

暗纹东方鲀生长性状相关微卫星标记筛选

马爱军^{1,2}, 邹杰^{1,3}, 孙建华^{1,3}, 王婷¹, 王广宁¹, 崔文晓^{1,3}, 王新安^{1,2}, 刘大勇⁴, 郭正龙⁴

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋生物学与生物技术功能实验室, 山东 青岛 266071; 3. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 4. 江苏中洋集团股份有限公司, 江苏 南通 226600)

摘要: 为了筛选与暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)生长相关的分子标记, 作者采用 SSR 结合 BSA 技术对同龄孵化群体的同池养殖暗纹东方鲀生长差异性性状标记进行筛选。利用 85 对微卫星引物对暗纹东方鲀生长快、慢各 30 尾个体构建的两个基因池进行分析, 共筛选到 14 个差异位点。然后分析这 14 个差异微卫星位点在这 60 个暗纹东方鲀个体中的基因型差异, 结果表明: 位点 TOP03、TOG01、fms15、fms75 与生长性状呈现极显著负相关关系($P < 0.01$), fms89 与生长性状呈现极显著正相关关系($P < 0.01$)。用另外 30 个个体(生长快慢各 15 个)进行验证实验后, 结果只有位点 fms15、fms75 与生长性状显著相关, 相关系数分别为-0.411 和-0.384。这两个微卫星位点对于暗纹东方鲀生长性状有显著效应, 为开展暗纹东方鲀的分子标记辅助育种提供了有价值的参考标记。

关键词: 暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*); 生长性状; 微卫星; 相关性分析

中图分类号: S917.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2016)10-0016-09

doi: 10.11759/hyxx 20150917002

暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)属硬骨鱼纲(Osteichthyes)、鲀形目(Tetraodontiformes)、鲀科(Tetraodontidae)、东方鲀属(*Takifugu*), 其分布集中于北太平洋西部地区的东海及黄海海域, 且可进入长江到江阴一带, 并可定居太湖^[1]。暗纹东方鲀不仅能够养血补气, 而且向来以肉味鲜美闻名, 为传统美食中的典范, 是具有很高经济价值的特种水产养殖品种^[2-3]。在实际养殖中, 暗纹东方鲀养殖技术日益成熟, 养殖规模不断扩大, 养殖产量逐年增高, 到 2014 年预期产量已达到 40 000t 以上^[2], 但都普遍存在同一暗纹东方鲀群体出现生长性状差异明显的情况, 往往一个养殖周期需要淘汰掉许多小的个体, 加之暗纹东方鲀具有相互残食的特性^[3], 小个体易受伤且死亡率极高, 而且还会受伤得病感染其他鱼体^[4]。因此, 进行暗纹东方鲀大小差异的微卫星标记研究既为暗纹东方鲀的良种选育提供依据, 也对提高养殖产量和经济效益具有深远的意义。

微卫星(Microsatellite)目前不仅广泛应用于遗传多样性分析重要性状标记的筛选^[5]、遗传图谱的构建^[6]和发育研究^[7]等, 而且可用于遗传性疾病的连锁分

析和基因诊断、品种鉴定、农作物及动物育种等领域^[8]。微卫星在水产动物生长性状分子标记方面的运用上也取得了一定的成果, Cnaani 等^[9]在利用微卫星标记对橙色莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicu*)和奥利亚罗非鱼(*Oreochromis aureus*)的杂交 F2 代进行与生长性状的相关性分析, 筛选得到位点 UNH130 和体长相关。佟广香等^[10]研究哲罗鱼(*Hucho taimen*)生长速度相关性状的微卫星筛选得到标记 106INRA、166TUF 与测量的 7 个生长性状显著相关; 111TUF 和 210TUF 与 6 个生长性状显著相关。刘伟等^[11]研究 3 种鲤鱼(*Cyprinus carpio*)群体的生长性状与微卫星标记的关系时发现: 黄河鲤(*C. carpio*)的生长性状和位点 Mfw5 相关; 建鲤(*C. carpio* var.

收稿日期: 2015-09-17; 修回日期: 2015-12-03

基金项目: 江苏省科技支撑计划资助项目(BE2013345); 江苏省水产三新工程资助项目(Y2013-12)

[Foundation: Jiangsu Science and Technology Support Program, No. BE2013345; Jiangsu Aquatic Three New Projects, No. Y2013-12]

作者简介: 马爱军(1971-), 女, 山东荣成人, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事鱼类繁育养殖生物学与遗传育种研究, E-mail: maaj@ysfri.ac.cn

jian)的生长性状与位点 Cca09、Hlj013、Mfw2、MfW7 和 Mfw29 相关; 黑龙江野鲤(*C. haematopterus*)的生长性状与位点 Mfw4、Mfw6 和 Mfw11 相关。王桂兴等^[12]研究利用 30 对牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)微卫星标记对雌核发育个体进行分析, 得到有 8 个座位分别与体质量、体长、体高性状的相关性显著。目前有关利用微卫星标记对暗纹东方鲀生长差异性性状分析研究较少, 为提高暗纹东方鲀的育种效率本研究拟运用 85 对微卫星标记, 采用 SSR 结合 BSA 技术比较分析暗纹东方鲀群体的生长差异性性状, 筛选出可能与暗纹东方鲀生长性状相连锁的微卫星标记, 为进行暗纹东方鲀的苗种选育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所用暗纹东方鲀样本由江苏中洋河豚庄园公司提供, 取自 2010 年的同池同时孵化的混合群

体, 约 180 日龄的个体。分别选取生长性状处于两端的差异个体各 30 尾, 其中, 生长快的 F(fast)组个体全长都大于 13 cm(14.8 cm±1.8 cm); 生长慢的 S(slow)组个体全长都小于 6 cm(4.9 cm±1.1 cm)。每个样本形态学测量完后, 剪取部分尾鳍鳍条分装于离心管中并置于-80℃冰箱中保存以备后用。

1.2 实验引物

使用引物序列参照 Ma 等^[13]和自己设计暗纹东方鲀引物共 16 对, 古川聪史^[14]、郝君^[15]和 Kai 等^[16]红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)微卫星引物 69 对, 由上海生工生物科技有限公司合成, 实验所用部分微卫星引物信息见表 1。

1.3 实验方法

1.3.1 基因组 DNA 的提取及检测

取保存两组样本 F 组和 S 组的尾鳍各 30 mg, 按照基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA。并用 1%的

表 1 本实验所用部分微卫星引物的核心序列、引物序列、退火温度和片段长度

Tab. 1 Microsatellite primers, repeat motif sequence, primer sequences, annealing temperature, and fragment length used in this experiment

基因座	引物序列(5'-3')	片段长度(bp)	退火温度(°C)
fms32	ACACCGCTCAATGCAAACCTC AATGTGGCGGCTACTTTTCAG	148	61
fms57	CCAGCACAGGCACTTCAGAT ATTCTGAGCATCCGCATTGT	158	60
fms75	GGCTTTACCGAGGTGTTGAG TGGAATCTGTGCCCTCACT	123	62
fms89	CGTCATGATCCAACACAAGA CGCACACATACACGAGTTCA	319	62
fms106	TCTACGCGGACATCTCTTC CTCCGCGCTCTAAAAGTCAG	355	63
fms118	ACTGGACCCTGTGTTGCTCT CCTCAGTGGTGCCAGTGTA	355	62
f1001	AAACCTAAGCTGGAGGCTCA AACTGACTGATTGGACAACACG	295~300	61
f1050	ACGTGTACGTGTGCTTCAGG CCATGATGCCTTTGATGATG	360~395	55
f1148	GGCAAGGAGCTGGCTTATGT CATCCAGCGTCACTACTCA	165~180	58
f1160	AGACACTGATGGTGCTGTG CGTAGCAACGAGACGAACAA	165~175	60
f1497	CACCTGCCCCGAAAGTTTAAG TGAAAGCCCAAGAGAGGAAA	170~182	58
f1505	CGTCAGGGAGAAGACGATTC TCGTGAAGATGGTCCACAGA	360~395	59

续表

基因座	引物序列(5'-3')	片段长度(bp)	退火温度(°C)
f1637	CCTGAAGCACACACTGCAAG CCTGATGACACCTGCTCTGA	200~208	60
f1690	TCCTCCAACCTCACGCTCTT AGGTACTTCTGGACCGCATC	220~235	59
f1691	GTTTTGCAGCACGAGTGTGT GCATCCAGGCAAGGATTA	175~195	59
f1781	TTTTCTTTCACACCCCGAAC CCCCACTTCCCCTCTTTTAG	181~202	57
TOG01	AACACCTCCACCTGCTTGCT ATTGCCAGTTGACTTTCC	280~290	54
TOG02	CACAAGGTGAGGACAAAGAC TTGGCAACAGTTAGGTAGGT	155~165	54
TOG03	TCGGTGATGATCGGTGAC TAAGCTCTGAGCCAAAAGG	280~290	57
TOP01	AAAAGAATGCTTATCCTG TTACTTGTGACCTGCGT	200~225	52
TOP02	TCTTCTTGCTATTTTGCT ATGAGTCTGGTCCTGCT	260~300	54
TOP03	TCCGCTATCACATCTATCT CATGATGCTCCTGGAAAAT	155~175	53
fms15	CTGGCATAACTGATTAGGCTGT ATAGCTGACAGCACGGGAAC	165~175	60
fms43	GTGCCACAAAGATGGAAAT TCCTTGGCAGAGTCAGTCCT	120	60
TOb10	ACCCACTCCGTCCTTCTCT TCAACCGCCCTTCCAAC	310~380	61
f169	CTCCCACGCAAGCAGTCA CTCAGTATCAGGGGTCAAAGAAAT	280~300	60
f362	TTTACTGGCCAAACAACCTCTG GGCCTATAGGACCTCTGGACT	398~405	60
f1372	GAGGACATCCGATCACATCC CCCTGCAGGAGGAATACCAG	212~240	60
f1497	CACCTGCCCGAAAGTTAAG TGAAAGCCCAAGAGAGGAAA	170~182	58

琼脂糖凝胶电泳进行鉴定，核酸蛋白测定仪检测 DNA 浓度，无菌水稀释到浓度为 50 ng/μL，-20°C 冷冻保存。

1.3.2 BSA 基因池的建立及其 PCR 扩增

F 和 S 两组暗纹东方鲀各 30 个样本，从 F 组每个样本抽取 10 μL DNA 溶液混合成 F 组基因池，同样方法获得 S 组基因池。用 85 对微卫星引物对 F 和 S 两组基因池进行 PCR 扩增，体系为：buffer 1.4 μL、dNTP 1.2 μL (mmol/μL)、上下游引物各 0.6 μL (10 μmol)、

模板 1 μL (50 ng/μL)、taq 酶 0.2 μL (5 U/μL)、补充去离子水 10 μL。PCR 程序是：预变性(95°C 5 min)，循环 30 次(变性 94°C 30 s、退火 30 s、复性 72°C 30 s)，延伸(72°C 10 min)，结束(4°C)。将 85 对微卫星引物的 PCR 扩增产物变性，在 8% 的变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离，使用硝酸银法染色^[17]，记录带型并用扫描保存电泳结果。

1.3.3 筛选差异条带及个体 PCR 扩增

比较分析两个基因池聚丙烯酰胺电泳条带，初

步找出 F 和 S 两组具有差异性条带的微卫星位点作为候选的生长差异的微卫星分子标记, 将筛选出的具有差异的引物按照上述的 PCR 条件, 对构建基因池的 60 个暗纹东方鲀个体进行 PCR 扩增、聚丙烯酰胺凝胶电泳及硝酸银法染色, 再次记录差异条带。

1.3.4 生长性状差异条带分析

使用 SPSS 软件对筛选出的差异等位基因片段与暗纹东方鲀生长性状这两个变量的进行相关性检验, 判断差异等位基因片段和暗纹东方鲀生长性状的相关性情况, 筛选出与暗纹东方鲀生长差异性状显著相关的位点。

1.3.5 验证生长性状差异位点

从江苏中洋河豚庄园公司再次采样, 来自不同家系混养的同日龄的暗纹东方鲀, 生长显著快、慢各 15 尾, 将筛选的微卫星位点, 对上述新样本个体进行 PCR 扩增、聚丙烯酰胺凝胶电泳及硝酸银法染色, 统计特异性条带并进行相关性检测, 以验证筛选到标记的准确性。

1.3.6 差异等位基因片段切胶测序

将验证实验的差异条带进行切胶回收、纯化, 送至上海生工生物科技有限公司进行克隆、测序, 以验证差异片段的是否为相应序列。

2 结果

2.1 BSA 基因池的差异条带筛选

使用试剂盒提取基因组 DNA, 紫外线分光光度计进行测定及琼脂糖检测后, 选取质量好的 DNA 用于下一步实验。用提取的高质量 DNA 构建了 F 和 S 两组基因池。85 对引物对构建的 F 和 S 两组基因池进行 PCR 扩增, 将扩增产物变性后进行 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染, 结果显示有 78 对引物具有清晰目的条带, 筛选出 TOP01、TOP03、TOG01、TOG02、Tob10、Tob13、fms15、fms75、fms89、f169、f362、f383、f1372 和 f1497 共 14 对引物的电泳条带在 F 组和 S 组间具有差异等位基因, 如图 1 为 F 和 S 基因池的差异等位基因的聚丙烯酰胺电泳图。

2.2 统计个体中带型的差异等位基因片段

将 F 和 S 两组基因池筛选的 14 对具有差异等位基因片段的微卫星引物, 对构建基因池的 60 个个体进行 PCR 扩增, 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分析结果。结果显示微卫星位点 f383 扩增产物的 PAGE 条带模糊无法辨认, 位点 Tob13 的产物则无多态性、无差异,

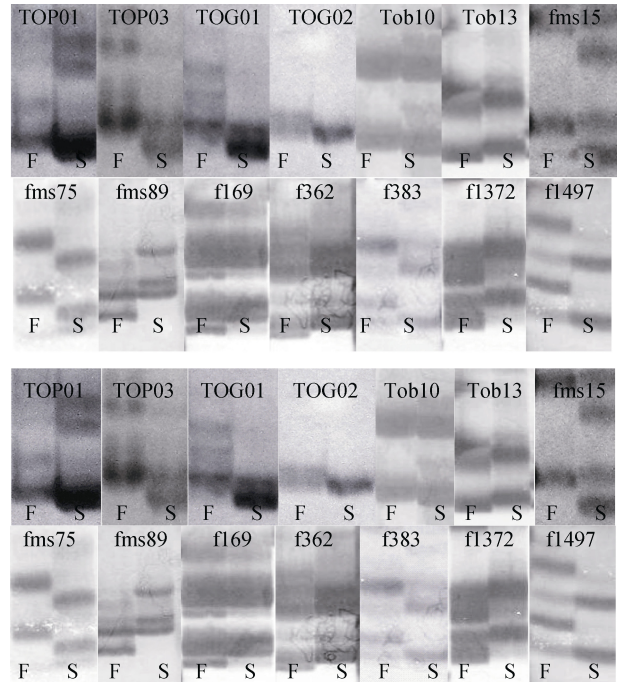


图 1 14 个微卫星位点的 BSA 分析扩增图

Fig. 1 The amplified bands from BSA analysis for 14 microsatellite loci

F. 生长快组; S. 生长慢组

F. fast; S. slow

所以两个微卫星位点被舍弃。其余位点差异带型统计结果见表 2。图 2 为引物 fms15、fms75 在两组个体中的 PCR 扩增带谱, 可以看出两微卫星位点在 F 组和 S 组的目的等位基因片段有着较明显的差异, fms15 位点 180 bp 和 fms75 位点 130 bp 的差异等位基因片段在 F 组的扩增带谱中出现的频率较低, 在 S 组的扩增带谱出现的频率较高(箭头指示的为差异等位基因片段)。

2.3 差异等位基因片段的 SPSS 相关性分析

根据表 2 结果, 通过 SPSS13.0 软件对筛选的 12 个微卫星位点的差异等位基因片段与暗纹东方鲀的生长差异性状进行相关性分析, 已知 r 在 0.00~0.33 呈现弱相关性, 0.33~0.67 呈现中相关性, 0.67~1.00 呈现强相关性。由表 3 可得, 位点 TOP01、TOG02、Tob10、f169、f362、f1372 的生长差异相关性不显著 ($P>0.05$); 位点 TOP03、TOG01、fms15、fms75、fms89 生长差异相关性极显著 ($P<0.01$), 且为中度相关 ($0.33<r<0.67$), 其中有 1 个微卫星位点 fms89 310 bp 的等位基因片段与暗纹东方鲀的 F 组性状存在一定的正相关性, 其余 4 个微卫星位点则为负相关性。

表 2 F 和 S 两组 12 个位点的差异等位基因片段统计表

Tab. 2 Frequency of each site of 12 pairs of primers of F and S groups

引物名称	大鱼特有带数	出现率(%)	小鱼特有带数	出现率(%)	差异片段大小(bp)
TOP01	15/30	50.00	8/30	26.67	225
TOP03	3/30	10.00	19/30	63.33	155
TOG01	6/30	20.00	16/30	53.33	210
TOG02	14/30	46.67	8/30	26.67	270
Tob10	5/30	16.67	11/30	36.67	310
fms15	2/30	6.67	10/30	33.33	165
fms75	2/30	6.67	13/30	43.33	130
fms89	10/30	33.33	1/30	3.33	310
f169	8/30	26.67	4/30	13.33	160
f362	17/30	56.67	22/30	73.33	230
f1372	15/30	50.00	9/30	30.00	245
f1497	8/30	26.67	13/30	43.33	200

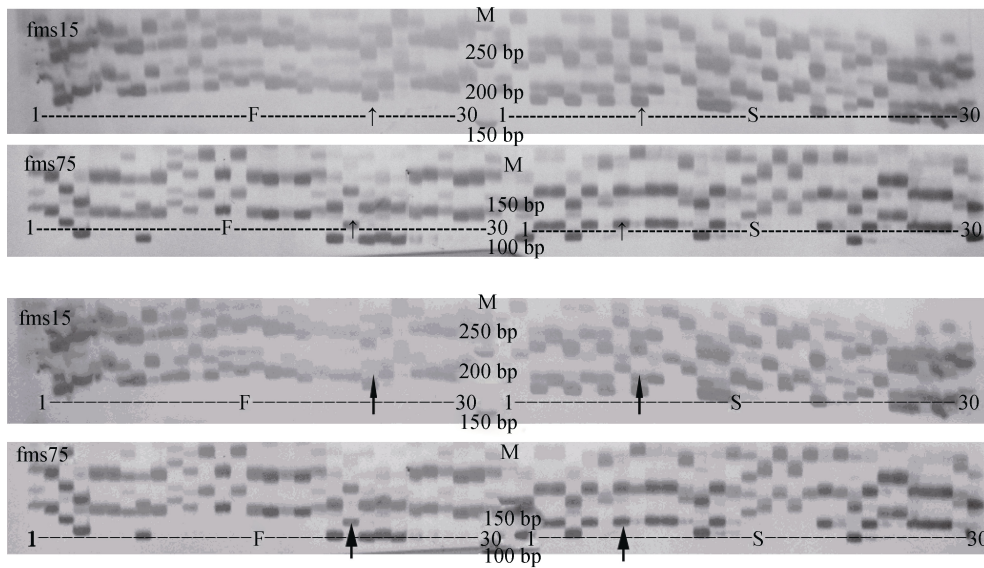


图 2 微卫星引物 fms15、fms75 在 F 和 S 组个体的 PCR 扩增带谱
Fig. 2 PCR-amplified bands of microsatellite primers fms15 and fms75 in F and S groups

M. DL500bp 分子标记; F. 生长快组; S. 生长慢组
M. DL500bp DNA marker ; F. fast; S. slow

2.4 验证生长显著差异的微卫星位点

经相关性分析得到 TOP03、TOG01、fms15、fms75 和 fms89 5 个微卫星位点与生长差异性状存在极显著相关关系, 且为中等相关; 位点 f1497 与生长性状存在显著相关, 但相关强度较弱。然后, 将重新选取的不同群体的暗纹东方鲀生长差异显著的快和慢各 15 个个体进行 5 个微卫星引物的 PCR 扩增、聚丙烯酰胺凝胶电泳及硝酸银染色, 统计差异片段, 并进行相关性分析(表 4)。由表 4 可得, 位点 fms15 扩增的差异等位基因片段在生长差异的 F 和 S 组重

新出现的频率分别为 0 和 33.33%; 位点 fms75 扩增的差异等位基因片段在生长差异的 F 和 S 组重新出现的频率分别为 6.67%和 40.00%, 且分析相关性关系均呈现显著性, 而其余 3 个则相关性不显著。得到的微卫星位点 fms15 和 fms75 的结果基本与实验预期一致, 相关系数分别为-0.411 和-0.384, 进一步验证了作者所筛选的与暗纹东方鲀生长性状存在显著相关性的微卫星位点的准确性。图 3 为 fms15、fms75 两个位点的 PCR 扩增带谱(箭头指示的为差异等位基因片段)。

表 3 微卫星位点与暗纹东方鲀生长差异性状的关联性分析
Tab. 3 Correlation analysis between microsatellite loci and faster-slower trait of *Takifugu obscurus*

引物名称	相关系数/ <i>r</i>	Sig.(2-tailed)/ <i>P</i>
TOP01	0.240	0.065
TOP03	-0.553	0.000**
TOG01	-0.346	0.007**
TOG02	0.208	0.112
Tob10	-0.226	0.082
fms15	-0.333	0.009**
fms75	-0.423	0.001**
fms89	0.388	0.002**
f169	-0.167	0.203
f362	-0.175	0.182
f1372	0.204	0.118
f1497	-0.259	0.046*

注: *. 显著相关($P < 0.05$); **. 极显著相关($P < 0.01$)

2.5 差异等位基因片段切胶测序及 BLAST 比对

对具有差异条带的微卫星引物进行验证的实验, 得到 fms15 和 fms75 存在显著性的差异。然后将其差异条带进行切胶回收, 送至上海生工生物科技发展有限公司进行序列克隆、测定, 获得微卫星位点 fms15 差异条带的 DNA 序列。位点 fms15 的测序结果为: TCTGGCATAACTGATTAGGCTGTAGCATGAATGTAGCATGTAGCAAGAATGCCAGCATCCTCTTACGGTGTGGAACAGAGAGGGCTATCATTAGCGAAAGCAATCTGCAGTCCCCGTGCTG

表 4 差异等位基因片段在个体扩增带型中的出现次数统计

Tab. 4 Statistical results of differential bands of individual banding patterns

引物名称	大鱼特有条带数	出现率(%)	小鱼特有条带数	出现率(%)	相关系数/ <i>r</i>	Sig.(2-tailed)/ <i>P</i>
TOP03	3/15	20.00	4/15	26.67	-0.079	0.679
TOG01	3/15	20.00	2/15	13.33	0.107	0.580
fms15	0/15	0	5/15	33.33	-0.441	0.017*
fms75	1/15	6.67	6/15	40.00	-0.384	0.040*
fms89	6/15	40.00	4/15	26.67	0.170	0.377

3 讨论

3.1 微卫星分析方法

分群分离分析法(BSA)的基本原理是从某一分群中筛选出一定数量具有目标基因表型差异的个体, 分别构成 2 个亚群或集团; 该方法可用来快速鉴别与特定基因或染色体区域连锁的标记^[18]。现在

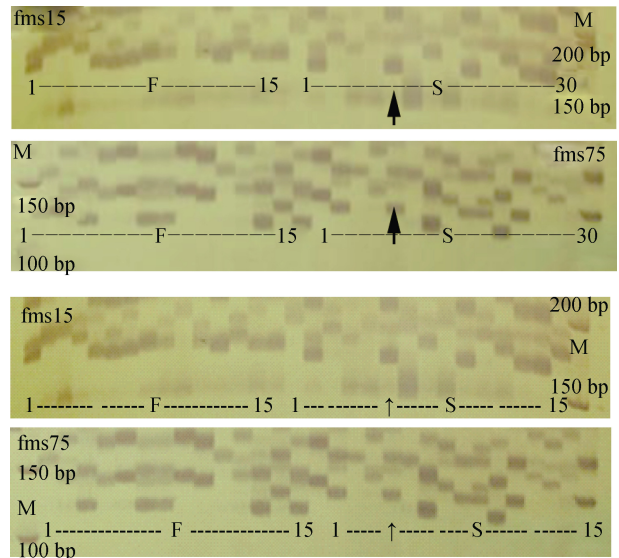


图 3 微卫星引物 fms15、fms75 在验证个体的 PCR 扩增带谱

Fig. 3 Amplified bands of microsatellite primers fms15 and fms75 in confirmatory individuals.

M. DL500bp 分子标记; F. 生长快组; S. 生长慢组
M. DL500bp DNA marker; F. fast; S. slow

TCAGCTATA, 通过 NCBI 数据库 BLAST 比对, 证实该片段序列和红鳍东方鲀发布的基因组一段高度吻合, 同源性达到 98%, 差别在于序列中有 3 个碱基发生置换(G-C、C-G、G-A); 同时发现该序列预测功能可能与 RNA 结合蛋白和 CXADR 膜蛋白有关。而位点 fms75 因为基因片段较小、非特异性扩增条带较多、回收 DNA 浓度较低, 导致未能获得理想扩增结果。

已经广泛应用于动植物抗性基因、生长相关性状的筛选鉴定工作当中^[19-20]。王美玉等^[21]采用 69 个微卫星位点对半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)极大群体和极小群体的基因型分布进行筛选, 得到 12 个微卫星位点存在差异, 在其后的验证群体与生长性状相关的检验中也呈现出显著差异, 说明采用极端群体进行初筛有效。张天时等^[22]采用分离群体标记法也

筛选出与中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 生长性状相关的微卫星位点。本实验则也采用 BSA 法将收集的暗纹东方鲀分为 F 和 S 组, 进行差异微卫星位点的初筛选。然后将这些标记对群体内个体进行相关分析, 并验证筛选极端群体标记的有效性。

微卫星遗传标记为共显性标记, 且检测方便, 数量性状基因位点定位常采用微卫星遗传标记分析, 是目前水产动物数量性状基因位点定位的常用方法之一。近几年, 国内研究者利用微卫星标记也得到了鲫 (*Carassius auratus*)^[23]、青虾 (*Macrobrachium nipponense*)^[24]、刺参 (*Stichopus japonicus*)^[25] 和中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*)^[26] 等生长性状相关联的微卫星位点。因鱼类大多数的经济性状属于数量性状, 遗传基础复杂且受多基因调控, 易受环境影响, 表现为连续变异, 从而不能明确表现型与基因型之间的对应关系^[27]。但在基因组时代分析大批 DNA 分子标记与性状连锁关系、分子标记与数量性状的相关关系, 得到与一个或多个标记的遗传相关的数量性状, 通过改变相应基因型频率, 达到改变表型的目的^[28]。本研究采用微卫星分子标记的方法对暗纹东方鲀生长差异性状进行研究, 从分子层面揭示数量性状的遗传基础, 后续的工作将对筛选获得的微卫星标记进行其他群体验证和多代验证, 进一步证实其适应范围、准确性和有效性, 以达到能合理地应用该标记指导育种, 提高育种速度, 改良重要生长性状。

3.2 与生长性状显著相关的微卫星标记

Reed 等^[29]通过对小鼠进行基因敲除试验后, 发现小鼠 (*Mus musculus*) 的体质量性状是受多个基因控制的性状。刘伟等^[11]对 3 种不同地理群体的鲤研究发现鲤的生长性状也与多个基因相关, 本研究也得到了类似的结果: 利用 85 对东方鲀微卫星引物对 60 个生长性状差异显著的个体进行 SSR 结合 BSA 技术的分析, 得到了 14 个微卫星位点能在暗纹东方鲀 F 和 S 两组基因池中扩增出差异条带, 并通过单个样本的 SSR 分析验证得到了其中 5 个微卫星位点扩增的差异条带显著, SPSS 分析得到该 5 个微卫星位点与生长差异性状相关极显著, 说明这些微卫星位点可能与暗纹东方鲀的生长差异性状有一定的关联, 如果条带所对应基因位点与生长差异性状无关, 则在大小群体之间出现的频率应该基本一致。再用新的生长性状差异明显的群体进行验证实验, 结果只有 fms15 和 fms75 两个位点与生长差异形状存在显

著相关, 进一步说明这两个位点与暗纹东方鲀的生长性状存在着一定的关联。为进一步确认本试验中微卫星位点是否与暗纹东方鲀的生长性状有关, 我们将 fms15 位点测序所得全序列与 NCBI 的 BLAST 数据库进行比对, 去寻找与生长相关的基因及蛋白, 作为辅助数据验证本试验结果的可靠性。对比完后发现, 该序列可能与 RNA 结合蛋白和 CXADR 膜蛋白有关, 但目前并没有具体的研究结果。

本研究所用 BSA 法只能对目标基因进行分子标记, 而目标基因与分子标记间连锁的紧密程度不能确定, 也无法得知在遗传连锁图上的位置, 更不能完成后续的 QTL 定位, 因此目前还不能完全确定 fms15 或 fms75 两个位点是否存在多位点关联效应, 该遗传标记是否可以作为暗纹东方鲀优势生长性状分子辅助育种标记还需要进一步深入验证和研究。

参考文献:

- [1] 成庆泰, 王存信, 田明诚, 等. 中国东方鲀属鱼类分类研究[J]. 动物学报, 1975, 21(4): 353-378.
Cheng Qingtai, Wang Cunxin, Tian Mingcheng, et al. Studies on the Chinese tetraodonid fishes of the genus *fugu*[J]. Acta Zoologica Sinica, 1975, 21(4): 353-378.
- [2] 马爱军, 房金岑, 陈蓝荪, 等. 河豚鱼产业调研报告(上)[J]. 海洋与渔业, 2014(7): 87-92.
Ma Aijun, Fang Jincen, Chen Lansun. Research report on puffer fish industry[J]. Ocean and Fishery, 2014(7): 87-92.
- [3] 窦海鸽, 刘彦. 暗纹东方鲀苗种互相残食原因及控制措施[J]. 北京水产, 2004, 3: 13-14.
Dou Haige, Liu Yan. Reason and control measure of cannibalism in *Takifugu obscurus* young fish[J]. Journal of Beijing Fisheries, 2004, 3: 13-14.
- [4] 郭正龙. 暗纹东方鲀常见疾病及防治方法[J]. 科学养鱼, 2009, 2: 57-58.
Guo Zhenglong. Prevention and treatment methods for common disease of bubble fish[J]. Scientific Fish Farming, 2009, 2: 57-58.
- [5] Miyao A, Zhong H S, Monna L, et al. Characterization and genetic mapping of simple sequence repeats in the rice genome[J]. DNA Research, 1996, 3(4): 233-238.
- [6] Norri A T, Bradley D G, Cunningham E P. Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations[J]. Aquaculture, 1999, 180(3): 247-264.
- [7] Bierne N, Launey S, Naciri Graven Y, et al. Early effect of inbreeding as revealed by microsatellite analyses on *Ostrea edulis* larvae[J]. Genetics, 1998, 148(4): 1893-1906.

- [8] Beheregaray L B, Ciofi C, Geist D, et al. Genes record a prehistoric volcano eruption in the Galapagos[J]. *Science*, 2003, 302 (5642): 75.
- [9] Cnaani A, Hallerman E M, Ron M, et al. Detection of a chromosomal region with two quantitative trait loci, affecting cold tolerance and fish size, in an F2 tilapia hybrid[J]. *Aquaculture*, 2003, 223(1-4): 117-128.
- [10] 佟广香, 匡友谊, 张超, 等. 哲罗鱼生长速度相关性状的微卫星标记筛选[J]. *华北农学报*, 2012, 27(z1): 33-39.
Tong Guangxiang, Kuang Youyi, Zhang Chao, et al. Identification of microsatellite markers associated with growth rate traits in *Hncho taimen*[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2012, 27(z1): 33-39.
- [11] 刘伟, 苏胜彦, 董在杰, 等. 3个鲤群体的微卫星标记与生长性状相关性分析[J]. *南方水产科学*, 2012, 8(3): 17-24.
Liu Wei, Su Shengyan, Dong Zaijie, et al. Correlation analysis of microsatellite DNA markers with growth trait among 3 breeding populations of common carp[J]. *South China Fisheries Science*, 2012, 8(3): 17-24.
- [12] 王桂兴, 刘永新, 孙效文, 等. 牙鲆微卫星分子标记与生长性状的相关性分析[J]. *东北农业大学学报*, 2009, 40(7): 77-84.
Wang Guixing, Liu Yongxin, Sun Xiaowen, et al. Correlation analysis of microsatellite DNA marks with growth trait of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2009, 40(7): 77-84.
- [13] Ma Hongyu, Chen Songlin, Liao Xiaolin, et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from a dinucleotide-enriched genomic library of obscure puffer (*Takifugu obscurus*) and cross-species amplification[J]. *Conserv Genet*, 2009, 10(4): 955-957.
- [14] 古川聪史. 红鳍东方鲀与高生长性状有关的遗传学及分子生物学的研究[D]. 日本: 东京大学农学院生命科学研究科, 2009.
Guchuan Congshi. Study on the genetics and molecular biology of growth-related traits in *Takifugu rubripes*[D]. Japan: Tokyo University of Agriculture and Life Sciences, 2009.
- [15] 郝君, 孙效文, 孟雪松. 红鳍东方鲀微卫星 DNA 多态性初步分析[J]. *上海水产大学学报*, 2006, 15(1): 21-24.
Hao Jun, Sun Xiaowen, Meng Xuesong. Analyzing the polymorphisms of *Takifugu rubripes* with microsatellite[J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2006, 15(1): 21-24.
- [16] Kai W, Kikuchi K, Tohari S, et al. Integration of the genetic map and genome assembly of fugu facilitates insights into distinct features of genome evolution in teleosts and mammals[J]. *Genome Biol Evol*, 2011, 3: 424-442.
- [17] 梁宏伟, 王长忠, 李忠, 等. 聚丙烯酰胺凝胶快速、高效银染方法的建立[J]. *遗传*, 2008, 30(10): 1379-1382.
Liang Hongwei, Wang Changzhong, Li Zhong, et al. Improvement of the silver-stained technique of polyacrylamide gel electrophoresis[J]. *Hereditas*, 2008, 30(10): 1379-1382.
- [18] Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(21): 9828-9832.
- [19] 陈超, 石拓, 孙曙光, 等. 应用 RAPD 标记对东方鲀属进行种类鉴别及其聚类分析[J]. *海洋水产研究*, 2001, 22(3): 32-36.
Chen Chao, Shi Tuo, Sun Shuguang, et al. Identification and phylogenetic relationships among four species of puffer fish in *Fugu* as determined by RAPD markers[J]. *Marine Fisheries Research*, 2001, 22(3): 32-36.
- [20] 崔建洲, 申雪艳, 杨官品, 等. 红鳍东方鲀基因组微卫星特征分析[J]. *中国海洋大学学报*, 2006, 36(2): 249-254.
Cui Jianzhou, Shen Xueyan, Yang Guanpin, et al. The analysis of simple sequence repeats in *Takifugu rubripes* genome[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2006, 36(2): 249-254.
- [21] 王美玉, 刘海金. 半滑舌鲷生长性状的微卫星标记筛选[J]. *海洋渔业*, 2012, 34(2): 121-129.
Wang Meiyu, Liu Haijin. Correlation analysis between growth-related traits and microsatellite markers in half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *Marine Fisheries*, 2012, 34(2): 121-129.
- [22] 张天时, 刘萍, 李健, 等. 中国对虾与生长性状相关微卫星 DNA 分子标记的初步研究[J]. *海洋水产研究*, 2006, 27(5): 201-209.
Zhang Tianshi, Liu Ping, Li Jian, et al. Preliminary study on specific microsatellites markers related to growth trait in *Fenneropenaeus chinensis*[J]. *Marine Fisheries Research*, 2006, 27(5): 201-209.
- [23] 贾志武, 郑先虎, 匡友谊, 等. 鲫微卫星标记与几个生长性状的相关性分析[J]. *水产学杂志*, 2012, 25(6): 1-6.
Jia Zhiwu, Zheng Xianhu, Kuang Youyi, et al. Correlation analysis on four growth traits in crucian carp *Carassius auratus* by SSR and EST-SSR markers[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2012, 25(6): 1-6.
- [24] 傅洪拓, 万山青, 付春鹏, 等. 青虾生长性状相关的微卫星标记筛选[J]. *水生生物学报*, 2010, 34(5): 1043-1048.
Fu Hongtuo, Wan Shanqing, Fu Chunpeng, et al.

- Screening of microsatellite markers associated with growth traits in *macrobrachium nipponense*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2010, 34(5): 1043-1048.
- [25] 孙国华, 杨建敏, 孙孝德, 等. 刺参微卫星标记与生长性状体重、体长的相关分析[J]. 水产学报, 2011, 35(4): 501-508.
- Sun Guohua, Yang Jianmin, Sun Xiaode, et al. Correlation analysis of microsatellite DNA markers with growth traits of body weight and length in *Apostichopus japonicus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(4): 501-508.
- [26] 吴滢, 付春鹏, 蒋速飞, 等. 中华绒螯蟹微卫星标记与生长性状相关性的初步分析[J]. 水生生物学报, 2011, 35(2): 197-202.
- Wu Yan, Fu Chunpeng, Jiang Sufei, et al. Preliminary studies on the correlation between microsatellite markers and growth traits in chinese mitten crab (*Eriocheir Sinensis*)[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2011, 35(2): 197-202.
- [27] 许可, 马爱军, 王新安, 等. 大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)生长性状相关的微卫星标记筛选[J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(3): 577-583.
- Xu Ke, Ma Aijun, Wang Xinan, et al. Microsatellites molecular markers and the correlation to growth trait of *Scophthalmus maximus*[J]. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2009, 40(3): 577-583.
- [28] Wang Z, Zhou J, Ye Y, et al. Genetic structure and low genetic diversity suggesting the necessity for conservation of the Chinese longsnout catfish, *Leiocassis longirostris* (Pisces: Bagriidae)[J]. Environ Biol Fish, 2006, 75(4): 455-463.
- [29] Reed D R, Lawler M P, Tordoff M G, et al. Reduced body weight is a common effect of gene knockout in mice[J]. BMC Genet, 2008, 9(4): 1-6.

Screening growth-related microsatellite markers in *Takifugu obscurus*

MA Ai-jun^{1, 2}, ZOU Jie^{1, 3}, SUN Jian-hua^{1, 3}, WANG Ting¹, WANG Guang-ning¹, CUI Wen-xiao^{1, 3}, WANG Xin-an^{1, 2}, LIU Da-yong⁴, GUO Zheng-long⁴

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Qingdao 266071, China; 2. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China; 3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 4. Jiangsu Zhongyang Group Limited by Share Ltd, Nantong 226600, China)

Received: Sept. 17, 2015

Key words: *Takifugu obscurus*; growth trait; microsatellite; correlation analysis

Abstract: A population of *Takifugu obscurus* with significant growth differences was investigated for screening molecular markers linked to growth traits, using SSR combined with bulked segregation analysis (BSA). Two gene pools were respectively constructed using 30 DNA templates isolated from *T. obscurus* samples with significantly different growth rates and then amplified by 85 pairs of microsatellite primers. The unique alleles were found in 14 loci. These 60 *T. obscurus* individuals were genotyped by SSRs. The results showed that loci TOP03, TOG01, fms15, and fms75 had a highly significant negative correlation with growth trait ($P < 0.01$), while fms89 showed extremely significant positive correlation with growth trait ($P < 0.01$). The verification test using another population of 30 randomly selected *T. obscurus* with significantly different growth rates indicated that only loci fms15 and fms75 were significantly correlated with growth trait, with correlation coefficients of -0.384 and -0.411 , respectively. Therefore, these two microsatellite loci with a significant linkage with growth traits could be used as reference markers for marker-assisted breeding of *T. obscurus*.

(本文编辑: 谭雪静)