

草鱼柠檬酸合酶基因 SNP 筛选 及与生长性状的关联分析

樊佳佳 刘小献 白俊杰 于凌云

中国水产科学研究院珠江水产研究所/

农业部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室, 广州 510380

摘要 根据草鱼(*Ctenopharyngodon idella*) EST-SNP 库中预测的柠檬酸合酶基因的 1 个 Contig 序列, 设计引物扩增该基因的部分序列, 然后采用 PCR 产物直接测序法筛选 SNP 突变点。测序的序列经比对后, 共筛选到 2 个在内含子 10 上的 SNP 突变点: A-386G 和 C-499G。随机选择同批繁殖和同塘混养的 144 尾草鱼对 2 个 SNP 位点用 Snapshot 方法进行检测和分型, 并统计基因型频率。A-386G 位点的 AA 基因型占 47.10%, AG 基因型占 38.41%, GG 基因型占 14.49%; C-499G 位点的 CC 基因型占 31.85%, CG 基因型占 46.67%, GG 基因型占 21.48%, 均属于中度多态位点。利用一般线性模型(GLM)分析 2 个 SNP 位点与草鱼 6 个生长性状(体质量、体长、体高、头长、尾柄长和尾柄高)的相关性, 结果显示, A-386G 和 C-499G 位点的不同基因型在这 6 个生长性状均值有差异, 但均不存在显著差异。将这 2 个 SNP 不同基因型两两组合, 一共组成 7 种双倍型(去掉频率小于 3% 的组合 D2 和 D5), GLM 相关分析表明 5 种双倍型在 5 个生长性状(体质量、体长、体高、尾柄长和尾柄高)上均存在差异, 其中在头长上存在显著差异, D6 双倍型(A-386G/AG 和 C-499G/GG)在 6 个生长性状上均值均最大, 属于生长优势双倍型。本研究显示, 筛选到的柠檬酸合酶基因上的 2 个 SNP 位点具有用于草鱼生长性状的分子辅助育种的潜力。

关键词 草鱼; 柠檬酸合酶基因; 单核苷酸多态性; 生长性状

中图分类号 Q 959.46⁺8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2014)03-0084-06

柠檬酸合酶(citrate synthase, CS/EC 2.3.3.1)是三羧酸循环中的第一步关键酶, 三羧酸循环是动物体内糖类、脂类和氨基酸三大营养素的最终代谢通路, 又是糖类、脂类、氨基酸代谢联系的枢纽^[1-2]。柠檬酸合酶基因活性降低, 能引起机体能量代谢紊乱, 活性氧簇(ROS)产物增多, 氧化性损伤和细胞凋亡等^[3-4]。因其功能重要, 近年来柠檬酸合酶基因逐渐成为农业、医学以及生命科学领域方面的研究热点。在农业上研究人员采用转基因手段将同源或异源柠檬酸合酶基因转入目标植物体内, 以增加植物体内该基因表达量, 从而提高植物体生长、抗逆和营养成分等性状^[5-7]。研究发现, 在小鼠中柠檬酸合酶基因突变可以影响小鼠能量代谢、生长和神经系统功能^[8-9]。在人体中柠檬酸合酶基因主要参与脂肪酸氧化, 该基因突变或表达受阻, 导致机体脂肪代谢受

阻, 进而会影响生长、发育等很多方面^[10]。

目前柠檬酸合酶基因在植物和小鼠中研究较多, 在鱼类中对于柠檬酸合酶基因研究仅集中在通过检测柠檬酸合酶活性, 间接评价鱼体线粒体功能与生态适应性^[11], 而有关柠檬酸合酶基因多态性对鱼类生长影响的研究尚未见报道。笔者在草鱼 EST-SNP 库中查询到柠檬酸合酶基因有 SNP 突变点, 对该预测 SNP 进行验证, 并将筛选的 SNP 位点与体质量、体长等生长性状进行关联分析, 以期对草鱼生长性状的分子标记辅助育种提供候选标记。

1 材料与方法

1.1 试验鱼

用于筛选柠檬酸合酶基因 SNP 位点和生长性状关联分析的草鱼样本取自广东省佛山市白金水产

收稿日期: 2013-06-24

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-46-03)、国家科技支撑计划项目(2012BAD26B02)和国家高技术研究发展计划(2011AA100403) (“863”)项目

樊佳佳, 助理研究员。研究方向: 遗传育种。E-mail: fanjiajiaok@163.com

通信作者: 白俊杰, 研究员。研究方向: 水产动物繁育。E-mail: baijj2005@21cn.com

种苗有限公司。在同批繁殖、同塘饲养的草鱼群体中随机选择144尾用于生长性状关联分析。144尾草鱼均测量体质量、体长、体高、头长、尾柄长和尾柄高等生长数据,并剪取尾鳍保存于无水乙醇中备用。

1.2 主要试剂

DNA提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。*Taq* DNA聚合酶体系为华美生物工程有限公司产品。琼脂糖、无水乙醇等试剂均购自广州威佳科技有限公司。

1.3 SNP位点的筛选

根据笔者所在实验室 Roche 454 对草鱼进行转录组测序建立的 EST-SNP 数据库中的柠檬酸合酶基因序列,利用 Primer Premier 5.0 软件设计 1 对引物 P1(F:GTTTAAGCTCCTCCCCTTCCTG;R:GCAGGGCAAGGCCAAGAAC)。从 144 个草鱼 DNA 样本中随机挑选 20 个 DNA 样本用于扩增 P1 引物和筛选 SNP 位点。PCR 反应体系共 20 μ L;其中 10 \times PCR buffer 为 2.0 μ L,dNTP(10 mmol/L)为 0.3 μ L,*Taq* 酶(5 U/ μ L)为 0.2 μ L,上下游引物(20 μ mol/L)分别为 0.4 μ L,基因组 DNA(50 ng/ μ L)为 1 μ L,ddH₂O 为 15.7 μ L。PCR 扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,63 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共进行 35 个循环;最后再 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min,12 $^{\circ}$ C 保存。将扩增产物在含有 EB 的 1.5% 的琼脂糖凝胶中以 5 V/cm 进行电泳检测。PCR 产物直接送上海博尚生物技术有限公司进行测序,测序结果用 Vector NIT Suite 11.0 比对分析,获得 SNP 突变点。

1.4 SNP位点的分型

将所获得的柠檬酸合酶基因片段上的 2 个 SNP 位点送上海捷瑞生物工程有限公司应用 Snapshot 方法进行分型,分型的样品为 144 尾草鱼基因组 DNA,每个样品的 DNA 质量浓度为 100~400 ng/ μ L。

Snapshot 分型流程:设计引物分别特异扩增所筛选的 SNP 突变点;扩增后取 15 μ L PCR 产物加 2 U *Exo* I 和 5 U *Sap* 酶去除反应产物中的引物及 dNTPs,37 $^{\circ}$ C 保温 1 h,然后 75 $^{\circ}$ C 高温灭活 *Exo* I 和 *Sap* 酶 15 min;然后进行延伸反应。取 1 μ L 延伸产物,加 8 μ L 上样 loading buffer (8 μ L loading buffer + 0.2 μ L GS120LIZ),95 $^{\circ}$ C 变性 3 min,立即冰水浴 4 min,在 ABI3730XL 测序仪上进行检测。

1.5 数据处理

采用 Popgene 32 (version 3.2) 软件计算有效等位基因数 (N_e)、观测杂合度 (H_o)、期望杂合度 (H_e) 和等位基因频率等遗传参数。利用 SPSS 17.0 软件一般线性模型 (general linear model, GLM) 计算柠檬酸合酶基因片段的不同的 SNP 位点基因型与生长性状 (体质量、体长、体高、头长、尾柄长和尾柄高) 之间的关联分析并进行最小二乘分析 (least-significant difference, LSD)。

2 结果与分析

2.1 柠檬酸合酶基因序列扩增

引物 P1 在 20 个样本有 19 个扩增到 1 200 bp 左右的片段 (图 1)。将扩增片段的测序结果用 Vector NIT Suite 11.0 进行序列比对,共发现 2 个 SNP 突变点 (图 2 和图 3),将 P1 扩增到的片段与 NCBI 中登录的斑马鱼柠檬酸合酶基因的序列 (NM_199598.1) 比对发现,扩增到的序列为内含子 10 的序列 875 bp 和外显子 11 的序列 188 bp。

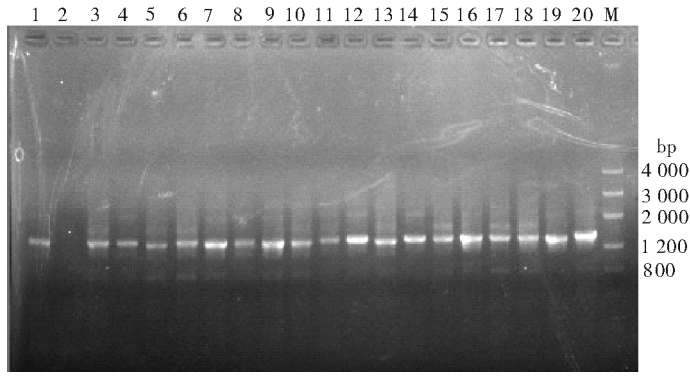
2.2 柠檬酸合酶基因序列的 SNP 位点筛选

PCR 产物直接测序和比对后,在内含子 10 上获得了 2 个 SNP 位点 (图 2 和图 3),以外显子 11 起始密码子为起点,这 2 个 SNP 分别命名为 A-386G 和 C-499G。

2.3 柠檬酸合酶基因 2 个 SNP 位点在草鱼群体中分布

经 Snapshot 分型和 Popgene 32 (Version 3.2) 处理,144 个草鱼样本上 2 个 SNP 位点的多态性遗传参数见表 1。根据 $0.25 < PIC < 0.50$ 为中度多态原则,分析发现这 2 个位点均属于中度多态位点,经 χ^2 检验得到 2 个位点均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态 ($P > 0.05$)。

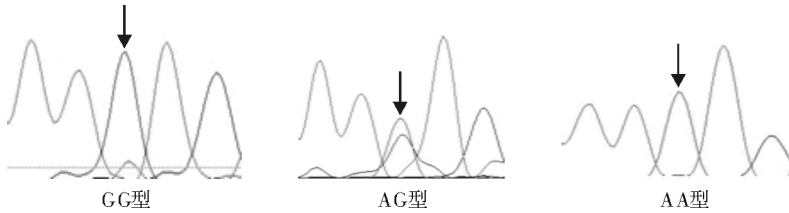
SNP 位点基因型及等位基因频率的统计结果见表 2。在 144 个草鱼样本中,A-386G 位点的 AA 基因型最多,AG 基因型次之,GG 基因型最少,等位基因 A 频率显著高于等位基因 C,推测该位点的等位基因 A 为优势等位基因。C-499G 位点的 CG 基因型最多,CC 基因型次之,GG 基因型最少,等位基因 C 频率比等位基因 G 频率稍高。



M; Marker III; 1-20:不同来源的草鱼样本 Grass carp samples, respectively.

图 1 草鱼柠檬酸合酶基因 Contig 片段的基因组扩增

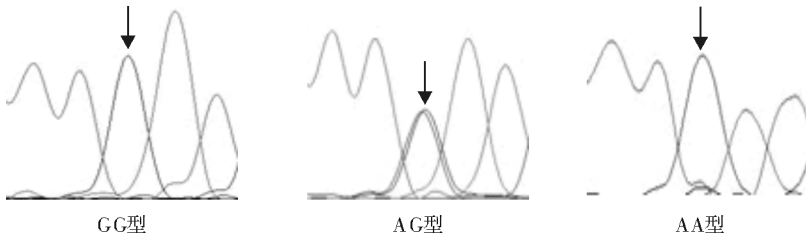
Fig. 1 The genome amplification result of Contig of citrate synthase gene in grass carp



突变点用箭头标出 Arrow indicates A-386G site.

图 2 A-386G 位点测序峰图

Fig. 2 DNA sequencing map of A-386G site



突变点用箭头标出 Arrow indicates C-499G site.

图 3 C-499G 位点测序峰图

Fig. 3 DNA sequencing map of C-499G site

2.4 柠檬酸合酶基因 SNP 位点与生长性状关联分析

将筛选到的 2 个 SNP 位点 6 种基因型与体质量、体长等 6 个生长性状进行 GLM 关联分析, 结果见表 3。A-386G 和 C-499G 位点的不同基

因型在 6 个生长性状上的差异不显著 ($P > 0.05$)。但 A-386G 杂合型 AG 在 6 个生长性状均值均高于纯合型 AA 和 GG。C-499G 纯合型 GG 基因型在 6 个生长性状均值均高于杂合型 CG 和纯合型 CC。

表 1 柠檬酸合酶基因 2 个 SNP 位点的遗传参数

Table 1 The polymorphic parameters of two SNP sites of citrate synthase gene

位点 Site	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	多态信息含量 PIC	有效等位基因数 N_e	Hardy-Weinberg 平衡 Hardy-Weinberg equilibrium
A-386G	0.385 2	0.450 9	0.348 3	1.815 8	$P=0.08(\chi^2=2.90)$
C-499G	0.466 7	0.496 5	0.372 3	1.978 7	$P=0.48(\chi^2=0.49)$

表 2 柠檬酸合酶基因 A-386G 和 C-499G 位点基因型及其等位基因频率

Table 2 Genotype and allele frequency of A-386G and C-499G site of citrate synthase gene

位点 Site	样品数 Number	基因型/频率/% Genotype/Frequency			等位基因/频率/% Allele gene/Frequency	
A-386G	138	AA/47.10	AG/38.41	GG/14.49	A/66.30	G/33.70
C-499G	135	CC/1.85	CG/46.67	GG/21.48	C/55.19	G/44.81

表 3 柠檬酸合酶基因 SNP 位点不同基因型的生长性状的关联分析

Table 3 Association of citrate synthase gene polymorphisms with growth traits

SNP 位点 SNP site	基因型 Genotype	体质量/g Body weight	体长/cm Body length	体高/cm Body depth	头长/cm Head length	尾柄长/cm Caudal peduncle length	尾柄高/cm Caudle peduncle depth
A-386G	AA	1 282.96±42.87	42.26±0.55	9.80±0.14	9.19±0.13	7.25±0.11	4.68±0.07
	AG	1 301.48±47.47	42.77±0.61	9.83±0.15	9.16±0.14	7.41±0.12	4.75±0.08
	GG	1 282.06±77.28	41.71±0.99	9.75±0.25	9.19±0.14	7.14±0.20	4.49±0.12
C-499G	CC	1 227.56±52.23	41.56±0.68	9.67±0.17	8.99±0.15	7.19±0.14	4.62±0.08
	CG	1 307.66±43.15	42.29±0.56	9.70±0.14	9.15±0.13	7.33±0.12	4.67±0.07
	GG	1 322.48±63.60	42.70±0.83	9.94±0.20	9.35±0.19	7.28±0.17	4.60±0.10

A-386G 和 C-499G 两个位点共组成 7 种双倍型,去掉 2 个频率小于 3% 的双倍型 D2 和 D5 后与生长性状进行关联分析,结果见表 4。在头长上,双倍型 D6 的均值最大,双倍型 D4 的均值最小,双倍型 D3、D6 和 D7 的均值与双倍型 D1 和 D4 的均值存在显著差异($P<0.05$),推测双倍型 D3、D6 和 D7 对头长有正相关,而双倍型 D1 和 D4 对头长有负相

关;在体质量上,双倍型 D3 和 D6 的均值高于双倍型 D1 和 D4 的均值,均接近显著差异水平,推测双倍型 D3 和 D6 对体质量也存在正相关;在体长、体高、尾柄长和尾柄高性状上双倍型的均值之间均不存在显著差异,但双倍型 D6 的均值均高于其他双倍型,表明双倍型 D6 属于生长优势双倍型。分析去掉的 2 个频率小于 3% 的双倍型 D2 和 D5,表明

表 4 柠檬酸合酶基因不同双倍型与草鱼生长性状的关联分析¹⁾

Table 4 Association of citrate synthase gene diplotype with growth traits

双倍型 Diplotype	SNP 位点 SNP site		频率/% Frequency	体质量/g Body weight	体长/cm Body length	体高/cm Body depth	头长/cm Head length	尾柄长/cm Caudal peduncle length	尾柄高/cm Caudle peduncle depth
	C-499G	A-386G							
D1	CC	AA	40	1 222.41±54.38	41.73±0.71	4.62±0.09	9.00±0.16 b	7.22±0.15	4.62±0.09
D3	CG	AA	21	1 393.25±75.06	42.80±0.98	4.66±0.12	9.53±0.22 abc	7.33±0.20	4.66±0.12
D4	CG	AG	38	1 262.86±55.80	42.04±0.73	4.68±0.09	8.95±0.16 c	7.34±0.15	4.68±0.09
D6	GG	AG	11	1 374.34±103.71	44.41±1.35	4.84±0.17	9.74±0.30 a	7.55±0.28	4.85±0.17
D7	GG	GG	17	1 299.36±83.42	41.71±1.09	4.46±0.13	9.15±0.24 abc	7.09±0.22	4.46±0.13
D2	CC	AG	1	1 394.00	43.41	5.18	9.65	8.18	5.18
D5	CG	GG	2	1 087.05±43.21	39.26±1.17	4.35±0.39	8.84±0.71	7.33±0.25	4.35±0.19

1)表中数值为平均值±标准误差,同一列字母不同表示差异显著($P<0.05$)。The figures are mean±standard error, values with different superscript letters within a column indicates significant difference at $P<0.05$.

在体质量、体长、体高、头长、尾柄长和尾柄高的均值上,双倍型 D2 均比其他双倍型高,双倍型 D5 均比其他双倍型低。

3 讨论

在草鱼 EST-SNP 库中查阅到柠檬酸合酶基因的一个 contig 有 4 个 SNP 突变点,考虑到该基因的突变很可能会影响草鱼机体能量代谢,进而可能对草鱼生长性状存在影响,我们将该基因作为草鱼生长性状的候选基因进行分析。根据 EST 库柠檬酸

合酶基因序列设计引物,采用 PCR 产物直接测序法验证,发现预测的 4 个 SNP 突变点均不存在,但在内含子 10 上新发现了 2 个 SNP 突变点(A-386G 和 C-499G)。曹婷婷等^[12]在草鱼 EST-SNP 库中对羧肽酶 A4 基因预测的 SNP 位点进行验证,也均不存在,而在内含子 3 上检测到 2 个 SNP 位点。李宏俊等^[13]对紫贻贝 EST 库中 SNP 进行验证,共设计 30 对引物验证预计的 SNP 位点,结果表明 20% 没有扩增出产物,33% 没有预计的突变点,47% 有预计的突变点,可见 EST 库中获得的 SNP 假阳性相当高。

分析造成 EST 库中 SNP 假阳性可能原因是:构建 cDNA 文库时,各种反转录酶和 DNA 聚合酶会不可避免地引入错配^[14];EST 测序往往只是进行单次测序,而测序方法本身固有的局限性使得碱基间测序正确率各不相同,可能对基于生物信息学的 SNP 发掘造成干扰,因此,需要利用有效的判别标准和算法以排除假阳性位点^[15]。例如鲤 EST-SNP 挖掘方法是严格设置 QualitySNP 软件参数,筛选的 SNP 假阳率才可大大降低^[16]。

在生物体基因组中 SNP 标记分布广泛,根据它们在基因组分布的位置可分为基因编码区 SNP 和非编码区 SNP^[17-18]。基因编码区 SNP 在外显子上的变异率为非编码区的 1/5^[18],研究表明,基因编码区 SNP 突变对生物育种有重要意义,但有研究证明非编码区的 SNP 突变对该基因的表达效应同样有一定的影响^[19],如 Graessmann 等^[20]对单纯疱疹病毒(HSV)tk 编码区和 SV40 病毒 T-抗原内含子进行体外单一位点甲基化,结果均导致基因失活。也就是说某些候选基因内含子的突变对生物的性状也有一定的影响。本研究结果表明,草鱼柠檬酸合酶基因内含子 10 上发现了 2 个突变点(A-386G 和 C-499G),这 2 个突变点的不同基因型在体质量、体长、体高、头长、尾柄长和尾柄高均有差异,但不存在显著差异($P>0.05$)。利用单个标记的基因型与性状进行关联分析,往往存在位点信息模糊和不够精确等问题^[21],单倍型(haplotype)分析方法的出现很好地解决了这些问题。刘福平等^[22]从罗非鱼 MC4R 基因中筛选到 5 个 SNP 突变点,经关联分析表明与生长性状均不存在显著差异,但将这 5 个突变点不同基因型组合成 7 种双倍型,双倍型 D4 和 D2 均与其他双倍型有差异,属于负效双倍型。刘小献等^[23]从草鱼 GSTR 基因上筛选到 2 个 SNP 位点,将这 2 个位点组合成 6 种双倍型,双倍型 D1 个体的体质量明显高于双倍型 D3 和 D6。本试验将 A-386G 和 C-499G 两个位点组成的 5 种双倍型进行关联分析,在体质量、体长、头长、体高、尾柄长和尾柄高方面,除了头长存在显著差异($P<0.05$),双倍型在其他性状上的均值均不存在显著差异,但双倍型 D6 的均值均高于其他双倍型,说明双倍型 D6 属于生长优势双倍型。分析频率小于 3% 的双倍型 D2 和 D5,显示在体质量、体长、头长、体高、头长、尾柄长和尾柄高的均值上,双倍型 D2 均比其他双倍型高,双倍型 D5 均比其他双倍型低,推测双倍型 D2 可能对草鱼的生长性状有正相关,而双倍型 D5

对草鱼的生长性状有负相关,下一步工作要增加关联的样本数,着重分析双倍型 D2 和 D5 的影响效用,并期待其是一个比较好的用于选育生长快的草鱼的有效候选标记。

参 考 文 献

- [1] SCHNARRENBERGER C, MARTIN W. Evolution of the enzymes of the citric acid cycle and the glyoxylate cycle of higher plants: a case study of endosymbiotic gene transfer[J]. *Eur J Biochem*, 2002, 269(3): 868-883.
- [2] PRACHAROENWATTANA I, CORNAH J E, SMITH S M. Arabidopsis peroxisomal citrate synthase is required for fatty acid respiration and seed germination[J]. *The Plant Cell*, 2005, 17(7): 2037-2048.
- [3] BALABAN R S, NEMOTO S, FINKEL T. Mitochondria, oxidants, and aging[J]. *Cell*, 2005, 120(4): 483-495.
- [4] DIRKS A J, HOFER T, MARZETTI E, et al. Mitochondrial DNA mutations, energy metabolism and apoptosis in aging muscle[J]. *Ageing Research Reviews*, 2006, 5(2): 179-195.
- [5] 胡利华, 吴慧敏, 周泽民, 等. 利用农杆菌介导法将柠檬酸合成酶基因(CS)导入水稻品种明恢 86 [J]. *分子植物育种*, 2006, 4(2): 160-166.
- [6] 胡清泉, 王奇峰, 李昆志, 等. 烟草柠檬酸合成酶基因的克隆及其光诱导型植物表达载体的构建 [J]. *草业学报*, 2009, 18(4): 161-167.
- [7] 张秀梅, 杜丽清, 孙光明, 等. 菠萝果实发育过程中有机酸含量及相关代谢酶活性的变化 [J]. *果树学报*, 2007, 24(3): 381-384.
- [8] JOHNSON K R, GAGNON L H, LONGO-GUESS C, et al. Association of a citrate synthase missense mutation with age-related hearing loss in A/J mice[J]. *Neurobiology of Aging*, 2012, 33(8): 1720-1729.
- [9] 吴淦宪, 董为伟. 实验性鼠脑缺血时脑细胞线粒体酶活性的变化——人工虫草菌丝的抗线粒体损害作用[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 1995, 21(2): 75-77.
- [10] BONACHE S, MARTINEZ J, FERNÁNDEZ M, et al. Single nucleotide polymorphisms in succinate dehydrogenase subunits and citrate synthase genes: association results for impaired spermatogenesis[J]. *International Journal of Andrology*, 2007, 30(3): 144-152.
- [11] 闫玉莲, 谢小军. 南方鲇不同组织间线粒体代谢的比较研究 [J]. *水生生物学报*, 2011, 35(2): 262-269.
- [12] 曹婷婷, 刘小献, 白俊杰, 等. 草鱼羧肽酶 A4 基因部分序列多态性及生长性状关联分析 [J]. *南方农业学报*, 2012, 43(3): 380-384.
- [13] 李宏俊, 梁瑜, 邢坤, 等. 紫贻贝 EST-SNP 的筛选及多态性检测 [J]. *水产学报*, 2011, 35(3): 348-355.
- [14] PICOULT-NEWBERG L, IDEKER T E, POHL M G, et al. Mining SNPs from EST databases[J]. *Genome Res*, 1999, 9: 167-174.

- [15] 周锦,刘义飞,黄宏文.基于EST数据库进行SNP分子标记开发的研究进展及在猕猴桃属植物中的应用研究[J].热带亚热带植物学报,2011,19(2):184-194.
- [16] 张晓峰,杨晶,孙效文.基于EST序列的鲤鱼生长相关SNP发掘[J].水产学杂志,2009,22(4):1-7.
- [17] WANG D G, FAN J B, SIAO C J. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphism in the human genome[J]. Science, 1998, 208:1077-1082.
- [18] 杨永强,王巍杰,徐长波.单核苷酸多态性研究进展[J].化学与生物工程,2009,26(8):19.
- [19] 曹婷婷,白俊杰,于凌云,等.草鱼羧胺酶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.
- [20] GRAESSMANN A, SANDBERG G, GUHL E, et al. Methylation of single sites within the herpes simplex virus tk coding region and the simian virus 40 T-antigen intron causes gene inactivation[J]. Molecular and Cellular Biology, 1994, 14(3): 2004-2010.
- [21] DALY M J, RIOUX J D, SCHAFFNER S F, et al. High-resolution haplotype structure in the human genome [J]. Nature Genetics, 2001, 29:229-232.
- [22] 刘福平,白俊杰,叶星,等.罗非鱼MC4R基因克隆及与其生长相关的SNP位点[J].中国水产科学,2009,16(6):816-823.
- [23] 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.

Detection of SNP citrate synthase gene and association analysis with growth traits in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)

FAN Jia-jia LIU Xiao-xian BAI Jun-jie YU Ling-yun

Pearl River Fisheries Research Institute, CAFS/Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application & Cultivation, Ministry of Agriculture, Guangzhou 510380, China

Abstract The enzyme citrate synthase (E. C. 2. 3. 3. 1) exists in nearly all living cells and stands as a pace-making enzyme in the first step of the tricarboxylic acid cycle (TAC). Citrate synthase is located within eukaryotic cells in the mitochondrial matrix. In this study, genomic fragments of the citrate synthase gene were amplified based on the sequences of one available contig in the EST-SNP database of grass carp. Two SNPs mutations, A-386G and C-499G, were identified after sequencing the PCR products. The two SNPs were located in intron ten of the citrate synthase gene. Regarding the two SNPs, the genotype and gene frequency of 144 grass carps were further assayed with the method of Snapshot. The frequencies of AA, AG and GG were 47. 10%, 38. 41% and 14. 49% at the A-386G site, and CC, CG and GG were 31. 85%, 46. 67% and 21. 48% at the C-499G site, respectively. The polymorphic information content (PIC) of the two SNPs were medium genetic diversity. A general linear model was used for the correlation analysis between the citrate synthase gene SNPs and growth traits (body weight, body length, body depth, head length, caudal peduncle length and caudal peduncle depth). The different genotypes of the A-386G and C-499G site were different but not significantly different associated with the six growth traits ($P > 0.05$). Seven diplotypes consisted of the two SNPs (remove minor allelic frequencies lower than 3% of the D2 and D5) were used to do the correlation analysis between the six growth traits. Association analysis indicated that five diplotypes were not significant different growth traits ($P > 0.05$), except for head length ($P < 0.05$). The diplotypes D6 (A-386G/AG and C-499G/GG) had the maximum mean of all growth traits, suggesting that D6 belongs to dominant genotypes. These results indicate that the two SNPs of citrate synthase gene can be used as a molecular marker for growth traits selective breeding in grass carp.

Key words grass carp; citrate synthase gene; single nucleotide polymorphism (SNP); growth traits