

文章编号: 1000-0615(2017)09-1329-09

DOI: 10.11964/jfc.20160910546

## 草鱼 *GH* 基因3'部分序列多态性与生长性状及肌肉成分的相关性分析

王沈同, 张 猛, 沈玉帮, 李家乐\*

(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)

**摘要:** 为了解草鱼 *GH* 基因多态性与早期生长性状及肌肉成分的相关性, 实验利用直接测序法从156尾草鱼 *GH* 基因的3'部分序列中共筛选到9个变异位点(分别命名为SNP1~SNP9: G2825A、G2914T、T2966G、A3002T、T3022C、A3301G、C3463T、C3547T、C3620T)。卡方检验结果显示, 9个位点均未显著偏离Hardy-Weinberg平衡, 且均表现为中等多态性( $0.25 < PIC < 0.5$ ); 经连锁不平衡分析发现, SNP3、SNP4和SNP5位点为一组完美连锁不平衡, SNP2、SNP7、SNP9位点为一组完美连锁不平衡; *GH* 基因3'部分序列5个位点单倍型分析共发现6种单倍型, 其中Hap1(30.4%)所占的比例最高, Hap6(4.8%)所占比例最低。利用GLM及多重比较对草鱼 *GH* 基因中9个SNPs多态性与早期生长性状和肌肉成分进行相关性分析, 发现SNP2和SNP3位点的纯合突变型在体质量、体长和粗脂肪性状上均显著高于野生型和杂合突变型; 在双倍型分析时得出了相似的结果, 同时含有SNP2和SNP3位点纯合突变的双倍型组合在生长和粗脂肪性状上均显著性高于其他组合。研究表明, 草鱼 *GH* 基因中SNP2和SNP3位点与早期生长性状及肌肉成分存在显著性相关, 可作为草鱼生长及肉质改良的候选辅助分子标记, 并且为进一步对相关变异位点的功能验证奠定研究基础。

**关键词:** 草鱼; *GH* 基因; 多态性; 生长性状; 肌肉成分

**中图分类号:** Q 785; S 965

**文献标志码:** A

草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)隶属于鲤形目(Cypriniformes)、鲤科(Cyprinidae)、草鱼属, 和鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙(*Aristichthys nobilis*)、青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)一起构成我国著名的“四大家鱼”。草鱼已有1700多年的养殖历史<sup>[1]</sup>, 2014年, 其年产量在世界淡水鱼品种中名列第一<sup>[2]</sup>。虽然中国的草鱼产量高, 但由于其个体大、难操作、性成熟周期长等原因, 至今还没有人工选育出性状优良的新品种。利用分子标记进行辅助育种可以缩短育种的年限、提高育种的效率、加快新品种的育成, 这成为目前动物育种过程中的重要辅助手段之一。SNP作为第三代分子标记, 比起传统的分子标记

(AFLP、RAPD、RFLP、SSR), 其具有数量多、分布广泛、遗传稳定、可进行自动化检测等优点, 已成为研究表型和基因型之间关联的最好载体<sup>[3]</sup>。

生长性状包括体长、体质量、肌肉成分含量等, 是水产品重要的经济性性状之一, 性状的优劣将会直接影响其经济价值<sup>[4]</sup>。生长激素(GH)作为一种脑垂体前叶合成并分泌的单链多肽, 具有广泛的生理作用, 对动物的躯体生长有着重要的作用<sup>[5]</sup>, 生长激素能促进鱼类肌肉中蛋白质的合成, 并能促进骨骼的生长和性腺的成熟, 提高饵料的转化率<sup>[6-7]</sup>, 在现有的研究中已发现鲫(*Carassius auratus*)、牙鲮(*Paralichthys*

收稿日期: 2016-09-19 修回日期: 2017-03-03

资助项目: 现代农业产业技术体系专项(CARS-46-04); 上海市工程中心提升项目(16DZ2281200); 通威产学研项目(TW2014F003)

通信作者: 李家乐, E-mail: jlli2009@126.com

*olivaceus*)、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)*GH*基因的多态性与生长性状具有显著性相关<sup>[8-11]</sup>, 而草鱼的生长性状及肌肉成分与*GH*基因多态性之间的相关分析未见报道。已有相关研究发现, 草鱼载脂蛋白*A-I-I*基因3'端存在着与其生长性状相关的SNPs<sup>[12]</sup>, 褚敏等<sup>[13]</sup>也发现大通牦牛*MyoDI*基因3'端SNPs的多态性与生长性状有关, 因此在本实验中, 为提高寻找草鱼*GH*基因中与生长性状及肌肉成分相关SNPs的概率, 通过直接测序法以草鱼*GH*基因3'端为切入点, 对草鱼*GH*基因3'端部分序列进行了多态性的检测, 并结合草鱼早期生长性状和肌肉成分进行了关联分析, 旨在研究草鱼*GH*基因中可用于分子标记辅助育种的SNP标记。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验样品

2014年5月, 于江苏省吴江市国家级四大家鱼原种场对长江水系野生草鱼群体进行人工繁殖, 实验选取12尾雌鱼、12尾雄鱼在水体为20 m<sup>3</sup>的流水池进行流水人工繁殖, 获得受精卵。在孵化桶中充氧孵化, 两天后长成水花, 以10万尾/亩密度移入池塘继续培育。早期泼洒豆浆, 后期投喂人工配合饲料。一个月后, 将夏花鱼苗(约40日龄)运到上海海洋大学南汇滨海基地进行培育<sup>[14]</sup>。

### 1.2 数据采集与样本DNA提取

当年9月份, 采集192尾草鱼, 测量其体长(standard length, SL, 单位cm), 体质量(body weight, BW, 单位g), 并计算其肥满度(condition factor, CF, %), 公式为 $CF=BW/SL^3 \times 100$ , 测量工具为电子天平(精确到0.01 g), 游标卡尺(精确到0.002 cm), 取背部肌肉, 采用凯式定氮法和索氏抽提法分别对草鱼的肌肉成分进行测定, 测定其粗蛋白含量(protein content, PC)和粗脂肪含量(fat content, FC)<sup>[15]</sup>, 相关检测由青岛科标化工分析检测有限公司完成, 并取鳍条固定于95%酒精, -20 °C保存。

对收集的192尾草鱼尾鳍采用改良的高盐法<sup>[16]</sup>提取基因组DNA, 经1%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性, 用NanoDrop 2000紫外分光光度计检测其纯度和浓度, 并稀释至50 ng/μL, 于-20 °C冰箱保存备用。

### 1.3 草鱼*GH*基因变异位点筛选及验证

草鱼*GH*基因的cDNA(GenBank登录号: JN711124.1)和DNA(GenBank登录号: X60419.1)序列从NCBI上获取, 运用Primer 5.0软件设计引物, 上游引物: 5'-CTAGTTTTCTGAAGCCTCCG-3', 下游引物: 5'-TGGTCATTTTTTCGGTC-3', 选取10尾草鱼进行草鱼*GH*基因变异位点的筛选, PCR反应体系总体积为25 μL: Taq PCR Mastermix 12.5 μL(成分为0.1 U Taq Polymerase/μL, 500 μmol/L dNTP each, 20 mmol/L Tris-HCl (pH=8.3), 100 mmol/L KCl, 3 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 其他稳定剂和增强剂), 上下游引物各0.5 μL (10 μmol/L), 模板DNA 2 μL (50 ng/μL), dd H<sub>2</sub>O 9.5 μL。反应程序: 94 °C预变性2 min; 94 °C变性30 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸90 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扩增产物直接进行测序, 拼接。根据直接测序的峰图, 预测SNP变异位点, 选取192尾草鱼基因组DNA进行SNP位点的验证, 引物设置及PCR反应体系条件同上。

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BioEdit软件<sup>[17]</sup>筛选草鱼*GH*基因的SNPs, 采用HaploView软件分析各位点的连锁不平衡程度和单倍型分布, 利用Cervus 3.0软件<sup>[18]</sup>计算各变异位点的观测杂合度( $H_o$ ), 期望杂合度( $H_e$ ), 有效等位基因( $N_e$ )及多态性信息含量(PIC), 利用EXCEL软件整理基因型及生长数据, 使用SPSS18.0软件<sup>[19]</sup>中的一般线性模型(general linear model, GLM)对草鱼体长、体质量、肥满度、粗蛋白和粗脂肪进行相关性分析, 多重比较显著性采用Duncan氏法。统计模型如下:

$$Y_{ij}=\mu+B_i+e_{ij}$$

式中,  $Y_{ij}$ 为某性状第*i*个变异位点(或位点组合)第*j*尾个体观测值;  $\mu$ 为某性状实验观测所有个体的平均值;  $B_i$ 为第*i*个变异位点(或位点组合)的效应值;  $e_{ij}$ 为对应于观测值的随机残差效应。

## 2 结果

### 2.1 草鱼*GH*基因3'部分序列SNP筛选

对草鱼10个个体*GH*基因3'序列测序拼接,

通过与NCBI上GH全长基因(共3975 bp)源序列的对比, 共获得GH基因3'部分序列1207 bp(从GH全长基因2685 bp延伸到3891 bp), 其中共发现9个变异位点, 其中位点G2825A位于第4个外显子, 位点G2914T、T2966G、A3002T、T3022C位于第四个内含子, 位点A3301G、C3463T、C3547T、C3620T位于3'非编码区。为方便统计, 分别用

SNP1-SNP9代表位点G2825A、G2914T、T2966G、A3002T、T3022C、A3301G、C3463T、C3547T、C3620T(表1), 其中SNP1、SNP5、SNP6、SNP7、SNP8、SNP9为转换变异类型, 其余为颠换变异类型。

## 2.2 SNP位点的验证及多态性分析

使用192尾草鱼基因组DNA对预筛选的变异

表1 草鱼GH基因SNPs位点基因型及基因频率

Tab. 1 Genotype and gene frequency of SNPs sites in grass carp GH 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	$\chi^2$ (P值) $\chi^2$ (P value)
SNP1	AA	5	3.20	A	23.72	2.113(0.146)
	GG	87	55.77	G	76.28	
	AG	64	41.03			
SNP2	GG	103	66.02	G	80.13	1.593(0.207)
	TT	9	5.77	T	19.87	
	GT	44	28.21			
SNP3	GG	9	5.77	G	24.68	0.003(0.959)
	TT	88	56.41	T	75.32	
	GT	59	37.82			
SNP4	TT	9	5.77	T	24.68	0.003(0.959)
	AA	88	56.41	A	75.32	
	AT	59	37.82			
SNP5	CC	9	5.77	C	24.68	0.003(0.959)
	TT	88	56.41	T	75.32	
	TC	59	37.82			
SNP6	GG	13	8.33	G	25.96	0.828(0.363)
	AA	88	56.41	A	74.04	
	AG	55	35.26			
SNP7	CC	103	66.02	C	80.13	1.593(0.207)
	TT	9	5.77	T	19.87	
	CT	44	28.21			
SNP8	CC	78	50.00	C	68.27	3.437(0.064)
	TT	21	13.46	T	31.73	
	TC	57	36.54			
SNP9	CC	103	66.02	C	80.13	1.593(0.207)
	TT	9	5.77	T	19.87	
	CT	44	28.21			

注:  $\chi_{0.01(2)}^2=9.21$ ,  $\chi_{0.05(2)}^2=5.99$ ,  $\chi^2$ 值为对不同基因型分布的Hardy-Weinberg平衡检验值

Notes:  $\chi_{0.01(2)}^2=9.21$ ,  $\chi_{0.05(2)}^2=5.99$ , The value of  $\chi^2$  is Hardy Weinberg equilibrium test value for different genotype distribution

位点进行验证，剔除测序失败的个体，共获得156个个体以上9个变异位点的碱基组成、基因型、基因型频率及基因频率。SNP1-SNP9所对应的优势等位基因分别是G、G、T、A、T、A、C、C、C，且经卡方检验结果表明，所有位点均未显著偏离Hardy-Weinberg平衡( $P>0.05$ )(表1)。

GH基因部分序列各多态性位点在群体中的观测杂合度( $H_o$ )，期望杂合度( $H_e$ )，有效等位基因( $N_e$ )，多态性信息含量( $PIC$ )如表2所示，由统计结果可知，观测杂合度的数值范围为0.2821~0.4103，期望杂合度的数值范围为0.3195~0.4346，有效等位基因的数值范围为1.4673~1.7644，且所有变异位点表现为中等多态性( $0.25<PIC<0.5$ )，说明以上9个位点能够提供一定量的遗传信息，

表2 变异位点的群体遗传参数

**Tab. 2 Population genetic parameters of variable sites**

位点 SNPs site	观测杂合度 $H_o$	期望杂合度 $H_e$	有效等位基因数 $N_e$	多态信息含量 $PIC$
SNP1	0.4103	0.3630	1.5670	0.296
SNP2	0.2821	0.3195	1.4673	0.268
SNP3	0.3782	0.3730	1.5918	0.303
SNP4	0.3782	0.3730	1.5918	0.303
SNP5	0.3782	0.3730	1.5918	0.303
SNP6	0.3526	0.3857	1.6245	0.311
SNP7	0.2821	0.3195	1.4673	0.268
SNP8	0.3654	0.4346	1.7644	0.339
SNP9	0.2821	0.3195	1.4673	0.268

且该群体遗传多样性较为丰富，有进一步选育的价值。

2.3 SNP位点连锁不平衡及单倍型分析

对本实验中的9个变异位点进行连锁不平衡分析，SNP3、SNP4、SNP5位点为一组完美连锁不平衡位点( $r^2=1$ )，SNP2、SNP7、SNP9位点为一组完美连锁不平衡位点( $r^2=1$ )，其余位点存在着不同程度的连锁不平衡，这也验证了表1和表2中这两组完全不平衡位点组内的基因型频率、基因频率、群体遗传参数完全相同的结果(表3)。由于存在以上两组连锁不平衡位点，SNP3可以完全代表SNP4和SNP5这两个位点，SNP2可以完全代表SNP7和SNP9这两个位点，因此在进行单倍型分析时，实验只分析SNP1，SNP2，SNP3，SNP6，SNP8这五个位点(表4)，剔除频率小于1%的单倍型，我们共发现6种单倍型，其中Hap1(30.4%)所占的比例最高，Hap6(4.8%)所占比例最低。

2.4 SNP位点基因型与生长性状及肌肉成分相关分析

统计分析中，因SNP1位点突变个体数少于样本数的5%，不具有代表性，因此舍弃此突变位点的关联分析，由于SNP3、SNP4、SNP5位点为一组完美连锁不平衡位点，SNP2、SNP7、SNP9位点为一组完美连锁不平衡位点，因此在进行生长性状及肌肉成分相关分析时，可以用SNP3来完全代表其余两个位点，SNP2来完全代

表3 9个位点连锁不平衡系数D'和r<sup>2</sup>值

**Tab. 3 The linkage disequilibrium coefficient  $D'$  and  $r^2$  value for 9 loci**

位点 SNPs site	SNP1	SNP2	SNP3	SNP4	SNP5	SNP6	SNP7	SNP8	SNP9
SNP1		0.999	1	1	1	0.026	0.999	0.906	0.999
SNP2	0.077		1	1	1	0.995	1	0.915	1
SNP3	0.102	0.757		1	1	0.998	1	0.934	1
SNP4	0.102	0.757	1		1	0.998	1	0.934	1
SNP5	0.102	0.757	1	1		0.998	1	0.934	1
SNP6	0.001	0.086	0.114	0.114	0.114		0.995	1	0.995
SNP7	0.077	1	0.757	0.757	0.757	0.086		0.915	1
SNP8	0.119	0.097	0.133	0.133	0.133	0.163	0.097		0.915
SNP9	0.077	1	0.757	0.757	0.757	0.086	1	0.097	

注：对角线上为 $D'$ ；对角线下方为 $r^2$   
Notes:  $D'$  is above the diagonal;  $r^2$  is below the diagonal

表另外两个位点, 因此实验最后只分析SNP2, SNP3, SNP6, SNP8位点的基因型与生长性状及肌肉成分的相关性。

4个位点的基因型在草鱼肥满度和粗蛋白水平上均无显著性差异, SNP2, SNP3位点基因型在草鱼体质量、体长、粗脂肪水平上存在显著性差异( $P<0.05$ ), SNP6, SNP8基因型在草鱼体质量、体长、粗脂肪水平上不存在显著性差异(表5)。多重对比发现, SNP2位点的纯合突变型(TT)个体的体质量、体长及粗脂肪均显著的高于野生型(GG)和杂合突变型(GT)( $P<0.05$ ), 而野生型(GG)和杂合突变型(GT)在体质量、体长及粗脂肪水平上无显著性差异; SNP3位点的纯合突变型

(GG)个体的体质量、体长及粗脂肪均显著的高于野生型(TT)和杂合突变型(TG)( $P<0.05$ ), 野生型(TT)和杂合突变型(TG)在体质量、体长及粗脂肪水平上无显著性差异。5个位点的单倍型组合与生长性状及肌肉成分相关分析发现, 在所建立的单倍型组合中, 剔除个体数小于样本数5%的组合, 共有6种组合参与统计并分析其与生长性状及肌肉成分的相关性, 其中Hap3/Hap3组合在体质量、体长及粗脂肪水平上显著高于其他组合( $P<0.05$ ), 在粗蛋白水平上显著高于Hap2/Hap3组合, 但与其他组合的数值差异并不显著(表6)。

### 3 讨论

本实验中, 通过对草鱼GH基因3'部分序列进行PCR扩增。测序结果发现9个SNP位点(表1), 9个变异位点中6个变异位点为转换, 3个变异位点为颠换, 其比值为2:1, 而在6个转换变异类型中4个为C↔T变异。有研究表明, 在SNP突变类型当中, 发生转换居多, 颠换较少, 发生转换的SNP与发生颠换的SNP之比大约为2:1, 而在转换中又以C↔T变异居多, 这与在本研究中发现的结果一致, 这可能是因为在CpG二核苷酸上的胞嘧啶残基大多数是甲基化的, 是自发地脱去氨基而形成胸腺嘧啶所导致<sup>[20]</sup>。

表4 GH基因部分SNPs位点单倍型分析

**Tab. 4 Haplotype analysis for GH gene partial SNPs**

单倍型 haplotype	SNP位点 locus					频率/% frequency
	SNP1	SNP2	SNP3	SNP6	SNP8	
Hap1	G	G	T	A	T	30.40
Hap2	G	G	T	G	C	20.50
Hap3	G	T	G	A	C	18.90
Hap4	A	G	T	A	C	17.90
Hap5	A	G	T	G	C	5.50
Hap6	G	G	G	A	C	4.80

表5 草鱼GH基因部分序列SNPs不同基因型与生长性状及肌肉成分相关分析

**Tab. 5 Association of GH gene partial sequence polymorphism with growth traits and muscle compositions in grass carp**

位点 SNPs site	基因型 genotype	样本数 number	体质量/g body weight	体长/cm standard length	肥满度/% condition factor	粗蛋白/% protein content	粗脂肪/% fat content
SNP2	GG	103	11.30±0.60 <sup>b</sup>	8.49±0.13 <sup>b</sup>	1.70±0.02	15.48±0.25	1.59±0.07 <sup>b</sup>
	TT	9	21.82±5.93 <sup>a</sup>	10.20±0.72 <sup>a</sup>	1.75±0.06	15.95±1.00	2.48±0.35 <sup>a</sup>
	GT	44	12.40±1.69 <sup>b</sup>	8.55±0.25 <sup>b</sup>	1.73±0.03	15.27±0.37	1.89±0.14 <sup>b</sup>
SNP3	GG	9	21.82±5.93 <sup>a</sup>	10.20±0.72 <sup>a</sup>	1.75±0.06	15.95±1.00	2.48±0.35 <sup>a</sup>
	TT	88	11.01±0.63 <sup>b</sup>	8.42±0.14 <sup>b</sup>	1.71±0.02	15.62±0.27	1.61±0.07 <sup>b</sup>
	TG	59	12.55±1.34 <sup>b</sup>	8.64±0.21 <sup>b</sup>	1.72±0.03	15.12±0.32	1.78±0.11 <sup>b</sup>
SNP6	AA	13	11.49±0.84	8.49±0.15	1.70±0.02	15.71±0.28	1.75±0.09
	AG	88	13.86±1.49	8.91±0.22	1.72±0.03	15.26±0.34	1.70±0.10
	GG	55	10.17±1.68	8.11±0.40	1.75±0.03	14.47±0.56	1.62±0.19
SNP8	CC	88	13.98±1.32	8.88±0.20	1.72±0.02	15.49±0.27	1.77±0.10
	TT	21	10.44±1.24	8.27±0.30	1.71±0.04	15.53±0.53	1.77±0.17
	CT	57	10.47±0.57	8.34±0.14	1.71±0.02	15.37±0.38	1.64±0.10

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 6 草鱼 *GH* 基因部分序列 SNPs 双倍型与生长性状及肌肉成分相关分析Tab. 6 Association of *GH* gene partial sequence diplotype with growth traits and muscle compositions in grass carp

双倍型 diplotype	体质量 body weight	体长 standard length	肥满度 condition factor	粗蛋白 protein content	粗脂肪 fat content
Hap1/Hap1	10.49±1.31 <sup>b</sup>	8.28±0.31 <sup>b</sup>	1.71±0.04	15.50±0.56 <sup>ab</sup>	1.80±0.18 <sup>b</sup>
Hap1/Hap3	9.96±1.00 <sup>b</sup>	8.15±0.29 <sup>b</sup>	1.78±0.03	16.02±0.50 <sup>ab</sup>	1.98±0.26 <sup>b</sup>
Hap1/Hap4	11.02±0.89 <sup>b</sup>	8.44±0.20 <sup>b</sup>	1.73±0.03	16.04±0.54 <sup>ab</sup>	1.54±0.12 <sup>b</sup>
Hap2/Hap3	15.97±4.02 <sup>b</sup>	9.16±0.52 <sup>b</sup>	1.70±0.04	14.56±0.47 <sup>b</sup>	1.92±0.24 <sup>b</sup>
Hap2/Hap4	11.08±1.96 <sup>b</sup>	8.51±0.44 <sup>b</sup>	1.64±0.04	15.40±0.49 <sup>ab</sup>	1.45±0.14 <sup>b</sup>
Hap3/Hap3	23.24±6.53 <sup>a</sup>	10.39±0.79 <sup>a</sup>	1.77±0.06	16.60±0.87 <sup>a</sup>	2.65±0.35 <sup>a</sup>

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  $P < 0.05$

本实验中的9个SNP位点经卡方检验结果表明，所有位点均未显著偏离Hardy-Weinberg平衡 ( $P > 0.05$ )，且所有位点的多态信息含量处于0.25到0.5之间，据Botstein划分的标准，当  $0.25 < PIC < 0.5$ ，该位点为中度多态位点<sup>[21]</sup>，该结果表明，所研究的草鱼群体未受到人工选择和其他因素的影响，且从群体遗传参数上可以看出该群体的遗传多样性较为丰富，如果这些变异位点能与生长性状及肌肉成分很好的关联在一起，那么将有可能用于分子标记辅助育种。

连锁不平衡的大体规律是，其程度会随着遗传距离的增加而下降，且只表现在较近距离的遗传标记间，不会延伸到很远，且通常用  $D'$  和  $r^2$  来度量连锁不平衡程度，其中  $r^2 = 1$  则视为两个位点处于完美连锁不平衡，此时只需任选其一便可了解其他位点的情况<sup>[22]</sup>，本研究中发现的9个变异位点距离较近，各个位点间存在着不同程度的连锁不平衡，其中SNP3、SNP4、SNP5为一组完美连锁不平衡 ( $r^2 = 1$ )，SNP2、SNP7、SNP9为一组完美连锁不平衡 ( $r^2 = 1$ )，有研究表明，当  $D' > 0.33$ ， $r^2 > 0.1$  则认为是有意义的连锁不平衡<sup>[23]</sup>，上述两组完美连锁不平衡的位点间确实存在着有意义的连锁不平衡，但与其他3个位点的连锁程度大多为没有意义的连锁，因此在进行分子标记辅助育种时，可将SNP3位点完全代表SNP4，SNP5这两个位点，将SNP2位点完全代表SNP7，SNP9这两个位点，进而方便育种工作的进行。

生长激素(GH)作为一种垂体分泌的单链多肽激素，具有调节糖类、脂类和蛋白质3大类物质代谢的重要作用<sup>[24]</sup>。倪静等<sup>[25]</sup>以100个牙鲆个

体为研究对象，扩增生长激素(*GH*)基因上的5个外显子序列，发现第4个外显子存在多态性，而且这种多态性与生长性状具有一定的连锁关系。在本研究中，通过单个位点关联分析，发现SNP2和SNP3这两个位点的纯合突变型在体质量、体长、粗脂肪水平上均不同程度的高于野生型和杂合突变型。在研究SNP位点与性状的相关性时，运用位点的双倍型组合进行性状之间的关联分析通常更能说明问题<sup>[26]</sup>，本研究在单位点关联分析的基础上进行了单倍型组合的关联分析，研究发现，Hap3/Hap3组合在体质量、体长、粗脂肪水平上显著高于其他组合 ( $P < 0.05$ )，而Hap3的碱基组成为GTGAC，是所有单倍型是中唯一同时含有SNP2，SNP3纯合突变的组合，符合单个位点分析时得出的结果，因此可以推断这两个位点的纯合突变为生长的有利突变，这种有利突变虽然隐藏在内含子中，不直接通过转录翻译表达出来，但隐藏在内含子中的这种有利突变可能在转录和mRNA剪切时发挥着重要的作用<sup>[20]</sup>，而且在NCBI数据库中记录着草鱼生长激素(*GH*)基因的两种转录本(JN711124；AY616661)，因此不排除生长激素(*GH*)基因拥有多种不同转录本的可能性，可能就此影响了不同个体生长激素的表达，进而影响了不同个体草鱼的生长性状和肌肉成分，这也就解释了SNP2和SNP3位点的纯合突变型和Hap3/Hap3组合在体质量、体长、粗脂肪水平上非常显著，数值几近两倍的高于野生型和杂合突变型或其他组合的现象了。在本研究中，单位点分析时并没有发现其存在着粗蛋白和肥满度水平之间的显著性差异，但大致的规律为存在有利基因型

的个体在粗蛋白和肥满度水平上高于其他个体, 推测其原因可能为样本数目的不足导致其结果间差异不大。综合上述结果, 研究可以认为SNP2, SNP3位点的多态性对草鱼早期生长性状及肌肉成分存在显著性影响( $P < 0.05$ ), 可作为草鱼早期生长及肌肉性状辅助选择的分子标记, 并且为进一步对相关变异位点的功能验证奠定研究基础。

#### 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] FAO. Fishery and aquaculture statistics [R]. FAO Fisheries & Aquaculture Report. Rome: FAO, 2014.
- [3] 张晓萌, 马普, 王洪迪, 等. SNPs在水产动物中的研究进展[J]. 生物技术通报, 2013(8): 7-11.
- Zhang X M, Ma P, Wang H D, et al. Progresses of SNPs studies in aquaculture animals[J]. Biotechnology Bulletin, 2013(8): 7-11(in Chinese).
- [4] 谭新, 童金苟. SNPs及其在水产动物遗传学与育种学研究中的应用[J]. 水生生物学报, 2011, 35(2): 348-354.
- Tan X, Tong J G. SNPs and their applications in studies on genetics and breeding of aquaculture animals[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2011, 35(2): 348-354(in Chinese).
- [5] Chen T T, Marsh A, Shambloot M, et al. 6 structure and evolution of fish growth hormone and insulinlike growth factor genes[J]. Fish Physiology, 1994, 13: 179-209.
- [6] Zeng C, Liu X L, Wang W M, et al. Characterization of *GHRs*, *IGFs* and *MSTNs*, and analysis of their expression relationships in blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*[J]. Gene, 2014, 535(2): 239-249.
- [7] Cavari B, Funkenstein B, Chen T T, et al. Effect of growth hormone on the growth rate of the gilthead seabream (*Sparus aurata*), and use of different constructs for the production of transgenic fish[J]. Aquaculture, 1993, 111(1-4): 189-197.
- [8] 赵君丽, 何峰, 温海深, 等. 雄性半滑舌鳎GH基因多态性与激素水平及生长性状相关性分析[J]. 中国海洋大学学报, 2014, 44(12): 35-40.
- Zhao J L, He F, Wen H S, et al. Correlation between the polymorphism of *GH* gene of male half-smooth tongue sole and their growth traits and hormone content[J]. Periodical of Ocean University of China, 2014, 44(12): 35-40(in Chinese).
- [9] 倪静, 尤锋, 刘思思, 等. 牙鲆GH基因第1外显子区微卫星标记与幼鱼生长性状的相关分析[J]. 动物学杂志, 2011, 46(5): 108-113.
- Ni J, You F, Liu S S, et al. Correlation analysis of microsatellite DNA Marker in the *GH* exon 1 region with growth traits of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Chinese Journal of Zoology, 2011, 46(5): 108-113(in Chinese).
- [10] 刘峰, 鲁双庆, 刘臻, 等. 三种鳊鱼(*Siniperca*)生长激素基因内含子多态性的比较研究[J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(4): 470-478.
- Liu F, Lu S Q, Liu Z, et al. The *GH* gene diversity among three *Siniperca* fish species[J]. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2009, 40(4): 470-478(in Chinese).
- [11] 莫赛军, 宋平, 罗大极, 等. 鲫鱼生长激素 I 基因内含子2的多态性分析[J]. 遗传学报, 2004, 31(6): 582-590.
- Mo S J, Song P, Luo D J, et al. Polymorphism in intron 2 of crucian carp *GH I* gene[J]. Acta Genetica Sinica, 2004, 31(6): 582-590(in Chinese).
- [12] 刘小献, 白俊杰, 于凌云, 等. 草鱼载脂蛋白A- I- I基因3'非编码区SNPs筛选及其与生长性状的关联分析[J]. 大连海洋大学学报, 2012, 27(1): 12-17.
- Liu X X, Bai J J, Yu L Y, et al. SNPs screening of 3'UTR in Apoprotein A-I-I gene and its association with growth traits in grass carp[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2012, 27(1): 12-17(in Chinese).
- [13] 褚敏, 阎萍, 梁春年, 等. 大通牦牛MyoDI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.
- Chu M, Yan P, Liang C N, et al. Association between polymorphism of *MyoDI* gene and growth traits in yak[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2012, 39(2): 111-113(in Chinese).
- [14] 傅建军, 王荣泉, 沈玉帮, 等. 我国草鱼野生群体D-Loop序列遗传变异分析[J]. 水生生物学报, 2015, 39(2): 349-357.
- Fu J J, Wang R Q, Shen Y B, et al. Genetic variation analysis based on *D-Loop* sequences of wild populations of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) in China[J].

- Acta Hydrobiologica Sinica, 2015, 39(2): 349-357(in Chinese).
- [15] 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).
- [16] Rivero E R C, Neves A C, Silva-Valenzuela 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.
- [17] Hall T A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT[J]. Nucleic Acids Symposium Series, 1999, 41: 95-98.
- [18] Kalinowski S T, Taper M L, Marshall T C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment[J]. Molecular Ecology, 2007, 16(5): 1099-1106.
- [19] Coakes S J, Steed L. SPSS Version 14.0 for Windows: Analysis Without Anguish Using SPSS [M]. Milton: John Wiley & Sons, 2007.
- [20] Brookes A J. The essence of SNPs[J]. Gene, 1999, 234(2): 177-186.
- [21] Botstein D, White R L, Skolnick M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. American Journal of Human Genetics, 1980, 32(3): 314-331.
- [22] 周靖晶. 中国人群年龄相关性黄斑变性与基因及环境因素的关联研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2013.  
Zhou J J. Association of genetic and environmental factors with age-related macular degeneration in a Chinese population [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2013 (in Chinese).
- [23] Kruglyak L. Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes[J]. Nature Genetics, 1999, 22(2): 139-144.
- [24] 宋成义, 经荣斌. 畜禽GH基因多态性与生产性能相关研究进展[J]. 国外畜牧科技, 2000, 27(2): 25-27.  
Song C Y, Jing R B. Research on the relation between polymorphism in the stock and poultry GH gene and production performance[J]. Animal Science Abroad, 2000, 27(2): 25-27(in Chinese).
- [25] 倪静, 尤锋, 张培军, 等. 牙鲈GH基因外显子多态性与生长性状关系的初步研究[J]. 高技术通讯, 2006, 16(3): 307-312.  
Ning J, You F, Zhang P J, *et al.* Primary study on PCR-SSCP analysis of GH gene's exon polymorphism in *Paralichthys olivaceus* and its association with growth traits among a hatchery stock[J]. Chinese High Technology Letters, 2006, 16(3): 307-312(in Chinese).
- [26] Drysdale C M, Mcgraw D W, Stack C B, *et al.* Complex promoter and coding region  $\beta_2$ -adrenergic receptor haplotypes alter receptor expression and predict *in vivo* responsiveness[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(19): 10483-10488.



## Polymorphisms of the *GH* gene 3' partial sequence and their associations with growth traits and muscle composition in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)

WANG Shentong, ZHANG Meng, SHEN Yubang, LI Jiale\*

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

**Abstract:** In order to comprehend whether the polymorphism of grass carp *GH* gene was associated with growth traits and muscle compositions, 156 individuals from Yangtze River were used in this study. Nine polymorphic loci were found in the *GH* gene 3' partial sequence: G2825AG2914TT2966GA3002TT3022CA3301GC3463TC3547TC3620T, which were named SNP1-SNP9 respectively. Nine loci were not significantly deviated from Hardy-Weinberg equilibrium based on Chi-square test ( $P>0.05$ ), and performed moderate polymorphism ( $0.25<PIC<0.5$ ). The results of linkage disequilibrium showed that SNP3, SNP4, SNP5 were a set of completed linkage disequilibrium ( $r^2=1$ ) and SNP2, SNP7, SNP9 were a set of completed linkage disequilibrium ( $r^2=1$ ). Haplotype analysis for five loci in *GH* 3'partial sequence revealed 6 haplotypes, which Hap1(30.4%) had the greatest proportion, Hap6(4.8%) had the lowest proportion. A general linear model and multiple comparisons were used to analyze the correlation between those single nucleotide polymorphisms (SNPs) and grass carp traits. The results showed that the body weight, body length and fat content of individuals with the homozygous mutant genotype at SNP2 and SNP3 were significantly higher than wide-type and heterozygous mutant genotype. Similar results were found in diplotype combinations analysis. The body weight, body length and fat content of combination with heterozygous mutant genotype at SNP2 and SNP3 were significantly higher than other combinations. The results showed that the polymorphism of SNP2 and SNP3 in grass carp *GH* gene had a significant correlation with growth traits and muscle composition ( $P<0.05$ ), and it might have utility as markers for practical breeding programs for growth traits and muscle composition in grass carp. Meanwhile, we have laid a foundation for further research on the functional verification of the relevant mutation sites.

**Key words:** *Ctenopharyngodon idella*; *GH*; polymorphism; growth trait; muscle composition

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

**Funding projects:** China Agriculture Research System (CARS-46-04); Shanghai Engineering and Technology Center for Promoting Ability (16DZ2281200); University-Industry Cooperation Project of Tongwei (TW2014F003)