

陈俊峰,王璟,靳玮,等.淮南猪肌肉组织不同发育阶段的甲基化差异基因筛选[J].华中农业大学学报,2025,44(1):183-190.  
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2025.01.020

## 淮南猪肌肉组织不同发育阶段的甲基化差异基因筛选

陈俊峰<sup>1</sup>,王璟<sup>1</sup>,靳玮<sup>1</sup>,柴进<sup>2</sup>,张庆<sup>1</sup>,任巧玲<sup>1</sup>,邢宝松<sup>1</sup>

1. 河南省畜禽繁育及营养调控重点实验室/河南省农业科学院畜牧兽医研究所,郑州 450002;

2. 农业农村部猪遗传育种重点开放实验室/农业动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室/

华中农业大学动物科技学院,武汉 430070

**摘要** 为进一步开展淮南猪分子选育,提升其生长速度和瘦肉率等经济性状,选取淮南猪胚胎期(days post coitus, dpc)第38、58、78天和出生后第21天4个发育阶段的淮南公猪背最长肌,开展全基因组甲基化测序并通过信号通路富集分析筛选调控肌肉发育的甲基化差异的候选基因。结果显示,基因主体的CpG甲基化程度高于基因上下游2 kb序列的CpG甲基化,基因组元件中内含子、3' UTR和重复序列等甲基化程度最高。随着发育时间的增加,基因主体的CpG甲基化水平逐渐下降,上下游2 kb则是下降-上升-下降趋势。基因组元件中内含子区、3' UTR区和重复序列的甲基化水平都逐渐下降,启动子区则为下降-上升-下降趋势。信号通路富集分析显示,在淮南猪相邻的发育阶段38~58 dpc、58~78 dpc、78 dpc~21 d三者间的差异化均达到极显著水平,黏着斑信号通路存在CpG甲基化差异基因,且达到极显著水平(*P*值分别为0.000 9、0.000 4、0.000 1),细胞黏附连接信号通路存在CHH甲基化差异基因,且分别达到显著或极显著水平(*P*值分别为0.013 2、0.012 8、0.000 5),生物信息学分析结果显示,在2个信号通路中筛选到辅肌动蛋白A4基因(actinin-4, ACTN4)和成纤维细胞生长因子受体(fibroblast growth factor receptor, FGFR1)基因。ACTN4基因调节肌动蛋白结合过程,在4个发育阶段的甲基化水平分别为55.75%、11.18%、10.18%、59.75%,FGFR1基因和肌肉细胞分化相关,在4个发育阶段的甲基化水平分别为0.81%、0.78%、7.52%、0.44%。以上结果表明,在淮南猪肌肉组织不同发育阶段筛选到的2个甲基化差异基因ACTN4和FGFR1可作为淮南猪肌肉发育候选基因进行分子育种。

**关键词** 淮南猪; 甲基化; 差异基因; 肌肉组织; 肌肉发育

**中图分类号** S828    **文献标识码** A    **文章编号** 1000-2421(2025)01-0183-08

DNA甲基化是一种表观遗传修饰方式,通过DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)把甲基基团添加到5' C位点上而形成<sup>[1-2]</sup>。在DNA复制过程中,泛素样含PHD和环指域1蛋白(ubiquitin-like protein containing PHD and RING finger domains 1, UHRF1)将DNMT1招募到半甲基化的CpG位点,并维持DNA甲基化<sup>[3-4]</sup>。哺乳动物细胞的甲基化主要发生在CpG序列的C位点上,且在基因组中呈不均匀分布<sup>[5-7]</sup>。在卵母细胞和胚胎发育过程中,DNA甲基化呈现动态变化<sup>[8]</sup>。卵母细胞在减数分裂前期到排卵期间几乎不存在甲基化,而胚胎发育早期则发生了大量的DNA甲基化重编程<sup>[9]</sup>。着床后,DNMT3A、DNMT3B又迅速恢复基因组

甲基化,并参与胚胎早期发育的生物学过程<sup>[10]</sup>。因此,甲基化是胚胎早期发育的一个重要影响因素。

猪的骨骼肌在胚胎期包括2个发育阶段,即初级肌纤维和次级肌纤维的形成。妊娠后第14~22天经历体节-轴旁中胚层-生肌节的发育过程,第35天左右形成初级肌纤维,第49天左右达到增殖顶峰,并持续至妊娠第60天。次级肌纤维约在猪妊娠第45~90天形成并分化发育,并在妊娠第75天左右达到顶峰<sup>[11-14]</sup>。肌纤维的第3次生成出现在出生后至断奶期(21 d)<sup>[15]</sup>。找出猪胚胎期骨骼肌发育的甲基化差异基因,有助于理解猪肌纤维发育的分子机制。

收稿日期: 2023-05-06

基金项目:国家重点研发计划项目(2021YFD1301200);河南省农业科学院科技创新团队项目(2022TD34;2023TD22)

陈俊峰, E-mail: afeng008@163.com

通信作者: 邢宝松, E-mail: baosong@126.com

淮南猪于1986年被列入河南省地方优良畜禽品种志,主产于河南信阳地区,归属于黄淮海黑猪、华北型。在肉质性状方面,淮南猪具有肌纤维细、肉色鲜红、肌内脂肪含量高等优点<sup>[16]</sup>,但是其生长速度和瘦肉率等经济性状显著低于国外引进品种,达90 kg的时间大约需要240 d<sup>[17]</sup>,本研究选取胚胎期第38、58、78天和出生后第21天的淮南公猪,研究其不同发育阶段的甲基化水平,筛选调控肌肉发育的甲基化差异基因,旨在为下一步开展淮南猪分子选育,提升生长速度和瘦肉率等经济性状奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

选取正常怀孕第38、58、78天(分别记为H38 dpc、H58 dpc、H78 dpc)的淮南母猪,屠宰后每头母猪分别选取3头公猪胚胎,采集背最长肌组织;屠宰21日龄(记为H21)断奶淮南公猪3头并采背最长肌组织。分别提取DNA后进行质量检测,−20℃储存备用。

### 1.2 试验方法

1)对未甲基化修饰位点进行处理,构建文库。对插入片段长度和有效浓度检测合格后,加入一定比例的lambda DNA作为阴性对照,将DNA随机打断到200~300 bp后进行末端修复、加A尾,并连接经过甲基化修饰的测序接头。利用EZ DNA Methylation Gold Kit试剂盒(Zymo Research)进行重亚硫酸盐处理,经过PCR扩增后获得测序文库。

2)甲基化测序及生物信息学分析。不同文库送

至北京诺禾致源生物信息科技有限公司开展 Illumina Hiseq 双末端测序。测序完成后利用 DSS (2.12.0)、Goseq(2.13)、KOBAS(2.0)等软件分别进行甲基化序列类型比例统计、不同发育阶段全基因组甲基化水平差异分析、基因上下游 CpG 甲基化差异分析、各基因组元件 CpG 甲基化差异分析、信号通路分析,分析所用的参考基因组网址为 [ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-81/fasta/sus\\_scrofa/dna/](ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-81/fasta/sus_scrofa/dna/)。登录信号通路查询网站 (<https://www.genome.jp/kegg/>),在达到显著性差异的信号通路中筛选影响肌肉发育的候选基因。

## 2 结果与分析

### 2.1 甲基化序列类型比例统计

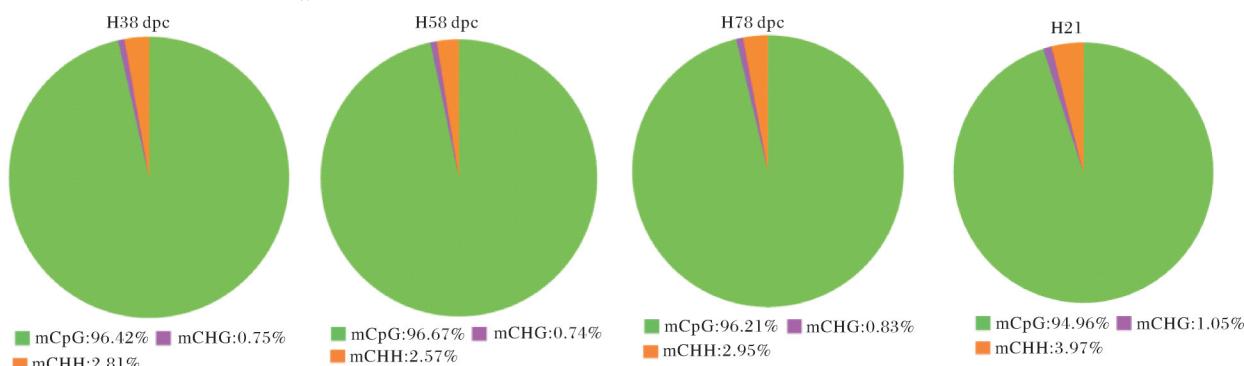
所有样品测序位点数如表1所示,其测序深度均达到了20×以上,符合分析要求。

表1 测序深度和覆盖度统计

Table 1 Data of sites number and sites coverage mean

样本名称 Samples	位点数 Sites number	平均覆盖深度(倍) Sites coverage mean
H38dpc	2 067 668 013	22.56
H58dpc	2 061 696 680	20.99
H78dpc	2 064 819 745	20.74
H21	2 083 321 461	22.55

C位点甲基化主要以CpG、CHG、CHH(H表示A、C、T)3种序列形式存在。对淮南猪胚胎期38、58、78 d 及出生21 d 4个阶段进行甲基化测序,分析发现4个阶段CpG上的甲基化C位点比例分别为27.75%、27.23%、27.51%、30.34%,分别占3种甲基化序列的96.42%、96.67%、96.21%、94.96%(图1)。



不同颜色代表3种不同甲基化形式,各部分面积的大小代表相应甲基化形式C位点的比例。The color represents methylated cytosines in different contexts, the area size represents ratio of methylated cytosines in different contexts.

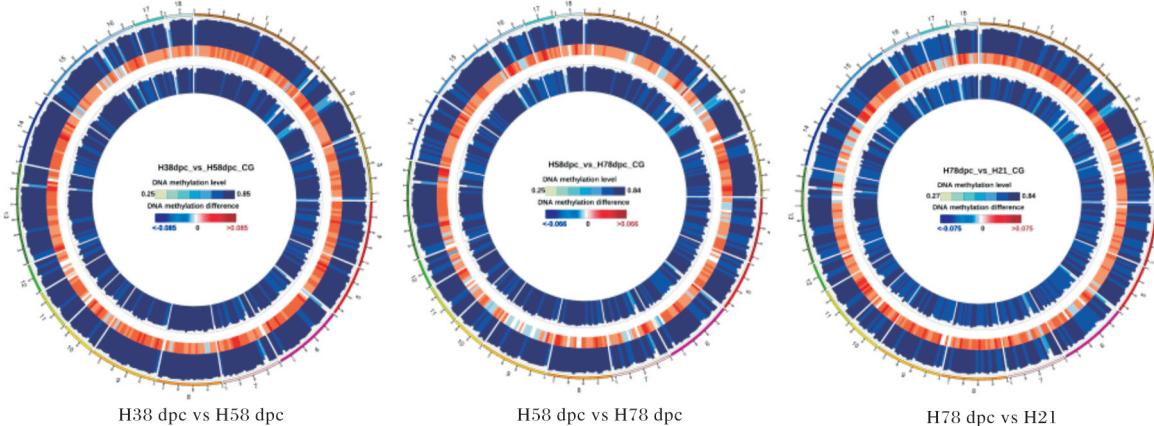
图1 不同C位点甲基化比例

Fig.1 The ratio of methylated cytosines in CpG, CHG and CHH

## 2.2 淮南猪不同发育阶段全基因组甲基化水平差异分析

为了解淮南猪不同发育阶段总体的甲基化差异

情况,在全基因组范围内通过circos图比较了各个发育阶段的甲基化水平(图2),结果显示,淮南猪各个相邻阶段之间的甲基化均存在差异。



外圈表示处理组甲基化水平,中圈表示样本组间甲基化水平差异,内圈表示对照组甲基化水平;不同颜色表示甲基化水平高低,热图表示样本间甲基化水平差异程度。From outside to inside presents DNA methylation levels in treatment group, differences in DNA methylation levels between samples, DNA methylation levels in control group, respectively; the color chart indicates the DNA methylation levels, and heat map indicates DNA methylation differences.

图2 不同阶段CpG甲基化水平比较

Fig.2 DNA mCpG levels at different developmental stages

## 2.3 淮南猪基因上下游甲基化水平分布

对C位点在各种基因主体(genebody)及转录起始和终止位点上下游2 kb序列的平均甲基化水平进行统计,结果如图3所示。总体上淮南猪基因上下游甲基化水平分布规律是:mCpG含量远远高于其他形式的甲基化。在基因主体的mCpG甲基化程度高于基因上下游2 kb序列的甲基化。

## 2.4 淮南猪不同发育阶段基因上下游CpG甲基化差异

对淮南猪不同发育阶段的基因不同区域的平均甲基化水平两两比较,结果显示:随着发育时间的增加,基因主体的CpG甲基化水平呈逐渐下降趋势,上下游2 kb序列的CpG甲基化水平则是下降-上升-下降趋势(图4)。

## 2.5 淮南猪各基因组元件甲基化水平分布

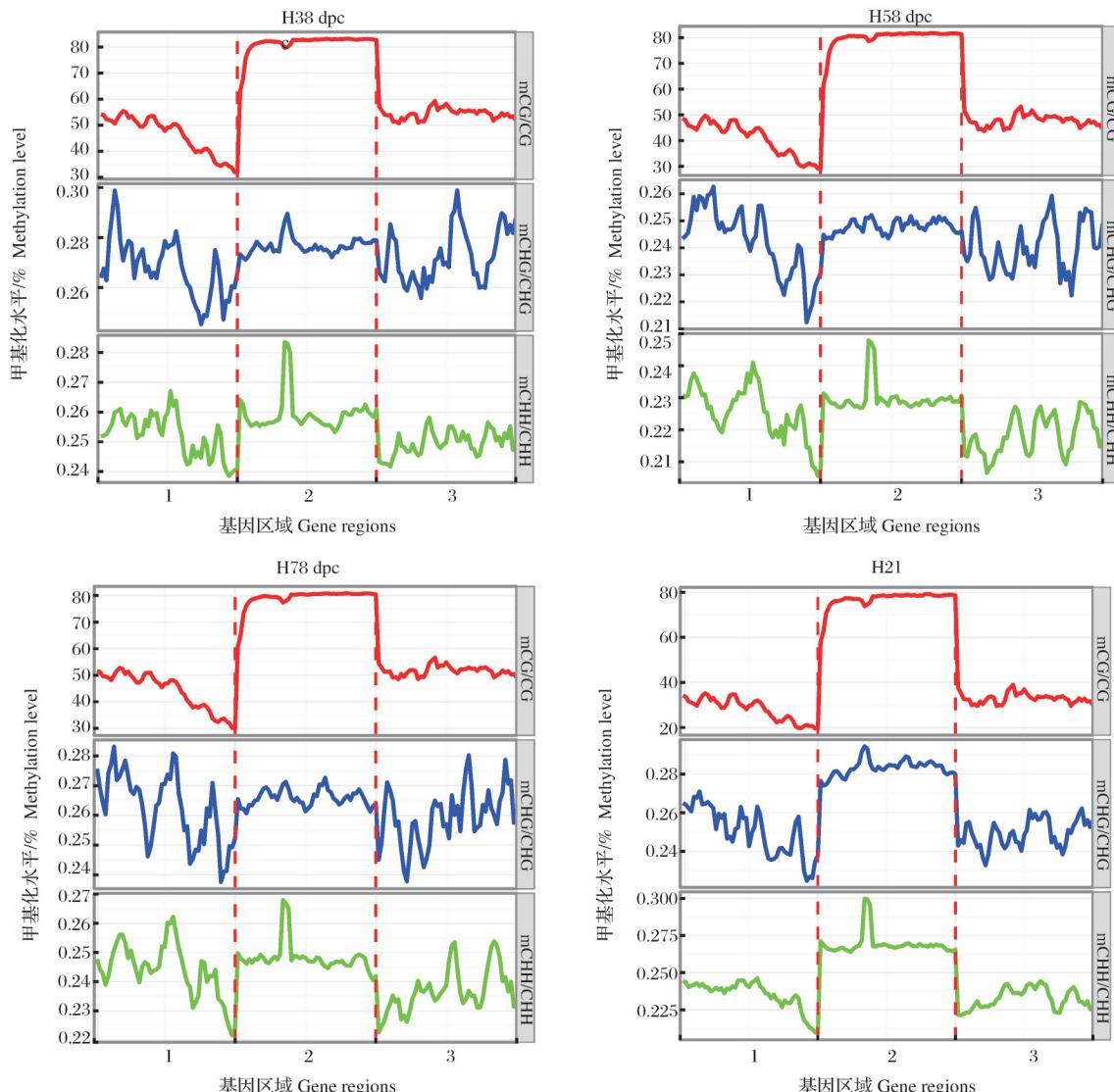
对C位点在各种基因组功能区域(如启动子、外显子、内含子、CpG岛、重复序列,其中启动子区为转录起始位点上游2 kb的区域)的平均甲基化水平进行统计,结果显示:总体上mCpG含量远远高于其他形式的甲基化。mCpG在基因各区域的分布情况为:内含子、3'UTR和重复序列甲基化程度最高,外显子、CpG岛和CpG岛外沿次之,启动子区和5'UTR甲基化程度最低(图5)。

## 2.6 淮南猪不同发育阶段各基因组元件CpG甲基化差异

对不同发育阶段的C位点在不同功能区域(启动子、外显子、内含子、CpG岛、重复序列,其中启动子区为转录起始位点上游2 kb的区域)的平均甲基化水平进行对比,结果显示:随着发育时间的增加,淮南猪的内含子区、3'UTR区和重复序列的CpG甲基化水平都呈逐渐下降趋势,启动子区则是下降-上升-下降趋势(图6)。

## 2.7 甲基化差异基因KEGG富集分析

通过信号通路公共数据库(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析,在黏着斑(ssc04510:Focal Adhesion)信号通路发现,淮南猪相邻的发育阶段均存在CpG甲基化差异基因(图7),且38~58 dpc、58~78 dpc、78 dpc~21 d三者间的差异化均达到极显著水平( $P$ 值分别为0.000 9、0.000 4、0.000 1)。结合生物信息学和基因功能分析,筛选调节肌动蛋白结合的辅肌动蛋白A4(actinin-4, ACTN4)基因作为候选基因,它能调节肌动蛋白结合过程。此外,在细胞黏附连接(ssc04520:Adherents junction)信号通路还发现了CHH甲基化差异基因,在38~58 dpc、58~78 dpc发育阶段的差异达到显著水平( $P$ 值分别为0.013 2、0.012 8),在78 dpc~21 d的差异达到极显著水平( $P$  0.000 5),并筛选了调节



基因区域1为转录起始位点上游2 kb序列,2为基因主体,3为终止位点下游2 kb序列。红色、蓝色、绿色分别代表CpG、CHG、CHH甲基化。Regions 1-3 represent sequences of upstream 2 kb, genebody and downstream 2 kb respectively. The red, blue and green represent methylation levels of CpG, CHG and CHH, respectively.

图3 基因上下游2 kb的甲基化分布

Fig.3 DNA methylation distribution in upstream 2 kb and downstream 2 kb of genebody regions

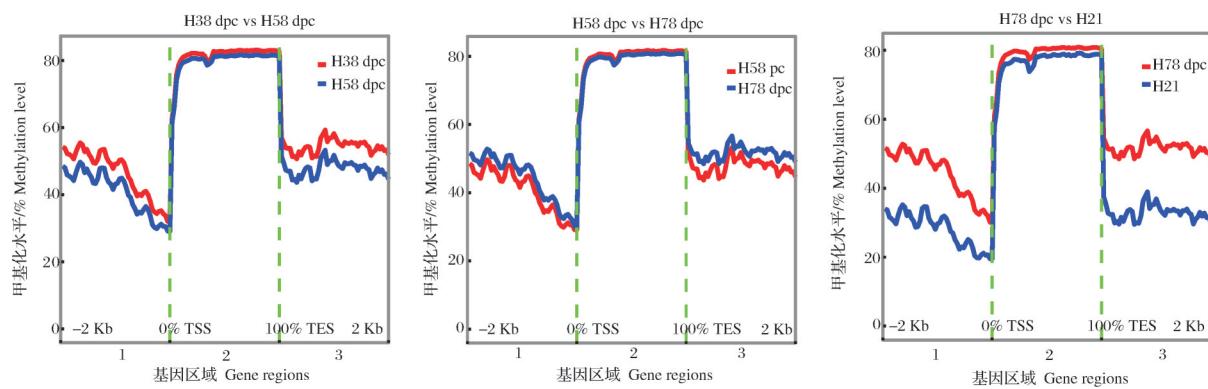
骨骼肌细胞分化的成纤维细胞生长因子受体(fibroblast growth factor receptor, FGFR1)作为候选基因。ACTN4基因在4个发育阶段的甲基化水平分别为55.75%、11.18%、10.18%、59.75%,FGFR1基因在4个发育阶段的甲基化水平分别为0.81%、0.78%、7.52%、0.44%(图8)。

### 3 讨 论

本研究测序发现所有样品中CpG甲基化占所有甲基化形式的90%以上,这符合哺乳动物甲基化主要发生在CpG序列的C位点上这一规律<sup>[5]</sup>。大部分

CpG位于启动子区,其甲基化抑制转录因子与启动子区的结合,从而影响基因表达<sup>[18]</sup>。此外,基因主体的外显子区和内含子区甲基化同样会调控基因表达,其中首位内含子由于与转录起始位点较近,从而影响基因转录调控<sup>[19]</sup>。

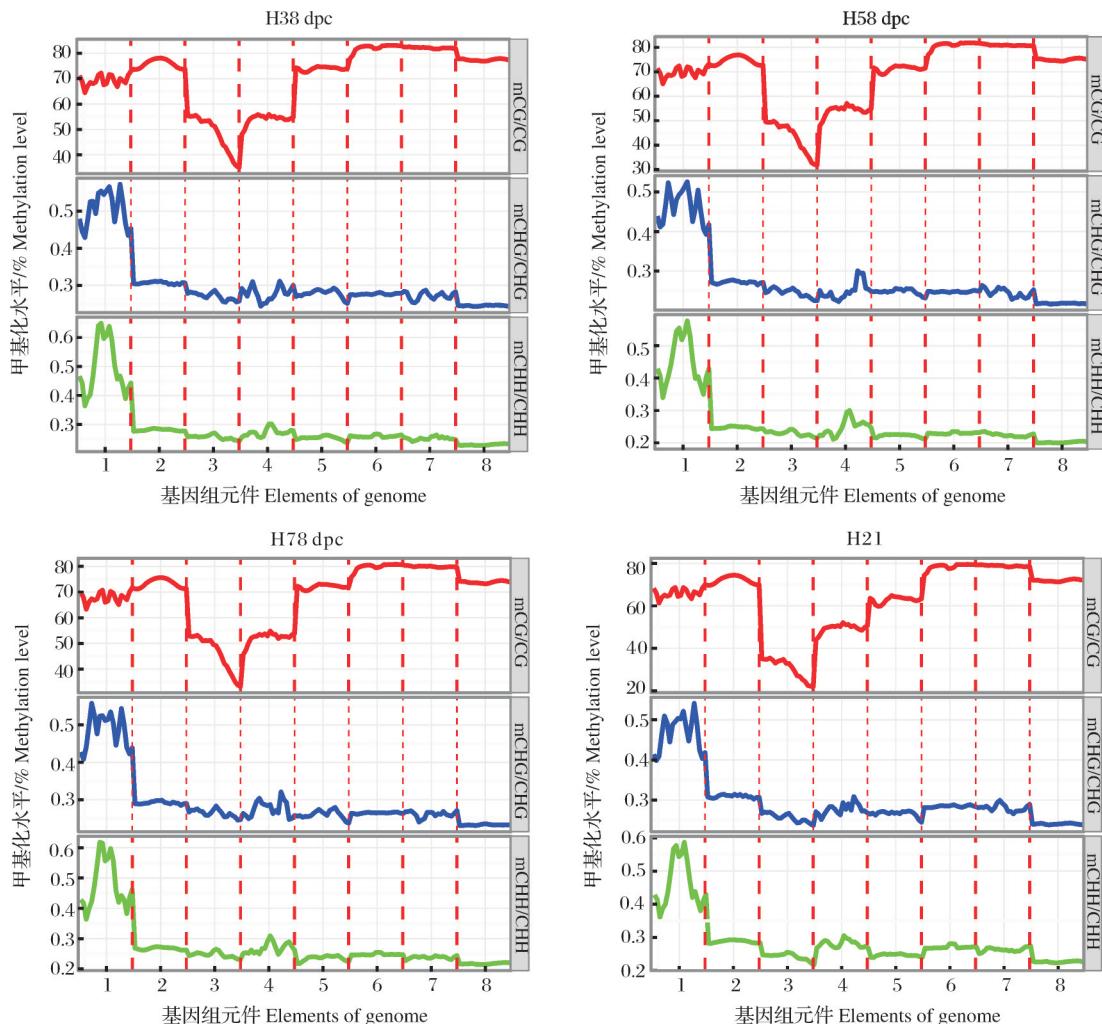
猪的肌纤维总数在出生前就已经确定,因此,胚胎时期肌肉发育进程的差异会导致出生后产肉量的差异。一般而言,甲基化与基因表达呈现负相关,因此,在肌肉发育的不同阶段,肌肉发育相关基因甲基化与否及甲基化水平会影响其表达与否及表达量,从而直接影响肌纤维的生长发育并决定瘦肉率。本



区域1为转录起始位点上游2 kb序列,2为基因主体,3为终止位点下游2 kb序列。Regions 1-3 represent sequences of upstream 2 kb, genebody and downstream 2 kb respectively.

图4 不同发育阶段基因上下游2 kb的CpG甲基化差异比较

Fig.4 DNA mCpG differences in upstream 2 kb and downstream 2 kb of genebody regions at different developmental stages



横坐标中1~8分别为CpG岛、CpG岛外沿、启动子区、5'非翻译区、外显子区、内含子区、3'非翻译区、重复序列。下同。1-8 represent CpG island, CpGI shore, promoter, 5'-UTR, exon, intron, 3' UTR and repeat sequences. The same as below.

图5 不同基因组元件上的甲基化水平分布

Fig.5 DNA methylation distribution in different elements

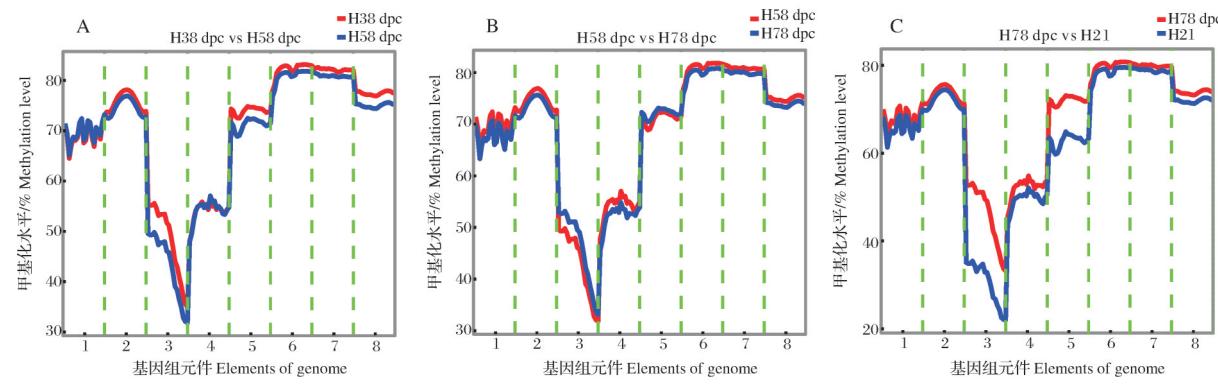


图6 不同发育阶段的基因组元件甲基化水平两两比较

Fig.6 Comparative analysis of DNA methylation levels in different elements at different developmental stages

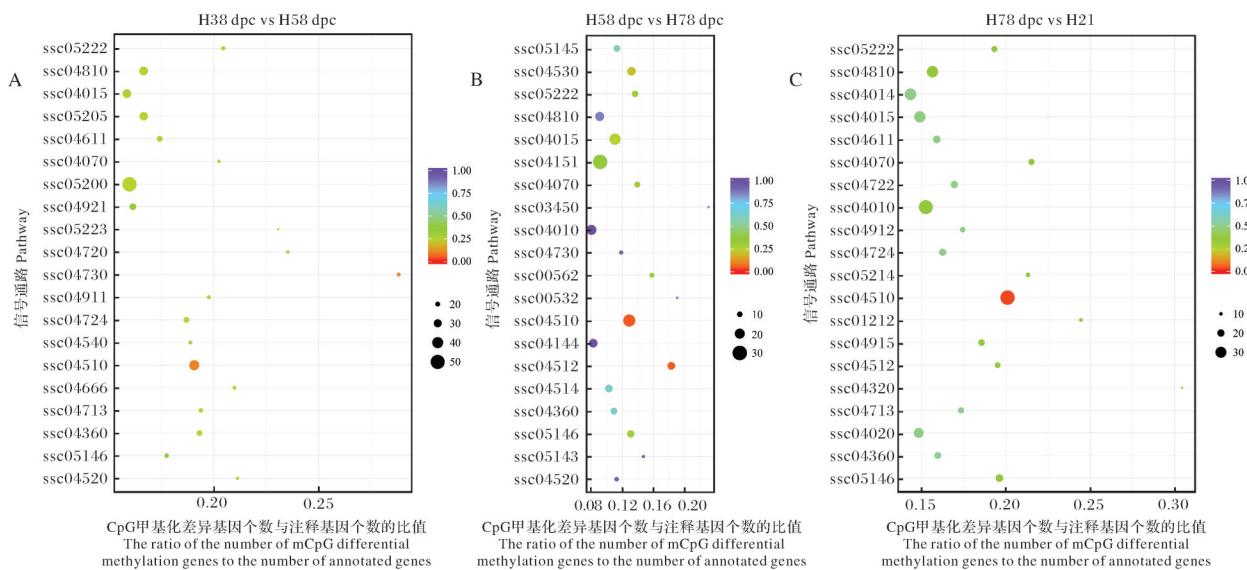


图7 淮南猪CpG甲基化差异基因的KEGG富集代谢通路分析

Fig.7 KEGG pathway analysis of mCpG differential methylation genes in Huainan pigs

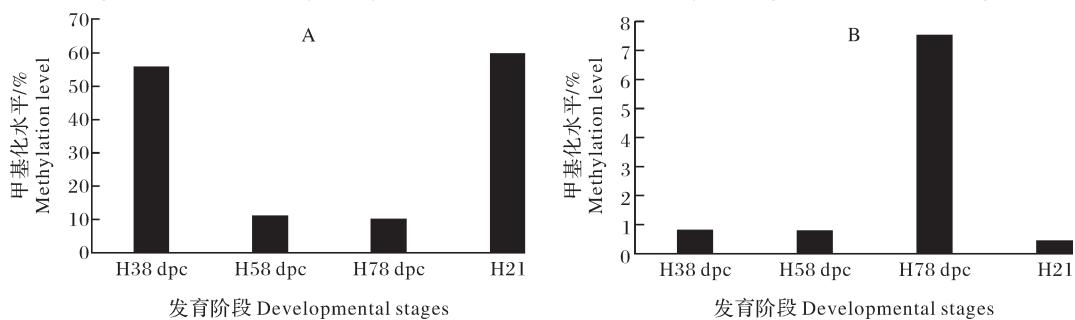


图8 ACTN4(A)和FGFR1(B)基因甲基化水平

Fig.8 Methylation levels of ACTN4(A) and FGFR1(B) genes

研究在淮南猪胚胎期与出生后21 d不同发育阶段间均发现了甲基化差异基因,并根据生物信息学筛选了2个候选基因ACTN4、FGFR1,其甲基化水平在4

个发育阶段分别呈甲基化—去甲基化—甲基化和去甲基化—甲基化—去甲基化,从而影响该基因的表达。

细胞外基质与一个细胞的肌动蛋白细胞骨架之间的物理联系由被称为“黏着斑”的细胞器组成。本研究选取的4个肌肉发育阶段中,每2个相邻发育阶段的黏着斑信号通路都存在甲基化差异基因。候选基因 $ACTN4$ 是新近发现的一种肌动蛋白交联蛋白,在运动细胞变皱膜中有较高的表达。表皮生长因子(endothelial growth factor)诱导的信号通路可引起 $\alpha$ - $ACTN4$ 酪氨酸磷酸化,降低 $\alpha$ - $ACTN4$ 与肌动蛋白的结合能力,使细胞骨架解体,从而有利于细胞迁移及胞质分裂<sup>[20]</sup>。候选基因 $FGFR1$ 属于成纤维细胞生长因子受体(FGFR)家族成员之一,目前已确定了4种FGFRs,即 $FGFR1$ 、 $FGFR2$ 、 $FGFR3$ 和 $FGFR4$ 。 $FGFR1$ 是一种跨膜蛋白,属于受体酪氨酸激酶,活化的 $FGFR1$ 酪氨酸激酶可以传导及调节骨骼肌细胞的分化,但不能刺激细胞增殖,只有当FGFs与 $FGFR1$ 结合形成完整的FGFs/ $FGFR1$ 信号传递通路时才能刺激细胞增殖<sup>[21]</sup>,因此,当 $FGFR1$ 部分区域发生甲基化时,其表达量会降低从而抑制肌细胞发育。

本研究筛选的胚胎期肌肉发育的相关基因及信号通路,有助于理解淮南猪早期肌肉发育的机制,并为下一步开展候选基因甲基化与表达的相关性研究奠定良好基础。

## 参考文献 References

- [1] RAZIN A, RIGGS A D. DNA methylation and gene function [J]. *Science*, 1980, 210(4470): 604-610.
- [2] MOORE L D, LE T, FAN G P. DNA methylation and its basic function [J]. *Neuropharmacology*, 2013, 38 (1) : 23-38.
- [3] NISHIYAMA A, MULHOLLAND C B, BULTMANN S, et al. Two distinct modes of DNMT1 recruitment ensure stable maintenance DNA methylation [J/OL]. *Nature communications*, 2020, 11: 1222 [2023-05-06]. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15006-4>.
- [4] PETRYK N, BULTMANN S, BARTKE T, et al. Staying true to yourself: mechanisms of DNA methylation maintenance in mammals [J]. *Nucleic acids research*, 2021, 49 (6) : 3020-3032.
- [5] LI E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development [J]. *Nature reviews genetics*, 2002, 3 (9): 662-673.
- [6] NISHIYAMA A, NAKANISHI M. Navigating the DNA methylation landscape of cancer [J]. *Trends in genetics*, 2021, 37(11): 1012-1027.
- [7] HALUŠKOVÁ J, HOLEČKOVÁ B, STANIČOVÁ J. DNA methylation studies in cattle [J]. *Journal of applied genetics*, 2021, 62(1): 121-136.
- [8] YAMAZAKI T, HATANO Y, TANIGUCHI R, et al. Editing DNA methylation in mammalian embryos [J/OL]. *International journal of molecular sciences*, 2020, 21 (2) : 637 [2023-05-06]. <https://doi.org/10.3390/ijms21020637>.
- [9] CANOVAS S, IVANOVA E, HAMDI M, et al. Culture medium and sex drive epigenetic reprogramming in preimplantation bovine embryos [J/OL]. *International journal of molecular sciences*, 2021, 22 (12) : 6426 [2023-05-06]. <https://doi.org/10.3390/ijms22126426>.
- [10] SENDŽIKAITĖ G, KELSEY G. The role and mechanisms of DNA methylation in the oocyte [J]. *Essays in biochemistry*, 2019, 63(6): 691-705.
- [11] LIANG Y, WANG Y, MA L, et al. Comparison of microRNAs in adipose and muscle tissue from seven indigenous Chinese breeds and Yorkshire pigs [J]. *Animal genetics*, 2019, 50 (5): 439-448.
- [12] FAZARINC G, VRECL M, ŠKORJANC D, et al. Dynamics of myosin heavy chain isoform transition in the longissimus muscle of domestic and wild pigs during growth: a comparative study [J]. *Animal*, 2017, 11(1): 164-174.
- [13] AYUSO M, FERNÁNDEZ A, NÚÑEZ Y, et al. Developmental stage, muscle and genetic type modify muscle transcriptome in pigs: effects on gene expression and regulatory factors involved in growth and metabolism [J/OL]. *PLoS One*, 2016, 11 (12) : e0167858 [2023-05-06]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167858>.
- [14] WANG J, CHEN J F, MA Q A, et al. Identification and characterization of circRNAs related to meat quality during embryonic development of the longissimus dorsi muscle in two pig breeds [J/OL]. *Frontiers in genetics*, 2022, 13: 1019687 [2023-05-06]. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1019687>.
- [15] BÉRARD J, KALBE C, LÖSEL D, et al. Potential sources of early-postnatal increase in myofibre number in pig skeletal muscle [J]. *Histochemistry and cell biology*, 2011, 136 (2) : 217-225.
- [16] 卜鸿静,岳磊,韵晓冬,等.引进猪种与我国地方猪种生产效率及肉质特性比较[J].山西农业科学,2014,42(1):74-77.
- BU H J, YUE L, YUN X D, et al. Comparison of the characteristics of production efficiency and meat quality between the imported and Chinese native pig breeds [J]. *Journal of Shanxi agricultural sciences*, 2014, 42 (1) : 74-77 (in Chinese with English abstract).
- [17] 豆成林,周枫.淮南猪、豫南黑猪和长白猪氨基酸组成及含量的分析与比较[J].食品工业,2013,34(9):200-202. DOU C L, ZHOU F. Analysis of amino acid in the longissimus dorsi muscles of Huainan pig, Yu'nan black pig and Landrace [J]. *The food industry*, 2013, 34 (9) : 200-202 (in Chinese with English abstract).

- [18] MA J N, ZHANG L, HUANG Y, et al. Epigenomic profiling indicates a role for DNA methylation in the postnatal liver and pancreas development of giant pandas [J/OL]. *Genomics*, 2022, 114 (3) : 110342 [2023-05-06]. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2022.110342>.
- [19] ANASTASIADI D, ESTEVE-CODINA A, PIFERRER F. Consistent inverse correlation between DNA methylation of the first intron and gene expression across tissues and species [J]. *Epigenetics & chromatin*, 2018, 11(1):1-17.
- [20] 蒋鹏.  $\alpha$ 辅肌动蛋白4在背部变皱膜中的功能研究[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2011. JIANG P. Study on the function of  $\alpha$ -actin 4 in the wrinkled membrane of back [D]. Changsha: Hunan Normal University, 2011 (in Chinese with English abstract).
- [21] LEGEAI-MALLET L, BENOIST-LASSELIN C, DEL-EZOIDE A L, et al. Fibroblast growth factor receptor 3 mutations promote apoptosis but do not alter chondrocyte proliferation in thanatophoric dysplasia [J]. *Journal of biological chemistry*, 1998, 273(21):13007-13014.

## Selection of differential methylation genes of longissimus dorsi muscle during different developmental stages in Huainan pig breed

CHEN Junfeng<sup>1</sup>, WANG Jing<sup>1</sup>, JIN Wei<sup>1</sup>, CHAI Jin<sup>2</sup>, ZHANG Jiaqing<sup>1</sup>, REN Qiaoling<sup>1</sup>, XING Baosong<sup>1</sup>

1. Henan Key Laboratory of Farm Animal Breeding and Nutritional Regulation/Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China;  
 2. Key Laboratory of Swine Breeding and Genetics, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics, Breeding, and Reproduction of Ministry of Education/College of Animal Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract** To further enhance the growth rate and lean meat percentage traits in Huainan pigs through molecular breeding, we performed whole genome methylation sequencing and screened for candidate muscle-regulating genes with differential methylation levels through pathway enrichment analyses using the longissimus dorsi muscle of Huainan boars at 38, 58, and 78 days post coitus (dpc) and at 21 postnatal days. The results showed that the methylation level of mCpG in gene body regions was higher than that in the upstream 2 kb and downstream 2 kb regions of the gene, and the highest methylation levels were observed in introns, 3' UTRs and repeat sequences. During development, the methylation levels in the gene body regions decreased, while those in the upstream 2 kb and downstream 2 kb of the gene regions exhibited a trend of down-up-down. The methylation levels of introns, 3' UTRs and repeat sequences gradually decreased, while the methylation levels of promoter regions exhibited a pattern of down-up-down. Pathway enrichment analyses were conducted, revealing significant differences in CpG methylation of focal adhesion ( $P=0.000\ 9$ ,  $P=0.000\ 4$ ,  $P=0.000\ 1$ ) and CHH methylation of adherents junctions ( $P=0.013\ 2$ ,  $P=0.012\ 8$ ,  $P=0.000\ 5$ ) during the adjacent developmental stages of 38~58 dpc, 58~78 dpc, 78 dpc~21 d of Huainan pigs. Through bioinformatics analyses, *ACTN4* and *FGFR1* were identified as candidate genes involved in muscle development from these pathways. *ACTN4* plays a role in regulating actin binding, and the methylation levels at different developmental stages were found to be 55.75%, 11.18%, 10.18%, and 59.75%. *FGFR1* is associated with muscle cell differentiation, and the methylation levels were 0.81%, 0.78%, 7.52%, and 0.44% at different developmental stages. In conclusion, two differentially methylated genes can be selected as candidate genes affecting muscle development to facilitate molecular breeding of Huainan pigs.

**Keywords** Huainan pig; methylation; differential gene; muscle tissue; muscle development

(责任编辑:边书京)