

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20171217002

http://www.yykxjz.cn/

刘安然, 廖梅杰, 李彬, 王印庚, 荣小军, 张正, 范瑞用, 陈贵平. 刺参(*Apostichopus japonicus*)重要经济性状相关SNP标记的验证分析. 渔业科学进展, 2019, 40(1): 101-109

Liu AR, Liao MJ, Li B, Wang YG, Rong XJ, Zhang Z, Fan RY, Chen GP. Validation of SNPs associated with important economic traits of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(1): 101-109

刺参(*Apostichopus japonicus*)重要经济性状 相关 SNP 标记的验证分析*

刘安然^{1,2} 廖梅杰^{2,3①} 李彬^{2,3} 王印庚^{2,3} 荣小军^{2,3}
张正^{2,3} 范瑞用⁴ 陈贵平^{2,3}

(1. 上海海洋大学 上海 201306; 2. 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 4. 青岛瑞滋海珍品发展有限公司 青岛 266400)

摘要 本研究在前期构建的刺参(*Apostichopus japonicus*)高密度遗传连锁图谱和 QTL 分析的基础上, 筛选出 26 个与体长、体重、体宽、棘刺总数、抗病力相关的 SNP 位点, 设计出可用于 HRM 检测的 SNP 扩增引物 13 对。在扩大群体中利用 HRM 小片段法对这 13 个刺参重要经济性状相关的候选 SNP 位点进行分型和多态性检测, 并结合扩大群体的相关性数据进行了 QTL 位点验证。多态性结果显示, 13 个位点中有 3 个单态性位点, 其余 10 个多态性位点中有 3 个位点为低等位多态性, 7 个位点为中等位多态性。10 个多态性位点的最小等位基因频率(MAF)介于 0.016(SNP113)~0.332(SNP160)之间, 平均值为 0.173; 各位点的观测杂合度(H_o)介于 0.031(SNP113)~0.818(SNP9)之间, 平均值为 0.433; 期望杂合度(H_e)介于 0.031(SNP113)~0.834(SNP9)之间, 平均值为 0.402; 多态信息含量(PIC)介于 0.030(SNP113)~0.393(SNP160)之间, 平均为 0.248, 有 6 个位点偏离 Hardy-Weinberg 平衡。QTL 验证结果表明, SNP40 和 SNP160 位点为与生长(体长、体重、体宽)相关的位点, 各位点的优势基因型分别为 SNP40(CC)和 SNP160(AA); SNP88、SNP112 和 SNP126 这 3 个位点为与抗病力相关的位点, 各位点的优势基因型为 SNP88(CC)、SNP112(AA)和 SNP126(TT)。基于这 5 个位点构建生长和抗病二倍型, 发现二倍型 K_1 (CC AA TT)抗病力最强, S_1 (CC AA)、 S_3 (CC AC)在生长方面优势显著, 相关研究结果可为分子标记辅助育种在生产中应用提供基础数据。

关键词 刺参; QTL 位点; SNP; 高分辨率溶解曲线; 验证

中图分类号 S966.9 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2019)01-0101-09

刺参(*Apostichopus japonicus*)是我国北方重要的海珍品之一(廖玉林, 1997)。近年来, 我国刺参养殖规模拓展迅猛, 2016 年海参养殖面积为 218138 hm², 产量为 204359 t, 直接经济产值约 300 亿元(中国渔业年

* 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022016008)和山东省农业良种工程重大课题(2017LZGC010)共同资助 [This work was supported by Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences (20603022016008), and Agriculture Seed Improvement Project of Shandong Province(2017LZGC010)]. 刘安然, E-mail: 1196476161@qq.com

① 通讯作者: 廖梅杰, 副研究员, E-mail: liaomj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-12-17, 收修改稿日期: 2018-01-02

鉴, 2017), 成为沿海渔业经济结构调整和渔民就业及增产增收的重要途径。但随着刺参产业规模的不断拓展, 种质退化、生长缓慢、养殖周期长、抵御环境变化能力差、病害频发等一系列制约或潜在制约产业发展的瓶颈问题也日益凸显(王印庚等, 2014)。良种选育是解决上述问题的有效手段。在良种选育过程中, 分子标记辅助选择育种(Marker-assisted selection, MAS)在选择效率和选择准确性上表现出良好的应用潜力(Würschum *et al*, 2014)。

在水产动物分子标记辅助育种方面, 随着分子技术的发展, 构建遗传连锁图谱, 挖掘数量性状基因座(Quantitative trait locus, QTL), 利用与目标性状紧密连锁的分子标记促进对性状的遗传改良是当今水产动物遗传育种的研究热点(Collard *et al*, 2005)。目前, 已经构建遗传连锁图谱并发掘了候选 QTL 标记的水产物种有鲤鱼(*Cyprinus carpio*)(Zhao *et al*, 2013)、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)(Chu *et al*, 2014)、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)(Qiu *et al*, 2016)、贻贝(*Hyriopsis cumingii*)(Bai *et al*, 2015)、九孔鲍鱼(*Haliotis diversicolor*)(Ren *et al*, 2016)、大西洋鲑鱼(*Salmo salar*)(Gonen *et al*, 2015)等。随着刺参分子标记的开发, Tian 等(2015)构建了高密度刺参遗传连锁图谱, 并筛选出一个与生长关联的 QTL; 和飞(2016)发掘了刺参的 9 个与生长和对灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)的抗病力相关的 QTL。这些分子标记的发现为刺参的良种选育提供了宝贵资料。QTL 的验证和鉴定是实施 MAS 的前提(Hou *et al*, 2011), 本研究在前期构建的刺参遗传连锁图谱和 QTL 分析的基础上, 筛选与体重、体长、体宽、棘刺总数、抗病力 5 个性状相关的 SNP 位点, 并在扩大繁育群体中进行验证, 评估不同基因型与相关性状的关联性, 以期获得真实可靠的 QTL 结果, 为刺参的分子标记辅助选育奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用刺参苗种采集自青岛瑞滋海珍产品发展有限公司, 为同一批次大规模育苗并同一养殖条件下培育的 8 月龄苗种, 该批苗种繁育用亲本数量为 800 头, 苗种繁育与培育参照该公司《苗种繁育技术规范》进行。苗种采集后暂养于实验室玻璃钢桶(D=80 cm, h=60 cm)内, 充气, 水温(18.0±0.5)℃, 每天换水 1/2, 每天投喂 1 次。暂养稳定后用于后续实验。

1.2 实验方法

1.2.1 刺参生长性状的测量 随机选择 200 头刺参苗种进行体长、体宽、体重和棘刺总数的测定。体长、体重测量方法: 用 0.6 mol/L 的 MgSO₄ 溶液浸泡参苗, 待参苗麻醉后, 用圆规标定参苗长度后, 再用游标卡尺测量其体长、体宽, 精确到 0.01 cm; 用电子天平测量其体重, 精确到 0.01 g, 并记录每个刺参的棘刺总数(魏杰等, 2007; 廖梅杰等, 2010)。分别解剖分离其纵肌组织, 于 95%乙醇中, -20℃保存。

1.2.2 刺参抗病力性状的测量 随机选择 200 头刺参苗种进行人工攻毒浸染实验, 攻毒所用菌株为实验室分离保存的刺参腐皮综合征重要致病原—灿烂弧菌, 人工浸染浓度为 1.0×10⁷ CFU/ml, 攻毒实验为期 30 d。攻毒期间, 每 3 d 换水 1 次, 换水后及时补充病原菌, 每天观察刺参苗种化皮情况, 对攻毒期间出现化皮症状的苗种及时捞出, 记录其发病时间(记录为存活天数)并分离保存其纵肌组织。到攻毒实验结束时, 仍未出现化皮症状的苗种记录为抗病苗种, 其发病时间统一记录 30 d。实验结束后分别解剖分离其纵肌组织置于 95%乙醇中, -20℃保存(和飞等, 2017)。同时, 设置未攻毒感染组作为对照组, 以排除环境对刺参发病的影响。

1.2.3 基因组 DNA 的提取 使用 Omega 软体动物 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA, 相关操作参照试剂盒说明书。用 1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性; 用 NanoDrop 分光光度计测 DNA 的浓度, 将提取的 DNA 统一稀释成 50 ng/μl, -20℃保存备用。

1.2.4 SNP 位点的筛选和引物设计 在前期构建的遗传连锁图谱中筛选到与体长、体宽、体重、棘刺总数及抗病力 5 个性状相关的 9 个 QTL, 这 9 个 QTL 包含 81 条 SLAF 标签、189 个 SNP 位点。依据 HRM 分型的条件, 挑选 SNP 位点两侧侧翼序列大于 200 bp 且无不确定碱基, 并且 SNP 的突变频率>1%的测序序列, 利用软件 Primer Premier 5.0 进行 SNP 扩增用引物设计, 引物设计原则为长度在 20 bp 左右, GC 含量为 45%~65%, 产物链长度不超过 120 bp, 且利用 Oligo 7.0 分析引物参数时不能有能值高的错配、二聚体和发卡结构。同时, 合成 HRM 基因分型所需的标尺高低温内标及其反向互补序列(王婷等, 2014)。SNP 引物和内标引物送生工生物工程(上海)技术有限公司进行引物合成。

1.2.5 PCR 扩增及基因分型 自生长性状和抗病性状测定群体中各选取 96 个个体, 采用(HRM)法(Reed *et al*, 2007)进行 SNP 位点的 PCR 扩增和基因分型。10 μl PCR 反应体系: DNA 模板 1 μl (50 ng/μl),

4.5 μl 2 \times ES Taq Master Mix, 上下游引物各 0.5 μl (10 $\mu\text{mol/L}$), 3.5 μl ddH₂O; PCR 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 退火 30 s(退火温度见表 1), 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。向 PCR 产物中加入染料 LC Green 1.0 μl , 高低温内标的正负向引物各 0.25 μl , 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min 后降温至 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 利用 Light Scanner 进行基因分型, 基因分型用程序为以 0.1 $^{\circ}\text{C/s}$ 的速度从 56 $^{\circ}\text{C}$ 快速升温到 97 $^{\circ}\text{C}$, 并以 1 次/s 的密度采集荧光信号, 得到熔解曲线, 采集结束后用 Light Scanner 配套软件对熔解曲线进行分析(Ting *et al.*, 2014)。

1.2.6 数据处理 统计各 SNP 位点的基因分型结果, 利用 Popgene32 软件处理统计各位点上的最小等位基因频率(Minor allele frequency, MAF)、观测杂合度(Observed heterozygosity, H_o)、期望杂合度(Expected heterozygosity, H_e)和固定指数(Fixation index, F), 并进行 Hardy-Weinberg 平衡检测。用 Cervus 软件计算各位点多态信息含量(Polymorphism information content, PIC)等指标。

利用 SPSS20 对数据进行统计分析, 用一般线性模型(GLM)对各 SNP 位点以及二倍型与 5 个性状的关联性进行最小二乘分析, 采用 Duncan's 多重比较分析 SNP 位点各基因型、二倍型在生长及抗病性状差异的显著性, 显著性水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 引物设计结果

根据实验室前期高密度遗传连锁图谱和 QTL 分析结果对所筛选的 189 个候选 SNP 位点的序列进行分析, 筛选到可用于设计 SNP 扩增的引物序列 26 条, 依据引物设计条件, 成功设计 SNP 扩增引物 14 对, 但鉴于 SNP107 位点引物与高温内标重合, 最后用于 SNP 验证的扩增引物共 13 对, 相关引物具体信息见表 1。其中, 与体长性状相关的候选 SNP 位点 4 个(SNP6、SNP9、SNP40 和 SNP160), 与体宽相关的候选位点 6 个(SNP6、SNP9、SNP40、SNP64、SNP140 和 SNP160), 与体重相关的候选位点 4 个(SNP6、SNP40、SNP64 和 SNP160), 与棘刺总数相关的候选位点 5 个(SNP6、SNP40、SNP64、SNP91 和 SNP160), 与抗病力相关的候选 SNP 位点 11 个(SNP6、SNP9、SNP64、SNP88、SNP91、SNP109、SNP112、SNP113、SNP126、SNP134 和 SNP160)。由此可见, SNP6、

SNP9、SNP64 和 SNP160 这 4 个候选位点既与生长性状相关, 也与抗病力相关。

2.2 SNP 多态性分析

利用 13 对引物对所检测的个体进行基因分型, 利用 Popgen32 对所获得的所有个体的基因型统计分析。结果显示, 3 个位点(SNP6、SNP64 和 SNP91)在检测群体中没有多态性, 为单态位点, 其余 10 个位点为多态性位点。10 个多态性位点的最小等位基因频率(MAF)介于 0.016(SNP9)~0.332(SNP160)之间, 平均值为 0.173; 各位点的观测杂合度(H_o)介于 0.031(SNP113)~0.818(SNP9)之间, 平均值为 0.433; 期望杂合度(H_e)介于 0.031(SNP113)~0.834(SNP9)之间, 平均值为 0.402; 多态信息含量(PIC)介于 0.030(SNP113)~0.393(SNP160)之间, 平均 0.248(表 2)。6 个位点的观测杂合度(H_o)大于期望杂合度(H_e), 固定指数(F)只有在 SNP160 位点是正值, 其他均为负值; Hardy-Weinberg 平衡分析结果显示, 有 6 个 SNP 位点显著偏离平衡($P < 0.05$)。

2.3 SNP 位点与相关性状的关联性验证

对刺参体长、体重、体宽、棘刺总数和抗病力性状与 10 个多态性 SNP 标记的相关性分析结果见表 3。经验证, SNP40、SNP88、SNP112、SNP126 和 SNP160 位点与所关联的性状显著相关($P < 0.05$)。位点 SNP40 和 SNP160 与体长、体重、体宽、棘刺总数呈显著相关, 其中, SNP40 与体长、体宽、体重呈极显著相关($P < 0.01$); SNP160 与体宽、体重呈极显著相关($P < 0.01$); SNP88、SNP126 与存活天数显著相关($P < 0.05$); 位点 SNP112 与存活天数极显著相关($P < 0.01$)。

2.4 SNP 各位点不同基因型与生长性状的相关性分析

对与 5 个经济性状显著相关的 10 个多态性 SNP 位点进行不同基因型与生长性状多重比较分析, 结果见表 4。SNP40 的 CC 基因型的个体在体长、体重、体宽、棘刺总数 4 个性状的平均值显著高于 CT 基因型的个体($P < 0.05$); SNP88、SNP112、SNP126 基因型分别为 CC、AA、TT 的个体在灿烂弧菌的攻毒实验中的存活天数的平均值显著高于 CT、AG、TG 基因型($P < 0.05$); SNP160 的 AA 基因型个体在体长、体重、体宽、棘刺总数的平均值显著高于基因型 CC 的个体。由此可见, 与生长和棘刺相关的 SNP40 和 SNP160 位点的优势基因型分别为 CC 和 AA; 抗病力相关的 SNP88、SNP112 和 SNP126 位点的优势基因

表1 刺参13个SNP位点引物信息
Tab.1 Information of 13 SNPs of *A. japonicus*

位点 Locus	连锁群 Linkage group	SNP类型 SNP type	引物序列 Primer sequence (5'~3')	退火温度 Annealing temperature(°C)	扩增片段长度 Amplicon length (bp)
SNP6	22	A/G	F: CACAGCTATGGAAACACCGC R: CTCCAGCATATCACAGGCCAT	59.0	111
SNP9	22	A/G	F: GTGCTGATAACTGTAGAAGATTGG R: AGTGATTCCGGTTACGAGTTTGA	59.0	100
SNP40	22	C/T	F: GGGTGGACTTGGAGCAGAAG R: ACCAACGTCCTCTCTGGTTATCA	60.5	64
SNP64	7	G/A	F: CCCAAATTTCCGACCATCTCTG R: AGTGCGGCTCTATCACTCT	59.5	59
SNP88	19	C/T	F: TTTTGTCCCAGAGCATTATCCAA R: TCCAGGAATGATATTTAGTGGTTGT	58.3	77
SNP91	19	A/T	F: TCGGGACTGTGACTGTGTGA R: TCGAGGGGAATGGTGATGC	59.5	52
SNP109	19	C/T	F: TCATAACGCTGGTCTCCGGT R: CTTGCACCACAACAAGTGGC	60.0	185
SNP112	19	A/G	F: ATTTTGGTTAGGGTTAAGAAGGCT R: GTTTCCAAACAACATATGCACTCC	58.5	53
SNP113	19	G/A	F: GCATATGTTGTTTGGAAACAGGTAA R: GACGATACATGTCGTCTGCTAAT	58.5	100
SNP126	19	T/G	F: GGATTGATCGGGGACACACA R: TGGGCTAAGTCACCAATCTGC	60.0	89
SNP134	19	T/C	F: ATGAAAGGCAGAGGTCCAGTT R: GGGGTAAGAGTAGGAATGCAGAA	59.5	97
SNP140	19	A/C	F: AAGAACACAGGATGGTTCTGTCC R: GGAAAAGAGCATGCGGAAATGT	60.0	74
SNP160	19	A/C	F: TCGCAGGAAACCAACCTTCA R: AAGGGAGGGTCAAGGAGGAT	59.5	53

表2 10个多态性SNP位点的遗传参数
Tab.2 Genetic diversity at 10 polymorphic SNPs 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 PIC	固定指数 F	P 值
SNP9	0.091	0.818	0.834	0.152	-0.100	0.154
SNP40	0.256	0.487	0.617	0.309	-0.345	0.000*
SNP88	0.297	0.594	0.387	0.330	-0.422	0.000*
SNP109	0.204	0.409	0.327	0.272	-0.257	0.148
SNP112	0.245	0.490	0.372	0.301	-0.324	0.002*
SNP113	0.016	0.031	0.031	0.030	-0.016	0.899
SNP126	0.202	0.404	0.324	0.271	-0.253	0.016*
SNP134	0.026	0.295	0.503	0.306	-0.338	0.000*
SNP140	0.065	0.129	0.121	0.113	-0.069	0.525
SNP160	0.332	0.670	0.504	0.393	0.332	0.000*
Mean	0.173	0.433	0.402	0.248	-0.179	0.432

注: P 值表示偏离Hardy-Weinberg平衡情况, “*”表示显著偏离($P<0.05$)

Note: P : Deviation from Hardy-Weinberg equilibrium, *: Significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium ($P<0.05$)

型分别为CC、AA和TT。

2.5 SNP二倍型构建及其与性状的关联分析

分别对与抗病力相关和与生长性状相关的SNP

位点构建二倍型,比较二倍型关联性状之间的差异显著性,结果分别见表5、表6。利用SNP88、SNP112和SNP126这3个抗病力相关的SNP位点在检测群体中共检测到6种二倍型,其中, $K_1(CC AA TT)$ 的存

表 3 SNP 位点与体长、体重、体宽、棘刺总数、存活天数相关性分析结果

Tab.3 Significant correlation analysis between SNP loci and body length, body weight, body breadth, pallet number and survival day

位点 Locus	体长 Body length	体宽 Body breadth	体重 Body weight	棘刺总数 Pallet number	存活天数 Survival day
SNP9	0.629	0.628			0.072
SNP40	0.007**	0.004**	0.001**	0.020*	
SNP88					0.013*
SNP109					0.246
SNP112					0.000**
SNP113					0.808
SNP126					0.017*
SNP134					0.940
SNP140		0.931			
SNP160	0.042*	0.004**	0.010**	0.013*	0.619

注: 表中数值为性状(体长、体重、体宽、棘刺总数、存活天数)与 SNP 位点关联分析的概率值, “*”表示 $P<0.05$, “**”表示 $P<0.01$

Note: Values in the table are the probability of association analysis (P) between SNP loci and trait (body length, body weight, body breadth, pallet number and survival day), “*”means $P<0.05$, “**”means $P<0.01$

表 4 SNP 位点不同基因型在关联性状的多重比较分析

Tab.4 Multiple comparisons of related traits with genotypes of SNP

位点 Locus	基因型 Genotype	个体数 Individual number	体长 Body length	体宽 Body breadth	体重 Body weight	棘刺总数 Pallet number	存活天数 Survival day
SNP40-BL	CT	50	6.441±3.148 ^b				
	CC	46	8.383±3.802 ^a				
SNP40-BW	CT	52			8.062±9.152 ^b		
	CC	44			14.954±10.164 ^a		
SNP40-BB	CT	49		1.517±0.817 ^b			
	CC	47		2.167±1.280 ^a			
SNP40-PN	CT	52				30.885±5.694 ^b	
	CC	44				33.841±6.534 ^a	
SNP88-SD	CT	57					21.228±8.266 ^b
	CC	39					25.718±7.591 ^a
SNP112-SD	AA	49					27.469±7.655 ^a
	AG	47					18.447±6.182 ^b
SNP126-SD	TG	38					20.711±8.532 ^b
	TT	56					24.732±7.579 ^a
SNP160-BL	AA	37	8.096±3.573 ^a				
	AC	32	7.317±3.912 ^{ab}				
	CC	27	6.295±3.151 ^b				
SNP160-BW	AA	40			13.967±10.098 ^a		
	AC	41			11.955±10.674 ^a		
	CC	25			5.918±7.720 ^b		
SNP160-BB	AA	38		2.186±1.379 ^a			
	AC	27		1.848±0.883 ^{ab}			
	CC	21		1.835±1.113 ^b			
SNP160-PN	AA	37				34.081±5.609 ^a	
	AC	27				32.593±7.250 ^{ab}	
	CC	32				29.813±5.331 ^b	

注: 同一栏中不同上标字母表示数值间差异显著($P<0.05$)。下同。BL、BW、BB、PN、SD 分别为体长、体重、体宽、棘刺总数、存活天数

Note: Values with different superscript letters within a column are significantly different at 0.05 level, the same as below; BL, BW, BB, PN, SD are the abbreviation of body length, body weight, body breadth, pallet number and survival day

表5 SNP二倍型与刺参抗病力的关联分析
Tab.5 Association between diplotypes of SNPs and disease resistance

二倍型 Diplotype	SNP88	SNP112	SNP126	个体数 Individual number	存活天数 Survival day
K ₁	CC	AA	TT	11	30.000±0.000 ^a
K ₂	CC	AA	TG	11	27.546±6.654 ^{ab}
K ₃	CC	AG	TT	10	25.500±9.958 ^{bc}
K ₄	CT	AA	TT	19	26.632±6.627 ^{ab}
K ₅	CT	AG	TT	14	19.500±6.948 ^{cd}
K ₆	CT	AG	TG	15	15.067±5.650 ^d

表6 SNP二倍型与刺参生长性状的关联分析
Tab.6 Association between diplotypes of SNPs and growth trait

二倍型 Diplotypes	SNP40	SNP160	个体数 Individual number	体长 Body length	个体数 Individual number	体宽 Body breadth	个体数 Individual number	体重 Body weight	个体数 Individual number	棘刺总数 Pallet number
S ₁	CC	AA	21	8.47±3.64 ^{ab}	24	2.35±1.60 ^a	22	16.77±9.99 ^a	22	33.14±5.61 ^a
S ₂	CC	CC	10	8.04±3.40 ^{abc}	10	1.65±0.69 ^{ab}	7	6.08±7.05 ^b	9	33.56±7.58 ^{ab}
S ₃	CC	AC	13	9.17±4.12 ^a	12	2.32±0.79 ^a	15	16.43±9.97 ^a	9	33±7.04 ^{ab}
S ₄	CT	AA	14	7.27±3.64 ^{abc}	14	1.89±0.85 ^{ab}	18	10.54±9.38 ^{ab}	14	33±5.31 ^{ab}
S ₅	CT	CC	15	5.55±2.60 ^c	20	1.28±0.76 ^b	18	5.86±8.16 ^b	19	28.84±3.27 ^b
S ₆	CT	AC	17	6.11±3.11 ^{bc}	15	1.47±0.78 ^b	16	7.76±9.80 ^b	17	31.59±7.57 ^{ab}

活天数最高,该基因型所有个体在整个攻毒期间均未发病, K₂(CC AA TG)次之,但都显著高于其他二倍型;利用 SNP40 和 SNP160 这 2 个与生长和棘刺性状相关的 SNP 位点,在检测群体中共检测到 6 种二倍型,关联分析结果显示, S₁(CC AA)和 S₃(CC AC)在生长性状(体长、体重、体宽)上显著优于其他二倍型。而棘刺总数性状关联分析结果显示, S₅(CT AC)为劣势基因型,其他几种二倍型差异不大。

3 讨论

分子标记辅助水产动物育种是目前水产动物遗传育种的研究重点,但由于小样本作图 QTL 区间过大,且数量性状受环境影响大,导致 QTL 的检测和对 QTL 效应评估发生偏离(Würschum *et al*, 2014),在一个群体或者家系中定位到的 QTL 可能不适用于另一个家系或者群体,因此, QTL 的验证和鉴定是实施 MAS 的前提(Hou *et al*, 2011)。目前,在水产物种中已进行了 QTL 验证的相关研究报道, Wang 等(2014)对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)的抗病力关联的 QTL 进行验证,韦国建等(2015)对马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)的 2 个生长关联基因进行验证,发现优势基因型。随着刺参研究热度的增加(孙国华等, 2011),目前对刺参性状相关 SNP 发掘越来越多, Gao 等(2013)

开发了 26 个与刺参的防御机制相关的 SNP 位点; Dong 等(2016)在对野生和人工养殖的刺参遗传多样性和种群结构的研究中,利用 HRM 发掘了 51 个相关 SNP 位点,解释了遗传多样性降低的原因; Li 等(2016)发现了与刺参干重相关的 3 个 SNP 位点;董玉等(2016)在对 SNP 与生长的关联分析中发现了 10 个与生长性状显著相关的位点。但这些标记是否能直接用于遗传育种,需在扩大群体中进一步验证。本研究是在前期高密度遗传连锁图谱和 QTL 分析获得的候选 SNP 位点的基础上,在扩大群体中对获得的 SNP 位点进一步验证,筛选出可用于遗传育种、与生长性状和抗病力相关的 SNP 位点,并确定其优势基因型,可为分子标记辅助育种在育种生产中直接应用提供技术支撑。

QTL 验证分析的关键步骤是对 SNP 进行准确的基因分型,目前已有多种 SNP 分型方法:半热不对称反向 PCR(Semi-thermal asymmetric reverse PCR)(Long *et al*, 2015);多光谱分析法(Mass spectrometry)(Parka *et al*, 2017)、Fast-GBS(Fast Genotyping-by-sequencing)(Torkamaneh *et al*, 2017)。SNP 的检测方法虽有很多种,但受设备与试剂昂贵、检测时间长、步骤繁琐的限制,不便大规模应用。近年来兴起的高分辨率熔解曲线分析技术(High Resolution Melting, HRM)(Li *et al*, 2012),因其具有灵敏度高、特异性好、

操作简便、能实现真正的闭管操作、分型结果准确率高、费用成本较低的优势,已被广泛用于 SNP 的检测和分型(Liew *et al.*, 2004)。本研究对 13 个位点的多态性分析结果表明,10 个 SNP 位点的多态信息含量在 0.030~0.393 之间,没有高等位多态性的位点,这与 SNP 为二等位标记、基因型较少有关(Bmokes, 1998)。检测结果中,位点 SNP9、SNP40 和 SNP134 所检测的个体中的期望杂合度大于观测杂合度,其他位点的观测杂合度大于期望杂合度,但相差不大,固定指数(F)除位点 SNP160 是正值,其他均为负值,说明普遍存在杂合子缺失现象,这可能是选育造成纯合度增加导致。

孙效文等(2010)建议,将 QTL 结果应用育种之前,最好在大样本量的随机群体中进行验证,以增加 QTL 在育种群体中的利用价值。本研究对 10 个多态性的候选性状关联位点与性状进行相关性分析验证,筛选出 5 个性状相关位点,验证成功率为 50%。由此可见,在扩大群体中对 QTL 位点进行验证对提高标记的准确性具有重要意义。对所检测 SNP 位点与相关性状的关联性验证表明,位点 SNP40 和 SNP160 与体长、体重、体宽、棘刺总数 4 个性状均呈显著相关,即出现了同一个位点关联多个性状的现象,说明这 4 个性状之间存在一定程度的关联,相关结果可为刺参不同性状间的间接良种选育提供参考。孙文静(2010)和董玉等(2016)相关研究结果也表明,刺参所检测的相关 SNP 位点同时与体长、体宽、体重和体壁重 4 个性状显著相关,相关研究结果与本结果基本一致。此外,在抗病力相关 SNP 位点检测中,SNP88、SNP112 和 SNP126 均与抗病力显著相关,出现一个性状有多个 SNP 位点与之关联的现象,表明该性状受多个位点控制,符合数量遗传学相关理论(孙效文, 2010)。抗病力相关 SNP 位点与生长相关 SNP 位点不存在重合现象,表明生长与抗病力 2 个性状相关性不大,后期选择育种过程中需作为 2 个性状进行独立选择。

对同一个 SNP 位点不同基因型关联性状的多重比较分析结果显示,生长和刺型相关 SNP 位点 SNP40 和 SNP160 的优势基因型分别为 CC 和 AA,抗病力相关 SNP 位点 SNP88、SNP112、SNP126 的优势基因型分别为 CC、AA、TT。由此可见,相应位点的纯合型会表现出更好的表型,在以后的选育工作中可对相应基因进行筛选与组合。

为了降低利用单个 SNP 标记进行性状关联分析的局限性,本研究对性状相关的多个 SNP 位点通过构建二倍性相关分析,以提高分析的准确性(De Bakker *et al.*, 2005)。利用 SNP40、SNP160 构建的与

生长相关的二倍型,显示 S_1 (CC AA)和 S_3 (CC AC)在生长性状(体长、体重、体宽)上显著优于其他二倍型,均为与生长性状(体长、体重、体宽)相关的优势基因型组合,证明 SNP40 位点对生长贡献率更大一些,鉴于 SNP40、SNP160 分别位于 LG22 和 LG19 连锁群上,二者不存在连锁效应,在将来育种实践中对携带这 2 个位点优势基因型的亲本进行组合构建优势二倍型个体。同样,利用 SNP88、SNP112、SNP126 这 3 个位点构建的二倍型与性状分析结果表明, K_1 型(CC AA TT)个体的存活天数最高,也就是抗病力最强,鉴于 SNP88、SNP112、SNP126 均来自高密度遗传连锁图谱的 LG19 连锁群,相关位点是否存在互作效应有待下一步证实。

综上所述,本研究是在前期高密度遗传连锁图谱和 QTL 分析获得的候选 SNP 位点的基础上,在扩大群体中对获得的 SNP 位点进一步验证,筛选出可用于遗传育种的、与生长性状和抗病力相关的 SNP 位点,并确定其优势基因型,相关研究结果为实施刺参分子标记辅助育种在育种生产中应用有重要意义。

参 考 文 献

- Bai ZY, Han XK, Luo M, *et al.* Constructing a microsatellite-based linkage map and identifying QTL for pearl quality traits in triangle pearl mussel (*Hyriopsis cumingii*). *Aquaculture*, 2015, 437: 102–110
- Bmokes A, Day I. SNP attack on complex traits. *Nature Genetics*, 1998, 20(3): 217–218
- Chu GN, Jiang LM, Zhang QQ, *et al.* A microsatellite genetic linkage map of black rock fish (*Sebastes schlegelii*). *Journal of Ocean University of China*, 2014, 13(6): 1078–1086
- Collard BCY, Jahufer MZZ, Brouwer JB, *et al.* An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*, 2005, 142(1–2): 169–196
- De Bakker PI, Yelensky R, Pe'Er I, *et al.* Efficiency and power in genetic association studies. *Nature Genetics*, 2005, 37(11): 12–17
- Dong Y, Li Q. Correlation analysis between SNPs and growth traits of *Apostichopus japonicus*. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2016, 149(2): 49–58 [董玉, 李琪. 刺参 SNP 标记与生长性状的关联分析. *海洋湖沼通报*, 2016, 149(2): 49–58]
- Dong Y, Li Q, Zhong XX, *et al.* Development of gene-derived SNP markers and their application for the assessment of genetic diversity in wild and cultured populations in sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2016, 47(6): 873–888
- Gao LL, Chen M, Chang YQ, *et al.* Development of SNP markers

- associated with defense mechanism of sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. Conservation Genetics Resources, 2013, 5(2): 587–591
- Gonen S, Baranski M, Thorland I, et al. Mapping and validation of a major QTL affecting resistance to pancreas disease (salmonid alphavirus) in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Heredity, 2015, 115(5): 405–414
- He F. Estimation of the heritability of important economic traits and construction of high density genetic linkage map for sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2016, 1–83 [和飞. 刺参 (*Apostichopus japonicus*) 重要经济性状遗传力估计及高密度遗传连锁图谱的构建. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2016, 1–83]
- He F, Wang YG, Liao MJ, et al. Estimation of the heritability of three economic traits in 9-month-old sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Progress in Fishery Sciences, 2017, 38(5): 114–121 [和飞, 王印庚, 廖梅杰, 等. 刺参 (*Apostichopus japonicus*) 9 月龄主要经济性状遗传力的估计. 渔业科学进展, 2017, 38(5): 114–121]
- Hou SY, Ma AJ, Wang XA, et al. Isolation and characterization of 45 polymorphic microsatellite loci of turbot (*Scophthalmus maximus*) and cross species amplification. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2011, 29(2): 311–316
- Liao MJ, Wang YG, Hao ZK, et al. Method for measuring body weight of live *Apostichopus japonicus*. ZL 201010100781.3, 2010 [廖梅杰, 王印庚, 郝志凯, 等. 活体刺参体重测量方法. ZL 201010100781.3, 2010]
- Liao YL. China Fauna, Echinodermata, Holothuroidea, Beijing: Journal of Science, 1997: 53–64 [廖玉麟. 中国动物志, 棘皮动物门, 海参纲. 北京: 科学出版社, 1997: 53–64]
- Liew M, Pryor R, Palais R, et al. Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. Clinical Chemistry, 2004, 50(7): 1156–1164
- Li FB, Niu BL, Huang YP, et al. Application of high-resolution DNA melting for genotyping in lepidopteran non-model species: *Ostrinia furnacalis* (Crambidae). PLoS One, 2012, 7(1): 1–8
- Li SL, Zhou ZC, Dong Y, et al. Molecular characterization expression analysis of the myostatin gene and its association with growth traits in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). Comparative Biochemistry and Physiology Biochemistry and Molecular Biology, 2016, 201: 12–20
- Long YM, Chao W, Ma G, et al. An innovative SNP genotyping method adapting to multiple platforms and throughputs. Theoretical and Applied Genetics, 2015, 130(3): 597–607
- Ministry of Agriculture Fishery Administration. China fisheries statistics yearbook. Beijing: China Agriculture Press, 2017 [农业部渔业渔政管理局. 2017 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2017]
- Parka JH, Jang H, Yun KJ, et al. A mass spectrometry-based multiplex SNP genotyping by utilizing allele-specific ligation and strand displacement amplification. Biosensors and Bioelectronics, 2017, 91: 122–127
- Qiu GF, Xiong LW, Liu ZQ, et al. A first generation microsatellite-based map of the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) and its application in quantitative trait loci (QTL) detection. Aquaculture, 2016, 451: 223–231
- Reed GH, Kent JQ, Wittwer CT. High resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. Pharmacogenomics, 2007, 8(6): 597–608
- Ren P, Peng WZ, You WW, et al. Genetic mapping and quantitative trait loci analysis of growth-related traits in the small *Haliotis diversicolor* using restriction-site-associated DNA sequencing. Aquaculture, 2016, 454: 163–170
- Sun GH, Yang JM, Sun XD, et al. Correlation analysis of microsatellite DNA markers with growth traits of body weight and length in *Apostichopus japonicus*. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(4): 501–508 [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. 水产学报, 2011, 35(4): 501–508]
- Sun WJ. Analysis of QTL associated with growth trait of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). Master's Thesis of Ocean University of China, 2012 [孙文静. 刺参生长相关性状 QTL 分析. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2012]
- Sun XW. Molecular breeding of fish. Beijing: China Ocean Press, 2010 [孙效文. 鱼类分子育种学. 北京: 海洋出版社, 2010]
- Tian M, Li YP, Jing J, et al. Construction of a high-density genetic map and quantitative trait locus mapping in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Scientific Report, 2015, 5: 14852
- Torkamaneh D, Laroche J, Bastien M, et al. Fast-GBS: A new pipeline for the efficient and highly accurate calling of SNPs from genotyping-by-sequencing data. BioMed Central Bioinformatics, 2017, 18(1): 1–7
- Wang L, Fan C, Liu Y, et al. A genome scan for quantitative trait loci associated with *Vibrio anguillarum* infection resistance in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) by bulked segregant analysis. Marine Biotechnology, 2014, 16(5): 513–521
- Wang T, Huang ZH, Ma AJ, et al. Development and polymorphic analysis of SNP marker in *Scophthalmus maximus* based on transcriptome database. Oceanologia et Limnologia Sinica. 2014, 45(6): 1300–1307 [王婷, 黄智慧, 马爱军, 等. 基于转录组数据的大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) SNP 标记开发及多态性分析. 海洋与湖沼, 2014, 45(6): 1300–1307]
- Wang YG, Rong XJ, Liao MJ, et al. Sea cucumber culture and disease control technology. Beijing: China Agriculture Press, 2014 [王印庚, 荣小军, 廖梅杰, 等. 刺参健康养殖与病害防控技术丛解. 北京: 中国农业出版社, 2014]
- Wei GJ, Liu WG, Lin JS, et al. Verification of two QTL associated with growth traits of Pear oyster *Pinctada martensii* Dunker. Marine Sciences, 2015, 39(11): 13–19 [韦国建, 刘文广,

- 林坚士, 等. 马氏珠母贝两个与生长性状相关 QTL 的验证. 海洋科学, 2015, 39(11): 13–19]
- Wei J, Chang YQ, Nie ZL, *et al.* Method for accurately measuring body length of living *Apostichopus japonicus*. ZL 20071001074.6, 2007 [魏杰, 常亚青, 聂竹兰, 等. 准确测量活体刺参体长的方法. ZL 20071001074.6, 2007]
- Würschum T, Kraft T. Cross-validation in association mapping and its relevance for the estimation of QTL parameters of complex traits. *Heredity*, 2014, 112(4): 463–468
- Zhao L, Zhang Y, Ji PF, *et al.* A dense genetic linkage map for common carp and its integration with a BAC-based physical map. *PLoS One*, 2013, 8(5): 1–11

(编辑 冯小花)

Validation of SNPs Associated with Important Economic Traits of Sea Cucumber (*Apostichopus japonicus*)

LIU Anran^{1,2}, LIAO Meijie^{2,3①}, LI Bin^{2,3}, WANG Yingeng^{2,3}, RONG Xiaojun^{2,3}, ZHANG Zheng^{2,3}, FAN Ruiyong⁴, CHEN Guiping^{2,3}

(1. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 4. Qingdao Ruizi Seafood Development Co. Ltd, Qingdao 266400)

Abstract Based on the high-density genetic linkage map and QTL of the sea cucumber (*Apostichopus japonicus*), we selected 26 candidate SNPs associated with body length, body weight, body breadth, pallet number, and disease resistance. Thirteen pairs of primers were successfully designed, which could be used for high resolution melting (HRM) detection. The 13 candidate SNPs associated with important economic traits were validated and analyzed with phenotypic data using genotyping of HRM in the expanded population. Polymorphic analysis results showed 3 loci were monomorphic sites and the other 10 loci possessed polymorphic minor allele frequency (MAF) at the 10 polymorphic sites, which ranged from 0.016 (SNP113) to 0.332 (SNP160), with an average of 0.173. Observed heterozygosity (H_o) ranged from 0.031 (SNP113) to 0.818 (SNP9), with an average of 0.433. Expected heterozygosity (H_e) ranged from 0.031 (SNP113) to 0.834 (SNP160), with an average of 0.402. The polymorphism information content (PIC) value ranged from 0.030 to 0.393, with an average of 0.284. Six loci departed from the Hardy Weinberg equilibrium. The results of QTL verification indicated that loci SNP40 and SNP160 associated with growth traits (body length, body weight, body breadth) with the dominant genotypes SNP40 (CC), SNP160 (AA). SNP88, SNP112, and SNP126 were associated with disease resistance. The dominant genotypes were SNP88 (CC), SNP112 (AA), and SNP126 (TT). Diplotypes were constructed based on the five SNPs and association analyses revealed that K_1 (CC AA TT) was best for disease resistance, and S_1 (CC AA) and S_3 (CC AC) were dominant diplotypes for growth traits. These results provide basic data for marker-assisted selection in sea cucumber breeding.

Key words *Apostichopus japonicus*; Quantitative trait locus (QTL); Single nucleotide polymorphism (SNP); High-resolution melting (HRM); Validation

① Corresponding author: LIAO Meijie, E-mail: liaomj@ysfri.ac.cn