

中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)EST-SSR 标记 与生长性状相关性分析*

张群英¹ 黄鹤忠¹ 袁文成¹ 李文龙¹ 雍福和² 徐雪英³ 张平⁴

(1. 苏州大学基础医学与生物科学学院 苏州大学水产研究所 苏州 215123; 2. 江苏省苏州市吴中区胥口镇
马舍特种水产养殖场 苏州 215004; 3. 江苏省苏州市水产技术推广站 苏州 215006;
4. 江苏省徐州市睢宁县水产技术指导站 徐州 221200)

提要 采用中华鳖转录组测序方法开发了一系列 EST-SSR 引物,对 60 只中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)的遗传多样性和标记-性状相关性进行研究,结果表明,15 对 EST-SSR 引物扩增结果达到了高度多态水平,平均的有效等位基因数、期望杂合度和多态性信息含量分别为 2.7633、0.5961 和 0.539177。C8387 位点分别与体长、体重、背甲长和裙边宽显著相关($P<0.05$)和极显著相关($P<0.01$),CC 型、AB 型分别为 4 种性状的优势、劣势基因型;C211 位点分别与体重、背甲长和裙边宽呈极显著相关($P<0.01$)和显著相关($P<0.05$),其中等位基因 C 与体重呈负相关,CC 型是裙边宽、背甲长性状的劣势基因型,而 BB 型和 AB 型分别是裙边宽和体重的优势基因型;C5670 位点与体重和背甲长分别呈极显著相关($P<0.01$)和显著相关($P<0.05$),其中 BB 型和 AA 型分别是体重和背甲长的优势、劣势基因型;C1312 和 C13038 位点均与体重、背甲长极显著相关($P<0.01$),且 C1312 上的 BC 型、C13038 上的 BB 型分别是中华鳖体重、背甲长性状的优势基因型。

关键词 中华鳖; EST-SSR 标记; 生长性状; 相关性分析

中图分类号 S941

中华鳖(*Pelodiscus sinensis*),又名水鱼、甲鱼、团鱼,因鲜美独特的风味和良好的滋补效果,一直备受消费者和养殖者喜爱。近年来随着科学技术和养殖技术的发展,中华鳖的养殖规模发展迅猛,然而自二十世纪九十年代以来,由于大量境外走私鳖涌入我国,加之各养殖场间相互引种、不规范导种和近亲繁殖,导致中华鳖的种质性状出现退化等现象(黄丽英等,2005),不利于中华鳖产业的可持续发展,因此中华鳖的种质保护和良种选育势在必行。

微卫星(即简单序列重复 simple sequence repeat, SSR)具有多态性高、重复性好和共显性的特点,在基因组中分布广泛、数量丰富,按照其来源可分为基因组 SSR(G-SSR)和表达序列标签 SSR(EST-SSR)。其中

EST-SSR 来源于基因编码区,可以定位到相关功能基因上,与 G-SSR 标记相比可提高标记辅助育种的效率(Gupta *et al*, 2004; Skaala *et al*, 2004)。Que 等(2007)、Li 等(2010)、Bu 等(2011)分别通过磁珠富集法开发了少量中华鳖 G-SSR 标记,但其定位的基因不得而知。随着高通量技术的发展,第二代测序逐渐成为大规模开发 EST-SSR 标记的主要技术(Zalapa *et al*, 2012),与传统繁琐低效的磁珠富集法和小型 EST 文库构建法相比,转录组测序技术可在短时间内高效经济地开发出大量适用于分子标记辅助育种及 QTL 定位的 SSR 标记(Zhang *et al*, 2012)。目前,许晓军等(2013)分析了中华鳖转录组部分 EST 数据中微卫星序列的类型和频率,证明了从中华鳖转录组 EST

* 江苏省科技支撑项目, BE2012357 号; 江苏省睢宁县水产原良种体系建设项目, PJ2012-10 号。张群英, 硕士研究生, E-mail: 18862131376@163.com

通讯作者: 黄鹤忠, 并列第一作者, E-mail: suda-shui@163.com

收稿日期: 2012-05-26, 收修改稿日期: 2012-08-18

中发掘 SSR 标记的可行性,但是,中华鳖 EST-SSR 标记的开发及其与性状相关性的研究在国内外还未见报道。本文基于本课题组对中华鳖转录组测序产生的 EST 而开发的多态性微卫星标记,研究微卫星位点与体长、体重等经济性状的相关性,为中华鳖 EST-SSR 的批量开发开辟新途径,可弥补当前中华鳖良种选育和种质改良研究中遗传背景较模糊、分子标记数量少的局限性,为中华鳖良种选育和种质改良提供基础,从而推动中华鳖分子标记辅助遗传育种和基因组学研究的进程。

1 材料与方法

1.1 材料

中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)来自于苏州市吴中区胥口镇马舍特种水产养殖场和徐州睢宁县龙池甲鱼养殖场,随机抽取中华鳖太湖鳖品系和中华鳖黄河品系的足量鳖卵,置同一温室中进行孵化后,再同池中混养至一龄后随机抽取 60 只健康中华鳖个体,活体运回实验室进行体长、体重等指标的测量。

1.2 EST-SSR 引物

所用的 15 对引物为本实验室中华鳖转录组 EST

数据设计并开发,多态性均已验证,由上海生工公司合成,引物的序列及定位的基因注释信息见表 1。

1.3 试验方法

1.3.1 表型数据的测量及基因组 DNA 的提取 60 只中华鳖进行表型性状测量并记录数据后,分别取黄豆粒大小的后腿肌肉,固定保存于无水乙醇中,采用酚-氯仿抽提法提取基因组 DNA 后,经核酸蛋白测定仪(Thermo Fisher)和琼脂糖凝胶电泳测定 DNA 含量、纯度及完整性,无菌水稀释至 100ng/μL,保存于-20℃。

1.3.2 微卫星扩增反应及电泳 15 对微卫星引物扩增均采用 20μL PCR 反应体系,包括 2×ES TaqMIX 10μL,上下游引物(10μmol/L)各 1μL,模板 DNA 1μL,无菌水补足至 20μL,然后在 PCR 仪(TAKARA)上进行扩增,扩增程序为:94℃预变性 2min,26 个循环(94℃变性 30s,50—60℃30s,72℃延伸 30s),最后 72℃延伸 2min。6%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后,参照高东等(2009)的方法进行硝酸银染色,凝胶成像系统拍摄电泳图后采用 Gel-Pro Analyzer 4.5 软件进行读带和分型。

1.3.3 数据分析与统计

(1) 微卫星引物在中华鳖群体中的遗传多样性检测

表 1 微卫星位点及引物信息
Tab.1 Information of the microsatellite loci and primers sequence

位点	基序	引物序列(5'—3')	NR-tophit_description
C8433	(AT) ₉	F: ATGCCAGCGTTGTGCTTTC R: CAAATCTGCCCTACGTCGC	—
C8387	(ATTT) ₄	F: GCTGTTCCGACCCAGTGTG R: AGCACCTGTAGGAGGACTTG	泛素蛋白连接酶 E3A[鸡]
C4663	(GT) ₈	F: AAACAACAGGATTTCCATGCTC R: CCTCCCTCAGACAAGCTCC	—
C211	(CGG) ₅	F: AGTTCCTGAGCAGTACCC R: ACCTGCTTACAGCTGAGTTTC	B 细胞易位蛋白[鸡]
C5670	(AGG) ₅	F: CAACGGATGCACTCTCGC R: AGTGTTAGGGACAGCGCC	—
C5960	(AGC) ₄	F: CTGCATCCTTGGCTTCGTG R: CTGCATCCTTGCCTTCGTG	—
C0009	(GT) ₉	F: CATCGCAACCTTGAGAGAGAC R: CTGGCTAATTGTGCAGACCG	—
C8513	(GT) ₉	F: CCAATGCGAATGAGTTTGCC R: CTGGCTAATTGTGCAGACCG	—
C11010	(CCTT) ₄	F: AGCTGGGCAATAGATGGCTG R: ATGAGGCAGACAAGAGCC	小 G 蛋白信号调制器 3 同源蛋白[火鸡]
C25692	(GT) ₉	F: ATCAAACCTCCAGGGCTCC R: GAGATTGCCCTGGTTGGC	肌细胞增强因子 2D 样[鸡]
C2226	(CT) ₁₀	F: GGCACAGTTTGATCAGTGGG R: GGGTGAAGACTCTGATGGG	—
C4950	(AC) ₁₁	F: GCTTGCATAGATCCGCGAC R: TGATACCTAGGACCCGAGG	—
C1312	(CT) ₁₁	F: AGAGGATTGACCTAAGAAATTG R: AGGGAAGTGAAGGAGGTTG	Der1-like 家族成员 1 转录变体[斑胸草雀]
C13038	(CCT) ₅	F: GATGCAGCGAAGGAACACG R: GGGCTTTGGTGACGACTTG	RNA 聚合酶 的 RPBI 亚基[安乐蜥]
C1675	(GT) ₁₁	F: CAAGAAGTCCGGCTTTGGC R: CTCCAGAGATAIGCCTTCCAG	—

NR-tophit_description: “—”表示该位点所在序列与 NR 数据库比对得到的物种相似序列的描述

聚丙烯酰胺凝胶电泳、硝酸银染色后拍照, 并利用软件 Gel-Pro Analyzer 4.5 获取每只中华鳖的基因型数据。利用 PopGen32 软件统计各个微卫星标记基因座的等位基因频率(P)、等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)以及期望杂合度(H_e), 根据 Botstein 等(1980)的公式计算出多态性信息含量 PIC。

(2) 基因位点、基因型与经济性状的相关分析

首先利用 SPSS 16.0 软件中 Shapiro-Willk 检验检测 4 种生长性状的频率分布是否显著偏离正态分布, 再利用该软件中广义线性模型(GLM)对本文的 15 个 SSR 位点与中华鳖体长、体重、背甲长和裙边宽 4 个生长性状的相关性进行最小二乘方差分析, 以得到与生长性状显著相关的微卫星位点。利用该软件的 ANOVA 方差分析法对与生长性状显著相关的位点进行不同基因型间与不同性状间的多重比较, 得到与 4 种经济性状显著相关的基因型。

2 结果与分析

2.1 表型性状的分布检测

检验结果表明, 60 只中华鳖的体重、体长、背甲长和裙边宽性状都显示出连续变异的特点, 说明 4 种生长性状都是典型的数量性状(吴滢等, 2011)。通过 SPSS 16.0 中的 Kolmogorov-Smirnov 检验, 体重、体长、背甲长和裙边宽的 P 值均大于 0.05, 说明 4 者均符合正态分布(表 2), 满足分析的要求。

2.2 中华鳖遗传多样性的分析

经过 PCR 反应和聚丙烯酰胺凝胶电泳, 15 对微卫星引物在中华鳖群体中扩增效果理想, 条带清晰稳定, 并表现出一定程度的多态性, 如图 1、图 2 分别是位点 C8433、位点 C0009 在中华鳖部分群体中的多态性扩增结果。

表 2 中华鳖的体重、体长、背甲长、裙边宽正态分布检验
Tab.2 The test of normal distribution in body weight, body length, carapace length and side width of *P. sinensis*

性状	均值	最小值	最大值	P
体重	42.3592 ± 11.67388	18.44	65.97	0.561
体长	7.9800 ± 1.30702	5.60	10.20	0.122
背甲长	6.0800 ± 0.79814	4.10	7.60	0.631
裙边宽	1.2400 ± 0.28175	0.70	1.80	0.123

15 对引物的等位基因数为 2—7, 平均等位基因数(N_a), 平均有效等位基因数(N_e)、平均观测杂合度(H_o)、平均期望杂合度(H_e)和平均多态信息含量(PIC)分别为 3.3333、2.7633、0.3989、0.5961 和 0.539177(表 3)。

2.3 生长性状显著相关位点、基因型的分析

将 15 个多态性位点与中华鳖 4 种生长性状进行一般线性模型相关性分析, 求出最小二乘均值, 结果发现共有 5 个位点与生长性状表现出一定的相关性, 其中 C8387 与体长($P=0.021$)、体重($P=0.02$)、背甲长($P=0.032$)均显著相关($P<0.05$), 与裙边宽($P=0.0087$)极显著相关($P<0.01$); C211 位点与体重($P=0.007$)、背甲长($P=0.009$)极显著相关($P<0.01$), 与裙边宽($P=0.028$)显著相关($P<0.05$); C5670 与体重($P=0.000$)极显著相关($P<0.01$), 与背甲长($P=0.042$)显著相关($P<0.05$); C1312 和 C13038 位点分别与体重($P=0.009$)和背甲长($P=0.002$)极显著相关($P<0.01$)。

将 5 个性状相关性的位点的所有基因型与各生长性状分别做多重比较, 结果如下(见表 4): 在中华鳖微卫星标记 C8387 位点上, CC 基因型的体重、体长、背甲长和裙边宽 4 个性状均值最大, 且均显著大于 AB 基因型($P<0.05$), 说明 CC 型为 4 种生长性状的优势基因型, AB 型为劣势基因型。

在微卫星 C5670 位点中, BB 基因型中华鳖的体

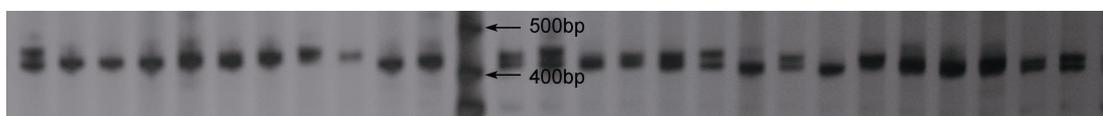


图 1 C8433 位点在中华鳖中扩增的多态性

Fig.1 PCR amplification result of C8433 loci in *P. sinensis*

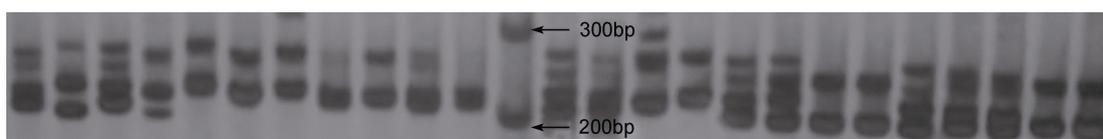


图 2 C0009 位点在中华鳖中扩增的多态性

Fig.2 PCR amplification result of C0009 loci in *P. sinensis*

表 3 中华鳖群体 15 个微卫星位点的遗传多样性统计
Tab.3 Data of genetic diversity of 15 microsatellite loci for *P. sinensis*

位点	N_a	N_e	H_o	H_e	PIC
C8433	4	3.0756	0.3833	0.6805	0.631108
C4663	3	2.6836	0.4833	0.6326	0.580413
C8387	4	2.7098	0.3333	0.6363	0.608413
C211	3	2.7304	0.3833	0.6391	0.571331
C5670	4	3.5122	0.4667	0.7213	0.686731
C5960	4	3.9024	0.6833	0.7500	0.722843
C0009	7	6.1121	0.6333	0.8434	0.895932
C8513	3	2.8092	0.3667	0.6494	0.609267
C11010	3	1.9667	0.3333	0.4957	0.406474
C25692	3	2.4991	0.3000	0.6049	0.526842
C2226	3	2.0202	0.4000	0.5092	0.393309
C4950	2	2.0000	0.4000	0.5042	0.37500
C1312	3	1.6969	0.2500	0.4141	0.367502
C13038	2	1.8967	0.5333	0.4768	0.36101
C1675	2	1.8349	0.400	0.4588	0.351488
平均值	3.3333	2.7633	0.3989	0.5961	0.539177

N_a 等位基因数, N_e 有效等位基因数, H_o 观测杂合度, H_e 期望杂合度, PIC 多态性信息含量

重和背甲长性状均显著高于 AA 基因型个体 ($P < 0.05$), 说明 BB 基因型是体重和背甲长性状的优势基因型, 而 AA 为劣势基因型。

C211 位点定位在编码 B 细胞易位蛋白的基因上, 说明该蛋白与中华鳖的生长性状相关。多重比较分析表明, 中华鳖 CC 基因型个体的体重显著低于 AB、AA 和 BB 基因型个体 ($P < 0.05$), BC 基因型个体的体重也显著低于 AB 型个体 ($P < 0.05$), 而 AB、AA、BB 三种基因型间差异不显著 ($P > 0.05$), 推测等位基因 C 与体重呈负相关; CC 基因型个体的背甲长均值显著低于其它基因型的个体 ($P < 0.05$), 而其它 4 种基因型间无显著性差异 ($P > 0.05$); CC 基因型个体的裙边宽性状均值最小, 且显著低于均值最高的 BB 型个体 ($P < 0.05$), 而其它基因型 BB、BC、AB、AA 个体间未形成显著性差异 ($P > 0.05$)。以上结果说明, CC 基因型是背甲长和裙边宽性状的劣势基因型; 而 BB 型和 AB 型分别为裙边宽和体重性状的优势基因型。

微卫星标记 C1312 位点定位在 Der1-like 家族成员 转录变体上, 此转录变体影响着中华鳖的体重。对各基因型间的 4 种生长性状显著性差异比较后也

表 4 中华鳖 5 个微卫星位点不同基因型体重、体长、背甲长和裙边宽的平均值及多重比较

Tab.4 Means and multiple comparisons of body weight, body length, carapace length and side width of *P. sinensis* in 5 microsatellite loci

位点	基因型	个体数	体重(g)	体长(cm)	背甲长(cm)	裙边宽(cm)
C8387	AB	6	28.6575 ± 10.56721 ^a	6.4750 ± 0.7974 ^a	5.2000 ± 0.9055 ^a	1.1792 ± 0.2653 ^a
	AA	36	40.2771 ± 10.4760 ^b	7.7583 ± 1.2703 ^{ab}	5.9750 ± 0.7525 ^{ab}	1.0000 ± 0.2449 ^{ab}
	BC	7	50.8920 ± 9.6764 ^b	8.8800 ± 0.95237 ^b	6.3600 ± 0.4159 ^{ab}	1.4200 ± 0.2387 ^b
	CC	11	51.2329 ± 7.1991 ^b	8.9571 ± 0.7067 ^b	6.7429 ± 0.5533 ^b	1.4571 ± 0.2070 ^b
C5670	AA	33	36.2590 ± 2.0200 ^a	7.8451 ± 0.2433 ^a	5.8131 ± 0.6142 ^a	1.0913 ± 0.0533 ^a
	AB	18	47.6231 ± 2.7360 ^b	8.7670 ± 0.3250 ^a	6.1424 ± 0.9312 ^a	1.1513 ± 0.1022 ^a
	BB	9	54.1982 ± 3.8690 ^b	8.8830 ± 0.4591 ^a	6.9333 ± 0.5355 ^b	1.1674 ± 0.0723 ^a
C211	CC	6	24.3632 ± 6.5334 ^a	7.2752 ± 0.7412 ^a	4.6500 ± 0.4042 ^a	0.8511 ± 0.1915 ^a
	BC	5	33.1970 ± 17.4441 ^{ab}	7.7333 ± 1.2702 ^a	5.6221 ± 0.9539 ^b	0.9667 ± 0.2309 ^{ab}
	AA	28	43.4240 ± 7.5511 ^{bc}	8.5684 ± 0.7917 ^a	6.2474 ± 0.60311 ^b	1.1158 ± 0.1501 ^{ab}
	BB	15	47.0631 ± 10.9060 ^{bc}	8.2734 ± 1.7340 ^a	6.2912 ± 0.5216 ^b	1.2700 ± 0.3434 ^b
	AB	6	50.4123 ± 11.971 ^c	8.3251 ± 1.4408 ^a	6.5532 ± 0.9678 ^b	1.1751 ± 0.1707 ^{ab}
C1312	AB	3	31.6950 ± 18.7454 ^a	7.2500 ± 2.3335 ^a	5.4500 ± 0.7778 ^a	1.0000 ± 0.4243 ^a
	BB	45	40.2087 ± 10.4746 ^{ab}	7.7133 ± 1.21506 ^a	5.9633 ± 0.8037 ^a	1.1933 ± 0.2586 ^a
	AA	6	50.7300 ± 9.9586 ^b	8.8500 ± 0.6758 ^a	6.6750 ± 0.6185 ^a	1.4500 ± 0.2646 ^a
	BC	6	55.4500 ± 7.1233 ^b	9.4750 ± 0.7805 ^a	6.6750 ± 0.3304 ^a	1.5000 ± 0.2160 ^a
C13038	AB	33	40.4873 ± 11.4677 ^a	7.8636 ± 1.3040 ^a	5.8182 ± 0.8063 ^a	1.2714 ± 0.3315 ^a
	AA	21	43.3414 ± 12.9017 ^a	8.0000 ± 1.4507 ^a	6.2571 ± 0.6802 ^{ab}	1.2091 ± 0.2724 ^a
	BB	6	49.2175 ± 6.0706 ^a	8.5500 ± 0.8062 ^a	6.9000 ± 0.4243 ^b	1.3000 ± 0.1414 ^a

同一栏中不同上标字母数值间差异显著 ($P < 0.05$)

发现,除了 AB 型个体在体重上与 BC 和 AA 基因型个体间差异达到了显著水平($P < 0.05$)以外,其它 3 个生长性状的基因型间差异不显著($P > 0.05$)。其中 AB 基因型体重、体长、背甲长和裙边宽均值最小,推测为劣势基因型,而 BC 型均值最大,推测为优势基因型。

C13038 位点所在的基因编码 RNA 聚合酶的 RPB1 亚基蛋白,表明此蛋白与中华鳖背甲长的生长有关。显著性差异分析也表明, BB 基因型个体的背甲长均值最大,并显著高于 AB 基因型个体,推测 BB 基因型为背甲长生长优势基因型。

3 讨论

3.1 中华鳖群体遗传多样性的分析

本文中 15 对多态性引物对中华鳖群体进行基因组扫描后,平均有效等位基因数为 2.7633,小于平均等位基因数 3.3333,说明该群体存在等位基因丢失的现象,推测是因为迁移、近交和人工选择导致(万玉美等, 2011)。杂合度可作为群体优良特性的表征,反映了物种、群体或家系的遗传多样性的高低,杂合度越高的群体适应性更强、生命力更旺盛(孙效文等, 2010)。本文中该群体的平均观测杂合度(H_o)为 0.3989,小于期望杂合度(H_e)0.5961,说明群体杂合子不足、遗传多样性低、遗传力不足,可能是由于人工选择和近交影响了其遗传变异。在今后的养殖中,要尽量避免近交、自交,提高亲本的遗传多样性水平,并增加野生群体亲本,从而提高群体遗传多样性和遗传力。多态信息含量(PIC)体现了标记在群体中的多态性高低,本文 15 对引物中,6 对引物表现为中度多态($0.25 < \text{PIC} < 0.5$),9 对引物表现为高度多态($\text{PIC} > 0.5$),15 对引物的平均 PIC 为 0.539177,已达到高度多态水平($\text{PIC} > 0.5$)。证明了通过转录组测序获得的 EST 而开发的 EST-SSR 标记,具有较好的扩增效果和多态性水平,能很好地满足群体遗传研究要求。

3.2 生长性状关联的生长标记的分析

本文的中华鳖太湖鳖品系和中华鳖黄河品系采样前未进行过杂交,将两种品系的鳖卵置于同一环境下孵化后并同池饲养至采样,排除了环境对于两种品系中华鳖的生长性状的干扰,此外,在关联性分析过程中,只考虑观察值不低于 3 次的基因型,从而确保遗传标记-性状关联分析的可信度(刘福平等, 2010)。在 15 个 SSR 位点中, C8387 与体长、体重、背甲长极显著相关,与裙边宽显著相关; C211 位点与体重、背甲长极显著相关,与裙边宽显著相关; C5670

与体重极显著相关,与背甲长显著相关, C1312 和 C13038 分别与体重、背甲长极显著相关;其中一个生长性状与多个 SSR 位点同时相关,说明了这些生长性状是多基因控制的,存在基因连锁或多因一效的现象(李仕贵等, 2002; 郑先虎等, 2011)。同时,不同经济性状同时与一个位点相关联,说明了四种生长性状之间也存在一定程度的关联,可为中华鳖今后良种选育提供参考(安泉泉等, 2012),这一结论与马晓等(2013)的研究结果一致,他们认为中华鳖的背甲长、腹甲长、背甲宽、体高与其体重呈显著正相关($P < 0.01$)。此外, C211 位点、C1312 位点、C13038 位点所在的 EST 序列经过之前转录组测序时的拼接与注释,已定位到具体的功能基因序列或蛋白上,因此从传统的性状-标记连锁上升到性状-基因或性状-蛋白连锁,从而加快了分子标记辅助育种的步伐和效率,但这些蛋白和基因的功能及对性状的详细作用机制还需深入研究。目前,中华鳖的研究主要集中在生长发育(朱道玉, 2009)、疾病防治(胡广洲等, 2010; 孔蕾等, 2013)、地理种群间和不同世代间的遗传结构及多样性(刘至治等, 2004; 张志允等, 2011)和基于转录组测序的生物代谢途径(Wang *et al.*, 2013)等方面,而利用转录组测序的 EST 数据来开发 EST-SSR 标记,并进行种群遗传多样性、性状关联性分析的研究却未见报道,本文首次开发出的 EST-SSR 标记为中华鳖种质保护、分子标记辅助育种、QTL 定位、遗传图谱构建等提供了基础和参考,但这些标记能否作为中华鳖分子标记辅助育种标记还需进一步验证。

4 结论

本文利用 15 对 EST-SSR 多态性引物,对中华鳖进行遗传多样性和生长性状相关性分析,结果如下:

(1) 15 个多态性引物的平均有效等位基因数(N_e)、平均观测杂合度(H_o)、平均期望杂合度(H_e)、平均多态信息含量(PIC)分别为 2.7633、0.3989、0.5961 和 0.539177,达到高度多态水平。

(2) 15 个微卫星位点中,5 个位点与生长性状显著相关: C8387 位点与体长、体重和背甲长极显著相关($P < 0.01$),与裙边宽显著相关($P < 0.05$), C211 位点与体重、背甲长极显著相关($P < 0.01$),与裙边宽显著相关($P < 0.05$), C5670 位点与体重呈极显著相关($P < 0.01$),与背甲长呈显著相关($P < 0.05$), C1312 和 C13038 位点分别与体重、背甲长极显著相关($P < 0.01$)。

(3) C8387 位点上 CC 型为 4 种生长性状的优势基

因型, AB 型为劣势基因型; C5670 位点上 BB 基因型是体重和背甲长性状的优势基因型, 而 AA 为劣势基因型; C211 位点上的等位基因 C 与体重呈负相关, CC 基因型是裙边宽、背甲长性状的优势基因型, BB 型和 AB 型分别是裙边宽性状、体重的优势基因型; 而位点 C1312 上的 BC 型、C13038 上的 BB 型分别是中华鳖体重、背甲长性状的优势基因型。

参 考 文 献

- 万玉美, 王 蕾, 谭照君等, 2011. 红鳍东方鲀两个群体的遗传结构及与经济性状的相关性分析. 淡水渔业, 41(5): 9—16
- 马 晓, 王晓清, 杜海波等, 2013. 中华鳖的体重与形态特征的关联分析. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 39(2): 179—182
- 孔 蕾, 朱凝瑜, 贝亦江等, 2013. 中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)摩氏摩根菌(*Morganella morganii*)的鉴定及致病性研究. 海洋与湖沼, 44(3): 722—727
- 朱道玉, 2009. 中华鳖性腺的发生与发育研究. 水生生物学报, 33(5): 923—930
- 刘至治, 蔡完其, 李思发, 2004. 中华鳖五群体遗传变异的 RAPD 分析. 水产学报, 28(2): 119—126
- 刘福平, 白俊杰, 宋红梅等, 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
- 安泉泉, 刘海金, 王桂兴等, 2012. 牙鲆骨骼生长性状与微卫星标记的相关性分析. 水产学报, 36(005): 641—646
- 许晓军, 张海琪, 张 超等, 2013. 中华鳖表达序列标签资源中的微卫星信息分析. 经济动物学报, 17(1): 15—18
- 孙效文, 鲁翠云, 匡友谊等, 2010. 鱼类分子育种学. 北京: 海洋出版社, 78—79
- 李仕贵, 马玉清, 何 平等, 2002. 不同环境条件下水稻生育期和株高的 QTL 分析. 作物学报, 28(4): 546—555
- 吴 滢, 付春鹏, 蒋速飞等, 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
- 张志允, 李思发, 蔡完其等, 2011. 中华鳖黄河群体选育世代 F_1 , F_2 及 F_3 遗传变异微卫星分析. 上海海洋大学学报, 20(2): 161—166
- 郑先虎, 匡友谊, 鲁翠云等, 2011. 镜鲤体长, 体高, 体厚性状 QTL 定位分析. 遗传, 33(12): 1366—1373
- 胡广洲, 李登峰, 苏秀榕等, 2010. 患暴发性败血症中华鳖体内细菌的分离与鉴定. 中国水产科学, 17(4): 859—868
- 高 东, 杜 飞, 朱有勇, 2009. 低背景、高分辨率 PAGE 简易银染法. 遗传, 31(6): 668—673
- 黄丽英, 何中央, 丁诗华等, 2005. 中华鳖种质资源的研究现状及保护, 利用对策. 宁波大学学报: 理工版, 18(2): 183—186
- Botstein D, White R L, Skolnick M *et al*, 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics, 32(3): 314
- Bu X J, Liu L, Wang L *et al*, 2011. Isolation and characterization of 21 novel polymorphic microsatellite loci in the Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis*. Genetics and Molecular Research, 10(2): 1006—1010
- Gupta P K, Rustgi S, 2004. Molecular markers from the transcribed/expressed region of the genome in higher plants. Functional & Integrative Genomics, 4(3): 139—162
- Li Z Q, Li J L, Feng X Y *et al*, 2010. Sixteen polymorphic microsatellites for breeding of Chinese soft-shelled turtles (*Pelodiscus sinensis*). Animal Genetics, 41(4): 446—447
- Que Y, Zhu B, Rosenthal H *et al*, 2007. Isolation and characterization of microsatellites in Chinese soft-shelled turtle, *Pelodiscus sinensis*. Molecular Ecology Notes, 7(6): 1265—1267
- Skaala Ø, Høyim B, Glover K *et al*, 2004. Microsatellite analysis in domesticated and wild Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): allelic diversity and identification of individuals. Aquaculture, 240(1): 131—143
- Wang W, Li C, Ge C *et al*, 2013. De-novo characterization of the soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis* transcriptome using Illumina RNA-Seq technology. Journal of Zhejiang University Science B, 14(1): 58—67
- Zalapa J E, Cuevas H, Zhu H *et al*, 2012. Using next-generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) loci in the plant sciences. American Journal of Botany, 99(2): 193—208
- Zhang H, Wei L, Miao H *et al*, 2012. Development and validation of genic-SSR markers in sesame by RNA-seq. BMC Genomics, 13(1): 316

CORRELATION OF EST-SSR MARKERS WITH GROWTH TRAITS IN CHINESE SOFT-SHELLED TURTLES (*PELODISCUS SINENSIS*)

ZHANG Qun-Ying¹, HUANG He-Zhong¹, YUAN Wen-Cheng¹, LI Wen-Long¹,
YONG Fu-He², XU Xue-Ying³, ZHANG Ping⁴

(1. School of Medicine and Life Sciences, Medical College of Soochow University, Fisheries Research Institute of Soochow University, Suzhou, 215123; 2. Mashe Special Aquaculture Farms in Xukou Town, Wuzhong District, Suzhou City, Jiangsu Province, Suzhou, 215004; 3. Fisheries Technology Extension Station of Suzhou City, Jiangsu Province, Suzhou, 215006; 4. Fisheries Technology Guide Station of Suining County in Xuzhou City, Jiangsu Province, Xuzhou, 221200)

Abstract 15 polymorphic microsatellites were developed from the transcriptome sequencing EST database of Chinese soft-shelled turtles (*Pelodiscus sinensis*) to analyze the genetic diversity and linkage of 60 individuals. The result indicate that: 15 EST-SSR markers obtained amplified products successfully in a high polymorphism level; the number of mean valid alleles was 2.7633; the value of mean expected heterozygosity was 0.5961; and the mean polymorphism information content (PIC) was 0.539177. The linkage analysis showed the locus C8387 had a significant impact on body weight, body length, carapace length and a extremely significant difference in side width ($P<0.01$), and CC at C8387 was a favorable genotype for the four growth traits while AB was a disadvantage genotype; locus C211 showed an extremely significant impact on body weight, carapace length ($P<0.01$) and a significant impact on the side width ($P<0.05$), among them allele C was negatively associated with the body weight and genotype CC was disadvantage genotype of carapace length and side width, while BB and AB were favorable genotypes of side width and body weight respectively; locus C5670 had an extremely significant impact on body weight ($P<0.01$) and a significant impact on carapace length ($P<0.05$), in which BB was the dominant genotype of body weight and carapace length while the AA was the negative genotype; the locus C1312 and C13038 had a extremely significant correlation of body weight, carapace length, respectively ($P<0.01$), in which BC of locus C1312 and BB of C13038 was dominant genotype of body weight and carapace length, respectively.

Key words *Pelodiscus sinensis*; EST-SSR marker; growth trait; correlation analysis