

全基因组关联分析定位大口黑鲈 抗维氏气单胞菌的候选基因

杜金辉¹, 叶 坤¹, 周 凡², 章海鑫³, 张燕萍³,
陈文静³, 李完波¹, 徐先栋³, 韩 芳¹

(1. 集美大学水产学院 福建 厦门 361021; 2. 浙江省水产技术推广总站, 浙江 杭州 310012;
3. 江西省水产科学研究所, 江西 南昌 330039)

[摘要] 为减少假阳性, 对患病和未患病大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 各 96 尾进行群体结构和亲缘关系分析, 结果显示, 两个群体在亲缘关系上接近, 没有明显的群体分层, 但未患病群体的遗传分化明显低于患病群体。对 192 尾大口黑鲈重测序个体, 通过全基因组关联分析和选择信号分析, 定位了与抗维氏气单胞菌 (*Aeromonas veronii*) 相关的染色体区段及变异位点, 并在 2、5、12 和 17 号染色体中定位了 12 个与抗病相关的候选基因。其中 *cxadr* 和 *vtcn1* 基因在免疫应答中作用明显, 多个免疫球蛋白轻链基因 (*igl*) 可能在鱼类免疫中发挥重要作用。

[关键词] 大口黑鲈; 维氏气单胞菌; 全基因组关联分析; 抗病基因; 遗传分化

[中图分类号] S 963

Identification of Candidate Genes for *Aeromonas veronii* Resistance in Largemouth Bass (*Micropterus salmoides*) Using Genome-Wide Association Analysis

DU Jinhui¹, YE Kun¹, ZHOU Fan², ZHANG Haixin³, ZHANG Yanping³, CHEN Wenjing³,
LI Wanbo¹, XU Xiandong³, HAN Fang¹

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Zhejiang Fisheries Technology Extension Station, Hangzhou 310012; 3. Jiangxi Fisheries Research Institute, Nanchang 330039, China)

Abstract: To reduce false positives, population structure and kinship analyses were conducted on both diseased and healthy largemouth bass. The results showed that the two groups were closely related without significant population stratification, though the genetic differentiation of the healthy group was significantly lower than that of the diseased group. A performed genome-wide association analysis and selective signal analysis based on 192 resequenced largemouth bass (*Micropterus salmoides*) individuals were to identify chromosomal regions and genetic variants associated with resistance to *Aeromonas veronii*. Ultimately, 12 candidate genes associated with disease resistance were identified on chromosomes 2, 5, 12, and 17. Notably, the *cxadr* and *vtcn1* genes exhibi-

[收稿日期] 2024-06-13

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (32072969); 福建省教育厅面上项目 (JAT210242); 浙江省水产新品种选育重大科技专项 (2021C02069-2)

[通信作者] 韩芳 (1981—), 女, 教授, 博导, 从事鱼类生物技术方向研究。E-mail: hanfangyc@jmu.edu.cn

ted significant roles in immune response, and multiple immunoglobulin light chain genes (*igl*) may play crucial roles in fish immunity.

Keywords: *Micropterus salmoides*; *Aeromonas veronii*; genome-wide association analysis (GWAS); disease resistance gene; genetic differentiation

0 引言

大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*), 俗称加州鲈, 隶属于鲈形目 (Perciformes) 太阳鱼科 (Centrarchidae) 黑鲈属 (*Micropterus*), 是一种栖息在北美河流和淡水湖泊的大型食肉鱼类。经引进, 现该物种已成为我国重要的淡水养殖品种^[1-2]。近年来, 我国的大口黑鲈养殖业遭遇病害暴发, 尤其是多种细菌和病毒的大规模传播, 如诺卡氏菌属 (*Nocardia*) 和气单胞菌属 (*Aeromonas*) 等, 使大口黑鲈养殖业遭受了巨大的经济损失^[3]。

维氏气单胞菌 (*Aeromonas veronii*) 隶属于气单胞菌科 (Aeromonadaceae) 气单胞菌属 (*Aeromonas*), 是一种人、兽及水生生物共患的传染性病原菌, 广泛分布于水体环境中。水生生物在免疫力低下或体表有创伤的情况下更容易感染该菌, 病害暴发时可造成较高的死亡率, 如 2014 年四川某水库的大口黑鲈因感染维氏气单胞菌出现大面积死亡, 死亡率高达 60%^[4-5]。维氏气单胞菌是引起淡水鱼败血症和溃疡的重要病原菌^[6], 鱼类被感染后一般表现为皮肤溃疡、体表或内脏出血等^[7]。有研究表明, 大口黑鲈感染维氏气单胞菌后游动缓慢, 背部出现溃疡灶, 溃疡周围滋生水霉^[8]。鲤 (*Cyprinus carpio*)^[9]、斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*)^[10]、罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[11] 等被感染后也表现为体表溃疡、体表或内脏出血等症状。除了淡水鱼, 海水鱼中也有维氏气单胞菌的病害报道, 如维氏气单胞菌导致大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 出现肝脏结节^[12], 引起鳗鲡肠炎和烂鳃等^[13]。

维氏气单胞菌引起的疾病主要依赖药物进行防治, 但治疗效果欠佳, 如江西省高安市怡佳仁生态园的大口黑鲈在患病期间一直用药物治疗, 但是病害得不到有效控制, 患病鱼陆续死亡。所以对特定病原进行抗病基因及其遗传机制的研究, 并选育抗病品系在大口黑鲈养殖中显得尤为迫切。本研究以江西省高安市怡佳仁生态园养殖场的两批来源不同且抗维氏气单胞菌能力差异明显的大口黑鲈为研究对象, 对这两批鱼进行 DNA 样本的采集和基因组重测序, 分析其群体结构和亲缘关系, 并利用全基因组关联分析 (genome-wide association analysis, GWAS) 和选择信号分析等方法挖掘与大口黑鲈抗维氏气单胞菌相关的基因位点, 以为大口黑鲈的抗病育种研究提供一定的数据支持。

1 材料及方法

1.1 材料

本研究所用的 200 尾大口黑鲈样本于 2022 年 10 月采自江西省高安市怡佳仁生态园大口黑鲈养殖场, 其中患病群体 (susceptible population, SP) 和未患病群体 (disease resistant population, DRP) 各 100 尾。这两个群体分别来源于不同的育苗场, 两组鱼在相同的养殖条件下饲养, 包括相同的水温、饲料和管理措施, 以保证试验条件的一致性。患病大口黑鲈平均体长 21.2 cm, 未患病大口黑鲈平均体长 22.6 cm。自 2022 年 7 月起, 患病群体因感染维氏气单胞菌陆续患病死亡, 到 2022 年 10 月, 患病率超过 90%, 死亡率超过 50%; 未患病群体在相同的养殖条件下, 在患病群体持续发病的 7—10 月共 3 个月期间, 一直保持着健康的状态。

1.2 病原菌的分离鉴定

患病鱼体表出现溃疡, 肝脏、脾脏及肾脏等器官出现结节。对其肝脏、脾脏、肾脏和肠道等部位进行病原菌分离, 对分离菌进行生理生化特性反应、16S rDNA 序列鉴定、系统发育树构建、回归感染试验以及药敏试验。

1.3 DNA 样本采集与测序

剪取两组大口黑鲈的胸鳍,放入75%的酒精中保存。利用南京诺唯赞 DNA 提取试剂盒分别提取两组样本的DNA。将提取的大口黑鲈基因组DNA送至北京诺禾致源 (Novogene) 科技股份有限公司进行DNA文库构建和测序。因成功提取的患病个体DNA只有96个(舍弃4尾DNA质量不合格样本),为方便测序,患病和未患病群体各送测96尾,共计192尾。

1.4 测序数据与变异位点的挖掘

对测序所得的192尾大口黑鲈的原始数据,进行测序数据与变异位点的挖掘。步骤如下:

1) 使用Trimomatic (v0.36) 软件^[14]过滤掉数据中的接头序列及质量不合格的碱基,得到高质量的reads,即clean data (CD);再用FastQC 软件^[15]对CD进行质量检测,并通过MultiQC 软件^[16]生成包含所有样本的质量评估报告,包括CD的长度、GC含量和重复率等信息。

2) 使用BWA (v0.7.17) 软件将质检后的CD与大口黑鲈的参考基因组(版本为ASM1485139v1)进行比对,生成bam格式的文件;再通过SAMtools (v1.11) 软件^[17]对bam文件进行排序和索引。

3) 使用GATK 4.2 软件^[18]去除建库过程中产生的冗余序列,通过GATK 4.2 中的HaplotypeCaller 工具完成SNP calling;并使用Beagle (v4.1) 软件对部分缺失的单核苷酸(single nucleotide polymorphism, SNP) 多态性进行基因型填充。

4) 使用PLINK (v1.9) 软件^[19]对生成的vcf文件进行过滤,排除可能影响后续全基因组关联分析(GWAS) 结果的低质量SNPs。

1.5 大口黑鲈群体结构与亲缘关系分析

由于本研究的患病和未患病两个大口黑鲈群体来源不同,为了确定这两个群体的亲缘关系,在全基因组关联分析前对两批大口黑鲈的群体来源和结构进行分析。我国养殖市场上的大口黑鲈大体可以分为优鲈系和台湾苗,为了确定本研究两个群体的遗传来源,在进行主成分分析时加入29尾福建漳平养殖的台湾苗样本(记为台湾群体, TW)。用PLINK (v1.9) 软件进行主成分分析(principal component analysis, PCA)。对221尾大口黑鲈的SNP数据集设置了10个主成分(principal component, PC), 选取所占比重最大的前两个主成分PC1和PC2用于绘制二维PCA图,以了解这3个大口黑鲈群体的群体结构。同时,也将PCA的结果作为后续全基因组关联分析的协变量,以降低假阳性。

在构建进化树时,同样也加入了29尾的台湾群体(TW) 样本,用以比较这3个群体间的亲缘关系。使用TASSEL (v5.2.4) 软件^[20],采用邻接法进行系统发育树的构建,使用在线软件iTol (Interactive Tree of Life) (<https://itol.embl.de/>) 对进化树进行修饰。

为了进一步分析患病和未患病两个大口黑鲈群体的血统来源和基因交流情况,加入了5个大口黑鲈群体,分别是台湾群体(TW)、漳州群体(ZZ)、三明群体(SM)、优鲈群体(U)和北方亚种群体(NN)。其中漳州群体(ZZ)为福建漳州养殖群体,三明群体(SM)为福建三明养殖群体,优鲈群体(U)和北方亚种群体为广东佛山养殖群体。采用ADMIXTURE 软件分析这7个群体的血缘关系,先预设了一个亚群数K,代表假设的祖先群体数量,并基于不同的K值进行分析,得到每个K值下个体的群体归属概率,然后通过交叉验证误差确定最优K值。

1.6 全基因组关联分析

在进行大口黑鲈抗维氏气单胞菌的全基因组关联分析时,以抗病表型(高抗组和低抗组)为分析基础,检测与维氏气单胞菌抗性相关的显著SNP位点。使用GEMMA (genome-wide efficient mixed-model association) 软件^[21]中的混合线性模型(mixed linear model, MLM)进行分析。为了校正群体结构的影响,将主成分分析的结果和每个个体的体重作为协变量加入全基因组关联分析中。为筛选出最有可能与抗病性状相关联的SNP位点,并评估它们与抗病性的相关性,设定显著关联的SNP位点的显著性阈值 $P_1=0.05/N$ 数,并建议显著性阈值 $P_2=1/N$ 数,其中N表示SNP位点数。

1.7 群体间遗传分化指数

本研究计算了 192 尾大口黑鲈的遗传分化指数(fixation index, FST)。使用 VCFtools 软件, 设滑动窗口的大小为 100 kb, 步长为 50 kb, 计算患病和未患病大口黑鲈群体间的 FST 值。为了更直观地展示遗传分化的结果, 使用 R 语言的“qqman”包绘制 Manhattan 图, 对 FST 值从大到小进行排序, 并以前 1% 为阈值线^[22], 将高于阈值线的 SNP 位点作为受选择的位点, 其所在的染色体区域可能携带与抗维氏气单胞菌相关的遗传变异。

1.8 群体间扩展单倍型纯合度

通过群体间扩展单倍型纯合度(cross population extended haplotype homozygosity, XP-EHH)可以确定选择作用所在的群体。当 XP-EHH 值为正时, 表明选择发生在试验群体; 反之, 则选择发生在参考群体。将未患病群体作为试验群体, 患病群体作为参考群体, 用 selscan (v1.1.0) 软件^[23] 计算这 2 个大口黑鲈群体的 XP-EHH 值。由于 XP-EHH 法得到的统计值近似遵循正态分布^[24], 为了提高结果的准确性, 使用 selscan 软件的 norm 参数对原始 XP-EHH 值进行了标准化处理, 将其转换为标准正态分布。随后, 将这些经过标准正态化处理的 XP-EHH 值按降序排列, 并以前 0.1% 的值作为显著性阈值。通过该阈值判断未患病和患病大口黑鲈 2 个群体之间是否发生选择作用, 并进一步筛选出受到选择的染色体区段。

1.9 候选基因的定位

综合以上 3 种方法的结果, 找到信号显著的染色体 P 值最大的 SNP 位点。用 SnpEff 软件^[25] 及大口黑鲈基因组注释文件进行变异位点的注释。根据大口黑鲈基因组注释文件, 在该 SNP 位点上下游 500 kb 范围内找出对应的基因, 并在 GeneCards 数据库对这些基因进行功能注释, 识别出可能与大口黑鲈抗维氏气单胞菌相关的候选基因。

1.10 连锁不平衡衰减分析

对筛选到与抗病相关的 SNP 基因组区域进行连锁不平衡(linkage disequilibrium, LD)衰减分析, 可判断其关联程度及提高候选基因筛选的准确性。先用 VCFtools 软件提取 vcf 文件中所筛选出的 SNP 基因组区域, 然后用 PopLDdecay 软件计算其 LD 值, 再用 R 语言的“ggplot2”包绘制 LD 衰减图。

2 结果与分析

2.1 病原菌的鉴定结果

从患病大口黑鲈的肾脏结节部位分离出一株优势菌, 菌株氧化酶反应、葡萄糖发酵、硝酸盐还原以及产氨等表现为阳性, 革兰氏染色、甲基红等呈阴性, 与维氏气单胞菌的生化指标一致。分离菌株的 16S rDNA 序列与维氏气单胞菌聚为一支, 相似性达 98%。因此, 该菌株被鉴定为维氏气单胞菌。

2.2 测序数据与变异位点的挖掘

对 192 尾大口黑鲈的 DNA 进行了基因组重测序, 共获得 667 Gb CD, 基因组大小为 930.57 Mb, 平均测序深度为 4.03 倍。经 SNP calling、质控及过滤, 最终保留了 2 403 294 个高质量 SNP 位点用于后续的分析。大口黑鲈 23 条染色体的 SNP 数量如图 1 所示, 由图 1 可见, SNP 比较均匀地分布在每条染色体上。

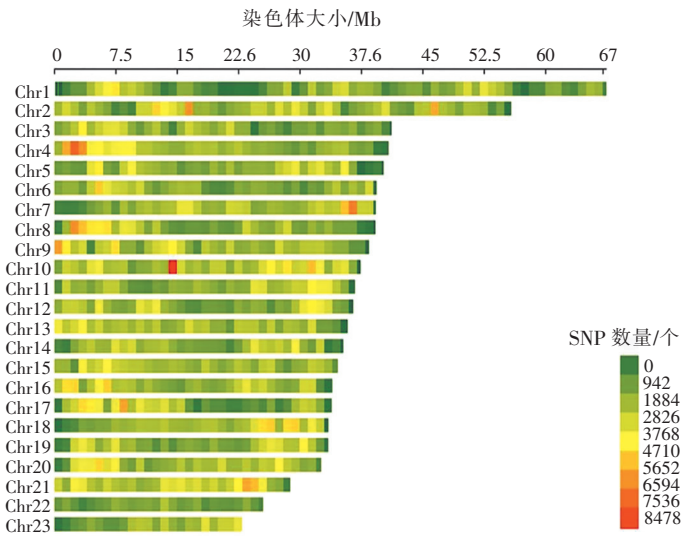


图 1 大口黑鲈每条染色体每 1 Mb 的 SNP 密度图
Fig.1 SNP density plot in the 1 Mb range of each chromosome of largemouth bass

2.3 群体结构与亲缘关系

对未患病 (DRP)、患病 (SP) 及台湾 (TW) 3 个大口黑鲈群体进行了主成分分析 (PCA)。从主成分分析散点图 (见图 2) 中可以看出, 第一主成分 (PC1) 占总变异的 7.51%, 第二主成分 (PC2) 占 7.06%, 前两个主成分贡献了总变异的 14.57%。由图 2 还可以看出 DRP 与 SP 大口黑鲈群体有明显的交集, 说明这两个群体遗传上较为接近; 然而, 患病和未患病群体都与台湾群体明显分离, 表明它们与台湾群体有明显的遗传差异。根据 PCA 的结果, 将 10 个 PC 作为协变量加入 GWAS 分析的模型中, 以校正群体结构的影响, 降低假阳性率。

对 3 个大口黑鲈群体构建的系统发育树如图 3 所示。进化树主要分为 3 大支, DRP 和 SP 群体有一定的交集, 而 DRP、SP 群体与 TW 群体明显分层; 表明 SP 群体中部分个体与 DRP 群体遗传距离关系较近, 而 DRP、SP 群体均与 TW 群体遗传距离较远, 这与 PCA 结果一致。

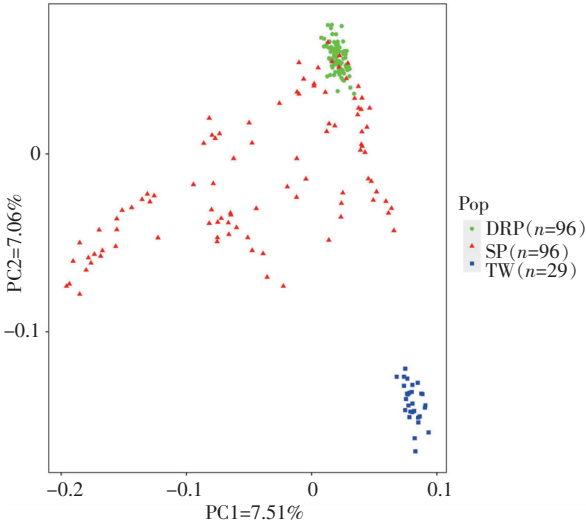


图 2 3 个大口黑鲈群体主成分分析图
Fig.2 Principal component analysis of three largemouth bass populations

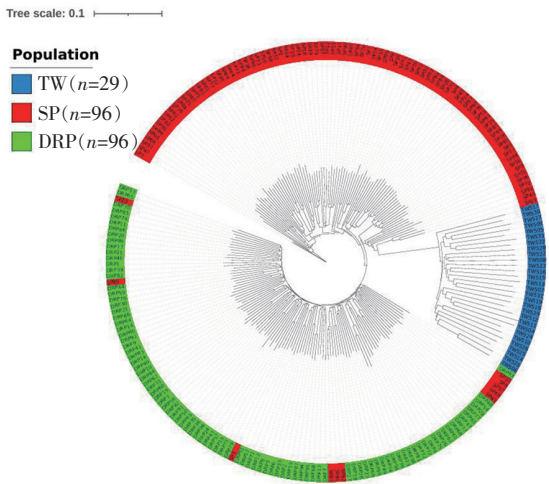
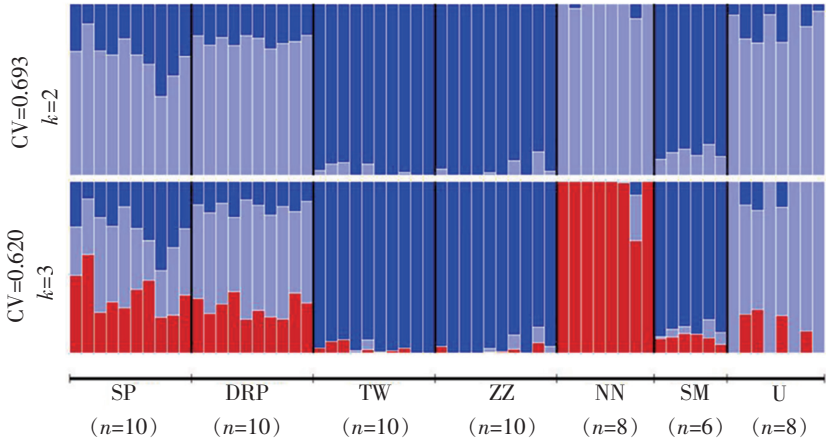


图 3 3 个大口黑鲈群体系统发育树
Fig.3 The phylogenetic tree of three largemouth bass populations

对 7 个大口黑鲈群体进行血缘关系分析, 得到的结果如图 4 所示。由图 4 可知, 当 $K = 3$ 时误差最小 (0.620), 此时的结果表明, DRP 和 SP 群体的祖先来源十分相似, 都来源于优鲈系, 两个群体的血缘关系比较接近, 这与 PCA 及系统发育树分析的结果相一致; ZZ 和 SM 与 TW 来源相似, 应都来源于台湾苗, 而与 SP、DRP、NN 和 U 群体的祖先来源不同。



每个竖条代表一个个体; 不同的颜色代表不同的祖先群体;
颜色的长度表示祖先群体在该个体基因组中所占比例。

图 4 7 个大口黑鲈群体血缘关系

Fig.4 Genetic relationship of seven largemouth bass populations

2.4 全基因组关联分析结果

本研究使用 GEMMA 软件的 MLM 模型对 192 尾大口黑鲈进行全基因组关联分析，并将 PCA 结果和每个个体的体重作为协变量纳入关联分析。计算了 2 403 294 个 SNP 与大口黑鲈抗维氏气单胞菌相关的阈值 P 。计算结果为： $P_1 = 0.05/2\,403\,294 = 2.08 \times 10^{-8}$ ($-\lg P = 7.68$)， $P_2 = 1/2\,403\,294 = 4.16 \times 10^{-7}$ ($-\lg P = 6.38$)。根据全基因组关联分析的结果绘制了曼哈顿图（见图 5）。从图 5 可以看出，信号簇主要集中在 5 号和 17 号染色体上，5 号染色体上有 9 个 SNP 位点的 P 值超过了建议显著性阈值，17 号染色体上有 4 个 SNP 位点的 P 值超过了建议显著性阈值，同时 2 号染色体上也存在一定的信号簇。

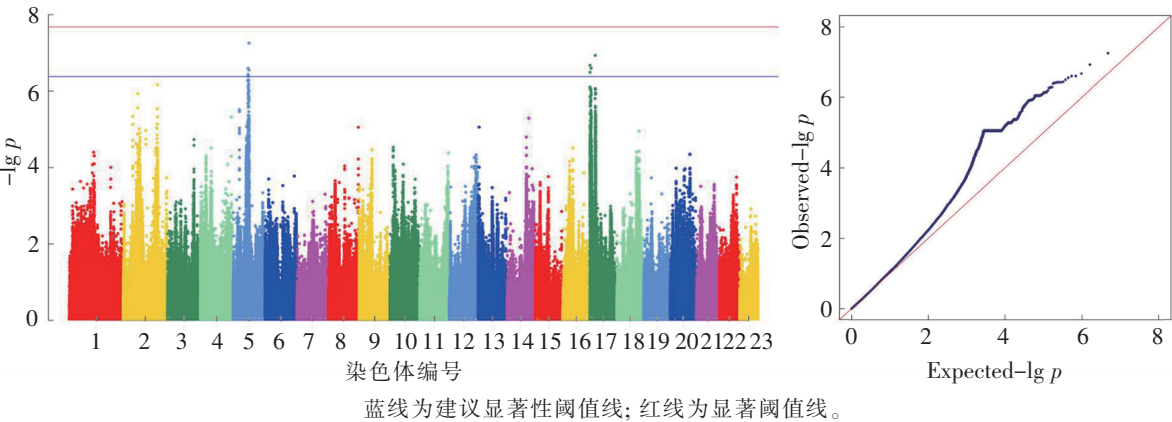


图 5 大口黑鲈抗病 GWAS 曼哈顿图和 QQ 图

Fig.5 The Manhattan plots and QQ plots of GWAS in largemouth bass disease-resistant

2.5 群体间遗传分化指数计算结果

通过 VCFtools 软件计算得到了每个滑动窗口大口黑鲈 SNP 位点的 F_{ST} 值，并将阈值线定为 F_{ST} 值的前 1%，即 0.1431（见图 6 中红线），其中高于阈值线的 SNP 位点共有 162 个，占总 SNP 数的 0.94%。且 2、12 和 17 号染色体中均有比较明显的信号，又以 12 号染色体的信号最为明显（其 F_{ST} 值为 0.2804）。

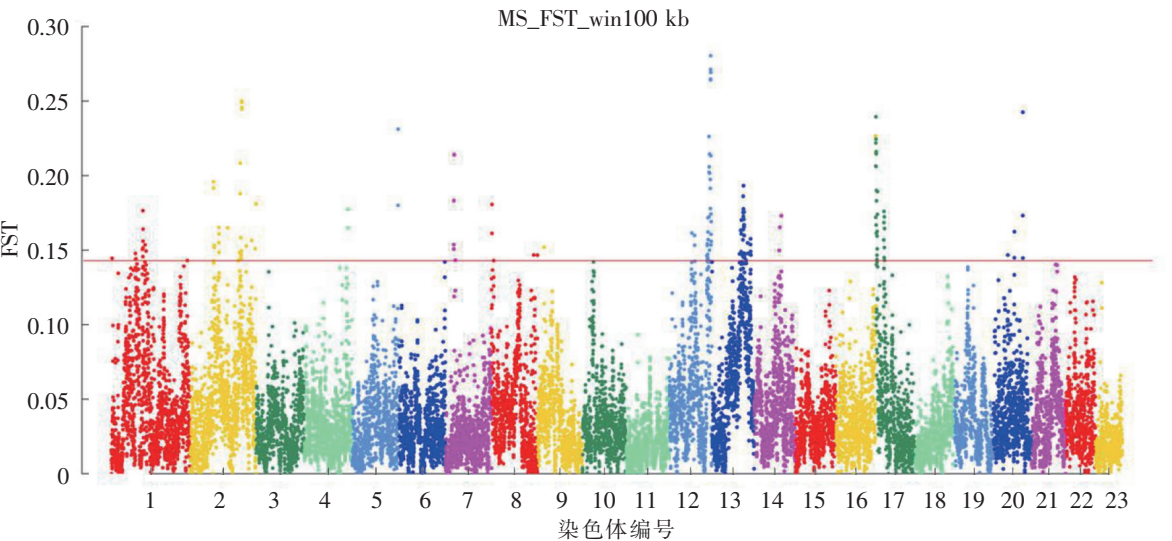


图 6 大口黑鲈遗传分化指数 F_{ST} 分析

Fig.6 F_{ST} analysis of genetic differentiation of largemouth bass

2.6 群体间扩展单倍型纯合度（XP-EHH）结果

两个大口黑鲈群体的 XP-EHH 值见图 7。DRP 群体在 1、2、5、12、17、18 和 22 号染色体上存

在较为明显的选择区段,其中以2、5和12号染色体最为明显;前0.1% XP-EHH 值为3.7136,高于阈值线的 SNP 位点有2055个;XP-EHH 值最高的位点位于12号染色体,其值为6.5925。

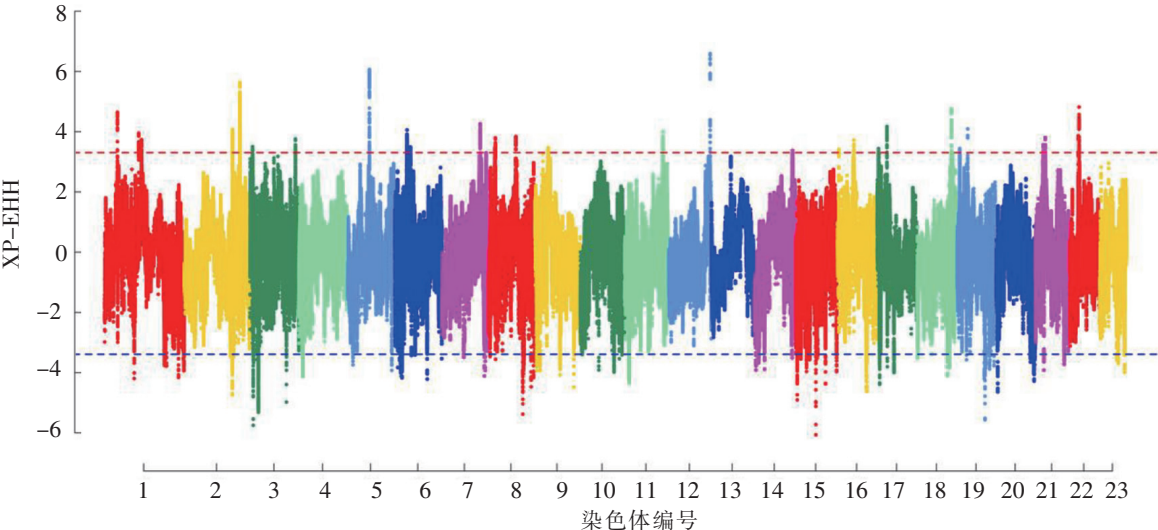


图7 患病和未患病大口黑鲈的 XP-EHH 选择信号分布
Fig.7 The XP-EHH selection signal distribution of susceptible population and disease resistant population of largemouth bass

2.7 候选基因的定位结果

全基因组关联分析结果显示,具有明显信号簇的染色体为2、5和17号;FST 结果显示,2、12和17号染色体的信号比较明显;XP-EHH 结果显示,2、5和12号染色体的信号比较明显。综合三种分析结果,将与大口黑鲈抗维氏气单胞菌相关的基因定位在2、5、12和17号染色体上。

在 GWAS 的结果中,2号染色体上 *P* 值最大的2个为5.93 (位置:18418515)和6.17 (位置:43213281);5号染色体上 *P* 值最大的2个为7.26 (位置:19957424)和6.60 (位置:18957120);17号染色体上 *P* 值最大的3个为6.67 (位置:300300)、6.60 (位置:1796497)和6.93 (位置:6933123)。在 FST 的结果中,2号染色体上 FST 值最大为0.25 (位置:43700001—43750001);12号染色体上 FST 值最大为0.28 (位置:35200001—35250001);17号染色体上 FST 值最大为0.24 (位置:150001—200001)。在 XP-EHH 的结果 (见表1)中,2号染色体上最大值为5.63 (位置:46924782);5号染色体上最大值为6.07 (位置:18531341);12号染色体上最大值为6.59 (位置:35238352)。综合以上结果,截取了4条染色体上 *P* 值最大的 SNP 位点的上下游各500 kb (2号:43250005—44248590;5号:18501150—20004883;12号:34750177—35749951;17号:6617988—7617455和70—526904)寻找并确定候选基因。

在2号染色体上找到4个候选基因,分别是柯萨奇病毒和腺病毒受体 (coxsackievirus and adenovirus receptor,*cxadr*)、含有 ν 细胞活化抑制剂1的 ν 型结构域 (ν -set domain containing T-cell activation inhibitor 1-like,*vtcn1-like*)、fc 受体蛋白 (Fc receptor-like protein 5,*fcr15*)和基质重塑相关蛋白5 (matrix-remodeling-associated protein 5-like,*mxra5-like*)。候选基因的相关信息见表2。

在5号染色体上找到3个候选基因,分别是原钙黏蛋白 γ -A11 (protocadherin gamma-A11-like, *pcdhy-A11-like*)、原钙黏蛋白 β -15 (protocadherin beta-15-like, *pcdh β -15-like*)和原钙黏蛋白 β -16 (protocadherin beta-16-like, *pcdh β -16-like*)。

在12号染色体上找到2个候选基因,分别是*f7* (nuclear factor 7, *f7*)和整合素亚基 α -L (integrin alpha L, *itgal*)。

在17号染色体上找到3个候选基因,分别是免疫球蛋白 Lambda 位点 (immunoglobulin light chain, *igl*)、免疫球蛋白 Lambda 多肽1 (*igll1*)和唾液酸结合 Ig 样凝集素1 (sialoadhesin-like, *siglec1*)。

表 1 与大口黑鲈抗病相关的 SNP 位点信息

Tab. 1 The SNPs information related to disease resistant of largemouth bass

染色体编号	SNP 名称	参考等位基因	替代等位基因	最小等位基因频率	突变类型
2	Chr2_43305349	C	T	0.0500	无义突变
5	Chr5_18827475 *	G	T	0.4062	内含子变异
	Chr5_18834722 *	T	C	0.4036	内含子变异
	Chr5_18949871 *	G	C	0.4036	内含子变异
	Chr5_18957120 *	T	C	0.4062	内含子变异
	Chr5_18979096 *	A	C	0.3984	下游基因变异
	Chr5_19246990 *	G	A	0.4036	上游基因变异
	Chr5_19247054 *	C	G	0.4036	上游基因变异
	Chr5_19930610 *	T	C	0.4297	下游基因变异
	Chr5_19957424 *	T	A	0.4245	下游基因变异
12	Chr12_35245867	G	A	0.2214	翻译起始缺失
	Chr12_35309891	A	G	0.0781	无义突变
17	Chr17_6658278	C	A	0.0535	无义突变
	Chr17_6726887	A	G	0.1458	无义突变
	Chr17_6933123 *	T	G	0.1484	上游基因变异

注：* 表示超过阈值线的 SNP 位点。

表 2 显著 SNP 位点附近与大口黑鲈抗病相关的候选基因

Tab. 2 The candidate genes associated with disease resistance in largemouth bass near significant SNPs

基因编号	基因名	染色体	基因位置	基因功能
LOC119911602	<i>cxadr</i>	2	42851303—43305413	促进 T 细胞增殖进而刺激上皮组织修复
LOC119911652	<i>vtcn1-like</i>	2	43319537—43326340	在抑制肿瘤相关抗原特异性 T 细胞免疫中起重要作用
LOC119911991	<i>fcrl5</i>	2	43673366—43680167	可能参与外周淋巴器官的 B 细胞发育和分化,在边缘区 B 细胞中具有免疫调节作用
LOC119911605	<i>mxra5-like</i>	2	44014369—44044834	在肾脏中,通过限制趋化因子、纤连蛋白和胶原蛋白的表达来响应 TGB1 和促炎刺激,具有抗炎和抗纤维化特性
LOC119889225	<i>pcdhγ-A11-like</i>	5	18540326—18801745	在特定细胞间神经连接的建立和功能中起着关键作用
LOC119889252	<i>pcdhβ-16-like</i>	5	18531560—18534379	在特定细胞间神经连接的建立和功能中起着关键作用
LOC119889253	<i>pcdhβ-15-like</i>	5	18577567—18580792	在特定细胞间神经连接的建立和功能中起着关键作用
LOC119899887	<i>f7, brain-like</i>	12	35268941—35272187	在血液凝固中起重要作用
LOC119899876	<i>utgal</i>	12	35245792—35268780	参与多种免疫反应,包括白细胞-内皮细胞相互作用、细胞毒性 T 细胞介导的杀伤以及粒细胞和单核细胞的抗体依赖性杀伤,与 ICAM3 结合有助于巨噬细胞凋亡中性粒细胞吞噬作用。在淋巴组织生成中起作用
LOC119907319	<i>igl</i>	17	493863— 514602	在识别外来抗原和启动免疫反应中起重要作用,其相关通路包括免疫应答 Fc epsilon RI 通路和免疫应答中的 NFAT
LOC119908041	<i>igl</i>	17	6658248—6658752	在识别外来抗原和启动免疫反应中起重要作用,其相关通路包括免疫应答 Fc epsilon RI 通路和免疫应答中的 NFAT

续表

基因编号	基因名	染色体	基因位置	基因功能
LOC119908135	<i>igl</i>	17	6773240—6773742	在识别外来抗原和启动免疫反应中起重要作用,其相关通路包括免疫应答 Fc epsilon RI 通路和免疫应答中的 NFAT
LOC119908052	<i>igl</i>	17	6676832—6678467	在识别外来抗原和启动免疫反应中起重要作用,其相关通路包括免疫应答 Fc epsilon RI 通路和免疫应答中的 NFAT
LOC119907467	<i>igll1</i>	17	6726260—6727325	对 B 细胞发育至关重要,该基因的突变可导致 B 细胞缺乏症和无丙种球蛋白血症
LOC119906820	<i>siglec1</i>	17	6994015—7002274	通过与唾液酸化细菌结合来促进适应性免疫反应的有效吞噬作用和抗原呈递,在限制细菌传播方面起着至关重要的作用。通过 TYROBP 和 TRIM27 介导的泛素化促进 TBK1 降解,在抑制抗病毒先天免疫中发挥作用

2.8 LD 衰减分析结果

从图 8 可以看出,随着距离的增加,LD 衰减的速度逐渐加快,在较近的距离范围内,两个位点之间的连锁不平衡程度较高;而在较远的距离范围内,两个位点之间的连锁不平衡程度较低。

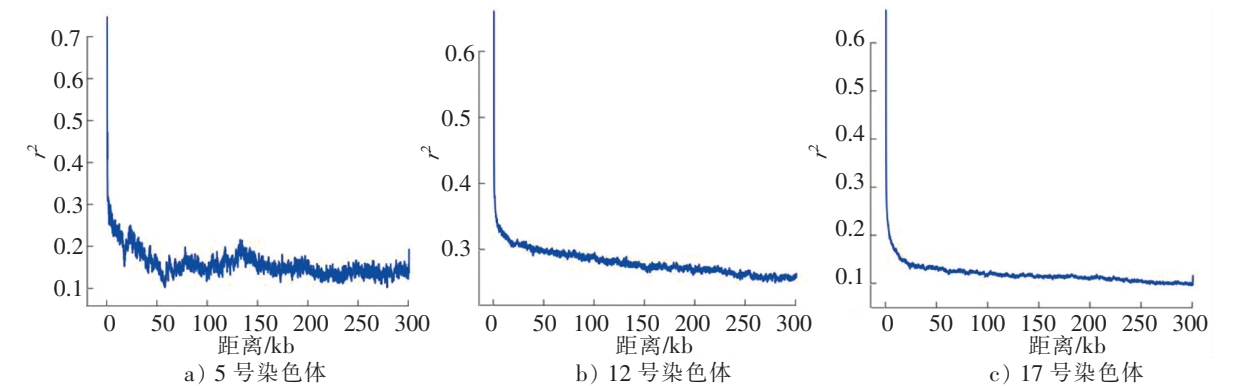


图 8 抗病相关 SNP 位点基因组区域 LD 衰减
Fig.8 LD decay in genomic regions of disease resistance associated SNP

3 讨论

本研究 PCA、系统发育树及血缘关系的结果显示,患病和未患病大口黑鲈群体亲缘关系接近,没有明显的群体分层,均来源于优鲈系,且未患病群体的遗传分化明显低于患病群体。因此,推测患病和未患病群体虽均来源于优鲈系,但未患病群体可能在最近世代中因维氏气单胞菌感染,经选择和淘汰后,存活个体繁育的后代获得了对该菌的抵抗能力。PCA 图中未患病个体聚集紧密,遗传分化低,也反映出该群体内亲缘关系近,可能是少量抗病存活个体的后代。

本研究在 4 条染色体上共找到 14 个 SNP 位点和 12 个可能与大口黑鲈抗维氏气单胞菌相关的基因。这些 SNP 位点大部分分布在编码区和调控区。位于编码区的 Chr12_35309891 和 Chr17_6658278 等的 SNP 属于无义突变,这些位点的变异可导致相关蛋白质的翻译过程提前终止,直接影响蛋白质的结构和功能,进而可能导致抗病能力的差异。也有一些 SNP 位于上下游调控区,可能影响相关基因的表达水平。这些 SNP 位点基本都在 GWAS 阈值线以上,说明与抗病有比较明显的关联,后续也

将尝试从这些位点中开发与抗病相关的分子标记。从 SNP 所在的基因组区域的 LD 衰减图可以看出, 在较近的距离范围内, 两个位点之间的连锁不平衡程度较高, 在较远距离则相对较低, 这意味着在研究 SNP 与疾病之间的关系以及挖掘相关的基因时, 需要考虑这种距离效应。

本研究定位的基因中, *cxadr* (柯萨奇病毒和腺病毒受体) 可促进 T 细胞增殖, 刺激上皮组织的修复。Luissint 等^[26]发现该基因在结肠癌中具有抑制肿瘤作用, 表明 *cxadr* 可能在大口黑鲈抗病方面起作用。研究^[27]还表明, 人体 *CXADR* 基因的两个单核苷酸多态性 (SNP) 与胰岛自身免疫的易感性增加有关, 这也暗示其表达可能与未患病群体的抗病能力相关。Wang 等^[28]发现, *VTCN1* (含有 v 细胞活化抑制剂 1 的 v 型结构域) 在多种疾病中异常表达, 抑制 T 细胞免疫应答, 促进免疫逃逸。Xia 等^[29]的研究表明, *Vtcn1* 在小鼠白血病中具有肿瘤抑制作用。有研究^[30]表明 *VTCN1* 表达受限会加剧自身免疫疾病的症状。因而推测 *vtcn1* 在大口黑鲈感染维氏气单胞菌后的表达模式: 未患病群体中 *vtcn1* 正常表达, 使其对体表溃疡和其他炎症具有保护效果; 而易感群体中 *vtcn1* 表达下降 ($P < 0.05$), 加剧了维氏气单胞菌导致的症状。*fer15* 和 *mxra5* 基因在抗炎及其免疫反应中也具有类似的作用。

本研究在 5 号染色体的显著 SNP 附近找到 3 个原钙黏蛋白基因簇的成员 (*pcdhγ-A11-like*、*pcdhβ-16-like* 和 *pcdhβ-15-like*), 其具体功能有待研究, 很可能在特定细胞间神经连接中起关键作用^[31]。Zhang 等^[32]在小鼠的 7 号染色体上鉴定出 *Stsl6* 和 *Stsl7* 两个位点, 在 *Stsl7* 区域, 他们发现整合素 α -L (*Itgal*) 基因中携带沙门氏菌特有的功能丧失变异。*Itgal* 功能丧失增加小鼠对沙门氏菌的易感性。Smith 等^[33]发现, 小鼠中与细菌控制和细胞因子相关的多个数量性状位点, 包括 *Itgal* 基因中的功能丧失突变位点, 导致其受细菌感染的肺部中抗原特异性 T 细胞减少, 并且这些 T 细胞中并未表达该基因。Koutsogiannaki 等^[34]也得到了类似的结果, 通过敲除小鼠中的 *Itgal*, 发现其体内细菌载量减少, 并且减少了小鼠中性粒细胞的死亡, 同时增强了中性粒细胞的吞噬作用, 即 *Itgal* 可以作为细菌引起的脓毒症的新靶点。这些研究结果表明 *Itgal* 参与小鼠多种细菌感染后的免疫反应。*ITGAL* 在牛^[35]、狗^[36]、兔^[37]和人^[38]的疾病中均发挥重要的保护作用, 推测该基因在大口黑鲈抗菌过程中也起到了关键作用。

值得注意的是, 本研究在 17 号染色体中定位的 6 个候选基因中有 5 个都是免疫球蛋白轻链 (*igl*) 及其家族基因, 表明该基因存在多个拷贝, 需进一步研究。Ozturk 等^[39]研究了褐鳟 (*Salmo trutta*) 品系及其杂交种对格氏乳球菌 (*Lactococcus garvieae*) 和鲁氏耶尔森菌 (*Yersinia ruckeri*) 的敏感性, 并分析了褐鳟免疫相关基因的组织表达谱, 发现未患病群体中的免疫相关基因如 *mhc-i* 和免疫球蛋白轻链 (*igl*) 等都是高表达。Zhang 等^[40]对虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 注射脂多糖 (LPS) 模拟细菌感染, 激活免疫系统并引起炎症反应, 发现 *igl* 在虹鳟脾脏和肠道中上调表达, 参与免疫应答。Tian 等^[41]研究发现, 大黄鱼 (*Lavimichthys crocea*) 具有 21 个免疫球蛋白轻链 (*igl*) 基因, 病原刺激后, 其中 3 种 *igl* 在肾和脾脏组织中表达上调。这些研究表明 *igl* 基因在鱼类识别外来抗原和启动免疫反应中起重要作用, 推测该基因家族在大口黑鲈抗菌中也发挥关键作用。*siglec1* 基因编码的蛋白质是一种免疫球蛋白受体, 主要表达在巨噬细胞、树突状细胞和自然杀伤细胞等免疫细胞表面, 参与调节免疫反应。*siglec1* 与肿瘤、自身免疫性疾病和细菌感染等有关, 在限制细菌传播方面起重要作用。Kong 等^[42]对尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 注射无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*), 发现感染后 *siglec1* 在前肾和脾脏中的表达显著上调, 巨噬细胞对无乳链球菌的吞噬能力增强, 这表明 *siglec1* 在尼罗罗非鱼中具有促进巨噬细胞吞噬活性的功能。

4 结论

通过分析患病和未患病两个大口黑鲈群体的群体结构和亲缘关系, 发现这两个群体均来自优鲈群体, 亲缘关系接近, 遗传分化不大。通过 GWAS 等方法在 2、5、12 和 17 号染色体上挖掘到 14 个 SNP 位点以及 12 个可能在大口黑鲈抗维氏气单胞菌病中发挥重要作用的候选基因, 如 *cxadr*、*vtcn1* 和

igl 等,为大口黑鲈的抗病育种研究提供了数据支撑,但这些基因在免疫过程中的具体作用仍需进一步探究。后续会对其他大口黑鲈群体进行攻毒试验,对筛选到的 SNP 位点进行验证分析,用于开发相关分子标记。对挖掘到的候选功能基因也会进行验证以及抗菌功能的研究。

[参考文献]

- [1] 谭爱萍,赵飞,郭忠宝,等.大口黑鲈白皮病病原菌的分离鉴定及药物敏感性试验[J].微生物学通报,2022,49(5):1741-1758.
- [2] DENG G, LI S, XIE J, et al. Characterization of a ranavirus isolated from cultured largemouth bass (*Micropterus salmoides*) in China[J]. Aquaculture, 2011, 312(4):198-204.
- [3] 杨超,董浚键,刘志刚,等.大口黑鲈源维氏气单胞菌的分离鉴定[J].南方水产科学,2021,17(3):54-61.
- [4] 康元环,张冬星,杨滨瑾,等.维氏气单胞菌最新研究进展[J].中国人兽共患病学报,2018,34(5):452-459.
- [5] 李聪,蔡岩,周永灿,等.海南罗非鱼致病性维氏气单胞菌分离鉴定及药敏特性研究[J].水产科学,2015,34(10):640-646.
- [6] TEKEDAR H C, KUMRU S, BLOM J, et al. Comparative genomics of *Aeromonas veronii*: identification of a pathotype impacting aquaculture globally[J]. PloS One, 2019, 14(8):e0221018.
- [7] MCGAREY D J, MILANESI L, FOLEY D P, et al. The role of motile *Aeromonas* in the fish disease, ulcerative disease syndrome (UDS) [J]. Experientia, 1991, 47(5):441-444.
- [8] 邓龙君.大口黑鲈维氏气单胞菌的分离鉴定及其感染的病理损伤[J].河南农业科学,2021,50(1):164-171.
- [9] 裴立硕,刘彬,韩卓然,等.鲤致病性维氏气单胞菌的分离鉴定及生物学特性分析[J].南方农业学报,2023,54(7):2184-2194.
- [10] 田浪,温贵兰,张升波,等.斑点叉尾鮰源致病性维氏气单胞菌的分离与生物学特性鉴定[J].中国畜牧兽医,2018,45(11):3203-3210.
- [11] 黎炯,叶星,卢迈新,等.罗非鱼维氏气单胞菌的分离鉴定和药敏试验[J].水生态学杂志,2011,32(3):132-136.
- [12] 李忠琴,张坤,林茂,等.大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)致病性维氏气单胞菌的分离鉴定与药敏特性研究[J].海洋与湖沼,2017,48(1):139-147.
- [13] 王巧煌.鳊鲃源气单胞菌毒力基因及其耐药性分析[J].大连海洋大学学报,2024,39(3):1-15.
- [14] BOLGER A M, LOHSE M, USADEL B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. Bioinformatics, 2014, 30(15):2114-2120.
- [15] BROWN J, PIRRUNG M, MCCUE L A. FQC Dashboard: integrates FastQC results into a web-based, interactive, and extensible FASTQ quality control tool[J]. Bioinformatics, 2017, 33(19):3137-3139.
- [16] EWELS P, MAGNUSSON M, LUNDIN S, et al. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report[J]. Bioinformatics, 2016, 32(19):3047-3048.
- [17] LI H, HANDSAKER B, WYSOKER A, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools[J]. Bioinformatics, 2009, 25(16):2078-2079.
- [18] MCKENNA A, HANNA M, BANKS E, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data[J]. Genome Research, 2010, 20(9):1297-1303.
- [19] PURCELL S, NEALE B, TODD-BROWN K, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses[J]. American Journal of Human Genetics, 2007, 81(3):559-575.
- [20] BRADBURY P J, ZHANG Z, KROON D E, et al. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples[J]. Bioinformatics, 2007, 23(19):2633-2635.
- [21] VOGT F, SHIRSEKAR G, WEIGEL D. vcf2gwas: Python API for comprehensive GWAS analysis using GEMMA[J]. Bioinformatics, 2022, 38(3):839-840.
- [22] 杨宇昕,邹彬.基于温带和热带玉米群体全基因组 FST 和 XP-EHH 的选择信号检测[J].中国农业科学,2019,52(4):579-590.
- [23] SZPIECH Z A, HERNANDEZ R D. selscan: an efficient multithreaded program to perform EHH-based scans for positive selection[J]. Molecular Biology and Evolution, 2014, 31(10):2824-2827.

- [24] SABETI P C, VARILLY P, FRY B, et al. Genome-wide detection and characterization of positive selection in human populations [J]. *Nature*, 2007, 449 (7164) : 913-918.
- [25] CINGOLANI P. Variant annotation and functional prediction: SnpEff [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2022, 2493 : 289-314.
- [26] LUISANT A C, FAN S, NISHIO H, et al. CXADR-like membrane protein regulates colonic epithelial cell proliferation and prevents tumor growth [J]. *Gastroenterology*, 2024, 166 (1) : 103-116. e9.
- [27] NYGÅRD L, VALTA M, LAINE A P, et al. CXADR polymorphism rs6517774 modifies islet autoimmunity characteristics and exhibits sex disparity [J]. *Frontiers in Genetics*, 2023, 14 : 1248701.
- [28] WANG J Y, WANG W P. B7-H4, a promising target for immunotherapy [J]. *Cellular Immunology*, 2020, 347 : 104008.
- [29] XIA F, ZHANG Y, XIE L, et al. B7-H4 enhances the differentiation of murine leukemia-initiating cells via the PTEN/AKT/ROR2/RUNX1 pathways [J]. *Leukemia*, 2017, 31 (10) : 2260-2264.
- [30] VAISHNAV J, KHAN F, YADAV M, et al. V-set domain containing T-cell activation inhibitor-1 (VTCN1) : a potential target for the treatment of autoimmune diseases [J]. *Immunobiology*, 2022, 227 (6) : 152274.
- [31] HASEGAWA S, KOBAYASHI H, KUMAGAI M, et al. Clustered protocadherins are required for building functional neural circuits [J]. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2017, 10 : 114.
- [32] ZHANG J, TEH M, KIM J, et al. A loss-of-function mutation in the integrin alpha L (*Itgal*) gene contributes to susceptibility to salmonella enterica serovar typhimurium infection in collaborative cross strain CC042 [J]. *Infection and Immunity*, 2019, 88 (1) : e00656-19.
- [33] SMITH C M, PROULX M K, LAI R, et al. Functionally overlapping variants control tuberculosis susceptibility in collaborative cross mice [J]. *MBio*, 2019, 10 (6) : e02791-19.
- [34] KOUTSOGIANNAKI S, HOU L, OKUNO T, et al. α D β 2 as a novel target of experimental polymicrobial sepsis [J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13 : 1059996.
- [35] ZECCHINON L, FETT T, DESMECHT D. How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism [J]. *Veterinary Research*, 2005, 36 (2) : 133-156.
- [36] SCHWARTZ M, CARLSON R, TIPOLD A. Selective CD11a upregulation on neutrophils in the acute phase of steroid-responsive meningitis-arteritis in dogs [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2008, 126 (4) : 248-255.
- [37] KOTANI M, YAMAMURA Y, TAMATANI T, et al. Generation and characterization of monoclonal antibodies against rabbit CD4, CD5 and CD11a antigens [J]. *Journal of Immunological Methods*, 1993, 157 (2) : 241-252.
- [38] TANG Z, DAVIDSON D, LI R, et al. Inflammatory macrophages exploit unconventional pro-phagocytic integrins for phagocytosis and anti-tumor immunity [J]. *Cell Reports*, 2021, 37 (11) : 110111.
- [39] OZTURK R C, ALTINOK I, TURGUT S, et al. Comparative susceptibilities and immune-related gene expressions of brown trout strains and their hybrids infected with *Lactococcus garvieae* and *Yersinia ruckeri* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 91 : 264-274.
- [40] ZHANG N, ZHANG X J, SONG Y L, et al. Preferential combination between the light and heavy chain isotypes of fish immunoglobulins [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2016, 61 : 169-179.
- [41] TIAN C, DING Y, AO J, et al. Three isotypes of immunoglobulin light chains in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) : molecular cloning, characterization, and expression analysis [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30 (6) : 1249-1256.
- [42] KONG L, WU L, GUO Z, et al. A Siglec-1-like lectin from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) possesses functions of agglutination and mediation of macrophage phagocytic activity [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 102 : 203-210.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 黄力行)