

研究报告

Research Report

中华鳖(*Trionyx sinensis*)微卫星标记与生长性状的相关分析

李婷^{1,2} 李伟¹ 赵建¹ 史燕¹ 洪孝友^{1,2} 王亚坤^{1,3} 朱新平^{1,2*}

1 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室, 广州, 510380; 2 上海海洋大学水产与生命学院, 上海, 201306; 3 南昌大学生命科学学院, 南昌, 330031

* 通讯作者, zhuxinping_1964@163.com

摘要 利用筛选到的 25 个微卫星标记, 以中华鳖极大、极小两个群体共 120 个个体为实验材料, 分析这些微卫星标记与体重、背甲长、背甲宽、体高、腹甲长及腹甲宽之间的相关性。结果表明: 有 3 个位点与生长性状的相关性达到显著或极显著水平($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$), 其中位点 LTF1 与体重、背甲长、背甲宽、腹甲长、腹甲宽、体高均极显著相关; 位点 LTR87 与体重、背甲长、和腹甲宽显著相关; 位点 LT8 与体重、体高、腹甲长、腹甲宽显著相关。将同一性状不同基因型之间进行多重比较, 结果显示位点 LTF1 中的 BE 型, 位点 LTR87 中的 BB 型, 以及位点 LT8 中的 CF 型、BC 型、AC 型、CC 型具有明显的生长优势, 可作为辅助育种的参考标记。

关键词 中华鳖, 微卫星, 生长性状, 相关分析

Correlation Analysis of the Microsatellite DNA Markers and Growth Traits of Chinese Soft Shell Turtle (*Trionyx sinensis*)

Li Ting^{1,2} Li Wei¹ Zhao Jian¹ Shi Yan¹ Hong Xiaoyou^{1,2} Wang Yakun^{1,3} Zhu Xinping^{1,2*}

1 Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Tropic and Subtropical Fishery Resource Application and Cultivation of Ministry of Agriculture, Guangzhou, 510380; 2 College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306; 3 School of Life Sciences, Nanchang University, Nanchang, 330031

* Corresponding author, zhuxinping_1964@163.com

DOI: 10.13417/j.gab.035.000063

Abstract With a total of 120 Chinese soft shell turtle of maximum, minimum two groups individual as experimental material, we analyzed the correlation between 25 selected microsatellite DNA markers and body weight, carapace length, carapace width, body height, shell length and shell width of Chinese soft shell turtle. The results indicated that 3 microsatellite loci showed significant or highly significant influences on these growth traits ($p < 0.05$ or $p < 0.01$). LTF1 is significantly correlated with body weight, carapace length, carapace width, body height, shell length and shell width; and LTR87 is significantly correlated with body weight, carapace length and shell width, while LT8 is significantly correlated with body weight, body height, shell length and shell width. Multiple comparison analysis of genotypes related to growth traits showed that BE genotypes of LTF1, BB genotypes of LTR87, and CF, BC, AC and CC genotypes of LT8 played positive roles in growth traits respectively, which could give effective basis to the study of Chinese soft shell turtle marker-assisted breeding.

Keywords Chinese soft-shell turtle (*Trionyx sinensis*), Microsatellite marker, Growth trait, Correlation analysis

中华鳖(*Trionyx sinensis*) ,在分类学上属于鳖科(Trionychidae)、鳖属(*Trionyx*)及爬行纲(Reptilia)、龟鳖目(Testudinata), 有甲鱼、团鱼等俗称, 具有独特的营养价值和药用滋补功效(潘迎捷, 2007)。中华鳖在我国很多地区均有分布, 但是西藏、青海及新疆地区

除外, 在长江流域和华南地区比较常见, 国外主要分布于朝鲜、日本和越南(王培潮, 2000)。

近年来中华鳖的养殖规模越来越大, 2014 年年产量已达到 34 万 t, 成为我国重要的水产养殖品种之一(中华人民共和国农业部渔业局, 2015)。由于市

场利益驱动,许多养殖场育种不规范,特别是近亲繁殖,导致中华鳖种苗质量良莠不齐,种质性状出现退化,生长速度减慢,这些状况阻碍了中华鳖产业的可持续发展,因此我们开展了中华鳖良种选育工作,希望能够利用分子标记选育出快长的中华鳖良种品系,以促进产业的健康发展,极大的满足人类需求。

微卫星 DNA (microsatellite DNA),也称单一的重序列(simple sequence repeat, SSR)或是小串联重复(short tandem repeats, STRs),它是由 1~6 个碱基对的核心序列重复串联形成,它们在真核生物基因组中的分布比较广泛,且分布很均匀(Hamada et al., 1982; Tautz and Renz, 1984)。利用微卫星技术在分子水平上找到与物种优良性状连锁的遗传标记,从而实现 QTL 定位来达到良种选育的目的,已经在水产动物中广泛应用,国内外学者也取得了一定的成果(鲁双庆等, 2003, 水利渔业, 23(6): 9-11; Fuji et al., 2006; 万山青, 2009; 刘福平等, 2010; 杨晶等,

2010)。目前,微卫星标记在中华鳖中进行了遗传多样性以及群体之间的差异等方面的研究,而对于利用微卫星进行生长性状相关性的分析报道较少(Lal et al., 2004; 李思发等, 2004; 刘阳等, 2012)。本实验以我们前期选育的中华鳖群体为研究对象,采用分群分离分析法(bulked segregation analysis, BSA)和方差分析法相结合,从 25 个候选微卫星标记中筛选与中华鳖生长相关的标记,初步评估了微卫星标记与中华鳖的体重、背甲长、背甲宽、体高、腹甲长、腹甲宽等方面的相关性,为中华鳖的快长及优良选育奠定基础。

1 结果与分析

1.1 中华鳖的极大和极小个体的表型数据统计

数据经 SPSS 19.0 处理,得到中华鳖极大极小群体的表型数据(表 1),及总体平均值、标准差、最大值、最小值和各性状之间的相关系数(表 2)。

表 1 中华鳖极大、极小群体表型相关数据

Table 1 The data related phenotypic of the maximal and minimal weight populations of *Trionyx sinensis*

群体	项目	极小值	极大值	均值	标准差
Population	Item	Minimum	Maximum	Mean	STD deviation
极大群体 Maximum group	体重(g)	578.70	1 185.00	764.48	143.12
	背甲长(cm)	13.10	16.71	14.45	0.86
	Carapace length (cm)				
	背甲宽(cm)	11.10	15.80	12.18	0.92
	Carapace width (cm)				
	体高(cm)	4.27	6.50	5.00	0.47
	Body height (cm)				
	腹甲长(cm)	12.04	14.82	13.36	0.70
	Shell length (cm)				
	腹甲宽(cm)	11.00	14.52	12.36	0.73
Shell width (cm)					
极小群体 Minimum group	体重(g)	61.43	306.40	162.51	67.48
	Body Weight (g)				
	背甲长(cm)	6.00	16.33	8.87	1.77
	Carapace length (cm)				
	背甲宽(cm)	5.32	12.65	7.37	1.27
	Carapace width (cm)				
	体高(cm)	2.31	4.04	3.06	0.39
	Body height (cm)				
	腹甲长(cm)	5.82	10.35	7.95	1.13
	Shell length (cm)				
腹甲宽(cm)	5.03	9.22	7.47	1.05	
Shell width (cm)					

表 2 群体表型数据及性状间的相关系数

Table 2 Correlation coefficient between the groups data and phenotypic traits

性状 Characters	N	均值 Mean	极小值 Minimum	极大值 Maximum	相关系数 Correlation coefficients					
					体重(g) Body weight (g)	背甲长(cm) Carapace length (cm)	背甲宽(cm) Carapace width (cm)	体高(cm) Body height (cm)	腹甲长(cm) Shell length (cm)	腹甲宽(cm) Shell width (cm)
体重(g) Body weight (g)	120	463.50	61.43	1 185.00						
背甲长(cm) Carapace length (cm)	120	11.66	6.00	16.71	0.940**					
背甲宽(cm) Carapace width (cm)	120	9.77	5.32	15.80	0.947**	0.963**				
体高(cm) Body height (cm)	120	4.03	2.31	6.50	0.949**	0.909**	0.917**			
腹甲长(cm) Shell length (cm)	120	10.65	5.82	14.82	0.965**	0.965**	0.967**	0.937**		0.988**
腹甲宽(cm) Shell width (cm)	120	9.91	5.03	14.52	0.968**	0.963**	0.972**	0.936**	0.988**	

注:** 表示两个性状间极显著相关($p < 0.01$)

Note: ** indicated highly significant correlation between the two tested traits ($p < 0.01$)

1.2 遗传多样性分析

25 个微卫星位点在中华鳖中的扩增后,共检测到等位基因数为 339,平均等位基因数为 13.56,每个微卫星位点检测到的等位基因数为 4~26 个(表 3)。平均观察杂合度为 0.667,平均期望杂合度为 0.755,平均多态性信息含量为 0.607 9,均大于 0.5,表明实验中华鳖群体处于高多态性水平。

1.3 中华鳖微卫星标记与生长性状的相关性分析

利用卡方检验评估 25 个微卫星位点与 120 个个体生长相关性性状的相关性结果(表 4),结果显示 22 个微卫星位点在 120 个个体中的基因型分布呈显著相关性($p < 0.05$)有些甚至达到极显著相关($p < 0.01$),表明这些位点是比较理想的微卫星标记,可进一步进行分析。

运用一般线性模型对初步筛选的微卫星位点与中华鳖生长性状的相关性进行最小二乘法分析(表 5),结果显示:位点 LTF1 与体重、背甲长、背甲宽、腹甲长、腹甲宽、体高均极显著相关;位点 LTR87 与体重、背甲长、和腹甲宽显著相关;位点 LT8 与体重、体高、腹甲长、腹甲宽显著相关。

利用 Duncan 法对同一位点的不同基因型与生长性状进行多重比较(表 6),位点 F1,基因型 BE 的个体的各个生长性状极显著高于其他基因型,基因

型 AE 的个体的各个生长性状极显著低于其他基因型,在各个生长性状中基因型 AE 与 BE 差异都极显著,AE 和 DE 差异显著,且在除了体重之外的其他生长性状中基因型 AE 与 CE 差异显著,由此可表明基因 A 与中华鳖的生长负相关,而基因 B 可能与其生长性状正相关;位点 R87,基因型 BB 的各个生长性状显著高于其他基因型,基因型 CC 的各个生长性状显著低于其他基因型,且基因型 BC 与 CC, BB 与 BC 都差异显著,由此可推断出基因 B 与中华鳖的生长性状有正面影响;位点 LT8,基因型 CF 的各个生长性状都显著高于其他基因型,且基因型 CF 与 CE 差异显著,推测基因 F 对中华鳖的生长有促进作用,基因型 BE 的各个生长性状都显著低于其他基因型,且与 CE 等其他基因型差异显著,基因 C 在其生长过程中可能起到促进作用。

1.4 优势基因型的筛选

以微卫星位点的某一基因型的生长相关性性状均值显著高于其他基因型的均值,且高于群体生长性状的均值作为群体优势基因型的评定标准,并结合表 1 和表 2 以及 Duncan 法多重比较结果(表 6),共筛选出 6 种具有生长优势的基因型。位点 LTF1 中的 BE 基因型各个生长性状的均值都大于其他基因型的均值,且都高于群体各个生长性状的均值;

表 3 25 个微卫星位点在中华鳖群体中的遗传多样性分析

Table 3 Genetic diversity analysis of 25 microsatellite loci in population of Chinese soft-shell turtle

位点 Locus	等位基因数(n) Number of allele	观测杂合度(HO) Observed heterozygosity	期望杂合度(He) Expected heterozygosity	多态信息含量(PIC) Polymorphic information content
LT79	13	0.392	0.594	0.573
LT42	15	0.842	0.893	0.880
LT60	26	0.833	0.944	0.937
LT7	9	0.392	0.744	0.697
LT61	19	0.592	0.924	0.915
LT48	19	0.592	0.930	0.921
LT9	18	0.742	0.895	0.883
LT70	24	0.800	0.941	0.934
LT49	26	0.900	0.959	0.953
LT47	16	0.942	0.912	0.901
LT64	22	0.892	0.913	0.902
LT38	19	0.689	0.858	0.840
LT46	6	0.483	0.468	0.372
LT8	9	0.525	0.551	0.528
LT6	6	0.933	0.638	0.573
LT40	23	0.642	0.936	0.928
LTH61	10	0.700	0.778	0.740
LTF56	4	0.567	0.536	0.427
LTF68	11	0.525	0.592	0.556
LTH101	9	0.742	0.764	0.731
LTR87	4	0.283	0.293	0.273
LTF1	5	0.983	0.613	0.538
LTH18	9	0.667	0.611	0.557
LTF42	10	0.642	0.866	0.847
LTH30	7	0.375	0.725	0.673
平均值	13.56	0.667	0.755	0.723
LSM				
标准差 SD	7.142	0.196	0.184	0.204

表 4 25 个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

Table 4 The χ^2 test of 25 microsatellite loci in the maximal and minimal weight populations

位点 Locus	卡方值 χ^2 value	p 值 p value	位点 Locus	卡方值 χ^2 value	p 值 p value
LT79	68.01	0.000	LT8	90.065	0.000
LT42	413.250	0.000	LT6	114.667	0.000
LT60	7.825	0.020	LT40	10.131	0.017
LT7	85.886	0.000	LTH61	498.788	0.000
LT61	17.204	0.004	LTF56	480.000	0.000
LT48	6.369	0.095	LTF68	487.543	0.000
LT9	13.777	0.008	LTH101	718.130	0.000
LT70	0.757	0.685	LTR87	480.000	0.000
LT49	1.481	0.224	LTF1	698.571	0.000
LT47	14.613	0.002	LTH18	523.648	0.000
LT64	8.169	0.086	LTF42	413.259	0.000
LT38	13.493	0.036	LTH30	718.130	0.000
LT46	117.000	0.000			

注: $p < 0.01$ 表示差异极显著; $p < 0.05$ 表示差异显著

Note: $p < 0.01$ indicated highly significant difference; $p < 0.05$ indicated significant difference

表 5 微卫星位点与中华鳖生长性状的相关性

Table 5 Correlation analysis on Correlation analysis on growth traits of 3 microsatellites

位点	体重(g)	背甲长(cm)	背甲宽(cm)	体高(cm)	腹甲长(cm)	腹甲宽(cm)
Locus	Body weight (g)	Carapace length (cm)	Carapace width (cm)	Body height (cm)	Shell length (cm)	Shell width (cm)
LTF1	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**
LTR87	0.032*	0.038*	0.063	0.061	0.054	0.045*
LT8	0.044*	0.063	0.054	0.048*	0.045*	0.037*

注: ** 表示差异极显著($p<0.01$); *表示差异显著($p<0.05$)

Note: ** indicated highly significant difference ($p<0.01$); * indicated significant difference ($p<0.05$)

表 6 七个微卫星位点不同基因型在不同表型中的多重比较

Table 6 Multiple comparison on phenotypic data of different genotypes in seven microsatellite loci

位点	基因型	个体数	体重(g)	背甲长(cm)	背甲宽(cm)	体高(cm)	腹甲长(cm)	腹甲宽(cm)
Locus	Gene type	Number	Body weight (g)	Carapace length (cm)	Carapace width (cm)	Body height (cm)	Shell length (cm)	Shell width (cm)
LTF1	BE	85	541.07±303.810 ^{Aa}	12.58±2.653 ^{Aa}	10.54±2.332 ^{Aa}	4.29±0.973 ^{Aa}	11.45±2.480 ^{Aa}	10.66±2.266 ^{Aa}
	DE	8	442.11±343.172 ^{ABa}	11.35±3.544 ^{Aa}	9.48±2.809 ^{Aa}	4.09±1.212 ^{Aa}	10.37±3.329 ^{Aa}	9.75±2.908 ^{Aa}
	CE	5	388.87±365.165 ^{ABab}	10.83±3.763 ^{ABa}	8.90±2.987 ^{ABa}	3.79±1.227 ^{ABab}	9.96±3.291 ^{ABa}	8.93±2.851 ^{ABa}
	AE	20	130.92±120.053 ^{Bb}	7.82±1.490 ^{Bb}	6.62±1.138 ^{Bb}	2.89±0.472 ^{Bb}	7.25±1.363 ^{Bb}	6.78±1.147 ^{Bb}
LTR87	BB	83	494.81±333.202 ^{Aa}	11.95±3.086 ^{Aa}	9.94±2.572 ^{Aa}	4.13±1.077 ^{Aa}	10.93±2.844 ^{Aa}	10.18±2.576 ^{Aa}
	BC	18	426.55±264.005 ^{Aab}	11.63±2.818 ^{ABa}	10.09±2.810 ^{ABa}	3.98±0.953 ^{Aa}	10.49±2.664 ^{ABa}	9.78±2.460 ^{ABa}
	AB	14	412.73±317.511 ^{Aab}	11.21±3.322 ^{ABa}	9.37±2.719 ^{ABa}	3.79±1.003 ^{Aab}	10.27±3.023 ^{ABa}	9.45±2.759 ^{ABa}
	CC	3	389.69±30.557 ^{Ab}	6.78±1.089 ^{Bb}	5.92±0.644 ^{Bb}	2.67±0.372 ^{Ab}	6.42±0.721 ^{Bb}	6.11±1.127 ^{Bb}
LT8	CF	10	614.74±275.770 ^{Aa}	13.05±2.992 ^{Aa}	10.93±2.487 ^{Aa}	4.55±1.006 ^{Aa}	12.01±2.706 ^{Aa}	11.13±2.562 ^{Aa}
	BC	9	575.70±354.520 ^{Aa}	12.65±3.329 ^{ABab}	10.41±2.702 ^{Aa}	4.45±1.289 ^{Aa}	11.70±2.888 ^{ABa}	10.72±2.850 ^{Aa}
	AC	8	521.01±311.983 ^{Aabc}	12.25±3.094 ^{ABab}	10.07±2.527 ^{Aab}	4.25±0.942 ^{Aabc}	11.09±2.871 ^{ABab}	10.41±2.566 ^{Aabc}
	CC	53	501.61±339.699 ^{Aa}	11.86±3.014 ^{ABab}	10.03±2.635 ^{Aa}	4.13±1.059 ^{Aa}	10.96±2.840 ^{ABa}	10.22±2.615 ^{Aa}
	CD	6	359.13±346.424 ^{Aabc}	10.56±3.195 ^{ABabc}	8.77±2.661 ^{Aabc}	3.73±1.101 ^{Aabc}	9.67±3.086 ^{ABabc}	9.09±2.842 ^{Aabc}
	CE	14	289.04±235.686 ^{Abc}	10.28±2.842 ^{ABbc}	8.94±2.950 ^{Abc}	3.49±0.771 ^{Abc}	9.21±2.552 ^{ABbc}	8.46±2.055 ^{Abc}
	BE	3	119.55±36.232 ^{Ac}	7.75±1.362 ^{Bc}	6.57±0.725 ^{Ac}	2.91±0.352 ^{Ac}	7.21±1.000 ^{Bc}	7.09±0.974 ^{Ac}

注: 表中性状数值为平均值±标准差, “***”表示同一位点中的优势基因型, 括号内的数字代表优势基因型扩增片段的大小; 在同一列数值中, 上标含有相同字母者表示两种基因型个体间差异不显著($p>0.05$), 小写字母的不同代表差异显著($p<0.05$), 大写字母的不同代表差异极显著($p<0.01$)

Note: The mean ± standard deviation represented the numerical value in different characters, “***” meant the dominant genotype in the same loci, figures in brackets represent the size of the amplified fragment of the dominant genotype; The numerical values containing the same superscript letter expressed no significant difference between the two genotypes ($p>0.05$), different lowercase represent significant difference ($p<0.05$), different uppercase represent highly significant difference ($p<0.01$) in the same column

位点 LTR87 中的 BB 基因型体重、背甲长和腹甲宽的均值都大于其他基因型的背甲宽和腹甲长均值, 且高于群体这些生长性状的均值; 位点 LT8 中基因型 AC、BC、CC、CF 的体重、体高、腹甲长和腹甲宽的均值都大于其他基因型的均值, 且高于群体这些生长性状的均值。根据群体表型数据及性状间的相关系数, 得出中华鳖的体重与体高、腹甲长、腹甲宽等性状都有较好的相关性, 由此可见筛选出的基因型具有很好的生长优势, 可作为良种选育的理想基因型。

2 讨论

微卫星标记具有良好的稳定性和丰富的多态性, 已在水产动物的研究中广泛应用。本实验共选用了 100 对微卫星引物对中华鳖的群体进行 PCR 扩增, 共有 25 对引物能检测到多态性, 而且扩增结果稳定。在筛选出的 25 个微卫星位点中等位基因数都大于 4, 对于群体遗传多样性的评估比较有益(张志允等, 2011)。Botstein 等(1980)提出了衡量多态性信息含量(PIC)变异高低程度指标, 其中 $PIC \geq 0.25$ 属

于低度多态性水平, $0.25 \leq PIC \leq 0.5$ 属于中度多态水平, $PIC \geq 0.5$ 说明群体处于高度多态性水平。25 个微卫星位点的平均多态性信息含量大于 0.5, 表明这些微卫星位点包含的遗传信息容量大, 或是能够提供大容量的遗传信息, 多态信息含量以及群体杂合度都较高, 具有选育优良种质的潜力, 可较好的用于下步相关分析。

微卫星位点与生长性状的关联性研究在水产动物分子标记辅助育种中被广泛应用。吴滢等(2011)采用 30 个微卫星标记分析同池养殖的长江水系中华绒螯蟹(*Eriochei sinensis*)群体, 以筛选生长性状(体重、体长和体宽)相关的分子标记。结果表明, 其中 3 个位点与体重、体宽和体高呈极显著相关($p < 0.01$), 分别是 ESIN33、ESC29 和 ESC57; 一个位点与体高、体宽呈极显著相关($p < 0.01$), 与体重呈显著相关($p < 0.05$), 即 ESC65。然后进行不同基因型间的多重比较, 其中 ESIN33、ESC29、ESC65 三个位点中的 AC、DD、BB 基因型的平均体重、体宽和体高均高于其他基因型, 而且差异显著, 可以作为生长性状的优势基因型。樊佳佳等(2009)结合了分离群体标记关联分析法和随机选择群体标记关联分析法, 使用 40 个微卫星位点在人工养殖的大口黑鲈(*Micropterus salmoides* L.)群体中进行扩增, 筛选出 JZL60、JZL67、JZL72、JZL124、MiSaTPW76、MiSaTPW117 和 MiSaTPW173 共 7 个微卫星位点与体重、体长和体高显著或极显著相关($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$), 然后将这些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, 结果表明, 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 为体重、体长和体高性状相关的优势基因型。鲁翠云等(2013)通过一般线性模型分析了 24 个微卫星位点与大磷鲈生长性状的相关性, 结果表明 6 个位点与 4 项生长性状均具有显著相关性, 然后通过 Duncan 法进行多重比较找出每个微卫星位点中的优势基因型。根据以上研究可以表明, 在微卫星标记中会有某个标记与多个生长性状相关或是多个标记与某一个生长性状相关的情况, 这就是一因多效和多效一因的现象。

本研究通过微卫星标记与数量性状的表型连锁分析, 对标记位点的基因型和个体表型进行显著性检验, 从而确定微卫星位点和数量性状之间的关联性。利用一般线性分析找出了 3 个微卫星位点与中华鳖的生长性状显著或极显著相关, 然后使用 Duncan 法将与生长性状显著相关的微卫星位点的不同基因型进行多重比较, 共得到 6 种具有生长性状优势的基因型, 其中位点 LTF1 中的 BE 基因型对中华

鳖的体重、背甲长、背甲宽、体高、腹甲长和腹甲宽等生长性状都比其他基因型有明显的生长优势; 位点 LTR87 中的 BB 基因型对中华鳖的体重、背甲长和腹甲宽都有明显的生长优势; 位点 LT8 中的 CF、BC、AC、CC 基因型对中华鳖的体重、体高、腹甲长和腹甲宽都有明显的生长优势。这些基因型可以作为开发中华鳖生长性状正相关辅助标记选择的基因型, 为中华鳖的良种选育提供了有价值的依据。

本实验结果发现, 所筛选的位点 LTF1、LTR87 和 LT8 及其 6 种优势基因型在极大群体中的多个个体中发生了聚合, 这为下一步多基因位点的聚合效果的分析提供了初步数据。这些标记能否用于中华鳖的其他群体的良种选育研究有待进一步的论证, 但是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。

3 材料与方法

3.1 实验材料

该试验对象来源于珠江水产研究所与国家级中华鳖良种场—广东省绿卡实业有限公司共同逐代选育繁殖的健康鳖苗。2014 年 7 月, 以重量为指标, 从同一养殖池中选取同龄的鳖 120 只, 体重 600 g 以上 60 只为一组, 组成极大群体, 300 g 以下 60 只为一组, 组成极小群体。

3.2 实验所用试剂和仪器

表型性状的测量: 用电子天平称取中华鳖样本体重, 游标卡尺测量样本背甲长、背甲宽、体高以及腹甲长、腹甲宽。

基因组 DNA 的提取: 剪取中华鳖样本的指甲, 置于无水乙醇中浸泡, -20°C 保存备用。利用 OMEGA Micro Elute Genomic DNA Kit 试剂盒提取 DNA。1% 琼脂糖电泳检测 DNA 的完整性。DNA 经 NanoQ™ 微型分光光度计(博奥)检测浓度, 并用去离子水稀释至终浓度 $20 \text{ ng}/\mu\text{L}$, 置于 -20°C 保存备用。

实验所用引物: 所用的微卫星引物有中华鳖转录组信息设计微卫星引物和 GenBank 中华鳖 EST 序列筛选所得微卫星位点设计, 主要由英潍捷基公司(广州)合成, 上游 5' 端添加相同的 M13 通用引物接头。在设计 100 对微卫星引物中筛选出 25 对条带清晰、多态性丰富、稳定性及特异性强的引物, 然后在不同引物上游 5' 端加不同颜色的荧光标记序列(ROX, HEX, FAM, TAMRA), 送往英潍捷基公司重新合成, PCR 扩增前将每对引物上下游按照 1:40 混合, 在涡旋混合器上混匀。引物详细信息列于表中(表 7)。

表 7 25 对微卫星引物序列特征

Table 7 Characteristics of the twenty-five microsatellite primers' sequences

基因位点 Locus	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	产物大小 (bp) Production size (bp)	退火温 度(°C) Tm (°C)	接头序列(5'-3') Joint sequence (5'-3')	荧光标记 Fluorescence labeling	登录号 Accession number
LT6	F: AAAGCAGGGGAGAGAACAGC R: CATGGTCTAGGCAGTGCTGA	145~190	63.1	CAGGAACTCAGTGTGACACTC	HEX	DQ371923
LT7	F: ACGCAGGACCAAGAGTGAGG R: TGTGCCACTCCCCGTATTGT	142~176	62.1	CGACAGACAGTAAGGTCTCTG	TAMRA	HM068084
LT8	F: AGTGAACCTTGACATCCCAG R: TCCAGTGAAGGTTCCAGACA	176~216	61.4	CAGGAACTCAGTGTGACACTC	HEX	DQ371914
LT9	F: ACCAGTCAGGAAAGTTGACAC R: GCCAGTTTACCAAGAGATGGA	190~244	63.5	CACGACGTTGTAACACGAC	ROX	FJ889059
LT38	F: GGAATAAGGGAAGTCAGAGG R: CAAAGGATACCATCACAAA	240~300	56	CAGGAACTCAGTGTGACACTC	HEX	HQ207559
LT40	F: TTACTGTCAAGTGCTGTCCC R: AGCGAATCCATAATCCTGTT	234~309	55.3	CAGGAACTCAGTGTGACACTC	HEX	HQ207553
LT42	F: CGAAGGTGAAAAAAGGTGTT R: ATGTTTGTGCTGGGAAGG	183~249	56.7	AGCTCGACCAGTGAGTCAG	FAM	HQ207555
LT46	F: ATTTTTTTGGCCTCTGTA R: CTCTTTCCGCTGTCTTTTT	235~304	57.3	CAGGAACTCAGTGTGACACTC	HEX	HQ207560
LT47	F: GGACAACATCCAGTCAAATG R: CCAATCCCCAAAGAAGGTAA	240~300	55.8	CAGGAACTCAGTGTGACACTC	HEX	HQ207561
LT48	F: TAGTCCTTTATTGAACCCTG R: CTTGAAAGAGCATCTCCATA	286~358	57.3	CGACAGACAGTAAGGTCTCTG	TAMRA	HQ207562
LT49	F: TAAAGTGAGGCTAGAGAAG R: AAAAAATGAGTGAGTGATG	299~452	57.3	CAGGAACTCAGTGTGACACTC	HEX	-
LT60	F: CCCCAAGAAGGAAGACTATT R: ATTTGAGAGGAAGCACAG	259~393	57.5	AGCTCGACCAGTGAGTCAG	FAM	HQ207554
LT61	F: TGCTGTCCCCCTCTTTGATT R: AGCAGACAGAAGTATCCCCAA	182~258	60.7	CGACAGACAGTAAGGTCTCTG	TAMRA	HQ207553
LT64	F: ATTCCTCTTGAACGCACTCT R: GGGAACGCATAATGGTAAT	149~267	55.5	CAGGAACTCAGTGTGACACTC	HEX	HQ207550
LT70	F: CTTGAAAAAACGGACTTAC R: AATGTCCACGGAGTGCTAT	140~242	56.6	CAGGAACTCAGTGTGACACTC	HEX	HQ207543
LT79	F: TAACAAGCAGGACCAAGAG R: TGTGCCATTCCCCGTATT	146~177	58.3	AGCTCGACCAGTGAGTCAG	FAM	-
LTF1	F: GTGGGTGTTTGGTCAAGGAT R: CTTCCACACACACAACCCTG	86~125	63	CAGGAACTCAGTGTGACACTC	HEX	-
LTF42	F: TGCTCGCATTGTCTTCAGTC R: AACCCAAAACATCCTTGA	246~274	63	CAGGAACTCAGTGTGACACTC	HEX	-
LTF56	F: TGCTGTGCTGTATCCCAGAG R: GGATTACCAGGGTTAGGGCT	274~284	63	CAGGAACTCAGTGTGACACTC	HEX	-
LTF68	F: GCAACACGCCACATTTACTG R: CGATGAGAGCATCCTGAACA	225~278	63	CAGGAACTCAGTGTGACACTC	HEX	-
LTH18	F: CAGACCAACAACCAATCT R: TGAAAGCACACCACCCAGTA	253~293	63	CAGGAACTCAGTGTGACACTC	HEX	-
LTH30	F: AGAAGAGAGGGGGTGAGAGC R: GCGTGTGACTTCTCTGTCA	273~302	63	CAGGAACTCAGTGTGACACTC	HEX	-
H61	F: ACCCCTCACAGCATTGTTTC R: GGTTGCAAGGAGTCCCACTA	208~255	63	CAGGAACTCAGTGTGACACTC	HEX	-
LTH101	F: CGCTCTGCTTTTGTGTTTCC R: CGGTGTGTGCAAAGACTAGG	171~293	63	CAGGAACTCAGTGTGACACTC	HEX	-
LTR87	F: AAGCTCCAGGAACTGTGCAT R: TCCTTCAGCCACATTCAAGT	189~293	63	CAGGAACTCAGTGTGACACTC	HEX	-

3.3 PCR 反应程序及产物检测

PCR 反应总体系为 10 μ L :AB Multiplex PCR Master Mix 5 μ L ,混合引物 2 μ L (上下游 1:40) 荧光接头 0.2 μ L ,去离子水 1.8 μ L ,DNA 1 μ L (20~30 ng)。扩增程序为 :94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min ,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s ,最适退火温度退火 45 s ,72 $^{\circ}$ C 延伸 70 s ,22 个循环 ,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s ,53 $^{\circ}$ C 退火 40 s ,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s ,8 个循环 ,72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。

PCR 产物检测 :反应结束后 取 2 μ L 的产物 加入 8 μ L 的 HiDi (去离子甲酰胺)与 LIZ-500 (内标)的混合物 ,置于冰板变性 5 min ,然后利用全自动遗传分析仪 ABI3130 进行毛细管电泳。

3.4 统计分析

利用 Peak Scanner Software V1.0 软件统计个体各位点的分子量 通过分子量确定基因型(同一位点的分子量值由小到大依次记为 A、B、C……所有位点同此)。运用 CERVUS 软件计算等位基因数(number of allele, Ne)、观测杂合度(observed heterozygosity, Ho)、期望杂合度(expected heterozygosity, He)和多态性信息含量(PIC) ,并进行 Hardy-weinberg 检验。然后运用 SPSS 19.0 软件对实验数据进行统计分析。首先利用卡方检验 对 25 个微卫星位点在极大和极小群体中的分布进行初步筛选。然后应用一般线性模型(general linear models, GLM)对体重、背甲长、背甲宽、体高、腹甲长、腹甲宽等生长性状与初步筛选微卫星位点的关联性进行最小二乘分析 ,经分析差异显著的位点 再使用 Duncan 法对同一位点的各基因型进行多重比较。由于微卫星位点中某些基因型出现频率太低 不具有统计分析意义。因此 在实际统计分析中 当基因型样本数的观测值在 3 次及以上时才计入统计。分析结果以平均值 \pm 标准偏差($\bar{x}\pm$ SD)表示。

作者贡献

李婷对研究进行实施操作、数据登记整理以及论文撰写 ;朱新平对研究进行设计、指导和论文审核修改 ;李伟、赵建、史燕、洪孝友和王亚坤参与本研究的采样、数据测量等具体工作。

致谢

本研究由广东省海洋渔业科技与产业发展专项科技攻关与研发项目(A201501A01)资助。感谢中国水产科学研究院珠江水产研究所农业部热带亚热带

水产资源利用与养殖重点实验室的支持。

参考文献

- Botstein D., White R.L., Skolnick M., and Davis R.W., 1980, Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism, *Am. J. Human Genetics*, 32(3): 314-331
- Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture, People's Republic of China, ed., 2015, China fishery statistics year book, China Agriculture Press, Beijing, China, pp.30 (中华人民共和国农业部渔业局, 编著, 2015, 中国渔业统计年鉴, 中国农业出版社, 中国, 北京, pp.30)
- Fan J.J., Bai J.J., Li X.H., He X.P., He X.Y., Li S.J., Ye X., and Wu L.X., 2009, Identification of microsatellite markers associated with growth traits in largemouth bass (*Micropterus salmoides* L.), *Yichuan (Hereditas)*, 31(5): 515-522 (樊佳佳, 白俊杰, 李小慧, 何小平, 何小燕, 李胜杰, 叶星, 吴立新, 2009, 大口黑鲈生长性状的微卫星 DNA 标记筛选, *遗传*, 31(5): 515-522)
- Fuji K., Kobayashi K., Hasegawa O., Coimbra M.R.M., Sakamoto T., and Okamoto N., 2006, Identification of a single major genetic locus controlling the resistance to lymphocystis disease in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*), *Aquaculture*, 254(1-4): 203-210
- Hamada H., Petrino M.G., and Kakunaga T., 1982, A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79(21): 6465-6469
- Lal K.K., Chauhan T., Mandal A., Singh R.K., Khulbe L., Ponniah A.G., and Mohindra V., 2004, Identification of microsatellite DNA markers for population structure analysis in Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton-Buchanan, 1882), *Journal of Applied Ichthyology*, 20(2): 87-91
- Li S.F., Cai W.Q., Liu Z.Z., Fu L.X., Wang C.H., Ji G.H., Zhu J., Gu Z.M., and Song X.P., 2004, Comparative study on variation of body shape and belly back spot pattern among seven populations of *Trionyx sinensis*, *Shuichan Xuebao (Journal of Fisheries of China)*, 28(1): 15-22 (李思发, 蔡完其, 刘至治, 付立霞, 王成辉, 季高华, 朱津, 顾忠明, 宋晓平, 2004, 中华鳖七群体体形和腹部黑斑图案的差异比较, *水产学报*, 28(1): 15-22)
- Liu F.P., Bai J.J., Song H.M., Ye X., Li S.J., and Yu L.Y., 2010, Correlation analysis of microsatellite DNA markers with major growth traits of tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Shuichan Xuebao (Journal of Fisheries of China)*, 34(2): 169-177 (刘福平, 白俊杰, 宋红梅, 叶星, 李胜杰, 于凌云, 2010, 尼罗罗非鱼微卫星标记与主要生长性状的相关性分析, *水产学报*, 34(2): 169-177)

- Liu Y., Shi Y., Zhu X.P., Zhao J., Zhou G.T., and Hong X.Y., 2012, Genetic diversity in five populations of *Trionyx sinensis* revealed by microsatellite markers, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 31(2): 141-146 (刘阳, 史燕, 朱新平, 赵建, 周贵谭, 洪孝友, 2012, 中华鳖 5 个群体遗传多样性的微卫星分析, *基因组学与应用生物学*, 31(2): 141-146)
- Lu C.Y., Geng L.W., Li C., Cheng L., Sun X.W., and Xu W., 2013, Analysis of genetic structure and growth traits in *Barbus capito* using microsatellite markers, *Shuichan Xuebao (Journal of Fisheries of China)*, 37(8): 1121-1128 (鲁翠云, 耿龙武, 李超, 程磊, 孙效文, 徐伟, 2013, 微卫星标记分析大鳞鲃养殖群体的遗传结构及生长性状, *水产学报*, 37(8): 1121-1128)
- Pan Y.J., ed., 2007, Aquatic dictionary, Shanghai Lexicographical Publishing House, Shanghai, Zhongguo, pp.26-28 (潘迎捷, 主编, 2007, 水产辞典, 上海辞书出版社, 中国, 上海, pp.26-28)
- Tautz D., and Renz M., 1984, Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes, *Nucleic Acids. Res.*, 25(10): 4127-4138
- Wan S.Q., 2009, Screening of microsatellite markers associated with growth traits in *Macrobrachium nipponense*, Thesis for M.S., Nanjing Agricultural University, Supervisor: Fu H. T., pp. 23-27 (万山青, 2009, 青虾生长性状相关微卫星标记的筛选, 硕士学位论文, 南京农业大学, 导师: 傅洪拓, pp.23-27)
- Wang P.C., ed., 2000, China's turtles, East China Normal University Press, Shanghai, Zhongguo, pp.50-56 (王培潮, 编著, 2000, 中国的龟鳖, 华东师范大学出版社, 中国, 上海, pp.50-56)
- Wu Y., Fu C.P., Jiang S.F., Fu H.T., Qiao H., Gong Y.S., and Xiong Y.W., 2011, Preliminary studies on the correlation between microsatellite markers and growth traits in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*), *Shuisheng Shengwu Xuebao (Acta Hydrobiologica Sinica)*, 35(2): 197-202 (吴滢, 付春鹏, 蒋速飞, 付洪拓, 乔慧, 龚永生, 熊怡伟, 2011, 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*, 35(2): 197-202)
- Yang J., Zhang X.F., Chu Z.Y., and Sun X.W., 2010, Correlation analysis of microsatellite markers with body weight, length, height and upper jaw length wensize of common carp (*Cyprinus carpio* L.), *Zhongguo Shuichan Kexue (Journal of Fishery Sciences of China)*, 17(4): 721-730 (杨晶, 张晓峰, 储志远, 孙效文, 2010, 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*, 17(4): 721-730)
- Zhang Z.Y., Li S.F., Cai W.Q., Xie Z.F., and Yin L.M., 2011, Microsatellite analysis of genetic variation in selected F₁, F₂ and F₃ generations of Yellow River populations of Chinese soft-shelled turtle, *Trionyx sinensis*, *Shanghai Haiyang Daxue Xuebao (Journal of Shanghai Ocean University)*, 20(2): 161-166 (张志允, 李思发, 蔡完其, 谢中富, 殷黎明, 2011, 中华鳖黄河群体选育世代 F₁、F₂ 及 F₃ 遗传变异微卫星分析, *上海海洋大学学报*, 20(2): 161-166)

International Journal of Super Species Research



International Journal of Super Species Research (ISSN 1927-6621) is an open access, peer reviewed journal published online by BioPublisher. The journal publishes all aspects of super species research, containing super species, plant species and their biological aspects including life histories population dynamics molecular biosystematics co-evolutionary networks among plants and other organisms and mechanisms of speciation; as well as summarizing the current understanding of the biology of species including systematics, distribution, fossil history, genetics, anatomy, physiology, behavior, ecology, and conservation.

Email: edit@ijssr.biopublisher.ca

Web: <http://ijssr.biopublisher.ca>