

翘嘴鳊(*Siniperca chuatsi*)EST-SSR 标记与生长性状相关性及其 4 个选育群体遗传结构研究*

袁文成¹ 叶金明² 黄鹤忠^{1,3}① 肖攀¹ 路瑶¹ 李泽¹ 朱传坤³

(1. 苏州大学基础医学与生物科学学院 苏州大学水产研究所 苏州 215123; 2. 扬州市水产生产技术推广站 扬州 225007; 3. 江苏省区域现代农业与环境保护协同创新中心 淮安 223300)

摘要 采用翘嘴鳊(*Siniperca chuatsi*)转录组高通量测序并筛选得到的 13 对多态性 EST-SSR 引物,对 60 尾翘嘴鳊的体长、体高、体厚及体重 4 种生长性状进行标记-性状相关性研究,并对 4 个翘嘴鳊选育群体各 30 尾个体进行遗传结构分析。结果显示,与其生长性状显著相关的微卫星分子标记有 5 个,包括:分别与体厚和体长极显著相关($P<0.01$)和显著相关($P<0.05$)的标记 C10127, AA 型为体长、体厚的优势基因型,而 AC 型为劣势基因型;与体重显著相关($P<0.05$)的标记 C19016, AA 型为体重的优势基因型,AB 型为体长的劣势基因型;与体厚显著相关($P<0.05$)的标记 C14847, BB 型为体厚的优势基因型;分别与体长、体高和体重、体厚极显著相关($P<0.01$)和显著相关($P<0.05$)的标记 C12350, BC 型为体长、体厚、体高和体重性状的优势基因型;分别与体厚、体重和体高极显著相关($P<0.01$)和显著相关($P<0.05$)的 C18691 标记, BB 型为体厚、体重和体高性状的优势基因型。4 个翘嘴鳊群体遗传多样性高低依次为太湖选育群体>长江口选育群体>洪泽湖选育群体>鄱阳湖选育群体,其平均的等位基因数、有效等位基因数、观测杂合度、期望杂合度和多态信息含量分别为 2.2115、1.9405、0.55513、0.5925 和 0.3775,属于中度多态水平。

关键词 翘嘴鳊; EST-SSR 标记; 生长性状; 遗传结构; 相关性分析

中图分类号 Q953; Q789 doi: 10.11693/hyh20171000257

翘嘴鳊(*Siniperca chuatsi*)隶属鲈形目、鳊亚科、鳊属,是我国鳊属的 7 个种中个体最大、生长速度最快的种类,历来为我国重要的名优鱼类养殖对象。但近年来翘嘴鳊野生原始种质资源锐减、种质退化、生长和抗逆性能下降等问题变得越来越严重,迫切需要开展鱼类选育和遗传改良的研究(Liu *et al.*, 2004)。微卫星(即简单序列重复 simple sequence repeat, SSR)具有重复性好、多态性高、共显性强以及在基因组中数量丰富和分布广泛的特点。通过转录组测序和验证获得来源于基因编码区的表达序列微卫星分子标记(EST-SSR)可以在相关功能基因上定位,从而经济高

效地开发出 QTL 定位的 EST-SSR 标记并应用于分子标记辅助育种(Zhang *et al.*, 2012), EST-SSR 标记相比基因组 SSR(G-SSR)标记辅助育种的效率更高(Gupta *et al.*, 2004; Skaala *et al.*, 2004),已成为开展物种性状选育(Nie *et al.*, 2013; Xanthopoulou *et al.*, 2017)和群体遗传结构分析(Ding *et al.*, 2015)研究的理想工具。近年来,微卫星分子标记技术在翘嘴鳊的遗传和育种研究方面也得到了较好的应用,匡刚桥等(2007)采用 FIASCO (Fast Isolation by AFLP Sequences Containing repeats)法构建翘嘴鳊 G-SSR 富集文库,分离了微卫星 DNA 序列并对其特征进行分析; Yang 等(2014)利

* 江苏省水产三新工程项目, D2015-15 号; 江苏省科技计划现代农业重点项目, BE2017311 号; 江苏省区域现代农业与环境保护协同创新项目, 48SKY00 号; 江苏省渔业科技项目, Y2017-38 号; 苏州市科技计划农业应用基础研究项目, SNG201608 号。袁文成, 硕士研究生, E-mail: wencheng_bio@163.com

通讯作者: 黄鹤忠, E-mail: suda-shui@163.com, huanghz@suda.edu.cn

收稿日期: 2017-10-10, 收修改稿日期: 2017-11-09

用 G-SSR 开展了翘嘴鲈亲子关系的研究; 宋易等 (2016) 对 5 代翘嘴鲈选育群体开展了 2 个单核苷酸多态性标记和 4 个微卫星标记优势基因型的数目以及遗传相似性和遗传距离的研究, 以验证这些微卫星标记用于辅助育种的富集效果和可靠性。为了进一步开发与翘嘴鲈生长性状相关的 EST-SSR 分子标记并评估不同选育群体的遗传变异状况, 本文基于作者前期翘嘴鲈转录组测序并开发的 EST-SSR 多态性分子标记(袁文成等, 2015)的基础上, 通过单标记分析技术筛选了与翘嘴鲈体长、体高、体厚、体重 4 个生长性状相关的 EST-SSR 分子标记, 并利用此分子标记研究不同选育群体的遗传结构。以期翘嘴鲈生长性状分子标记辅助育种和种质资源保护提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料

用于翘嘴鲈标记-性状相关性研究的材料来自于相同批次长江口群体和太湖群体苗种且在同一池塘养殖 7 月龄的翘嘴鲈健康个体, 随机选取 60 尾, 进行体长、体重等表型性状指标测量以及分子生物学检测。翘嘴鲈选育群体遗传结构分析的材料分别取自于扬州市董氏特种水产有限公司养殖基地的 F2 代鄱阳湖选育群体(简称 BYHP)和 F2 代洞庭湖选育群体(简称 HZHP)以及苏州市申航生态科技发展股份有限公司养殖基地的 F2 代太湖选育群体(简称 THP)和 F2 代长江口选育群体(简称 CJKP)。样本数量为每个群体中各随机选取健康个体 30 尾。

1.2 EST-SSR 引物

采用本实验室在翘嘴鲈转录组测序数据基础上自主设计并经多态性验证的 13 对 EST-SSR 引物(表 1), 引物由上海生工公司合成。

1.3 试验方法

1.3.1 表型性状的测量及基因组 DNA 的提取 测量和计算每尾鱼的体重、体长、体厚及体高 4 个表型性状后剪取其鳍条组织, 保存于 95% 酒精中备用。基因组 DNA 提取采用酚-氯仿抽提法, DNA 含量、纯度及完整性测定采用核酸蛋白测定仪(Thermo Fisher)和琼脂糖凝胶电泳法, 用无菌水稀释至 100ng/ μ L 后, -20°C 保存备用。

1.3.2 微卫星扩增反应及电泳 按照 Zhang 等 (2012) 的方法, 将 13 对微卫星引物(表 1)在 PCR 仪 (TaKaRa) 上扩增, 采用 PCR 反应体系 20 μ L (其中: 无

菌水 7 μ L, 2 \times ES Taq MasterMix 10 μ L, 模板 DNA 50ng, 10 μ mol/L 上下游引物各 1 μ L), 扩增程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 2min 预变性, 30 个循环[变性(95 $^{\circ}\text{C}$)、退火(50—60 $^{\circ}\text{C}$)和延伸(72 $^{\circ}\text{C}$)各 30s], 最后延伸(72 $^{\circ}\text{C}$)5min。参照高东等 (2009) 的方法, PCR 产物在 6% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 90min(电压 150V)后进行硝酸银染色, 电泳图用凝胶成像系统拍摄, 利用 Gel-Pro Analyzer 4.5 软件进行读带和分型。

1.3.3 种群遗传结构的检测 按 1.3.2 方法, 利用 13 对微卫星分子标记引物(表 1)对 HZHP、CJKP、BYHP 和 THP 4 个选育群体进行基因组扫描, 获得稳定扩增、条带清晰的多态性电泳图, 用于种群遗传结构分析。

1.4 数据分析与统计

1.4.1 基因标记、基因型与生长性状的相关分析 在 SPSS 16.0 软件中首先利用 Kolmogorov-Smirnov 法对翘嘴鲈体长、体重、体厚和体重 4 个生长性状的频率分布进行正态分布检验; 其次利用广义线性模型(GLM)的最小二乘方差分析法分别分析 13 个 SSR 标记与翘嘴鲈 4 种生长性状间的相关性, 获得显著相关的 SSR 标记; 最后采用 ANOVA 方差分析法进行显著相关 SSR 标记的不同基因型与 4 种生长性状间的多重比较, 从而获得与生长性状显著相关的基因型。

1.4.2 遗传结构分析 获取扩增电泳条带图以后, 利用软件 Gel-Pro Analyzer 4.5 获取每尾翘嘴鲈的基因型数据。采用 PopGen32 软件对 4 个选育群体的每个微卫星标记统计其等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、等位基因频率(P)、观测杂合度(H_o)及期望杂合度(H_e), 并计算多态性信息含量(PIC) (Botstein *et al.*, 1980)。

$$\text{PIC} = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2$$

式中, P_i 、 P_j 分别为第 i 个和第 j 个群体中的等位基因在群体中的频率, n 为某一基因座上的等位基因数。

根据 Lynch(1999)的 Nei 指数法计算 4 个翘嘴鲈选育群体间的遗传相似度(S)和遗传距离(D)。 $S = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ 。式中, N_{xy} 为两个个体共享的图带数, N_x 和 N_y 分别为 x 和 y 个体拥有的电泳条带数。

2 结果与分析

2.1 表型性状的分布检测

翘嘴鲈体重、体长、体厚和体高 4 个生长性状的测量数据均表现出连续变化的特点, 表明这些性状

均是数量性状(吴滢等, 2011); 由 Kolmogorov-Smirnov 检测表明, 4 种生长性状符合正态分布 ($P>0.05$) (表 2)。

2.2 生长性状相关 EST-SSR 标记及基因型分析

统计分析结果表明, 13 个多态性微卫星标记(表

1)中的 5 个标记与翘嘴鲌生长性状表现出显著相关性(表 3)。其中, 标记 C10127 分别与体厚和体长极显著相关($P<0.01$)和显著相关($P<0.05$); 标记 C19016 与体重显著相关($P<0.05$); 标记 C14847 与体厚显著相关($P<0.05$); 标记 C12350 分别与体重、体厚和体长、体

表 1 EST-SSR 标记及引物信息(袁文成等, 2015)
Tab.1 Information of the EST-SSR loci and primers sequence of *S. chuasti*

标记号	SSR 类型	引物序列(5'—3')	产物大小(bp)	退火温度 $T_a(^{\circ}\text{C})$
C5150	(AC) ₉	F: CTGCACATGGCCAAGACTG R: TACCTGTGTGTCCCTTGGC	217	56
C12350	(GGT) ₅	F: GTCGGGTCAGGCATTTAGC R: ACACCACCTGCCAGACTTC	242	57
C15209	(GT) ₇	F: TTGACCCACCAGAGCAAGG R: TCAGACAACCCTGTGCGAGC	341	57
C10127	(GT) ₉	F: GCTGGTGCAGGTGGATTTC R: GTGGGTGAGAAGCTTTGCC	377	57
C5528	(GT) ₇	F: TGTCACCTGCGACCATCCTC R: CGATAACCGGGTAGCCCTC	383	60
C43527	(GCT) ₅	F: GGGCTGTGATGGTTTGACG R: AGTATCAACCACCGAGGCG	162	57
C14847	(GT) ₈	F: TGATGGAGTGCACAGTCAAG R: CTTGTCATTGGCGCTGAGG	354	56
C18691	(GCT) ₆	F: GACGAGTCAGTGCACAAC R: CTTTGCCTTCTCTGGCTG	177	57
C9810	(GT) ₉	F: CTCGGGAGGCTTCTGGAC R: TCCGTTTGTGCCAACCATC	384	56
C19016	(GT) ₈	F: TCTTGTCTGCCGGTGAGC R: GTGCTTGCAGACATACTCC	427	56
C32533	(AC) ₈	F: GCGAAGGTGGATCATTGCC R: TCTCGACCCTGAGTCTTGC	184	56
C6340	(AGG) ₅	F: CCATGATCAACGCTGTGCC R: TCCTGGCTTCTTCTCCAG	383	61
C29449	(ACC) ₆	F: TGAGAACGGCTGCTACCTC R: GGTTGTTGATGGAGAACGGG	388	57

表 2 翘嘴鲌体重、体长、体厚和体高正态分布检验
Tab.2 The test of normal distribution in body weight, body length, body thickness and body height of *S. chuasti*

性状	均值	标准差	最大值	最小值	P 值
体重(kg)	0.5562	0.1024	0.9425	0.3667	0.32
体长(cm)	26.8654	2.7545	33.8747	16.3542	0.24
体厚(cm)	4.6638	0.6543	6.0870	3.3075	0.20
体高(cm)	9.6878	0.9372	13.536	6.0546	0.25

高显著相关($P<0.05$)和极显著相关($P<0.01$); 标记 C18691 分别与体高和体重、体厚显著相关($P<0.05$)和极显著相关($P<0.01$)。

将翘嘴鳊 5 个微卫星分子标记的不同基因型分别与生长性状进行多重比较的结果显示: 在 C10127 标记上, 个体 AA 型的体厚显著高于 AC 型($P<0.05$), 个体 AA 型的体长显著高于 AC、AB 型($P<0.05$)。因此, AA 型是体厚、体长性状的优势基因型, 而 AC 型和 AB 型分别是体厚、体长和体长性状的劣势基因型。在 C19016 标记上, 个体 AB 型的体长显著低于 AA 型个体($P<0.05$), AA 型个体的体重显著高于 AB 型($P<0.05$), 说明 AB 基因型是体长性状的劣势基因型, AA 型为体重的优势基因型。在 C14847 标记上, 个体 BB 型的体厚显著大于 AB 型($P<0.05$),

表明 BB 型和 AB 型分别是体厚性状的优势基因型和劣势基因型; 而基因型间的体长、体高和体厚性状无显著差异($P>0.05$)。在 C12350 标记上, BC 型的体长显著大于 AC 型和 CC 型个体($P<0.05$), 体高和体重都显著大于 AA 型、AB 型、AC 型、BB 型和 CC 型个体($P<0.05$), 体厚显著大于 AB 型、AC 型和 BB 型个体($P<0.05$), 说明 BC 型是体长、体高、体重和体厚 4 种性状的优势基因型。标记 C18691 与增强子结合蛋白 β 有关, 该蛋白是增强子结合蛋白家族一员, 在生长发育、能量代谢和细胞分化等多个方面发挥作用。该标记上 BB 型个体的体厚、体重和体高分别显著大于 AA 型、AB 型和 AA 型个体($P<0.05$), 推测 BB 型为体厚、体重和体高性状的优势基因型, AA 型为劣势基因型。

表 3 翘嘴鳊微卫星标记不同基因型的体重、体长、体厚和体高的均值和多重比较

Tab.3 Means and multiple comparison of body weight, body length, body thickness and body height of different genotypes in microsatellite loci of *S. chuatsi*

标记号	基因型	个体数	体长(cm)	体高(cm)	体厚(cm)	体重(kg)
C10127	AA	23	29.059±0.964 ^a	9.7594±0.412 ^a	4.602±0.284 ^a	0.559±0.035 ^a
	AB	15	25.657±0.857 ^b	9.7631±0.536 ^a	4.188±0.245 ^{ab}	0.525±0.045 ^a
	AC	7	25.425±0.756 ^b	9.4569±0.654 ^a	3.968±0.324 ^b	0.487±0.037 ^a
	BB	12	27.625±0.868 ^{ab}	9.654±0.547 ^a	4.354±0.350 ^{ab}	0.504±0.056 ^a
	CC	3	27.784±1.472 ^{ab}	9.373±0.640 ^a	4.324±0.674 ^{ab}	0.496±0.054 ^a
C19016	AA	13	29.025±1.230 ^a	9.786±0.495 ^a	4.631±0.261 ^a	0.562±0.074 ^a
	AB	15	25.056±0.094 ^b	8.435±0.510 ^a	4.036±0.234 ^a	0.403±0.032 ^b
	AC	13	26.654±0.095 ^{ab}	9.462±0.624 ^a	4.278±0.324 ^a	0.515±0.045 ^{ab}
	BB	19	26.953±0.084 ^{ab}	9.556±0.427 ^a	4.476±0.265 ^a	0.527±0.038 ^{ab}
C14847	AB	31	26.685±0.635 ^a	9.402±0.401 ^a	4.057±0.102 ^a	0.475±0.042 ^a
	BB	29	27.054±0.658 ^a	9.654±0.451 ^a	4.765±0.125 ^b	0.524±0.054 ^a
C12350	AA	6	28.845±1.245 ^{ab}	9.845±0.627 ^a	4.242±0.351 ^{ab}	0.520±0.086 ^a
	AB	19	27.654±0.856 ^{ab}	9.395±0.425 ^a	4.140±0.285 ^a	0.498±0.056 ^a
	AC	17	25.234±0.651 ^b	9.412±0.335 ^a	4.168±0.202 ^a	0.508±0.052 ^a
	BB	6	28.314±1.628 ^{ab}	9.435±0.542 ^a	4.224±0.367 ^a	0.512±0.075 ^a
	BC	5	31.354±1.864 ^a	12.686±0.758 ^b	5.685±0.402 ^b	0.882±0.131 ^b
C18691	AA	32	26.425±0.754 ^a	9.056±0.301 ^a	4.102±0.124 ^a	0.465±0.037 ^a
	AB	13	26.541±0.756 ^a	9.320±0.362 ^{ab}	4.198±0.146 ^a	0.464±0.038 ^a
	BB	15	28.685±1.132 ^a	10.858±0.351 ^b	5.251±0.184 ^b	0.726±0.048 ^b

注: 同一栏中相同列的不同上标字母代表数值间存在显著差异($P<0.05$)

2.3 翘嘴鳊 4 个选育群体遗传多样性

13 个多态性微卫星标记引物(表 1)对 4 个选育群

体的 120 尾个体进行了 PCR 和聚丙烯酰胺凝胶电泳, 均获得了具有多态性的扩增条带, 图 1 和图 2 显示了

部分标记在翘嘴鲌选育群体中的扩增结果。每个标记平均得到等位基因 2.2115 个, 其中, 平均有效等位基因数为 1.9405 个。4 个选育群体的等位基因数、有效

等位基因数、观测杂合度、期望杂合度及多态信息含量见表 4, 由表 4 可知, 4 个选育群体遗传多样性高低依次为 THP > CJKP > HZHP > BYHP。

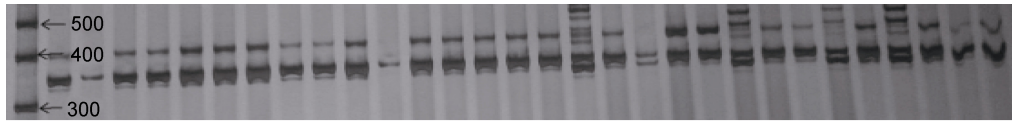


图 1 标记 C15209 在翘嘴鲌选育群体中的扩增结果
Fig.1 PCR amplification results of C15209 loci in *S. chuatsi*

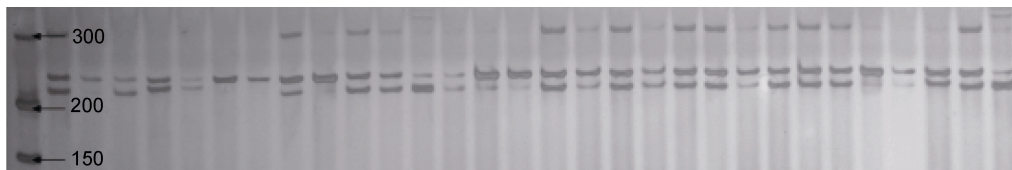


图 2 标记 C12350 在翘嘴鲌选育群体中的扩增结果
Fig.2 PCR amplification results of C12350 loci in *S. chuatsi*

表 4 基于 13 个微卫星标记的 4 个翘嘴鲌选育群体的遗传多样性数据
Tab.4 Data of genetic diversity based on 13 microsatellite markers in 4 breeding populations of *S. chuatsi*

标记	THP					BYHP					HZHP					CJKP				
	N_a	N_e	H_o	H_e	PIC	N_a	N_e	H_o	H_e	PIC	N_a	N_e	H_o	H_e	PIC	N_a	N_e	H_o	H_e	PIC
C5150	2	1.9652	0.4745	0.7854	0.4305	2	1.8751	0.4226	0.4786	0.3562	2	1.5624	0.5258	0.5607	0.3856	2	1.6361	0.5219	0.5324	0.3752
C12350	3	2.8548	0.4643	0.7625	0.4628	3	2.1356	0.4853	0.5867	0.3857	3	2.1867	0.4516	0.5062	0.3954	2	2.3514	0.5236	0.5305	0.3745
C15209	2	1.7654	0.4534	0.6634	0.3864	3	2.0517	0.4682	0.5044	0.3852	3	1.8954	0.5025	0.5238	0.3251	3	2.2257	0.6238	0.6532	0.4545
C10127	2	1.7586	0.6581	0.5243	0.3952	2	1.8425	0.4350	0.4861	0.3235	2	1.5571	0.5124	0.5950	0.3567	3	2.6524	0.5623	0.578	0.4251
C43527	2	1.9657	0.5162	0.7857	0.4021	2	1.4255	0.4056	0.2994	0.2586	2	1.4846	0.5840	0.5727	0.3305	2	1.5852	0.7541	0.7641	0.4527
C14847	2	1.9623	0.5152	0.8241	0.4125	2	1.6567	0.4652	0.4861	0.3341	3	2.0642	0.4427	0.4804	0.3026	2	1.5574	0.4587	0.4622	0.3652
C18691	2	1.9687	0.6753	0.7845	0.3856	2	1.5842	0.5856	0.6025	0.3956	2	1.8162	0.6543	0.7218	0.4309	2	1.4658	0.6204	0.6324	0.3854
C6340	2	1.9568	0.5264	0.6320	0.3805	2	1.7415	0.5341	0.5524	0.3625	2	1.5321	0.5642	0.5684	0.3214	2	1.4575	0.536	0.6524	0.3985
C32533	2	1.6251	0.7065	0.6358	0.4128	2	1.7428	0.6350	0.6532	0.3665	2	1.5354	0.5451	0.5624	0.3026	2	1.5242	0.6028	0.6707	0.4032
C9810	3	2.5564	0.7084	0.6523	0.4852	2	1.7564	0.4265	0.4962	0.3324	2	1.5271	0.5456	0.5745	0.3548	2	1.4528	0.5234	0.5260	0.3454
C19016	2	1.8767	0.7181	0.5264	0.3851	2	1.7567	0.4658	0.4958	0.3628	3	2.5657	0.624	0.6341	0.4686	3	2.4262	0.6527	0.5828	0.3541
C5528	2	1.8645	0.6272	0.7568	0.3568	2	1.6548	0.4856	0.5024	0.3762	2	1.5384	0.5367	0.5623	0.3654	2	1.6751	0.5042	0.5374	0.3325
C29449	2	1.8643	0.6874	0.5365	0.3652	2	1.6527	0.6574	0.6853	0.4056	2	1.7818	0.5688	0.5742	0.3708	2	1.9846	0.5234	0.5538	0.3452
平均	2.1538	1.9988	0.5947	0.6823	0.4067	2.1538	1.7597	0.4978	0.5253	0.3573	2.3077	1.7729	0.5429	0.5720	0.3623	2.2302	1.8457	0.5698	0.5905	0.3855

注: N_a : 等位基因数; N_e : 有效等位基因数; H_o : 观测杂合度; H_e : 期望杂合度; PIC: 多态信息含量

2.4 翘嘴鲌 4 个选育群体间的遗传距离和遗传相似度

由表 5 可知, THP 和 CJKP 两个选育群体间的遗传距离最小(0.0696)、遗传相似度最大(0.8133), 表明这两个群体亲缘关系最近; 而 BYHP 和 HZHP 两个群体的遗传距离最大(0.1247), 遗传相似度最小(0.6326), 表明它们之间的亲缘关系较远。

3 讨论

3.1 基于 EST-SSR 分子标记的生长性状的关联分析

通过分子标记的基因型与个体数量性状表型间关联的差异显著性检验, 可开展标记-性状连锁分析(叶华等, 2014)。若根据其关联分析, 找到一个或多个分子标记与某一性状存在显著的遗传相关性, 则可

表 5 翘嘴鲌 4 个选育群体间的遗传距离(下三角)和遗传相似度(上三角)
Tab.5 Genetic distance and genetic identity of 4 breeding populations of *S. chuatsi*

Pop ID	HZHP	CJKP	BYHP	THP
HZHP	*	0.7230	0.6326	0.7226
CJKP	0.0766	*	0.6972	0.8133
BYHP	0.1247	0.1037	*	0.7342
THP	0.0772	0.0696	0.0725	*

认为存在一个数量性状分子标记, 从而实现育种技术由传统的表型选择向分子标记选择育种的革新(王高富等, 2006)。因此, 分子标记与性状间的关联分析是近年来遗传育种的研究热点。但是, 目前有关翘嘴鲌的研究主要集中在人工繁育和病害防治(Ding *et al.*, 2010; 刘希良等, 2013; Tanaka *et al.*, 2013)、不同地理群体间遗传结构及遗传多样性研究(杨受保等, 2003; 方展强等, 2005)和微卫星分子标记开发(Yang *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2013)等方面。本文首次采用基于转录组测序基础上开发的 13 个多态性 EST-SSR 分子标记开展了与翘嘴鲌体重、体高、体长和体厚 4 个生长性状关联分析的研究, 找到了 5 个与上述翘嘴鲌 4 个生长性状显著相关的微卫星分子标记, 其中, 标记 C10127 和 C12350 均与体长性状显著和极显著相关, 标记 C14847 和 C10127 均与体厚性状显著和极显著相关, 标记 C19016 和 C12350 均与体重性状显著相关, 表明翘嘴鲌的生长性状与多个 EST-SSR 标记相关, 提示存在多因一效或表型与基因连锁的现象(李仕贵等, 2002; 郑先虎等, 2011)。实验结果还显示翘嘴鲌存在一因多效的现象, 如: 标记 C12350 与体重、体长、体高和体厚 4 个生长性状均具有显著相关性; 标记 C18691 与体厚、体重和体高存在极显著和显著相关。这与草鱼的研究结果相类似(王解香等, 2012)。导致这些一因多效的原因, 一方面是由于这些生长性状之间本身存在着相关性; 另一方面提示这些一因多效的标记可能是与控制生长性状的主效基因紧密连锁或处于同一染色体的不同座位的标记。由于这些与翘嘴鲌多个生长性状相关的 EST-SSR 标记已获得了所在 EST 序列的转录组测序信息以及相关基因序列或相对应的蛋白质信息, 因此, 可为翘嘴鲌 QTL 定位和分子标记辅助育种提供重要的遗传学基础。

3.2 基于 EST-SSR 分子标记的翘嘴鲌不同选育群体的遗传结构

群体遗传多样性水平的高低与基因丰富度和遗

传潜力的大小正相关, 观测杂合度、期望杂合度、等位基因数和多态信息含量都是其常用指标(侯宁等, 2007)。本研究基于 13 对多态性 EST-SSR 引物对 4 个翘嘴鲌选育群体进行基因组扫描结果显示(表 4), 平均有效等位基因数(N_e)位于 1.7597—1.9988 之间, 其值小于 2.15, 表明 4 个群体均存在等位基因缺失现象(万玉美等, 2011)。作为衡量群体遗传结构和遗传变异程度的最适指标之一的杂合度, 可以反映一个群体内所包含的所有等位基因的分布情况和丰富程度, 也可反映群体内个体的均匀度和变异程度, 揭示群体、物种或家系的生存和适应能力以及进化程度, 杂合度的高低与其生命力和适应能力成正相关(Botstein *et al.*, 1980)。本研究 4 个翘嘴鲌选育群体平均的观测杂合度(H_o)和期望杂合度(H_e)分别位于 0.4978—0.5947 和 0.5253—0.6823 之间, 均低于对翘嘴鲌野生群体的研究结果(0.6754 和 0.7487)(朱稻等, 2013)。导致上述结果的原因, 可能是由于本试验所用 SSR 引物均与经济性状相关, 在同一群体内人工选育至 F2 代以后, 逐渐降低了这些经济性状的遗传变异程度, 使选育群体经济性状遗传的富集度增加、多样性降低。一般而言, 多态信息含量(PIC) <0.25 为低度多态性, $0.25 < PIC < 0.5$ 为中度多态性, 而 $PIC > 0.5$ 为高度多态性(Nei, 1987; Liu *et al.*, 2008)。本研究结果显示, 4 个翘嘴鲌选育群体的平均 PIC 位于 0.3573—0.4067 之间, 为中度多态水平, 表明仍具有一定的选育潜力。遗传距离和相似性指数是用于检验群体间亲缘关系的重要指标。一级和二级亲缘关系的遗传相似性指数分别为 0.5 和 0.25 (Nei *et al.*, 1979)。本研究 4 个翘嘴鲌选育群体的遗传相似性指数均处于 0.6326—0.8133 之间, 表明同一物种在不同地理种群的选育群体之间仍然处于一级亲缘关系水平上。因此, 今后可在不同地理种群间构建选育群体或家系, 并且通过增加不同地理种群的数量和野生亲本数量等手段, 来提高选育群体的遗传多样性, 以获得遗传结构丰富和性状优良的选育种质。

4 结论

(1) 对 60 尾翘嘴鳊的体长、体高、体厚及体重 4 种生长性状进行标记-性状相关性研究表明: 有 13 个中的 5 个翘嘴鳊 EST-SSR 标记分别与生长性状显著相关, 包括: 分别与体厚和体长极显著相关 ($P < 0.01$) 和显著相关 ($P < 0.05$) 的标记 C10127, AA 型为体长、体厚的优势基因型, 而 AC 型为劣势基因型; 与体重显著相关 ($P < 0.05$) 的标记 C19016, AA 型为体重的优势基因型, AB 型为体长的劣势基因型; 与体厚显著相关 ($P < 0.05$) 的标记 C14847, BB 型为体厚的优势基因型; 分别与体长、体高和体重、体厚极显著相关 ($P < 0.01$) 和显著相关 ($P < 0.05$) 的标记 C12350, BC 型为体长、体厚、体高和体重性状的优势基因型; 分别与体厚、体重和体高极显著相关 ($P < 0.01$) 和显著相关 ($P < 0.05$) 的 C18691 标记, BB 型为体厚、体重和体高性状的优势基因型。

(2) 对 4 个翘嘴鳊选育群体各 30 尾个体进行遗传结构分析的结果显示: 遗传多样性高低依次为太湖选育群体 > 长江口选育群体 > 洪泽湖选育群体 > 鄱阳湖选育群体, 其平均的等位基因数、有效等位基因数、观测杂合度、期望杂合度和多态信息含量分别为 2.2115、1.9405、0.55513、0.5925 和 0.3775, 属于中度多态水平。4 个翘嘴鳊选育群体的遗传相似性指数均处于 0.6326—0.8133 之间, 表明同一物种在不同地理种群的选育群体之间仍然处于一级亲缘关系。其中, 鄱阳湖选育群体与洪泽湖选育群体的遗传距离最大 (0.1247), 遗传相似度最小 (0.6326), 表明它们之间的亲缘关系较远。

参 考 文 献

- 万玉美, 王 蕾, 谭照君等, 2011. 红鳍东方鲀两个群体的遗传结构及与经济性状的相关性分析. 淡水渔业, 41(5): 9—16
- 王高富, 吴登俊, 2006. 凉山半细毛羊微卫星标记与羊毛性状的相关分析. 遗传, 28(12): 1505—1512
- 王解香, 白俊杰, 于凌云, 2012. 草鱼 EST-SSRs 标记的筛选及其与生长性状相关分析. 淡水渔业, 42(1): 3—8, 29
- 方展强, 陈 军, 郑文彪等, 2005. 鳊野生群体与养殖群体的 RAPD 分析. 大连水产学院学报, 20(1): 16—19
- 叶 华, 刘 洋, 刘贤德等, 2014. 大黄鱼微卫星标记与生长性状的相关分析. 西南大学学报(自然科学版), 36(3): 27—33
- 匡刚桥, 刘 臻, 鲁双庆等, 2007. FIASCO 法筛选鳊鱼微卫星标记. 中国水产科学, 14(4): 608—614
- 朱 滔, 梁旭方, 彭敏燕等, 2013. 翘嘴鳊 EST-SSR 标记的开发及 3 个群体遗传多态性分析. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 23(3): 347—352
- 刘希良, 宾石玉, 王开卓等, 2013. 翘嘴鳊的人工繁殖与胚胎发育观察. 广西师范大学学报(自然科学版), 31(2): 100—106
- 李仕贵, 马玉清, 何 平等, 2002. 不同环境条件下水稻生育期和株高的 QTL 分析. 作物学报, 28(4): 546—550
- 杨受保, 祖国掌, 程久发, 2003. 鳊鱼遗传多样性的 RAPD 指纹分析. 水产养殖, 24(4): 33—35
- 吴 滢, 付春鹏, 蒋速飞等, 2011. 中华绒螯蟹微卫星标记与生长性状相关性的初步分析. 水生生物学报, 35(2): 197—202
- 宋 易, 梁旭方, 田昌绪等, 2016. 生长相关分子标记在翘嘴鳊五代中的富集. 水生生物学报, 40(5): 951—957
- 郑先虎, 匡友谊, 鲁翠云等, 2011. 镜鲤体长、体高、体厚性状 QTL 定位分析. 遗传, 33(12): 1366—1373
- 侯 宁, 张 研, 鲁翠云等, 2007. 微卫星 DNA 标记分析德国镜鲤的遗传潜力. 遗传, 29(12): 1509—1518
- 袁文成, 黄鹤忠, 李文龙等, 2015. 翘嘴鳊 (*Siniperca chuatsi*) 转录组 EST-SSR 位点的信息分析及其多态性检测. 海洋与湖沼, 46(2): 403—409
- 高 东, 杜 飞, 朱有勇, 2009. 低背景、高分辨率 PAGE 简易银染法. 遗传, 31(6): 668—672
- Botstein D, White R L, Skolnick M *et al*, 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics, 32(3): 314—331
- Ding W C, Chen J, Shi Y H *et al*, 2010. Rapid and sensitive detection of infectious spleen and kidney necrosis virus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. Archives of Virology, 155(3): 385—389
- Ding Y J, Zhang J H, Lu Y F *et al*, 2015. Development of EST-SSR markers and analysis of genetic diversity in natural populations of endemic and endangered plant *Phoebe chekiangensis*. Biochemical Systematics and Ecology, 63: 183—189
- Gupta P K, Rustgi S, 2004. Molecular markers from the transcribed/expressed region of the genome in higher plants. Functional & Integrative Genomics, 4(3): 139—162
- Huang W, Liang X F, Qu C M *et al*, 2013. Development and characterization of novel polymorphic microsatellite loci in *Siniperca scherzeri* Steindachner and *Siniperca chuatsi* (Basilewsky). Molecular Biology Reports, 40(2): 751—756
- Liu Q S, Feng D Y, Zhang H M *et al*, 2008. Genetic diversity of Chinese Shar-pei Dog using microsatellite DNA markers. Zoological Research, 29(1): 31—36
- Liu Z J, Cordes J F, 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquaculture, 238(1—4): 1—37
- Lynch M, 1999. The similarity index and DNA fingerprinting. Molecular Biological Evolution, 7(5): 478—484
- Nei M, Li W H, 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 76(10): 5269—5273
- Nei M, 1987. Molecular Evolutionary Genetics. New York:

- Columbia University Press, 121—134
- Nie Q, Yue X, Chai X L *et al*, 2013. Three vibrio-resistance related EST-SSR markers revealed by selective genotyping in the clam *Meretrix meretrix*. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(2): 421—428
- Skaala Ø, Høyim B, Glover K *et al*, 2004. Microsatellite analysis in domesticated and wild Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): allelic diversity and identification of individuals. *Aquaculture*, 240(1): 131—143
- Tanaka N, Izawa T, Kuwamura M *et al*, 2013. The first case of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) infection in aquarium-maintained mandarin fish, *Siniperca chuatsi* (Basilewsky), in Japan. *Journal of Fish Diseases*, 37(4): 401—405
- Xanthopoulou A, Ganopoulos I, Psomopoulos F *et al*, 2017. *De novo* comparative transcriptome analysis of genes involved in fruit morphology of pumpkin cultivars with extreme size difference and development of EST-SSR markers. *Gene*, 622: 50—66
- Yang M, Liang X F, Tian C X *et al*, 2012. Isolation and characterization of fifteen novel microsatellite loci in golden mandarin fish (*Siniperca scherzeri*) Steindachne. *Conservation Genetics Resources*, 4(3): 599—601
- Yang M, Tian C X, Liang X F *et al*, 2014. Parentage determination of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) based on microsatellite DNA markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 54: 285—291
- Zhang H Y, Wei L B, Miao H M *et al*, 2012. Development and validation of genic-SSR markers in sesame by RNA-seq. *BMC Genomics*, 13(1): 316

STUDY ON CORRELATION OF EST-SSR MARKERS WITH GROWTH TRAITS AND GENETIC STRUCTURE OF 4 BREEDING POPULATIONS IN MANDARIN FISH *SINIPERCA CHUATSI*

YUAN Wen-Cheng¹, YE Jin-Ming², HUANG He-Zhong^{1,3}, XIAO Pan¹, LU Yao¹,
LI Ze¹, ZHU Chuan-Kun³

- (1. School of Medicine and Life Sciences, Medical College of Soochow University, Fisheries Research Institute of Soochow University, Suzhou 215123, China; 2. Aquatic Products Production Technical Guidance Station of Yangzhou City, Yangzhou 225007, China; 3. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Regional Modern Agriculture & Environmental Protection, Huai'an 223300, China)

Abstract The linkage between growth traits (body length, body height, body weight, and thickness) of 60 individuals and EST-SSR marker trait and genetic structure of 4 breeding groups (each having 30 individuals of mandarin fish *Siniperca chuatsi*) was analyzed by 13 polymorphic EST-SSR microsatellites obtained by transcriptome high-throughput sequencing and screening. The linkage analysis showed that: the locus C10127 had an extremely significant impact on body thickness ($P < 0.01$) and a significant impact on body length ($P < 0.05$). AA at C10127 was a favorable genotype for body length and thickness traits while AC was a disadvantage genotype. Locus C19016 showed a significant impact on body weight ($P < 0.05$), in which AA was the dominant genotype of body weight while the AB was the negative genotype of body length. Locus C14847 showed a significant impact on thickness ($P < 0.05$), and BB was advantage genotype of thickness. Locus C12350 presented an extremely significant impact on body length and body height ($P < 0.01$) and a significant impact on body weight and thickness ($P < 0.05$), in which BC was dominant genotype of the 4 growth traits. Locus C18691 showed an extremely significant impact on body weight and thickness ($P < 0.01$), and a significant impact on body height ($P < 0.05$), and BB was a dominant genotype of thickness, body weight, and body height. The genetic diversity analysis determined that the value of mean valid alleles was 1.9405, the number of mean expected heterozygosity was 0.5925 and the mean polymorphism information content was 0.3775, indicating intermediate level of polymorphism.

Key words *Siniperca chuatsi*; EST-SSR marker; growth trait; genetic structure; correlation analysis