

刺参 SNP 标记与生长性状的关联分析*

董玉, 李琪*

(中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要: 为探究 SNP 标记与刺参 (*Apostichopus japonicus*) 性状之间的相关性, 本研究运用高分辨率溶解曲线 (HRM) 分析方法, 采用 46 个 SNP 标记对刺参家系的遗传多样性进行分析, 运用一般线性模型对 SNP 标记与刺参体长、体宽、体重、体壁重和出肉率性状的关联性进行检测。结果表明, 平均多态信息含量 (PIC) 的范围从 0.0302 到 0.3750, 观测杂合度 (H_o) 的范围是从 0.0312 到 0.4688, 18 个位点显著偏离哈迪-温伯格平衡 ($P < 0.05$)。相关性分析显示, 46 个 SNP 位点中有 10 个位点与生长性状呈显著相关 ($P < 0.05$), 其中位点 SNP183 的基因型 AB 与出肉率显著相关 ($P < 0.05$); 位点 SNP189 的基因型 AA 与体长呈显著相关 ($P < 0.05$); 8 个 SNP 位点 (SNP4、SNP146、SNP154、SNP163、SNP164、SNP175、SNP178 和 SNP216) 的基因型 BB 与体长、体宽、体重、体壁重性状中的部分或全部呈显著相关, 推断基因型 BB 可能是这些位点的优势基因型。

关键词: 刺参; SNP 标记; 相关性; 生长性状

中图分类号: S968

文献标志码: A

文章编号: 1003-6482(2016)02-049-10

DOI: 10.13984/j.cnki.cn37-1141.2016.02.007

引言

刺参 (*Apostichopus japonicus*) 在分类上隶属棘皮动物门 (Holothuroidea)、海参纲 (Echinodermata)、楯手目 (Aspidochirotida), 自古以来作为“海产八珍”之一, 以其较高的药用价值和富含丰富的氨基酸、微量元素而受到人们的喜爱, 成为中国重要的海水养殖品种^[1-3]。近年来, 刺参养殖业发展迅速, 2012 年全国刺参产量达到 170 830t^[4]。然而, 刺参养殖业快速发展的同时, 也出现了一系列问题, 如刺参苗种质量参差不齐、抗病能力下降和生长缓慢等, 严重制约了刺参养殖业的健康发展^[5-6]。因此, 选育具有优良经济性状的刺参健康苗种势在必行。

随着分子标记技术的快速发展, 分子辅助育种 (Marker-assisted Selection, MAS) 在动植物中的应用为筛选具有优良经济性状的苗种提供了有效手段^[7], 在水稻、辣椒、大豆等农作物取得了可喜进展^[8-10]。关联分析是利用分子标记或者候选基因的遗传变异与经济性状表型联系起来的分析方法, 是实现分子标记辅助育种的 1 种有效方法^[11-13]。目前, 在中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*)、珍珠贝 (*Pinctada martensii*)、中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*)、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 等水产动物, 开展了微卫星标记与生长相关性状关联分析^[14-17]。在刺参的研究中, 孙国华等^[5]运用单标记分析法分析了 10 个微卫星位点与控制体重、体长数量性状的 QTL (quantitative trait loci) 的连锁关系, 发现 4 个微卫星位点分别与刺参的体重和体长具有显著的相关性。

SNP (Single nucleotide polymorphism), 即单核苷酸多态性, 是真核生物基因组中含量最为丰富最具有应用前景的第三代分子标记^[18]。作为一种理想的分子工具, SNP 以其二态性、数目多、易于高通量检出等优点在高密度图谱构建、QTL 分析、评估遗传多样性、家系鉴定和分子育种方面得到了广泛的应用^[19-21]。目前, 刺参的 SNP 标记主要从基因组和 EST (Expressed Sequence Tag) 数据库中进行开

* 基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2011BAD13B03); 国家海洋公益性行业科研专项 (201305005); 教育部博士点基金 (20130132110009) 资助

第一作者简介: 董玉 (1990-), 女, 硕士, E-mail: dongyu14127@163.com

* 通讯作者: 李琪, Tel: 0532-82031622; qili66@ouc.edu.cn

收稿日期: 2015-

发^[6,22-25]。其中,从 EST 数据库中开发的 SNP 标记更具有优势,原因在于 EST-SNP 位点位于编码区,发生的突变可能会引起编码区序列的改变,进而可能改变了氨基酸的种类,从而影响到了表型性状^[26]。

高分辨率溶解曲线(High Resolution Melting, HRM)是 1 种高效的突变筛查与基因分型技术,具有高效、精确、成本低及闭管操作等特点,通过可视化的 PCR 产物的熔解曲线轮廓来检测并分析扩增片段的微小差异^[27]。在前期研究中,我们运用 HRM 分析方法从刺参 EST 数据库中获得了 51 个 SNP 标记*。本研究选取了其中的 46 个扩增稳定的 EST-SNP 标记,利用 1 个刺参全同胞家系进行了 EST-SNP 基因型与体长、体宽、体重、体壁重和出肉率性状的关联分析,筛选相关分子标记,以期对刺参经济性状 QTL 定位和分子标记辅助育种提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用的材料为刺参全同胞家系,其母本为日本红刺参,父本为山东沿海采捕野生刺参。家系培育 10 个月,随机取家系子代个体,测量生长相关性状数据,然后保存于 -80℃ 备用。

1.2 生长性状测量和 DNA 提取

由于在不同条件下刺参的体型与体重会有很大的差异,为保证测量数据的有效性,将刺参放入培养皿中,加入少量海水,在没有刺激的自然伸展状态下测量刺参的体长和体宽。将刺参用干燥的纱布吸取表面水分,放置在纱布上,30 min 后称量体重。用镊子进行刺激,使其吐出内脏,在干燥纱布上放置 10 min 后称量体壁重。出肉率为刺参体壁重占总体重的百分比。

对家系的 32 个个体采用 CTAB 法提取 DNA,取约 100 mg 刺参体壁组织放入研钵内,加入适量液氮进行研磨至粉状,将切碎的组织与 500 μL CTAB 裂解液(2% CTAB, 0.2% β-巯基乙醇, 20 mmol/L EDTA, 1.4 mol/L NaCl, 100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)和 15 μL 蛋白酶 K(20 mg/mL)混合均匀,放置在 60℃ 金属浴中进行消化直至澄清,再加入等体积氯仿异戊醇(氯仿:异戊醇=24:1)溶液抽提几次后,异丙醇溶液沉淀 DNA, 70% 乙醇充分洗涤沉淀 3-4 次并充分烘干后 TE 溶解。

1.3 SNP 引物设计和 PCR 反应

从已开发的 51 个的刺参 EST-SNP,筛选出 46 个扩增稳定、多态性高的标记,引物序列见表 1。在 Lighter Cycle® 480 实时定量分析仪(Roche Diagnostics)上进行 PCR 扩增及产物的熔解曲线分析。反应体系为 10 μL,其中包括 0.25 U Taq DNA 聚合酶, 2.5 mmol/L 10× PCR buffer, 0.2 mmol/L dNTP, 1.5 mmol/L MgCl₂, 上下游引物各 0.2 μmol/L, 5 μmol/L SYTO9 染液和 10 ng 模板 DNA。HRM 反应条件:95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 按每对引物退火温度(60-62℃)反应 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 45-55 个循环;扩增结束后,运行高分辨率熔解曲线程序,设定软件收集 60℃-95℃ 之间的数据,每升高 1℃ 采集荧光 25 次,升温速率设定为 0.1℃/s,以满足对单碱基差异的区分。

1.4 数据分析

利用 PopGen32 软件进行最小等位基因频率、期望杂合度(H_e)、观测杂合度(H_o)、哈迪-温伯格平衡(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)和固定指数(Fixation index)的分析和计算。根据 Bostein 等^[28]的方法计算位点多态信息含量(PIC),公式如下:

$$PIC = \sum_{i=0}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-2} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

其中, P_i 和 P_j 分别为第 i 个和第 j 个的等位基因在群体中频率, n 为等位基因数。

利用 SPSS19.0 软件对实验数据进行统计分析,采用一般线性模型(General Linear Model, GLM)对刺参各生长性状与 SNP 位点的关联性进行最小二乘分析。采用 $y_{ij} = \mu + a_i + e_{ij}$ 线性模型公式进行最小二乘法分析,式中 y_{ij} 为某性状第 i 个标记第 j 个个体的观测值; μ 为实验观测所有个体的平均值(即总

* 董玉等,未发表

体平均值); a_i 为第 i 个标记的效应值; e_{ij} 为随机误差。对同一位点不同基因型之间生长性状指标差异显著性进行检验并进行多重比较 (LSD), 进而分析等位基因的效应。

表 1 刺参 46 个 SNP 位点信息

Table 1 Characterization of 46 polymorphic SNP loci of *Apostichopus japonicus* used in this study

位点 Locus	注册号 Accession no.	引物序列(5'-3') Primer sequences (5'-3')	退火温度 Annealing temp. /°C	扩增片段长度 Amplicon length(bp)	SNP 类型及位置 SNP type and location
SNP4	GH986253	F:GAACCTGAAGGAGGATTAAGACC R: GAAGTAGTCCGACCGTTCCAC	60	63	A/G 776
SNP8	GH253714	F:GCTAATTTGACAGGTATCACACACC R: CAACACCTTTAGTGGTAGCGGC	60	86	A/G 851
SNP20	GH253420	F: ACTCACTGTGCTGGAAGTGTCTG R: CGCCGTAAAGGCTGACTGATT	60	67	A/G 586
SNP26	GO253762	F: GTCTTAACCAGACCTCTTTCCTATT R: ATGGGACTGATTCTATAACTATCGG	60	114	A/G 723
SNP27	GH986068	F: GGTAACCAAAGGGTGTAGCAGC R: ACCTGACTTACGTCCGGTCTGAAC	60	91	A/G 412
SNP33	GH986384	F: GACTGCTCGTAAATCAACTGGTGG R: CACTCTTCTGGCTGCCTTGG	62	71	T/G 287
SNP59	GO253323	F: GCAACCGTGGAGAAAAAGAAT R: AACTTTTTCCGTTTACCAGAGTAAC	60	97	A/G 389
SNP62	GH985579	F:GGGGAGTCACAAGTATGTATCAGAG R: TGTAGTGCCATGTACGGATTCTC	60	89	A/G 258
SNP68	GR706505	F: TATCTGCCATTTGTTTACCTCTCT R: TTGACCTGTGTAGTAAGCTGATAC	60	126	A/G 642
SNP84	GO270701	F: GGAAGCGTGTCTTTATTAGGAAC R: GATAGAGCAGACTTTTGAAGGGAG	60	132	A/G 106
SNP88	GO495976	F: CCCATATTGACGAGAAGGATTGC R: GACCTGACTTACGTCCGGTCTGAAC	62	134	C/T 441
SNP92	GR706116	F:GAAGAAGTGACCAAGAAGAGGACC R: CTGACCTCTGGCTTCTGATTCTT	60	110	A/G 422
SNP105	GR706656	F:GGTGCTGTATTTGCTATATTTGCC R: AGTGTGTGGGAAGAAGGTTAGG	60	139	A/G 434
SNP106	GR706656	F: GATTACCCAGACGCTTATAACAACAT R: ATTGTCATTCCAGAGATGCGG	60	163	A/G 625
SNP115	GO496096	F: AACATCTTGAAACAGGAAAGTCAC R: CTGGTTTACTGTGGTTTGTCTTCAT	60	64	A/G 219
SNP123	GH550818	F: CTTTCAGTGTGTAATGTGTGGTTGG R:GCACAAATGAAGTGTGACGATAAG	62	167	C/T 124
SNP126	GH985773	F: TGTGTTGGTGAGAGCGGTGAC R:CTTTTGAGAAGACTGGTGTCTGTCC	62	85	C/G 255
SNP131	GO269824	F: AGGGTGACAACAAGTCCAGG R: AGCCTCTGTTGGGTTGAATCC	60	74	C/T 262
SNP136	GR706115	F: GGACGGCAAGTTCAACCAGAT R: CCAATAATGACGAAGACCACGAT	60	109	C/T 479
SNP138	GR706048	F:GAGGATGTTAGAGGCAAGAAGTGTCT R: GACCATAGAGCAATACTGTCCCTG	62	78	C/T 464
SNP141	GH986450	F: TGAGGGAGTTGAAGGAGCAGTAGT R: ACCTCCATTCCAGAAAGATACTC	60	120	C/T 488
SNP143	GH985516	F: AATCTGAACTTAGCAAACCTCAAACG R: CCTGGAGTTCTCGGCTGGTAT	60	111	C/T 388
SNP146	GR706693	F: GGTAACCAAAGGGTGTAGCAGC R: GTAGGAATTAACGGACGAACAG	60	59	A/G 244

SNP147	GO253384	F: CTTGCCAGGGTGACAGC R: CATATCCCCAACTGGTGACTCC	60	87	A/G 736
SNP148	DY625372	F: AGGTTCTTGTGTTGCTATCATTGTT R: AGTTTACCCGTGTTTCAGCCAT	60	103	A/G 151
SNP149	GO253404	F: AATGTCATCAGAGTCAACTGGTCC R: GTTAGATGTGGAGACCCCATAGAG	60	63	C/G 415
SNP153	GO270690	F: AACACTGGCTACAACAGAGGACC R: CTCAAAGCGACCGATTGTGC	60	67	A/G 442
SNP154	GH551555	F: GTTGTTTCTGTTTGGTGCTTTTTTTC R: CCACCAAGCACACCAAAAATG	62	118	C/G 721
SNP155	GR706565	F: CGCAGATGAAACTGTTGAGCAT R: TGACAAGAAGAGGCTTTTCCAGAT	62	126	C/T 742
SNP163	GH550645	F: GACCCTACCCTGGAGGTTGC R: ATCTCCGTGGTGGTGAATGACT	60	155	T/G 765
SNP164	GH551587	F: CCATTTGCTCTTTGAAGACTGTTT R: ATTGCTACAGTGCAAAAAGACGAG	60	124	A/C 68
SNP166	GO270325	F: GCCAAGGGAACCCAGGACT R: TTCAGTGCCTTGATGATGAGAGAG	62	119	A/C 289
SNP175	GH985470	F: GGAGGAGAAGTTGAACAAGGCAC R: AAAGTGTCCCATCTTGCTTG	62	111	A/C 301
SNP177	DY625159	F: TGAAGTTATTTGGCAAGTGGAGC R: CGGAAACGCTTGACCTGGT	60	113	A/G 188
SNP178	DY625289	F: CAGTGCCAGCCGTAGAAC R: CATCAGTTTCTTGCCATTGTTTC	60	72	C/T 153
SNP183	GH550884	F: CGGAGAAAATGTCCTGATGTAAAC R: CCAGTGAATGTGTCTGATCAAACG	62	111	C/T 334
SNP186	GR706604	F: CTTACTTGCTGATTTTGTGTGGTG R: TACGGTCTACAAGGAACATACACTG	60	56	A/G 607
SNP187	GR706604	F: ATGCTCTAGTTTCCCTTCCATTACAC R: ACAAACTGTTTTCCGATTTATGGT	60	157	A/G 854
SNP189	GH986408	F: GCTCTCAGGGTCAGTGTACTCAAGT R: ATGATGGAACGGTTTGTGTGTC	62	64	A/T 263
SNP213	GH549884	F: ACTGGTCAACTTCCAAAGCGTAT R: TCATCTCACAGTAGCCCTTGGTT	60	68	C/T 241
SNP216	GO269843	F: AATGTGCTACTCATGGGGTGATT R: AGTCGGGGATCTCTCTCCTTATT	60	104	A/G 427
SNP217	GH985485	F: AACTGGATGTGGTTACACGAGG R: CTTTGGGGAGGTCTGATGGTC	60	156	C/G 551
SNP222	GH551382	F: CTGCTCTATTCTGTGCTTTATGTCC R: ATTGGGAGTGCTTCAAGTCATAAC	60	60	C/T 351
SNP223	GH550323	F: CAGGGATGGTGTCTTTACGAT R: ACTGCCACCAGCAATTCCAG	60	92	T/G 175
SNP225	GH550784	F: GTCTTATGGTTGCTTTTCTTATCCT R: AACACCGTTCTCTCTGGTCAAAT	60	140	A/G 565
SNP228	GH551832	F: GCTATCAGACGCCCTACTT R: GTAACGTCAGAGAAGGACAGTGGT	60	58	A/C 447

2 结 果

2.1 SNP 多态性

46对引物均在刺参家系中表现出了多态性,平均多态信息含量(*PIC*)为0.2738,最大的*PIC*出现在位点SNP147,为0.3750;最小的*PIC*出现在位点SNP59,为0.0302(表2)。最小等位基因频率介于0.0156—0.5000,平均值为0.2631。观测杂合度最大值为SNP141位点的0.4688,最小值为SNP59位点的0.0312,平均值为0.2428;期望杂合度普遍大于观测杂合度,其平均值为0.3510。固定指数在

SNP20 等 9 个位点为负值,在其他位点均为正值,平均值为 0.2617。哈迪-温伯格平衡分析发现有 18 个位点显著偏离平衡($P < 0.05$)。

表 2 刺参家系中 SNP 位点的遗传参数

Table 2 Genetic diversity parameters at the 46 SNP loci in a full-sib family of *A. japonicus*

位点 Locus	最小等位 基因频率 MAF	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	多态信息含量 PI_C	固定指数 Fixation index	P 值 P value
SNP4	0.3065	0.2903	0.4320	0.3348	0.3170	0.0678
SNP8	0.2258	0.2581	0.3554	0.2885	0.2619	0.1372
SNP20	0.1129	0.2258	0.2036	0.1802	-0.1273	0.3815
SNP26	0.0161	0.0323	0.0323	0.0312	-0.0164	1.0000
SNP27	0.2742	0.2903	0.4045	0.3188	0.2706	0.1189
SNP33	0.4355	0.4194	0.4997	0.3708	0.1471	0.3625
SNP59	0.0156	0.0312	0.0312	0.0302	-0.0159	1.0000
SNP62	0.3438	0.1250	0.4583	0.3494	0.7229	0.0000*
SNP68	0.0156	0.0312	0.0312	0.0302	-0.0159	1.0000
SNP84	0.2500	0.3750	0.3810	0.3047	0.0000	0.9279
SNP88	0.2188	0.3125	0.3472	0.2834	0.0857	0.5708
SNP92	0.1719	0.2812	0.2892	0.2442	0.0120	0.8734
SNP105	0.0156	0.0312	0.0312	0.0302	-0.0159	1.0000
SNP106	0.0625	0.0625	0.1190	0.1103	0.4667	0.0465*
SNP115	0.2031	0.2812	0.3289	0.2713	0.1312	0.4183
SNP123	0.3594	0.2812	0.4678	0.3545	0.3892	0.0222*
SNP126	0.4516	0.2581	0.5034	0.3726	0.4790	0.0050*
SNP131	0.2656	0.2812	0.3963	0.3140	0.2791	0.1046
SNP136	0.4531	0.2188	0.5035	0.3728	0.5586	0.0009*
SNP138	0.4844	0.2812	0.5074	0.3748	0.4370	0.0093*
SNP141	0.3281	0.4688	0.4479	0.3437	-0.0631	0.7872
SNP143	0.3167	0.2333	0.4401	0.3391	0.4608	0.0097*
SNP146	0.1719	0.1562	0.2892	0.2442	0.4511	0.0169*
SNP147	0.5000	0.2500	0.5079	0.3750	0.5000	0.0028*
SNP148	0.0156	0.0312	0.0312	0.0302	-0.0159	1.0000
SNP149	0.3125	0.1875	0.4365	0.3374	0.5636	0.0011*
SNP153	0.2031	0.3438	0.3289	0.2713	-0.0618	0.7869
SNP154	0.2969	0.3438	0.4241	0.3303	0.1766	0.2826
SNP155	0.4531	0.2188	0.5035	0.3728	0.5586	0.0009*
SNP163	0.2742	0.2258	0.4045	0.3188	0.4327	0.0151*
SNP164	0.2969	0.3438	0.4241	0.3303	0.1766	0.2826
SNP166	0.3387	0.4194	0.4553	0.3476	0.0639	0.6555
SNP175	0.3125	0.2500	0.4365	0.3374	0.4182	0.0155*
SNP177	0.3226	0.3871	0.4442	0.3415	0.1143	0.4695
SNP178	0.3125	0.4375	0.4365	0.3374	-0.0182	0.9895
SNP183	0.4839	0.2581	0.5077	0.3747	0.4833	0.0046*
SNP186	0.0625	0.0625	0.1190	0.1103	0.4667	0.0465*
SNP187	0.1406	0.1562	0.2455	0.2125	0.3535	0.0639
SNP189	0.3281	0.4062	0.4479	0.3437	0.0786	0.5942
SNP213	0.3750	0.4375	0.4762	0.3589	0.0667	0.6409
SNP216	0.4355	0.3548	0.4997	0.3708	0.2783	0.0996
SNP217	0.1667	0.2000	0.2825	0.2392	0.2800	0.1328
SNP222	0.4219	0.1562	0.4955	0.3688	0.6797	0.0000*
SNP223	0.0645	0.0645	0.1227	0.1134	0.4655	0.0483*
SNP225	0.4219	0.3438	0.4955	0.3688	0.2953	0.0774
SNP228	0.0625	0.0625	0.1190	0.1103	0.4667	0.0465*
平均值	0.2631	0.2428	0.3510	0.2738	0.2617	0.5295

注: MAF, minor allele frequency; P 值表示偏离哈迪-温伯格平衡情况; “*”表示显著偏离 ($P < 0.05$)

Note: MAF= minor allele frequency; P value means deviation from Hardy-Weinberg equilibrium; “*” means significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.05$).

2.2 SNP位点与生长性状相关性分析

刺参体长、体宽、体重、体壁重和出肉率指标与 SNP 标记相关性分析结果中,共有 10 个 SNP 位点分别与刺参的生长性状具有显著相关性($P < 0.05$)(概率值见表 3)。位点 SNP146 与体重、体壁重呈极显著相关($P < 0.01$),与体长和体宽呈显著相关($P < 0.05$);位点 SNP216 与体宽、体重和体壁重呈极显著相关($P < 0.01$),与体长、出肉率呈显著相关($P < 0.05$);位点 SNP189 与体长呈极显著性相关($P < 0.01$),而与其他生长性状并没有显著的相关性。位点 SNP183 与 SNP216 均与出肉率具有显著相关性($P < 0.05$)。

对显著相关的 SNP 位点进行不同基因型间与生长性状的多重比较发现,8 个位点(SNP4、SNP146、SNP154、SNP163、SNP164、SNP175、SNP178 和 SNP216)的基因型 BB 分别与体长、体宽、体重、体壁重性状的部分或全部呈显著相关(见表 4)。其中,SNP146 和 SNP216 位点的基因型 BB 的个体全部四种性状(体长、体宽、体重、体壁重)的平均值高于基因型 AA 和 AB 的个体,并且差异均达到了显著性的水平($P < 0.05$)。位点 SNP189 的基因型 AA 个体的体长平均值显著高于基因型 AB 和 BB 的个体($P < 0.05$),而基因型 BB 个体的体长平均值则显著低于基因型 AA 个体($P < 0.05$)。位点 SNP183 的杂合子 AB 个体的出肉率平均值显著高于纯合子基因型 AA 和 BB 的个体($P < 0.05$),但该位点并没有在生长性状的其他方面表现出显著关联(见表 3)。

表 3 SNP 位点与刺参体长、体宽、体重、体壁重和出肉率性状显著相关性分析结果

Table 3 Significant correlation analysis between genotypes of SNP markers and growth traits

位点 Locus	体长 Body length	体宽 Body width	体重 Body weight	体壁重 Body wall weight	出肉率 Dressing percentage
SNP4	—	0.016*	—	—	—
SNP146	0.012*	0.010*	0.003**	0.004**	—
SNP154	—	—	—	0.046*	—
SNP163	—	—	0.041*	0.043*	—
SNP164	—	0.017*	0.027*	0.041*	—
SNP175	0.039*	—	—	—	—
SNP178	0.031*	—	0.044*	—	—
SNP183	—	—	—	—	0.021*
SNP189	0.009**	—	—	—	—
SNP216	0.010*	0.002**	0.000**	0.000**	0.049*

注:表中数值为性状(体长、体宽、体重、体壁重和出肉率)与 SNP 位点关联分析的概率值;“*”表示 $P < 0.05$,“**”表示 $P < 0.01$,“—”表示无显著关联性

Note: Values in Table 3 are the probability of association analysis (P) between SNP loci and body length, body width, body weight, body wall weight and dressing percentage, “*” means $P < 0.05$, “**” means $P < 0.01$, “—” means no significant correlations.

表 4 与生长性状显著相关的 10 个 SNP 基因型刺参体长、体宽、体重、体壁重和出肉率的多重比较

Table 4 Multiple comparisons of body length, width, body weight, body wall weight and dressing percentage with genotypes of SNP correlated with growth traits in *A. japonicus*

位点 Locus	基因型 Genotype	个体数 No.	体长 Body length	体宽 Body width	体重 Body weight	体壁重 Body wall weight	出肉率 Dressing percentage
SNP4	AA	16	27.73±12.36	3.64±1.06	0.36±0.33 ^{ab}	0.23±0.22	0.63±0.09
	AB	9	24.25±6.30	3.20±0.76	0.17±0.09 ^b	0.12±0.06	0.65±0.05
	BB	4	31.55±11.36	5.15±2.51	0.65±0.64 ^a	0.42±0.41	0.63±0.04
SNP146	AA	23	27.09±10.06 ^{ab}	3.69±1.31 ^{ab}	0.35±0.31 ^{ab}	0.22±0.20 ^{ab}	0.64±0.08
	AB	5	21.19±7.72 ^b	2.88±0.61 ^b	0.11±0.08 ^b	0.07±0.02 ^b	0.62±0.05
	BB	3	42.73±5.10 ^a	5.76±0.33 ^a	0.99±0.34 ^a	0.66±0.25 ^a	0.66±0.03
SNP154	AA	16	23.59±7.95	3.35±0.82	0.25±0.11	0.16±0.07 ^b	0.61±0.06
	AB	10	29.17±7.25	3.95±0.96	0.31±0.21	0.21±0.14 ^{ab}	0.67±0.06
	BB	4	36.32±17.38	4.42±1.22	0.66±0.59	0.42±0.37 ^a	0.67±0.06
SNP163	AA	19	26.42±9.98	3.52±0.94	0.25±0.24 ^{ab}	0.17±0.15 ^{ab}	0.65±0.08
	AB	6	23.08±9.22	3.18±0.70	0.17±0.14 ^b	0.10±0.08 ^b	0.59±0.09
	BB	4	33.73±13.09	4.70±2.68	0.79±0.70 ^a	0.52±0.45 ^a	0.66±0.04
SNP164	AA	16	24.10±7.29	3.32±0.78 ^b	0.19±0.11 ^b	0.13±0.08 ^b	0.64±0.09
	AB	11	29.22±13.51	3.68±1.22 ^{ab}	0.43±0.38 ^{ab}	0.28±0.24 ^{ab}	0.63±0.06
	BB	3	35.79±7.51	5.75±2.51 ^a	0.83±0.67 ^a	0.53±0.43 ^a	0.63±0.03
SNP175	AA	18	29.20±10.98 ^{ab}	3.85±1.40	0.44±0.38	0.28±0.25	0.65±0.07
	AB	8	20.77±8.53 ^b	3.17±1.10	0.19±0.17	0.14±0.12	0.61±0.10
	BB	4	30.63±7.03 ^a	4.03±1.44	0.34±0.28	0.22±0.18	0.65±0.03
SNP178	AA	15	22.65±7.72 ^b	3.26±0.85	0.17±0.13 ^b	0.11±0.08	0.63±0.08
	AB	12	29.93±9.82 ^{ab}	4.07±1.69	0.47±0.44 ^{ab}	0.31±0.29	0.65±0.07
	BB	3	38.50±15.45 ^a	4.37±1.39	0.61±0.48 ^a	0.37±0.28	0.61±0.07
SNP183	AA	11	27.89±13.03	3.65±1.19	0.34±0.30	0.20±0.18	0.61±0.05 ^b
	AB	7	29.63±9.63	4.00±0.88	0.40±0.38	0.28±0.26	0.69±0.06 ^a
	BB	11	25.85±8.38	3.57±1.77	0.43±0.32	0.27±0.21	0.64±0.07 ^{ab}
SNP189	AA	15	29.42±9.71 ^a	3.77±0.28	0.31±0.28	0.20±0.16	0.65±0.07
	AB	12	27.20±10.70 ^{ab}	3.70±1.80	0.48±0.41	0.32±0.26	0.64±0.07
	BB	3	15.56±6.92 ^b	3.29±0.53	0.09±0.05	0.05±0.03	0.59±0.13
SNP216	AA	12	21.68±7.50 ^b	2.89±0.61 ^b	0.13±0.07 ^b	0.08±0.05 ^b	0.61±0.09
	AB	9	27.77±12.88 ^{ab}	3.68±1.05 ^{ab}	0.33±0.30 ^{ab}	0.20±0.19 ^{ab}	0.64±0.09
	BB	8	33.15±7.70 ^a	4.62±1.64 ^a	0.60±0.51 ^a	0.40±0.32 ^a	0.68±0.03

注:同一栏中不同上标字母数值间差异显著($P<0.05$)

Note: Trait values of every SNPs with different superscript letters within a column are significantly different at 0.05 level

3 讨论

3.1 刺参家系遗传多样性分析

46 个 SNP 位点在刺参家系中均表现出多态性,多态信息含量(PIC)的范围在 0.0302~0.3750 之间。根据 Bostein 等^[28]的分类标准,当 $PIC>0.5$ 时,该位点为高度多态位点; $0.25<PIC<0.5$ 时,为中度多态位点; $PIC<0.25$ 时,为低度多态位点。其中 SNP20 等 14 个位点表现出了低度的多态性,其他 32 个位点表现出了中度的多态性,并没有位点表现出高度多态性,原因在于 SNP 标记是一种典型的两等位基因标记^[19]。Liu 等^[29]指出尽管 SNP 标记并未像微卫星标记具有较高的多态性,但是 SNP 标记在基因组中分布广泛,弥补了 SNP 标记多态性较低的不足。此外,SNP 标记还具有便于高通量开发、快速分型等优点,适宜建立高密度遗传连锁图谱,利于发掘 QTL 和与优良经济性状相关的基因^[30-31]。

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^[32]。本研究中仅有3个位点(SNP141、SNP153和SNP178)期望杂合度(H_e)小于观测杂合度(H_o),其余位点的期望杂合度均大于观测杂合度,这表明存在杂合子缺失现象。固定指数也能够反映杂合子缺乏或者是过量,只有SNP20等9个位点的固定指数为负值,其他位点均为正值,说明除了在该9个位点表现为杂合子过剩以外,其他位点均表现为杂合子缺失,这和大部分位点的观测杂合度小于期望杂合度的结果是一致的。该结果可能是由于人工选择增加了近交,从而降低了家系遗传多样性。

3.2 SNP标记与经济性状

SNP标记与刺参生长性状的关联性分析显示位点SNP146和SNP216分别与体重、体壁重呈极显著相关($P < 0.01$),位点SNP163与体重、体壁重呈显著相关($P < 0.05$),位点SNP154仅与体壁重呈显著相关($P < 0.05$),出现一个性状与多个SNP具有相关性现象。这表明性状受多基因(位点)控制,存在基因连锁或多因一效的现象,符合数量性状的相关理论^[14,16]。同时,也出现几种不同的生长性状与同一个位点相关联,例如位点SNP146和216分别与四种生长性状具有显著相关性,说明这四种生长性状之间也存在一定程度的关联,可为刺参不同生长性状之间的间接选良提供参考^[33]。该结果与孙文静^[34]的刺参QTL分析结果一致,QTL分析结果表明刺参的体长、体宽、体重以及体壁重之间具有显著的相关性($P < 0.05$),而出肉率则与这些性状之间并没有显著的相关性。

对SNP位点的不同基因型的多重比较表明,SNP4等8个位点的基因型BB个体的体长、体宽、体重、体壁重的平均值高于基因型AA和AB的个体,部分性状或者全部性状差异程度达到显著性水平,因此推断基因型BB可能是这些位点的优势基因型,与生长性状呈正相关。此外,位点SNP189的基因型AA与体长,位点SNP183的基因型AB与出肉率也呈正相关关系,表明这两位点具有用于刺参分子辅助育种的可能性。

综上所述,本研究首次利用刺参基因编码区的SNP标记,分析其不同基因型与刺参生长性状的相关性,揭示了标记和性状之间存在一因多效和多因一效现象,筛选出生长性状相关SNP位点,为刺参分子标记辅助育种提供了有用工具。

参考文献

- [1] 王磊,陆海霞,陈青. 东海海参(*Acaudina molpadioidea*)营养成分分析及评价[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(8):215-218.
- [2] 赵学敏. 本草纲目拾遗[M]. 北京:中国中医药出版社, 2007: 406-407.
- [3] Chen, J. X., Present Status and Prospects of Sea Cucumber Industry in China[C]. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2004: 25 - 38.
- [4] 农业部渔业局. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京:中国农业出版社, 2013: 29.
- [5] 孙国华,杨建敏,孙孝德,等. 刺参微卫星标记与生长性状体重、体长的相关分析[J]. 水产学报, 2011, 35(4):501-508.
- [6] Du, H. X., Z. M. Bao, J. J. Yan, et al., Development of 101 gene-based single nucleotide polymorphism markers in sea cucumber, *Apostichopus japonicus*[J]. International Journal of Molecular Science, 2012, 13: 7080-7097.
- [7] Collard, B. C. Y., M. Z. Z. Jahufer, J. B. Brouwer, et al., An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts [J]. Euphytica, 2005, 142:169-196.
- [8] Jantaboon, J., M. Siangliw, S. Im-mark, et al., Ideotype breeding for submergence tolerance and cooking quality by marker-assisted selection in rice [J]. Field Crops Research, 2011, 123(3):206-213.
- [9] Hong, H. T., K. Kim, S. Kim, et al., Development of gene-based markers for the Bs2 bacterial spot resistance gene for marker-assisted selection in pepper (*Capsicum* spp.) [J]. Horticulture, Environment, and Biotechnology, 2011, 52 (1): 65-73.
- [10] Chaisan, T., K. Van, M. Y. Kim, et al., In silico single nucleotide polymorphism discovery and application to marker-assisted selection in soybean [J]. Molecular Breeding, 2012, 29(1): 221-233.
- [11] 王荣焕,王天宇,黎裕. 关联分析在作物种质资源分子评价中的应用[J]. 植物遗传资源学报, 2007, 8(3): 366-372.
- [12] Zondervan, K. T., and L. R. Cardon, The complex interplay among factors that influence allelic association [J]. Nature Reviews Genetics, 2004, 5: 89-100.
- [13] 刘思玮,李琪,于红,等. 长牡蛎糖原磷酸化酶基因 SNPs 与生长性状和糖原含量的相关性分析[J]. 中国水产科学, 2013, 20(3):

- 481-489.
- [14] 群英, 黄鹤忠, 袁文成, 等. 中华鳖(*Pelodiscus sinensis*) EST-SSR 标记与生长性状相关性分析[J]. 海洋与湖沼, 2013, 44(6): 1654-1660.
- [15] Qiu, Y., H. Lu, J. T. Zhu, et al., Characterization of novel EST-SSR markers and their correlations with growth and nacreous secretion traits in the pearl oyster *Pinctada martensii* (Dunker) [J]. Aquaculture, 2014, 420-421(Suppl 1): S92-S97.
- [16] 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[J]. 水生生物学报, 2011, 35(2): 197-202.
- [17] 刘福平, 白俊杰, 宋红梅, 等. 尼罗罗非鱼微卫星标记与主要生长性状的相关性分析[J]. 水产学报, 2010, 34(2): 169-177.
- [18] Clemento, A. J., A. Abad a-cardoso, H. A. Starks, et al., Discovery and characterization of single nucleotide polymorphisms in Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* [J]. Molecular Ecology Resources, 2011, 11, 50-66.
- [19] Hubert, S., J. T. Bussey, B. Higgins, et al., Development of single nucleotide polymorphism markers for Atlantic cod (*Gadus morhua*) using expressed sequences [J]. Aquaculture, 2009, 296: 7-14.
- [20] Zhu, Y. L., Q. J. Song, D. L. Hyten, et al., Single-Nucleotide Polymorphisms in Soybean [J]. Genetics, 2003, 163: 1123-1134.
- [21] Bester, A. E., R. Roodt-Wilding, and H. A. Whitaker, Discovery and evaluation of single nucleotide polymorphisms (SNPs) for *Haliotis midae*: A targeted EST approach [J]. Animal Genetics, 2008, 39: 321-324.
- [22] Gao, L. L., M. Chen, Y. Q. Chang, et al., Development of SNP markers associated with defense mechanism of sea cucumber, *Apostichopus japonicus* [J]. Conservation Genetics Resources, 2013, 5: 587-591.
- [23] Zhou, Z. C., Y. Dong, H. J. Sun, et al., Transcriptome sequencing of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) and the identification of gene-associated markers [J]. Molecular Ecology Resources, 2013, 14: 127-138.
- [24] Sun, W. J., Q. Li, and L. F. Kong, Characterization of thirteen single nucleotide polymorphism markers in the sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) [J]. Conservation Genetics Resources, 2010, 2: 141-144.
- [25] Yang, A. F., D. P. Sun, S. K. Liu, et al., Characterization of fifteen SNP markers by mining EST in sea cucumber, *Apostichopus japonicus* [J]. Journal of Genetics, 2012, 91: e49-e53.
- [26] Kim, H., C. J. Schmidt, K. S. Decker, et al., A double-screening method to identify reliable candidate non-synonymous SNPs from chicken EST data [J]. Animal Genetics, 2003, 34: 249-254.
- [27] Reed, G. H., J. O. Kent, and C. T. Wittwer, High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. Pharmacogenomics, 2007, 8(6): 597-608.
- [28] Botstein, N., R. L. White, M. Skolnick, et al., Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. American Journal of Human Genetics, 198, 32: 314-331.
- [29] Liu, Z. J., and J. F. Cordes, DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics [J]. Aquaculture, 2004, 238: 1-37.
- [30] Fernández, M. E., D. E. Goszczynski, J. P. Lirón, et al., Comparison of the effectiveness of microsatellites and SNP panels for genetic identification, traceability and assessment of parentage in an inbred Angus herd [J]. Genetics and Molecular Biology, 2013, 36 (2): 185-191.
- [31] Narum, S. R., M. Banks, T. D. Beacham, et al., Differentiating salmon populations at broad and fine geographical scales with microsatellites and single nucleotide polymorphisms [J]. Molecular Ecology, 2008, 17: 3464-3477.
- [32] 孙效文, 鲁翠云, 匡友谊, 等. 鱼类分子育种学[M]. 北京, 海洋出版社, 2010: 78-79.
- [33] 安泉泉, 刘海金, 王桂兴, 等. 牙鲆骨骼生长性状与微卫星标记的相关性分析[J]. 水产学报, 2012, 36(5): 641-646.
- [34] 孙文静. 刺参生长相关性状 QTL 分析[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.

Correlation Analysis Between Snps and Growth Traits of *Apostichopus japonicas*

DONG Yu, LI Qi

(Key Laboratory of Mariculture of Ministry of Education, Ocean University of China,
Qingdao 266003, China)

Abstract: The aim of this study was to explore the correlation between SNP markers and growth traits of sea cucumber (*Apostichopus japonicas*). Forty-six SNP markers were used to analyze the genetic diversity of a full-sib family with high resolution melting method, and examine the correlation of SNP markers with the body length, body width, body weight, body wall weight, dressing percentage with general linear model (GLM). The results of genetic diversity showed that the polymorphism information content (PIC) value ranged from 0.0302 to 0.3750, and the observed heterozygosity ranged from 0.0312 to 0.4688. Significant departure from Hardy Weinberg equilibrium was observed at 18 of 46 SNPs ($P < 0.05$). The analysis of correlation suggested that 10 of 46 SNPs correlated with the growth traits significantly ($P < 0.05$). Of 10 SNP loci, the genotype of AB at SNP183 locus was correlated with dressing percentage while the genotype AA at SNP189 correlated with body length significantly. The genotype BB at eight loci (SNP4, SNP146, SNP154, SNP163, SNP164, SNP175, SNP178 and SNP216) significantly correlated with body length, body width, bodyweight, and body wall weight, respectively, suggesting that genotype BB was superiority at these loci.

Key words: *Apostichopus japonicas*; SNP marker; growth trait; correlation analysis