

杉虎杂交斑肌球蛋白重链基因分子结构分析及生长相关 SNPs 筛选

曹 柳^{1,2,3,4}, 马 军^{1,2,3,4}, 卢 艳⁴, 武雅彤⁴, 王 钧⁴, 钟立静⁴, 苏珊珊⁴, 黄 海^{1,2,3,4}

1. 海南热带海洋学院崖州湾创新研究院, 海南 三亚 572022
2. 海南省热带海洋渔业资源保护与利用重点实验室, 海南 三亚 572022
3. 热带海洋生物资源利用与保护教育部重点实验室, 海南 三亚 572022
4. 海南热带海洋学院 水产与生命学院, 海南 三亚 572022

摘要: 肌球蛋白重链 (Myosin heavy chain) 参与鱼类肌纤维肥大和增生过程, 在肌肉生长和收缩过程中扮演重要角色。为筛选出与生长性状相关的单核苷酸多态性 (Single nucleotide polymorphisms, SNPs) 位点, 采用 PCR 扩增技术获得海水经济养殖鱼类——杉虎杂交斑 (棕点石斑鱼 *Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × 清水石斑鱼 *E. polyphekadion* ♂) 的肌球蛋白重链基因序列全长, 并基于相关性分析筛选与生长性状相关的 SNPs 位点。结果表明, 杉虎杂交斑肌球蛋白重链基因序列全长为 12 129 bp, 包含 36 个外显子和 35 个内含子, 可编码 1 934 个氨基酸。该基因包含 4 种类型的蛋白结构域: Myosin_N、MYSc、IQ 和 Myosin_tail_1。经比对分析发现, 该基因的核苷酸序列及蛋白结构域在鲈形目、鲷形目和鲹形目鱼类中均表现出较高的保守性。在肌球蛋白重链基因中检测到 62 个 SNPs 位点, 其中 8 个符合 Hardy-Weinberg 平衡。有 12 个 SNPs 位点位于外显子区域, 且均与体质量、全长等多个生长表型性状显著相关 ($p < 0.05$)。在这 12 个 SNPs 位点中仅有 g5417 C>G 为错义突变, 导致丙氨酸变成甘氨酸; 其余位点均为同义突变。这些与生长相关的 SNPs 位点可作为杉虎杂交斑生长分子标记开发的候选位点。

关键词: 杉虎杂交斑; 肌球蛋白重链基因; 生长性状; 单核苷酸多态性位点

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Molecular characterization and SNPs association with growth-related traits of myosin heavy chains in hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. polyphekadion* ♂)

CAO Liu^{1,2,3,4}, MA Jun^{1,2,3,4}, LU Yan⁴, WU Yatong⁴, WANG Jun⁴, ZHONG Lijing⁴, SU Shanshan⁴, HUANG Hai^{1,2,3,4}

1. Yazhou Bay Innovation Institute of Hainan Tropical Ocean University, Sanya 572022, China
2. Hainan Key Laboratory for Conservation and Utilization of Tropical Marine Fishery Resources, Sanya 572022, China
3. Key Laboratory of Utilization and Conservation for Tropical Marine Bioresources of Ministry of Education, Sanya 572022, China
4. College of Fisheries and Life Sciences, Hainan Tropical Ocean University, Sanya 572022, China

Abstract: Myosin heavy chain (MYH) participates in hypertrophy and hyperplasia of muscle fibres in fish and plays an important role in muscle growth and contraction. In order to screen single nucleotide polymorphism (SNP) sites associated with

收稿日期: 2024-12-24; 修回日期: 2025-02-22

基金项目: 海南热带海洋学院崖州湾创新研究院青年项目 (2022CXYQNXM06); 海南省重大科技计划 (ZDKJ2021017); 国家自然科学基金地区科学基金项目 (32160861); 海南热带海洋学院崖州湾创新研究院重大科技计划项目 (2022CXYZD001)

作者简介: 曹 柳 (1992—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为鱼类遗传育种。E-mail: 1065078131@qq.com

通信作者: 黄 海 (1974—), 男, 教授, 博士, 研究方向为鱼类遗传育种。E-mail: Huanghai74@126.com

growth traits, we applied the PCR amplification method to obtain the nucleotide sequence of MYH in the cultured marine fish, the hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. polyphkadion* ♂), and then used the correlation analysis to detect the SNPs related to its growth traits. The results show that the sequence length of the MYH was 12 129 bp, including 36 exons and 35 introns, encoding 1 934 amino acids. Four typical domains in MYH were detected, namely Myosin_N, MYSc, IQ and Myosin_tail_1. Comparative analysis reveals that high conservation in nucleotide sequence and protein domain of MYH was manifested in Perciformes, Tetraodontiformes and Pleuronectiformes species. Sixty-two SNP loci were found in the MYH. Eight SNP loci were in Hardy-Weinberg equilibrium state. Twelve SNP loci were located on exons, significantly correlated with growth traits, such as body mass and total length. Among the 12 SNP sites, only g5417 C>G was a missense mutation, resulting in the transformation from alanine to glycine. Other loci were synonymous mutations. These SNP sites related to growth provide candidate sites for screening the growth-related molecular markers in the hybrid grouper.

Keywords: *Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. polyphkadion* ♂; Myosin heavy chain gene; Growth traits; Single nucleotide polymorphism

生长是水产养殖经济动物的重要性状。在一些经济鱼类中,肌肉占到鱼体质量的 50%~70%^[1]。肌球蛋白是肌肉细胞的重要组成部分,在肌肉收缩、细胞分裂及细胞内物质运输等方面有着重要功能^[2-3]。肌球蛋白由 2 条肌球蛋白重链(Myosin heavy chain)和 4 条肌球蛋白轻链(Myosin light chain)共同形成“Y”形不对称结构。肌球蛋白重链具有运动和肌纤维形成双重生物学功能,在肌肉生长、发育和收缩上扮演着重要角色^[4],这与其球状氨基末端头部结构域和细长 α -螺旋卷曲羧基末端棒状结构域密不可分^[5]。肌球蛋白重链基因属多基因家族,在鳊(*Siniperca chuatsi*)^[6]、青鳉(*Oryzias latipes*)^[7]、斑马鱼(*Danio rerio*)^[8]、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)^[9]等多种鱼类中发现了不同基因类型。该基因编码区较长,普遍在 5 000 bp 以上,约可编码 1 900 个氨基酸。

肌球蛋白重链基因可通过表达量的差异以及核苷酸序列上存在的单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphisms, SNPs)位点影响物种生长^[10-13]。已有文献报道其表达量与石斑鱼仔鱼期肌纤维的新生、仔鱼后期原有肌纤维的增生相关^[14]。在红鳍东方鲀中,肌球蛋白重链基因表达量的差异体现在快慢肌中,影响其生长速率^[15]。在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)和玻璃梭吻鲈(*Sander vitreus*)中也同样发现肌球蛋白重链基因的表达量会影响生长速度^[16-17]。此外,在鳊中发现肌球蛋白重链基因 5' 转录调控区存在与生长表型性状(如体长、体高等)相关的 SNPs 位点,这些位点位于启动子区域,可通过影响转录调控因子结合进而改变该基因的表达量,最终实现对生长性状的调控^[4]。

石斑鱼为名贵水产经济动物,属鲈形目、鲷科、石斑鱼亚科。因其低脂肪、高蛋白、肉质细腻

等特点,备受消费者喜爱。在众多石斑鱼养殖种类中,杉虎杂交斑(棕点石斑鱼 *Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × 清水石斑鱼 *E. polyphkadion* ♂)因生长速度快、抗病性强、肉质鲜嫩等特点,成为我国沿海地区重要的养殖鱼类^[18-19]。有学者基于生长重要基因,如生长激素(Growth hormone)^[20]、生长激素受体(Growth hormone receptors)^[19]、肌肉抑制素(Myostatin)^[21]来研究杉虎杂交斑的生长性状。本研究团队在杉虎杂交斑及其亲本的转录组数据比较分析中发现,肌球蛋白重链基因在杉虎杂交斑生长性状调控中具有重要作用。但该基因在杉虎杂交斑中尚未见相关报道。获取杉虎杂交斑肌球蛋白重链基因的序列全长,分析其蛋白结构是解析该基因功能的重要前提。

分子标记辅助育种借助于目标性状分子标记对个体进行选择,进而获得含有目标基因的优良个体。该技术在水产经济动物育种中应用较为成熟,其在育种中呈现的高效性和精准性是单一依赖表型性状进行传统选育所无法比拟的^[22-23]。筛选与性状紧密相关的分子标记是开展辅助育种的重要前提和基础。基于生长重要调控基因的 SNPs 位点挖掘生长分子标记是一种非常有效的手段,在植物和动物育种中应用较为广泛^[24-26]。在水产经济动物如鳊^[6]、大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)^[13]、马氏珠母贝(*Pinctada fucata martensii*)^[12]中,均在肌球蛋白重链基因核苷酸序列中成功筛选到与生长相关的 SNPs 位点。因此,本研究克隆了杉虎杂交斑的肌球蛋白重链基因核苷酸序列,预测其蛋白结构,并挖掘与生长相关的 SNPs 位点,可为杉虎杂交斑生长分子标记开发提供候选位点,为筛选鉴定具有生长优势的杉虎杂交斑提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料

杉虎杂交斑采集自陵水德林诚信水产养殖有限公司(海南省陵水黎族自治县)。杉虎杂交斑在鱼苗时期养殖在 4 m×4 m×1.2 m 的椭圆形水泥池中, 养殖密度为 1 200 尾·m⁻³。根据鱼苗生长情况逐渐调整养殖密度, 最后转移至 6 m×5 m×1.5 m 的长方形水泥池进行养殖。至 12 月龄时其养殖密度约为 50 尾·m⁻³, 每日投喂 1~2 次。利用游标卡尺测量养殖在同一水泥池中 12 月龄杉虎杂交斑表型生长数据(包括全长、体长、头长、体高和尾柄高)。利用电子秤称量体质量, 精确到 0.01 kg。在体质量数据符合正态分布的群体中, 挑选位于两端极值的杉虎杂交斑个体(即生长较快个体和生长较慢个体)组成 2 个群体, 每个群体各 30 尾。生长较快的群体平均体质量为 (0.59±0.05) kg, 生长较慢的群体平均体质量为 (0.15±0.03) kg。表型数据测定前利用 3-氨基苯甲酸乙酯甲基磺酸盐 (MS-222) 对鱼体进行麻醉, 数据测量同时取尾鳍组织。按照动物基因组 DNA 快速抽提试剂盒 [生工生物工程 (上海) 有限公司] 的操作步骤提取基因组 DNA。本研究操作严格遵守实验动物伦理要求。

1.2 肌球蛋白重链基因全长序列扩增及 SNPs 位点筛选

根据研究团队测得的棕点石斑鱼基因组, 获得肌球蛋白重链基因参考序列并进行引物设计(表 1)。以杉虎杂交斑 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增获取肌球蛋白重链基因序列全长。扩增体系为: DNA 模板 1 μL, Taq 5 μL, 正、反向引物各 0.5 μL, 最后用水补齐至 10 μL。扩增程序: 55~60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 循环数为 30。将扩增获得的产物送至广州生工进行测序。采用 BioEdit 和 Clustal W 对序列进行多重比对分析并筛选 SNPs 位点。根据 SNPs 位点前后 150 bp 序列进行引物设计, 再次进行 PCR 扩增以验证 SNPs 位点(表 1)。

1.3 肌球蛋白重链基因序列分析

利用 Open Reading Frame (ORF) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 预测肌球蛋白重链基因序列阅读框。通过 SMART (<https://smart.embl.de/>) 预测蛋白结构域。MEGA 7.0 软件用于进化分析。SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 用于三级蛋白结构预测。

表1 用于 PCR 扩增引物表
Table 1 Primers used for PCR

引物名称 Primer	序列 (5'—3') Sequence (5'—3')	用途 Usage
引物 1 Primer 1	F: GAACTTTTATCATCTCTAC R: ACTTGTTATTTTCTTTTGT	全长序列扩增
引物 2 Primer 2	F: GTATCTAAACATGAAGCAC R: AACCTACAAATTATCGACCA	全长序列扩增
引物 3 Primer 3	F: GGTCCCAAATCAAACCTCCTG R: GCCTGACATCTGTTGCCATC	全长序列扩增
引物 4 Primer 4	F: TGTCAGGCTCTCACTCATTC R: GTAAGTGTCTCTTCTGATTG	全长序列扩增
引物 5 Primer 5	F: TACTCAAGAGGAAAAGAACT R: TTGTTCTTCACCAGCCAGTT	全长序列扩增
引物 6 Primer 6	F: AGCTTCTGATACCACCTTTA R: ACAATCACAAACCAATCAT	全长序列扩增
引物 7 Primer 7	F: CTATTCAAGCCAGGTCCCGT R: CATCCTCAAGTCTGCCATTT	全长序列扩增
引物 8 Primer 8	F: GACCTTGAGAGAGCTAAGAG R: CAAGTGAAAAGAGTAATGCT	全长序列扩增
引物 9 Primer 9	F: GTCAGCATTACTCTTTTCAC R: TCTCTCTCTTCAGGGTCTCC	全长序列扩增
引物 10 Primer 10	F: GGAAACAAAAATATGAGGAG R: ATACAATGTACGAAAAAGCA	全长序列扩增
引物 11 Primer 11	F: CAGATTGAAGTAGAGGAAGC R: GGGAAAGAAAGAAGAAGAGA	全长序列扩增
引物 12 Primer 12	F: AGAACCAATCAGAAGAGACA R: TGTAAATACCAAGCAGTGAAA	SNP 位点验证
引物 13 Primer 13	F: ACTTTCATAGATTTTGGGAT R: TAGACTTCTGGTAGAGCGCA	SNP 位点验证
引物 14 Primer 14	F: ACTCATATTTTGTCCCCTC R: TTTGCCTTCAGTAACTTCGG	SNP 位点验证
引物 15 Primer 15	F: ATAAAAATATTCTGTCCCTCC R: TGTCTTGAAAGTTCATCTAG	SNP 位点验证
引物 16 Primer 16	F: ATTATCATTTGCCAAAATGT R: TCCTTCACCAAGTTGCTCAG	SNP 位点验证
引物 17 Primer 17	F: TGGAGCAGGAAAAGAGCGAG R: GGTTACAAAGATGCCAGAGT	SNP 位点验证
引物 18 Primer 18	F: CCTGAAGGTAAAAAAGAGGA R: ACAATGTACGAAAAAGCAAC	SNP 位点验证

1.4 肌球蛋白重链基因 SNPs 分析

计算 SNPs 位点基因频率和基因型频率^[27]。选取最小等位基因频率大于 0.05 的位点用于后续分析。利用 PLINK 软件计算预期杂合度 (Expected heterozygosity, H_e)、观测杂合度 (Observed heterozygosity, H_o) 和 Hardy-Weinberg 平衡。采用 Popgene v. 1.31^[28] 分析有效等位基因数 (Effective number of alleles, N_e)。多态性信息 (Polymorphic information content, PIC) 参考 Bostein 等^[29] 提出的方法进行计算。SNPs 位点间的连锁不平衡分析通过 Haploview 4.2 计算, 连锁程度大小用 r^2 度量^[30]。采用 PLINK 一般线性模型进行 SNPs 位点与生长性状关联分析。同一位点不同基因型之间的性状表现差异由 SPSS 17.0 软件的 t -test 检测。显著性水平

α 设为 0.05。

2 结果

2.1 肌球蛋白重链基因序列分析

经测定发现杉虎杂交斑肌球蛋白重链基因序列长度为 12 129 bp, 包含 36 个外显子和 35 个内含子 (图 1), 完整的基因序列已经提交到 NCBI (PQ826489)。外显子长度介于 28~390 bp, 可编码 1 934 个氨基酸。推测其蛋白分子质量约为 223 kD, 等电点为 5.532。蛋白结构域分析结果显示存在 4 种结构类型, 即 Myosin_N (第 34—第 73 位氨基酸)、MYSc (第 79—第 782 位氨基酸)、IQ (第 783—第 805 位氨基酸) 和 Myosin_tail_1 (第 846—第 1 927 位氨基酸)。

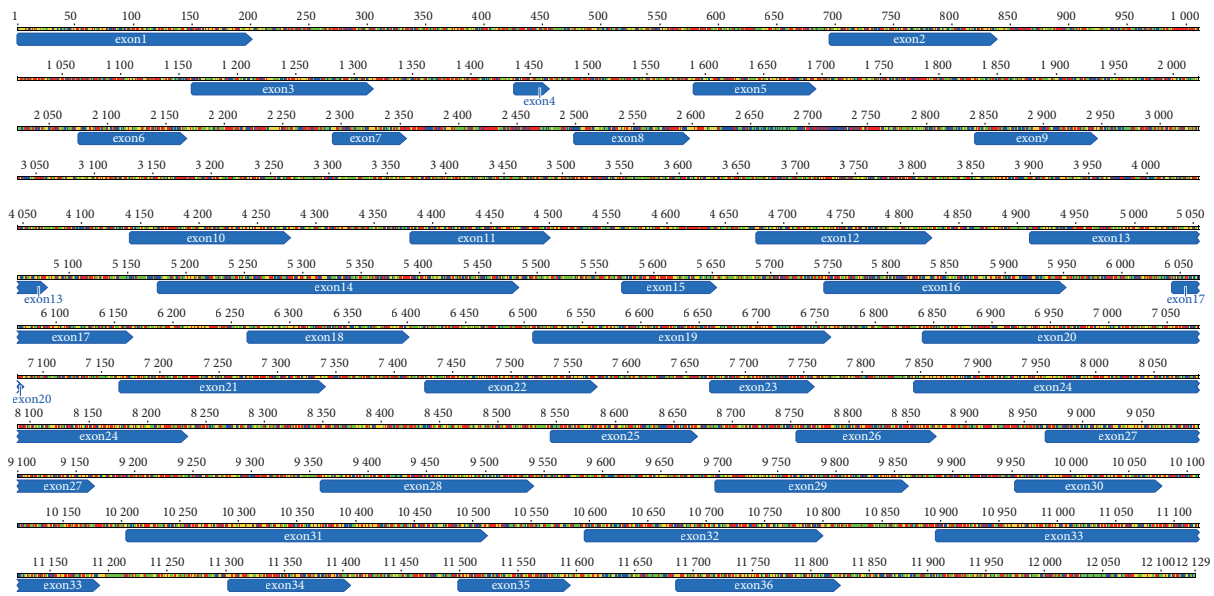


图1 杉虎杂交斑肌球蛋白重链基因核苷酸序列分析

Fig. 1 Nucleotide sequence analysis of MYH

2.2 肌球蛋白重链基因蛋白高级结构预测

将杉虎杂交斑肌球蛋白重链基因氨基酸序列与棕点石斑鱼 (XP_049453941.1)、鞍带石斑鱼 (*E. lanceolatus*, XP_033506503.1)、金钱鱼 (*Scatophagus argus*, XP_046263685.1)、红鳍东方鲀 (XP_011614688.1)、黄鳍棘鲷 (*Acanthopagrus latus*, XP_036941235.1)、狭鳞庸鲷 (*Hippoglossus stenolepis*, XP_035027113.1)、射水鱼 (*Toxotes jaculatrix*, XP_040910911.1) 以及大口黑鲈 (XP_038574763.1) 进行同源性比对。结果表明, 杉虎杂交斑肌球蛋白重链基因氨基酸序列与其他鱼类的相似度均高于 90%; 其中与棕点石斑鱼和鞍带石斑鱼的相似度最

高, 分别为 98.9% 和 98.7%; 与狭鳞庸鲷的相似度最低 (91.6%)。以上结果表明肌球蛋白重链基因在不同物种间具有较高的保守性 (表 2)。

对上述物种的 Myosin_N、MYSc、IQ 和 Myosin_tail_1 蛋白结构域比较分析发现, 在不同物种间, 结构域有较高的氨基酸序列相似性, 其中 IQ 区域保守性最高。此外, 在 Myosin_N、MYSc 和 Myosin_tail_1 这 3 个区域中存在石斑鱼类保守性氨基酸位点, 如 3 种石斑鱼在 Myosin_N 区域第 37 位均为缬氨酸、MYSc 区域第 245 位均为天冬酰胺。而这些位点与其他鱼类的氨基酸组成不同 (图 2, 红色星号所示)。在 MYSc 和 Myosin_tail_1 区

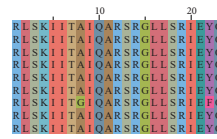
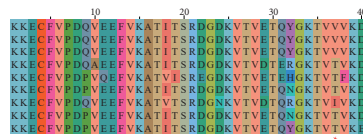
表2 肌球蛋白重链基因氨基酸序列在不同物种间的相似度比较

Table 2 Similarity comparison of amino acid sequence in MYH gene between different species

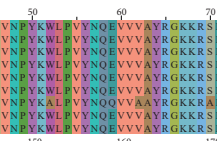
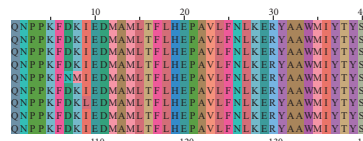
%

	棕点石斑鱼 <i>E. fuscoguttatus</i>	鞍带石斑鱼 <i>E. lanceolatus</i>	金钱鱼 <i>S. argus</i>	红鳍东方鲀 <i>T. rubripes</i>	黄鳍棘鲷 <i>A. latus</i>	狭鳞庸鲷 <i>H. stenolepis</i>	射水鱼 <i>T. jaculatrix</i>	大口黑鲈 <i>M. salmoides</i>
杉虎杂交斑 <i>E. fuscoguttatus</i> × <i>E. polyphkadion</i>	98.9	98.7	94.5	92.4	94.3	91.6	94.2	94.0
棕点石斑鱼 <i>E. fuscoguttatus</i>		99.4	95.1	93.0	95.0	92.2	94.8	94.6
鞍带石斑鱼 <i>E. lanceolatus</i>			95.0	92.9	94.8	92.2	94.9	94.5
金钱鱼 <i>S. argus</i>				94.7	96.7	93.4	96.3	95.9
红鳍东方鲀 <i>T. rubripes</i>					94.9	91.8	93.8	93.6
黄鳍棘鲷 <i>A. latus</i>						93.1	95.9	96.1
狭鳞庸鲷 <i>H. stenolepis</i>							93.0	92.3
射水鱼 <i>T. jaculatrix</i>								95.2

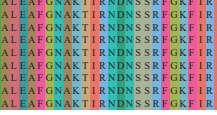
杉虎杂交斑 *Epinephelus fuscoguttatus* × *E. polyphkadion*
棕点石斑鱼 *Epinephelus fuscoguttatus*
鞍带石斑鱼 *Epinephelus lanceolatus*
金钱鱼 *Scatophagus argus*
红鳍东方鲀 *Takifugu rubripes*
黄鳍棘鲷 *Acanthopagrus latus*
狭鳞庸鲷 *Hippoglossus stenolepis*
射水鱼 *Toxotes jaculatrix*
大口黑鲈 *Micropterus salmoides*



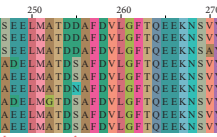
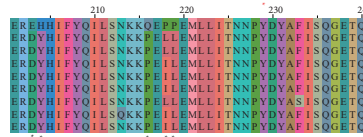
杉虎杂交斑 *Epinephelus fuscoguttatus* × *E. polyphkadion*
棕点石斑鱼 *Epinephelus fuscoguttatus*
鞍带石斑鱼 *Epinephelus lanceolatus*
金钱鱼 *Scatophagus argus*
红鳍东方鲀 *Takifugu rubripes*
黄鳍棘鲷 *Acanthopagrus latus*
狭鳞庸鲷 *Hippoglossus stenolepis*
射水鱼 *Toxotes jaculatrix*
大口黑鲈 *Micropterus salmoides*



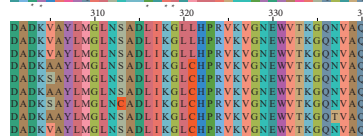
杉虎杂交斑 *Epinephelus fuscoguttatus* × *E. polyphkadion*
棕点石斑鱼 *Epinephelus fuscoguttatus*
鞍带石斑鱼 *Epinephelus lanceolatus*
金钱鱼 *Scatophagus argus*
红鳍东方鲀 *Takifugu rubripes*
黄鳍棘鲷 *Acanthopagrus latus*
狭鳞庸鲷 *Hippoglossus stenolepis*
射水鱼 *Toxotes jaculatrix*
大口黑鲈 *Micropterus salmoides*



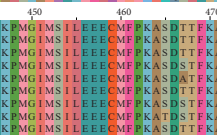
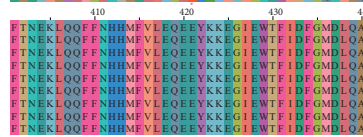
杉虎杂交斑 *Epinephelus fuscoguttatus* × *E. polyphkadion*
棕点石斑鱼 *Epinephelus fuscoguttatus*
鞍带石斑鱼 *Epinephelus lanceolatus*
金钱鱼 *Scatophagus argus*
红鳍东方鲀 *Takifugu rubripes*
黄鳍棘鲷 *Acanthopagrus latus*
狭鳞庸鲷 *Hippoglossus stenolepis*
射水鱼 *Toxotes jaculatrix*
大口黑鲈 *Micropterus salmoides*



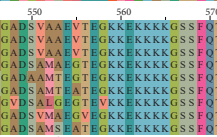
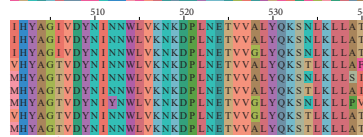
杉虎杂交斑 *Epinephelus fuscoguttatus* × *E. polyphkadion*
棕点石斑鱼 *Epinephelus fuscoguttatus*
鞍带石斑鱼 *Epinephelus lanceolatus*
金钱鱼 *Scatophagus argus*
红鳍东方鲀 *Takifugu rubripes*
黄鳍棘鲷 *Acanthopagrus latus*
狭鳞庸鲷 *Hippoglossus stenolepis*
射水鱼 *Toxotes jaculatrix*
大口黑鲈 *Micropterus salmoides*



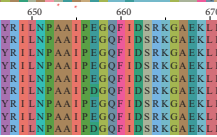
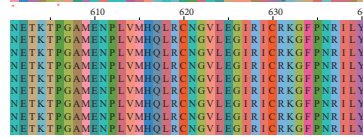
杉虎杂交斑 *Epinephelus fuscoguttatus* × *E. polyphkadion*
棕点石斑鱼 *Epinephelus fuscoguttatus*
鞍带石斑鱼 *Epinephelus lanceolatus*
金钱鱼 *Scatophagus argus*
红鳍东方鲀 *Takifugu rubripes*
黄鳍棘鲷 *Acanthopagrus latus*
狭鳞庸鲷 *Hippoglossus stenolepis*
射水鱼 *Toxotes jaculatrix*
大口黑鲈 *Micropterus salmoides*



杉虎杂交斑 *Epinephelus fuscoguttatus* × *E. polyphkadion*
棕点石斑鱼 *Epinephelus fuscoguttatus*
鞍带石斑鱼 *Epinephelus lanceolatus*
金钱鱼 *Scatophagus argus*
红鳍东方鲀 *Takifugu rubripes*
黄鳍棘鲷 *Acanthopagrus latus*
狭鳞庸鲷 *Hippoglossus stenolepis*
射水鱼 *Toxotes jaculatrix*
大口黑鲈 *Micropterus salmoides*



杉虎杂交斑 *Epinephelus fuscoguttatus* × *E. polyphkadion*
棕点石斑鱼 *Epinephelus fuscoguttatus*
鞍带石斑鱼 *Epinephelus lanceolatus*
金钱鱼 *Scatophagus argus*
红鳍东方鲀 *Takifugu rubripes*
黄鳍棘鲷 *Acanthopagrus latus*
狭鳞庸鲷 *Hippoglossus stenolepis*
射水鱼 *Toxotes jaculatrix*
大口黑鲈 *Micropterus salmoides*



杉虎杂交斑 *Epinephelus fuscoguttatus* × *E. polyphkadion*
棕点石斑鱼 *Epinephelus fuscoguttatus*
鞍带石斑鱼 *Epinephelus lanceolatus*
金钱鱼 *Scatophagus argus*
红鳍东方鲀 *Takifugu rubripes*
黄鳍棘鲷 *Acanthopagrus latus*
狭鳞庸鲷 *Hippoglossus stenolepis*
射水鱼 *Toxotes jaculatrix*
大口黑鲈 *Micropterus salmoides*



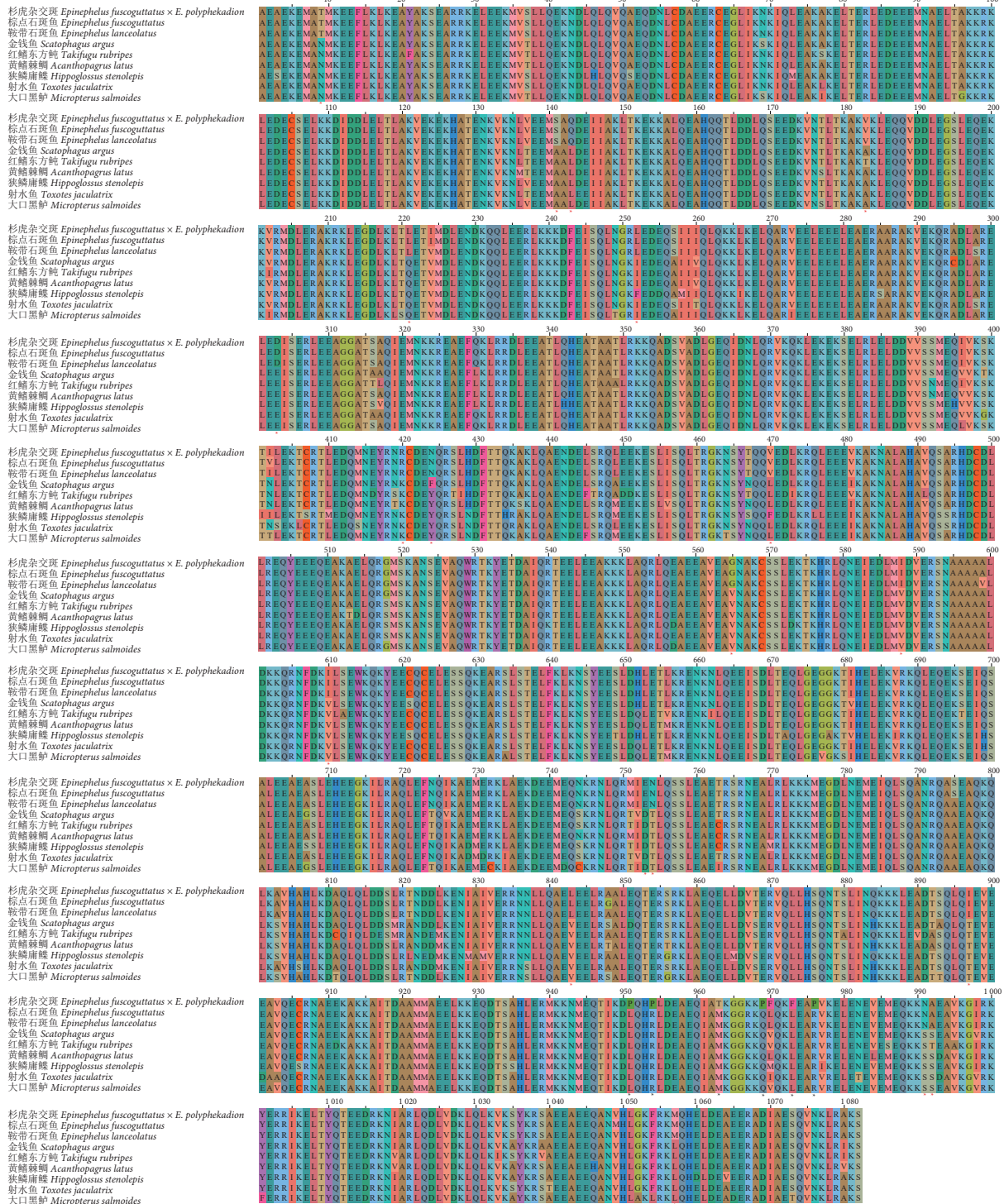


图2 不同物种中肌球蛋白重链基因蛋白结构域氨基酸序列比较分析

Fig. 2 Amino acid sequence alignment in Myosin_N, MYSc, IQ and Myosin_tail_1 domain of MYH gene among different species

域还存在杉虎杂交斑特异性氨基酸位点, 如 MY-Sc 区域第 187—第 189 位分别为苏氨酸、脯氨酸和色氨酸, Myosin_tail_1 区域第 951 位为脯氨酸。这些位点与其他鱼类均不同(图 2, 黑色星号所示)。

对杉虎杂交斑、棕点石斑鱼及狭鳞庸鲷的高级蛋白结构进行预测, 发现三者蛋白结构具有极高的

相似性(图 3), 表明肌球蛋白重链基因在不同物种间具有相似的蛋白功能。

2.3 肌球蛋白重链基因遗传进化分析

基于肌球蛋白重链基因氨基酸序列构建进化树(图 4)。结果表明, 3 种石斑鱼先紧密聚集成一小支, 再与其他鲈形目鱼类聚集。红鳍东方鲷(鲷

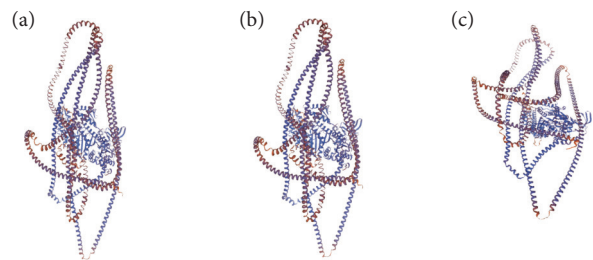


图3 预测肌球蛋白重链基因的蛋白结构
注: a. 杉虎杂交斑; b. 棕点石斑鱼; c. 狭鳞庸鲷。
Fig. 3 Predicted protein structure of MYH
Note: a. *E. fuscoguttatus* × *E. polyphkadion*; b. *E. fuscoguttatus*;
c. *H. stenolepis*.

形目) 相较于狭鳞庸鲷 (鲷形目), 与鲈形目鱼类的遗传关系更近。

2.4 肌球蛋白重链基因 SNPs 位点分析

根据肌球蛋白重链基因全长, 筛选获得 62 个 SNPs 位点 (表 3)。各位点 H_e 介于 0.066 7~0.750 0, H_o 介于 0.152 8~0.497 8。在 62 个 SNPs 位点中,

除 4 个为低水平遗传多态性外, 其余均属于中等水平遗传多态性, 未发现有位点属于高水平遗传多态性。有 8 个 SNPs 位点符合 Hardy-Weinberg 平衡 ($p>0.05$), 即 g960 C>T, g988 G>A, g1442 C>T, g3740 A>G, g5196 T>C, g5253 C>A, g8598 A>G, g10120 C>T。对这些位点进行连锁不平衡分析, 发现位点 g5196 T>C 和 g8598 A>G 之间显示出强连锁 ($r^2=0.81$)。

2.5 SNPs 与生长性状关联分析

在 62 个 SNPs 位点中有 12 个位点位于外显子区域, 将它们与生长性状进行关联分析。结果表明, 所有 SNPs 均与生长性状表现出显著相关 ($p<0.05$) (表 4)。在 12 个 SNPs 中, 除 g5196 T>C、g5253 C>A 和 g8598 A>G 外, 其余位点均发生了基因型丢失现象。例如在 g4482 A>G 位点处丢失 GG 型。但所有位于外显子区域的 SNPs 仅有 g5417 C>G 为错义突变 (第 606 个氨基酸), 导致丙氨酸变成甘

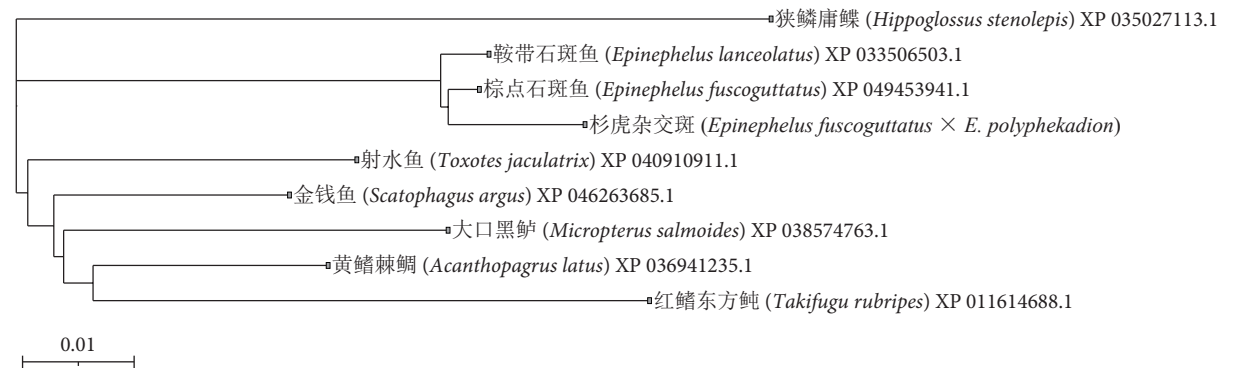


图4 在不同物种间基于邻接法构建肌球蛋白重链基因进化树
Fig. 4 Phylogenetic tree of MYH among different species based on Neighbor-Joining method

表3 肌球蛋白重链基因上 62 个 SNPs 的遗传参数
Table 3 Genetic parameters of 62 SNPs in MYH

单核苷酸多态性位点 SNPs	碱基类型 Type of base	有效等位 基因数 N_e	期望杂合度 H_e	观测杂合度 H_o	遗传多态性 PIC	Hardy-Weinberg 平衡 (p 值) HWE (p value)
g960	T/C	1.342 3	0.300 0	0.255 0	0.255 0	0.332 4
g979	A/T	1.973 1	0.750 0	0.468 8	0.469 0	$9.27\times10^{-7*}$
g988	A/G	1.280 0	0.250 0	0.218 8	0.219 0	0.579 5
g1011	T/C	1.882 4	0.750 0	0.468 8	0.469 0	$9.27\times10^{-7*}$
g1017	C/T	1.800 0	0.666 7	0.444 4	0.444 0	$6.59\times10^{-5*}$
g1027	A/G	1.800 0	0.666 7	0.444 4	0.444 0	$6.59\times10^{-5*}$
g1038	A/G	1.800 0	0.666 7	0.444 4	0.444 0	$6.59\times10^{-5*}$
g1113	T/A	1.935 0	0.316 7	0.483 2	0.483 0	0.008 008*
g1166	T/C	1.724 1	0.550 0	0.398 8	0.399 0	0.002 727*
g1187	C/T	1.724 1	0.600 0	0.420 0	0.420 0	0.000 535 5*

续表 3

to be continued

单核苷酸多态性位点 SNPs	碱基类型 Type of base	有效等位 基因数 N_e	期望杂合度 H_e	观测杂合度 H_o	遗传多态性 PIC	Hardy-Weinberg 平衡 (p 值) HWE (p value)
g1283	C/A	1.851 4	0.650 0	0.459 9	0.459 8	0.001 751*
g1352	A/G	1.910 3	0.683 3	0.476 5	0.476 5	0.001 054*
g1442	T/C	1.219 5	0.200 0	0.180 0	0.180 0	1
g1805	C/T	1.882 4	0.750 0	0.468 8	0.468 8	$9.27 \times 10^{-7*}$
g2796	C/T	1.763 0	0.200 0	0.432 8	0.432 8	$4.39 \times 10^{-5*}$
g2975	G/A	1.896 7	0.300 0	0.472 8	0.472 8	0.005 796*
g3006	A/C	1.991 2	0.200 0	0.497 8	0.497 8	$2.38 \times 10^{-6*}$
g3007	A/G	1.763 0	0.166 7	0.432 8	0.432 8	$2.80 \times 10^{-6*}$
g3015	C/T	1.663 2	0.116 7	0.398 8	0.398 8	$1.16 \times 10^{-7*}$
g3073	T/C	1.882 4	0.183 3	0.468 8	0.468 8	$2.95 \times 10^{-6*}$
g3176	A/T	1.882 4	0.183 3	0.468 8	0.468 8	$2.95 \times 10^{-6*}$
g3428	G/C	1.834 9	0.133 3	0.455 0	0.455 0	$3.49 \times 10^{-8*}$
g3740	G/A	1.406 0	0.250 0	0.288 8	0.288 8	0.36
g4301	G/A	1.882 4	0.750 0	0.468 8	0.468 8	$9.27 \times 10^{-7*}$
g4482	G/A	1.882 4	0.750 0	0.468 8	0.468 8	$9.27 \times 10^{-7*}$
g4778	T/C	1.882 4	0.750 0	0.468 8	0.468 8	$9.27 \times 10^{-7*}$
g5196	C/T	1.973 1	0.616 7	0.493 2	0.493 2	0.071 36
g5217	T/C	1.743 8	0.616 7	0.426 5	0.426 5	0.000 456 2*
g5253	A/C	1.683 8	0.300 0	0.406 1	0.406 1	0.054 04
g5265	C/T	1.743 8	0.616 7	0.426 5	0.426 5	0.000 456 2*
g5322	C/T	1.867 2	0.733 3	0.464 4	0.464 5	$2.56 \times 10^{-6*}$
g5391	G/A	1.867 2	0.733 3	0.464 4	0.464 5	$2.56 \times 10^{-6*}$
g5417	G/C	1.882 4	0.750 0	0.468 8	0.468 8	$9.27 \times 10^{-7*}$
g6413	T/C	1.956 0	0.183 3	0.488 8	0.488 8	$9.08 \times 10^{-7*}$
g7071	C/T	1.683 0	0.066 7	0.406 1	0.406 1	$1.36 \times 10^{-7*}$
g7588	G/T	1.743 8	0.616 7	0.426 5	0.426 5	0.000 456 2*
g7606	T/C	1.743 8	0.616 7	0.426 5	0.426 5	0.000 456 2*
g7619	T/C	1.743 8	0.616 7	0.426 5	0.426 5	0.000 456 2*
g8320	T/C	1.743 8	0.616 7	0.426 5	0.426 5	0.000 456 2*
g8328	G/A	1.743 8	0.616 7	0.426 5	0.426 5	0.000 456 2*
g8406	C/A	1.743 8	0.616 7	0.426 5	0.426 5	0.000 456 2*
g8528	A/G	1.743 8	0.616 7	0.426 5	0.426 5	0.000 456 2*
g8548	A/G	1.743 8	0.616 7	0.426 5	0.426 5	0.000 456 2*
g8598	G/A	1.973 1	0.583 3	0.476 5	0.476 5	0.110 2
g8715	T/C	1.683 8	0.066 7	0.406 1	0.406 1	$1.36 \times 10^{-10*}$
g9646	T/C	1.882 4	0.750 0	0.468 8	0.468 8	$9.27 \times 10^{-7*}$
g9649	T/C	1.882 4	0.750 0	0.468 8	0.468 8	$9.27 \times 10^{-7*}$

续表 3to be continued

单核苷酸多态性位点 SNPs	碱基类型 Type of base	有效等位 基因数 N_e	期望杂合度 H_e	观测杂合度 H_o	遗传多态性 PIC	Hardy-Weinberg 平衡 (p 值) HWE (p value)
g9657	A/G	1.882 4	0.750 0	0.468 8	0.468 8	$9.27\times10^{-7*}$
g9846	A/G	1.882 4	0.750 0	0.468 8	0.468 8	$9.27\times10^{-7*}$
g9884	C/T	1.882 4	0.750 0	0.468 8	0.468 8	$9.27\times10^{-7*}$
g9902	T/C	1.882 4	0.750 0	0.468 8	0.468 8	$9.27\times10^{-7*}$
g10120	T/C	1.180 3	0.167 0	0.152 8	0.152 8	1
g10187	C/G	1.882 4	0.750 0	0.468 8	0.468 8	$9.27\times10^{-7*}$
g10221	G/A	1.882 4	0.750 0	0.468 8	0.468 8	$9.27\times10^{-7*}$
g10368	C/T	1.882 4	0.750 0	0.468 8	0.468 8	$9.27\times10^{-7*}$
g10444	C/T	1.896 7	0.733 3	0.472 8	0.472 8	$1.88\times10^{-5*}$
g10545	T/C	1.867 2	0.733 3	0.464 4	0.464 5	$2.56\times10^{-6*}$
g10559	T/G	1.882 4	0.750 0	0.468 8	0.468 8	$9.27\times10^{-7*}$
g10575	T/G	1.882 4	0.750 0	0.468 8	0.468 8	$9.27\times10^{-7*}$
g10658	A/C	1.882 4	0.750 0	0.468 8	0.468 8	$9.27\times10^{-7*}$
g10661	C/T	1.239 5	0.083 3	0.193 2	0.193 1	0.000 693 7 [*]
g10994	A/G	1.600 0	0.066 7	0.375 0	0.375 0	$8.73\times10^{-10*}$

注：*表示偏离 Hardy-Weinberg 定律 ($p<0.05$)。
Note: *. Devating from Hardy-Weinberg equilibrium ($p<0.05$).

表4 肌球蛋白重链基因 SNPs 位点与各生长性状相关性
Table 4 Correlations between different genotypes at SNP loci of MYH and various growth traits

单核苷酸 多态性位 点 SNPs	位置 Location	基因型 Genotype	样本数 Number	体质量 Body mass/kg	全长 Total length/cm	体长 Body length/cm	头长 Head length/cm	体高 Body height/cm	尾柄高 Caudal peduncle height/cm
g4482	外显子 11	AA	15	0.58±0.06 ^a	32.48±1.00 ^a	27.30±0.88 ^a	10.31±0.53 ^a	9.65±0.63 ^a	3.35±0.29 ^a
		AG	45	0.30±0.21 ^b	21.36±7.52 ^b	18.17±6.35 ^b	6.75±2.51 ^b	6.07±2.65 ^b	2.15±0.88 ^b
		CC	8	0.27±0.19 ^a	20.18±6.65 ^a	17.08±5.53 ^a	6.29±2.08 ^a	5.52±2.48 ^a	2.01±0.84 ^a
g5196	外显子 14	CT	37	0.31±0.22 ^a	21.62±7.68 ^a	18.41±6.49 ^a	6.84±2.58 ^a	6.19±2.68 ^a	2.17±0.88 ^a
		TT	15	0.58±0.06 ^b	32.48±1.00 ^b	27.30±0.88 ^b	10.31±0.53 ^b	9.65±0.63 ^b	3.35±0.29 ^b
g5253	外显子 14	AA	8	0.27±0.19 ^a	20.18±6.65 ^a	17.08±5.53 ^a	6.29±2.08 ^a	5.52±2.48 ^a	2.01±0.84 ^a
		AC	18	0.17±0.11 ^b	16.88±3.51 ^b	14.40±3.02 ^b	5.35±1.37 ^a	4.57±1.31 ^b	1.67±0.51 ^b
		CC	34	0.50±0.18 ^a	28.92±6.70 ^a	24.45±5.59 ^a	9.16±2.26 ^b	8.57±2.30 ^a	2.96±0.77 ^a
g5322	外显子 14	TT	16	0.56±0.12 ^a	31.41±4.25 ^a	26.41±3.56 ^a	9.96±1.43 ^a	9.29±1.53 ^a	3.23±0.54 ^a
		TC	44	0.30±0.22 ^b	21.50±7.56 ^b	18.29±6.38 ^b	6.79±2.52 ^b	6.12±2.66 ^b	2.16±0.88 ^b
g5391	外显子 14	AA	16	0.56±0.12 ^a	31.41±4.25 ^a	26.41±3.56 ^a	9.96±1.43 ^a	9.29±1.53 ^a	3.23±0.54 ^a
		AG	44	0.30±0.22 ^b	21.50±7.56 ^b	18.29±6.38 ^b	6.79±2.52 ^b	6.12±2.66 ^b	2.16±0.88 ^b
g5417	外显子 14	CC	15	0.58±0.06 ^a	32.48±1.00 ^a	27.30±0.88 ^a	10.31±0.53 ^a	9.65±0.63 ^a	3.35±0.29 ^a
		CG	45	0.30±0.21 ^b	21.36±7.52 ^b	18.17±6.35 ^b	6.75±2.51 ^b	6.07±2.65 ^b	2.15±0.88 ^b
g8598	外显子 25	AA	10	0.49±0.19 ^a	29.11±6.31 ^a	24.36±5.10 ^a	9.27±2.13 ^a	8.17±2.01 ^a	2.87±0.69 ^a
		AG	47	0.35±0.22 ^b	23.24±8.09 ^b	19.74±6.82 ^b	7.32±2.63 ^b	6.79±2.85 ^b	2.38±0.96 ^b
		GG	3	0.31±0.21	21.77±7.73	18.57±6.60	7.17±2.99	5.73±2.89	2.05±0.78

续表 4

to be continued

单核苷酸多态性位点 SNPs	位置 Location	基因型 Genotype	样本数 Number	体质量 Body mass/kg	全长 Total length/cm	体长 Body length/cm	头长 Head length/cm	体高 Body height/cm	尾柄高 Caudal peduncle height/cm
g9846	外显子 29	GG	15	0.58±0.06 ^a	32.48±1.00 ^a	27.30±0.88 ^a	10.31±0.53 ^a	9.65±0.63 ^a	3.35±0.29 ^a
		AG	45	0.30±0.21 ^b	21.36±7.52 ^b	18.17±6.35 ^b	6.75±2.51 ^b	6.07±2.65 ^b	2.15±0.88 ^b
g10221	外显子 31	AA	15	0.58±0.06 ^a	32.48±1.00 ^a	27.30±0.88 ^a	10.31±0.53 ^a	9.65±0.63 ^a	3.35±0.29 ^a
		AG	45	0.30±0.21 ^b	21.36±7.52 ^b	18.17±6.35 ^b	6.75±2.51 ^b	6.07±2.65 ^b	2.15±0.88 ^b
g10368	外显子 31	TT	15	0.58±0.06 ^a	32.48±1.00 ^a	27.30±0.88 ^a	10.31±0.53 ^a	9.65±0.63 ^a	3.35±0.29 ^a
		TC	45	0.30±0.21 ^b	21.36±7.52 ^b	18.17±6.35 ^b	6.75±2.51 ^b	6.07±2.65 ^b	2.15±0.88 ^b
g10444	外显子 31	TC	44	0.30±0.22 ^a	21.47±7.57 ^a	18.26±6.40 ^a	2.19±0.43 ^a	6.11±2.67 ^a	2.16±0.88 ^a
		TT	15	0.58±0.06 ^b	32.48±1.00 ^b	27.30±0.88 ^b	10.31±0.53 ^b	9.65±0.63 ^b	3.35±0.29 ^b
g10658	外显子 32	CC	15	0.58±0.06 ^a	32.48±1.00 ^a	27.30±0.88 ^a	10.31±0.53 ^a	9.65±0.63 ^a	3.35±0.29 ^a
		CA	45	0.30±0.21 ^b	21.36±7.52 ^b	18.17±6.35 ^b	6.75±2.51 ^b	6.07±2.65 ^b	2.15±0.88 ^b

注：均值±标准误。同一列中不同上标字母表示差异显著 ($p<0.05$)。

Note: Mean±SE. Values with the different superscript letters within same column are significantly different ($p<0.05$).

氨酸；其余均属同义突变。位点 g10444 T>C 虽存在 3 种基因型，但 CC 型个体仅 1 个(体质量 0.16 kg，全长 16.50 cm，体长 14.40 cm，头长 5.30 cm，体高 4.27 cm，尾柄高 1.40 cm)。通过对 12 个 SNPs 位点各基因型生长性状的比较分析发现，杂合基因型均不属于优势基因型。

3 讨论

3.1 肌球蛋白重链基因结构特征

肌球蛋白约占鱼类骨骼肌蛋白总质量的 60%^[31]，在肌肉生长和运动过程中具有结构和动力学功能^[32]。有研究表明在太阳科鱼类中，肌球蛋白重链基因在游泳和进食过程中对肌肉收缩起重要作用^[33]。尽管肌球蛋白重链基因的分子结构已在多种鱼类中被报道，但在石斑鱼类中的研究较少。本研究获得杉虎杂交斑的肌球蛋白重链基因全长序列 (12 129 bp)，包含 36 个外显子和 35 个内含子。经与其他物种比对分析，发现其在氨基酸组成及蛋白结构上均呈现较高的保守性。这也与其他文献报道的结果一致^[12-13]。肌球蛋白重链基因包含 4 种结构域，即 Myosin_N、MYSc、IQ 和 Myosin_tail_1。Myosin_N 区域主要形成球状头部，保守性较强，是肌球蛋白家族的主要功能域。MYSc 结构是分子马达，具有 ATP 酶活性。ATP 酶合成和水解的速率与肌肉新陈代谢和生理学特征息息相关，例如收缩速率、肌肉类型等^[34]。MYSc 结构通过分子间构型变化可以调节肌球蛋白与 ATP 的结合能力，其

与肌动蛋白结合位点可直接参与肌肉运动和能量供应^[35]。IQ 结构域为保守结构域，一般包含 23 个氨基酸，常作为 EF-hand 家族的结合位。在软体动物中，Ca²⁺ 和 EF-hand 结构域的结合可引发肌肉收缩^[36]。Myosin_tail_1 具有决定肌球蛋白与膜结合或与另外肌球蛋白分子相互反应的功能^[37]，同时也是构成粗肌丝的基础结构^[38]。Myosin_N 和 IQ 在本研究中显示出较高的序列保守性。而在 MYSc 和 Myosin_tail_1 区域，发现存在杉虎杂交斑特异性氨基酸位点，与其他物种均不同。肌球蛋白重链的蛋白高级结构在杉虎杂交斑与棕点石斑鱼中未见明显差异，表明该基因在杉虎杂交斑中仍具有正常的生物学功能。Nakaya 和 Watabe^[39] 提出，不同驯化温度下鲤 (*Cyprinus carpio*) Myosin_tail_1 的 α -螺旋结构有所差异，进而影响该基因的表达。相较于其他石斑鱼，杉虎杂交斑的肌球蛋白重链基因在氨基酸组成上发生改变，这种改变对基因的表达是否有影响仍有待进一步研究。除了仅存在于杉虎杂交斑中的特异性氨基酸位点外，还在 Myosin_N、MYSc 和 Myosin_tail_1 区域检测到石斑鱼与其他鱼类的差异性位点。例如在 Myosin_N 第 37 位氨基酸，石斑鱼为缬氨酸，而其他鱼类为苏氨酸、异亮氨酸。遗传进化分析结果也证明，所有石斑鱼类紧密地聚集成一个分支，与其他鱼类分开。以上结果表明，肌球蛋白重链基因在石斑鱼进化过程中具有高度保守性，因此可作为石斑鱼类与其他

鱼类的分子鉴定标记。

3.2 肌球蛋白重链基因编码区 SNPs 位点分布特征

杉虎杂交斑肌球蛋白重链基因序列共检测到 62 个 SNPs 位点, 其中有 12 个分布于外显子。这些外显子区域包括 11、14、25、29、31 以及 32。其中位于外显子 14 的 SNPs 位点最多, 有 5 个; 其次是外显子 31, 为 3 个; 其余外显子均只含有 1 个 SNPs 位点。外显子 14 编码第 526—第 628 位氨基酸, 参与 MYSc 蛋白结构域。外显子 31 编码第 1 552—第 1 654 位氨基酸, 参与 Myosin_tail_1 蛋白结构域。以上结果表明这 2 个区域的遗传变异相对较高。从基因进化的角度分析, 功能基因在进化中其蛋白编码区保持高度的保守性以保障基因的正常功能。而通过对本研究中 3 种石斑鱼的肌球蛋白重链基因在 4 种蛋白结构域的氨基酸序列比对分析发现, 该基因在石斑鱼中有着极高的保守性, 但杉虎杂交斑仍存在与其他石斑鱼不同的特异性氨基酸位点。杉虎杂交斑是由棕点石斑鱼和清水石斑鱼种间杂交而来。杂交可以快速改变物种基因型, 使子代具备更强的遗传可塑性和更好的生理适应性, 为其具备优于亲本的表型性状奠定遗传基础^[40-41]。在 2 种杂交鲍 (*Haliotis rubra* × *H. laevigata* 和 *H. discus hannai* × *H. fulgens*) 中, 均有文献报道杂交带来的遗传变异可能是它们呈现杂交优势的潜在原因^[42-43]。杉虎杂交斑在生长速率上相较于亲本存在一定的优势^[44], 其肌球蛋白重链基因的核苷酸位点变异可能与其生长优势存在关联性, 但具体作用机制本研究并未涉及, 仍需进一步探究。

3.3 SNPs 位点与生长性状关联分析

位于肌球蛋白重链基因外显子区域的 12 个 SNPs 位点, 其 Ho 和 PIC 均高于 0.4, 属中等水平遗传多样性, 但不符合高水平遗传多样性标准。本研究的实验样本杉虎杂交斑为棕点石斑鱼与清水石斑鱼杂交获得的子一代, 属人工养殖群体。该群体虽未经历选育, 但其亲本均为选育群体。而定向选育会导致群体遗传多样性水平呈现一定程度下降^[45]。定向选育还可导致不利基因型逐渐丢失, 而使有利基因型得到累积^[46-47]。在 12 个 SNPs 位点中仅有 4 个位点包含 3 种基因型, 其余位点均发生基因型丢失事件。而这种基因型丢失可能在杉虎杂交斑 2 个亲本的重要经济性状中属于不利基因型或与隐性致死基因位点连锁, 进而在选育过程中遭到

淘汰。在马氏珠母贝、鳙 (*Aristichthys nobilis*) 中也发现与生长性状显著相关的 SNPs 位点存在基因型丢失现象, 认为这是适应选育的一种结果^[12,46,48]。现代分子育种策略是通过育种技术使后代富集优势基因或基因型。但实际育种情况非常复杂, 需要考虑基因与基因之间的互作关系, 以及不同基因型对性状的作用效应大小。因此, 某一基因型的丢失对整个性状的影响及其作用机制仍有待进一步探究。

通过重要调控基因筛选与经济性状相关的 SNPs 位点, 获得分子标记, 可应用于水产经济动物分子辅助选育工作^[49-50]。在鳊 *MYH-7* 基因 5' 端调控区筛选到与生长显著相关的 SNP 位点^[4]。在大口黑鲈中, 肌球蛋白重链基因在位于内含子的 C-6811T 位点存在与体质量、全长、体高以及尾柄长显著相关的基因型^[13]。而本研究中将位于外显子区域的 12 个 SNPs 位点与生长性状进行关联分析发现, 所有位点均与生长性状 (体质量、体长、全长、头长、体高、尾柄高) 呈显著性相关。在只有 2 种基因型的位点 g4482、g5322、g5391、g5417、g9846、g10221、g10368、g10658, 均为纯合基因型 (AA、TT、AA、CC、GG、AA、TT、CC) 的生长表型性状显著高于杂合基因型 (AG、TC、AG、CG、AG、AG、TC、CA), 成为优势基因型。具有 3 种基因型的位点 g5196、g5253、g8598 和 g10444, TT、CC、AA 和 TT 分别为优势基因型, 其生长表型数据均高于其他 2 种基因型。位点 g5196 T>C 和 g8598 A>G 显示出强连锁。2 个位点的联合作用相较于单个位点其效应可能会更强, 进而对性状的影响更大^[51]。上述结果显示, 杉虎杂交斑的肌球蛋白重链基因编码区存在与生长性状显著相关的 SNPs。Chen 等^[12] 在马氏珠母贝的肌球蛋白重链基因编码区同样检测到 18 个与生长性状显著相关的 SNPs, 与本研究结果一致。肌球蛋白重链基因氨基酸组成变异可对肌肉特性产生重要影响, 进而影响其功能^[52]。本研究仅发现位点 g5417 C>G 表现为错义突变, 该位点位于 MYSc 区域, 可能通过影响 MYSc 结构进而改变 ATP 酶活性。肌球蛋白重链头部 ATP 酶活性的差异与肌纤维的收缩速率极其相关^[53], 而高质量的肌肉收缩对肌肉的生长不可或缺^[54]。其余与生长相关的 SNPs 位点均为同义突变。在豹纹鳃棘鲈 (*Plectropomus leopardus*) 中同样发现有生长相关 SNPs 位点属同

义突变^[55]。同义突变可影响基因 mRNA 的二级结构,从而改变在翻译、翻译整体速度以及蛋白折叠过程中暂停周期的时间长度^[22,56-57]。这种普遍存在的长时间暂停会导致阅读框移码和蛋白质错误折叠^[58]。已有研究表明,基因外显子区域的同义突变位点确实会通过影响转录和转录后过程进而影响该基因的表达和生物学功能^[59]。本研究基于肌球蛋白重链基因 SNPs 位点与生长性状之间的关联分析,筛选获得生长候选标记。但由于样本数量有限,可能会带来抽样误差,从而影响研究结果的准确性,后续仍需继续扩大样本数量对候选位点进行进一步验证分析。

4 结论

本研究成功获得了杉虎杂交斑肌球蛋白重链基因的核苷酸序列全长,识别出完整的蛋白编码区,并分析了其蛋白功能结构域及高级结构,为解析该基因的生物学功能奠定了基础。同时,通过与其他 8 种鱼类的蛋白结构域氨基酸序列进行比对分析及基于全部氨基酸序列构建遗传进化树,鉴定到能够区别石斑鱼类和其他鱼类的氨基酸位点以及杉虎杂交斑的特异性位点。揭示肌球蛋白重链基因在物种进化中有着极高的保守性,而杂交可为生物带来遗传变异。此外,基于杉虎杂交斑肌球蛋白重链基因上发现的 62 个 SNPs 位点,筛选到 12 个位于外显子且与生长表型性状显著相关的位点。本研究填补了石斑鱼肌球蛋白重链基因的研究空白,同时为杉虎杂交斑生长优势个体的筛选提供了候选分子标记。

参考文献:

- [1] CAO L, MA J, LU Y, et al. Combining full-length transcriptome sequencing and next generation sequencing to provide insight into the growth superiority of the hybrid grouper [*Cromileptes altivelas* (♀) × *Epinephelus lanceolatus* (♂)] [J]. *PLoS One*, 2024, 19(10): e0308802.
- [2] DOS SANTOS M, BACKER S, AURADÉ F, et al. A fast Myosin super enhancer dictates muscle fiber phenotype through competitive interactions with Myosin genes [J]. *Nat Commun*, 2022, 13: 1039.
- [3] LEE L A, KARABINA A, BROADWELL L J, et al. The ancient sarcomeric myosins found in specialized muscles [J]. *Skelet Muscle*, 2019, 9(1): 7.
- [4] 刘召静, 陶妍, 王玲军, 等. 鲢肌球蛋白重链球状结构域的

cDNA 克隆及结构解析 [J]. *水产学报*, 2010, 34(3): 441-449.

- [5] CRAIG R, WOODHEAD J L. Structure and function of myosin filaments [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2006, 16(2): 204-212.
- [6] DONG J, CHEN Z H, SUN C F, et al. Cloning, SNP detection, and growth correlation analysis of the 5' flanking regions of two myosin heavy chain-7 genes in Mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2019, 228: 10-16.
- [7] LIANG C S, KOBIYAMA A, SHIMIZU A, et al. Fast skeletal muscle myosin heavy chain gene cluster of medaka *Oryzias latipes* enrolled in temperature adaptation [J]. *Physiol Genomics*, 2007, 29(2): 201-214.
- [8] HASAN S, ASAKAWA S, WATABE S, et al. Regulation of the expression of the myosin heavy chain (myh) gene *myh14* in zebrafish development [J]. *Mar Biotechnol*, 2021, 23: 821-835.
- [9] SHAKUR AHAMMAD A K, ASADUZZAMAN M D, BUGRAHAN CEYHUN S, et al. Multiple transcription factors mediating the expressional regulation of myosin heavy chain gene involved in the indeterminate muscle growth of fish [J]. *Gene*, 2019, 687: 308-318.
- [10] LI H J, YU H, LI Q. Striated myosin heavy chain gene is a crucial regulator of larval myogenesis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 179: 388-397.
- [11] 史宝, 孙冉冉, 柳学周, 等. 黄条鲷 (*Seriola aureovittata*) *MyHC* 基因克隆及其在早期发育阶段表达研究 [J]. *海洋与湖泊*, 2020, 51(2): 422-432.
- [12] CHEN Q Y, YU W M, HAO R J, et al. Molecular characterization and SNPs association with growth-related traits of myosin heavy chains from the pearl oyster *Pinctada fucata martensii* [J]. *Aquac Res*, 2022(7): 53.
- [13] 李胜杰, 姜鹏, 樊佳佳, 等. 大口黑鲈肌球蛋白重链基因 SNPs 的筛选及与生长性状的关联 [J]. *水产学报*, 2018, 42(3): 305-313.
- [14] AHAMMAD A K S, ASADUZZAMAN M, ASAKAWA S, et al. Regulation of gene expression mediating indeterminate muscle growth in teleosts [J]. *Mech Dev*, 2015, 137: 53-65.
- [15] AKOLKAR D B, KINOSHITA S, YASMIN L, et al. Fibre type-specific expression patterns of myosin heavy chain genes in adult torafugu *Takifugu rubripes* muscles [J]. *J Exp Biol*, 2010, 213(1): 137-145.
- [16] OVERTURF K, HARDY R W. Myosin expression levels in trout muscle: a new method for monitoring specific growth rates for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) on varied planes of nutrition [J]. *Aquac Res*, 2001, 32(4): 315-322.
- [17] DHILLON R S, ESBAUGH A J, WANG Y S, et al. Characterization and expression of a myosin heavy-chain isoform in juvenile walleye *Sander vitreus* [J]. *J Fish Biol*, 2009, 75(5): 1048-1062.
- [18] CAO L, CHEN P, HOU X R, et al. Genetic characteristics and growth patterns of the hybrid grouper derived from the hybridization of *Epinephelus fuscoguttatus* (female) × *Epinephelus polyphekadion* (male) [J]. *J Fish Biol*, 2023, 102(2): 328-339.
- [19] AMENYOGBE E, CHEN G, WANG Z L. Identification, characteri-

- zation, and expressions profile analysis of growth hormone receptors (GHR1 and GHR2) in hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus polyphekadion* ♂)[J]. *Genomics*, 2020, 112(1): 1-9.
- [20] AMENYOGBE E, CHEN G, HUANG J S, et al. Molecular profiling of growth hormone in the juvenile hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus polyphekadion* ♂)[J]. *Afr J Agric Res*, 2020, 15(1): 73-84.
- [21] CAO L, MA J, CHEN P, et al. Exploring the influence of DNA methylation and single nucleotide polymorphisms of the *Myostatin* gene on growth traits in the hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* (female) × *Epinephelus polyphekadion* (male))[J]. *Front Genet*, 2023, 14: 1277647.
- [22] BOOPATHI N M. Marker-assisted selection (MAS)[M]//Genetic mapping and marker assisted selection: basics, practice and benefits. 2nd ed. Singapore: Springer, 2020: 343-388.
- [23] LAL J, VAISHNAV A, SINGH S K, et al. Biotechnological innovation in fish breeding: from marker assisted selection to genetic modification[J]. *Discover Biotechnol*, 2024, 1: 7.
- [24] MORGIL H, GERCEK Y C, TULUM I. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in plant genetics and breeding[M]//ÇALIŞKAN M, EROL O, CEVAHIR-ÖZ G. The recent topics in genetic polymorphisms. Rijeka: IntechOpen, 2020: 1-12.
- [25] KAYUMOV F, KOSILOV V, GERASIMOV N, et al. The effect of SNP polymorphisms in growth hormone gene on weight and linear growth in crossbred Red Angus×Kalmyk Heifers[C]. Proceedings of the International Scientific and Practical Conference "Digital agriculture-development strategy" (ISPC 2019). Atlantis Press, 2019: 325-328.
- [26] HUYEN TRAN T T, NGUYEN H T, NGUYEN LE B T, et al. Characterization of single nucleotide polymorphism in IGF1 and IGF1R genes associated with growth traits in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus* Sauvage, 1878)[J]. *Aquaculture*, 2021, 538(1): 736542.
- [27] LYU S J, YANG P, LIU Y Y, et al. Genetic effects of MOGAT1 gene SNP in growth traits of Chinese cattle[J]. *Gene*, 2021, 769: 145201.
- [28] YE H F C, YANG R C, BOYLE T. POPGENE Version 1.31: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis quick user guide[M]. University of Alberta and Centre for International Forestry Research, 1999: 1-28.
- [29] BOSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. *Am J Hum Genet*, 1980, 32: 314-331.
- [30] BRITO L F, JAFARIKIA M, GROSSI D A, et al. Characterization of linkage disequilibrium, consistency of gametic phase and admixture in Australian and Canadian goats[J]. *BMC Genetics*, 2015, 16: 67.
- [31] OCHIAI Y, OZAWA H. Biochemical and physicochemical characteristics of the major muscle proteins from fish and shellfish[J]. *Fish Sci*, 2020, 86(5): 729-740.
- [32] CHEN L, PAN Y X, CHENG J, et al. Characterization of myosin heavy chain (MYH) genes and their differential expression in white and red muscles of Chinese perch, *Siniperca chuatsi*[J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 250: 125907.
- [33] CAMPION L A, CHOI S, MISTRY H L, et al. Myosin heavy chain and parvalbumin expression in swimming and feeding muscles of centrarchid fishes: the molecular basis of the scaling of contractile properties[J]. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2012, 163(2): 223-230.
- [34] SCHIAFFINO S, REGGIANI C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance[J]. *Physiol Rev*, 1996, 76: 371-423.
- [35] JENA B P. Myosin: cellular molecular motor[M]//JENA B P. Cellular nanomachines, Cham: Springer, 2020: 79-89.
- [36] SZENT-GYÖRGYI A G, KALABOKIS V N, PERREAULT-MICALE C L. Regulation by molluscan myosins[J]. *Mol Cell Biochem*, 1999, 190(1/2): 55-62.
- [37] OJIMA K. Myosin: formation and maintenance of thick filaments[J]. *Anim Sci J*, 2019, 90: 801-807.
- [38] STREHLER E E, STREHLER-PAGE M A, PERRIARD J C, et al. Complete nucleotide and encoded amino acid sequence of a mammalian myosin heavy chain gene: evidence against intron-dependent evolution of the rod[J]. *J Mol Bio*, 1986, 190(3): 291-317.
- [39] NAKAYA M, WATABE S. Differences in the thermal stability of acclimation temperature-associated types of carp myosin and its rod on differential scanning calorimetry[J]. *Biochemistry*, 1995, 34: 3114-3120.
- [40] WANG S, ZHOU P, HUANG X, et al. The establishment of an autotetraploid fish lineage produced by female allotetraploid hybrids × male homodiploid hybrids derived from *Cyprinus carpio* (female) × *Megalobrama amblycephala* (male)[J]. *Aquaculture*, 2020, 515: 734583.
- [41] SEEHAUSEN O. Hybridization and adaptive radiation[J]. *Trends Ecol Evol*, 2004, 19(4): 198-207.
- [42] KUBE P D, MCPHERSON L, KRSINICH A, et al. Genetic variation and heterosis of the interspecific abalone hybrid of *Haliotis rubra* and *H. laevigata*[J]. *Aquaculture*, 2024, 580: 740275.
- [43] ZHOU M C, ZHANG J P, HUANG M Q, et al. Genetic variation between a hybrid abalone and its parents (*Haliotis discus hannai* ♀ and *H. fulgens* ♂) based on 5S rDNA gene and genomic resequencing[J]. *Aquaculture*, 2024, 579: 740173.
- [44] JAMES C M, AI-THOBAITI S A, RASEM B M, et al. Potential of grouper hybrid (*Epinephelus fuscoguttatus* × *E. polyphekadion*) for aquaculture[J]. *NAGA: The ICLARM Quarterly*, 1999, 22: 19-23.
- [45] 田镇, 陈爱华, 曹奕, 等. 红壳色文蛤选育群体遗传多样性的微卫星分析[J]. *南方农业学报*, 2021, 52(9): 2582-2598.
- [46] LAI Z X, ADZIGBLI L D, CHEN Q Y, et al. Identification and allelic variants associated with cold tolerance of *PmPIAS* in *Pinctada fucata martensii*[J]. *Front Physiol*, 2021, 12: 634838.
- [47] CUEVAS A, RAVINET M, SÆTRE G P, et al. Intraspecific geno-

- mic variation and local adaptation in a young hybrid species[J]. *Mol Ecol*, 2021, 30(3): 791-809.
- [48] 高一凡, 俞小牧, 桂建芳, 等. 鳙 *bmi1b* 基因单核苷酸多态性及其与生长和体型性状的关联性[J]. *中国水产科学*, 2022, 29(4): 503-514.
- [49] WANG Z M, LIU Y, ZHENG Z, et al. A genome-wide association study identifies SNPs and candidate genes associated with nacre color of pearl oyster *Pinctada fucata martensii*[J]. *Aquaculture*, 2022, 561: 738743.
- [50] LYU D, HU Y L, WU H H, et al. Estimating breeding values for juvenile body weight using trait associated SNP assisted BLUP in turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. *Aquaculture*, 2019, 508: 46-51.
- [51] CLARK A G. The role of haplotypes in candidate gene studies[J]. *Genet Epidemiol*, 2004, 27(4): 321-333.
- [52] GAO Y, PENG L, ZHAO C F. MYH7 in cardiomyopathy and skeletal muscle myopathy[J]. *Mol Cell Biochem*, 2024, 479: 393-417.
- [53] WAGNER P D, GINIGER E. Hydrolysis of ATP and reversible binding to F-actin by myosin heavy chains free of all light chains[J]. *Nature*, 1981, 292: 560-562.
- [54] TIDBALL J G. Mechanical signal transduction in skeletal muscle growth and adaptation[J]. *J Appl Physiol*, 2005, 98: 1900-1908.
- [55] WANG T, WU X, SONG L L, et al. Identification of candidate growth-related SNPs and genes using GWAS and transcriptome analyses in leopard coral grouper (*Plectropomus leopardus*)[J]. *Aquaculture*, 2023, 574: 739677.
- [56] SHANKAR S, BANARJEE R, JATHAR S M, et al. De novo structure prediction of meteorin and meteorin-like protein for identification of domains, functional receptor binding regions, and their high-risk missense variants[J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2023, 42(9): 4522-4536.
- [57] RUIZ-de-la-CRUZ G, SIFUENTES-RINCÓN A M, PAREDES-SÁNCHEZ F A, et al. Analysis of nonsynonymous SNPs in candidate genes that influence bovine temperament and evaluation of their effect in Brahman cattle[J]. *Mol Biol Rep*, 2024, 51(1): 285.
- [58] WEN J D, LANCASTER L, HODGES C, et al. Following translation by single ribosomes one codon at a time[J]. *Nature*, 2008, 452(7187): 598-603.
- [59] WANG S Y, CHENG Y Y, LIU S C, et al. A synonymous mutation in *IGF-1* impacts the transcription and translation process of gene expression[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021, 26: 1446-1465.