

doi: 10.7541/2018.037

中华绒螯蟹 *MSTN* 基因 SNPs 多态性及与生长性状的关联分析

陈义培 吴 廉 陈晓雯 岳武成 黄 姝 王 军 王成辉

(上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心, 上海水产养殖工程技术研究中心,
农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306)

摘要: 为研究中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)肌肉生长抑制素基因(*myostatin*, *MSTN*)的多态性及其与生长性状的相关性, 对中华绒螯蟹3个群体(育种群体、大赛群体、野生群体)共321个个体 *MSTN* 基因的多态性进行筛选, 发现该基因的第1外显子存在3个多态性 SNP 位点(S1: C714T; S2: G729A; S3: G753T), 均为处于 Hardy-Weinberg 平衡($P > 0.05$)的中、高度多态性位点。利用一般线性模型分析3个位点及其基因型组合与生长性状的相关性, 发现S1位点对中华绒螯蟹的体重和壳长等生长性状有显著影响($P \leq 0.05$), 而其余2个位点与生长性状无显著关联性。结果表明S1位点的TT基因型对中华绒螯蟹的生长最为有利, 可作为分子标记辅助育种的候选标记。

关键词: 中华绒螯蟹; *MSTN*; SNP; 生长性状; 关联分析

中图分类号: S917 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2018)02-0293-07

肌肉生长抑制素(Myostatin, *MSTN*), 又称生长分化因子8(Growth differentiation factor-8, GDF-8), 是生物体内广泛表达的一种糖蛋白, 对肌肉生长发育起着负向调控^[1]。该基因自从被发现后就引起了研究者的广泛兴趣, 生产出了“双肌牛”、“超级鼠”^[2, 3]。在家畜的研究中发现, *MSTN* 基因多态性与猪的生长和肉质性状等存在关联^[4-6]; 该基因的多态性与南阳牛的体高、胸围等性状也存在显著相关性^[7]。随后该基因在水产动物的研究也越来越多, 包括生产出身体增大的模式鱼类斑马鱼^[8]和青鳉^[9], 以及非模式鱼类的标记与性状关联分析等^[10]。在水生甲壳动物, *MSTN* 基因的研究主要集中在基因的克隆与表达方面^[11-14], 而与生长性状的关联性研究很少, 如Zhou等^[15]报道了墨吉明对虾 *MSTN* 基因的 SNP 与体长、体质量的显著相关性。当前, *MSTN* 基因已应用于育种领域, 培育出了躯体增大, 肌肉量增加的陆生和水生动物^[16-18]。深入研究水生甲壳动物中 *MSTN* 基因的结构特性对丰富甲壳动

物产业育种手段具有指导意义。

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)作为一种具有较高经济价值的水生甲壳动物, 在整个生长过程中需要经历18—21次蜕壳。中华绒螯蟹在蜕壳后首先是吸收水分, 然后逐渐被肌肉组织所代替^[19]。当肌肉生长发育至一定程度时, 进行下一次蜕壳。我们推测, 肌肉的生长发育对于刺激中华绒螯蟹的蜕壳可能发挥了较为重要的作用。因而, 开展中华绒螯蟹 *MSTN* 基因的研究, 不仅对甲壳动物的蜕壳生长研究有较好的科学价值, 而且对于甲壳动物育种(如分子育种)也有较好的指导意义。

单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphisms, SNP)是基因组上单个核苷酸产生的碱基变异, 其具有分布数量多、多态性丰富等特点, 是继微卫星分子标记之后又一重要的分子遗传标记。该标记已广泛应用于基因定位、遗传多样性研究和动植物育种等领域^[20-24]。本研究拟对不同来源具有不同遗传背景的中华绒螯蟹 *MSTN* 基因的

收稿日期: 2017-03-14; 修订日期: 2017-05-27

基金项目: 上海市中华绒螯蟹产业技术体系项目(沪农科(产)字2017第4号); 上海市科技兴农重点攻关项目(2017-02-08-00-10-F00076); 上海市科委项目(16391953000); 上海市工程技术中心建设项目(13DZ2251800)资助 [Supported by Shanghai Chinese Mitten Crab Industry Technology System Construction Project (Shanghai Agricultural Science Production 2017-4); Shanghai Science and Technology Xingnong Key Project (2017-02-08-00-10-F00076); Shanghai Science and Technology Commission Project (16391953000); Shanghai Engineering Technology Center Construction Project (13DZ2251800)]

作者简介: 陈义培(1991—), 女, 江苏南通人; 硕士研究生; 研究方向为水产动物种质资源与种苗工程。E-mail: 727352922@qq.com

通信作者: 王成辉(1972—), 男, 湖南人; 博士, 教授。E-mail: wangch@shou.edu.cn

SNP进行分型,探讨不同基因型与生长性状(体重、壳长)的相关性,以期为我们中华绒螯蟹的良种选育或分子育种提供相关候选标记。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验材料包括3大类样本,第一类是本实验室的中华绒螯蟹育种群体(刚完成生殖蜕壳的A、B选育系及其正反杂交子一代,体重规格86.2—194.9 g,数量120只),简称育种群体;第二类是选自2010、2012、2014三个年度的全国河蟹大赛参赛样本,体重规格207.0—611.3 g,数量124只,简称大赛群体;第三类是来自长江、黄河等水系的野生群体,体重规格49.0—260.5 g,数量77只,简称野生群体。每个样本用SCOUT SE型电子天平(精确0.1 g)称量表面净水的蟹体重,用游标卡尺(精确0.01 mm)测量每只样本的壳长。性状测量后,剪取第二步足长节的肌肉用无水乙醇浸泡,常温保存,用于提取DNA。

1.2 基因组DNA的提取及检测

采用饱和氯化钠法提取肌肉中的DNA^[25]。提取的DNA利用1.5%琼脂糖凝胶电泳进行检测,并用核酸蛋白仪检测仪(Bio-Rad Smartspic plus)测定DNA纯度,−20℃保存备用。

1.3 *MSTN*基因的PCR扩增

根据中华绒螯蟹*MSTN*基因序列^[26](GenBank: EU650662.1),采用Primer Premier 5.0^[27]软件进行引物设计(F: 5'-GCACGGATGTCCTCTACTT-3', R: 5'-GGGTCTGGCTACCTTGAA-3'),然后交上海生工生物工程有限公司合成。PCR反应总体积为50 μL: 包括25 μL 2×*Taq* PCR MasterMix (天根生化科技有限公司),正反引物(0.2 μmol/L)各2.5 μL, DNA模板2 μL, ddH₂O 18 μL。反应程序: 94℃预变性3min、94℃变性30s、56.5℃退火30s、72℃延伸60s, 35个循环,最后72℃再延伸5min, 4℃保存。PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,检测有单一条带的PCR产物送上海生工生物工程技术有限公司进行测序。测序结果经软件BioEdit进行比对后发现,该引物扩增产物获得3个SNP位点,应用此引物对所有样本进行PCR扩增并进行测序。

1.4 数据统计分析

首先采用Popgene 32(version 3.2)^[28]软件计算各类样本的有效等位基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)和多态信息含量(PIC)等遗传参数,了解SNP位点在群体中的分布特性。然后应

用SPSS20.0^[29]软件的一般线性模型(General linear model, GLM)进行SNP位点与生长性状(体重、壳长)的关联性分析,所构建的线性模型如下:

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

式中, Y_{ij} 为个体生长性状表型值; μ 为群体均值; S_i 为SNP标记的基因型效应, e_{ij} 为随机残差。

2 结果

2.1 *MSTN*基因SNP位点分型

应用该引物对321个中华绒螯蟹的*MSTN*基因进行扩增、测序,经BioEdit编辑后与NCBI斑马鱼该基因序列比对发现,扩增到的序列为斑马鱼第3外显子区域。进一步分析序列的核苷酸变异后发现3个SNP(起始密码子为起点, C714T、G729A、G753T)突变位点,均为同义突变,分别命名为S1、S2、S3。通过读取突变位点的测序峰值进行等位基因的纯杂合分型, TC基因型峰值图为T/C套峰, GA基因型峰值图为G/A套峰, GT基因型峰值图为G/T套峰; 峰值图为单峰的均为对应基因型的纯合子。

2.2 *MSTN*基因SNP位点的多态性分析

本研究3个位点的观测杂合度与期望杂合度基本相等,经 χ^2 检验,均处于Hardy-Weinberg平衡($P>0.05$),具体遗传变异情况如表1所示。根据中度多态性原则($0.25<PIC<0.50$),3个群体中3个SNP位点表现为中、高度多态性($PIC>0.25$)。

从3个SNP位点在3个群体中的基因型频率和基因频率(表2)看, TT基因型在3个群体的S1位点中均占据优势地位,等位基因T是为优势基因;同样, AA为S2位点的优势基因型且等位基因A的频率高于G, TT为S3位点的优势基因型且等位基因T占优势地位。由此我们推测S1、S2、S3三个突变位点的优势基因型和优势基因分别为TT、AA、TT和T、A、T。

2.3 *MSTN*基因SNP位点与生长性状的关联分析

对3个SNP位点共9种基因型分别与中华绒螯蟹的生长性状(体重、壳长)进行关联分析发现(表3), S1位点的生长性状在3个群体和总群体中均存在一致性的显著差异($P<0.05$),即TT基因型的体重、壳长显著大于TC、CC基因型,而S2、S3这两个SNP位点均没有表现出这种规律性。将3个位点的优势基因型S1(TT₁)、S2(AA₂)、S3(TT₃)分别两两组合后发现(表4), AA₂×TT₃组合的生长效果最差,显著低于其他基因型组合TT₁×AA₂和TT₁×TT₃($P<0.05$)。3种基因型组合TT₁×AA₂×TT₃的平均生

表 1 中华绒螯蟹三群体*MSTN*基因3个SNP位点的遗传参数统计Tab. 1 Genetic parameters of three SNP sites in the *MSTN* gene from three populations of Chinese mitten crab

群体 Population	SNP位点 Locus	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	Hardy-Weinberg平衡 P_{HWE}
育种群体 Breeding population	S1	0.4583	0.4752	1.976	0.372	0.4563
	S2	0.5001	0.4104	1.683	0.3236	0.3346
	S3	0.4917	0.4325	1.753	0.3374	0.5526
大赛群体 Contest population	S1	0.4424	0.3942	1.641	0.5794	0.8712
	S2	0.3876	0.3578	1.5585	0.5439	0.4589
	S3	0.4355	0.412	1.7106	0.606	1.0673
野生群体 Wild population	S1	0.3618	0.4633	1.8345	0.6254	0.9548
	S2	0.432	0.3973	1.6984	0.584	0.4312
	S3	0.4198	0.4099	1.8542	0.433	0.8738
总群体 Total population	S1	0.4175	0.4031	1.7634	0.5433	0.3427
	S2	0.4509	0.3988	1.6128	0.5347	0.0762
	S3	0.4432	0.4156	1.7893	0.4723	0.5692

表 2 中华绒螯蟹三个群体*MSTN*基因SNP位点的等位基因及基因型频率Tab. 2 Genotype and allele frequency of three SNP sites in the *MSTN* gene from the three populations of Chinese mitten crab

群体 Populations	位点 Locus	样品数 Number	基因型频率 Genotype frequency			等位基因频率 Allele frequency		χ^2 检验 χ^2 -testing	P value
育种群体 Breeding population	S1(T/C)	120	TT/0.33($n=39$)	TC/0.46($n=55$)	CC/0.22($n=26$)	T/0.55	C/0.45	0.6298	0.4474
	S2(A/G)	120	AA/0.47($n=56$)	AG/0.50($n=60$)	GG/0.03($n=4$)	A/0.72	G/0.28	2.4139	0.0713
	S3(T/G)	120	TT/0.44($n=53$)	TG/0.49($n=59$)	GG/0.07($n=8$)	T/0.69	G/0.31	2.4967	0.1141
大赛群体 Contest population	S1(T/C)	124	TT/0.52($n=64$)	TC/0.44($n=54$)	CC/0.04($n=6$)	T/0.73	C/0.27	0.7760	0.2008
	S2(A/G)	124	AA/0.57($n=71$)	AG/0.39($n=48$)	GG/0.04($n=5$)	A/0.77	G/0.23	0.7979	0.3717
	S3(T/G)	124	TT/0.48($n=59$)	TG/0.45($n=56$)	GG/0.07($n=9$)	T/0.70	G/0.30	0.7660	0.3815
野生群体 Wild population	S1(T/C)	77	TT/0.49($n=38$)	TC/0.44($n=34$)	CC/0.06($n=5$)	T/0.71	C/0.29	0.5146	0.4728
	S2(A/G)	77	AA/0.55($n=42$)	AG/0.40($n=31$)	GG/0.06($n=4$)	A/0.75	G/0.25	0.3197	0.5718
	S3(T/G)	77	TT/0.52($n=40$)	TG/0.36($n=28$)	GG/0.12($n=9$)	T/0.70	G/0.30	1.3426	0.2466
总群体 Total population	S1(T/C)	321	TT/0.44($n=141$)	TC/0.45($n=143$)	CC/0.12($n=37$)	T/0.66	C/0.34	0.5066	0.9351
	S2(A/G)	321	AA/0.53($n=169$)	AG/0.43($n=139$)	GG/0.04($n=13$)	A/0.74	G/0.26	2.7492	0.0865
	S3(T/G)	321	TT/0.47($n=152$)	TG/0.45($n=143$)	GG/0.08($n=26$)	T/0.70	G/0.30	0.9100	0.3401

表 3 中华绒螯蟹三群体*MSTN*基因的SNP位点基因型与生长性状的关联分析Tab. 3 The association of SNP polymorphisms in *MSTN* gene with growth traits from three populations of Chinese mitten crab

位点 Locus	基因型 Genotype	育种群体 Breeding population		大赛群体 Contest population		野生群体 Wild population		总群体 Total population	
		BW (g)	CL (mm)	BW (g)	CL (mm)	BW (g)	CL (mm)	BW (g)	CL (mm)
SNP1	TT	156.50±42.31 ^a	62.45±4.66 ^a	366.35±62.67 ^a	76.16±6.41 ^a	153.75±45.84 ^a	62.57±6.32 ^a	223.78±92.29 ^a	68.41±8.17 ^a
	TC	118.74±50.61 ^{bc}	56.95±7.53 ^{bc}	311.79±78.13 ^{bc}	75.15±4.25 ^{ac}	160.00±49.15 ^{ab}	62.28±6.48 ^{ab}	200.60±100.54 ^{ab}	65.40±10.92 ^{ab}
	CC	88.50±16.30 ^c	52.83±3.48 ^c	302.40±39.32 ^c	66.15±3.15 ^c	113.29±60.02 ^c	55.77±8.54 ^c	124.69±60.95 ^c	56.70±9.16 ^c
SNP2	AA	133.18±50.27 ^{ab}	59.19±6.82 ^{ab}	307.06±57.23 ^{ab}	75.32±4.00 ^{ab}	155.90±46.35 ^{ab}	62.85±6.53 ^{ab}	211.59±96.79 ^{ab}	66.85±9.28 ^{ab}
	AG	117.50±48.01 ^{bc}	56.71±6.88 ^{bc}	312.38±85.03 ^{ac}	76.51±6.71 ^{ac}	147.05±52.53 ^{bc}	60.50±6.78 ^{bc}	189.55±96.93 ^{bc}	64.23±11.09 ^{bc}
	GG	106.78±41.00 ^{bc}	56.11±7.64 ^{bc}	292.40±46.01 ^{bc}	75.20±5.10 ^{bc}	144.02±75.05 ^{bc}	59.07±10.48 ^{bc}	183.55±97.79 ^{bc}	63.66±11.49 ^{bc}
SNP3	TT	133.98±47.41 ^a	59.47±6.38 ^{ab}	305.93±56.38 ^{ab}	75.56±3.96 ^{ab}	151.03±45.24 ^{ab}	61.64±6.38 ^{ab}	205.21±95.11 ^{ab}	66.29±9.28 ^{ab}
	TG	118.20±50.86 ^{ab}	56.59±7.20 ^{bc}	312.56±80.79 ^{ac}	76.19±6.50 ^{bc}	147.33±58.46 ^{bc}	60.93±7.80 ^{bc}	198.93±91.47 ^{bc}	65.03±11.40 ^{bc}
	GG	107.58±41.56 ^{bc}	56.35±6.97 ^{bc}	300.50±65.66 ^{bc}	74.57±4.05 ^{ac}	160.04±50.50 ^{ac}	62.75±7.06 ^{ac}	186.43±90.51 ^{ac}	64.47±9.26 ^{ac}

注: BW. 体重(g); CL. 壳长(mm); 表中值为平均值±标准误; 同列不同小写字母表示差异显著($P \leq 0.05$, 相同字母差异不显著($P > 0.05$); 下同

Note: BW. Body weight; CL. Carapace length; values are presented as means ± SE; the different capital letters in the same column indicate significant difference ($P \leq 0.05$ and same letters show non-significant difference ($P > 0.05$); the same applies below

表 4 中华绒螯蟹三群体 *MSTN* 基因不同 SNP 位点组合的生长性状比较Tab. 4 The growth traits of different SNP genotype combinations in *MSTN* gene from the three populations of Chinese mitten crab

群体 Populations	性状 Traits	基因型 Genotype			
		TT ₁ ×AA ₂	TT ₁ ×TT ₃	AA ₂ ×TT ₃	TT ₁ ×AA ₂ ×TT ₃
育种群体 Breeding population	体重 BW (g)	162.97±41.69 ^a	164.50±33.48 ^a	136.93±44.02 ^b	169.55±31.44 ^a
	壳长 CL (mm)	63.09±4.31 ^a	63.92±2.39 ^a	60.15±5.62 ^b	64.53±2.24 ^a
大赛群体 Contest population	体重 BW (g)	310.39±64.44 ^a	306.31±64.00 ^a	310.14±58.90 ^a	310.89±67.46 ^a
	壳长 CL (mm)	75.53±4.54 ^a	75.76±4.60 ^a	75.60±4.26 ^a	75.77±4.87 ^a
野生群体 Wild population	体重 BW (g)	157.70±44.37 ^a	147.50±50.54 ^a	123.91±43.90 ^b	159.59±45.91 ^a
	壳长 CL (mm)	63.51±6.05 ^a	63.61±6.92 ^a	60.04±6.08 ^b	63.31±6.39 ^a
总群体 Total population	体重 BW (g)	229.49±92.20 ^a	228.11±94.08 ^a	209.97±96.70 ^b	233.82±95.24 ^a
	壳长 CL (mm)	68.86±7.84 ^a	68.06±8.62 ^a	65.71±8.83 ^b	69.48±8.29 ^a

长规格虽最大, 但与基因型组合 TT₁×AA₂ 和 TT₁×TT₃ 没有显著的生长差异 ($P>0.05$)。

3 讨论

MSTN 基因作为肌肉生长发育的直接调控基因, 其 SNP 特性自发现以来, 在陆生肉用动物中的研究越来越丰富。如不同研究者在多种陆生动物(猪、牛、鸡等)^[30–36] 中均发现了该基因的 SNP 特性, 并通过大量数据阐明了该基因作为肉用动物分子辅助标记育种方式的可行性。近年来该基因在水生动物中的研究也越来越普遍, 在鱼类(草鱼 *Ctenopharyngodon idellu*、大黄鱼 *Pseudosciaena crocea*、大口黑鲈 *Micropterus salmoides*、尼罗罗非鱼 *Oreochromis niloticus*)^[37–39] 以及软体动物和贝类(海参 *Apostichopus japonicus*、海湾扇贝 *Argopecten irradians*、蛭子 *Sinonovacula constricta*)^[40–41, 43, 47] 中的研究也越来越多。本实验通过直接测序对中华绒螯蟹的 *MSTN* 基因的 SNP 位点进行分型, 发现了第一外显子上 3 个位点的碱基突变(C714T、G729A、G753T), 但均属于同义突变。这些位点的 SNP 特性和上述水产动物有所不同, 大黄鱼中是第一外显子发生多处非同义突变, 大口黑鲈的突变位于启动子区域, 而海参的突变位点又在 *MSTN* 的 5' 非编码区和编码区均有分布^[37–39]。虽然不同水生动物的 *MSTN* 基因的 SNP 特性具有差异, 但其都和生长性状具有相关性, 这说明 *MSTN* 在陆生动物和水生动物的分子辅助标记育种中具有普遍性。

目前 *MSTN* 在水生甲壳动物(虾、蟹)中的研究也逐渐深入, Zhou 等^[15] 对墨吉明对虾的 *MSTN* 基因进行了研究, 发现 3 个同义突变和 8 个非同义突变, 并分析得出其和生长性状的显著相关性。Covi 等^[44] 在黑背陆蟹的大螯肌肉组织中发现, *MSTN* 的高表达和骨骼肌中的蛋白合成量具有显著负相关

性。以上研究说明该基因在虾蟹中具有和哺乳动物相同或者相似的功能, 对肌肉的生长发育具有负调控作用。然而也有部分学者通过基因功能研究等手段发现该基因和陆生动物以及其他水生动物的不同特性, 如 De Santis 等^[45] 以及 Lee 等^[46] 分别对斑节对虾和凡纳滨对虾的 *MSTN* 进行了研究, 发现敲降该基因会显著降低实验组的生长速率, 认为 *MSTN* 在对虾的生长发育过程中可能为有别于其他动物的正调控因子。虽然不同学者对虾蟹类 *MSTN* 基因的研究结果不尽相同, 但是作为水生甲壳动物的代表性动物(虾蟹)其生长特性本身就和其他动物有所差异。甲壳类的生长发育和蜕壳活动是相互耦合的^[44], 虾蟹类 *MSTN* 的功能可能和蜕壳活动相互联系, *MSTN* 可能受到蜕皮激素的转录调控^[48]。因此, 在甲壳动物中, *MSTN* 基因的多态性作为生长性状的分子标记辅助选育是可行的, 但是该基因在甲壳动物中对肌肉发育的具体调控功能还需要结合甲壳动物的生长发育特点进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Jiang Y L, Lian Z X, Li N, et al. Myostatin: A negative regulator of skeletal muscle mass [J]. *Hereditas*, 2000, **22**(2): 119—121 [姜运良, 连正兴, 李宁, 等. 肌肉生长抑制素基因的研究进展. 遗传, 2000, **22**(2): 119—121]
- [2] McPherron A C, Lee S J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997, **94**(23): 12457—12461
- [3] 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
- [4] Li S H, Xiong Y, Zheng R. Polymorphism of porcine myostatin gene [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2002, **29**(4): 326—331 [李绍华, 熊远, 郑嵘. 猪 *MSTN* 基因多态性及其 SNPs 的研究. 遗传学报, 2002, **29**(4): 326—331]

- [5] Chen L. Polymorphism of *MSTN* gene and *MEF2D* gene in pigs and its relationship with carcass and meat quality traits [D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University. 2005 [陈磊. 猪MSTN基因和MEF2D基因的多态性及其与胴体和肉质性状间关联性研究. 雅安: 四川农业大学. 2005]
- [6] Qian L, Tang M, Yang J, *et al.* Targeted mutations in myostatin by zinc-finger nucleases result in double-muscling phenotype in Meishan pigs [J]. *Scientific Reports*, 2015, **5**: 1443
- [7] Zhang R F, Chen H, Lei C Z, *et al.* Association between polymorphisms of MSTN and MYF5 genes and growth traits in three Chinese cattle breeds [J]. *Asian Australasian Journal of Animal Science*, 2007, **20**(12): 1798
- [8] Acosta J, Carpio Y, Borroto I, *et al.* Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype [J]. *Journal of Biotechnology*, 2005, **119**(4): 324—331
- [9] Chiang Y A, Kinoshita M, Maekawa S, *et al.* TALENs-mediated gene disruption of myostatin produces a larger phenotype of medaka with an apparently compromised immune system [J]. *Fish & Shell fish Immunology*, 2015, **48**: 212—220
- [10] 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*, 2012, **34**(1): 72—78 [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. 遗传, 2012, **34**(1): 72—78]
- [11] MacLea K S, Covi J A, Kim H W, *et al.* Myostatin from the American lobster, *Homarus americanus*: cloning and effects of molting on expression in skeletal muscles [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2010, **157**(4): 328—337
- [12] Covi J A, Bader B D, Chang E S, *et al.* Molt cycle regulation of protein synthesis in skeletal muscle of the blackback land crab, *Gecarcinus lateralis*, and the differential expression of a myostatin-like factor during atrophy induced by molting or unweighting [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2010, **213**(1): 172—183
- [13] Wang W, Wu X G, Xu L, *et al.* Expression analysis of Myostatin during molting cycle in *Eriocheir sinensis* [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2015, **24**(5): 662—667 [王伟, 吴旭干, 徐蕾, 等. 中华绒螯蟹Myostatin基因在蜕皮过程中的表达分析. 上海海洋大学学报, 2015, **24**(5): 662—667]
- [14] Xue B, Zhang P, Li Z H, *et al.* Expression profiles of Myostatin (MSTN) gene in different tissues and at different post-molt times in *Exopalaemon carinicauda* [J]. *Journal of Huaihai Institute of Technology (Natural Science Edition)*, 2016, **25**(4): 66—70 [薛蓓, 张培, 李志辉, 等. 脊尾白虾MSTN基因组织及不同蜕皮后时间点的表达特征. 淮海工学院学报, 2016, **25**(4): 66—70]
- [15] Zhou R Q, Zhou T T, Yang S P *et al.* Characterization of a molt-related myostatin gene (FmMstn) from the banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2017, **248**: 55—68
- [16] Hu S, Ni W, Sai W, *et al.* Knockdown of myostatin expression by RNAi enhances muscle growth in transgenic sheep [J]. *PloS One*, 2013, **8**(3): 1—6
- [17] Luo J, Song Z, Yu S, *et al.* Efficient generation of myostatin (MSTN) biallelic mutations in cattle using zinc finger nucleases [J]. *PloS One*, 2014, **9**(4): 1—10
- [18] Guo L, Xia J, Li M, *et al.* Targeted Sequencing of Myogenic regulatory factors and myostatins reveals an association between MSTN-1 and interorbital distance in Orange-spotted Grouper, *Epinephelus coioides* (Hamilton, 1822) [J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2016, **47**(5): 741—753
- [19] Wang W, Wang C H, Ma X Z. Ecological Culture of Crab [M]. Beijing: China Agriculture Press. 2013, 52—55 [王武, 王成辉, 马旭洲. 河蟹生态养殖. 北京: 中国农业出版社. 2013, 52—55]
- [20] Tang L Q, Xiao C L, Wang W P. Research and application progress of SNP markers [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, **28**(12): 154—158 [唐立群, 肖层林, 王伟平. SNP分子标记的研究及其应用进展. 中国农学通报, 2012, **28**(12): 154—158]
- [21] Hill E W, McGivney B A, Gu J, *et al.* A genome-wide SNP-association study confirms a sequence variant (g. 66493737C>T) in the equine myostatin (MSTN) gene as the most powerful predictor of optimum racing distance for thoroughbred racehorses [J]. *BMC Genomics*, 2010, **11**(1): 1—10
- [22] Hill E W, Gu J, Eivers S S, *et al.* A sequence polymorphism in MSTN predicts sprinting ability and racing stamina in thoroughbred horses [J]. *PloS One*, 2010, **5**(1): 1—6
- [23] Wang C, Wang H, Li Y, *et al.* Identification of a fructose-1, 6-bisphosphate aldolase gene and association of the single nucleotide polymorphisms with growth traits in the clam *Meretrix meretrix* [J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, **39**(4): 5017—5024
- [24] 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 [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. 水生生物学报, 2016, **40**(6): 1128—1134]
- [25] Zhou L, Wang C H, Cheng Q X, *et al.* Comparison and

- analysis between PST and FST of mitten crabs in the Minjiang River [J]. *Zoological Research*, 2012, **33**(3): 314—318 [周陆, 王成辉, 成起萱, 等. 闽江水系绒螯蟹的表型性状差异与分子遗传差异的比较与分析. 动物学研究, 2012, **33**(3): 314—318]
- [26] Kim K S, Jeon J M, Kim H W. A myostatin-like gene expressed highly in the muscle tissue of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* [J]. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 2009, **12**(3): 185—193
- [27] Singh V K, Mangalam A K, Dwivedi S, *et al.* Primer premier: program for design of degenerate primers from a protein sequence [J]. *Biotechniques*, 1998, **24**(2): 318—319
- [28] Yeh F C, Yang R C, Boyle T B J, *et al.* POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis [J]. *Molecular Biology and Biotechnology Center*, 1997: 10
- [29] Jiang Y Y, Liu Q. The application of SPSS in data processing [J]. *Journal of Beijing Institute of Graphic Communication*, 2007, **15**(2): 69—71 [姜玉英, 刘强. SPSS在数据处理中的应用. 北京印刷学院学报, 2007, **15**(2): 69—71]
- [30] McPherron A C, Lawler A M, Lee S J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member [J]. *Nature*, 1997, **387**(6628): 83—90
- [31] Grobet L, Martin L J R, Poncelet D, *et al.* A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle [J]. *Nature Genetics*, 1997, **17**(1): 71—74
- [32] Stratil A, Kopečný M. Genomic organization, sequence and polymorphism of the porcine myostatin (GDF8; MSTN) gene [J]. *Animal Genetics*, 1999, **30**(6): 462—478
- [33] François L, Fegraeus K J, Eriksson S, *et al.* Conformation traits and gaits in the Icelandic horse are associated with genetic variants in Myostatin (MSTN) [J]. *Journal of Heredity*, 2016, **107**(5): 431—437
- [34] Esmailizadeh A K, Bottema C D K, Sellick G S, *et al.* Effects of the myostatin F94L substitution on beef traits [J]. *Journal of Animal Science*, 2008, **86**(5): 1038—1046
- [35] Mosher D S, Quignon P, Bustamante C D, *et al.* A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs [J]. *PLoS Genet*, 2007, **3**(5): 779—786
- [36] GU Z L, Zhu D H, Li N, *et al.* Single Nucleotide Polymorphism of myostatin gene and their association with skeletal muscle and fat growth in chicken [J]. *Science in China*, 2003, **33**(3): 273—280 [顾志良, 朱大海, 李宁, 等. 鸡Myostatin基因单核苷酸多态性与骨骼肌和脂肪生长的关系. 中国科学: C辑, 2003, **33**(3): 273—280]
- [37] Zhang M, Chen Y, Shen Y B, *et al.* Polymorphism of MSTN-1 and the association with growth traits and muscle compositions of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, **40**(4): 618—625 [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. 水产学报, 2016, **40**(4): 618—625]
- [38] Han M X, Xue L Y. Effects of fasting and refeeding on the expression of MSTN in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, **39**(4): 669—676 [韩明星, 薛良义. 饥饿及复投喂对大黄鱼肌肉生长抑制素1型和2型基因表达的影响. 水生生物学报, 2015, **39**(4): 669—676]
- [39] 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 [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. 水生生物学报, 2016, **40**(1): 50—57]
- [40] Meng X, Wang H, Qiu X, *et al.* SNPs of myostatin (MSTN) gene and their association with growth traits in three bay scallop (*Argopecten irradians*) populations [J]. *Aquaculture Research*, 2017, **48**(2): 531—536
- [41] Guo L, Li L, Zhang S D, *et al.* Molecular cloning and characterization of the myostatin gene in a cultivated variety of bay scallop, *Argopecten irradians* [J]. *Aquaculture*, 2012, **350**(2): 192—199
- [42] Kim K S, Kim Y J, Jeon J M, *et al.* Molecular characterization of myostatin-like genes expressed highly in the muscle tissue from Morotoge shrimp, *Pandalopsis japonica* [J]. *Aquaculture Research*, 2010, **41**(11): 862—871
- [43] Niu D H, Wang L, Bai Z Y, *et al.* Identification and expression characterization of the myostatin (MSTN) gene and association analysis with growth traits in the razor clam *Sinonovacula constricta* [J]. *Gene*, 2015, **555**(2): 297—304
- [44] Joseph A C, Hyun W K, Donald L M. Expression of alternatively spliced transcripts for a myostatin-like protein in the blackback land crab, *Gecarcinus lateralis* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 2008, **150**(4): 423—430
- [45] De Santis C, Wade N M, Jerry D R, *et al.* Growing backwards: an inverted role for the shrimp ortholog of vertebrate myostatin and GDF11 [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2011, **214**(16): 2671—2677
- [46] Lee J H, Momani J, Kim Y M, *et al.* Effective RNA-silencing strategy of Lv-MSTN/GDF11 gene and its effects on the growth in shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 2015, **179**: 9—16
- [47] Li S L, Zhou Z C, Dong Y, *et al.* Molecular characteriza-

tion, expression analysis of the myostatin gene and its association with growth traits in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) [J]. *Gene*, 2016, **201**: 12—20

[48] Qian Z, Mi X, Wang X, *et al.* cDNA cloning and expres-

sion analysis of myostatin/GDF11 in shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2013, **165**(1): 30—39

POLYMORPHISM OF *MSTN* GENE AND ITS ASSOCIATION WITH GROWTH TRAITS IN CHINESE MITTEN CRAB, *ERIOCHEIR SINENSIS*

CHEN Yi-Pei, WU Lian, CHEN Xiao-Wen, YUE Wu-Cheng, HUANG Shu, WANG Jun and WANG Cheng-Hui

(National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture, Shanghai 201306, China)

Abstract: To study the polymorphism of myostatin (*MSTN*) gene and its association with growth traits in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*, 321 individuals from the three populations (breeding population, contest population and wild population) were screened polymorphic sites of *MSTN* gene. Three SNPs were found in the first exon of *MSTN* gene, which were named as S1, S2 and S3, respectively (S1:C714T; S2:G729A; S3:G753T). These three SNPs were middle or high polymorphism loci, and they were all in hardy-Weinberg equilibrium ($P>0.05$) in population structure. A general linear model used to analyze the correlation between the three SNPs and growth traits (body weight and carapace length) of Chinese mitten crab indicated that S1 but not S2 and S3 had a significant effect on the growth traits ($P\leq 0.05$). The TT genotype was the most beneficial genotype on growth of Chinese mitten crab, which could be used as candidate for molecule marker-assisted breeding.

Key words: Chinese mitten crab; *MSTN* gene; Single nucleotide polymorphisms; Growth traits; Correlation analysis

《水生生物学报》编辑委员会

EDITORIAL BOARD OF ACTA HYDROBIOLOGICA SINICA

主 编

Chief Editor 桂建芳 GUI Jian-Fang

副主编

Associate Editor 解绶启 XIE Shou-Qi

委 员

Members (以姓氏拼音为序)

蔡庆华

CAI Qing-Hua

曹文宣

CAO Wen-Xuan

常剑波

CHANG Jian-Bo

陈家宽

CHEN Jia-Kuan

陈宜瑜

CHEN Yi-Yu

陈毅锋

CHEN Yi-Feng

高坤山

GAO Kun-Shan

何舜平

HE Shun-Ping

胡征宇

HU Zheng-Yu

李文鑫

LI Wen-Xin

李钟杰

LI Zhong-Jie

林浩然

LIN Hao-Ran

刘建康

LIU Jian-Kang

刘永定

LIU Yong-Ding

麦康森

Mai Kang-Sen

聂 品

NIE Pin

曲久辉

QU Jiu-Hui

宋立荣

SONG Li-Rong

唐启升

TANG Qi-Sheng

王 丁

WANG Ding

吴灶和

WU Zao-He

吴振斌

WU Zhen-Bin

相建海

XIANG Jian-Hai

肖 伟

XIAO Wei

谢 平

XIE Ping

谢小军

XIE Xiao-Jun

熊邦喜

XIONG Bang-Xi

熊思岳

XIONG Si-Yue

徐旭东

XU Xu-Dong

杨先乐

YANG Xian-Le

于 丹

YU Dan

余其兴

YU Qi-Xing

游 力

YOU Li

张奇亚

ZHANG Qi-Ya

朱作言

ZHU Zuo-Yan

Harald Rosenthal (德国)

编辑部

Editorial office 杜新征 Du Xin-Zheng 余 茜 YU Xi 叶文娟 YE Wen-Juan