

文章编号: 1674-5566(2024)01-0001-08

DOI: 10.12024/jsou.20230304117

## 基于HRM技术的草鱼抗小瓜虫 *nirc3* 基因 SNP 标记开发及关联分析

陈 锋<sup>1</sup>, 黄梦璐<sup>1</sup>, 李家乐<sup>1,2,3</sup>, 沈玉帮<sup>1,2,3</sup>

(1. 上海海洋大学 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 上海水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306; 3. 上海海洋大学 水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心, 上海 201306)

**摘要:** 为探究草鱼 *nirc3* 基因的多态性和抗多子小瓜虫 (*Ichthyophthirius multifiliis*) 病之间的关联性, 通过多子小瓜虫感染草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 筛选出易感群体和抗病群体, 并分析比较两个群体 *nirc3* 基因的单核苷酸多态性 (Single nucleotide polymorphism, SNP) 位点, 使用高分辨率熔解 (High resolution melt, HRM) 和 Sanger 测序技术验证 SNP 位点基因型, 并将获得的 SNP 位点与草鱼抗病性状进行关联性分析。结果显示, 从草鱼 *nirc3* 基因中筛选得到了 4 个 SNPs 位点, 有 3 个 SNPs 位点 (SNP1、SNP3 和 SNP4) 成功分型, 其中 SNP1 和 SNP3 中分别含有 AA、AG 和 AA、GG 两种基因型, 且与抗多子小瓜虫性状显著相关; 倍型组合及其与抗病能力相关性分析显示, 与其他二倍型相比, 由 SNP1 的 AG 和 SNP3 的 AA 基因型组成的二倍型 (D1) 中 100% 为抗病个体, 由 SNP1 的 AG 与 SNP3 的 GG 基因型组成的二倍型 (D2) 中 95% 为抗病个体, 均为抗病优势基因型。研究表明, 抗小瓜虫的草鱼全体中存在 *nirc3* 基因多态性现象, 并且不同分型与抗多子小瓜虫感染的能力显著相关, 其中 SNP1 AG 与 SNP3 AA 组合的 D1 基因型为最强基因型。该研究结果为进一步开展草鱼抗小瓜虫病的育种和预防提供了重要的理论依据和技术支持。

**关键词:** 草鱼; 多子小瓜虫; 高分辨率熔解; 单核苷酸多态性

**中图分类号:** S 967.4      **文献标志码:** A

草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 是我国重要的淡水经济鱼类之一<sup>[1]</sup>, 但在其养殖过程中会遭受多种病害, 其中多子小瓜虫 (*Ichthyophthirius multifiliis*) 是危害性较大的寄生虫之一, 会导致养殖草鱼批量死亡, 但目前尚无有效的治疗方法<sup>[2]</sup>。

单核苷酸多态性 (Single nucleotide polymorphism, SNP) 是常见的基因多态性类型之一, 由于其在基因组水平上广泛分布, 且易于检测和分析, 因此在疾病筛查以及遗传育种等方面有越来越多的应用<sup>[3]</sup>, 目前许多基因的 SNP 位点已经被证明与抗病或易感性状相关, 例如 *NOD1*<sup>[4]</sup>, *SRR*<sup>[5]</sup>, *T2DM*<sup>[6]</sup>, *TRIs*<sup>[7]</sup> 等基因。随着高通量测序技术的发展, 高分辨率熔解 (High resolution melt, HRM) 技术应运而生, 该技术原理主要是依据不同单核苷酸的结构组成不同<sup>[8]</sup> (比如: 5 种碱基类型、磷酸个数以及五碳糖的种类), 因此不同分子达到不同变性程度所需的温度不同, 即可可视化上的溶解温度和曲线形态各有不同。与传统

测序技术相比, HRM 具有极高的敏感性, 且具有通量高、成本低、结果准确等优点<sup>[9]</sup>。因此本研究使用 HRM 技术对感染过小瓜虫的草鱼个体进行检测。通过对具有不同表型的草鱼个体进行多态性分析, 筛选出与小瓜虫抗性相关的 SNP 位点, 用于后续与抗病性状的关联性分析<sup>[10]</sup>。

NLR 蛋白家族 (Nucleotide binding oligomerization domain-like receptors, NLRs) 广泛存在于动物中, 其多个蛋白在细胞内都具有特异病原传感器的功能, 在特异以及非特异免疫系统关键上游或下游通路中起着重要的作用, 有报道指出该家族中的蛋白在硬骨鱼群体中具有响应病害的功能<sup>[11]</sup>。NLR3 是 NLRs 的成员之一, 在鱼类病害的免疫过程中起到了积极作用: ZHOU 等<sup>[12]</sup> 有关团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 抗病性的研究中发现 *nirc3* 基因在非特异性免疫通路中行使相关功能; 同样的, RAHUL 等的研究也证实了 *nirc3* 基因

收稿日期: 2023-03-04      修回日期: 2023-05-23

基金项目: 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系 (CARS-45-03)

作者简介: 陈 锋 (1997—), 男, 硕士研究生, 研究方向为鱼类遗传育种。E-mail: 3414857194@qq.com

通信作者: 沈玉帮, E-mail: ybshen@shou.edu.cn

版权所有 © 《上海海洋大学学报》编辑部 (CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

的免疫作用,其可以通过负向调节 PI3K-mTOR 轴并激活细胞自噬反应<sup>[11]</sup>。此外,*nlrc3*可能在宿主对细菌感染的早期反应中发挥重要作用,例如:尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)受到无乳链球菌感染后 *nlrc3* 基因表达显著升高<sup>[13-15]</sup>。因此,本研究以感染多子小瓜虫的草鱼为研究对象,根据其感染后存活时间将研究对象分为抗病组和易感组,结合课题组预先测得的转录组数据对 *nlrc3* 基因位点的多态性进行生信分析,之后结合 HRM 技术对该基因上的多态性位点做进一步的确认、分型和组合,最后将各位点以及组合的二倍基因型与被感染草鱼的抗病指标做关联性分析,找到草鱼抗多子小瓜虫能力的最优基因型。以期为当下养殖业中草鱼育种相关工作提供进一步的科学依据和理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验草鱼

本实验草鱼由国家级草鱼遗传育种中心提供,实验用鱼未曾有多子小瓜虫接触史。将草鱼暂养在上海海洋大学草鱼实验室 200 L 塑料养殖桶中,控制溶氧在  $(4.0 \pm 0.5)$  mg/L,水温为 15~18 °C。暂养 7 d 后选取 450 尾生长发育良好、活力好、体表无损伤的个体作为实验用鱼[平均体长:  $(5.1 \pm 0.4)$  cm,平均体质量:  $(12.50 \pm 0.63)$  g]进行多子小瓜虫感染实验。

### 1.2 多子小瓜虫感染草鱼及样品采集

排除外源因素刺激可能性后,将 450 条试验鱼随机平分为 3 组,分别用 200 L 的养殖桶养殖。将多子小瓜虫培养于小牛血清培养基中进行扩培。使用制备好的小瓜虫溶液(8 000 个/L)对 450 尾草鱼进行感染,并每天换水 10%。感染 4 d 后出现死亡个体,经镜检后发现死亡草鱼鳃部存在大量多子小瓜虫,鳃丝网状结构破损,毛细血管消失,鳃丝细胞结构紊乱,感染 5 d 后死亡个体数不断上升,至第 9 天死亡个体数达到最大,随后死亡个体数开始逐渐下降并趋于稳定,感染 14 d 以后无死亡个体出现。取感染后先死亡的 144 条作为易感组,最后存活的 144 条草鱼作为抗病组,用预先准备好的且已消毒的剪刀剪取鳃部于装有无水乙醇的 1.5 mL 无酶离心管中,置于 4 °C 冰箱中保存备用。

### 1.3 基因组 DNA 提取

使用动物基因组 DNA 快速抽提试剂盒(生

工,上海)提取 DNA,使用微量分光光度计 NanoDrop 2000(Thermo,美国)对 DNA 浓度和纯度进行检测,再将基因组 DNA 溶液稀释至 50 ng/ $\mu$ L 的工作浓度,放入 -20 °C 冰箱中保存。

### 1.4 转录组中 SNP 位点筛选

从实验室转录组文库中获得草鱼抗小瓜虫基因序列(PRJNA896750)并使用 samtools 软件(v1.5)构建索引。然后,在该课题组服务器上,分别使用 bwa-mem2 和 GATK 4.13 相关命令将 Clean reads 比对到参考基因组上,并进行 PCR 重复标记、变异检测、GVCF 文件合并以及 GVCF 文件转换等处理。将合并后的 VCF 文件注释并比对到草鱼基因组中,为了评估筛选结果,随机选取 20% 的 SNP 位点并使用 Variants To Table 模块获取 SNP 位点的 DP、MQ、QD、FS、SOR、MQ Rank Sum、Read Pos Rank Sum 等 7 个参数的数值。通过使用 R 脚本(vcf\_filter.R),计算各参数值在各变异位点的密度分布。根据各参数总体分布情况来设置参数阈值,然后确定过滤参数值为  $DP < 5$ ,  $DP > 10\ 000$ ,  $QD < 2.0$ ,  $MQ < 34.0$ ,  $FS > 10.0$ ,  $SOR > 3.5$ ,  $-cluster\ 3$ ,  $-window\ 10$ 。最后,使用 GATK Variant Filtration 根据上述过滤参数阈值对获得的 SNP 进行硬过滤获得 SNP 位点。

### 1.5 高分辨率熔解 SNP 位点分型

根据草鱼基因组上 *nlrc3* 基因序列信息,使用 Primer 5 软件对获得的 4 个 SNPs 位点进行引物设计,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表 1)。

使用 QuantStudio 6 Flex 分析仪进行扩增,扩增体系包括 1  $\mu$ L DNA 模板,2  $\mu$ L 上游和下游引物,1  $\mu$ L Ace Taq DNA Polymerase,1  $\mu$ L dNTP Mix,5  $\mu$ L Ace Taq Buffer ( $Mg^{2+}$  plus)以及 2.5  $\mu$ L LyGreen 核酸染料;扩增反应程序为 95 °C 预变性,5 min;95 °C 变性,30 s,56 °C 退火,30 s,72 °C 延伸,1 min,34 个循环;72 °C 延伸,7 min;再对扩增产物的高分辨率熔解曲线进行筛选与采集,采集曲线的温度范围为 45~97 °C,升温速度为 0.1 °C/s,最后使用 Quant Studio realtime software 软件对 SNPs 位点分型进行分析。根据分型结果,将 PCR 扩增片段送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行 Sanger 测序,采用 Chromas 软件对测序图谱和 *nlrc3* 基因的单点突变进行分析,用于对 HRM 的分型结果进行比较和验证,获得基因型。

表 1 基因突变位点所用引物信息  
Tab. 1 Primer information for gene mutation sites

Name	SNP type	Primers sequence (5'-3')	Tm/°C	Production/bp
<i>nrc3</i> -F1	G/A	TGTGCATCTCTCCTTCACAAAC	55.0	192
<i>nrc3</i> -R1	A/G	AACCGCAGGAAAAGATCCAGA	56.4	
<i>nrc3</i> -F2	G/A	CAAGAAGCAGATCAGACAGC	53.5	87
<i>nrc3</i> -R2	A/G	TGATGGATTCTCAGGAGAGT	52.3	
<i>nrc3</i> -F3	A/C	TGACTCTCCTGAGAAATCCA	52.1	50
<i>nrc3</i> -R3	C/A	CCAGTTCATTGACAGAGTGG	53.2	
<i>nrc3</i> -F4	G/A	TCAGTGGTCAGCTGTAGTTT	53.1	141
<i>nrc3</i> -R4	A/G	GATTCTTTCATCACGGGCAG	53.8	

1.6 SNP 多态性与抗多子小瓜虫的关联性分析

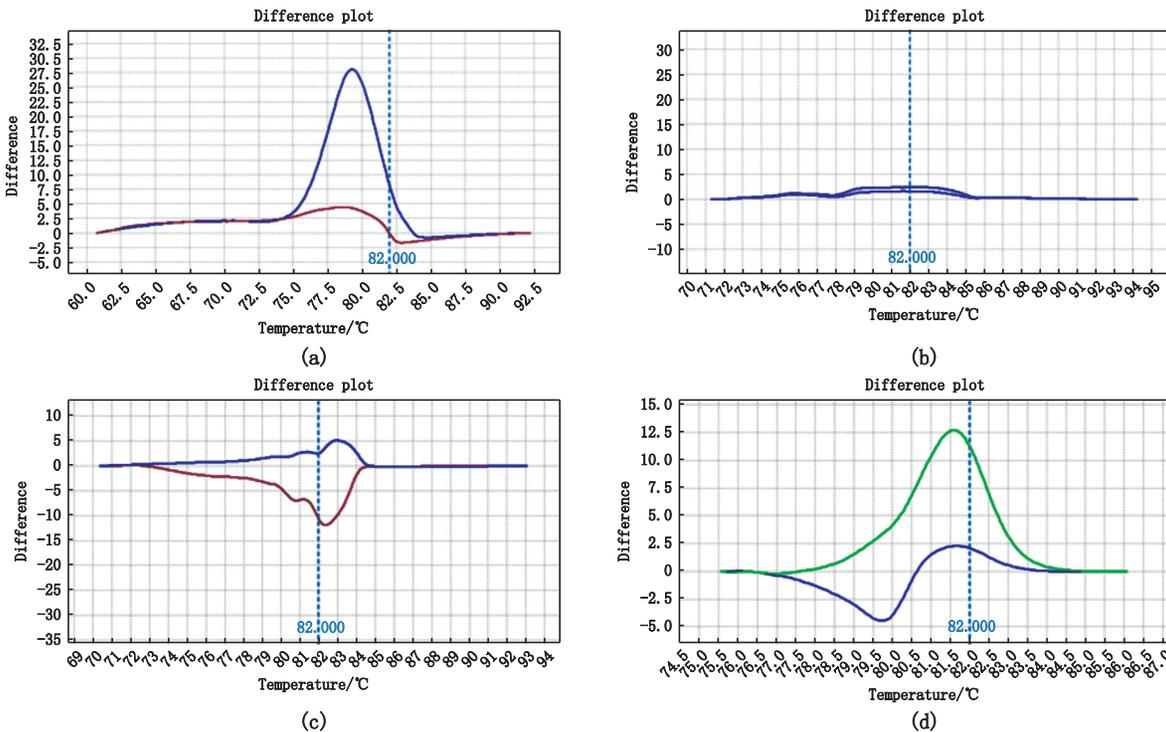
通过对获取到的 SNPs 位点进行分析对应的基因型和等位基因在不同群体中的频率和比例,结合抗病性状指标进行位点多态性和基因型之间的联合分析。利用 IBM SPSS statistics 26 软件对 各组数据进行卡方检验,  $P < 0.05$  为差异显著,  $P < 0.01$  为差异极显著。

共表达网络分析(WGCNA),发现 *nrc3* 基因可能为抗多子小瓜虫病的关键基因,因此选定 *nrc3* 基因为研究基因,发现 *nrc3* 基因上有 4 个 SNP 位点。将 SNP 位点分别命名为 SNP1、SNP2、SNP3、SNP4。之后用 HRM 技术对 4 个抗病相关 SNP 位点进行分型验证,结果如标准视图所示,SNP1、SNP3 和 SNP4 产生的熔解曲线形状各不相同(如图 1),具有较好的多态性,证明这 3 个 SNPs 分子标记可用于进一步的基因分型。而 SNP2 位点产生的熔解曲线没有显著差异,证明 SNP2 标记分型效果差,不同性状的个体之间没有差异,因此在后续分析中予以剔除(如图 1b)。

2 结果

2.1 多态 SNP 分子标记的筛选

本研究对课题组之前获得的抗多子小瓜虫病的不同性状草鱼个体的转录组数据进行加权



(a) SNP1 筛选结果; (b) SNP2 筛选结果; (c) SNP3 筛选结果; (d) SNP4 筛选结果。  
(a) SNP1 screening results; (b) SNP2 screening results; (c) SNP3 screening results; (d) SNP4 screening results.

图 1 HRM 筛选结果图

Fig. 1 HRM screening results

## 2.2 草鱼抗病相关SNP的HRM分型结果

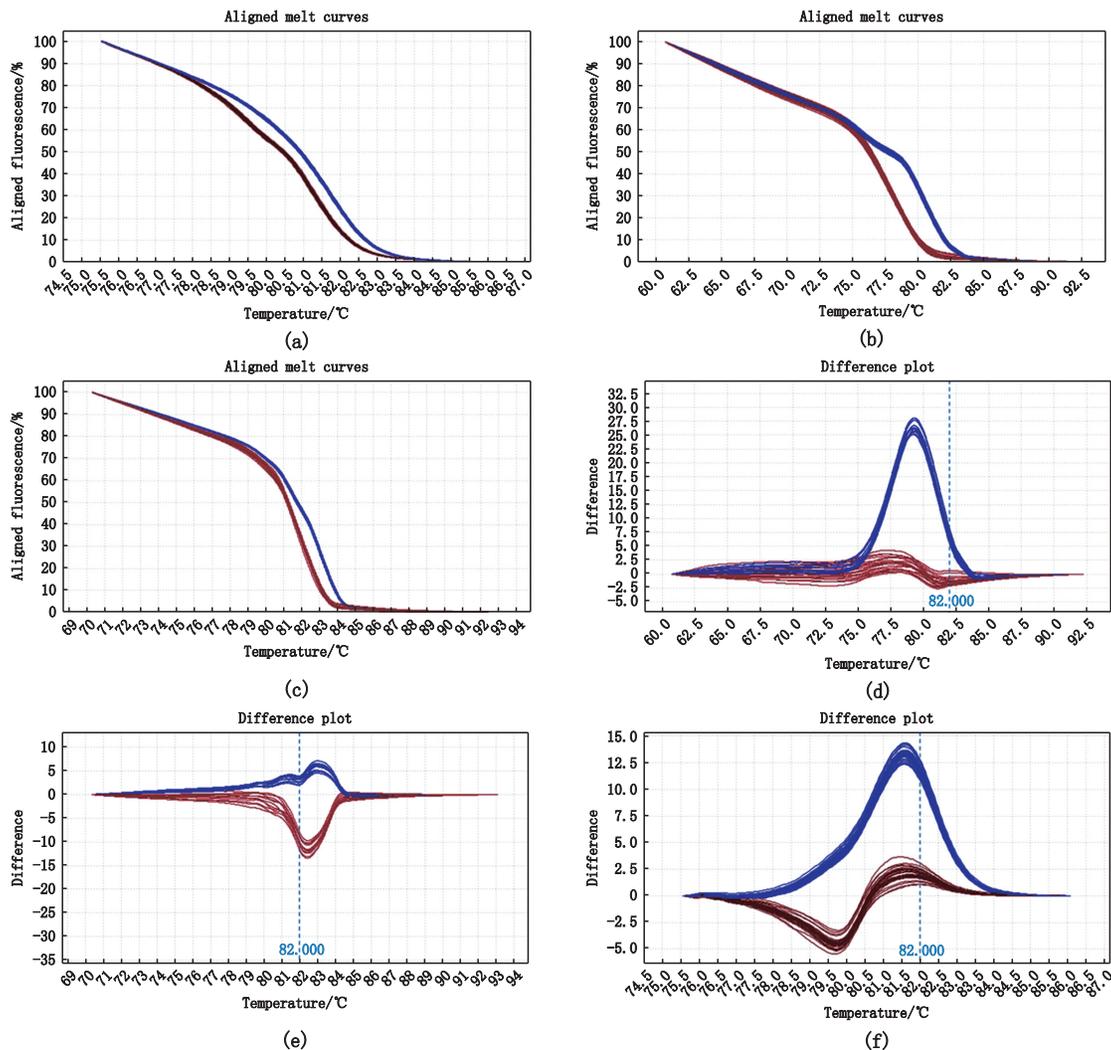
针对已经筛选出分型效果显著的SNP1、SNP3、SNP4 3个位点,在反应体系和普通PCR程序下,使用HRM技术对抗病、易感组的288条草鱼进行分型,3个HRM结果以差异作图显示(图2)。其中KB代表抗病组,YG代表易感组。

草鱼群体 *nirc3* 基因上3个SNP位点的高分辨率熔解曲线,如图2c和2e所示,SNP1、4的熔解曲线趋势一致,证明其发生了单核苷酸的转换,确定对应的基因型为G/A;SNP3的熔解曲线趋势差异明显,证明其转换发生程度不完全。易感组和抗病组在标准荧光峰值图中峰值差距明显,区分度高,进一步证明了这3个SNP位点的分子标记可用

于抗病性状分型,如图2b、2d和2e所示。

## 2.3 草鱼抗病相关SNP位点的基因型分析

3个抗病相关的SNP位点在熔解曲线上T<sub>m</sub>值差异显著,表明分型成功,且这3个位点的等位基因频率在抗病和易感群体中存在显著差异(表2)。Sanger测序结果与HRM分型结果一致(表2),测序结果显示,SNP1、SNP4位点发生的突变为G/A,SNP3则为A/G,因此,SNP1基因型为AA或AG型;SNP3基因型为AA或GG型;SNP4的基因型为AA或GG型。最后将不同基因型与草鱼的抗病能力进行关联性分析,结果表明SNP1的AG型与SNP3位点的AA型与抗病性状有显著相关关系( $P < 0.05$ ),SNP4位点与抗病性状无显著性关联。



(a)和(b). SNP1的高分辨率熔解曲线和标准熔解曲线峰图;(c)和(d). SNP2的高分辨率熔解曲线和标准熔解曲线峰图;(e)和(f). SNP4的高分辨率熔解曲线和标准熔解曲线峰图;蓝色是KB组,红色为YG组。

(a) and (b). High fraction melting curve and standard melting curve peak diagram of SNP1; (c) and (d). High-resolution melting curve and standard melting curve profile of SNP2; (e) and (f). High-resolution melting curve and standard melting curve profile of SNP4; Blue is KB group, red is YG group.

图2 HRM分析结果图

Fig. 2 HRM analysis results

表 2 SNP 位点的基因型和基因频率  
Tab. 2 Genotypes and gene frequencies of SNP loci

位置 Loci	基因型 Genotype	易感 Susceptible	抗病 Resistant	$\chi^2$	等位基因 Allele	易感 Susceptible	抗病 Resistant	$\chi^2$
SNP1 A > G	AA	142 (0.986)	13 (0.091)	232.482 (0.001)	A	286 (0.993)	157 (0.545)	162.685 (0.001)
	AG	2 (0.013)	131 (0.909)					
	GG	0 (0)	0					
SNP3 A > G	AA	20 (0.138)	105 (0.729)	102.125 (0.001)	A	40 (0.138)	210 (0.729)	102.125 (0.001)
	AG	0 (0)	0 (0)					
	GG	124 (0.861)	39 (0.271)					
SNP4 G > A	AA	123 (0.854)	22 (0.153)	147 (0.001)	A	246 (0.854)	44 (0.153)	183.74 (0.001)
	AG	0 (0)	0 (0)					
	GG	21 (0.145)	122 (0.847)					

表 3 不同基因型与抗病性状关联分析  
Tab. 3 Association analysis between different  
genotypes and disease resistance traits

位点 Loci	基因型 Genotype	个数 Number	易感 Susceptible	抗病个数 Resistant	$\chi^2$
SNP1	AG	132	2	130	229.147 (0.001)
	AA	156	142	14	
SNP3	AA	125	20	105	102.125 (0.001)
	GG	163	124	39	
SNP4	AA	135	15	120	0.306 (0.580)
	GG	143	19	124	

#### 2.4 不同二倍型与草鱼抗病性状关联分析

为提高分析的准确性,因 SNP4 与抗病性状无显著性关联,所以仅将 SNP1 与 SNP3 组合为二倍型,最终共检测到 4 种二倍型。之后对不同种类的二倍型与抗病能力之间做相关性分析,结果显示:由 SNP1 的 AG 和 SNP3 的 AA 组成的二倍型 D1 中全部为抗病个体(抗病率为 100%),为抗病优势基因型;由 SNP1 的 AG 和 SNP3 的 AA 组成的二倍型 D2 次之(抗病率为 95%),两种二倍型均表现出强抗病性状。

表 4 SNP1、SNP3 组成的二倍型和抗病性状的关联分析  
Tab. 4 Correlation analysis of the diploid and disease  
resistance characters composed of SNP1 and SNP3

二倍型 Diploid type	SNP 位点 Loci		数量 Number	易感 数量 Susceptible	抗病 数量 Resistant	抗病率 Rate
	SNP1	SNP3				
D1	AG	AA	91	0	91	1 <sup>a</sup>
D2	AG	GG	41	2	39	0.95 <sup>a</sup>
D3	AA	AA	34	20	14	0.41 <sup>b</sup>
D4	AA	GG	122	122	0	0 <sup>c</sup>

注:同列含有不同字母表示存在显著差异( $P < 0.05$ )。

Notes: The values with different superscript letters within a column are significantly different.

### 3 讨论

#### 3.1 基于 HRM 技术对 SNP 位点进行验证并对抗感染性状进行基因分型

随着测序技术的发展以及生物信息软件的开发和利用,针对 SNP 分子标记的检测和分析越来越便捷,并得到了广泛的普及,比如遗传育种、疾病诊断与防控等方面。而 HRM 技术是一种基于不同核苷酸熔解温度不同,进而可通过可视化等方式加以展示的原理的高通量测序技术,相较于传统测序技术,HRM 技术具有通量高、成本低并且准确度高等优点。因此本研究采用该技术对感染过白点病的近 300 条草鱼个体进行 SNP 位点的检测,并通过相应的结果对从转录组数据中筛选出的 SNP 位点加以验证并做最终的确认,之后再用于进行性状鉴定的基因分型位点,并与抗病性状进行相关性分析。

基于相关的测序及分析结果,虽然通过转录组数据得到与抗病基因(*nirc3* 基因)相关的位点共 4 个,分别标为 SNP1, SNP2, SNP3 和 SNP4,但 HRM 测序结果的标准图显示:在抗病和易感组中,SNP2 位点的熔解曲线并没有显著差异,表明该位点的数量在两组之间并无显著差异,即用于标记分型的结果较差,不能被标识为分子标记,在后续的分析中被剔除。因此,草鱼 *nirc3* 基因上可用于抗病性状标识的位点有 3 个,为 SNP1, SNP3 和 SNP4。之后,差异熔解曲线及 Sanger 测序结果进一步明确表示:在抗病组和易感组中,SNP1 和 SNP4 发生了单核苷酸 G/A 转换现象,SNP3 发生单核苷酸 A/G 转换现象。因此,SNP1 基因型为 AA 或 AG 型;SNP3 基因型为 AA 或 GG

型;SNP4基因型为AA或GG型。

### 3.2 *nirc3* 基因 SNP 标记与草鱼抗多子小瓜虫性状的关联分析

小瓜虫作为原生动物纤毛虫的一种,主要通过攻击鱼类的头、皮肤等部位对其进行感染,称为“白点病”,草鱼也是小瓜虫易感染物种中的一种,感染后体表组织发生充血以及继发性感染等症状,严重时出现大批死亡现象,因此对经济造成严重损失<sup>[16]</sup>。当小瓜虫侵入皮肤或腮会引发一系列的炎症反应,包括特异性和非特异性免疫的过程,而对应的免疫细胞,如淋巴细胞、T细胞和B细胞也会通过一系列的免疫机制和通路行使功能,如首先通过NOD样受体家族对病原体的受体进行识别<sup>[17]</sup>。*nirc3*基因作为NOD蛋白家族中的一员,通过特有的结构域能对不同的病原体加以识别,再通过其他信号通路(如MAPK、NF- $\kappa$ B等通路)起到调节炎症反应的作用,最终在细胞层面上表现为细胞吞噬等行为消灭病原体,进而达到维持宿主细胞内环境的稳态的目的<sup>[18]</sup>。目前在鳊鱼、尼罗罗非鱼、日本牙鲆中,均有文献报道其体内可通过相关的抗病基因介导免疫反应<sup>[18]</sup>,从而达到抵抗病原体的目的,但在草鱼中尚没有文献进行报道<sup>[19-20]</sup>。

RUAN<sup>[21]</sup>等发现低眼巨鲈(*Pangasianodon hypophthalmus*)*nirc3*基因有3个SNP位点与对嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)抗性有关。在本研究中,通过本课题组在前期实验中已发现草鱼*nirc3*基因可能为抗多子小瓜虫的关键基因,并且筛选得到与抗小瓜虫性状相关的3个SNP位点。之后通过与性状的相关性分析得出,SNP1和SNP3与草鱼的抗多子小瓜虫能力显著相关( $P < 0.05$ )。进一步,将这两个位点上的多态性进行组合并与抗病性状进行相关性分析,结果显示:*nirc3*基因上SNP1的AG和SNP3的AA基因型组中,全部为抗病个体,SNP1的AG与SNP3的GG基因型组中,95%为抗病个体,因此认为这两个组合为优势抗病基因型,这为后续从基因型角度筛选优良个体提供了有力的理论支持和技术指导。

综上所述,本研究在样本量的基础上,利用从转录组数据里得到的SNP标记,结合表型数据,通过关联分析的方法对草鱼抗多子小瓜虫性状相关SNP进行了验证,并确定了该实验群体抗

病的优势基因型,该结果可以为草鱼的分子标记辅助育种提供参考。

### 参考文献:

- [1] 刘芳玲,陈宇豪,张凯,等. 患多子小瓜虫病草鱼的血液指标及心脏病理研究[J]. 浙江师范大学学报(自然科学版), 2021, 44(4): 444-449.  
LIU F L, CHEN Y H, ZHANG K, et al. The heart disease and blood-change in *Ctenopharyngodon idella* after parasitized *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. Journal of Zhejiang Normal University (Natural Sciences), 2021, 44(4): 444-449.
- [2] 周建强,司思,祁增源,等. 牦牛*SMAD1*基因第1外显子SNPs检测及与生长性状的关联分析[J]. 西北农业学报, 2023, 32(2): 179-186.  
ZHOU J Q, SI S, QI Z Y, et al. Detection of SNPs in Exon 1 of *SMAD1* gene and its association with growth traits in Yak [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2023, 32(2): 179-186.
- [3] 杨林,刘桂兰,周礼敬,等. 云南光唇鱼小瓜虫病的防治试验研究[J]. 渔业致富指南, 2022(9): 60-62.  
YANG L, LIU G L, ZHOU L J, et al. Experimental study on the control of Small melon worm disease in Yunnan [J]. Guide to Getting Rich in Fishing, 2022(9): 60-62.
- [4] 姜赞,史加海. 基于GWAS数据库鉴定与食管癌相关的易感基因[J]. 南通大学学报(医学版), 2020, 40(6): 522-526.  
JIANG Y, SHI J H. Identification of susceptibility genes associated with esophageal cancer based on GWAS database [J]. Journal of Nantong University (Medical Science), 2020, 40(6): 522-526.
- [5] 王玉琢,张一鸣,董晓莲,等. 2型糖尿病易感基因SNP位点对生活方式干预降低血糖应答效果的修饰效应[J]. 遗传, 2020, 42(5): 483-493.  
WANG Y Z, ZHANG Y M, DONG X L, et al. Modification effects of T2DM-susceptible SNPs on the reduction of blood glucose in response to lifestyle interventions [J]. Hereditas (Beijing), 2020, 42(5): 483-493.
- [6] 胡启超,罗仍卓么,魏大为,等. 固有免疫相关编码基因在奶牛乳腺炎调节中的研究进展[J]. 生物技术通报, 2020, 36(12): 239-246.  
HU Q C, LUORENG Z M, WEI D W, et al. Research progress on innate immunity-related coding genes in the regulation of cow mastitis [J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(12): 239-246.
- [7] 鲁振华,牛良,张南南,等. 基于HRM获得与桃Tssd紧密连锁的SNP标记[J]. 中国农业科学, 2017, 50(8): 1505-1513.  
LU Z H, NIU L, ZHANG N N, et al. SNP marker tightly

- linked to Tssd for peach using high resolution melting analysis [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, 50(8): 1505-1513.
- [8] WANG S S, SONG F, WANG Y Y, et al. High resolution melting analysis (HRM) based on 16S rRNA as a tool for personal identification with the human oral microbiome [J]. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 2019, 7(1): 161-163.
- [9] 王冬梅, 李俊, 杨红敏, 等. 高分辨率溶解曲线 HRM 在 SNP 检测中的应用 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2015, 34(4): 892-895.
- WANG D M, LI J, YANG H M, et al. Application of high resolution melting curve in SNP detection [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2015, 34(4): 892-895.
- [10] 柴欣, 胡晓坤, 马徐发, 等. 团头鲂 *MHC II α* 基因的 SNP 位点开发、鉴定及与抗病性状关联分析 [J]. *华中农业大学学报*, 2017, 36(4): 76-82.
- CHAI X, HU X K, MA X F, et al. Screening, identification and association with disease resistance of *MHC II α* gene in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2017, 36(4): 76-82.
- [11] KRISHNAN R, RAJENDRAN R, JANG Y S, et al. NLRC3 attenuates antiviral immunity and activates inflammasome responses in primary grouper brain cells following nervous necrosis virus infection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022, 127: 219-227.
- [12] ZHOU F J, ZHAN Q F, DING Z J, et al. A *NLRC3-like* gene from blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*): Molecular characterization, expression and association with resistance to *Aeromonas hydrophila* infection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 63: 213-219.
- [13] HOU Z M, YE Z, ZHANG D D, et al. Characterization and expression profiling of NOD-like receptor C3 (NLRC3) in mucosal tissues of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) following bacterial challenge [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 66: 231-239.
- [14] GAO F Y, PANG J C, LU M X, et al. Molecular characterization, expression and functional analysis of NOD1, NOD2 and NLRC3 in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 73: 207-219.
- [15] 廖志伟. 草鱼 TLR5 两个膜型成员识别配体及信号通路研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2022.
- LIAO Z W. Study on the ligand recognition and signaling pathway of two membrane TLR5 members in grass carp [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2022.
- [16] 王哲, 刘春雷, 顾泽茂, 等. 多子小瓜虫的形态发生及其寄生导致翘嘴鲃鳃组织病理变化 [J]. *水生生物学报*, 2016, 40(5): 935-941.
- WANG Z, LIU C L, GU Z M, et al. Morphology and morphogenesis of *Ichthyophthirius multifiliis* and pathological study of gills of *Culter alburnus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, 40(5): 935-941.
- [17] 郭梦娇, 李明桃, 谭惠惠, 等. 兔 *NLRC3* 基因克隆及其表达特性研究 [J]. *中国畜牧兽医*, 2021, 48(11): 3940-3949.
- GUO M J, LI M T, TAN H H, et al. Study on cloning and expression characteristic of *NLRC3* gene in rabbit [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2021, 48(11): 3940-3949.
- [18] 李金蕊. 鳊鱼 NLR 家族的基因组水平研究和表达模式分析 [D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2016.
- LI J R. A genome-wide survey and expression analysis of NLR receptors in miyu croaker [D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2016.
- [19] LIU J X, LU L, LIU L L, et al. Genomic structure and molecular characterization of NLRC3-like from Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) and expression response to *Streptococcus iniae* and pathogen-associated molecular patterns [J]. *Fish and Shellfish Immunology Reports*, 2021, 2: 100042.
- [20] CHANG M X, XIONG F, WU X M, et al. The expanding and function of NLRC3 or NLRC3-like in teleost fish: Recent advances and novel insights [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2021, 114: 103859.
- [21] RUAN Z H, LI Y F, JIANG L S, et al. The SNPs of three immunity genes in striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* are associated with resistance against infection of *Aeromonas hydrophila* [J]. *Aquaculture*, 2022, 559: 738461.

## Development and association analysis of SNP markers of *nrc3* gene in grass carp against *Ichthyophthirius multifiliis* based on HRM technology

CHEN Feng<sup>1</sup>, HUANG Menglu<sup>1</sup>, LI Jiale<sup>1,2,3</sup>, SHEN Yubang<sup>1,2,3</sup>

(1. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Shanghai Collaborative Innovation Center of Aquatic Animal Genetics and Breeding, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** To investigate the relationship between the polymorphism of the *nrc3* gene in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and resistance to *Ichthyophthirius multifiliis*, susceptible and resistant groups were selected from grass carp populations infected with *I. multifiliis*. The single nucleotide polymorphism (SNP) sites of the *nrc3* gene in the two groups were analyzed and compared. High-resolution melting (HRM) and Sanger sequencing techniques were used to validate the genotypes of the SNP sites, and the obtained SNP sites were analyzed for their association with the disease resistance traits in grass carp. The results showed that four SNPs sites were identified from the *nrc3* gene in grass carp, and three SNP sites (SNP1, SNP3, and SNP4) were successfully genotyped. Among them, SNP1 and SNP3 exhibited two genotypes each (AA and AG for SNP1, AA and GG for SNP3) and were significantly associated with resistance to *I. multifiliis*. The analysis of haplotype combinations and their correlation with disease resistance revealed that the genotype composed of SNP1 AG and SNP3 AA (D1) showed 100% disease resistance, while the genotype composed of SNP1 AG and SNP3 GG (D2) showed 95% disease resistance, both representing advantageous genotypes for disease resistance. The study demonstrated the existence of *nrc3* gene polymorphism in the entire population of *I. multifiliis* resistant grass carp, and different genotypes were significantly correlated with the ability to resist *I. multifiliis* infection. Among them, the D1 genotype with SNP1 AG and SNP3 AA combination exhibited the strongest resistance. These findings provide important theoretical and technical support for further breeding and prevention of *I. multifiliis* disease in grass carp.

**Key words:** grass carp; *Ichthyophthirius multifiliis*; high resolution melt; single nucleotide polymorphism