

基于标记系谱的红鳍东方鲀生长性状遗传分析

刘永新^{1*}, 周勤², 张红涛², 刘奕³

(1. 中国水产科学研究院, 北京 100141;

2. 中国水产科学研究院北戴河中心实验站, 河北 秦皇岛 066100;

3. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380)

摘要: 利用分子标记辅助家系选育进行红鳍东方鲀生长性状的遗传评估, 由红鳍东方鲀基础群体中选择性腺发育良好的雌雄亲本各11尾建立全同胞家系11个, 每个全同胞家系随机采集10尾个体组建全同胞家系群体, 从混合培育的家系中选择相对较大的个体400尾组建混合选育群体。在红鳍东方鲀遗传连锁图谱上挑选44个均匀分布于22个连锁群上的微卫星DNA标记, 每个连锁群有2个标记。全同胞家系群体的遗传分析结果显示, 10个高亲本排除概率微卫星标记的Excl (1)和Excl (2)为0.58~0.662和0.736~0.797, 14个低亲本排除概率标记的Excl (1)和Excl (2)为0.054~0.43和0.177~0.608, 剩余20个中等亲本排除概率标记的Excl (1)和Excl (2)为0.467~0.575和0.641~0.732。利用拥有高亲本排除概率的微卫星DNA标记进行混合选育群体的亲权鉴定, 结果显示: 不同父母本繁殖产生的子代数量存在明显差异, 父本M2和母本F4产生了124个子代, 占子代个体总数的32.89%。根据亲权鉴定结果建立的系谱估计主要生长性状的遗传参数, 不同日龄的体质量和体长遗传力估计值为0.17~0.21和0.15~0.18。研究表明, 利用具有高亲本排除概率的微卫星DNA标记能够有效建立红鳍东方鲀系谱, 进行生长性状的遗传参数估计, 分子标记辅助家系选育可以作为红鳍东方鲀目标性状遗传改良的新方法。

关键词: 红鳍东方鲀; 微卫星; 生长性状; 排除概率; 系谱

中图分类号: S 917.3

文献标志码: A

优质、高产、抗病、抗逆等性状一直是水产遗传育种学家进行遗传改良的主要目标性状。为了能够快速培育出具有这些优良经济性状的水产动物新品种, 选择育种^[1-3]、杂交育种^[4-6]、细胞工程育种^[7-9]、分子育种^[10-12]等众多技术都已经在不同种类的水产动物中进行了广泛的应用, 并取得了卓有成效的研究成果。尤其是在“十二五”以来, 以家系选育为代表的育种技术成为培育主要养殖鱼类^[13-14]、虾类^[15-16]、贝类^[17-18]和蟹类^[19-20]新品种的主推技术。伴随着这一技术的有效推广, 一大批具有优良经济性状的新品种应运而生, 这在极大程度上缓解了水产动物养殖业良种匮乏、病害频发、经济效益低等突出

问题。家系选育需要以具有丰富遗传多样性的育种核心群体为基础, 选择群体内亲缘关系相对较远的雌雄亲本进行配组。为了能够从后代挑选出具有优良性状的家系及个体, 常规的家系选育方法往往都是大规模建立全同胞或半同胞家系。家系培育阶段于单独的水槽中进行饲养, 在个体发育达到可以承受电子标记之后再合池饲养。随着建立家系数目的显著增加对所需配备的基础设施提出了很高的要求, 有时还造成了养殖水体、人工和资源的大量消耗。为了能够降低家系选育对于养殖空间的需求压力, 育种学家已经尝试从现代分子生物学技术中选择合适的分子标记技术进行个体的亲缘关

收稿日期: 2016-02-15 修回日期: 2016-09-29

资助项目: 国家科技支撑计划(2012BAD26B01)

通信作者: 刘永新, E-mail: liuyx@cafs.ac.cn

系鉴定, 进而达到区分混合选育群体中不同家系的目的。在众多的分子标记当中, 微卫星DNA标记以其高多态性、共显性遗传、遵循孟德尔遗传法则、数量丰富等特点成为进行亲缘关系鉴定的首选标记^[21-24], 并且, 成功应用于多个水产动物品种进行性状遗传改良的家系选育过程中^[25-30]。纵观已有报道的共同点, 研究所用微卫星DNA标记皆为随机选择, 通过标记多态性高低、标记拥有的亲本排除概率或累计排除概率来判断此标记是否作为选用标记。但是鲜有文献报道从覆盖全部连锁群的标记中挑选出具有高亲本排除概率的微卫星DNA标记进行不同家系的鉴别, 从而提高分子标记辅助家系选育研究的准确性与实效性。

红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)是暖水性海洋底栖鱼类, 在分类学上隶属于硬骨鱼纲(Osteichthyes)、鲀形目(Tetraodontiformes)、鲀亚目(Tetraodontoidei)、鲀总科(Tetraodontoidea)、鲀科(Tetraodontidae)、东方鲀属(*Takifugu*), 俗有规仔、气规、虎河鲀等称谓, 主要分布海域有我国东、黄海及韩国、日本、朝鲜等沿海^[31]。红鳍东方鲀肉质细致、味道鲜美、营养价值高、富含各种维生素, 具有非常高的经济价值。国外对于红鳍东方鲀主要侧重于遗传学基础研究, 例如全基因组测序^[32]、遗传连锁图谱构建^[33-34]与功能基因资源挖掘^[35]。国内与红鳍东方鲀育种相关工作有群体遗传结构分析^[36]、杂交育种^[37]、选育家系构建及生长性状的遗传评估^[38-39]等。迄今为止, 尚未见将家系选育与DNA分子标记技术联合应用进行红鳍东方鲀经济性性状遗传改良的报道。有鉴于此, 本实验从覆盖红鳍东方鲀全部连锁群的微卫星DNA标记中筛选出拥有高亲本排除概率的微卫星标记, 利用这些标记鉴定混合选育群体中个体的亲缘关系, 建立相应的分子系谱结构, 进而估计混合选育群体不同发育阶段主要生长性状的遗传参数。通过此研究不仅能够筛选出准确鉴定红鳍东方鲀亲缘关系的有效标记, 同时, 也提出了进行该物种经济性性状遗传改良的新方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用亲鱼来自中国水产科学研究院北戴河中心实验站红鳍东方鲀育种基础群体, 该

群体由两部分群体组成, 一是从我国沿海收集的自然群体中的个体, 二是从日本引进的受精卵培育至性成熟的个体。选择体表无外伤、性腺发育良好、外观性状优良的个体作为选育亲本。按照雄鱼(编号FM1-FM11)和雌鱼(标号FF1-FF11) 1:1的比例进行配组, 共计建立11个全同胞选育家系, 每个家系单独饲养于圆形的玻璃钢水槽中。此外, 选择3尾雄鱼(编号M1-M3)和4尾雌鱼(编号F1-F4)于圆形的产卵池中自然交配进行繁殖, 通过流水的方式收集受精卵, 受精卵在圆形的水泥池中进行孵化与培育饲养。所有的仔鱼饲养过程完全按照常规流程进行, 轮虫作为仔鱼的开口生物饵料, 5~7 d后生物饵料逐步转化为卤虫, 15~20 d后生物饵料逐渐由人工配合饲料所代替。所有培育的环境条件均采用人工流水进行培育, 养殖水温随自然条件变化而改变。在100日龄时, 每个全同胞家系随机采集10尾个体建立全同胞家系群体; 在150日龄时, 圆形水泥池培育的群体中选择体质量相对较大的个体400尾建立混合选育群体。

1.2 微卫星标记的选择

44个微卫星标记选自红鳍东方鲀遗传连锁图谱^[34], 每个连锁群2个标记。从GenBank检索标记的微卫星序列或者引物序列, 由上海生工生物工程技术服务有限公司完成引物合成。44个微卫星标记的名称、引物序列和所在连锁群见表1。基因组DNA的提取利用TIANGEN海洋动物基因组DNA提取试剂盒, 提取出的DNA质量采用琼脂糖凝胶电泳检测, DNA浓度利用核酸蛋白测定仪测定($A_{260/280}$ 的标准范围为1.8~2.0); 将达到检测标准的DNA稀释至50 ng/ μ L, 保存于-20 °C冰箱中待用。

1.3 PCR扩增与产物检测

PCR反应体系为25 μ L, 包括: 10 \times Buffer 2.5 μ L、Mg²⁺(25 mmol/L)1 μ L、dNTPs(各2 mmol/L) 1 μ L、上下游引物(10 μ mol/L)各1 μ L、模板DNA 1 μ L(50 ng/ μ L)、Taq DNA聚合酶1 U, 加适量ddH₂O。反应程序为94 °C预变性3 min, 30个循环(94 °C变性30 s, 退火30 s, 72 °C延伸30 s), 最后72 °C延伸10 min, 整个扩增过程在AB9700型PCR仪上完成。PCR扩增产物利用8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 0.25%的溴酚蓝和40%的蔗糖水溶液作为上样缓冲液。电泳后用1%硝

表 1 44个微卫星标记的名称、引物序列、连锁群、退火温度和扩增片段大小

Tab. 1 Locus, primer sequences, linkage group, annealing temperature and allele size of 44 microsatellite loci

标记 locus	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	连锁群 linkage group	退火温度/°C annealing temperature	扩增片段 大小/bp allele size	标记 locus	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	连锁群 linkage group	退火温度/°C annealing temperature	扩增片段 大小/bp allele size
F1176	F: TCGCCGAAGACTTTAGAGA R: CGTCAGTCGGTGTGATGTT F: CAAAGACGTTACCCACAGA	1	57	140~190	F1367	F: CTCCTCCCACTGTCTGCATT R: AGTCAGACGGCTTTGGACAC F: AAATGGTGGCAGCTGATAC	12	60	135~161
F1407	R: ACCGCTCTGCTTTGACAG F: GGGAGTCTCACTGAGATGG	1	55	189~231	F1061	R: GGAGACCACGAAGTTCCTCA F: CTTTGGATTGTGGGAGGAAA	12	61	207~229
F810	R: TAATGGAGCCACAGGTACACA F: GTCCTGACTCTCAGCCCAAC	2	60	178~224	F809	R: AGGTGGGAACGAATGTTTTG F: TTTGTCACCCGGGAAGAGAT	13	56	215~253
F791	R: ATTGGACGTCTCCTACTCTGG F: GGGGATTGGTTCCTGAAGTT	2	61	187~227	F98	R: TTTTAGTGCCAAGAATGTGTC F: TCAATGCCCTCTGAGATCAA	13	56	206~254
F1064	R: TGGCCATTAAGAAGGTGACA F: GAAGACATGATGGGCAGT	3	62	220~244	F503	R: TCATCTTGACTGCACTGTGG F: CACATCCCACACAAGGAGTG	14	55	212~242
F1055	R: ACCCAGTGTGTAGGACAGT F: ATGACCAGGTGTTTTTACA	3	62	216~250	F573	R: AGGTCACCCATCACAACCT F: TAGAGAGCGGATTCGACTGG	14	55	125~179
F1732	R: TGGCCTCAATTCAGACATCA F: CAGCGCACCATCTCTCTAT	4	58	234~280	F935	R: CCAGTGTGGATCACCTTCCT F: CCGTAAGTTTGCCTGGATA	15	61	153~199
F1012	R: AGACACGCTCTCCTACTCTCT F: GGATGTGGAACAATCTGCTT	4	57	136~158	F637	R: GCTATGGGGAGGATGGAAT F: GGTCGTGCACATAGAGCTGA	15	60	142~192
F1752	R: GCTGAAGTTCATGTTGGAAG F: GTCTCTGAGCCTGTGTTG	5	55	194~244	F1235	R: CTATGCGGTGGTCTCTAGC F: CATGAGCTGGGGATTAAGA	16	62	177~215
F333	R: CTCCACACATGAAGACAGC F: GTGACGAGGGCAACAG	5	55	103~175	F1680	R: CACCTGCAGCACTCACTGAT F: TGAGCACCAGCAATTGAG	16	62	168~174
F112	R: GTGACACCAGACTATACAAAGATG F: ATGAGAGGGAAGTCCACAT	6	61	267~309	F1066	R: CCTCGTCTGTCGCACTAAA F: AATGGCAGTCCATCCAAAC	17	56	194~258
F1487	R: TCAGCTGAGGACATGAGACT F: GCGATGGATGCACAATGATA	6	60	194~216	F1326	R: GITCACCTATGGCAGCACAA F: CCATGGGAAAGTGAACC	17	56	315~373
F1062	R: TGGAGAACAATCCAGCTC F: GGGAGGCGAGCAGTATAAT	7	62	129~181	F1356	R: GAAAGGAGTGCCAGACTGA F: AGCCGTTCCAGCTGTTACTC	18	58	212~250
F1408	R: CATGACCAGCCATCTATCA F: CCAGGAATGTCTCTCTCCA	7	63	176~234	F1385	R: TGTGACGAGGATTCCTCT F: GAGTGCCGTGTCCAGTATCA	18	57	292~334
F1102	R: CGTCATCCACAGACCACAC F: CCGGTGGGAAATAAGAGTT	8	58	217~251	F1129	R: CATACTGGCTGTGTGTC F: ATGGGACACGGATTGATGAT	19	60	286~306
F1316	R: CAGGTACAAAGAGCTGGCAGA F: GGAACATGCTCTGTTGGT	8	57	212~252	F667	R: GACAACAGGCTTTTCAGCACA F: CCCGTATGTACAACCAATG	19	60	153~197
F1202	R: CCCTCCCTCTCTCTCTC F: CTGAAAGGAAAAGCAGCAA	9	60	180~212	F665	R: GAAAAAGTGCCAAAGTTTA F: AGCTGCCGTTGGAGACGAA	20	61	222~270
F1077	R: CACGTACAGAGCTGCGATTA F: TGGCGACAATCATCTCAAAT	9	60	171~235	F1043	R: AACGCCCAAACAACCCATCAGT F: GCTGCTAACAGGCTGTAT	20	62	203~243
F171	R: AAGCCATCTACAATCAGGTCAA F: GCTAAAACGGACAGCCAGAG	10	55	205~231	F139	R: CAAAAGGTTATGCGACATCAGA F: TGAATGTCAACACTGTGGTC	21	60	198~212
F1422	R: TTGAGCTCATCTCCCACTC F: CCAGCGTTTGTGAATCATGT	10	55	167~235	F1621	R: GGATTGGATCCACAAAACCTG F: CTCCAGGTTAACAGCGGAAC	21	60	178~206
F663	R: TGGGGGAGTATCTGAACCAG F: CCAAGACGTGAGGAGCTTGT	11	58	148~164	F840	R: CTCCGTGACAGTCCAGCACAC F: GGACTTCAGTCTGGTCTCTG	22	63	244~260
F1641	R: GAAAACAGAAGGGTCTGTGGA	11	57	228~282	F1360	R: GGTGCGACTGCTTCCATCTA	22	60	168~252

酸银染色10 min, 显色液显色10 min。凝胶在HP scanjet G4010扫描仪成像, Gel-Pro Analyzer 4.5凝胶分析软件对电泳谱带进行数据采集和分析。

1.4 性状记录

在150日龄采集混合选育群体鳍条样品时进行该群体的第一次性状测量, 同时, 于该时间点完成个体的电子标记。第二次性状测量时间点为240日龄。测定的生长性状包括体质量和体长。其中, 体质量测定标准为鱼体的全重, 测量仪器为电子天平, 测量单位为g, 测量精度为0.01; 体长测定标准为吻端至尾鳍基部的直线长度, 测量仪器为电子数显游标卡尺, 测量单位为cm, 测量精度为0.01。

1.5 统计分析

每个微卫星标记的亲本排除概率(probabilities of exclusion, PE)^[40]利用CERVUS (Version 3.0)软件来计算, 两个常用的亲本排除概率计算指标为Excl (1)和Excl (2), Excl (1)的统计条件为只有子代信息已知, Excl (2)的统计条件为只有一个亲本信息已知。每个微卫星标记在全同胞家系群体的遗传参数利用PopGene (Version 3.2)^[41]软件来计算, 遗传参数的统计指标包括: 等位基因数(number of alleles, N_a)、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(polymorphism information content, PIC)。混合选育群体生长性状

遗传参数的计算采用如下动物模型： $y_{ij}=u+a_i+f_i+e_{ij}$ ，式中， y_{ij} 为第*i*个个体生长性状， u 为总体均值， a_i 为第*i*个体加性遗传效应， f_i 为第*i*个全同胞家系效应， e_{ij} 为残差效应。遗传模型分析过程利用DMU软件(Version 6)执行AI-REML (average Information restricted maximum likelihood)来完成。混合选育群体生长性状的表型参数使用SAS 8.2软件来进行统计。

2 结果与分析

2.1 微卫星标记的亲本排除概率

44个微卫星标记等位基因数、观测杂合度与期望杂合度的变化范围为4~19、0.288~0.973与

0.324~0.904(表2)。有21个微卫星标记为高度多态标记，其PIC为0.659~0.891，仅有1个微卫星标记为低度多态标记，其PIC为0.306。F1360的Excl(1)(0.662)和Excl(2)(0.797)为最高，依次至F98的Excl(1)(0.58)和Excl(2)(0.736)，共计10个微卫星标记拥有高亲本排除概率。此外，有14个标记表现出低亲本排除概率，其Excl(1)和Excl(2)范围分别为0.054~0.43和0.177~0.608；剩余的20个标记表现出中等亲本排除概率，其Excl(1)和Excl(2)范围分别为0.467~0.575和0.641~0.732。

2.2 混合选育群体生长性状的遗传评估

选择10个具有高亲本排除概率的微卫星DNA标记进行混合选育群体的亲缘关系鉴定，根据

表 2 44个微卫星标记在11个全同胞家系的遗传学统计指标

Tab. 2 Genetic statistical data of forty-four microsatellite loci observed in eleven full-sib families

标记 locus	N_a	H_o	H_e	PIC	Excl(1)	Excl(2)	标记 locus	N_a	H_o	H_e	PIC	Excl(1)	Excl(2)
F1176	12	0.829	0.852	0.833	0.542	0.706	F1367	10	0.892	0.867	0.848	0.565	0.725
F1407	13	0.910	0.898	0.885	0.647	0.787	F1061	7	0.784	0.726	0.685	0.324	0.504
F810	11	0.802	0.792	0.764	0.428	0.607	F98	14	0.892	0.869	0.852	0.580	0.736
F791	8	0.748	0.690	0.659	0.298	0.485	F809	12	0.892	0.864	0.845	0.563	0.723
F1064	4	0.288	0.324	0.306	0.054	0.177	F503	10	0.919	0.844	0.823	0.523	0.690
F1055	6	0.775	0.724	0.674	0.307	0.481	F573	14	0.847	0.862	0.843	0.560	0.720
F1732	10	0.784	0.742	0.711	0.359	0.543	F935	13	0.820	0.859	0.841	0.556	0.717
F1012	9	0.892	0.855	0.834	0.537	0.702	F637	13	0.892	0.863	0.845	0.563	0.722
F1752	15	0.901	0.888	0.873	0.620	0.767	F1235	10	0.955	0.854	0.832	0.534	0.699
F333	19	0.892	0.896	0.883	0.647	0.785	F1680	6	0.703	0.729	0.678	0.306	0.480
F1487	9	0.811	0.793	0.761	0.419	0.598	F1326	18	0.874	0.860	0.842	0.565	0.723
F112	13	0.874	0.875	0.859	0.595	0.747	F1066	13	0.973	0.883	0.867	0.611	0.759
F1062	11	0.802	0.868	0.849	0.566	0.725	F1356	10	0.919	0.851	0.829	0.531	0.696
F1408	11	0.775	0.817	0.790	0.467	0.641	F1385	15	0.883	0.869	0.851	0.575	0.732
F1102	15	0.802	0.837	0.827	0.535	0.699	F1129	8	0.784	0.772	0.735	0.384	0.563
F1316	10	0.838	0.846	0.825	0.527	0.693	F667	13	0.883	0.866	0.848	0.572	0.730
F1202	9	0.757	0.75	0.719	0.366	0.550	F1403	12	0.928	0.870	0.854	0.583	0.738
F1077	15	0.856	0.886	0.871	0.615	0.763	F665	13	0.847	0.879	0.862	0.598	0.749
F171	10	0.847	0.853	0.832	0.533	0.699	F139	8	0.874	0.805	0.773	0.430	0.608
F1422	12	0.874	0.848	0.829	0.535	0.700	F1621	8	0.820	0.774	0.740	0.391	0.571
F663	7	0.784	0.749	0.715	0.358	0.541	F840	8	0.811	0.754	0.715	0.358	0.536
F1641	10	0.910	0.851	0.830	0.533	0.698	F1360	16	0.928	0.904	0.891	0.662	0.797

标记鉴定结果建立混合选育群体的系谱, 基于此系谱估计该群体生长性状的遗传参数。群体中父本M2和母本F4产生的子代最多, 占子代个体总数的32.89%; 其次为父本M3和母本F4产生的子代, 占子代个体总数的12.20%; 父本M1和母本F1及父本M2和母本F3产生的子代数最少, 仅占子代个体总数的0.80%(表3)。不同日龄混合选育群体从150日龄到240日龄, 体质量与体长的平均值、标准差、变异系数和遗传力均随着日龄的升高而逐渐增大(表4)。在相同日龄, 体质量的标准差与变异系数均明显高于体长, 而两个性状的遗传力则相接近, 体质量的遗传力估计值略高于体长。

表 3 混合选育群体中亲本繁殖后代所占的比例

Tab. 3 Percentage of offspring related to each parent contributing to reproduction in mixed selection and breeding population

父本 male	母本 female	子代个体数 number of offspring	百分比/% percentage
M1	F1	3	0.80
M1	F2	33	8.75
M1	F3	40	10.61
M1	F4	40	10.61
M2	F1	6	1.59
M2	F2	35	9.28
M2	F3	3	0.80
M2	F4	124	32.89
M3	F1	11	2.92
M3	F2	6	1.59
M3	F3	30	7.96
M3	F4	46	12.20
合计 total		377	100

3 讨论

家系选育需要提供两个重要的育种指标, 即遗传参数和育种值。准确、可靠的遗传参数是制定育种规划的前提和基础, 而育种值则是家系和家系内个体选留的依据和标准^[42]。为了获得这两个指标的准确估计值, 往往要求选育群体具有清晰的系谱结构和精确的目标性状表型值记录。系谱中包含的亲本与个体数越多、世代数越长则越有利于进行育种指标的遗传评估。水产动物的遗传育种具有自身优势, 每一对父母本配组都可以产生大量的后代个体, 这是畜禽动物无法比拟的优越性所在。众多来自不同父母本繁殖的子代所组成的大规模家系为开展目标性状的遗传改良提供了丰富的育种材料。但是, 在传统的家系选育过程中, 每一个家系及其子代都需要在独立的养殖单元内进行培育, 这在造成养殖空间浪费的同时也增大了人工管理的强度。此外, 饲养于不同养殖单元内的鱼体受到外界环境的影响也并不完全相同, 难以保证不同家系表现出的目标性状差异完全是由遗传差异所导致。因此, 为了较大程度地减少养殖物质与人工资源的消耗, 降低外界环境条件对性状表型值的影响, 分子标记辅助家系选育的育种方法应运而生。这种方法在受精卵孵化、培育阶段开始便可利用几个养殖池来饲养多个家系, 借助分子标记技术来区分不同家系, 建立分子系谱开展目标性状的遗传评估。通过在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[27-28]、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)^[29]、大口黑鲈(*Microp terus salmoides*)^[43]、许氏平鲈(*Sebastes schlegelii*)^[44]、日本对虾(*Penaeus japonicus*)^[45]、三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)^[46]、马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)^[47]、虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)^[48]和三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)^[49]等多个水

表 4 混合选育群体生长性状的表型与遗传参数

Tab. 4 Phenotypic and genetic parameters of growth traits for mixed selection and breeding population

日龄 days of age	性状 traits	平均值 mean	标准差 standard deviation	变异系数 coefficient of variation	最大值 maximum	最小值 minimum	遗传力 heritability
150	体质量/g body weight	46.01	8.02	0.17	80.87	28.43	0.17
	体长/cm body length	11.24	0.61	0.05	13.04	10.46	0.15
240	体质量/g body weight	134.70	26.32	0.20	248.51	55.01	0.21
	体长/cm body length	17.85	1.30	0.07	26.40	14.68	0.18

产主要养殖品种的研究与应用,均取得了较好的遗传进展与育种结果,由此证实了分子标记辅助家系选育方法的有效性。

总结上述品种研究过程的共同点,所采用的标记皆为微卫星DNA分子标记,且全部从连锁群上随机选取,没有进行具有高亲本排除概率标记的选择,导致建立分子系谱时往往需要利用较多标记的鉴定结果。这不仅显著增加了实验群体进行遗传学分析的工作量,而且对分子系谱结果的可靠性也产生一定影响。不同于以往报道,本实验从覆盖红鳍东方鲀22个连锁群上的44个微卫星标记中,筛选出10个具有高亲本排除概率的标记,这些标记均匀分布于红鳍东方鲀9个连锁群上,在第20号连锁群上有2个标记。利用这些标记开展全同胞家系群体的亲缘关系鉴定结果与已知的系谱结构完全一致。实际上,除了利用10个高亲本排除概率标记进行实验分析以外,6、7、8和9个标记的鉴定结果也同时进行了比较,结果表明,6个标记与7~10个的标记的分析结果基本相同,由此也证实了高亲本排除概率标记开展亲缘关系鉴定的高效性。除了标记本身拥有的鉴定能力以外,为了能够拓展这些标记在其他实验群体的有效应用,从等位基因数(A)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、多态信息含量(PIC)等常规遗传学指标也对标记进行了统计分析,结果表明这些标记具有足够丰富的遗传多态性,可以作为开展类似遗传学研究的备选标记。利用这些标记建立混合选育群体的系谱结构,在400尾采样个体中有377尾个体成功鉴定出其父母本,有23尾个体由于DNA质量问题未获得全部标记的基因分型结果,因此未纳入系谱中。利用此系谱进行混合选育群体生长性状的遗传参数估计,不同日龄体质量和体长的遗传力属于低至中等遗传力范畴。对比类似研究中不同鱼类动物品种的遗传力估计值,鲤(*Cyprinus carpio*)8周龄体质量和体长的遗传力均为0.33^[26];大口黑鲈20月龄体质量和体长的遗传力分别为0.50和0.53^[29];大黄鱼(*Larimichthys crocea*)13月龄体长和体高的遗传力分别为0.25和0.36^[30];牙鲆主要形态性状的遗传力范围为0.22~0.56^[27]。与这些结果相比较,红鳍东方鲀的遗传力略低于报道的鱼类品种,这可能是由于所选择的目标物种、性状测定的发育阶段、分析建立的遗传模型和所采用的统计分析方法

不同而导致。对比红鳍东方鲀常规家系选育获得的生长性状遗传参数估计值,其在200日龄体质量和体长的遗传力估计值分别为0.16和0.14^[39],这与本研究结果中的遗传力范围基本相同,在估计值上存在的略微差异主要来源于分析所选用的实验群体规模、性状记录的日龄及遗传模型中考虑的随机效应项不同等客观因素。

分子标记辅助家系选育开展联合育种,实现了以较少的养殖单元培育大量选育家系。这不仅大幅度降低了养殖资源的浪费,同时,不同家系的经济性状所表现出的差异更多是由遗传因素所造成。此外,这种选育方法不需要在进行性状遗传评估时所有家系都有个体存在。以生长性状为例,同一个养殖单元中仅挑选性状表现突出的个体进行采样分析与标记,相对规格较小的个体直接淘汰,无需进行后续的遗传分析工作。如此,便可大量减少进行亲缘关系鉴定的个体数量,显著降低个体基因分型所需要的成本。直接挑选出几个不同养殖单元中性状优秀的个体组成目标群体,通过分子标记鉴定结果建立的系谱便可进行群体内个体的遗传评估。虽然这种方法参与遗传评估的个体数量少于常规家系选育方法,但在实际育种可承担的能力范围内还应尽量多保留不同养殖单元中的个体,从而保证后期进行遗传评价的群体拥有较为丰富的遗传多样性。除了生长性状以外,分子标记与家系选育联合育种技术也可以拓展到抗病、抗逆、生殖、性别调控和品质等其他重要性状,从而为培育高产优质抗病抗逆的水产养殖动物新品种提供新思路与新方法。

参考文献:

- [1] 肖述,喻子牛. 养殖牡蛎的选择育种研究与实践[J]. 水产学报, 2008, 32(2): 287-295.
Xiao S, Yu Z N. Review of selective breeding research and practice in oyster cultivation[J]. Journal of Fisheries of China, 2008, 32(2): 287-295 (in Chinese).
- [2] 于洋, 张晓军, 李富花, 等. 全基因组选择育种策略及在水产动物育种中的应用前景[J]. 中国水产科学, 2011, 18(4): 936-943.
Yu Y, Zhang X J, Li F H, et al. Strategy of whole genomic selection breeding and its application prospect in aquaculture[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(4): 936-943 (in Chinese).

- [3] 栾生, 隋娟, 孟宪红, 等. 最佳遗传贡献理论及其在水产动物选择育种中的应用前景[J]. 渔业科学进展, 2014, 35(6): 133-140.
Luan S, Sui J, Meng X H, *et al.* Optimum contribution theory and the prospect of its application in selective breeding in aquaculture[J]. Progress in Fishery Sciences, 2014, 35(6): 133-140 (in Chinese).
- [4] 张跃环, 王昭萍, 喻子牛, 等. 养殖牡蛎种间杂交的研究概况与最新进展[J]. 水产学报, 2014, 38(4): 613-624.
Zhang Y H, Wang Z P, Yu Z N, *et al.* A recent review of interspecific hybridization among cultivated oysters[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(4): 613-624 (in Chinese).
- [5] 蒋湘, 刘建勇, 赖志服. 九孔鲍养殖群体与野生群体杂交一代生长比较[J]. 广东海洋大学学报, 2013, 33(1): 22-27.
Jiang X, Liu J Y, Lai Z F. Growth and survival studies on hybridization between cultured stock and wild stock of *Haliotis diversicolor supertexta*[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2013, 33(1): 22-27 (in Chinese).
- [6] 孙灵毅, 赵强, 任利华, 等. 中国刺参与韩国红刺参杂交及子代发育特性的研究[J]. 大连海洋大学学报, 2013, 28(3): 281-286.
Sun L Y, Zhao Q, Ren L H, *et al.* Crossing and offspring development of sea cucumber *Stichopus japonicus* between Chinese and Korean populations[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2013, 28(3): 281-286 (in Chinese).
- [7] 张龙岗, 李娴, 付佩胜. 人工诱导雌核发育技术在淡水鱼类遗传育种研究中的应用[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(7): 1430-1433, 1453.
Zhang L G, Li X, Fu P S. Application of artificially induced gynogenesis on research of freshwater fish[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2011, 50(7): 1430-1433, 1453 (in Chinese).
- [8] 陈戟, 胡炜, 朱作言. 鱼类生殖发育调控研究进展[J]. 科学通报, 2013, 58(2): 103-114.
Chen J, Hu W, Zhu Z Y. Progress in studies of fish reproductive development regulation[J]. Chinese Science Bulletin, 2013, 58(2): 103-114.
- [9] 梅洁, 桂建芳. 鱼类性别异形和性别决定的遗传基础及其生物技术操控[J]. 中国科学: 生命科学, 2015, 58(2): 124-136.
Mei J, Gui J F. Genetic basis and biotechnological manipulation of sexual dimorphism and sex determination in fish[J]. Science China Life Sciences, 2015, 58(2): 124-136.
- [10] 孙效文, 鲁翠云, 贾智英, 等. 水产动物分子育种研究进展[J]. 中国水产科学, 2009, 16(6): 981-990.
Sun X W, Lu C Y, Jia Z Y, *et al.* The progress of molecular marker-based breeding for aquatic species[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16(6): 981-990 (in Chinese).
- [11] 桂建芳, 朱作言. 水产动物重要经济性状的分子基础及其遗传改良[J]. 科学通报, 2012, 57(15): 1751-1760.
Gui J F, Zhu Z Y. Molecular basis and genetic improvement of economically important traits in aquaculture animals[J]. Chinese Science Bulletin, 2012, 57(15): 1751-1760.
- [12] 童金苟, 孙效文. 鱼类经济性状遗传解析及分子育种应用研究[J]. 中国科学: 生命科学, 2015, 58(2): 178-186.
Tong J G, Sun X W. Genetic and genomic analyses for economically important traits and their applications in molecular breeding of cultured fish[J]. Science China Life Sciences, 2015, 58(2): 178-186.
- [13] 马爱军, 郭建丽, 王新安, 等. 大菱鲆选育家系抗鳃弧菌性能[J]. 中国水产科学, 2014, 21(3): 484-493.
Ma A J, Guo J L, Wang X A, *et al.* Family selection and estimation of disease resistance in turbot, *Scophthalmus maximus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(3): 484-493 (in Chinese).
- [14] 王磊, 胡灿灿, 陈松林, 等. 牙鲆家系4个选育性状的测定与分析[J]. 中国水产科学, 2015, 22(4): 620-629.
Wang L, Hu C C, Chen S L, *et al.* Determination and analysis of 4 breeding traits in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) families[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(4): 620-629 (in Chinese).
- [15] 黄永春, 艾华水, 潘忠诚, 等. 凡纳滨对虾抗WSSV选育家系的建立及其抗病特性[J]. 水产学报, 2013, 37(3): 359-366.
Huang Y C, Ai H S, Pan Z C, *et al.* Establishment and WSSV resistant characteristics of selective breeding families for resistance to the white spot syndrome virus of *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(3): 359-366 (in Chinese).
- [16] 孔杰, 罗坤, 栾生, 等. 中国对虾新品种“黄海2号”的培

- 育[J]. 水产学报, 2012, 36(12): 1854-1862.
- Kong J, Luo K, Luan S, *et al.* The new variety of *Fenneropenaeus chinensis* "Huanghai No. 2"[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(12): 1854-1862 (in Chinese).
- [17] 高保全, 刘萍, 李健, 等. 三疣梭子蟹家系的建立及生长性状比较[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2010, 40(2): 47-51.
- Gao B Q, Liu P, Li J, *et al.* Growth comparison between families of *Portunus trituberculatus*[J]. Periodical of Ocean University of China, 2010, 40(2): 47-51 (in Chinese).
- [18] 刘伟, 李应森, 王武, 等. 长江水系中华绒螯蟹不同家系扣蟹阶段生长性能的研究[J]. 湖北农业科学, 2010, 49(4): 933-936.
- Liu W, Li Y S, Wang W, *et al.* A comparative study of growth performance in different families of larval crab in the Yangtze river system[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2010, 49(4): 933-936 (in Chinese).
- [19] 彭张明, 陶后全, 刘锦上, 等. 马氏珠母贝红色闭壳肌 F1 代的家系选育及家系评定[J]. 广东海洋大学学报, 2015, 35(4): 37-45.
- Peng Z M, Tao H Q, Liu J S, *et al.* Research on family selection and evaluation of *Pinctada martensi* with red adductor muscle[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2015, 35(4): 37-45 (in Chinese).
- [20] 刘志刚, 章启忠, 朱晓闻, 等. 海湾扇贝南部亚种自交家系选育及其 Kung 育种值评价[J]. 中国水产科学, 2013, 20(2): 308-315.
- Liu Z G, Zhang Q Z, Zhu X W, *et al.* Breeding of a self-fertilizing family and Kung breeding value evaluation of *Argopecten irradians concentricus* (Say)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(2): 308-315 (in Chinese).
- [21] Hara M, Sekino M. Efficient detection of parentage in a cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* using microsatellite DNA marker[J]. Aquaculture, 2003, 217(1-4): 107-114.
- [22] Hatanaka A, Yamada S I, Sakamoto T, *et al.* Isolation and application of microsatellite DNA markers for pedigree tracing of seedlings of red sea bream (*Pagrus major*)[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2006, 37(1): 139-143.
- [23] Kim S G, Morishima K, Satoh N, *et al.* Parentage assignment in hatchery population of brown sole *Pleuronectes herzensteini* by microsatellite DNA markers[J]. Fisheries Science, 2007, 73(5): 1087-1093.
- [24] Wang H, Iwai Jr T, Zhao B P, *et al.* Identification of microsatellite DNA markers for Pacific Threadfin parentage assignment[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2010, 41(1): 640-647.
- [25] Wilson A J, Mcdonald G, Moghadam H K, *et al.* Marker-assisted estimation of quantitative genetic parameters in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. Genetical Research, 2003, 81(2): 145-156.
- [26] Vandeputte M, Kocour M, Mauger S, *et al.* Heritability estimates for growth-related traits using microsatellite parentage assignment in juvenile common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. Aquaculture, 2004, 235(1-4): 223-236.
- [27] Shikano T. Estimation of quantitative genetic parameters using marker-inferred relatedness in Japanese flounder: A case study of upward bias[J]. Journal of Heredity, 2008, 99(2): 94-104.
- [28] Shikano T. Marker-based estimation of heritability for body color variation in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Aquaculture, 2005, 249(1-4): 95-105.
- [29] Luo W, Zeng C, Deng W, *et al.* Genetic parameter estimates for growth-related traits of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) using microsatellite-based pedigree[J]. Aquaculture Research, 2014, 45(11): 1881-1888.
- [30] Liu X D, Zhao G T, Cai M Y, *et al.* Estimated genetic parameters for growth-related traits in large yellow croaker *Larimichthys crocea* using microsatellites to assign parentage[J]. Journal of Fish Biology, 2013, 82(1): 34-41.
- [31] 高露姣, 黄艳青, 夏连军, 等. 不同养殖模式下红鳍东方鲀的品质比较[J]. 水产学报, 2011, 35(11): 1668-1676.
- Gao L J, Huang Y Q, Xia L J, *et al.* Comparison of flesh quality of farmed fugu, *Takifugu rubripes* from different culture models[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(11): 1668-1676 (in Chinese).
- [32] Aparicio S, Chapman J, Stupka E, *et al.* Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*[J]. Science, 2002, 297(5585): 1301-1310.
- [33] Kai W, Kikuchi K, Fujita M, *et al.* A genetic linkage

- map for the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes*[J]. *Genetics*, 2005, 171(1): 227-238.
- [34] 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 Biology and Evolution*, 2011, 3: 424-442.
- [35] Kamiya T, Kai W, Tasumi S, *et al.* A trans-species missense SNP in *Amhr2* is associated with sex determination in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes* (Fugu)[J]. *Plos Genetics*, 2012, 8(7): e1002798.
- [36] 陆丽君, 马爱军, 王新安, 等. 5个红鳍东方鲀养殖群体微卫星DNA遗传多态性分析[J]. *渔业科学进展*, 2013, 34(4): 27-33.
- Lu L J, Ma A J, Wang X A, *et al.* Polymorphisms analysis of five populations of *Takifugu rubripes* with microsatellite[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(4): 27-33 (in Chinese).
- [37] 万玉美, 赵海涛, 张福崇. 红鳍东方鲀、菊黄东方鲀及其杂交F1幼鱼耗氧率与窒息点研究[J]. *水产科学*, 2013, 32(1): 21-25.
- Wan Y M, Zhao H T, Zhang F C. Oxygen consumption and critical asphyxia point in juvenile redfin puffer *Fugu rubripes*, Tawny puffer *F. flavidus* and their hybrid F₁[J]. *Fisheries Science*, 2013, 32(1): 21-25 (in Chinese).
- [38] 李伟业, 马爱军, 王新安, 等. 红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)选育家系构建与早期标准化培育[J]. *海洋与湖沼*, 2013, 44(4): 944-952.
- Li W Y, Ma A J, Wang X A, *et al.* The study of *Takifugu rubripes* breeding family establishment and the early standardized cultivation technique[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(4): 944-952 (in Chinese).
- [39] 刘永新, 周勤, 张红涛, 等. 红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)生长性状的遗传参数估计[J]. *渔业科学进展*, 2014, 35(6): 39-44.
- Liu Y X, Zhou Q, Zhang H T, *et al.* Estimation of genetic parameters of growth traits of redfin puffer (*Takifugu rubripes*)[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(6): 39-44 (in Chinese).
- [40] Gundel H, Reetz I. Exclusion probabilities obtainable by biochemical polymorphisms in dogs[J]. *Animal Blood Groups and Biochemical Genetics*, 1981, 12(2): 123-132.
- [41] Raymond M, Rousset F. GENEPOP (version 1.-2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism[J]. *Journal of Heredity*, 1995, 86(3): 248-249.
- [42] Henderson C R. Estimation of variances and covariances under multiple trait models[J]. *Journal of Dairy Science*, 1984, 67(7): 1581-1589.
- [43] 何小燕, 白俊杰, 刘小林, 等. 微卫星DNA标记在大口黑鲈亲权鉴定中的应用[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2009, 37(8): 55-62.
- He X Y, Bai J J, Liu X L, *et al.* Application of microsatellite makers for parentage determination in *Micropterus salmoides*[J]. *Journal of Northwest A-&F University (Natural Science Edition)*, 2009, 37(8): 55-62 (in Chinese).
- [44] 初冠因, 姜黎明, 于海洋, 等. 卵胎生鱼许氏平鲈(*Sebastes schlegelii*)雌亲家系的微卫星鉴定[J]. *海洋与湖沼*, 2013, 44(3): 670-676.
- Chu G N, Jiang L M, Yu H Y, *et al.* Family assessment with microsatellite markers in the ovoviviparous black rock fish *Sebastes schlegelii*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(3): 670-676 (in Chinese).
- [45] Jerry D R, Preston N P, Crocos P J, *et al.* Application of DNA parentage analyses for determining relative growth rates of *Penaeus japonicus* families reared in commercial ponds[J]. *Aquaculture*, 2006, 254(1-4): 171-181.
- [46] 王照旗, 韩学凯, 白志毅, 等. 三角帆蚌紫色选育系1龄阶段内壳色及生长性状的遗传参数估计[J]. *水产学报*, 2014, 38(5): 644-650.
- Wang Z Q, Han X K, Bai Z Y, *et al.* Estimates of genetic parameters for inner shell color and growth traits during one year old stage in the purple strain of *Hyriopsis cumingii* using microsatellite based parentage assignment[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(5): 644-650 (in Chinese).
- [47] 杜晓东, 高远镇, 邓岳文, 等. 利用微卫星标记进行马氏珠母贝家系遗传结构分析与系谱认证[J]. *水产学报*, 2011, 35(12): 1795-1804.
- Du X D, Gao Y Z, Deng Y W, *et al.* Genetic structure and genealogical identification of four families of pearl oyster *Pinctada martensii*, as inferred by microsatellite markers[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(12): 1795-1804 (in Chinese).
- [48] 程鹏, 杨爱国, 吴彪, 等. 微卫星标记在不同壳色虾夷扇贝家系亲权鉴定的适用性[J]. *水生生物学报*, 2011, 35(5): 768-775.

- Cheng P, Yang A G, Wu B, *et al.* The applicability analysis on microsatellite markers for parentage determination of different shell color lines of Japanese scallop *Patinopecten yessoensis*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, 35(5): 768-775 (in Chinese).
- [49] 刘磊, 李健, 刘萍. 基于微卫星标记的三疣梭子蟹家系系谱认证[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2012, 42(S2): 38-44.
- Liu L, Li J, Liu P. Parentage determination of *Portunus trituberculatus* in family establishment based on microsatellite DNA markers[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2012, 42(S2): 38-44 (in Chinese).

Genetic analysis of redfin puffer (*Takifugu rubripes*) for growth traits by using a marker-based pedigree

LIU Yongxin^{1*}, ZHOU Qin², ZHANG Hongtao², LIU Yi³

(1. Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141, China;

2. Beidaihe Central Experiment Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qinhuangdao 066100, China;

3. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

Abstract: To carry out genetic evaluation on growth traits in redfin puffer (*Takifugu rubripes*) by using molecular marker-assisted family selection and breeding, in this study, the mature 11 females and 11 males chosen from the selection and breeding founder were used to produce 11 full-sib families of redfin puffer. 10 individuals from each family separately raised were random selected to construct the family population. About 400 larger individuals from the families raised together were random selected to construct the mixed breeding population. A set of 44 microsatellite DNA markers distributed evenly in 22 linkage groups were selected from the genetic linkage maps of redfin puffer, furthermore, 2 markers were located in each linkage group. According to the Excl 1 and Excl 2 probabilities based on the results of genetic analysis in full-sib family population, high probability values of 10 markers ranged from 0.58 to 0.662 and 0.736 to 0.797, low probability values of 14 markers were from 0.054 to 0.43 and 0.177 to 0.608, and intermediate probability values of the remainder 20 markers showed 0.467 to 0.575 and 0.641 to 0.732. The results of parentage determination of mixed breeding population by using these markers with higher parental probabilities demonstrated that there were differences in the number of offspring from the combination of different parents. Male M2 and female F4 generated 124 offspring, whose percentage of all the individuals attained to 32.89%. Estimating the genetic parameters of growth traits with the marker-based pedigree according to the results of parentage determination, the heritabilities of body weight and body length were from 0.17 to 0.21 and 0.15 to 0.18 at different days of age, respectively. The research results verified that the microsatellite DNA markers selected with higher parental probabilities of exclusion can effectively construct the pedigree in redfin puffer to perform the estimation of genetic parameters for growth traits, therefore, molecular marker-assisted family selection is an efficient approach to genetically improve objective traits in this species.

Key words: *Takifugu rubripes*; microsatellite; growth trait; probabilities of exclusion; pedigree

Corresponding author: LIU Yongxin. E-mail: liuyx@cafs.ac.cn

Funding projects: Applied National Science and Technology Support Program in China (2012BAD26B01)