



## 大菱鲂饲料转化率相关微卫星标记的筛选

常浩文<sup>1,2,3</sup>, 刘志峰<sup>1,3</sup>, 孙志宾<sup>1,3</sup>, 马爱军<sup>1,3\*</sup>,  
王新安<sup>1,3</sup>, 杨敬昆<sup>1,3</sup>, 徐荣静<sup>4</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东省海洋渔业生物技术与遗传育种重点实验室,

青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室, 山东 青岛 266071;

2. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;

3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 海洋生物学与生物技术功能实验室, 山东 青岛 266071;

4. 烟台开发区天源水产有限公司, 山东 烟台 265617)

**摘要:** 饲料转化率 (FCR) 是大菱鲂重要的经济性性状, 通过选择育种提高饲料转化率, 能够有效地降低大菱鲂的养殖成本, 进而推动产业的发展。微卫星标记是鱼类分子标记辅助选育中常用的分子标记, 为了筛选出与大菱鲂饲料转化率相关的微卫星标记, 提高育种效率, 实验以 300 尾大菱鲂幼鱼为研究对象, 通过特制的网箱养殖系统, 测定个体饲料转化率, 分别选取饲料转化率最高和最低的 30 个样本作为高饲料转化率组 (H 组) 和低饲料转化率组 (L 组)。利用 40 对大菱鲂微卫星引物, 对 H 组和 L 组的 DNA 混池进行 PCR 扩增, 统计两组个体 PCR 产物的基因型, 筛选两池之间出现差异等位基因片段的位点, 通过进一步的群体验证和家系验证, 分析微卫星位点与大菱鲂饲料转化率的相关性。结果显示, 微卫星位点 YSKr148 在 238 bp 的等位基因片段与大菱鲂饲料转化率存在极显著正相关, 相关系数达到 0.359, 家系验证中该位点的阳性组的饲料转化率显著高于阴性组。研究表明, 大菱鲂微卫星位点 YSKr148 与饲料转化率性状显著相关, 可以用于该性状的分子标记辅助选育。本研究首次获得了与大菱鲂饲料转化率性状显著相关的分子标记, 为研究该性状的遗传基础以及相关分子机制提供了依据, 为该性状的分子标记辅助选育奠定基础。

**关键词:** 大菱鲂; 微卫星标记; 饲料转化率; 分群分离分析法 (BSA)

中图分类号: Q 348; S 965.3

文献标志码: A

大菱鲂 (*Scophthalmus maximus*) 又被称为“多宝鱼”, 隶属菱鲂科 (Scophthalmidae) 菱鲂属 (*Scophthalmus*), 是我国重要的海水养殖经济鱼类。最新的产业发展报告指出, 在大菱鲂的养殖成本中占比最高的是饲料支出, 占总成本的 43.35%<sup>[1]</sup>。随着近几年饲料价格的上涨, 饲料支出随之提高, 严重影响了养殖者的积极性及大菱鲂养殖产业的

发展。饲料转化效率是衡量养殖对象对饲料利用效率高的一项指标, 已有研究表明, 饲料转化率遗传力较高, 在尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 中可达 0.32, 通过选择育种能够显著提高饲料转化率<sup>[2]</sup>, 相关研究在舌齿鲈 (*Dicentrarchus labrax*)<sup>[3]</sup>、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[4]</sup> 中也有报道。因此针对饲料转化率性状开展遗传选育

收稿日期: 2022-07-26 修回日期: 2022-11-07

资助项目: 国家重点研发计划 (2022YFD2400403); 国家自然科学基金 (32002362); 山东省自然科学基金 (ZR2019BC089); 国家现代农业产业技术体系专项 (CARS-47-G01); 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2020TD25); 山东省良种工程 (2019LZGC013)

第一作者: 常浩文 (照片), 从事鱼类遗传育种研究, E-mail: 821206183@qq.com

通信作者: 马爱军, 从事鱼类遗传育种研究, E-mail: maaj@ysfri.ac.cn



工作, 培育出具有高饲料转化率的大菱鲂新品种, 能够有效地降低大菱鲂的养殖成本、提高养殖利润, 进而推动产业的发展。

因为鱼类在水中处于不断游动的状态, 并且个体识别技术尚未开发, 造成个体的饲料转化率表型获取困难, 大菱鲂是一种底栖鱼类, 性格较温和, 针对其特点设计的小型养殖网箱, 实现了个体饲料转化率的测定目标。但相对于其他易测量的性状来说, 开展饲料转化率表型测定仍存在费时费力、测定成本高等问题。分子标记辅助育种是借助与性状紧密相关的分子标记对具有性状优势的等位基因或基因型的个体进行直接选择育种<sup>[5]</sup>。与传统的选育方法相比, 分子标记辅助选择具有信息量大、不易受环境影响、选择强度大、选种效率和准确性高等特点, 对不易测量的性状选育来说更具优势<sup>[6]</sup>。

关于饲料转化率性状相关分子标记的研究在畜牧中已有较多报道, Sherman 等<sup>[7]</sup>找到影响家牛 (*Bos taurus*) 食物摄取量的 6 个 SNP 标记, 它们分布于 5 个染色体上, 对表型效应的综合贡献率达到 6.9%。Dragos-Wendrich 等<sup>[8]</sup>利用野猪 (*Sus scrofa*) 18 号染色体上的 5 个分子标记对饲料转化率等数量性状进行精细定位并找到与其紧密连锁的功能基因。张燕等<sup>[9]</sup>采用限制性片段长度多态性聚合酶链反应 (PCR-RFLP) 技术对优质鸡生长激素 (cGH) 基因 5' 调控区和第 4 内含子进行多态检测, 找到 2 个与饲料转化率具有显著相关性的 SNP 位点。但目前关于鱼类饲料转化率的分子标记研究开展较少, Zimmerinan 等<sup>[10]</sup>筛选到 3 个 QTL 位点与虹鳟饲料转化率显著相关。李鸥等<sup>[11]</sup>找到 6 个 SSR 标记与鲤 (*Cyprinus carpio*) 饲料转

化率性状相关, 其中两个标记与饲料转化率相关性达极显著水平。关于大菱鲂饲料转化率相关的分子标记研究在国内外还未见报道。

在众多种类的分子标记中, 微卫星 (SSR) 标记在基因组中广泛随机分布, 具有共显性遗传、多态性高、稳定性好和操作简单等优点<sup>[12]</sup>, 已被广泛应用于牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)<sup>[13]</sup>、暗纹东方鲀 (*Takifugu obscurus*)<sup>[14]</sup>、大菱鲂<sup>[15-17]</sup>、鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*)<sup>[18]</sup>、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)<sup>[19-20]</sup> 等多种鱼类的分子标记辅助育种工作中。本研究采用微卫星标记与分群分离分析法 (bulked segregant analysis, BSA) 相结合的方式, 筛选与饲料转化率相关的微卫星标记, 以期为大菱鲂高饲料转化率新品种选育奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验鱼来自烟台开发区天源水产有限公司, 随机挑选 300 尾体表无损伤、活力好的幼鱼 [(11.2±0.5) cm, 体重 (22.34±2.25) g], 放入特制的 300 个网箱养殖系统 (图 1), 进行单独养殖。该养殖系统已获国家发明专利授权, 专利名为“一种用于大规模测定大菱鲂个体饲料转化率的装置及方法”。实验开始前暂养 2 周, 水温 (20.0±0.5) °C, 盐度 30, 溶解氧 > 6.0 mg/L。实验过程中操作人员严格遵守实验动物相关伦理规范。

### 1.2 实验设计

暂养结束后, 准确称量并记录每尾鱼的体重 (记为初始体重), 于次日开始投喂商业饲料, 第 1



图 1 大菱鲂个体饲料转化率测定网箱养殖系统

(a) 网箱养殖系统照片, (b) 养殖网箱单元照片。

Fig. 1 A cage culture system for determination of individual feed conversion ratio of *S. maximus*

(a) photo of cage culture system, (b) photo of aquaculture cage unit.

周的日投喂量为初始体重的 1% (13 粒, 每粒均重 16.85 mg), 之后每 2 周投喂量增加 1 粒, 每尾鱼的日投喂粒数保持一致, 实验持续 60 d, 实验期间保持水温 (20.0±0.5) °C, 盐度 30, 溶解氧>6.0 mg/L。实验结束后停食 24 h, 准确称量并记录每尾鱼的体重 (记为终末体重)。计算每个个体的饲料转化率:

饲料转化率 (FCR, %)=(终末体重-初始体重)/投入饲料的干物质总重×100%

称重结束后, 剪取每尾鱼的尾鳍置于无水乙

醇后冻于-80 °C 冰箱中备用。选取饲料转化率最高的 30 尾作为高转化率组 (H 组), 饲料转化率最低的 30 尾作为低转化率组 (L 组), 通过 *t* 检验验证两组之间是否存在差异显著,  $P<0.05$  为差异显著,  $P<0.01$  为差异极显著。

### 1.3 微卫星引物设计

根据大菱鲂微卫星图谱<sup>[21-22]</sup>, 选择 40 个微卫星位点, 根据其侧翼保守序列设计引物, 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成 (表 1)。

表 1 大菱鲂的 40 个微卫星位点的引物序列

Tab. 1 Primer sequences of 40 microsatellite loci in *S. maximus*

位点 locus	引物序列(5'→3') primer sequence (5'→3')	重复序列及重复次数 repeat motif and no. of repeats	退火温度/°C $T_a$	GenBank 登录号 GenBank accession no.
SmaC02	F:TGTCTCTCGTCAGTGGCAGT R:AAACTGCAGCCTCCAAGATG	(AT)10	56	DQ659648
SmaC06	F: GACCCAACGAGCACTGTT R: GGGCCAACATCATTATGG	(GGAT)3...(GGAT)6	57	DQ454088
SmaC09	F: CGACCCGCCACTACAGGAT R: AGCGACAGCAACGCACCAAG	(TC)13TA(TC)2	57	DQ659638
SmaC10	F: GGTGGCTGGGTAAATCTGTT R: CTTCCCTCCGTCTACGCTCC	(TGA)8	60	DQ659659
SmaC12	F: CTGCAAGCCTTGATACCACT R: TTCCGCTGCCTTTATGTGAG	(TA)22	58	DQ659675
B11-12/6/3	F: GTTGTACTGCTGATCTAGC R: ATGTTCCATCTCATTCCCTGC	(CA)12CG(CA)6(CG)CA3	55	AF182080
5/4CA20	F: GACGGAAGCTCGGAGATTC R: GATTGGTGACCTTGGCAAC	(CA)20A(AC)2	63	AF182096
YSKr41	F: CCTCTCATTGGAAGACGG R: TGCCTGTCAGTGGAAAGTAG	(CT)19	53.8	GQ121176
YSKr43	F: TATGCCCTGGTTACGCTTC R: TCTGGTGATGTCTTCTGGAG	(CA)11	53.8	GQ121177
YSKr44	F: CTGGGATGATAGGAAGTGG R: GAAGACAGAAGGGATGAAGG	(CT)5TT(CT)8...(CT)10	56.2	GQ121178
YSKr45	F:CGTAACTCTCTGTATCTGCTTTC R:TCCACCAACTATTTAGGATGCTC	(TC)10...(CT)12 T(TC)6	56.2	GQ121179
YSKr46	F: TTCCCACTCTTCCTTGC R: GAAAGATGAAGTGCGTGC	(TC)25	53.8	GQ121180
YSKr50	F:GTAGGGAGCAGAAAGGATGAGG R: GGTCCAACAACAAATGCGAGG	(AC) 12	56.2	GQ121181
YSKr51	F: GAACGACCGACGAAACTG R: TTCTAAACACCACCGACCCT	(GA)7 T(AT) 12	56.2	GQ121182
YSKr54	F: GAACGAAGGGATGTAAGG R: ACTCAGCAACAGGGTAC	(TC) 20	56.2	GQ121183
YSKr90	F: TGGTCTTCTCAACAGTC R: AAGTCTCAGCCATTCTC	(GT)16TT(TG)5CA(TG)4	53.4	GQ121204
YSKr91	F: CTATCGCCGCCGTATTG R: TGATTGACAGGGTTTGA	(AC)5AT(AC)28	53.4	GQ121205
YSKr92	F: CCACGCTGTGTATTTCCCTCAT R: GGTCAACATTCAAACCCAAC	(GTGC)10	58.7	GQ121206
YSKr93	F: GAAGAGGCGACAAAGGC R: ACGGCAGAATCATCAGGT	(AC)14	61.1	GQ121207
YSKr94	F: CGCCGCACATTCATTCAC R: GGCTTGGCTGTCTCATAGTC	(GCAC)11(AC)3G(CA)8	53.4	GQ121208
YSKr146	F: GTTTGTAATGAGACTTTGC R: GTCACCCTGAGAGGAGAT	(AC)21	58.7	GQ121241
YSKr147	F: CAGAACAAGGGACTGAGGAT R: TGTGTGTCACCGACCAAC	(CA)13	50.8	GQ121242
YSKr148	F: GTACAAGTACACAACAGCAGT R: ACCATTGAAGACAGAAGTGT	(TG)14	56.1	GQ121243



· 续表 1 ·

位点 locus	引物序列(5'→3') primer sequence (5'→3')	重复序列及重复次数 repeat motif and no. of repeats	退火温度/°C $T_a$	GenBank登录号 GenBank accession no.
YSKr154	F: ACAATGTGCCTGAGTGCT R: TGTGCTGACAATGGTGA	(AGAC)12GGAC(AGAC)2	44.9	GQ121244
YSKr173	F: CTGGATTGCCACGTCAGTAC R: TCTCGCTAACGCTTCACTC	(AAG)7	60.1	GQ132060
YSKr176	F: GCTTTGGAGGCAGTGGCA R: GAGAGCAGACATGGGAGACG	(AC)15	61.1	GQ132061
YSKr178	F: TGTACCATAACAACGTCTGC R: GAAAGTGCTGGGAAATCA	(GT)4GC (GT)6	53.4	GQ132062
YSKr234	F: TGAAAGGCAGGGAGAT R: GCACGCTTGACAACCAC	(TG)12	56.1	GQ132089
YSKr235	F: TGGTGGATAGAGAACAGTGCT R: AACAATGCTGTGCCAGTAGA	(CT)19	61.1	GQ132090
YSKr236	F: GCTCTTCGGTCAAACACT R: GTAATCTTCTTCTCCAG	(CA)13	56.1	GQ132091
YSKr241	F: GTCTCAGCGGAAACAAATC R: ATGTGTAGCCCCAGGTGACTC	(CA)11	61.1	GQ132092
YSKr242	F: TTACACCCGAGAGACGC R: TCAGGCTGTGATGTGGTC	(AC)20	53.4	GQ132093
YSKr256	F: CGTGAACCCTGAGAAATGGC R: ACAAACTCGCAGAGAAACA	(TG)30	58.7	GQ132101
YSKr258	F: AAATGCGTTGTATAGTG R: TTAGGAAAAGACCCAGAG	(GT)15	50.8	GQ132102
YSKr259	F: TCTTGCTCGTCTTCATCAC R: GCACCCATCTAACATCCA	(GT)6 T(TG)17	56.1	GQ132103
YSKr261	F: TTCCCAGATACTGTCACG R: TTCGGGCAGGATAATACT	(AC)21	56.1	GQ132104
YSKr262	F: TTGTTCTGGAGTTTTTGTGC R: ATTTTATGCCTGTGGTGTG	(CCAA)7...(AATC)5...(CCAA)5	58.7	GQ132105
YSKr264	F: GAATGGTGTGGCAATGAC R: TTGAGGGGACCGTGGAG	(GCAC)11ACGC(AC)10	53.4	GQ132106
YSKr265	F: CACTTCTCAGCCAGACCTCACT R: TGTTCACAGCCCCCTCCAG	(AC)6GC(AC)3(ACGC)17(AC)56	56.1	GQ132107
YSKr266	F: CCCCATCCTTCCATTTAGT R: TGGTTTGTGATCGGCTG	(AACC)7	46.6	GQ132108

注: 括号内字母代表碱基种类, 括号外数字代表重复次数。

Notes: Letters in brackets represent the type of base, and the numbers outside brackets represent the number of repeats.

#### 1.4 基因组 DNA 的提取和检测

使用天根生化科技(北京)有限公司海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒提取大菱鲆 H 组和 L 组各 30 尾的尾鳍 DNA。使用 Nanodrop 2000 测定 DNA 浓度, 采用 1% 琼脂糖凝胶电泳测定 DNA 的质量及完整性, 检测合格后将 DNA 保存于 -80 °C 备用。

#### 1.5 分群分离分析法 (BSA) 混池分组及基因池的 PCR 扩增

分别选取 H 组饲料转化率最高的 15 个样本与 L 组饲料转化率最低的 15 个样本, 每个样本取 5 μL DNA 溶液混为相应的 H 池和 L 池。使用 40 对微卫星引物分别对两个 DNA 池进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 1 μL DNA 溶液, 1 μL 上游引物, 1 μL 下游引物, 10 μL 2×Taq PCR Mix, 7 μL 灭菌双蒸水。PCR 扩增反应条件: 94 °C 预变性 10 min; 94 °C 变性 5 s, 按每对引物实际退火

温度反应 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。在扩增出的 20 μL 产物中加入 5 μL 6×Loading Buffer, 95 °C 5 min, 立即冰浴 10 min。

#### 1.6 PCR 产物检测

PCR 产物进行 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (30% 丙烯酰胺预混液 133.3 mL、尿素 210.2 g、10×TBE 50 mL, 加蒸馏水定容至 500 mL), 上样量 4 μL, 恒压 100 V, 电泳 6 h。电泳结束后, 采用银染法 (4 g 硝酸银, 2 000 mL 蒸馏水) 对聚丙烯酰胺 (PAGE) 胶进行摇床染色 10 min, 用双蒸水冲洗 1 min, 减少背景色, 用显影液 (30 g 氢氧化钠、4 mL 甲醛、2 000 mL 蒸馏水) 进行摇床显影, 待出现浅色条带, 立即停止显色并用大量双蒸水冲洗 1 min, 然后立即在白光下进行拍照, 保存电泳结果。通过分析 2 个基因池 DNA 的 PCR 扩增情况, 初步筛选出 2 个能在 2 个池中扩增出差异常等位基因片段的微卫星位点。

使用 STR 测序的方法, 将带有荧光标记的 PCR 产物送往华大基因进行测序, 分析 STR 分型结果, 减少杂带的影响, 进一步验证聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果, 提高分型准确性。

将出现了差异条带的 PCR 产物进行测序, 验证差异条带片段是否是相应的微卫星位点序列。

### 1.7 差异条带分析

针对上述 2 个能在 2 个 DNA 池中扩增出差异常等位基因片段的微卫星位点, 按照“BSA 分池及基因池的 PCR 扩增”和“PCR 产物检测”中涉及到的 PCR 扩增、PCR 产物电泳、荧光 PCR 产物 STR 测序, 对 H 组和 L 组的所有个体进行 SSR 差异条带分析。通过 BANDSCAN 软件对电泳结果进行分析, 获取差异条带的分布情况、碱基数以及涌动位置, 分析有差异的等位基因片段在 H 组和 L 组中具体的扩增情况。使用 SPSS 18.0 软件对微卫星引物在 H 组和 L 组个体中所扩增出的差异等位基因片段的有无与大菱鲂饲料转化率两个变量进行 Pearson 检验, 判断差异条带与大菱鲂饲料转化率是否具有相关性。

### 1.8 差异条带家系个体验证

从天源水产培育的 8 个大菱鲂全同胞家系中各随机挑选 20 个个体 [体长 (10.43±1.31) cm, 体重 (38.43±18.46) g], 重复“实验设计”中的饲料转化率测定实验。将同一家系的 DNA 样本混合, 得到 8 个混池, 使用与饲料转化率性状显著相关的微卫星引物, 按照“BSA 分池及基因池的 PCR 扩增”和“PCR 产物检测”中涉及到的 PCR 扩增、PCR 产物电泳对 8 个混池进行 SSR 差异条带分析, 选出含有差异等位基因的家系。使用此家系中所有个体的 DNA, 重复上述步骤, 统计差异等位基因片段的扩增情况。对统计结果进行 *t* 检验, 若  $P < 0.05$  则认为差异等位基因与饲料转化率显著相关。

## 2 结果

### 2.1 个体饲料转化率的测定结果

实验结束后, 计算 300 个个体的 FCR, 结果发现 FCR 为 35.3%~192.6%, 平均值为 126.5%±23.5%。经 K-S 检测后发现, 该性状基本符合正态分布 ( $P > 0.05$ ) (图 2)。其中 H 组 FCR 为 159.35%±8.04%, L 组 FCR 为 81.85%±17.24%, 两组间饲料转化率差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

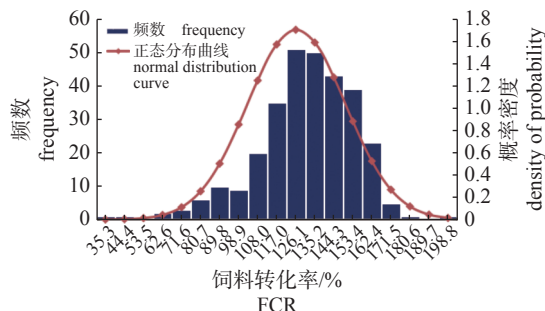


图 2 300 个个体的饲料转化率频数分布图

Fig. 2 Frequency distribution of feed conversion ratio for 300 individuals

### 2.2 BSA 分池 PCR 扩增结果分析

用所选的 40 对微卫星引物对所构建的 H 池和 L 池进行 PCR 扩增以及对 PCR 产物进行检测, 统计并分析在 H 池和 L 池中出现差异条带的微卫星位点, 结果如图 3 所示。可以发现 SmaC06 和 YSKr148 位点的电泳条带在两个混池中出现了明显的差异。针对两个位点的 PCR 产物测序后发现, 差异条带片段符合相应的微卫星位点扩增序列。

### 2.3 微卫星位点的差异等位基因片段在大菱鲂个体中带型统计及 STR 测序结果分析

使用 SmaC06 和 YSKr148 的引物对 H 组与 L 组共 60 个个体的 DNA 进行 SSR 差异条带分析。结果发现 YSKr148 位点在两个池中存在明显的差异分布。该位点在两组大菱鲂个体 DNA 扩增产物的电泳结果如图 4 所示。

使用微卫星位点 SmaC06 和 YSKr148 的荧光引物对 H 组与 L 组所有个体 DNA 进行 PCR 扩增, 对扩增产物进行 STR 测序。将测序结果与电泳结果进行对比后发现, STR 结果与聚丙烯酰胺凝胶电泳结果一致。同时经过对比分析能去除电泳结果中假带的干扰, 进一步验证实验的准确性, 以 H 组中的 8 号个体为例 (图 5)。

统计所有个体的条带分布, 统计结果如表 2 所示。对条带的有无与饲料转化率进行 Spearman 相关性分析, 结果显示, YSKr148 的扩增产物中, 长度为 238 bp 的条带与大菱鲂饲料转化率呈极显著相关 ( $P < 0.01$ ), 相关系数达到 0.359 (表 3)。

### 2.4 微卫星位点 YSKr148 在全同胞家系个体中的验证

使用微卫星位点 YSKr148 的引物对 8 个家系混池 DNA 进行 PCR 扩增, 结果显示只有家系 6

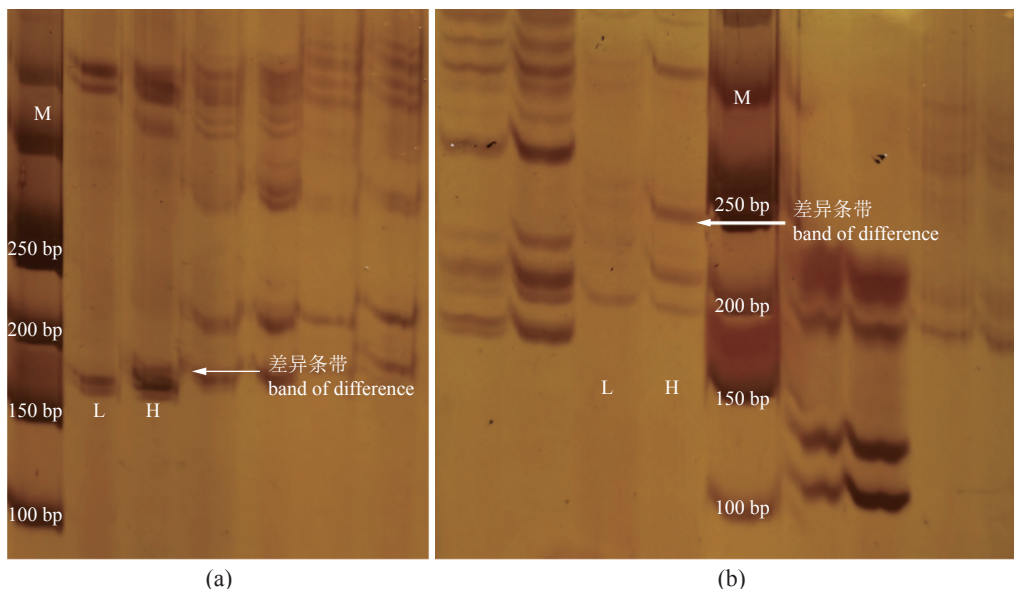


图 3 部分微卫星位点的 BSA 分析差异带型图

(a) SmaC06, (b) YSKr148; M. 50 bp marker, H. 高饲料转化率组, L. 低饲料转化率组, 下同。

Fig. 3 Difference pattern map of BSA analysis of some microsatellite loci

(a) SmaC06, (b) YSKr148; M. 50 bp marker, H. high feed conversion group, L. low feed conversion group, the same below.

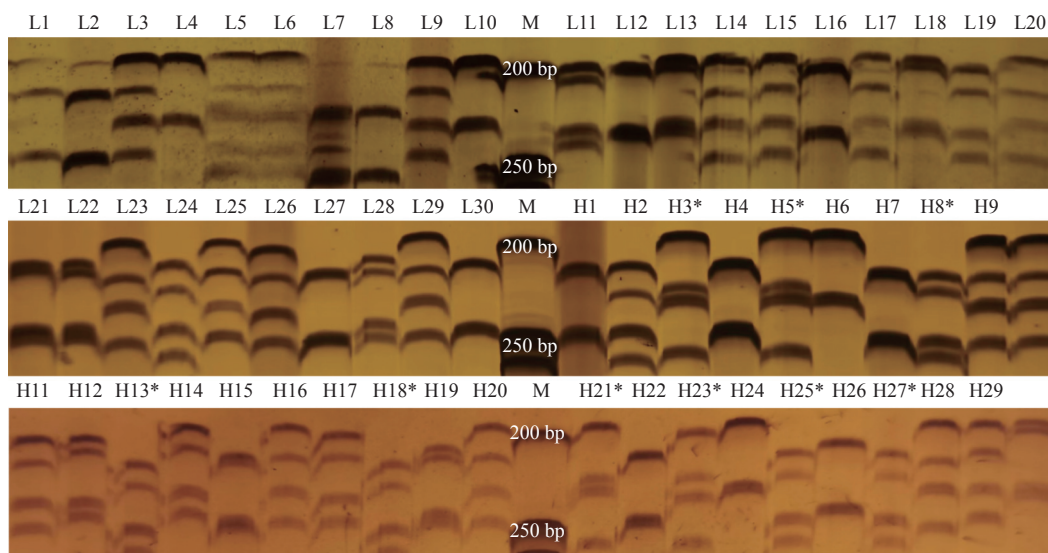


图 4 微卫星位点 YSKr148 在个体 PCR 扩增中的带谱

\*. 含有 238 bp 条带。

Fig. 4 Bands of YSKr148 microsatellite locus in individual PCR amplification

\*. Contains 238 bp bands.

出现 238 bp 条带 (图 6)。对家系 6 中的所有个体进行 SSR 差异条带分析, 统计 238 bp 差异等位基因的扩增情况 (图 7)。根据 238 bp 条带的有无对该家系的 20 个个体进行分组, 分为阳性组和阴性组, 其中阳性组分为阳性纯合组和阳性杂合组 (表 4)。经过 *t* 检验, 阳性组和阴性组之间的饲料转化率差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 进一步验证了该位

点与大菱鲂饲料转化率存在极显著相关性。另外, 阳性杂合组的平均饲料转化率略高于阳性纯合组, 差异不显著。

### 2.5 微卫星位点 YSKr148 BLAST 分析

利用 NCBI 数据库, 对微卫星 YSKr148 序列进行 BLAST 比对, 可知该位点位于大菱鲂 2 号常

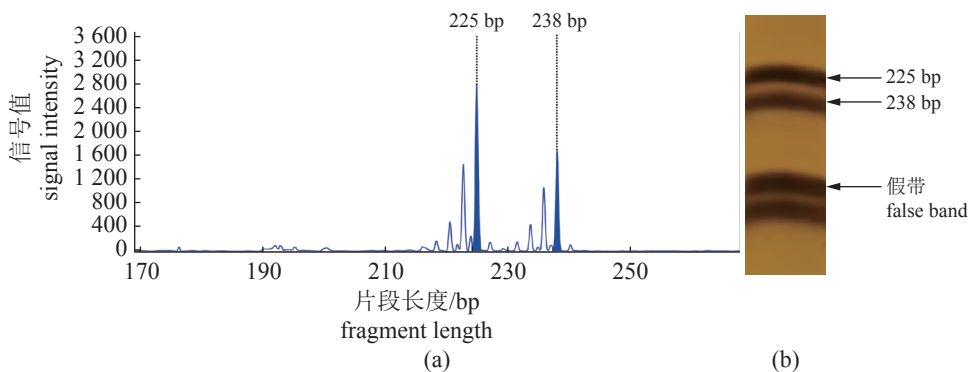


图 5 H8 个体的 STR 测序结果和聚丙烯酰胺电泳结果

(a) STR 测序结果, (b) 聚丙烯酰胺电泳结果。

Fig. 5 STR sequencing results and polyacrylamide electrophoresis results of H8 individuals

(a) STR sequencing results, (b) results of polyacrylamide electrophoresis.

表 2 YSKr148 位点不同等位基因片段在个体扩增带型中的出现次数

Tab. 2 Statistics on the frequency of different alleles at YSKr148 in individual amplification bands

片段长度/bp fragment length	H组频数 no. of group H	频率 frequency	L组频数 no. of group L	频率 frequency
218	3	0.1	4	0.13
225	21	0.7	19	0.63
238	9	0.3	1	0.03
242	18	0.6	23	0.77

表 3 YSKr148 位点等位基因与大菱鲂饲料转化率的的相关性分析

Tab. 3 Correlation between YSKr148 allele and FCR of *S. maximus*

片段长度/bp fragment length	Spearman相关系数 Spearman correlation coefficient	P值 P value	相关性 correlation
218	0.097	0.459	
225	0.069	0.598	
238	0.359	0.005	**
242	-0.276	0.033	*

注: \*表示显著相关( $P < 0.05$ ), \*\*表示极显著相关( $P < 0.01$ )。Notes: \* represents significant correlation ( $P < 0.05$ ), \*\* represents extremely significant correlation ( $P < 0.01$ ).

染色体上, 与推测的能导致肢带肌营养不良的基因 (LGMD) 存在连锁关系。

### 3 讨论

饲料转化率是水产养殖鱼类的重要经济性状, 选育具有高饲料转化率性状的新品种能够减少养殖过程中饲料的使用量, 从而降低生产成本, 提高养殖利润。本研究采用 BSA-SSR 方法对大菱鲂的饲料转化率性状进行研究, 筛选与之显著相关

的分子标记, 为该性状的分子标记辅助选育奠定基础。目前关于饲料转化率性状的研究多集中在畜禽动物方面, 在鱼类中研究较少, 其主要原因可能是鱼类具有在水中不断游动的特点, 导致获取个体饲料转化率的难度较大。而大菱鲂是一种底栖鱼类, 性格较温和, 游动较少, 本研究针对其特点设计了小网箱养殖系统, 在此基础上获得

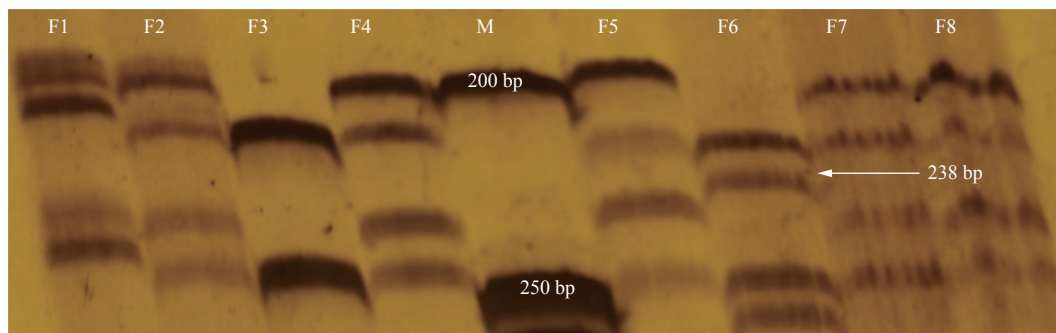


图 6 YSKr148 在 8 个全同胞家系 DNA 混池中的扩增带型 F1~F8 家系编号

Fig. 6 Amplification bands of YSKr148 in DNA mixing pool of 8 whole sib families F1-F8 family number





图7 YSKr148在20尾家系个体中的扩增带型

1~20. 个体编号。

Fig. 7 Amplification band type of YSKr148 in 20 homogeneous individuals

1-20. The individual number.

表4 家系个体分组及各组饲料转化率

Tab. 4 Results of family grouping and FCR of each group

238 bp条带 238 bp band	个体数 number of individuals	平均饲料转化率/% average FCR	标准差/% standard deviation
阳性 positive	8	135.38	11.788
阳性纯合 positive homozygous	2	129.11	4.229
阳性杂合 positive heterozygosity	6	137.88	12.999
阴性 negative	12	83.67	37.388

注: 阳性.有238 bp条带; 阳性纯合.有238 bp条带; 阳性杂合.有238 bp和另一条带; 阴性.无238 bp条带。

Notes: Positive. 238 bp band; positive homozygous. 238 bp band; positive heterozygosity. 238 bp and another band; negative. no 238 bp band.

了300个个体的饲料转化率, 结果经分析基本呈正态分布, 符合数量性状的特点。

分群分离分析法, 由 Michelmores 等<sup>[23]</sup>在1991年提出, 常用于快速鉴别与特定基因或染色体区域连锁的标记, 广泛应用于动植物的遗传研究, 目前该方法在鱼类的生长<sup>[14-15, 24]</sup>、抗逆<sup>[16]</sup>、抗病<sup>[25]</sup>等性状的工作中起到重要的作用。本研究采用这一方法筛选与大菱鲂个体饲料转化率相关的微卫星标记, 选取群体中饲料转化率最高与最低的个体构建DNA混池, 通过SSR分析在两池间寻找到具有差异条带的微卫星位点, 最后通过单个样本的SSR分析进行验证。实践证明, 相较于对样本逐一筛选, BSA的运用有效地减少了聚丙烯酰胺凝胶电泳的重复过程<sup>[26]</sup>, 缩小了需要统计的条带长度范围<sup>[16]</sup>, 减少了工作量, 提升了工作效率。另外, 分析微卫星PCR扩增产物的电泳结果, 发现存在条带过多的现象, 这与许可等<sup>[15]</sup>研究中出现的问题相似。推测其原因, 是由于报道的微卫星位点本身特异性问题而与基因组内其他位置存在一定的同源性, 因而产生一些非特异的假带, 这些假带可以通过调整PCR反应的条件来减少。本研究通过与STR测序结果对比, 以排除假带的干扰, 提高了分析结果的准确性。

一般来说, 同种类型的性状之间存在着一定

的遗传相关, 饲料转化率属于生长性状的一种, 与其他生长性状具有较强的相关性<sup>[27]</sup>。据此对大菱鲂微卫星位点进行初次筛选, 根据已有报道中与生长相关的微卫星位点<sup>[21-22]</sup>, 确定了40个位点用于本研究。从本实验的结果来看, 在40个微卫星位点中筛选到的2个差异等位基因与饲料转化率性状存在一定的相关性, 从侧面证实了筛选方法的可行性。群体验证结果发现, YSKr148位点的238 bp差异等位基因片段与饲料转化率性状存在极显著正相关, 相关性为0.359。一般来说在群体中筛选到的标记, 由于普适性问题, 并不能保证在家系内得到验证, 本研究中从8个家系中找到1个带有该等位基因的家系, 且通过比较不同基因型的表型结果证实了该等位基因与饲料转化率之间的相关性, 表明该标记的普适性良好。因此, 该微卫星标记被认为是用于大菱鲂饲料转化率分子辅助育种的优良标记。在家系验证中发现, 在YSKr148位点上携带238 bp等位基因的杂合个体的饲料转化率高纯合个体, 然而受限于家系样本有限, 是否存在杂合优势还需要进一步验证。

对微卫星YSKr148序列进行BLAST比对得知, 该位点位于大菱鲂2号常染色体上, 与推测的能导致肢带肌营养不良的基因LGMD存在连锁关系。现有的研究表明, 肢带肌营养不良是一种



与肌肉相关的常染色体遗传病<sup>[28]</sup>。李丽萍等<sup>[29]</sup>的研究表明, 斑马鱼 (*Danio rerio*) *tcap* 基因功能缺失导致 *p53* 基因下调可能是 2G 型肢带肌营养不良致病机制之一, 而肢带肌营养不良会影响斑马鱼的最大游泳速度, 与肌肉的发育有关。因此大菱鲂 YSKr148 位点表现为与饲料转化率相关, 可能与肌肉发育相关的基因连锁有关。若能够明确该基因的功能, 了解其影响大菱鲂饲料转化率的内在机制, 将会为高饲料转化率性状的选育提供极大的帮助。

综上, 本研究通过 BSA-SSR 方法对大菱鲂的饲料转化率性状进行研究, 筛选出与之极显著相关的微卫星分子标记 YSKr148, 为高饲料转化率大菱鲂的分子标记辅助选育奠定基础。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

#### 参考文献 (References):

- [1] 关长涛, 杨正勇, 王启要, 等. 大菱鲂产业发展报告[J]. 中国水产, 2021(1): 22-35.  
Guan C T, Yang Z Y, Wang Q Y, *et al.* Development report of turbot industry[J]. China Fisheries, 2021(1): 22-35 (in Chinese).
- [2] de Verdal H, Vandeputte M, Mekawiy W, *et al.* Quantifying the genetic parameters of feed efficiency in juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus*[J]. BMC Genetics, 2018, 19(1): 105.
- [3] Besson M, Allal F, Chatain B, *et al.* Combining individual phenotypes of feed intake with genomic data to improve feed efficiency in sea bass[J]. Frontiers in Genetics, 2019, 10: 219.
- [4] 杨林林. 选择性育种有利于提高虹鳟的饲料转化率[J]. 渔业信息与战略, 2017, 32(3): 230.  
Yang L L. Selective breeding favours rainbow trout feed conversion ratio[J]. Modern Fisheries Information, 2017, 32(3): 230 (in Chinese).
- [5] 鲁翠云, 匡友谊, 郑先虎, 等. 水产动物分子标记辅助育种研究进展[J]. 水产学报, 2019, 43(1): 36-53.  
Lu C Y, Kuang Y Y, Zheng X H, *et al.* Advances of molecular marker-assisted breeding for aquatic species[J]. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(1): 36-53 (in Chinese).
- [6] 鲁绍雄, 吴常信. 动物遗传标记辅助选择研究及其应用[J]. 遗传, 2002, 24(3): 359-362.  
Lu S X, Wu C X. Research and application of animal genetic marker-assisted selection[J]. Hereditas (Beijing), 2002, 24(3): 359-362 (in Chinese).
- [7] Sherman E L, Nkrumah J D, Murdoch B M, *et al.* Identification of polymorphisms influencing feed intake and efficiency in beef cattle[J]. Animal Genetics, 2008, 39(3): 225-231.
- [8] Dragos-Wendrich M, Stratil A, Hojny J, *et al.* Linkage and QTL mapping for *Sus scrofa* chromosome 18[J]. Journal of Animal Breeding and Genetics, 2003, 120(S1): 138-143.
- [9] 张燕, 黄晓灵, 季从亮, 等. 优质鸡 *GH* 基因 SNPs 与饲料转化率的关联分析[J]. 中国畜牧杂志, 2013, 49(11): 24-26.  
Zhang Y, Huang X L, Ji C L, *et al.* Association analysis of SNPs of *GH* gene and feed conversion rate in high-quality chickens[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2013, 49(11): 24-26 (in Chinese).
- [10] Zimmerman A M, Wheeler P A, Ristow S S, *et al.* Composite interval mapping reveals three QTL associated with pyloric caeca number in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. Aquaculture, 2005, 247(1-4): 85-95.
- [11] 李鸥, 曹顶臣, 张研, 等. 利用 EST-SSR 分子标记研究鲤的饲料转化率性状[J]. 水产学报, 2009, 33(4): 624-631.  
Li O, Cao D C, Zhang Y, *et al.* Studies on feed conversion ratio trait of common carp (*Cyprinus carpio* L.) using EST-SSR marker[J]. Journal of Fisheries of China, 2009, 33(4): 624-631 (in Chinese).
- [12] Powell W, Machray G C, Provan J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats[J]. Trends in Plant Science, 1996, 1(7): 215-222.
- [13] 卢钟磊, 池信才, 王义权, 等. 褐牙鲈耐热性状相关的微卫星分子标记筛选[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2007, 46(3): 396-402.  
Lu Z L, Chi X C, Wang Y Q, *et al.* The screening of microsatellites molecular Markers with correlation to heat-resistance of *Paralichthys olivaceus*[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science Edition), 2007, 46(3): 396-402 (in Chinese).
- [14] 马爱军, 邹杰, 孙建华, 等. 暗纹东方鲀生长性状相关微卫星标记筛选[J]. 海洋科学, 2016, 40(10): 16-24.  
Ma A J, Zou J, Sun J H, *et al.* Screening growth-related microsatellite markers in *Takifugu obscurus*[J]. Marine Sciences, 2016, 40(10): 16-24 (in Chinese).
- [15] 许可, 马爱军, 王新安, 等. 大菱鲂 (*Scophthalmus maximus*) 生长性状相关的微卫星标记筛选[J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(5): 577-583.  
Xu K, Ma A J, Wang X A, *et al.* Microsatellites molecular markers and the correlation to growth trait of *Scophthalmus maximus*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2009, 40(5): 577-583 (in Chinese).

- 2009, 40(5): 577-583 (in Chinese).
- [16] 马爱军, 许可, 黄智慧, 等. 大菱鲂与耐高温性状相关的微卫星标记筛选[J]. 海洋科学进展, 2011, 29(3): 370-378.  
Ma A J, Xu K, Huang Z H, *et al.* Screening of microsatellite molecular marker associated with heat-resistance of turbot (*Scophthalmus maximus* L.)[J]. Advances in Marine Science, 2011, 29(3): 370-378 (in Chinese).
- [17] 郭建丽, 田岳强, 马爱军, 等. 大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)抗鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)性状的微卫星分子标记研究[J]. 海洋与湖沼, 2015, 46(1): 157-164.  
Guo J L, Tian Y Q, Ma A J, *et al.* The screening of microsatellites molecular markers with reference to anti-*Vibrio anguillarum* of turbot *Scophthalmus maximus*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2015, 46(1): 157-164 (in Chinese).
- [18] 吴新燕, 梁宏伟, 罗相忠, 等. 长丰鲢生长性状相关微卫星标记的初步筛选[J]. 水产学报, 2022, 46(1): 20-30.  
Wu X Y, Liang H W, Luo X Z, *et al.* Preliminary screening of microsatellite DNA markers associated with growth traits in Changfeng silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2022, 46(1): 20-30 (in Chinese).
- [19] 王惠儒, 柳敏海, 油九菊, 等. 大黄鱼群体遗传多样性分析及耐低温性状相关微卫星标记的筛选[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2014, 33(1): 6-13.  
Wang H R, Liu M H, You J J, *et al.* Genetic diversity analysis and screening of microsatellite markers associated with cold tolerance of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* Richardson[J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science Edition), 2014, 33(1): 6-13 (in Chinese).
- [20] 叶华, 刘洋, 刘贤德, 等. 大黄鱼微卫星标记与生长性状的相关分析[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2014, 36(3): 27-33.  
Ye H, Liu Y, Liu X D, *et al.* Correlation analysis of microsatellite markers with growth traits in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*)[J]. Journal of Southwest University (Natural Science Edition), 2014, 36(3): 27-33 (in Chinese).
- [21] Bouza C, Hermida M, Pardo B G, *et al.* A microsatellite genetic map of the turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. Genetics, 2007, 177(4): 2457-2467.
- [22] Ruan X H, Wang W J, Kong J, *et al.* Genetic linkage mapping of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) using microsatellite markers and its application in QTL analysis[J]. Aquaculture, 2010, 308(3-4): 89-100.
- [23] Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991, 88(21): 9828-9832.
- [24] Wan S M, Xiong X M, Tomljanović T, *et al.* Identification and mapping of SNPs associated with number of intermuscular bone in blunt snout bream[J]. Aquaculture, 2019, 507: 75-82.
- [25] Zhang K, Han M, Liu Y X, *et al.* Whole-genome resequencing from bulked-segregant analysis reveals gene set based association analyses for the *Vibrio anguillarum* resistance of turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 88: 76-83.
- [26] 袁晨浩, 刘志峰, 马爱军. 红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)耐低温相关微卫星标记的初步筛选[J]. 海洋科学, 2022, 46(2): 97-104.  
Yuan C H, Liu Z F, Ma A J. Screening and identification of microsatellite markers related to low temperature tolerance in *Takifugu rubripes*[J]. Marine Sciences, 2022, 46(2): 97-104 (in Chinese).
- [27] 彭宗桃, 廖冰, 刘龙, 等. 影响矮小型蛋鸡饲料转化率的相关性状遗传参数估计[J]. 中国家禽, 2011, 33(15): 13-15.  
Peng Z T, Liao B, Liu L, *et al.* Estimation of genetic parameters of the traits related with feed conversion ratio of dwarf layers[J]. China Poultry, 2011, 33(15): 13-15 (in Chinese).
- [28] 孙顺昌, 樊绮诗, 吴华成, 等. Dysferlin缺陷: 肢带2B型肌营养不良与Miyoshi肌病的致病原因[J]. 中华医学遗传学杂志, 2004, 21(2): 128-131.  
Sun S C, Fan Q S, Wu H C, *et al.* Dysferlin deficiency: the cause of limb-girdle muscular dystrophy 2B and Miyoshi myopathy in a Chinese pedigree[J]. Chinese Journal of Medical Genetics, 2004, 21(2): 128-131 (in Chinese).
- [29] 李丽萍, 钟静, 牛玉娟, 等. 2G型肢带肌营养不良症斑马鱼疾病模型的构建[J]. 精准医学杂志, 2021, 36(4): 299-303,307.  
Li L P, Zhong J, Niu Y J, *et al.* Establishment of a zebrafish disease model of limb-girdle muscular dystrophy type 2G[J]. Journal of Precision Medicine, 2021, 36(4): 299-303,307 (in Chinese).

## Screening of microsatellite markers associated with feed conversion ratio in *Scophthalmus maximus*

CHANG Haowen<sup>1,2,3</sup>, LIU Zhifeng<sup>1,3</sup>, SUN Zhibin<sup>1,3</sup>, MA Aijun<sup>1,3\*</sup>,  
WANG Xin'an<sup>1,3</sup>, YANG Jingkun<sup>1,3</sup>, XU Rongjing<sup>4</sup>

(1. Shandong Key Laboratory of Marine Fisheries Biotechnology and Genetic Breeding,  
Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology,  
Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

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

3. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology,  
Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071, China;

4. Yantai Tianyuan Aquaculture Co., Ltd., Yantai 265617, China)

**Abstract:** Feed conversion ratio (FCR, %) is an important economic trait of turbot (*Scophthalmus maximus*). Improving feed conversion ratio through selective breeding can effectively reduce the breeding cost and improve the breeding profit, thus promoting the development of the industry. Microsatellite markers are commonly used in molecular marker-assisted breeding of fish. In order to screen out microsatellite markers related to feed conversion ratio of *S. maximus* and improve breeding efficiency, 300 juvenile *S. maximus* were used as experimental material in this study, and individual feed conversion ratio was measured through a special cage culture system. The 30 samples with the highest and lowest feed conversion ratios were selected as the high feed conversion ratio group (group H) and the low feed conversion ratio group (group L). 40 pairs of microsatellite primers were used to amplify the DNA mixed pools of *S. maximus* from groups H and L by PCR. The genotypes of individual PCR products of the two groups were counted, and the loci with different allele fragments between the two pools were screened. Through further population verification and family verification, the correlation between microsatellite loci and feed conversion ratio of *S. maximus* was analyzed. The results showed that the allele of microsatellite locus YSKr148 at 238 bp was significantly positively correlated with the feed conversion ratio of *S. maximus* ( $P < 0.01$ ), and the correlation coefficient reached 0.359. The feed conversion ratio of the positive group was significantly higher than that of the negative group in family verification ( $P < 0.01$ ). In this study, for the first time, molecular markers significantly related to feed conversion ratio of *S. maximus* were screened, which provided a basis for studying the genetic basis and related molecular mechanism of this trait, and laid a foundation for molecular marker-assisted breeding of this trait.

**Key words:** *Scophthalmus maximus*; microsatellite markers; feed conversion ratio; bulked segregant analysis (BSA)

**Corresponding author:** MA Aijun. E-mail: maaj@ysfri.ac.cn

**Funding projects:** National Key R & D Program of China (2022YFD2400403); National Natural Science Foundation of China (32002362); Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2019BC089); China Agriculture Research System (CARS-47-G01); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund of Chinese Academy of Fishery Sciences (2020TD25); Agricultural Fine Breed Project of Shandong Province (2019LZGC013)