

文章编号: 1674 - 5566(2012)04 - 0516 - 08

褐牙鲈耐热相关分子标记筛选及遗传多样性分析

李三磊^{1,2}, 徐冬冬², 楼宝², 辛俭², 耿智^{1,2}, 程国宝²

(1. 浙江海洋学院 海洋科学学院, 浙江 舟山 316004; 2. 浙江省海洋水产研究所 浙江省海水增殖重点实验室, 浙江 舟山 316100)

摘要: 通过高温刺激 (32 °C) 获得褐牙鲈的耐热群体和热敏感群体, 利用扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP) 和微卫星技术筛选与褐牙鲈耐热性相关的分子标记, 并分析了两个群体的遗传多样性。采用 81 对 AFLP 引物组合和 42 对微卫星引物进行耐热相关分子标记的筛选, 结果表明: 1 个 AFLP 位点 (A3) 在热敏感群体中出现的频率显著高于耐热群体, 与耐热性存在显著的负相关 ($P < 0.01$), 相关系数达到 -0.453 ; 4 个 AFLP 位点在耐热群体中出现的频率显著高于热敏感群体, 与耐热性存在显著正相关性 ($P < 0.01$); 微卫星引物 Po25A 和 205TUF 扩增出的位点 S1 和 S2 与耐热性存在显著负相关性 ($P < 0.01$), 相关系数分别为 -0.408 和 -0.398 。群体遗传多样性分析表明耐热群体与热敏感群体的遗传变异水平较高, 两个群体的遗传多样性水平相当。研究的结果不仅为褐牙鲈的耐高温选育提供技术支持, 而且可以为鱼类抗逆性研究提供参考数据。

研究亮点: 利用 AFLP 和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。研究的结果不仅为褐牙鲈的耐高温品系选育提供技术支持, 而且可以为鱼类抗逆性研究提供参考。

关键词: 褐牙鲈; AFLP; 微卫星; 耐热性; 遗传多样性
中图分类号: S 917
文献标志码: A

褐牙鲈 (*Paralichthys olivaceus*) 是一种冷、温水性、底栖的海产名贵经济鱼类, 自然分布在中国的南海、东海、黄渤海以及朝鲜、日本和俄罗斯的亚洲海区等海域。我国的褐牙鲈养殖始于 20 世纪 60 年代, 20 世纪 90 年代后发展成为工厂化、池塘和网箱养殖的主要品种, 目前, 国内牙鲈年产鱼苗产量约在 3 000 万尾, 在海水鱼类养殖中占有重要地位^[1]。近年来, 由于褐牙鲈的经济价值较高, 养殖效益显著, 其养殖区域已经由北方的山东、辽宁等省扩张到南方的浙江、福建、广西等省。但是, 南方省份的沿海海域地处亚热带, 夏季水温可达 31 °C 以上, 远高于褐牙鲈适宜生长的温度范围, 这可能是造成褐牙鲈渡夏成活率较低的重要诱因之一^[2-3]。因此, 开展褐牙鲈耐热性状选育的研究, 对提高养殖褐牙鲈的渡夏成活率, 延长生长期都显得非常重要。

鱼类的耐热性作为养殖中重要的经济性状一直受到遗传学家和育种学家的普遍关注。关于褐牙鲈的耐热性研究已有许多报道。FONDS 等^[4]研究发现 32 °C 可能是褐牙鲈热忍耐的上限温度; 程丽娜等^[5]研究表明高温胁迫和规格大小显著影响褐牙鲈的生长性能; 严福生^[6]研究认为不同月龄的褐牙鲈家系在急性升温和慢性升温的条件下其耐受性均表现显著差异, 表明褐牙鲈的耐热性状具有一定的选择育种潜力。一般认为, 鱼类的耐热性是受多基因控制的数量性状^[7-8], 随着当代分子生物学的发展, 利用分子标记技术可以筛选与耐热性状紧密连锁的标记, 在新品种选育的前期就可实现对耐高温性状的选择, 从而加快育种的进程。目前, 关于褐牙鲈耐热品系选育的分子标记辅助育种报道较少, 仅见池信才等^[8]利用了 20 对微卫星引物对褐牙鲈耐

收稿日期: 2012-01-06

修回日期: 2012-02-23

基金项目: 浙江省重大科技专项 (2008C12011、2009C12078); 浙江省创新团队建设与人才培养项目 (2010F20006)

作者简介: 李三磊 (1985—), 男, 硕士研究生, 研究方向为鱼类遗传育种。E-mail: sanjun198563@126.com

通讯作者: 楼宝, E-mail: loubao6577@163.com

热性状相关的分子标记进行了初步的研究。本研究利用 81 对 AFLP 选择性引物组合和 42 对微卫星引物筛选与褐牙鲂耐热性状相关的分子标记,并分析其耐热群体和热敏感群体的遗传多样性,旨在寻找与褐牙鲂耐热性状显著相关的分子标记,以期为褐牙鲂耐高温选育提供技术支持。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验用褐牙鲂共 600 尾,取自浙江省海洋水产研究所西闪岛试验基地,体长 8 ~ 10 cm,体重平均约为 16.5 ~ 18.5 g。实验开始前,实验鱼置于 1.5 m² × 0.8 m 的圆形缸中,常温 (27 ~ 28 ℃) 下暂养 2 周,避免其它的应激因素对实验造成干扰。采用电热棒 (1 000 W) 对水体进行加热,WMZK201 型自动控温仪进行控温,控温精度为 ±0.2 ℃,对各实验组以 2 ℃/d 的速率逐步升温,直到 32 ℃。温度到达 32 ℃后,持续 13 d,采用预热水进行换水,上下午各换水一次。温度达到 32 ℃时,鱼开始大量死亡,收集 32 ℃时死亡的个体定义为热敏感组 N。当鱼死亡数达到一半时,将存活且状态良好的褐牙鲂定义为耐热组 U,编号保存。从两组中各选取 50 尾用于后续的遗传分析。

1.2 基因组 DNA 的提取

取 30 ~ 40 mg 的褐牙鲂肌肉、剪碎,然后加入 350 μL 的组织匀浆缓冲液,混匀后加入 10% 的十二烷基硫酸钠 (SDS) 40 μL,蛋白酶 K (20 mg/mL) 8 μL 和核酸酶 (20 mg/mL) 4 μL,放在 56

℃的水浴锅中消化,消化期间每 30 min 摇晃离心管一次,一般需要消化 2 ~ 3 h;取出离心管低速离心去除管壁水珠,然后加入 300 μL 氯化钠 (6 mol/L),震荡混匀,室温 12 000 r/min 离心 30 min,置上清液于新的离心管中;在上清液中加入等体积的异丙醇 (约 700 μL),轻轻混匀,置于 -20 ℃下 2 h,室温 12 000 r/min 离心 15 min,弃去上清液;加入 70% 的乙醇于离心管中,混匀漂洗沉淀一次,然后室温 12 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液;用 30 μL 的双蒸水溶解 DNA。紫外分光光度计测定样品 DNA 的 OD₂₆₀、OD₂₈₀ 值,确定其浓度和纯度,将 DNA 母液置于 -20 ℃保存。

1.3 AFLP 与微卫星分析

1.3.1 AFLP 分析

AFLP 分析参照 VOS 等^[9]的方法,稍作修改。首先,利用 *EcoR* I (10 U/μL, 0.3 μL) 和 *Mse* I (20 U/μL, 0.25 μL) 内切酶酶切 250 ng 的基因组 DNA,37 ℃酶切 6 h;65 ℃变性 15 min。然后,将酶切产物与接头在 20 ℃水浴中连接 3 ~ 5 h。以连接产物为模板进行预扩增,预扩增引物 3'末端带 1 个选择性碱基,其序列为 *EcoR* I + A (5'-GACTGCGTACCAATTC + A-3') 和 *Mse* I + C (5'-GATGAGTCCTGAGTAA + C-3')。最后,以 40 倍稀释的预扩增产物为模板进行选择性的扩增,选择性扩增引物 3'端带有 3 个选择性碱基 (表 1)。选择性扩增产物经 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后银染显色,将获得清晰条带的胶板进行拍照并记录结果。

表 1 AFLP 分析中用的选择性引物序列

Tab.1 Sequence of primer combinations used in AFLP analysis

选择性引物	序列 (5' - 3')
M-CAA	GAT GAG TCC TGA GTA A CAA
M-CAC	GAT GAG TCC TGA GTA A CAC
M-CAG	GAT GAG TCC TGA GTA A CAG
M-CAT	GAT GAG TCC TGA GTA A CAT
M-CCA	GAT GAG TCC TGA GTA A CCA
M-CTA	GAT GAG TCC TGA GTA A CTA
M-CTC	GAT GAG TCC TGA GTA A CTC
M-CTG	GAT GAG TCC TGA GTA A CTG
M-CTT	GAT GAG TCC TGA GTA A CTT
E-AAC	GAC TGC GTA CCA ATT C AAC
E-AAG	GAC TGC GTA CCA ATT C AAG
E-ACA	GAC TGC GTA CCA ATT C ACA
E-ACC	GAC TGC GTA CCA ATT C ACC
E-ACG	GAC TGC GTA CCA ATT C ACG
E-ACT	GAC TGC GTA CCA ATT C ACT
E-AGA	GAC TGC GTA CCA ATT C AGA
E-AGC	GAC TGC GTA CCA ATT C AGC
E-AGG	GAC TGC GTA CCA ATT C AGG

1.3.2 微卫星分析

微卫星分析所用的引物序列如表 2。PCR 反

应条件为:94 ℃变性 5 min;94 ℃变性 60 s,退火 30 s (表 2),72 ℃延伸 45 s,进行 30 个循环;最后

72 °C 延伸 5 min。PCR 反应体系为 25 μ L, 含 10 \times PCR buffer 2.5 μ L, 25 mmol Mg^{2+} 1.5 μ L, 2.5 mmol dNTPs 1.6 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.2 μ L, 10 mol/ μ L 的上、下游引物各 0.5

μ L, 模板 DNA 100 ng, 其余体积用超纯水补齐。扩增产物经 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后银染显色, 将获得清晰条带的胶板进行拍照并记录结果。

表 2 褐牙鲆的 42 对微卫星引物序列

Tab. 2 Primer sequences of 42 microsatellites in *Paralichthys olivaceus*

位点	退火温度/°C	引物序列 (5'-3')		GenBank 登录号
Po1	55	F-GCCTTTTGTGACCCATTAACAGAGC	R-CTGAGGCCAGACATGACATTACCTT	AB046745
Po13	58	F-CGGCCTAAACCTGGACATCCTCTCTA	R-CGGGACAACGGAGTTTACTGAC	AB046746
Po20	58	F-TGCTCCTTACCTGCACGGCCTCAA	R-TGCACCCTGACCTGCTACTGGGGATT	AB046748
Po25A	55	F-TGAGGAGTCAGGTTTCAGGCCACT	R-TCGCAGGAACACCCAGAGTACAGA	AB046749
Po26	55	F-ACACTGGGCCCTCTGTTAAACAC	R-AGAGGAGAAAGGGCACCCAGATA	AB046750
Po31	57	F-AGGGTTAATTATAGAGGACGCCAG	R-TTACATATCCCACAATGCTTCACTC	AB046751
Po33	55	F-GTTGGTTTAACTGATTCATCTGCAG	R-TTACATATCCCACAATGCTTCACTC	AB046752
Po35	54	F-TGAGGAGTCAGGTTTCAGGCCACT	R-TCCGAGGAACACCCAGAGTACAGA	AB046753
Po42	55	F-CGAGCGCTGTTTCAACTACGGTCATT	R-ATGATGATCTAACCCGTCGGCTCCAT	AB046754
Po48	55	F-GCCTCCAGAAACATTTATGGGG	R-TGCTTGGCTCTGGTCTTCTT	AB046755
Po52	58	F-TCAGACAGAGGAGCGGGTTGTTGC	R-GCTGTACCCAGGGTCCGCTGAAGA	AB046756
Po56	55	F-TCCAGCGTAAACAAACCAGCTAACA	R-GCTGAAAATCGCTTTAGCTTCCCAT	AB046757
Po58	52	F-GCCCTCACTGAGACTGTGACA	R-CAAGGTATGTGCATGAGCAGGC	AB046758
Po83	57	F-TCCGGTCATCATGCTTTAAAATA	R-AGCAAATGTTTGCTTTTGGATACA	AB046759
Po89	60	F-ATCAGAAATCATCCATGCCTGGCAC	R-AGCTACTTATCCACAGGTGTCACGG	AB046760
Po91	55	F-AGGTTTCAAGGTGTTTCAATGCGAATC	R-TAAAGGAAGGTGTTTCAATGCGAATC	AB046761
Postr1	58	F-GATTGTTTCACTACCTGTTCAACCTG	R-TCATTAACAGACGGAGCACCC	EU307200
Kop7	67	F-GTGACACACCTCTGCTTCTCTG	R-GAGGACGTGGTTGAGATCACAG	AY328963
Kop12	65	F-CTTGGCTGTGAGGAACTGTG	R-CTTCCAGCAGCAACAGGTTTAC	AY328968
Kop15	62	F-ACTGGATGCCTCACTTATACC	R-GATTCTCACGTTTCCATGTC	AY330522
Kop26	60	F-CAGTAAAACAGTCCCTCCTGAAC	R-GGAGTCTGGAACCAAATGTCTG	AY328981
6TUF	60	F-CATGGATACACTCACAGACACA	R-CGATCAACGCTGCTGATG	AB037979
11TUF	60	F-ATGAAAACCACCAAGAATCCC	R-GCCGCATTTGGTAGTTTGT	AB037981
19TUF	55	F-ATGGCTGTAATGACAGCAGG	R-CGCAAAAACAACAGATGTTCA	AB037984
28TUF	55	F-ATCTCCAACTGTCAATCATCA	R-GTCGAGTCCAGTATCACTGCC	AB037986
30TUF	62	F-GAGACAACCCCAAGAAAT	R-ATCAGGGTATTGTTTTTGCCC	AB037988
108TUF	60	F-TAACAGGGAGGGTGTGAGG	R-GCTGGGACTCTTGGCTCC	AB086501
116TUF	62	F-CAAATCTGGCAAATTTAGGAATACTGG	R-GATACCTGGTGATACAGGTGAACACG	AB037991
204TUF	55	F-TTTACCAACTTTCAGGTCCTGTGGA	R-TCCCTCTAAACCAGAGGTTCCAG	AB218011
205TUF	55	F-TACTTAAGCTCCTCCTCCACTGCT	R-GTCTGCAGCTGCAAACTTGACTTTT	AB218041
206TUF	60	F-GAGTGCTCCATCATGTTCAAGC	R-TGTTAAAATGAGCCAAGACTATTGC	AB217997
212TUF	55	F-ATTTTAAATTGCCACTACCCCTCC	R-CCTTCTCTAATTAATTGACAAGTCCA	AB218009
214TUF	55	F-GAACAGCAGGAAGTCCATGAGGTC	R-TGACACGTTGAGTACCAACAAAAA	AB218031
217TUF	55	F-AAGTTCGGGTAAGAATGAGAGCCAG	R-ATCAGCACCTTGTAGTCTGGTCCAG	AB218013
226TUF	55	F-CATCAGCACTTTACATAAATGCAAACA	R-TGCAGGAACACAATTAAGTCTCCAGA	AB217955
236TUF	55	F-GAGTTCCACACTGGGTAAGTCTGTA	R-ATTAATGAAAAACAGTGGGCTGC	AB217957
9-8TUF	60	F-GAGAGACAGAAGGTCCTCAACGGTA	R-ACAAAGACCACGATGCAAAAGTGAC	AB037989
OF101	54	F-TCCTCAGGCAGCCAGTA	R-CAGTCTCCGGCACACA	DQ207959
OF102	54	F-TCCTCAGGCAGCCAGTA	R-CAGTCTCCGGCACACA	DQ207960
OF103	55	F-GCAGGCTGGATGTGGCC	R-CCCGGTTTATCCCGCTCT	DQ207961
OF104	53	F-CCCGTGAATCTTCCCTTTG	R-TGTCGGTTGCTCTTGGTG	DQ207962
OF105	58	F-GCCGACTCCGATGCTCC	R-CGCTCATGACGCCCGAC	DQ207963

1.4 数据分析

1.4.1 遗传多样性分析

将 AFLP 标记技术的电泳图谱中扩增条带的有无转化为“0”,“1”数据矩阵,依据数据矩阵统计总位点数、多态性位点数等。利用 Popgen 1.32^[10] 软件对 Nei's 遗传多样性指数 (Nei's genetic diversity, H), Shannon's 信息多样性指数 (Shannon's information index, I), Nei's 遗传距离 (Nei's genetic distance, D), 遗传相似系数 (Nei's genetic identity, S) 和 Nei's 基因分化系数等遗传学参数进行分析。

利用 Popgen 1.32^[10] 软件对微卫星标记技术的相关等位基因数 (observed number of alleles, N_a), 有效等位基因数 (effective number of alleles, N_e), 观测杂合度 (observed heterozygosity, H_o), 期望杂合度 (expected heterozygosity, H_e), Nei's 遗传距离 (Nei's genetic distance, D), 遗传相似系数 (Nei's genetic identity, S) 和 Nei's 基因分化系数等遗传学参数进行分析。

1.4.2 AFLP 和微卫星标记与耐热性状的相关性分析

采用 SPSS 11.5 软件对 AFLP 和微卫星引物所扩增出的等位基因片段与褐牙鲈耐热性状这两个变量进行皮尔逊检验 (Pearson correlation), 判断有差异的等位基因片段与褐牙鲈耐热性状是否具有相关性。

2 结果

2.1 耐热分子标记的筛选

2.1.1 AFLP 耐热分子标记筛选

利用 81 对 AFLP 引物组合对褐牙鲈耐热群体和热敏感群体各 10 个个体进行初步分析, 结果发现 8 对引物组合在两个群体中扩增得到差异性显著的等位基因位点。采用筛选到的 8 对 AFLP 引物组合对两个群体各 50 个个体进行分析, 结果发现位点 A3 (E-AAC/M-CAC) 在热敏感群体的个体中出现的频率与在耐热群体的个体中出现的频率差异显著 ($P < 0.01$), 相关系数达到 -0.453 ; 另有 4 个 AFLP 标记位点在耐热群体的个体中出现的频率显著高于热敏感群体的个体中出现的频率 (表 3)。

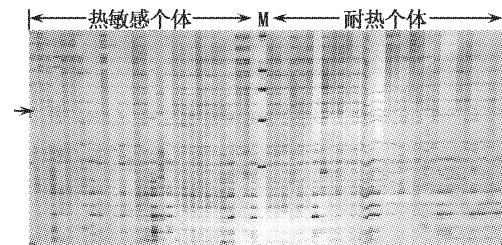


图 1 引物组合 E-AAC/M-CAC 产生的两群体间差异显著的部分条带

Fig. 1 Significantly different band amplified by E-AAC/M-CAC primer combination

M 为 marker, 箭头指示显性频率差异显著的基因位点。

表 3 耐热群体和热敏感群体中显著差异等位基因位点的扩增情况统计

Tab. 3 The statistics of significant differential gene loci in thermal-tolerance and thermal-susceptible stocks

位点	AFLP					SSR	
	A1	A2	A3	A4	A5	S1	S2
对应的引物	AAC/CCA	AGA/CTA	AAC/CAC	ACT/CTG	AGC/CTA	Po25A	205TUF
耐热群体阳性位点数	25/50	28/50	20/50	40/50	35/50	10/50	8/50
百分比/%	50	56	40	80	70	20	16
热敏感群体阳性位点数	12/50	10/50	42/50	25/50	17/50	30/50	27/50
百分比/%	24	20	84	58	34	60	54
皮尔逊相关系数	0.269	0.371	-0.453	0.314	0.360	-0.408	-0.398
P	0.007	0.001	0.001	0.002	0.001	0.001	0.001

2.1.2 微卫星耐热分子标记筛选

利用 42 对微卫星引物对褐牙鲈耐热群体和热敏感群体各 10 个个体进行初步分析, 结果发现 6 对微卫星引物在两个群体中扩增得到差异性明显的等位基因位点。利用筛选到的 6 对微

卫星对两个群体各 50 个个体进行扩增, 统计差异等位基因位点在不同个体的扩增比例。微卫星引物 Po25A 扩增出的差异等位基因位点在热敏感群体的个体中出现的频率高于耐热群体的个体中出现的频率。该引物扩增出的差异等位

基因位点约为 350 bp,在耐热群体的个体中和热敏感群体的个体中出现频率分别为 20% 和 60%,差异等位基因位点与耐热性存在显著的负相关性 ($P < 0.01$),相关系数达到 -0.408 。另外,引物 205TUF 扩增出的差异等位基因位点在耐热群体的个体中和热敏感群体的个体中出现频率分别为 16% 和 54%,与耐热性也存在显著的负相关性 ($P < 0.01$),相关性系数为 -0.398 (表 3)。



图 2 微卫星引物 Po25A 产生的两群体间差异显著的部分条带

Fig. 2 Significantly different band amplified by microsatellite primer Po25A

M 为 marker,箭头指示显性频率差异显著的基因位点。

2.2 遗传多样性分析

2.2.1 AFLP 分析群体遗传多样性

利用 8 对 AFLP 引物组合对耐热群体和热敏感群体进行扩增,共产生 317 个位点,其中有 221 个为多态性位点(平均每个引物组合为 27.75),多态性位点比例为 69.72%。耐热群体和热敏感群体扩增得到的多态性位点数目分别为 213 和 208,多态性位点比例分别为 68.49% 和 66.24%,卡方检验显示两个群体的多态性位点比例的差异不显著 ($df = 1, \chi^2 = 0.359, P = 0.549$)。耐热群体的 Nei's 遗传多样性指数和 Shannon's 信息多样性指数分别为 0.181 和 0.283;热敏感群体分别为 0.164 和 0.261 (表 4)。两群体间的遗传相似系数和遗传距离分别为 0.99 和 0.007 9,基因分化系数为 0.027。

表 4 褐牙鲆群体遗传多样性的 AFLP 分析

Tab. 4 Genetic diversity of *Paralichthys olivaceus* stocks by AFLP analysis

	扩增位点数	多态性位点数	Nei's 遗传多样性指数 (H)	Shannon's 多样性指数 (I)
耐热群体 U	311	213 (68.49%)	0.181	0.283
热敏感群体 N	314	208 (66.24%)	0.164	0.261
总体	317	221 (69.72%)	0.175	0.277

2.2.2 微卫星分析群体遗传多样性

利用 6 对微卫星引物对耐热群体和热敏感群体的分析结果如表 5,共检测到 38 个等位基因,平均等位基因数为 6.333 个,每个位点检测到的等位基因数为 5~8 个,有效等位基因数在 4.119~6.417 之间,平均为 5.007。耐热群体的

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 6.000、0.828 和 0.782,热敏感群体分别为 6.167、0.839 和 0.804。两群体间的遗传相似系数和遗传距离分别为 0.89 和 0.12,基因分化系数为 0.019。

表 5 褐牙鲆群体遗传多样性的微卫星分析

Tab. 5 Genetic diversity of *Paralichthys olivaceus* stocks by microsatellite analysis

引物	Po25A	Po31	Po35	Po83	205TUF	217TUF	平均水平
耐热群体 U							
等位基因数 (N_a)	5.000	5.000	6.000	6.000	7.000	7.000	6.000
有效等位基因数 (N_e)	3.719	3.846	4.082	4.986	5.187	4.615	4.406
观测杂合度 (H_o)	0.767	1.000	0.933	0.833	0.600	0.833	0.828
期望杂合度 (H_e)	0.744	0.753	0.768	0.813	0.821	0.797	0.782
热敏感群体 N							
等位基因数 (N_a)	5.000	5.000	5.000	7.000	8.000	7.000	6.167
有效等位基因数 (N_e)	3.863	4.554	4.148	5.187	5.788	5.941	4.897
观测杂合度 (H_o)	0.667	1.000	0.900	0.900	0.767	0.800	0.839
期望杂合度 (H_e)	0.754	0.789	0.772	0.821	0.841	0.846	0.804
总体水平等位基因数 (N_a)							
等位基因数 (N_a)	5.000	5.000	6.000	7.000	8.000	7.000	6.333
有效等位基因数 (N_e)	4.119	4.455	4.167	5.373	6.417	5.513	5.007
观测杂合度 (H_o)	0.717	1.000	0.917	0.867	0.683	0.817	0.833
期望杂合度 (H_e)	0.764	0.782	0.766	0.821	0.851	0.826	0.802

3 讨论

DNA 分子标记技术的快速发展及广泛应用为鱼类抗逆性相关的标记筛选提供了新的技术手段,其中,AFLP 和微卫星标记技术是较为常用的两种分子标记技术,已被广泛应用于鱼类分子辅助育种中。OZAKI 等^[11]利用微卫星分析了虹鳟肝胰脏坏死病(IPN)的抗性品系和敏感品系,发现了2个与抗虹鳟肝胰脏坏死病毒(IPNV)相关的微卫星标记;高国强等^[12]筛选与大黄鱼耐低温性状相关的微卫星标记,结果发现标记LYC0002可能与大黄鱼的耐低温相关基因存在一定的连锁关系;刘云国等^[13]利用 AFLP 技术获得了8个与褐牙鲈抗鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)相关的 AFLP 位点,这些位点可能是抗病性相关的候选标记。本实验利用81对 AFLP 选择性引物组合和42对微卫星引物对褐牙鲈的耐热性相关的标记进行筛选和分析,发现了5个 AFLP 位点和2个微卫星位点与耐热性存在显著的相关性($P < 0.01$),其中位点A3在热敏感群体的个体中出现的频率达到84%,位点S1在热敏感群体的个体中的出现频率达60%,相关系数分别达到-0.453和-0.408。

池信才等^[8]研究发现微卫星Po42和Po13筛选得到的标记位点与褐牙鲈耐热性存在极显著的相关性;本实验也利用这两对引物进行筛选,结果发现没有扩增到与褐牙鲈耐热性显著相关的基因位点,表明这两对引物没有普遍应用性。可能是由于耐热性状是由多个基因控制的数量性状,具有某个耐热基因的个体可能在整体表型上呈现热敏感性,具有某个热敏感基因的个体也可能在整体表型上呈现出耐热性^[7-8],因此,利用分子标记筛选获得的性状相关标记应当建立在统计学基础上。对于耐热相关标记普遍应用性还需要进一步的实验验证。本实验所用样本数为100尾,采用统计学方法分析筛选得到的差异等位基因位点与耐热性状的相关性,增强了所获得的耐热相关分子标记的可靠性,可以作为与褐牙鲈耐热相关的候选标记,为褐牙鲈耐高温选育提供参考。本研究更深入的工作是进一步验证这些耐热相关的候选标记的可靠性和普遍应用性,为褐牙鲈分子标记辅助育种提供技术支持。

本研究利用 AFLP 和微卫星分析得到的耐热群体与热敏感群体间的遗传分化系数分别为0.027和0.019,遗传距离分别为0.0079和0.12,表明耐热性差异的两个群体间没有发生明显的遗传分化^[14];同时,比较耐热性群体和热敏感群体的遗传多样性参数,发现两个群体的遗传差异不显著,这表明两个群体的耐热性差异可能不会引起群体间的遗传分化。李素红等^[15]在中国对虾抗病性状遗传标记筛选及遗传多样性分析的研究中发现,两个抗病能力不同的群体间的遗传分化不显著。LIU 等^[16-17]利用 AFLP 和微卫星技术分析了褐牙鲈普通群体,抗鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)群体和感病群体的遗传结构,其结果也显示3个群体间的遗传分化均不显著。以上研究均显示某一表型性状的差异可能并不会引起群体间的遗传分化。

多态性位点信息、Nei's 基因多样性指数(H)、Shannon's 多样性指数(I)和杂合度(H_o 、 H_e)等是度量群体遗传多样性的重要参数,它们的大小反映了群体遗传变异程度的高低^[18-20]。本实验利用 AFLP 标记分析的两个群体的多态性位点比例(P)、Nei's 基因多样性指数(H)和 Shannon's 多样性指数(I)分别为69.72%,0.175和0.277;微卫星标记分析的两个群体的平均观测杂合度(H_o)和平均期望杂合度(H_e)分别为0.833和0.802。与LIU等^[16]利用 AFLP 分析的褐牙鲈选择性养殖群体($P = 60.92\% \sim 65.78\%$)和刘海金等^[21]利用16对微卫星引物分析的5个养殖群体($H_o = 0.506 \sim 0.604$, $H_e = 0.559 \sim 0.648$)相比,本研究报道的两个群体的遗传多样性水平较高;与SEKINO和HARA^[22]调查的日本沿海野生群体($H_o = 0.740 \sim 0.780$)和KIM等^[23]分析的韩国沿海野生群体($H_o = 0.820 \sim 0.888$)相比,遗传多样性水平相当。这表明本实验的褐牙鲈群体的遗传多样性水平相对较高,具有较大的育种潜力。

分子标记辅助育种是缩短育种周期、提高育种效率的有效方法。本研究综合利用 AFLP 和微卫星两种方法筛选得到与褐牙鲈耐热性相关的5个 AFLP 和2个微卫星标记,这些标记可以为褐牙鲈耐热品系选育提供技术支持和理论参考,对于加速褐牙鲈的分子标记辅助育种进程具有积极的推动作用。然而,虽然关于褐牙鲈高温胁迫

的抗逆反应及生理变化已有报道,但是其耐热机理尚未阐明,这也阻碍了分子辅助育种的进程。因此,从基因组成、表达调控和转录表达等方面进行耐热机理的研究,将是褐牙鲆分子育种研究的方向和重点。

参考文献:

- [1] 田永胜,陈松林,徐田军,等. 牙鲆不同家系生长性能比较及优良亲本选择[J]. 水产学报, 2009, 33(6): 901 - 911.
- [2] 林越超,吴石绅,何伟湃,等. 台湾海峡牙鲆养殖技术研究[J]. 海洋科学, 2006, 30(9): 48 - 51.
- [3] 楼宝,毛国民,史会来,等. 舟山野生牙鲆 *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel) 的人工驯养试验[J]. 现代渔业信息, 2008, 23(6): 15 - 17.
- [4] FONDS M, TANAKA M, Van der VEER H W. Feeding and growth of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in relation to temperature and food supply [J]. Netherlands Journal of Sea Research, 1995, 34(1/3): 111 - 118.
- [5] 程丽娜,徐冬冬,李三磊,等. 高温胁迫对不同规格褐牙鲆生长性能的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2011, 20(3): 368 - 373.
- [6] 严福生. 牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 生长相关性状遗传力估计和耐热性状初步研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009: 37 - 45.
- [7] 方宣钧,吴为人,唐纪良. 作物 DNA 标记辅助育种[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [8] 池信才,卢钟磊,王义权,等. 褐牙鲆耐热性状相关的微卫星分子标记筛选[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2007, 46(3): 396 - 402.
- [9] VOS P, HOGERS R, BLEEKER M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23(21): 4407 - 4411.
- [10] YEH F C, YANG R C, BOYLE T. Population genetic analysis of codominant and dominant markers and quantitative traits [J]. Belgian Journal of Botany, 1997, 129(1): 157.
- [11] OZAKI A, SAKAMOTO T, KHOO S, et al. Quantitative trait loci (QTL) associated with resistance/susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2001, 265(1): 23 - 31.
- [12] 高国强,常玉梅,韩启霞,等. 大黄鱼耐低温性状相关微卫星标记的筛选[J]. 遗传学报, 2010, 32(3): 248 - 253.
- [13] 刘云国,陈松林,刘占江. 牙鲆抗鳃弧菌病 AFLP 分子标记筛选[J]. 中国水产科学, 2007, 14(1): 155 - 159.
- [14] WRIGHT S. Evolution and the genetics of populations [M]. Chicago: Univ. of Chicago Press, 1978: 79 - 103.
- [15] 李素红,张天时,孔杰,等. 中国对虾抗病性状遗传标记筛选及遗传多样性分析[J]. 渔业科学进展, 2009, 30(2): 54 - 59.
- [16] LIU Y G, CHEN S L, LI B F, et al. Analysis of genetic variation in selected stocks of hatchery flounder, *Paralichthys olivaceus*, using AFLP markers [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2005, 33(10): 993 - 1005.
- [17] LIU Y G, CHEN S L, LI B F. Assessing the genetic structure of three Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) stocks by microsatellite markers [J]. Aquaculture, 2005, 243(1/4): 103 - 111.
- [18] 匡友谊,佟广香,尹家胜,等. 呼玛河哲罗鱼遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 中国水产科学, 2007, 14(4): 615 - 621.
- [19] NEI M. Molecular evolutionary genetics [M]. New York: Columbia University Press, 1987.
- [20] LEBERG P L. Estimating allelic richness: effects of sample size and bottlenecks [J]. Molecular Ecology, 2002, 11(11): 2445 - 2449.
- [21] 刘海金,朱晓琛,孙效文,等. 牙鲆 5 个养殖群体的遗传多样性分析[J]. 中国水产科学, 2008, 15(1): 30 - 37.
- [22] SEKINO M, HARA M. Application of microsatellite markers to population genetics studies of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. Marine Biotechnology, 2001, 3(6): 572 - 589.
- [23] KIM W J, KIM K K, HAN H S, et al. Population structure of the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Korea inferred from microsatellite marker analysis [J]. Journal of Fish Biology, 2010, 76(8): 1958 - 1971.

The screening of molecular markers correlated to thermal-tolerance and genetic diversity analysis of selective stocks of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)

LI San-lei^{1,2}, XU Dong-dong², LOU Bao², XIN Jian², GENG Zhi^{1,2}, CHENG Guo-bao²

(1. College of Marine Science, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316004, Zhejiang, China; 2. Marine Fishery Institute of Zhejiang Province, Zhejiang Province Key Lab of Mariculture and Enhancement, Zhoushan 316100, Zhejiang, China)

Abstract: The studied Japanese flounders (*Paralichthys olivaceus*) were divided into two categories: thermal-tolerance stock and thermal-susceptible stock by exposing in heated water (32 °C). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) and microsatellite technology were employed to screen the molecular markers correlated to thermal-tolerance and analyze the genetic diversity of thermal-tolerance stock and thermal-susceptible stock of Japanese flounder. Eighty-one AFLP primer combinations and forty-two microsatellite primers were used to screen molecular markers correlated to thermal tolerance of Japanese flounder. AFLP and microsatellite loci which occurred in different genotype frequencies were analyzed using χ^2 -test to examine the correlation between the molecular markers and thermal tolerance in Japanese flounder. The results showed that the frequency of AFLP locus A3 was significantly higher in thermal-susceptible stock than that in thermal-tolerance stock, which indicated that this locus was negatively correlated with thermal tolerance, and the parameter of correlation was -0.453 ($P < 0.01$). Also, the frequencies of 4 AFLP loci were significantly higher in thermal-tolerance stock than those in thermal-susceptible stock, which indicated that the 4 loci were correlated with thermal tolerance ($P < 0.01$). Based on microsatellite analysis, the loci S1 and S2 amplified by Po25A and 205TUF showed to be negatively correlated with thermal tolerance, and the parameters of correlations were -0.408 ($P < 0.01$) and -0.398 ($P < 0.01$), respectively. In addition, the genetic diversity of thermal-tolerance stock and thermal-susceptible stock were analyzed using eight AFLP primer combinations and six microsatellite primers. The results showed high genetic variations in the two stocks, and the genetic diversity of the two stocks was comparable. The results of present study could be helpful for the selective breeding of heat-resistant flounders and provide reference basis for the stress resistance study of fish.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; AFLP; microsatellite; thermal tolerance; genetic diversity