

文章编号: 1000-0615(2018)03-0305-09

DOI: 10.11964/jfc.20170310750

大口黑鲈肌球蛋白重链基因SNPs的筛选及与生长性状的关联

李胜杰^{1,2}, 姜鹏¹, 樊佳佳¹, 白俊杰¹, 李锐³, 朱新平^{1*}

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业部热带亚热带水产资源利用与
养殖重点实验室, 广东广州 510380;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

3. 内江师范学院, 四川内江 641100)

摘要: 肌球蛋白是肌肉细胞的重要组成成分, 影响肌纤维的组成和肌肉生长。为了研究肌球蛋白重链(MYH)基因多态性与大口黑鲈生长性状的相关性, 本研究采用PCR技术扩增得到编码区序列全长为9759 bp的大口黑鲈MYH基因, 该基因包含37个外显子和36个内含子, 编码1940个氨基酸。采用直接测序法在MYH基因上筛选到8个单核苷酸多态性标记(SNP)位点(A-305G、G-558C、A-2784C、A-2816G、T-4765A、C-6206T、C-6811T和G-6935T), 有4个位于外显子上, 其中2个属于同义突变。用SNaPshot方法对从同批繁殖、同塘养殖的大口黑鲈“优鲈1号”群体中随机选取的430尾个体中各位点的基因型进行检测。结果显示, 内含子上的A-2784C和A-2816G位点完全连锁, 所有位点在大口黑鲈“优鲈1号”群体中的平均有效等位基因数、平均观测杂合度和平均期望杂合度分别为1.635、0.406和0.373, 仅C-6206T、C-6811T和T-4765A位点的基因型频率分布符合Hardy-Weinberg定律。采用一般线性模型分析各位点与大口黑鲈生长性状之间的相关性, 研究发现, C-6811T位点CC基因型个体的体质量和全长显著大于TT基因型, CC基因型个体的体高和尾柄长显著大于CT和TT基因型, 其余位点不同基因型个体间的生长性状均不存在显著差异。C-6811T位点与生长性状显著相关, 可作为大口黑鲈分子标记辅助育种的候选标记。

关键词: 大口黑鲈; 肌球蛋白重链基因; 单核苷酸多态性标记(SNP); 生长性状; 关联分析

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

肌球蛋白是肌肉细胞的重要组成成分, 广泛存在于非肌细胞中^[1]。肌球蛋白是一种多功能马达蛋白, 为肌肉收缩、细胞内物质运输和细胞分裂等提供动力^[2]。脊椎动物肌球蛋白的分子结构为“Y”形不对称六聚体, 由2条肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MYH)和4条肌球蛋白轻链(myosin light chain, MYL)组成。鱼类MYH基因属于多基因家族成员, 其表达水平受组织器官、发育阶段及环境因子等因素影响^[3]。鱼类终生在生长, 其肌肉纤维一直在增生和增粗。MYH基因的表达量影响肌纤维的增生, 与鱼类持续生

长有关^[4]。虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、玻璃梭吻鲈(*Sander vitreus*)和大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)MYH基因的表达量与生长速度密切相关, 快长个体中MYH基因的表达水平显著升高^[5-7]。MYH基因表达量与金头鲷(*Sparus aurata*)幼鱼的全长相关, 是早期生长关联基因^[8]。基于MYH基因是影响生长的重要候选基因, 段鹏杰等^[9]在秦川牛(*Bos taurus*)MYH8基因第33外显子发现3个单核苷酸多态性标记(single nucleotide polymorphism, SNP)位点, 其中一个与体长性状显著相关。然而, 鱼类MYH基因多态性及其与生长性状的相

收稿日期: 2017-03-16 修回日期: 2017-05-03

资助项目: 渔港建设和渔业产业发展专项(A201601A12); 广东省科技计划项目(2016A020210020, 2015A020209035); 浙江省农业(水产)新品种选育重大科技专项(2016C02055-3)

通信作者: 朱新平, E-mail: zhuxinping_1964@163.com

关研究还未见报道,有必要对其基因多态性进行进一步分析。

大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)俗名为加州鲈,原产于北美洲,属广温性鱼类,在分类学上隶属鲈形目(Perciformes),棘臀鱼科(Ce-trachidae)。大口黑鲈具有肉质鲜美、无肌间刺、适合高密度养殖和长途运输等特点,自20世纪70年代被引入我国大陆后进行广泛养殖,现已成为我国重要的淡水养殖品种之一,年产量超35万t^[10]。通过人工选育提高养殖品种的生长性能是大口黑鲈遗传育种研究的重要方向。大口黑鲈是凶猛的肉食性鱼类,生长表型性状易受养殖条件与环境因素的影响,导致常规选育中的选择准确性不高。分子标记辅助育种技术是通过利用与目标性状紧密连锁的分子标记对目标性状进行间接选择的现代育种技术,具有选择强度大、不受环境影响、结果可靠等特点。采用分子标记辅助育种技术可弥补常规育种的不足,并可在选育早期进行准确选择,从而提高选育效率。与传统育种相比,分子标记辅助育种可提高育种效率2~3倍^[11]。将分子标记或者候选基因的遗传变异与经济性状表型联系起来的相关分析,是实现分子标记辅助育种的一种有效方法^[12]。鉴于MYH基因是影响动物生长性状的重要候选基因,且鱼类MYH基因多态性与生长性状的相关研究尚未见报道,本研究采用PCR技术获得了大口黑鲈MYH基因组序列,进一步分析其多态性与生长性状的关联,以期获得与生长相关的SNP,为大口黑鲈分子标记辅助育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大口黑鲈“优鲈1号”养殖新品种是以国内4个养殖群体为基础的选育种群,采用传统的群体选育方法,以生长速率为主要指标,经连续5代选育获得的大口黑鲈选育品种^[13]。用于筛选SNP和关联分析的大口黑鲈成鱼来自佛山南海区九江镇新旭养殖场,该养殖群体为9500尾大口黑鲈“优鲈1号”亲本于2015年3月1日繁殖的子代。实验鱼在相同条件下培育,在同一个池塘中进行养殖,全程投喂冰冻野杂鱼,11月龄时从群体中随机取430尾测量体质量、全长、体高、头长

和尾柄长等性状值,同时以抗凝剂(ACD)与血液体积比为6:1的比例进行尾静脉活体取血,按天根生化科技(北京)有限公司试剂盒说明书提取鱼血液DNA,使用琼脂糖和紫外分光光度计测定DNA质量和浓度,于-20℃保存。2×Taq PCR master mix购自宝生物(大连)工程有限公司;引物委托广州艾基生物技术有限公司合成;DNA分子量标准购自广州艾基生物技术有限公司;琼脂糖为Sigma公司(美国)产品。

1.2 MYH基因的扩增及测序

根据从大口黑鲈转录组数据库(SRA436296)中获取的大口黑鲈MYH cDNA序列和NCBI数据库中登录的鳊(*Siniperca chuatsi*) MYH基因序列(KF601703.1)设计10对引物(表1),以大口黑鲈基因组DNA为模板,采用PCR技术分别扩增MYH基因的各个片段。PCR扩增反应总体积为20 μL,PCR反应体系包括10 μL 2×Taq PCR master mix,上下游引物各0.5 μL,模板DNA 0.5 μL,加ddH₂O至20 μL。PCR扩增程序:94℃预变性3 min;94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸30 s,32个循环;72℃终延伸7 min。用1.2%琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行检测,PCR产物委托广州艾基生物技术有限公司进行测序,测序结果用Vector NTI Suite 11.0软件进行序列比对和组装及计算序列同源性。

1.3 突变位点筛选

从430尾大口黑鲈“优鲈1号”群体中随机取20尾大口黑鲈基因组DNA,利用上述10对引物扩增MYH基因,PCR产物经纯化后委托广州艾基生物技术有限公司进行测序,用Vector NTI Suite 11.0软件比对分析序列及寻找SNPs位点。

1.4 SNaPshot方法检测基因型

用SNaPshot分型方法分析每个SNP位点在个体中的基因型,委托上海捷瑞生物工程有限公司完成。具体方法:根据目标SNP侧翼序列设计扩增引物(表2),然后对每个样品DNA进行多重PCR扩增。PCR扩增后取3 μL PCR产物用Exo I和FastAP纯化:Exo I去除反应产物中的剩余引物,FastAP去除反应中剩余的DNTP,37℃反应15 min,80℃高温灭活Exo I和FastAP酶活性15 min。根据ABI公司提供的SNaPshot试剂盒,用延伸引物进行延伸反应,使用ABI公司的PRISM 3730测序仪

表 1 引物名称及序列

Tab. 1 Primer sequences applied in the amplification of *M. salmoides* *MHY* gene

引物名称 primer	引物序列5'→3' sequence	引物名称 primer	引物序列5'→3' sequence
1F	ATGGGTGATGCTGCAATGAAAGAG	1R	GAGCAGGGTTAGCCTGAATGAT
2F	CAACACCAAGCGTGTTCATTC	2R	TGCCCTCTTTCTTGTACTCTTC
3F	GTTCTGGACATTGCTGGATTTG	3R	GACCCTCAGGAATGGCATTAG
4F	CACTTTGTACGCTGCATCATC	4R	CTCCTCAGTCAGTTCTTTACC
5F	ACAAGGTACCACAAATCCTAATAAC	5R	TCTCAATTCCGGGCTAATGTGTAC
6F	AGACATTGTTCTTTGTTACTTGG	6R	CAGCATTAGACCTCTCCACATC
7F	CATTCCTCGTGTCTCAACTC	7R	GGTCTCTTCCATCTTCTTCTC
8F	ATCTGACCTCACTGAGCAAATTA	8R	TTCATCCAGACGGTCTGCAGGTC
9F	ATGAGATGGAGATCCAGCTTAGCC	9R	TGTTGTAGATTAGTACTTAAAGGC
10F	AAGACCTGCAGCACCGTCTGGATG	10R	CATTTAAGGCTTCACTCTTCATCG

表 2 引物名称及序列

Tab. 2 Primer sequences applied in SNPs genotyping

位点 SNP locus	上游引物 former primer	下游引物 reverse primer	延伸引物 extension primer
A-305G	GTACGTCAAGGCATCCATCAC	GGCTCATGGAGGAAGGTGAA	TGTCACAGTGAAGGAGTGTGAT
G-558C	CGTTATGCAGCATGGATGATCTCACAGAAGAGCCCGAGTAG	CATTATGCTATCTTCTCAACAT	
A-2784C	TTTTGGGATGGACTTGCAGG	CACTGGCTTTGGGGAACATG	TTTTTTTTTCTGATTGAAAAGGTGAGTATT
A-2816G	TTTTGGGATGGACTTGCAGG	CACTGGCTTTGGGGAACATG	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGGCAAATTAGCCTAAATATGT
T-4765A	CCAGAGTAACTCTAAGTCAT	CCAGAAGATAGTAGAACGCAG	TTTTTTTTTTTTTTTTTTCAGGTCATTCTTCTTGGAG
C-6206T	GAGAGAGGCCGAGTTTCAGA	TGGTTGCACTCACTTTGGA	TTTTTTTTTCCGACCTGGGAGAGCAGATTGA
C-6811T	AGAGGAGGAAATCAAGGTATC	GCTCCTCTCATACTGCTCC	CTCAAATTACCGTGAATTCAG
G-6935T	TGCACTTGCCCATGCAGTGC	GCTCAGAGACCTAGCTTCTCTTTTTTTTTTTTTTTGAGACGAACATTTAGCATTCAC	

进行基因分型。

1.5 数据统计分析

采用POPGENE version 1.32软件计算有效等位基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)和期望杂合度(H_e)等遗传参数。Chi-square检验估计群体Hardy-Weinberg平衡偏离由POPGENE软件计算。用SPSS 19.0软件一般线性模型(general linear model, GLM)分析各个基因型与大口黑鲈生长性状之间的相关性, 统计分析模型为 $Y_{ij}=\mu+B_i+e_{ij}$, Y_{ij} 为某个性状第*i*个标记第*j*个个体上的观测值; μ 为实验观测所有个体的平均值(即总体平均值); B_i 为第*i*个标记的效应值; e_{ij} 为对应于观察值的随机误差效应。

2 结果

2.1 大口黑鲈MYH基因序列分析

对已测定的大口黑鲈MYH基因组DNA序列进行拼接和组装, 所获得的编码区序列长度为9759 bp。经序列分析, 编码区序列包含37个外显子和36个内含子, 外显子长度介于21 bp和389 bp之间。每个内含子都以GT开头, AG结尾, 符合GT-AG法则。大口黑鲈MYH基因编码1940个氨基酸, 推测分子量为223 ku, 等电点为5.54。将大口黑鲈MYH基因组序列上传至NCBI数据库中, 登录号为KY681146。

2.2 序列同源性比较

大口黑鲈MYH基因序列与GenBank中已登录

的鱼类MYH基因进行比较,与鳊(AHB33632.1)的同源性最高,其氨基酸同源性为95%;与尖吻鲈(*Lates calcarifer*, XP_018533900.1)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*, XP_019203421.1)、非洲青鳉(*Nothobranchius furzeri*, XP_015812773.1)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*, XP_019109128.1)、舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*, CBN81811.1)、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*, XP_008332927.1)、斑马鱼(*Danio rerio*, XP_009292203.1)、鲤(*Cyprinus carpio*, XP_018923296.1)和大西洋鲑(*Salmo salar*, XP_014015175.1)的氨基酸同源性依次为94%、94%、93%、92%、92%、91%、91%、90%和89%,表明鱼类MYH基因的保守性较高。

2.3 突变位点筛查结果

10对引物在20个个体中的PCR扩增产物经测序和比对后,共获得8个SNP位点,分别位于MYH基因核苷酸序列中的第305、558、2784、2816、4765、6206、6811和6935碱基处,其中4个位点(G-558C、A-2784C、A-2816G和C-6811T)位于内含子上,其他4个位点在外显子上。C-6206T和T-4765A位点为同义突变,而A-305G和G-6935T位点属于错义突变,分别导致缬氨酸(Val)突变为异亮氨酸(Ile),精氨酸(Arg)突变为蛋氨酸(Met)。

2.4 MYH基因突变位点在群体中的遗传结构分析

大口黑鲈“优鲈1号”群体在8个SNP位点上的

多样性比较丰富, N_e 、 H_e 和 H_o 分别为1.635、0.373和0.406(表3)。Chi-square检验分析表明,3个位点(C-6206T、C-6811T和T-4765A)的基因型频率分布均符合Hardy-Weinberg定律($P>0.05$)(表3),其余位点均偏离Hardy-Weinberg定律。此外,A-2784C位点碱基A和A-2816G位点的碱基G连锁,组成单倍型A,A-2784C位点碱基C和A-2816G位点的碱基A连锁,组成单倍型B,两位点组成单倍型标记H1,存在AA、AB和BB 3种基因型。

2.5 SNPs与性状的关联分析

用于关联分析的430尾大口黑鲈的平均体质量为523.5 g。采用SPSS软件对关联群体的体质量进行正态分布检验,该群体基本符合正态分布。用GLM进行关联分析,各标记与大口黑鲈生长性状的相关性结果显示,C-6811T位点的CC基因型个体的5个生长性状(体质量、全长、头长、体高、尾柄长)平均表型值均高于CT型和TT型个体的均值,其中CC基因型与TT基因型个体在体质量和全长上存在显著差异($P<0.05$),CC型与CT型和TT型个体的均值在体高和尾柄长方面均存在显著差异($P<0.05$)。其他位点不同基因型个体间的生长性状均不存在显著差异(表4)。

3 讨论

3.1 编码区中SNP位点的分布密度

本研究在长度为9759 bp的大口黑鲈MYH基因中共检测到8个SNP位点,分布密度为1/1456 bp。

表3 MYH基因上8个SNPs的遗传参数

Tab. 3 Genetic parameters of 8 SNPs in MYH gene

SNP位点 SNP locus	碱基类型 type	有效等位基因数 N_e	期望杂合度 H_e	观测杂合度 H_o	哈温平衡(P值) HWE (P value)
A-305G	A/G	1.296	0.229	0.151	0.000*
G-558C	G/C	1.957	0.490	0.851	0.000*
A-2784C	A/C	1.567	0.362	0.316	0.008*
A-2816G	A/G	1.567	0.362	0.316	0.008*
T-4765A	T/A	1.995	0.499	0.495	0.867
C-6206T	C/T	1.267	0.211	0.193	0.075
C-6811T	C/T	1.823	0.452	0.423	0.187
G-6935T	C/A	1.606	0.378	0.505	0.000*
平均值 average		1.635	0.373	0.406	

注: *偏离Hardy-Weinberg定律($P<0.05$)

Notes: * indicates deviating from Hardy-Weinberg equilibrium ($P<0.05$)

表 4 *MYH*基因SNP位点基因型与生长性状的相关性

Tab. 4 Correlations between different genotypes at SNP loci of *MYH* gene and various growth traits (mean±SE)

SNP位点 SNP site	基因型 genotype	样本数 number	体质量/g body weight	全长/cm total length	头长/cm head length	体高/cm body depth	尾柄长/cm caudal peduncle length
A-305G	AA	24	518.57±26.13	29.71±0.51	7.49±0.32	8.67±0.20	8.50±0.19
	AG	341	543.43±15.88	29.72±0.31	7.42±0.20	8.62±0.12	8.44±0.12
	GG	65	520.28±6.94	29.27±0.14	7.43±0.09	8.47±0.05	8.28±0.05
G-558C	CC	64	532.87±16.01	29.70±0.31	7.42±0.20	8.61±0.12	8.48±0.12
	CG	366	522.08±6.70	29.30±0.13	7.44±0.08	8.48±0.05	8.29±0.05
H1	AA	260	525.68±7.96	29.38±0.16	7.49±0.10	8.49±0.06	8.33±0.06
	AB	136	526.49±10.98	29.42±0.22	7.37±0.14	8.57±0.09	8.31±0.08
	BB	34	497.34±21.96	28.99±0.43	7.29±0.27	8.32±0.17	8.27±0.16
T-4765A	AA	98	532.42±12.91	29.63±0.25	7.46±0.16	8.55±0.10	8.39±0.09
	AT	213	528.47±8.76	29.35±0.17	7.49±0.11	8.54±0.07	8.33±0.06
	TT	119	507.25±11.72	29.16±0.23	7.32±0.14	8.39±0.09	8.24±0.08
C-6206T	CC	337	524.90±6.99	29.41±0.14	7.46±0.09	8.52±0.05	8.32±0.05
	CT	83	523.17±14.07	29.25±0.28	7.37±0.17	8.48±0.11	8.31±0.10
	TT	10	487.48±40.53	28.51±0.79	7.26±0.50	8.19±0.32	8.22±0.29
C-6811T	CC	57	551.16±16.93 ^a	30.08±0.33 ^a	7.53±0.21	8.86±0.13 ^a	8.58±0.12 ^a
	CT	182	522.97±9.50	29.34±0.19	7.38±0.12	8.46±0.07 ^b	8.31±0.07 ^b
	TT	191	516.18±9.25 ^b	29.17±0.18 ^b	7.46±0.11	8.43±0.07 ^b	8.25±0.07 ^b
G-6935T	AC	217	526.75±8.69	29.45±0.17	7.39±0.11	8.55±0.07	8.34±0.06
	CC	213	520.19±8.77	29.27±0.17	7.48±0.11	8.46±0.07	8.30±0.06

注: 同列中上标字母不同表示差异显著($P<0.05$)

Notes: different superscripts within the same column denote significant differences ($P<0.05$)

景燕娟等^[14]分析了大口黑鲈北方亚种转录组数据库, 基因编码区上SNP位点的平均密度为1/1700 bp; 于凌云等^[15]在大口黑鲈肌肉生长抑制素基因的外显子中上筛选到1个SNP位点, 分布的密度为1/1626 bp。本研究中SNP位点的分布密度与先前大口黑鲈研究结果接近, 但明显低于长牡蛎(*Crassostrea gigas*)编码区SNP的分布密度(1/60 bp)^[16], 这种显著差异是由于不同物种本身所具备的遗传多样性不同所导致。

3.2 大口黑鲈“优鲈1号”群体遗传多样性分析

群体杂合度反映群体在多个基因座位上的遗传变异, 一般认为它是度量群体遗传变异的最适参数。 H_0 代表分子标记多态性的高低, H_0 越大, 表明该群体的遗传一致程度越低, 遗传多态性越高^[17-18]。本实验所获8个位点的 H_0 为0.41, 反映大口黑鲈“优鲈1号”群体具有较丰富

遗传多样性, 可进一步利用选育手段来提高其生长性能。李镕等^[19]用微卫星标记技术分析得出第4代大口黑鲈选育群体(F_4)的 H_0 为0.427。本研究所用实验群体是第10代选育群体(F_{10}), 与 F_4 相比, F_{10} 的 H_0 减少了0.05%, 这与大黄鱼选用品系中不同选育世代群体的遗传多样性指标值随选育进行呈下降趋势的研究结果一致^[20]。人工高强度定向选择导致群体基因水平上多样性一定程度地降低。与 F_4 相比, F_{10} 的遗传多样性降低幅度很小, 与我们选育过程中每代保持较多数量的繁育亲本有关, 尽可能避免近交造成负面影响。

3.3 SNPs位点的基因型缺失

大口黑鲈*MYH*基因上5个位点极显著偏离Hardy-Weinberg定律($P<0.01$), 其中G-558C位点上只检测到CC和CG基因型, G-6935T位点仅存在CC和AC基因型。本研究所用实验群体是经多代

选育后的群体,人工选择使部分等位基因的频率发生改变。徐磊等^[21]发现大口黑鲈选育群体中所含优势基因型的数量呈逐代递增趋势,人工选育使生长优势基因发生富集。先前本实验室在大口黑鲈*GHRH*基因启动子上发现的缺失突变位点(c.-923_-858del)BB基因型个体在受精卵中可以检测到,但在随后的仔鱼出膜期前全部死亡^[22]。吴周林等^[23]发现家兔(*Oryctolagus cuniculus* f. *domesticus*)XKR4基因外显子3中2个SNP位点都仅存在CC和CT基因型,TT基因型可能是缺陷基因型。因此,我们推测G-558C位点GG基因型和G-6935T位点AA基因型可能是不利基因型,从而在选择过程中被淘汰。

3.4 MYH基因及其SNP标记对大口黑鲈生长的影响作用

已有研究表明,MYH基因是影响生长的候选功能基因。陈之航等^[24]研究了鳊MYH基因在早期发育过程中的表达水平,发现其表达量高低与鳊生长快慢密切相关。本实验室在先前研究中发现大口黑鲈快长个体肌肉组织中MYH基因表达量显著高于慢长个体^[25]。本研究进一步分析大口黑鲈MYH基因多态性与生长性状的相关性,首次在鱼类MYH基因中找到一个与生长性状显著关联的SNP位点,这与段鹏杰等^[9]的研究结果一致,提示MYH基因对大口黑鲈肌肉生长起重要的调控作用。与大口黑鲈生长性状相关的C-6811T位点位于MYH基因第27个内含子中。相类似的研究已有报道,唐永凯等^[26]发现吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*, GIFT) *MSTN*第二内含子的1个SNP位点与其体型(体厚/体长、体高/体长)存在显著相关。王春晓等^[27]在尼罗罗非鱼*ghrelin*基因第1个内含子中发现3个完全连锁的SNP位点,组成的双倍型标记与生长性状显著相关。虽然基因内含子中的突变位点不参与蛋白质合成,但它对维持基因特定功能方面发挥重要作用,会引起基因表达效率的改变^[28],从而影响大口黑鲈生长性状。

本研究中A-2784C和A-2816G位点的等位基因频率、基因型频率和遗传参数在群体中完全一致,说明这2个SNP位点完全连锁。先前研究在大口黑鲈高密度脂蛋白结合蛋白基因和尼罗罗非鱼*ghrelin*基因中均发现这种不同SNP位点存在完全连锁现象^[27, 29]。多个突变位点的相互作

用会大于单个位点的作用效应,不仅对相关性状的影响作用更大,也更反映所分析位点与性状相关的真实性^[30]。尽管A-2784C和A-2816G组成的单倍型标记中不同基因型与各生长性状的差异不显著,但AB基因型个体的平均体质量比BB基因型高29.2 g,增重了5.9%。

肌肉品质已成为鱼类育种工作者密切关心的研究问题。肌球蛋白是构成肌肉的主要结构和功能蛋白之一,影响肌肉品质。本研究未涉及肌肉品质指标,因此MYH基因是否会影响大口黑鲈肌肉品质有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 石耀华,刘军,桂建芳. 银鲫3个肌球蛋白轻链基因cDNA的克隆与特征分析[J]. 水生生物学报, 2003, 27(3): 308-313.
Shi Y H, Liu J, Gui J F. Cloning and characterization of three myosin light chain cDNA from silver crucian carp[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2003, 27(3): 308-313(in Chinese).
- [2] Seb e-Pedr s A, Grau-Bov  X, Richards T A, et al. Evolution and classification of myosins, a paneukaryotic whole-genome approach[J]. Genome Biology and Evolution, 2014, 6(2): 290-305.
- [3] Bryson-Richardson R J, Daggett D F, Cortes F, et al. Myosin heavy chain expression in zebrafish and slow muscle composition[J]. Developmental Dynamics, 2005, 233(3): 1018-1022.
- [4] Biga P R, Goetz F W. Zebrafish and giant danio as models for muscle growth: determinate vs. indeterminate growth as determined by morphometric analysis[J]. American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2006, 291(5): R1327-R1337.
- [5] Overturf K, Hardy R W. Myosin expression levels in trout muscle: a new method for monitoring specific growth rates for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) on varied planes of nutrition[J]. Aquaculture Research, 2001, 32(4): 315-322.
- [6] Dhillon R S, Esbaugh A J, Wang Y S, et al. Characterization and expression of a myosin heavy-chain isoform in juvenile walleye *Sander vitreus*[J]. Journal of Fish Biology, 2009, 75(5): 1048-1062.
- [7] Churova M V, Meshcheryakova O V, Veselov A E, et al.

- Activity of enzymes involved in the energy and carbohydrate metabolism and the level of some molecular-genetic characteristics in young salmon (*Salmo salar* L.) with different age and weight[J]. Russian Journal of Developmental Biology, 2015, 46(5): 254-262.
- [8] Georgiou S, Makridis P, Dimopoulos D, et al. Myosin light chain 2 isoforms in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): molecular growth markers at early stages[J]. Aquaculture, 2014, 432: 434-442.
- [9] 段鹏杰,张慧林,刘宇,等.秦川牛MYH8基因多态性及其与生长性状的关联分析[J].西北农业学报,2016,25(1):1-8.
- Duan P J, Zhang H L, Liu Y, et al. Polymorphism in MYH8 gene and association with growth traits of Qin-chuan beef cattle[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2016, 25(1): 1-8(in Chinese).
- [10] 刘海涌,李胜杰,白俊杰.大口黑鲈养殖群体和引进群体生长性能的比较分析[J].水产养殖,2015,36(9):1-5.
- Liu H Y, Li S J, Bai J J. Comparison of growth performance between the farmed population and introduced population of largemouth bass[J]. Journal of Aquaculture, 2015, 36(9): 1-5(in Chinese).
- [11] Gomez-Raya L, Klemetsdal G. Two-stage selection strategies utilizing marker-quantitative trait locus information and individual performance[J]. Journal of Animal Science, 1999, 77(8): 2008-2018.
- [12] 董玉,李琪.刺参SNP标记与生长性状的关联分析[J].海洋湖沼通报,2016(2):49-58.
- Dong Y, Li Q. Correlation analysis between SNPs and growth traits of *Apostichopus japonicus*[J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2016(2): 49-58(in Chinese).
- [13] 樊佳佳,白俊杰,李胜杰,等.大口黑鲈“优鲈1号”选育群体肌肉营养成分和品质评价[J].中国水产科学,2012,19(3):423-429.
- Fan J J, Bai J J, Li S J, et al. Nutrient composition and nutritive quality of the muscle of *Micropterus salmoides*, "Youlu No.1"[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(3): 423-429(in Chinese).
- [14] 景燕娟,白俊杰,李胜杰,等.大口黑鲈两个亚种EST数据库分析[J].上海海洋大学学报,2012,21(6):945-950.
- Jing Y J, Bai J J, Li S J, et al. Analysis of EST database for two subspecies of largemouth bass[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2012, 21(6): 945-950(in Chinese).
- [15] 于凌云,白俊杰,樊佳佳,等.大口黑鲈肌肉生长抑制素基因单核苷酸多态性位点的筛选及其与生长性状关联性分析[J].水产学报,2010,34(6):665-671.
- Yu L Y, Bai J J, Fan J J, et al. SNPs detection in large-mouth bass myostatin gene and its association with growth traits[J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(6): 665-671(in Chinese).
- [16] Sauvage C, Bierne N, Lapègue S, et al. Single nucleotide polymorphisms and their relationship to codon usage bias in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. Gene, 2007, 406(1-2): 13-22.
- [17] 李莉,孙振兴,杨树德,等.用微卫星标记分析皱纹盘鲍群体的遗传变异[J].遗传,2006,28(12):1549-1554.
- Li L, Sun Z X, Yang S D, et al. Analysis of genetic variation of abalone (*Haliotis discus hannai*) populations with microsatellite markers[J]. Hereditas, 2006, 28(12): 1549-1554(in Chinese).
- [18] 全迎春,马冬梅,白俊杰,等.大口黑鲈转录组SNPs筛选及其与生长的关联分析[J].水生生物学报,2016,40(6):1128-1134.
- Quan Y C, Ma D M, Bai J J, et al. SNPs identification in RNA-seq data of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) fed on formulated feed and association analysis with growth trait[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2016, 40(6): 1128-1134(in Chinese).
- [19] 李镛,白俊杰,李胜杰,等.大口黑鲈选育群体遗传结构的微卫星分析[J].广东海洋大学学报,2010,30(3):11-15.
- Li R, Bai J J, Li S J, et al. Analysis on genetic structure of selected population of largemouth bass by microsatellite DNA markers[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2010, 30(3): 11-15(in Chinese).
- [20] 赵广泰,刘贤德,王志勇,等.大黄鱼连续4代选育群体遗传多样性与遗传结构的微卫星分析[J].水产学报,2010,34(4):500-507.
- Zhao G T, Liu X D, Wang Z Y, et al. Genetic structure and genetic diversity analysis of four consecutive breeding generations of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) using microsatellite markers[J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(4): 500-507(in Chinese).
- [21] 徐磊,白俊杰,李胜杰,等.生长相关优势基因型在大口黑鲈“优鲈1号”选育世代中的聚合[J].华南农业大学学报,2014,35(1):7-11.

- Xu L, Bai J J, Li S J, *et al.* Pyramiding of growth-related genotypes in generations of the largemouth bass, *Micropterus salmoides*, 'Youlu No.1'[J]. Journal of South China Agricultural University, 2014, 35(1): 7-11(in Chinese).
- [22] Ma D M, Han L Q, Bai J J, *et al.* A 66-bp deletion in growth hormone releasing hormone gene 5'-flanking region with largemouth bass recessive embryonic lethal[J]. Animal Genetics, 2014, 45(3): 421-426.
- [23] 吴周林, 曾予, 贾先波, 等. 家兔*XKR4*基因遗传多态性及其与生长性能的相关性[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2016, 44(8): 13-18.
- Wu Z L, Zeng Y, Jia X B, *et al.* Polymorphisms of rabbit *XKR4* gene and its association with growth traits[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2016, 44(8): 13-18(in Chinese).
- [24] 陈之航, 董浚键, 孙成飞, 等. 基于转录组测序对翘嘴鲈(*Siniperca chuatsi*)2种肌球蛋白重链基因的克隆与分析[J]. 渔业科学进展, 2017, 38(3): 51-61.
- Chen Z H, Dong J J, Sun C F, *et al.* cDNA cloning and analyses of two myosin heavy chain isoforms of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) based on transcriptome sequencing[J]. Progress in Fishery Sciences, 2017, 38(3): 51-61(in Chinese).
- [25] Li S J, Liu H, Bai J J, *et al.* Transcriptome assembly and identification of genes and SNPs associated with growth traits in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. Genetica, 2017, 145(2): 175-187.
- [26] 唐永凯, 李建林, 俞菊华, 等. 吉富罗非鱼*MSTN*基因结构及其多态性与生长性状的相关性[J]. 中国水产科学, 2010, 17(1): 44-51.
- Tang Y K, Li J L, Yu J H, *et al.* Genetic structure of *MSTN* and association between its polymorphisms and growth traits in genetically improved farmed tilapia (GIFT)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(1): 44-51(in Chinese).
- [27] 王春晓, 卢迈新, 高凤英, 等. 尼罗罗非鱼*ghrelin*基因的多态性及其与生长性状相关SNP位点的筛选[J]. 水生生物学报, 2016, 40(1): 50-57.
- Wang C X, Lu M X, Gao F Y, *et al.* The polymorphism of *ghrelin* gene of *Oreochromis niloticus* and identification of its SNP loci associated with the growth traits[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2016, 40(1): 50-57(in Chinese).
- [28] Hir H L, Nott A, Moore M J. How introns influence and enhance eukaryotic gene expression[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2003, 28(4): 215-220.
- [29] Zhou C L, Bai J J, Li S J, *et al.* SNP detection of high density lipoprotein binding protein gene (*HBP*) and its correlations with growth traits in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. Agricultural Biotechnology, 2015, 4(3): 43-46, 50.
- [30] Clark A G. The role of haplotypes in candidate gene studies[J]. Genetic Epidemiology, 2004, 27(4): 321-333.

SNPs detection of *MYH* gene and its association with growth traits in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)

LI Shengjie^{1,2}, JIANG Peng¹, FAN Jiajia¹, BAI Junjie¹, LI Rui³, ZHU Xinping^{1*}

(1. Key Laboratory of Tropical and Subtropical Fishery Resource Application and Cultivation, Ministry of Agriculture, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Guangzhou 510380, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Neijiang Normal College, Neijiang 641100, China)

Abstract: Largemouth bass (*Micropterus salmoides*) is one of the primary cultured species in China, with annual production of 350 000 tons. Growth is one of the most crucial economic traits of all aquaculture species, but the molecular mechanisms involved in growth of *M. salmoides* are poorly understood. Investigation of the correlations between single nucleotide polymorphism (SNP) and growth traits can provide candidate markers for molecular marker-assisted selection. Hypothesis-driven candidate gene association analysis is directed at genes that have clear roles in controlling special traits. Myosin heavy chain (MYH) is the main component of skeletal muscle cells and affects muscle growth and development. In order to study the relationship between DNA polymorphisms of *MYH* gene and growth traits of *M. salmoides* in this study, the sequence of *MYH* gene coding region was obtained by PCR amplification method, which was 9759 bp in length. *MYH* gene contained 37 exons and 36 introns and encoded a predicted protein of 1940 amino acids. Eight SNP mutations were identified (A-305G, G-558C, A-2784C, A-2816G, T-4765A, C-6206T, C-6811T and G-6935T) in *M. salmoides MYH* gene using direct sequencing method. Among them, four SNPs were located in exons and two synonymous mutations happened. Eight SNP loci of 430 randomly selected Youlu No.1 *M. salmoides* individuals were genotyped by SNaPshot method. Genetic structure was analyzed by Popgene32 software. The results showed that the average effective number (N_e), average expected heterozygosity (H_o) and average observed heterozygosity (H_e) of these SNPs was 1.635, 0.373 and 0.406, respectively. Chi-square test showed that three SNP loci (C-6206T, C-6811T and T-4765A) were in Hardy-Weinberg equilibrium state in the Youlu No.1 *M. salmoides* population. A-2784C and A-2816G formed two haplotypes (A and B), and three genotypes (AA, AB, and BB) were observed. A general linear model was established for correlation analysis between different genotypes at SNP loci of *MYH* gene and various growth traits using SPSS19.0 software. At the position of C-6811T, individuals with the CC genotype had significantly greater values for body weight or total length than those with the TT genotypes. The individuals with genotypes CC had a greater value than the individuals with the genotype CT and TT in body height and caudal peduncle length. Other seven SNP loci were not significantly correlated with growth traits. The growth-related C-6811T locus could be a useful candidate molecular marker for *M. salmoides* molecular marker-assisted selection.

Key words: *Micropterus salmoides*; myosin heavy chain gene; single nucleotide polymorphism(SNP); growth traits; correlation analysis

Corresponding author: ZHU Xinping. E-mail: zhuxinping_1964@163.com

Funding projects: Fishing Port Construction and Fishery Industry Development Project (A201601A12); Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (2016A020210020, 2015A020209035); Zhejiang Major Science & Technology Project of New Agricultural Varieties (2016C02055-3)