

杨二军, 杨林桐, 王维政, 等. 军曹鱼响应低氧胁迫转录组 SNP 位点鉴定及其功能注释分析[J]. 海洋学报, 2022, 44(1): 113–124, doi:10.12284/hyxb2022006

Yang Erjun, Yang Lintong, Wang Weizheng, et al. Identification and functional analysis of SNP from transcriptome of cobia (*Rachycentron canadum*) in response to hypoxia stress[J]. Haiyang Xuebao, 2022, 44(1): 113–124, doi:10.12284/hyxb2022006

军曹鱼响应低氧胁迫转录组 SNP 位点 鉴定及其功能注释分析

杨二军¹, 杨林桐¹, 王维政¹, 黄建盛^{1,2,3*}, 张健东^{1,2,3}, 王忠良^{1,2,3}, 陈刚^{1,2,3*}

(1. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524088; 2. 南方海洋科学与工程广东省实验室(湛江), 广东 湛江 524025; 3. 广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室, 广东 湛江 524088)

摘要: 为了研究低氧胁迫下军曹鱼肠道转录组中单核苷酸多态性 (SNP) 标记位点及 SNP 所在基因 SNP-Unigene 的作用, 通过 SOAPSnp 软件对军曹鱼幼鱼对照组和低氧胁迫转录组测序结果进行 SNP 检测, 并将其比对到 GO、KOG、KEGG 数据库进行功能注释。结果显示, 军曹鱼转录组 SNP 位点分布在 26 120 条 SNP-Unigene 上, 共检测到 431 845 个 SNP 位点, SNP 平均发生频率约为 1/171 bp; SNP-Unigene 功能注释发现, 在低氧胁迫条件下, 军曹鱼 SNP-Unigene 主要涉及信号转导、传染病、癌症和内分泌系统等信号通路。进一步筛选到 3 417 条 SNP-Unigene 被注释到 MAPK 信号通路等 35 条与免疫相关的通路中。基于转录组差异基因分析, 检测了其中 7 个重要免疫通路中 18 个免疫相关基因的 SNP 位点分布情况。同时, 也检测了 HIF-1 信号通路中 *PIK3CA* 等 8 个差异基因的 SNP 位点分布情况。研究结果将为进一步挖掘免疫及低氧相关 SNP 的分子遗传标记奠定基础, 为军曹鱼低氧适应机制的深入研究提供科学参考。

关键词: 军曹鱼; 低氧胁迫; 转录组测序; 免疫基因; 单核苷酸多态性

中图分类号: S965.3

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2022)01-0113-12

1 引言

溶解氧 (Dissolved Oxygen, DO) 对水生动物的发育和健康至关重要^[1], 同时也是水生动物生存不可缺少的环境因子之一。溶解氧不足时, 机体的生长发育、呼吸、新陈代谢、繁殖及免疫功能等生化反应和生理功能会受到影响, 严重时会发生死亡^[2]。随着全球气候变暖和水体富营养化引发的一系列生态问题, 水体低氧化现象越来越严重。调查发现, 我国近岸海

域出现的低氧层 (DO 浓度约为 3 mg/L) 水域范围越来越大, 对生活在其中的海洋生物造成了极大的威胁, 低氧现象已成为一个被高度重视和广泛关注的问题^[3-4]。

军曹鱼 (*Rachycentron canadum*), 隶属于鲈形目 (Periformes), 军曹鱼科 (Rachycentridae), 军曹鱼属 (*Rachycentron*), 又名海鲷、海龙鱼等, 是热带和亚热带海域的广盐性、肉食性洄游鱼类。因其具有生长快、抗病能力强、营养丰富、肉质鲜美等特点, 使其

收稿日期: 2021-05-12; 修订日期: 2021-08-12。

基金项目: 南方海洋科学与工程广东省实验室(湛江)资助项目 (ZJW-2019-06); 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系资助项目 (CARS-47); 广东海洋大学本科生创新创业团队项目 (CCTD201804)。

作者简介: 杨二军 (1994—), 男, 甘肃省陇南市人, 主要研究方向海水鱼类养殖生理生态学。E-mail: 931471532@qq.com

* 通信作者: 黄建盛, 副教授, 主要研究方向为海水鱼养殖生理生态学。E-mail: huangjs@gdou.edu.cn; 陈刚, 教授, 主要研究方向为海水鱼养殖生理生态学。E-mail: cheng@gdou.edu.cn

成为我国南方沿海地区深水网箱养殖的重要品种之一^[5]。近年来,随着高密度集约化养殖模式的推广,军曹鱼近海浮动式网箱养殖和深海网箱养殖发展迅速,然而受养殖密度大、管理不善、养殖生态环境恶化、天气、温度等因素的影响,军曹鱼在养殖过程中容易出现缺氧、抗病能力下降等情况,导致病害日趋频繁,严重制约了军曹鱼的健康养殖发展^[6-7]。针对军曹鱼养殖过程中出现的缺氧问题,本实验室前期开展了低氧胁迫对军曹鱼幼鱼生长和血清生化指标、氧化应激、能量代谢以及肠道菌群影响的研究,结果表明,低氧胁迫对军曹鱼幼鱼的生理状况有显著影响^[7-12]。因此,开展军曹鱼的遗传改良和优良性状品种培育的工作,对促进我国军曹鱼养殖业健康快速的发展具有现实意义。

单核苷酸多态性(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)是指因单个核苷酸变异引起的DNA序列多态性,其形式包括单个碱基的转换、颠换、插入和缺失,是一种常见的基因突变^[13]。SNP作为第三代分子标记方法,是基因型和表型之间最好的研究载体,相比于前几代的标记方法,它具有位点丰富、分布广泛、遗传稳定性强、检测快速、自动化分析便利和成本低等特点,已成为最具前景的遗传标记方法之一,被广泛应用于生物、农学、医学等众多领域^[14-15]。近年来,SNP分子标记技术在鱼类^[16-17]、甲壳类^[18-19]和贝类^[20-21]等水产动物的研究中也取得了重要进展。

随着高通量测序技术的快速发展以及测序成本的下降,利用转录组测序筛选目标性状SNP位点已成为研究遗传多样性、分子育种等分子标记的常用手段^[22]。研究发现,利用转录组测序技术和物种基因组信息,更易获得与目标性状相关的SNP^[23]。目前,通过转录组测序来筛选大量SNP位点的研究已在多种水产动物中被报道,如马氏珠母贝(*Pinctada fucata*)^[20]、方斑东风螺(*Babylonia areolata*)^[23]、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)^[24]、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)^[25]、鳙鱼(*Hypophthalmichthys nobilis*)^[26]等。关于军曹鱼群体遗传的研究资料较为匮乏,曹丹煜^[27]曾利用转录组测序结果筛选与军曹鱼盐度适应相关SNP位点,但未对其响应低氧胁迫SNP位点挖掘和功能注释进行研究。本研究基于低氧胁迫后的军曹鱼幼鱼肠道转录组测序结果,筛选出大量SNP位点,对SNP所在基因的SNP-Unigene进行功能注释,侧重对免疫防御及低氧通路中的相关基因进行SNP的挖掘与筛选,以期今后军曹鱼耐低氧和抗病品系的遗传选育、分子辅助育种研究提供基础资料。

2 材料和方法

2.1 实验用鱼及饲养

军曹鱼幼鱼由广东海洋大学湛江东海岛生物研究基地提供。实验在广东恒兴饲料实业股份有限公司863基地进行,养殖设施为室内24 h持续充气的流水养殖系统,水体为500 L。选取大小规格整齐、活力好、体格健壮的军曹鱼210尾(体重为 (50.44 ± 2.78) g),先在养殖水槽中暂养1周使其适应新环境后再进行低氧胁迫实验,每天投喂2次,及时用虹吸管清理粪便和剩余饵料,暂养期间水体溶解氧在6 mg/L以上,水温为 (29 ± 1) °C, pH为7.8~8.0,盐度为28~30,氨氮浓度小于0.02 mg/L,自然光照。

2.2 实验设计及采样

将实验用鱼分为对照组(CT组)和低氧组(HT组),每组设置3个重复实验,每个重复实验有35尾鱼。HT组溶解氧浓度为 (3.15 ± 0.21) mg/L,通过覆盖塑料薄膜、调整充气量和水流速度的大小来降低水体溶解氧浓度。水体溶解氧采用碘量法(GB 7489-87)进行测定,CT组无任何处理,溶解氧浓度为 (6.18 ± 0.23) mg/L。实验处理周期为28 d。军曹鱼采样前24 h禁止饲喂,采样时先经丁香酚麻醉,测定鱼体的生物学指标,然后置于冰上解剖,取出整个肠道并剔除脂肪、结缔组织和内容物,用无菌生理盐水冲洗干净后,放置于2.0 mL的冻存管中,投入液氮速冻,运回实验室后转入-80°C冰箱保存进行后续实验。

2.3 转录组测序数据

实验样品送至广州基迪奥生物科技有限公司进行转录组测序工作,使用TRIzol法提取总RNA,纯度(NanoDrop 2000)和浓度(Agilent 2100)检测合格后,每组建3个转录组文库,每个文库以2尾鱼的肠道RNA等效混合进行建库,利用Illumina HiSeq-2000进行测序^[23]。转录组测序共获得302 588 246条原始读数(Raw Reads),经去除含有接头、重复及测序质量较低的原始读数后共获得293 736 220条干净读数(Clean Reads)(数据未发表)。

2.4 SNP位点检测及所在Unigene的注释与功能分析

使用hisat2(<http://ccb.jhu.edu/software/hisat2/index.shtml>)全局比对方式,将不同长度的干净读数比对到本实验室军曹鱼参考基因组(NCBI Bioproject ID: PRJNA634421)获得比对文件,使用samtools sort对其进行排序^[28];将CT组和HT组中所有样本排序后的比对文件和相应的参考基因组序列输入到bcftools(<https://github.com/samtools/bcftools>)软件中,使用bcftools

mpileup 命令将两组军曹鱼比对后的 bam 文件转换成 vcf 文件, 进行 SNP 分型; 使用 bcftools filter 对 vcf 文件进行过滤, 将质量值小于 20 的低质量突变位点过滤掉, 保留质量值不小于 20 的结果; 使用 annovar(<http://www.openbioinformatics.org/annovar/>) 软件对过滤后的 vcf 文件进行注释; 使用 Excel 统计 SNP 位点的数量及分布情况^[29-31]。再将包含 SNP 的基因序列比对到 GO、KOG 和 KEGG 数据库进行功能注释。同时, 从转录组数据中筛选免疫和低氧相关的 KEGG 通路, 再由此通路筛选出差异表达的免疫防御和低氧相关基因, 进行 SNP 位点分析^[23]。

3 结果与分析

3.1 SNP 位点分析

3.1.1 SNP 位点数量

利用软件 SOAPsnp 将 CT 组和 HT 组的转录组数据进行分析, 26 120 条 Unigene 中共存在 431 845 个 SNP 位点, 其中 CT 组有 215 953 个 SNP 位点, HT 组有 215 892 个 SNP 位点。所有 SNP 位点中, 纯合 SNP 位点有 152 642 个(CT 组 76 550 个, HT 组 76 092 个)(表 1)。SNP 发生频率约为 1/171 bp(约 171 bp 有 1 个 SNP 位点)。SNP 密度频数分析显示, 每 1 000 bp 含有 0~5 个 SNP 位点的 Unigene 出现的频率最高(图 1)。

3.1.2 SNP 的分布及转换、颠换信息

对于 Unigene 中 SNP 位点数目统计得出, CT 组

表 1 SNP 位点数量概况

Table 1 The number of the SNP sites

组别	CT组	HT组	合计
SNP-Unigene数	13 076	13 044	26 120
SNP位点总数	215 953	215 892	431 845
纯合SNP位点数	76 550	76 092	152 642

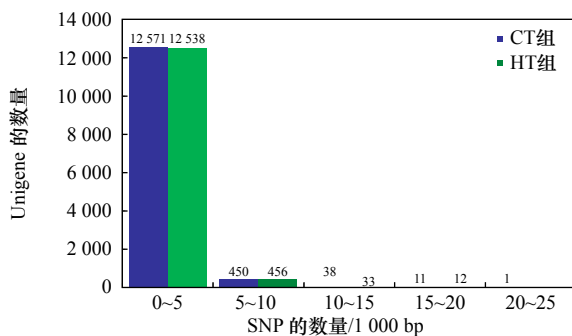


图 1 SNP 密度频数分布

Fig. 1 The density frequency distribution of SNP

和 HT 组中分别含有 1 个 SNP 位点的 Unigene 有 4 337 和 4 384 条, 含有 2~10 个 SNP 位点的 Unigene 有 8 299 和 8 258 条; 含有 10 个以上 SNP 位点的 Unigene 有 400 条和 402 条(图 2)。

对军曹鱼 SNP 突变类型的数量分析表明, 在纯合 SNP 位点中, 转换数量明显高于颠换数量, 即 CT 组 SNP 位点中, 转换类型 131 054 个(60.69%), 颠换类型 84 899 个(39.31%); HT 组 SNP 位点中, 转换类型 131 587 个(60.95%), 颠换类型 84 305 个(39.05%)。在核苷酸的变异类型中, C-T 发生转换的频率最高, 分别占纯合 SNP 数的 44.60%(CT 组 34 145 个)和 45.21%(HT 组 34 400 个); T-A 发生颠换的频率最高, 分别占纯合 SNP 数的 16.45%(CT 组 12 591 个)和 16.37%(HT 组 12 458 个)(图 3)。

3.1.3 SNP 位置分析及突变类型分析

对军曹鱼肠道转录组 SNP 序列位置变异类型分析结果显示(图 4), CT 组和 HT 组中 SNP 位点总数分别为 215 953 和 215 892 个, 位于内含子和基因间区的 SNP 位点较多。在 CT 组和 HT 组中, 位于内含子的 SNP 位点分别占 45.13% 和 44.62%; 位于基因间区的 SNP 位点分别占 24.66% 和 25.17%; 位于外显子的 SNP 位点分别占 20.53% 和 20.43%; 位于基因下游的 SNP 位点分别占 13.54% 和 13.71%; 位于 3'非编码区

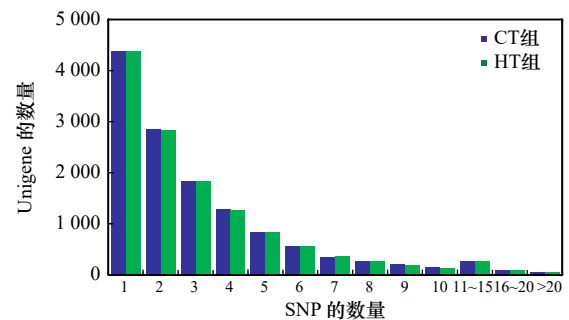


图 2 SNP 的分布统计

Fig. 2 The statistics distribution of SNP

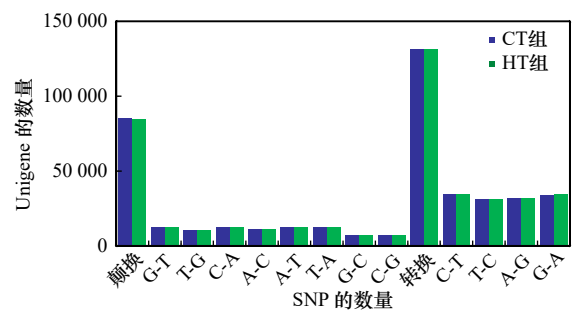


图 3 SNP 突变类型数量统计

Fig. 3 The numbers of different mutation types statistics of SNP

的 SNP 位点分别占 8.74% 和 8.76%; 位于基因上游的 SNP 位点分别占 4.45% 和 4.44%; 位于 5'非编码区的 SNP 位点分别占 2.20% 和 2.15%; 位于基因上游和下游的 SNP 位点分别为 2 031 个和 2 028 个; 位于剪切位点的 SNP 位点分别为 523 个和 518 个。

对 SNP 的突变类型分析结果显示(图 5), 突变的 SNP 位点数量较少, 其中同义突变 SNP 位点数量占比最高, CT 组为 10.10%, HT 组为 10.04%; 非同义突变 SNP 位点数量在 CT 组中占比为 9.15%, HT 组占比为 9.11%。其他少量突变类型包括移码缺失、无义突变和非移码缺失等。

3.2 SNP-Unigene 的注释与功能

将 26 120 条 SNP-Unigene 与 GO 数据库比对, 结果显示, 分布于生物学过程 (Biological Process, BP)、分子功能 (Molecular Function, MF) 和细胞组分 (Cellular Component, CC) 3 大功能分类的 GO 条目分别为 8 043 条、7 537 条和 7 854 条, 其中参与生物学过程

的 SNP-Unigene 数量最多(图 6)。将 SNP-Unigene 序列比对到 KOG 数据库进行注释和分类, 结果显示, 共有 14 334 条 SNP-Unigene 匹配到相应的注释信息, 根据功能分为 25 类, 其中以“信号转导机制”和“一般功能预测”类较多, 分别包含 2 822 条和 2 548 条 SNP-Unigene(图 7)。将 26 120 条 SNP-Unigene 序列进行 KEGG 富集分析, 发现有 5 160 条 SNP-Unigene 富集到 349 条 KEGG 代谢通路中, 其中以“信号转导”“全球概览地图”和“传染病”通路中富集的 SNP-Unigene 较多, 分别为 1 541 条、1 123 条和 1 153 条(图 8)。

3.3 免疫防御相关 SNP-Unigene 的富集及特异 SNP 位点

根据 KEGG 信号通路的富集分析, 发现共有 3 417 条免疫防御相关的 SNP-Unigene 被注释到“MAPK 信号通路”等 35 条与免疫相关的通路中, 其中以“MAPK 信号通路”中注释的 SNP-Unigene 最多(262 条), 其次分别为“神经活性配体-受体相互作用”(228 条)、“Rap1 信号通路”(190 条)、“Ras 信号通路”(164 条)

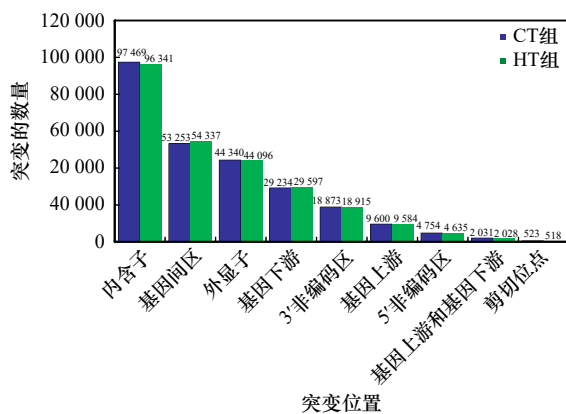


图 4 SNP 位置鉴定

Fig. 4 Identification of SNP location

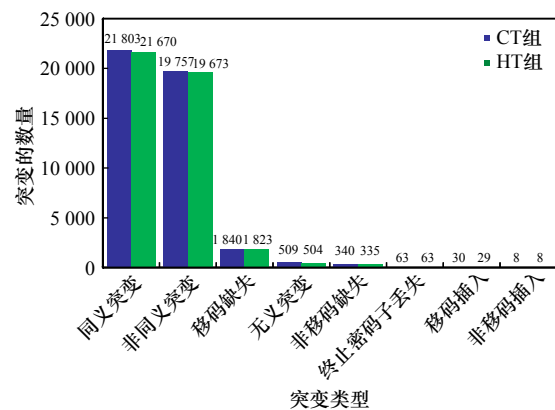


图 5 SNP 突变类型鉴定

Fig. 5 Identification of SNP variants type

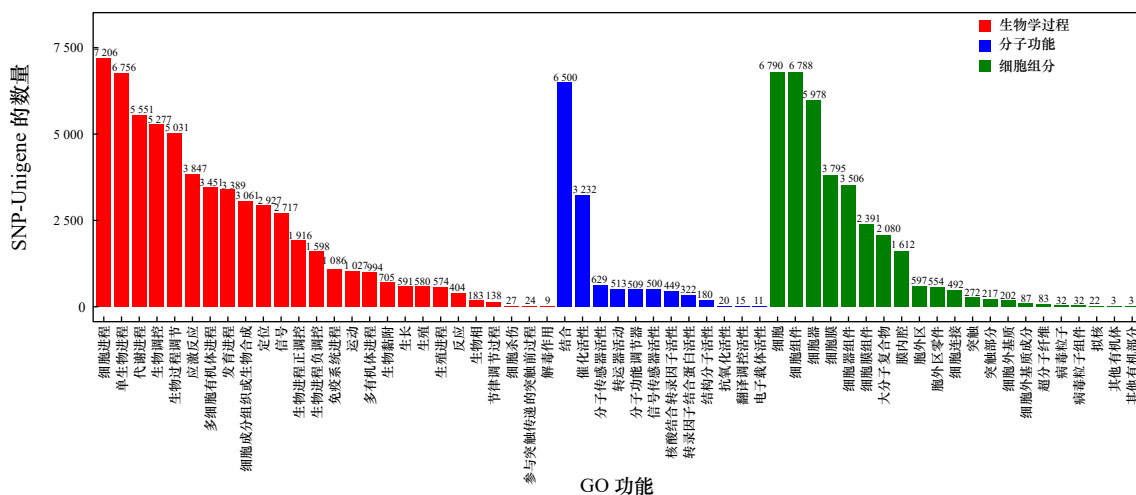


图 6 SNP-Unigene GO 功能注释分析

Fig. 6 GO annotation analysis of SNP-Unigene

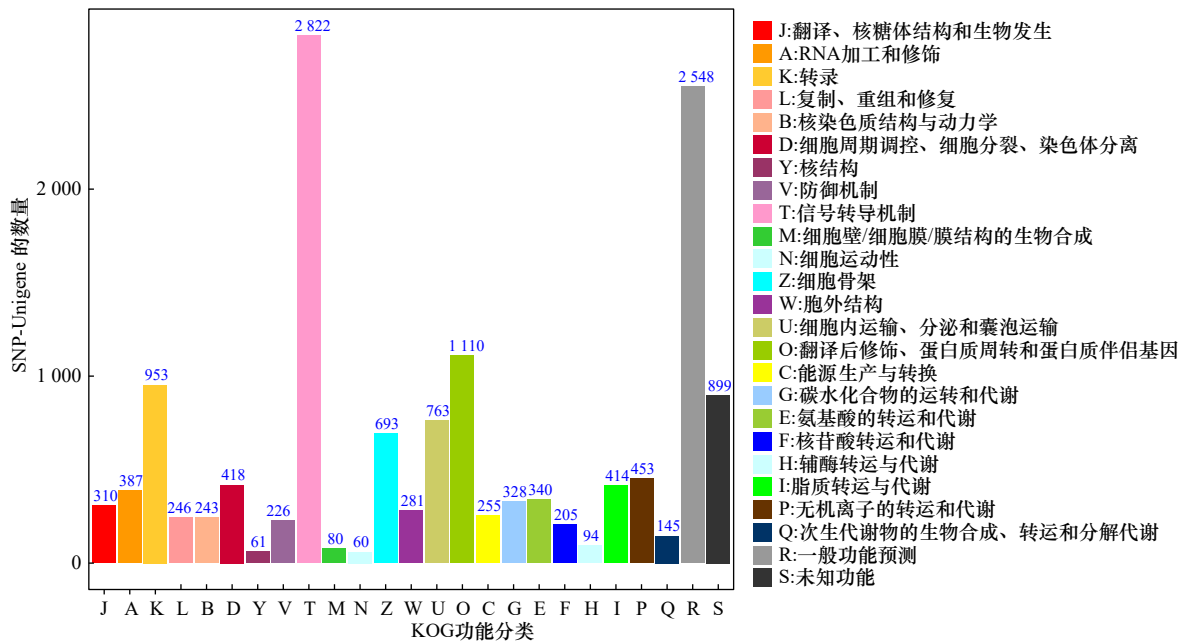


图7 SNP-Unigene KOG 功能注释分析

Fig. 7 KOG function annotation analysis of SNP-Unigene

等信号通路(表2)。

3.4 差异表达免疫防御及低氧相关基因 SNP 位点分析

基于军曹鱼低氧胁迫后肠道转录组分析,得到大量的差异基因(筛选条件为错误发生率(False Discovery Rate, FDR)小于0.05且 $|\log_2 FC|$ 大于1,其中FC为差异倍数)。对“MAPK 信号通路”等7个免疫通路及“HIF-1 信号通路”中差异基因进行了 SNP 位点分析(表3)。

4 讨论

4.1 低氧胁迫下军曹鱼转录组数据中 SNP 位点鉴定及功能注释

SNP 作为一种分子遗传标记,在水生动物的遗传选育中发挥着重要作用^[25]。本研究从 CT 转录组、HT 转录组数据中分别获得大量的 SNP 位点, SNP 发生频率依次为 0.00586 和 0.005858 (1/171 bp), 高于盐度胁迫对军曹鱼 (1/730 bp)^[27]、半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) (1/491 bp)^[32]、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) (1/506 bp)^[33]、罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) (1/1152 bp)^[24]、大西洋鲑 (*Salmo salar*) (1/641 bp)^[34] SNP 发生频率,但低于马氏珠母贝 (1/100 bp)^[20]。有研究表明,不同物种中 SNP 分布频率差异很大,可能与研究物种、遗传背景和生存环境有关^[19],也可能是因为在表达序列标签中筛选 SNP 的要求和条件不同^[21]。SNP 碱基替换是产生基因突变和推动进化的原始动力^[35]。碱基替换类型分为转换 (A-G 和 T-C 的相互置

换)和颠换 (A-T、C-G、A-C、T-G 的相互置换)。理论上,生物中发生颠换与转换比例为 1:2^[23]。本研究中, SNP 转换类型的比例约为 60%, 颠换类型的比例约为 40%, 转换大于颠换,符合“转换偏差”原理。在核苷酸变异类型中, C-T 发生转换的比例最高,与大多数水产动物的研究结果相一致^[19,36],原因可能是 CpG 二核苷酸上甲基化的胞嘧啶残基容易脱去氨基形成胸腺嘧啶^[37],或受物种进化过程中承受的压力影响^[38]。

根据 SNP 在基因组的分布位置可分为 3 类: 基因编码区 SNPs (cSNPs)、基因间 SNPs (iSNPs) 和基因周边 SNPs (pSNPs)^[39]。其中 cSNP 和 pSNP 会对基因的表达产生影响^[22]。根据对生物遗传性状的影响, cSNPs 又分为同义突变和非同义突变,前者编码序列的变化不会影响翻译后的氨基酸序列,故不会导致蛋白质的功能变化;后者编码序列的变化会引起翻译后氨基酸序列的变化,改变蛋白质的生物学功能^[40]。由于受到较强的选择压力,非同义 SNP 位点的突变经常会影响生物的表型,而关于非同义 SNP 位点的研究已在团头鲂^[25]、大黄鱼^[41]有相关报道。对军曹鱼肠道转录组序列 SNP 位置和突变类型分析发现,位于基因编码区的 SNP 位点以及非同义突变 SNP 位点占比较多。因此,研究基因编码区非同义 SNP 可能对军曹鱼具有重要的生物学意义。此外,GO、KOG 及 KEGG 功能注释结果表明,大部分 SNP-Unigene 涉及信号转导、传染病、代谢、癌症、内分泌系统和免疫系统等多种途径,表明军曹鱼幼鱼遭受低氧胁迫后,这些

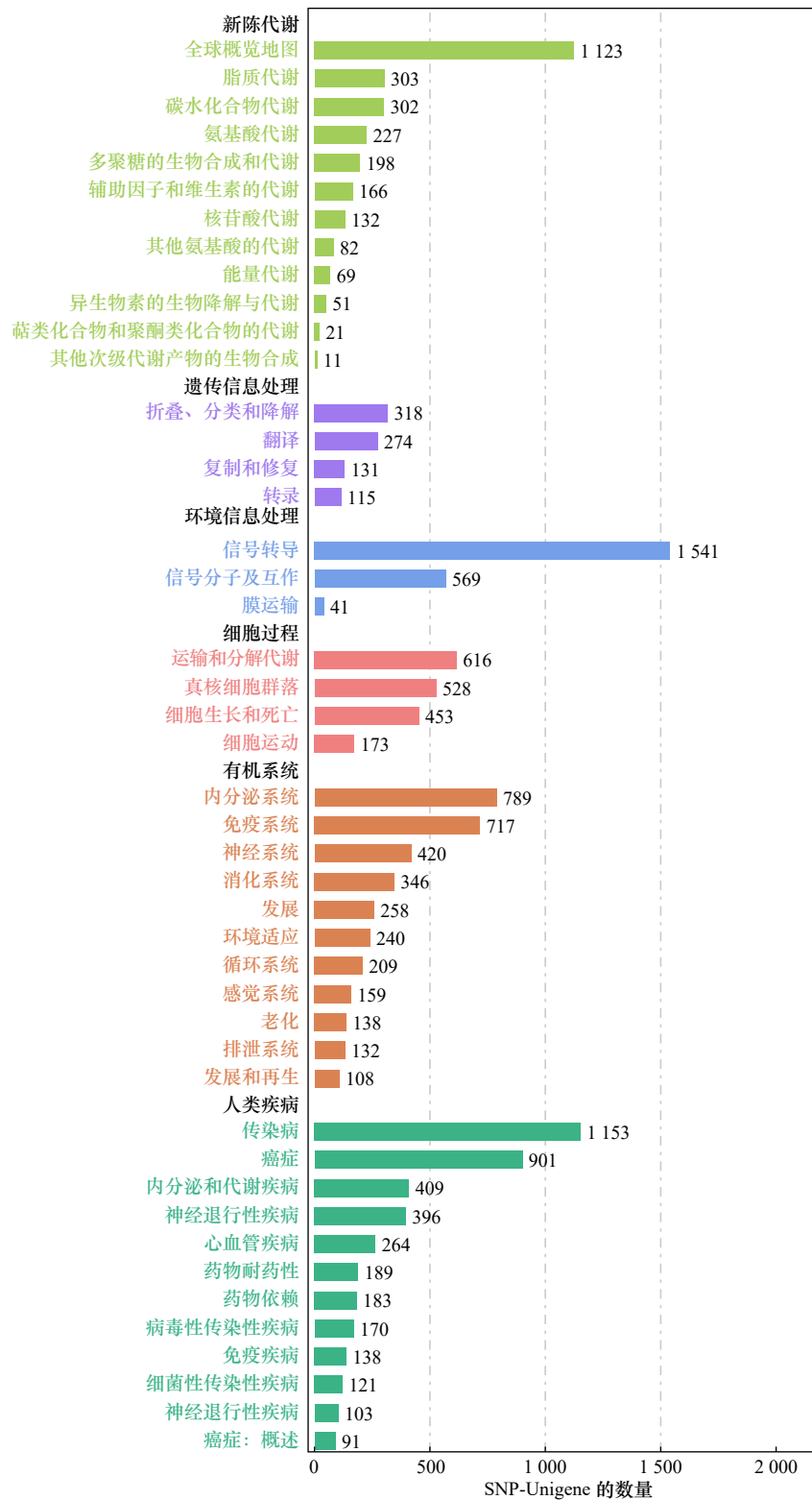


图 8 SNP-Unigene 的 KEGG 功能注释分析

Fig. 8 KEGG classification of SNP-Unigene

SNP-Unigene 参与各种生命活动, 并影响机体的各种生物学性状。

4.2 低氧胁迫下军曹鱼免疫相关基因 SNP 位点分析 免疫相关基因的 SNP 在水产遗传育种中的应用

对鱼类抗逆性性状的选育具有重要意义^[4]。在本研究中, 为了解军曹鱼免疫防御机制, 对转录组测序数据进一步分析, 结果发现, 3 417 条 SNP-Unigene 被注释到 35 条与免疫防御相关的通路中, 大部分 SNP-

表2 免疫防御相关 SNP-Unigene 的 KEGG 富集分析

Table 2 KEGG enrichment analysis of immune-related SNP-Unigene

KEGG信号通路	信号通路ID	SNP-Unigene数目
MAPK信号通路	ko04010	262
神经活性配体-受体相互作用	ko04080	228
Rap1信号通路	ko04015	190
Ras信号通路	ko04014	164
Wnt信号通路	ko04310	144
细胞因子-细胞因子受体相互作用	ko04060	137
细胞凋亡	ko04210	130
mTOR信号通路	ko04150	129
吞噬体	ko04145	123
趋化因子信号通路	ko04062	117
血小板活化	ko04611	117
FoxO信号通路	ko04068	117
NOD样受体信号通路	ko04621	113
白细胞经内皮迁移	ko04670	101
TNF信号通路	ko04668	95
Jak-STAT信号通路	ko04630	93
T细胞受体信号通路	ko04660	92
TRP通道的炎症介质调节	ko04750	89
NF-κB信号通路	ko04064	81
TGF-β信号通路	ko04350	80
Fcγ-R介导的吞噬作用	ko04666	79
B细胞受体信号通路	ko04662	73
造血细胞系	ko04640	72
Toll样受体信号通路	ko04620	71
自然杀伤细胞介导的细胞毒性	ko04650	69
Notch信号通路	ko04330	63
PPAR信号通路	ko03320	56
IL-17信号通路	ko04657	55
补体和凝血级联	ko04610	53
FcεRI信号通路	ko04664	47
抗原处理与呈递	ko04612	47
RIG-I样受体信号通路	ko04622	45
Toll和Imd信号通路	ko04624	35
肠道免疫网络Ig A的产生	ko04672	27
细胞质DNA传感通路	ko04623	23
合计		3 417

表3 CT和HT转录组中差异表达免疫防御及低氧相关基因 SNP 位点分析

Table 3 SNP identified in differentially expressed immune and hypoxia-related genes in CT and HT transcriptomes

信号通路	基因名称	低氧后表达水平	CT-SNP数目	HT-SNP数目
MAPK信号通路				
	<i>IL1R1</i>	上调	4	4
	<i>ERBB3</i>	上调	5	5
	<i>CACNA1E</i>	上调	4	4
Wnt信号通路				
	<i>FZD3</i>	下调	3	1
	<i>LRP5</i>	下调	5	5
	<i>PLCB2</i>	上调	10	11
	<i>PLCB3</i>	下调	7	7
	<i>NFATC4</i>	上调	6	6
mTOR信号通路				
	<i>LPIN1</i>	上调	9	9
	<i>LPIN2</i>	下调	3	3
	<i>DDIT4</i>	上调	2	2
Jak-STAT信号通路				
	<i>GHR</i>	下调	8	8
	<i>LEPR</i>	上调	5	5
	<i>IL4RA</i>	上调	9	9
NOD样受体信号通路				
	<i>TRPM7</i>	下调	17	17
Toll和Imd信号通路				
	<i>ANK3</i>	上调	18	18
NF-κB信号通路				
	<i>BTK</i>	下调	3	3
	<i>TNFRSF11A</i>	下调	2	2
HIF-1信号通路				
	<i>PIK3CA</i>	下调	5	4
	<i>HK1</i>	上调	4	4
	<i>EPAS1</i>	下调	3	3
	<i>GAPDH</i>	下调	2	2
	<i>EDN1</i>	下调	1	1
	<i>ENO3</i>	下调	1	1
	<i>ANGPT1</i>	上调	4	4
	<i>ANGPT2</i>	上调	1	1

Unigene 参与“MAPK 信号通路”“神经活性配体-受体相互作用”“Rap1 信号通路”“Ras 信号通路”等免疫通路。我们从相关免疫通路中筛选出了大量差异表达的免疫相关基因及其 SNP 位点。因此,这里对部分关键基因进行后续的研究分析。

IL1R1 是细胞表面重要的免疫基因,是白细胞介素-1 β (IL-1 β)的受体,在机体炎症反应和免疫信号转导过程中非常重要^[42]。Lam 等^[43] 研究报道,慢性缺氧时,大鼠颈动脉体细胞中促炎细胞因子及其受体(*IL-1 β* 和 *IL1R1*)的表达量显著增加,表明其在颈动脉体局部炎症中起着重要功能。在本研究中,军曹鱼受低氧胁迫后,肠道 *IL1R1* 基因的表达量显著上调,提示 *IL1R1* 基因可能在军曹鱼免疫调节和抵御低氧应激中发挥着重要作用。此外,在基因多态性方面,已发现 *IL1R1* 基因的 SNP 与多种人类疾病相关^[44]。胡亮^[45] 对岗巴绵羊的候选特异性 SNP 位点进行基因注释和富集分析,发现 *IL1R1* 和 *IL1R2* 基因参与炎症反应及自身免疫性调节。因此,暗示 *IL1R1* 基因可作为军曹鱼免疫防御的候选基因,这为今后进行 *IL1R1* 基因的多态性与疾病关联研究提供了参考。

Wnt 信号通路是一个高度保守的系统,通过 Wnt 蛋白与细胞表面受体相互作用,调控着细胞增殖、分化和黏附等多种复杂的生物学过程^[23,46]。Wnt 配体蛋白与跨膜受体卷曲蛋白(FZD)和低密度脂蛋白受体相关蛋白(LRP5/6)形成的细胞表面受体复合物结合,从而激活细胞内的 Wnt 信号通路^[47]。在本研究中,军曹鱼受低氧胁迫后,Wnt 信号通路中 *FZD3* 和 *LRP5* 基因表达量显著下调,且存在多个 SNP 位点。目前有关鱼类中 FZDs 家族基因的研究主要涉及基因克隆、组织表达及在鱼类发育过程中的生理作用^[48]。张丽晗等^[48] 研究了铜胁迫下黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*) FZD 家族基因(*FZD2*、*FZD3A*、*FZD4* 和 *FZD10*)的 mRNA 水平。*FZD3* 在小鼠和人的毛囊发育、细胞迁移等方面发挥着关键作用^[49],已有研究者对该基因多态性位点进行分析,筛选影响性状的 SNP 位点。Zhao 等^[49] 对中国美利奴羊 *FZD3* 基因的多态性进行检测,发现 SNP1 和 SNP2 与羊毛性状有显著的相关性,可作为绵羊育种的潜在遗传标记。*LRP5* 基因在 Wnt 信号通路中扮演着重要角色,其突变与骨质疏松、癌症等疾病的发生密切相关^[50]。已有研究表明^[50],*LRP5* 基因多态性与 2 型糖尿病患者的 β 细胞功能和脂质代谢有关。由此推测,*FZD3* 和 *LRP5* 基因可能参与调控军曹鱼低氧应激过程中的免疫反应,具体机制有待进一步探讨,而研究这些免疫基因的 SNP

对低氧胁迫下军曹鱼免疫防御相关 SNP 位点的开发也具有潜在意义。

本研究结果表明,参与 mTOR 信号通路的差异基因 *LIPIN1* 表达水平上调,也存在多个 SNP 位点。*Lipin1* 是由 *LIPIN1* 基因编码的磷脂酸磷脂酶,具有双向调控脂肪代谢的功能,既能催化磷脂酸去磷酸化得到二脂酰甘油,从而促进甘油三酯和磷脂的合成;还具有转录激活功能,参与调控脂肪代谢相关基因表达^[51-52]。关于 LIPIN 蛋白家族的研究主要集中在蛋白功能和基因表达方面,多态性方面以小鼠、猪、牛等哺乳动物为主,水产经济动物较为匮乏。有报道称^[53],*LIPIN1* 基因受 *HIF-1* 调控,其表达水平上调与非脂肪细胞中的甘油三酯和脂滴的积累有关,提示 *LIPIN1* 是细胞适应低氧应激的重要中介物。He 等^[54] 在猪的 *LIPIN1* 基因的编码区和 UTR 检测到 5 个 SNP 位点与猪的脂肪沉积性状存在显著相关。这些研究表明,*LIPIN1* 基因可能对军曹鱼低氧胁迫过程中脂质代谢有一定程度的影响,可为 *LIPIN1* 基因多态性与目标性状关联研究提供了新思路。

4.3 低氧胁迫下军曹鱼 HIF-1 信号通路中差异基因 SNP 位点分析

除了免疫防御相关信号通路所涉及的差异基因外,还有多种基因是通过其他信号通路来共同应答鱼类的低氧胁迫。*HIF-1* 信号通路是鱼类遭受低氧应激时的关键通路之一,通路中的相关基因不仅参与机体代谢的调控,而且还会通过抑制血红细胞的增殖和凋亡,提高血氧亲和力,以此来适应低氧应激^[55]。在本研究结果中发现,*HIF-1* 信号通路中存在 *PIK3CA*、*HK1*、*ANGPT1*、*EPAS1*、*GAPDH*、*ANGPT2*、*EDN1* 和 *ENO3* 等 8 个差异基因也同样含有多个 SNP 位点。

PIK3CA 基因是编码 I 类磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3Ks)的催化亚单位,其突变能激活 PI3K/AKT 信号通路,进而参与细胞增殖、凋亡和蛋白质合成等多种生理过程^[56-57]。Zhang 等^[56] 研究发现,*SmPIK3CA* 基因参与大菱鲆的免疫反应,并在该基因中筛选出 4 个抗病相关的 SNPs。*EPAS1* 作为激活低氧调控基因表达的关键转录因子^[58],在细胞代谢和氧化还原反应中起着重要作用。关于 *EPAS1* 基因 SNP 位点的研究多集中在藏族人和高原哺乳动物,在鱼类中的研究较少。在藏族人和高原动物低氧适应研究中发现,*EPAS1* 基因都受到选择且信号显著。在牦牛中发现 *EPAS1* 基因多态性与血红蛋白(HGB)关系紧密^[58]。在藏绵羊 *EPAS1* 基因与低氧适应相关性研究中发现,该基因第 8 内含子 C871T 变异位点的等位基因(T)突变频率

与海拔高度呈现正相关,且 TT 基因型能显著增加血红蛋白浓度^[59]。由此推测, HIF-1 信号通路中筛选出来的 *PIK3CA* 等 8 个显著差异基因可能对军曹鱼低氧相关 SNP 位点的挖掘具有重要的参考价值。

综上所述,本研究基于低氧胁迫下军曹鱼肠道转

录组测序数据,获得了大量与免疫、低氧相关差异基因的 SNP 位点,丰富了军曹鱼分子标记的数据,这些候选标记将为今后深入了解军曹鱼响应低氧胁迫的分子机制、SNP 分子标记开发和遗传连锁图谱构建等研究提供重要的理论依据。

参考文献:

- [1] Fan Shiliang, Li Haidong, Zhao Rui. Effects of normoxic and hypoxic conditions on the immune response and gut microbiota of *Bostrichthys sinensis*[J]. *Aquaculture*, 2020, 525: 735336.
- [2] 贾玉东, 王嘉伟, 李娟, 等. 溶解氧对鱼类生理功能影响及调控机制[J]. *水产研究*, 2020, 7(1): 8-14.
Jia Yudong, Wang Jiawei, Li Juan, et al. Effect of dissolved oxygen on physiological functions and mechanism in fish[J]. *Open Journal of Fisheries Research*, 2020, 7(1): 8-14.
- [3] 穆景利, 靳非, 赵化德, 等. 水体低氧的早期暴露对青鳉(*Oryzias latipes*)后期的生长、性别比和繁殖能力的影响[J]. *生态毒理学报*, 2017, 12(2): 137-146.
Mu Jingli, Jin Fei, Zhao Huade, et al. Early-life exposure to hypoxia altered growth, sex ratio, and reproduction in Medaka (*Oryzias latipes*)[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2017, 12(2): 137-146.
- [4] Vanderplancke G, Claireaux G, Quazuguel P, et al. Hypoxic episode during the larval period has long-term effects on European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*)[J]. *Marine Biology*, 2015, 162(2): 367-376.
- [5] 林艾影, 王维政, 陈刚, 等. 2种乳酸菌对军曹鱼幼鱼生长及消化酶、免疫酶活性的影响[J]. *广东海洋大学学报*, 2020, 40(5): 112-117.
Lin Aiyong, Wang Weizheng, Chen Gang, et al. Effects of two lactic acid bacteria on growth performance and activities of digestive and non-specific immune enzymes of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*)[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2020, 40(5): 112-117.
- [6] 勾效伟, 区又君, 廖锐. 我国军曹鱼研究现状[J]. *海洋渔业*, 2007, 29(1): 84-89.
Gou Xiaowei, Ou Youjun, Liao Rui. Present status on studies of cobia *Rachycentron canadum* in China[J]. *Marine Fisheries*, 2007, 29(1): 84-89.
- [7] 王维政, 曾泽乾, 黄建盛, 等. 低氧胁迫对军曹鱼幼鱼生长、血清生化和非特异性免疫指标的影响[J]. *海洋学报*, 2021, 43(2): 49-58.
Wang Weizheng, Zeng Zeqian, Huang Jiansheng, et al. Hypoxia stress on growth, serum biochemical and non-specific immune indexes of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*)[J]. *Haiyang Xuebao*, 2021, 43(2): 49-58.
- [8] 王维政, 曾泽乾, 黄建盛, 等. 低氧胁迫对军曹鱼幼鱼抗氧化、免疫能力及能量代谢的影响[J]. *广东海洋大学学报*, 2020, 40(5): 12-18.
Wang Weizheng, Zeng Zeqian, Huang Jiansheng, et al. Effects of hypoxia stress on antioxidation, immunity and energy metabolism of juvenile cobia, *Rachycentron canadum*[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2020, 40(5): 12-18.
- [9] 李洪娟, 陈刚, 郭志雄, 等. 军曹鱼(*Rachycentron canadum*)幼鱼对环境低氧胁迫氧化应激与能量利用指标的响应[J]. *海洋学报*, 2020, 42(4): 12-19.
Li Hongjuan, Chen Gang, Guo Zhixiong, et al. Oxidative stress and energy utilization responses of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*) to environmental hypoxia stress[J]. *Haiyang Xuebao*, 2020, 42(4): 12-19.
- [10] 郭志雄, 曾泽乾, 黄建盛, 等. 急性低氧胁迫对大规模军曹鱼幼鱼肝脏氧化应激、能量利用及糖代谢的影响[J]. *广东海洋大学学报*, 2020, 40(3): 134-140.
Guo Zhixiong, Zeng Zeqian, Huang Jiansheng, et al. Effects of acute hypoxia on oxidative stress, energy utilization and carbohydrate metabolism in liver of large-sized juvenile cobia (*Rachycentron canadum*)[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2020, 40(3): 134-140.
- [11] 黄建盛, 陆枝, 陈刚, 等. 急性低氧胁迫对军曹鱼大规格幼鱼血液生化指标的影响[J]. *海洋学报*, 2019, 41(6): 76-84.
Huang Jiansheng, Lu Zhi, Chen Gang, et al. Acute hypoxia stress on blood biochemical indexes of large-sized juvenile cobia (*Rachycentron canadum*)[J]. *Haiyang Xuebao*, 2019, 41(6): 76-84.
- [12] Wang Weizheng, Huang Jiansheng, Zhang Jiandong, et al. Effects of hypoxia stress on the intestinal microflora of juvenile of cobia (*Rachycentron canadum*)[J]. *Aquaculture*, 2021, 536: 736419.
- [13] 张晓萌, 马普, 王洪迪, 等. SNPs在水产动物中的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2013(8): 7-11.
Zhang Xiaomeng, Ma Pu, Wang Hongdi, et al. Progresses of SNPs studies in aquaculture animals[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2013(8): 7-11.
- [14] 赵莲, 薛蓓, 高焕, 等. SNP分子标记技术在经济甲壳动物中的应用进展[J]. *海洋渔业*, 2017, 39(2): 233-240.
Zhao Lian, Xue Bei, Gao Huan, et al. Progress on the SNP molecular markers in economic crustaceans[J]. *Marine Fisheries*, 2017, 39(2): 233-240.
- [15] 侯振平, 蒋思文. 单核苷酸多态性的研究进展[J]. *中国畜牧杂志*, 2004, 40(4): 45-47.

- Hou Zhenping, Jiang Siwen. Advance in single nucleotide polymorphism[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2004, 40(4): 45–47.
- [16] 王婷, 黄智慧, 马爱军, 等. 基于转录组数据的大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)SNP标记开发及多态性分析[J]. 海洋与湖沼, 2014, 45(6): 1300–1307.
- Wang Ting, Huang Zhihui, Ma Aijun, et al. Development and polymorphic analysis of SNP markers in *Scophthalmus maximus* based on transcriptome database[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, 45(6): 1300–1307.
- [17] Tsai H Y, Robledo D, Lowe N R, et al. Construction and annotation of a high density SNP linkage map of the Atlantic salmon (*Salmo salar*) genome[J]. *G3 Genes| Genomes| Genetics*, 2016, 6(7): 2173–2179.
- [18] 刘敬文. 凡纳滨对虾免疫基因SNPs开发及其与WSSV抗性的关联分析[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2014.
- Liu Jingwen. SNPs identification of immune related genes from *Litopenaeus vannamei* and their association analyses to WSSV resistance[D]. Qingdao: The Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2014.
- [19] 张德宁, 吕建建, 刘萍, 等. 三疣梭子蟹生长相关SNP位点的鉴定[J]. 中国水产科学, 2015, 22(3): 393–401.
- Zhang Dening, Lü Jianjian, Liu Ping, et al. Identifying SNP markers correlated with growth of swimming crab (*Portunus trituberculatus*) based on a comparative transcriptome[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(3): 393–401.
- [20] 王忠良, 丁熺, 许尤厚, 等. 马氏珠母贝(*Pinctada fucata*)血细胞转录组测序数据中SNP标记的开发及其功能注释分析[J]. 海洋与湖沼, 2018, 49(2): 403–412.
- Wang Zhongliang, Ding Yu, Xu Youhou, et al. SNP discovery and functional annotation in transcriptome datasets from hemocytes of *Pinctada fucata*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2018, 49(2): 403–412.
- [21] 李纪勤, 包振民, 李玲, 等. 栉孔扇贝EST-SNP标记开发及多态性分析[J]. 中国海洋大学学报, 2013, 43(1): 56–63.
- Li Jiqin, Bao Zhenmin, Li Ling, et al. Development and characterization of EST-SNP in *Chlamys farreri*[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2013, 43(1): 56–63.
- [22] 雒林通, 马芳, 唐德富, 等. 基于益生菌调节的太平鸡回肠SNP位点分析[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(21): 86–90, 94.
- Luo Lintong, Ma Fang, Tang Defu, et al. SNP site analysis of Taiping chicken ileum based on probiotic regulation[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2020, 48(21): 86–90, 94.
- [23] 王菁, 刘付柏, 许尤厚, 等. 基于转录组测序的方斑东风螺单核苷酸多态性位点挖掘及功能注释[J]. 广东海洋大学学报, 2021, 41(1): 111–118.
- Wang Jing, Liu Fubai, Xu Youhou, et al. SNP site biological analysis of *Babylonia areolata* based on RNA-seq technology[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2021, 41(1): 111–118.
- [24] 唐修阳, 王传聪, 项杰, 等. 罗氏沼虾转录组免疫相关SNP的挖掘与分析[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(4): 145–148.
- Tang Xiuyang, Wang Chuancong, Xiang Jie, et al. Mining and analysis of immune-related SNPs in transcriptome of *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2019, 47(4): 145–148.
- [25] 陈柏湘, 王伟峰, 王卫民, 等. 团头鲂低氧耐受相关SNPs标记的开发[J]. 华中农业大学学报, 2019, 38(2): 23–29.
- Chen Boxiang, Wang Weifeng, Wang Weimin, et al. Isolation of SNP markers associated with hypoxia tolerance in *Megalobrama amblycephala*[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2019, 38(2): 23–29.
- [26] An Rui, Fu Jianjun, Jiang Bingjie, et al. Development of SNP markers for the bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) by using transcriptomic sequences[J]. *Conservation Genetics Resources*, 2020, 12(3): 409–412.
- [27] 曹丹煜. 军曹鱼幼鱼盐度适应特性及渗透压调节分子机制的初步分析[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2020.
- Cao Danyu. Preliminary analysis of salinity adaptation characteristics and osmotic pressure regulation molecular mechanism of juvenile cobia, *Rachycentron canadum*[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2020.
- [28] 王伟佳, 韩兆方, 李完波, 等. 大黄鱼雌雄性腺长链非编码RNA的挖掘与差异分析[J]. 中国水产科学, 2019, 26(5): 852–860.
- Wang Weijia, Han Zhaofang, Li Wanbo, et al. The identification and analysis of long noncoding RNA in testes and ovaries of the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(5): 852–860.
- [29] 张美彦, 宋春艳, 于海龙, 等. 基于SNP分型的香菇交配型AS-PCR鉴定[J]. 食用菌学报, 2019, 26(2): 1–9.
- Zhang Meiyuan, Song Chunyan, Yu Hailong, et al. Mating-type identification of *Lentinula edodes* based on SNP genotyping by AS-PCR[J]. *Acta Edulis Fungi*, 2019, 26(2): 1–9.
- [30] 范欢欢, 王天骄, 董依萌, 等. 马鹿特异性SNP分子标记的验证[J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48(4): 1313–1322.
- Fan Huanhuan, Wang Tianjiao, Dong Yimeng, et al. Verification of red deer specific molecular marker SNP[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2021, 48(4): 1313–1322.
- [31] Wang Kai, Li Mingyao, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data[J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(16): e164.
- [32] Wang Wenji, Yi Qilin, Ma Liman, et al. Sequencing and characterization of the transcriptome of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 470.
- [33] Wang Panpan, Xiao Shijun, Han Zhaofang, et al. SNP discovery in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) using Roche 454 pyrosequencing sequencing platform[J]. *Conservation Genetics Resources*, 2015, 7(4): 777–779.
- [34] Hayes B, Laerdahl J K, Lien S, et al. An extensive resource of single nucleotide polymorphism markers associated with Atlantic salmon (*Salmo salar*) expressed sequences[J]. *Aquaculture*, 2007, 265(1/4): 82–90.

- [35] Zhao Hui, Li Qizhai, Li Jun, et al. The study of neighboring nucleotide composition and transition/transversion bias[J]. *Science in China Series C: Life Sciences*, 2006, 49(4): 395–402.
- [36] 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[J]. *海洋渔业*, 2018, 40(1): 38–46.
Li Shengjie, Bai Junjie, Zhao Luo, et al. Development of EST-SNPs in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) and analysis of their correlation with growth traits[J]. *Marine Fisheries*, 2018, 40(1): 38–46.
- [37] 李彦杰, 贾洪沅, 李庆天, 等. 基于转录组数据的三峡库区消落带适生狗牙根SNPs和SSRs分析[J]. *西南农业学报*, 2020, 33(3): 524–528.
Li Yanjie, Jia Hongyuan, Li Qingtian, et al. Analysis of SNPs and SSRs of suitable *Cynodon dactylon* in fluctuating zone of Three Gorges Reservoir Area based on transcriptome data[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2020, 33(3): 524–528.
- [38] Zhao Zhongming, Boerwinkle E. Neighboring-nucleotide effects on single nucleotide polymorphisms: a study of 2.6 million polymorphisms across the human genome[J]. *Genome Research*, 2002, 12(11): 1679–1686.
- [39] 唐立群, 肖层林, 王伟平. SNP分子标记的研究及其应用进展[J]. *中国农学通报*, 2012, 28(12): 154–158.
Tang Liqun, Xiao Cenglin, Wang Weiping. Research and application progress of SNP markers[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28(12): 154–158.
- [40] 谭新, 童金苟. SNPs及其在水产动物遗传学与育种学研究中的应用[J]. *水生生物学报*, 2011, 35(2): 348–354.
Tan Xin, Tong Jingou. SNPs and their applications in studies on genetics and breeding of aquaculture animals[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, 35(2): 348–354.
- [41] 孙明洁, 张娜, 徐善良, 等. 两种弧菌感染大黄鱼免疫相关基因的SNP位点分析[J]. *上海海洋大学学报*, 2019, 28(5): 772–781.
Sun Mingjie, Zhang Na, Xu Shanliang, et al. Analysis of SNP loci in immune-related genes of two species of *Vibrio* infecting large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2019, 28(5): 772–781.
- [42] 张磊. 鲢鱼microRNA-21对IL1R1的免疫调控机制研究[D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2020.
Zhang Lei. Study on the immune regulation mechanism of microRNA-21 on IL1R1 in *Miichthys miuy* [D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2020.
- [43] Lam S Y, Tipoe G L, Liong E C, et al. Chronic hypoxia upregulates the expression and function of proinflammatory cytokines in the rat carotid body[J]. *Histochemistry and Cell Biology*, 2008, 130(3): 549–559.
- [44] 郭旗, 李超. *IL1R1*和*IL1R2*基因多态性与缺血性脑卒中患病风险的相关性[J]. *贵州医科大学学报*, 2018, 43(3): 294–298.
Guo Qi, Li Chao. Association of *IL1R1* and *IL1R2* gene polymorphisms with risk of ischemic stroke[J]. *Journal of Guizhou Medical University*, 2018, 43(3): 294–298.
- [45] 胡亮. 藏系绵羊种质资源鉴定技术的研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2019.
Hu Liang. Study on identification techniques of Tibetan Sheep germplasm resources[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2019.
- [46] 赵亚男, 刘明, 张玥, 等. Wnt信号通路与皮肤创面愈合的关系[J]. *现代生物医学进展*, 2015, 15(11): 2173–2176, 2184.
Zhao Ya'nan, Liu Ming, Zhang Yue, et al. The relationship between Wnt signaling pathway and skin wound healing[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2015, 15(11): 2173–2176, 2184.
- [47] 陈爽, 张晓敏. Wnt信号通路在自身免疫性疾病中的作用研究进展[J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(2): 254–258.
Chen Shuang, Zhang Xiaomin. Research progress on role of Wnt signaling pathway in autoimmune diseases[J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2021, 37(2): 254–258.
- [48] 张丽晗, 罗智, 有文静, 等. 黄颡鱼FZD家族4个基因的克隆、组织表达及对铜的响应[J]. *水产学报*, 2018, 42(5): 625–632.
Zhang Lihan, Luo Zhi, You Wenjing, et al. Molecular characterization and tissue distribution of Frizzled (FZD) in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) by copper exposure[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(5): 625–632.
- [49] Zhao Bingru, Fu Xuefeng, Tian Kechuan, et al. Identification of SNPs and expression patterns of *FZD3* gene and its effect on wool traits in Chinese Merino sheep (Xinjiang Type)[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2019, 18(10): 2351–2360.
- [50] 张璐. 环境因素及*LRP5*基因与2型糖尿病发病关联的队列研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2017.
Zhang Lu. Association of environmental factors and *LRP5* gene with type 2 diabetes mellitus in a cohort study[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2017.
- [51] Eaton J M, Mullins G R, Brindley D N, et al. Phosphorylation of lipin 1 and charge on the phosphatidic acid head group control its phosphatidic acid phosphatase activity and membrane association[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(14): 9933–9945.
- [52] Lu Shuxian, Lü Zhaojie, Wang Zhihao, et al. Lipin 1 deficiency causes adult-onset myasthenia with motor neuron dysfunction in humans and neuromuscular junction defects in zebrafish[J]. *Theranostics*, 2021, 11(6): 2788–2805.
- [53] Mylonis I, Sembongi H, Befani C, et al. Hypoxia causes triglyceride accumulation by HIF-1-mediated stimulation of lipin 1 expression[J]. *Journal of Cell Science*, 2012, 125(14): 3485–3493.
- [54] He Xiaoping, Xu Xuewen, Zhao Shuhong, et al. Investigation of *Lpin1* as a candidate gene for fat deposition in pigs[J]. *Molecular Biology Reports*, 2009, 36(5): 1175–1180.
- [55] 郭志雄. 低氧环境对军曹鱼幼鱼生化指标、相关基因表达的影响及其转录组学分析[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2020.
Guo Zhixiong. Effects of hypoxic environment on biochemical indexes, related gene expression and transcriptome analysis of cobia juveniles[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2020.

- [56] Zhang Kai, Liu Xiumei, Han Miao, et al. Functional differentiation of three phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit alpha (PIK3CA) in response to *Vibrio anguillarum* infection in turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 92: 450–459.
- [57] Engelman J A, Luo Ji, Cantley L C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2006, 7(8): 606–619.
- [58] Wu Xiaoyun, Ding Xuezhi, Chu Min, et al. Novel SNP of *EPASI* gene associated with higher hemoglobin concentration revealed the hypoxia adaptation of yak (*Bos grunniens*)[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2015, 14(4): 741–748.
- [59] 朱莉, 李根, 孔小艳, 等. 藏绵羊血红蛋白、*EPASI*基因与低氧适应相关性研究[J]. *云南农业大学学报(自然科学版)*, 2020, 35(3): 436–442.
- Zhu Li, Li Gen, Kong Xiaoyan, et al. The association of genes hemoglobin and *EPASI* with hypoxia adaptation in the Tibetan Sheep[J]. *Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science)*, 2020, 35(3): 436–442.

Identification and functional analysis of SNP from transcriptome of cobia (*Rachycentron canadum*) in response to hypoxia stress

Yang Erjun¹, Yang Lintong¹, Wang Weizheng¹, Huang Jiansheng^{1,2,3}, Zhang Jiandong^{1,2,3},
Wang Zhongliang^{1,2,3}, Chen Gang^{1,2,3}

(1. Fishery College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China; 2. Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Zhanjiang), Zhanjiang 524025, China; 3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Pathogenic Biology and Epidemiology for Aquatic Economic Animals, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: In order to mine single nucleotide polymorphism (SNP) sites relates to hypoxia stress and study the function of the gene SNP-Unigene from *Rachycentron canadum*. SOAPsnp software is mainly used to detect the SNP of the intestinal transcriptome sequencing results of cobia juveniles under hypoxia stress conditions, and then annotation of them in the databases of GO, KOG, and KEGG are compared. The results show that the transcriptome SNP locus are distributed on 26 120 SNP-Unigene, with a total of 431 845 SNP sites are detected, the average frequency of SNP occurrence is about 1/171 bp. SNP-Unigene functional annotation shows that the cobia is mainly involved in signal transduction, infectious disease, cancer and endocrine system under hypoxia stress. Further, 3 417 SNP-Unigene are annotated to 35 immune-related pathways including MAPK signaling pathway. Based on the transcriptome differential gene analysis, the distribution of SNP sites of 18 immune-related genes in 7 important immune pathways is examined. At the same time, the distribution of SNP sites of 8 differential genes such as *PIK3CA* in the HIF-1 signaling pathway is also detected. The research results will lay the foundation for further mining of the molecular genetic markers of immune and hypoxia-related SNPs, and provide a scientific reference for the in-depth study of cobia's hypoxia adaptation mechanism.

Key words: *Rachycentron canadum*; hypoxia stress; transcriptomics; immune gene; SNP