

文章编号: 1000-0615(2019)08-1706-08

DOI: 10.11964/jfc.20180911463

## 草鱼7个插入/缺失型突变多态性及 与幼鱼生长性状关联分析

张猛<sup>1</sup>, 沈玉帮<sup>1,2,3</sup>, 徐晓雁<sup>1,2,3</sup>, 王荣泉<sup>4</sup>, 冷向军<sup>1,2,3</sup>, 李家乐<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 上海海洋大学农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306;

2. 上海海洋大学水产养殖工程研究中心, 上海 201306;

3. 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;

4. 苏州市申航生态科技发展股份有限公司, 农业农村部大宗淡水鱼繁育与  
养殖技术重点实验室, 江苏苏州 215225)

**摘要:** 对草鱼生长性状进行数量性状基因座(quantitative trait locus, QTL)定位过程中, 在15号连锁群中定位到一个与体质量相关的QTL, 本研究根据已有的草鱼遗传连锁图谱和基因组序列, 拟用短片段重复序列(short tandem repeat, STR)分型技术对该连锁群的3个scaffolds中插入/缺失型突变位点进行筛选, 以降低分型成本, 同时将筛选出的7个多态性位点与草鱼幼鱼生长性状进行关联分析。结果显示, (1) 草鱼3个scaffolds中44个插入/缺失型突变位点中有17个简单重复序列(又称微卫星, simple sequence repeats, SSRs), 2个位点引物设计不成功, 设计的25对引物中仅22对扩增和分型成功; (2) 22个位点中仅有7对引物在4个亲本中存在多态性, 直接测序结果发现, STR分型技术不仅可准确对插入/缺失型突变位点进行分型, 同时可降低分型成本; (3) 将7个插入/缺失型突变位点与323尾选育F<sub>2</sub>草鱼的生长性状进行关联分析发现, 除了位点ID-10H和ID-41F以外, 其余5个位点都与草鱼幼鱼的一个或多个生长性状显著相关, 其中ID-6H与幼鱼肥满度性状显著相关, 位点ID-11F、ID-15F、ID-32F和ID-39F分别与草鱼幼鱼体质量、体长、体宽和体高性状显著相关, 可将以上5个与草鱼幼鱼生长性状相关的突变位点用于草鱼生长性状QTL加密和分子标记辅助育种。

**关键词:** 草鱼; 突变; 多态性; 生长; 关联分析

**中图分类号:** S 917.4

**文献标志码:** A

草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)是我国主要淡水养殖鱼类之一, 其产量居于我国淡水养殖鱼类产量首位<sup>[1]</sup>。我国草鱼种质资源的研究已有三十多年<sup>[2]</sup>, 多年的研究积累为草鱼养殖、育种等工作提供了丰富的理论基础, 但草鱼性成熟周期长、亲本个体大, 通过传统育种方法选育出性状优良、适合大范围推广的品种所需周期漫长<sup>[3]</sup>, 截止目前, 草鱼仍没有被审定为优良品种。然而, 随着生物技术的快速发展, 以及分

子标记在其他动植物育种中的成功应用<sup>[4-5]</sup>, 为草鱼缩减育种周期、精准性状定位等研究提供了新的思路。拥有足够多、可供选择的分子标记是分子标记辅助选育(molecular marker assisted selection, MAS)的前提, 但目前关于草鱼分子标记开发和应用的报道相对较少, 且多与微卫星(又称为简单重复序列, simple sequence repeats, SSRs)标记相关<sup>[6-8]</sup>。

单核苷酸多态性(single nucleotide polymor-

收稿日期: 2018-09-26 修回日期: 2018-11-28

资助项目: 现代农业产业技术体系专项(CARS-46-04); 上海市科委工程技术中心能力提升项目(16DZ2281200); 国家自然科学基金青年科学基金(31802285)

通信作者: 李家乐, E-mail: jlli2009@126.com

phisms, SNPs)作为第三代分子标记, 因其在基因组中密度更高、分布更广、更有可能影响表型性状等优点而得到广泛应用<sup>[9]</sup>。但SNPs标记在草鱼中的研究主要集中于特定基因或序列与某性状进行关联分析<sup>[10-12]</sup>, 而大规模开发的报道极少<sup>[13-14]</sup>, 这可能与SNPs标记自身分型成本有关。随着基因组学和基因组技术在水产动物中的应用, 草鱼遗传连锁图谱于2010年首次构建成功, 该图谱共构建24个连锁群(linkage groups, LGs), 连锁群数与草鱼单倍染色体数目一致<sup>[15]</sup>。2015年, 草鱼全基因组草图绘制完成, 该基因组草图以草鱼第一张遗传连锁图谱为基础进行拼接, 提供了大量基因和分子标记对应的参考信息<sup>[16]</sup>, 拉开了草鱼分子标记辅助育种的序幕。最近, 本课题组用SSRs标记对草鱼生长性状进行定位, 在15号连锁群上定位到一个与体质量相关的数量性状基因座(quantitative trait locus, QTL)。经序列比对发现, 该QTL跨越草鱼基因组的3个scaffolds(CI01000095, CI01000225和CI01000230)。本实验拟以草鱼基因组参考序列为基础, 在以上3个scaffolds中筛选插入/缺失型突变位点, 使用短片段重复序列(short tandem repeat, STR)分型技术以降低分型成本; 同时研究所筛选突变位点的实用性和多态性, 并与草鱼幼鱼生长性状进行关联分析, 以期为后续生长性状QTL加密和分子标记辅助育种提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验用鱼

实验用草鱼幼鱼为F<sub>2</sub>选育群体, 2017年于苏州市申航生态科技发展股份有限公司进行人工授精。通过4个选育亲本F<sub>1</sub>构建2个家系: 家系1(♀长江F<sub>1</sub>, PIT标记号020415656427; ♂珠江F<sub>1</sub>, PIT标记号020415644856), 家系2(♀长江F<sub>1</sub>, PIT标记号020415654843; ♂长江F<sub>1</sub>, PIT标记号020415602664), 2个家系的受精卵各取300 mL于同一孵化桶孵化。受精卵孵化后第7天运至上海海洋大学滨海基地进行培育。2018年3月, 随机选取323尾草鱼, 分别记录每尾草鱼的体长、体宽、体高和体质量, 剪取尾鳍于无水乙醇中备用。

### 1.2 基因组DNA提取

用传统酚氯仿法提取草鱼基因组DNA, 用1%琼脂糖凝胶电泳检测其质量, 并经NanoDrop 2000

检测其浓度并统一稀释至50~60 ng/μL, -20 °C保存。

### 1.3 插入/缺失型位点筛选

筛选草鱼基因组3个scaffolds中插入或缺失片段长度4 bp以上的位点, 共44个。经序列分析发现17个SSRs位点, 同时2个位点侧翼序列设计引物不成功, 因此, 成功设计引物25对。

PCR扩增体系为20 μL: 10 μL 2×Taq Master Mix, 1.6 μL DNA, 0.4 μmol/L上/下游引物, ddH<sub>2</sub>O补至20 μL。扩增程序: 95 °C预变性3 min; 95 °C变性20 s, 退火20 s, 72 °C延伸20 s, 35个循环; 72 °C终延伸10 min。经初步PCR扩增, 发现3对引物未能扩增成功。依据扩增产物片段长度, 在其余22对上游引物的5'端进行HEX或FAM荧光修饰。

利用5'修饰过的22对引物, 在4个亲本中进行PCR扩增, 扩增体系及程序如上。扩增结束后依据产物片段长度及不同荧光修饰进行混样, 交上海迈浦生物科技有限公司进行STR分型, 结果发现, 仅有7对引物在4个亲本中具有多态性(表1)。将以亲本DNA为模板、7对引物扩增出的PCR产物交由生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 以验证STR分型结果。

### 1.4 数据处理及与生长性状关联分析

利用筛选出的7对引物, 以323尾草鱼基因组DNA为模板进行PCR扩增, 扩增完成后进行混样, STR分型结果在Gene Mapper 4.0中读数。使用软件Cervus 3.0和Popgen 32对7个插入/缺失型突变位点特征进行分析, 利用SPSS 18.0中一般线性模型(general linear model, GLM)分析各突变位点与草鱼幼鱼生长性状的相关性。

## 2 结果

### 2.1 插入/缺失型突变位点筛选

对3个scaffolds中的44个插入/缺失型突变位点进行筛选, 经序列比对发现17个SSRs位点, 同时2个位点引物设计不成功, 因此共成功设计引物25对; PCR扩增结果发现, 3对引物扩增不成功, 其余22对引物中仅有7对引物对应的亲本STR结果显示多态性(表2)。

通过测序峰图和序列比对, 发现7个位点的测序结果与参考基因组序列一致, 表明利用STR分型技术可以成功实现对本研究中7个插入/缺失

表 1 7个插入/缺失型突变对应的引物

Tab. 1 Primers of seven insert/deletion mutations

引物 primer	scaffold-位置-类型-长度 scaffold-location-type-length		引物序列 (5'-3') primer sequence	退火温度/°C annealing temperature
ID-6H	CI01000225-220191-I-6	F	HEX-CACGAAAGACAGTGTGCTAA	48.0
		R	CGTGTTTCGAGCGTACATT	
ID-10H	CI01000225-379094-D-6	F	HEX-AATCAGCCAATCAGAATCCA	52.0
		R	TGTATGTGATGGCTTCAGGAG	
ID-11F	CI01000225-383312-I-7	F	FAM-ACATAACCCTTTCCATTAAGTTC	50.0
		R	CTGGAAGAGACAGACTTGAATG	
ID-15F	CI01000225-450635-I-9	F	FAM-GCTTGTACCAAACCGACCTTA	52.0
		R	TCATCTTGCCAGGCTGAG	
ID-32F	CI01000230-258112-D-8	F	FAM-TCGTATTTGCTGATGAATGATT	52.0
		R	GGGCGACGCTCTCTAAAG	
ID-39F	CI01000230-369267-D-6	F	FAM-CTTCTCATCCAAACTCGTG	52.0
		R	CAATTCCTGTTTTACAGTGC	
ID-41F	CI01000230-391906-I-5	F	FAM-CTTGAGTATGGAGGGTTTG	48.0
		R	TCATTCCTGTCGCCTAA	

注：“scaffold-位置-类型-长度”依次表示该位点所在scaffold中的名称、位置(bp)、类型(插入/缺失)和长度  
Notes: “scaffold-location-type-length” means the name, location (bp), type (insert/deletion) and length of each locus

表 2 亲本对应的STR分型结果

Tab. 2 Results of STR genotyping in parents

引物 primer	亲本STR分型片段长度/bp length of STR fragment in parent			
	020415654843	020415602664	020415656427	020415644856
ID-6H	191/197	191/197	197/197	191/191
ID-10H	268/268	268/274	268/274	268/268
ID-11F	186/193	186/193	193/193	193/193
ID-15F	163/172	172/172	163/163	172/172
ID-32F	127/127	127/135	127/127	127/127
ID-39F	152/152	146/152	152/152	152/152
ID-41F	188/188	188/193	188/193	188/193

型突变位点的分型(Set A: ID-11F, ID-15F, ID-32F; Set B: ID-6H, ID-10H, ID-39F, ID-41F)(图1)。

2.2 插入/缺失型位点的多态性分析

经初步筛选和后续STR分型,发现仅有7个插入/缺失型位点在4个亲本中具有多态性。使用软件Cervus 3.0对7个位点的观测杂合度(observed heterozygosity,  $H_o$ )、期望杂合度(expected heterozygosity,  $H_e$ )和多态信息含量(polymorphic inf-

ormation content,  $PIC$ )进行分析,发现2个位点属于低度多态性( $PIC < 0.25$ ),5个位点属于中度多态性( $0.25 < PIC < 0.5$ );利用Popgen 32软件对7个位点进行Hardy-Weinberg平衡检验,发现所有位点均未显著偏离Hardy-Weinberg平衡(表3)。

7个插入/缺失型位点在323尾子代草鱼中有效等位基因数(effective number of alleles,  $N_e$ )、 $H_o$ 、 $H_e$ 和 $PIC$ 分别介于1.327~2.000, 0.288~0.740, 0.247~0.501和0.216~0.375, Hardy-Weinberg平衡检验发现所有位点均显著偏离Hardy-Weinberg平衡( $P < 0.05$ )(表4)。

2.3 插入/缺失型位点与草鱼幼鱼生长性状相关性分析

利用SPSS 18.0中一般线性模型对7个插入/缺失型突变位点与草鱼幼鱼的生长性状[体质量、体长、体宽、体高和肥满度<sup>[17]</sup>, 肥满度(%)=体质量/体长<sup>3</sup>×100%]进行关联分析。结果显示,位点ID-10H和ID-41F各基因型(命名:位点+基因型,“00”代表无插入、“01”代表杂合插入、“11”代表纯合插入,如“6-00”表示位点ID-6H处无插入的基因型)与草鱼幼鱼生长性状均无相关性,其余5个位点显著影响草鱼幼鱼的一个或多个生长性

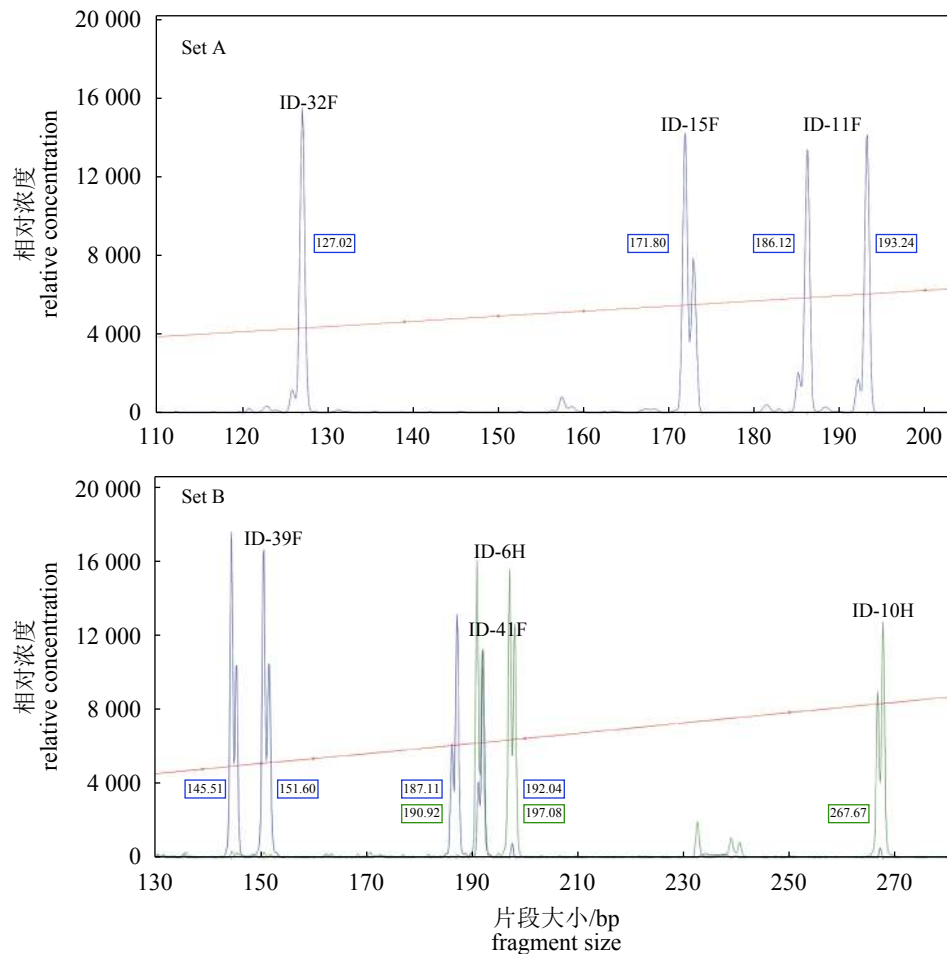


图 1 子代STR分型结果

Fig. 1 Result of STR genotyping in offspring

表 3 7 个位点在亲本中的多态性分析

Tab. 3 Polymorphic analysis of 7 insert/delete mutations in parent

引物名称 primer name	基因型频率 genotype frequency			各位点特征 characterization of different loci			
	AA	AB	BB	$H_o$	$H_e$	$PIC$	$P_{HW}$
ID-6H	0.250	0.500	0.250	0.500	0.571	0.375	0.773
ID-10H	0.500	0.500	—	0.500	0.429	0.305	0.655
ID-11F	—	0.500	0.500	0.500	0.429	0.305	0.655
ID-15F	0.250	0.250	0.500	0.250	0.536	0.359	0.206
ID-32F	0.750	0.250	—	0.250	0.250	0.195	1.000
ID-39F	—	0.250	0.750	0.250	0.250	0.195	1.000
ID-41F	0.250	0.750	—	0.750	0.536	0.359	0.343

状( $P < 0.05$ )。位点ID-6H的6-00和6-01基因型对应的草鱼幼鱼肥满度性状有显著差异( $P < 0.05$ )，位点ID-11F的11-01和11-11基因型对应的草鱼幼鱼在体质量、体长和体宽性状有显著性差异( $P < 0.05$ )，

位点ID-15F的15-01和15-11基因型对应的草鱼幼鱼在体质量和体高性状有显著性差异( $P < 0.05$ )，位点ID-32F的2个基因型对应的草鱼幼鱼体长性状有显著性差异( $P < 0.05$ )，位点ID-39F不同基因

表 4 7个位点在子代中的多态性分析

Tab. 4 Polymorphic analysis of 7 insert/deletion mutations in offspring

位点 locus	有效等位基因 $N_e$	观测杂合度 $H_o$	期望杂合度 $H_e$	多态信息含量 $PI_C$	Hardy-Weinberg平衡 $P_{HW}$
ID-6H	2.000	0.740	0.501	0.375	0.000*
ID-10H	1.594	0.495	0.373	0.303	0.000*
ID-11F	1.668	0.313	0.401	0.320	0.001*
ID-15F	1.850	0.715	0.460	0.354	0.000*
ID-32F	1.327	0.288	0.247	0.216	0.003*
ID-39F	1.327	0.288	0.247	0.216	0.003*
ID-41F	1.871	0.520	0.466	0.357	0.037*

注: \*. 代表显著偏离Hardy-Weinberg平衡( $P < 0.05$ )

Notes: \*. means significantly deviated from Hardy-Weinberg equilibrium ( $P < 0.05$ )

型对应草鱼幼鱼的体质量和体长性状存在显著差异( $P < 0.05$ )(表5)。

### 3 讨论

分子标记是以遗传物质为基础、核酸水平

的直接反映, 因其不受表型及基因表达的影响、数量丰富、且多呈共显性<sup>[18]</sup>, 在多领域均有广泛应用。SNP标记作为第三代分子标记, 与其他分子标记相比, SNP在基因组中数量更多、分布更广、多呈二态性、遗传更稳定、更有可能与表

表 5 草鱼7个突变位点不同基因型与生长性状相关分析

Tab. 5 Correlation analysis between different genotypes of seven mutations and growth traits in *C. idella*

位点 locus	基因型 genotype	样本数 number	体质量/g body weight	体长/cm body length	体宽/cm body width	体高/cm body height	肥满度/% fatness
ID-6H	6-00	41	95.282±5.128	17.532±0.320	2.358±0.059	3.794±0.076	1.704±0.015 <sup>a</sup>
	6-01	239	95.665±2.330	17.669±0.127	2.361±0.021	3.791±0.031	1.666±0.007 <sup>b</sup>
	6-11	43	86.669±3.655	17.193±0.254	2.331±0.040	3.692±0.060	1.661±0.012 <sup>ab</sup>
ID-10H	10-00	163	93.494±2.412	17.575±0.147	2.353±0.024	3.769±0.035	1.664±0.008
	10-01	160	95.362±2.974	17.602±0.158	2.361±0.027	3.788±0.038	1.676±0.009
ID-11F	11-00	39	95.883±5.296 <sup>ab</sup>	17.584±0.328 <sup>ab</sup>	2.367±0.060 <sup>ab</sup>	3.801±0.078	1.699±0.015
	11-01	101	87.435±2.624 <sup>b</sup>	17.186±0.163 <sup>b</sup>	2.304±0.027 <sup>b</sup>	3.726±0.040	1.674±0.010
	11-11	183	97.962±2.797 <sup>a</sup>	17.811±0.150 <sup>a</sup>	2.384±0.025 <sup>a</sup>	3.803±0.037	1.662±0.008
ID-15F	15-01	231	98.002±2.463 <sup>a</sup>	17.777±0.135	2.379±0.023	3.815±0.032 <sup>a</sup>	1.673±0.007
	15-11	92	85.422±2.349 <sup>b</sup>	17.116±0.160	2.301±0.025	3.686±0.039 <sup>b</sup>	1.663±0.010
ID-32F	32-00	230	96.513±2.330	17.737±0.127 <sup>a</sup>	2.369±0.021	3.797±0.031	1.667±0.007
	32-01	93	89.241±3.235	17.222±0.198 <sup>b</sup>	2.327±0.033	3.732±0.048	1.679±0.010
ID-39F	39-01	93	87.981±3.080 <sup>b</sup>	17.157±0.191 <sup>b</sup>	2.316±0.033	3.714±0.046	1.678±0.010
	39-11	230	97.023±2.356 <sup>a</sup>	17.763±0.128 <sup>a</sup>	2.373±0.022	3.804±0.031	1.667±0.007
ID-41F	41-00	120	94.128±2.726	17.629±0.157	2.362±0.026	3.783±0.038	1.669±0.010
	41-01	168	94.627±2.866	17.565±0.159	2.353±0.027	3.785±0.039	1.670±0.008
	41-11	35	94.417±5.974	17.564±0.347	2.359±0.055	3.731±0.079	1.677±0.024

注: 同一位点中同列的不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )

Notes: different superscript letters in a column of each locus indicate significant difference ( $P < 0.05$ )

型性状相关, SNP标记比其他分子标记更具应用潜力<sup>[19]</sup>。然而, 草鱼中关于SNP标记开发和应用的报道却很少。目前, 关于草鱼SNP标记规模化开发的报道仅有3篇<sup>[13-14, 20]</sup>, 其他关于SNP标记的报道多是在特定基因或序列中进行筛选, 并与某种性状进行关联分析<sup>[12]</sup>。导致SNP标记在草鱼中开发和应用较少的原因可能有: ①草鱼基因组学和基因组技术起步相对较晚, 草鱼作为非模式水产动物, 其基因组序列于2015年才绘制完成<sup>[16]</sup>, 早期只能以转录组数据库为参考进行SNP标记开发, 但转录组参考序列是cDNA序列, 引物设计和基因组覆盖率受到很大限制; ②虽然SNP标记比其他分子标记更具应用潜力, 但其分型成本高于其他分子标记, 因此, 在草鱼基因组序列为参考的前提下, 如何降低草鱼SNP标记分型成本是目前的关键问题。本实验以STR分型技术对草鱼基因组中插入/缺失型位点进行分型, 以降低突变位点分型成本。由于STR技术有较高的分辨率、可精确分析PCR扩增产物片段大小, 在插入/缺失型位点侧翼设计引物, 根据STR分型结果(不同片段大小和荧光颜色)可准确推算出该位点的具体基因型。随后, 对7个突变位点对应的亲本PCR产物进行测序, 测序结果显示, PCR产物为各位点对应扩增结果, 表明使用STR分型技术不仅可以准确对插入/缺失型突变位点进行分型, 而且能降低突变位点分型成本。可用此方法在草鱼基因组中大规模开发插入/缺失型位点, 为草鱼遗传连锁图谱加密提供参考。

草鱼物理连锁图谱的首次构建成功<sup>[15]</sup>为草鱼经济性状QTL定位和基因组序列组装<sup>[16]</sup>等研究提供了理论基础。2015年, 草鱼基因组序列绘制完成, 该基因组以草鱼物理连锁图谱为参考, 将大量基因和分子标记锚定在24个连锁群上。在以上研究的基础上, 本课题组用SSRs标记对草鱼生长性状进行定位时, 在15号连锁群上发现一个与体质量相关的QTL(可解释表型变异7.7%)。本实验以草鱼基因组序列和附件信息(C\_idella\_male\_heterozygosisINDELloci.v1.gz, <http://www.ncgr.ac.cn/grasscarp/>)<sup>[17]</sup>为参考, 对3个scaffolds中插入/缺失型突变位点进行筛选。44个位点(插入或缺失4个以上碱基)中有17个SSRs位点(占所筛选位点的38.64%), 2个位点未能成功设计引物; 成功设计的25对引物中有3对扩增失败, 共22对引物可成功扩增; 而成功扩增的引物中, 仅有7对引

物在亲本中具有多态性(占所筛选位点的15.91%)。在筛选的44个位点中, 虽然在亲本中具有多态性的插入/缺失型突变位点比例较低, 但草鱼基因组中提供了丰富的插入/缺失型突变位点, 使用上述STR分型技术可有效开发出大量插入/缺失型突变位点, 为后续草鱼遗传连锁图谱加密提供参考。

将7个插入/缺失型突变位点与323个F2选育群体草鱼的生长性状进行关联分析, 发现除了位点ID-10H和ID-41F以外, 其余5个位点均与草鱼幼鱼的一个或多个生长性状显著相关( $P<0.05$ ), 其中ID-6H与幼鱼肥满度性状显著相关( $P<0.05$ ), 位点ID-11F、ID-15F、ID-32F和ID-39F分别与草鱼幼鱼体质量、体长、体宽和体高性状显著相关( $P<0.05$ )。虽然在草鱼选育过程中, 通常将体质量和体长作为首选考虑因素, 但关于体型和肥满度等相关性状也不能忽视。因此, 可将以上5个与草鱼幼鱼生长性状相关的突变位点用于草鱼生长性状QTL加密和分子标记辅助育种。

综上, 本研究对草鱼3个scaffolds中44个插入/缺失型突变位点进行筛选, 成功筛选出22个突变位点。利用STR分型技术对草鱼插入/缺失型突变位点进行分型, 22个突变位点均可成功分型, 表明STR分型技术不仅可准确对插入/缺失型突变位点进行分型, 同时可降低分型成本。成功分型的22个突变位点中仅有7个位点在4个亲本中具多态性, 经与草鱼幼鱼生长性状进行关联分析发现, 有5个位点与草鱼幼鱼的一个或多个生长性状显著相关( $P<0.05$ ), 可将这5个位点用于草鱼生长性状QTL加密和分子标记辅助育种。

#### 参考文献:

- [1] 董金和. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2013.  
Dong J H. China fishery statistics yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2013(in Chinese).
- [2] 李思发. 主要养殖鱼类种质资源研究进展[J]. 水产学报, 1993, 17(4): 344-358.  
Li S F. Advances in the study of the genetic resources of the major cultured fishes[J]. Journal of Fisheries of China, 1993, 17(4): 344-358(in Chinese).
- [3] 王解香. 草鱼不同地域群体的遗传结构分析及生长性状相关的微卫星标记筛选[D]. 上海: 上海海洋大学, 2011.  
Wang X X. Analysis of genetic diversity in five

- populations of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and screening of SSR markers related to growth traits[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2011(in Chinese).
- [4] Xu Y B, Lu Y L, Xie C X, *et al.* Whole-genome strategies for marker-assisted plant breeding[J]. *Molecular Breeding*, 2012, 29(4): 833-854.
- [5] 贾继增. 分子标记种质资源鉴定和分子标记育种[J]. 中国农业科学, 1996, 29(4): 1-10.
- Jia J Z. Molecular germplasm diagnostics and molecular marker-assisted breeding[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 1996, 29(4): 1-10(in Chinese).
- [6] 李达. 草鱼微卫星标记开发及9个养殖群体遗传多样性分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2014.
- Li D. Isolation of microsatellite markers in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and genetic diversity analysis for nine cultured populations[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2014(in Chinese).
- [7] 孙俊龙. 草鱼生长性状和抗病力遗传参数及QTL初步定位分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.
- Sun J L. Analysis of growth traits and disease resistance of grass carp genetic parameters and QTL mapping[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2015(in Chinese).
- [8] Li D, Wang S T, Shen Y B, *et al.* A multiplex microsatellite PCR method for evaluating genetic diversity in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Aquaculture and Fisheries*, 2018, 3(6): 238-245.
- [9] 曲娟娟, 于敏, 董蕾, 等. SNP在动植物遗传育种中的应用[J]. *东北农业大学学报*, 2011, 42(12): 9-13.
- Qu J J, Yu M, Dong L, *et al.* Applications of SNP in animal and plant genetic breeding[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2011, 42(12): 9-13(in Chinese).
- [10] 王沈同, 张猛, 沈玉帮, 等. 草鱼GH基因3'部分序列多态性与生长性状及肌肉成分的相关性分析[J]. *水产学报*, 2017, 41(9): 1329-1337.
- Wang S T, Zhang M, Shen Y B, *et al.* Polymorphisms of the GH gene 3' partial sequence and their associations with growth traits and muscle composition in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(9): 1329-1337(in Chinese).
- [11] 傅建军, 张猛, 沈玉帮, 等. 草鱼PRL基因多态性与幼鱼生长性状和肌肉成分的关联分析[J]. *中国水产科学*, 2016, 23(3): 491-499.
- Fu J J, Zhang M, Shen Y B, *et al.* Polymorphisms of the PRL gene and their associations with growth traits and flesh components in juvenile grass carp, *Ctenopharyngodon idella*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(3): 491-499(in Chinese).
- [12] 张猛. 草鱼SNP标记开发及与生长性状关联分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2016.
- Zhang M. Development of SNP markers and their association with growth traits in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016(in Chinese).
- [13] Yu L Y, Bai J J, Cao T T, *et al.* Genetic variability and relationships among six grass carp *Ctenopharyngodon idella* populations in China estimated using EST-SNP markers[J]. *Fisheries Science*, 2014, 80(3): 475-481.
- [14] Zhang M, Nie J K, Shen Y B, *et al.* Isolation and characterization of 25 novel EST-SNP markers in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Conservation Genetics Resources*, 2015, 7(4): 819-822.
- [15] Xia J H, Liu F, Zhu Z Y, *et al.* A consensus linkage map of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) based on microsatellites and SNPs[J]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 135.
- [16] Wang Y P, Lu Y, Zhang Y, *et al.* The draft genome of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) provides insights into its evolution and vegetarian adaptation[J]. *Nature Genetics*, 2015, 47(6): 625-631.
- [17] Fernández-Delgado C. Life history patterns of the common carp, *Cyprinus carpio*, in the estuary of the Guadalquivir river in south-west Spain[J]. *Hydrobiologia*, 1990, 206(1): 19-28.
- [18] 赵淑清, 武维华. DNA分子标记和基因定位[J]. *生物技术通报*, 2000(6): 1-4.
- Zhao S Q, Wu W H. DNA molecular markers and mapping[J]. *Biotechnology Information*, 2000(6): 1-4(in Chinese).
- [19] 唐立群, 肖层林, 王伟平. SNP分子标记的研究及其应用进展[J]. *中国农学通报*, 2012, 28(12): 154-158.
- Tang L Q, Xiao C L, Wang W P. Research and application progress of SNP markers[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28(12): 154-158(in Chinese).
- [20] Xu B, Wang S L, Jiang Y, *et al.* Generation and analysis of ESTs from the grass carp, *Ctenopharyngodon idella*[J]. *Animal Biotechnology*, 2010, 21(4): 217-225.

## Polymorphism of seven insert/deletion mutations and their connection with growth traits of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)

ZHANG Meng<sup>1</sup>, SHEN Yubang<sup>1,2,3</sup>, XU Xiaoyan<sup>1,2,3</sup>, WANG Rongquan<sup>4</sup>,  
LENG Xiangjun<sup>1,2,3</sup>, LI Jiale<sup>1,2,3\*</sup>

(1. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs,  
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education,  
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

4. Key Laboratory of Conventional Freshwater Fish Breeding and Health Culture Technology Germplasm Resources, Ministry of  
Agriculture and Rural Affairs, Suzhou Shenheng Eco-technology Development Limited Company, Suzhou 215225, China)

**Abstract:** A weight-related QTL was found in the 15 linkage group (LG) during mapping the growth traits of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). And we tried to screen insert/deletion mutations on three scaffolds in the 15 LG, according to the previous consensus linkage map and draft genome of *C. idella*. At the meantime, the STR genotyping method was used in genotyping of insert/deletion mutations. Moreover, the association analysis of selected mutations and growth traits of 323 individuals was conducted. Results found that 17 of the 44 selected insert/deletion mutations were SSRs, and 2 loci failed to design primers; therefore, 25 pairs of primer were successfully designed. PCR amplifications showed that only 22 of the 25 primer pairs were effective. Then STR genotyping method was used for genotyping of those 22 insert/deletion mutations, and 7 polymorphic mutations were found in four parents. Afterwards, PCR products were sequenced to confirm the STR genotyping results. Sequencing results showed that STR genotyping method could not only classify insertion/deletion mutants accurately, but also reduce the genotyping costs. Finally, the general linear model was used to analyze the relevance between those 7 insert/deletion mutations and growth traits of 323 juvenile *C. idella*. Correlation results found that 2 loci (ID-10H and ID-41F) were not related with growth traits, while the other 5 loci were significantly related with one or more growth traits of juvenile *C. idella*. According to the 5 loci, locus ID-6H was significantly correlated with fatness traits of juvenile *C. idella*, while locus ID-11F, ID-15F, ID-32F and ID-39F were significantly correlated with body weight or length or width or height. In summary, the inexpensive STR genotyping method could be used in the development of insert/deletion mutations, and the 5 growth related mutations could be used in QTL density-increasing and molecular marker assisted breeding of *C. idella*.

**Key words:** *Ctenopharyngodon idella*; mutation; polymorphism; growth traits; connection

**Corresponding author:** LI Jiale. E-mail: jlli2009@126.com

**Funding projects:** China Agricultural Research System (CARS-46-04); Engineering and Technology Center from Shanghai Municipal Science and Technology Commission (16DZ2281200); Youth Foundation of the National Natural Science Foundation of China (31802285)