

doi: 10.7541/2013.138

大黄鱼快长相关微卫星标记的筛选与验证

刘贤德 隋班良 王志勇 蔡明夷

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

摘要: 为了筛选与大黄鱼生长性状紧密相关的分子标记, 并对这些标记的有效性进行鉴定, 研究以大黄鱼家系和群体为材料, 经标记筛选、两次验证共三个步骤, 找到 2 个与大黄鱼生长性状紧密相关的微卫星标记: LYC0088 和 LYC0143, 其中 LYC0088 与体高、体质量均极显著相关($P < 0.01$), 与体长显著相关($P < 0.05$), LYC0143 与体长和体质量显著相关($P < 0.05$), 与体高的相关性极显著($P < 0.01$)。LYC0088 与 LYC0143 位点的优势等位基因分别为 E、A, 优势等位基因型均为 AB, 优势等位基因型组合为 AB/AB, 两个位点呈加性效应。该结果为开展大黄鱼分子标记辅助育种提供了有价值的遗传标记。

关键词: 大黄鱼; 微卫星; 生长性状; 快长标记

中图分类号: Q346⁺.5; S965.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2013)06-1036-08

大黄鱼是我国重要的海水养殖鱼类, 自 1987 年突破人工繁殖以来, 大黄鱼养殖规模和范围不断扩大, 至 2010 年, 已形成年产 8.6 万吨, 产值约 65 亿元的产业^[1]。但随之而来的种质退化、生长减缓、病害频发等问题也日益严重, 因此亟待对大黄鱼进行遗传改良。集美大学、宁德市水产技术推广站等单位在国家和福建省相关科技项目的资助下, 从“十五”期间开始开展大黄鱼的遗传改良研究, 至“十一五”末通过选择育种结合雌核发育技术培育出大黄鱼的第 1 个人工选育品种“闽优 1 号”, 该品种生长速度提高 23.9%, 成活率提高 13.7%, “闽优 1 号”选育的成功对于提升大黄鱼产业起到良好的促进作用^[2]。然而, “闽优 1 号”的选育历经 10 年五代时间, 费时费力, 主要原因是常规的选育是根据性状的表型而不是基因型进行选择, 对目标性状缺乏预选手段, 育种周期长、效率低。现代分子生物学技术的发展使根据与性状相关的基因或分子标记进行选择成为可能。

分子标记有广义和狭义之分, 广义的分子标记是指遗传的并可检测的 DNA 序列或蛋白; 狭义的分子标记是指能反映生物个体或种群间基因组中某

种差异的特异性 DNA 片段。DNA 分子标记由于不受发育阶段、不同组织和生理状态的影响, 能够在早期实现快速、准确的选择, 大大缩短育种周期。迄今为止, 发展起来的分子标记主要有以 RFLP 为代表的第二代分子标记, 以微卫星为代表的第二代分子标记和以 SNP 为代表的第三代分子标记^[3, 4]。第一代 RFLP 标记由于检测步骤过于繁琐现已淘汰, 第三代分子标记对检测手段要求较高, 常规实验室大多还缺乏实验条件, 因而目前在水产方面的应用还较少。

微卫星作为第二代分子标记, 由于具有容易检测、多态性高、重复性好、共显性遗传等特点, 在水产生物遗传图谱构建、亲缘关系剖分、遗传参数估计等研究中得到了广泛地应用^[5-7]。寻找与生长、抗逆等性状紧密连锁或相关的微卫星标记, 并用来指导育种实践已经成为当前遗传育种研究的热点之一^[8-18]。如: 高国强等^[11]进行了大黄鱼耐低温标记的筛选, 找到一个标记(LYC0002)可能与耐低温有关; 刘贤德等^[12]研究了 1 个大黄鱼 F₁ 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, 找到 3 个与生长相关的微

收稿日期: 2013-01-28; 修订日期: 2013-09-07

基金项目: 国家 863 计划项目(2012AA10A403); 国家自然科学基金(31172397, 31272653); 福建省高校水产动物遗传育种科技创新团队项目资助

作者简介: 刘贤德(1974—), 男, 山东枣庄人; 博士, 副教授; 研究方向为水产动物遗传育种学。E-mail: xdlou@jmu.edu.cn

通信作者: 王志勇(1963—), 男, 福建安溪人; 教授, 博导; 研究方向为水产动物遗传育种学。E-mail: zywang@jmu.edu.cn

卫星标记 LYC0077、LYC0015 和 LYC0243; 薛良义等^[19]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($P>0.05$)。以上研究都是基于一个群体,对标记在其他群体的通用性如何,没有进行系统比较。

基于此,本研究在已构建的大黄鱼遗传连锁图谱基础上^[5],每个连锁群选择 1—2 个微卫星标记共 32 个标记,以家系和群体为材料,经标记筛选、两次验证,以期找到与生长性状紧密相关的微卫星标记,为大黄鱼分子标记辅助选育打下基础。

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 月在福建省宁德市集美大学实验基地利用人工授精方法培育的全同胞家系(FS)和 1 个窝选群体(为 4 个雌与 4 个雄混合随机交配后代,记为 GP),2008 年 10 月从 FS 中采集 208 尾大黄鱼,从 GP 中采集 207 尾,测定每尾大黄鱼的体长、体高和体质量。剪取部分尾鳍,固定于 95%乙醇中用于 DNA 提取。

1.2 实验方法

微卫星标记选择:根据叶华构建的大黄鱼微卫星标记连锁图谱^[5],从每个连锁群上选择 1—2 个标记,共 32 个微卫星标记进行分析(表 1),引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。微卫星分析参照文献^[12]所述方法进行。

快长标记筛选:首先从 FS 中选出体质量最大的 30 尾和最小的 30 尾,提取每个个体基因组 DNA,以选定的 32 个标记进行基因分型,结合个体表型数据,

筛选与生长相关的微卫星标记。

快长标记的初步验证:为确保所获标记的有效性,将筛选到的标记在同一家系更多的个体中进行初步验证。从上述 FS 余下的个体中选择 60 个体质量值居中的个体,针对筛选到的标记进行基因分型后,与快长标记筛选所用数据合并在一起进行分析,检测是否还存在相关性。

再次验证:对在家系扩大验证后依然存在相关性的标记,在群体中进行进一步验证。从 GP 中选出最大的 30 尾和最小的 30 尾,对上述筛选到的标记进行基因分型后,结合表型数据进行验证分析。

1.3 统计分析

将电泳图谱拍照,依据 Marker 确定每个扩增条带(等位基因)的大小,按照从小到大的顺序,将等位基因分别标为 A、B、C、D…。

利用 SAS V8.0 软件对微卫星位点与大黄鱼主要生长性状(包括体长、体高和体质量)之间的相关性进行分析,如果该位点只含有 2 个基因型,采用双侧 t 检验(Two-tailed t test),如果该位点含有 3 个以上基因型,则进行 ANOVA 分析, F 检验显著的进行多重比较(Duncan 法)。

用于基因型效应分析的线性模型公式如下:

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

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。

对经过初步筛选、两次验证与三个性状显著相关的位点,除了进行上述基因型效应分析之外,同时进行各等位基因的效应检测,基因效应分析的线性模型公式和基因型效应分析线性模型相同。

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

微卫星位点 Microsatellite locus	核心序列 Repeat motif sequence	引物序列 Primer sequence (5'-3')	退火温度 Annealing temperature (°C)
LYC0009	(GT) ₁₀ TTA(TG) ₄ CTG	F: GTCAATCACGTCTGTCTCTGC R: TCAGCCATTGTCTGTGAGGT	60
LYC0014	(AC) ₂ CT(CA) ₁₀ ...(AC) ₅ ...(AC) ₂ AG	F: TGAGTGTCAATTGTCTTGTGTG R: GTGGATCTATTTCTGTGTCT	50
LYC0065	(AC) ₁₁ ATA(AC) ₅	F: GCCGCTTCATCTTCACCC R: GGGCTCAGGGATAATGTA	58
LYC0088	(AAG) ₂₀	F: TAAGTAGTACCTGAAGGCAACA R: GCAGGAAATAATGGAGGC	60
LYC0091	(CT) ₇ TACT(CA) ₁₁	F: CCCCTGTTTGTCCCTC R: GACTCTTGCTGTCTTTGG	55

续表

微卫星位点 Microsatellite locus	核心序列 Repeat motif sequence	引物序列 Primer sequence (5'-3')	退火温度 Annealing temperature (°C)
LYC0095	(CA) ₁₇	F: TGTCACCACCACTCCTCT R: AACCGCTTAGTGTTCCTG	55
LYC0097	(CA) ₁₅	F: GTCGTCTGTAGTCGCATTT R: CCGCTAATGACAGGGTGT	60
LYC0119	(AC) ₁₁	F: CTGCGTGTTCGACATTCC' R: GCGTGACTCTGGAGGATT	55
LYC0124	(TG) ₁₈ ...(TG) ₁₇	F: TTCCTCTTCCTCGCTGAT R: TCCATCCAGTCGGTCTTT	55
LYC0132	(CA) ₇	F: GTTCTCGTTGGTGGAGCG R: ATCCAGCCACGGCAGTTT	55
LYC0134	(CA) ₂₂	F: CGGGAAATGTCATTAGCA R: GAGCGAAATTGAAAGTAG	51
LYC0135	(CA) ₂₀	F: AGCAGGAGGGAGATGACT R: GGAAGAATACGGAGGTGA	60
LYC0143	(GT) ₁₂	F: GGGTTCTGTTTGTGGAAA R: AGATGACAACACGATAACT	55
LYC0147	(TG) ₁₁	F: AACACTCGCTGCTTATT R: GACAGCGTTGTTAGTTG	51
LYC0149	(AC) ₁₉	F: ATGTGGGCTACAGGATTA R: CTGCCTGAAATGATGTTG	53
LYC0150	(AC) ₆	F: CAATCCCACTTCAAATCA R: GTCTAAATCCTGGCACCC	53
LYC0158	(TG) ₂₁	F: TACTTTGCCCTGCCTAAC R: CAGCCAATGGTTCTTCA	53
LYC0163	(CA) ₁₁	F: TCCAAAGTGCTGTAAGGGTA R: AGGCAGGAATCAATCTCG	55
LYC0200	(AC) ₁₆	F: GAGATGAGGGATAAGTGC R: ATAGTTCCCATTAGGATACA	55
LYC0204	(CA) ₁₄	F: GCTATGAGTAATGGCTGGAA R: AGGAAAGGCAATGGAAAT	52
LYC0218	(AC) ₈	F: AGCGATTGCTAACAGATC R: GTTTGTAGCATCAGACCC	55
LYC0228	(TG) ₂₅	F: ATCTGCCAAATCCCCTT R: GGTCTCGTTCTCGTAGC	53
LYC0233	(CA) ₁₅	F: GCTGTCGCTGCAAATGAG R: TGGAAGCAAAGGGAAACT	53
LYC0243	(CA) ₁₄	F: GGGATGTTACTGATGCTC R: TCGTGGACATTAAGAGT	53
LYC0246	(CA) ₁₄	F: CCCAGCACTCTGCCAATC R: CGCCTATCGCTACATCTTC	60
LYC0403	(GA) ₁₅	F: GATGCTGGTGGTATTGGG R: TGGGCAATTACGGAGAAT	50
LYC0405	(TG) ₂₁	F: TCTTTGGCTCTGCTCTGA R: AACCGATGACCTCTTGTAGTG	58
LYC0413	(TG) ₂₈	F: CCTTCAGAATAAAGTGGGTT R: AAGGGGTCAGCACACAC	51
LYC0421	(AC) ₈	F: TCAGACAGCTTCTGGTCACG R: CAGTCCTGCCCTTAAACCAA	60
LYC0439	(A) ₁₁	F: ACCCAGGTGATTATAGGGGG R: CAGCTCAGGTAAAGGAGGCA	60
LYC0447	(AAGG) ₆	F: GGAATGAACGGGCTGTTTTA R: CACTGTAAACCATCCCCAC	55
LYC0453	(T) ₁₈	F: GGAGTCACAGGCTGGAAGAG R: CATGAGACAGGTTAGAGAGCGA	60

2 结果

2.1 性状表型值分布

用于快长标记初步筛选的全同胞家系 60 个极端个体表型数据见表 2。从表中可见, 虽然这 60 个个体来自于同一个全同胞家系, 但是按照大小分组后(最大 30 尾, 最小 30 尾), 最大组与最小组的体长、体高、体质量差异均极显著($P<0.01$)。

用于初步验证的 120 个个体的表型数据见表 3, 这 120 个个体是从同一个全同胞家系中选出, 其中有 60 个个体与标记筛选所用个体相同, 其表型值呈现连续变异, 符合正态分布($P>0.05$)。

用于群体验证的 60 个个体(最大的 30 尾, 最小 30 尾)的表型数据见表 4。从表中可以看到, 最大组与最小组 3 个表型性状都差异极显著($P<0.01$)。特别是体质量, 最大组体质量的平均值为 440.50 g, 而最小组平均值只有 156.50 g。

2.2 快长标记筛选与验证

快长标记的初步筛选 用于快长标记初步筛选的材料为 1 个大黄鱼全同胞家系的极端大和极端小各 30 尾鱼, 在 32 个微卫星位点中, 共找到 3 个与生长性状显著相关的位点。其中 LYC0088、LYC0143 与体长、体高、体质量相关均极显著($P<0.01$), LYC0200 与体长相关显著($P<0.05$), 与体质量、体高相关不显著($P>0.05$)(表 5)。

快长标记的初步验证 为验证所筛选标记的有效性, 从上述用于快长标记筛选的家系中又选择 60 个用于验证分析, 经验证还有 2 个位点与生长相关: 位点 LYC0088 和 LYC0143 与体长、体高、体质量相关均极显著($P<0.01$)(表 6)。

再次验证 利用筛选到的 2 个微卫星标记对 GP 中最大的 30 尾和最小 30 尾共计 60 个个体进行基因分型, 结合每个个体的体长、体高、体质量 3 个性状的表型数据进行显著性检验(表 7)。从检验结

表 2 用于大黄鱼快长标记初步筛选的一个大黄鱼家系不同组(大、小)生长性状 t 检验结果

Tab. 2 The results of t test for growth traits between large and small groups in a family of *Larimichthys crocea* used for screening rapid growth markers

	组别 Group	平均值 Mean	标准差 Std. deviation	t 值 t value	P 值 P value
体长 BL (cm)	大	28.58	0.89	20.00	<0.001
	小	23.61	1.03		
体高 BH (cm)	大	8.24	0.29	21.12	<0.001
	小	6.36	0.36		
体质量 BW (g)	大	456.0	35.37	26.15	<0.001
	小	231.7	30.94		

表 3 用于大黄鱼快长标记初步验证的家系生长性状正态分布检验结果

Tab. 3 Normal distribution test for growth traits in the family used for rapid growth markers preliminary verification

	个体数 No.	最大值 Max	最小值 Min	平均值 Mean	标准差 Std. deviation	$K-S$ 值 $K-S$ value	P 值 P value
体长 BL (cm)	120	30.60	21.00	26.16	2.011	0.67	0.761
体高 BH (cm)	120	9.00	5.50	7.28	0.765	1.113	0.168
体质量 BW (g)	120	560.0	160.0	336.79	88.763	0.896	0.398

表 4 用于大黄鱼快长标记再次验证的一个大黄鱼群体不同组(大、小)生长性状 t 检验结果

Tab. 4 The results of t test for growth traits between large and small groups in a population of *Larimichthys crocea* used for rapid growth markers verification again

	组别 Group	平均值 Mean	标准差 Std. deviation	t 值 t value	P 值 P value
体长 BL (cm)	大	28.09	0.983	28.908	<0.001
	小	20.09	1.154		
体高 BH (cm)	大	8.37	0.463	24.850	<0.001
	小	5.67	0.375		
体质量 BW (g)	大	440.50	44.283	30.173	<0.001
	小	156.50	26.397		

表 5 大黄鱼快长标记初步筛选结果
Tab. 5 Preliminary results for screening rapid markers in *Larimichthys crocea*

位点 Locus	个体数 Number	体长 BL		体质量 BW		体高 BH	
		F 值 F value	P 值 P value	F 值 F value	P 值 P value	F 值 F value	P 值 P value
LYC0088	49	13.26	<0.001**	14.03	<0.001**	14.43	<0.001**
LYC0143	56	18.33	<0.001**	20.71	<0.001**	22.84	<0.001**
LYC0200	55	3.17	0.0318*	1.90	0.1415	2.38	0.0806

注: 上标“*”、“**”分别代表 F 检验显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$), 下同
Note: Superscript “*”, “**” represent significant ($P < 0.05$) or extremely significant ($P < 0.01$) respectively; the same applies bellow

表 6 大黄鱼快长标记初步验证结果
Tab. 6 Preliminary results for rapid markers verification in *Larimichthys crocea*

位点 Locus	个体数 No.	体长 BL		体质量 BW		体高 BH	
		F 值 F value	P 值 P value	F 值 F value	P 值 P value	F 值 F value	P 值 P value
LYC0088	105	5.07	0.0026*	9.88	<0.0001**	13.17	<0.0001**
LYC0143	107	7.68	0.0066*	18.59	<0.0001**	28.67	<0.0001**

表 7 大黄鱼快长标记再次验证结果
Tab. 7 Results for rapid markers verification again in *Larimichthys crocea*

位点 Locus	个体数 No.	体长 BL		体高 BH		体质量 BW	
		F 值 F value	P 值 P value	F 值 F value	P 值 P value	F 值 F value	P 值 P value
LYC0088	56	2.64	0.0269*	4.13	0.0020**	3.30	0.0083**
LYC0143	55	3.21	0.0486*	5.32	0.0079**	4.46	0.0163*

果可以看到, LYC0088、LYC0143 仍与生长性状紧密相关, 其中 LYC0088 与体高、体质量均相关极显著($P<0.01$), 与体长相关显著($P<0.05$), LYC0143 与体长和体质量相关显著($P<0.05$), 与体高相关性极显著($P<0.01$)。

2.3 快长标记优势基因、基因型及基因型组合

对窝选群体 LYC0088 与 LYC0143 两个位点不同等位基因对应的体长、体高和体质量的多重比较结果如表 8 所示。LYC0088 位点的优势等位基因为 E, 但与 A、B、C 三个等位基因差异不显著($P>0.05$), 与 D 等位基因差异显著($P<0.05$)。LYC0143 位点的优势等位基因为 A, 与 B 等位基因差异不显著($P>0.05$), 与 C 等位基因差异显著($P<0.05$)。

对窝选群体 LYC0088 与 LYC0143 两个位点不同基因型对应的体长、体高和体质量的多重比较结果如表 9 所示。在 LYC0088 位点, AB 基因型个体的体长、体高、体质量 3 个性状均高于其他基因型个体, 因此, AB 为优势基因型。在 LYC0143 位点, AB 基因型对应的个体的体长、体高、体质量 3 个性状均高于 BC 基因型个体, 因此 AB 为优势生长基因型。

因为体质量是最终收获的主要经济性性状, 因此,

本研究以体质量作为参照指标对这两个位点不同基因型组合进行比较。LYC0088和LYC0143两个位点分别有7种和2种基因型, 可形成14种组合, 在实际检测的57个体(3个缺失)中出现了12种基因型组合, AB/BC和BE/BC两种基因型组合的个体没有出现, 另外有3种基因型组合对应个体数为1, 没有统计学意义, 因而没有参与进一步分析, 所以实际参与排序的基因型组合为9种。经比较, 以AB/AB组合对应的体质量最大, 为优势基因型组合(表10)。

3 讨论

寻找与经济性性状紧密相关的微卫星标记, 并进行相关的 QTL 定位研究, 已经成为当前水产生物遗传育种的研究热点^[5, 8, 10—18]。在本研究中, 我们从家系和群体两个水平对初步筛选得到的微卫星标记进行了验证。在家系水平, LYC0088 和 LYC0143 与体长、体质量、体高的相关性达到极显著水平($P<0.01$); 在群体水平, LYC0088 和 LYC0143 与体高亦均达到了极显著水平($P<0.01$)。从实验结果可以看到, 这两个标记均与多个性状相关, 同时两个标记位点又与同一性状相关, 显示出明显的一因多效或多因一效的现象。通过与大黄鱼微卫星遗传连锁图谱比较,

表 8 2 个微卫星位点不同等位基因主要生长性状的平均值及多重比较
Tab. 8 Means and multiple comparisons of major growth traits with different allele at two microsatellite loci

位点 Locus	等位基因 Allele	基因频数 No. of allele	体长 BL (cm)	体高 BH (cm)	体质量 BW (g)
LYC0088	E	3	27.00±0.58 ^a	8.23±0.14 ^a	421.67±15.90 ^a
	A	10	26.45±1.02 ^{ab}	7.77±0.36 ^a	378.50±36.91 ^a
	B	52	24.22±0.57 ^{ab}	7.10±0.19 ^{ab}	304.33±20.55 ^{ab}
	C	21	23.54±0.95 ^{ab}	6.93±0.35 ^{ab}	283.57±35.83 ^{ab}
	D	28	22.42±0.79 ^b	6.29±0.22 ^b	231.61±24.75 ^b
LYC0143	A	34	25.42±0.62 ^a	7.58±0.23 ^a	352.50±23.78 ^a
	B	55	23.85±0.57 ^{ab}	6.91±0.19 ^b	288.09±20.01 ^{ab}
	C	25	22.78±0.82 ^b	6.48±0.27 ^b	244.40±26.85 ^b

注: 数值用平均值±标准误表示; 不同行小写字母不同表示在一位点中不同等位基因之间差异显著($P<0.05$); 下同

Note: Values are means ± SE. Different lower case letters among rows are meaning significant different among different alleles at the same microsatellite locus ($P<0.05$); the same applies bellow

表 9 2 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. 9 Means and multiple comparisons of major growth traits with different genotypes at two microsatellite loci

位点 Locus	基因型 Genotype	个体数 No.	体长 BL (cm)	体高 BH (cm)	体质量 BW (g)
LYC0088	AB	5	27.42±0.19 ^a	8.36±0.14 ^a	425.00±10.00 ^a
	BE	3	27.00±0.58 ^a	8.23±0.15 ^a	421.67±15.90 ^a
	BC	11	25.72±1.27 ^{ab}	7.84±0.48 ^{ab}	367.73±51.20 ^{ab}
	AD	5	25.48±2.04 ^{ab}	7.18±0.62 ^{abc}	332.00±69.90 ^{abc}
	BB	11	22.91±1.28 ^{ab}	6.63±0.42 ^{bc}	257.73±44.44 ^{bc}
	BD	11	23.13±1.28 ^{ab}	6.46±0.35 ^{bc}	246.82±38.48 ^{bc}
	CD	10	21.15±1.02 ^b	5.94±0.31 ^c	191.00±33.08 ^c
LYC0143	AB	29	25.21±0.73 ^a	7.42±0.25 ^a	341.03±27.31 ^a
	BC	24	22.61±0.84 ^b	6.39±0.26 ^b	236.46±26.74 ^b

表 10 大黄鱼 LYC0088 和 LYC0143 位点不同基因型组合对应体质量排序
Tab. 10 Sort according to body weight values corresponding to genotypes at LYC0088 and LYC0143 loci in *Larimichthys crocea*

LYC0088/LYC0143 基因型组合 Genotype combination of LYC0088 and LYC0143	体质量 Body weight	排序 Sorting
AB/ AB	421.3	1
BC/ AB	363.5	2
AD/ BC	300.0	3
BB/ AB	289.2	4
BD/ AB	267.5	5
BB/ BC	240.0	6
BD/ BC	218.1	7
CD/ BC	194.3	8
CD/ AB	183.3	9

我们发现本研究筛选到的 LYC0088 与 LYC0143 都处于第 11 号连锁群, 叶华等^[5]也将一个与体质量相关的 QTL 定位于该连锁群上, 可见该连锁群上可能存在着影响大黄鱼生长的重要基因。

与刘贤德等^[12]的研究相比, 本实验结果略有差异。刘贤德等分析了 1 个大黄鱼 F₁ 家系 22 个微卫

星位点与生长性状的相关性, 结果得出 LYC0077 位点与体质量、体长和体高均呈显著相关($P<0.05$), 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($P>0.05$)。在本研究中, 我们尽管也分析了 LYC0243 与生长性状的相关性, 但相关不显著($P>0.05$), 其中原因可能与所用家系

材料不同有关,这也是在本研究中为何对筛选到的标记进行多次验证的原因。虽然如此,亦不能保证本研究中筛选到的标记在其他群体适用,因而在后续研究中尚需扩大群体的规模和类型,进行多方向比较进行进一步验证,设法找到引起生长差异的关键基因,为下一步基因辅助育种、进一步提高性状选择的准确性提供依据。

在本研究中,LYC0088 位点的优势等位基因为 E,但优势基因型组合中却不包含等位基因 E,我们推测这个位点可能存在除了加性效应之外的其他效应。另外等位基因 E 与 A、B、C 三个等位基因的效应差异不显著($P>0.05$),理论上优势基因型中不包含等位基因 E 也是正常的。

4 结论

本研究利用家系和群体为材料,经过标记筛选、两次验证共找到了 2 个与大黄鱼生长性状紧密相关的微卫星标记 LYC0088 和 LYC0143,其优势等位基因分别为 E 和 A,优势等位基因型均为 AB,优势等位基因型组合为 AB/AB,该结果为下一步进行大黄鱼分子标记辅助育种提供依据。

参考文献:

- [1] Fishery Bureau of the Ministry of Agriculture. China Fishery Statistical Yearbook 2011 [M]. Beijing: China Agriculture Press. 2011, II [农业部渔业局编制. 2011 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社. 2011, II]
- [2] The National Fisheries Technology Extension Station. Promotion Guide of New Aquatic Varieties in 2010 [M]. Beijing: China Agriculture Press. 2010, 82—100 [全国水产技术推广总站. 2010 水产新品种推广指南. 北京: 中国农业出版社. 2010, 82—100]
- [3] Liu Y G. Aquatic DNA Molecular Marker Technology [M]. Beijing: Science Press. 2009, 20—67 [刘云国. 水产生物 DNA 分子标记技术. 北京: 科学出版社. 2009, 20—67]
- [4] Bao B L, Wang Z Y, Zhang S C, *et al.* Aquaculture Genomics Technologies [M]. Beijing: Chemical Industry Press. 2011, 1—75 [鲍宝龙, 王志勇, 张士瑾, 等. 水产基因组学技术. 北京: 化学工业出版社. 2011, 1—75]
- [5] Ye H. Construction of SSR linkage maps and QTL analysis for growth-related traits in the large yellow croaker [D]. Doctoral dissertation. Hunan Agricultural University, Changsha. 2010 [叶华. 大黄鱼 SSR 遗传连锁图谱的构建及生长相关性状的 QTL 定位. 博士学位论文, 湖南农业大学, 长沙. 2010]
- [6] Liu X D, Zhao G T, Wang Z Y, *et al.* Parentage assignment and parental contribution analysis in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) using microsatellite markers [J]. *Current Zoology*, 2012, **58**(2): 244—249
- [7] 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
- [8] Wu Y, Fu C P, Jiang S F, *et al.* Preliminary studies on the correlation between microsatellite markers and growth traits in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, **35**(2): 197—202 [吴滢, 付春鹏, 蒋速飞, 等. 中华绒螯蟹微卫星标记与生长性状相关性的初步分析. 水生生物学报, 2011, **35**(2): 197—202]
- [9] Ye H, Ren P, Liu Y, *et al.* Isolation and genetic analysis of microsatellite markers for *Larimichthys crocea* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, **36**(6): 1156—1163 [叶华, 任鹏, 刘洋, 等. 大黄鱼微卫星标记的开发及其遗传方式分析. 水生生物学报, 2012, **36**(6): 1156—1163]
- [10] Fu H T, Wan S Q, Fu C P, *et al.* Screening of microsatellite markers associated with growth traits in *Macrobrachium nipponense* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, **34**(5): 1043—1048 [傅洪拓, 万山青, 付春鹏, 等. 青虾生长性状相关的微卫星标记筛选. 水生生物学报, 2010, **34**(5): 1043—1048]
- [11] Gao G Q, Chang Y M, Han Q X, *et al.* Screening of microsatellite markers associated with cold tolerance of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* R.) [J]. *Hereditas* (Beijing), 2010, **32**(3): 248—253 [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. 遗传, 2010, **32**(3): 248—253]
- [12] Liu X D, Wei X J, Cai M Y, *et al.* The segregation patterns of microsatellite markers in an F_1 family of large yellow croaker *Larimichthys crocea* and correlation analysis with growth-related traits [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, **36**(9): 1322—1329 [刘贤德, 韦信键, 蔡明夷, 等. 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. 水产学报, 2012, **36**(9): 1322—1329]
- [13] Wang X P, Zhang X F, Li W S, *et al.* Mapping and genetic effect analysis on quantitative trait loci related to feed conversion ratio of common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, **36**(2): 177—196 [王宣朋, 张晓峰, 李文升, 等. 鲤饲料转化率性状的 QTL 定位及遗传效应分析. 水生生物学报, 2012, **36**(2): 177—196]
- [14] Sun X W, Lu C Y, Cao D C, *et al.* Molecular markers associated with body weight of mirror carp and selection and raising of progenies [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2009, **33**(2): 77—81 [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. 水产学报, 2009, **33**(2): 77—81]
- [15] Wang H Z, Zhang Y, Yin Q Q, *et al.* Analysis of genetic diversity and economic traits in two mirror carp semi-sib families [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, **33**(3):

- 522—531 [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. 水生生物学报, 2009, 33(3): 522—531]
- [16] 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 [许可, 马爱军, 王新安, 等. 大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 生长性状相关的微卫星标记筛选, 海洋与湖沼, 2009, 40(5): 577—583]
- [17] Xue L Y, Sun S, Xiao Z K, *et al.* Microsatellite polymorphism analysis of myostatin from *Pseudosciaena crocea* [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 24(10): 980—985 [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. 中国生物化学与分子生物学报, 2008, 24(10): 980—985]
- [18] Yang J, Zhang X F, Chu Z Y, *et al.* Correlation analysis of microsatellite markers with body weight, length, height and upper jaw length wensize of common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(4): 721—730 [杨晶, 张晓峰, 储志远, 等. 鲤的微卫星标记与体质量、体长、体高和吻长的相关分析. 中国水产科学, 2010, 17(4): 721—730]

SCREENING AND VERIFICATION OF MICROSATELLITE MARKERS CLOSELY RELATED WITH RAPID GROWTH TRAITS IN LARGE YELLOW CROAKER *LARIMICHTHYS CROCEA*

LIU Xian-De, Sui Ban-Liang, WANG Zhi-Yong and CAI Ming-Yi

(Key Laboratory of Mariculture of the East China Sea, Ministry of Agriculture of China, Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: To screen the molecular markers closely related with growth traits and identify the validity of these markers in large yellow croaker, a family and a population were used as material and three steps were included. The first step was makers screening. In this step, a family with 60 extreme individuals was used as genetic material. The second step was markers preliminary verification. In this step, a family with 120 random individuals was used as genetic material. The last step was markers verification once again. A population with 60 extreme individuals was used. Two microsatellite markers closely related with growth traits were obtained. LYC0088 was significantly correlated with body height, body weight ($P<0.01$), and body length ($P<0.05$). LYC0143 was significantly correlated with body length and body weight ($P<0.05$), and body height ($P<0.01$). For LYC0088 and LYC0143 loci, the advantage allele was E and A, respectively. The advantage genotypes were both AB. The advantage combination of genotype was AB/AB. These two loci presented additive effects. The results provide valuable genetic markers for conducting large yellow croaker molecular marker-assisted breeding.

Key words: Large yellow croaker; Microsatellites; Growth traits; Rapid growth marker