

## 尼罗罗非鱼微卫星标记与主要生长性状的相关性分析

刘福平<sup>1,2</sup>, 白俊杰<sup>1\*</sup>, 宋红梅<sup>1</sup>, 叶星<sup>1</sup>, 李胜杰<sup>1</sup>, 于凌云<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 中国水产科学研究院热带亚热带

鱼类选育与养殖重点开放实验室, 广东广州 510380;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

**摘要:**为了筛选到与尼罗罗非鱼生长相关的分子标记,并对这些标记进行准确性鉴定,运用65个微卫星标记对鹭业和番禺2个尼罗罗非鱼群体进行了PCR扩增,再利用SPSS软件一般线性模型(GLM)对这些微卫星位点与尼罗罗非鱼体重等主要生长性状进行了标记—性状连锁关联分析。结果表明,鹭业群体中有8个微卫星标记(UNH130, UNH183, UNH911, GM558, UNH211, UNH176, UNH914和UNH974)与主要生长性状显著或极显著相关( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),其中有2个微卫星标记(UNH914和UNH974)与番禺群体的主要生长性状显著或极显著相关( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),1个微卫星标记(UNH176)只与体重显著相关( $P < 0.05$ )。通过对与生长性状相关标记的基因型和表型值进行多重比较,得到了对体重、体长和体高3种性状有利的基因型或等位基因。发现了对罗非鱼生长性状有显著效应的微卫星位点,为开展罗非鱼的分子标记辅助育种提供了有价值的遗传标记。

**关键词:**尼罗罗非鱼;微卫星标记;生长性状;相关性分析

**中图分类号:**Q 953; S 917

**文献标识码:**A

微卫星DNA(microsatellites DNA)又称简单重复序列(simple sequence repeats, SSRs),广泛存在于真核生物基因组中,最早于1981年由Miesfeld等<sup>[1]</sup>提出。由于微卫星具有共显性遗传、检测方便和多态信息含量高等特点,从而成为群体遗传学研究的有效方法之一,主要应用于遗传图谱的构建、QTL定位、分子遗传多样性分析等方面<sup>[2]</sup>。

近年来,国内外许多学者将微卫星标记广泛应用于动物分子标记辅助育种,在筛选与猪、牛等畜牧类动物主要经济性状相关的标记方面取得了很大的进展。赵晓枫等<sup>[3]</sup>基于最小二乘法分析了IGF-1 5'调控序列微卫星位点对金华猪初生重,断奶重等生长性状的影响,结果表明,基因型(286/286)对金华猪初生重有显著影响( $P < 0.05$ )。单雪松等<sup>[4]</sup>通过4个微卫星位点进行荷斯坦牛群产奶性能的标记分析研究,结果发现BMS2321基

因座对乳蛋白量和乳蛋白率有极显著的影响( $P < 0.01$ ),TGLAI61对乳蛋白量和乳蛋白率的影响达到显著水平( $P < 0.05$ )。Paszek等<sup>[5]</sup>用大白×梅山猪资源家系为材料,通过区间定位将影响断奶重至56 kg阶段日增重的QTL定位于1号染色体微卫星标记SW373和SW1301之间。Napolitano等<sup>[6]</sup>在研究分析皮埃蒙特和契安尼娜的杂交牛群体肉用性能与微卫星标记关系中发现IDVGA46等位基因205与体高、体长和胸宽呈明显正相关( $P < 0.05$ )。

在水产动物方面,关于对虾<sup>[7]</sup>、牙鲆<sup>[8]</sup>等种类的标记—性状关联分析已有许多报道,而有关罗非鱼的研究还大多只是简单的遗传多样性分析<sup>[9-10]</sup>,与罗非鱼生长性状相关的分子标记研究报道尚不多见,仅见到Cnaani等<sup>[11]</sup>用20个有多态性的微卫星位点对莫桑比克与奥利亚杂交后代F<sub>2</sub>进行耐寒能力分析,结果发现微卫星位点

收稿日期:2009-01-05 修回日期:2009-07-10

资助项目:农业部“948”项目(2006-G55);国家“十一五”科技支撑计划(2006BAD01A1201);国家科技基础条件平台工作项目(2005DKA21103)

通讯作者:白俊杰, Tel:020-81616121, E-mail: jjbai@163.net

UNH879 与罗非鱼的耐低温性状显著相关 ( $P < 0.05$ );同时还发现,微卫星位点 UNH130 与罗非鱼的体重显著相关 ( $P < 0.05$ )。Moen 等<sup>[12]</sup>利用 54 个 SSR 和 23 个 AFLP 标记对四系杂交罗非鱼杂交系统的基因组扫描分析,发现 UNH130 不仅与罗非鱼体重相关还与耐低温性状显著相关 ( $P < 0.05$ ),同时还将 UNH130 定位于第 23 个连锁群上。本研究旨在筛选到更多与罗非鱼生长相关的微卫星标记,并对这些标记的准确性进行鉴定,以期为进行与罗非鱼生长性状的 QTL 定位奠定基础,从而加快分子标记辅助育种进程,尽快培育出优良的罗非鱼品系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**实验鱼群体** 实验用尼罗罗非鱼 (*Tilapia nilotica*) 群体 1 (鹭业群体, 120 尾) 随机取自鹭业

国家级罗非鱼良种场—3 335 m<sup>2</sup> 的成鱼养殖池塘,为同一批繁殖和同池养殖的个体,用于初步筛选与罗非鱼生长性状相关的微卫星标记;实验用尼罗罗非鱼群体 2 (番禺群体, 120 尾) 取自国家级广东省罗非鱼良种场,也是同一批繁殖和同池养殖的个体,用于验证从鹭业群体中筛选出的微卫星标记的准确性。

**引物与试剂** 根据文献报道<sup>[13-14]</sup> 及美国汉普郡大学 Hubbard 基因研究中心网站的数据 (<http://hcg.unh.edu/>), 选取尼罗罗非鱼微卫星位点 65 个 (引物信息见表 1), 由上海生工生物技术有限公司合成; PCR 反应所用的 *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs 等生化试剂购自上海申能博彩生物工程公司; pBR322 DNA/*Msp* I Marker 购自天根生化科技有限公司; 聚丙烯酰胺凝胶电泳槽为北京君意公司 JY-SCZ7 型垂直电泳槽; 成像仪为 Alpha image (uv5254-220k) 型凝胶成像系统。

表 1 罗非鱼微卫星引物信息

Tab. 1 The microsatellite loci primer information of tilapia

位点 locus	GenBank accession number	引物序列 (5' - 3') primer sequence (5' - 3')		退火温度 (°C) annealing temperature
UNH130	G12283	AGGAAGAATAGCATGTAGCAAGTA	GTGTGATAAATAAAGAGGCAGAAA	58
UNH183	G12335	CTTTCAGGCTGTGTGTT	CCTCACITGGCGTTTAC	52
UNH911	G68224	AAGAGGAGAGCACGGAAACA	GTCACAAACCACAGCCAAGA	50
GM558	BV005494	TTGGCAGATTTTGCTTATTGG	CATGTTTGATTTGGCAAAGG	53
UNH211	G12362	GGGAGGTGCTAGTCATA	CAAGGAAAACAATGGTGATA	57
UNH176	G12328	GATCAGCTCTCCTCTACTTA	GATCTGATTTCTTATTACTACAA	42
UNH914	G68261	GCACGCTGAGAGTGTGGAA	CAGCTTTCACACCAGCCTAA	52
UNH974	G68261	GCACGCTGAGAGTGTGGAA	CAGCTTTCACACCAGCCTAA	55
GH-MS01	/	CCAGCCATGAACTCAGTAAGACA	TGCTGAGAGGAGACGCCAAACA	60
PRL-MS01	/	GTTAGCCCCCTCCTCACTCT	ACCTTGCTCGTCACACCTG	60
PRL-MS02	/	TCGTGCTTGTGGGAAACC	TGAATGGATGCAACAGGATG	55
ISP-MS01	/	TGAGCTGAGCAGATGGAGCAGAAG	ATGAACAGCCCTGTGAAGAGATGG	55
IGF-II-MS01	/	TCCCCAGCTGGAAGATGTGTCACG	CTGGACGCAGCTGAAATCCTGTGG	47
IGF-II-MS3	/	ATGCTAGCAAACATCAAAGGTC	GATATGCTGATGATGCACAGAGTC	55
UNH180	G12332	GCAACTAATCACACAATTTT	GTTTAAGTTAAAAACAAATTCGTTT	45
UNH907	G68221	CAGGACCGACTCTGCAAGAT	GAGCTCTTTTGTGTTCAAAATC	52
UNH848	G68186	TCCCCCGTAATAAATTAACCA	GCCTGTGAATAACAATGTATTTCCT	47
UNH211	G12362	GGGAGGTGCTAGTCATA	CAAGGAAAACAATGGTGATA	57
GM509	BV005465	CAACAGCAAAGCCAGGAGAG	AGCCCTGCACAGTTTAGCAA	55
UNH846	G68185	TGGAGCAGCTTCTTCTACATCA	CACATGATGGAAGCCGTGTA	55
UNH738	G63987	TGCTGTGCAATAAAGTGCTG	TCTTTGCCAGGTTGTCCATT	50
UNH197	G12348	CAGGATGGTGAGATGTTT	TTAAGTGGAAGAAGTCAATG	55
GM180	BV005346	CGGCGGCGACTTGTAGTGTA	GGACGGTCTGGCGAGGAC	60
UNH925	G68234	GTAGCTGCTGGGGTCTGAAG	TAGCACTCTGCCACTTGTCC	60
GM047	BV005287	GTCGCAGGTAGACTGAAGG	TCTTGGGGACAGAAGTGTATT	55
UNH934	G68240	ACTGCAATGAAATGCTGCTT	CCATTCTCAGAGCACAACA	55
UNH125	G12278	GCTATCTACCTACCTACCTGT	TCATTCTTTCACAAATGTTTCTA	42
UNH138	G12290	TTCAGTTCATCTCTTG	CCATTTTAACTCTCCATCT	45
UNH166	G12318	CCCTCACACACACTCTT	GATAACGACACGACAGTAC	45
UNH719	G63968	AAACCATTTCATCCTTCACTCG	GAATGCTTAGTGCCATCAAT	45
UNH855	G68191	ACTCCCCTGTGCTGTTAG	GAGGGGAGCCTACAACGTAA	55

· 续表 1 ·

位点 locus	GenBank accession number	引物序列(5'-3') primer sequence(5'-3')		退火温度(°C) annealing temperature
UNH878	G68205	TTTCAGGAGGACGAGCAGTT	CAGGCGGCAGATATTCATT	46
UNH868	G68199	TCCTTGTTTCAGACCTTGTGG	AGCCAGGCTGAAAGGAAATA	55
UNH906	G68220	AACATGCTTTCAGCCTTCGT	TGAGCAAATCCCGTCCATA	55
UNH980	G68264	GAAGATATGCATGCGGACAC	CACTCCCATTTCTGTGTG	55
GM201	BV005353	TATTCAGGCTCTTCTTTTGTCT	CAGAATGAACTCCCTCCAG	56
UNH933	G68239	GGGGTGAGGTGTTTCACAGAT	GGGGCCTTAGTTTCACCTCA	57
UNH999	G68278	TGCAAAGTCACAAATCCACAA	CTCCCATTCATTACCCCAAA	48
UNH971	G68259	GGTGGGCAGTGTGTGTTTTT	TTTTTCATCCAGGCCTCAGTT	57
GM024	BV005273	GTGATTCCTCCCAACAGTAA	AGCCATGACAGGATTTTGA	50
UNH874	G68202	AGTAAATGGGCGAACGTGT	TGAAGCTGGGAGTTTCTCTGT	58
UNH106	G12259	CCITTCAGCATCCGTATAT	TCTCTTCTCTCTGTCCACAAG	50
UNH115	G12268	ACCTTCATCTCCGGTCAG	TCAAGCAGCTGATTTTTT	50
GM119	BV005317	AATTTCTCGTATTTTCATGCTA	TCCTTACATTCCCTCTGACC	50
GM566	BV005502	CAGACACGCAGAGATGTGGA	TCTTCCGTTTGACTCACCAA	50
UNH927	G68235	GGTGGGCAGTGTGTGTTTTT	TTTTTCATCCAGGCCTCAGTT	58
UNH853	G68189	TAAAGCTCGTCCCGTAACA	TGCGTCTCATCACTGTCTGC	50
UNH880	G68207	GGCAGCAGTATAACAATCACCA	TTCTGACATCCATCCAGCAG	60
UNH913	G68225	CAATGACTGTTTTTGTTCCTGTG	GCTTCTGTGCACATGCAGTC	50
UNH989	G68269	CCACCTCATACACGCAAATG	CAGCAGCAGCTGTCCACTAA	50
UNH112	G12275	TCACGATCATTCTCTGA	ATGTTATCACTCTGTTTACACG	52
UNH222	G12373	CTCTAGCACACGTGCAT	TAACAGGTGGGAACTCA	52
UNH899	G68216	ACGTCACATGGAGGTGCTTA	GCTAGACCTCTGTCCCCTGA	60
UNH988	G68268	TCTGTGTGCCTTGTCTTGTCT	CAGGGGTTTGACAGACAGAAC	52
UNH1004	G68281	CATCTGAGTCACGCAGGTTT	GCTGAGGTGAGTGTGATGGA	53
UNH954	G68250	GGAAAACGTTTGGAGAGACG	AAACGGAGCTCCTGTCTGAA	60
GM636	BV005533	AACTCTGAGCCTGTCCGCTTC	GGCAGCAGTTTGTTCACCT	53
UNH995	G68274	CCAGCCCTCTGCATAAAGAC	GCAGCACAACCACAGTGCTA	62
UNH104	G12257	GCAGTTATTTGTGGTCACTA	GGTATATGCTAACTGAAATCC	52
UNH860	G68195	ACTGTTTACCCACTGCGACA	AGATGTGTCTGAGCCATCCA	54
UNH876	G68204	TCCAAGCAGAAAAATGTGAGG	TTTCTCCTCTGGCCCTTAT	54
UNH896	G68214	CCTCTGTCCCTCCATGTGTT	AGCCTGGCTTTAGAGGCAAT	54
UNH974	G68261	GCACGTCTGAGAGTGTGGAA	CAGCTTTCACACCAGCCTAA	55
UNH990	G68270	GCCACAGGTGACCATGTTAG	GGTGTCTGATTGCACTGACG	55
UNH214	G12365	TTCCATAATTGCTTCTG	GCACGTTTTCCATCACTCAA	55

## 1.2 方法

**罗非鱼基因组 DNA 的提取** 采用实验鱼活体尾静脉取血,加入预先装有抗凝剂(ACD)的离心管中(抗凝剂与血液的体积约为 6:1),根据天根时代(TIANGEN)离心柱型基因组 DNA 提取试剂盒介绍的方法提取血液基因组 DNA,0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量和浓度,-20 °C 保存。

**PCR 反应程序** PCR 反应总体系为 20  $\mu$ L,含有 10  $\times$  Buffer 2.0  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L)0.8 ~ 1.0  $\mu$ L, dNTPs (10 mmol/L)0.3  $\mu$ L,上、下游引物(20 pmol/L)各 0.5  $\mu$ L, Taq 酶 0.2  $\mu$ L (约为 1 U),模板 DNA 量为 60 ng 左右。PCR 反应程序为 94 °C 预变性 4 min 后进入循环体系 94

°C 变性 30 s,各引物退火温度 45 ~ 60 °C,退火时间 30 s,72 °C 延伸 30 s,25 个循环,最后 72 °C 延伸 7 min。

**电泳与银染** (1)电泳:PCR 扩增产物在 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳检测,电泳缓冲液为 0.5  $\times$  TBE,电压 250 V,电泳 2 h。产物上样量均为 4  $\mu$ L(样品与 Buffer 按 3:1 混合),DNA Marker 上样量为 0.5  $\mu$ L。(2)银染:电泳后进行硝酸银染色,染色方法参照文献[15]略加改进,将凝胶放入盛有蒸馏水的塑料容器中轻轻漂洗 5 s,倒掉蒸馏水;加入 10 mg/mL AgNO<sub>3</sub> 溶液,静置 2.5 min,倒掉 AgNO<sub>3</sub> 溶液;用少许蒸馏水漂洗两次,每次不超过 10 s,倒掉蒸馏水;快速加入配好的显色液(NaOH 12 g, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.5 g, HCHO 3

mL,加蒸馏水定容至 500 mL) 约 50 mL 漂洗两次,振荡时间不超过 5 s,倒掉漂洗液;加入一定量的显色液,显色 3~5 min。待带型清晰时,立即将胶取出,将胶取出晾干后放于 Alpha image 凝胶成像系统拍照,然后将其做成干胶,长久保存。

#### 实验设计

实验 1:对鹭业群体 120 尾尼罗罗非鱼个体的体重、体长和体高等生长性状的数据进行称量和测量,将具有多态性的 65 对微卫星引物对样本 DNA 进行扩增,统计不同个体的基因型,用 SPSS 软件对不同基因型与体重、体长和体高之间的相关性进行最小二乘法分析,初步筛选与尼罗罗非鱼体重等主要生长性状相关的微卫星位点。

实验 2:将实验 1 中筛选出的位点在番禺群体中进行扩增,并统计基因型,然后进行相关性分析,从而进一步验证实验 1 筛选出的微卫星位点的可重复性。

统计分析 利用 SPSS 15.0 软件一般线性模型 (general linear model, GLM),对微卫星位点

与尼罗罗非鱼主要生长性状之间的相关性进行最小二乘法分析。统计模型采用  $y_{ij} = \mu + a_i + e_{ij}$ ,其中  $y_{ij}$  为某性状第  $i$  个标记第  $j$  个个体的观测值; $\mu$  为实验观测所有个体的平均值 (即总体平均值); $a_i$  为第  $i$  个标记的效应值; $e_{ij}$  为随机误差。

## 2 结果与分析

### 2.1 利用一般线性模型对不均衡数据进行方差分析

以微卫星位点为标记效应组成固定模型,对尼罗罗非鱼鹭业群体和番禺群体体重等主要生长性状进行方差分析。结果表明,在鹭业群体中从 65 对微卫星引物中筛选出 8 对引物的标记效应与尼罗罗非鱼体重等生长性状显著或极显著相关;在番禺群体中将这 8 对引物进行了验证,其中 2 对引物 (UNH914 和 UNH974) 与尼罗罗非鱼体重等生长性状显著或极显著相关,1 对引物 (UNH176) 只与尼罗罗非鱼体重显著相关 (表 2 和表 3)。

表 2 8 个微卫星位点不同基因型间主要生长性状表型值的  $F$  检验 ( $P$  值)

Tab. 2  $F$ -test of deviation between 8 microsatellite genotypes and major growth traits ( $P$  value)

位点 locus	鹭业群体 Luye populations			番禺群体 Panyu populations		
	体重 (g) body weight	体长 (cm) body length	体高 (cm) body width	体重 (g) body weight	体长 (cm) body length	体高 (cm) body width
UNH130	0.045	0.047	0.047	0.106	0.195	0.148
UNH183	0.001	0.008	0.009	0.634	0.458	0.565
UMH911	0.041	0.023	0.049	0.521	0.657	0.568
GM 558	0.024	0.048	0.033	0.998	0.993	0.983
UNH211	0.050	0.039	0.042	0.147	0.256	0.091
UNH176	0.000	0.007	0.000	0.031	0.061	0.056
UNH914	0.000	0.001	0.000	0.045	0.039	0.010
UNH974	0.000	0.009	0.001	0.000	0.008	0.003

### 2.2 微卫星位点与鹭业群体主要生长性状相关性的初步筛选结果

根据方差分析结果,对鹭业群体中与生长性状显著相关的 8 个标记不同基因型间的表型值进行了多重比较 (表 3)。基因座是指基因在染色体上所处的位置,而基因型就是指与所研究的性状有关的基因座上的基因组合类型。在基因型统计分析过程中,由于一些位点中某些基因型出现频率太少,缺乏分析价值,因此在实际统计分析中,每种基因型至少有 3 次观察值才被考虑。

在标记 UNH130 中,基因型 AD 个体的体重、体长和体高均值为最高,其次为基因型 CC 个体。

在体重方面,AD 型个体与除 CC 型个体以外的其他基因型 (BC 和 BB) 个体差异均显著,且 AD 型个体与 BB 型个体之间的差异达到了极显著;在体长和体高方面,AD 型个体与其他基因型个体差异都达到了显著水平,同时 AD 型个体还与 BB 型个体间存在差异极显著。由此可以看出,等位基因 A 或 D 有可能对体重、体长和体高的影响均呈正相关,而等位基因 B 呈负相关。

在标记 UNH183 中,在体重和体高方面,3 种性状均值最高的 AB 型个体和最低的 AA 型个体差异极显著;在体长方面,AB 型和 BB 型个体均显著高于 AA 型个体。

表 3 5 个微卫星位点不同基因型主要生长性状的平均值及多重比较(鹭业群体)

Tab. 3 Means and multiple comparisons of major growth traits in 5 microsatellite loci (Luye populations)

位点 locus	基因型 genotype	个体数 no.	体重(g) body weight	体长(cm) body length	体高(cm) body width
UNH130					
A = 236 bp	AD	8	89.69 ± 11.54 <sup>aA</sup>	12.62 ± 0.63 <sup>aA</sup>	5.89 ± 0.38 <sup>aA</sup>
B = 216 bp	BB	8	44.88 ± 11.54 <sup>bB</sup>	10.10 ± 0.63 <sup>bB</sup>	4.38 ± 0.38 <sup>bB</sup>
C = 204 bp	BC	35	63.39 ± 5.52 <sup>bAB</sup>	11.13 ± 0.30 <sup>bAB</sup>	4.99 ± 0.18 <sup>bAB</sup>
D = 188 bp	CC	63	66.60 ± 4.11 <sup>abAB</sup>	11.22 ± 0.22 <sup>bAB</sup>	5.02 ± 0.14 <sup>bAB</sup>
UNH183					
A = 202 bp	AA	108	61.02 ± 2.95 <sup>B</sup>	11.02 ± 0.17 <sup>bA</sup>	4.90 ± 0.10 <sup>B</sup>
B = 194 bp	AB	8	102.94 ± 10.83 <sup>A</sup>	12.61 ± 0.60 <sup>aA</sup>	6.00 ± 0.36 <sup>A</sup>
UNH911					
A = 152 bp	AA	4	27.50 ± 17.18 <sup>bB</sup>	8.59 ± 0.89 <sup>bB</sup>	3.57 ± 0.53 <sup>bB</sup>
B = 146 bp	AB	42	67.81 ± 5.30 <sup>acAB</sup>	11.47 ± 0.28 <sup>aA</sup>	5.12 ± 0.17 <sup>aA</sup>
C = 140 bp	AC	19	64.82 ± 7.88 <sup>abcAB</sup>	11.02 ± 0.41 <sup>aAB</sup>	4.99 ± 0.25 <sup>aAB</sup>
	BB	16	61.60 ± 8.59 <sup>abcAB</sup>	11.04 ± 0.45 <sup>aAB</sup>	4.93 ± 0.27 <sup>aAB</sup>
	BC	25	70.30 ± 6.87 <sup>aAB</sup>	11.26 ± 0.36 <sup>aA</sup>	5.11 ± 0.21 <sup>aA</sup>
	CC	4	94.63 ± 17.18 <sup>aA</sup>	12.93 ± 0.89 <sup>aA</sup>	6.00 ± 0.53 <sup>aA</sup>
GM 558					
A = 203 bp	AA	5	86.30 ± 15.17 <sup>aA</sup>	11.92 ± 0.80 <sup>ahAB</sup>	5.61 ± 0.47 <sup>ahA</sup>
B = 183 bp	AB	22	71.73 ± 7.23 <sup>ahcA</sup>	11.49 ± 0.38 <sup>ahcAB</sup>	5.16 ± 0.23 <sup>ahcAB</sup>
C = 175 bp	AC	18	80.22 ± 8.00 <sup>acA</sup>	12.12 ± 0.42 <sup>aA</sup>	5.62 ± 0.25 <sup>aAB</sup>
	BB	23	64.39 ± 7.08 <sup>ahcA</sup>	11.10 ± 0.37 <sup>ahcAB</sup>	4.93 ± 0.22 <sup>hcAB</sup>
	BC	40	58.50 ± 5.37 <sup>abdA</sup>	10.86 ± 0.28 <sup>bcAB</sup>	4.81 ± 0.17 <sup>bcB</sup>
	CC	6	44.00 ± 13.85 <sup>bA</sup>	9.89 ± 0.73 <sup>cb</sup>	4.21 ± 0.43 <sup>cb</sup>
UNH211					
A = 121 bp	AA	59	72.95 ± 4.50 <sup>acA</sup>	11.57 ± 0.24 <sup>aA</sup>	5.23 ± 0.14 <sup>aA</sup>
B = 116 bp	AB	47	57.80 ± 5.04 <sup>bA</sup>	10.79 ± 0.27 <sup>bA</sup>	4.78 ± 0.16 <sup>bA</sup>
	BB	3	76.33 ± 20.00 <sup>aA</sup>	11.45 ± 1.06 <sup>ahA</sup>	5.20 ± 0.63 <sup>ahA</sup>

注:同一列不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ ),同一列不同大写字母表示差异极显著( $P < 0.01$ )。

Notes: Different lower case of mean within a column indicate a significant difference at  $P < 0.05$ ; different capital letters of mean within a column indicate a significant difference at  $P < 0.01$ .

在标记 UNH911 中,基因型为 CC 个体的体重、体长和体高均值均高于其他基因型个体。在体重方面,均值最小的 AA 个体与 CC、BC 和 AB 个体存在显著差异,并且与 CC 个体差异达到了极显著水平;在体高和体长方面,AA 个体与其他基因型个体都存在差异显著性,同时与 CC、BC 和 AB 个体的差异还达到了极显著水平。可以说明等位基因 C 对 3 种性状起正面影响而等位基因 A 有可能对 3 种性状起负面影响。在检测到这 6 种基因型的 110 个个体中,其中 CC 型个体仅占 4 个。因此,在以后的选育中要注意选留 CC 型个体,淘汰 AA 型个体。

在标记 GM 558 中,AA 和 AC 型个体体重均值都显著高于 BC 和 CC 型个体;在体长和体高方面,AC 和 AA 型个体均值显著高于 CC 型个体,AC 型和 CC 型之间还达到了差异极显著水平,同时 AC 型个体均值还显著高于 BC 型个体。

从均值较高的 AA 和 AC 型个体中可以看出,等位基因 A 占优势,可以认为等位基因 A 与体重、体长和体高正相关;同理,在均值较低的 BC 和 CC 型个体中,等位基因 C 占优势,说明等位基因 C 有可能与这 3 种性状负相关。

在标记 UNH211 中,BB 型个体体重均值最高,AA 型次之,AB 型最小。BB 型个体均值与 AA 型个体差异不显著,但两者均显著高于 AB 型个体;在体高和体长方面,AA 个体均值高于其他基因型个体,与 BB 型差异不显著但显著高于均值最小的 AB 型个体。

在标记 UNH176 中,CD 型个体 3 种性状均值都要高于其他基因型个体,并且与均值最小的 BC 型个体达到了极显著水平。在体重方面,CD 型个体均值要显著高于其他基因型个体;在体长和体高方面,CD 型个体与 BB 型个体差异没有达到显著水平,但都显著高于其他基因型个体。由

此,可以推测 CD 型为有利基因型,在选种过程中要注意多保留该基因型。

在标记 UNH914 中,共检测到 2 种基因型,分别为 BD 型和 BB 型。BD 型个体 3 种性状均值都要高于 BB 型个体,并且达到了极显著水平。这说明等位基因 D 有可能对 3 种性状的影响呈正相关,而等位基因 B 有可能对 3 种性状呈负相关。

在标记 UNH974 中,BC 型个体 3 种性状均值都要高于其他基因型个体。BC 型个体的体重、体长和体高均值与 BB 型个体不显著,但两者都显著高于 CC 型个体。在体重和体高方面,BC 型个体均值还要极显著高于 CC 型个体,而 BC 型个体体长均值与 CC 型个体没有达到极显著水平。不难看出 CC 型个体 3 种性状均值都是最小的,属于劣势基因型。

表 4 3 个微卫星位点不同基因型主要生长性状的平均值及多重比较(鹭业群体和番禺群体)

Tab. 4 Means and multiple comparisons of major growth traits in 3 microsatellite loci (Luye and Panyu populations)

位点 locus	基因型 genotype	鹭业群体 Luye populations				番禺群体 Panyu populations			
		个体数 no.	体重(g) body weight	体长(cm) body length	体高(cm) body width	个体数 no.	体重(g) body weight	体长(cm) body length	体高(cm) body width
UNH176 A = 162 bp B = 156 bp C = 150 bp D = 146 bp E = 142 bp	AA	0	0	0	0	11	318.41 ± 25.97 <sup>hB</sup>	21.39 ± 0.56 <sup>a</sup>	8.91 ± 0.30 <sup>a</sup>
	AB	0	0	0	0	14	343.04 ± 23.02 <sup>hAB</sup>	21.72 ± 0.49 <sup>a</sup>	9.20 ± 0.27 <sup>a</sup>
	AC	0	0	0	0	7	92.98 ± 32.56 <sup>ahAB</sup>	21.84 ± 0.70 <sup>a</sup>	9.16 ± 0.38 <sup>a</sup>
	AD	0	0	0	0	18	355.03 ± 20.30 <sup>hAB</sup>	21.20 ± 0.43 <sup>a</sup>	9.04 ± 0.24 <sup>a</sup>
	AE	0	0	0	0	3	386.33 ± 49.73 <sup>ahAB</sup>	21.24 ± 1.06 <sup>a</sup>	9.32 ± 0.58 <sup>a</sup>
	BB	8	75.38 ± 11.20 <sup>hAB</sup>	12.10 ± 0.62 <sup>ahB</sup>	5.37 ± 0.36 <sup>ahB</sup>	0	0	0	0
	BC	39	57.39 ± 5.07 <sup>hB</sup>	10.82 ± 0.28 <sup>hB</sup>	4.77 ± 0.16 <sup>hB</sup>	4	344.88 ± 43.07 <sup>hAB</sup>	21.46 ± 0.92 <sup>a</sup>	9.02 ± 0.50 <sup>a</sup>
	BD	0	0	0	0	9	320.78 ± 28.71 <sup>hAB</sup>	21.25 ± 0.61 <sup>a</sup>	9.16 ± 0.33 <sup>a</sup>
	CD	9	113.72 ± 10.56 <sup>ahA</sup>	12.93 ± 0.58 <sup>ahA</sup>	6.37 ± 0.34 <sup>ahA</sup>	11	377.27 ± 25.97 <sup>ahAB</sup>	21.37 ± 0.56 <sup>a</sup>	9.17 ± 0.30 <sup>a</sup>
	DD	59	64.01 ± 4.12 <sup>hB</sup>	11.14 ± 0.23 <sup>hB</sup>	4.97 ± 0.13 <sup>hB</sup>	17	345.71 ± 20.89 <sup>hAB</sup>	21.26 ± 0.45 <sup>a</sup>	9.15 ± 0.24 <sup>a</sup>
UNH914 A = 190 bp B = 186 bp C = 180 bp D = 168 bp	DE	0	0	0	0	9	419.61 ± 28.71 <sup>ahA</sup>	21.84 ± 0.61 <sup>a</sup>	9.33 ± 0.33 <sup>a</sup>
	AA	0	0	0	0	4	450.88 ± 40.22 <sup>ahA</sup>	23.23 ± 0.84 <sup>ahA</sup>	9.73 ± 0.45 <sup>ahA</sup>
	AC	0	0	0	0	9	356.33 ± 26.81 <sup>hAB</sup>	21.05 ± 0.56 <sup>ahA</sup>	9.13 ± 0.30 <sup>ahA</sup>
	BB	106	61.29 ± 3.09 <sup>B</sup>	11.02 ± 0.17 <sup>B</sup>	4.89 ± 0.10 <sup>B</sup>	23	336.78 ± 16.77 <sup>hB</sup>	21.10 ± 0.35 <sup>ahA</sup>	8.87 ± 0.19 <sup>ahA</sup>
	BC	0	0	0	0	11	298.55 ± 24.25 <sup>hB</sup>	20.87 ± 0.50 <sup>ahA</sup>	8.76 ± 0.27 <sup>ahA</sup>
	BD	14	100.18 ± 8.50 <sup>A</sup>	12.76 ± 0.46 <sup>A</sup>	6.05 ± 0.27 <sup>A</sup>	0	0	0	0
	CC	0	0	0	0	57	364.11 ± 10.65 <sup>hAB</sup>	21.72 ± 0.22 <sup>ahA</sup>	9.33 ± 0.12 <sup>ahA</sup>
UNH974 A = 204 bp B = 184 bp C = 178 bp D = 170 bp	CD	0	0	0	0	5	351.20 ± 35.97 <sup>hAB</sup>	20.47 ± 0.75 <sup>ahA</sup>	8.48 ± 0.41 <sup>ahA</sup>
	DD	0	0	0	0	3	385.17 ± 46.44 <sup>ahAB</sup>	21.62 ± 0.97 <sup>ahA</sup>	9.44 ± 0.52 <sup>ahA</sup>
	AA	0	0	0	0	12	432.75 ± 22.67 <sup>ahA</sup>	22.31 ± 0.48 <sup>ahA</sup>	9.81 ± 0.26 <sup>ahA</sup>
	AC	0	0	0	0	30	386.13 ± 14.34 <sup>ahA</sup>	22.06 ± 0.31 <sup>ahA</sup>	9.43 ± 0.16 <sup>ahAB</sup>
	AD	0	0	0	0	3	295.17 ± 45.34 <sup>hB</sup>	20.03 ± 0.96 <sup>ahA</sup>	8.54 ± 0.51 <sup>hB</sup>
	BB	3	102.67 ± 17.85 <sup>ahB</sup>	13.01 ± 0.99 <sup>ahA</sup>	6.28 ± 0.59 <sup>ahAB</sup>	0	0	0	0
	BC	5	122.5 ± 13.82 <sup>ahA</sup>	13.01 ± 0.77 <sup>ahA</sup>	6.32 ± 0.45 <sup>ahA</sup>	0	0	0	0
CC	111	61.64 ± 2.93 <sup>hB</sup>	11.05 ± 0.16 <sup>ahA</sup>	4.91 ± 0.10 <sup>hB</sup>	34	325.78 ± 13.47 <sup>hB</sup>	21.07 ± 0.29 <sup>ahA</sup>	8.86 ± 0.15 <sup>hB</sup>	
CD	0	0	0	0	10	293.85 ± 24.84 <sup>hB</sup>	20.46 ± 0.53 <sup>ahA</sup>	8.72 ± 0.28 <sup>hB</sup>	

注:同一列不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ ),同一列不同大写字母表示差异极显著( $P < 0.01$ )。

Notes: Different lower case of mean within a column indicates a significant difference at  $P < 0.05$ ; different capital letters of mean within a column indicates a significant difference at  $P < 0.01$ .

### 2.3 鹭业群体中与主要生长性状相关的标记在番禺群体中的验证

为了进一步确保标记的准确性,将鹭业群体中筛选到的与主要生长性状相关的 8 个微卫星位点在番禺群体中进行验证。通过方差分析和多重比较,发现有 3 个位点得到了验证(表 2 和表 4),分别为 UNH176、UNH914 和 UNH974。

在标记 UNH176 中,基因型 DE 个体的体重、体长和体高均值都高于其他基因型个体。在体重方面,DE 型个体均值与 AC、AE 和 CD3 种基因型个体差异不显著,但与其他 5 种基因型个体差异都显著,并且与 AA 型个体的差异达到了极显著水平;在体长和体高方面,各基因型个体均值之间差异没有达到显著水平。

在标记 UNH914 中,AA 型个体 3 种性状均值都要高于其他基因型个体。在体重方面,AA 型个体均值与除 DD 型个体以外的其他基因型个体差异均达到了显著水平,并且与 BB 和 BC 型个体的差异达到了极显著水平;在体长方面,AA 型个体与除 CC 和 DD 型个体以外的其他基因型个体差异显著;在体高方面,AA 型个体只与 CD 型个体差异显著,同时 DD 和 CC 型个体与 BB、BC 和 CD 型个体差异也达到了极显著水平。由此可知,等位基因 A 或 D 有可能对 3 种性状起正面影响,而等位基因 B 起负面影响。

在标记 UNH974 中,基因型 AA 个体 3 种性状均值都要高于其他基因型,与 AC 型个体差异没有达到显著水平,两者与 CC、AD 和 CD 型个体的差异都达到了显著水平。在体重方面,AA 型和 AC 型个体均值与 CC、AD 和 CD 3 种基因型个体达到了极显著水平;在体高方面,AA 型个体均值与其他 4 种基因型达到了极显著水平;在体长方面,各基因型均值间的差异都没有达到极显著水平。

### 3 讨论

#### 3.1 同鹭业和番禺群体生长相关的 3 个微卫星标记分析

本研究分析了微卫星标记与尼罗罗非鱼主要生长性状的相关性,利用最小二乘法在鹭业群体中检测到 UNH130、UNH183、UNH911、GM558、UNH211、UNH176、UNH914 和 UNH974 共 8 个微卫星标记与尼罗罗非鱼的体重、体长和体高显著或极显著相关,并且在番禺群体中进行了验证,结果显示有 2 个标记 UNH914 和 UNH974 与尼罗罗非鱼体重、体长和体高显著或极显著相关,1 个标记 UNH176 仅与体重显著相关。将 UNH176、UNH914 和 UNH974 3 个标记在 2 个群体中的等位基因整合在一起,然后进行多重比较,结果表明,在标记 UNH176 中,鹭业群体中 CD 型个体 3 种性状均值要显著高于其他基因型个体,而在番禺群体中 CD 型个体均值也都要高于 BC 型个体,只是没有达到显著水平,由此可以认为 UNH176 标记中对尼罗罗非鱼生长有利的基因型是 CD 型;在标记 UNH914 中,鹭业群体中等位基因 D 对 3 种性状的影响呈正相关,等位基因 B 呈负相关,而在番禺群体中等位基因 A 或 D 对 3 种

性状的影响呈正相关,等位基因 B 呈负相关,由此可知 UNH914 标记中等位基因 D 有可能对尼罗罗非鱼 3 种性状起正面影响,而等位基因 B 有可能起负面影响;在标记 UNH974 中,鹭业群体 CC 型是不利基因型,并且在番禺群体也处于 3 种性状均值偏小的基因型当中,因此标记 UNH974 中的 CC 型是对尼罗罗非鱼生长不利的基因型。本研究结果表明,有 8 个微卫星标记与尼罗罗非鱼主要生长性状相关联,其中包括 UNH130,这与 Cnaani 等<sup>[11]</sup>进行 QTL 定位认为 UNH130 和体重及体长相关的结果基本一致。Moen 等<sup>[12]</sup>利用对四系杂交罗非鱼杂交系统的基因组扫描分析,进一步将 UNH130 定位于第 23 连锁群,这说明此基因座与控制体重和体长性状的主效基因相连锁,可作为分子标记辅助育种应用的首选标记。达到显著水平的关联在一定程度上说明另外 7 个标记与特定性状间可能存在相关。在这些关联中,出现了一个标记同几个性状相关,或几个标记同一个性状相关,说明这些位点存在一因多效或多因一效的现象。由于缺少罗非鱼体重、体长和体高 QTL 定位的结果用来进行相关比较,因此本实验所得到的结果是否可靠有待进一步验证,这些标记是否能作为尼罗罗非鱼优良生长性状选择辅助育种标记还需要深入研究。

#### 3.2 与生长相关的微卫星标记的可重复性

影响标记—性状连锁分析准确性的一个重要因素是群体数量,本研究利用鹭业和番禺 2 个群体对微卫星标记与生长性状进行了关联分析,从而最大限度保证了标记的准确性。由于现在对于进行标记—性状连锁分析时群体数量必须达到一个什么标准,筛选出的标记才可信,还没有明确的依据,因而并不能说在另外一个群体中没有得到验证的关联标记就不可信。因而,在实际操作中也可以将在番禺群体中没有得到验证的 5 个微卫星标记作为分子标记辅助育种的依据。

#### 3.3 关联标记在不同世代中的相关性验证

生长性状属于数量性状,是由多基因控制的,这些基因可能在不同的世代中分离或整合。因此,对于与生长性状相关联的 UNH176、UNH914 和 UNH974 3 个标记,不仅要证明其在不同群体中的可重复性,还要证实其在不同世代中也具有相关性,这就需要以后用更多的尼罗罗非鱼世代来进行研究,进一步完善以确保研究结果的准确

性。今后可以通过选择含有这些优势标记的亲本来建立多个家系,在进行家系选育时尽量选择含有这些优势标记的后代,从而实现由生长相关标记的筛选到应用于尼罗罗非鱼实际选育的转化。

#### 参考文献:

- [1] Miesfeld R, Krystal M, Arnheim N. A member of a new repeated sequence family which is conserved throughout eukaryotic evolution is found between the human delta and beta globin genes [J]. *Nucleic Acids Research*, 1981, 9(22): 5931 - 5947.
- [2] Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1989, 17(16): 6463 - 6471.
- [3] 赵晓枫, 徐宁迎, 胡晓湘, 等. IGF-1 调控区微卫星座位对金华猪生长性能的影响 [J]. *遗传*, 2007, 29(2): 180 - 186.
- [4] 单雪松, 张沅, 李宁. 奶牛微卫星基因座与产奶性能关系的研究 [J]. *遗传学报*, 2002, 29(50): 430 - 433.
- [5] Paszek A A, Wilkie P J, Flickinger G H, *et al.* Interval mapping of growth in divergent swine cross [J]. *Mamm Genome*, 1999, 10(1): 117 - 122.
- [6] Napolitano F, Leone P, Puppo S, *et al.* Exploitation of microsatellites as genetic markers of beef performance traits in Pimontese × Chianina crossbred cattle [J]. *Anim Breed Genet*, 1996, 113(3): 157 - 162.
- [7] 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.
- [8] 倪静, 尤锋, 于深辉, 等. 牙鲆 GHR 基因 Promoter 区微卫星序列多态性与生长性状关系的初步研究 [J]. *中国海洋大学学报*, 2008, 38(5): 719 - 725.
- [9] 宋红梅, 白俊杰, 叶星, 等. 橙色莫桑比克罗非鱼微卫星遗传多样性分析及其与尼罗罗非鱼差异位点的筛选 [J]. *中国水产科学*, 2008, 15(3): 400 - 406.
- [10] 宋红梅, 白俊杰, 全迎春, 等. 三种罗非鱼微卫星分子鉴定和遗传结构分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2008, 16(6): 952 - 958.
- [11] 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 F<sub>2</sub> tilapia hybrid [J]. *Aquaculture*, 2003, 223: 330 - 340.
- [12] Moen T, Agresti J J, Cnaani A, *et al.* A genome scan of a four-way tilapia cross supports the existence of a quantitative trait locus for cold tolerance on linkage group 23 [J]. *Aquaculture Research*, 2004, 35(9): 309 - 315.
- [13] Carleton K L, Strelman J T, Lee B Y, *et al.* Rapid isolation of CA microsatellites from the tilapia genome [J]. *International Society for Animal Genetics, Animal Genetics*, 2002, 33(2): 140 - 144.
- [14] Yue G H, Orban L. Microsatellites from genes show polymorphism in two related *Oreochromis* species [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2002, 2(2): 99 - 100.
- [15] 霍金龙, 曾嵘, 潘伟荣, 等. 微卫星 PCR 聚丙烯酰胺凝胶银染法影响因素的分析研究 [J]. *云南农业大学学报*, 2005, 20(1): 67 - 71.



## Correlation analysis of microsatellite DNA markers with major growth traits of tilapia (*Oreochromis niloticus*)

LIU Fu-ping<sup>1,2</sup>, BAI Jun-jie<sup>1\*</sup>, SONG Hong-mei<sup>1</sup>, YE Xing<sup>1</sup>, LI Sheng-jie<sup>1</sup>, YU Ling-yun<sup>1</sup>  
(1. Key Laboratory of Tropical and Subtropical Fish Breeding & Cultivation, 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:** In order to obtain more molecule markers linked to growth-related traits of tilapia and evaluate their accuracy, 65 microsatellites loci were amplified in two Nile tilapia populations (Luye and Panyu), and the marker-trait association was analyzed by GLM (general linear model) procedure of SPSS software. The correlation analysis results showed that 8 loci (UNH130, UNH183, UNH911, GM558, UNH211, UNH176, UNH914 and UNH974) had a significant impact on major growth traits (weight, body length and body height) of Luye population ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). In Panyu tilapia population, UNH914 and UNH974 had a significant impact on major growth traits ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), and UNH176 just had a significant impact on body weight ( $P < 0.05$ ). The favorable genotypes or allele linked to growth traits including weight, body length and body height were determined by multiple comparison analysis between the phenotypic value and different genotypes of microsatellites markers linked to major growth traits. In this study, the microsatellite loci with a significant effect on growth traits were found, and they were potential valuable genetic markers for marker-assisted selection of tilapia.

**Key words:** tilapia (*Oreochromis niloticus*); microsatellite; growth trait; correlation analysis

**Corresponding author:** BAI Jun-jie. E-mail: jjbai@163.net