

陈 静, 何吉祥, 樊佳佳, 等. 草鱼 *MyoD* 基因 SNP 和 Indel 标记的筛选及其与生长性状的关联分析[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(3): 612-616.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2018.03.019

草鱼 *MyoD* 基因 SNP 和 Indel 标记的筛选及其与生长性状的关联分析

陈 静¹, 何吉祥¹, 樊佳佳², 黄 龙¹, 吴本丽¹, 宋光同¹, 汪 翔¹, 武 松¹

(1. 安徽省农业科学院水产研究所, 安徽 合肥 230031; 2. 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)

摘要: 为探索 *MyoD* 基因多态性对草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 生长性状的影响, 采用 PCR 产物直接测序的方法, 检测草鱼 *MyoD* 基因上的突变位点, 并分析其与草鱼生长性状的相关性。结果表明: 在草鱼 *MyoD* 基因上筛选到 4 个多态性高、分型稳定的突变位点, 即 *M1* (940 后 T 碱基的插入)、*M3* (1630 后重复单元 AATAGCCT 的缺失)、*M4* (G1669A) 和 *M5* (A1681T)。 *M1* 位点不同基因型个体间的体长、全长、尾柄长和尾柄高存在显著差异 ($P < 0.05$), 纯合缺失基因型 (DD) 显著大于纯合插入基因型 (TT); *M3* 和 *M4* 位点不同基因型个体间的生长性状差异均不显著 ($P > 0.05$); *M5* 位点不同基因型个体间的体质量、体宽、体高和眼间距存在显著差异 ($P < 0.05$), 优势基因型为 TT。 *MyoD* 基因的 *M1* 和 *M5* 突变位点可作为草鱼选育的候选分子标记。

关键词: 草鱼; *MyoD* 基因; SNP 标记; Indel 标记; 生长性状

中图分类号: S965.112 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2018)03-0612-05

Screening of SNP and Indel marker of *MyoD* gene and its association with growth traits in *Ctenopharyngodon idella*

CHEN Jing¹, HE Ji-xiang¹, FAN Jia-jia², HUANG Long¹, WU Ben-li¹, SONG Guang-tong¹, WANG Xiang¹, WU Song¹

(1. Fishery Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, China; 2. Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application & Cultivation, Ministry of Agriculture, Guangzhou 510380, China)

Abstract: To explore the effect of *MyoD* gene polymorphism on grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) growth traits, mutation sites of *MyoD* in grass carp were determined by PCR production sequencing, and the association between genotypes and growth traits was investigated. The results showed that four mutation sites which had high polymorphism and stable typing were found in *MyoD* gene of grass carp, *M1* (insertion of T base after 940), *M3* (deletion of repeated unit of AATAGCCT after 1630), *M4* (G1669A) and *M5* (A1681T), respectively. There were significant differences in body length, total length, caudal peduncle length and caudal peduncle height of *M1* trait of different genotypes ($P < 0.05$), homozygous deletion genotype (DD) was significantly higher than homozygous insertion genotype (TT). There was no significant difference in the growth traits between individuals of *M3* and *M4* traits ($P > 0.05$). There were significant differences in body weight, body width, body height and interocular distance among individuals with dif-

收稿日期: 2017-11-28

基金项目: 安徽省农业科学院学科建设项目 (15A0516); 安徽省农业科学院科技创新团队建设项目 (13C0506); 安徽省水产产业技术体系项目 [皖农科 2016(84) 号]

作者简介: 陈 静 (1985-), 女, 山东单县人, 硕士, 助理研究员, 主要从事水产动物遗传育种研究。 (E-mail) chenjingok5@163.com

通讯作者: 何吉祥, (E-mail) hejixiang813@126.com

ferences in body weight, body width, body height and interocular distance among individuals with dif-

ferent genotypes at *M5* trait ($P < 0.05$), and the dominant genotype was TT. The *M1* and *M5* mutation sites of *MyoD* gene can be used as candidate molecular markers for selection of grass carp.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; *MyoD*; SNP marker; Indel marker; growth trait

生肌决定因子基因 *MyoD* 是生肌调节因子基因 *MRFs* 家族 (*MyoD*、*MyoG*、*Myf5* 和 *MRF4*) 的主要成员之一,生肌调节因子具有一个保守的碱性螺旋-环-螺旋结构 (bHLH)^[1-2]。*MyoD* 在成肌细胞分化为肌纤维的过程中起关键的正向调控作用,控制着很多关键基因的表达^[3-5]。因为时空表达模式不同,4 个 *MRFs* 家族成员在动物肌肉发育过程中所发挥的作用不同^[6],其中 *MyoD* 基因是脊椎动物胚胎期肌肉发育的主要调控基因,主要作用是促进骨骼肌的形成和分化,缺少 *MyoD* 基因可导致成肌细胞无法正常增殖和分化^[7-8]。*MyoD* 与肌肉基因启动子的 E-BOX 区域结合后,能激活肌肉特异性转录,进而促进肌前体细胞的增殖和分化,另外 *MyoD* 基因还可使成纤维细胞及脂肪细胞等转化为成肌细胞,最终分化为成熟肌纤维^[9]。

单核苷酸多态性 (Single nucleotide polymorphism, SNP) 和插入/缺失 (Insertion/deletion, Indel) 标记作为新型分子标记,广泛分布于整个基因组,是动植物中普遍存在的一种遗传标记^[10-12]。草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 是中国淡水养殖鱼类中产量最大的养殖品种,至今仍未通过国家良种审定委员会鉴定的人工选育的良种。基于 *MyoD* 基因对动物肌肉发育和生长的重要作用,本研究以 *MyoD* 基因作为草鱼生长性状的候选基因,通过直接测序法检测 SNP 和 Indel 标记,并与相关生长性状进行关联分析,以期获得与草鱼生长性状相关联的 SNP 和 Indel 标记作为草鱼分子标记辅助选育的候选标记,缩短育种周期,提高选择效率。

1 材料与方法

1.1 材料

收集尽量多来源的草鱼共 20 尾作为筛选突变位点的样本,取鱼的尾鳍, -20 ℃ 保存备用。生长性状关联性分析的草鱼样品采自长丰县盛源养殖专业合作社,随机选择同期繁殖、同塘养殖的 3 龄草鱼共 297 尾,测量体质量、全长、体长、体宽、体高、眼间距、尾柄长和尾柄高 8 项生长指标,同时剪取尾鳍 -20 ℃ 保存。

1.2 基因组 DNA 的提取与检测

使用 QIAamp DNA Mini Kit (北京 Qiagen 公司产品) 提取基因组 DNA,用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测核酸的质量, -20 ℃ 保存待用。

1.3 *MyoD* 基因的 PCR 扩增及突变位点基因分型

根据本实验室克隆得到的草鱼 *MyoD* 基因序列 (GenBank 登录号: MG544985) 与草鱼全基因组测序序列 (<http://www.ncgr.ac.cn/grasscarp/>)^[13] 进行比较,在 5' 侧翼区、外显子和内含子上筛选多态位点。根据突变位点采用 Primer Premier 5.0 软件进行引物设计。

以不同来源的 20 尾草鱼为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系包括 10.0 μl 2×Taq PCR master mix、上下游引物 (20 μmol/L) 各 0.5 μl、模板 DNA 20 ng,加 ddH₂O 至 20.0 μl。PCR 反应程序: 94 ℃ 10 min; 94 ℃ 10 s, 57 ℃ 15 s, 72 ℃ 30 s, 共 35 个循环, 72 ℃ 延伸 10 min, 保存于 4 ℃。PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物纯化后送至上海捷瑞生物工程有限公司测序。测序结果用软件 BioEdit 进行比对和筛选,获得多态性高、分型稳定的突变位点。采用直接测序法对 297 尾草鱼 *MyoD* 基因的突变位点进行分型。

1.4 数据统计分析

采用 PopGen 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), 利用 Picalc 程序包计算各位点的多态信息含量 (PIC)。采用 SPSS 20 软件一般线性模型 (General linear model, GLM) 分析突变位点各基因型与生长性状的关联程度,因变量为草鱼 8 项生长指标,自变量为筛选到的突变位点的不同基因型。其生物统计模型为: $Y_{ij} = \mu + B_i + e_{ij}$, 其中 Y_{ij} 表示某性状第 i 个标记在第 j 个个体上的观测值, μ 表示试验观测的所有个体平均值, B_i 表示第 i 个标记的效应值, e_{ij} 表示对应个体观测值的随机残差效应。

2 结果与分析

2.1 *MyoD* 基因突变位点筛选

通过序列比对,在 *MyoD* 基因 5' 侧翼区、外显子

和内含子上共筛选得到 6 个突变位点,分别命名为 *M1* (940 后 T 碱基的插入)、*M2* (A1601G)、*M3* (1630 后重复单元 AATAGCCT 的缺失)、*M4* (G1669A)、*M5* (A1681T)、*M6* (T2322G)。其中 *M1* 位于 5'侧翼区,*M2*、*M3*、*M4* 和 *M5* 位于内含子 1,*M6* 位于外显子 3。*M6* 位点(T2322G)的突变没有导致氨基酸的变化,

属于同义改变。

共设计 3 对引物在 20 个草鱼样本中对这 6 个突变位点进行验证(引物序列和参数见表 1),3 对引物 PCR 扩增分别获得 409 bp、354 bp 和 245 bp 片段。PCR 产物经测序和比对后获得多态性高、分型稳定的 4 个位点,即 *M1*、*M3*、*M4* 和 *M5*。

表 1 草鱼 *MyoD* 基因扩增多态位点检测引物

Table 1 The polymorphic loci detection primers of amplifying *MyoD* of the *Ctenopharyngodon idella*

引物	序列(5'→3')	产物大小(bp)	扩增区域
MF1	CAGCGCACATGTTTCATTGGTC	409	5'侧翼区、外显子 1
MR1	TGAGCAGGCTCACGTGGACGA		
MF2	TCGAGTCTCTGCAGGCGCTACT	354	外显子 1、内含子 1
MR2	TTGGCCTGTAATATTGATTCA		
MF3	GGATTGCTCTGTCGAGTATCGT	245	外显子 3
MR3	TGATTCAAATTGTCCTTTTCG		

2.2 *MyoD* 基因突变位点在草鱼群体中的遗传结构分析

采用直接测序法对 297 尾草鱼 *MyoD* 基因的 4 个多态位点进行基因分型,统计 4 个突变位点的遗传参数。结果(表 2)表明,有效等位基因数(N_e)为 1.422 0~1.978 6,观测杂合度(H_o)为 0.268 5~

0.466 4,期望杂合度(H_e)为 0.297 2~0.495 4,多态信息含量(PIC)为 0.252 7~0.372 3, H_e 和 PIC 均大于 0.25 小于 0.50,说明 4 个突变位点具有中度多态性^[14]。经 χ^2 检验,Hardy-Weinberg 平衡常数分别为 0.690 3、0.175 6、0.093 2、0.311 8,表明试验群体在该 4 个突变位点均处于哈温平衡状态($P>0.05$)。

表 2 草鱼 *MyoD* 基因 SNP 和 Indel 遗传多样性参数

Table 2 Diversity parameters of SNP and Indel of *MyoD* gene in *Ctenopharyngodon idella*

位点	有效等位基因数(N_e)	观测杂合度(H_o)	期望杂合度(H_e)	多态信息含量(PIC)	哈温平衡常数(HWE)
<i>M1</i>	1.595 7	0.382 6	0.373 9	0.303 7	0.690 3
<i>M3</i>	1.617 1	0.352 3	0.382 3	0.308 8	0.175 6
<i>M4</i>	1.422 0	0.268 5	0.297 2	0.252 7	0.093 2
<i>M5</i>	1.978 6	0.466 4	0.495 4	0.372 3	0.311 8

2.3 *MyoD* 基因突变位点与草鱼生长性状的关联分析

采用一般线性模型分析草鱼 *MyoD* 基因 4 个多态位点不同基因型与生长性状的相关性(表 3)。*M1* 位点不同基因型个体间的体长、全长、尾柄长和尾柄高存在显著差异($P<0.05$),纯合缺失基因型(DD)显著大于纯合插入基因型(TT),为优势基因型;*M3* 和 *M4* 位点不同基因型个体间的生长性状差异均不显著($P>0.05$);*M5* 位点不同基因型个体间的体质量、体宽、体高和眼间距存在显著差异($P<$

0.05),优势基因型为 TT。

3 讨论

本研究中,在草鱼 *MyoD* 基因中共发现 4 个多态性高、分型稳定的突变位点,即 *M1*、*M3*、*M4* 和 *M5*,其中 *M1* 位于 5'侧翼区,*M3*、*M4* 和 *M5* 位于内含子 1。位于 5'侧翼区的 *M1* 位点虽然不编码氨基酸,但由于 5'UTR 在基因表达调控中有重要作用,因而其序列突变可能会对基因表达调控产生变化进而影响机体的多种性状^[15-16],在本研究中就发现该

突变与草鱼全长、体长等生长性状有显著相关。有研究表明,基因组中的突变位点绝大多数位于内含子区域,而外显子相对较保守^[8,17]。本研究在草鱼 *MyoD* 基因中发现的 4 个突变位点中就有 3 个

位于内含子,可能是因为内含子不参与氨基酸编码,与外显子相比其受到的选择压力较小,变异更容易积累^[18-19]。

表 3 草鱼 *MyoD* 基因 SNP 和 Indel 位点基因型与生长性状的相关性

Table 3 Correlation between genotypes of *MyoD* gene SNP and Indel locus and growth traits

位点 Locus	基因型 (样本量)	体质量 (g)	全长 (cm)	体长 (cm)	体宽 (cm)	体高 (cm)	眼间距 (cm)	尾柄长 (cm)	尾柄高 (cm)
M1	TT(167)	1 429.20±24.65a	49.77±0.38a	43.47±0.28a	7.11±0.04a	10.98±0.20a	5.26±0.03a	7.08±0.07a	5.12±0.04a
	TD(114)	1 472.42±20.37a	49.92±0.46a	43.48±0.34a	7.19±0.04a	10.53±0.24a	5.27±0.03a	6.95±0.09a	5.10±0.04a
	DD(16)	1 534.19±65.80a	52.75±1.23b	45.97±0.90b	7.24±0.12a	11.08±0.64a	5.41±0.08a	7.72±0.24b	5.38±0.12b
M3	DD(168)	1 454.77±20.40a	50.18±0.38a	43.72±0.28a	7.14±0.05a	10.95±0.20a	5.30±0.03a	7.03±0.08a	5.11±0.04a
	ID(105)	1 458.92±25.81a	49.73±0.48a	43.49±0.36a	7.16±0.04a	10.65±0.25a	5.25±0.03a	7.08±0.09a	5.14±0.05a
	II(24)	1 490.92±53.98a	49.79±1.01a	43.31±0.75a	7.25±0.09a	10.49±0.53a	5.23±0.07a	7.23±0.20a	5.17±0.10a
M4	AA(203)	1 469.50±18.53a	50.27±0.35a	43.81±0.26a	7.17±0.03a	10.93±0.18a	5.31±0.02a	7.08±0.07a	5.13±0.03a
	AG(80)	1 443.23±29.52a	49.51±0.55a	43.35±0.41a	7.13±0.05a	10.61±0.29a	5.22±0.04a	7.02±0.11a	5.15±0.05a
	GG(14)	1 400.29±70.57a	48.60±1.32a	42.20±0.97a	7.14±0.12a	10.20±0.69a	5.20±0.09a	7.03±0.26a	4.96±0.13a
M5	AT(139)	1 423.15±22.21a	49.53±0.42a	43.37±0.31a	7.09±0.04a	10.52±0.22a	5.24±0.03a	6.99±0.08a	5.10±0.04a
	TT(95)	1 509.66±26.87b	50.41±0.51a	43.88±0.37a	7.25±0.05b	11.33±0.26b	5.34±0.03b	7.11±0.10a	5.14±0.05a
	AA(63)	1 462.44±33.00ab	50.36±0.62a	43.72±0.46a	7.18±0.06ab	10.65±0.32ab	5.28±0.04ab	7.14±0.12a	5.17±0.06a

相同位点同列数值后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

MyoD 基因是生肌调节因子基因 *MRFs* 家族的主要成员之一,是脊椎动物胚胎期肌肉发育的主导调控基因之一,对骨骼肌的形成和分化起主要作用,因此,*MyoD* 基因的核苷酸变异可能会影响一些与肌肉肉质和生长性能相关的生产性状^[20]。*MyoD* 基因多态性与生产性能的关联研究在畜牧领域中已经有较多报道。Han 等^[21]研究发现大白猪 *MyoD* 基因的 SNP 位点 *g.257A>C* 与肌肉 pH 值呈显著关联性。田璐等^[22]在肉牛上发现 *MyoD* 基因内含子 2 中不同基因型对肉牛的宰前活质量、胴体质量、净肉质量、高档肉质量、眼肌面积等性状影响极显著或显著。褚敏等^[20]在大通牦牛 *MyoD1* 基因 3'UTR 的 1 976 bp 处发现 1 个突变位点,对体质量、胸围、体斜长方面影响显著。李万贵等^[23]在樱桃谷鸭 *MyoD* 基因外显子 4 发现 2 个 SNP 位点,突变基因型 TT 鸭群体显著小于野生基因型 AA 群体。Chen 等^[24]研究发现 *MyoD1a* 和 *MyoD1b* 对虹鳟肉质有重要影响。陈松波等^[25]研究发现牙鲈 *MyoD* 基因内含子 1 上的 SNPs 对牙鲈的生长性状影响显著。在本研究中,*MyoD* 基因多态性位点与草鱼生长性状的相关

分析结果表明,5'侧翼区 M1 位点不同基因型个体间的体长、全长、尾柄长和尾柄高存在显著差异($P<0.05$),纯合缺失基因型(DD)显著大于纯合插入基因型(TT);内含子 1 中 M5 位点不同基因型个体间的体质量、体宽、体高和眼间距存在显著差异($P<0.05$),与这些经济性性状连锁的优势基因型为 TT。因此可以将草鱼 *MyoD* 基因作为分子辅助草鱼选育的候选基因,位点 M1(940 后 T 碱基的插入)和 M5(A1681T)作为草鱼分子标记辅助育种的候选分子标记。

参考文献:

- [1] BUCKINGHAM M. Making muscle in mammals[J]. Trends Genet, 1992, 8(4):144-149.
- [2] 蒋运良,李 宁,吴常信.肌肉生成的分子生物学研究进展(综述)[J]. 农业生物技术学报, 1999, 7(2):201-204.
- [3] FRANCETIC T, LI Q. Skeletalmyogenesis and *Myf5* activation[J]. Transcription, 2011, 2(3): 109-114.
- [4] RESCAN P Y. Regulation and functions of myogenic regulatory factors in lower vertebrates[J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2001, 130(1):1-12.
- [5] NAIDU P S, LUDOLPH D C, TO R Q, et al. Myogenin and

- MEF2 function synergistically to activate the MRF4 promoter during myogenesis [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1995, 15 (5): 2707-2718.
- [6] CARVAJAL J J, RIGBY P W. Regulation of gene expression in vertebrate skeletal muscle [J]. *Experimental Cell Research*, 2010, 316(18): 3014-3018.
- [7] WYZYKOWSKI J C, WINATA T I, MITIN N, et al. Identification of novel *MyoD* gene targets in proliferating myogenic stem cells [J]. *Molecular & Cellular Biology*, 2002, 22(17): 6199-6208.
- [8] 于凌云,白俊杰,叶 星,等. 大口黑鲈 *MyoD* 基因结构和单核苷酸多态性位点的筛选 [J]. *水产学报*, 2009, 33(1): 1-8.
- [9] 李永平,梁炳生. *MyoD* 肌形成作用机制研究进展 [J]. *国际骨科学杂志*, 2007, 28(1): 37-40.
- [10] 赵广珍,贾 青,张翠翠,等. 猪 *MyoD1* 基因多态性与肉质性状的相关分析 [J]. *河北农业大学学报*, 2012, 35(4): 90-94.
- [11] 程金花,赵文明,包文斌,等. 皖西白鹅 *Pit-1* 基因插入/缺失多态性及其对早期体重的影响 [J]. *农业生物技术学报*, 2008, 16(3): 426-429.
- [12] 邱峰芳,聂庆华,金卫根,等. 鸡 *PIT-1* 基因 57bp 插入/缺失多态与生长和屠体性状的相关研究 [J]. *江西农业大学学报*, 2006, 28(2): 284-288.
- [13] WANG Y P, LU Y, ZHANG Y, et al. The draft genome of the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) provides insights into its evolution and vegetarian adaptation [J]. *Nature Genetics*, 2015, 47 (6): 1-8.
- [14] BOSTEIN D, WLLITE R L, SKOLNICK M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism [J]. *The American Journal of Human Genetics*, 1980, 32: 314-331.
- [15] WANG L, LI K, XU Q, et al. Potential synergy between SNP and CpG-A or IL-1 beta in regulating transcriptional activity of IL-20 promoter [J]. *The Journal of Investigative Dermatology*, 2014, 134 (2): 389-395.
- [16] YANG Z H, ZHOU C L, ZHU H, et al. A functional SNP in the MDM2 promoter mediates E2F1 affinity to modulate cyclin D1 expression in tumor cell proliferation [J]. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2014, 15(8): 3817-3823.
- [17] NIE Q, LEI M, QU Y, et al. Identification and characterization of single nucleotide polymorphisms in 12 chicken growth-correlated genes by denaturing high performance liquid chromatography [J]. *Genetics Selection Evolution*, 2005, 37 (3): 339-360.
- [18] 张 猛,陈 勇,沈玉帮,等. 草鱼 *MSTN-1* 基因多态性及与早期生长性状和肌肉成分关联分析 [J]. *水产学报*, 2016, 40 (4): 618-625.
- [19] ZHAO Z M, FU Y X, HEWETT E D, et al. Investigating single nucleotide polymorphism (SNP) density in the human genome and its implications for molecular evolution [J]. *Gene*, 2003, 312: 207-213.
- [20] 褚 敏,阎 萍,梁春年,等. 大通牦牛 *MyoD1* 基因 3'UTR SNPs 多态性及其与生长性状相关性的研究 [J]. *中国畜牧兽医*, 2012, 39(2): 111-113.
- [21] HAN X, JIANG T, YANG H, et al. Investigation of four porcine candidate genes (H-FABP, *MYOD1*, UCP3 and MASTR) for meat quality traits in large white pigs [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39 (6): 6599-6605.
- [22] 田 璐,许尚忠,岳文斌,等. *MyoD* 基因对肉牛胴体性状影响的分析 [J]. *遗传*, 2007, 29(3): 313-318.
- [23] 李万贵,张依裕,王单单,等. 樱桃谷鸭 *MyoD1* 基因外显子 4 多态与体尺的关联效应研究 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2015, 34(5): 950-954.
- [24] CHEN W X, MA Y, LIU K H. Association of *MYOD1a* and *MYOD1b* gene polymorphisms and meat quality traits in rainbow trout [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14(3): 9034-9044.
- [25] 陈松波,龚 丽,范兆廷,等. 牙鲆 *MyoD* 基因单核苷酸多态性位点的筛选 [J]. *水生生物学报*, 2013, 37(5): 863-868.

(责任编辑:张震林)