

丁秀芳,冯文荣,李建林,等. 中华绒螯蟹 *MIH* 基因 SNP 位点筛选及其与生长性状的关联分析[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(6):1053-1059.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2024.06.012

中华绒螯蟹 *MIH* 基因 SNP 位点筛选及其与生长性状的关联分析

丁秀芳¹, 冯文荣^{1,2}, 李建林^{1,2}, 苏胜彦^{1,2}, 唐永凯^{1,2}

(1.南京农业大学无锡渔业学院,江苏 无锡 214026; 2.中国水产科学研究院淡水渔业研究中心/农业农村部淡水渔业与种质资源利用重点实验室,江苏 无锡 214026)

摘要: 为明确蜕皮抑制激素基因(*MIH*)对中华绒螯蟹的生长调控机制,本研究选取 100 只中华绒螯蟹幼蟹个体,分析幼蟹 *MIH* 基因的单核苷酸多态性(SNP)位点及基因型,并对与生长指标相关的多态性位点进行连锁不平衡和单倍型分析,进一步明确多态性位点单倍型与生长性状之间的相关性。结果显示,在中华绒螯蟹幼蟹 *MIH* 基因中共筛选鉴定出 5 个 SNP 位点,其中 3 个位点(*C640G*、*C2529T* 和 *G2595T*)与中华绒螯蟹生长性状具有相关性;3 个相关位点中共检测到 5 种单倍型,其中 H1 单倍型(GCG)的占比最高(68.8%),为优势单倍型;H3 单倍型(GTT)个体的生长性状指标最高,显著高于 H2 单倍型(CCG)。本研究得到的中华绒螯蟹 *MIH* 基因上 3 个与生长性状相关的 SNP 位点,可作为候选分子标记用于中华绒螯蟹优质品种选育。

关键词: 中华绒螯蟹; *MIH* 基因; 单核苷酸多态性(SNP)位点; 单倍型; 生长性状

中图分类号: S966.16 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2024)06-1053-07

Screening of SNP loci of *MIH* gene in *Eriocheir sinensis* and its association with growth traits

DING Xiufang¹, FENG Wenrong^{1,2}, LI Jianlin^{1,2}, SU Shengyan^{1,2}, TANG Yongkai^{1,2}

(1.Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214026, China; 2.Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences/Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Wuxi 214026, China)

Abstract: In order to clarify the regulatory mechanism of molt-inhibiting hormone (*MIH*) gene on the growth of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*), 100 juvenile Chinese mitten crabs were selected to analyze the single nucleotide polymorphism (SNP) loci and genotypes of *MIH* gene, and the linkage disequilibrium and haplotype analysis of polymorphic loci related to growth indicators were carried out to further clarify the correlation between haplotypes of polymorphic loci and growth traits. The results showed that five SNP loci were screened and identified in *MIH* gene of juvenile Chinese mitten crab, and three of them (*C640G*, *C2529T* and *G2595T*) were related to the growth traits of Chinese mitten crab. Five haplotypes were detected in the three related sites. Among them, H1 haplotype (GCG) accounted for the highest proportion (68.8%), which was the dominant haplotype. The growth traits of individuals with H3 haplotype (GTT) were the highest and significant-

ly higher than those of individuals with H2 haplotype (CCG). The three SNP loci associated with growth traits in *MIH* gene of Chinese mitten crab obtained in this study can be used as candidate molecular markers for the breeding of high-quality Chinese mitten crab varieties.

Key words: *Eriocheir sinensis*; *MIH* gene; single nucleotide polymorphism (SNP) loci; haplotype; growth traits

收稿日期:2023-03-29

基金项目:江苏省种业振兴项目[JBGS(2021)031];江苏省农业重大新品种创制项目(PZCZ201749);中央级基本科研业务费(2020TD36);江苏省重点研发项目(BE2022360)

作者简介:丁秀芳(1997-),女,河南周口人,硕士研究生,研究方向为水产动物遗传育种。(E-mail)1806336879@qq.com

通讯作者:唐永凯,(E-mail)tangyk@ffrc.cn

蜕皮抑制激素 *MIH* (Molt Inhibiting Hormone) 属于甲壳动物高血糖激素 (Crustacean Hyperglycemic Hormone, CHH) 家族神经肽, 由眼柄神经细胞 (X-器官窦腺复合体) 分泌产生的一种多肽神经激素, 由窦腺的轴突末端释放^[1]。在青虾 (*Macrobrachium nipponense*)^[2]、脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicauda*)^[3]、克氏原螯虾 (*Procambarus calrkii*)^[4]、墨吉明对虾 (*Fenneropenaeus merguensis*)^[5] 和中华绒螯蟹^[6-7] 等甲壳动物上的研究表明, *MIH* 基因在甲壳动物的蜕壳生长调控中具有重要作用, 通过调控 *MIH* 基因的表达可以控制甲壳动物的蜕壳过程。

单核苷酸多态性 (Single nucleotide polymorphisms, SNP), 指单个核苷酸的变异而引起的核酸序列多态性, 此标记技术属于第 3 代分子标记技术^[8]。目前 SNP 分子标记技术在水产动物病原菌鉴定^[9-10]、经济性状关联分析^[11-14] 和分子育种^[15-16] 等方面得到了广泛应用。关于中华绒螯蟹 *MIH* 基因的 SNP 分子标记研究, 大多集中于性早熟性状相关分析。Xu 等^[17] 发现在中华绒螯蟹 *MIH* 基因 5' 非翻译区有 5 个 SNP 位点, 在 3' 非翻译区有 6 个 SNP 位点, 然而只有 3' 非翻译区中的 1 个 SNP 位点与中华绒螯蟹的性早熟相关; 殷悦等^[18] 发现中华绒螯蟹 *MIH* 基因内含子存在 1 个 SNP 位点, 且其与性早熟之间存在显著相关性。*MIH* 与蜕壳生长密切相关, 但目前关于中华绒螯蟹 *MIH* 基因的 SNP 位点与生长性状相关分析还未见报道。

中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 是中国经济价值较高的淡水养殖品种。中华绒螯蟹一生经历多次蜕壳, 其过程受内分泌系统和神经系统的多重调节, *MIH* 基因直接参与中华绒螯蟹的蜕壳过程^[19-21]。由于蟹蜕壳过程伴随着蟹体的生长与发育, 因此 *MIH* 基因在中华绒螯蟹的生长发育过程中具有重要作用。本研究通过对中华绒螯蟹 *MIH* 基因的测序, 分析基因的结构, 筛选 *MIH* 基因 SNP 位点, 分析其基因型, 明确中华绒螯蟹 *MIH* 基因 SNP 位点基因型与生长性状 (体重、体长、体宽和体厚) 的相关性, 以期中华绒螯蟹分子标记辅助育种提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2021 年 3 月从中国水产科学研究院淡水渔业研究中心阳澄湖蟹绿色养殖基地选取重约 6.95 g 的

中华绒螯蟹幼蟹 100 只, 测量每只蟹的体重、体长、体宽和体厚, 冰水浴麻醉后, 剪取步足肌肉, 液氮速冻后, 保存于 -80 ℃ 超低温冰箱, 用于 DNA 提取。

1.2 基因组 DNA 的提取

使用海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒 (北京天根生化科技有限公司产品) 进行样本基因组 DNA 提取。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性, 采用 NanoPhotometer-N50 超微量分光光度计 (德国 Implen GmbH 公司产品) 检测 DNA 纯度和浓度。

1.3 *MIH* 基因 SNP 位点筛选

根据美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 网站查找得到的中华绒螯蟹 *MIH* 基因序列 (GenBank: AY310313.1), 设计 5 对引物 (表 1), 进行 PCR 扩增。PCR 反应条件是 94 ℃ 预变性 3 min; 94 ℃ 变性 30 s, 58 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 45 s, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 5 min, 最后于 4 ℃ 冰箱保存。PCR 扩增产物送天霖生物科技无锡有限公司测序。用 ClustalXv1.83 软件进行序列比对, 筛选得到中华绒螯蟹幼蟹 *MIH* 基因 SNP 位点。根据测序峰值图, 明确 SNP 位点的基因型, 其中, 单峰峰值图所对应的基因型为纯合子, 而套峰峰值图所对应的基因型为杂合子。

表 1 中华绒螯蟹 *MIH* 基因扩增引物

Table 1 *MIH* gene amplification primers of *Eriocheir sinensis*

引物名称	引物序列 (5'→3')	位置 (bp)
<i>MIH1F</i>	GCCTTTGGAATCACCAGGGA	229~248
<i>MIH1R</i>	AGCGCCGCAATACAAATGTC	709~728
<i>MIH2F</i>	GACATTTGTATTGCGCGCT	709~728
<i>MIH2R</i>	GGCCATTCACAGACCTGACA	1 193~1 212
<i>MIH3F</i>	TGGCCTAGACTCGTGCAATT	1 208~1 227
<i>MIH3R</i>	GGACACTCGGCGTTGATGAT	1 715~1 734
<i>MIH4F</i>	TGTGTAGCTTCGGTGTCCAG	1 680~1 699
<i>MIH4R</i>	GAGCGTTAGGCATGGGGAAA	2 446~2 465
<i>MIH5F</i>	CGCTCCCACACTTCACCTTT	2 461~2 480
<i>MIH5R</i>	CAAGACCTTCTGGAGACCC	2 940~2 960

1.4 数据分析

分析各 SNP 位点基因型与中华绒螯蟹生长性状的关系, 得到与中华绒螯蟹生长性状存在显著相关的 SNP 位点; 进一步利用 Haploview 4.2 软件对与中华绒螯蟹生长性状存在显著相关的 SNP 位点进行单倍型和连锁不平衡分析, 估算各单倍型的频率。

一般认为连锁不平衡系数(D') >0.7 属于强连锁。利用 SPSS 20.0 软件^[22] 分析中华绒螯蟹 *MIH* 基因 SNP 位点不同基因型以及不同单倍型与中华绒螯蟹生长性状(体重、体高、体长和体厚)之间的相关性。差异显著性水平设置为 $P<0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 *MIH* 基因 SNP 位点的筛选

经测序分析及碱基序列比对,中华绒螯蟹 *MIH* 基因序列全长为3 506 bp,包括3 个外显子和2 个内含子。在 *MIH* 基因碱基序列上共筛选得到5 个 SNP 位点,位置如图1 所示。第1 内含子上有3 个

SNP 位点(*T614C*、*T621C* 和 *C640G*),3'非翻译区和第3 外显子上各有1 个 SNP 位点,分别为 *G2595T* 和 *C2529T*。第3 外显子上的 SNP 位点为无义突变。

中华绒螯蟹 *MIH* 基因 SNP 位点测序峰值图如图2 所示。*T614C* 位点单峰对应的纯合子为 C/C,套峰对应的杂合子为 T/C; *T621C* 位点单峰对应的纯合子为 T/T,套峰对应的杂合子为 T/C; *C640G* 位点单峰对应的纯合子为 G/G,套峰对应的杂合子为 C/G; *C2529T* 位点单峰对应的纯合子为 T/T,套峰对应的杂合子为 C/T; *G2595T* 位点单峰对应的纯合子为 G/G,套峰对应的杂合子为 G/T。

```

1  gcgagggttct  gtccaccgcc  aagctaataa  tatgtcgcta  aagacgcatt  ttccaaacct  tctcgaggag  gaggaggtag  aagaagagga  gacggggagg
101 aggaggaggga  ggaggaaag  ggtagcgcgc  ggtcatagga  acccccctcc  cgcctctccc  cgcccccgcc  gtgacgtaag  tggcaggcag  gtttataagg
201 gcggtcgtctc  agacagtcag  ggcattcagc  ctttggaatc  accagggaact  gttccccctg  tgaagccccct  gagcaccaga  gagacgcttc  ctccggctcc
301 tgcgtccacc  tctactctcc  tccgacgcgc  cgccccctcag  tctcaccact  cccactccgc  cctcactccc  ttcttcggcg  cctccgtcca  cggctccgtc
401 ctctaagcca  ccATGGTGTG  CCGCGCTCAA  TCCAGATTTT  CCTCTCAGgt  tagtttgagg  acgcacgtgt  tgggtagtca  gcgttatcgt  gtaatatgta
501 ggggtgtgtgt  gtgtgtgtgt  gtgtgtgtgt  gttttcatct  tgtttcttgc  tatttttttc  gttttgcccc  tgtttttttt  cttcgttggg  gtacaaagaa
601 aatctcgctc  attttttagg  aaattatag  aacttggct  tactatattt  tgcaacgatt  tccgggcatg  tcatctgagc  cccaagtact  gacagacaga
701 agtagtgaga  catttgatt  gcggcgctg  ggatgaaatt  ctagggtcac  tgcaagacga  tctccaggga  aaacattgcc  cgggataaga  taaaaagtt
801 acagcattga  gtaaaagac  ttccaatac  attcataagc  atcgtgtgcc  attattcgaa  cagcaggagg  cagcgagtag  cgggcttttt  ttattattgt
901 gttttttttg  tgcccttgag  ctgtccctt  tgttgtaaaa  aaaaaaaacg  ttaccagac  ctgtgactgg  aagagcctgg  tggatgcaga  taacctttct
1 001 ttctatatcc  ttctgacta  cgaactgagc  gtgttcgtat  ttgttctctc  tgtatttctt  cacccttgag  ctgcttctct  tgtgtgaaag  aagagggtgt
1 101 gagaagggtt  aagcgaggcc  ctggaacact  aaagaagctg  aggtctgatg  atggagagga  atagaagggc  gaagggaag  catgaaggac  gctgtcaggt
1 201 ctgtgaatgg  cctagactcg  tgcatttaga  aggtaggaga  gaaagagtta  gctgagtc  tggcccatgt  acgaagctgc  catatctggt  gatgggagag
1 301 gctggtgaac  gcagagggta  gagggaaaga  gttagctgag  gcctggcac  atgtaggaa  atgccgtatc  tgttgatggg  agaggctggt  gaacgcagag
1 401 ggtagaggga  aagagttagc  tgaggccctg  gcacatgtag  gaagctgcca  tatctgttga  tgggagaggc  tgggtgaac  agagggtaga  gggaaagagt
1 501 tagctgaggg  cctggcccat  gtaggaaagt  gccatatctg  ttgatgggag  aggtctgttg  acgcagagga  taaagggaac  ggctttgtta  ggtgaggccc
1 601 aggagcatgt  atcacgcgg  ctcacgacac  ggtgtcttac  agAGGACGTG  GCTGTGGCG  GCGGTGGTGC  TGGCCGTCCT  GTGTAGTCTC  GGTGTCCAGC
1 701 GGGCCGCGCC  GGAATCATC  AACGCCGAGT  GTCCAAACAT  GATCGGGAAT  CGTGACATCT  ACAAGAAGGT  GGACTGGATC  TGTGAGGACT  GCGCCACAT
1 801 CTTCGCGATC  GACGGTCTGG  GCATGCTCTG  CAGgtacgca  agagagagag  agagagagag  agagagagag  agagagagag  agagataaat  agagttaaat
1 901 gaataaaaaa  gtaaaaaaag  atctccttat  actctctctt  ctctctcccc  agcttctctt  ctctctgctc  atcctctctt  tcctctctct  tctctctctc
2 001 ttctctcact  ttaccatgt  ttccatgttc  ataactgacc  ctcatcatca  tcatcttact  cctctacttc  ctctctctcc  tcctctctcc  tctctctctc
2 101 cagcttctct  tctctctgct  catctctctc  ttctctctcc  ttcaactata  ccaatgttcc  tttttcatat  tctctctctc  cctctctctc  ttctctctcc
2 201 tactctctct  cctctctctc  ctcttctctc  tctctctctc  ctctctctct  ctctctctct  ctctctctct  ctctctctct  ctctctctct  acactataac
2 301 caatgtttca  ttttcataac  cgaccctctc  ctctctctct  ctctctctct  ctctctctcc  cctctctacc  gatcacctaa  accctcatga  tccccctcca
2 401 cctcttctac  gttgttacc  ccaccaccat  catcatcatc  accagtttcc  ccatgcctaa  cgctccca  cttcaccttt  cagGAAGAAC  TGCTTTAGGA
2 501 ACATCGACTT  CCTGTGTGT  GTGTACGCT  CGGAACGGCA  CGCACAGAAG  GACGACCTCA  CGCGTTACGT  CAGCATCTTC  GGGCAATAAC  tcttgggtgc
2 601 cccactctgc  ggcctccctc  tcctccccc  ggggtatctg  cgctgtctga  gatgccccga  ggggtgaagcc  gatgtccggg  aagcgctttg  aagtgaagag
2 701 tgaagtgcgt  ctctccagca  gctgtccctc  cctctctggc  tgcctctctg  ccgtgtgtga  agaatccagc  ggctaaagcc  ttggttcagt  ctctcgcgag
2 801 gagctttgat  tggcctccgt  tcacctccat  tcagtcgctt  gtctctgttt  agctccgttc  acgcttctgt  ctattgttca  gccgttcacc  ttccgttcac
2 901 ctgcgtttac  cacaagaagc  cacttgctag  tgctttctct  ggtccctccg  aaaggtcttg  catatcaggg  acactatttt  agcattggga  attggaggta
3 001 acagagtata  gaaaagagca  attacatttt  tgtttgtgta  catggacgag  tattcgaatg  tagaaggctg  ctgtagtagt  tgtaatagta  gctgtagtat
3 101 ataggaggag  gaggaggagc  agaaggagga  gcaggagtgg  aaaaggaa  agagaggagg  aagaaggtat  ttgaaagtag  aaataagttg  aaagacatct
3 201 cactgaaaca  gatcttctca  aactctagtc  aactctaaag  ctgtttgagg  gttttctctt  tatgtaatgt  cgtactcttg  ttattttgca  ttattttgca
3 301 ttcttggtta  gtgttgtaac  attcctttgt  gtgtgagtg  gtgtatgtca  acttctcttg  ttattttgtt  tcactttgtg  ttactctctc  tcgttttgtc
3 401 ctaattttat  gaggtttag  tattttattg  aatctgagcc  gctgtgttct  tccacgtctt  agaattaatt  gtggctgata  aaaaaataa  agagaaacga
3 501 aagagc

```

灰色突出显示为 SNP 位点,5'非翻译区、3'非翻译区及内含子用小写字母表示,外显子用大写字母表示。

图1 中华绒螯蟹 *MIH* 基因全长序列和5 个 SNP 位点所在的位置

Fig.1 The full-length sequence of *MIH* gene of *Eriocheir sinensis* and the locations of five SNP loci

5 个 SNP 位点的基因型类型与频率和等位基因类型与频率见表2。从表中数据可知,所有位点均有3 个基因型和2 个等位基因。*C640G* 和 *G2595T* 位点的优势基因型是 GG,其频率分别为 59% 和 92%; *C2529T*、*T614C*、*T621C* 位点的优势基因型是 CC,其频率分别为 91%、73% 和 59%。位点 *C640G* 和 *G2595T* 的优势等位基因类型是 G,其频率分别为 72.0% 和

95.0%;位点 *C2529T*、*T614C*、*T621C* 的优势等位基因类型是 C,其频率分别为 94.0%、85.5% 和 76.0%。

2.2 中华绒螯蟹 *MIH* 基因 SNP 位点基因型与生长性状之间的相关性

中华绒螯蟹 *MIH* 基因 5 个 SNP 位点不同基因型个体的生长性状指标如表3 所示。从表3 可以看出,位点 *T614C* 和 *T621C* 的不同基因型个体之间的

体重、体长、体宽及体厚等生长性状指标无显著差异,而位点 *C640G*、*C2529T* 和 *G2595T* 的不同基因型个体的生长性状指标存在一定的差异。位点 *C640G* 为 GG 基因型的体重、体长、体宽和体厚显著高于 CG 基因型,CC 基因型的蟹体生长性状指标介于两者之间,但与 2 者都没有显著差异。位点 *C2529T*

优势基因型 CC 的体长、体宽和体厚显著低于 CT 基因型,而 TT 基因型个体的生长性状指标介于 CC 基因型和 CT 基因型之间。同样,位点 *G2595T* 优势基因型 GG 的体长、体宽和体厚都显著低于 GT 基因型。

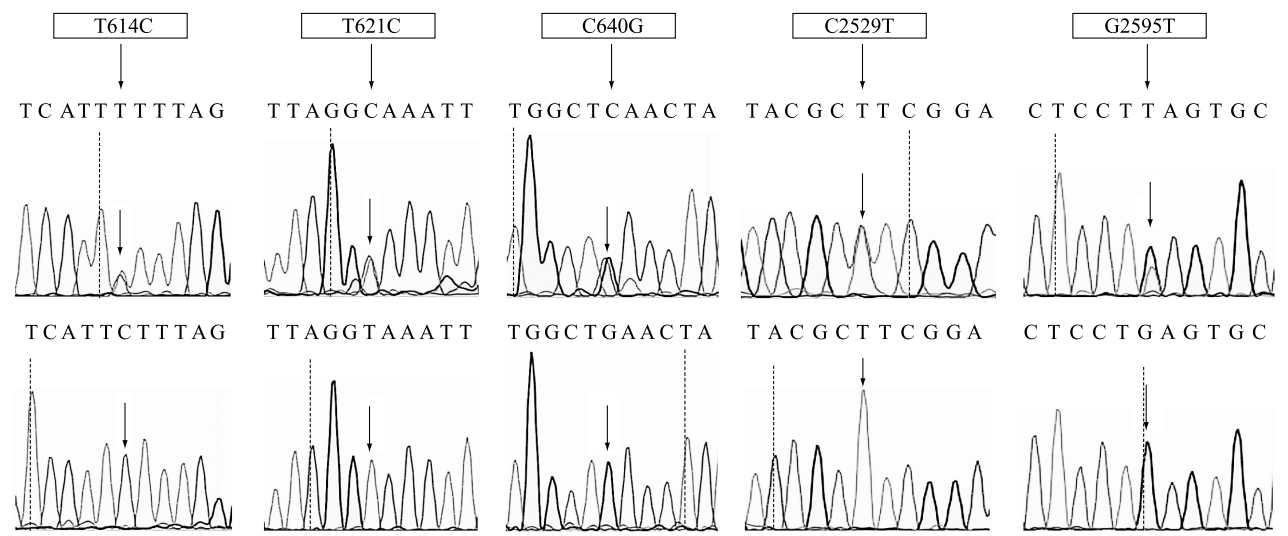


图 2 中华绒螯蟹 *MIH* 基因 5 个 SNP 位点测序峰值图

Fig.2 The sequencing peak map of five SNP loci of *MIH* gene in *Eriocheir sinensis*

表 2 中华绒螯蟹 *MIH* 基因 5 个 SNP 位点的基因型和等位基因频率

Table 2 Genotypes and allele frequencies of five SNP loci in *MIH* gene of *Eriocheir sinensis*

位点	基因型		等位基因	
	类型	频率 (%)	类型	频率 (%)
T614C	CC	73	C	85.5
	TC	25	T	14.5
	TT	2		
T621C	CC	59	C	76.0
	TC	34	T	24.0
	TT	7		
C640G	GG	59	G	72.0
	CG	26	C	28.0
	CC	15		
C2529T	CC	91	C	94.0
	CT	6	T	6.0
	TT	3		
G2595T	GG	92	G	95.0
	GT	6	T	5.0
	TT	2		

2.3 中华绒螯蟹 *MIH* 基因 SNP 位点单倍型与生长性状之间的相关性

对中华绒螯蟹 *MIH* 基因中与生长显著相关的 3 个 SNP 位点(*C640G*、*C2529T* 和 *G2595T*)连锁不平衡和单倍型分析结果如图 3 和表 4 所示。位点 *C640G* 和位点 *C2529T* 连锁不平衡系数为 0.27,位点 *C640G* 和位点 *G2595T* 连锁不平衡系数为 0.11,位点 *G2595T* 和位点 *C2529T* 之间的连锁不平衡系数为 1.00。其中,位点 *C2529T* 和 *G2595T* 之间处于强连锁不平衡状态。3 个与生长显著相关的 *C640G*、*C2529T* 和 *G2595T* 位点共检测到 5 种单倍型 H1~H5(表 4)。5 个单倍型中,H1 单倍型频率最高(68.8%),为优势单倍型;H5 单倍型频率最低,为 1.0%。

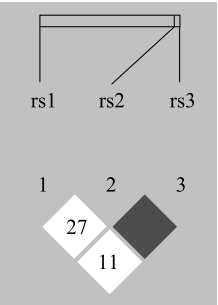
MIH 基因单倍型与生长性状指标之间的关联性如表 5 所示。从表中可以看出,蟹个体生长性状指标(体重、体长、体宽和体厚)从高到低的单倍型依次为 H3、H4、H5、H1、H2,其中 H3 单倍型个体的生长性状指标(体重、体长、体宽和体厚)皆显著高于 H2 单倍型。

表 3 中华绒螯蟹 *MIH* 基因 5 个 SNP 位点不同基因型个体生长性状的差异分析

Table 3 Difference analysis in growth traits of individuals with different genotypes at five SNP loci of *MIH* gene in *Eriocheir sinensis*

位点	基因型	体重(g)	体长(cm)	体宽(cm)	体厚(cm)
<i>T614C</i>	CC	6.935±0.476a	2.180±0.048a	2.277±0.049a	1.145±0.030a
	TC	6.902±0.030a	2.248±0.058a	2.362±0.063a	1.175±0.037a
	TT	8.135±1.405a	2.395±0.125a	2.500±0.180a	1.275±0.095a
<i>T621C</i>	CC	7.114±0.499a	2.210±0.051a	2.308±0.052a	1.163±0.031a
	TC	6.471±0.624a	2.158±0.065a	2.263±0.068a	1.121±0.040a
	TT	7.906±1.205a	2.339±0.124a	2.456±0.134a	1.253±0.084a
<i>C640G</i>	GG	7.692±0.515a	2.278±0.051a	2.390±0.052A	1.204±0.031A
	CC	6.530±0.960ab	2.158±0.100ab	2.242±0.106AB	1.137±0.066AB
	CG	5.512±0.520b	2.050±0.062b	2.141±0.064B	1.055±0.037B
<i>C2529T</i>	CT	9.543±1.117a	2.505±0.093a	2.607±0.108a	1.350±0.072a
	TT	8.190±0.709a	2.390±0.068ab	2.513±0.088ab	1.273±0.050ab
	CC	6.739±0.395a	2.175±0.040b	2.276±0.042b	1.138±0.025b
<i>G2595T</i>	GT	9.543±1.117a	2.505±0.093a	2.607±0.108a	1.350±0.072a
	TT	8.715±0.825a	2.440±0.080ab	2.580±0.100ab	1.310±0.060ab
	GG	6.743±0.393a	2.176±0.040b	2.277±0.041b	1.139±0.024b

同一列中不同大写和小写字母分别表示各位点基因型个体间差异极显著($P<0.01$)和差异显著($P<0.05$)。



rs1 表示位点 *C640G*, rs2 表示位点 *C2529T*, rs3 表示位点 *G2595T*。

图 3 中华绒螯蟹 *MIH* 基因 SNP 位点连锁不平衡分析

Fig.3 Linkage disequilibrium analysis of SNP loci in *MIH* gene of *Eriocheir sinensis*

表 4 中华绒螯蟹 *MIH* 基因突变位点单倍型分析

Table 4 Haplotype analysis of *MIH* gene mutation sites in *Eriocheir sinensis*

单倍型名称	单倍型	频率(%)
H1	GCG	68.8
H2	CCG	25.2
H3	GTT	3.2
H4	CTT	1.8
H5	CTG	1.0

3 讨论

MIH 基因是甲壳动物高血糖激素(CHH)基因家族的一员,在甲壳动物生长发育过程中起着至关重要的作用。高俊娜^[23]对三疣梭子蟹 *MIH* 基因的 SNP 位点进行了筛选,在 *MIH* 基因的外显子序列 1 上找到了 1 个 SNP 位点 *G212A*,该位点突变导致精氨酸改变为谷氨酰胺;Yu 等^[24]在斑节对虾的 *MIH1* 和 *MIH2* 基因中分别检测到 1 个 SNP 位点;Xu 等^[25]在克氏原螯虾 *MIH* 基因的 5'端非编码区和 3'端非编码区共鉴定出了 17 个 SNP 位点,其中位点 *g.-12C>G* 与体重显著相关。上述研究结果说明将 *MIH* 基因作为甲壳动物生长性状分子标记候选基因是合理的。本研究用直接测序法从中华绒螯蟹幼蟹 *MIH* 基因序列中共鉴定出 5 个 SNP 位点,并发现 3 个与生长性状相关的 SNP 位点(*C640G*、*C2529T* 和 *G2595T*)。位点 *C640G* 中的 GG 基因型个体、*C2529T* 中的 CT 基因型个体、*G2595T* 中的 GT 基因型个体均表现出较优的生长性状,说明这 3 个位点可以作为提高中华绒螯蟹体重的候选分子标记位点。

表 5 中华绒螯蟹 *MIH* 基因突变位点单倍型与生长性状的关系Table 5 Relationship between *MIH* mutation site haplotype and growth traits in *Eriocheir sinensis*

单倍型名称	样本数(个)	体重(g)	体长(cm)	体宽(cm)	体厚(cm)
H1	84	7.000±0.410ab	2.210±0.040ab	2.310±0.040ab	1.160±0.030ab
H2	39	5.800±0.500b	2.080±0.060b	2.170±0.060b	1.080±0.040b
H3	6	9.060±0.960a	2.450±0.080a	2.580±0.100a	1.320±0.060a
H4	3	8.740±1.950ab	2.420±0.180ab	2.520±0.190ab	1.300±0.120ab
H5	3	8.490±2.020ab	2.390±0.180ab	2.480±0.190ab	1.280±0.130ab

同一列不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

单倍型是指在同一个染色体上作为一个整体而共同遗传的块状区域内多个基因座上等位基因的组合,其比单个 SNP 位点包含更多的有价值信息。目前在动物基因单倍型与生长性状的关联分析方面已有较多研究。例如,王明远等^[26]通过连锁不平衡分析发现绵阳 *MTNRI A* 基因单倍型与产羔数具有显著相关性;祁增源等^[27]将青海高原型牦牛 *SCD* 基因单倍型与生长性状进行关联性分析,发现 H₁H₃ 为最优组合单倍型,*SCD* 基因可作为优质牦牛筛选的分子标记辅助候选基因;石福岳等^[28]将早胜牛 *CAPNI* 基因上检测到的 4 个 SNP 位点存在的 6 种单倍型与肉质性状进行关联分析,发现单倍型与早胜牛的肉品质性状具有显著相关性,因此这 4 个位点可作为优质早胜牛选育的候选分子标记位点。本研究通过中华绒螯蟹 *MIH* 基因 3 个与生长性状相关的 SNP 位点连锁不平衡分析,并构建单倍型,发现 3 个 SNP 位点共存在 5 种单倍型,且不同单倍型中华绒螯蟹个体生长性状指标存在较大的差异,H3 单倍型个体占据一定的生长优势,其体重、体长、体宽和体厚显著大于 H2 单倍型个体。H3 单倍型中华绒螯蟹具有较高的生长力,是优良的种质资源。

4 结 论

本研究在中华绒螯蟹 *MIH* 基因中共筛选出 5 个 SNP 位点,其中 *C640G*、*C2529T* 和 *G2595T* 3 个位点与生长性状之间具有相关性。3 个位点中 *C2529T* 和 *G2595T* 处于强连锁不平衡状态;3 个位点存在 5 种单倍型,其中 H3 单倍型个体占据一定的生长优势,是优良的种质资源。

参考文献:

- [1] LACHAISE F, LEROUX A, HUBERT M, et al. The molting gland of crustaceans: localization, activity, and endocrine control (a review) [J]. *Journal of Crustacean Biology*, 1993, 13(2): 198-234.
- [2] 江丰伟. 青虾 RNAi 技术的研究及其在蜕皮抑制激素 (MIH) 基因功能研究中的应用 [D]. 南京: 南京农业大学, 2014.
- [3] 张 美. 脊尾白虾高血糖激素家族基因的克隆、表达及功能研究 [D]. 大连: 大连海洋大学, 2015.
- [4] 林宇博. 克氏原螯虾 *MIH*、*EcR* 及 *RXR* 基因在蜕皮过程中的表达模式分析及其相互作用初探 [D]. 南京: 南京师范大学, 2017.
- [5] 刘 燕. 墨吉明对虾蜕皮抑制激素 *MIHI* 基因克隆、表达及功能研究 [D]. 广州: 广东海洋大学, 2017.
- [6] 黄 姝, 陈 娇, 陈晓雯, 等. 中华绒螯蟹蜕壳周期内蜕皮激素和蜕壳相关基因的表达动态分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2018, 26(1): 150-158.
- [7] 黄 姝. *EcR* 和 *MIH* 基因在中华绒螯蟹蜕壳过程中的相互调节机制研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.
- [8] 肖起珍. 中华绒螯蟹 DNA 分子标记开发及其应用 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2018.
- [9] LIN Z Y, QIAO J, ZHANG Y L, et al. Cloning and characterisation of the *SpToll* gene from green mud crab, *Scylla paramamosain* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2012, 37(1): 164-175.
- [10] SAEIJ J P J, STET R J M, VRIES B J D, et al. Molecular and functional characterization of carp TNF; a link between TNF polymorphism and trypanotolerance? [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2003, 27(1): 29-41.
- [11] 卞光明, 胡则辉, 柴学军, 等. SNP 标记技术及其在水产动物遗传学中的应用 [J]. *浙江海洋学院学报(自然科学版)*, 2016, 35(4): 346-353.
- [12] ZHANG B, CHEN N, HUANG C H, et al. Molecular response and association analysis of *Megalobrama amblycephala fih-1* with hypoxia [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2016, 291(4): 1615-1624.
- [13] GUTIERREZ A P, YANEZ J M, FUKUI S, et al. Genome-wide association study (GWAS) for growth rate and age at sexual maturation in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0119730.
- [14] 于爱清, 施永海, 徐嘉波. 刀鲚 *MSTN* 基因遗传多态性与生长性状的关联分析 [J]. *水产科技情报*, 2021, 48(2): 69-76.
- [15] LACONCHA U, IRIONDO M, ARRIZABALAGA H, et al. New

- nuclear SNP markers unravel the genetic structure and effective population size of Albacore Tuna (*Thunnus alalunga*) [J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0128247.
- [16] 江丽华. 我国主要石首鱼科鱼类分子系统发育及大黄鱼群体遗传结构的 DNA 标记研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2014.
- [17] XU Z Q, TANG L X, LI Y H, et al. Identification of SNPs in the 5-flanking region and 3-UTR of the *MIH* gene and their association with precocity of the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* [J]. Aquaculture Research, 2016, 47(3): 992-1000.
- [18] 殷悦, 徐宇, 唐刘秀, 等. 中华绒螯蟹蜕皮抑制激素基因单核苷酸多态与性早熟的关联性分析[J]. 水产养殖, 2019, 40(1): 14-17, 22.
- [19] ABUHAGR A M, BLINDERT J L, NIMITKUL S, et al. Molt regulation in green and red color morphs of the crab *Carcinus maenas*; gene expression of molt-inhibiting hormone signaling components [J]. Journal of Experimental Biology, 2014, 217(5): 796-808.
- [20] COVI J A, CHANG E S, MYKLES D L, et al. Neuropeptide signaling mechanisms in crustacean and insect molting glands [J]. Invertebrate Reproduction & Development, 2012, 56(1): 33-49.
- [21] JUNG H, LYONS R E, HURWOOD D A, et al. Genes and growth performance in crustacean species; a review of relevant genomic studies in crustaceans and other taxa [J]. Reviews in Aquaculture, 2013, 5(2): 77-110.
- [22] 姜玉英, 刘强. SPSS 在数据处理中的应用 [J]. 北京印刷学院学报, 2007, 15(2): 69-71.
- [23] 高俊娜. 三疣梭子蟹和日本鳊的线粒体 DNA 序列比较分析及三疣梭子蟹蜕皮抑制激素基因的 SNP 位点筛选 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.
- [24] YU M, CHENG Y, ROTHSCCHILD M F. SNP analysis of molting related genes in *Penaeus monodon* and *Litopenaeus vannamei* shrimp (Brief report) [J]. Archiv Fur Tierzucht-Archives of Animal Breeding, 2006, 49(4): 411-412.
- [25] XU Y, PENG G, SUN M L, et al. Genomic organization of the molt-inhibiting hormone gene in the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* and characterization of single-nucleotide polymorphisms associated with growth [J]. Comparative Biochemistry and Physiology (Part B), 2019, 237: 110334.
- [26] 王明远, 朱梦婷, 邵焱焱, 等. 绵羊 *MTNR1A* 基因多态性及其单倍型与产羔数的相关性 [J]. 农业生物技术学报, 2021, 29(7): 1303-1312.
- [27] 祁增源, 高占红, 周建强, 等. 青海高原型牦牛 *SCD* 基因 SNP 及单倍型与生长性状的关联性分析 [J]. 农业生物技术学报, 2022, 30(7): 1314-1320.
- [28] 石福岳, 王燕燕, 容维中, 等. 早胜牛 *CAPN1* 基因多态性及与肉质性状的关联性分析 [J]. 中国畜牧杂志, 2021, 57(8): 151-155.

(责任编辑: 石春林)