

黄健玲, 杨子敏, 王雨欣, 等. 石斑鱼 *PPAR-δ* 基因 SNP 位点和单倍型与抗虹彩病毒和神经坏死病毒抗性的关联 [J]. 华南农业大学学报, 2023, 44(3): 391-401.
HUANG Jianling, YANG Zimin, WANG Yuxin, et al. Association between *PPAR-δ* gene SNPs, haplotypes and resistances to SGIV and RGNNV in the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*[J]. Journal of South China Agricultural University, 2023, 44(3): 391-401.

石斑鱼 *PPAR-δ* 基因 SNP 位点和单倍型与抗虹彩病毒和神经坏死病毒抗性的关联

黄健玲✉, 杨子敏, 王雨欣, 李鑫帅, 刘翠瑜, 陈锦鹏, 秦启伟, 杨敏✉
(海洋生物资源保护与利用粤港澳高校联合实验室/华南农业大学 海洋学院, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】获得石斑鱼 *Epinephelus* spp.抗病分子标记, 选育石斑鱼抗病品系以解决石斑鱼病害频发的问题。【方法】基于免疫基因 *PPAR-δ* 的基因组 DNA 序列开展单核苷酸多态性 (Single nucleotide polymorphism, SNP) 位点筛选, 并对这些位点分别进行石斑鱼虹彩病毒 (Singapore grouper iridovirus, SGIV) 和神经坏死病毒 (Red-spotted grouper nervous necrosis virus, RGNNV) 抗性的关联分析。【结果】在 SGIV 感染的易感组和抗感组样品中共筛选到 9 个 SNP 位点, 均位于内含子中; 多态信息含量 (Polymorphism information content, PIC) 的范围为 0.177~0.375, 其中, SNP-S1(g.940T>A) 属于低度多态 (PIC<0.25), 其余 SNP 位点属于中度多态 (0.25≤PIC<0.50); 关联分析结果显示, SNP-S7(g.4595T>A) 基因型频率在 SGIV 易感组和抗感组中存在显著差异分布 ($P<0.05$), SNP-S7 的 TT 和 AA 这 2 种纯合子基因型与 SGIV 抗感性状相关, 而 AT 杂合子基因型与 SGIV 易感性相关。在 RGNNV 感染的易感组和抗感组样品中共筛选到 8 个 SNP 位点, 其中, SNP-N1 位于外显子中, 属于同义突变, 其余 SNP 均位于内含子中; PIC 的范围为 0.106~0.317, 其中, SNP-N1(g.324G>A) 和 SNP-N2(g.883A>G) 属于低度多态 (PIC<0.25), 其余 SNP 属于中度多态 (0.25≤PIC<0.50); 关联分析表明, SNP-N5(g.2510C>T) 基因型频率在 RGNNV 易感组和抗感组中存在显著差异分布 ($P<0.05$), SNP-N5 的 CT 基因型与 RGNNV 抗感性状相关, CC 基因型与 RGNNV 易感性状相关。【结论】本研究在 *PPAR-δ* 的基因组 DNA 序列中分别筛选到与 SGIV 和 RGNNV 抗性相关的 SNP 标记各 1 个, 可以为石斑鱼抗病育种提供技术支持和理论依据。

关键词: 石斑鱼; 虹彩病毒; 神经坏死病毒; SNP; *PPAR-δ* 基因
中图分类号: S965.334 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2023)03-0391-11

Association between *PPAR-δ* gene SNPs, haplotypes and resistances to SGIV and RGNNV in the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*

HUANG Jianling✉, YANG Zimin, WANG Yuxin, LI Xinshuai, LIU Cuiyu, CHEN Jinpeng, QIN Qiwei, YANG Min✉
(Joint Laboratory of Guangdong Province and Hong Kong Region on Marine Bioresource Conservation and Exploitation/
College of Marine Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

收稿日期:2022-03-11 网络首发时间:2023-03-17 14:49:14
首发网址:<https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20230316.0919.004.html>
作者简介:黄健玲, 硕士研究生, 主要从事水产动物病害与分子生物学研究, E-mail: 1065974326@qq.com; 通信作者: 秦启伟, 教授, 博士, 主要从事海洋鱼类病毒学、免疫学和水产病害防控等研究, E-mail: qinqw@scau.edu.cn; 杨敏, 副教授, 博士, 主要从事水产动物抗病性状功能基因分析、种质资源调查和抗病遗传育种等研究, E-mail: yangmin2016@scau.edu.cn
基金项目:国家自然科学基金 (U20A20102, 311021006); 广东省自然科学基金 (2019A1515011747); 南方海洋科学与工程广东实验室珠海实验室创新群项目 (311021006); 中国农业科学研究体系 (CARS-47-G16)

Abstract: 【Objective】 To obtain the disease-resistant molecular markers in grouper (*Epinephelus* spp.), and serve for the selective breeding program of disease-resistant grouper strains, so as to solve the problem of frequent occurrence of grouper disease. 【Method】 Single nucleotide polymorphisms (SNPs) were screened based on *PPAR-δ* genomic DNA sequence, and association analysis of resistance to Singapore grouper iridovirus (SGIV) and red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) was performed on these SNPs. 【Result】 A total of nine SNPs were detected in the susceptible and resistant groups against SGIV infection, all of which were located in the introns, with the polymorphism information contents (PICs) ranging from 0.177–0.375. Among the SNPs, SNP-S1(g.940T>A) showed low degree polymorphism (PIC<0.25), while the rest SNPs showed moderate degree polymorphism(0.25≤PIC<0.50). The association analysis showed that the genotype frequencies of SNP-S7 (g.4595T>A) were significantly different between SGIV susceptible and resistant groups ($P<0.05$), the TT and AA homozygous genotypes of SNP-S7 were correlated with SGIV resistance traits, while the AT heterozygous genotypes were correlated with SGIV susceptibility traits. In addition, a total of eight SNPs were detected in the susceptible and resistant groups agasint RGNNV infection, among which SNP-N1 was located in the exon, with a synonymous mutation, and the rest SNPs were located in the introns, with the PICs ranging from 0.106–0.317. Among the SNPs, SNP-N1 (g.324G>A) and SNP-N2 (g.883A>G) showed low degree polymorphism (PIC<0.25), while the rest SNPs showed moderate degree polymorphism (0.25≤PIC<0.50). The association analysis showed that SNP-N5 (g.2510C>T) genotype frequencies were significantly different between RGNNV susceptible and resistant groups ($P<0.05$), the CT genotype of SNP-N5 was correlated with RGNNV resistance traits and the CC genotype was correlated with RGNNV susceptibility traits. 【Conclusion】 In this study, we successfully screened one SNP marker related to SGIV resistance and one SNP marker related to RGNNV resistance from *PPAR-δ* genomic DNA sequence. This finding can offer a technical support and a theoretical basis for resistance breeding of grouper.

Key words: *Epinephelus* spp.; Singapore grouper iridovirus; Red-spotted grouper nervous necrosis virus; SNP; *PPAR-δ* gene

石斑鱼 *Epinephelus* spp.是亚洲许多国家最重要的经济水产养殖品种之一，其繁殖速度较快，肉质鲜嫩、营养价值高，具有相当大的经济价值。近年来，随着集约化、规模化养殖的快速发展，细菌性和病毒性传染病暴发的频率急剧增加，对石斑鱼养殖业造成了严重的危害。目前已报道的感染石斑鱼的致病性病毒主要是虹彩病毒和神经坏死病毒^[1]。

新加坡石斑鱼虹彩病毒 (Singapore grouper iridovirus, SGIV) 隶属于虹彩病毒科 Iridoviridae 蛙病毒属 *Ranavirus*，是从养殖石斑鱼体分离得到的一种高致病性病原，由 SGIV 引起的疾病暴发多发生在仔鱼和成年石斑鱼中，患病鱼脾脏肿大，并伴有出血等症状，病症持续数周，患病仔鱼死亡率超过 90%，给养殖业造成巨大经济损失^[2]。鱼类病毒性神经坏死病是由神经坏死病毒引起的一类疾病，是水产生殖过程中常见的鱼类流行性传染病之一，患病鱼苗体表异常着色，食欲不振，间歇螺旋运动，脑和视网膜有空泡化病^[3-4]。而中国大多数海洋鱼类病毒

性神经坏死病是由赤点石斑鱼神经坏死病毒 (Red-spotted grouper nervous necrosis virus , RGNNV) 引起的，对石斑鱼的成鱼以及幼鱼危害很大，严重时死亡率可达 100%，严重威胁到石斑鱼养殖产业的健康发展。然而针对该病毒性疾病，目前还没找到有效的防治方法。

单核苷酸多态性 (Single nucleotide polymorphism, SNP) 指生物体的基因组 DNA 序列中单个核苷酸发生突变而产生的多态性现象，其突变形式包括位点的转换、颠换、插入及缺失等，一般情况下，等位基因的频率在同物种的群体中不小于 1%^[5]。SNP 作为一种理想的遗传标记，是基因和表型之间的研究载体，它拉近了分子遗传标记与育种的距离，成为研究疾病、生长和繁殖性能等经济性状与相关候选基因关联性的新工具。随着 SNP 检测技术的进步，其在水产动物中的应用也越来越广泛，在水产经济动物中进行特定经济性状关联的 SNP 位点的挖掘及功能验证也越来越受到研究者的重视。在水产动物抗病 SNP 分子标记研究中，

高焕等^[6]对中国明对虾 *Penaeus chinensis* 抗菌肽 SNP 位点进行了筛查, 并对与白斑综合征病毒抗性的关联程度进行了分析, 结果发现其 SNP 位点很少, 且在抗感和易感群体中无明显偏向分布。Bao 等^[7]在海湾扇贝 *Argopecten irradians* 超氧化物歧化酶家族的 3 个基因的启动子和基因组 DNA 序列区域均检测到 SNP 位点, 其中 3 个位于启动子区域的 SNP 位点与鳃弧菌 *Vibrio anguillarum* 的抗性显著相关。Fu 等^[8]在尖吻鲈 *Lates calcarifer* 的 *LECT2* 基因中发现了 3 个 SNP 位点, 并发现其与瘦大肚皮病的抗性之间存在显著的相关性。

PPAR-δ(Peroxisome proliferator-activated receptors δ) 是核受体超家族 PPARs 中的一员, 是一类转录因子, 其在多种生理刺激下调节基因表达, 参与调节机体的脂代谢、免疫反应等多种生理过程。其中 PPARs 的免疫调节作用的研究得到了越来越多的关注^[9-10]。在不同人体组织中, 均发现 *PPAR-δ* 对炎症反应的密切调控关系^[10]。除了保持稳定的炎症反应, *PPAR-δ* 也影响干扰素信号通路, 在哺乳动物免疫细胞中, *PPAR-δ* 抑制干扰素基因以及相关细胞因子的表达^[9], 而在另外一些免疫细胞中 *PPAR-δ* 则会增强干扰素信号的强度, 影响细胞凋亡^[10-12]。前期研究也表明, 鱼类 PPARs 在抗病毒免疫反应中发挥着重要作用^[13]。

开展石斑鱼抗病品系的选育研究是解决石斑鱼病毒性病害的重要途径之一, 开发抗病相关分子标记, 利用分子标记定向选育石斑鱼抗病品系, 可以有效避免选育的盲目性, 从而加快选育进程。本研究分别针对石斑鱼虹彩病毒感染群体和神经坏死病毒感染群体进行 *PPAR-δ* 基因组 DNA 序列的 SNP 位点筛选, 并对筛选到的 SNP 位点进行抗病毒关联分析, 以期获得与抗病毒性状关联的 SNP 位点或基因型, 为石斑鱼抗病选育提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

斜带石斑鱼 *E. coioides*, 体质量 40~60 g, 体长 10~14 cm, 购自福建省厦门市小嶝岛水产养殖公司, 在 25~30 ℃ 的海水循环系统中驯化并饲养 2 周, 每天以 3% 的体质量作为喂食量, 密切监测海水的溶解氧、pH 和氨浓度。

攻毒用 SGIV 和 RGNNV 分别从发病石斑鱼中分离获得, 后利用实验室构建的石斑鱼脾脏细胞系 (Grouper spleen, GS) 进行病毒的培养与制备,

GS 细胞系用含有体积分数为 10% 胎牛血清 (Invitrogen) 的 Leibovitz's L15 培养基放置于 28 ℃ 培养箱中传代培养^[14]。利用 TCID₅₀ 法对制备的 SGIV 和 RGNNV 进行滴度测定。制备后的病毒于 -80 ℃ 条件下保存备用。

1.2 半致死浓度的测定

为了获得感染石斑鱼苗的 SGIV 和 RGNNV 的最适浓度, 随机选取 210 尾石斑鱼苗进行浓度梯度腹腔注射感染试验, 2 周后统计每组累计死亡率, 选取可导致 50%~80% 石斑鱼死亡率的 SGIV 和 RGNNV 感染浓度, 进行抗感与易感群体筛选的正式试验。

试验结果显示当 SGIV 的滴度为 1×10^7 TCID₅₀/mL 时, 其感染鱼苗后的死亡率为 72%, 当 RGNNV 滴度为 1×10^5 TCID₅₀/mL 时, 其感染鱼苗后的死亡率为 65%, 因此选择上述 2 个病毒滴度进行正式感染试验。

1.3 石斑鱼抗感和易感群体的采集

随机选取 520 尾鱼苗进行攻毒感染试验, 共分为 3 组, 对照组 40 条鱼腹腔注射 100 μL PBS 溶液, SGIV 感染组 240 尾鱼腹腔注射 100 μL 病毒滴度为 1×10^7 TCID₅₀/mL 的 SGIV 溶液, RGNNV 感染组 240 尾鱼腹腔注射 100 μL 病毒滴度为 1×10^5 TCID₅₀/mL 的 RGNNV 溶液, 感染后每隔 6 h 观察 1 次鱼苗死亡情况, 参考前期研究中评判抗感和易感样品的标准^[15-16], 将感染后 5 d 内死亡的个体作为易感个体, 感染后 14 d 后还存活的个体作为抗感个体, 采集易感、抗感个体的尾鳍样品, 于样品稳定剂 (TaKaRa) 中, -20 ℃ 保存备用。

1.4 基因组 DNA 提取

基因组 DNA 提取使用 *Trelief*TM Animal Genomic DNA Kit (TsingKe) 试剂盒, 具体方法步骤参考试剂盒说明书, 并用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 提取质量。

1.5 石斑鱼 *PPAR-δ* 基因组 DNA 序列的克隆与 SNP 位点筛选

以斜带石斑鱼鳍条 DNA 为模板, 根据石斑鱼基因组中的 *PPAR-δ* 基因 gDNA 序列, 利用 Primer Primer 5.0 软件设计引物 (表 1), 由北京擎科生物有限公司合成, 以上述易感和抗感个体基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系和反应条件参考文献 [15]。PCR 扩增产物经胶回收以后, 克隆至 pMD19-T 载体, 抗感组和易感组各送 5 个阳性克隆样品至北京擎科生物有限公司进行测序。测序结果使用 MEGA 6.0 软件进行多重比对, 观察测序

表 1 *PPAR-δ* 基因组 DNA 序列扩增引物

Table 1 Primers for *PPAR-δ* genomic DNA sequence amplification

引物名称 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequence	$\theta/^{\circ}\text{C}$	产物长度/bp Product length
PPAR-δ-1-F	CAGGGCTTTTCCGACGAAC	59	1 325
PPAR-δ-1-R	GGTTGACTCATCACTCGCCT	59	
PPAR-δ-2-F	GACCTCCTGTGGCCCTTAAC	60	1 398
PPAR-δ-2-R	CTGGGAGCGGCTTAAAGGAA	60	
PPAR-δ-3-F	AAGCCGCTCCCAGTAGAAAC	60	1 168
PPAR-δ-3-R	TTCCTAGCAATGGCAGCGTT	60	
PPAR-δ-4-F	CAAACGCTGCCATTGCTAGG	60	1 324
PPAR-δ-4-R	ACGTTCATTAGCCCAGGACG	60	

结果峰图, 预测 SNP 位点。同一位点不同碱基出现比例大于 30% 则认定为 SNP 位点。

1.6 SNP 的基因分型及与 SGIV 和 RGNNV 抗性的关联分析

依据上述方法预测的 *PPAR-δ* 基因 SNP 位点, 采用 SNaPshot 法^[17], 分别对 SGIV 感染组和 RGNNV 感染组的易感样品和抗感样品进行 SNP 分型, 其中 SGIV 易感组、SGIV 抗感组、RGNNV 易感组和 RGNNV 抗感组的样品数目均为 50 尾。SNaPshot 分型由北京擎科生物有限公司完成。

使用 Popgen 32 和 PIC 软件分析 SNP 位点的观测杂合度 (Observed heterozygosity, H_o)、期望杂合度 (Expected heterozygosity, H_e)、等位基因频率、有效等位基因数 (Effective number of alleles, N_e)、哈迪-温伯格平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium), 使用 Cervus3.0 软件计算位点的多态信息含量 (Polymorphism information content, PIC) 等。使用 Haploview 4.2 软件进行各个 SNP 位点间的连锁不平衡和单倍型的分析。使用 SPSS17 软件中的 χ^2 检验对 SNP 位点在抗病组和易感组群体中的基因型频率和单倍型频率进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 石斑鱼 *PPAR-δ* 基因结构图以及筛查的 SNP 位点信息

根据石斑鱼基因组中的 *PPAR-δ* 基因 gDNA 序列和转录组中的 cDNA 序列, 以斜带石斑鱼鳍条 DNA 为模板, 使用 4 对引物 (表 1) 对 *PPAR-δ* 基因的内含子及外显子序列进行扩增, 对克隆进行测序比对, 绘制 *PPAR-δ* 基因结构图 (图 1)。以易感组和抗感组各 5 个基因组 DNA 样品作为模板进行

PCR 扩增, 对测序结果进行多重比对分析。在 SGIV 感染的易感组和抗感组样品中共筛查到 9 个 SNP 位点, 分别将其命名为 SNP-S1(g.940T>A)、SNP-S2(g.994C>G)、SNP-S3(g.1644A>C)、SNP-S4(g.2541C>T)、SNP-S5(g.4188A>T)、SNP-S6(g.4479G>A)、SNP-S7(g.4595T>A)、SNP-S8(g.4791T>A) 和 SNP-S9(g.4852T>A), 所有 SNP 位点均位于内含子中 (图 1A)。在 RGNNV 感染的易感组和抗感组样品中共筛查到 8 个 SNP 位点, 分别将其命名为 SNP-N1(g.324G>A)、SNP-N2(g.883A>G)、SNP-N3(g.1140A>T)、SNP-N4(g.1702A>T)、SNP-N5(g.2510C>T)、SNP-N6(g.5253G>C)、SNP-N7(g.5522G>A) 和 SNP-N8(g.5564T>C), 其中 SNP-N1 位于外显子中, 属于同义突变, 没有改变编码的氨基酸, 其余 SNP 均位于内含子中 (图 1B)。

2.2 石斑鱼 *PPAR-δ* 基因组 SNP 的遗传多态性分析

采用 SnaPshot 分型法对石斑鱼群体进行基因分型分析。在 SGIV 感染组中, 100 个送样样品中共获得 100 个有效结果, 其中 SGIV 抗感组 50 个, SGIV 易感组 50 个。使用 Popgen32 和 PIC 软件对 9 个 SNP 位点在 SGIV 抗感组和易感组中的遗传多态性进行分析, 结果 (表 2) 显示: 在 SGIV 抗感组中, PIC 的范围为 0.136~0.370, SNP-S1 属于低度多态 ($\text{PIC}<0.25$), 其余 SNP 位点属于中度多态 ($0.25\leq\text{PIC}<0.50$); 在 SGIV 易感组中, PIC 的范围为 0.177~0.375, 其中 SNP-S1 属于低度多态 ($\text{PIC}<0.25$), 其余 SNP 位点属于中度多态 ($0.25\leq\text{PIC}<0.50$) (表 2)。 χ^2 检验结果表明, 在 SGIV 抗感组中, 除 SNP-S4、SNP-S5、SNP-S6、SNP-S7、SNP-S8、SNP-S9 不符合 Hardy-Weinberg 平衡外 ($P<0.05$), 其余 SNP 均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态

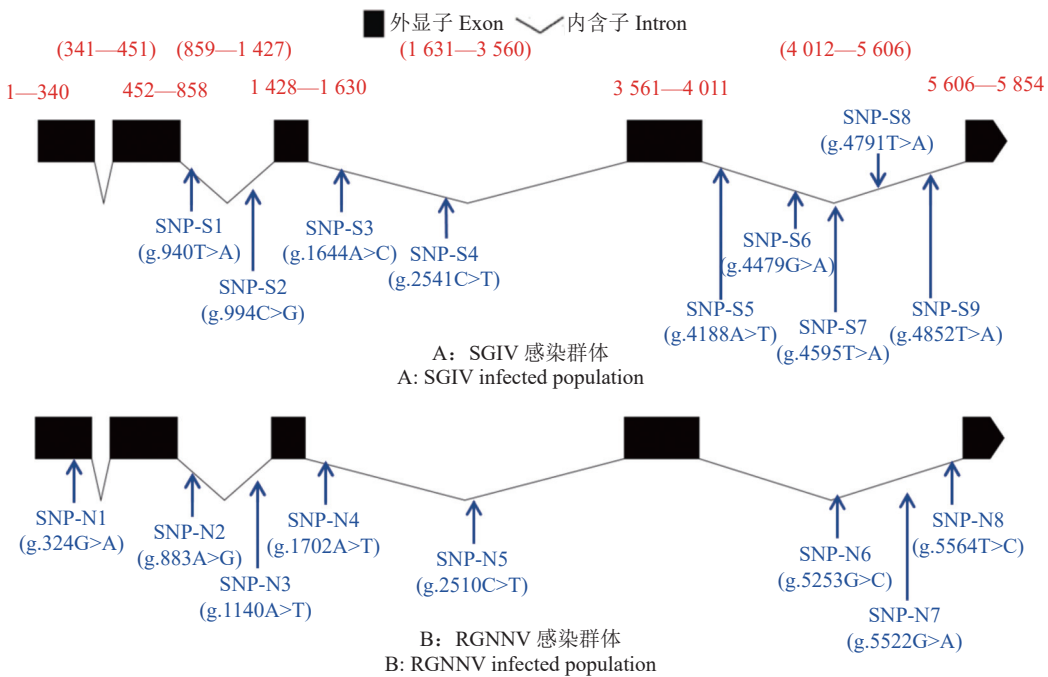


图 1 石斑鱼 *PPAR-δ* 基因结构及 SNP 位点

Fig. 1 DNA structure of *PPAR-δ* gene and its SNP loci of grouper

表 2 9 个 SNP 在石斑鱼 SGIV 抗感组和易感组中的遗传多态性信息

Table 2 Genetic polymorphisms of nine SNPs in SGIV resistant and susceptible grouper groups

组别	SNP	观测杂合度	期望杂合度	多态信息含量	有效等位基因数	Hardy-Weinberg平衡	
Group		Observed	Expected	Polymorphism	Number of	Hardy-Weinberg	<i>P</i> ¹⁾
		heterozygosity	heterozygosity	information	effective	equilibrium	
		(Ho)	(He)	content (PIC)	alleles (Ne)	(H-W)	
抗感组	SNP-S1	0.160	0.149	0.136	1.173	0.328	0.567
Resistant group	SNP-S2	0.460	0.398	0.317	1.651	1.244	0.265
	SNP-S3	0.400	0.407	0.322	1.676	0.016	0.898
	SNP-S4	0.660	0.489	0.367	1.937	6.279	0.012*
	SNP-S5	0.640	0.492	0.369	1.950	4.612	0.032*
	SNP-S6	0.640	0.492	0.369	1.950	4.612	0.032*
	SNP-S7	0.240	0.424	0.332	1.724	9.699	0.002*
	SNP-S8	0.300	0.495	0.370	1.962	7.932	0.005*
	SNP-S9	0.280	0.492	0.369	1.950	9.676	0.002*
易感组	SNP-S1	0.220	0.198	0.177	1.244	0.688	0.407
Susceptible group	SNP-S2	0.460	0.481	0.363	1.908	0.094	0.759
	SNP-S3	0.280	0.347	0.284	1.523	1.923	0.166
	SNP-S4	0.500	0.500	0.372	1.980	0.000	1.000
	SNP-S5	0.500	0.500	0.372	1.980	0.000	1.000
	SNP-S6	0.520	0.502	0.373	1.987	0.007	0.796
	SNP-S7	0.520	0.453	0.348	1.814	1.109	0.292
	SNP-S8	0.360	0.492	0.369	1.950	3.681	0.055
	SNP-S9	0.360	0.504	0.375	1.997	4.220	0.040*

1) “*” 表示该位点理论基因型频率和观测基因型频率之间的差异显著($P<0.05$, χ^2 检验)

1) “*” indicates significant difference between the theoretical genotype frequency and the observed genotype frequency of the site ($P<0.05$, χ^2 test)

($P>0.05$); 在 SGIV 易感组中, 除 SNP-S9 不符合 Hardy-Weinberg 平衡外 ($P<0.05$), 其余 SNP 均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态 ($P>0.05$)。

采用 SnaPshot 分型法对石斑鱼群体进行基因分型分析。在 RGNNV 感染组中, 100 个送样样品中共获得 97 个有效结果, 其中 RGNNV 抗感组 48 个, RGNNV 易感组 49 个。使用 Popgen32 和 PIC 软件对 8 个 SNP 位点在抗感组和易感组中的遗传多态性进行分析, 结果 (表 3) 显示: 在 RGNNV 抗感组中, PIC 的范围为 0.136~0.358, SNP-N1 和 SNP-N2 属于低度多态 ($PIC<0.25$), 其余 SNP 属于

中度多态 ($0.25\leq PIC<0.50$); 在 RGNNV 易感组中, PIC 的范围为 0.106~0.317, 其中 SNP-N1 和 SNP-N2 属于低度多态 ($PIC<0.25$), 其余 SNP 属于中度多态 ($0.25\leq PIC<0.50$)。 χ^2 检验结果表明, 在 RGNNV 抗感组中, SNP-N1、SNP-N2 和 SNP-N4 处于 Hardy-Weinberg 平衡状态 ($P>0.05$), 其余 SNP 均不符合 Hardy-Weinberg 平衡 ($P<0.05$); 在 RGNNV 易感组中, 除 SNP-N3 不符合 Hardy-Weinberg 平衡外 ($P<0.05$), 其余 SNP 均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态 ($P>0.05$)。

表 3 8 个 SNP 在石斑鱼 RGNNV 抗感组和易感组中的遗传多态性信息
Table 3 Genetic polymorphisms of eight SNPs in RGNNV resistant and susceptible grouper groups

组别 Group	SNP	观测杂合度 Observed heterozygosity (Ho)	期望杂合度 Expected heterozygosity (He)	多态信息含量 polymorphism information content (PIC)	有效等位基因数 Number of effective alleles (Ne)	Hardy-Weinberg平衡 Hardy-Weinberg Equilibrium (H-W)	$P^{1)}$
抗感组 Resistant group	SNP-N1	0.180	0.164	0.150	1.200	0.431	0.512
	SNP-N2	0.160	0.147	0.136	1.170	0.328	0.567
	SNP-N3	0.640	0.435	0.341	1.770	10.700	0.001*
	SNP-N4	0.540	0.466	0.358	1.870	1.100	0.294
	SNP-N5	0.620	0.442	0.344	1.800	7.720	0.005*
	SNP-N6	0.680	0.448	0.349	1.810	12.800	0.000*
	SNP-N7	0.660	0.442	0.344	1.790	11.700	0.001*
	SNP-N8	0.600	0.420	0.332	1.720	8.830	0.003*
易感组 Susceptible group	SNP-N1	0.160	0.149	0.136	1.170	0.328	0.567
	SNP-N2	0.120	0.114	0.106	1.130	0.168	0.682
	SNP-N3	0.480	0.369	0.298	1.570	4.750	0.029*
	SNP-N4	0.380	0.379	0.304	1.600	0.001	0.982
	SNP-N5	0.380	0.358	0.291	1.550	0.200	0.655
	SNP-N6	0.440	0.389	0.311	1.630	0.900	0.343
	SNP-N7	0.420	0.398	0.317	1.650	0.155	0.694
	SNP-N8	0.420	0.335	0.277	1.500	3.340	0.068

1) “*” 表示该位点理论基因型频率和观测基因型频率之间的差异显著($P<0.05$, χ^2 检验)
1) “*” indicates significant difference between the theoretical genotype frequency and the observed genotype frequency of the site ($P<0.05$, χ^2 test)

2.3 石斑鱼 PPAR-δ 基因组 SNP 的连锁不平衡分析及与病毒抗性的关联分析

PPAR-δ 基因在 SGIV 抗感组和易感组的 SNP 统计分析结果 (表 4) 显示: SNP-S7 基因型频率在抗感组和易感组中存在显著差异分布 ($P<0.05$); SNP-S7 的 TT 基因型在抗感组中分布频率为 60%,

易感组中分布频率为 40%, AT 基因型在抗感组中分布频率为 24%, 易感组中分布频率为 52%, 而 AA 基因型在抗感组中分布频率为 16%, 在易感组中分布频率为 8%, 表明 TT 和 AA 这 2 种纯合子基因型与 SGIV 抗感性状相关, 而 AT 杂合子基因型与 SGIV 易感性相关。

表 4 石斑鱼 *PPAR-δ* 基因在 2 种病毒抗感组和易感组的 SNP 统计分析

Table 4 *PPAR-δ* gene SNPs analysis in resistant and susceptible grouper groups infected by two viruses

基因型频率/%					基因型频率/%				
SNP (SGIV)	基因型 ¹⁾ Genotype	Genotype frequency		χ^2	SNP (RGNNV)	基因型 ¹⁾ Genotype	Genotype frequency		χ^2
		抗感组	易感组				抗感组	易感组	
		Resistant group	Susceptible group				Resistant group	Susceptible group	
SNP-S1	TT(81)	84	78	0.585	SNP-N1	GA(17)	18.8	16.3	0.099
	AT(19)	16	22			GG(80)	81.3	83.7	
SNP-S2	CC(44)	50	38	4.418	SNP-N2	AA(83)	83.3	87.8	0.384
	GC(46)	46	46			GA(14)	16.7	612.2	
	GG(10)	4	16		SNP-N3	AT(54)	62.5	49.0	1.796
						TT(43)	37.5	51.0	
SNP-S3	AC(34)	40	28	1.680	SNP-N4	AA(45)	37.5	55.1	2.520
	AA(58)	52	64			GA(44)	52.1	38.8	
	CC(8)	8	8			GG(8)	10.4	6.1	
						SNP-N5	CC(46)	37.5	
SNP-S4	CC(28)	26	3	3.818		CT(48)	60.4	38.8	
	CT(58)	66	50			TT(3)	2.1	4.1	
	TT(14)	8	2		SNP-N6	CC(2)	0	4.1	3.820
						GC(54)	66.7	44.9	
SNP-S5	AA(28)	26	30	2.669		GG(41)	33.3	51.0	
	AT(57)	64	50			SNP-N7	AA(3)	0	
	TT(15)	10	20			GA(52)	64.6	42.9	
						SNP-N8	CT(49)	58.3	
SNP-S6	GA(58)	64	52	2.324		TT(48)	41.7	57.1	
	GG(27)	26	28						
	AA(15)	10	20						
SNP-S7	TT(50)	60	40	8.491*					
	AT(38)	24	52						
	AA(12)	16	8						
SNP-S8	TT(26)	28	24	0.451					
	AT(33)	15	18						
	AA(41)	42	40						
SNP-S9	TT(39)	44	34	1.176					
	AT(32)	28	36						
	AA(29)	28	30						

1)括号中的数字为基因型数量;2)使用多组样品的 χ^2 检验统计,“*”表示该SNP位点不同基因型在抗感组和易感组的分布差异显著,即该位点不同基因型与抗感/易感性状相关联($P<0.05$)

1) Numbers in the brackets are numbers of the genotypes; 2) χ^2 test statistics of samples from multiple groups are used, “*” indicates the distribution of different genotypes of the SNP locus is significantly different between the resistant group and the susceptible group, that is, different genotypes of this locus are associated with the resistant/susceptible traits ($P<0.05$)

使用 Haploview 4.2 软件中的 Four Gamete Rule 计算方法对 9 个 SNP 位点进行连锁不平衡分析,结果显示:SNP-S4、SNP-S5 和 SNP-S6 这 3 个位点高度连锁,构成单倍块 1,可形成 TTT、AAA、TAA 和 TAT 共 4 个单倍型;SNP-S7、SNP-S8 和 SNP-S9 这 3 个 SNP 位点高度连锁,构成单倍块 2,可形成 CAG、TTA 和 CAA 共 3 个单倍型(图 2)。将上述单倍型与石斑鱼抗虹彩病毒抗性性状进行关联分析,结果显示上述单倍型与石斑鱼抗虹彩病

毒抗性性状均无显著的相关性 ($P>0.05$)(表 5)。

PPAR-δ 基因在 RGNNV 抗感组和易感组的 SNP 统计分析结果(表 4)显示:SNP-N5 基因型频率在易感组和抗感组中存在显著差异分布 ($P<0.05$); SNP-N5 的 CC 基因型在易感组中分布频率为 57.1%,在抗感组中分布频率为 37.5%,表明 CC 基因型与 RGNNV 易感性状相关;而 CT 基因型在易感组中分布频率为 38.8%,在抗感组中分布频率为 60.4%,表明 CT 基因型与 RGNNV 抗性

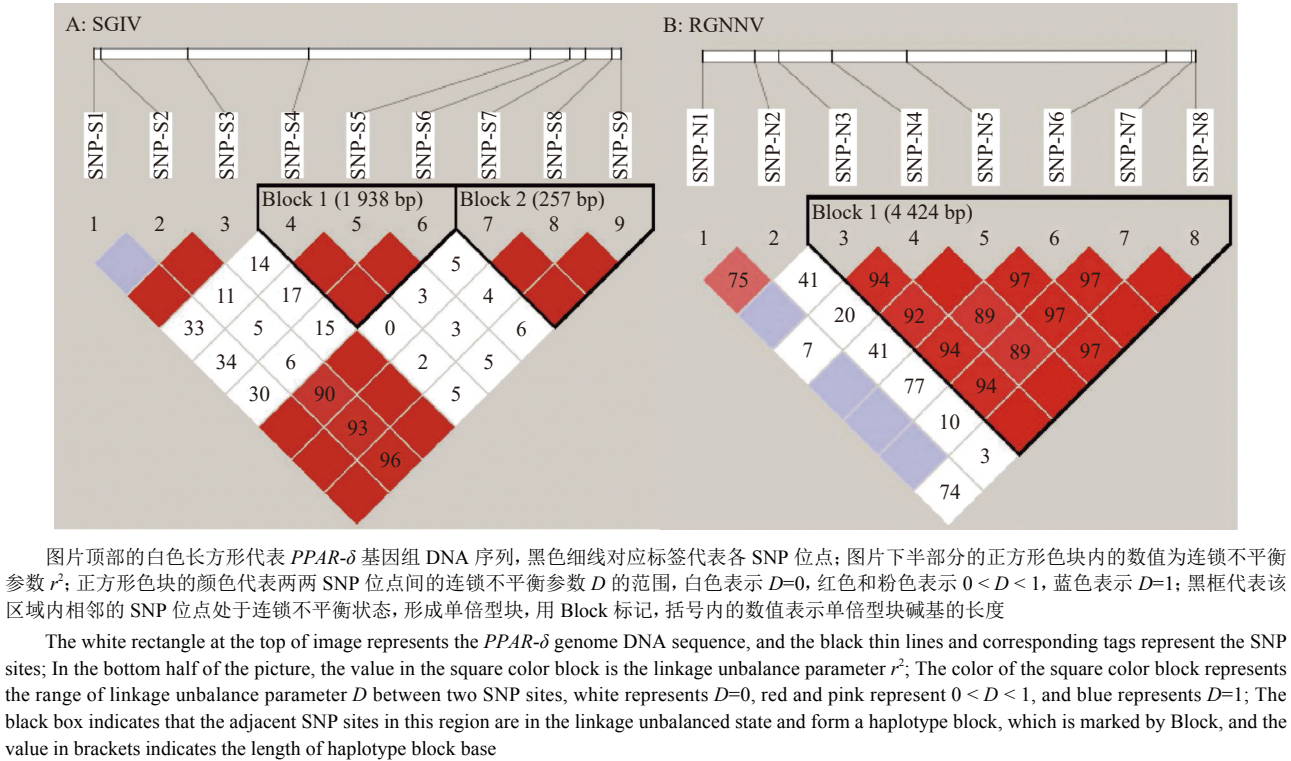


图 2 石斑鱼 SGIV 和 RGNNV 感染组中筛选出 *PPAR-δ* 基因 SNP 标记的连锁不平衡分析

The white rectangle at the top of image represents the *PPAR-δ* genome DNA sequence, and the black thin lines and corresponding tags represent the SNP sites; In the bottom half of the picture, the value in the square color block is the linkage unbalance parameter r^2 ; The color of the square color block represents the range of linkage unbalance parameter D between two SNP sites, white represents $D=0$, red and pink represent $0 < D < 1$, and blue represents $D=1$; The black box indicates that the adjacent SNP sites in this region are in the linkage unbalanced state and form a haplotype block, which is marked by Block, and the value in brackets indicates the length of haplotype block base

图 2 石斑鱼 SGIV 和 RGNNV 感染组中筛选出 *PPAR-δ* 基因 SNP 标记的连锁不平衡分析

Fig. 2 Linkage disequilibrium analysis of *PPAR-δ* SNP markers screened from SGIV and RGNNV infected groupers

相关。

对 8 个 SNP 位点进行连锁不平衡分析, 结果 (表 5) 显示: SNP-N3、SNP-N4、SNP-N5、SNP-N6、SNP-N7 和 SNP-N8 这 6 个 SNP 位点高度连锁, 构成单倍块 1, 可形成 TACGGT、AGTCAC、TGCGGT、TACCAT、AGTCAT、AACGGT 和 TGTCAT 共 7 个单倍型 (图 2)。将上述单倍型与石斑鱼抗神经坏死病毒抗性性状进行关联分析, 结果显示 7 个单倍型与石斑鱼抗神经坏死病毒抗性性状均无显著的相关性 ($P>0.05$)。

表 5 石斑鱼 <i>PPAR-δ</i> 基因 SNP 连锁单倍型与 2 种病毒抗性的关联分析							
Table 5 Association analysis between <i>PPAR-δ</i> SNPs linked haplotype and resistance of two viruses							
病毒	单倍块	单倍型	分布频率/%	抗感组频率/%	易感组频率/%	χ^2	$P^{1)}$
Virus	Haploblock	Haplotype	Distribution frequency	Frequency in resistant group	Frequency in susceptible group		
SGIV	单倍块1	TTT	42.50	43.00	42.00	0.020	0.890
	Block 1	AAA	32.00	30.00	34.00	0.370	0.540
		TAA	13.00	15.00	14.00	0.040	0.840
		TAT	12.50	12.00	10.00	0.200	0.650
	单倍块2	CAG	56.00	58.00	54.00	0.330	0.570
	Block 2	TTA	43.00	41.00	45.00	0.000	0.990
		CAA	1.00	1.00	1.00	0.000	1.000
RGNNV	单倍块1	TACGGT	23.20	20.00	27.40	2.950	0.086
	Block 1	AGTCAC	12.70	13.30	11.90	0.177	0.674
		TGCGGT	12.70	13.80	11.30	0.528	0.468
		TACCAT	12.50	12.40	12.50	0	0.987
		AGTCAT	13.50	14.20	12.50	0.245	0.621
		AACGGT	12.00	12.00	11.90	0.001	0.977
		TGTCAT	13.50	14.20	12.50	0.245	0.621

1) $P>0.05$ 表示该位点的单倍型分布频率在抗感组和易感组之间差异不显著(χ^2 检验)

1) $P>0.05$ indicates the distribution frequency of haplotype of the site is not significantly different between the resistant group and the susceptible group (χ^2 test)

3 讨论与结论

3.1 *PPAR-δ* 基因的 SNP 位点分布分析

在本研究中,在石斑鱼对 SGIV 的易感和抗感群体中共筛查到 9 个 SNP 位点,全部位于内含子区域,在石斑鱼对 RGNNV 的易感和抗感群体中共筛查到 8 个 SNP 位点,除 SNP-N1 位于外显子区域外,其余均分布在内含子区域,且 SNP-N1 产生的突变为同义突变,对氨基酸编码并不造成影响。尽管对 SNP 的研究表明,SNP 位点既可能发生在编码区也可能发生在非编码区,但其发生在非编码区的机率更大,这是由于相较于具有编码功能的外显子,内含子在进化上受到的压力更小一些,故内含子的核苷酸多态性和变异度会明显高于外显子^[18]。尽管内含子不参与基因的编码功能,但其在机体中仍发挥着重要作用,内含子对机体的 mRNA 前体起着调节其剪接、运输和降解的作用,此外,近年来的研究还表明内含子对基因的表达也起着重要的调控作用^[19]。因此我们推测,本研究在 *PPAR-δ* 基因内含子中发现的 SNP 位点,也许与该基因的转录调控相关,其不同突变体通过影响 *PPAR-δ* 的转录调控来发挥免疫调控功能,从而影响宿主的抗病性状,在我们今后的研究中,会对该机制进一步深入分析。

3.2 SNP 位点在不同群体中的多态性分析

Botstein 等^[20]对 SNP 位点进行分类时提出,当 PIC 大于 0.50 时,该位点为高度多态性位点;PIC 大于或等于 0.25 而小于 0.50 时为中度多态性位点;PIC 小于 0.25 时为低度多态性位点。对本试验中发现的 SNP 位点进行多态性分析,结果显示石斑鱼 *PPAR-δ* 基因 SNP 位点在抗感组和易感组中均表现为低度或中度多态,并未出现高度多态位点。而在草鱼、罗非鱼等的免疫基因 SNP 位点分析中也发现,中度多态性位点较多,低度和高度多态性位点偏少,造成这一现象的原因可能是由于 SNP 位点为典型的二等位基因表达,本身多态性不高^[21],此外,用于筛选抗病性状的群体会在养殖过程中经过自然选择和人工选择,淘汰掉抗病能力差的个体,导致群体多样性下降,因此 SNP 位点的整体多态性不高。

Hardy-Weinberg 平衡分析表明,在不同感染组群体中均检测到不符合 Hardy-Weinberg 平衡的 SNP 位点,由于本研究中的试验群体均来自养殖场,而养殖场的亲本是经过了长期人工选育过程而获得的,因此群体遗传多态性在选育过程中会逐渐

降低,从而导致部分 SNP 偏离 Hardy-Weinberg 平衡。

3.3 SNP 位点与病毒抗性性状的关联分析

SNP 是第 3 代分子标记技术,其具有分布广泛、遗传稳定性高,易于分型等特点。近年来,SNP 标记技术在水产动物育种中得到广泛应用^[22]。在草鱼中,采用 Snapshot 法筛选与草鱼呼肠弧病毒(GCRV)抗感/易感性状关联的 SNP 位点,结果表明在 *RIG-I*(视黄酸诱导基因蛋白 1)、*TLR3*(Toll 样受体 3)和补体 *C6* 等许多重要免疫基因中均筛选到多个抗病相关 SNP 位点和单倍型,可以作为草鱼抗出血病品系的构建提供技术手段^[23-25]。在罗非鱼中,同样利用 Snapshot 分型法,在 *LBP*(脂多糖结合蛋白)、*NOD1*(核苷酸结合和寡聚化结构域 1)和 *MCP-8*(肥大细胞蛋白酶-8)等基因中筛选出多个与无乳链球菌抗性关联的 SNP 位点和单倍型^[26-28]。此外,基于高通量测序,全基因组数据库分析等其他技术手段也分别在异育银鲫、牙鲆、虹鳟、鲤鱼等重要经济鱼类中分别筛选获得与鲫疱疹病毒(CaHV)、鳗弧菌、传染性造血器官坏死病毒(IHNV)和鲤疱疹病毒(CyHV-3)等病原抗性关联的 SNP 位点。

在 *PPARs* 基因 SNP 分子标记研究方面,目前在人、鼠以及牦牛上已有相关研究,而在低等脊椎动物上的研究鲜有报道。有研究对黑线仓鼠繁殖相关基因 *PPAR-δ* 部分序列进行 SNP 分析,发现其外显子区域发生碱基突变的概率较大,与人类研究结果一致,猜测与其功能有密切关系^[29]。*PPARs* 基因作为调控牦牛肌内脂肪沉积的相关候选基因,分析其基因多态性,并与生长性状进行关联分析,为牦牛分子育种提供了科学依据^[30]。

在本试验中,在 SGIV 感染组中筛选到 9 个 SNP 位点,与抗病性状的关联分析结果表明,SNP-S7 基因型频率在易感组和抗感组中存在显著差异分布($P<0.05$)。该位点的 TT 和 AA 2 种纯合子基因型与 SGIV 抗感性状相关,而 AT 杂合子基因型与 SGIV 易感性相关。对 9 个 SNP 位点进行连锁不平衡分析,结果显示:SNP-S4、SNP-S5 和 SNP-S6 这 3 个位点高度连锁,构成单倍块 1,可形成 TTT、AAA、TAA 和 TAT 共 4 个单倍型;SNP-S7、SNP-S8 和 SNP-S9 这 3 个 SNP 位点高度连锁,构成单倍块 2,可形成 CAG、TTA 和 CAA 共 3 个单倍型。将上述单倍型与石斑鱼抗虹彩病毒抗性性状进行关联分析,结果显示上述单倍型与石斑鱼抗虹彩病毒抗性性状均无显著的相关性($P>0.05$)。在 RGNNV 感染群体中筛选到 8 个 SNP 位点,与抗病

性状进行关联分析结果表明, SNP-N5(g.2510C>T) 基因型频率在抗感组和易感组中存在显著差异分布 ($P<0.05$), 该位点的 CC 基因型与 RGNNV 易感性状相关, CT 基因型则与 RGNNV 抗性相关。连锁不平衡分析结果显示, SNP-N3、SNP-N4、SNP-N5、SNP-N6、SNP-N7 和 SNP-N8 这 6 个 SNP 位点高度连锁, 构成单倍块 1, 可形成 TACGGT、AGTCAC、TGCGGT、TACCAT、AGTCAT、AACGGT 和 TGTCAT 共 7 个单倍型。将上述单倍型与石斑鱼抗 RGNNV 性状进行关联分析, 结果显示 7 个单倍型与石斑鱼抗神经坏死病毒抗性性状均无显著的相关性 ($P>0.05$)。上述研究结果中筛选出来的与抗 SGIV 和 RGNNV 关联的 SNP 位点及其基因型可以作为石斑鱼抗病品种选育的候选分子标记。

在本试验中, 虽然抗性关联 SNP 位点与其他位点形成了高度连锁的单倍块, 但并没有单倍型与抗病性状显著关联, 通常情况下, 将位于 1 条染色体上某一区域的 1 组相关联的多个 SNP 等位点称为单倍型, 其经常被用于基因组关联研究、复杂的致病基因或者重要经济性状基因的定位以及多态性筛选研究中, 相较于单个 SNP 位点的分析, 其效应分析更为可靠, 基因型检测工作也更为高效^[31]。因此本研究这些单倍块暂时无法用于石斑鱼抗病品系的构建工作中。

3.4 总结

本研究分析了石斑鱼 *PPAR-δ* 基因组多态性及其与 SGIV 和 RGNNV 抗感/易感性状的相关性, 研究发现 SNP-N5(g.2510C>T) 与石斑鱼 RGNNV 抗性显著相关, SNP-S7(g.4595T>A) 与 SGIV 抗性显著相关 ($P<0.05$), 该研究结果为石斑鱼病毒性疾病的抗病选育工作提供了理论基础和技术支持。

参考文献:

[1] 罗鸣, 陈傅晓, 刘龙龙, 等. 我国石斑鱼养殖疾病的研究进展[J]. 水产科学, 2013, 32(9): 549-554.

[2] QIN Q W, CHANG S F, NGOH-LIM G H, et al. Characterization of a novel ranavirus isolated from grouper *Epinephelus tauvina*[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2003, 53(1): 1-9.

[3] COSTA J Z, THOMPSON K D. Understanding the interaction between Betanodavirus and its host for the development of prophylactic measures for viral encephalopathy and retinopathy[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2016, 53: 35-49.

[4] 黄剑南, 郭志勋, 冯娟, 等. 鱼类诺达病毒及其所导致的疾病[J]. 水产学报, 2006, 30(6): 831-836.

[5] VIGNAL A, MILAN D, SANCRISTOBAL M, et al. A

review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics[J]. Genetics Selection Evolution, 2002, 34(3): 275-305.

[6] 高焕, 赖晓芳, 孟宪红, 等. 中国明对虾抗菌肽基因应答 WSSV 侵染的表达及其 SNP 分析[J]. 中国水产科学, 2011, 18(3): 646-653.

[7] BAO Y, LI L, ZHANG G. Polymorphism of the superoxide dismutase gene family in the bay scallop (*Argopecten irradians*) and its association with resistance/susceptibility to *Vibrio anguillarum*[J]. Developmental and Comparative Immunology, 2010, 34(5): 553-561.

[8] FU G H, BAI Z Y, XIA J H, et al. Characterization of the *LECT2* gene and its associations with resistance to the big belly disease in Asian seabass[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2014, 37(1): 131-138.

[9] DUNN S E, BHAT R, STRAUS D S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor delta limits the expansion of pathogenic Th cells during central nervous system autoimmunity[J]. Journal of Experimental Medicine, 2010, 207(8): 1599-1608.

[10] SUN L, SHI Y, WANG G, et al. *PPAR-delta* modulates membrane cholesterol and cytokine signaling in malignant B cells[J]. Leukemia, 2018, 32(1): 184-193.

[11] NEEL J G, GRIMALDI P A. Physiological functions of peroxisome proliferator-activated receptor beta[J]. Physiological Reviews, 2014, 94(3): 795-858.

[12] JI J D, KIM H J, RHO Y H, et al. Inhibition of IL-10-induced STAT3 activation by 15-deoxy-Delta12, 14-prostaglandin J2[J]. Rheumatology, 2005, 44(8): 983-988.

[13] WANG Y, YU Y, WANG Q, et al. *PPAR-δ* of orange-spotted grouper exerts antiviral activity against fish virus and regulates interferon signaling and inflammatory factors[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 94: 38-49.

[14] HUANG X, HAUNG Y, SUN J, et al. Characterization of two grouper *Epinephelus akaara* cell lines: Application to studies of Singapore grouper iridovirus (SGIV) propagation and virus-host interaction[J]. Aquaculture, 2009, 292(3/4): 172-179.

[15] YANG M, WEI J, LI P, et al. MHC polymorphism and disease resistance to Singapore grouper iridovirus (SGIV) in the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*[J]. Science Bulletin, 2016, 61(9): 693-699.

[16] YANG M, WANG Q, CHEN J, et al. Identification of candidate SNPs and genes associated with anti-RGNNV using GWAS in the red-spotted grouper, *Epinephelus akaara*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2021, 112: 31-37.

[17] NORTON N, WILLIAMS N M, WILLIAMS H J, et al. Universal, robust, highly quantitative SNP allele frequency measurement in DNA pools[J]. Human Genetics, 2002, 110(5): 471-478.

[18] PARENTEAU J, ABOU ELELA S. Introns: Good day

junk is bad day treasure[J]. *Trends in Genetics*, 2019, 35(12): 923-934.

[19] SHAUL O. How introns enhance gene expression[J]. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2017, 91: 145-155.

[20] BOTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32(3): 314-331.

[21] HUBERT S, BUSSEY J T, HIGGINS B, et al. Development of single nucleotide polymorphism markers for Atlantic cod (*Gadus morhua*) using expressed sequences[J]. *Aquaculture*, 2009, 296(1/2): 7-14.

[22] 周欣, 高风英, 卢迈新. 鱼类抗病育种研究进展[J]. *大连海洋大学学报*, 2021, 36(3): 510-523.

[23] WAN Q Y, SU J G, CHEN X H, et al. Genomic sequence comparison, promoter activity, SNP detection of *RIG-I* gene and association with resistance / susceptibility to grass carp reovirus in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2013, 39(4): 333-342.

[24] HENG J F, SU J G, HUANG T, et al. The polymorphism and haplotype of *TLR3* gene in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and their associations with susceptibility / resistance to grass carp reovirus[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(1): 45-50.

[25] SHEN Y B, ZHANG J B, XU X Y, et al. A new haplotype variability in complement C6 is marginally associated with resistance to *Aeromonas hydrophila* in grass carp[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(5): 1360-1365.

[26] 高风英, 卢迈新, 曹建萌, 等. 尼罗罗非鱼 *NOD1* 基因 SNP 位点和单倍型与抗无乳链球菌感染的关联分析[J]. *农业生物技术学报*, 2018, 26(11): 1949-1961.

[27] FU G H, LIU F, XIA J H, et al. The LBP gene and its association with resistance to *Aeromonas hydrophila* in tilapia[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(12): 22028-22041.

[28] FU G H, WAN Z Y, XIA J H, et al. The *MCP-8* gene and its possible association with resistance to *Streptococcus agalactiae* in tilapia[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 40(1): 331-336.

[29] LATRUFFE N, VAMECQ J. Peroxisome proliferators and peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) as regulators of lipid metabolism[J]. *Biochimie*, 1997, 79(2/3): 81-94.

[30] 纪永吉. 牦牛 *PPARα*、*PPARγ*、*PPARδ* 基因的多态性与生长性状相关性研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2016.

[31] 丁克越. 不同单倍型块定义在单倍型块结构推断与 ht-SNPs 选择中的效应[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2004.

【责任编辑 庄 延】