

DOI: 10.12264/JFSC2023-0347

## 基于 RAD-seq 的大口黑鲈选育群体快长 SNP 挖掘及其与生长性状的关联分析

华吉祥<sup>1,2</sup>, 陶易凡<sup>2</sup>, 李岩<sup>1,2</sup>, 王庆春<sup>1</sup>, 陈文华<sup>3</sup>, 诸葛燕<sup>3</sup>, 张茂友<sup>3</sup>, 董亚伦<sup>2</sup>, 路思琪<sup>2</sup>, 姜冰洁<sup>2</sup>, 强俊<sup>1,2</sup>

1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;
2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业农村部淡水渔业与种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081;
3. 苏州市水产技术推广站, 江苏 苏州 215004

**摘要:** 大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)生长性状是衡量品质与产量的重要标准, 开发快长 SNP 标记与挖掘优势基因型及生长主效基因, 有助于进一步解析其生长发育遗传机制, 为选育优质高产新品系奠定基础。基于简化基因组测序技术(restriction-site associated DNA sequencing, RAD-seq), 在大口黑鲈美国北方亚种 F0 生长性状极端群体(体重极大前 1%和极小后 1%)中, 筛选了与生长性状存在潜在关联的 SNP 位点, 利用一般线性模型(generalized linear model, GLM)将 SNP 位点基因型与 230 尾 F0 个体的体重、体长、体高和体厚进行相关性分析, 此外通过基因注释信息预测生长候选基因, 并结合优势基因型加性效应分析优势基因型聚合效果。在大口黑鲈 23 条染色体上发现了 4196486 个高质量 SNPs, 基于种群特异基因型频率阈值 0.7, 初步筛选出 100 个与生长性状潜在相关的 SNP 位点。关联性分析显示, 有 12 个 SNP 标记存在显著关联, 包括 5 个标记与体重显著关联, 10 个与体长显著关联, 4 个与体高显著关联, 5 个与体厚显著关联。其中标记 SNP19140160、SNP24406191、SNP3355498 和 SNP9244620 分别定位至生长候选基因 *fam174b*、*diaph2*、*kiaa1549lb* 和 *ppip5k1b* 上。富集 6~10 个优势基因型的群体较富集 0~5 个优势基因型的群体在平均体重、体长、体高和体厚上分别提高了 32.07%、9.63%、9.96%和 10.58%。本研究所鉴定的 12 个快长 SNP 标记和 4 个生长候选基因可助力大口黑鲈生长性状改良。

**关键词:** 大口黑鲈; 简化基因组测序; SNP; 生长性状; 优势基因型

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)03-0241-16

大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)原产于北美, 20 世纪 80 年代引入国内, 因其生长速度快、适应性强、肉质鲜美而深受消费者喜爱。近年来大口黑鲈养殖产量逐年提升, 2022 年大口黑鲈养殖产量达 80.2 万 t, 较 2021 年的 70.2 万 t 增幅 14.3%<sup>[1]</sup>。然而, 伴随养殖产业不断发展, 种质资源退化、抗病能力下降、优质苗种获取困难等问题日益增多,

严重阻碍产业健康发展<sup>[2-3]</sup>。因此, 系统开展大口黑鲈的良种保存和选育工作是解决目前大口黑鲈亲本品质退化的重要途径。

在鱼类养殖生产中, 生长相关性状是衡量养殖成效的重要指标。鱼类的生长发育极为复杂, 受基因、环境及其相互作用共同影响<sup>[4]</sup>。基因是影响鱼类生长发育的内在因素, 目前在草鱼(*Ctenopharyngodon*

收稿日期: 2023-12-19; 修订日期: 2024-02-18.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFE0139600); 科技创新 2030-重大项目(2023ZD04065); 苏州市科技计划项目(SNG2021009); 江苏省种业振兴“揭榜挂帅”项目(JBGS[2021]130); 加州鲈产业重大技术协同推广计划项目(2022-ZYXT-07); 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心基本科研业务费项目(2023JBFR02).

作者简介: 华吉祥(1998-), 男, 硕士, 研究方向为水产生物技术. E-mail: huajixiang@ffrc.cn

通信作者: 强俊, 研究员, 研究方向为水产生物技术. E-mail: qiangj@ffrc.cn

*idella*)<sup>[5]</sup>, 鳙(*Hypophthalmichthys nobilis*)<sup>[6]</sup>, 大黄鱼(*Larimichthys crocea*)<sup>[7]</sup> 和金鲷(*Trachinotus ovatus*)<sup>[8]</sup>等重要经济水产动物上均已鉴定出与生长相关的基因。在大口黑鲈中, 通过候选基因法, 筛选了众多与生长发育和代谢相关的基因, 如热休克因子结合蛋白(*HSBP1*)、组织蛋白酶 B(*CTSB*)、垂体特异性转录因子(*POU1F1*)、胰岛素样生长因子-1(*IGF-I*)和载脂蛋白 A1(*ApoproteinA1*)等<sup>[9-13]</sup>。温度、溶氧、光照等环境因子是影响鱼类生长发育的外部因素<sup>[14-16]</sup>。

传统的良种选育结合分子标记辅助育种(marker assisted selection, MAS), 极大地加快了育种进程, 因其具有更高的准确性, 在水产动物育种中已被广泛运用<sup>[17]</sup>。SNP 标记在基因组中具有位点分布广、密度高、遗传稳定等优势, 已成为遗传学领域最为流行的分子标记之一<sup>[18]</sup>。目前, 鱼类与生长相关的 SNP 标记被广泛发掘。孙雪等<sup>[19]</sup>基于不同生长速率的草鱼群体转录组数据, 筛选了 4 个候选 SNP 标记。苗亮等<sup>[20]</sup>通过对光唇鱼(*Acrossocheilus fasciatus*) *MSTN* 基因的克隆, 并检测其在不同组织中的表达情况筛选了 10 个生长相关 SNP 标记。近年来, 由于简化基因组测序技术具有文库构建简单快速、准确性高等优点, 在鱼类生长相关 SNP 标记开发中更具优势。通过简化基因组测序, 在比目鱼(*Paralichthys olivaceus*)<sup>[21]</sup>、橙点石斑鱼(*Epinephelus coioides*)<sup>[22]</sup>、红尾鲈(*Hemibagrus wyckioides*)<sup>[23]</sup>中均筛选到生长相关 SNP 标记。通过 SNP 标记与生长性状进行关联性分析, 探讨表型与功能等位基因的联系, 有助于理解优势基因型聚合效果, 这为下一步开展分子标记辅助育种提供支撑。周晓敏等<sup>[24]</sup>通过一般线性模型(generalized linear model, GLM)对罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*) 5 个生长性状进行相关性分析, 找到 4 个显著关联的 SNP 标记。Zhang 等<sup>[25]</sup>基于黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)的转录组数据, 在 60 个基因分型成功的 SNP 中发现 4 个标记与体重显著关联, 可用于生产实践。

本实验基于 2020 年从美国引种的 3000 尾大口黑鲈北方亚种构建的 F0 基础种群, 通过简化基因组测序技术, 筛选大口黑鲈快长 SNP 标记, 挖

掘优势基因型, 为其种质改良奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本实验以引进种 P0 为亲本构建的 F0 基础种群为对象, 在中国水产科学研究院淡水渔业研究中心南泉基地饲养, 养殖期间保持水体溶氧高于 6 mg/L, 氨氮低于 6 mg/L, pH 保持在 7.7, 于每天 8:00 和 17:00 使用鲈鱼专用商品饲料投喂。在相同养殖条件下, 从 3000 尾鱼中挑选 30 尾极大个体, 平均体重(724.2±119.2) g 和 30 尾极小个体, 平均体重(307.2±107.7) g。所有实验鱼均用 MS-222 (200 mg/L)麻醉, 剪取 0.5 g 尾鳍, 立即置于液氮中冷冻, 并在-80 °C 中保存备用。

### 1.2 DNA 提取及 dd-RAD 文库构建和测序

使用 DNA 提取试剂盒(诺唯赞生物技术有限公司)从尾鳍样本中提取基因组 DNA。通过 1%琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 2000 超微量分光光度计检测 DNA 的浓度和纯度。将基因组 DNA 稀释至 50~70 ng/μL, 保存在-20 °C。采用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Mse* I 组合对全基因组 DNA 进行完全酶切, 回收插入一定长度的酶切片段, 利用二代测序技术(next-generation sequencing, NGS), 基于 Illumina NovaSeq 测序平台, 对文库进行 2×150 bp 双末端测序(派森诺, 上海, 中国)。使用 fastp (v0.20.0)滑动窗口法对原始数据进行过滤, 生成高质量序列。

### 1.3 全基因组 SNP 筛查

采用 bwa-mem (0.7.12-r1039)程序将过滤后的高质量数据对比大口黑鲈参考基因组(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Micropterus+salmoides>, PRJNA640112), 按照 bwamem 的默认参数比对。采用 GATK 软件进行 SNP 的检测, 为保证 SNP 位点的可靠性, 按照 Zhu 等<sup>[26]</sup>过滤标准对 SNP 进一步过滤。

### 1.4 群体亲缘关系分析

采用 GCTA 软件根据 SNP 数据去除次要等位基因频率(MAF)<5%的 SNP 位点, 对 30 尾快长个体和 30 尾慢长个体进行主成分分析(PCA)。群体亲缘关系分析通过状态同源 IBS 矩阵(plink v1.9)和

全基因组关系矩阵(Gmatrix Ver2)计算完成。

### 1.5 快长群体特异性 SNP 筛选

采用派森诺生物技术有限公司自制脚本进行快长群体特异性 SNP 筛选。根据 SNP 位点在快长和慢长群体内 4 种基因型(0/0 纯合基因型; 0/1 杂合基因型; 1/1 纯合的基因型; ./ 为位点缺失)出现的频率, 设定种群特异基因型频率的阈值, 如果在快长群体中该基因型个体出现的频率>阈值, 且慢长群体中该基因型个体出现的频率<(1-阈值), 则该基因型为快长群体的特异基因型。本研究设定种群特异基因型频率的阈值为 0.7。

### 1.6 基因分型检测与生长性状关联性分析

为验证实验 1.5 中筛选的 SNP 位点, 在除了用于简化基因组测序的 60 尾鱼的另外 2940 尾鱼中随机收集 230 尾 1 龄 F0 大口黑鲈北方亚种个体, 分别测量体重、体长、体高和体厚 4 个生长性状。按照 1.1 中的方法, 剪取尾鳍, 使用高通量 Hi-SNP 分型技术, 采用 Primer3.0 软件对初筛的 SNP 位点设计特异性扩增引物, 完成基因分型检测。采用 TASSEL 软件将 SNP 基因型和生长性状导入, 利用一般线性模型进行关联分析, 对生长性状关联定位。采用 SPSS 22.0 以 SNP 位点的基因型为自变量, 不同性状值为因变量, 进行差异显著性检验, 显著性水平  $P<0.05$ , 则认为该位点与性状显著关联。

### 1.7 SNP 位点遗传多态性分析

采用 Powermarker 和 PopGene32 软件, 计算与生长性状显著关联 SNP 位点在总群体中的遗传多样性指数, 包括观测杂合度( $H_o$ )、期望杂合度( $H_e$ )、多态性信息含量(PIC)、哈温平衡常数(HWE)、Nei's 遗传多样性指数( $H$ )等。

### 1.8 生长候选基因预测

采用 ANNOVAR 软件对显著关联的 SNP 位点进行注释, 利用已公布的大口黑鲈基因组测序数据库, 将 SNP 位点与大口黑鲈基因组进行 BLAST 比对, 定位基因组位置, 并在 SNP 位点侧翼序列 200 kb 范围内提出候选基因。

### 1.9 统计分析

采用 Excel 2021 录入生长数据, 并用 SPSS22.0 软件进行正态分布检验, 符合正态分布的性状方

可用于后续关联性分析。采用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行显著性差异分析, 采用 LSD 进行多重比较, 显著水平为 0.05。实验结果均以平均值±标准差( $\bar{x} \pm SD$ )表示。通过 GraphPad Prism 9.0 和 Origin 2022 软件绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 测序数据及全基因组 SNP 统计

基于 dd-RAD 测序, 通过质量控制后, 快长群体共获得高质量 reads 252315516 个, Q30 为 92.08%; 慢长群体共获得高质量 reads 238299380 个, Q30 为 92.28%。快长群体获得 reads 数更多, 两群体的平均 GC 含量相似, 均为 43.4%。对比参考基因组显示, 两群体对比率均为 99.82%。简化基因组测序结果统计, 快长群体共检测到 2080471 个 SNP, 平均每尾 69349 个, 慢长种群共检测到 2116015 个 SNP, 平均每尾 70533 个, 慢长群体的 SNP 检出率高于快长群体, 转换与颠换(Ts/Tv)之比为 1.27。这 4196486 个 SNP 位于大口黑鲈 23 条基因组序列上(图 1a), 以 0.5 Mb 为窗口统计 SNP 的数目, 结果发现在 NW\_024040040.1 基因组序列上聚集最多的 SNP。

### 2.2 群体亲缘关系分析结果

30 尾极大个体和 30 尾极小个体大口黑鲈主成分分析结果显示, 两个群体表现出相似的聚类模式, 属于相同的亚群(图 1b), 个体之间遗传距离范围为 0~0.215 (图 1c), 亲缘关系矩阵 G 值范围为 0.326~1 (图 1d), 个体间亲缘关系变化范围不大。总体而言, 两群体分化水平不高, 亲缘关系相近, 适合用于快长 SNP 标记的开发。

### 2.3 快长群体特异性 SNP 筛选结果

根据本研究的 2 个群体差异性 SNP 筛选标准, 共筛选出 100 个快长 SNP 位点, 关联性分析结果显示, 共 12 个 SNP 位点与生长性状显著关联(表 1)。其中 5 个与体重显著关联, 10 个与体长显著关联, 4 个与体高显著关联, 5 个与体厚显著关联, 与体长显著关联的 SNP 位点最多, 与体高显著关联的 SNP 位点最少。其中位点 SNP38891697 和 SNP19140160 分别与体重、体长、体高和体厚均显著关联, 位点 SNP24406191 和 SNP4710104 也分

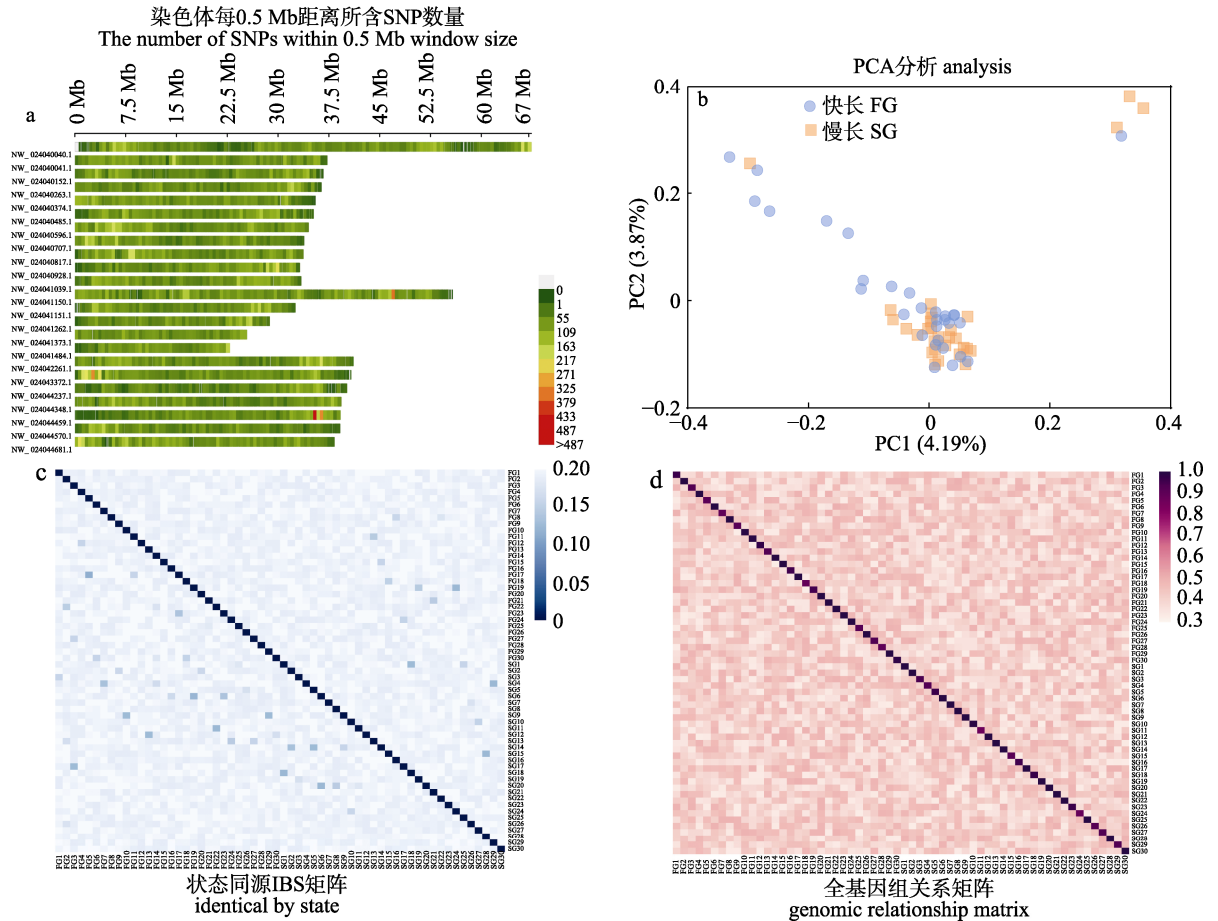


图 1 SNP 与群体亲缘关系分析结果

a. SNP 在 23 条染色体上的分布; b. 快长慢长种群主成分分析; c. IBS 遗传距离矩阵热图; d. 全基因组亲缘关系矩阵热图.

Fig. 1 Results of SNP and kinship analysis of population

a. Distribution of SNPs across 23 chromosomes; b. Principal component analysis of fast- and slow growth populations; c. IBS genetic distance matrix heat map; d. Genome-wide kinship matrix heat map.

表 1 大口黑鲈生长性状与 12 个 SNP 位点关联性分析

Tab. 1 Correlation analysis of the twelve SNP loci with growth traits of *Micropterus salmoides*

性状 trait	位点 locus	P	贡献率 R <sup>2</sup>	性状 trait	位点 locus	P	贡献率 R <sup>2</sup>
体重 body weight	SNP38891697	0.0017	0.0561	体重 body weight	SNP4710104	0.0306	0.0308
体长 body length	SNP38891697	0.0200	0.0346	体长 body length	SNP4710104	0.0269	0.0319
体高 body height	SNP38891697	0.0001	0.0632	体高 body height	SNP4710104	0.0279	0.0306
体厚 body thickness	SNP38891697	0.0061	0.0449	体长 body length	SNP33992108	0.0494	0.0270
体重 body weight	SNP19140160	0.0023	0.0522	体高 body height	SNP48043665	0.0232	0.0338
体长 body length	SNP19140160	0.0278	0.0311	体厚 body thickness	SNP48043665	0.0227	0.0340
体高 body height	SNP19140160	0.0025	0.0514	体长 body length	SNP9639603	0.0408	0.0278
体厚 body thickness	SNP19140160	0.0027	0.0509	体长 body length	SNP9639605	0.0408	0.0278
体重 body weight	SNP24406191	0.0460	0.0281	体重 body weight	SNP9519393	0.0055	0.0460
体长 body length	SNP24406191	0.0018	0.0567	体长 body length	SNP9519393	0.0052	0.0465
体厚 body thickness	SNP24406191	0.0352	0.0305	体长 body length	SNP17586389	0.0252	0.0330
体长 body length	SNP23355498	0.0407	0.0278	体厚 body thickness	SNP9244620	0.0400	0.0288

注: P 值为显著性水平; R<sup>2</sup> 值为表型变异解释率, 该值大于 10% 认为是主效应 QTL 或主效基因.

Note: P-value is the significance level; R<sup>2</sup>-value is the rate of explanation of phenotypic variance, which is greater than 10% considered to be a main effect QTL or dominant gene.

别与 3 个生长性状显著关联, 位点 *SNP480436654* 与体高和体厚性状显著关联, 位点 *SNP9519393* 与体重和体长性状显著关联, 位点 *SNP23355498*、*SNP33992108*、*SNP9639603*、*SNP9639605*、*SNP17586389* 和 *SNP9244620* 均只与 1 个生长性状显著关联。12 个 SNP 位点主要分布在 7 条基因组序列上, 其中序列 NW\_024044237.1 上分布的 SNP 位点最多, 为 3 个, 序列 NW\_024040485.1、NW\_024044348.1 和 NW\_024044570.1 上均分布 2 个 SNP 位点, 序列 NW\_024040040.1、NW\_024041150.1 和 NW\_024044681.1 上均只分布 1 个 SNP 位点(图 2)。12 个 SNP 位点解释了 2.7%~6.32% 的表型变异, 其中位点 *SNP38891697* 解释的表型变异最高为 6.32%。

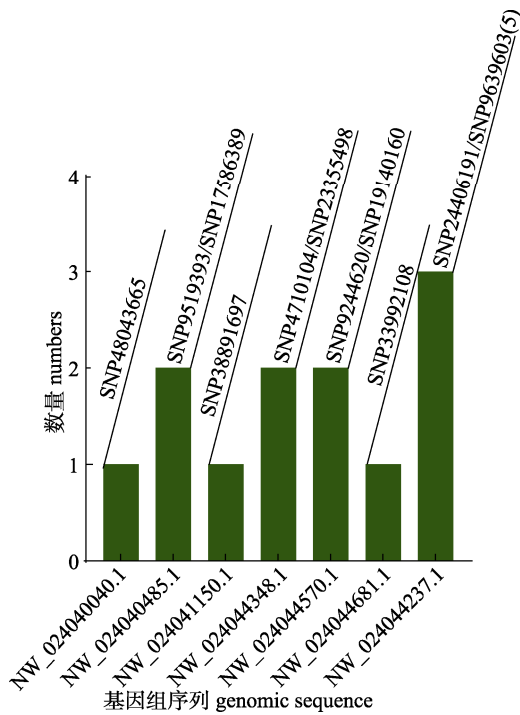


图 2 12 个 SNP 位点在大口黑鲈基因组序列上的分布情况

Fig. 2 Distribution of the twelve SNP loci over the genomic sequences of *Micropterus salmoides*

### 2.4 快长 SNP 标记多态性分析结果

12 个 SNP 标记遗传多态性结果显示, 遗传多态信息含量(PIC)介于 0.12~0.35 之间, 平均 PIC 值为 0.29, 其中位点 *SNP24406191*、*SNP9519393* 和 *SNP17586389* 为低多态性位点( $PIC < 0.25$ ), 其余所有位点均为中度多态性位点( $PIC > 0.25$ )。观测

杂合度( $H_o$ )为 0.13~0.50, 期望杂合度( $H_e$ )为 0.13~0.26, 有效等位基因数( $N_e$ )为 1.14~1.184, 平均群体 Nei's 遗传多样性指数( $H$ )为 0.36, 表明所选用的大口黑鲈群体具有较为丰富的遗传多样性。其中位点 *SNP4710104* 偏离哈温平衡状态( $P < 0.05$ ), 其余 11 个位点均符合哈温平衡状态( $P > 0.05$ )(表 2)。

### 2.5 SNP 标记与大口黑鲈生长性状关联性分析结果

**2.5.1 大口黑鲈生长性状数据统计** 通过对 230 尾用于关联分析的大口黑鲈体重、体长、体高和体厚等性状进行统计分析(表 3), 各性状数值均呈正态分布(图 3), 体重变异幅度为 246~1261, 平均值为 624.5 g, 变异系数最大为 27.2%; 体厚变异幅度为 3.6~7.1, 平均值为 5.1 cm, 变异系数次之为 11.4%; 体长变异幅度为 19.8~32.7 平均值为 25.6 cm, 变异系数最小为 8.8%; 体高变异幅度为 7.1~11.4, 平均值为 8.7 cm, 变异系数为 9.7%。4 个生长性状均表现出广泛的表型变异, 变异范围为 8.8%~27.2%。

**2.5.2 SNP 标记不同基因型与大口黑鲈生长性状相关性分析** 12 个 SNP 标记不同基因型所对应的生长性状结果见表 4, 标记 *SNP38891697* 的 CC

表 2 12 个 SNP 位点在大口黑鲈群体中的遗传多态性  
Tab. 2 Genetic polymorphism of 12 SNP loci in *Micropterus salmoides* population

位点 locus	观测杂合度 $H_o$	期望杂合度 $H_e$	有效等位基因数 $N_e$	多态信息含量 PIC	哈温平衡常数 HWE P	Nei's 遗传多样性指数 $H$
<i>SNP38891697</i>	0.41	0.44	1.80	0.34	0.30	0.44
<i>SNP19140160</i>	0.38	0.44	1.79	0.34	0.53	0.44
<i>SNP24406191</i>	0.30	0.28	1.39	0.24	0.29	0.28
<i>SNP23355498</i>	0.41	0.38	1.61	0.31	0.22	0.38
<i>SNP4710104</i>	0.21	0.34	1.50	0.28	0.00	0.33
<i>SNP33992108</i>	0.36	0.40	1.68	0.32	0.13	0.40
<i>SNP48043665</i>	0.36	0.39	1.65	0.32	0.28	0.39
<i>SNP9639603</i>	0.43	0.43	1.75	0.34	0.89	0.43
<i>SNP9639605</i>	0.43	0.43	1.75	0.34	0.89	0.43
<i>SNP9519393</i>	0.13	0.13	1.14	0.12	0.98	0.13
<i>SNP17586389</i>	0.27	0.26	1.35	0.23	0.55	0.26
<i>SNP9244620</i>	0.50	0.46	1.84	0.35	0.15	0.46
平均值 mean	0.35	0.37	1.60	0.29	0.43	0.36

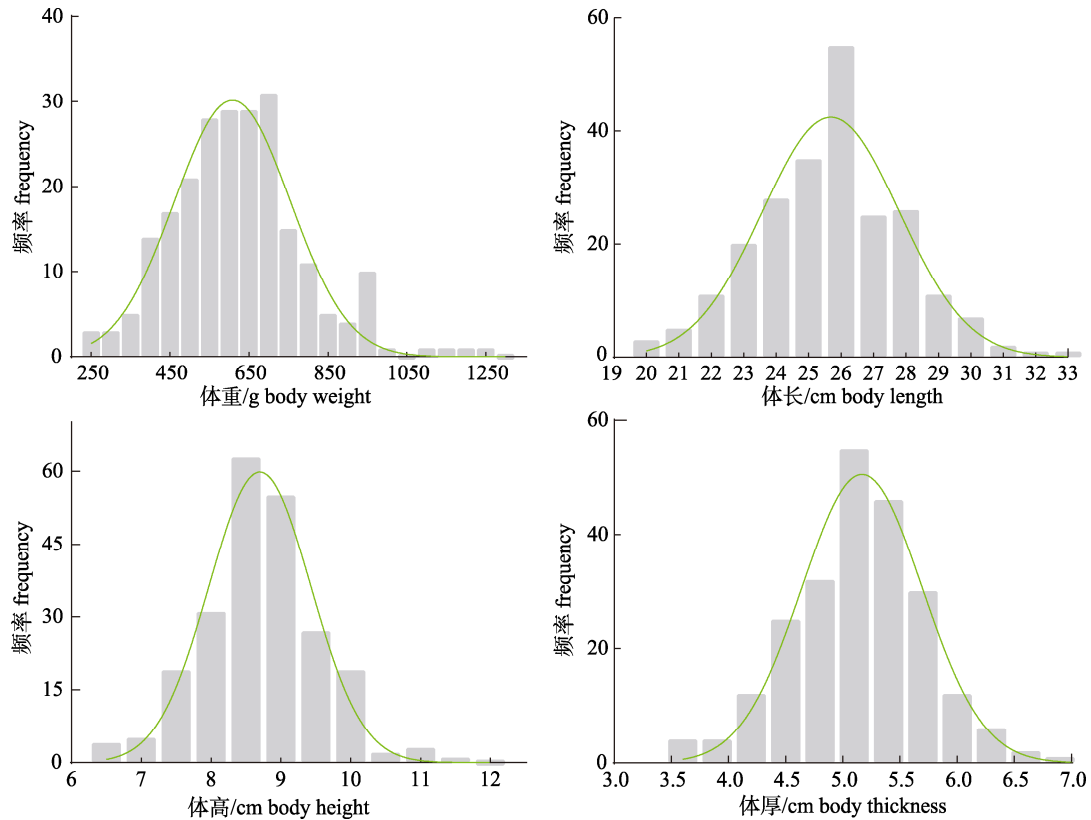


图 3 大口黑鲈 4 个生长性状的频率分布

Fig. 3 Frequency distribution of four growth traits of *Micropterus salmoides*

表 3 用于关联性分析的 230 尾大口黑鲈生长性状统计

Tab. 3 Summary of growth data for the *Micropterus salmoides* ( $n=230$ ) used for the association analysis

性状 traits	最小值 min	最大值 max	平均值±标准差 mean±SD	变异系数 CV/%
体重/g body weight	246.0	1261.0	624.5±169.8	27.2
体长/cm body length	19.8	32.7	25.6±2.3	8.8
体高/cm body height	6.1	11.4	8.7±0.8	9.7
体厚/cm body thickness	3.6	7.1	5.1±0.6	11.4

基因型、SNP19140160 的 AA 基因型、SNP23355498 的 GG 基因型、SNP33992108 的 AT 基因型、SNP48043665 的 CT 基因型、SNP9519393 的 AT 基因型和 SNP9244620 的 AA 基因型个体在体重、体长、体高和体厚 4 个性状上均为最高值。其中标记 SNP38891697 的 CC 基因型、SNP19140160 的 AA 基因型和 SNP48043665 的 CT 基因型在体重、体长、体高和体厚 4 个性状上分别与 GG 基因型、CC 基因型和 CT 基因型存在显著差异 ( $P<0.05$ )，标记 SNP23355498 的 GG 基因型和 SNP33992108 的 AT 基因型在体重、体长

和体高 3 个性状上分别与 AG 基因型和 TT 基因型存在显著差异 ( $P<0.05$ )，标记 SNP9244620 的 AA 基因型仅在体高和体厚 2 个性状上与 TT 基因型存在显著差异 ( $P<0.05$ )。标记 SNP4710104 的 CC 基因型、SNP9639603 的 GG 基因型、SNP9639605 的 AA 基因型和 SNP17586389 的 AG 基因型个体在体重、体长和体高 3 个性状上均为最高值。其中标记 SNP9639603 的 GG 基因型和 SNP9639605 的 AA 基因型仅在体长上分别与 GT 和 AT 基因型存在显著差异 ( $P<0.05$ )。标记 SNP24406191 的 CC 基因型个体在体重和体高性状上最高，且与 CT 基因型存在显著差异 ( $P<0.05$ )，在体长和体厚性状上 TT 基因型更高。

统计 12 个 SNP 标记不同基因型所对应的生长性状分布(图 4)，以标记 SNP19140160 的体重为例，具有 AA 基因型个体的体重中位线在 652 g 处，AC 基因型在 623 g 处，CC 基因型在 534 g 处，AA 基因型处在中位线上的个体较多，且群体体重极大值也在基因型 AA 上。而标记 SNP9519393

表 4 12 个 SNP 标记不同基因型与大口黑鲈生长性状的相关性分析

Tab. 4 Correlation analysis of different genotypes of the twelve SNP markers with growth traits of *Micropterus salmoides*

标记 marker	基因型 genotype	体重/g body weight	体长/cm body length	体高/cm body height	体厚/cm body thickness
SNP38891697	CC	656.52±166.58 <sup>a</sup>	25.92±2.13 <sup>a</sup>	8.87±0.78 <sup>a</sup>	5.22±0.55 <sup>a</sup>
	CG	626.04±168.83 <sup>a</sup>	25.67±2.34 <sup>a</sup>	8.72±0.83 <sup>a</sup>	5.19±0.58 <sup>a</sup>
	GG	528.86±147.07 <sup>b</sup>	24.59±2.14 <sup>b</sup>	8.20±0.87 <sup>b</sup>	4.83±0.65 <sup>b</sup>
SNP19140160	AA	651.82±175.56 <sup>a</sup>	25.87±2.29 <sup>a</sup>	8.93±0.87 <sup>a</sup>	5.23±0.59 <sup>a</sup>
	AC	622.99±163.32 <sup>a</sup>	25.64±2.29 <sup>a</sup>	8.81±0.77 <sup>a</sup>	5.16±0.55 <sup>a</sup>
	CC	534.06±136.29 <sup>b</sup>	24.67±1.79 <sup>b</sup>	8.25±0.83 <sup>b</sup>	4.83±0.61 <sup>b</sup>
SNP24406191	CC	649.62±151.45 <sup>a</sup>	26.03±2.02 <sup>a</sup>	8.81±0.73 <sup>a</sup>	5.23±0.51 <sup>a</sup>
	CT	587.52±203.86 <sup>b</sup>	24.86±2.63 <sup>b</sup>	8.56±1.04 <sup>b</sup>	5.02±0.70 <sup>b</sup>
	TT	635.75±42.50 <sup>ab</sup>	26.10±0.67 <sup>ab</sup>	8.68±0.43 <sup>ab</sup>	5.33±0.39 <sup>ab</sup>
SNP23355498	GG	646.02±167.36 <sup>a</sup>	25.94±2.15 <sup>a</sup>	8.82±0.81 <sup>a</sup>	5.20±0.57 <sup>a</sup>
	AG	595.85±172.60 <sup>b</sup>	25.16±2.30 <sup>b</sup>	8.57±0.89 <sup>b</sup>	5.07±0.62 <sup>a</sup>
	AA	625.36±150.47 <sup>ab</sup>	25.81±2.64 <sup>ab</sup>	8.63±0.60 <sup>ab</sup>	5.11±0.42 <sup>a</sup>
SNP4710104	AA	639.84±174.74 <sup>a</sup>	25.74±2.27 <sup>a</sup>	8.78±0.85 <sup>a</sup>	5.20±0.59 <sup>a</sup>
	AC	571.13±144.53 <sup>b</sup>	24.97±2.06 <sup>b</sup>	8.46±0.80 <sup>b</sup>	4.97±0.57 <sup>b</sup>
	CC	658.38±162.39 <sup>a</sup>	26.38±2.18 <sup>a</sup>	8.85±0.77 <sup>ab</sup>	5.19±0.54 <sup>ab</sup>
SNP33992108	AA	630.67±161.22 <sup>a</sup>	25.65±2.11 <sup>a</sup>	8.74±0.79 <sup>a</sup>	5.17±0.58 <sup>a</sup>
	AT	645.27±178.64 <sup>a</sup>	25.96±2.39 <sup>a</sup>	8.79±0.88 <sup>a</sup>	5.19±0.58 <sup>a</sup>
	TT	552.00±172.21 <sup>b</sup>	24.63±2.30 <sup>b</sup>	8.35±0.93 <sup>b</sup>	4.93±0.66 <sup>a</sup>
SNP48043665	CC	611.75±164.36 <sup>a</sup>	25.43±2.31 <sup>a</sup>	8.62±0.82 <sup>a</sup>	5.08±0.57 <sup>a</sup>
	CT	662.13±184.46 <sup>b</sup>	26.12±2.15 <sup>b</sup>	8.92±0.90 <sup>b</sup>	5.30±0.63 <sup>b</sup>
	TT	588.63±115.64 <sup>ab</sup>	25.21±2.25 <sup>ab</sup>	8.52±0.58 <sup>ab</sup>	5.02±0.34 <sup>ab</sup>
SNP9639603	GG	645.85±175.29 <sup>a</sup>	26.00±2.28 <sup>a</sup>	8.77±0.85 <sup>a</sup>	5.19±0.59 <sup>a</sup>
	GT	600.36±164.69 <sup>a</sup>	25.21±2.22 <sup>b</sup>	8.62±0.85 <sup>a</sup>	5.08±0.60 <sup>a</sup>
	TT	629.73±157.95 <sup>a</sup>	25.62±2.06 <sup>ab</sup>	8.75±0.78 <sup>a</sup>	5.2±0.55 <sup>a</sup>
SNP9639605	AA	645.85±175.29 <sup>a</sup>	26.00±2.28 <sup>a</sup>	8.77±0.85 <sup>a</sup>	5.19±0.59 <sup>a</sup>
	AT	600.36±164.69 <sup>a</sup>	25.21±2.22 <sup>b</sup>	8.62±0.85 <sup>a</sup>	5.08±0.60 <sup>a</sup>
	TT	629.73±157.95 <sup>a</sup>	25.62±2.06 <sup>ab</sup>	8.75±0.78 <sup>a</sup>	5.2±0.55 <sup>a</sup>
SNP9519393	AA	584.00	25.90	8.40	4.90
	AT	724.21±188.81	26.94±1.91	9.19±0.83	5.40±0.63
	TT	614.74±163.14	25.47±2.25	8.66±0.82	5.12±0.57
SNP17586389	AA	621.25±179.36 <sup>a</sup>	24.98±3.27 <sup>a</sup>	8.73±0.87 <sup>a</sup>	5.35±0.65 <sup>a</sup>
	AG	666.87±182.96 <sup>a</sup>	26.32±2.10 <sup>a</sup>	8.88±0.86 <sup>a</sup>	5.27±0.65 <sup>a</sup>
	GG	613.47±164.02 <sup>ab</sup>	25.42±2.26 <sup>ab</sup>	8.66±0.83 <sup>a</sup>	5.11±0.56 <sup>a</sup>
SNP9244620	AA	683.48±187.46 <sup>a</sup>	26.25±2.28 <sup>a</sup>	9.03±0.84 <sup>a</sup>	5.40±0.59 <sup>a</sup>
	AT	608.28±177.26 <sup>a</sup>	25.43±2.38 <sup>a</sup>	8.60±0.93 <sup>b</sup>	5.07±0.64 <sup>b</sup>
	TT	636.60±154.34 <sup>a</sup>	25.77±2.07 <sup>a</sup>	8.78±0.71 <sup>ab</sup>	5.19±0.51 <sup>ab</sup>

注: 不同小写字母表示组内差异显著( $P<0.05$ ).

Note: Different lowercase letters indicate significant differences within group ( $P<0.05$ ).

的 AA 基因型个体只有 1 尾, TT 基因型个体最多, 其体重和体长中位线分别在 614 g 和 25 cm 处。

**2.5.3 SNP 标记加性效应与优势基因型统计** 进一步统计各 SNP 标记所具备的加性效应与优势基因型, 根据加性效应计算公式[等位基因 A 加性效

应=(AA-BB)/2], A 为高表型值等位基因, B 为低表型值等位基因, AA 为 A 的纯合基因型, BB 为 B 的纯合基因型, 4 个生长性状的加性效应见图 5。与体重显著关联的 5 个 SNP 标记中, SNP38891697 和 SNP19140160 加性效应突出, 分别为 63.8 g 和

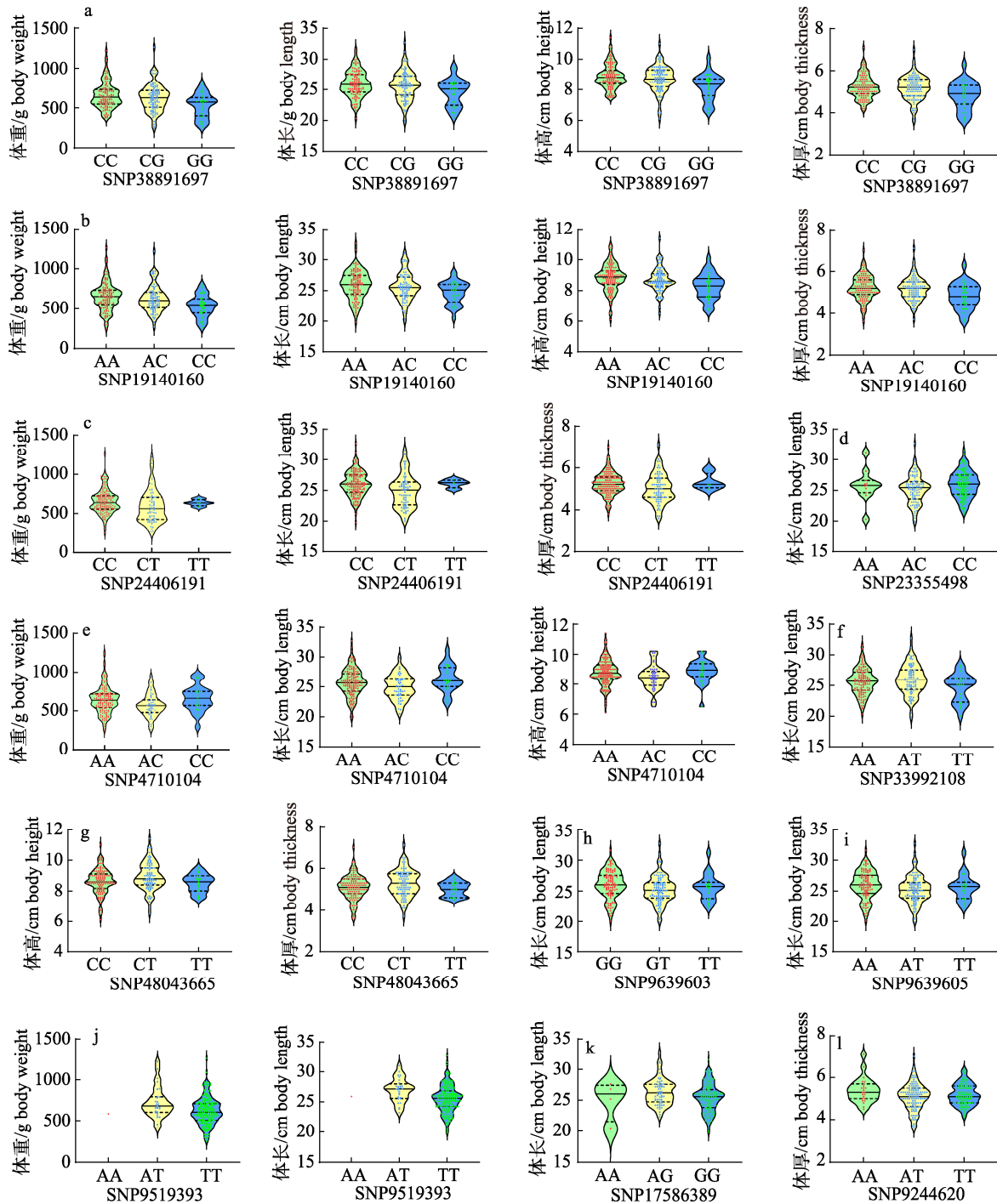


图 4 12 个 SNP 标记不同基因型对应大口黑鲈生长性状分布

- a. SNP38891697-体重, 体长, 体高, 体厚. b. SNP19140160-体重, 体长, 体高, 体厚. c. SNP24406191-体重, 体长, 体厚.  
 d. SNP23355498-体长. e. SNP4710104-体重, 体长, 体高. f. SNP33992108-体长. g. SNP48043665-体高, 体厚.  
 h. SNP9639603-体长. i. SNP9639605-体长. j. SNP9519393-体重, 体长. k. SNP17586389-体长. l. SNP9244620-体厚.

Fig. 4 Distribution of growth traits of *Micropterus salmoides* corresponding to different genotypes of the twelve SNP markers  
 a. SNP38891697-body weight, length, height, thickness. b. SNP19140160-body weight, length, height, thickness.  
 c. SNP24406191-body weight, length, thickness. d. SNP23355498-body length. e. SNP4710104-body weight, length, height.  
 f. SNP33992108-body length. g. SNP48043665-body height, body thickness. h. SNP9639603-body length. i. SNP9639605-body  
 length. j. SNP9519393-body weight, body length. k. SNP17586389-body length. l. SNP9244620-body thickness.



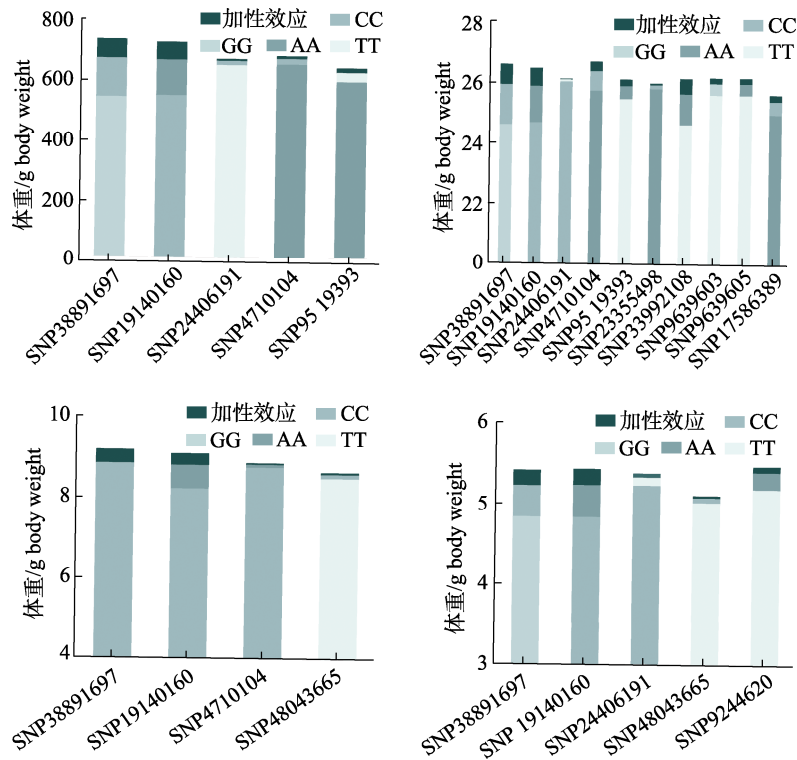


图 5 大口黑鲈 4 个生长性状对应 SNP 标记的加性效应

Fig. 5 Additive effects of SNP markers corresponding to four growth traits of *Micropterus salmoides*

58.9 g, SNP24406191 最低, 仅为 6.9 g; 与体长显著关联的 10 个 SNP 标记中, 加性效应突出的是 SNP38891697、SNP19140160、SNP4710104 和 SNP33992108, 其中 SNP38891697 的加性效应最高, 为 0.67 cm, SNP24406191 最低, 为 0.03 cm; 与体高显著关联的 4 个 SNP 标记中, 标记 SNP19140160 加性效应最高, 为 0.39 cm, SNP4710104 最低, 为

0.04 cm; 与体厚显著关联的 5 个 SNP 标记中, 标记 SNP19140160 加性效应同样最高, 为 0.20 cm, SNP48043665 最低, 为 0.03 cm。标记 SNP38891697 和 SNP19140160 在体重、体长、体高和体厚上均具有更好的加性效应, 可作为主效标记。

同时, 本研究统计了 12 个 SNP 标记的优势基因型(图 6a), 代表个体所在基因型最高的生长性

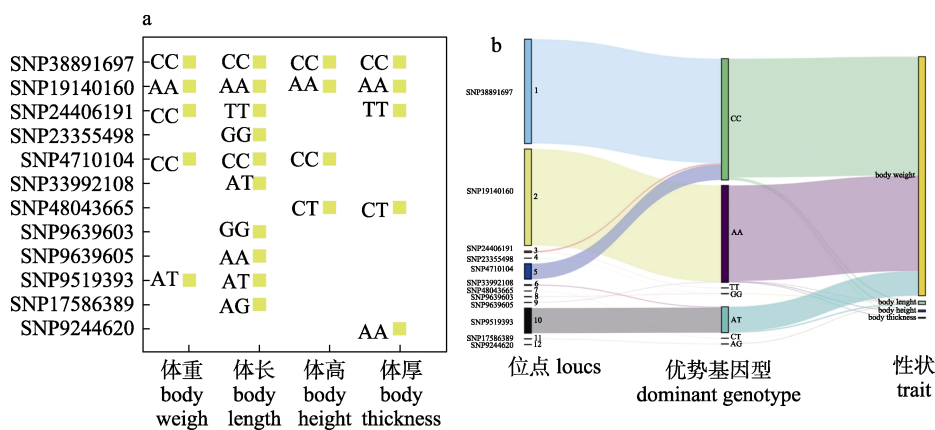


图 6 大口黑鲈 12 个 SNP 标记优势基因型及性状关联统计

a. 12 个 SNP 标记在 4 个性状上对应的优势基因型; b. 12 个 SNP 标记优势基因型加性效应与性状关联统计。

Fig. 6 Dominant genotypes and trait association statistics of 12 SNP markers of *Micropterus salmoides*  
a. Correspondence of 12 SNP markers to dominant genotypes on 4 traits. b. Additive effect of dominant genotypes of twelve SNP markers with trait association statistics.

状。其中标记 SNP24406196 体重的优势基因型为 CC 基因型, 体长和体厚的优势基因型为 TT 基因型。标记 SNP48043665 体高和体厚的优势基因型为杂合 CT 基因型, SNP9519393 体重和体长的优势基因型为杂合 AT 基因型, SNP33992108 和 SNP17586389 体长的优势基因型分别为杂合 AT 和 AG 基因型。其余 SNP 标记的优势基因型均为纯合基因型。将 SNP 标记优势基因型与所对应的生长性状加性效应进行关联性分析(图 6b), 其中标记 SNP38891687、SNP19140160、SNP9519393 和 SNP4710104 在体重上关联性更高, 体重可作为重点改良性状。

**2.6 SNP 标记优势基因型聚合效果分析**

12 个 SNP 标记优势基因型富集效果显示, 230 尾 F0 个体中最多富集 10 个优势基因型, 最少富集 0 个优势基因型, 富集 3~5 个优势基因型的个体最多, 优势基因型富集尾数分布呈“纺锤形”(图 7a)。富集优势基因型个数在富集群体上的生长性状分析结果显示(图 7b), 富集优势基因型个数越

多, 4 个性状值越高, 总体均呈上升趋势。富集 10 个优势基因型个体 4 个性状值均最高, 较只有 1 个优势基因型个体在 4 个性状上分别提升了 74.5%、20%、20.22%和 24.2%。从富集 6 个优势基因型开始, 富集效果开始大幅提升, 优势基因型聚合效果显著, 但个体比例逐渐减少。

富集不同优势基因型个数与 4 个性状相关性结果显示(图 8); 在体重上, 个体富集 6、7、10 个优势基因型均与富集 0~5 个优势基因型的个体显著差异( $P<0.05$ ); 在体长和体高上, 富集 6 个以上基因型个体中, 富集 7 个优势基因型个体均与富集 6 个以下优势基因型个体显著差异( $P<0.05$ ); 在体厚上, 富集 6 个以下优势基因型个体同样均与富集 7 个优势基因型个体显著差异( $P<0.05$ )。在 4 个性状上, 个体富集 8 个优势基因型均与只有 1 个优势基因型个体显著差异( $P<0.05$ ), 富集 6 个以上优势基因型个体与富集 5 个以下优势基因型个体的差异显著关联图大都呈对角线分布, 这与 SNP 标记优势基因型聚合效果分析结果一致。

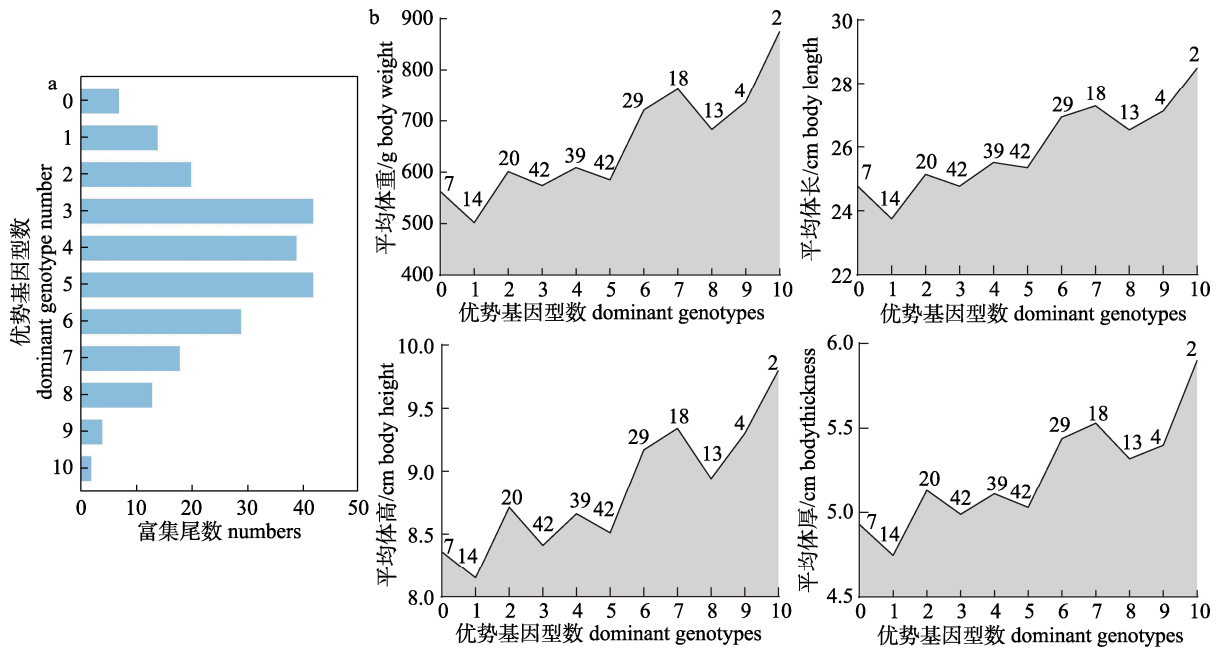


图 7 大口黑鲈优势基因型分布比较

a. 优势基因型富集尾数; b. 4 个生长性状富集优势基因型统计。

Fig. 7 Comparison of distribution of dominant genotypes of *Micropterus salmoides*

a. Dominant genotype enrichment numbers; b. Statistics of enriched dominant genotypes for four growth traits.

**2.7 生长候选基因预测**

对 12 个快长 SNP 标记进行候选基因预测(表

5)。ANNOVAR 注释结果有 8 个 SNP 标记位于内含子区, 其中标记 SNP24406191、SNP23355498 和

SNP9244620 分别注释到功能候选基因 *diaph2*、*kiaa1549lb* 和 *ppip5k1b* 上, 标记 SNP19140160 位于非翻译区, 注释到基因 *fam174b* 上, SNP4710104 位于基因 *si:ch211-146m13.3* 下游, 编码亲连接素-3; 标记 SNP17586389 位于基因

*LOC119902146* 外显子区, 而标记 SNP38891697 位于基因 *LOC119913443* 基因间区, 编码低亲和力免疫球蛋白  $\gamma$  Fc II-样, 没有注释到具体的功能基因上。标记 SNP9639603 和 SNP9639605 紧密关联, 同样位于基因 *zgc:66433* 的内含子区。

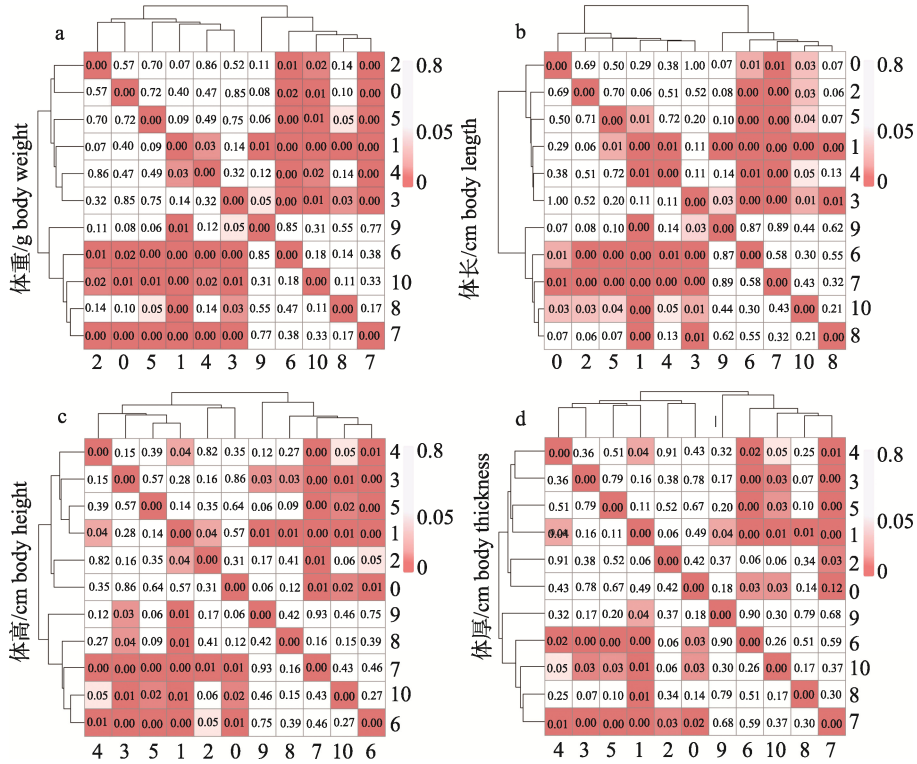


图 8 大口黑鲈富集优势基因型个数与生长性状相关性

a. 体重; b. 体长; c. 体高; d. 体厚. 相同性状富集不同优势基因型数组间存在显著差异( $P < 0.05$ ), 以不同颜色表示.

Fig. 8 Correlation between the number of enriched dominant genotypes and growth traits of *Micropterus salmoides*  
a. Body weight; b. Body length; c. Body height; d. Body thickness. Significant differences ( $P < 0.05$ ) between groups enriched for different dominant genotypes for the same trait are indicated by different colors.

表 5 大口黑鲈生长候选基因预测

Tab. 5 The detail information of growth candidate genes of *Micropterus salmoides*

标记 marker	类型 type	候选基因 candidate gene	注释 annotation
SNP38891697	基因间区 intergenic	<i>LOC119913443</i>	低亲和力免疫球蛋白 $\gamma$ Fc II-样 low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor II-like
SNP19140160	非翻译区 3'UTR	<i>fam174b</i>	序列相似家族 174 成员 B family with sequence similarity 174 member B
SNP24406191	内含子 intronic	<i>diaph2</i>	透明相关 formin 2 diaphanous-related formin 2
SNP23355498	内含子 intronic	<i>kiaa1549lb</i>	KIAA1549-样 b KIAA1549-like b
SNP4710104	下游 downstream	<i>si:ch211-146m13.3</i>	亲连接素-3 junctophilin-3
SNP33992108	内含子 intronic	<i>LOC119895006</i>	GTPase 激活蛋白 32-样 rho GTPase-activating protein 32-like
SNP48043665	内含子 intronic	<i>LOC119884402</i>	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 H1 同源物 serine/threonine-protein kinase H1 homolog
SNP9639603	内含子 intronic	<i>zgc:66433</i>	非特性 LOC119888120 uncharacterized LOC119888120
SNP9639605	内含子 intronic	<i>zgc:66433</i>	非特性 LOC119888120 uncharacterized LOC119888120
SNP9519393	内含子 intronic	<i>LOC119901824</i>	受体酪氨酸蛋白磷酸酶 mu-样 receptor-type tyrosine-protein phosphatase mu-like
SNP17586389	外显子 exonic	<i>LOC119902146</i>	胶原 $\alpha$ -1(IV)链-样 collagen alpha-1(IV) chain-like
SNP9244620	内含子 intronic	<i>ppip5k1b</i>	二磷酸肌醇五磷酸激酶 1b diphosphoinositol pentakisphosphate kinase 1b

### 3 讨论

RAD-seq 技术因其不受参考基因组有无的限制,可筛选到足够数量的分子标记,实验成本低,实验周期短,在水产动物遗传图谱构建、遗传多样性分析、物种分化等领域应用广泛<sup>[27-29]</sup>。此前有关大口黑鲈生长相关 SNP 标记的开发主要通过转录组测序获得<sup>[30]</sup>,而通过 RAD-seq 技术筛选大口黑鲈快长标记尚无应用。简化基因组测序通过在全基因组范围筛选 SNP 位点,覆盖度更高,本研究中,快长群体共检测到 2080471 个 SNP 位点,所获 SNP 数量较采用转录组测序获得大口黑鲈快长 SNP 数量更多,更有助于快长 SNP 标记的挖掘。SNP 是由生物体 DNA 序列中单个核苷酸点突变产生的多态性,这种突变可能是由单核苷酸位点的转换与颠换所导致的,转换发生在 A 与 G 或 C 与 T 之间,颠换发生在 A 与 C、A 与 T、C 与 G 和 T 与 G 之间,理论上转换与颠换发生的概率一致,而往往转换发生的概率更高。而不同物种间转换与颠换发生的概率也有差异。本研究中发现,大口黑鲈的转换与颠换的比为 1.27,低于中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)的 1.4 和鲍(*Haliotis*)的 2.33,高于马氏珠母贝(*Pinctada fucata*)的 0.5,转换发生的概率远远高于颠换,这可能与物种在进化过程中承受的选择压力有关<sup>[31-33]</sup>。

杂合度是衡量基因多态性的重要指标,本研究所筛选的 12 个与生长性状显著关联的 SNP 标记在群体中的平均观测杂合度和期望杂合度分别为 0.35 和 0.37,总体差异不大,观测杂合度低于期望杂合度表明存在杂合子缺失现象。在“优鲈 1 号”群体中检测到与生长相关 SNP 标记,部分 SNP 标记的平均观测杂合度和期望杂合度分别为 0.47 和 0.46<sup>[30]</sup>,高于本实验结果。这可能与转录组测序检测 SNP 标记数相对有限,经常表现出高杂合度有关。前期研究中,课题组采用微卫星标记和线粒体 D-loop 序列分析了美国大口黑鲈北方亚种 F0 与大口黑鲈“优鲈 1 号”、“优鲈 3 号”和台湾鲈等国内养殖群体的遗传多样性,发现与国内种群相比,原种 F0 遗传多样性水平更高且遗传结

构相对独立<sup>[34]</sup>。因此认为,大口黑鲈选育驯化后进化距离的改变可能导致杂合度变化。PIC 值为遗传纯合度的倒数,它是研究群体遗传多样性的重要参数。在本研究中,12 个 SNP 标记的平均 PIC 值为 0.29,其中标记 SNP24406191、SNP9519393 和 SNP17586389 PIC 值 $<0.25$ ,为低多态性位点,其余 9 个位点均为中度多态性位点( $0.25 < \text{PIC} < 0.5$ )<sup>[35]</sup>。此前课题组用于遗传多样性分析的 SSR 标记的 PIC 值为 0.514,在大口黑鲈“优鲈 1 号”EST-SNP 标记中的 PIC 值为 0.356<sup>[30]</sup>,均高于本研究中 12 个 SNP 标记的 PIC 值,这可能和遗传标记种类不同有关。本实验中 F0 群体主要来自 2020 年引种的 3000 尾原种扩繁后代,在后续大口黑鲈育种群体构建时,为保持较高的遗传多样性,应选择富集 PIC 值更高的 SNP 标记的亲本,减少富集低多态性位点的亲本。

体重、体长、体高、体厚等生长性状是影响大口黑鲈体型和产量的重要经济性状<sup>[36]</sup>,本研究发现 4 个生长性状均呈连续性分布,属于数量性状遗传,但 SNP 标记解释的表型变异最高,为 6.32%,没有超过 10%,缺少主效 QTL<sup>[37]</sup>。本研究采用基因组测序所获得的 SNP 分布在 23 条基因组序列上,其中 12 个 SNP 标记主要分布在 7 条基因组序列上,分布较为集中,其中序列 NW\_024044237.1 上分布的 SNP 位点最多,有 3 个。在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[38]</sup>、橙点石斑鱼<sup>[22]</sup>中生长 SNP 标记分布更为分散,这可能与不同物种的不同基因组有关。同时,与 4 个生长性状显著关联的 SNP 至少都有 4 个,最多有 10 个,表明性状会受多基因(位点)控制。同一标记也会与多性状关联,例如标记 SNP38891697 和 SNP19140160 均与体重、体长、体高和体厚关联,在草鱼<sup>[5]</sup>、鳊(*Siniperca chuatsi*)<sup>[39]</sup>、斑点鲈(*Lateolabrax maculatus*)<sup>[40]</sup>中都出现这一现象,说明在水生动物中也存在同一基因(位点)控制多性状的情况。其中标记 SNP9639605 与 SNP9639603 紧密相连,除优势基因型不同,其余在体长中的加性效应均相同,这可能是由同一基因共同控制所导致的。鱼类生长发育是极其复杂的过程,通过基因层面选择对生长性状贡献率更高的基因(位点),更有

利于生长性状的改良。本研究中发现同一 SNP 位点可与多性状关联, 同一性状也可与多 SNP 位点关联, 通过分析不同基因(位点)与性状之间的关联性, 可为大口黑鲈快长新种质创制提供参考。

本研究中挖掘到的 12 个 SNP 标记, 有 8 个位于内含子区, 在基因间区、非翻译区等均有 SNP 标记, 只有 4 个标记定位到了生长相关的候选基因, 说明对生长性状的影响会通过基因表达与基因产物共同作用。所定位到的生长基因分别为 *fam174b*、*kiaa1549lb*、*diaph2* 和 *ppip5k1b*。其中标记 SNP19140160 处于 *fam174b* 非翻译区, SNP 可能通过基因 3'UTR 参与亚细胞定位以及蛋白的翻译过程<sup>[41]</sup>。同时, 靶基因 3'UTR 的 SNP 位点可能影响 miRNA 靶向结合作用。*kiaa1549lb* 是 KIAA 基因家族的一员, KIAA 基因家族在人类基因组中涉及编码大型蛋白质, 与生物体内细胞新陈代谢功能相关<sup>[42]</sup>。在绵羊(*Ovis aries*)中位点 *kiaa2012 g. 203440537 A>G* 与体长性状显著相关, 可作为分子育种辅助标记<sup>[43]</sup>。*diaph2* 作为一种蛋白质编码基因, 在卵巢的发育过程中发挥作用, 该基因的缺陷可能导致卵巢早衰<sup>[44]</sup>。在青鳉(*Oryzias melastigma*)中, 通过缺氧诱导触发了 miRNA 失调, 其中 *diaph2* 基因参与调控生殖过程进而导致了雌性生殖障碍造成个体差异, 推测 *diaph2* 基因可能通过调节性腺发育过程, 参与生长相关功能的调控<sup>[45]</sup>。*ppip5k1b* 也是一种蛋白质编码基因, 该基因通过编码双功能肌醇激酶, 调节多种细胞过程, 包括细胞凋亡、胰岛素信号传导和中性粒细胞活化等<sup>[46]</sup>。这些生长候选基因的发现为后期大口黑鲈的基因工程育种提供了科学依据。

分子标记辅助育种通过富集具有更多快长标记优势基因型的个体, 从而实现优势生长性状的稳定遗传。在本研究的 230 尾亲本中, 富集 6 个以上优势基因型个体只有 66 尾, 占比仅为 28.7%, 但是却能在体重上提高 32.07%, 在体长、体高和体厚上提高 10%左右, 使生长性状大幅提高。同样, 在建鲤(*Cyprinus carpio* var. *jian*)中富集所有优势基因型个体较未富集个体增重约 14%<sup>[47]</sup>。在黄河鲤(*Cyprinus carpio*)中, 富集了 2 个以上优势

基因型的亲本生长性能显著提升<sup>[48]</sup>。在草鱼中, 富集 7 个优势基因型个体在体重上提高 36.3%<sup>[49]</sup>。在大口黑鲈后续 F1 选育过程中, 在关注标记贡献率更好的同时应选择富集更多优势基因型的亲本, 将更有利于遗传性状的改良。

#### 参考文献:

- [1] Administrative Department for Fisheries the Ministry for Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. 2023 China fishery statistical yearbook[M]. Beijing: China Agricultural Publishing Press, 2023. [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2023 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2023.]
- [2] Du J X, Li S J, Shao J Q, et al. Genetic diversity analysis and development of molecular markers for the identification of largemouth bass (*Micropterus salmoides* L.) based on whole-genome re-sequencing[J]. *Frontiers in Genetics*, 2022, 13: 936610.
- [3] Yi W Y, Zhang X, Zeng K, et al. Construction of a DNA vaccine and its protective effect on largemouth bass (*Micropterus salmoides*) challenged with largemouth bass virus (LMBV)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 106: 103-109.
- [4] Yue G H. Recent advances of genome mapping and marker-assisted selection in aquaculture[J]. *Fish and Fisheries*, 2014, 15(3): 376-396.
- [5] Hao Y H, Jia X W, Yuan L, et al. Genome-wide association study reveals growth-related SNPs and candidate genes in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Aquaculture*, 2023, 577: 739979.
- [6] Luo W W, Zhou Y, Wang J R, et al. Identifying candidate genes involved in the regulation of early growth using full-length transcriptome and RNA-seq analyses of frontal and parietal bones and vertebral bones in bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*)[J]. *Frontiers in Genetics*, 2021, 11: 603454.
- [7] Zhou Z X, Han K H, Wu Y D, et al. Genome-wide association study of growth and body-shape-related traits in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) using ddRAD sequencing[J]. *Marine Biotechnology*, 2019, 21(5): 655-670.
- [8] Zhu F Q, Sun H B, Jiang L M, et al. Genome-wide association study for growth-related traits in golden pompano (*Trachinotus ovatus*)[J]. *Aquaculture*, 2023, 572: 739549.
- [9] Li S J, Liu H, Bai J J, et al. Transcriptome assembly and identification of genes and SNPs associated with growth traits in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. *Genetica*, 2017, 145(2): 175-187.

- [10] Li S J, Zhou C L, Bai J J, et al. SNP detection in cathepsin B gene and analysis of its correlations with growth traits in *Micropterus salmoides*[J]. Freshwater Fisheries, 2018, 48(2): 39-42. [李胜杰, 周春龙, 白俊杰, 等. 大口黑鲈组织蛋白酶 B 基因 SNP 筛选及其与生长性状关联分析[J]. 淡水渔业, 2018, 48(2): 39-42.]
- [11] Du F F, Bai J J, Li S J, et al. Effects of SNPs in *POU1F1* promoter on growth traits in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(6): 793-800. [杜芳芳, 白俊杰, 李胜杰, 等. 大口黑鲈 *POU1F1* 启动子区域 SNPs 对生长的影响[J]. 水产学报, 2011, 35(6): 793-800.]
- [12] Li X H, Bai J J, Ye X, et al. Polymorphisms in the 5' flanking region of the insulin-like growth factor I gene are associated with growth traits in largemouth bass *Micropterus salmoides*[J]. Fisheries Science, 2009, 75(2): 351-358.
- [13] Li S J, Jing Y J, Bai J J, et al. Single nucleotide polymorphism of apolipoprotein genes and analysis of its correlation with growth traits in *Micropterus salmoides*[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2018, 26(1): 132-139. [李胜杰, 景燕娟, 白俊杰, 等. 大口黑鲈载脂蛋白基因序列单核苷酸多态性及与生长性状相关分析[J]. 农业生物技术学报, 2018, 26(1): 132-139.]
- [14] Udayantha H M V, Lee S, Liyanage D S, et al. Identification of candidate variants and genes associated with temperature tolerance in olive flounders by Genome-Wide Association Study (GWAS)[J]. Aquaculture, 2023, 576: 739858.
- [15] Song Z, Ye W, Tao Y F, et al. Transcriptome and 16S rRNA analyses reveal that hypoxic stress affects the antioxidant capacity of largemouth bass (*Micropterus salmoides*), resulting in intestinal tissue damage and structural changes in microflora[J]. Antioxidants, 2023, 12(1): 1-21.
- [16] Takahashi A, Kasagi S, Murakami N, et al. Chronic effects of light irradiated from LED on the growth performance and endocrine properties of barfin flounder *Verasper moseri*[J]. General and Comparative Endocrinology, 2016, 232: 101-108.
- [17] Hou X, Liu H, Chen X W, et al. Polymorphisms and association analysis of the myostatin gene of the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. Aquaculture, 2023, 572: 739523.
- [18] Orliac E J, Banos D T, Ojavee S E, et al. Improving GWAS discovery and genomic prediction accuracy in biobank data[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2022, 119(31): e2121279119.
- [19] Sun X, Li S J, Jiang P, et al. RNA sequencing to identify genes and SNP markers associated with growth traits in *Ctenopharyngodon idella*[J]. Journal of Fisheries of China, 2021, 45(3): 333-344. [孙雪, 李胜杰, 姜鹏, 等. 利用 RNA-Seq 技术分析草鱼生长性状相关基因和 SNP 标记[J]. 水产学报, 2021, 45(3): 333-344.]
- [20] Miao L, Li M Y, Pan N, et al. Cloning, tissue expression and SNP screening of *MSTN* gene in *Acrossocheilus fasciatus*[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2017, 25(5): 700-708. [苗亮, 李明云, 潘娜, 等. 光唇鱼 *MSTN* 基因克隆、组织表达及 SNP 位点筛查[J]. 农业生物技术学报, 2017, 25(5): 700-708.]
- [21] Omeka W K M, Liyanage D S, Lee S, et al. Genome-wide association study (GWAS) of growth traits in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Aquaculture, 2022, 555: 738257.
- [22] Ai C H, Zhu Z X, Huang D D, et al. Identification of SNPs and candidate genes associated with early growth in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) by a genome-wide association study[J]. Aquaculture, 2023, 565: 739129.
- [23] Zhou Y L, Wang Z W, Guo X F, et al. Construction of a high-density genetic linkage map and fine mapping of QTLs for growth and sex-related traits in red-tail catfish (*Hemibagrus wyckioides*)[J]. Aquaculture, 2021, 531: 735892.
- [24] Zhou X M, Kong J M, Dai X L. Correlation analysis of SNP markers loci with growth related traits of *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Journal of Southern Agriculture, 2021, 52(8): 2284-2293. [周晓敏, 孔嘉明, 戴习林. SNP 标记位点与罗氏沼虾生长性状的相关分析[J]. 南方农业学报, 2021, 52(8): 2284-2293.]
- [25] Zhang Z W, Lin Z J, Wei M L, et al. Development of single nucleotide polymorphism and association analysis with growth traits for black porgy (*Acanthopagrus schlegelii*)[J]. Genes, 2022, 13(11): 1992.
- [26] Zhu P Y, He L Y, Li Y Q, et al. Correction: OTG-snp caller: An optimized pipeline based on TMAP and GATK for SNP calling from ion torrent data[J]. PLoS ONE, 2015, 10(9): e0138824.
- [27] Chen X M, Li J K, Wang Z Y, et al. Genome-wide association study of thermal tolerance in large yellow croaker *Larimichthys crocea* based on slaf-seq technology[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2017, 41(4): 735-740. [陈小明, 李佳凯, 王志勇, 等. 基于简化基因组测序的大黄鱼耐高温性状全基因组关联分析[J]. 水生生物学报, 2017, 41(4): 735-740.]
- [28] Wang X H, Chang X Q, Cheng F P, et al. Population genetic diversity of three dominant fishes in the Sanmen Bay area based on 2b-RAD simplified genome sequencing[J]. Marine Fisheries, 2021, 43(5): 513-520. [王星火, 常雪晴, 程方平, 等. 基于 2b-RAD 简化基因组测序的三门湾海域 3 种优势鱼类群体遗传多样性分析[J]. 海洋渔业, 2021, 43(5): 513-520.]
- [29] Chen Y F, Jiang Q F, Cai Z Y, et al. Research progress on the reduced-representation genome sequencing in livestock

- and poultry applications[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2022(21): 35-40, 136-137. [陈亚飞, 蒋秋菲, 蔡正云, 等. 简化基因组测序在畜禽应用中的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2022(21): 35-40, 136-137.]
- [30] Li S J, Bai J J, Zhao L, et al. Development of EST-SNPs in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) and analysis of their correlation with growth traits[J]. Marine Fisheries, 2018, 40(1): 38-46. [李胜杰, 白俊杰, 赵莹, 等. 大口黑鲈 EST-SNP 标记开发及其与生长性状的相关性分析[J]. 海洋渔业, 2018, 40(1): 38-46.]
- [31] Wang F J, Meng X H, Fu Q, et al. Analysis of genetic diversity in three generations of breeding populations of *Fenneropenaeus chinensis* based on reduced-representation genome sequencing[J]. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(4): 68-76. [王凤娇, 孟宪红, 傅强, 等. 基于简化基因组测序的中国明对虾 3 个选育世代遗传多样性分析[J]. 渔业科学进展, 2020, 41(4): 68-76.]
- [32] Wang Z L, Ding Y, Xu Y H, et al. SNP discovery and functional annotation in transcriptome datasets from hemocytes of *Pinctada fucata*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2018, 49(2): 403-412. [王忠良, 丁熹, 许允厚, 等. 马氏珠母贝(*Pinctada fucata*)血细胞转录组测序数据中 SNP 标记的开发及其功能注释分析[J]. 海洋与湖沼, 2018, 49(2): 403-412.]
- [33] Wang L X, Ke C H, Wang Z Y, et al. Sequence analysis of mitochondrial 16S rRNA gene and molecular phylogeny of eight species of abalones in genus *Haliotis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(2): 167-173. [王鹭骁, 柯才焕, 王志勇, 等. 中国沿岸几种鲍线粒体 16S rRNA 基因片段序列比较及鲍属系统发育[J]. 中国水产科学, 2006, 13(2): 167-173.]
- [34] Zhang D, Qiang J, Fu J J, et al. Genetic analysis of five stocks of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) with microsatellite and mitochondrial D-loop sequences[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2022, 29(9): 1277-1289. [张帝, 强俊, 傅建军, 等. 基于微卫星标记和线粒体 D-loop 序列的 5 个大口黑鲈群体遗传变异分析[J]. 中国水产科学, 2022, 29(9): 1277-1289.]
- [35] Fu J J, Gong Y T, Zhu W B, et al. Multiplex PCR sets of microsatellites and their application in genetic analyses three populations of largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2023, 47(9): 1514-1522. [傅建军, 龚雅婷, 朱文彬, 等. 大口黑鲈微卫星多重 PCR 体系及 3 个群体的遗传分析[J]. 水生生物学报, 2023, 47(9): 1514-1522.]
- [36] Wang Q C, Tao Y F, Li Y, et al. Effects of morphological traits on body weight and fillet yield of largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2023, 30(5): 617-629. [王庆春, 陶易凡, 李岩, 等. 不同大口黑鲈群体形态性状与体重和出肉率的相关性及通径分析[J]. 中国水产科学, 2023, 30(5): 617-629.]
- [37] Li T, Dong Y, Zhang J, et al. Genome-wide association study of ear related traits in maize hybrids[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2022, 55(13): 2485-2499. [李婷, 董远, 张君, 等. 玉米杂交种穗部性状的全基因组关联分析[J]. 中国农业科学, 2022, 55(13): 2485-2499.]
- [38] Salem M, Vallejo R L, Leeds T D, et al. RNA-Seq identifies SNP markers for growth traits in rainbow trout[J]. PLoS ONE, 2012, 7(5): e36264.
- [39] Zhou Y, Fu H C, Wang Y Y, et al. Genome-wide association study reveals growth-related SNPs and candidate genes in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)[J]. Aquaculture, 2022, 550: 737879.
- [40] Zhang C, Wen H S, Zhang Y H, et al. First genome-wide association study and genomic prediction for growth traits in spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*) using whole-genome resequencing[J]. Aquaculture, 2023, 566: 739194.
- [41] Hoshida H, Kondo M, Kobayashi T, et al. 5'-UTR introns enhance protein expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(1): 241-251.
- [42] Nakayama M, Iida M, Koseki H, et al. A gene-targeting approach for functional characterization of KIAA genes encoding extremely large proteins[J]. FASEB Journal, 2006, 20(10): 1718-1720.
- [43] Guo S W, Chu M X, Liu Y F. Polymorphisms, carcass quality trait association and bioinformatics analyses of the KIAA2012 and UTP20 genes in sheep[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2022, 54(3): 1-10. [郭思武, 储明星, 刘玉芳. 绵羊 KIAA2012 与 UTP20 多态、胴体品质性状关联与生物信息学分析[J]. 畜牧与兽医, 2022, 54(3): 1-10.]
- [44] Chang A L S, Atzmon G, Bergman A, et al. Identification of genes promoting skin youthfulness by genome-wide association study[J]. Journal of Investigative Dermatology, 2014, 134(3): 651-657.
- [45] Lai K P, Leung C C T, Boncan D A T, et al. Hypoxia-induced epigenetic transgenerational miRNAs dysregulation involved in reproductive impairment of ovary[J]. Chemo-Biological Interactions, 2022, 367: 110176.
- [46] Gu C F, Liu J, Liu X J, et al. Metabolic supervision by PPIP5K, an inositol pyrophosphate kinase/phosphatase, controls proliferation of the HCT116 tumor cell line[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2021, 118(10): e2020187118.
- [47] Li H X, Li J L, Tang Y K, et al. Correlation analysis between

- body weight gain and ODC1 genotypes in *Cyprinus carpio* var. jian[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(3): 414-421. [李红霞, 李健林, 唐永凯, 等. 建鲤 ODC1 基因型与增重的相关性分析[J]. *水生生物学报*, 2014, 38(3): 414-421.]
- [48] Zhang C F, Su S Y, Zhu J, et al. Candidate parents selection containing multiple genotypes with higher performance and correlated molecular markers' genetic effects analysis[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, 41(1): 79-85. [张成锋, 苏胜彦, 朱健, 等. 富集优势基因型的后备亲本筛选以及相关分子标记的遗传效应分析[J]. *水生生物学报*, 2017, 41(1): 79-85.]
- [49] Sun X, Li S J, Du J X, et al. The effects of pyramiding growth-related genotypes in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(5): 40-46. [孙雪, 李胜杰, 杜金星, 等. 草鱼生长相关优势基因型的聚合效果分析[J]. *渔业科学进展*, 2021, 42(5): 40-46.]

## Development of fast-growth SNP screening and association analysis with growth traits based on RAD-seq for largemouth bass (*Micropterus salmoides*) breeding populations

HUA Jixiang<sup>1,2</sup>, TAO Yifan<sup>2</sup>, LI Yan<sup>1,2</sup>, WANG Qingchun<sup>1</sup>, CHEN Wenhua<sup>3</sup>, ZHUGE Yan<sup>3</sup>, ZHANG Maoyou<sup>3</sup>, DONG Yalun<sup>2</sup>, LU Siqi<sup>2</sup>, JIANG Bingjie<sup>2</sup>, QIANG Jun<sup>1,2</sup>

1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;
2. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;
3. Suzhou Aquatic Technology Extension Station, Suzhou 215004, China

**Abstract:** Growth traits in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) are crucial indicators of quality and yield. The development of growth single nucleotide polymorphism (SNP) markers and exploration of dominant genotypes and growth genes will enhance our understanding of the genetic mechanisms underlying growth and development. Moreover, this research will facilitate the selection and breeding of new populations with exceptional growth traits. Using restriction site-associated DNA sequencing (RAD-seq), we conducted SNP screening in the F0 generation of the northern subspecies of largemouth bass, focusing on extreme groups with very high body weights (top 1%) and very low body weights (bottom 1%). A general linear model (GLM) was applied to establish correlations between the SNP genotypes and four growth traits (body weight, body length, body height, and body thickness) in a cohort of 230 F0 individuals. Additionally, candidate genes associated with growth were predicted using gene annotation information, and the combined additive effects of the dominant genotypes were analyzed through examination of their aggregation. A total of 4196486 high-quality SNPs were identified across 23 chromosomes of the largemouth bass. Using a population-specific genotype frequency threshold of 0.7, we initially screened 100 potential SNP loci related to growth and identified 12 that were significantly associated with growth. Specifically, five SNPs were significantly associated with body weight, 10 SNPs were significantly associated with body length, four SNPs were significantly associated with body height, and five SNPs were significantly associated with body thickness. Notably, the candidate growth genes *fam174b*, *diaph2*, *kiaa1549lb*, and *ppip5k1b* were linked to specific SNP markers including SNP19140160, SNP24406191, SNP3355498, and SNP9244620, respectively. The enrichment of 6–10 dominant genotypes resulted in an average increase of 32.07% in body weight, 9.63% in body length, 9.96% in body height, and 10.58% in body thickness compared to the enrichment of 0–5 dominant genotypes, significantly improving the effect of genotype enrichment. The 12 fast-growth SNP markers and four candidate growth genes identified in this study could assist in the improvement of growth traits in largemouth bass.

**Key words:** *Micropterus salmoides*; RAD-seq; SNP; growth traits; dominant genotypes

**Corresponding author:** QIANG Jun. E-mail: qiangj@ffrc.cn