

# 大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)生长性状相关的 微卫星标记筛选\*

许 可<sup>1,2</sup> 马爱军<sup>1</sup> 王新安<sup>1</sup> 雷霖霖<sup>1</sup> 陈松林<sup>1</sup> 侯仕营<sup>1</sup> 黄智慧<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室 青岛 266071;

2. 上海海洋大学 上海 201306)

**提要** 采用分群分离分析法,以同一批受精卵孵化的同池养殖大菱鲂生长性状发生分离的群体为材料,进行微卫星 DNA 遗传分析,以揭示影响大菱鲂生长发育速度方面的遗传信息。30 个多态性微卫星位点对生长高值组(F 组)和生长低值组(S 组)各 10 个样本建立的 DNA 混合池进行扩增时,在两池间出现了 7 个差异片段。通过对两组大菱鲂个体 PCR 扩增出的差异条带进行统计,分析微卫星位点与大菱鲂生长性状的相关性。结果表明,有 1 个微卫星位点(SmaC10)在 355bp 的等位基因片段与大菱鲂生长性状存在一定的负相关性;有 4 个微卫星位点(SmaC02、SmaC06、SmaC09、B11-I 12/6/3)分别在 258bp、182bp、226bp、175bp 的等位基因片段与大菱鲂生长性状存在正相关性,其中位点 SmaC09 在 226bp 的等位基因片段与生长性状的正相关性极显著,相关系数达到 0.354。位点 SmaC09 所扩增出的等位基因片段可作为具有良好生长特性人工选育群体的分子标记,指导大菱鲂的辅助育种。

**关键词** 微卫星标记,大菱鲂,生长性状,分群分离分析法

**中图分类号** Q953

大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)隶属于鲆科、菱鲆属,英文名 Turbot,又称“多宝鱼”,是一种欧洲沿海特有的比目鱼,属冷温性鱼类,主要分布于大西洋东北部沿岸,黑海、波罗的海和地中海也有分布。由于其生长速度快、宜驯化、容易接收配合饲料、病害较少且便于密养,是工厂化养殖的理想品种(雷霖霖,2003)。我国于 1992 年首次从英国引进大菱鲂苗种,通过驯化、试养和人工繁殖,1999 年突破生产性育苗技术,大菱鲂养殖业在我国得到蓬勃发展,目前已建立起一整套养殖生产技术(雷霖霖等,2002;马爱军等,2002)。然而近几年来,由于累代养殖、近亲交配造成种质退化、杂合度降低,大菱鲂生长速度与引进初期相比明显下降,养成周期由原来的 12 个月左右延长到 18 个月左右(邹曙明等,2001;申雪艳等,2004;雷

霖霖等,2005)。因此,选育具有优良生长性状的大菱鲂品系成为大菱鲂养殖的当务之急。

分子标记技术的发展为选育工作开辟了新的途径。与传统的选育方法相比,分子标记辅助选择的信息量大,不易受环境的影响,选择强度大,选种效率和准确性高(鲁绍雄等,2002)。常见的分子标记有微卫星(SSR)、随机扩增多态性 DNA(RAPD)、扩增片段长度多态性(AFLP)等。其中微卫星标记因其具有多态性丰富、方法简便、快速、稳定性好等特点(徐莉等,2002),已经被广泛应用于水产动物性状的标记及连锁图谱的构建等领域。例如,与中国对虾生长性状相关微卫星 DNA 分子标记的初步研究(张天时等,2006),褐牙鲆耐热性状相关的微卫星分子标记筛选(卢钟磊等,2007),大菱鲂微卫星基因连锁图谱的绘制

\* 国家支撑计划专题,2006BAD01A12012 号;农业公益性行业科研专项经费项目,nyhyzx07-046 号;现代农业产业技术体系建设专项资金资助;国家“863”计划资助,2006AA10A404 号;中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费项目,2009-ts-11 号;“泰山学者”建设工程专项经费资助。许 可, E-mail: xukeven@126.com

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

收稿日期:2008-04-20,收修改稿日期:2008-07-30

(Carmen *et al.*, 2007), 利用微卫星标记技术对莫桑比克罗非鱼和奥利亚罗非鱼的杂交子二代进行了耐寒和大小(体质量和体长)的连锁分析(Cnaani *et al.*, 2003)等。但有关大菱鲂生长性状的分子标记研究国内外还未见报道, 本文中采用微卫星标记与分群分离分析法(Bulked Segregant Analysis, BSA)相结合的方式, 寻找与生长性状相关的微卫星标记, 以期为大菱鲂标记辅助育种奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

大菱鲂样本养殖于自烟台天源水产有限公司。取同一家系 6 月龄个体 300 尾, 全长 7—16cm, 记录所取大菱鲂的体重、体长数据, 建立体长正态分布图, 淘汰 90% 大多数中间类型, 将生长高值和生长低值两种极端表型的个体区分开来, 分别为全长大于 13cm 的 F(fast)组; 全长小于 10cm 的 S(slow)组, 每组各 30 尾, 活体运回后 -20 保存。

### 1.2 微卫星引物

根据文献(Chen *et al.*, 2007; Iyengar *et al.*, 2000)中报道的 30 个微卫星位点的两翼保守序列设计, 由上海生工公司合成, 序列等详细情况见表 1。

### 1.3 试验方法

**1.3.1 基因组 DNA 的提取及检测** 提取大菱鲂 F 组和 S 组各 30 尾的背部肌肉组织 DNA, 方法参照 Salah 等(1997), 置 4 保存。基因组 DNA 浓度经由核酸蛋白测定仪(EPPENDORF)和琼脂糖凝胶电泳 Genefinder 染色的荧光强度双重测定其含量及完整性, 用灭菌水稀释至 50ng/ $\mu$ l, -20 保存备用。

**1.3.2 BSA(Bulked Segregant Analysis)分池及基因池的 PCR 扩增** 从 F 组和 S 组中取样本各 10 个, 每个取 5 $\mu$ l DNA 溶液混合构成相应的 F 池和 S 池。以 30 对引物分别对两个池 DNA 进行 PCR(PCR 仪为 BIO-RAD, PTC0200)扩增, 寻找差异条带。大菱鲂微卫星扩增采用 25 $\mu$ l PCR 反应体系, 含 100ng 模板 DNA, 10pmol 引物, 200 $\mu$ mol/L dNTPs, 0.8—2.5mmol/L 的  $Mg^{2+}$ , 1 $\times$  PCR 反应 buffer, 1U 的 *Taq* DNA 聚合酶。PCR 反应中, 首次循环前 94 变性 4min, 然后 94 变性 30s, 按每对引物的实际退火温度反应 50s, 72 延伸 50s, 共 30 个循环; 最后一个循环结束后 72 延伸 7min (Chen *et al.*, 2007)。

**1.3.3 大菱鲂个体 DNA 的微卫星 PCR 扩增** 通过分析池 DNA 的 PCR 扩增情况, 初步筛选出在两 DNA

池间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, 按照上述 PCR 条件对 60 个大菱鲂个体进行 PCR 扩增, 分析有差异的等位基因片段在个体上具体的扩增情况。

**1.3.4 PCR 反应产物检测** PCR 产物在 8% 的变性聚丙烯酰胺凝胶上分离, 上样量为 3 $\mu$ l, 恒压 360V, 电泳 2h。电泳结束后, 采用快速银染法(Sambrook *et al.*, 2002)对 PAGE 胶进行染色。将胶板自然干燥, 记录带型并用扫描保存电泳结果。

**1.3.5 差异条带分析** 通过 BANDSCAN 软件对扫描保存的电泳结果进行分析, 获得差异条带的分布情况、碱基数及泳动位置。

使用 SPSS 软件对微卫星位点所扩增出的差异等位基因片段与大菱鲂生长性状这两个变量的进行皮尔逊检验(Pearson correlation), 判断有差异的等位基因片段与大菱鲂生长性状是否具有相关性。Pearson

相关系数公式为: 
$$r_{xy} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

**1.3.6 差异等位基因片段的克隆与测序** 切胶回收、纯化差异片段, 连接 TA 载体后转化 DH5 菌株, 挑取阳性克隆并测序(相关试剂购自 TAKARA 公司)。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序列。

**1.3.7 与生长性状有极显著相关性的微卫星位点在生长速度显著差异个体中的扩增验证** 从天源水产公司重新采样来自不同家系的混养同日龄大菱鲂 20 个体(生长显著快、慢各 10 尾), 选取与生长性状有极显著相关性的微卫星位点, 用其相应的 PCR 引物对上述个体进行 PCR 扩增, 统计特异性条带出现频率并进行卡方检验, 以验证筛选到的标记的准确性。

卡方检验公式为: 
$$\chi^2 = \sum_{i=1}^4 (O_i - T_i)^2 / T_i$$

## 2 结果

### 2.1 BSA 分池 PCR 扩增结果分析

如方法中所述, 用 30 对微卫星引物对所构建的 F 池和 S 池进行 PCR 扩增, 然后对 PCR 产物进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳并银染, 结果如图 1。可以看出, F 池和 S 池 PCR 扩增带谱上出现的某些微卫星位点的等位基因差异片段是明显的(如图 1 箭头所示), 进一步使用 BANDSCAN 软件计算差异条带的碱基

表 1 大菱鲆的 30 个微卫星位点的引物序列  
Tab.1 Primer sequences of 30 microsatellite loci in *S. maximus*

位点	重复序列	引物序列(5' 3')	MgCl <sub>2</sub> (mmol/L)	退火温度 ( )	Genebank 登录号
SmaC01	(TG) <sub>9</sub> ...(GT) <sub>10</sub>	F: TGTTGCTTTGCTCCTTTTCC R: TAGTGAACGGCGTCTAGGT	2.0	56	DQ659661
SmaC02	(AT) <sub>10</sub>	F: TGTCCTCGTCAGTGGCAGT R: AAACGTCAGCCTCCAAGATG	2.0	56	DQ659648
SmaC03	(CA) <sub>11</sub> ...(AG) <sub>16</sub>	F: TGGACTGGTTTACTGTGGA R: AGGGAACCGATCTGAGAACA	1.5	56	DQ454081
SmaC04	(AT) <sub>17</sub>	F: ATTTGCTTTGAGCCTGATGG R: TTGCAGCACAGTGGTCTTTC	1.5	56	DQ454100
SmaC05	(GT) <sub>11</sub>	F: TTCGAATTCACCAAGTGCC R: GTCAGCCATCATCTCCACCT	2.0	56	DQ454101
SmaC06	(GGAT) <sub>3</sub> ...(GGAT) <sub>6</sub>	F: GACCCAACGAGCACTGTT R: GGGCCAACATCATTATGG	1.5	57	DQ454088
SmaC07	(CA) <sub>14</sub>	F: TCAGCAGCCAGAGCACCAGA R: GCCTCAGACTACAGGAGGATAC	2.0	58	DQ454090
SmaC08	(CT) <sub>13</sub> CG(CT) <sub>6</sub> ...(CT) <sub>2</sub> CA	F: GTACACTTATGGTGCAAGGC R: TTCTGACAGATTTGTGGCACT	2.0	58	DQ659632
SmaC09	(CT) <sub>2</sub> CA(CT) <sub>7</sub> (TC) <sub>13</sub> TA(TC) <sub>2</sub>	F: CGACCCGCCACTACAGGAT R: AGCGACAGCAACGACCAAG	1.5	57	DQ659638
SmaC10	(TGA) <sub>8</sub>	F: GGTGCTGGGTAAATCTGTT R: CTTCCCTCCGTCTACGCTCC	1.5	60	DQ659659
SmaC11	(GT) <sub>23</sub>	F: AACCACTAGCTGGAAATCAGACC R: CTTCCCTTCAACTCGGCAAAA	1.5	64	DQ659672
SmaC12	(TA) <sub>22</sub>	F: CTGCAAGCCTTGATACCACT R: TTCCGCTGCCTTTATGTGAG	2.0	58	DQ659675
B11-I 12/6/3	(CA) <sub>12</sub> CG(CA) <sub>6</sub> (CG)CA <sub>3</sub>	F: GTTGTACTGCTGATCTAGC R: ATGTTCCATCTCATTCCTGC	1.0	55	AF182080
B12-I GT14	(GT) <sub>14</sub>	F: GTGATGGAAGATTGTACCAG R: CACAATAAAGGATAGACAGG	1.5	58	AF182082
B18-II CA70	(CA) <sub>70</sub>	F: CAGAGGGATAATTCTGTGC R: TACTGGCATCATGGTCAAC	1.0	56	AF182083
F1-OCA19	(CA) <sub>19</sub>	F: AGTTACACCAGTGCACAGAG R: CCAGGCCATCCACATTTAAC	1.5	56	AF182084
F8-I CA26	(CA) <sub>26</sub> (GA) <sub>3</sub>	F: ATTCTACGAGTCAGGCTCG R: TTCGATGTCAGTCGAGGACG	1.5	61	AF182085
F8-I 11/8/17	(CA) <sub>11</sub> T(CA) <sub>8</sub> T(CA) <sub>17</sub>	F: CACTAATTACCGGACAGACG R: AATCGGATGAGACGGCGAAC	1.5	62	AF182086
F12-I TG16	(TG) <sub>16</sub> (CG) <sub>4</sub>	F: CAGTCATATCAGCAGATGCC R: AATCAGCCGACAACTCTC	1.0	56	AF182087
F12-I AG18	(AG) <sub>18</sub> G(GA) <sub>5</sub>	F: GGCAGGACTGTACATTTTGG R: AGTCAGCCAGTTTACTGCAC	2.5	60	AF182100
1/4AC18	(AC) <sub>18</sub>	F: AGAAAGGCTCGACCAGCTCC R: TGATGGCTCATAGTGGCTAC	0.8	62	AF182088
2/5TG14	(TG) <sub>14</sub>	F: GAGGATTGGTGACCTTGGC R: CCTCAGACTACTGAAGTCAC	1.0	62	AF182089
3/3GT	(GT) <sub>14</sub> CG(GT) <sub>8</sub> (TG) <sub>4</sub> T(TG) <sub>3</sub>	F: GATCTAGTTGTCTAACAGG R: ATAGCAGGTCCTGCTAAAG	0.8	58	AF182090
3/9CA15	(CA) <sub>15</sub>	F: AGAGTGAAGAACGTACCTGC R: CAATGGAGAGGCAGTATCGG	1.0	60	AF182091
3/20CA17	(CA) <sub>17</sub>	F: AAGCACCCATACGCAGG R: AAATTGGAAACTGGACCG	1.5	62	AF182092
4/3COMP	(A) <sub>5</sub> CA(AC) <sub>4</sub> CA(AC) <sub>4</sub> G(AC) <sub>5</sub> G(A C) <sub>7</sub> ATG(AC) <sub>20</sub> AAT(CA) <sub>13</sub> AT(CA) <sub>3</sub>	F: GTACTTAAGCAGCTGTTCGC R: GAAACGCAGTTAGTTCTCTGC	2.5	58	AF182093
4/4CA4/13	(AC) <sub>4</sub> G(CA) <sub>13</sub>	F: GCACTCATGCTGACATACAG R: GACTCAGTGAATGATGAATC	1.5	64	AF182094
4/5CA22/6/2	(CA) <sub>22</sub> CT(CA) <sub>6</sub> CT(CA) <sub>2</sub>	F: ACTCTGAGGGCAGAGGAAC R: GCTGCTGGTAATCAGAAAAGC	0.8	60	AF182095
5/4CA20	(CA) <sub>20</sub> A(AC) <sub>2</sub>	F: GACGGAAGCTCGGAGATTC R: GATTGGTGACCTTGGCAAC	1.5	63	AF182096
7/1TC18	(TC) <sub>18</sub>	F: GAGAACTGAGCTGAGTCAC R: AATGATTATCACCGCTGCAC	1.5	60	AF182097

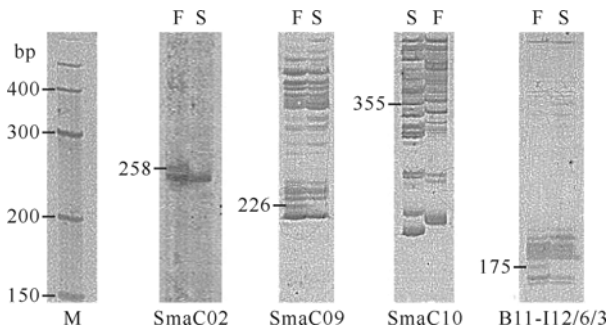


图 1 部分微卫星位点的 BSA 分析差异带型图

Fig.1 Banding patterns of BSA analysis for some microsatellite loci

M: 分子量标准, F: 生长高值基因池, S: 生长低值基因池

数, 结果见表 2。在总共 30 个微卫星位点中, 共有 7 个位点在两个基因池的 PCR 扩增比较中呈现出明显的差异等位基因条带, 其中有 5 个位点在 F 池中扩增出差异条带, 2 个位点在 S 池中扩增出差异条带, 这些位点将用于随后的大菱鲆个体 DNA 的扩增分析。

2.2 微卫星位点的差异等位基因片段在大菱鲆个体中带型统计及 SPSS 相关性分析

在以上 BSA 分析中得到的 7 个在两基因池间显

示差异性的微卫星位点(表 2), 用其相应的引物对 F 组和 S 组各 30 个大菱鲆个体分别进行 PCR 扩增, 通过 PAGE 电泳分析每个位点的差异等位基因片段在不同个体间的扩增情况, 其出现频率统计结果见表 3。

以表 3 的微卫星位点 SmaC09 为例, 在其扩增出的 226bp 差异等位基因片段位置, F 组 30 个个体中共有 17 个个体扩增出该片段(56.7%), 而 S 组 30 个个体中有 3 个个体扩增出该片段(10%)。可见该位点的这个差异等位基因片段对大菱鲆的生长性状具有较明显的偏好性, 该微卫星位点可能与调控生长的某些基因存在一定的连锁关系。图 2 是微卫星位点 SmaC09 在两个组的大菱鲆个体 DNA 中的扩增带谱。从图中可以看出该微卫星位点在 F 组和 S 组个体中的带型差异较为显著, 226bp 的差异等位基因片段在 F 组个体的扩增图谱中出现的频率较高, 而在 S 组的个体中出现的频率极低, 此结果与 BSA 分析的结果相吻合。

根据表 3 的结果, 使用 SPSS 统计软件对以上的 7 个微卫星位点的差异等位基因片段与生长性状进行相关性分析, 结果(表 4)有 1 个微卫星位点 SmaC10

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	SmaC02	SmaC06	SmaC09	SmaC10	SmaC12	B11-I 12/6/3	5/4CA20
差异片段大小(bp)	258	182	226	355	280	175	166
出现基因池	F	F	F	S	S	F	F

注: F 为生长高值基因池, S 为生长低值基因池

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	SmaC02	SmaC06	SmaC09	SmaC10	SmaC12	B11-I 12/6/3	5/4CA20
差异片段大小(bp)	258	182	226	355	280	175	166
F 组(阳性/总数)	13/28	23/28	15/30	15/30	8/30	10/30	13/29
出现率	46.4%	82.1%	50%	50%	26.7%	33.3%	44.8%
S 组(阳性/总数)	4/27	17/30	5/30	22/29	13/30	3/30	9/29
出现率	14.8%	56.1%	16.7%	75.9%	43.3%	10%	31.0%

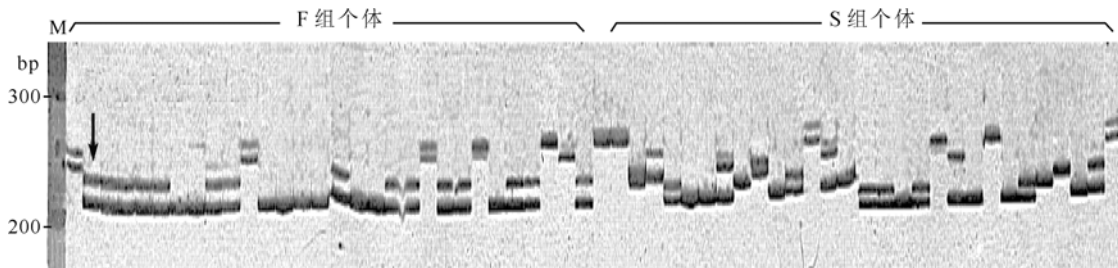


图 2 微卫星位点 SmaC09 在大菱鲆个体 PCR 扩增中的带谱

Fig.2 Banding pattern of microsatellite locus SmaC09 of individuals

M: 分子量标准, F: 生长高值组, S: 生长低值组

355bp 的等位基因片段与大菱鲂生长性状存在一定的负相关性; 有 4 个微卫星位点 SmaC02、SmaC06、SmaC09、B11-I 12/6/3 分别在 258bp、182bp、226bp、175bp 的等位基因片段与大菱鲂生长性状存在正相关性, 其中位点 SmaC09 226bp 的等位基因片段与生长性状的正相关性极显著, 相关系数达到 0.354( $P<0.01$ ), 其余 3 个位点为一般显著性相关。

2.3 差异等位基因片段的克隆与测序结果

选取与生长性状呈极显著正相关性的微卫星位点 SmaC09 的差异等位基因片段, 克隆并测序。序列如下:

TACTCTCGACCCGCCCACTACAGGATGCTGTATT  
TGAAGCTGTAGATTGTGGGGGAGTTGTGTAACG  
GCTACATACTTTGTCCCCACCCCCTCTTCTCTC  
TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTGTTCCAAT  
GGAAGTGGATTTATCATGGAAGTTGCACTTAGCT  
GACGGTGTCCCTCCTCAGTGTGCACAAACGAGG  
ACCTTGTTGCGTTGCTGTCTAA

通过 BLAST 比对, 证实其为公布的大菱鲂微卫星位点 SmaC09 中的一段, 同源性达到 97%, 差别仅在于微卫星核心序列的 TA 两碱基缺失。

2.4 微卫星位点在生长性状显著差异个体的验证

选取来源于不同家系的混养 9 月龄大菱鲂生长显著快、慢个体各 10 尾, 用与生长性状存在极显著正相关的微卫星位点 SmaC09 相应的引物对其 DNA 进行 PCR 扩增, 统计其 226bp 位置差异等位基因片段的扩增情况。结果显示(图 3), 差异等位基因片段在

生长显著快、慢各 10 尾大菱鲂的扩增结果中的重复率分别为 60%和 10%, 存在显著性差异( $X^2 = 5.494$ ,  $P<0.05$ )。以上结果基本与实验预期一致, 进一步验证了作者所发现的这个与大菱鲂生长性状存在极显著相关性的微卫星位点的准确性。

3 讨论

鱼类大多数的经济性性状属于数量性状。与质量性状不同, 数量性状受多基因控制, 遗传基础复杂, 且易受环境影响, 表现为连续变异, 表现型与基因型之间没有明确的对应关系。长期以来只能借助于数理统计的手段, 将控制数量性状的多基因系统作为一个整体来研究, 用平均值和方差来反映数量性状的遗传操作特征, 无法了解单个基因的位置和效应。这种状况制约了人们在育种中对数量性状的遗传操纵能力(方宣钧等, 2001)。因此, 作者采用分子标记的方法对大菱鲂的生长性状进行研究, 从分子层面揭示数量性状的遗传基础。

分群分离分析法常用于快速鉴别与特定基因或染色体区域连锁的标记(Michelmore, 1991)。作者采用这一方法, 从大菱鲂群体中选取生长极高、低值个体样本各 10 个, 构建两个混合的 DNA 样品池, 通过 SSR 分析在两池间寻找到了有差异的条带, 最后通过单个样本的 SSR 分析进行验证。实践证明, 这一方法的应用大大缩小了用单个样本检测时需统计的条带

表 4 微卫星位点与大菱鲂生长性状的相关性分析  
Tab.4 The correlation analysis between microsatellite loci and the growth trait of *S. maximus*

微卫星位点	SmaC02	SmaC06	SmaC09	SmaC10	SmaC12	B11-I 12/6/3	5/4CA20
Sig.(2-tailed)	0.011	0.037	0.006	0.041	0.182	0.028	0.784
泊松相关系数	0.342*	0.275*	0.354**	- 0.267*	- 0.175	0.283*	0.037
相关性	*	*	**	*		*	

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

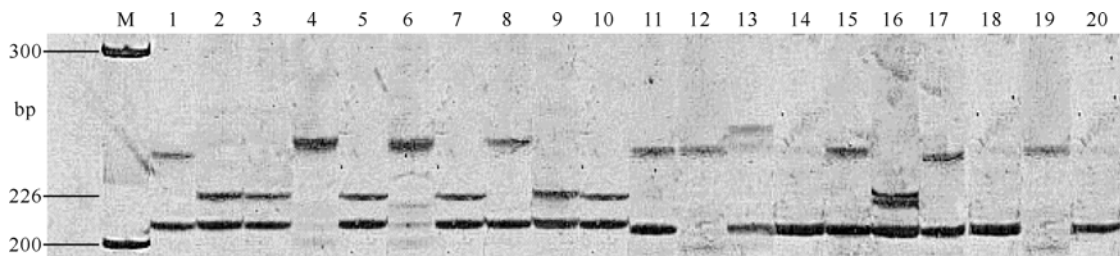


图 3 SmaC09 在 20 尾生长性状发生分离的大菱鲂中的扩增带型

Fig.3 Banding patterns of microsatellite loci SmaC09 in 20 individuals with segregant growth trait  
1—10: 生长速度显著快的大菱鲂, 11—20: 生长速度显著慢的大菱鲂, M: 分子量标准

长度范围,有效地减少了工作量。需要提及的是,本文中选取的大菱鲂样本是同池混养的6月龄个体,且采取影响大菱鲂体重的主要表型性状全长(王新安等,2008)作为划分生长极值的代表性指标,可以最大限度地降低环境、性别及表型形态等因素对实验结果的影响。

分析微卫星引物 PCR 扩增带谱的结果,发现存在个别位点条带过多和条带缺失的现象。究其原因,可能有以下两方面:一方面由于报道的微卫星位点本身特异性问题而与基因组内其它位置存在或大或小的同源性,因而产生一些非特异的假带,这些假带可以通过调整 PCR 反应的条件来减少。在本研究中,微卫星的扩增中也存在一些假带,作者严格参照文献(Chen *et al*, 2007; Iyengar *et al*, 2000)中记载的相应微卫星位点的大小范围将其排除,因而假带的存在对本实验结果影响不大。另一方面,微卫星在进行 PCR 扩增时偶尔会出现无效等位基因(null allele)的现象,即无特异性的扩增产物,这可能是微卫星引物的结合部位的点突变、插入或缺失阻碍微卫星的扩增(Ede *et al*, 1995),而且这种突变并没有在群体中被固定,只有一部分等位基因没有被扩增出来,因此在电泳时,实际为杂合的位点仅出现单条电泳带而呈现纯合现象(Ball *et al*, 1998),另一部分个体则可能由于含有两个无效等位基因而得不到相应的扩增产物。出现这种情况的样本,作者不将其统计在内。

从本实验的结果来看,在30个微卫星位点中有5个的差异等位基因与生长性状存在一定的相关性,其中1个位点的差异等位基因片段与生长性状存在极显著正相关性,相关性达到0.354( $P < 0.01$ ),并且在另外20个生长显著快、慢个体样本中验证了以上的结果。因此,作者确信这个微卫星标记是大菱鲂辅助育种的优良标记。但BSA法只能对目标基因进行分子标记,还不能确定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。在这方面,国外最早于1994年就将SSR标记技术应用于虹鳟,目前绘制成的遗传连锁图谱上的标记数为1359,分辨率达714cM/L,已对抗IPN(infection pancreatic necrosis)、抗IHN(infection hematopoietic necrosis)、抗myxosporea、耐高温、产卵时间、胚胎早期发育、dominant albino等性状进行了定位研究。在国内,孙效文等(2000)报道了鲤鱼(*Cyprinus carpio* L.)的初步遗传图谱,包括56个RAPD标记、115个微卫星标记、91个基因标记,图谱为50个连锁群,与鲤鱼的单倍

体染色体数一致,覆盖基因组总长度为5789cM/L。梁利群等(2003)又利用105个基因标记、110个微卫星标记和57个RAPD标记完成了鲤鱼的又一遗传图谱,该图谱覆盖4111cM/L,并把与冷应激相关的基因定位到第5连锁群上。因此,作者将致力于开发大菱鲂的微卫星标记并进一步绘制分子连锁图,以期完成对目标基因的定位,使分子标记辅助选择发挥更大的作用。

## 参 考 文 献

- 马爱军,雷霖霖,陈四清等,2002.大菱鲂产卵季节对卵子的生物学及生化特征的影响.海洋与湖沼,33(1):75—82
- 王新安,马爱军,许可等,2008.大菱鲂早期阶段外部形态性状对体重的影响效果分析.动物学报,54(3):540—545
- 方宜钧,吴为人,唐纪良,2001.作物DNA标记辅助育种.北京:科学出版社,35—40
- 卢钟磊,池信才,王义权等,2007.褐牙鲂耐热性状相关的微卫星分子标记筛选.厦门大学学报,46(3):396—402
- 申雪艳,宫庆礼,雷霖霖等,2004.进口大菱鲂 *Scophthalmus maximus* L.苗种的遗传结构分析.海洋与湖沼,35(4):332—341
- 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
- 邹曙明,李思发,蔡完其,2001.牙鲆和大菱鲂养殖群体的分子标记和遗传变异.中国水产科学,7(4):25—38
- 张天时,刘萍,李健等,2006.中国对虾与生长性状相关微卫星DNA分子标记的初步研究.海洋水产研究,27(5):34—38
- 徐莉,赵桂仿,2002.微卫星DNA标记技术及其在遗传多样性研究中的应用.西北植物学报,22(3):74—72
- 梁利群,孙效文,2003.鲤耐寒性状分子标记在遗传连锁图上的定位.大连水产学院学报,18(4):278—281
- 鲁绍雄,吴常信,2002.动物遗传标记辅助选择研究及其应用.遗传,24(3):359—362
- 雷霖霖,2003.大菱鲂养殖技术.上海:上海科学技术出版社,8
- 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
- 雷霖霖,马爱军,陈超等,2005.大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)养殖现状与可持续发展.中国工程科学,7(5):30—34
- Ball A O, Leonard S, Chapman R W, 1998. Characterization of (GT)<sub>n</sub> microsatellites from native white shrimp *Penaeus setiferus*. Mol Ecol, 7: 1251—1253
- Carmen Bouza, Miguel Hermida, Bele'n G Pardo *et al*, 2007. A microsatellite genetic map of the turbot (*Scophthalmus maximus*). Genetics, 177: 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 amplifica-

- tion. Mol Ecol Notes, 7: 848—850
- Cnaani A, Hallerman E M, Ron M *et al*, 2003. Detection of a chromosomal region with two quantitative trait loci, affecting cold tolerance and fish size, in an F<sub>2</sub> tilapia hybrid. Aquaculture, 223: 117—128
- Ede A M, Crawford A M, 1995. Mutations in the sequence flanking the microsatellite at the KAP8 locus prevent the amplification of some alleles. Anim Genet, 26: 43—44
- Iyengar A, Piyapattanakorn S, Heipel D A *et al*, 2000. A suite of highly polymorphic microsatellite markers in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) with potential for use across several flatfish species. Blackwell Science Ltd, Molecular Ecology, 9: 365—378
- Michelmore R W, 1991. Identification of marker linked to disease-resistance gene by bulked segregant analysis: a rapid method detect marker in specific genomic regions by using segregating populations. Proc Natl Acad Sci USA, 88: 9828—9832
- Salah M Aljanabi, Iciar Martinez, 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. Nucleic Acids Research, 25: 1492—1493
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, 2002. Molecular Cloning, a Laboratory Manual. 3rd ed. N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1—108

## MICROSATELLITES MOLECULAR MARKERS AND THE CORRELATION TO GROWTH TRAIT OF *SCOPHTHALMUS MAXIMUS*

XU Ke<sup>1,2</sup>, MA Ai-Jun<sup>1</sup>, WANG Xin-An<sup>1</sup>, LEI Ji-Lin<sup>1</sup>, CHEN Song-Lin<sup>1</sup>,  
HOU Shi-Ying<sup>1</sup>, HUANG Zhi-Hui<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, 266071;  
2. Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306)

**Abstract** Genetic variation of cultured stock of *Scophthalmus maximus* L. whose growth trait was segregated was studied with bulked segregant analysis. Two classes with mixed DNA template of 10 samples were analyzed in 30 polymorphic microsatellites loci. A total of 7 unique alleles for each class were found in all the loci. After PCR amplification on the individuals, differential bands were calculated and the correlation between growth trait and microsatellite loci was established. The results show that one locus is negatively correlated with growth trait significantly, while other four loci, positively related, among them SmaC09 is of extreme significance at 0.354 ( $P < 0.01$ ). This microsatellite and its differential band could be used as a molecular marker to selected stocks of good growth performance at molecular level for *S. maximus*.

**Key words** Microsatellites molecular markers, *Scophthalmus maximus* L., Growth trait, Bulked segregant analysis