^a
G472A	GG (5) GA (53) AA (4)	3.57 ± 0.51^{b} 13.73 ± 10.88^{b} 26.13 ± 2.13^{a}	59.02 ± 2.12^{b} 80.89 ± 25.49^{b} 109.92 ± 5.41^{a}	$74.38 \pm 3.15^b \\ 100.49 \pm 30.67^b \\ 134.23 \pm 5.46^a$
T484C	CC (4) TT (5) CT (55)	26.13 ± 2.13^{a} 3.57 ± 0.51^{b} 12.86 ± 10.59^{b}	109.92±5.41 ^a 59.02±2.12 ^b 79.19±25.01 ^b	134.23±5.46 ^a 74.38±3.15 ^b 98.44±30.07 ^b
G520A	GG (5) AA (4) GA (54)	3.57 ± 0.51^{b} 26.13 ± 2.13^{a} 12.86 ± 10.81^{b}	59.02 ± 2.12^{b} 109.92 ± 5.41^{a} 79.06 ± 25.40^{b}	74.38±3.15 ^a 134.23±5.46 ^a 98.27±30.54 ^a

续表 4

位点 Loci	基因型(样本量) Genotype(n)	体质量/g Body mass	体长/mm Body length	全长/mm Total length
T583C	CC (4) TT (5) CT (50)	26.13±2.13 ^a 3.57±0.51 ^b 12.70±10.83 ^b	109.92±5.41 ^a 59.02±2.12 ^b 78.51±25.34 ^b	134.23±5.46 ^a 74.38±3.15 ^b 97.60±30.47 ^b
C664T	CC (6) CT (56)	$\substack{3.41 \pm 0.60^b \\ 14.64 \pm 11.14^a}$	58.21±2.75 ^a 83.01±25.96 ^a	73.50±3.55 ^a 102.90±31.09 ^a
G736A	GG (5) AA (4) GA (57)	3.57 ± 0.51^{b} 26.13 ± 2.13^{a} 13.50 ± 10.94^{b}	59.02±2.12 ^b 109.92±5.41 ^a 80.44±25.45 ^b	74.38 ± 3.15^{a} 134.23 ± 5.46^{a} 99.98 ± 30.64^{a}
C742T	CC (5) CT (61)	$\begin{array}{c} 3.57{\pm}0.51^{a} \\ 14.33{\pm}11.04^{a} \end{array}$	59.02±2.12 ^a 82.37±25.69 ^a	$74.38 \pm 3.15^{a} \\ 102.22 \pm 30.83^{a}$
C775G	CC (5) GG (4) GC (57)	3.57 ± 0.51^{b} 26.13 ± 2.13^{a} 13.50 ± 10.94^{b}	59.02±2.12 ^b 109.92±5.41 ^a 80.44±25.45 ^b	74.38 ± 3.15^{a} 134.23 ± 5.46^{a} 99.98 ± 30.64^{a}

注: 同一位点同一指标不同上标小写字母表示组内差异显著 (P<0.05), 相同上标字母表示组内差异不显著 (P>0.05)。

Note: Different superscript lowercase letters in the same column of locus indicate significant difference within the group (P<0.05), and the same superscript lowercase letters indicate no significant differences within the group (P>0.05).

3 讨论

3.1 软鳍新光唇鱼群体遗传学特征

 N_e 、 H_e 、 H_o 和 PIC 等参数是衡量群体遗传变异程度、遗传信息大小,指示遗传多态性的重要指标,各数值越高,则群体遗传多样性越高,对环境的适应力越强,在生长、繁殖性能上也更具培育优势 [25-27]。群体遗传分析结果显示,本研究在MC4R 基因检测出的 15 个 SNP 位点中,除 G669C外,其余 14 个 SNP 位点的 N_e 、PIC 和 H_o 均处于较高水平,属中度多态性,群体中等位基因分布均匀。

 F_{is} 是以观测杂合频率与期望杂合频率的差 异性反映群体间的近交程度,也被称为 HWE 平衡 偏离系数。 F_{is} 值越趋近于 0,群体越趋于 HWE 平 衡, 当 F_{is} 的值小于 0 时, $H_o > H_e$, 群体内杂合子 较多; 反之,则群体纯合子更多[28]。本研究对 15个 SNP 位点进行 Hardy-Weinberg 平衡检验,结 果显示除位点 G669C 外, 其余 14 个位点 P 值均小 于 0.01, F_{is} 值接近于-1, 处于 Hardy-Weinberg 极 不平衡状态,种群中杂合子过剩。杂合子过剩是养 殖群体较为常见的现象,人工选择压力、非随机交 配、亲本数量限制、种群大小和结构变化等因素是 造成养殖群体杂合子过剩而偏离 Hardy-Weinberg 平衡的主要原因^[29],如团头鲂(Megalobrama amblycephala)等养殖群体也存在杂合子过剩现象[30-32]。 此外,本研究杂合子过剩也可能与样本量相对较 少,且样本体长、体质量等表型存在较大差异有 关。本研究中软鳍新光唇鱼群体杂合子过剩, 表明 其正经历人工选育过程,与实际养殖、选育情况相 符,一定程度上证明了本研究筛选生长相关 SNP 位点的可靠性与真实性较高。

3.2 SNP 位点筛选及与生长性状的关联性

本研究对 MC4R 基因扩增后产物采取直接测序法进行 SNP 位点的筛选,MC4R 基因筛选出 15个 SNP 位点。MC4R 基因一级结构预测分析发现,15个 SNP 位点中,仅 G227A 位点出现错义突变,所在序列由 GTC 变为 ATC,导致氨基酸种类由缬氨酸(V)变为异亮氨酸(I),其余位点同属同义突变,虽然同义突变不能通过氨基酸突变直接改变蛋白质的结构和功能,但仍可以改变 mRNA二级结构、翻译效率而影响生物体表型[33-34],此结论也在后续软鳍新光唇鱼生长表型的关联性分析中得到印证。

MC4R 基因的 15 个 SNP 位点与软鳍新光唇鱼 主要生长性状关联分析结果显示 13 个 SNP 位点与 个体体长、体质量具有不同程度的相关性。其中, G227A、A322G、C364T、G403A、T451C、G457A、 G472A、T484C、G520A、T583C、G736A、C775G 等 12 个 SNP 位点与体长、体质量显著相关,且均 以纯合子为优势基因型,分别为 AA、GG、TT、 AA, CC, AA, AA, CC, AA, CC, AA, GG 型; 位点 C664T 检测到 CC、CT 两种基因型, 虽以杂合子 CT 型为优势基因型,但仅与体质量显 著相关。MC4R基因的多态性与性状关联研究在 畜牧中开展较早且更广泛, 虽然在尼罗罗非鱼 (Oreochromis niloticus) [35]、红鳍东方鲀(Takifugu rubripes) [36]、光倒刺鲃(Spinibarbus hollandi) [37] 中筛选出多个 SNP 位点, 但较少与鱼类的生长性 状显著相关,研究更多集中在基因克隆、组织表 达[38-41]。不同群体以杂合子或以纯合子为优势基因

型,在许多研究中也有报道,如黄李勇等^[42] 在对巴什拜羊(Ovis aries)MC4R 基因与生长性状关联分析中检测出 GC 和 GG 两种基因型,并以 GC 型为群体的优势基因型;周艳等^[43] 在 5 个地方鸡种MC4R 基因的研究中检测出 g.54 C>G、g.315 G>T 两处 SNP 位点,且两位点在各群体中均主要以纯合子为优势基因型。因此,本研究结果支持 MC4R 基因存在丰富的 SNP 位点,且对软鳍新光唇鱼的生长性状具有显著影响,可以将其作为鱼类分子育种研究的候选基因进一步挖掘。

4 结论

本研究通过直接测序法在软鳍新光唇鱼 MC4R 基因 2 个拷贝中检测出 15 个 SNP 位点,遗传多样性分析表明该养殖群体具有较高的遗传丰富度,能够作为良种选育的候备种群,同时利用关联性分析筛选出 13 个 SNP 位点与生长性状显著相关,为今后软鳍新光唇鱼生长相关机制和分子标记的进一步解析,以及生长性状的改良提供了科学依据。

参考文献 (References):

- [1] 褚新洛,陈银瑞.云南鱼类志(上册)[M].北京:科学出版社,1989:175-176.
 - Chu X L, Chen Y R. Fishes of Yunnan Province (I) [M]. Beijing: Science Press, 1989: 175 176.
- [2] 杨剑,潘晓赋,陈小勇,等.李仙江鱼类资源的现状与保护对策 [J]. 水生态学杂志,2010,3(2):54-60.
 - Yang J, Pan X F, Chen X Y, *et al.* Status and conservation strategy of fish resources in Lixianjiang River[J]. Journal of Hydroecology, 2010, 3(2): 54 60.
- [3] 杨永宏,杨君兴,潘晓赋,等.云南李仙江流域水电 开发中的鱼类资源保护[J].动物学研究,2011, 32(2):188-195.
 - Yang Y H, Yang J X, Pan X F, *et al.* Fishery resource protection by artificial propagation in hydroelectric development: Lixianjiang River drainage in Yunnan as an example[J]. Zoological Research, 2011, 32(2): 188 195.
- [4] 王晓爱,杨君兴,陈小勇,等.软鳍新光唇鱼精子的超低温冷冻保存[J].动物学研究,2012,33(3):283-289.
 - Wang X A, Yang J X, Chen X Y, et al. Cryopreservation of sperm from *Neolissochilus benasi*[J]. Zoological

- Research, 2012, 33(3): 283 289.
- [5] 潘晓赋,刘倩,王晓爱,等. 软鳍新光唇鱼(Neolissochilus benasi)的人工繁殖与胚胎发育[J]. 动物学研究,2013,34(6):617-625.
 Pan X F, Liu Q, Wang X A, et al. Artificial propagation and embryonic development of Neolissochilus benasi[J].

Zoological Research, 2013, 34(6): 617 - 625.

- [6] 潘亚丹, 鲁翠云, 孙志鹏, 等. 梭鲈快速生长品系 F₃ 基因型与生长性状关联分析 [J]. 上海海洋大学学报, 2024, 33 (5): 1053-1063.

 Pan Y D, Lu C Y, Sun Z P, et al. Correlation analysis between genotypes and growth traits of fast growing strain F₃ of pikeperch (Sander lucioperca)[J]. Journal of
- [7] Yue G H. Recent advances of genome mapping and marker-assisted selection in aquaculture[J]. Fish and Fisheries, 2014, 15(3): 376 396.

Shanghai Ocean University, 2024, 33(5): 1053 - 1063.

- [8] 殷艳慧, 蒋万胜, 潘晓赋, 等. 水产养殖鱼类生长性 状研究进展 [J]. 中国水产科学, 2020, 27(4): 463-484.
 - Yin Y H, Jiang W S, Pan X F, *et al.* Recent progress in growth trait of aquaculture fish[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2020, 27(4): 463 484.
- Yeo G S, Farooqi I S, Challis B G, et al. The role of melanocortin signalling in the control of body weight: evidence from human and murine genetic models [J].
 QJM-an International Journal of Medicine, 2000, 93(1): 7-14.
- [10] Sinha P S, Schiöth H B, Tatro J B. Roles of the melanocortin-4 receptor in antipyretic and hyperthermic actions of centrally administered alpha-MSH[J]. Brain Research, 2004, 1001(1-2): 150 – 158.
- [11] Haskell-Luevano C, Monck E K. Agouti-related protein functions as an inverse agonist at a constitutively active brain melanocortin-4 receptor[J]. Regulatory Peptides, 2001, 99(1): 1 7.
- [12] Gantz I, Miwa H, Konda Y, *et al.* Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor[J]. Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(20): 15174 15179.
- [13] Mountjoy K G, Mortrud M T, Low M J, et al. Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain [J]. Molecular Endocrinology, 1994, 8(10): 1298 1308.

- [14] Sheridan M A, Hagemeister A L. Somatostatin and somatostatin receptors in fish growth[J]. General and Comparative Endocrinology, 2010, 167(3): 360 365.
- [15] 李星润, 兰国湘, 王孝义, 等. 猪 *MC4R* 基因 Asp-298Asn 位点多态性及其与生长性状的关联 [J]. 畜牧与兽医, 2016, 48 (2): 23-27.

 Li X R, Lan G X, Wang X Y, *et al.* Polymorphism of Asp298Asn site in the porcine *MC4R* gene and its association with growth traits [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2016, 48(2): 23-27.
- [16] Choi J S, Jin S K, Jeong Y H, *et al.* Relationships between single nucleotide polymorphism markers and meat quality traits of duroc breeding stocks in Korea[J].

 Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2016, 29(9): 1229 1238.
- [17] 奥斯伯 F M, 布伦特 R, 金斯顿 R E, 等. 精编分子生物学实验指南 [M]. 颜子颖, 王海林, 译. 北京:科学出版社, 1998: 30-31.

 Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, et al. Short protocols in molecular biology [M]. Yan Z Y, Wang H L, trans. Beijing: Science Press, 1998: 30-31.
- [18] Wagner A, Silva-santos A R, Rosa S S, *et al.* Primary purification of plasmid DNA using differential isopropanol precipitation [M]//Sousa Â. DNA vaccines: methods and protocols. New York: Humana, 2021: 151–165.
- [19] Burland T G. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software [M]//Misener S, Krawetz S A. Bioinformatics methods and protocols. Totowa: Humana Press, 2000: 71 91.
- [20] Yeh F C, Boyle T J B. Population genetic analysis of codominant and dominant markers and quantitative traits[J]. Belgian Journal of Botany, 1997, 129: 157 163.
- [21] Liu K J, Muse S V. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis[J]. Bioinformatics, 2005, 21(9): 2128 2129.
- [22] SPSSAU. The SPSSAU project (2020) (version 20.0) [online application software] [EB/OL]. [2024-12-10]. https://www.spssau.com.
- [23] Hearne C M, Ghosh S, Todd J A. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits [J]. Trends in Genetics, 1992, 8(8): 288 294.
- [24] Botstein D, White R L, Skolnick M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction frag-

- ment length polymorphisms [J]. American Journal of Human Genetics, 1980, 32(3): 314 331.
- [25] Nei M, Maruyama T, Chakraborty R. The bottleneck effect and genetic variability in populations [J]. Evolution, 1975, 29(1): 1 10.
- [26] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals[J]. Genetics, 1978, 89(3): 583 590.
- [27] Beardmore J A, Mair G C, Lewis R I. Biodiversity in aquatic systems in relation to aquaculture[J]. Aquaculture Research, 1997, 28(10): 829 839.
- [28] Wright S. Evolution and the genetics of populations, volume 4: variability within and among natural populations [M]. Chicago: University of Chicago Press, 1984.
- [29] Waples R S. Testing for Hardy-Weinberg proportions: have we lost the plot?[J]. Journal of Heredity, 2015, 106(1): 1 19.
- [30] 袁吉贵,刘丽,陈增祥,等.吉富罗非鱼第二十一代选育群体微卫星标记研究 [J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36 (4): 1498 1504.

 Yuan J G, Liu L, Chen Z X, et al. Microsatellite marker research of the twenty-one generation breeding population of GIFT strains of *Oreochromis niloticus* [J]. Genomics and Applied Biology, 2017, 36(4): 1498 1504.
- [31] Wigginton J E, Cutler D J, Abecasis G R. A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium [J]. The American Journal of Human Genetics, 2005, 76(5): 887 893.

[32] 徐湛宁,李福贵,郑国栋,等.团头鲂耐低氧新品系

- 雌核发育群体遗传结构的微卫星分析 [J]. 水产学报, 2017, 41 (3): 330 338.

 Xu Z N, Li F G, Zheng G D, et al. Analysis of genetic structure of gynogenetic population in new strain of hypoxia-tolerant *Megalobrama amblycephala* using microsatellite markers[J]. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(3): 330 338.
- [33] Bali V, Bebok Z. Decoding mechanisms by which silent codon changes influence protein biogenesis and function[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2015, 64: 58 74.
- [34] Sharma Y, Miladi M, Dukare S, *et al.* A pan-cancer analysis of synonymous mutations[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 2569.
- [35] 刘福平,白俊杰,叶星,等.罗非鱼 MC4R 基因克隆 及与其生长相关的 SNPs 位点 [J].中国水产科学,

2009, 16 (6): 816 - 823.

- Liu F P, Bai J J, Ye X, *et al.* Cloning of *MC4R* gene and study on the association between SNPs of MC4R and growth trait in tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16(6): 816 823.
- [36] 张丽, 仇雪梅, 王娟, 等. 红鳍东方鲀(Takifugu rubripes) MC4R 基因的多态性分析[J]. 生物技术通报, 2012(7): 97-102.
 - Zhang L, Qiu X M, Wang J, *et al.* Polymorphism analysis on *melanocortin-4 receptor (MC4R)* gene in *Takifugu rubripes* [J]. Biotechnology Bulletin, 2012(7): 97 102.
- [37] Yang Y, Li Q, Shu H, et al. Characterization of the melanocortin-4 receptor gene from Spinibarbus hollandi and the association between its polymorphisms and S. hollandi growth traits[J]. Fisheries Science, 2017, 83(6): 967 976.
- [38] Wan Y M, Zhang Y, Ji P F, *et al.* Molecular characterization of CART, AgRP, and *MC4R* genes and their expression with fasting and re-feeding in common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39(3): 2215 2223.
- [39] 费飞,孙少阳,姚玉霄,等. lepr 和 mc4r 基因突变斑 马鱼的制备及表型分析 [J]. 生理学报,2017,69(1):61-69.
 - Fei F, Sun S Y, Yao Y X, *et al*. Generation and phenotype analysis of zebrafish mutations of obesity-related genes *lepr* and *mc4r*[J]. Acta Physiologica Sinica, 2017,

- 69(1): 61 69.
- [40] Li L, Yang Z, Zhang Y P, et al. Molecular cloning, tissue distribution, and pharmacological characterization of melanocortin-4 receptor in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. Domestic Animal Endocrinology, 2017, 59: 140 151.
- [41] 黄露. 翘嘴红鲌 mc3r、mc4r 和 mrap2 的基因克隆、表达分析及功能初步研究 [D]. 长沙: 湖南师范大学, 2021.
 - Huang L. Gene cloning, expression analysis and preliminary functional studies of *mc3r*, *mc4r* and *mrap2* in topmouth culter[D]. Changsha: Hunan Normal University, 2021.
- [42] 黄李勇,赵雄,曼则热·朱尔丁,等. 巴什拜羊 *MC4R* 基因多态性及其与生长性状的关联分析 [J]. 草食家畜,2018(3):17-23.
 - Huang L Y, Zhao X, Manzere Z, *et al.* Association analysis of single nucleotide polymormhism of MC4R gene with growth traits in Bashibai sheep [J]. Grass-feeding Livestock, 2018(3): 17 23.
- [43] 周艳,雷秋霞,韩海霞,等. 黑素皮质素受体 4 (*MC4R*) 基因在 5 个地方鸡种中的遗传多态性分析 [J]. 山东农业科学,2017,49 (8): 127-130. Zhou Y, Lei Q X, Han H X, *et al.* Genetic polymorphism analysis on *MC4R* gene in five Chinese indigenous chicken breeds[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2017, 49(8): 127-130.

Polymorphisms of MC4R gene and its association with growth traits in Neolissochilus benasi

TANG Zhihui^{1,2,3}, YIN Yanhui¹, PAN Xiaofu¹, WU Anli¹, ZHANG Yuanwei¹, WANG Mo^{1,2,3*}, WANG Xiao'ai^{1*}

- (1. Yunnan Key Laboratory of Plateau Fish Breeding, State Key Laboratory of Genetic Resources and Evolution, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China;
- Key Laboratory of Biodiversity Conservation in Southwest China, State Forestry and Grassland Administration, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China;
 - 3. Yunan Academy of Biodiversity, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

Abstract: [Background] Neolissochilus benasi is an important aquatic germplasm resource, but there is a problem of large differences in growth rate among individuals during the breeding process. [Objective] The study aims to identify molecular markers significantly associated with the growth traits in N. benasi and promote the improvement of its growth characteristics. [Methods] The study focused on melanocortin-4 receptor (MC4R) gene, which are deeply related to ingestion, energy metabolism and growth development. Single nucleotide polymorphism (SNP) detection and genotyping were performed using PCR-Sanger sequencing technology, and association analysis was conducted between the SNP loci and growth traits to identify SNP markers related to the growth traits of N. benasi. [Results] The results showed that there were 15 SNP loci in the two copies of MC4R gene, with one SNP locus in the first copy and 14 SNP loci in the second copy. Among the 15 SNP loci, only G227A was a missense mutation, with the amino acid type changed from valine (V) to isoleucine (I). The remaining loci were synonymous mutations. Population genetic analysis showed that, except for SNP locus G669C in the first copy with low genetic parameter values, the SNP loci in the second copy of MC4R gene had an expected heterozygosity (H_e) and observed heterozygosity (H_e) of 0.860 4±0.027 2 and 0.503 2±0.001 4, respectively, and their polymorphic information content (PIC) ranged from 0.373 1 to 0.3749, indicating a middleupper level of genetic diversity in this population. Association analysis revealed that 13 SNP loci in the two copies of MC4R gene had varying degrees of influence on the growth traits of N. benasi: G227A, A322G, C364T, G403A, T451C, G457A, G472A, T484C, G520A, T583C, G736A, and C775G were significantly associated with body length and body mass (P<0.05), with homozygous genotypes AA, GG, TT, AA, CC, AA, AA, CC, AA, CC, AA, and GG being the dominant genotypes, respectively. Meanwhile, C664T was only detected two genotypes (CC and CT), with the heterozygous CT genotype being dominant and strongly associated with body mass (P<0.05). [Conclusion] This study preliminarily screens 15 candidate SNP loci associated with growth traits in N. benasi, providing a scientific basis for further analysis of growth-related mechanisms and molecular markers, as well as for the improvement of growth traits in this species.

Key words: Neolissochilus benasi; melanocortin-4 receptor (MC4R); SNP; correlation analysis with growth traits