

水产生物微卫星标记技术研究进展及其应用

孙效文, 张晓锋, 赵莹莹, 张研, 贾智英, 常玉梅, 鲁翠云, 梁利群

(中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 农业部北方鱼类生物工程育种实验室, 黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要: 微卫星标记的发展和利用极大地扩展了 DNA 分子标记应用的深度和广度, 使探索生物性状遗传本质的研究发生了革命性变化。本文简要介绍了微卫星标记技术的发展及其在水产遗传与育种研究中的应用。首先回顾了微卫星克隆技术的发展, 尤其是水产生物微卫星标记及技术的发展过程, 以及水产生物微卫星序列的主要来源, 并对微卫星标记与其他 DNA 分子标记在使用范围、难易程度等方面做了比较; 其次探讨了微卫星标记在遗传连锁图谱的制备、性状分析及 QTL 定位、群体遗传学、进化遗传、种质鉴定与亲权分析、品种培育等 6 个研究领域的应用; 本文还对几种 DNA 分子标记在操作上的难易程度、多态性程度、重复性与可比性等方面进行了比较, 同时还分别阐述了微卫星和其他 DNA 分子标记应用于水产生物研究中的适用性, 并对微卫星标记的应用前景做了展望。本文旨在为微卫星标记技术在水产生物中的有效应用提供理论依据。[中国水产科学, 2008, 15(4): 689-703]

关键词: 水产生物; 微卫星标记

中图分类号: S917

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)04-0689-15

遗传育种研究的大部分工作是利用遗传标记来完成的, 而遗传标记的分辨力决定着研究的深度和水平。微卫星标记是近似于理想的遗传标记, 具有中性、量大、共显性的特点。微卫星标记的出现使连锁图谱制备、性状分析等遗传研究发生了革命性的进步。本文回顾了水产生物微卫星标记技术的发展历程并对微卫星标记在水产生物遗传与育种研究中的作用与意义进行了概述, 旨在为微卫星标记技术在水产生物中的有效应用提供理论依据。

1 微卫星分子标记的发展

微卫星 DNA (Microsatellites DNA) 又称短串联重复序列 (Short Tandem Repeats, STRs) 或简单重复序列 (Simple Sequence Repeats, SSRs), 是广泛分布于真核生物基因组中的一种中度重复序列。在基因组研究的早期, 人们利用离心机分离基因组 DNA 时发现有一类 DNA 游离于主带之外, 类似于星球的卫星, 并将此类 DNA 叫做卫星 DNA, 卫星 DNA 是由长度超过 300bp 重复次数超

过 10 000 次的高度重复序列组成的。进一步研究之后, 将重复序列长度 14~70 bp 的叫做小卫星, 重复序列在 1~13 bp 的叫微卫星。Skinner 等^[1-3]早在 20 世纪 70 年代中期研究水产生物 (寄居蟹) 的基因组时, 已经报道了卫星 DNA 中存在微卫星序列。Hamada 等^[4]在 1982 年在人心肌肌动蛋白 (Ha-25) 的内含子中发现了 1 个重复 25 次的 TG 序列, 同时指出, 这一序列在人及其他真核生物的基因组中广泛存在。发明 DNA 指纹分析技术的英国科学家 Jeffreys 等^[5]发现与小微卫星一样在基因组离散性分布的、重复序列长度仅有 2~5 bp 的微卫星序列^[2]。微卫星标记技术的研究作为独立的研究领域, 逐渐成为遗传学家们最重视的遗传标记。Beckmann 等^[6]、Weber 等^[7-8]许多科学家根据微卫星的结构特点并结合新兴的 PCR 技术, 建立了以 PCR 技术为基础的检测方便的微卫星标记技术, 随后此技术获得了广泛应用, 并在当时人类基因组计划的遗传图谱研究中发挥了重大作用。随着微卫星标记技术的不断发展及应用, 水生生物学

收稿日期: 2008-03-12; 修订日期: 2008-06-04.

基金项目: 国家科技基础条件平台建设项目 (2006DKA30470-005); 国家重点基础研究计划项目 (2004CB117405); 农业部“引进国际先进农业科学技术”计划 [2007-G55 (A)]。

作者简介: 孙效文 (1955-), 男, 研究员, 博士生导师, 从事水产经济动物遗传育种研究。E-mail: sunxw2002@163.com

家们也开始应用此技术对水生生物进行研究^[9-10],并在1991年前后对鱼类(鲑科鱼类和罗非鱼)的微卫星标记进行了报道。下面分3部分对水产生物微卫星标记的开发及应用进行概述。

1.1 微卫星序列克隆技术的发展

利用微卫星标记技术进行研究的前提是首先要得到微卫星序列。目前已存在很多种克隆微卫星序列的方法,但最主要的有2种:经典的小片段基因组DNA随机克隆技术和生物素-磁珠富集技术^[11]。

小片段基因组DNA随机克隆技术就是基因工程中的质粒为载体的基因组DNA克隆技术,只是插入片段比较小。首先是利用酶切或机械剪切将基因组DNA打碎,分离出300~700 bp大小的片段,将这些目标片段连接到质粒载体上,并转化到大肠杆菌中建立一个基因组文库,最后用同位素或其他筛选技术筛选阳性克隆并测序,获得含微卫星序列的DNA片段,依据微卫星侧翼序列设计PCR引物,在目标生物中扩增出多态性片段即为多态性标记。人、小鼠及斑马鱼等模式生物大量的微卫星都是利用这种技术开发的^[12-14]。此方法的缺点是由于小片段随机克隆技术获得的阳性克隆率较低,很难获得足够用于群体遗传结构或建立图谱等研究所需的微卫星标记,这也是早期多数物种没有开发出足够的微卫星标记的原因。随机法的优点是可以根据获得微卫星结果计算出各种重复序列的组成比例,从而了解不同生物在基因组组成上的差别,这是富集法等其他克隆技术无法替代的。

为了提高克隆微卫星的效率,Kijas等^[15]发明了“生物素-磁珠”富集微卫星序列的克隆技术。对基因组DNA进行双酶切,将酶切获得的DNA小片段的两端连接上具有特定序列的接头(这个接头是为后来PCR扩增和筛选而设计的),然后用包裹着链霉亲和素的磁珠吸附携带微卫星重复序列的生物素,洗脱获得含重复序列的DNA片段,经过两次PCR扩增后,再克隆到质粒中,获得富集微卫星片段的克隆库。可以直接对这个库的克隆进行测序或经同位素探针等技术再筛选一次。作者所在实验室是利用同位素探针进行第2次筛选,可以较好地避免克隆库中的假阳性克隆^[16-17]。此方法出现后很快使多数非模式生物的微卫星序列尤其是水产生物的微卫星标记得以开发出来,使微卫星标记这一共显性标记很快用于种质鉴定和育

种研究之中,作者所在实验室用此技术已克隆了鲤(*Cyprinus capio* Linnaeus)、鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)等35个物种的微卫星。

随着对基因组结构认识的增加,依据微卫星序列特征并结合PCR反应的有关微卫星的标记技术还有:(1)内嵌ISSR引物扩增(Inter-simple Sequence Repeat)技术,又称ASSR(Anchored-simple Sequence Repeat),是一种类似RAPD但利用包含重复序列并在5'端或3'端锚定上2~4个寡聚核苷酸引物对基因组进行PCR扩增的标记系统^[18-19]。与基本微卫星技术相比,ISSR不要求预知基因组序列信息,大大减少了多态性分析的预备工作。同时它在模板的用量,实验繁琐程度和费用上也占有优势。其缺点在于ISSR为显性遗传标记,不能区分显性纯合基因型和杂合基因型。但在其他方法不能获得多态位点的情况下以及绝大多数缺乏分子遗传学研究背景的濒危动植物的遗传多样性水平评价中,ISSR可发挥极为重要的作用。(2)随机扩增微卫星DNA多态(RAMPs, Random Amplified Microsatellite Polymorphisms)。Wu等^[20]将5'端引物与RAPD引物结合起来扩增,即一端为锚定ISSR引物,另一端为RAPD引物,所得谱带既显示RAPD的多态性,又揭示出核心重复序列的差异,并且增加小分子量区域清晰可辨的带纹数目,减少反应背景。这些谱带的两端引物序列会存在3种情况,两端均是5'端锚定ISSR引物、两端均是RAPD引物以及一端为锚定引物另一端为RAPD引物。该项技术在种系亲缘关系研究中已有一些应用^[21]。(3)随机扩增杂交微卫星(Random Amplified Hybridization Microsatellite, RAHM)标记技术。这项技术是将随机扩增微卫星DNA多态技术做进一步延伸,先进行基因组的随机引物结合微卫星的DNA扩增,扩增产物进行电泳,对电泳凝胶进行Southern Blot转移,再用微卫星DNA核心序列作探针对转移膜进行杂交,放射自显影得到谱带。因为这种方法利用随机扩增片段内可能含有核心重复序列,经与之互补的探针杂交,便可检测到其多态性,所以得到的谱带有可能与电泳时得到的谱带迥然不同。(4)FIASCO(Fast Isolation by AFLP of Sequences Containing Repeats)技术,这是Zane等^[22]结合AFLP扩增和磁珠富集2种技术于一体,发展出来的简便且高效的微卫星克隆方法。基于磁珠富集的方法还有很多改进方案,包括接头

设计与 PCR 扩增技术的差别等,总之,微卫星克隆技术在磁珠富集法出现后已达到技术非常成熟的程度,即简便、快速、成本低。

1.2 目前水产动物微卫星序列的主要来源

1.2.1 直接克隆获得 水产生物尤其是中国的水产养殖生物有很多在世界上是独特的,如鲢、鳙、草鱼、土鲮鱼等,这些养殖种的微卫星标记只能由中国自己来制备。中国水产养殖动物的微卫星标记主要通过随机克隆法及磁珠富集法获得,但以磁珠富集法得到的微卫星较多。直接克隆主要是克隆基因组 DNA 的微卫星,最近也有从 cDNA 文库中筛选微卫星阳性克隆,经测序获得含微卫星的序列^[23-24]。

1.2.2 从网上公布的序列中获得 网上公布的序列有 DNA 和 cDNA 两种,都可能查到含有微卫星的序列。含有微卫星的 DNA 序列,可以直接用软件设计引物,直接进行序列的克隆^[25]。目前网上公布的 cDNA 序列多于 DNA 序列,从 cDNA 序列中得到多态性标记比从基因组 DNA 获得的微卫星标记的价值要大一些,这种标记相当于目前所定义的 I 型标记,但 cDNA 含有的微卫星序列其多态性远远低于基因组 DNA 微卫星的序列^[26];另外,由于内含子存在,cDNA 序列设计的引物可能扩增不出预期产物,这两点是从 cDNA 制备微卫星标记的不足之处。

1.2.3 借用其他物种的标记 这种情况在中国鱼类群体遗传结构研究中很常见,如利用鲤标记分析鲢、鳙、草鱼等的研究都有报道^[27-29]。前些年微卫星克隆技术不成熟且测序成本较高,获得微卫星标记比较困难,借用其他物种不失为一种权宜之计。但是,借用其他物种的引物筛选出可用的多态性标记的工作量较大,甚至比克隆所花费用和时间都要多,如果其侧翼与原物种的侧翼序列不完全相同时,还会给出错误的研究结果,更得不偿失,因此,借用其他物种的标记这一途径不应提倡。

1.3 微卫星标记与其他 DNA 分子标记的比较

目前, DNA 分子标记的划分方法比较多,有基于 PCR 反应和不基于 PCR 反应的划分法^[30],有 I 型标记(与基因有连锁关系的标记)和 II 型标记(与基因没有连锁的标记)划分法^[31],有显性和共显性划分法等等。就目前使用较多的 DNA 标记[RFLP、RAPD、AFLP、微卫星(SSR)、EST、SNP]而言,用显性与共显性划分实用性更强,概念也更

清楚。Fisher^[32]在 70 年前已提出共显性标记在种群遗传结构分析和性状追踪等研究上都明显优于显性标记的观点。如果从标记技术直接读取 DNA 扩增带型来判定,RFLP、RAPD、AFLP 这 3 种为显性标记,微卫星、EST、SNP 为共显性标记。当然,经过在子代的重组与分离检验,显性标记中可鉴定出一定比例的共显性标记,共显性标记中也有很小比例的显性标记。操作最为简单的是 RAPD 技术,20 世纪 90 年代初这一技术应用得非常广泛,但由于重复性差而使用的越来越少,但在应急事件中还是一个好方法;RFLP 的操作最为复杂,但相对稳定性高,目前仍是刑事案件的主要分析工具。RFLP 标记多利用特定的序列作为探针如人的 Alu 片段、小微卫星等以及线粒体 DNA 的酶切片段等,水产生物中线粒体的 RFLP 应用较多,核基因 RFLP 技术在水产生物中使用的不是很多;AFLP 是在 RAPD 之后发展出来的,因其具有不需要知道研究对象的序列信息及重复性相对高于 RAPD 的优点,应用相当广泛。作者认为 AFLP 很适合群体遗传结构分析,但由于有酶切、连接接头等复杂操作,不太适合实验室间要比较的研究工作,也不适合与历史资料比较的研究。微卫星、EST、SNP 这 3 种共显性标记中,目前使用最多的是微卫星标记,由于测序技术的快速发展,可用的 EST 标记也越来越多。最近国外很多实验室在大力开发 SNP 标记,但从标记的序列信息到个体基因型数据获得这个过程的难易程度来分析,由于 SNP 较微卫星分析多了一个 PCR 扩增后还要对结果测序这一复杂环节,使其操作难度和实验费用提高很大,但由于 SNP 可以制成芯片并由此可开展基因型分析的全自动化,且 SNP 的数量大,从 cDNA 序列获得的 SNP 标记如果有多态则很大程度上可与控制性状的基因连锁上,因此此标记技术是分子标记发展的方向。EST 在鉴定出具有多态性时确实是一个好的标记,也可作为 I 型标记来使用,但那些没有鉴别出多态性的标记其利用价值不大,如果能放到连锁图的确切位置上可以作为筛选基因的路标,但当水产生物在没有 RH 图谱及 BAC 库时,这样的标记利用价值就比较低。综合对比发现,微卫星标记的一大优点是共显性、重复性和可比性高的特征,使其具有所获长期资料的比对功能;另一个明显的优势就是随着工作的积累其应用价值越来越大,如鲤微卫星经 7~8 年积累的微卫星序列已有 3 000 多个,可以从任何遗

传背景不同的群体中筛选出足够的多态性标记来完成研究工作。

Liu 等^[30]对 DNA 分子标记在水产上的应用做了较为详细的总结,表 1 列出了各种标记在操作上的难易程度、多态性程度、重复性与可比性等性质和特征及其比较。

表 1 DNA 分子标记类型、遗传特点、使用简便性汇总

Tab. 1 Types of DNA markers, characteristics and degree of difficulty

标记类型 Marker type	预知信息 Requires prior molecular information	遗传特性 Mode of inheritance	类型 Type	位点数目 Locus under investigation	多态性水平 Polymorphism	技术难度 Degree of difficulty for use	重复性 Repeatability
mtDNA with PCR	Yes	母性遗传	—	单个	低	容易	高
RFLP	No	孟德尔,显性	II	多个	低	难	高
RAPD	No	孟德尔,显性	II	多个	中等	非常容易	低
AFLP	No	孟德尔,显性	II	多个	高	难	中等
SSR	Yes	孟德尔, 共显性	I 或 II	单个	高	非常容易	高
EST	Yes	孟德尔, 共显性	I	单个	低	非常容易	高
SNP	Yes	孟德尔, 共显性	I 或 II	单个	中等	难	高

2 微卫星标记在水产生物研究中的应用

尽管微卫星标记有着多态性丰富、共显性的优点,但在水产领域中的应用较 RAPD 和 AFLP 2 种标记缓慢许多。从文献报道的时间及内容上不难看出^[33-38],在过去的 10 多年中,水产科研领域中使用 RAPD 和 AFLP 2 种方法的较多,微卫星克隆及其应用研究只是在近 2 年才被广泛应用起来。中国前些年 RAPD 应用较多,而近 2 年微卫星的文献所占比例较高,而国外自 2001 年微卫星就占相关文献的主要地位,虽然近 2 年有 SNP 标记的报道,但文献还不多,详见图 1。

此外,作者还统计了 Journal of Fish Biology、Molecular Ecology、Animal Genetics 3 本杂志 1996~2007 年发表的水产生物遗传方面的文章,关于微卫星标记的 273 篇,其他方面如同工酶、AFLP、RAPD、RFLP 4 种标记的合计 177 篇,说明在水产生物遗传研究中使用微卫星较其他标记多。而国内在 2000 年前水产生物遗传标记研究以 RAPD 为主,基本上没有利用微卫星的文献报道,

这种现象与 Liu 等^[31]的统计一致,也说明国内水产科技领域在使用容易获得的标记如 RAPD 的研究跟进较快,而在使用难于获得的标记如微卫星标记进行研究时,初期跟进比较慢。

2.1 微卫星标记在遗传连锁图上的应用

第一代水产养殖动物的遗传连锁图谱出现于 20 世纪 90 年代,由于当时微卫星标记的数量还不足够,有关图谱上的遗传标记多由微卫星标记、RAPD 标记和 AFLP 等几种标记组成,如 Kocher 等^[39]的尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 图谱、Young 等^[40]的虹鳟图谱、Liu 等^[41]的沟鲶 (*Ictalurus punctatus*) 图谱等。大多数水产生物的第 1 代图谱的标记密度都比较低,难于满足性状精细的 QTL 研究的需要,有的第 1 代图谱连锁群仅有 2~3 个标记,基本上无法进行 QTL 定位分析^[42-43]。随着研究的深入,更多的多态性标记被鉴定出来,并相继报道了主要养殖种的第 2 代遗传连锁图谱,如罗非鱼^[44]、虹鳟 (*O. mykiss*)^[45]、鲤^[46],这些图谱都具有进行 QTL 精细分析的标记密度。

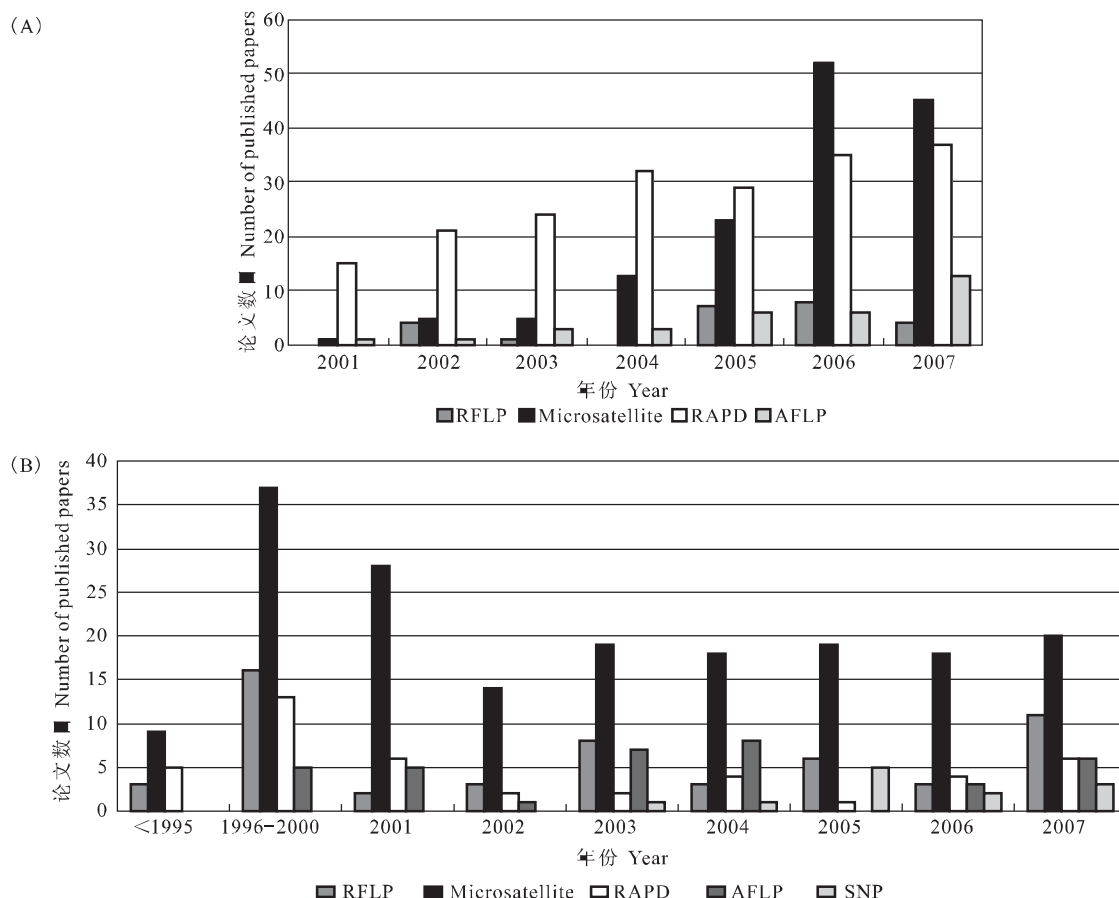


图1 不同分子标记类型发表的论文数目统计

注: (A) 为中文文献统计结果,检索中文维普期刊数据库中水产生物使用4种类型分子标记技术发表的论文数目,尚未检索到使用SNP标记技术的中文文献; (B) 为NCBI Pubmed中检索的主要水产生物(大西洋鲑、虹鳟、罗非鱼、虾、牡蛎、沟鲈、鲤和牙鲆)使用5种分子标记技术发表的论文数目。

Fig. 1 Number of papers using different molecular marker

目前遗传图谱建立的技术有了非常大的飞跃^[47],如标记技术已具备越来越接近理想的中性标记如II型DNA分子标记,数据处理技术从手工到多种计算机软件。但基本原理没有变化,只是从早期的两点测验扩展到多点测验(Multipoint test),根据重组率将遗传标记进行排序并计算遗传距离。多点测验通常采用似然比检验法,先对各种可能的基因排列顺序进行最大似然估计,然后通过似然比检验确定出可能性最大的顺序。在每次多点测验的时候,如果每个连锁群上标记数很多,则排列数会非常大就需要进行大量的统计分析,必须借助于计算机软件。目前主要的作图软件有:Linkage,利用最大似然法估计两座位或多座位间的重组率和LOD值,可通过<http://linkage.rockefeller.edu/>

software/linkage获得;MAPMAKER/EXP 3.0版,处理的群体类型包括回交家系BC、F₂自交家系、RILS重组近交系、全同胞家系等等,该软件可在<ftp://ftp-genome.wi.mit.edu/distributions/software/mapmaker3>免费下载。JoinMap 3.0是基于Join Map 2.0之上的修订版,适合BC1, F2, RILS, (双)单倍体、全同胞等群体,参见网点<http://www.kyazma.nl>。CRI-MAP,主要用于多点连锁分析。更多的软件参阅<http://linkage.rockefeller.edu/soft/>等网站。

2.2 微卫星标记在性状分析方面的应用

大多数经济性状属数量性状,数量性状在连锁图上的定位分析(QTL, Quantitative Traits Loci)是农业生物遗传研究的重要方面,是分子育种学科的基础研究。QTL定位是利用图谱和标记对性状进

行遗传分析,遗传学史上的第一张图谱就是通过性状的连锁分析得到的,可以说,性状的连锁分析与遗传图谱制备是遗传发展过程中密不可分的同一问题的2个方面。养殖鱼类QTL分析的报道很早就有报道,如虹鳟温度耐受性和传染性胰脏坏死病毒(IPNV)性疾病的抗性基因位点及沟鲈经济性状的QTL分析等^[48-50]。利用QTL结果进行育种研究虽有报道^[51],但产业上大规模使用这类品种还需要一段时间。水产生物的QTL研究主要以经济性状研究为主,也有少量其他性状如性别^[52]、饲料转化率^[53]、体质量与体长^[54]等。在QTL研究中,养殖鱼类积累最多的是虹鳟,OKAMOTO等^[55]在2005年总结了疾病、产卵时间等6个性状的QTL,不完全统计,至目前为止虹鳟QTL分析的性状已有16个。同脊椎动物或进化层次更高级的动物相比,鱼类更容易建立适于QTL分析的样本库,因此,对于性状的精细分析,鱼类无疑是比较好的研究对

象,虽然目前还没有足够的实验数据,但根据笔者的研究结果,同一物种的不同遗传背景(亲本来自不同品种制备的QTL样本库与同一品种制备的QTL样本库)应有不完全相同的QTL结果,因此,以育种研究为目标的QTL分析应该与育种研究同步进行,这样的育种研究才能事半功倍。

常用的QTL方法主要有以下几种:单标记分析法,区间作图法,复合区间作图法,多区间作图法。目前报道的QTL定位的结果通常采用 $LOD>3$, LOD值为 $\lg[L(r)/L(0.5)]$, $L(r)$ 为假设两座位间存在连锁的概率, $L(0.5)$ 为假设两座位间不存在连锁的概率。遗传连锁图密度越高, QTL定位将越准确。目前大多数QTL分析采用此方法,很多免费软件包如MAPMAKER/QTL^[56]和Cartographer 2.0^[57]可提供分析方法。

目前QTL分析的主要标记多使用微卫星标记和AFLP标记,具体研究情况详见表2。

表2 微卫星标记在鱼类数量性状定位中的应用
Tab. 2 Application of microsatellite markers in QTL analysis for fish

性状 Trait	相关的表型性状 Phenotypical trait	标记 Marker	QTL	物种 Species	参考文献 Reference
可数	骨刺, 腮耙, 侧板等	SSR	2-4	三棘刺鱼	[58, 59]
	幽门盲囊	AFLP/SSR	3	虹鳟	[60]
繁殖	产卵期	SSR	13	虹鳟	[61]
	繁殖速率	AFLP/SSR	3	虹鳟	[62]
可量	体质量	SSR	2	大西洋鲑	[63]
	体长	SSR	7	鲤	[64]
	抗病	SSR/AFLP	2-7	虹鳟	[65, 66]
抗逆	耐盐碱	SSR/SNP	2	罗非鱼	[67]
	抗寒	SSR	2	罗非鱼	[68]
	耐高温	SSR	3	虹鳟	[69]
其他	性别	SSR/GENE	2	罗非鱼	[70, 71]

QTL分析从理论上讲难度不大,但由于环境因素和标记数量的影响,获得确切的定位结果或者说得到具有育种潜力的QTL结果并不容易。10年前很多国家将经济性状的QTL分析列为水产生物基因组计划的主要目标,至今其仍是同类计划的主要目标。目前的研究进展较为缓慢,缺少足够的标记是主要原因。因此,要深入研究某一物种的经济性状,集中开发大量的微卫星标记是必要的前提条件。

2.3 微卫星标记在群体遗传学方面的应用

生物群体的遗传组成是群体所有基因型的集

合。生物群体发生变异或同一物种不同群体间的差异也主要表现在基因频率的不同上。比较显性标记,共显性标记的分析结果更能准确计算出群体的基因频率,而微卫星标记就是目前能大量得到的共显性标记。如图2所示,对一个二倍体而言,共显性标记在所有个体中都能获得表现型:电泳带,杂合子有2条,纯合子有1条,在任何条件下(平衡或不平衡)都可以清楚地计算出所有等位基因的频率;而显性标记在显性纯合子和杂合子都是1条,在隐性纯合子中没有带,只有在等位基因完全

平衡的条件下才能准确计算各等位基因的频率,而实际生物群体中多是偏离理论平衡值的,同时,显性个体与杂合子虽然能扩增出带型,但区分不出哪

个是杂合哪个是显性,而且隐性无带与 DNA 质量不高没有获得 PCR 产物的现象也混淆在一起难于分辨。

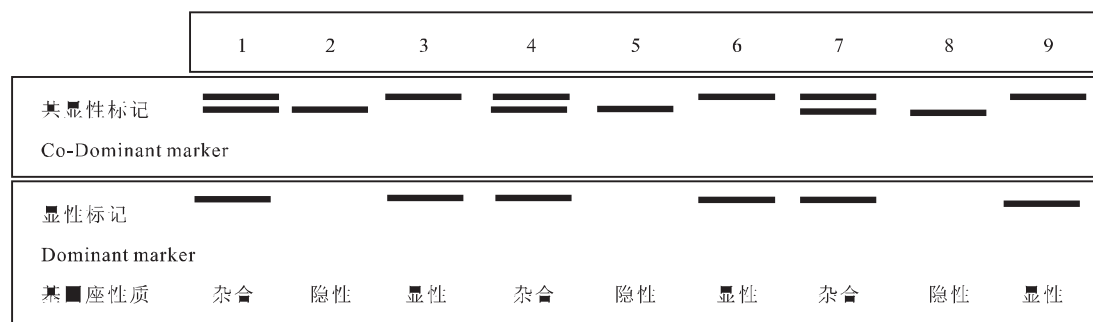


图2 共显性标记与显性标记 PCR 产物在电泳带型示意图

Fig. 2 Schematic drawing of electrophoresis for PCR products from Co-dominant and dominant molecular markers

利用微卫星进行水产生物群体的遗传组成研究,群体的样本量及标记数利用的合理性是至关重要的,否则,研究结果与水产生物群体的真实遗传组成会产生很大的差异。理论上讲,生物样本量与标记数之间属于多因子函数关系,可以根据标记的遗传特征确定最小样本量,但在实际研究中难以计算。鲁翠云等^[72]通过大群体进行鱼类基因型分析并设置8个样本数梯度,5个标记量梯度,对各种遗传参数的变化进行了统计分析。结果建议,在用微卫星进行水产动物群体分析时标记量应在20个以上,样本容量在45以上。

微卫星用于水生动物群体遗传结构的研究比较多,例如: Desvignes 等^[73]以微卫星与同工酶标记研究法国和捷克鲤养殖群体的遗传变异,发现微卫星变异水平较同工酶要高得多。常玉梅等^[74]以微卫星标记检测“江西三红”、黄河鲤 (*C. carpio* var.) 和黑龙江鲤的遗传多样性,证实黑龙江鲤基因组 DNA 多态性丰富,从遗传学角度看种质资源状况良好。Zhang 等^[75]以微卫星分析野生与养殖亚洲牡蛎 (*Crassostrea ariakensis*) 的遗传多样性,发现亚洲牡蛎存在2种具有一定程度生殖隔离的同域种群,群体间存在一定的遗传分化。Huang 等^[76]以微卫星标记分析澳大利亚维多利亚的红鲍 (*Haliotis rubra*) 的遗传结构时,发现这几个群体为遗传异质的,并且有一定的遗传分化现象。Sekino 等^[77]以微卫星标记研究皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*) 的野生群体与养殖群体间近交与遗传分化状况,结果发现群体间分化显著,2个群体均为非随

机交配群体,该情况可能是由遗传闭合群体的累加效应产生。

2.4 微卫星标记在进化方面的应用

系统发育 (Phylogeny) 是指所有分类单元的起源及进化关系^[78]。重建种群间的系统发育关系有助于种群的进化过程、生物地理学以及物种保护研究。随着分子系统发育学的兴起和发展,人们选用众多的分子标记应用于物种的系统演化和分类研究,选用不同的遗传标记对物种进行分类及系统进化,在对传统分类系统进行验证和补充的同时,亦可为传统分类系统中存在的有争议的,或者形态学尚不能解决的某些类群的系统发育学问题提供新手段。微卫星可以提供大量的多态性位点,而且进化速率很快,十分适用于分析亲缘关系较近的物种或种群的系统发育关系^[79-80]。Thorp^[81]通过分析研究认为,不同物种间遗传距离 $D_s=0.2\sim0.8$,同科属群体间 $D_s=0.5\sim0.9$,同种群体内 $ID_s=0.03\sim0.2$ 。通过对遗传距离的估算,重建物种间的系统发生,可估测品种间遗传结构和分化关系,聚类先后顺序反映了种群间亲缘关系的远近^[82]。

要阐明细微的遗传变异,必须有可靠的方法对物种间的遗传分化进行测定^[83]。微卫星标记得出的遗传距离能很好地反映分化时间的长短,能客观地反映群体间的遗传变异和分化。近年来微卫星在动物物种起源进化和系统发育研究中得到越来越多的应用。微卫星标记常用的构建系统树的方法有2种: 算术平均的不加权对群法 (UPGMA) 和邻接法 (NJ)。UPGMA 法是目前聚类分析中使用

得最多的一种聚合策略^[84]。当用来重建系统发生树时,其假定的前提条件是:在进化过程中,每一世代发生趋异的次数相同,即核苷酸取代速率是均等且恒定的。通过UPGMA法所产生的系统发生树可以说是物种树的简单体现。因此,这种方法较多地用于物种树的重建。NJ法的原始思路由Saitou和Nei提出^[85],后由Studier和Keppler修正^[86]。在重建系统发生树时,它取消了UPGMA法所作的假定。NJ法认为,在进化分支上,发生趋异的次数可以不同。计算机模拟试验已表明,它是最有效的基于距离数据重建系统发生树的方法之一。NJ法通过确定距离最近(或相邻)的成对分类单位来使系统树的总距离达到最小。

微卫星结构至少有2点可以用来探索生物进化研究,即侧翼序列的突变和重复次数长度的变化,这些变异将借助微卫星的共显性特性而方便地检测得到。微卫星序列变异本身就含有重要的物种进化信息^[87-88],但用微卫星来研究进化更多地还是利用其在同一基因座不同等位基因的重组与分离方面的分辨能力,从而得到物种结构与功能方面的进化信息。Amores等^[89]利用与HOX基因连锁的多态性标记探索斑马鱼HOX基因家族及其线性同源进化基因簇的遗传机制,揭示了鱼类多倍化历史事件^[90]。Kingsley等以三刺鱼进化出的海水和淡水2种生态适应类型为研究对象,利用微卫星等标记研究腹鳍等结构进化和性控机制的进化,鉴定出鱼类腹鳍相关基因与哺乳类骨盆控制基因之间的对应关系^[91-94]。Streelman等^[95-96]、Kocher等^[97]和Albersen等^[98]利用微卫星标记为探索马拉维湖区鲷科鱼快速进化遗传机制提供了重要依据,也提高了对牙齿形状进化、颌骨进化的理论认识。

国内学者利用微卫星对水产生物进化也做了大量的研究,梁利群等^[99]采用微卫星标记对5种鲟鲤鱼的亲缘关系进行了聚类分析,结果表明达氏鲟(鲟属)与史氏鲟、西伯利亚鲟(鲟属)为科内属间关系,与鱼类分类学的分类结果一致。全迎春等^[100]对4个鲤群体的遗传多样性研究结果显示,这4种鲤应属于同一科属或同一种群,与常玉梅等^[101]和邹曙明^[102]等研究结果一致。崔建洲等^[103]对野生红鳍东方鲀(*Fugu rubripes*)、野生假睛东方鲀(*Fugu pseudommus*)2个地理种群和1个养殖红鳍东方鲀群体进行了遗传多样性分析结果表明,红鳍东方鲀与假睛东方鲀应为同一个种,佐证了Song等^[104]的结

论。汪桂玲等^[105]分析五大湖野生群体三角帆蚌的遗传多样性及种间的亲缘关系,结果与其形态学和RAPD研究结果相似^[106-107],即洪泽湖与洞庭湖群体的亲缘关系较近,巢湖、鄱阳湖和太湖群体亲缘关系较近。鲁双庆等^[108]应用远缘种鲤的微卫星引物,对3个不同地域的黄鳝基因组DNA多态性进行研究,综合微卫星分析结果、黄鳝的外形特征及地理位置,推测广东黄鳝与湖南黄鳝为同一个生物种的不同地理种群,而孟加拉黄鳝为同属中另一个种。梁俊等^[109]采用微卫星标记探究日本鳗鲡和欧洲鳗鲡的进化关系,结果显示日本鳗鲡与欧洲鳗鲡两个远缘种之间遗传结构存在显著差异,推算2个种的分化时间约为200多万年。鲁双庆等^[110]分析普通鲫、红鲫、白鲫以及彭泽鲫种内的遗传多样性及种间的亲缘关系,结果证实越早分化出来的群体,遗传变异度越大,为前人的研究提供了佐证^[111-113]。全迎春等^[114]选取了微卫星标记分析镜鲤群体遗传多样性,结果聚类的先后与它们在地理分布上距离远近有一定的相关性。而谭杰等^[115]对烟台、威海、大连的3个野生仿刺参群体进行遗传分析发现,用UPGMA法得到3个群体的聚类分析图与3群体的地理分布不一致,分析认为这可能与黄、渤海的气候条件有关。董秋芬等^[116]研究中国南海海域9种石斑鱼遗传多样性和系统发生关系,结果表明石斑鱼内的系统发生与其种类的地理分布并不相关,与Maggio等^[117]、丁少雄^[118]、庄轩等^[119]的研究结果一致。

综合上述研究结果不难发现,形态进化和分子进化是各自独立并遵循不同的进化规律,分子生物学研究结果不可能完全替代由形态数据建立起来的系统发育关系,在某种程度上只能是对传统系统学的验证和补充。因此,在选用遗传标记时,应全面了解每一种标记的特点和适用范围,根据不同的分类目的选用不同的标记或几种标记联合使用,使所得结果更为合理可信。总之,传统的形态分类仍然是分类研究的前提和基础,只有将分子系统学与传统分类学结果结合起来,才有可能对生物多样性做出更好的描述和解释。

2.5 微卫星标记在水产生物种质鉴定方面的应用

水产生物种质鉴定包括:物种间的鉴定、物种内不同品种或不同地理群的鉴定、杂种的鉴定、亲子鉴定等。物种间鉴定较为简单,物种特异性标记比较多。如果从操作难易程度和成本角度考虑,RAPD技术应该是首选;如果考虑到鉴定工作的繁

锁性如需要反复进行,则微卫星是很好地选择。物种内不同品种或不同地理群的鉴定比较复杂,多数分子标记都难于找到品系特异性或群体特异性的标记。对于杂交来源的品种或品系,筛选出目标品种/品系特异标记的难易程度不同,要个案处理。对于同一物种不同地理群,筛选群体特异性标记也是有难有易。在中国,要找到鲤、草鱼、鲢、鳙群体的特异性标记比较困难,多数特异性标记都被异地移植所导入的外来等位基因所淹没。对于得不到品种间或地理群间特异标记的情况,通过基因频率进行区分是唯一的选择。杂种的鉴定也是一样,不同种的鉴定比较简单,同一物种不同品系或不同地理群的杂交很难得到好的鉴定结果。

在目前通用的 DNA 分子标记中,线粒体 DNA、小卫星指纹技术较多用于种系鉴定研究。线粒体的 RFLP 技术、基于测序的点突变分析技术、基于 PCR 的线粒体特定片段分析技术在人类与鱼类的种系鉴定中都非常成熟,虽然线粒体的 RFLP 技术近年由于多态性低和操作复杂渐渐用得少了,但基于 PCR 技术的线粒体特定区(如 D-loop 区,细胞色素 b 等)的碱基突变检测应用的还比较多。小微卫星指纹图谱至今仍是人类亲权分析的主要技术,鱼类早期种系研究也是利用此种技术较多^[120-123]。AFLP 也是前几年使用较多的种系鉴定技术^[124-125]。由于鱼类微卫星属共显性遗传,可以准确计算出所有等位基因的频率,因此在上述种质鉴定中具有一定的优越性。随着微卫星数量的积累和质量提高,微卫星技术越来越多地用于种系研究。Nielsen 等^[126]利用基于微卫星标记建立的所谓“草堆寻针”技术,区分并鉴定出在引进外来种多年后的 5 条丹麦的河流中仍有土著原种;Aldbieser 等^[127]针对目前无法鉴定沟鲶的不同品种和不同群体的技术弱点,利用从 120 多个微卫星中筛选出的 8 个特异标记,成功区分了美国农业部批准的优良沟鲶品种 USDA103 与其他沟鲶品系。

如何利用分子标记将一个新创建的品种与同物种的其他品种分开是提高品种管理技术水平的一个环节,微卫星在其工作中有非常大的应用空间。对种源多,混杂度高的中国水生生物来讲,建立可区分同种不同地理群或不同品种(系)的种质鉴定技术对产业的发展是至关重要的,而微卫星由于其共显性和重复性高等特征为研究者提供了建立所需鉴定技术的条件。

2.6 微卫星标记在遗传育种方面的应用

目前,微卫星标记用于水产动物的育种研究主要在 2 个方面,一是用微卫星分析群体、家系和个体的遗传差异,利用这些差异计算出群体间、家系间和个体间的遗传距离,再结合表型确定亲本配组方案,达到既优选出表型,又避免近亲交配的目的;二是依据 QTL 等性状分析结果,利用与性状相关的微卫星等标记或基因来筛选出性状优良的个体,再从优秀个体建立品种或品系^[128-129]。Fuji 等^[130]根据牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)的 QTL 的分析结果,进行抗病育种的选育得到了较好的研究结果。孙效文等^[131-132]建立了鲤的基于微卫星标记的群体选育和育成品种的优化技术,并在品种选育中得到了较好的研究结果,选育的 2 龄镜鲤有一批优良个体的体质量达到 4 500 g,可使育种速度提高 1 倍以上。

3 展望

无论从基因组 DNA 中克隆微卫星还是从 cDNA 中克隆微卫星的技术都已非常成熟,经典的小片段克隆技术对一般研究单位难度较大,但“生物素-磁珠富集法”及相应的改进技术已非常简便且易于操作,稍有分子生物学技术的实验人员都可很方便地获得大量的微卫星序列;其次,目前测序技术成本已相当低,利用 cDNA 库测序来筛选微卫星成本尚可接受;再次,目前通过网络可查到很多物种的微卫星序列、基因组 DNA 序列和 cDNA 序列。由于技术成熟和有价值的序列资源较丰富,因而获得微卫星标记在技术上和方法上都不再困难。除了极少的有创新性的微卫星克隆技术出现之外,微卫星克隆研究不再是一个技术创新点,微卫星标记技术的研究重点将转向如下方面:(1)利用微卫星序列鉴定出多态性高且扩增效果好的标记;(2)通过 QTL 定位获得微卫星标记与某个性状的紧密连锁关系,这样的微卫星标记就提升为基因标记(Gene marker),成为 I 型标记;(3)在鉴定优质标记的基础上开展应用研究。

在继续大力开发微卫星标记的同时,应注意到 I 型标记较一般的微卫星标记更可能与性状相关基因连锁在一起,同时 SNP 标记可以进行全自动分析,这些特点使得从 cDNA 序列中或直接从基因组 DNA 序列中开发 SNP 标记成为当前分子标记领域的研究热点。

在水产各领域的研究中,利用哪种分子标记更为简便且有效率,这与多种因素有关,如经验、实验条件、研究者的技术水平等。表3中归纳了

不同研究工作中所选择的标记,以供读者在研究工作中参考。

表3 DNA分子标记在水产遗传研究中的利用
Tab.3 Application of DNA molecular markers in aquaculture genetic research

目的 Task	推荐引物 (一次) Recommend marker (one time)	推荐引物 (重复) Recommend marker (Repeats)	其他有用引物 Other useful marker
物种鉴定 Species identification	RAPD	MS (RAPD)	AFLP
家系鉴定 Strain identification	MS	MS (RFLP)	RAPD
杂交子鉴定 Hybrid identification	RAPD	MS	AFLP
亲子鉴定 Paternity identification	MS	MS	RFLP
遗传连锁图谱 Linkage map	MS (AFLP)	MS (SNP)	I Type
QTL 图谱 QTL mapping	MS (I type)	MS (SNP)	EST

参考文献:

- [1] Skinner D M, Beattie W G, Blattner F R, et al. The repeat sequence of a hermit crab satellite deoxyribonucleic acid is (-T-A-G-G-)n-(-A-T-C-C-)n[J]. *Biochemistry*, 1974, 13 (19): 3 930-3 937.
- [2] Selsing E, Leslie A G, Arnott S, et al. Conformations of satellite DNAs[J]. *Nucleic Acids Res*, 1976, 3 (10): 2 451-2 457.
- [3] Tautz D, Renz M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes[J]. *Nucleic Acids Res*, 1984, 25; 12 (10): 4 127 4 138.
- [4] Hamada H, Petrino M G, Kakunaga T. A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79: 6 465-6 469.
- [5] Jeffreys A J, Royle N J, Wilson V, et al. Spontaneous mutation rates to new length alleles at tandem-repetitive hypervariable loci in human DNA[J]. *Nature*, 1988, 332 (6 161): 278-281.
- [6] Beckmann J S, Soller M. Towards a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellites[J]. *Bio / technology*, 1990, 8: 930-932.
- [7] Weber J L, May P E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction[J]. *Am J Hum Genet*, 1990, 44: 388 396.
- [8] Weber J L. Human DNA polymorphisms and methods of analysis[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 1990, 1: 166 171.
- [9] Taggart J B, Ferguson A. Minisatellite DNA fingerprinting of salmonid fishes[J]. *Animal Genetics*, 1990, 21: 377 389.
- [10] Bentzen P, Harris A, Wright J M. Cloning of hypervariable minisatellite and simple sequence microsatellite repeats for DNA fingerprinting of important aquaculture species of salmonids and tilapia[C]. In: Burke T, Dolf G A., Jeffreys A J, et al, eds. *DNA Fingerprinting: Approches and Applications*, Basel: Birkhauser Verlag, 1991: 243 262.
- [11] 孙效文, 贾智英, 魏东旺, 等. 磁珠富集法与小片段克隆法筛选鲤微卫星的比较研究 [J]. *中国水产科学*, 2005, 12 (2): 126-132.
- [12] Chang Ya-Hui, Su Wen-Hui, Lee Tso-Ching. TPMD: a database and resources of microsatellite marker genotyped in Taiwanese populations[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, Vol. 33: Database issue D174-D177.
- [13] Lindqvist A K, Magnusson P K, Balciuniene J. Chromosome-specific panels of tri- and tetranucleotide microsatellite markers for multiplex fluorescent detection and automated genotyping: evaluation of their utility in pathology and forensics[J]. *Genome Res*, 1996, 6: 1 170-1 176.
- [14] Knapik E W, Goodman A, Atkinson O S. A reference cross DNA panel for zebrafish anchored with simple sequence length polymorphisms[J]. *Development*, 1996, 123: 451-460.
- [15] Kijas JMH, Fowler JCS, Garbett C A. Thomas MR: Enrichment of microsatellites from the Citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles[J]. *Bio Techniques*, 1994, 16: 656-662.
- [16] JIA Z, Sun X, Liang L, et al. Isolation and characterization

- of microsatellite markers from Fangzheng silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio* (Bloch)) and cross-amplification in the closely related species crucian carp (*C. auratus auratus* (Linnaeus)) [J]. *MEN*, 2006, 6: 1 141 1 143.
- [17] TONG G, KUANG Y, YIN J, et al. Isolation of microsatellite DNA and Analysis on genetic diversity of endangered fish, *Hucho taimen* (Pallas) [J]. *MEN*, 2006, 6: 1 099-1 101.
- [18] Gupta M, Chyi Y-S, Romero-Severson J, et al. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats [J]. *Theoret Appl Gen*, 1994, 89: 998-1 006.
- [19] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, 20: 176-183.
- [20] Wu K S, Jones R, Danneberger L, et al. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning [J]. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22 (15): 3 257 3 258.
- [21] 吴晓雷, 贺超英, 陈受宜, 等. 用 SSR 分子标记研究大豆属种间亲缘进化关系 [J]. *遗传学报*, 2001, 28 (4): 359 366.
- [22] Zane L, Bargellon L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation: a review [J]. *Molecular Ecology*, 2002, 11 (1): 1-16.
- [23] Cheng L, Yu X, Liao X, Tong J. Development of EST-SSRs by an efficient FIASCO-based strategy: a case study in rare minnow (*Gobiocypris rarus*) [J]. *Animal Biotechnology*, 2007, 18: 1-10.
- [24] 鲁翠云, 全迎春, 李大字, 等. 用鲤鱼 EST-SSRs 分子标记分析长江黑龙江鲤种群结构 [J]. *农业生物技术学报*, 2007, 15 (6): 947-952.
- [25] 郝君, 孙效文, 孟雪松, 等. 红鳍东方鲀 BAC 数据库和 SETs 数据库中微卫星的筛选与应用 [J]. *大连水产学院学报*, 2007, 22 (2): 97 101.
- [26] 孙效文, 梁利群. 斑马鱼 SSLP 标记检测检测鲤鱼种间的遗传多态性 [J]. *中国水产科学*, 2001, 8 (2): 5 6.
- [27] 廖小林, 俞小牧, 谭德清, 等. 长江水系草鱼遗传多样性的微卫星 DNA 分析 [J]. *水生生物学报*, 2005, 29: 113 119.
- [28] Tong J, Wang ZW, Wu Q J, et al. Cross-species amplification in silver carp and bighead carp with microsatellite primers of common carp [J]. *MEN*, 2002, 2: 245-248.
- [29] Lin KD, Luo C. Preliminary study on applicability of microsatellite primers developed from common carp for genomic analysis of grass carp [J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2003, 12 (2): 121-127.
- [30] 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, 2000.
- [31] Liu Z J, Cordes J. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics [J]. *Aquaculture*, 2004, 238: 1 37.
- [32] Fisher R A. Has Mendel's work been rediscovered? [J]. *Annals Sci*, 1936, 1: 115-137.
- [33] Wright J M, Bentzen P. Microsatellites: genetic markers for the future [J]. *Fish Biol Fish*, 1994, 4: 383-388.
- [34] 孙效文, 梁利群, 闫学春, 等. 遗传标记与鱼类育种 [J]. *水产学杂志*, 1995, 8 (1): 86-89.
- [35] O'connell M, Wright J M. Microsatellite DNA in fishes [J]. *Fish Biol Fish*, 1997, 7: 331-363.
- [36] Herbingen C M, Reith M E, Jackson T R. DNA markers and aquaculture genetics [M]. In *Recent Advances in Marine Biotechnology*. Vol 10: Molecular genetics of marine organisms. Fingerman M, Nagabhushanam R.. Enfield USA Plymouth: Science Publishers, 2003.
- [37] Zhang X, Tong J, Xiong B. Applications of microsatellite markers on studies of genetics and breeding of fishes [J]. *Chin J Agr Biotechnol*, 2006, 3 (2): 83 87.
- [38] 王伟, 尤锋, 高天翔. 鱼类微卫星标记的研究进展 [J]. *Mar Sci*, 2006, 30 (10): 81-86.
- [39] Kocher T D, Lee W J, Sobolewska H, et al. A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Genetics*, 1998, 148: 851-858.
- [40] Young W P, Wheeler P A, Coryell V H, et al. A detailed linkage map of rainbow trout produced using doubled haploids [J]. *Genetics*, 1998, 148: 839-850.
- [41] Liu Z, Karsi A, Li P, et al. An-AFLP-based genetic linkage map of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) constructed by using an interspecific hybrid resource family [J]. *Genetics*, 2003, 165: (2), 687 694.
- [42] 孙效文, 梁利群. 鲤鱼的遗传连锁图谱 (初报) [J]. *中国水产科学*, 2000, 7 (1): 1 6.
- [43] Sun Xiaowen, Liang Liqun. A genetic linkage map of common carp (*Cyprinus carpio* L.) and mapping a locus associated with cold tolerance trait [J]. *Aquaculture*, 2004, 238 (1-4): 165 172.
- [44] Lee B Y, Lee W J, Streelman J T, et al. A Second-generation genetic linkage map of tilapia (*Oreochromis* spp.) [J]. *Genetics*, 2005, 170 (1): 237-244.
- [45] Nichol K M, Young W P, Danzmann R G. A consolidated linkage map for rainbow trout [J]. *Animal Genetics*, 2003, 34: 102-115.

- [46] Zhang Y, Liang L Q, Sun X W, et al. A Second-generation genetic linkage map of common carp [J]. *Genetics*, 2008 (In press).
- [47] Sturtevant A H, Morgan T H. The linear arrangement of six sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association [J]. *J Exper Zool*, 1913, 14: 43–59.
- [48] Jackson T R, Ferguson M M, Danzmann R G, et al. Identification of two QTL influencing upper temperature tolerance in three rainbow trout half-sib families [J]. *Heredity*, 1998, 80: 143–151.
- [49] Ozaki A, Sakamoto T, Khoo S, et al. Quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance/susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout [J]. *Mol Genet Genomics*, 2000, 265: 23–31.
- [50] Liu Z J, Dunham R. Genetic linkage and QTL mapping of ictalurid catfish. Alabama Agr. Exp [J]. *Sta Cir Bulletin*, 1997, 321: 1–19.
- [51] Fuji K, Hasegawa O, Honda K, et al. Marker-based breeding of a lymphocytis disease-resistant Japanese flounder [J]. *Aquaculture*, 2007, 272: 291–295.
- [52] Lee B-Y, Hulata G, Kocher T D. Two unlinked loci controlling the sex of blue tilapia (*Oreochromis aureus*) [J]. *Heredity*, 2004, 92 (6): 543–549.
- [53] 张义凤, 张研, 鲁翠云, 等. 鲤鱼微卫星标记与体重、体长和体高性状的相关分析 [J]. *遗传*, 2008, 30 (5): 613–619.
- [54] Reid DP, Szanto A, Glebe B, et al. QTL for body weight and condition factor in Atlantic salmon: comparative analysis with rainbow trout and Arctic charr [J]. *Heredity*, 2005, 94: 166–172.
- [55] Okamoto N K, Fuji E, Ohara T, et al. Strategy for marker-assisted breeding, status of genetic linkage maps, and QTL for aquaculture species [C]. // 生物技术对水产业的促进作用—2005 水产科技论坛论文集. 北京: 海洋出版社, 2006: 114–125.
- [56] Lander E S, Green P. Construction of multilocus genetic maps in humans [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1987, 84: 2 363–2 367.
- [57] Wang L, Song L, Chang Y, et al. A preliminary genetic map of Zhikong scallop (*Chlamys farreri* Jones et Preston 1904) [J]. *Aqu Res*, 2005, 36: 643–653.
- [58] 常玉梅, 孙效文. 水产养殖动物遗传连锁图谱及 QTL 定位研究进展 [J]. *动物学研究*, 2006, 27 (5): 533–541.
- [59] Peichel C L, Nereng K S, Ohgi K A, et al. The genetic architecture of divergence between threespine stickleback species [J]. *Nature*, 2001, 414: 901–905.
- [60] Zimmerman A M, Wheeler P A, Ristow S S, et al. Composite interval mapping reveals three QTL associated with pyloric caeca number in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Aquaculture*, 2005, 247: 85–95.
- [61] Sakamoto T, Danzmann R G, Okamoto N, et al. Linkage analysis of quantitative trait loci associated with spawning time in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Aquaculture*, 1999, 173: 33–43.
- [62] Robison B D, Wheeler P A, Sundin K, et al. Composite interval mapping reveals a major locus influencing embryonic development rate in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Heredity*, 2001, 92: 16–22.
- [63] Reid D P, Szanto A, Glebe B, et al. QTL for body weight and condition factor in Atlantic salmon (*Salmo salar*): comparative analysis with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) [J]. *Heredity*, 2005, 94: 166–172.
- [64] 张研, 梁利群, 常玉梅, 等. 鲤鱼体长性状的 QTL 定位及其遗传效应分析 [J]. *遗传*, 2007, 29 (10): 1 243–1 248.
- [65] Ozaki A, Sakamoto T, Khoo S, et al. Quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance/susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Mol Genet Genom*, 2001, 265: 23–31.
- [66] Ozaki A, Khoo S, Yoshiura Y, et al. Identification of additional quantitative trait loci (QTL) responsible for susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus in rainbow trout [J]. *Fish Pathol*, 2007, 42: 131–140.
- [67] Lee W J. Detection of QTL for salinity tolerance of tilapia [C]. *Plant & Animal Genomes XI Conference*, 2003.
- [68] Cnaani A, Hallerman E M, Ron M, et al. Detection of a chromosomal region with two quantitative trait loci, affecting cold tolerance and fish size, in an F2 tilapia hybrid [J]. *Aquaculture*, 2003, 223: 117–128.
- [69] Danzmann R G, Jackson T R, Ferguson M M. Epistasis in allelic expression at upper temperature tolerance QTL in rainbow trout [J]. *Aquaculture*, 1999, 173: 45–58.
- [70] Lee B Y, Hulata G, Kocher T D. Two unlinked loci controlling the sex of blue tilapia (*Oreochromis aureus*) [J]. *Heredity*, 2004, 92: 543–549.
- [71] Shirak A, Seroussi E, Cnaani A, et al. Amh and Dmrt2 Genes Map to tilapia (*Oreochromis* spp.) linkage group 23 within quantitative trait locus regions for sex determination [J]. *Genetics*, 2006, 174: 1 573–1 581.

- [72] 鲁翠云, 金万昆, 孙效文, 等. 样本容量对养殖群体内主要遗传结构分析参数的影响 [J]. 农业生物技术学报, 2008 (印刷中).
- [73] Desvignes J F, Laroche J, Durand J D, et al. Genetic variability in reared stocks of common carp (*Cyprinus carpio* L.) based on allozymes and microsatellites[J]. Aquaculture, 2001, 194: 291-301.
- [74] 常玉梅, 孙效文, 梁利群. 中国鲤几个代表种群基因组 DNA 遗传多样性分析 [J]. 水产学报, 2004, (5): 481-486.
- [75] Zhang Q, Allen S K, Reece K S. Genetic variation in wild and hatchery stocks of suminoe oyster (*Crassostrea ariakensis*) assessed by PCR-RFLP and microsatellite markers[J]. Mar Biochnol, 2005, 7: 588-599.
- [76] Huang BX, Peakall R, Hanna PJ. Analysis of genetic structure of blacklip abalone (*Haliotis rubra*) populations using RAPD, minisatellite and microsatellite markers[J]. Mar Biol, 2000, 136: 207-216.
- [77] Sekino M, Saido T, Fujita T, et al. Microsatellite DNA markers of Ezo abalone (*Haliotis discus hannai*): a preliminary assessment of natural populations sampled from heavily stocked areas[J]. Aquaculture, 2005, 243: 33-47.
- [78] 邹喻萍, 葛颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 1-139.
- [79] Goldstein D B, Pollock D D. Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference[J]. Hered, 1997, 88: 355-342.
- [80] 盛岩, 郑蔚虹, 裴克全, 等. 微卫星标记在种群生物学研究中的应用 [J]. 植物生态学报, 2002, 26 (增刊): 119-126.
- [81] Thorp J P. The molecular clock hypothesis: Biochemical evolution, genetic differentiation, and systematics [J]. Annual Review of Ecology Systematics, 1982, 13 (1): 139-168.
- [82] 邢荣莲, 丁君, 滕利平, 等. 3 种鲍基因组 DNA 多态性的 RAPD 分析 [J]. 大连水产学院学报, 2003, 18 (3): 191-196.
- [83] Crawford A M, LittlePohn R P. The use of DNA marker in deciding conservation priorities in sheep and other livestock [J]. Animal Genetic Resources Information, 1998, 23: 21-26.
- [84] Sneath PHA, Sokal R S. Numerical taxonomy: the principle and practice of numerical classifications [M]. San Francisco: Freeman and Com, 1973.
- [85] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. Mol Biol Evol, 1987, 4 (4): 406-425.
- [86] Studier J A, Keppler K J. A note on the neighbor-joining algorithm of Saitou and Nei[J]. Molecul Biol Evol, 1988, 5: 729-731.
- [87] Liu ZJ, Jensen JW. Aquaculture has great expectations of the genome revolution [M]. In: Celebration of the 50 Years of DNA, A Commemorative Book for the discovery of the DNA structure by Francis Crick and James Watson. London: Cambridge, 2003: 50-52.
- [88] Zardoya R, Vollmer D M, Craddock C, et al. Evolutionary conservation of microsatellite flanking regions and their use in resolving the phylogeny of cichlid fishes (Pisces: Perciformes) [J]. Proc Biol Sci, 1996, 22: 263 (1376): 1589-1598.
- [89] Amores A, Force A. Y-L, Yan L, et al. Zebrafish *hox* clusters and vertebrate genome evolution [J]. Science, 1998, 282: 1711-1714.
- [90] O'Brien S J, Eisenberg J F, Miyamoto M, et al. Genome maps 10. Comparative genomics. Mammalian radiations wall chart [J]. Science, 1992, 86: 463-478.
- [91] McKinnon J S, Mori S, Blackman B K, et al. Evidence for ecology's role in speciation [J]. Nature, 2004, 429 (6989): 294-298.
- [92] Peichel C L, Ross J A, Matson C K, et al. The master sex-determination locus in threespine sticklebacks is on a nascent Y chromosome [J]. Curr Biol, 2004, 14 (16): 1416-1424.
- [93] Shapiro M D, Marks M E, Peichel C L, et al. Genetic and developmental basis of evolutionary pelvic reduction in threespine sticklebacks [J]. Nature, 2004, 428: 679-782.
- [94] Colosimo P F, Hosemann K E, Balabhadra S, et al. Widespread parallel evolution in sticklebacks by repeated fixation of ectodysplasin alleles [J]. Science, 2005, 307: 1928-1933.
- [95] Schliewen U K, Kocher T D, McKaye K R, et al. Evolutionary Biology: evidence for sympatric speciation? [J]. Nature, 2006, 444: E12-13.
- [96] Kocher T D. Adaptive evolution and explosive speciation: the cichlid fish model [J]. Nature Reviews Genetics, 2004, 5: 288-298.
- [97] Streelman J T, Webb J F, Albertson R C, et al. The cusp of evolution and development: A model of cichlid tooth shape diversity [J]. Evol Devel, 2003, 5: 600-608.
- [98] Albertson R C, Streelman J T, Kocher T D, et al. Integration and evolution of the cichlid mandible: the molecular basis of alternate feeding strategies [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 102: 16287-16292.

- [99] 梁利群,孙效文,董崇智,等. 5种鲟、鳊鱼基因组 DNA 遗传多样性分析[J]. 中国水产科学,2002,9(3): 273-276.
- [100] 全迎春,孙效文,梁利群. 应用微卫星多态分析四个鲤鱼群体的遗传多样性[J]. 动物学研究,2005,26(6): 595-602.
- [101] 常玉梅,孙效文,梁利群. 中国鲤几个代表种群基因组 DNA 遗传多样性分析[J]. 水产学报,2004,28(5): 481-486.
- [102] 邹曙明,楼允东,孙效文,等. 用 RAPD 方法研究草鱼、柏氏鲤和3个地理种群鲤的亲缘关系[J]. 中国水产科学,2000,7(1): 6-11.
- [103] 崔建洲,申雪艳,杨官品,等. 红鳍东方鲀与假睛东方鲀的微卫星 DNA 多态性分析[J]. 高技术通讯,2005,15(12): 90-96.
- [104] Song L, Liu B, Xiang J, et al. Molecular phylogeny and species identification of pufferfish of the genus *Takifugu* (Tetraodontiformes, Tetraodontidae) [J]. Mar Biotechnol, 2001,3: 398.
- [105] 汪桂玲,袁一鸣,李家乐. 中国五大湖三角帆蚌群体遗传多样性及亲缘关系 SSR 分析[J]. 水产学报,2007,31(2): 152-158.
- [106] 李家乐,钱荣华,鲍宝龙,等. 中国五大湖三角帆蚌群体遗传多样性 RAPD 分析[J]. 上海水产大学学报,2005,14(1): 1-5.
- [107] 钱荣华,李家乐,覃志国,等. 中国五大湖三角帆蚌形态差异分析[J]. 海洋与湖沼,2003,34(4): 112-119.
- [108] 鲁双庆,刘少军,刘红玉,等. 黄鳝微卫星引物筛选及其在保护遗传学上的应用[J]. 水产学报,2005,29(5): 612-618.
- [109] 梁俊,李道季,卢莉琼. 日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 和欧洲鳗鲡 (*A. anguilla*) 的微卫星差异[J]. 海洋与湖沼,2003,34(4): 414-421.
- [110] 鲁双庆,刘臻,刘红玉,等. 鲫鱼4群体基因组 DNA 遗传多样性及亲缘关系的微卫星分析[J]. 中国水产科学,2005,12(4): 371-376.
- [111] 刘筠,刘少军,孙远东,等. 多倍体鲫鲤[J]. 中国农业科技导报,2003,5(6): 3-6.
- [112] 张辉,董新红,叶玉珍,等. 三个三倍体鲫鱼种群及野鲫 mtDNA 的比较研究[J]. 遗传学报,1998,25(4): 330-336.
- [113] 侯亚义,袁传密. 异育银鲫、鲫和白鲫的肌浆蛋白及同工酶 (Est, MDH) 的电泳比较研究[J]. 南京师范大学学报: 自然科学版,1989,12(3): 69-74.
- [114] 全迎春,李太宇,曹鼎臣,等. 微卫星 DNA 标记探讨镜鲤的种群结构与遗传变异[J]. 遗传,2006,28(12): 1541-1548.
- [115] 谭杰,孙慧玲,刘萍,等. 3个仿刺参地理种群遗传变异的微卫星 DNA 分析[J]. 水产学报,2007,31(4): 437-442.
- [116] 董秋芬,刘楚吾,郭显嵩,等. 9种石斑鱼遗传多样性和系统发生关系的微卫星分析[J]. 遗传,2007,29(7): 837-843.
- [117] Maggio T, Andaloro F, Hemida F. A molecular analysis of some Eastern Atlantic grouper from the *Epinephelus* and *Mycteroperca* genus[J]. J Experim Mar Biol Ecol,2005,321(1): 83-92.
- [118] 丁少雄,王颖汇,王军,等. 基于 16S rDNA 部分序列探讨中国近海 30 种石斑鱼类的分子系统进化关系[J]. 动物学报,2006,52(3): 61-68.
- [119] 庄轩,丁少雄,郭丰,等. 基于细胞色素 b 基因片段序列研究中国近海石斑鱼类系统进化关系[J]. 中国科学 (C 辑),2006,36(1): 27-34.
- [120] Taggart J B, Ferguson A. Minisatellite DNA fingerprinting of salmonid fishes[J]. Ani Gen,1990,21: 377-389.
- [121] Harris A S, Bieger S, Doyler W, et al. DNA fingerprinting of tilapia, *Oreochromis niloticus*, and its application to aquaculture genetics[J]. Aquaculture,1991,92: 157-163.
- [122] Carter R E, Mair G C, Skibinski D O F, et al. The application of DNA fingerprinting in the analysis of gynogenesis in tilapia[J]. Aquaculture,1991,95: 41-52.
- [123] Herlinger R W, Doyle E R, Pitman D, et al. DNA fingerprint based analysis of paternal and maternal effects on offspring growth and survival in communally reared rainbow trout[J]. Aquaculture,1995,137: 245-256.
- [124] Ccongiu L, Dupanloup I, Patarnello T, et al. Identification of interspecific hybrids by amplified fragment length polymorphism: the case of sturgeon[J]. Mol Ecol,2001,10: 2355-2359.
- [125] Young W P, Ostberg C O, Keim P, et al. Genetic characterization of hybridization and introgression between anadromous rainbow trout and coastal cutthroat trout [J]. Mol Ecol,2001,10: 921-930.
- [126] Nielsen E, Bach H M. Looking for a needle in a haystack: discovery of indigenous Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in stocked population[J]. Conservation Genetics,2001,2: 219-232.
- [127] Aldbieser G C, Wolters W R. Definition of the USDA103 strain of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. Animal Genetics,2007,38(2): 180-183.
- [128] 孙效文,梁利群,鲁翠云,等. 水产分子育种研究进展[J]. 中国水产科学,待发表.
- [129] Hayes B, Baranski M, Goddard M E, et al. Optimisation of marker assisted selection for abalone breeding program[J].

- Aquaculture, 2007, 265: 61-69.
- [130] Fuji K, Hasegawa O, Honda K, et al. Marker-based breeding of a lymphocytis disease-resistant Japanese Flounder [J]. Aquaculture, 2007, 291-295.
- [131] 孙效文, 鲁翠云, 匡友谊, 等. 分子标记指导的镜鲤群体选育 [R]. 发明专利公报, 2008, 24(7).
- [132] 孙效文, 鲁翠云, 匡友谊, 等. 分子标记指导的镜鲤育成品种的遗传结构估计 [R]. 发明专利公报, 2008, 24(7).

Development and application of microsatellite markers in aquatic species

SUN Xiao-wen, ZHANG Xiao-feng, ZHAO Ying-ying, ZHANG Yan, JIA Zhi-ying, CHANG Yu-mei, LU Cui-yun, LIANG Li-qun

(Heilongjiang Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China)

Abstract: The development and application of microsatellite markers largely expands the depth and breadth of DNA markers application in the aquatic industry, and brings about a revolutionary change to researches on the genetic nature of biological traits. In this paper, the progress of microsatellite markers and their application in aquatic species genetics and breeding were introduced. The development course of the microsatellite markers cloning was presented. In particular, the technology of cloning microsatellite sequences in aquatic species was introduced, and the main resources of microsatellite markers in aquatic species were also reviewed. A comparison was conducted between microsatellite markers and other DNA molecular markers including AFLP, RFLP, RAPD and SNP in different aspects such as application scope and degree of difficulty in use. The application of microsatellite markers in aquatic researches were also presented, including making genetic linkage maps, studying biological traits and quantitative trait loci (QTL), population genetics, germplasm identification, evolutionary genetics, fish breeding etc. Another comparison was conducted by using some tables and figures to show the degree of difficulty in application, polymorphism information contents (PIC), repeatability and communication etc. between microsatellite markers and other DNA molecular markers. Consequently, suitability of different DNA markers used in aquatic researches were shown. Finally, future prospects on using microsatellite markers in fish breeding, germplasm identification and evaluation were presented. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(4): 689-703]

Key words: aquatic animal; microsatellite markers