

大黄鱼 22 个微卫星标记在 F_1 家系中的 分离方式及与生长性状的相关分析

刘贤德^{1,2}, 韦信键¹, 蔡明夷¹, 刘洋¹, 王志勇^{1*}

(1. 集美大学水产学院, 农业部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021;

2. 浙江海洋学院水产学院, 浙江 舟山 316004)

摘要: 研究了 1 个大黄鱼 F_1 家系 150 个个体 22 个微卫星位点的基因型分布, 并分析了标记位点与生长性状的相关性。结果显示, 22 个位点共检测到 60 个等位基因, 平均等位基因数为 2.73, 平均有效等位基因数为 2.37; 平均观测杂合度与期望杂合度分别为 0.75 和 0.73, 部分位点基因型分布严重偏离孟德尔定律, 暗示其可能与适应性基因相连锁, 其中 LYC0446 位点附近可能存在隐性纯合致死基因。LYC0077 位点与体质量、体长和体高均呈显著相关 ($P < 0.05$), 其中等位基因 A (165 bp) 对应的生长性状表型值最大, 可以作为选育快长性状的有效分子标记; LYC0015 和 LYC0243 与体高呈显著相关 ($P < 0.05$), 与体长、体质量的相关不显著 ($P > 0.05$), LYC0015 位点的等位基因 C (110 bp) 和 LYC0243 位点的等位基因 A (160 bp) 为有利的等位基因。对 LYC0015、LYC0077 和 LYC0243 进行不同基因型个体表型值的多重比较, 找到 3 种对生长性状有利的基因型, 分别为 BC、AA 和 AB。同时, 以体质量性状为参照, 对 3 个位点不同基因型组合进行比较, 找到一个最优基因型组合 (BC/AA/AB), 与 3 个位点单独分析对应的最优基因型完全一致, 符合加性作用模型。

关键词: 大黄鱼; 微卫星标记; 生长性状; 相关分析

中图分类号: Q 348; S 917.4

文献标志码: A

大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 属于鲈形目 (Perciformes)、石首鱼科 (Sciaenidae)、黄鱼属 (*Larimichthys*), 俗称黄花鱼, 为暖水性鱼类, 主要产于我国福建、浙江沿海^[1]。自大黄鱼人工繁育技术于 1987 年取得成功之后, 大黄鱼养殖业发展迅速, 至 2010 年大黄鱼年育苗量超过 20 亿尾, 养殖产量超过 8.58 万 t^[2]。随着养殖业快速发展, 因多年未加选育的累代养殖, 大黄鱼有近交衰退的趋势, 生长速度慢, 抗病力差, 体色发暗, 因此亟待对大黄鱼进行遗传改良。然而, 与大黄鱼经济价值相关的性状, 如生长速度、抗病力、肌肉品质和应激性等多为数量性状。传统选育方法是依据表型而非基因型进行选择, 周期长、效率低, 因此有必要借助分子生物学的技术手段查明重要经济

性状的遗传控制情况, 筛选与经济性状紧密连锁的分子标记, 利用基因组的信息开展标记辅助选育, 以提高育种效率。

微卫星 (microsatellites) 又称简单序列重复 (simple sequence repeats, SSRs), 是由 1~6 bp 的简单序列重复排列组成, 广泛存在于真核生物基因组中, 因具有含量丰富、多态性高、共显性遗传和实验重复性好等优点, 已被应用到大黄鱼群体遗传结构分析^[3-7]、遗传图谱构建^[8-9]、亲缘关系鉴定和遗传参数评估等方面^[10], 但利用微卫星标记研究大黄鱼生长性状与其相关性的分析报道还很少^[11]。本实验利用 1 个全同胞家系 150 个个体, 研究了 22 个微卫星位点等位基因的分离及基因型分布情况, 进行生长性状相关性分析, 发现了

收稿日期: 2011-11-30 修回日期: 2012-06-07

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划 (2012AA10A403); 公益性行业 (农业) 科研专项 (200903029-4); 国家自然科学基金项目 (31172397); 浙江海洋学院海洋渔业科学与技术浙江省重中之重学科开放课题 (20100203)

通讯作者: 王志勇, E-mail: zywang@jmu.edu.cn

一些与生长性状及适应性相关的座位,并找到了对大黄鱼生长有利的基因型及与有利基因连锁的标记,为大黄鱼的进一步选育和种质资源利用提供了有用的参考资料。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

所用大黄鱼材料系课题组 2007 年 3 月在福建省宁德市实验基地利用人工授精方法培育的全同胞(F_1)家系,2008 年 10 月(约 20 月龄),从中采集 150 尾大黄鱼,测定每个个体的体长、体高和体质量。剪取部分尾鳍,固定于 95% 乙醇中用于提取 DNA。

1.2 实验方法

DNA 的提取与检测 用常规的苯酚/氯仿/异戊醇法抽提 DNA,紫外分光光度计测定 OD_{260} 与 OD_{280} ,确定 DNA 的质量并将 DNA 浓度调至 $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$,保存于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 备用。

PCR 及检测 PCR 反应体系:反应总体积为 $20 \mu\text{L}$,其中模板 DNA $1.0 \mu\text{L}$ (50 ng), $10 \times$ PCR buffer $2.0 \mu\text{L}$, 25 mmol/L MgCl_2 $1.6 \mu\text{L}$, 10 mmol/L dNTPs $0.14 \mu\text{L}$, 10 mmol/L 引物对各 $0.2 \mu\text{L}$, $5 \text{ U}/\mu\text{L Taq}$ 酶 $0.1 \mu\text{L}$, 纯水 $14.76 \mu\text{L}$ 。实验中所用的微卫星引物的核心序列及退火温度见表 1。

表 1 本研究选用的微卫星位点、核心序列、引物序列和退火温度

Tab. 1 Microsatellite loci, repeat motif sequence, prime sequence and annealing temperature used in this study

微卫星位点 microsatellite locus	核心序列 repeat motif sequence	引物序列(5'-3') primer sequence	退火温度/ $^\circ\text{C}$ annealing temperature
HLJDH137	(AC) ₂₃	F: TCAAGTTTCCCTGTAGTC R: AACAAAGACGCTGATTTTC	55
KPC43	(TG) ₁₂	F: GCAAAGTTTTGACTACCGAC R: CAGTAACCTCAGGAAGACCC	58 ~ 60
KPC86	(CA) ₂₃ AA(CA) ₁₇	F: TTGTGGTATGACGAGGTAGG R: GAAAGTGTGAGGGTTGGTC	58 ~ 60
LYC0015	(AC) ₇ AGTCCAA(AC) ₂	F: ACAGTCTAAAGCTGCCAGCA R: TGAGACCAACCACATTTCTGT	55
LYC0077	(CA) ₁₂	F: AGTCCTGAGCGACTACAT R: AAACACCTACACCGAGA	50
LYC0079	(GA) ₈ ...(CA) ₈ ...(TG) ₂₉	F: CACAGATCCTAAAGCCTACT R: AATGACTGATTCGTCCTTG	57
LYC0080	(CA) ₁₂	F: AGCACTCTGAGCCCACC R: CTGAGCGACAGCGTGT	50
LYC0088	(AAG) ₂₀	F: TAAGTAGTACCTGAAGGCAACA R: GCAGGAAATAATGGAGGC	60
LYC0095	(CA) ₁₇	F: TGTCACCACCACTCCTCT R: AACCGCTTAGTGTTTCTG	55
LYC0119	(AC) ₁₁	F: CTGCGTGTGACATTC' R: GCGTGACTCTGGAGGATT	55
LYC0124	(TG) ₁₈ ...(TG) ₁₇	F: TTCCTCTCCTCGCTGAT R: TCCATCCAGTCGGTCTTT	55
LYC0127	(CA) ₁₃	F: GAGCGAGGACCAATCTTA R: ACTCGGGAGTCTGCTAT	55
LYC0134	(CA) ₂₂	F: CGGGAAATGTCATTAGCA R: GAGCGAAATTGAAAGTAG	51
LYC0150	(AC) ₆	F: CAATCCCACTTCAAATCA R: GTCTAAATCCTGGCACCC	53
LYC0212	(TCTT) ₉	F: TAGGTCTCGCTGAGGATT R: TTCCGTCAACAGCAGTAA	55

续表 1

微卫星位点 microsatellite locus	核心序列 repeat motif sequence	引物序列(5'-3') primer sequence	退火温度/℃ annealing temperature
LYC0232	(TG) ₂₀	F: AACAACCTCCATGACTGC R: AACCGCCTGAATAAATAC	53
LYC0243	(CA) ₁₄	F: GGGATGTTACTGATGCTC R: TCGGTGGACATTAAGAGT	53
LYC0249	(TG) ₁₂	F: AGTCCTGAGCGACCACAT R: GAAGCCCTCCTACCAAAA	55
LYC0403	(GA) ₁₅	F: GATGCTGGTGGTATTGGG R: TGGGCAATTACGGAGAAT	50
LYC0446	(GA) ₆	F: CCTGTTGTGTTCTGGCTTTG R: ACCGCGTATGTATCTCGACC	TD65 - 60*
LYC0448	(GT) ₆	F: CGATGGTCGCGATATAGTCA R: ACCTGTGAGTGGTCAAAGCA	TD65 - 60*
LYC0451	(GT) ₁₂	F: GACACTAGCTGCTGATGCCA R: GAGTCAGAAGGCTGGAATGC	60

注:采用 Touch-down 方法对退火温度进行设置。

Notes: The annealing temperature setting used Touch-down method.

PCR 反应程序:95 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,退火温度 30 s,72 ℃ 30 s,循环 30 次;72 ℃ 10 min;15 ℃ 保存。

PCR 产物经 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后,采用银染方法进行检测^[12]。等位基因大小用 10 bp DNA Ladder (Invitrogen, USA) 为参照标准对电泳条带进行判读。

统计分析 根据每个个体产生的条带位置确定其基因型,将电泳谱带中的每一条片段作为该座位的一个等位基因处理,每个座位扩增的等位基因按其迁移率的不同,从小到大依次定义:A、B、C…(其中 N 定义为无效基因)。用 Popgen 1.31 软件^[13] 计算各微卫星位点在 150 个子代个体中的等位基因数 (observed number of alleles, N_a)、有效等位基因数 (effective number of alleles, N_e) 和观测杂合度 (observed heterozygosity, H_o)。期望杂合度 (expected heterozygosity, H_e) 的计算根据亲本的基因型进行推算,比如亲本的基因型为 AB × BC,则按照分离定律子代的基因型比例应该为 AB: AC: BB: BC = 1: 1: 1: 1,期望杂合度应为 0.75,因子代中仅 BB 为纯合子。如果亲本的基因型为 AA × BB,则按照分离定律子代的基因型将全部为 AB,期望杂合度应为 1,而不是用 Popgen 等群体遗传分析软件算出的 0.5。

利用 SPSS 17.0 软件中的一般线性模型 (general linear model, GLM),对微卫星位点基因

型与大黄鱼主要生长性状(体长、体高和体质量)之间的相关性进行分析,经方差分析检验呈显著性差异的位点,使用 Duncan 法进行多重比较。本研究用于基因型效应分析的线性模型如下:

$$y_{ij} = \mu + g_i + \varepsilon_{ij}$$

式中, y_{ij} 为大黄鱼某性状第 i 个标记第 j 个个体表型值, μ 为群体平均值, g_i 为第 i 个标记的效应值, ε_{ij} 为随机误差。对位点上基因型类别少于 3 的,使用 SPSS 软件中的 compare means 过程进行不同位点表型值的比较,以确定位点不同基因型对应的表型数据是否存在差异,据此确定该位点是否与生长性状相关。

2 结果

2.1 性状的表型值分布

测量的体长、体高和体质量 3 个生长性状都显示出连续变异的特点,表明这些性状都是典型的数量性状,受多基因控制,除体高之外,体长、体质量的分布均符合正态分布,为进行下一步的分析,对体高数据进行了 Ln 转换,经转换后体高的分布符合正态分布(表 2)。

2.2 微卫星位点基因型及其分布情况

检测了 150 个 F_1 个体 23 个微卫星标记位点,其中有 1 个位点 PCR 产物电泳条带不够清晰,难以准确判读,因此舍弃了该位点,只对 22 个位点进行基因型判读统计。图 1 示 LYC0015、

LYC0077 和 *LYC0243* 3 个位点各 48 个体的电泳检测结果。22 个位点共检测到 60 个等位基因,大小为 105 ~ 285 bp;各位点的等位基因数 2 ~ 4 个,平均 2.73,平均有效等位基因数为 2.37。各位点的基因型分布、期望杂合度和观测杂合度值见表 3,检测的 22 个位点中有 10 个位点的基因型分布显著偏离了孟德尔定律 ($P < 0.05$),其中 7 个位点基因型分布严重偏离孟德尔分离定律 ($P < 0.01$),*KPC43*、*LYC0124*、*LYC0134*、*LYC0212* 和 *LYC0446* 5 个位点符合分离定律的概率甚至低至 1% 以下。22 个位点中,有 5 个位点观测杂合度低于预期杂合度,表现出纯合子过剩、杂合子不足现象,但偏差不大;有 10 个位点观测杂合度高于期望杂合度,表现出杂合子过剩、纯合子不足,其中 *LYC0446* 位点偏离最大,观测杂合度明显大于期望杂合度,其中一种纯合子 (AA) 完全缺失,

预示可能存在纯合致死现象。

2.3 标记-性状相关分析与多重比较

对每个微卫星位点的不同基因型进行分类,结合表型数据进行关联分析,结果在 22 个微卫星位点中,共找到 3 个与大黄鱼生长相关的位点。*LYC0077* 位点与体质量、体长和体高均呈显著相关 ($P < 0.05$),其中等位基因 A (165 bp) 与生长性状表型值有显著的正相关作用,可以作为选育快长基因的有效分子标记;*LYC0015* 和 *LYC0243* 与体高呈显著相关 ($P < 0.05$),对体长、体质量的影响不显著 ($P > 0.05$),前者的等位基因 C (110 bp) 和后者的等位基因 A (160 bp) 对生长有一定的正效应。对这 3 个有显著相关的位点进行不同基因型间的多重比较,结果发现,*LYC0015*、*LYC0077* 和 *LYC0243* 3 个位点,其优势基因型分别为 BC、AA 和 AB (表 4)。

表 2 体长、体高和体质量的表型数据及正态分布统计检验

Tab. 2 The phenotypic data of body length, body height and weight and normal distribution test

项目 item	最小值 minimum	最大值 maximum	平均值 mean \pm SD	K-S 值 Kolmogorov-Smirnov Z	P 值 P value
体长 body length (bl)	18.90	30.00	24.32 \pm 2.06	1.11	0.17
体高 body height (bh)	5.00	9.50	7.10 \pm 0.72	1.52	0.02
体质量 body weight (bw)	110.00	525.00	285.70 \pm 74.35	1.11	0.17
体高对数值 Ln _{bh}	1.61	2.25	1.96 \pm 0.10	1.28	0.08

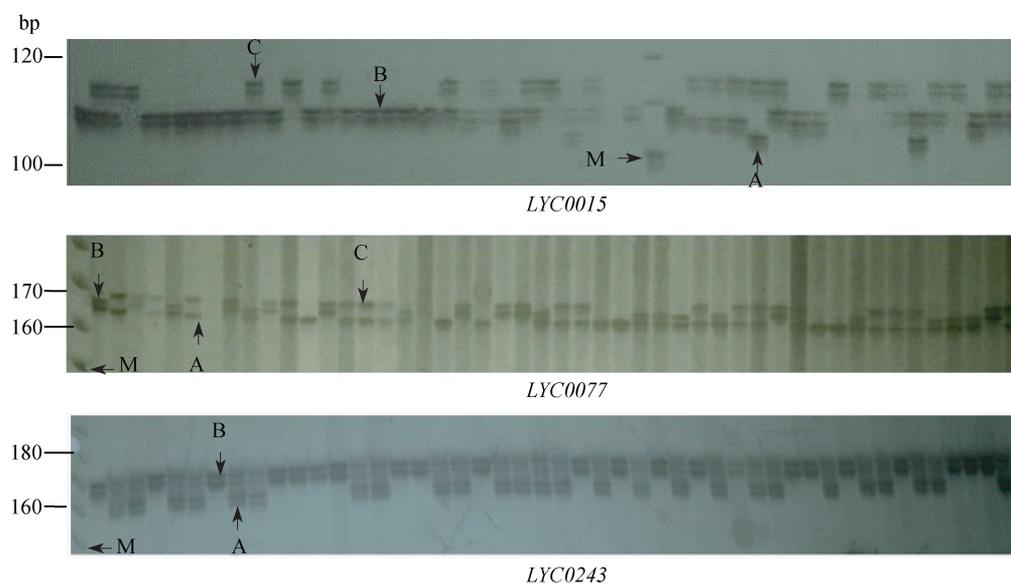


图 1 微卫星位点 *LYC0015*、*LYC0077* 及 *LYC0243* 在 48 个个体的扩增结果

M. DNA marker; A, B, C. 表示不同等位基因。

Fig. 1 The amplification results of *LYC0015*, *LYC0077* and *LYC0243* in 48 samples

M. DNA marker; A, B, C. different alleles.

表3 22个微卫星位点在大黄鱼F₁家系的统计信息
 Tab.3 Statistic information for 22 microsatellite loci in an F₁ family of large yellow croaker

位点 locus	亲本基因型 parents genotype	等位基因片段大小/bp fragment size	等位 基因 N _a	有效等位 基因数 N _e	观测杂 合度 H _o	期望杂 合度 H _e	F ₁ 的基因型分布 F ₁ genotype distribution	P 值 P value
HLJDH137	AC × AB	124 ~ 142	3	2.34	0.65	0.75	A: AB: AC: BC = 51:31:36:27	0.027 7
KPC43	AC × BB	136 ~ 160	3	2.57	1.00	1.00	AB: BC = 97:48	0.000 0
KPC86	BC × AB	175 ~ 220	3	2.52	0.75	0.75	AB: AC: BB: BC = 52:26:35:28	0.007 8
LYC0015	AC × BC	105 ~ 110	3	2.71	0.80	0.75	AB: AC: BC: CC = 30:43:30:26	0.164 0
LYC0077	AB × AC	165 ~ 169	3	2.80	0.85	0.75	AA: AB: AC: BC = 18:30:45:29	0.007 1
LYC0079	AB × AA	225 ~ 235	2	1.61	0.51	0.50	AA: AB = 74:76	0.870 3
LYC0080	AA × AB	180 ~ 190	2	1.70	0.58	0.50	AA: AB = 58:81	0.051 1
LYC0088	AB × AC	142 ~ 148	3	2.85	0.85	0.75	AA: AB: AC: BC = 20:42:42:36	0.026 1
LYC0095	BC × AD	157 ~ 177	4	3.99	1.00	1.00	AB: AC: BD: CD = 36:30:40:33	0.664 9
LYC0119	BC × AC	180 ~ 210	3	2.31	0.65	0.75	AB: AC: BC: CC = 24:35:34:50	0.021 9
LYC0124	AC × BB	111 ~ 145	3	2.55	1.00	1.00	AB: BC = 93:43	0.000 0
LYC0127	AA × AB	172 ~ 189	2	1.68	0.56	0.50	AA: AB = 56:72	0.157 3
LYC0134	AB × CC	122 ~ 165	3	2.51	1.00	1.00	AC: BC = 103:41	0.000 0
LYC0150	AN × BC	235 ~ 270	4	4.00	1.00	1.00	AB: AC: NB: NC = 38:27:30:35	0.522 9
LYC0212	BC × AB	268 ~ 285	3	2.23	0.65	0.75	AB: AC: BB: BC = 50:21:50:20	0.000 0
LYC0232	AC × BB	110 ~ 150	3	2.67	1.00	1.00	AB: BC = 72:71	0.933 4
LYC0243	AB × BB	160 ~ 170	2	1.63	0.53	0.50	AB: BB = 68:61	0.537 7
LYC0249	AA × AB	215 ~ 223	2	1.53	0.44	0.50	AA: AB = 60:48	0.248 2
LYC0403	AA × AB	178 ~ 205	2	1.54	0.45	0.50	AA: AB = 82:67	0.219 1
LYC0446	AB × AB	135 ~ 140	2	1.98	0.90	0.50	AA: AB: BB = 0:109:12	0.000 0
LYC0448	AB × AA	230 ~ 235	2	1.64	0.53	0.50	AA: AB = 63:71	0.489 5
LYC0451	AC × BC	250 ~ 258	3	2.67	0.77	0.75	AB: AC: BC: CC = 35:33:43:34	0.630 1
均值 mean			2.73	2.37	0.75	0.73		

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
 Tab.4 Means and multiple comparisons of major growth traits with different genotypes at 3 microsatellite loci

位点 locus	基因型 genotype	个体数 no.	体长/cm body length	体高/cm body height	体质量/g body weight
LYC0015					
A = 105 bp	BC	30	24.41 ± 0.40	2.00 ± 0.02 ^c	303.17 ± 16.20
B = 108 bp	CC	26	24.09 ± 0.48	1.98 ± 0.03 ^{bc}	290.58 ± 17.46
C = 110 bp	AC	43	24.58 ± 0.33	1.94 ± 0.01 ^{ab}	283.84 ± 10.55
	AB	30	23.68 ± 0.22	1.92 ± 0.01 ^a	261.83 ± 8.34
LYC0077					
A = 165 bp	AA	18	25.99 ± 0.48 ^b	2.02 ± 0.02 ^b	336.67 ± 18.90 ^b
B = 167 bp	AB	30	24.65 ± 0.40 ^a	1.97 ± 0.02 ^{ab}	293.50 ± 14.70 ^a
C = 169 bp	AC	45	23.80 ± 0.29 ^a	1.95 ± 0.01 ^a	273.44 ± 9.73 ^a
	BC	29	23.73 ± 0.33 ^a	1.92 ± 0.02 ^a	263.28 ± 13.44 ^a
LYC0243					
A = 160 bp	AB	68	24.47 ± 0.25	1.98 ± 0.01 ^a	292.28 ± 8.65
B = 170 bp	BB	61	23.99 ± 0.27	1.93 ± 0.01 ^b	269.43 ± 9.57

注:数值右肩不同字母表示在一位点中不同基因型之间差异显著($P < 0.05$),无字母标示的表示基因型间差异不显著。体高是 Ln 转换后的数据。

Notes: The right shoulder of mean value with the different letter are significantly different among different genotypes at the microsatellite locus ($P < 0.05$), and no letter shows that no significant difference. The mean value of body height used the Ln converted data.

2.4 最优基因型组合筛选

因为体质量是最终收获的主要经济性状,因此,本研究以体质量作为参照指标对这 3 个位点不同基因型组合进行比较。*LYC0015*、*LYC0077* 和 *LYC0243* 3 个位点的基因型分别有 4、4 和 2 种基因型,可形成 32 种组合,在检测的 150 个体中

实际出现了 31 种基因型组合,CC/AB/BB 基因型组合的个体没有出现。对 31 种不同基因型组合的体质量表型值进行比较,获得的最优基因型组合为 BC/AA/AB,与 3 个位点单独分析对应的最优基因型完全一致,符合加性作用模型(表 5)。

表 5 大黄鱼 F_1 家系的不同基因型组合对应体质量排序
Tab.5 Sorting according to body weight value with different genotype combinations in an F_1 family of large yellow croaker

基因型组合 genotype combination	体质量/g body weight	排序 sorting	基因型组合 genotype combination	体质量/g body weight	排序 sorting
BC/AA/AB	520.00 ± 0.00	1	AC/AC/AB	273.50 ± 26.93	17
AC/AA/AB	475.00 ± 30.25	2	CC/BC/AB	271.67 ± 36.32	18
BC/AA/BB	365.00 ± 0.00	3	BC/AC/BB	266.67 ± 26.19	19
AC/AA/BB	321.67 ± 36.09	4	BC/AC/AB	265.00 ± 43.59	20
AB/AB/AB	317.50 ± 57.50	5	CC/BC/BB	262.50 ± 88.57	21
CC/AB/AB	315.00 ± 37.53	6	AB/AC/BB	260.00 ± 21.79	22
AC/AB/AB	313.33 ± 49.10	7	BC/BC/BB	256.67 ± 34.44	23
BC/AB/AB	311.67 ± 59.33	8	AC/BC/BB	251.67 ± 34.44	24
AC/AC/BB	311.00 ± 30.39	9	AC/AB/BB	248.75 ± 21.93	25
BC/BC/AB	306.67 ± 19.22	10	AB/BC/AB	247.50 ± 7.50	26
AB/AA/AB	305.00 ± 0.00	11	AC/BC/AB	242.50 ± 16.89	27
CC/AA/BB	303.33 ± 43.43	12	CC/AC/BB	235.00 ± 52.68	28
CC/AA/AB	300.00 ± 0.00	13	AB/AA/BB	235.00 ± 0.00	29
CC/AC/AB	292.00 ± 19.79	14	BC/AB/BB	231.67 ± 54.87	30
AB/AB/BB	275.00 ± 42.53	15	AB/BC/BB	225.00 ± 30.00	31
AB/AC/AB	274.00 ± 23.10	16			

3 讨论

与王洪哲等^[14]报道不同,本实验在计算期望杂合度的时候,不是使用群体遗传分析软件常用的 Nei 氏公式^[15],而是根据亲本的基因型来推断子代的基因型,然后根据子代的基因型理论分布情况来推断期望杂合度。这两种算法结果有时候一致,有时候不一致。例如,当亲本基因型为 AB × CD、AC × BD 和 AD × BC,使用群体遗传分析软件根据 Nei 氏公式推断出的子代的期望杂合度为 0.75 [$H_e = 1 - \sum_{i=1}^m (p_i)^2 = 1 - 0.25^2 - 0.25^2 - 0.25^2 - 0.25^2 = 0.75$],而根据孟德尔分离定律,其子代个体的基因型应该全部为杂合体,期望杂合度为 1,两种方法计算的结果不一致;亲本为两种不同的纯合体(如 AA × BB、AA × CC)时,子代也全部为杂合体,期望杂合度为 1,而利用 Nei 氏

公式算出的期望杂合度则为 0.5。显然,使用群体遗传分析软件根据常用的 Nei 氏公式计算家系群体的期望杂合度,其值将明显偏低,这应该是以往一些报道中家系的观测杂合度显著高于期望杂合度的主要原因。因此,对于家系群体,应该根据亲本的基因型来推断期望杂合度。Nei^[16]提出的计算杂合度的公式只是针对随机交配群体而言,并不适用于非随机交配群体。本研究中,各微卫星位点的期望杂合度多数与观测杂合度基本一致,但位点 *LYC0446* 的观测杂合度要远远高于期望杂合度,表现出 F_1 个体的分离方式显著偏离孟德尔分离规律($P < 0.01$)。仔细分析该位点在 F_1 群体中的基因型分布,发现纯合子 AA 完全缺失, BB 个体也很少,仅占全部观测个体的 9.9% (理论上应该有 25%,若考虑 AA 频率为 0,则 BB 应占观测个体的 1/3)。这提示该位点附近可能存在着与之紧密连锁的隐性致死基因^[17],其中与 A

连锁的基因完全致死,与B连锁的基因也严重致死(致死率 $>70\%$),因为随机取样出现这样偏差的概率极低($<10^{-7}$),基本上可以忽略不计。其它几个严重偏离分离定律的位点($P<0.00005$),是由于部分基因型出现频率显著偏低所致,这些位点附近也可能存在着不利于大黄鱼存活的基因,值得进一步深入研究。

利用微卫星标记分析与生长性状的相关性,找到与生长性状相关或者紧密连锁的微卫星位点,对于指导育种实践具有重要意义。标记—性状的相关性分析是根据标记位点的基因型以及数量性状的表型对个体进行显著性检验,差异显著则说明标记与数量性状存在关联。因此,如果一个群体的性状差异显著,或两个群体的差异很大,就可以通过标记与性状的相关分析,找出性状与一个或多个标记的遗传相关,一旦发现显著相关,即可认为存在一个数量性状位点,从而实现从表型到基因型选择育种的转变^[18-23]。薛良义等^[11]研究了大黄鱼肌肉生长抑制素基因3'端非编码区微卫星序列多态性与体长、体质量的关系,发现微卫星序列长度与大黄鱼体长、体质量之间的相关系数没有达到显著水平($P>0.05$)。高国强等^[24]进行了大黄鱼耐低温标记的筛选,找到一个LYC0002标记可能与耐低温有关。

从重要经济性状分子标记的寻找到其在育种中的应用,当中要经历一个相对复杂的过程,现在已有不少将分子标记应用到育种实践的成功案例。东京海洋大学鱼类遗传病理研究室在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)上分别找到两个与传染性胰腺坏死病(infectious pancreatic necrosis, IPN)抗性以及两个与传染性造血器官坏死病(infectious hematopoietic necrosis, IHN)抗性有关的QTL,用与抗病性连锁较紧密的标记进行辅助选择试验,带有IPN抗病标记的虹鳟仔鱼在IPNV攻毒试验中其存活率(41.3%)是无标记组(1.3%)的31.8倍,带有IHN抗病标记的仔鱼在IHNV攻毒试验中死亡率(6.0%)仅为无抗病标记组(70.0%)的1/12,这充分显示了借助基因组信息育种(即分子标记辅助育种)是提高育种效率的一个极为有效的手段^[25-27]。孙效文等^[19]利用镜鲤与体质量相关的3个基因座(HLJ302, HLJ338, HLJ343)作为快速生长的标记,将其应用于镜鲤的育种生产实践,收到了良好的效果。在本研究中,实验共找

到了3个与生长性状相关的位点,尤其是位点LYC0077,与体长、体高、体质量均存在显著的相关关系,其基因型AA为优势基因型,A为优势等位基因,可用于进行生长性状的辅助选育;在后续的研究工作中,应该重点研究该位点,设法找到引起生长差异的基因及其分子标记,以进一步提高选择的准确性。此外,本研究获得的结果仅仅是针对所研究的家系而言,在其它群体中这种相关关系是否存在以及效应值如何,还有待在后续的研究中进一步验证。

参考文献:

- [1] 苏永全,张彩兰,王军,等. 大黄鱼养殖[M]. 北京:海洋出版社,2004:1-10.
- [2] 农业部渔业局. 2011中国渔业统计年鉴[M]. 北京:中国农业出版社,2011.
- [3] 吴清明,蔡明夷,刘贤德,等. 大黄鱼同质雌核发育的诱导及其微卫星标记鉴定[J]. 水产学报,2009,33(5):734-741.
- [4] 叶小军,王志勇,刘贤德,等. 大黄鱼连续两代雌核发育群体的微卫星标记分析[J]. 水生生物学报,2010,34(1):144-151.
- [5] 赵广泰,刘贤德,王志勇,等. 大黄鱼连续4代选育群体遗传多样性与遗传结构的微卫星分析[J]. 水产学报,2010,34(4):500-508.
- [6] 蔡明夷,刘贤德,武祥伟,等. 大黄鱼与黄姑鱼异源三倍体的诱导和微卫星分析[J]. 水产学报,2010,34(11):1629-1635.
- [7] Wu X W, Liu X D, Cai M Y, et al. Genetic analysis of farmed and wild stocks of large yellow croaker *Larimichthys crocea* by using microsatellite markers [J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10(30):5773-5784.
- [8] Ning Y, Liu X D, Wang Z Y, et al. A genetic map of the large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) [J]. Aquaculture, 2007, 264(1-4):16-26.
- [9] Li Y Y, Cai M Y, Wang Z Y, et al. Microsatellite-centromere mapping in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) using gynogenetic diploid families [J]. Marine Biotechnology, 2008, 10(1):83-90.
- [10] Liu X D, Sui B L, Wang Z Y, et al. Estimated reproductive success of brooders and heritability of growth traits for large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) using microsatellites [J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2011, 29(5):990-995.
- [11] 薛良义,孙升,肖章奎,等. 大黄鱼肌肉生长抑制素

- 基因微卫星序列多态性分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2008,24(10):980-985.
- [12] Wang Z Y, Tsoi K H, Chu K H. Applications of AFLP technology in genetic and phylogenetic analysis of penaeid shrimp [J]. *Biochemical systematics and Ecology*,2004,32(4):399-407.
- [13] Yeh F, Yang R C, Boyle T. POPGENE: A User friendly shareware for population genetic analysis [M]. Edmonton: Molecular and Biotechnology Center, University of Alberta,1997.
- [14] 王洪哲,张研,殷倩茜,等. 两个镜鲤半同胞家系的遗传多样性及经济性状分析[J]. 水生生物学报,2009,33(3):522-531.
- [15] Nei M. *Molecular evolutionary genetics* [M]. New York: Columbia University Press,1987:180.
- [16] 王家玉(译). 分子群体遗传学与进化论[M]. 北京:农业出版社,1983:122-125.
- [17] Yu Z N, Guo X M. Genetic linkage map of the eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin [J]. *Biology Bulletin*,2003,204(3):327-338.
- [18] 王高富,吴登俊. 凉山半细毛羊微卫星标记与羊毛性状的相关分析[J]. 遗传,2006,28(12):1505-1512.
- [19] 孙效文,鲁翠云,曹顶臣,等. 镜鲤体重相关分子标记与优良子代的筛选和培育[J]. 水产学报,2009,33(2):77-81.
- [20] 樊佳佳,白俊杰,李小慧,等. 大口黑鲈生长性状的微卫星 DNA 标记筛选[J]. 遗传,2009,31(5):515-522.
- [21] 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.
- [22] 付春鹏,傅洪拓,蒋速飞,等. 水产动物重要经济性状相关联的微卫星标记研究进展[J]. 中国农学通报,2010,26(4):314-317.
- [23] 储志远,张晓峰,曹柱,等. 鲤回交群体 4 种生长性状的相关性分析[J]. 水产学报,2011,35(1):10-18.
- [24] 高国强,常玉梅,韩启霞,等. 大黄鱼耐低温性状相关微卫星标记的筛选[J]. 遗传,2010,32(3):248-253.
- [25] Ozaki A, Sakamoto T, Khoo S, *et al.* Quantitative trait loci (QTL) associated with resistance/susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Molecular Genetics and Genomics*,2001,265(1):23-31.
- [26] Khoo S K, Ozaki A, Nakamura F, *et al.* Identification of a novel chromosomal region associated with infectious hematopoietic necrosis (IHN) resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Fish Pathology*,2004,39(2):95-101.
- [27] 孙效文. 鱼类分子育种学[M]. 北京:海洋出版社,2010:188-199.

The segregation patterns of 22 microsatellite markers in an F_1 family of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) and correlation analysis with growth-related traits

LIU Xian-de^{1,2}, WEI Xin-jian¹, CAI Ming-yi¹, LIU Yang¹, WANG Zhi-yong^{1*}

(1. Key Laboratory of Mariculture in the East China Sea, Ministry of Agriculture of China, Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Fishery School, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316004, China)

Abstract: The large yellow croaker *Larimichthys crocea* is one of the most important fish species in Chinese mariculture, and the research about correlation analysis between growth-related traits and microsatellite markers is very rare. In this study, the genotype distribution of twenty-two microsatellite markers was investigated in an F_1 family of large yellow croaker *Larimichthys crocea* of 20-month old, and the correlation between growth-related traits and microsatellite markers was also analyzed using statistical method. The results are as follows: A total of 60 alleles were detected, and the average number of alleles and effective number of alleles were 2.73 and 2.37, respectively. The average observed heterozygosity (H_o) and expected heterozygosity (H_e) were 0.75 and 0.73, respectively. The genotype distribution of partly loci deviated severely from Mendel's Laws, which suggested these loci might link with the adaptive gene, and LYC0446 may link with recessive homozygous lethal genes. We discovered that LYC0077 had significant impact on body weight, body length and body height ($P < 0.05$), and the allele A (165 bp) had highest phenotype value and can be used as a molecular marker in selection breeding; LYC0015 and LYC0243 had significant impact on body height ($P < 0.05$), and no significant effect on body length and body weight, and the allele C (110 bp) for LYC0015 and the allele A (160bp) for LYC0243 have positive effect on growth-related traits. Three genotypes of these loci with favorable effect on growth-related traits were also determined, BC for LYC0015, AA for LYC0077 and AB for LYC0243 respectively. The best genotype combinations (BC/AA/AB) for LYC0015, LYC0077 and LYC0243 were also selected according to body weight, which conformed to the Additive Effects Model. The results presented here provide a starting point for the eventual mapping of economically important genes and marker-assistant selection (MAS) in large yellow croaker.

Key words: *Larimichthys crocea*; microsatellite markers; growth-related traits; correlation analysis

Corresponding author: WANG Zhi-yong. E-mail: zywang@jmu.edu.cn