

文章编号: 1000-0615(2016)04-0618-08

DOI: 10.11964/jfc.20150309749

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

张 猛¹, 陈 勇², 沈玉帮¹, 傅建军¹, 徐晓雁¹,
孙俊龙¹, 胡默俨¹, 李家乐^{1*}

(1. 上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;

2. 通威股份有限公司水产工程技术研究中心, 四川 成都 610041)

摘要: 为研究草鱼 *MSTN-1* 基因多态性及与早期生长性状和肌肉成分的相关性, 本研究扩增出全长为 3824 bp 的草鱼 *MSTN-1* 基因, 用长江选育草鱼群体对 *MSTN-1* 基因多态性进行筛选和验证。结果共发现 3 个多态性位点 (Locus 1: C1799T, 野生型 EE/突变型 EF; Locus 2: C1842T, 野生型 HH/突变型 HI; Locus 3: TGAAGCGCTGGTTCT/2585-, 野生型 BB/缺失型 BD)。利用一般线性模型分析 3 个位点及其组合型 (剔除个体数少于 3 的组合) 与生长性状和肌肉成分的相关性, 发现 2 个位点对幼鱼生长性状表型差异有显著影响, 但 3 个位点对肌肉成分差异均无显著影响。多重比较发现, 单倍型 HI 突变组的体长和体质量显著高于 HH 野生组, BD 突变组的体长和体质量显著性低于 BB 野生组; 多倍型中存在 HI 突变组合的体长、体质量均显著高于其他组, 存在 BD 突变的组合在体长性状方面显著低于其他组。表明草鱼 *MSTN-1* 基因 3 个 SNPs 中, HI 突变是对草鱼生长性状的有利突变, BD 突变是不利突变, 而 EF 突变无显著影响, 可将 *MSTN-1* 基因作为分子标记辅助草鱼选育的候选基因。

关键词: 草鱼; *MSTN*; 多态性; 生长性状; 肌肉成分

中图分类号: Q 346; S 917.4

文献标志码: A

草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 在我国养殖历史悠久, 目前其产量在我国水产养殖鱼类中占首要地位。我国对草鱼种质资源的研究已有三十多年历史, 长期的工作积累为草鱼种质资源保护和开发提供了理论基础, 但至今尚未选育出具有良好经济性状且适合大范围推广的优良品种^[1]。草鱼多数经济性状 (如生长、肉质等) 为数量性状, 由许多微效基因共同控制, 且易受环境影响, 传统质量性状的研究方法已不能有效解决相关问题, 因此可以借助数量遗传学研究方法及现代分子生物技术手段^[2-3], 筛选与主要经济性状相关的分子标记进而辅助草鱼选育。目前在鱼类生长性状研究中应用较多的分

子标记有 SSR 和 SNP, 在草鱼研究中, 研究人员分别在羧肽酶 A1^[4]、醛缩酶 B^[5]、柠檬酸合酶^[6] 和 GSTR^[7] 等基因中筛选到与草鱼生长性状正相关的 SNPs 位点, 可为草鱼分子标记辅助选育提供理论支撑。

肌肉生长抑制基因 (myostatin, *MSTN*) 最早发现于小鼠 (*Mus musculus*) 骨骼肌 cDNA 文库^[8], 对肌肉生长有负调控作用, *MSTN* 基因的主要作用是影响骨骼肌总量, 其位点的突变可能导致骨骼肌肌群广泛分布, 相应地影响肉质性状, 历来是研究人员作为提高禽畜产肉量及改良肉质的理想基因^[9-10]。有关学者对吉富罗非鱼 (*GIFT Oreochromis niloticus*)^[11]、大口黑鲈 (*Micropterus*

收稿日期: 2015-03-05 修回日期: 2015-07-06

资助项目: 现代农业产业技术体系 (CARS-46-04); 上海市种业发展专项 (2012NY10); 通威股份有限公司产学研专项 (TW2014F003)

通信作者: 李家乐, E-mail: jlli2009@126.com

salmoides)^[12]、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)等^[13]的MSTN基因进行研究,发现几种鱼类MSTN基因不同SNPs位点对生长性状具有显著性影响。草鱼MSTN基因的cDNA全长最早于2009年克隆^[14],孙成飞^[15]和濮剑威等^[16]研究了该基因2种亚型的功能,发现草鱼MSTN基因不但调节肌细胞的增殖分化,还在早期的脊椎形成和神经系统发育中起重要作用;但MSTN-1基因的多态性及与生长性状和肌肉成分的相关分析工作尚未开展,本研究针对草鱼MSTN-1基因进行多态性检测,并结合早期草鱼的生长性状及肌肉成分进行相关性分析,以期在MSTN-1基因中找到可辅助草鱼育种的分子标记。

1 材料与方法

1.1 实验样品

2014年5月,于苏州市吴江水产养殖有限公司国家级四大家鱼良种场对长江水系野生草鱼群体进行人工繁殖,6月份将其子代运往上海海洋大学南汇滨海基地进行培育。于9月份测量繁殖后代草鱼的体长、体质量等生长参数,随机收集192条草鱼的尾鳍和肌肉用于本实验研究。

1.2 基因组DNA提取及肌肉成分分析

对收集的192条草鱼尾鳍使用经改良的高盐法^[17]提取基因组DNA。基因组DNA分别经1%琼脂糖凝胶电泳、Drop 2000紫外分光光度计检测质量和浓度,并统一稀释至50 ng/ μ L, -20 °C冰箱保存。

使用凯氏定氮法、索氏抽提法分别对草鱼肌肉中粗蛋白、粗脂肪含量进行分析检测^[18],相关工作由青岛科标检测研究院完成。

1.3 草鱼MSTN-1基因SNPs筛选

将草鱼MSTN-1基因的cDNA序列^[14](GenBank登录号:EU555520.1)与其他鱼类MSTN基因的cDNA或DNA序列进行比对,利用Primer Premier 5软件^[19]在保守区域设计2对引物(表1)以扩增草鱼MSTN-1基因内含子。PCR反应体系总体积为25 μ L: Taq PCR Mastermix(KT201-12)12.5 μ L,上下游引物各0.5 μ L (10 μ mol/L),模板2 μ L (50 ng/ μ L), ddH₂O 9.5 μ L。反应程序:94 °C预变性2 min;94 °C变性30 s,58 °C退火30 s,72 °C延伸45 s,共35个循环;72 °C延伸10 min。经1%的琼脂糖凝胶电泳检测,对检测合格的PCR扩增产物进行测序、拼接。

表1 草鱼MSTN-1基因全长扩增及SNPs位点筛选引物

Tab. 1 Primers for full length and SNPs of MSTN-1 gene in grass carp

引物 primers	序列(5'-3') sequence of primers	序列起/止/bp initiation /termination site	产物长度/bp products length	退火温度/°C annealing temperature
L1	GGGGGATGACAGTAAGGA	382	1131	58
	TAACCACACCGAGAGCAC	1512		
L2	GGTGCTCTCGGTGTGGTTA	1494	1576	58
	ATGGATGGTGGGTGGTGT	3069		
M1	TCCTCTAGTACGCCTTGG	68	682	56
	ACATTTTCTTCTGACCGACG	749		
M2	TGGGGGATGACAGTAAG	381	1130	58
	ACCACACCGAGAGCAC	1510		
M3	AGTCCGAAAATCCAAGCG	1294	1449	56
	GAAGTCCACAGTGAGAGGGTAT	2742		
M4	TGATGATTTGCTGGGGGC	2338	731	54
	TGGATGGTGGGTGGTGTGAT	3068		
M5	ATCCCTCAATGGTAGTAG	2962	651	50
	TTCTTCTCTCCCCTAATG	3612		

根据拼接得到的*MSTN-1*基因全长设计5对引物(表1), 随机选取15个个体的基因组DNA为反应模板, 分段扩增草鱼*MSTN-1*基因。依据直接测序的峰图筛选SNPs, 在存在SNPs位点的区域使用177尾草鱼个体进行验证。PCR反应体系及条件(退火温度不同)同上。

本实验所需试剂均购置于天根生化科技(北京)有限公司, 所有引物合成及PCR产物测序均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.4 序列分析及数据处理

使用NCBI在线软件(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)比对草鱼与其他鱼类的*MSTN*基因序列, 寻找草鱼*MSTN*基因保守区域。使用BioEdit软件^[20]拼接*MSTN*基因并筛选SNPs。使用SPSS18.0软件^[21]中一般线性模型对草鱼*MSTN-1*基因中SNPs位点与体长、体质量、肥满度、肌肉粗蛋白和粗脂肪等的相关性进行分析。

2 结果与分析

2.1 草鱼*MSTN-1*基因全长及SNPs位点筛选

实验获得草鱼*MSTN-1*基因(GenBank登录号: KP719016)全长共3824 bp, 包括3个外显子(分别为376、370和382 bp, 共组成1128 bp的开放阅读框)和2个内含子(长度分别为776和1008 bp), 上游非翻译区(5'UTR)88 bp和下游非翻译区(3'UTR)824 bp^[16]。与鳙(*Aristichthys nobilis*, GenBank登录号: HQ634244.2)、翘嘴红鲌(*Erythroculter ilishaeformis*, GenBank登录号: KC583257.1)*MSTN*基因的相似度分别为96%和93%。

根据重新设计的5对引物, 分段扩增草鱼*MSTN-1*基因。对随机挑取的15尾草鱼基因组DNA进行PCR扩增并直接测序, 仅在草鱼*MSTN-1*基因的第二内含子中发现3个SNPs位点(Locus 1: C1799T, 野生型EE/突变型EF; Locus 2: C1842T, 野生型HH/突变型HI; Locus 3: TGAAGCGCTGGTTCT/2585-, 野生型BB/缺失型BD, 图1)。

2.2 草鱼*MSTN-1*基因多态性分析

使用其余177尾草鱼基因组DNA对筛选出的SNPs位点进行验证, 剔除测序失败的个体, 共统计出162个有效个体在以上3个位点的碱基组

成。软件分析发现, 在草鱼*MSTN-1*基因3个SNPs位点中, 均存在杂合型突变, 无纯合型突变; 且3个位点的突变等位基因频率均很低(表2)。

2.3 草鱼*MSTN-1*基因SNPs与生长性状及肌肉成分相关分析

把经筛选及验证的3个SNPs位点的单倍型与草鱼体长、体质量、肥满度(%, 肥满度=体质量/体长³×100%)^[22]、肌肉粗脂肪和粗蛋白含量等5个性状进行相关分析。单倍型分析时发现Locus 1的2种基因型在5个性状上均无显著差异; 位点2的突变型体长和体质量均显著高于野生型($P<0.05$), 而位点3的突变型体长和体质量均显著低于野生型($P<0.05$), 但这2个位点不同基因型在其他3个性状上均无显著差异(表3)。

随机将3个位点中两两组合成双倍型(剔除频率低于3%的组合后, 共9种双倍型)与5个性状进行相关分析。在位点1和位点2组成的双倍型中, J12组的体长和体质量显著高于另外2组($P<0.05$), 其他性状无显著性差异; 在位点1和位点3组成的双倍型中, J22组的体长显著低于另外2组($P<0.05$), 体质量仅显著低于J21组, 其他性状无显著性差异; 在位点2和位点3组成的双倍型中, 3组在体长上都有显著性差异($P<0.05$), 体质量仅有J33组显著高于其他2组($P<0.05$), 而其他性状无显著性差异(表4)。

将3个位点不同基因型组成的4种三倍型(剔除频率低于3%的组合)分别与5个性状进行相关分析, N3组在体长和体质量两性状上均显著高于其他组($P<0.05$); N2组虽然在体长上显著低于另外3组, 但在体质量性状上不显著; 不同组合的其他3个性状差异不显著(表5)。

3 讨论

本研究拼接得到的草鱼*MSTN-1*基因全长3824 bp, 和其他动物一样, 均由3个外显子和2个内含子组成, 在与其他鱼类已知*MSTN*基因序列比对时显示出较高的相似度; 而已知研究表明草鱼*MSTN-1*基因的开放阅读框为1128 bp, 草鱼*MSTN-1*和*MSTN-2*基因编码的蛋白结构相同, 均包括TGF- β 前肽结构域和TGF- β 或类TGF- β 结构域2个蛋白结构域、有典型RXXR蛋白酶水解位点RIRR、都有9个保守半胱氨酸残基^[16]。赵浩斌等^[23]发现多数动物*MSTN*氨基酸序列中都有信号

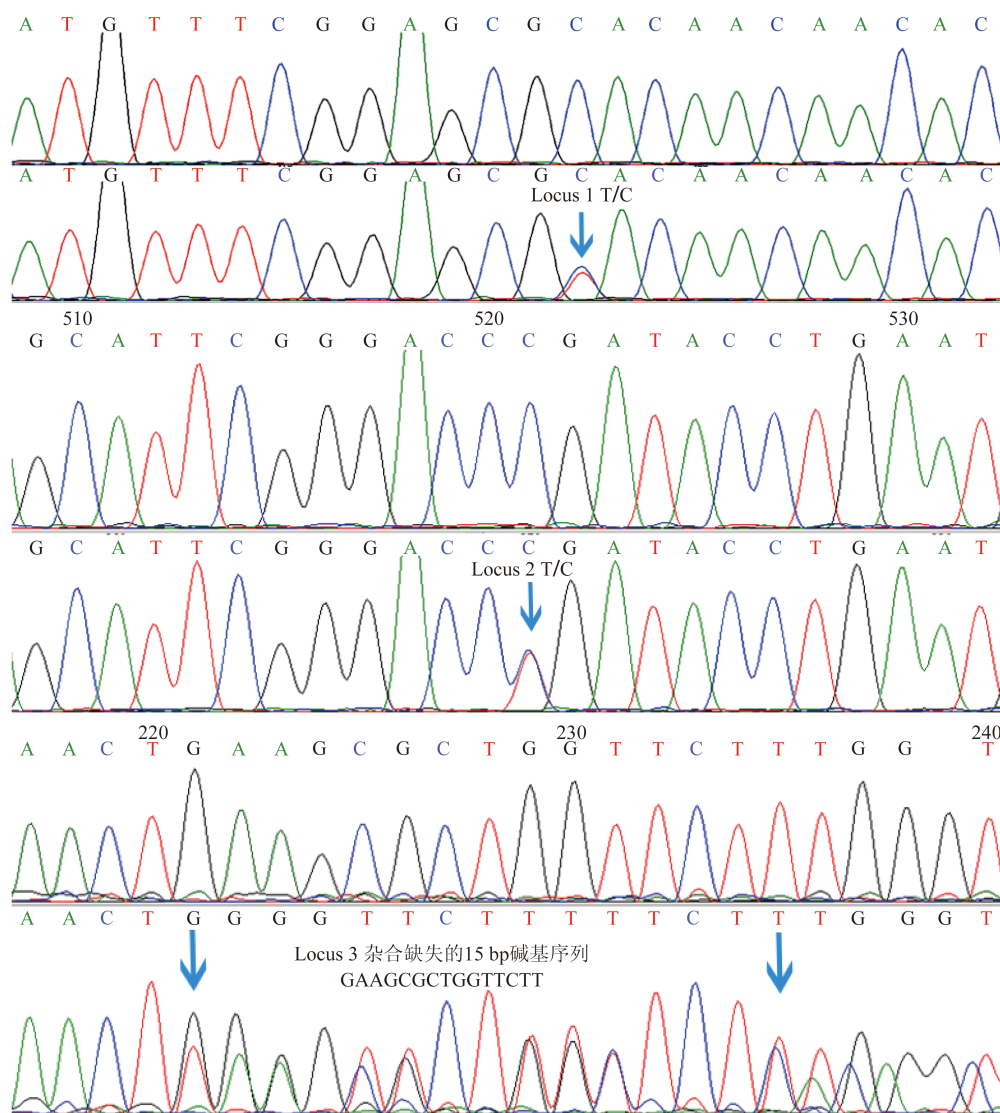


图 1 草鱼 *MSTN-1* 基因 3 个 SNPs 位点峰图

图中 Locus 1 和 Locus 2 箭头处代表突变位置, Locus 3 的 2 箭头之间为缺失片段的始末位置

Fig. 1 The peak chart of three SNPs of *MSTN-1* gene in grass carp

The arrows in Locus 1 and 2 represent the mutation positions, the arrows in Locus 3 represent the starting and ending positions of the deletion fragment

表 2 草鱼 *MSTN-1* 基因 SNPs 位点基因型及基因频率

Tab. 2 Genotype and gene frequency of SNPs sites in grass carp *MSTN-1* gene

位点 SNPs site	基因型 genotype	样本数 number	基因型频率 genotype frequency	等位基因 allele	等位基因频率 allele frequency
Locus 1	EE	130	0.8025	E	0.9012
	EF	32	0.1975	F	0.0988
Locus 2	HH	145	0.8951	H	0.9475
	HI	17	0.1049	I	0.0525
Locus 3	BB	156	0.9630	B	0.9815
	BD	6	0.0370	D	0.0185

表3 草鱼 *MSTN-1* 基因SNPs不同基因型与生长性状及肌肉成分相关分析

Tab. 3 Association of *MSTN-1* gene polymorphism with growth traits and muscle compositions in grass carp

位点 locus	基因型 genotype	样本数 number	体长/cm body length	体质量/g body weight	肥满度/% fatness	粗脂肪/% total fat	粗蛋白/% total protein
Locus 1	EE	130	8.53±0.11	13.51±0.63	2.01±0.02	1.70±0.07	15.43±0.22
	EF	32	8.43±0.27	13.27±1.55	1.99±0.03	1.77±0.15	14.60±0.38
Locus 2	HH	145	8.43±0.10 ^a	12.97±0.55 ^a	2.01±0.01	1.71±0.07	15.23±0.20
	HI	17	9.18±0.48 ^b	17.71±2.93 ^b	1.97±0.07	1.75±0.18	15.60±0.54
Locus 3	BB	156	8.57±0.11 ^a	13.72±0.60 ^a	2.01±0.01	1.73±0.06	15.28±0.19
	BD	6	6.93±0.38 ^b	6.78±1.22 ^b	1.96±0.07	1.22±0.09	14.87±0.83

注：同一位点中同列的不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)Notes: different superscript letters in a column of each locus indicate significant difference at $P<0.05$ 表4 草鱼 *MSTN-1* 基因SNPs双倍型与生长性状及肌肉成分相关分析

Tab. 4 Association of *MSTN-1* gene diplotype with growth traits and muscle compositions in grass carp

双倍型 diplotype	基因型 genotype	样本数 number	体长/cm body length	体质量/g body weight	肥满度/% fatness	粗脂肪/% total fat	粗蛋白/% total protein	
Locus 1&2	J11	EE&HH	114	8.42±0.11 ^b	12.80±0.56 ^b	2.01±0.02	1.69±0.07	15.40±0.23
	J12	EE&HI	16	9.28±0.48 ^a	18.33±3.04 ^a	1.97±0.07	1.75±0.19	15.66±0.57
	J13	EF&HH	31	8.47±0.28 ^b	13.45±1.58 ^b	1.99±0.03	1.77±0.16	14.60±0.39
Locus 1&3	J21	EE&BB	124	8.61±0.11 ^a	13.84±0.64 ^a	2.01±0.02	1.72±0.07	15.46±0.22
	J22	EE&BD	6	6.93±0.38 ^b	6.78±1.22 ^b	1.96±0.07	1.22±0.09	14.87±0.83
	J23	EF&BB	32	8.43±0.27 ^a	13.27±1.55 ^{ab}	1.99±0.03	1.77±0.15	14.60±0.38
Locus 2&3	J31	HH&BB	141	8.47±0.10 ^b	13.13±0.56 ^b	2.01±0.01	1.72±0.07	15.25±0.21
	J32	HH&BD	4	7.05±0.55 ^c	7.25±1.86 ^b	1.95±0.05	1.26±0.12	14.58±1.11
	J33	HI&BB	15	9.51±0.47 ^a	19.29±3.10 ^a	1.97±0.07	1.83±0.19	15.62±0.59

注：相同两位点组合中同列的不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)Notes: different superscript letters in a column of the same two locus indicate significant difference at $P<0.05$ 表5 草鱼 *MSTN-1* 基因SNPs三倍型与生长性状及肌肉成分相关分析

Tab. 5 Association of *MSTN-1* gene triple-type with growth traits and muscle compositions in grass carp

三倍型 triple-type	基因型/n genotype	个体数 number	体长/cm body length	体质量/g body weight	肥满度/% fatness	粗脂肪/% total fat	粗蛋白/% total protein
N1	EE&HH&BB	110	8.47±0.11 ^b	13.03±0.57 ^b	2.02±0.02	1.71±0.07	15.43±0.24
N2	EE&HH&BD	4	7.05±0.55 ^c	7.25±1.86 ^b	1.95±0.05	1.26±0.12	14.58±1.11
N3	EE&HI&BB	14	9.67±0.48 ^a	20.15±3.20 ^a	1.97±0.08	1.84±0.21	15.70±0.63
N4	EF&HH&BB	31	8.47±0.28 ^b	13.47±1.59 ^b	1.99±0.03	1.77±0.16	14.60±0.39

注：同列的不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)Notes: different superscript letters in a column indicate significant difference at $P<0.05$

肽序列、典型蛋白水解位点RXXR和保守半胱氨酸残基等特征，表明*MSTN*基因在长期进化过程中保守性较高；且*MSTN*基因在鱼体内分布更为广泛，推测该基因在鱼体内不但具有负向调控肌肉生长的作用，还可能影响其他组织的发育。

鉴于*MSTN*基因在草鱼个体发育和肌肉生长过程中发挥重要作用，且其保守性较高，其他动物中的功能研究结果可为草鱼*MSTN*基因的功能研究提供参考。

1997年*MSTN*基因的cDNA首次从小鼠骨骼肌

细胞中分离出^[8]后,一系列研究结果均表明MSTN基因具有负向调控骨骼肌生长发育的作用^[24]。经对牛、猪等动物MSTN基因的多态性及与肉质相关性研究,发现这些动物MSTN基因中存在的单核苷酸多态性与其生长性状及肌肉成分存在一定相关性。水产动物方面,罗非鱼^[11]、大口黑鲈^[12]、黄颡鱼^[13]、建鲤(*Cyprinus carpio var. jian*)^[25]等MSTN基因中均已发现SNPs位点,且多数SNPs位点位于内含子区域;将这些SNPs与鱼类生长性状关联分析,发现部分SNPs与生长性状显著相关($P<0.05$)。本研究中,在草鱼MSTN-1基因中共发现3个SNPs位点,且均位于第2内含子区域,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^[26]。虽然草鱼MSTN-1基因3个SNPs均位于内含子区域,不影响基因蛋白的编码,但可能在基因转录及mRNA剪切时发挥作用^[27]。将草鱼MSTN-1基因SNPs位点与生长性状进行关联分析,发现Locus 2和Locus 3的单倍型以及包含2个位点的组合型对生长性状的表型差异有显著影响($P<0.05$)。对实验草鱼MSTN-1基因中3个SNPs位点的基因频率进行分析,发现EF突变所占基因频率相对较高,可能因为该突变型对草鱼早期生长发育无显著影响,人工选择压力较小;HI突变基因型频率较低,而该突变属于草鱼生长性状有利突变,表明该选育群体仍有很大选育潜力;BD缺失型突变基因频率最低(仅0.0185),可能由于选育群体亲本数量有限,且该位点多态性较低所导致。综上,草鱼MSTN-1基因3个SNPs与生长性状及肌肉成分相关分析结果表明,HI突变是与草鱼生长性状相关的有利突变,因此可以将草鱼MSTN-1基因作为分子辅助草鱼选育的候选基因。

本研究对草鱼MSTN-1基因SNPs位点(单倍及组合型)与草鱼肌肉成分相关分析时,除含有BD突变的组合外,其他组肌肉粗蛋白、粗脂肪含量基本相同,而含BD突变的组合中草鱼肌肉粗脂肪、粗蛋白虽低于其他组,但无显著性差异。各组肌肉成分无显著性差异可能因为该时期草鱼处于快速生长阶段,摄取的能量主要用于生长发育;含BD突变的组合肌肉粗脂肪、粗蛋白低于其他组,可能由于该缺失型突变影响草鱼早期生长发育^[16]、竞争力差,进而导致存活个体少、存活个体肌肉成分与其他组差异不显

著。另外,本研究仅针对草鱼肌肉粗脂肪和粗蛋白含量进行分析,并未具体分析其肌肉组成成分;草鱼MSTN-1基因多态性与肌肉成分(尤其影响草鱼肌肉品质的成分)的关联分析工作需要进一步开展和验证。

参考文献:

- [1] 沈玉帮,张俊彬,李家乐. 草鱼种质资源研究进展[J]. 中国农学通报, 2011, 27(7): 369-373.
Shen Y B, Zhang J B, Li J L. Advances in studies on genetic resources of grass carp [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 27(7): 369-373 (in Chinese).
- [2] 桂建芳,朱作言. 水产动物重要经济性状的分子基础及其遗传改良[J]. 科学通报, 2012, 57(19): 1719-1729.
Gui J F, Zhu Z Y. Molecular basis and genetic improvement of economically important traits in aquaculture animals [J]. Chinese Science Bulletin, 2012, 57(19): 1751-1760.
- [3] 李玺洋. 草鱼形态性状对体质量影响效果分析及生长相关SNP位点筛选[D]. 武汉: 华中农业大学, 2012.
Li X Y. The relationship between morphological characters and body weight and SNP marker screening associated with growth traits of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2012 (in Chinese).
- [4] 曹婷婷,白俊杰,于凌云,等. 草鱼羧肽酶A1基因(CPA1)部分片段的单核苷酸多态性(SNP)多态性及其与生长性状的关联分析[J]. 农业生物技术学报, 2012, 20(3): 301-307.
Cao T T, Bai J J, Yu L Y, et al. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of carboxypeptidase A1 gene (CPA1) segments and their association with the growth traits of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2012, 20(3): 301-307 (in Chinese).
- [5] 曹婷婷,白俊杰,于凌云,等. 草鱼醛缩酶B基因部分序列的SNP多态性及其与生长性状的关联分析[J]. 水产学报, 2012, 36(4): 481-488.
Cao T T, Bai J J, Yu L Y, et al. Polymorphisms of SNPs in ALDO B gene and association analysis with growth traits in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(4): 481-488 (in Chinese).
- [6] 樊佳佳,刘小献,白俊杰,等. 草鱼柠檬酸合酶基因SNP筛选及与生长性状的关联分析[J]. 华中农业大学

- 学报, 2014, 33(3): 84–89.
- Fan J J, Liu X X, Bai J J, *et al.* Detection of SNP incitrate synthase gene and association analysis with growth traits in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2014, 33(3): 84–89 (in Chinese).
- [7] 刘小献, 白俊杰, 徐磊, 等. 草鱼*GSTR*基因外显子1、外显子2的SNPs筛选及其与生长性状的关联分析[J]. 华中农业大学学报, 2011, 30(6): 753–758.
- Liu X X, Bai J J, Xu L, *et al.* SNPs in exon 1, exon 2 of *GSTR* gene and its relationship with growth traits in grass carp [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2011, 30(6): 753–758 (in Chinese).
- [8] McPherron A C, Lawler A M, Lee S J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member [J]. Nature, 1997, 387(6628): 83–90.
- [9] 李绍华, 熊远著, 郑嵘, 等. 猪*MSTN*基因多态性及其SNPs的研究[J]. 遗传学报, 2002, 29(4): 326–331.
- Li S H, Xiong Y Z, Zheng R, *et al.* Polymorphism of porcine myostatin gene [J]. Acta Genetica Sinica, 2002, 29(4): 326–331 (in Chinese).
- [10] Lee S J, McPherron A C. Myostatin and the control of skeletal muscle mass [J]. Current Opinion in Genetics & Development, 1999, 9(5): 604–607.
- [11] 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).
- [12] 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 largemouth bass myostatin gene and its association with growth traits [J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(6): 665–671 (in Chinese).
- [13] 朱媛媛, 梁宏伟, 李忠, 等. 黄颡鱼*MSTN*基因多态性及其与生长性状的相关性分析[J]. 遗传, 2012, 34(1): 72–78.
- Zhu Y Y, Liang H W, Li Z, *et al.* Polymorphism of *MSTN* gene and its association with growth traits in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) [J]. Hereditas (Beijing), 2012, 34(1): 72–78 (in Chinese).
- [14] 黄利. 草鱼肌肉生长抑制素(MSTN)的cDNA克隆及地塞米松对其表达的影响[D]. 重庆: 西南大学, 2009.
- Huang L. cDNA cloning of grass carp myostatin (MSTN) and its expression in muscle tissue in response to dexamethasone [D]. Chongqing: Southwest University, 2009 (in Chinese).
- [15] 孙成飞. 草鱼肌肉生长抑制素2的克隆、功能分析及*Tgf2*转座子介导的鱼类插入诱变研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.
- Sun C F. Cloning and functional analysis of *myostatin* in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and insertional mutagenesis by *Tgf2* transposon in fish [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012 (in Chinese).
- [16] 濮剑威, 孙成飞, 蒋霞云, 等. 草鱼两个肌肉生长抑制素cDNA克隆、表达及过量表达对胚胎发育的影响[J]. 生物技术通报, 2011(8): 153–160.
- Pu J W, Sun C F, Jiang X Y, *et al.* Two cDNAs cloning, expression and overexpression in embryo of myostatin from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. Biotechnology Bulletin, 2011(8): 153–160 (in Chinese).
- [17] Rivero E R C, Neves A C, Silva V M G, *et al.* Simple salting-out method for DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues [J]. Pathology Research and Practice, 2006, 202(7): 523–529.
- [18] 程汉良, 蒋飞, 彭永兴, 等. 野生与养殖草鱼肌肉营养成分比较分析[J]. 食品科学, 2013, 34(13): 266–270.
- Cheng H L, Jiang F, Peng Y X, *et al.* Comparison of nutrient composition of muscles of wild and farmed grass carp, *Ctenopharyngodon idellus* [J]. Food Science, 2013, 34(13): 266–270 (in Chinese).
- [19] Lalitha S. Primer premier 5 [J]. Biotech Software & Internet Report, 2000, 1(6): 270–272.
- [20] Hall T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [C]. Nucleic Acids Symposium Series. Oxford: Oxford University Press, 1999.
- [21] Coakes S J, Steed L. SPSS: Analysis Without Anguish Using SPSS Version 14.0 for Windows [M]. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2009.
- [22] Fernández D C. Life history patterns of the common carp, *Cyprinus carpio*, in the estuary of the Guadalquivir

- River in south-west Spain [J]. *Hydrobiologia*, 1990, 206(1): 19–28.
- [23] 赵浩斌, 彭扣, 王玉凤, 等. 鱼类肌肉生长抑制素研究进展[J]. *水生生物学报*, 2006, 30(2): 227–231.
- Zhao H B, Peng K, Wang Y F, *et al.* Progress of studies on myostatin of fish [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, 30(2): 227–231 (in Chinese).
- [24] 姬云涛, 陆娟, 刘生杰, 等. *MSTN* 与骨骼肌生长发育 [J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2010, 19(6): 610–614.
- Ji Y T, Lu J, Liu S J, *et al.* *MSTN* participate in growth and development of skeletal muscle [J]. *Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2010, 19(6): 610–614 (in Chinese).
- [25] 俞菊华, 李红霞, 唐永凯, 等. 建鲤生长抑制素基因 (*MSTN*) 的分离、表达及多态性与体型、平均日增重相关性研究 [J]. *农业生物技术学报*, 2010, 18(6): 1062–1072.
- Yu J H, Li H X, Tang Y K, *et al.* Isolation and expression of Myostatin (*MSTN*) Genes, and their polymorphism correlations with body form and average daily gain in *Cyprinus carpio* var. *jian* [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2010, 18(6): 1062–1072 (in Chinese).
- [26] 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.
- [27] Brookes A J. The essence of SNPs [J]. *Gene*, 1999, 234(2): 177–186.

Polymorphism of *MSTN-1* and the association with growth traits and muscle compositions of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)

ZHANG Meng¹, CHEN Yong², SHEN Yubang¹, FU Jianjun¹, XU Xiaoyan¹,
SUN Junlong¹, HU Moyan¹, LI Jiale^{1*}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Tongwei Technology Center, State Level, Chengdu 610041, China)

Abstract: Previous studies suggested that the *myostatin-1* (*MSTN-1*) gene played an important role in the growth and development of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). In order to determine whether the polymorphism of grass carp *MSTN-1* gene was associated with growth traits and muscle compositions, 192 individuals from Yangtze River were used in this study. Three polymorphic loci were found in the 3824 bp *MSTN-1* gene: C1799T, C1842T and TGAAGCGCTGGTTCT/2585-, which were named Locus 1 (wild-type EE/mutant EF), Locus 2 (wild-type HH/mutant HI) and Locus 3 (wild-type BB/deletion type BD), respectively. A general linear model was used to analyse the correlation between those three single nucleotide polymorphisms (SNPs) and grass carp traits. The results showed that two SNPs have a significant influence on grass carp growth traits. Whereas, none of those SNPs have a significant effect on grass carp muscle compositions. Multiple comparisons found that the body length and body weight of individuals with HI genotype were significantly higher than that of wide-type individuals, conversely, mutant individuals with BD genotype were significantly lower than wide-type individuals at body length and body weight in haplotype analysis; the groups with HI or BD genotype also had the similar results in fold type combinations analysis, while the body length of groups with BD genotype were not significantly lower than other groups. Results indicate that HI is a beneficial mutation on growth traits, while BD is a detrimental mutation on grass growth traits. Preliminary study indicated the *MSTN-1* gene could be a candidate modifier gene in Molecular Marker-assisted Selection (MAS) of grass carp.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; *MSTN*; polymorphism; growth traits; muscle compositions

Corresponding author: LI Jiale. E-mail: jlli2009@126.com

Funding projects: China Agriculture Research system (CARS-46-04); Agricultural Seed Development Program of Shanghai (2012NY10); University-Industry Cooperation Project of Tongwei (TW2014F003)