

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.00515

## 大口黑鲈生长性状的微卫星 DNA 标记筛选

樊佳佳<sup>1,2</sup>, 白俊杰<sup>1</sup>, 李小慧<sup>1</sup>, 何小平<sup>1</sup>, 何小燕<sup>1,3</sup>, 李胜杰<sup>1</sup>, 叶星<sup>1</sup>, 吴立新<sup>2</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, 广州 510380;
2. 大连水产学院生命科学与技术学院, 大连 116023;
3. 西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100

**摘要:** 本研究在人工养殖的大口黑鲈 (*Micropterus salmoides* L.) 群体中对 40 个微卫星位点进行扩增, 运用卡方检验分析微卫星位点在极端大个体组和极端小个体组中的基因型分布差异, 选择差异显著的 16 个微卫星位点对大口黑鲈随机群体进行基因型与性状的关联分析, 同时分析群体的遗传多样性。结果表明: 关联分析得到 7 个微卫星位点 (JZL60、JZL67、JZL72、JZL124、MiSaTPW76、MiSaTPW117 和 MiSaTPW173) 与体重、体长和体高显著或极显著相关 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 同时对差异显著的位点进行不同基因型间与生长性状的多重比较, 找到了与体重、体长和体高性状相关的最有利基因型为 JZL60 位点的 AA、JZL67 位点的 BB、JZL72 位点的 AC、MiSaTPW76 位点的 BB 和 MiSaTPW117 位点的 BC。应用这 16 个微卫星位点对随机群体进行遗传多样性分析, 共检测到 47 个等位基因, 平均等位基因 2.938 个, 每个位点检测到的等位基因数为 2~5 个, 群体的平均观测杂合度、平均期望杂合度和平均多态信息含量分别为 0.515、0.500 和 0.445, 表明该群体遗传多样性处于中等水平。

**关键词:** 大口黑鲈; 微卫星; 生长性状; 关联分析; 遗传多样性

## Identification of microsatellite markers associated with growth traits in largemouth bass (*Micropterus salmoides* L.)

FAN Jia-Jia<sup>1,2</sup>, BAI Jun-Jie<sup>1</sup>, LI Xiao-Hui<sup>1</sup>, HE Xiao-Ping<sup>1</sup>, HE Xiao-Yan<sup>1,3</sup>,  
LI Sheng-Jie<sup>1</sup>, YE Xing<sup>1</sup>, WU Li-Xin<sup>2</sup>

1. Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fish Breeding & Cultivation of Chinese Academy of Fishery Sciences, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;
2. School of Life Science and Technology, Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China;
3. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

**Abstract:** Forty microsatellite loci were selected to amplify the genomic DNA of cultured stock of largemouth bass (*Micropterus salmoides* L.) in China. Genotypic differences of these microsatellites loci were analyzed using  $\chi^2$ -test between the maximal weight group and minimal weight group. Sixteen microsatellites showing significantly difference ( $P < 0.1$ ) were used in genotyping 121 individuals, and the associations between their genotypes and growth traits were examined. Microsatellite loci of JZL60, JZL67, JZL72, JZL124, MiSaTPW76, MiSaTPW117 and MiSaTPW173 were significantly associated with body weight, body length, and body height ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The most favorable genotypes for growth traits were AA at JZL60, BB at JZL67, AC at JZL72, BB at MiSaTPW76 and BC at MiSaTPW117. In addition, a total of 47

收稿日期: 2008-10-16; 修回日期: 2008-12-22

基金项目: 国家科技支撑项目 (编号: 2006BAD01A1209)、国家科技基础条件平台工作项目 (编号: 2005DKA21103) 和广东省科技计划项目 (编号: 2007B020708008) 资助

作者简介: 樊佳佳 (1983-), 女, 硕士研究生, 专业方向: 水产养殖; E-mail: fanjiajiaok@163.com

通讯作者: 白俊杰 (1957-), 男, 研究员, 研究方向: 水产动物遗传育种与生物技术。E-mail: jjbai@163.net; Tel: 020-81616129

alleles for the 16 loci were detected (2~5 alleles for each locus). The average effective number of alleles ( $A_e$ ), observed heterozygosity ( $H_o$ ), expected heterozygosity ( $H_e$ ) and mean polymorphic information content ( $PIC$ ) was 2.938, 0.515, 0.500 and 0.445, respectively, both of which indicated that the population genetic diversity was medium.

**Keywords:** largemouth bass (*Micropterus salmoides* L.); microsatellite; growth traits; association analysis; genetic diversity

微卫星DNA(也叫SSR)是近年来应用最广的分子标记之一,由于其呈共显性遗传、检测方便快捷、多态信息含量高等优点,已经被广泛应用于群体遗传结构分析、遗传图谱构建、QTL定位和标记辅助选择育种等研究领域<sup>[1,2]</sup>。微卫星应用于生长相关的遗传标记,在动植物<sup>[3,4]</sup>方面已有较多报道,在水产动物方面也取得了不少突破: Cnaani等<sup>[5]</sup>对橙色莫桑比克罗非鱼和奥利亚罗非鱼的杂交 $F_2$ 代进行微卫星位点筛选,发现位点UNH130和体长相关; Robison等<sup>[6]</sup>利用AFLP和SSR两种标记方法,定位了影响虹鳟胚胎发育速率相关的标记;国内学者在鲤鱼和对虾等水产动物上也找到了与生长性状相关联的微卫星标记<sup>[7~9]</sup>。

大口黑鲈(*Micropterus salmoides* L.)俗名加州鲈,原产于北美洲,属于鲈形目、鲈亚目、太阳鱼科、黑鲈属,具有生长快、耐低温、肉质鲜美和易捕捞等特点,是重要的淡水养殖鱼类之一。从上世纪70年代开始推广到世界各地,1983年从台湾引种到广东省,现在全国大部分地区均有养殖。然而由于引种二十多年未经有效的选育和种质保护,大口黑鲈养殖群体的遗传多样性已有降低,种质出现严重退化现象<sup>[10~13]</sup>。为促进大口黑鲈养殖业的可持续健康发展,迫切需要对其开展选择育种工作。标记辅助选择育种(Marker-assisted selection, MAS)是根据与某一性状紧密连锁的标记的出现来推断该性状从而进行选育,它不是根据表型而是在DNA水平上进行选择,可以大大提高选择的准确性,并可在早期鉴定出具有优良性状的个体,筛选优良亲本,从而缩短育种周期,加快育种进程。本实验拟利用已获得的微卫星标记,分析其与大口黑鲈体重、体长和体高3个性状的相关性,旨在寻找与大口黑鲈生长性状相关联的分子标记,为下一步大口黑鲈分子标记辅助选择育种工作奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验鱼群体

2006年11月,从广东顺德南水大口黑鲈养殖基地选择亲鱼300对,笠年3月对所选择的亲鱼进行人工繁殖,繁殖后代在同一养殖池塘中进行培育。同年12月份选择该养殖池塘中的大口黑鲈成鱼160尾,建立体重的正态分布图(图1),取15%的高值个体即体重为750g以上的记为“极端大群体”,15%低值个体即体重为315g以下的记为“极端小群体”,从这两个群体中各随机选择12尾用于与生长相关微卫星标记的初步筛选。另从相同的养殖池中随机选择121尾大口黑鲈,用于生长性状关联分析,此121尾大口黑鲈记为“随机群体”。121尾大口黑鲈均测量体重、体长和体高生长数据,同时尾静脉活体取血,加入ACD抗凝剂,保存于-20℃备用。

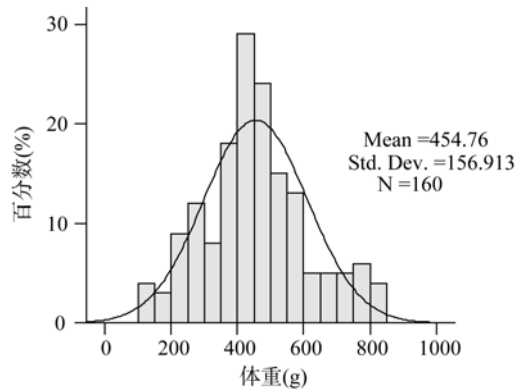


图1 体重的正态分布图

#### 1.1.2 微卫星引物

选用40个大口黑鲈微卫星标记(引物信息见表1),其中,22个来自本实验室通过磁珠富集法获得的微卫星标记<sup>[11]</sup>,18个来自Lutz-Carrillo等<sup>[14]</sup>发表的微卫星标记。经鉴定,这些标记在本实验群体中

表1 微卫星引物重复序列、序列、等位基因及复性温度

位点	重复序列	引物序列 (5' 3')		等位基因	复性温度( )
<i>JZL31</i>	(CA) <sub>25</sub>	F:TGGACTGAGGCTACAGCAGA	R:CCAAGAGAGTCCCAAATGGA	3	60
<i>JZL37</i>	(CA) <sub>24</sub>	F:TCCAGCCTTCTTGATTCTC	R:CCCGTTTAGCCAGAGAAGTG	2	56
<i>JZL43</i>	(CA) <sub>21</sub>	F:GCTGCGAGTGC GTGTA ACTA	R:GGGAAGCGAGAGTCAGAGTG	2	58
<i>JZL48</i>	(GT) <sub>13</sub>	F:TCGACGATCAATGGACTGAA	R:TCTGGACAACACAGGTGAGG	2	55
<i>JZL60</i>	(CA) <sub>21</sub>	F:AGTTAACCCGCTTTGTGCTG	R:GAAGGCGAAGAAGGGAGAGT	3	60
<i>JZL67</i>	(CA) <sub>16</sub>	F:CCGCTAATGAGAGGGAGACA	R:ACAGACTAGCGTCAGCAGCA	4	60
<i>JZL68</i>	(CA) <sub>20</sub>	F:AGGCACCGTCTTCTCTTCA	R:CATTGTGGGTGCATTCTCC	3	58
<i>JZL71</i>	(GT) <sub>21</sub>	F:GCAGCTTCAGGTGTGTGTT	R:TCGGTGAACCTCTGTCAGG	2	60
<i>JZL72</i>	(CA) <sub>21</sub>	F:AGGGTTCATGTTCATGGTAG	R:ACACAGTGGCAAATGGAGGT	3	58
<i>JZL83</i>	(CA) <sub>23</sub>	F:TGTGGCAAAGACTGAGTGGA	R:ATTTCTCAACGTGCCAGGTC	3	55
<i>JZL84</i>	(CA) <sub>20</sub>	F:GAAAACAGCCTCGGGTGTA	R:CATTGTGTGCTGCGTCTGTT	3	55
<i>JZL85</i>	(CA) <sub>17</sub>	F:GGGGCTCACTCACTGTGTTT	R:GTGCGCAGACAGCTAGACAG	3	56
<i>JZL105</i>	(GT) <sub>13</sub>	F:GTGTCCCTGACTGTATGGC	R:TCTGATGAGGCTGTGAAAT	2	58
<i>JZL106</i>	(GT) <sub>35</sub>	F:GCAGGCAGTGAACCCAGATT	R:TATGTATTGACGAGCGAGCAG	3	54
<i>JZL108</i>	(CA) <sub>17</sub>	F:GTGACAGATGAGCGGAGAA	R:GATGCTTGAGATACGACTA	2	55
<i>JZL111</i>	(GT) <sub>27</sub>	F:TGTCTCAACTCCACCTACG	R:CACCCTGGCTTCATCTGC	3	52
<i>JZL114</i>	(GA) <sub>11</sub> (GT) <sub>17</sub>	F:CTACAGGTTAGGGAGTTACACG	R:TGCTGAGGACACAACGAGGT	2	55
<i>JZL124</i>	(CA) <sub>28</sub> (CT) <sub>25</sub>	F:GCATTCATACACCATCATTG	R:AGCATTTTGTGTCAGACCACC	3	50
<i>JZL126</i>	(AC) <sub>24</sub>	F:CAGGTAGCAGCGTTAGGATG	R:TCTGAAACACGGACTCACGAC	2	55
<i>JZL127</i>	(CA) <sub>15</sub>	F:CAGAGAGATAGTGTCAACCA	R:ACCACGGAGAAAGCCATT	3	52
<i>JZL131</i>	(CA) <sub>8</sub>	F:CAAATGCCCGGTCCACAATAAC	R:GTATTTGAGCCGGATGATAAGTG	2	55
<i>JZL132</i>	(GT) <sub>11</sub>	F:CAAATGCCCGGTCCACAATAAC	R:GTATTTGAGCCGGATGATAAGTG	3	55
<i>Lma10</i>	(TG) <sub>10</sub> (TATGTG) <sub>4</sub>	F:GTCTGTAAGTGTGTTTGCTG	R:GAAACCCGAAACTTGTCTAG	3	55
<i>Lma120</i>	(GT) <sub>28</sub>	F:TGTCCACCCAACTTAAGCC	R:TAAGCCCATTCCTCAATCTCC	2	54
<i>MiSaTPW01</i>	(AC) <sub>16</sub>	F:AGTAAAGGACCACCTTGTCCA	R:GCCTGGTCATTAGGTTTCGGAG	3	56
<i>MiSaTPW11</i>	(AGAT) <sub>13</sub>	F:CAACATGGACGCTACTAT	R:CAACCATCACATGCTTCT	2	55
<i>MiSaTPW12</i>	(AGAT) <sub>21</sub>	F:CGGTTGCAAATTAGTCATGGCT	R:CAGGGTGCTCGCTGTCT	2	48
<i>MiSaTPW25</i>	(AGAT) <sub>11</sub>	F:CCAAGGTCAGGTTTAAC	R:ACCTTTGTGCTGTTCTGTC	2	55
<i>MiSaTPW51</i>	(AGAT) <sub>31</sub>	F:CACAGAGACATTGCAGCTGACCT	R:TGACGTATAGTACCAGCTGTGGT	2	55
<i>MiSaTPW70</i>	(AGAT) <sub>43</sub>	F:ACTTCGCAAAGGTATAAC	R:CCTCATGCAGAAAGATGTAA	2	55
<i>MiSaTPW76</i>	(AGAT) <sub>22</sub> (AGAC) <sub>10</sub>	F:ACACAGTGTGAGTTCTGCA	R:GTGAATACCTCAGCAAGCAT	2	48
<i>MiSaTPW90</i>	(ACAT) <sub>6</sub>	F:TGCCAGAGATCCTGAGCTAC	R:CACCTTACCTGAATAACCAGAGACA	2	48
<i>MiSaTPW96</i>	(AGAT) <sub>15</sub> (AGAC) <sub>6</sub>	F:CTTCTAAATGTGTGAGGGTTGC	R:AGCTTAGCATAAAGACTGGGAAC	2	55
<i>MiSaTPW117</i>	(AC) <sub>24</sub>	F:TGTGAAAGGCACAACACAGCTGCR	R:ATCGACCTGCAGACCAGCAACACT	3	55
<i>MiSaTPW123</i>	(AC) <sub>22</sub>	F:GCTAACTTAATCTGCTGGATGGTG	R:TGAACCTTCATAGGACAGCC	2	55
<i>MiSaTPW157</i>	(AC) <sub>21</sub>	F:GACCTCAATGCGGATACTGTGACC	R:AGGCACTCATCTGAATTGTCCATGT	5	55
<i>MiSaTPW165</i>	(AC) <sub>16</sub>	F:GTTTCGATCTGAATGCATGTGGTG	R:TGAAGGTATTAGCCTCAGCCTACA	3	55
<i>MiSaTPW173</i>	(AC) <sub>15</sub>	F:CCACACAGTGACACAACTGTGC	R:GCCATTGTGCTGCTGCAGAG	4	55
<i>MiSaTPW184</i>	(AC) <sub>14</sub> (CT) <sub>10</sub>	F:TTGTATACCAAGTGACCTGTGG	R:GGGAGTGCATCTTTCTGAAGTGCC	3	55
<i>Mdo6</i>	(CA) <sub>7</sub> (TA) <sub>4</sub>	F:TGAAATGTACGCCAGAGCAG	R:TGTGTGGGTGTTTATGTGGG	2	55

均具有多态性且分型效果好。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

## 1.2 方法

### 1.2.1 基因组的提取

参照天根离心柱型基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生物科技有限公司)说明书介绍的方法提取样品基因组 DNA。0.8%的琼脂糖凝胶电泳和分光光度计检测 DNA 质量和浓度,保存于-20 备用。

### 1.2.2 PCR 反应程序

PCR 反应总体积为 20  $\mu$ L, 含有 10 $\times$ buffer 2.0  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub>(25 mmol/L)0.8  $\mu$ L; dNTP(10  $\mu$ mol/L)0.3  $\mu$ L; 上下游引物(20  $\mu$ mol/L)各 0.5  $\mu$ L; 基因组 DNA 40 ng; Taq 酶(上海申能博彩生物科技有限公司)1 U; 在 PTC-200 扩增仪扩增, 扩增程序为 94 预变性 4 min, 然后 25 个循环(94 变性 30 s, 48~60 复性 30 s, 72 延伸 30 s), 最后 72 延伸 7 min。8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测、硝酸银染色, 扫描记录电泳图谱。

## 1.3 数据分析

### 1.3.1 遗传多样性分析

用 AlphaEase FC(Stand Alone)软件分析微卫星条带大小。根据电泳图上 DNA 泳动距离判断个体的基因型。统计每个微卫星位点的等位基因数, 用 Popgene(Version 3.2)进行数据处理, 计算以下参数:

有效等位基因数( $N_e$ ):  $N_e = 1 / \sum_{i=1}^n P_i^2$ ;

平均观测杂合度( $H_0$ ):  $H_0$ =观察到的杂合子数/观察个体总数;

平均期望杂合度( $H_e$ ):  $H_e = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$ ;

平均多态信息含量(PIC):  $PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2(P_i P_j)^2$ ;

式中  $P_i$  和  $P_j$  分别为群体中第  $i, j$  个等位基因频率,  $n$  为等位基因数。

### 1.3.2 卡方检验与标记-性状相关性分析

采用 SPSS15.0 软件对实验数据进行统计分析。运用卡方检验, 对 40 个微卫星位点在大口黑鲈极端大群体和极端小群体中的分布进行初步筛选。应用一般线性模型(General linear models, GLM)过程对大口黑鲈生长性状与初步筛选的微卫星位点的关联性进行最小二乘分析, 并对同一标记的各基因型进

行多重比较。

采用  $y_{ij} = \mu + a_i + e_{ij}$  线性模型公式, 进行最小二乘分析。式中  $y_{ij}$  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。由于一些微卫星位点中某些基因型出现频率太少, 不具有统计分析意义, 因此, 在实际统计分析中, 每种基因型的样本数应在 4 次以上观察值时, 才被考虑。

## 2 结果与分析

### 2.1 与大口黑鲈体重、体长、体高关联的微卫星位点的初步筛选

从卡方检验分析结果(表 2)可以看出, 在所选择的 40 个微卫星位点中, 有 16 个微卫星位点(表 2 中下划线的)的基因型分布, 在极端大个体组和极端小个体组的差异趋近于显著( $P < 0.1$ )。其中, JZL60、MiSaTPW76 和 MiSaTPW117 差异极显著( $P < 0.01$ ), JZL67、JZL72、JZL106、JZL108、JZL124、JZL127 和 MiSaTPW173 差异显著( $P < 0.05$ ), JZL37、JZL85、JZL126、JZL131、MiSaTPW70 和 MiSaTPW96 差异趋近于显著( $0.05 < P < 0.1$ )。这 16 个微卫星位点将用于下一步随机群体的验证分析。

### 2.2 与大口黑鲈体重、体长、体高关联的微卫星位点的验证

利用最小二乘法对微卫星位点与大口黑鲈体重、体长、体高性状进行关联性分析(表 3), 在 16 个微卫星位点中, JZL60、JZL67、JZL72、MiSaTPW76、MiSaTPW117 和 MiSaTPW173 与体重、体长、体高呈显著或极显著相关( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 而 JZL124 仅与体长显著相关( $P < 0.05$ )。对差异显著的位点进行不同基因型间与生长性状的多重比较(表 4)结果显示, 位点 JZL60 的基因型 AA 个体的 3 个性状的均值显著或极显著高于基因型 BC、AC 个体( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 同样看出具有 A 等位基因个体各性状均值均高于具有 C 等位基因的个体, 推测等位基因 A 对 3 种生长性状起正面影响; 位点 JZL67 基因型 BB 个体的 3 个性状均值均极显著高于基因型 AC 和 AA( $P < 0.01$ ), 同样看出等位基因 B 对 3 种性状起正面影响, 而等位基因 C 对 3 种性状起负面影响; 位点 JZL72 基因型 AC 在体重、体长和体高性状均值均显著或极显著高于其他基因型( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),

表2 微卫星位点在极大群体和极小群体中基因型分布的卡方检验

位点	<sup>2</sup> 值	P 值	位点	<sup>2</sup> 值	P 值
<i>JZL31</i>	5.371	0.121	<i>JZL131</i>	8.961	0.089
<i>JZL37</i>	5.790	0.055	<i>JZL132</i>	1.667	0.422
<i>JZL43</i>	1.955	0.376	<i>Lma10</i>	9.133	0.104
<i>JZL48</i>	0.670	0.413	<i>Lma120</i>	1.424	0.404
<i>JZL60</i>	14.37	0.006	<i>MiSaTPW01</i>	0.000	1.000
<i>JZL67</i>	8.578	0.047	<i>MiSaTPW11</i>	1.067	0.484
<i>JZL68</i>	0.715	0.699	<i>MiSaTPW12</i>	2.911	0.233
<i>JZL71</i>	1.200	0.273	<i>MiSaTPW25</i>	0.000	1.000
<i>JZL72</i>	13.13	0.022	<i>MiSaTPW51</i>	0.689	0.406
<i>JZL83</i>	1.530	0.675	<i>MiSaTPW70</i>	13.13	0.069
<i>JZL84</i>	2.311	0.379	<i>MiSaTPW76</i>	18.87	0.001
<i>JZL85</i>	9.262	0.055	<i>MiSaTPW90</i>	0.345	0.842
<i>JZL105</i>	2.053	0.289	<i>MiSaTPW96</i>	4.534	0.100
<i>JZL106</i>	8.985	0.011	<i>MiSaTPW117</i>	13.73	0.008
<i>JZL108</i>	5.042	0.020	<i>MiSaTPW123</i>	2.441	0.295
<i>JZL111</i>	1.733	0.545	<i>MiSaTPW157</i>	8.939	0.347
<i>JZL114</i>	6.479	0.831	<i>MiSaTPW165</i>	5.471	0.242
<i>JZL124</i>	2.129	0.039	<i>MiSaTPW173</i>	15.08	0.035
<i>JZL126</i>	5.137	0.055	<i>MiSaTPW184</i>	3.041	0.219
<i>JZL127</i>	9.803	0.044	<i>Mdo6</i>	3.452	0.178

注: “-” 表示此位点 $P<0.1$ 。

表3 微卫星位点与大口黑鲈体重、体长、体高性状的关联性

位点	体重	体长	体高
<i>JZL37</i>	0.497	0.450	0.478
<i>JZL60</i>	0.048*	0.059	0.045*
<i>JZL67</i>	0.011*	0.002**	0.002**
<i>JZL72</i>	0.001**	0.012*	0.001**
<i>JZL85</i>	0.540	0.272	0.546
<i>JZL106</i>	0.113	0.093	0.081
<i>JZL108</i>	0.923	0.726	0.762
<i>JZL126</i>	0.780	0.858	0.635
<i>JZL124</i>	0.059	0.049*	0.089
<i>JZL127</i>	0.573	0.448	0.547
<i>MiSaTPW70</i>	0.161	0.503	0.385
<i>MiSaTPW76</i>	0.000**	0.000**	0.000**
<i>MiSaTPW96</i>	0.835	0.631	0.846
<i>MiSaTPW117</i>	0.086	0.097	0.089
<i>MiSaTPW173</i>	0.050*	0.022*	0.032*
<i>Mdo6</i>	0.650	0.254	0.435

注: 表中数值为性状(体重、体长和体高)与微卫星位点关联分析的概率值。上标 “\*” 和 “\*\*” 分别代表性状与标记呈显著相关( $P<0.05$ )和极显著相关( $P<0.01$ ), 没有上标标注的数据代表性状和标记不相关( $P>0.05$ )。

推测基因型 *AC* 属于优势基因型; 位点 *MiSaTPW76* 基因型 *BB* 个体的 3 个性状的均值均明显高于基因型 *CC*、*BC*、*AA* 和 *AC*( $P<0.01$ ), 基因型 *CC* 和 *BC* 均值明显高于基因型 *AA* 和 *AC*( $P<0.01$ ), 推测等位基因 *B* 对 3 种性状有正效应; 位点 *MiSaTPW117* 基因型 *BC* 个体各性状均值显著高于基因型 *BB* 和 *AC*( $P<0.05$ ), 其他基因型之间均不存在显著差异, 推测基因型 *BC* 属于优势基因型; 标记 *MiSaTPW173* 基因型 *BC* 在体重、体长、体高的均值均显著或极显著低于其他基因型( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ), 推测 *BC* 属于负效基因型。

表4 微卫星位点不同基因型与体重、体长、体高的多重比较

位点	基因型	个体数	体重(g)	体长(cm)	体高(cm)
JZL60	AA	9	547.9 ± 63.49 <sup>a</sup>	27.80 ± 1.03 <sup>a</sup>	9.14 ± 0.47 <sup>Aa</sup>
	AB	41	493.4 ± 29.74 <sup>ab</sup>	25.75 ± 0.48 <sup>abd</sup>	8.48 ± 0.22 <sup>ABac</sup>
	BB	20	476.2 ± 42.59 <sup>abd</sup>	25.88 ± 0.69 <sup>ab</sup>	8.37 ± 0.31 <sup>ABabc</sup>
	BC	30	464.4 ± 34.77 <sup>bcd</sup>	25.36 ± 0.56 <sup>bcd</sup>	8.38 ± 0.26 <sup>ABabc</sup>
	AC	18	361.4 ± 44.89 <sup>c</sup>	23.83 ± 0.73 <sup>c</sup>	7.57 ± 0.33 <sup>Bb</sup>
JZL67	BB	7	648.6 ± 69.82 <sup>Aa</sup>	28.60 ± 1.13 <sup>Aa</sup>	9.82 ± 0.51 <sup>Aa</sup>
	BC	9	532.4 ± 61.57 <sup>ABab</sup>	26.51 ± 0.99 <sup>ABab</sup>	8.77 ± 0.44 <sup>ABab</sup>
	AB	46	489.3 ± 27.23 <sup>ABb</sup>	26.02 ± 0.44 <sup>ABb</sup>	8.57 ± 0.19 <sup>ABb</sup>
	AC	22	437.1 ± 39.38 <sup>Bb</sup>	24.99 ± 0.63 <sup>Bb</sup>	8.09 ± 0.28 <sup>Bb</sup>
JZL72	AA	34	422.0 ± 31.68 <sup>Bb</sup>	24.70 ± 0.51 <sup>Bb</sup>	7.98 ± 0.23 <sup>Bb</sup>
	AC	4	802.5 ± 90.03 <sup>A</sup>	29.73 ± 1.51 <sup>Aa</sup>	10.66 ± 0.66 <sup>A</sup>
	AA	5	482.8 ± 80.53 <sup>B</sup>	25.42 ± 1.35 <sup>ABb</sup>	8.23 ± 0.59 <sup>B</sup>
	AB	41	461.1 ± 28.12 <sup>B</sup>	25.71 ± 0.47 <sup>ABb</sup>	8.42 ± 0.21 <sup>B</sup>
	BB	58	439.6 ± 23.64 <sup>B</sup>	25.06 ± 0.39 <sup>Bb</sup>	8.13 ± 0.18 <sup>B</sup>
JZL124	BC	10	428.0 ± 56.94 <sup>B</sup>	24.58 ± 0.96 <sup>Bb</sup>	7.86 ± 0.42 <sup>B</sup>
	AB	27	495.4 ± 37.31 <sup>a</sup>	26.12 ± 0.61 <sup>a</sup>	8.64 ± 0.27 <sup>a</sup>
	AA	26	493.0 ± 38.02 <sup>a</sup>	26.10 ± 0.61 <sup>ac</sup>	8.55 ± 0.28 <sup>a</sup>
	CC	6	475.0 ± 79.14 <sup>a</sup>	25.00 ± 1.28 <sup>abc</sup>	8.24 ± 0.58 <sup>a</sup>
	BC	32	472.8 ± 34.27 <sup>a</sup>	25.66 ± 0.55 <sup>abc</sup>	8.35 ± 0.25 <sup>a</sup>
MiSaTPW76	BB	10	432.5 ± 61.30 <sup>a</sup>	24.85 ± 0.99 <sup>abc</sup>	8.09 ± 0.45 <sup>a</sup>
	AC	20	401.0 ± 43.35 <sup>a</sup>	24.22 ± 0.71 <sup>b</sup>	7.85 ± 0.32 <sup>a</sup>
	BB	10	658.9 ± 55.93 <sup>A</sup>	28.64 ± 0.91 <sup>A</sup>	9.74 ± 0.41 <sup>Aa</sup>
	CC	39	489.5 ± 28.32 <sup>B</sup>	25.97 ± 0.46 <sup>B</sup>	8.54 ± 0.21 <sup>ABb</sup>
	BC	42	485.8 ± 27.29 <sup>BD</sup>	25.87 ± 0.44 <sup>BD</sup>	8.52 ± 0.20 <sup>BDbd</sup>
MiSaTPW117	AA	10	366.5 ± 55.93 <sup>BCD</sup>	24.20 ± 0.91 <sup>BCD</sup>	7.70 ± 0.41 <sup>BCDbcd</sup>
	AC	20	338.6 ± 39.54 <sup>C</sup>	23.01 ± 0.64 <sup>C</sup>	7.24 ± 0.29 <sup>Cc</sup>
	BC	47	521.9 ± 27.57 <sup>Aa</sup>	26.47 ± 0.45 <sup>a</sup>	8.79 ± 0.20 <sup>a</sup>
	AB	13	467.5 ± 52.42 <sup>ABab</sup>	25.23 ± 0.86 <sup>ab</sup>	8.26 ± 0.39 <sup>ab</sup>
	CC	23	466.7 ± 39.41 <sup>ABab</sup>	25.47 ± 0.65 <sup>ab</sup>	8.25 ± 0.29 <sup>ab</sup>
MiSaTPW173	BB	23	425.6 ± 39.41 <sup>ABb</sup>	24.67 ± 0.65 <sup>b</sup>	8.04 ± 0.29 <sup>b</sup>
	AC	13	359.9 ± 52.42 <sup>Bb</sup>	24.32 ± 0.86 <sup>b</sup>	7.73 ± 0.39 <sup>b</sup>
	AB	6	572.0 ± 76.78 <sup>A</sup>	27.30 ± 1.24 <sup>Aa</sup>	9.30 ± 0.56 <sup>Aa</sup>
	CD	20	515.2 ± 42.06 <sup>A</sup>	26.41 ± 0.68 <sup>Aa</sup>	8.70 ± 0.31 <sup>Aa</sup>
	CC	5	510.7 ± 84.11 <sup>A</sup>	25.70 ± 1.36 <sup>ABCabc</sup>	8.52 ± 0.62 <sup>ABCa</sup>
	BD	25	494.5 ± 37.62 <sup>AC</sup>	26.28 ± 0.61 <sup>ACa</sup>	8.66 ± 0.28 <sup>ACa</sup>
	DD	7	488.2 ± 71.09 <sup>ABC</sup>	26.05 ± 1.15 <sup>ABCa</sup>	8.44 ± 0.52 <sup>ABCabc</sup>
	AC	7	439.6 ± 71.09 <sup>ABC</sup>	24.06 ± 1.15 <sup>ABCabc</sup>	7.81 ± 0.52 <sup>ABCabc</sup>
	AD	6	533.8 ± 76.78 <sup>A</sup>	25.82 ± 1.24 <sup>ABCabc</sup>	8.62 ± 0.56 <sup>ABCa</sup>
	BB	11	451.0 ± 56.71 <sup>ABC</sup>	25.88 ± 0.92 <sup>ABCac</sup>	8.48 ± 0.42 <sup>ABCac</sup>
	BC	26	348.7 ± 36.88 <sup>B</sup>	23.41 ± 0.59 <sup>Bb</sup>	7.44 ± 0.27 <sup>Bb</sup>

注: 表中数值分别为各性状的平均值(LSM.) ± 标准差(SD.)。同一列数值中, 上标含相同字母者表示两种基因型之间差异不显著( $P>0.05$ ), 不同小写字母代表差异显著( $P<0.05$ ), 不同大写字母代表差异极显著( $P<0.01$ )。

### 2.3 群体的遗传多样性分析

利用在极端大个体组和极端小个体组中基因型分布差异显著的 16 个微卫星位点, 对随机群体进行扩增(表 5), 共检测到 47 个等位基因, 平均等位基因

数为 2.938 个, 每个位点检测到的等位基因数为 2~5 个, 有效等位基因数在 1.456~3.535 之间, 平均值为 2.142; 平均观测杂合度为 0.515(0.250~0.783); 平均期望杂合度为 0.500(0.254~0.720); 平均多态信息含量为 0.445(0.218~0.685)。

表5 大口黑鲈遗传多样性的微卫星位点分析

位点	等位基因数 ( <i>n</i> )	有效等位基因 ( <i>Ne</i> )	观测杂合度 ( <i>H<sub>o</sub></i> )	期望杂合度 ( <i>H<sub>e</sub></i> )	多态信息含量 ( <i>PI</i> C)
<i>JZL37</i>	2	1.456	0.339	0.314	0.264
<i>JZL60</i>	3	2.767	0.736	0.641	0.575
<i>JZL67</i>	3	2.378	0.636	0.582	0.524
<i>JZL72</i>	3	1.870	0.455	0.467	0.410
<i>JZL85</i>	3	1.816	0.430	0.451	0.442
<i>JZL106</i>	3	1.496	0.364	0.333	0.306
<i>JZL108</i>	2	1.332	0.292	0.254	0.218
<i>JZL124</i>	3	2.908	0.653	0.659	0.606
<i>JZL126</i>	2	1.385	0.250	0.284	0.239
<i>JZL127</i>	3	2.165	0.542	0.550	0.502
<i>JZL131</i>	3	1.986	0.583	0.507	0.373
<i>MiSaTPW70</i>	5	2.575	0.603	0.614	0.599
<i>MiSaTPW76</i>	3	2.338	0.512	0.575	0.525
<i>MiSaTPW96</i>	2	1.753	0.458	0.439	0.337
<i>MiSaTPW117</i>	3	2.506	0.603	0.603	0.521
<i>MiSaTPW173</i>	4	3.535	0.783	0.720	0.685
平均值( <i>LSM</i> .)	2.938	2.142	0.515	0.500	0.445
标准差( <i>SD</i> .)	0.772	0.622	0.155	0.144	0.144

### 3 讨 论

#### 3.1 分析方法

应用分子标记对水产动物目标性状进行关联分析的方法归纳为两种,一种是分离群体标记关联分析法,另一种是随机选择群体标记关联分析法。这两种方法在水产动物研究方面都有应用。Gross等<sup>[15]</sup>和Kang等<sup>[16]</sup>在研究大西洋鲑和褐牙鲈的生长激素多态与体重关联时,就是利用分离群体标记关联分析法,根据体重把实验群体分为小个体组、中间个体组和大个体组,通过检测多态位点的等位基因和基因型频率在这三组中的分布差异来判断生长激素多态位点是否影响体重。张天时等<sup>[9]</sup>同样采用这种方法筛选出与体重关联的微卫星标记。分离群体标记关联分析法可以快速获得与目的性状连锁的分子标记,缺点是灵敏度和精确度都较低<sup>[17]</sup>;后一种方法应用相对较广泛,如罗非鱼的抗寒和体重标记的筛选<sup>[5]</sup>,斑点叉尾鮰的饲料转化率和抗斑点叉尾鮰肠道败血症病性状相关联标记的获得<sup>[18]</sup>,牙鲈的抗牙鲈淋巴囊肿病毒病相关联的标记获得<sup>[19]</sup>等。这种方法是把筛选的标记在所选的群体中进行扩增,通过方差分析找到与目标性状相关联的标记。随机选择群体标记关联分析法的优点是可以全面分析所选

用的标记,准确度和精确度较好,缺点是需要检测的DNA量大和分析费用较高<sup>[17]</sup>。

本实验结合上述两种方法,即先寻找极大和极小群体中基因型分布差异显著的多态标记,然后将这些差异显著的标记在随机群体中进行关联分析,验证极端群体中筛选的标记的有效性。结果表明,筛选到的在极大群体和极小群体的基因型分布趋向差异的16个微卫星位点中,有7个位点在其后的随机群体与生长性状关联的检验中呈现出差异显著,这7个位点均属于初筛差异显著( $P<0.05$ )的标记,这一结果说明用极端群体进行初筛可以提高标记筛选的效率。若仅仅用后一种方法进行筛选,需要分析所有筛选的微卫星位点与随机个体的关联性,会大大增加工作量。把这两种方法相结合既可提高标记筛选的效率,又可提高标记与性状的相关性。

#### 3.2 与生长性状显著相关的微卫星标记

标记-性状连锁分析,是指根据标记位点的基因型和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<sup>[20]</sup>。本研究结果显示微卫星位点*JZL60*、*JZL67*、*JZL72*、*MiSaTPW76*、*MiSaTPW117*和*MiSaTPW173*与大口黑鲈的体重、体长和体高性状显著相关,而位点*JZL124*仅与体长显著相关。其中,位点*JZL60*的AA基因型、



JZL67 的 BB 基因型、JZL72 的 AC 基因型、MiSaTPW76 的 BB 基因型和 MiSaTPW117 的 BC 基因型的个体生长性状均极显著高于同一标记的其他基因型的个体, 通过这几种基因型可以对生长性状进行间接选择。本实验首次鉴定出与大口黑鲈生长性状相关的微卫星标记, 下一步工作将对所得的微卫星标记结果进一步的分析, 探讨其能否作为大口黑鲈标记辅助育种的有效分子标记。

### 3.3 大口黑鲈养殖群体的遗传多样性

平均等位基因数( $N_e$ )、基因杂合度( $H_o$ 、 $H_e$ )和多态信息含量( $PIC$ )都是反映群体多样性的较好指标, 其均为数值越大, 表明群体多样性水平越高。本实验选择的养殖群体的  $N_e=2.938$ ,  $H_o=0.515$ ,  $H_e=0.5$ ,  $PIC=0.445$ , 遗传多样性属中等水平, 高于广州大口黑鲈养殖群体的遗传多样性水平<sup>[11, 12]</sup>。本实验用于分析遗传多样性的微卫星标记与梁等<sup>[11]</sup>和 Bai 等<sup>[12]</sup>用到的微卫星标记不同, 属于中度或高度多态性, 而这两位学者所选择的微卫星标记均是随机选择的, 其中包含低度多态性微卫星, 推测这是造成差异的主要原因。

### 参考文献(References):

- [1] 代金霞. 微卫星 DNA 标记技术及其应用. 农业科学研究, 2005, 26(1): 67–70.
- [2] Zane L, Bargellon L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol Ecol*, 2002, 11(1): 1–16. [\[DOI\]](#)
- [3] Dekkers JC. Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons. *J Anim Sci*, 2004, 82(E-Suppl): 313–328.
- [4] 王建民, 岳文斌, 秦孜娟, 曲绪仙, 马月辉. 绵羊微卫星标记与生长性状的相关研究. 畜牧兽医学报, 2007, 38(11): 1160–1167.
- [5] Cnaani A, Hallerman EM, Ron M, Weller JI, Indelman M, Kashi Y, Gall GAE, Hulata G. Detection of a chromosomal region with two quantitative trait loci, affecting cold tolerance and fish size, in an  $F_2$  tilapia hybrid. *Aquaculture*, 2003, 223(1–4): 117–128. [\[DOI\]](#)
- [6] Robison BD, Wheeler PA, Sundin K, Sikka P, Thorgaard GH. Composite interval mapping reveals a major locus influencing embryonic development rate in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Hered*, 2001, 92(1): 16–22. [\[DOI\]](#)
- [7] 孙效文, 鲁翠云, 匡友谊, 金万昆, 沈俊宝, 朱晓东, 李大宇, 马海涛, 于冬梅. 镜鲤两个繁殖群体的遗传结构和几种性状的基因型分析. 水产学报, 2007, 31(3): 273–279.
- [8] 张义凤, 张研, 鲁翠云, 曹顶臣, 孙效文. 鲤鱼微卫星标记与体重、体长和体高性状的相关分析. 遗传, 2008, 30(5): 613–619.
- [9] 张天时, 刘萍, 李健, 孔杰, 王清印. 中国对虾与生长性状相关微卫星 DNA 分子标记的初步研究. 海洋水产研究, 2006, 27(5): 201–209.
- [10] 梁素娴, 白俊杰, 叶星, 劳海华, 简清. 养殖大口黑鲈的遗传多样性分析. 大连水产学院学报, 2007, 22(4): 260–263.
- [11] 梁素娴, 孙效文, 白俊杰, 高峻生. 微卫星标记对中国引进加州鲈养殖群体遗传多样性的分析. 水生生物学报, 2008, 32(5): 80–86.
- [12] Lutz-Carrillo DJ, Nice CC, Bonner TH, Forstner MRJ. Admixture analysis of Florida largemouth bass and northern largemouth bass using microsatellite loci. *Transact Am Fish Soc*, 2006, 135(1): 779–791. [\[DOI\]](#)
- [13] Bai JJ, Lutz-Carrillo DJ, Quan YC, Liang SX. Taxonomic status and genetic diversity of cultured largemouth bass *Micropterus salmoides* in China. *Aquaculture*, 2008, 278(1–4): 27–30. [\[DOI\]](#)
- [14] Lutz-Carrillo DJ, Hagen C, Dueck LA, Glenn TC. Isolation and characterization of microsatellite loci for Florida largemouth bass, *Micropterus salmoides floridanus*, and other *Micropterus*. *Mol Ecol Res*, 2008, 1(1): 178–184. [\[DOI\]](#)
- [15] Gross R, Nilsson J. Restriction fragment length polymorphism at the growth hormone 1 gene in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and its association with weight among the offspring of a hatchery stock. *Aquaculture*, 1999, 173(1–4): 73–80. [\[DOI\]](#)
- [16] Kang JH, Lee SJ, Park SR, Ryu HY. DNA polymorphism in the growth hormone gene and its association with weight in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Sci*, 2002, 68(3): 494–498. [\[DOI\]](#)
- [17] 唐辉. 从数量性状基因座位到标记辅助选择. 中国畜牧杂志, 2003, 39(2): 44–45.
- [18] 赫崇波, 周遵春, 刘卫东. 斑点叉尾鲷的基因组研究. 水产科学, 2005, 24(1): 38–40.
- [19] Fuji K, Kobayashi K, Hasegawa O, Coimbra MRM, Sakamoto T, Okamoto N. Identification of a single major genetic locus controlling the resistance to lymphocystis disease in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 2005, 254(1–4): 203–210. [\[DOI\]](#)
- [20] 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. 遗传, 2006, 28(12): 1505–1512.