

doi: 10.7541/2018.039

中华鳖 *GHRL* 基因SNPs的筛选及生长性状的关联分析

李纯^{1,2} 陈辰¹ 赵建¹ 洪孝友¹ 李伟¹ 朱新平^{1,2}

(1. 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;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 为探究 *GHRL* 基因多态性对中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*) 生长性状的影响, 采用直接测序法在 *GHRL* 基因上检测到14个单核苷酸多态性位点 C289T、G501T、T738C、G776T、A841G、T885C、T2960C、A2987T、G3390A、A3857C、G4718A、T4820C、A4850C、T4979C。随机选取同批繁殖的120只中华鳖用飞行时间质谱法进行SNPs位点的分型, 并分析与生长性状的相关性。检测结果显示, 所有SNP位点均符合Hardy-Weinberg平衡状态 ($P > 0.05$)。方差分析结果显示, C289T位点CT、CC基因型的5项生长数据均显著高于TT基因型 ($P < 0.05$)。S2位点AB基因型的体重、背甲长、背甲宽和裙边宽4项数据均显著高于AA基因型 ($P < 0.05$)。G3390A位点AG基因型的背甲长、背甲宽2项数据显著高于AA基因型 ($P < 0.05$)。G4718A位点AG基因型的背甲长、背甲宽、裙边宽3项数据显著高于AA基因型 ($P < 0.05$)。在 *GHRL* 基因上获得的SNP位点可能影响着中华鳖的生长性状或与之紧密连锁, 可为中华鳖分子辅助育种提供助力与参考。

关键词: 中华鳖; *GHRL*; SNP; 生长相关

中图分类号: S966.5; Q173

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2018)02-0307-06

中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*) 的俗名为甲鱼、水鱼, 隶属于龟鳖目 (Testudinata) 鳖科 (Trionychidae) 鳖属 (*Trionyx*), 主要分布于越南、中国、韩国、日本等地区^[1, 2]。其味道鲜美, 具有很高的营养价值, 同时作为药材和补品也十分受欢迎^[3]。鳖类的养殖在21世纪初发展很快, 全国年产量从1996年的 3.2×10^7 kg 增长到2015年的 3.42×10^8 kg^[4]。但是随着养殖业的快速发展, 养殖技术并没有形成规范。中华鳖的养殖业正在面临着种质退化^[5], 种苗缺乏的困境^[6]。提升中华鳖选育工作的针对性和效率成为当务之急。

生长素 (Ghrelin, GHRL) 是一种来自胃的辛酰基化生长激素释放肽, 具有调节食欲、胃肠功能、心血管系统和能量平衡等作用, 与生长关系密切^[7]。很多人进行了 *GHRL* 基因的相关联的研究: 方梅霞等^[8] 在鸭 *GHRL* 基因发现SNP位点 C-792T 的CT基因型杂合子优势明显, 与生长性状显著相关; 王春晓等^[9] 在尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) *GHRL* 基

因中发现3个SNP位点均位于第一个内含子当中并完全连锁, 其基因型与快长性状密切相关; 罗开鹏等^[10] 在山羊的 *GHRL* 基因外显子4处发现一个同义SNP突变, 与贵州黑山羊 (麦坪) 群体的生长性状显著相关。Seim等^[11] 通过对接受肥胖治疗手术的女性的体细胞进行基因表达分析, 推测 *GHRL* 表达与肥胖存在一定关系。Tinoco等^[12] 通过对鲑鱼 *GHRL* 基因表达量的检测, 发现其与鲑鱼摄食量和生长相关。 *GHRL* 基因表达与生长的正相关在很多研究中得到证明, 但是在中华鳖中该基因的研究依然是空白, *GHRL* 基因多态性与中华鳖生长的关联性仍待证明。

单核苷酸多态性位点 (Signal nucleotide polymorphisms, SNPs) 是指在基因组水平上单个核苷酸的变异引起的多态性^[13]。SNPs的遗传标记有很多优势: 位点数量多^[14], 多态性丰富^[15], 遗传性稳定^[16], 能引起氨基酸突变, 分析简易^[17]。将这种多态性与生长性状进行连锁分析, 选出具有优良性状的个体,

收稿日期: 2017-03-02; 修订日期: 2017-05-21

基金项目: 广东省海洋渔业科技与产业发展专项科技攻关与研发项目 (A201501A01) 资助 [Supported by the Marine Fishery and Industrial Development Special Scientific & Technological Research and Development Projects of Guangdong Province (A201501A01)]

作者简介: 李纯 (1991—), 男, 湖北人; 硕士研究生; 主要研究方向为水产种质资源与遗传育种。E-mail: leechunnn2011@163.com

通信作者: 朱新平, 博士, 研究员。E-mail: zhuxinping_1964@163.com

是克服种质衰退的有效方法之一。

本研究以*GHRL*为候选基因,筛选SNP多态性位点,研究其与中华鳖生长性状的关联性,以期获得与长性状相关的SNP标记,为中华鳖分子标记辅助育种提供指导与帮助,进而选育出快长的中华鳖良种品系,促进中华鳖产业的健康可持续发展。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验中华鳖取自珠江水产研究所高要基地培育的同批繁殖同塘饲养的1冬龄健康中华鳖,该批中华鳖为来自依托湖南省水产科学研究所的湖南中华鳖原种场繁殖的苗种,基数群体为2000只,从中随机挑选120只用于生长性状关联分析,并从这120只个体中挑选10只极大个体(重量大于350 g)和10只极小个体(重量小于130 g)用于SNP位点的筛选。

1.2 研究方法

样本形态数据测量 对120只中华鳖进行形态学测量并记录。体重用电子天平称量,精确到0.1 g。形态用游标卡尺测量,测量每只中华鳖的背甲长、背甲宽、体高和裙边宽,精确到0.1 mm。

基因组DNA的提取 剪取所有样本中华鳖的裙边用于基因组DNA的提取及SNP分型。DNA提取试剂盒使用Omega MicroElute Genomic DNA Kit; 2×*Taq* PCR master mix购自GeneSTAR生物工程有限公司(广州);参照DNA提取试剂盒提供的方法提取120只中华鳖的基因组DNA,用无酶的去离子水溶解过柱,对纯度和浓度进行检测,放在-20℃保存待用。

***GHRL*基因的PCR扩增** 根据NCBI上中华鳖*GHRL*基因序列(GenBank登录号: NW_005857883)设计引物,采用Primer Premier 5.0软件设计5对引物(详细序列和参数见表1),引物委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成,分段扩增*GHRL*基因。PCR反应体系为50 μL,含2×PCR MIX 25 μL(含1.25 U*Taq* 酶)、正反向引物各2 μL(10 μmol/L)、DNA模板2 μL(100 ng/μL)、ddH₂O 19 μL。PCR反应程序为:94℃预变性5min;94℃变性45s,退火60s,72℃延伸60s,35个循环;72℃延伸10min。将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。测序结果使用Vector NTI进行比对找出SNP位点。

***GHRL*基因SNP分型** 根据极大个体群与极小个体群找出的SNP位点信息,委托生工生物工程(上海)股份有限公司采用飞行时间质谱法^[18]对120只中华鳖*GHRL*基因的SNP位点进行分型。

表1 中华鳖*GHRL*基因扩增引物

Tab. 1 Primer information of *Pelodiscus sinensis GHRL*

编号 Number	引物序列 Primer sequence (5'—3')	产物长度 Size range (bp)	T_m (°C)
A11F	CCCTTCACAAAGCTTACC CTGA	1050	58
A11R	AGATGTGTATTGCGGTAG TTGGT		
B1F	GTTTCCTCTCTGTACCT CTCC	1186	59
B1R	TGCATCTGCATCCAAAAA TCCTT		
C3F	AGCTGCCCATGTGGTAAA TTATG	1209	59
C3R	CTGAGCAGAACATGAAA AGTGGG		
D2F	GCCAGCAATGCCAGTTTT ATTCT	1370	58
D2R	GGCTCCCTGCATATACTA ACTCC		
E1F	AAGTGAAAGAAGAACCC TCTGTT	1319	60
E1R	ACCTTGAAACATACAGTT GACAC		

1.3 数据统计分析

采用Popgene 32软件计算观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)和等位基因频率等遗传参数。使用PIC_CALC软件计算群体的多态信息含量,采用SPSS19软件一般线性模型(General linear model, GLM)对分型结果和中华鳖的生长性状进行相关分析,因变量有体重、背甲长、背甲宽、体高和裙边宽,自变量为筛选到的SNP位点的不同基因型。其生物统计模型为: $Y_{ij} = \mu + B_i + e_{ij}$, 其中 Y_{ij} 表示某性状第*i*个标记在第*j*个个体上的观测值; μ 表示实验观测所有个体的平均值; B_i 表示第*i*个标记的效应值; e_{ij} 表示对应个体观测值的随机残差效应。

2 结果

2.1 *GHRL*扩增及SNP突变位点的筛查

5对引物PCR扩增分别获得扩增片段长1050、1186、1209、1370和1319 bp, PCR产物经测序和纵向对比后共发现14个SNP突变点。其中5'-UTR有6个,分别命名为C289T、G501T、T738C、G776T、A841G、T885C; Intron-3有3个:分别命名为T2960C、A2987T、G3390A; 3'-UTR有5个,分别命名为A3857C、G4718A、T4820C、A4850C、T4979C。

2.2 *GHRL* SNP遗传多样性分析

对分型结果进行处理后如表2、表3,可以看到所有SNP位点均符合Hardy-Weinberg平衡状态($P > 0.05$)。根据中度多态性原则 $0.25 < PIC < 0.50$,所有SNP位点均处于中度多态性水平。其中:G501T与A2987T处于连锁状态,命名为位点S1; T738C、G776T、A841G、T885C和A3857C位点均处于连

锁状态, 命名为位点S2; T4820C和A4850C也处于连锁状态, 命名为位点S3。将所有连锁状态的SNP位点的优势等位基因命名为A, 另一个为B, 便于接下来的分析。

2.3 GHRL SNP位点与生长性状关联分析

采用一般线性模型(General linear model, GLM)分析14个SNP位点不同基因型与体重、背甲长、背甲宽、体高和裙边宽的相关性(表4)。C289T位

表2 中华鳖GHRL SNP位点的基因型及其等位基因频率

Tab. 2 Genotype and allele frequency of SNPs in *Pelodiscus sinensis* GHRL

位点 Locus	等位基因频率		基因型数量		
	Allele frequency (%)		Number of genotype		
C289T	C/77.50	T/22.50	CC/72	TC/42	TT/6
G501T	G/49.17	T/50.83	GG/30	TG/58	TT/32
T738C	C/55.00	T/45.00	CC/37	TC/58	TT/25
G776T	G/45.00	T/55.00	GG/25	TG/58	TT/37
A841G	A/45.00	G/55.00	AA/25	GA/58	GG/37
T885C	C/55.00	T/45.00	CC/37	TC/58	TT/25
C2960T	C/39.58	T/60.42	CC/23	TC/49	TT/48
A2987T	A/49.17	T/50.83	AA/30	TA/58	TT/32
G3390A	A/51.67	G/48.33	AA/35	GA/54	GG/31
A3857C	A/45.00	C/55.00	AA/25	CA/58	CC/37
G4718A	A/75.42	G/24.58	AA/68	GA/45	GG/7
T4820C	C/50.42	T/49.58	CC/32	TC/57	TT/31
A4850C	A/49.58	C/50.42	AA/31	CA/57	CC/32
T4979C	C/14.17	T/85.83	CC/2	TC/30	TT/88

表3 中华鳖GHRL SNP位点的遗传参数

Tab. 3 The polymorphic parameters of SNPs in *Pelodiscus sinensis* GHRL

位点 Locus	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	固定指数 Fixation index	多态信息 含量PIC	HW平衡 Hardy- Weinberg equilibrium
C289T	0.3500	0.3502	-0.0036	0.2879	0.9947
G501T	0.4833	0.5020	0.0331	0.3749	0.6832
T738C	0.4833	0.4971	0.0236	0.3725	0.7611
G776T	0.4833	0.4971	0.0236	0.3725	0.7611
A841G	0.4833	0.4971	0.0236	0.3725	0.7611
T885C	0.4833	0.4971	0.0236	0.3725	0.7611
C2960T	0.4083	0.4803	0.1463	0.3639	0.0992
A2987T	0.4833	0.5020	0.0331	0.3749	0.6832
G3390A	0.4500	0.5015	0.0990	0.3747	0.2583
A3857C	0.4833	0.4971	0.0236	0.3725	0.7611
G4718A	0.3750	0.3724	-0.0113	0.3020	0.9374
T4820C	0.4750	0.5021	0.0499	0.3750	0.5533
A4850C	0.4750	0.5021	0.0499	0.3750	0.5533
T4979C	0.2500	0.2442	-0.0280	0.2137	0.7925

点的CT、CC基因型的5项生长数据均显著高于TT基因型。S2位点的AB基因型的体重、背甲长、背甲宽和裙边宽4项数据均显著高于AA基因型。G3390A位点的AG基因型的背甲长、背甲宽2项数据显著高于AA基因型。G4718A位点的AG基因型的背甲长、背甲宽、裙边宽3项数据显著高于AA基因型($P<0.05$)。而其他6个SNP位点的不同基因型在5个生长性状上无显著差异($P>0.05$)。显著性分析结果在极大个体数(重量大于350 g)分布上也得到了体现: C289T位点的TT基因型没有极大个体。S2位点的AB基因型有8只极大个体, 而AA基因型仅为1只。G3390A位点的AG基因型有8只极大个体, 而AA基因型仅1只。

3 讨论

生长素在哺乳动物、鸟类、鱼类及两爬类中广泛存在, 它是一种来自胃的辛酰基化生长激素释放肽, 其多肽物质首先是在大鼠及人的胃中发现的, 有人将之译作生长素^[19]。它主要由胃腺或胃黏膜皱襞内特定的内分泌细胞分泌^[20]。Ghrelin能够刺激生物体生长激素的释放、增加其进食量造成肥胖, 它还能影响多种激素释放以及调节GH/IGF-1轴^[21], 因此具有调节食欲、胃肠功能、心血管系统和能量平衡等作用。

本研究以中华鳖极大极小2个群体作为SNP筛选的实验材料, 在保证遗传背景一致的前提下增加了生长相关SNP出现的几率。检测中华鳖GHRL基因序列长度为5404 bp的SNP, 筛选到了14个SNP位点, 相当于每千个碱基中出现2.59个SNP位点, 并且全部位于非编码区和内含子上, 这说明GHRL基因在进化中比较保守, 该类基因的突变往往会对功能产生较大的影响。

S1、S2、S3三组SNP位点各自的基因型频率和等位基因频率完全一致, 是三组连锁的SNP位点。这种现象在其他基因的研究中也有报道, 如在大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)的高密度脂蛋白结合蛋白(High density lipoprotein binding protein, HBP)基因筛了3个SNP位点分别是H1、H2、H3, 其中H1和H2位点的基因型和基因频率都一致, 单个位点基因型与生长不相关, 而二者组成的BB基因型与快长密切相关并推测这两个位点之间连锁, 存在协同或拮抗作用^[22]。

本研究将120只中华鳖GHRL基因单个SNP位点的不同基因型与生长性状进行GLM关联分析, 发现在C289T位点、S2位点、G3390A位点和

表4 *GHRL*基因SNP位点不同基因型与中华鳖生长性状的关联分析
Tab. 4 Correlation analysis of *GHRL* gene polymorphisms and growth traits

位点 Locus	基因型 Genotype	样本数 No.	体重Body weight (g)	背甲长Body length (cm)	背甲宽Body width (cm)	体高Body height (cm)	裙边宽Calipash length (cm)	极大个体数No. of large individual
C289T	CC	72	230.66±65.48 ^a	11.60±1.27 ^a	9.82±1.01 ^a	3.55±0.37 ^{ab}	1.57±0.25 ^a	4
	CT	42	233.17±81.42 ^a	11.44±1.52 ^a	9.65±1.12 ^a	3.79±1.10 ^a	1.53±0.26 ^a	6
	TT	6	155.97±72.09 ^b	9.77±1.58 ^b	8.38±1.63 ^b	3.02±0.53 ^b	1.29±0.22 ^b	0
G501T	GG	30	216.39±66.76	11.35±1.28	9.59±1.01	3.43±0.39	1.56±0.25	1
	GT	58	239.43±76.49	11.65±1.46	9.86±1.13	3.73±0.94	1.56±0.25	8
	TT	32	217.44±71.17	11.20±1.45	9.47±1.17	3.55±0.48	1.50±0.29	1
T738C	CC	37	209.08±71.02 ^b	11.03±1.43 ^b	9.35±1.16 ^b	3.50±0.48	1.47±0.28 ^b	1
	CT	58	242.13±75.68 ^a	11.72±1.46 ^a	9.91±1.12 ^a	3.73±0.94	1.58±0.26 ^a	8
	TT	25	222.29±64.94 ^{ab}	11.44±1.18 ^{ab}	9.67±0.96 ^{ab}	3.48±0.38	1.57±0.21 ^{ab}	1
G776T	GG	25	222.29±64.94 ^{ab}	11.45±1.18 ^{ab}	9.67±0.96 ^{ab}	3.48±0.38	1.57±0.21 ^{ab}	1
	GT	58	242.13±75.68 ^a	11.72±1.46 ^a	9.91±1.12 ^a	3.73±0.94	1.58±0.26 ^a	8
	TT	37	209.08±71.01 ^b	11.03±1.43 ^b	9.35±1.16 ^b	3.50±0.48	1.47±0.28 ^b	1
A841G	AA	25	222.29±64.94 ^{ab}	11.45±1.18 ^{ab}	9.67±0.96 ^{ab}	3.48±0.38	1.57±0.21 ^{ab}	1
	AG	58	242.13±75.68 ^a	11.72±1.46 ^a	9.91±1.12 ^a	3.73±0.94	1.58±0.26 ^a	8
	GG	37	209.08±71.02 ^b	11.03±1.43 ^b	9.35±1.16 ^b	3.50±0.48	1.47±0.28 ^b	1
T885C	CC	37	209.08±71.02 ^b	11.03±1.43 ^b	9.35±1.16 ^b	3.50±0.48	1.47±0.28 ^b	1
	CT	58	242.13±75.68 ^a	11.72±1.45 ^a	9.91±1.12 ^a	3.73±0.94	1.58±0.26 ^a	8
	TT	25	222.29±64.94 ^{ab}	11.45±1.18 ^{ab}	9.67±0.96 ^{ab}	3.48±0.38	1.57±0.21 ^{ab}	1
C2960T	CC	23	218.78±71.02	11.36±1.33	9.60±1.04	3.45±0.42	1.55±0.27	1
	CT	49	231.89±67.27	11.58±1.31	9.78±1.04	3.72±1.01	1.53±0.24	4
	TT	48	227.97±80.43	11.36±1.57	9.64±1.24	3.57±0.46	1.55±0.27	5
A2987T	AA	30	216.39±66.76	11.35±1.27	9.59±1.01	3.43±0.39	1.55±0.25	1
	AT	58	239.43±76.48	11.65±1.46	9.86±1.13	3.73±0.94	1.56±0.25	8
	TT	32	217.44±71.17	11.20±1.45	9.47±1.17	3.55±0.48	1.50±0.29	1
G3390A	AA	35	215.40±70.82	11.13±1.45 ^b	9.43±1.16 ^b	3.54±0.48	1.49±0.28	1
	AG	54	241.49±77.01	11.70±1.45 ^a	9.89±1.13 ^a	3.75±0.97	1.57±0.25	8
	GG	31	217.97±66.23	11.38±1.27 ^{ab}	9.62±1.01 ^{ab}	3.44±0.38	1.57±0.25	1
A3857C	AA	25	222.29±64.94 ^{ab}	11.45±1.18 ^{ab}	9.67±0.96 ^{ab}	3.48±0.38	1.57±0.21 ^{ab}	1
	AC	58	242.13±75.68 ^a	11.72±1.46 ^a	9.91±1.12 ^a	3.73±0.94	1.58±0.26 ^a	8
	CC	37	209.08±71.02 ^b	11.03±1.43 ^b	9.35±1.16 ^b	3.50±0.48	1.47±0.28 ^b	1
G4718A	AA	68	217.49±75.67	11.21±1.48 ^b	9.51±1.19 ^b	3.52±0.45	1.49±0.27 ^b	5
	AG	45	242.13±67.56	11.78±1.29 ^a	9.95±0.98 ^a	3.75±1.05	1.61±0.23 ^a	5
	GG	7	235.97±74.75	11.64±1.27 ^{ab}	9.76±1.067 ^{ab}	3.53±0.41	1.61±0.24 ^{ab}	0
	CC	32	217.44±71.17	11.20±1.45	9.47±1.17	3.55±0.48	1.50±0.29	1

续表 4

位点 Locus	基因型 Genotype	样本数 No.	体重Body weight (g)	背甲长Body length (cm)	背甲宽Body width (cm)	体高Body height (cm)	裙边宽Calipash length (cm)	极大个体数No. of large individual
T4820C	CT	57	237.73±76.05	11.62±1.46	9.84±1.14	3.71±0.94	1.56±0.25	8
	TT	31	220.26±69.08	11.41±1.30	9.63±1.02	3.48±0.46	1.56±0.25	1
	AA	31	220.26±69.08	11.41±1.30	9.63±1.02	3.48±0.46	1.56±0.25	2
A4850C	AC	57	237.73±76.05	11.62±1.46	9.84±1.14	3.71±0.94	1.56±0.25	7
	CC	32	217.44±71.17	11.20±1.45	9.47±1.17	3.55±0.48	1.50±0.29	1
T4979C	CC	2	310.80±31.96	13.02±0.59	10.91±0.42	3.90±0.25	1.85±0.22	0
	CT	30	238.05±73.59	11.72±1.40	9.84±1.07	3.80±1.26	1.60±0.24	4
	TT	88	222.43±72.51	11.32±1.41	9.61±1.13	3.54±0.44	1.52±0.26	6
总计Total		120	227.81±73.04	11.45±1.42	9.69±1.12	3.61±0.73	1.54±0.26	10

注: 表中数值为 $\bar{X}\pm\text{SE}$, 不同上标字母表示差异显著($P<0.05$)Note: The data are $\bar{X}\pm\text{SE}$, different superscripts mean significant differences ($P<0.05$)

G4718A位点, 优势基因型均为杂合, 这符合了育种学上的杂交优势原理, 因此在育种工作中应将两种纯合群体进行杂交, 以取得最优生长性状。本实验在中华鳖GHRL基因上筛选到14个SNP位点, 其中C289T位点的CT、CC基因型的5项生长数据均显著高于TT基因型($P<0.05$)。S2位点的AB基因型的体重、背甲长、背甲宽和裙边宽4项数据均显著高于AA基因型($P<0.05$)。G3390A位点的AG基因型的背甲长、背甲宽2项数据显著高于AA基因型($P<0.05$)。G4718A位点的AG基因型的背甲长、背甲宽、裙边宽3项数据显著高于AA基因型($P<0.05$)。这8个SNP位点可能影响着中华鳖的生长性状或与之紧密连锁。今后可以将这些SNP位点作为中华鳖分子辅助育种的参考, 并进行进一步的研究。

参考文献:

- [1] Yang Z C, Niu C J, Sun R Y, *et al.* Advances in studies of the Chinese soft-shelled turtle *Trionyx sinensis* biology [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 1999, **34**(6): 41—44 [杨振才, 牛翠娟, 孙儒泳, 等. 中华鳖生物学研究进展. 动物学杂志, 1999, **34**(6): 41—44]
- [2] Wang P C. Turtle of China [M]. Shanghai: East China Normal University Press. 2000, 50—56 [王培潮. 中国的龟鳖. 上海: 华东师范大学出版社. 2000, 50—56]
- [3] Pan Y J. Shuichancidian [M]. Shanghai: Shanghai Lexicographical Publishing House. 2007, 26—28 [潘迎捷. 水产辞典. 上海: 上海辞书出版社. 2007, 26—28]
- [4] Ministry of Agriculture, Fisheries Bureau. Chinese Fishery Statistical Yearbook [M]. Beijing: China Agriculture Press. 2016, 30—32 [农业部渔业局编制. 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社. 2016, 30—32]
- [5] Zhu C H. Production Characterization and Application of Monoclonal Antibodies Against Soft-shelled Turtle Iridovirus (STIV) [D]. Thesis for Master of Science. Fujian Agriculture and Forestry University, Fujian. 2008 [朱春华. 中华鳖虹彩病毒单克隆抗体的制备、特性分析及应用研究. 福建农林大学, 福建. 2008]
- [6] Zhao C G. Present status and countermeasure of seed-raising of turtle in China [J]. *Scientific Fish Farming*, 2004, (9): 5—5 [赵春光. 我国龟鳖苗种生产现状与对策. 科学养鱼, 2004, (9): 5—5]
- [7] Wang Y H, He S G. Discovery and research progress of ghrelin [J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2001, **17**(12): 1256—1259 [王越晖, 祝世功. Ghrelin的发现及研究进展. 中国病理生理杂志, 2001, **17**(12): 1256—1259]
- [8] Fang M X, Li Y, Xu H P, *et al.* Associations of Ghrelin (GHRL) and its receptor (GHSR) genes polymorphisms with duck growth and carcass traits [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2011, **42**(1): 18—24 [方梅霞, 李莹, 徐海平, 等. GHRL及其受体GHSR基因多态性与鸭生长及屠体性状的关联性. 畜牧兽医学报, 2011, **42**(1): 18—24]
- [9] 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]
- [10] Luo K P, Song T W, Sun Y Y, *et al.* Study on relationship between GHRL gene polymorphism and body weight and body size traits of goat [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2014, **41**(6): 162—165 [罗开鹏, 宋桃伟, 孙岩岩, 等. 山羊GHRL基因多态性及其与体重、体尺性状的关系研究. 广东农业科学, 2014, **41**(6): 162—165]
- [11] Seim I, Crisp G, Shah E T, *et al.* Abundant ghrelin gene expression by monocytes: Putative implications for fat accumulation and obesity [J]. *Obesity Medicine*, 2017, **5**:

- 1—3
- [12] Tinoco A B, Näslund J, Delgado M J, *et al.* Ghrelin increases food intake, swimming activity and growth in juvenile brown trout (*Salmo trutta*) [J]. *Physiology & Behavior*, 2014, **124**: 15—22
- [13] Hampe J, Wollstein A, Lu T, *et al.* An integrated system for high throughput TaqMan™ based SNP genotyping [J]. *Bioinformatics*, 2001, **17**(7): 654—655
- [14] Kwok P Y, Deng Q, Zakeri H, *et al.* Increasing the information content of STS-based genome maps: identifying polymorphisms in mapped STSs [J]. *Genomics*, 1996, **31**(1): 123—126
- [15] Yang J, Ferreira T, Morris A P, *et al.* Conditional and joint multiple-SNP analysis of GWAS summary statistics identifies additional variants influencing complex traits [J]. *Nature Genetics*, 2012, **44**(4): 369—375
- [16] Cheng T G, Yi H F, Zhang T K, *et al.* DNA marker technologies and their applications in animal genetics and breeding [J]. *Stockbreeding Market*, 2006, (8): 47—50 [陈天国, 易华锋, 张廷科, 等. DNA分子标记与动物遗传育种. 畜牧市场, 2006, (8): 47—50]
- [17] Wang Y F, Ma S M, Liu C P, *et al.* Development of genetic markers and assay technique of molecular markers [J]. *Journal of Northwest Sci-tech University of Agriculture and Forestry*, 2001, **29**(6): 130—136 [王永飞, 马三梅, 刘翠平, 等. 遗传标记的发展和分子标记的检测技术. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2001, **29**(6): 130—136]
- [18] Yang H Y, Cai T, Wang J, *et al.* Study on single nucleotide polymorphisms genotyping by bio-mass spectrometry [J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2003, **24**(4): 449—455 [杨何义, 蔡耘, 王杰, 等. 生物质谱作为SNP分型检测方法的研究. 质谱学报, 2003, **24**(4): 449—455]
- [19] Kojima M, Hosoda H, Date Y, *et al.* Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach [J]. *Nature*, 1999, **402**(6762): 656—660
- [20] Chen W M, He M, Yang H, *et al.* Progress on ghrelin in poultry [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2015, (8): 86—89 [陈文明, 何敏, 杨欢, 等. 禽类 Ghrelin 研究进展. 动物医学进展, 2015, (8): 86—89]
- [21] Yin C L, Zhang H X, Peng H W, *et al.* Research progress of fish ghrelin [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2012, **40**(10): 5962—5965 [尹传龙, 张昊星, 彭焕文, 等. 鱼类 Ghrelin 的研究进展. 安徽农业科学, 2012, **40**(10): 5962—5965]
- [22] Zhou C L, Bai J J, Li S J, *et al.* SNPs Detection of high density lipoprotein binding protein gene (HBP) and its association with growth traits in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2014, **22**(2): 232—238 [周春龙, 白俊杰, 李胜杰, 等. 大口黑鲈高密度脂蛋白结合蛋白基因 (HBP) SNPs 的筛选及与生长性状关联性分析. 农业生物技术学报, 2014, **22**(2): 232—238]

SNPS DETECTION OF *GHRL* GENE AND ITS ASSOCIATION WITH GROWTH TRAITS OF CHINESE SOFT-SHELL TURTLE (*PELODISCUS SINENSIS*)

LI Chun^{1,2}, CHEN Cheng¹, ZHAO Jian¹, HONG Xiao-You¹, LI Wei¹ and ZHU Xin-Ping^{1,2}

(1. Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application & Cultivation of Ministry of Agriculture, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: To study the association between *GHRL* gene and growth traits of Chinese Soft-shell Turtle (*Pelodiscus sinensis*), In this study, we detected and found 14 SNPs of *GHRL* gene of *Pelodiscus Sinensis* by DNA sequencing: C289T, G501T, T738C, G776T, A841G, T885C, T2960C, A2987T, G3390A, A3857C, G4718A, T4820C, A4850C and T4979C. The genotype and gene frequency of these SNPs in 120 Chinese Soft-shell Turtle were assayed by using the method of Bio-Mass Spectrometry. The result showed that all the loci were found in Hardy-Weinberg equilibrium in the Chinese Soft-shell Turtle population. The growth traits (body weight, body length, body width, body height and calipash length) of CT and CC diplotype were significantly higher than those of TT diplotype in locus C289T ($P < 0.05$). The growth traits (Body weight, body length, body width and calipash length) of AB diplotype were significantly higher than those of AA diplotype in locus S2 ($P < 0.05$). The growth traits (Body length and body width) of AG diplotype were significantly higher than those of AA diplotype in locus G3390A ($P < 0.05$). The growth traits (Body length, body width and calipash length) of AG diplotype were significantly higher than those of AA diplotype in locus G4718A ($P < 0.05$). The results suggested that those loci identified in our study were closely related to the growth performance of Chinese Soft-shell Turtle; therefore it could demonstrating great potentials to be used as a potential molecular markers for better breeding.

Key words: *Pelodiscus sinensis*; *GHRL*; SNP; Growth