

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)新品种 “东海 1 号”体长相关的 DArT 标记筛选*

徐圣钊 林 勉 闫松松 史雨红 苗 亮 李星云 陈 炯

(宁波大学海洋学院 生物化学与分子生物学实验室 宁波 315211)

摘要 大黄鱼(*Larimichthys crocea*)是我国重要的海产经济鱼类。因多年未加选育的累代养殖,养殖大黄鱼生长缓慢,性早熟、免疫力低下,亟需对养殖大黄鱼进行遗传改良。多样性芯片技术(Diversity arrays technology, DArT)具有高通量和低成本的显著特点,不需要明确物种的基因组 DNA 序列信息,因而广泛应用于动植物遗传图谱制作和遗传多样性分析。本研究旨在采用 DArT 技术鉴定与“东海 1 号”大黄鱼体长相关分子标记。首先随机测得“东海 1 号”大黄鱼 199 个个体体长,均值为 13.45cm,符合正态分布($P>0.05$),“极端大群体”和“极端小群体”之间差异显著($P<0.01$)。然后采用 7 组限制性内切酶组合(*PstI/AluI*、*PstI/BanII*、*PstI/Bsp1286I*、*PstI/BstNI*、*PstI/HaeIII*、*PstI/RsaI*、*PstI/TaqI*)分别进行酶切,获得基因组代表性 DNA 片段并用于文库构建。根据多态性克隆数和多态性率确定 *PstI/RsaI* 酶切组合为最优降低基因组复杂度方法。之后从 *PstI/RsaI* 基因组代表性 DNA 片段文库中扩增获得 3360 个片段,以此为多样性芯片探针进行芯片点制,杂交筛选获得 18 个大黄鱼体长相关 DArT 候选标记。经过新群体样本再次验证,仍有 8 个 DArT 标记与体长相关。本研究有助于选育生长性状优良的大黄鱼群体。

关键词 大黄鱼; DArT; 体长; 生长性状

中图分类号 Q789

doi: 10.11693/hyhz20160600128

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)属硬骨鱼纲、鲈形目、石首鱼科、黄鱼属,是我国“四大海水经济鱼类”之一(姚康等,2008)。20 世纪 90 年代人工繁育成功后,大黄鱼成为我国人工育苗量和养殖规模最大的海洋水产养殖品种,其经济效益显著。由于不重视种质保护和人工选育,目前人工养殖大黄鱼在体形、生长、肉质、性成熟、抗逆性、抗病性等多钟性状上出现了衰退,遗传多样性降低,在一定程度上限制了其养殖业的可持续发展(Gao *et al.*, 2010)。因此,有必要对大黄鱼进行品质改良,培育出具有生长快、抗病强、体型肉质好、耐低温等性状的优良品种。

DNA 分子标记是根据个体间基因组 DNA 的多态性发展起来的一类遗传标记技术,相比形态学标记、

细胞学标记、生物化学标记具有一定的优越性(魏东旺等,2001),已广泛应用于水产动物遗传育种。大黄鱼遗传育种也普遍采用 DNA 分子标记技术。王志勇等(2002)采用 AFLP 技术(Amplified fragment length polymorphism)分析显示,大黄鱼野生群体和 2 个养殖群体,2 个福建养殖大黄鱼群体的遗传多样性低于野生群体。李星云等(2003)采用 RAPD 技术(Random amplified polymorphic DNA)分析表明,象山港网箱养殖大黄鱼群体遗传多样性水平较低。李鹏飞等(2008)采用鱼线粒体 DNA 的细胞色素 *b*(Cytochrome *b*, *Cytb*)基因片段多态性可以区分大黄鱼、鲷鱼和美国红鱼。王晓清等(2008)采用 AFLP 和 SSR 技术(Simple sequence repeats)对亲本与杂交子代分析结果

* 国家高技术研究发展计划(863 计划),2012AA10A403 号;浙江省重大科技专项,2012C12907-8 号;“水产”浙江省重中之重开放基金, xkzsc1417 号;宁波市自然科学基金项目,2015A610263 号。徐圣钊, E-mail: 15728043673@163.com

通讯作者: 史雨红, 副教授, E-mail: shiyuhong0517@163.com

收稿日期: 2016-06-20, 收修改稿日期: 2016-07-11

表明, 杂交子代与母本大黄鱼之间的遗传同质性极高, 属于异源精子诱导大黄鱼雌核发育个体。宁岳(2007)分离获得的 AFLP 和 SSR 标记应用于大黄鱼的雌性和雄性连锁图谱的构建, 同时确定了大黄鱼性别决定机制。此外, 也陆续筛选获得许多有价值的 SSR 标记(Guo *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2009)。早期 DNA 分子标记技术主要应用于大黄鱼遗传多样性检测、系谱确认、遗传连锁图谱的构建中(Ye *et al.*, 2014)。近年来, 研究者主要致力于采用 DNA 分子标记技术筛选性状相关标记。刘贤德等采用微卫星标记技术对不同大黄鱼家系和群体进行分析, 筛选到与大黄鱼生长性状紧密相关的微卫星标记(刘贤德等, 2012, 2013; 叶华等, 2014)。薛良义等(2013)研究表明大黄鱼肌肉生长抑制素基因 3'端非编码区微卫星序列多态性与大黄鱼体长、体质量之间的相关系数没有达到显著水平。但生长性状相关标记发掘较少, 此外是否可用于生产实践还需进一步验证, 因此还需继续筛选生长性状相关标记。

多样性芯片技术(Diversity arrays technology, DArT)是一种基于基因芯片技术的 DNA 指纹图谱分析方法, 可广泛用于检测和分析动物、植物和微生物的 DNA 差异以及构建遗传图谱、QTL 定位和品种指纹图谱鉴定(Sánchez-Sevilla *et al.*, 2015)。与常规技术相比, DArT 不需要明确物种的基因组 DNA 序列信息, 具有高通量和低成本的显著特点, 克服了以往跑电泳凝胶为主的标记技术产量低、成本高、耗时长、自动化程度低等缺点, 只用少量成本就可进行全基因组的高通量图谱分析。目前该技术已成功用于水稻、大麦、小麦、油菜、桉树、苹果、木薯、拟南芥、木豆、大麦病原菌、沙门氏菌等生物的遗传连锁图谱以及基因定位研究中(Hackl *et al.*, 2010; Schouten *et al.*, 2012)。在水产动物的研究中仅见该技术应用于三疣梭子蟹地理种群多样性分析(荣晔婧等, 2014)。

本研究旨在采用 DArT 技术鉴定与大黄鱼体长相关的 DArT 标记。首先按分离群体标记关联分析法筛选“东海 1 号”大黄鱼体长相关的 DArT 标记, 后续进一步验证其相关性, 以期为大黄鱼选育和种质资源利用提供有用参考资料。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2012 年 11 月从宁波象山港湾水产苗种有限公司网箱养殖的“东海 1 号”大黄鱼(1 龄)中挑选健康无损

伤的大黄鱼 199 尾, 测量每条鱼的体长, 并在鱼鳃盖内侧较软部位植入电子标记。然后分别将其放入水泥池中暂养。使用 SPSS 17.0 软件统计分析, 分别建立体长的正态分布图, 取体长位于 10%的高值个体记为“极端大群体”(20 尾), 10%低值个体记为“极端小群体”(20 尾)。

1.2 基因组代表性 DNA 片段文库构建

文库构建方法参照 Jaccoud 等(2001)描述。采用酚-氯仿法提取基因组 DNA, 并将“极端大群体”和“极端小群体”的大黄鱼基因组 DNA 等量混合。500ng 混合基因组 DNA 用切割频率低的限制性内切酶 *Pst*I 分别与切割频率高的 *Alu*I、*Ban* I、*Bsp*1286I、*Bst*NI、*Hae*III、*Rsa*I 和 *Taq*I 组合进行酶切。在 T4 DNA 连接酶作用下, 纯化的 DNA 连接上 *Pst*I 特异性接头(Wenzl *et al.*, 2004)。连接产物作为模板用于后续 PCR 扩增, 所用引物为 DArT-*Pst*I 引物(Wenzl *et al.*, 2004), 反应程序如下: 94°C 变性 5min 后, 以下程序重复 35 个循环, 94°C 变性 30s, 53°C 复性 30s, 72°C 延伸 1min, 循环完成后 72°C 延伸反应 10min。扩增产物克隆至载体 pMD19-T, 转化大肠杆菌 TOP10F 并涂布于含氨苄青霉素和 X-gal 的 LB 培养基上。

1.3 基因组 DNA 复杂性降低方法的优化

1.3.1 探针制备及芯片点制 从代表性基因组 DNA 文库中随机挑选单菌落, 利用质粒载体上的通用引物 M13F-47 和 M13R-48 对插入的 DNA 片段进行 PCR 扩增, 产物用 1 倍体积异丙醇沉淀。每个 7 种降低基因组复杂性方法基因组代表性 DNA 片段数为 840 个。在芯片中布置质控探针, 阴性对照探针, 阳性对照探针, 空白对照探针, 工作探针。每个探针包含三个重复。每张芯片包含 4 个点阵, 每个点阵 25 行、27 列, 每个点的位置用“行标-列标”表示。其中 1-1—1-3 为质控探针, 1-19—1-21 为阳性对照探针, 1-7—1-18、1-22—2-3 为阴性对照探针, 2-4—25-12 为工作探针, 1-4—1-6、25-13—25-27 为空白对照探针。从 *Pst*I/*Alu*I、*Pst*I/*Ban*II、*Pst*I/*Bsp*1286I、*Pst*I/*Bst*NI、*Pst*I/*Hae*III、*Pst*I/*Rsa*I、*Pst*I/*Taq*I 文库中获得的 840 个基因组代表性 DNA 片段依次排布在 4 个点阵中。采用晶芯 SmartArrayer™ 48 点样仪进行点制。

1.3.2 荧光标记基因组代表性 DNA 片段的制备 用 M13F-47 和 M13R-48 引物对未插入外源 DNA 片段的载体进行 PCR 扩增, 该 PCR 产物作为 reference DNA。经乙醇沉淀后, 加入 20μL 灭菌水溶解, 放 -30°C 冰箱保存备用。

采用酚-氯仿法提取大黄鱼“极端大群体”与“极端小群体”基因组 DNA, 两组 DNA 先分别使用 7 组限制性内切酶(*PstI/AluI*、*PstI/BanII*、*PstI/Bsp1286I*、*PstI/BstNI*、*PstI/HaeIII*、*PstI/RsaI*、*PstI/TaqI*)降低基因组复杂性, 再加 *PstI* 特异性接头, 接着用 *PstI* 引物对加接头产物进行 PCR 扩增, 最后扩增产物使用 DNAmate 沉淀浓缩 10 倍体积。

取 150ng 基因组代表性 DNA 片段变性后用 DecaLabel DNA Labeling Kit 进行 Cy3 标记, 加入含十碱基随机引物的 5×缓冲液、MixC、Cy5-dCTP、exo-Klenow fragment 共 2.1μL, 37°C 孵育 10min 后, 加入 dNTPs 0.4μL, 37°C 孵育 30min, 加入 0.1μL EDTA (pH 8.0)终止反应。取 150ng reference DNA 变性后用 DecaLabel DNA Labeling Kit 进行 Cy5 标记。

1.3.3 芯片杂交 Cy3 和 Cy5 标记反应产物混合, 再加入 1μL 鲑精 DNA(10g/L)和 50μL ExpressHyb™ 杂交液混合后, 96°C 变性 3min, 冰浴骤冷 1min。将上述反应产物加入预处理的 DArT 芯片中, 在晶芯®杂交仪中进行杂交(65°C 孵育过夜)。杂交后先用 0.3×SSC, 0.1% SDS 清洗一次, 再用 0.06×SSC 清洗两次, 离心甩干。

1.3.4 芯片的扫描与数据处理 杂交后采用晶芯® LuxScan™ 10K-A 双通道激光共聚焦扫描仪进行扫描, 并用 LuxScan3.0 软件进行数据的提取。若对应的 reference DNA 杂交荧光强度较弱, 则属于坏点, 弃之。质量符合条件的探针, 其对应的荧光强度按照 $\lg[\text{Cy3 Target}/\text{Cy5 Reference}]$ 进行计算均一化。利用模糊 C-均值聚类分析法(模糊度为 1.5)将归一化后的芯片信号值分为 2 组聚类簇(cluster), 如果计算出的聚类簇之间方差至少大于总方差的 80%, 则认为此探针具有多态性, 模糊 C-均值聚类分析法可将其在不同芯片样本内分成 0/1 两组类别(Wenzl *et al.*, 2004)。采用 ANOVA 单侧检验(one-way ANOVA)分析组差异标记。计算 *P* 值、*q* 值和 FDR, 并制作相应的散点图。

1.4 大黄鱼生长相关分子标记的筛选

从 *PstI/RsaI* 代表性基因组 DNA 文库中随机挑选 3360 个克隆, PCR 扩增插入片段, 重新点制芯片。在芯片中布置质控探针, 阴性对照探针, 阳性对照探针, 空白对照探针, 工作探针。每个探针包含三个重复。每张芯片包含 16 个点阵, 每个点阵的设置同 1.3.1。各取 500ng 基因组 DNA, 分别用 *PstI* 与 *RsaI* 组合进行双酶切。酶切后加 *PstI* 特异性接头, 用 DArT-*PstI* 引物引物对酶切产物进行 PCR 扩增。荧光标记基因组 DNA 代表性片段的制备方法同 1.3.2。芯片预处理、杂交、扫描、数据提取及数据初步处理方法同 1.3.3

和 1.3.4。

1.5 大黄鱼生长相关 DArT 标记的验证

在后期验证实验中, 重新取 177 尾网箱养殖的健康、无损伤 1 龄“东海 1 号”大黄鱼。使用 SPSS 17.0 软件统计分析建立体长的正态分布图。这个群体每个个体基因组 DNA 代表性片段制备、芯片预处理、杂交、扫描、数据提取及数据初步处理方法同 1.3.2—1.3.4。筛选获得的候选 DArT 标记进行测序, 同时用 BLAST2GO (<http://www.blast2go.org>)软件对鉴定的 DArT 标记进行基因功能注释。

2 结果

2.1 大黄鱼体长数据统计

随机选择 199 个大黄鱼样本测量其体长数据。实验群体中的体长最大值为 16.30cm、最小值为 11.50cm, 均值为 13.45cm, 标准偏差 1.0337。经过 Shapiro-Willie 过程进行正态分布检验, 峰度为 0.192, 偏度为 -0.210, 计算得到 $P=0.257$, 样品符合正态分布 ($P>0.05$)。因而根据采用分离群体分组分析法(Bulked Segregate Analysis, BSA)建立关于体长的正态分布图(图 1), 在各群体中选取 10%的高值个体即体长大于 14.80 cm 的记为极端大群体, 选取 10%的低值个体即体长小于 12.00 cm 的记为极端小群体, 两组之间体长差异极显著($P<0.01$)。可用于与生长相关 DArT 标记的初步筛选。

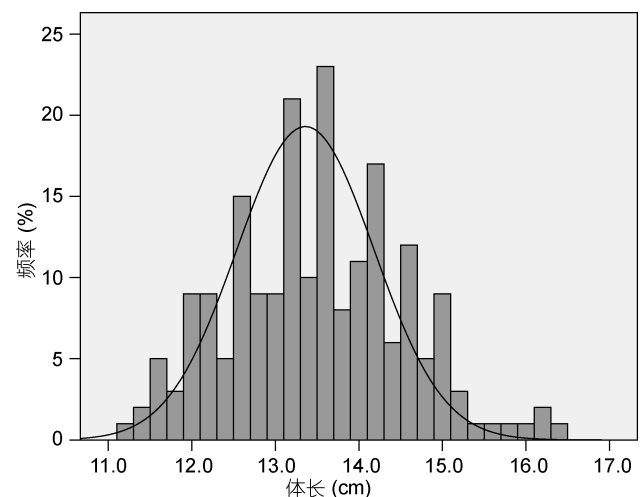


图 1 大黄鱼体长正态分布频率直方图

Fig.1 Normal distribution frequency histogram of body length of large yellow croaker

2.2 大黄鱼基因组代表性 DNA 片段文库的构建

本研究中大黄鱼基因组 DNA 完整, 纯度高, 无

RNA 污染(图 2A)。将不同体长的大黄鱼混合后, 分别用 *Pst*I/*Alu*I、*Pst*I/*Ban*II、*Pst*I/*Bsp*1286I、*Pst*I/*Bst*NI、*Pst*I/*Hae*III、*Pst*I/*Rsa*I、*Pst*I/*Taq*I 酶切后纯化(图 2B)。在 T_4 DNA 连接酶作用下, 纯化的 DNA 酶切片段与 *Pst* I 特异性接头连接。连接产物作为模

板进行后续 PCR 扩增(图 2C)。PCR 产物克隆至 pMD19-T 载体后转化大肠杆菌 Top10F', 所得 7 个基因组代表性 DNA 文库滴度 $\geq 10^5$ (表 1), 阳性克隆平均插入片段长度 >500 bp(图 2D—J), 符合 DArT 芯片点制要求。

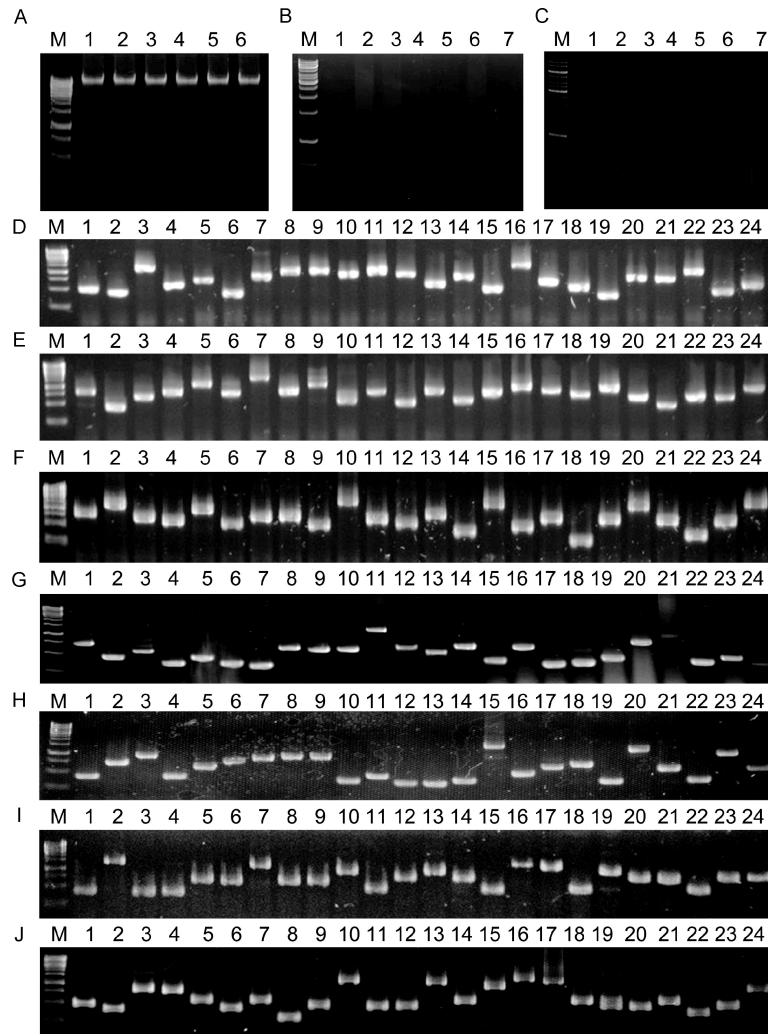


图 2 大黄鱼基因组代表性 DNA 片段文库构建

Fig.2 Construction of genomic representations library of large yellow croaker

注: A: 不同体长大黄鱼基因组 DNA, M: 1kb DNA ladder, A1: x725, A2: x784, A3: x798, A4: x658, A5: x625, A6: x827; B: 混合基因组 DNA 酶切检测 (5 μ L), M: 1kb DNA ladder, B1: *Pst*I 和 *Alu*I, B2: *Pst*I 和 *Ban*II, B3: *Pst*I 和 *Bsp*1286I, B4: *Pst*I 和 *Bst*NI, B5: *Pst*I 和 *Hae*III, B6: *Pst*I 和 *Rsa*I, B7: *Pst*I 和 *Taq*I; C: 加 *pst*I 接头后 PCR 扩增; D—J: 7 个基因组 DNA 代表性文库插入片段电泳检测结果, 1—24: 随机选取的克隆

2.3 降低基因组复杂性方法

大黄鱼“极端大群体”与“极端小群体”样品提取基因组 DNA, 分别采用 7 种酶切组合(*Pst*I/*Alu*I、*Pst*I/*Ban*II、*Pst*I/*Bsp*1286I、*Pst*I/*Bst*NI、*Pst*I/*Hae*III、*Pst*I/*Rsa*I、*Pst*I/*Taq*I)降低基因组复杂性。经标记后的 DNA 片段分别与各自 DArT 芯片杂交, 杂交结果清晰可靠。7 种酶切组合中, *Pst*I/*Rsa*I 不仅可降低基因组

复杂性, 且多态性率最高(17.62%)(表 1)。因此, 选择 *Pst*I/*Rsa*I 基因组代表性 DNA 片段文库用于大黄鱼体长相关 DArT 标记的筛选。

2.4 大黄鱼生长相关 DArT 标记的筛选

重新点制的 *Pst*I/*Rsa*I DArT 芯片, 其克隆数增加至 3360 个(图 3A)。并按照上述方法制备“极端大群体”与“极端小群体”*Pst*I/*Rsa*I 大黄鱼基因组代表性 DNA

表 1 7 个基因组 DNA 代表性文库由于所用限制性内切酶组合不同而造成的差异克隆数和多态性率

Tab.1 The number of unique clone and polymorphism level in genomic representative library differing in enzymes used for co-digestion

名称	库容	平均插入片段大小(bp)	多态性克隆数	多态性率 (%)
<i>PstI/AluI</i> 文库	8.0×10^5	886	58	6.90
<i>PstI/BanII</i> 文库	1.0×10^6	691	117	13.93
<i>PstI/Bsp1286I</i> 文库	4.0×10^6	820	68	8.10
<i>PstI/BstNI</i> 文库	1.2×10^6	607	119	14.17
<i>PstI/HaeIII</i> 文库	4.0×10^6	623	110	13.10
<i>PstI/RsaI</i> 文库	4.0×10^6	765	148	17.62
<i>PstI/TaqI</i> 文库	1.2×10^6	721	140	16.67

片段, 并加上 Cy3 荧光标记, reference DNA 为 Cy5 荧光标记。杂交后进行芯片扫描(图 3A)和数据提取。每张芯片经过归一化处理, 通过用模糊 C-均值聚类分析法获得 0/1 矩阵。根据计算所得的 p 值获得散点图(图 2B)。散点图中黑色为无差异位点, 红色为差异显著位点($P < 0.05$), 各位点集中在对角线附近, 偏离对角线越大越容易呈现红色。上述差异位点中只有 18 个 DArT 候选标记在“极端大群体”与“极端小群体”中聚类结果稳定, 且组间 $P < 0.01$ (表 2), 其中 17 个为“极端大群体”DArT 候选标记, 1 个“极端小群体”DArT 候选标记(表 2)。

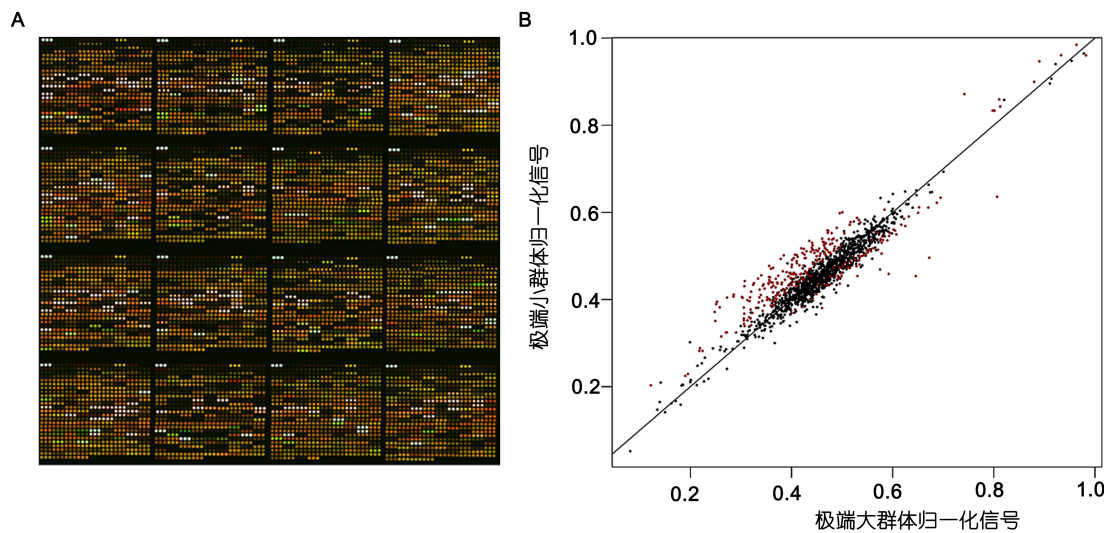


图 3 x827 样品杂交结果(A)及杂交归一化信号 P 值散点图(B)

Fig.3 Result of DArT microarray assay of x827 (A) and the P value scatter plot of normalization signals from maximal length group and minimal length group (B)

表 2 “极端大群体”和“极端小群体”0/1 矩阵及统计分析

Tab.2 The 0/1 matrix of maximal length group and minimal length group, and the statistics

候选标记	极端大群体	极端小群体	P 值	q 值	FDR
<i>RsaI1-05</i>	0	1	9.96E-06	0.000493	0.000649
<i>RsaI1-23</i>	0	1	0.000119	0.002948	0.003886
<i>RsaI4-73</i>	0	1	8.25E-07	6.71E-05	8.84E-05
<i>RsaI5-05</i>	0	1	1.02E-06	7.72E-05	0.000102
<i>RsaI5-23</i>	0	1	3.8E-05	0.001442	0.001901
<i>RsaI8-80</i>	0	1	2.21E-07	2.09E-05	2.76E-05
<i>RsaI9-38</i>	1	0	0.000111	0.002806	0.003699
<i>RsaI12-24</i>	0	1	0.000281	0.005217	0.006877
<i>RsaI12-18</i>	0	1	2.57E-07	2.25E-05	2.96E-05
<i>RsaI13-24</i>	0	1	4.16E-06	0.000263	0.000347
<i>RsaI14-11</i>	0	1	9.81E-06	0.000493	0.000649
<i>RsaI14-18</i>	0	1	6.09E-08	7.69E-06	1.01E-05
<i>RsaI14-73</i>	0	1	0.001214	0.013949	0.018387
<i>RsaI15-17</i>	0	1	9.26E-05	0.002478	0.003267
<i>RsaI16-85</i>	0	1	7.01E-06	0.000399	0.000527
<i>RsaI16-17</i>	0	1	3.09E-06	0.000218	0.000288
<i>RsaI14-79</i>	0	1	7.02E-06	0.000399	0.000527
<i>RsaI18-18</i>	0	1	8.56E-06	0.000464	0.000612

2.5 大黄鱼生长相关 DArT 标记的验证

为验证所筛选 DArT 候选标记的有效性, 又重新挑选了浙江象山港湾网箱养殖的“东海 1 号”F6 代大黄鱼(1 龄) 177 尾大黄鱼, 这个群体体长经过 Shapiro-Willie 过程进行正态分布检验, 也符合正态分布($P>0.05$)。从检验结

果可以看到, *RsaI1-23* 等 8 个 DArT 标记仍与体长性状紧密相关($P<0.01$) (表 3)。为了进一步确定筛选获得的大黄鱼 DArT 候选标记, 将上述候选标记进行测序, 测序结果用 BLAST2GO 软件进行 Blastn 分析。结果显示测定的序列中 6 个为已知序列, 2 个为未知序列(表 3)。

表 3 大黄鱼体长相关 DArT 标记再次验证结果
Tab.3 Re-verification for body-length-related DArT markers in large yellow croaker

候选标记	登录号	序列长度	序列描述	极端大群体	极端小群体	<i>P</i> 值	<i>q</i> 值	FDR
<i>RsaI1-23</i>	KX353586	445	<i>Homo sapiens</i> phosphatase complete cds	0	1	0.0001422	0.0005448	0.0024499
<i>RsaI4-73</i>	KX353587	789	<i>Homo sapiens</i> genomic chromosome 11q clone: rp11- complete sequences	0	1	1.22E-06	1.92E-05	8.64E-05
<i>RsaI8-80</i>	KX353588	224	<i>Epinephelus coioides</i> complement component c3 complete cds	0	1	1.46E-06	2.12E-05	9.55E-05
<i>RsaI9-38</i>	KX353589	1042	—NA—	1	0	0.000195	0.000666	0.00299
<i>RsaI14-11</i>	KX353590	669	<i>Homo sapiens</i> serine hydrolase-like 2 transcript variant non-coding RNA	0	1	4.03E-06	0.000200	0.000195
<i>RsaI16-85</i>	KX353591	342	—NA—	0	1	2.62E-06	0.000113	0.000508
<i>RsaI14-79</i>	KX353592	450	glucan -beta-glucosidase	0	1	9.35E-06	8.47E-05	0.000380
<i>RsaI18-18</i>	KX353593	357	serine threonine protein kinase	0	1	8.61E-06	8.01E-05	0.000360

注: “NA”表示没有注释

3 讨论

传统选育需要经历多个生命周期才能分离出稳定遗传的经济性状。随着分子生物学技术的迅猛发展, 运用 DNA 分子标记技术进行选育, 从分子水平研究与水产动物优良经济性状相连锁的分子标记极大地缩短了选育时间(刘贤德等, 2013)。目前, SSR 技术常用于寻找与生长、抗逆等性状紧密连锁或相关标记。如樊佳佳等(2009)关联分析得到 7 个微卫星位点与体重、体长和体高显著相关($P<0.05$)或极显著相关($P<0.01$)。Yi 等(2015)从 100 个 SSR 标记中找到 8 个基因座上 9 个基因型与鳊鱼生长性状(体重、体长和体高)相关。研究者也试图通过生长、抗逆等性状紧密连锁或相关标记指导大黄鱼遗传育种实践。高国强等(2010)进行了大黄鱼耐低温标记的筛选, 找到一个标记(LYC0002)可能与耐低温有关。刘贤德等采用微卫星标记技术鉴定了 LYC0088 和 LYC0143 与大黄鱼不同家系和群体生长性状紧密相关(刘贤德等, 2012, 2013; 叶华等, 2014)。薛良义等(2008)研究表明大黄鱼肌肉生长抑制素基因 3' 端非编码区微卫星序列多态性与大黄鱼体长、体质量无相关性。Ni 等(2012)在浙江养殖大黄鱼生长基因内含子 1 的 196 位 SNP(Single nucleotide polymorphysim)与体长和体高相关, 在两个群体大黄鱼生长基因内含子 2 的 692 位

SNP 与体重全长显著相关。本研究中首次采用 DArT 技术鉴定了 8 个大黄鱼体长相关 DArT 标记, 其中 7 个为“极端大群体”DArT 候选标记, 1 个“极端小群体”DArT 候选标记。

一般有两种方法筛选和鉴定水产动物目标性状相关联的分子标记, 一种是分离群体标记关联分析法, 该方法可快速获得与目的性状连锁的分子标记, 缺点是灵敏度和精确度都较低; 另一种为随机选择群体标记关联分析法, 该方法可全面分析所选用的标记, 准确度和精确度较好, 缺点是需要检测的样本量大和分析费用较高(樊佳佳等, 2009)。本研究采用分离群体标记关联析法进行初步筛选, 根据“东海 1 号”大黄鱼体长数据挑出“极端大群体”和“极端小群体”, 从两个群体中获得 18 个与体长相关 DArT 候选标记。随后新群体中验证确认 *RsaI1-23* 等 8 个 DArT 标记仍与体长性状紧密相关。由于仍不能保证本研究中筛选到的标记在其它群体适用, 因而在后续研究中尚需扩大群体的规模和类型, 进行多方比较进行进一步验证, 为下一步基因辅助育种、进一步提高性状选择的准确性提供依据。

4 结论

本研究从 *PstI/RsaI* 基因组代表 DNA 片段文库中扩增获得 3360 个基因组代表性 DNA 片段, 制备大黄

鱼体长相关多样性芯片。杂交信号转换为 0/1 矩阵并进行统计分析筛选, 初步获得 18 个大黄鱼体长相关 DArT 候选标记。之后经过验证表明仍有 8 个 DArT 标记与新群体的体长相关。本研究成功应用 DArT 技术筛选到与体长相关标记, 该方法也可以应用于其它生长相关性状标记筛选。同时本研究成果可直接指导大黄鱼人工选育工作; 也可作为进一步研究大黄鱼生长相关的遗传连锁图谱提供基础, 并对其它水产经济动物的遗传育种的建立提供理论依据与实践参考。

参 考 文 献

- 王志勇, 王艺磊, 林利民等, 2002. 福建官井洋大黄鱼 AFLP 指纹多态性的研究. 中国水产科学, 9(3): 198—202
- 王晓清, 王志勇, 谢中国等, 2008. 大黄鱼(♀)与鲢(♂)杂交的遗传分析. 水产学报, 32(1): 51—57
- 叶 华, 刘 洋, 刘贤德等, 2014. 大黄鱼微卫星标记与生长性状的相关分析. 西南大学学报: 自然科学版, 36(3): 27—33
- 宁 岳, 2007. 大黄鱼遗传连锁图谱的构建. 集美: 集美大学硕士学位论文, 23—52
- 刘贤德, 韦信键, 蔡明夷等, 2012. 大黄鱼 22 个微卫星标记在 F₁ 家系中的分离方式及与生长性状的相关分析. 水产学报, 36(9): 1322—1330
- 刘贤德, 隋班良, 王志勇等, 2013. 大黄鱼快长相关微卫星标记的筛选与验证. 水生生物学报, 37(6): 1036—1043
- 李星云, 张海琪, 薛良义等, 2003. 网箱养殖大黄鱼遗传多样性的同工酶和 RAPD 分析. 中国水产科学, 10(6): 523—525
- 李鹏飞, 周永东, 徐汉祥, 2008. 大黄鱼、鲢鱼及美国红鱼线粒体 DNA 的 Cyt b 基因序列比较. 南方水产, 4(3): 43—47
- 荣晔婧, 陈 强, 史雨红等, 2014. 基于 DArT 标记的三疣梭子蟹地理种群遗传多样性分析. 生物学杂志, 31(2): 18—21
- 姚 康, 王文策, 耿梅梅等, 2008. 大黄鱼紧密连锁 α -和 β -珠蛋白基因间序列功能分析. 水生生物学报, 32(3): 413—416
- 高国强, 常玉梅, 韩启霞等, 2010. 大黄鱼耐低温性状相关微卫星标记的筛选. 遗传, 32(3): 248—253
- 樊佳佳, 白俊杰, 李小慧等, 2009. 大口黑鲈生长性状的微卫星 DNA 标记筛选. 遗传, 31(5): 515—522
- 薛良义, 孙 升, 肖章奎等, 2008. 大黄鱼肌肉生长抑制素基因微卫星序列多态性分析. 中国生物化学与分子生物学报, 24(10): 980—985
- 魏东旺, 楼允东, 孙效文等, 2001. 鲤鱼微卫星分子标记的筛选. 动物学研究, 22(3): 238—241
- Chang Y M, Ding L, Wang W W *et al*, 2009. Isolation and characterization of 11 microsatellite markers for the large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. Conservation Genetics, 10(5): 1405—1408
- Gao G Q, Chang Y M, Han Q X *et al*, 2010. Screening of microsatellite markers associated with cold tolerance of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* R.). Hereditas, 32(3): 248—253
- Guo W, Wang Z Y, Wang Y L *et al*, 2005. Isolation and characterization of six microsatellite markers in the large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* Richardson). Molecular Ecology Notes, 5(2): 369—371
- Hackl E, Konrad-Köszler M, Kilian A *et al*, 2010. Phage-type specific markers identified by Diversity Arrays Technology (DArT) analysis of *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium. J Microbiol Meth, 80(1): 100—105
- Jaccoud D, Peng K M, Feinstein D *et al*, 2001. Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. Nucleic Acids Res, 29(4): e25
- Ni J, You F, Xu J H *et al*, 2012. Single nucleotide polymorphisms in intron 1 and intron 2 of *Larimichthys crocea* growth hormone gene are correlated with growth traits. Chin J Oceanol Limnol, 30(2): 279—285
- Sánchez-Sevilla J F, Horvath A, Botella M A *et al*, 2015. Diversity Arrays Technology (DArT) marker platforms for diversity analysis and linkage mapping in a complex crop, the Octoploid cultivated strawberry (*Fragaria × ananassa*). PLoS One, 10(12): e0144960
- Schouten H J, van de Weg W E, Carling J *et al*, 2012. Diversity arrays technology (DArT) markers in apple for genetic linkage maps. Mol Breed, 29(3): 645—660
- Wenzl P, Carling J, Kudrna D *et al*, 2004. Diversity Arrays Technology (DArT) for whole-genome profiling of barley. Proc Natl Acad Sci U S A, 101(26): 9915—9920
- Ye H, Liu Y, Liu X D *et al*, 2014. Genetic mapping and QTL analysis of growth traits in the large yellow croaker *Larimichthys crocea*. Mar Biotechnol, 16(6): 729—738
- Yi T L, Fang L, Liang X F, *et al*, 2015. Characterization of microsatellite markers and their correlations with growth traits in Mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). Genet Mol Res, 14(3): 8926—8934

IDENTIFICATION OF BODY-LENGTH-RELATED DART MARKERS IN NEW CULTIVAR “DONGHAI NO.1” OF LARGE YELLOW CROAKER *LARIMICHTHYS CROCEA*

XU Sheng-Zhao, LIN Mian, YAN Song-Song, SHI Yu-Hong, Miao Liang, LI Ming-Yun, CHEN Jiong
(Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract Large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) is an important marine economic fish in China. However, in recent years, many commercial traits have been degrading due to fast development of fish farming, resulting in lower growth rate, earlier sex maturation, and lower viability. Thus, the need is urgent in genetic improvement of farmed large yellow croaker. Diversity arrays technology (DART) provides a high-throughput and low-cost whole-genome genotyping platform for the detection and scoring of hundreds of polymorphic loci without any need for prior sequence information. DART is widely used to create genetic maps and analyze genetic diversity of animals and plants. We used DART to identify body-length-related molecular marks of the Donghai No.1 cultivar of large yellow croaker. The body lengths of 199 fish were randomly measured and the average was 13.45cm in conformation to normal distribution. The maximal and minimal length groups were significantly different ($P<0.01$). *Pst*I representations were digested with seven pairs of different frequent cutters (*Pst*I/*Alu*I, *Pst*I/*Ban*II, *Pst*I/*Bsp*1286I, *Pst*I/*Bst*NI, *Pst*I/*Hae*III, *Pst*I/*Rsa*I, *Pst*I/*Taq*I) and used for libraries construction. *Pst*I/*Rsa*I was selected as optimal complexity reduction method according to the numbers of unique clones and polymorphism levels. An amount of 3360 *Pst*I representations as probes was amplified from the *Pst*I/*Rsa*I library for array preparation. Eighteen DART candidate marks were screened by hybridization and data statistics. The new selected population was used to verify the candidate marks, and eight DART markers were significantly associated with body length. These basic data highlight potential application of DART for marker-assisted selection of large yellow croaker with good growth traits.

Key words large yellow croaker *Larimichthys crocea*; diversity arrays technology (DART); body length; growth trait