

大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)抗鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)性状的微卫星分子标记研究*

郭建丽¹ 田岳强^{1,3} 马爱军¹ 黄智慧¹ 商晓梅¹
王新安¹ 杨志² 曲江波²

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室 青岛 266071; 2. 烟台开发区天源水产有限公司 烟台 264003; 3. 上海海洋大学 上海 201306)

摘要 采用微卫星分子标记技术分析验证了 133 对微卫星分子标记, 以期为大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)育种提供合适的抗鳃弧菌分子标记。实验鱼经鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)感染, 分为非抗病组与抗病组。对两组鱼 PCR 扩增出的差异条带进行个体统计, 再进行微卫星位点与抗鳃弧菌的相关性分析, 并分析对比了两组鱼的遗传多样性。结果表明, 微卫星位点 Sma-USC108、Sma-USC141 的等位基因片段分别在 215bp 和 200bp 与抗鳃弧菌性状的正相关性极显著, 相关系数分别达到 0.363 和 0.407($P < 0.01$); 微卫星位点 FF0911、Sma-USC62、Sma-USC279 的等位基因片段分别在 189bp、163bp 和 236bp 与抗鳃弧菌性状的负相关性极显著, 相关系数分别达到-0.377、-0.364 和-0.363 ($P < 0.01$)。经过二次验证, 最终确定 Sma-USC141 和 FF0911 两个微卫星位点可指导大菱鲂抗鳃弧菌的辅助育种。两组大菱鲂的群体遗传多样性分析对比表明: 抗病群体与非抗病群体的遗传变异水平较低, 两个群体的遗传多样性水平相当。

关键词 大菱鲂; 微卫星标记; 鳃弧菌; 遗传多样性

中图分类号 Q953 **doi:** 10.11693/hyhz20140700196

大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)为原产于欧洲大西洋东北部沿海的底栖鱼类, 1992 年中国水产科学研究院黄海水产研究所率先将其引入我国(雷霆霖等, 2002), 20 年多来逐渐成为我国北方沿海工厂化养殖业的主导品种之一。弧菌病是养殖大菱鲂的主要细菌性疾病之一, 该病多由鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)感染所致(Novoa *et al.*, 1992; 张正等, 2004b; 邹玉霞等, 2004), 是现阶段制约我国大菱鲂养殖业可持续发展的一大瓶颈(张正等, 2004a)。因此, 培育抗病、优质的养殖品种, 提高大菱鲂养殖群体的天然抗病力已成为当务之急(陈松林, 2004)。

微卫星因其简易高效安全、稳定性好、多态性丰富、共显性遗传等特点(瞿陆峰等, 2010), 已经被广泛

应用于鱼类重要性状的标记及连锁图谱的构建等领域。例如, 刘福平等(2010)发现了对尼罗罗非鱼生长性状有显著效应的微卫星位点, 李三磊等(2012)微卫星技术筛选褐牙鲈耐热相关的分子标记并分析其群体的遗传多样性, Rodriguez 等(2004)筛选出与虹鳟抗 IHNV(传染性造血器官坏死病毒)相关的微卫星标记, Carmen 等(2007)利用微卫星构建了大菱鲂遗传连锁图谱。但有关大菱鲂抗鳃弧菌性状的分子标记研究国内外还鲜有报道, 本研究采用微卫星标记技术, 利用 133 对微卫星引物对本实验室 2011 年构建的家系进行筛选, 试图寻找与大菱鲂抗鳃弧菌显著相关的微卫星标记, 以期为大菱鲂抗鳃弧菌的辅助育种提供参考。

* 现代农业产业技术体系建设专项资金资助, CARS-50-G01 号。郭建丽, 硕士, E-mail: jianli279321233@126.com; 同等贡献第一作者: 田岳强, 硕士生, E-mail: tyqiang1988@163.com

通讯作者: 马爱军, 博士, 研究员, 博士生导师, E-mail: maaj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-07-03, 收修改稿日期: 2014-08-15

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 试验用鱼 所用大菱鲂为本研究团队于2011年10月构建的大菱鲂9月龄家系。随机从各家系中挑取210尾大菱鲂幼鱼[体重133.5—225.2g, 体重均值(164.7796 ± 24.9819)g, 均值 ± 标准差]养殖于直径110cm、高68cm的圆柱形玻璃钢桶内, 每桶35尾, 养殖桶的海水高度控制在50cm, 利用循环流水进行养殖, 养殖用海水为过滤深井海水。暂养14天。

1.1.2 鳎弧菌 攻毒实验所用的鳎弧菌为本实验室保存并经过鉴定的鳎弧菌菌株。菌株接种于灭菌的TSB培养基(TSB 30g, NaCl 15g, 蒸馏水1000mL溶解), 28°C, 200r/min培养约24h, 测定OD₆₀₀值, 并用0.9%生理盐水稀释至已测定的半致死浓度, 即将菌液稀释至10⁶ cfu/ml, 用于攻毒实验。

1.2 微卫星引物

本研究涉及的微卫星引物, 根据文献(Carmen *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2007; 顾颖等, 2009; 侯仕营, 2010)设计, 由上海生工公司合成, 列举其中主要30个, 见表1。

表1 30个微卫星引物序列
Tab.1 Primer sequences of 30 microsatellite loci

位点	核心序列	引物序列(5'—3')	退火温度(°C)	GenBank 登录号
FF0903	(CA) ₇	F: TCTGCCTGTTGAGTGTTTGC R: GCAGGGATGATGCTCGTT	59	GU433231
FF0911	(CA) ₈	F: TGAACGGTTACCAAGACAGG R: ACAAACAGCCCATCACAGG	60	GU433239
FF0921	(TG) ₈	F: TAGGTGGTTGCGATGAGTGC R: AACCATTCCGCTGACCTCC	59	GU433249
Sma-USC13	(GT) ₂₃	F: CATTGTGGCACTTTTAG R: CTTTCTGTCAGTCTCATCC	50	DQ470750
Sma-USC42	(CA) ₂₄	F: GCCCCTGATTTTAGATAGTAA R: TGCTGAACAAGATGATGGAT	54	DQ810842
Sma-USC59	(GT) ₂₄	F: GCCTCCATCTCAACAGC R: CTGTCTGGGAAGAGAATATG	54	DQ810859
Sma-USC60	(GT) ₁₆	F: CTCAGTGTGAGCAGCAAGG R: CTCCACCCAGACACACACAC	60	DQ810860
Sma-USC62	(AC) ₁₂ (TC) ₁₉ (AC) ₉	F: AGTTCGGGCTCCAGTTCAC R: GTGGTGGTTGAGTGTGTTCCG	56	DQ810862
Sma-USC63	(CA) ₁₁	F: GAGAAACAACATTCACACCC R: TTGAGGCAAATATAGAGAACC	56	DQ810863
Sma-USC102	(TGTA) ₁₀	F: ATGACCACACGCACCACT R: CTGACAAGCAATAGGAAACAG	52	DQ810902
Sma-USC108	(CATA) ₁₄	F: TAACCCTGAGGAGGAGCAT R: TTACACATAATGAGGCTGAATG	55	DQ810908
Sma-USC109	(CTAT) ₇	F: CCGTCATTGGTAGAATCGT R: GGCATCATTGGGTCTTTAT	55	DQ810909
Sma-USC138	(CA) ₁₆	F: TGGGAGGAATCTGCTACGAT R: CTCACCTTACCAGGCATGA	55	DQ810938
Sma-USC141	(GT) ₁₃	F: CTAGATGGCACTGGAGACC R: CAGATGTTGACGCAGACG	54	No data
Sma-USC142	(AC) ₃₇	F: CCGCTGTCATTGTATCAG R: TGCTAGTCTGTCCCATCA	56	DQ810942
Sma-USC146	(TG) ₁₇	F: TTCATTGGAATATCAATCACGT R: CCTGGAGACGAGAAAAATTACT	56	DQ810946

续表

位点	核心序列	引物序列(5'—3')	退火温度(°C)	GenBank 登录号
Sma-USC147	(CA) ₂₂	F: CACAAGCACTGGGTCACAATG R: ATGGCTTGTGGGGTATTTAGA	56	DQ810947
Sma-USC148	(GT) ₁₈	F: AGCTGTGTTTTCCCTGGTG R: CCTGTCACCTGTGTCGGCAG	58	DQ810948
Sma-USC149	(TC) ₆ (AC) ₁₉	F: GGGATTACTGCTCGCTCAGA R: CGCTCAGTTGATGGAAAGTGT	56	DQ810949
Sma-USC200	(AC) ₁₈	F: CTATGTAGGGAAGAGGTATTT R: CAAGGCACCAACAACT	52	DQ811000
Sma-USC271	(AC) ₂₃	F: AGTCAGAGCTGGTGGAGTGG R: AGCGTAACTCGTGTGCTGAA	58	DQ811071
Sma-USC279	(ACACT) ₉	F: TGTGTTTCTATGTCTCTCTGT R: CTGGATGAATATGGGCATCG	50	DQ811079
Sma-USC281	(AC) ₃₅	F: GCACGCACGCTCAACTTT R: GCTATTCTTCTGAACACTGCAA	55	DQ811081
Sma-USC284	(GT) ₂₃	F: GTTCTTTTCCAGTTTTTCAAT R: TCTTTTCACCTCTCTTTTCTC	52	DQ811084
Sma1-125INRA	(TAGA) ₁₁ -(TG) ₄	F: CACACCTGACAAAGCTCAAC R: GCTGAACATTTTCATGTTGATAG	55	No data
B11-I 12/6/3	(CA) ₁₂ CG(CA) ₆ CG(CA) ₃	F: GTTGTACTGCTGATCTAGC R: ATGTTCCATCTCATTCTGTC	55	AF182080
F1-OCA19	(CA) ₁₉	F: AGTTACACCAGTGCACAGAG R: CCAGGCCATCCACATTTAAC	56	AF182084
HLJDLP50	(GT) ₃₅	F: GACGATCAGTTTGGGTCCAT R: TGCTCAATTTTGACCCAGTG	51	FJ015051
SmaC05	(GT) ₁₁	F: TTCGAATTCACCAAGTGTC R: GTCAGCCATCATCTCCACCT	56	DQ454101
SmaC09	(TC) ₁₅ TA(TC) ₂	F: CGACCCGCCACTACAGGAT R: AGCGACAGCAACGCACCAAG	57	DQ659638

1.3 实验方法

1.3.1 攻毒实验及取样 按文献方法(陈松林等, 2008)进行攻毒实验: 实验组大菱鲂幼鱼腹腔注射 1 μ L/g 经过稀释的鳃弧菌菌液, 同时设置一个腹腔注射 1 μ L/g 0.9%生理盐水的对照组。实验持续 14d, 每 12h 统计一次死亡数目, 及时捞出死亡个体并记录死亡时间, -20°C 保存。攻毒实验注射鳃弧菌的实验鱼为 175 尾, 攻毒实验结束后, 存活 116 尾, 存活率为 66.29%。随机选取生活状态良好的 30 个个体作为抗病组 R, 依据死亡先后顺序取各家系早期死亡且确定为鳃弧菌感染致死的 30 个个体作为非抗病组 S, -20°C 保存。

1.3.2 基因组 DNA 的提取及检测 采用天根生化科技(北京)有限公司的海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒对大菱鲂 R 组和 S 组各 30 个个体尾鳍的 DNA 进行提取, 用灭菌水稀释浓度至 50ng/ μ L, 保

存于-20°C。

1.3.3 BSA (Bulked Segregant Analysis)分池及基因池的 PCR 扩增 从 R 组和 S 组分别随机取 DNA 20 个, 每个取 10 μ L DNA 溶液混合构成相应的 R 池和 S 池。以 133 对引物分别对两个基因池 DNA 进行 PCR 扩增, 以寻找差异条带。PCR 反应体系为 25 μ L, 依据文献(许可等, 2009)略有调整: 50ng 模板 DNA, 10mmol/L 的上下游引物各 1 μ L, 2.5mmol/L dNTPs 2 μ L, 10 \times Taq buffer 2.5 μ L, 1U 的 Taq DNA 聚合酶。PCR 扩增反应条件: 94°C 预变性 4 min; 94°C 变性 30 s, 退火 50 s (退火温度见表 1), 72°C 延伸 50 s, 共 35 个循环; 72°C 延伸 10 min (孙效文等, 2000)。PCR 扩增反应产物变性后进行 8%的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 而后采用快速银染法染色(侯仕营等, 2011)。记录带型, 分析电泳结果。

1.3.4 大菱鲂个体 DNA 的微卫星 PCR 扩增 通

过分析基因池 DNA 的 PCR 扩增情况,初步挑选出能扩增出差异等位基因片段的微卫星位点,用其相应的引物,对 R、S 两组大菱鲂 60 个个体进行 PCR 扩增。

1.3.5 差异条带分析 利用 BANDSCAN 软件对扩增后的结果进行分析,获得差异条带的分布情况、碱基数以及泳动位置。使用 SPSS 16.0 软件对微卫星位点所扩增出的差异等位基因片段的数目与大菱鲂抗鳗弧菌性状的相关性进行皮尔逊检验(Pearson correlation)。利用 Popgene32 软件分析扩增条带多态性,所涉及公式如下:

有效等位基因数: $N_e = 1 / \sum P_i$, P_i 为该位点上第 i 个等位基因的频率;

多态位点杂合度(观测值): $H_o = \text{杂合子观察数} / \text{观察个体总数}$;

多态位点杂合度(期望值): $H_e = 1 - \sum P_i^2$, P_i 为该位点上第 i 个等位基因的频率;

多态信息含量 PIC (Polymorphism Information Content):

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^m P_i^2 - \sum_{i=1}^{m-1} \sum_{j=i+1}^m 2P_i P_j$$

式中, P_i 、 P_j 分别为群体中第 i 个和第 j 个等位基因频

率, m 为等位基因数。

1.3.6 差异条带的测序 切胶回收,采用与该引物 PCR 扩增反应相同的 PCR 程序和体系进行二次 PCR。将二次 PCR 的产物送去南方基因中心测序。测序结果通过数据库 BLAST 比对,以验证差异片段是否为相应微卫星位点的序列。

1.3.7 与抗鳗弧菌极显著相关的微卫星位点的二次验证 从攻毒实验剩余的存活个体中随机选取 30 尾大菱鲂作为实验样本,对与抗鳗弧菌极显著相关的微卫星位点进行 SSR-PCR 扩增,统计出现相应的特异性条带的样本数并计算其出现的概率,作为二次验证,以确保候选标记的准确性。

2 实验结果

2.1 BSA 分池的 PCR 扩增结果分析

记录 R 池和 S 池 PCR 扩增带谱上等位基因片段存在明显差异的微卫星引物。使用 BANDSCAN 软件计算差异条带的碱基数,见表 2。在两个群体中出现差异条带的引物有 10 对,分别为 FF0911、Sma-USC42、Sma-USC62、Sma-USC108、Sma-USC141、Sma-USC147、Sma-USC149、Sma-USC279、Sma1-125INRA、SmaC05,部分扩增结果见图 1。

表 2 BSA 分池的 PCR 扩增差异条带统计
Tab.2 Statistics of different banding patterns of BSA analysis

微卫星位点	FF0911	Sma-USC42	Sma-USC62	Sma-USC108	Sma-USC141
差异片段大小(bp)	189	322	163	215	160
出现基因池	S	R	S	R	R
微卫星位点	Sma-USC147	Sma-USC149	Sma-USC279	Sma1-125INRA	SmaC05
差异片段大小(bp)	160	186	236	110	150
出现基因池	S	S	S	S	S

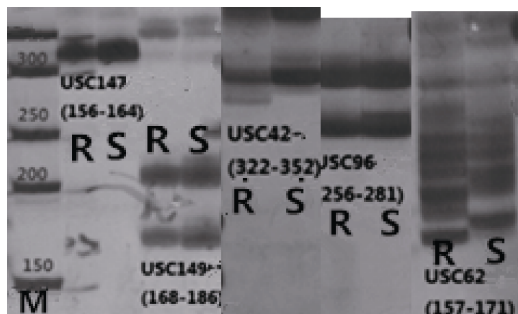


图 1 部分微卫星位点的 BSA 分析差异带型图
Fig.1 Banding patterns of BSA analysis for some microsatellite loci
M. 50bp 分子标记; R. 抗鳗弧菌组; S. 非抗鳗弧菌组

2.2 差异等位基因片段在大菱鲂个体中的验证及分析

将 BSA 基因池中筛选到的 10 对引物在抗性组和非抗性组的各 30 个个体中分别进行 PCR 扩增,通过 8% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,分析各位点差异等位基因片段在两个组不同个体间的扩增情况,统计结果见表 3。

以表 3 的微卫星位点 FF0911 为例,在其扩增出的差异等位基因片段(189bp)位置, R 组 30 个个体中共有 5 个扩增出该片段(17.24%),而 S 组 30 个个体中有 16 个扩增出该片段(52.33%)。差异等位基因片段

表 3 差异等位基因片段在个体扩增带型中的出现次数统计
Tab.3 Statistic of differential bands of individual's banding patterns

微卫星位点	FF0911	Sma-USC42	Sma-USC62	Sma-USC108	Sma-USC141
差异片段大小(bp)	189	322	163	215	160
R 组(阳性/总数)	5/29	5/30	4/30	7/30	14/30
出现率	17.24%	16.67%	13.33%	23.33%	46.67%
S 组(阳性/总数)	16/30	1/30	14/30	0/30	3/30
出现率	52.33%	3.33%	46.67%	0	10%
微卫星位点	Sma-USC147	Sma-USC149	Sma-USC279	Sma1-125INRA	SmaC05
差异片段大小(bp)	160	186	236	110	150
R 组(阳性/总数)	0/30	1/30	0/30	8/30	5/30
出现率	0	3.33%	0	26.67%	16.67%
S 组(阳性/总数)	4/30	8/30	7/30	16/30	14/30
出现率	13.33%	26.67%	23.33%	52.33%	46.67%

在 S 组个体的扩增图谱中出现的频率较高, 而在 R 组的个体中出现的频率极低。图 2 是微卫星位点 FF0911 在两个组的大菱鲂个体 DNA 中的扩增带谱。该微卫星位点在 R 组和 S 组个体中的带型差异较为显著, 此结果与 BSA 分析的结果相吻合。由此可见该位点的这个等位基因片段对大菱鲂抗鳃弧菌性状具有较明显的偏好性, 该微卫星位点可能与某些调控免疫的基因存在一定的连锁关系。

根据表 3 的结果, 使用 SPSS16.0 软件对以上 10 个微卫星位点的差异等位基因片段与抗鳃弧菌性状进行相关性分析, 研究结果表明: 微卫星位点 Sma-USC108、Sma-USC141 的等位基因片段分别在 215bp

和 200bp 与抗鳃弧菌性状的正相关性极显著, 相关系数分别达到 0.363 和 0.407 ($P<0.01$); 有 7 个微卫星位点 FF0911、Sma-USC62、Sma-USC147、Sma-USC149、Sma-USC279、Sma1-125INRA、SmaC05 的等位基因片段分别在 189bp、163bp、160bp、186bp、236bp、110bp 和 150bp 与抗鳃弧菌性状存在一定的负相关性, 其中 FF0911、Sma-USC62、Sma-USC279 的等位基因片段分别在 189bp、163bp、和 236bp 与抗鳃弧菌性状的负相关性极显著, 相关系数分别达到 -0.377 、 -0.364 和 -0.363 ($P<0.01$), 其余 4 个微卫星位点为显著性相关($P<0.05$); Sma-USC42 322bp 的等位基因片段与抗鳃弧菌性状的相关性不显著(表 4)。

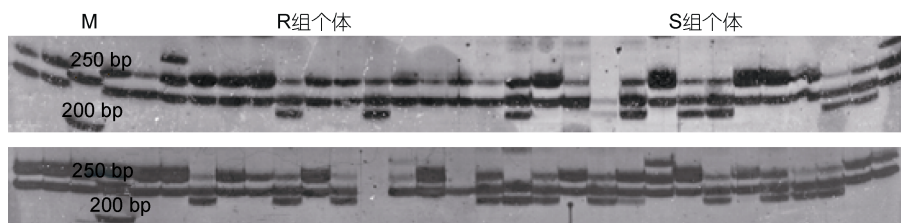


图 2 微卫星位点 FF0911 在大菱鲂个体 PCR 扩增中的带谱

Fig.2 Banding pattern of microsatellite locus FF0911 of individuals

M. 分子量标准; R. 抗性组; S. 非抗性组

表 4 微卫星位点与大菱鲂抗病性状的相关性分析

Tab.4 Correlation between microsatellite loci and the resistance trait of *S. maximus*

微卫星位点	FF0911	Sma-USC42	Sma-USC62	Sma-USC108	Sma-USC141
Sig.(2-tailed)	0.03	0.088	0.004	0.004	0.001
泊松相关系数	-0.377	0.222	-0.364	0.363	0.407
相关性	**		**	**	**
微卫星位点	Sma-USC147	Sma-USC149	Sma-USC279	Sma1-125INRA	SmaC05
Sig.(2-tailed)	0.039	0.011	0.004	0.035	0.012
泊松相关系数	-0.267	-0.327	-0.363	-0.272	-0.322
相关性	*	*	**	*	*

* 表示显著相关($P<0.05$), **表示极显著相关($P<0.01$)

2.3 与抗鳃弧菌性状极显著相关的微卫星引物的验证

从攻毒实验剩余的存活个体中再次随机选取 30 尾大菱鲂作为实验样本, 对 5 对与抗鳃弧菌性状极显著相关的微卫星引物进行 SSR-PCR 扩增, 统计出现特异条带的样本数。其中, 引物 FF0911 有 4 尾出现了 189bp 特异性条带, 出现率为 13.33%; 引物 Sma-USC141 有 13 尾出现了 200bp 特异性条带, 出现率为 43.33%。以上实验结果与实验预期基本一致, 进一步验证了本研究所筛选出与大菱鲂抗鳃弧菌性状相关微卫星位点的准确性; 引物 Sma-USC108 经多次尝试, 无法再次正常扩增, 初步判断此引物不稳定, 舍去; 引物 Sma-USC62、Sma-USC279 扩增后, 分别有 10 尾和 5 尾出现了特异性条带, 出现率达到 33.33%和 16.67%, 与初次结果相差很远, 舍去。

2.4 差异等位基因片段的克隆与测序结果

选取与抗鳃弧菌性状呈极显著负相关性的微卫星位点 FF0911 的差异等位基因片段, 克隆并测序。微卫星位点 FF0911 的序列如下:

AGCGACGGAGGCATGATCGTCAGATTGCTG

GCCTACATGCACCACTTAGAGAAGGAATTTTGCC
ACACATGAACATAAAAATACTCTCTCCCACACGC
ACACACACACACACACACGAGTGACATGTCCGA
GAGGAAGAACAATGTGTTTATACAGTGTGAGGG
CGAAACAGCCTGTGATGGGCTGTTT

通过 BLAST 比对, 证实其为已公布的大菱鲂微卫星位点 FF0911 中的一段, 同源性达到 98%, 差别仅在于重复单位重复次数的不同。

2.5 遗传多样性分析

从上述 10 对引物中随机挑选 6 对, 分别为 FF0911、Sma-USC42、Sma-USC62、Sma-USC147、Sma-USC149、Sma-USC279。对抗性组和非抗性组各 30 个个体的进行分析, 构建表 5。共检测到 21 个等位基因, 平均等位基因数为 3.5000 个, 每个位点检测到的等位基因数为 3—5 个, 有效等位基因数在 1.4417—2.9863 之间, 平均为 2.0077。抗性群体的平均等位基因数、平均观测杂合度和平均期望杂合度分别为 2.8333、0.4010 和 0.3897, 非抗性群体分别为 3.3333、0.4556 和 0.5325。抗性群体平均多态信息含量(PIC)为 0.3394, 略低于非抗性群体的 0.4498。

表 5 大菱鲂群体遗传多样性的微卫星分析
Tab.5 The genetic diversity of *S. maximus* stocks by microsatellite analysis

抗性群体 R	等位基因数(N_a)	有效等位基因数(N_e)	观测杂合度(H_o)	期望杂合度(H_e)	多态信息含量(PIC)
FF0911	2.0000	1.1870	0.1724	0.1603	0.1451
Sma-USC42	5.0000	2.8708	0.6667	0.6627	0.6130
Sma-USC62	3.0000	2.1403	0.5333	0.5418	0.4542
Sma-USC147	2.0000	1.7241	0.4667	0.4271	0.3318
Sma-USC149	2.0000	1.1803	0.1000	0.1554	0.1411
Sma-USC279	3.0000	1.6245	0.4667	0.3910	0.3514
平均值	2.8333	1.7879	0.4010	0.3897	0.3394
非抗性群体 S	等位基因数(N_a)	有效等位基因数(N_e)	观测杂合度(H_o)	期望杂合度(H_e)	多态信息含量(PIC)
FF0911	3.0000	1.7094	0.5667	0.4220	0.3415
Sma-USC42	4.0000	2.9752	0.5667	0.6751	0.6059
Sma-USC62	3.0000	1.9417	0.3000	0.4932	0.3824
Sma-USC147	4.0000	1.9824	0.5333	0.5040	0.4416
Sma-USC149	3.0000	2.0955	0.2000	0.5316	0.4289
Sma-USC279	3.0000	2.2699	0.5667	0.5689	0.4983
平均值	3.3333	2.1623	0.4556	0.5325	0.4498
总体	等位基因数(N_a)	有效等位基因数(N_e)	观测杂合度(H_o)	期望杂合度(H_e)	多态信息含量(PIC)
FF0911	3.0000	1.4417	0.3729	0.3090	0.2644
Sma-USC42	5.0000	2.9863	0.6167	0.6707	0.6193
Sma-USC62	3.0000	2.2032	0.4167	0.5507	0.4421
Sma-USC147	4.0000	1.8538	0.5000	0.4644	0.3927
Sma-USC149	3.0000	1.6293	0.1500	0.3895	0.3285
Sma-USC279	3.0000	1.9318	0.5167	0.4864	0.4338
平均值	3.5000	2.0077	0.4288	0.4785	0.4135

3 讨论

鱼类的抗病性状作为阈性状, 受多基因控制, 表现为不连续的正态分布, 且可能有主效基因的存在, 遗传基础复杂, 环境影响波动大, 性状与基因间对应关系不十分明确。运用传统的统计手段了解单个基因的位置和效应较为困难, 是制约人们在育种实践中对抗病性状遗传操纵的瓶颈。因此, 本研究采用微卫星分子标记的方法对大菱鲂抗鳃弧菌性状进行研究, 期望从分子层面揭示其抗病性的遗传基础。

本研究采用群体分离分析法(Bulked Segregant Analysis, BSA), 该方法根据性状在 F_2 代的极端表现分成两组, 从而尽可能地缩小用单个样本检测时需统计的条带长度范围, 提高效率。但 BSA 法也有一定的局限性, 即只能对目标基因进行分子标记, 对于目标基因与分子标记间连锁的紧密程度及其在遗传连锁图上的位置尚不能进行准确判断, 因此, 要使分子标记在大菱鲂育种方面发挥更大的作用, 需进一步开发微卫星标记并构建分子遗传连锁图谱。本实验通过 BAS 方法筛选出 10 个具有差异的条带的微卫星位点, 3 个与抗鳃弧菌性状存在一定的正相关性, 其中 Sma-USC108 和 Sma-USC141 为正相关性极显著, 相关系数分别达到 0.363 和 0.407 ($P<0.01$); 7 个微卫星位点与大菱鲂抗鳃弧菌性状存在负相关性, 其中 FF0911、Sma-USC62、Sma-USC279 与抗鳃弧菌性状的负相关性极显著, 相关系数分别达到 -0.377、-0.364 和 -0.363 ($P<0.01$)。

基因杂合度被普遍视为是衡量生物群体遗传变异的重要参数, 其数据能映射群体遗传变异的程度, 杂合度越高物种遗传多样性越丰富, 对环境适应能力则越强(刘海金等, 2008; 李建林等, 2012)。一般情况下, 杂合度高的生物群体, 适应环境变化的可能性较高, 能够忍受自然选择压力, 并有可能具有更多的优良经济性状。本研究中, R 组的位点 FF0911 和 Sma-USC149 的观测杂合度偏低表明这些位点的遗传多样性水平可能较低, 但其它位点上则表现出丰富的遗传多态性; S 组 Sma-USC149 位点的观测杂合度偏低, 其它位点较高。总体来看, Sma-USC149 位点的观测杂合度偏低。这反映出本实验所用大菱鲂抗病性 R 组和非抗病性 S 组两个群体的遗传多态性, 在所分析的 6 个基因位点上较为丰富。

多态信息含量(polymorphism information content, PIC)是等位基因频率和数目变化的函数, 是衡量片段

多态性的较好指标(Wright, 1978)。当 $PIC>0.5$ 时, 表明该遗传标记可能具有高度多态性; 当 $0.25<PIC<0.5$ 时, 表明该遗传标记能够较为合理的提供遗传信息, 即中度多态性; 而当 $PIC<0.25$ 时, 表明该遗传标记提供的遗传信息可能较差, 属低度多态性(Botstein *et al*, 1980)。R 组的 6 个微卫星位点, FF0911 和 Sma-USC149 的 PIC 值 <0.25 , 属于低度多态性位点, 其它位点 >0.25 , 其中 Sma-USC42 >0.5 , 属中高度多态性位点; S 组的所有位点均 >0.25 , 其中 Sma-USC42 位点 >0.5 , 属中高度多态性位点; 从总体上来看, 所有的位点的 PIC 值均 >0.25 , 其中 Sma-USC42 位点 >0.5 , 属中高度多态性位点。说明所选用的位点具有一定的多态性, 具有一定的实验意义。

本实验选取具有极其显著相关性的微卫星位点开展验证实验, 二次验证结果最终确定 FF0911 和 Sma-USC141 具有较好重复性, 可以作为抗鳃弧菌性状分子标记指导抗病大菱鲂的辅助育种。因此在进行相关性分析中, 扩大样本量, 进行重复实验, 才能确定筛选出的标记的准确性和可用性。

参 考 文 献

- 刘海金, 朱晓琛, 孙效文, 2008. 牙鲆 5 个养殖群体的遗传多样性分析. 中国水产科学, 15(1): 30—36
- 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
- 许 可, 马爱军, 王新安等, 2009. 大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)生长性状相关的微卫星标记筛选. 海洋与湖沼, 40(5): 577—583
- 孙效文, 梁利群, 2000. 鲤鱼的遗传连锁图谱(初报). 中国水产科学, 7(1): 1—5
- 李三磊, 徐冬冬, 楼 宝等, 2012. 褐牙鲆耐热相关分子标记筛选及遗传多样性分析. 上海海洋大学学报, 21(4): 516—523
- 李建林, 李红霞, 唐永凯, 2012. 利用微卫星标记分析 6 个鲤鱼群体的遗传差异. 福建农业学报, 27(9): 936—940
- 邹玉霞, 张培军, 莫照兰等, 2004. 大菱鲂出血症病原菌的分离和鉴定. 高技术通讯, 14(4): 89—93
- 张 正, 王印庚, 杨官品等, 2004a. 大菱鲂细菌性疾病的研究现状. 海洋湖沼通报, 3: 83—87
- 张 正, 王印庚, 韩文君等, 2004b. 养殖大菱鲂烂鳍病原菌的鉴定及系统发育学研究. 海洋科学进展, 2(2): 193—197
- 陈松林, 2004. 海水养殖鱼类抗病分子育种研究进展及前景展望. 科技导报, 9: 10—13
- 陈松林, 田永胜, 徐田军等, 2008. 牙鲆抗病群体和家系的建立及其生长和抗病性能初步测定. 水产学报, 32(5): 665—673

- 侯仕营, 2010. 大菱鲂引进不同地理群体遗传多样性分析及微卫星标记的开发. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 1—74
- 侯仕营, 马爱军, 王新安等, 2011. 大菱鲂 4 个引进地理群体遗传多样性的微卫星分析. 渔业科学进展, 32(1): 16—23
- 顾颖, 郭忠宝, 谷晶晶等, 2009. 大菱鲂微卫星标记的分离及其多态性位点检测. 大连水产学院学报, 24(4): 366—370
- 雷霖霖, 门强, 王印庚等, 2002. 大菱鲂“温室大棚+深井海水”工厂化养殖模式. 海洋水产研究, 23(4): 1—7
- 瞿陆峰, 潘伟荣, 曾养志, 2010. 微卫星 DNA 标记及其在应用. 畜牧与饲料科学, 31(4): 6—8
- 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: 314—331
- Carmen Bouza, Miguel Hermida, Belén G Pardo *et al*, 2007. A microsatellite genetic map of the turbot (*Scophthalmus maximus*). Genetics, 177(4): 2457—2467
- Chen S L, Ma H Y, Jiang Y *et al*, 2007. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from an EST of turbot (*Scophthalmus maximus*) and cross-species amplification. Mol Ecol Notes, 7: 848—850
- Novoa B, Nuñez S, Ferández P *et al*, 1992. Epizootic study in a turbot farm: bacteriology, virology, parasitology and histology. Aquaculture, 177(2—3): 253—258
- Rodriguez M, LaPatra S, Williams S *et al*, 2004. Genetic markers associated with resistance to infectious hematopoietic necrosis in rainbow and steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) backcrosses. Aquaculture, 241(1—4): 93—115
- Wright, 1978. Evolution and the Genetics of Populations. Chicago: University of Chicago Press, 112—202

THE SCREENING OF MICROSATELLITES MOLECULAR MARKERS WITH REFERENCE TO ANTI-*VIBRIO ANGUILLARUM* OF TURBOT *SCOPHTHALMUS MAXIMUS*

GUO Jian-Li¹, TIAN Yue-Qiang^{1,3}, MA Ai-Jun¹, HUANG Zhi-Hui¹,
SHANG Xiao-Mei¹, WANG Xin-An¹, YANG Zhi², QU Jiang-Bo²

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology; Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, P. R. China, Qingdao 266071, China; 2. Yantai Tianyuan Aquatic Limited Corporation, Yantai 264003, China; 3. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract We explored 133 pairs of microsatellite markers included in GenBank to obtain suitable molecular markers that closely associated with anti-*Vibrio anguillarum* for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) breeding. The experimental turbot by intraperitoneal injection with *Vibrio anguillarum* were divided into two groups: susceptible group and resistant group. The differential bands in the two turbot groups were selected, from which the correlation between the upper anti-*Vibrio anguillarum* and the microsatellite loci were analyzed, and the genetic diversity compared. The results show that alleles of Sma-USC108 and Sma-USC141 at 215bp and 200bp respectively were extremely significantly correlated with anti-*Vibrio anguillarum* with the Pearson correlation value of 0.363 and 0.407. On the other hand, alleles of FF0911, Sma-USC62, and Sma-USC279 at 189bp, 163bp, and 236bp, respectively, were extremely significantly negative-correlated with anti-*Vibrio anguillarum*, with the Pearson correlation values at -0.377, -0.364, and -0.363 ($P < 0.01$), respectively. We verified the above result with a second trial and determined that Sma-USC141 and FF0911 is useful for further molecular assistant selection of anti-*Vibrio anguillarum* turbot. Comparative analysis showed that they two groups were in low genetic variation at a same-level of genetic diversity.

Key words *Scophthalmus maximus* L.; microsatellites molecular markers; *Vibrio anguillarum*; genetic diversity