

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.01243

“ 黄海 1 号 ” 中国明对虾抗逆性状 SRAP 标记

陈华增^{1,2}, 李健¹, 王清印¹, 何玉英¹, 李吉涛¹, 戴芳钰¹, 王学忠³

1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;
2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306;
3. 山东省昌邑市海丰水产养殖有限责任公司, 山东 潍坊 262600

摘要: 采用序列相关扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)分子标记技术, 结合分群分析法(bulk segregate analysis, BSA)对中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)高氨氮和高 pH 胁迫敏感组和耐受组进行分析研究, 筛选出与高氨氮或高 pH 耐受性相关的遗传标记。应用 110 对 SRAP 引物进行筛选研究, 根据在 BSA 基因池产生的差异, 筛选出与高氨氮耐受相关引物 77 对, 与高 pH 耐受相关引物 102 对, 以用于验证分析。根据片段在群体中出现频率和变化规律, 筛选出 6 个可能与高氨氮耐受性相关的分子遗传标记, 其中耐受高氨氮负相关标记 1 个, 正相关标记 5 个; 7 个可能与高 pH 耐受性相关的分子遗传标记, 其中耐受高 pH 负相关标记 2 个, 正相关标记 5 个。对获得的 13 个序列片段进行回收, 连接于 pMD-18T 载体后转化于大肠杆菌 TOP10 感受态细胞, 进行了克隆和测序。将测序结果进行了 BLAST 分析比对, 发现测得片段序列与数据库中序列同源性较低(一般都低于 15%), 未找到与之同源性较高的功能基因, 推论这些特异性序列片段标记可能与高氨氮或高 pH 耐受性性状密切相关, 后续群体验证工作正在进行, 以期筛选出与中国明对虾抗逆性状密切相关的序列特征性片段扩增区域(sequence characterized amplified region, SCAR)分子标记, 为分子标记辅助育种提供技术支持。

关键词: 中国明对虾; 氨氮; pH; SRAP; 分群分析法; 抗逆性状

中图分类号: S96

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)06-1243-07

中国已经或正在开发养殖的海水动植物种类已达到上百种, 但由于缺乏良种, 海水养殖的绝大部分种类的苗种繁育需要依赖野生亲体。随着养殖世代的增加, 海洋生物成活率普遍降低, 虽然病害发生是重要原因, 但是缺乏经过遗传改良的高产、优质、抗逆性强的优良品种也是重要因素之一。

SRAP(sequence-related amplified polymorphism, 序列相关扩增多态性)技术是美国加州大学植物系的 Li 和 Quiros 于 2001 年研究芸薹(*Brassicaceae*)属植物时开发的新型分子标记技术^[1]。目前主要应用于遗传多样性分析^[2-3]、遗传

图谱构建^[4-5]、杂种优势预测^[6-7]、重要性状标记及基因定位^[1,8]等研究, 具有简便、稳定、产率高、信息量丰富和便于克隆等特点。

大多数经济动物的重要经济性状(如生长性状、抗病性等)受许多数量基因位点以及环境因素的共同影响而表现出数量性状的遗传学特点, 传统的经典遗传育种研究手段基本上无法析别一个重要性状的产生究竟是由哪个具体的基因控制。因此越来越多的研究人员筛选和建立有效的遗传分子标记, 将分子标记技术与传统选育方法相结合, 以期实现遗传改良的目的, 并已取得一系列的进展^[9-10]。中国水产科学研究院黄海水产研究

收稿日期: 2011-02-18; 修订日期: 2011-05-15.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(40706052); 国家科技支撑计划专题(2006BAD01A13); 农业部公益性行业专项(nyhyzx07-042); 国家虾产业技术体系资助项目(nyeytx-46).

作者简介: 陈华增(1983-), 男, 硕士, 研究方向为对虾遗传育种. E-mail: huazeng114@163.com

通信作者: 王清印, 研究员, 博士生导师. E-mail: qywang@public.qd.sd.cn

所自 1997 年开始进行中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)快速生长养殖新品种的选育研究,至 2003 年成功培育出“黄海 1 号”中国明对虾新品种,其具有明显的生长速度快、抗逆性强等优点,显示出良好的发展前景^[11]。本研究利用 SRAP 技术结合分群分析法(bulk segregate analysis, BSA)对“黄海 1 号”中国明对虾抗高氨氮和抗高 pH 性状进行分析,以期筛选出与中国明对虾抗逆性状相关的分子遗传标记,为进一步的遗传连锁图谱构建、基因定位以及种质资源保护和最终的分子标记辅助育种提供技术支撑和理论参考。

1 材料与方 法

1.1 材料

实验材料为 2008 年根据“黄海 1 号”中国明对虾人工选育群体构建的 51 个家系,挑取蜕皮间期个体养殖于山东省昌邑市海丰水产养殖有限责任公司保种池中。对虾样本体长(85.45±1.21) mm,体质量(8.75±0.95) g。

1.2 胁迫实验

2008 年 7 月,从保种池中每家系随机取样 50 尾健康蜕皮间期中国明对虾,暂养于室内水泥池对应围格内,严格统一的日常管理。暂养 3 d 后,氨氮胁迫利用 NH₄Cl 调节水体氨氮质量浓度为 64 mg/L, pH 胁迫试验是利用 NaOH 调节水体 pH 到 9.2, 分别进行胁迫试验四次,每 24 h 1 次。胁迫

后每隔 2 h 将死亡个体捞出,记录死亡时间。根据胁迫后个体存活时间正态分布,取左右两个极端各 5 个家系个体作为敏感组和耐受组。

1.3 基因组 DNA 的提取

中国明对虾总 DNA 的提取采用酚氯仿方法^[12],用 ND1000 核酸检测仪检测所提 DNA 溶液浓度和纯度,并将其稀释为 160 ng/μL 备用。

1.4 SRAP 引物设计与扩增

根据相关文献^[13-14]筛选出的 SRAP 引物(正向引物 10 条和反向引物 11 条)(表 1)由上海生工生物技术公司合成。SRAP-PCR 反应在 Eppendorf Mastercycler egradient S PCR 扩增仪上进行,聚丙烯酰胺凝胶电泳在北京六一 DYY-10C 型电泳仪上进行。

中国明对虾 SRAP 体系: 20 μL 反应体系中包含 1.0 U*Taq* 酶, 2.0 mmol/L 的 Mg²⁺, 40.0 ng 的模板 DNA, 0.125 mmol/L 的 dNTP 以及 0.4 μmol/L 的引物。

中国明对虾 SRAP-PCR 程序: 94℃ 预变性 5 min; 前 5 个循环程序: 94℃, 1 min; 35℃, 1 min; 72℃, 1 min。随后 35 个循环: 94℃, 1 min; 50℃, 1 min; 72℃, 1 min。72℃ 延伸 10 min, 4℃ forever。

PCR 扩增结束后,向产物中加入 4 μL Loading Buffer(10 mmol/L EDTA [0.5 mol/L, pH8.0], 98% 甲酰胺, 0.025% 溴芬兰, 0.025% 二甲苯青)。混匀后,取 5 μL PCR 产物在 8% 非变性聚丙烯酰胺

表 1 SRAP 引物编号及序列
Tab.1 Number and sequence of SRAP primers

正向引物 forward primer	序列(5'-3') sequence(5'-3')	反向引物 reverse primer	序列(5'-3') sequence(5'-3')
M1	TGAGTCCAAACCGGATA	E1	GACTGCGTACGAATTAAT
M2	TGAGTCCAAACCGGAGC	E2	GACTGCGTACGAATTTGC
M3	TGAGTCCAAACCGGAAT	E3	GACTGCGTACGAATTGAC
M4	TGAGTCCAAACCGGACC	E4	GACTGCGTACGAATTTGA
M5	TGAGTCCAAACCGGAAG	E5	GACTGCGTACGAATTAAC
M6	TGAGTCCAAACCGGTAA	E6	GACTGCGTACGAATTGCA
M7	TGAGTCCAAACCGGTCC	E7	GACTGCGTACGAATTCAA
M8	TGAGTCCAAACCGGTGC	E8	GACTGCGTACGAATTCTG
M9	TGAGTCCAAACCGGTAG	E8	GACTGCGTACGAATTCGA
M10	TGAGTCCAAACCGGTCT	E10	GACTGCGTACGAATTCAG
		E11	GACTGCGTACGAATTCOA

凝胶中 800 V 预电泳 30 min, 1 000 V 恒压电泳 90 min。待指示剂跑出胶板即停止电泳, 凝胶经 10% 醋酸固定、水洗、银染、显影、定影、阴干后, 采集图像并记录结果。

1.5 BSA 分池与引物的筛选

取胁迫试验获得的敏感组和耐受组样本分别 25 个, 每个样本取 10 μ L DNA 溶液混合构成相应的敏感池和耐受池。以 110 对 SRAP 引物分别对两个 DNA 池进行 PCR 扩增, 根据 BSA 池(bulk segregate analysis gene pool)是否出现差异条带, 筛选合适引物以进行群体扩增分析。

1.6 中国明对虾个体的 SRAP-PCR 扩增

根据 BSA 池 DNA 的 SRAP-PCR 扩增情况, 初步筛选出在两个 DNA 池扩增出现差异基因片段的 SRAP 引物, 按照建立的中国明对虾 SRAP 反应体系与程序对敏感组和耐受组分别 30 个实验样本进行扩增, 筛选扩增产生的特异条带。

1.7 特异片段的回收、克隆与测序鉴定

聚丙烯酰胺凝胶电泳后对在敏感组和耐受组中出现差异的条带利用 OMEGA 胶回收试剂盒回收。对回收的特异条带 DNA 利用相应引物进行 SRAP-PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳检测后, 利用 TIANgen 琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的条带。回收 DNA 连接于 pMD-18T 载体上后, 转化于大肠杆菌 TOP10 感受态细胞, 培养于 LB 培养基, 挑取阳性克隆培养, 培养的菌液用于提取质粒, 检测后利用相应 SRAP 引物扩增, 符合目的片段大小的菌液样品应用限制性内切酶 *Eco*I 和 *Sal*I 进一步确定目的片段准确的连接转化, 保种后送华大基因测序。对测序结果进行 Blast 同源性检测。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 提取

共提取中国明对虾敏感组和耐受组个体各 60 个 DNA 样本, 2% 琼脂糖凝胶电泳检测发现 DNA 质量较好, 满足本实验要求。

2.2 BSA 分池的 SRAP-PCR 扩增

据方法所述, 分别构建了高氨氮和高 pH 胁迫后的耐受池和敏感池。用 110 对 SRAP 引物对

耐受池和敏感池进行 PCR 扩增, PCR 产物经 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 银染后统计结果见图 1。

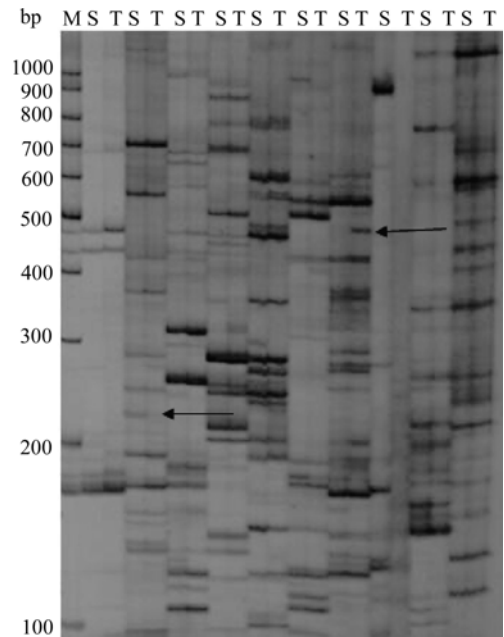


图 1 部分 SRAP 引物的 BSA 分析扩增图

M: 100 bp DNA Marker; S: 敏感池; T: 耐受池; 箭头所示特异条带 M 后每一组 S、T 为 1 对引物扩增结果。

Fig.1 Banding patterns of BSA analysis via some SRAP primers

M: 100 bp DNA Marker; S: Sensitive DNA pool; T: Tolerant DNA pool; Arrow showed special SRAP band each group of S、T band as BSA analysis of one SRAP primer combination.

通过 110 对引物的筛选, 其中有 77 对引物在氨氮敏感组和耐受组, 102 对引物在 pH 敏感组和耐受组中出现差异条带, 或者在产物量上存在不同量的特异条带。条带大小自 100~1 500 bp 不等, 主要在 1 000 bp 大小内。

2.3 SRAP 引物在敏感组和耐受组的群体扩增

据 BSA 分池扩增结果获得的出现特异条带的 SRAP 引物, 对耐受组和敏感组样品每个个体样本进行群体分析(图 2)。77 对引物在氨氮敏感和耐受组中共产生 1 155 个位点, 扩增条带大小自 100~1 500 bp 不等, 但多集中在 1 000 bp 内。共获得 6 个可能与高氨氮耐性相关的片段, 占标记总数的 0.52%, 其中正相关片段(特定序列片段仅在耐受组中出现, 在敏感组中不出现, 即视为与抗

逆正相关;反之,为负相关)5个,负相关片段1个。102对引物在pH敏感和耐受组共产生1530个位点,其中7个为可能与高pH耐性相关的核苷酸片段,占标记总数的0.45%,其中耐受性正相关片段5个,负相关片段2个。

2.4 特异条带回收、克隆及测序

将特异条带回收,经相应SRAP引物扩增回收的模板DNA连接转化,培养,提取质粒,酶切确定目的片段(图3)后测序。抗高氨氮性状相关特异分子标记测序后,获得序列长度在166~571bp间,与预期片段大小基本一致。各序列已提交至GenBank,接受号自GU570681至GU570686(表2)。抗高pH性状相关特异分子标记测序获得序列长度在104~1093bp间,各序列GenBank接受号自GU570687至GU570693(表2)。经NCBI在线BLAST比对发现获得的氨氮或pH特异片段序列与数据库中序列相似性均较低(一般小于15%),未找到同源性较高的功能基因组。

3 讨论

Michelmore^[15]提出了群体分析法(BSA)用于快速筛选与特定基因或者染色体区域连锁的分子标记。一般寻找与某一性状相连锁的分子标记的方法通常是分子标记技术结合BSA法或近等位基因系分析法。但由于中国明对虾的一年生生物学特性,无法进行回交,并且目前构建的中国明对虾连锁图谱的精密度和饱和度还不够高,因此利用BSA法是获得与目标性状连锁的分子标记的快捷途径^[16]。

SRAP标记技术自提出后已在植物研究领域获得广泛应用,融合传统分子标记技术(如RAPD、AFLP等)优点表现出简便、稳定、产率高、信息量丰富等技术特点,但目前该技术在水产动物相关研究中应用甚少。笔者经优化建立了中国明对虾SRAP技术体系,并在遗传结构分析中获得应用性验证(另文发表),结果显示SRAP标记技术是进行中国明对虾遗传分析研究的优良

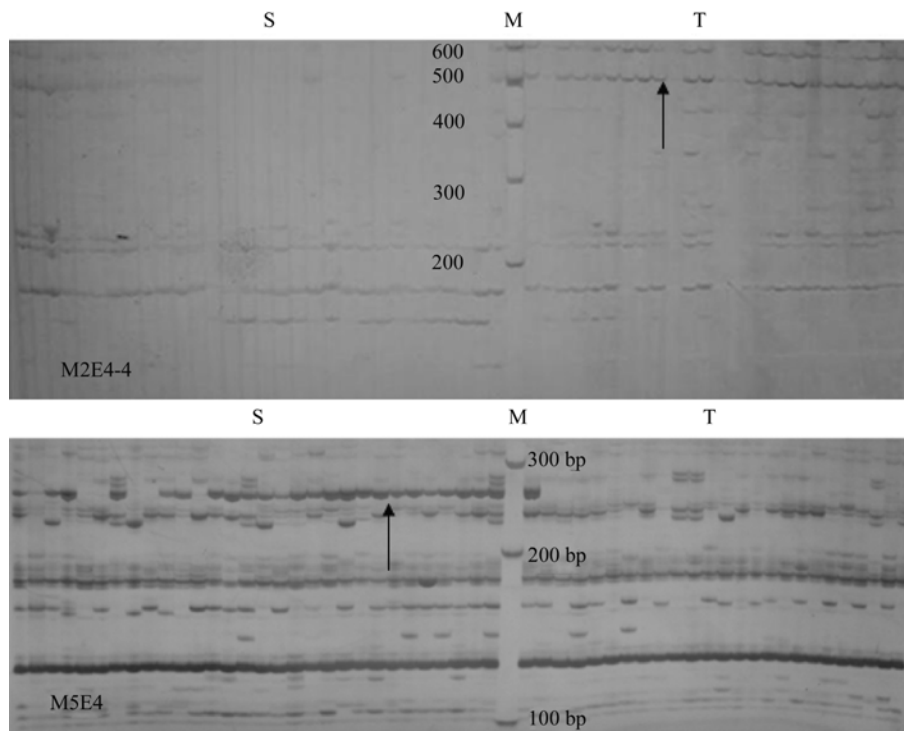


图2 SRAP引物(M2E4, M5E4)扩增获得特异条带(箭头所示)

M: 100 bp DNA Marker; S: 敏感组; T: 耐受组; 箭头所示特异条带.

Fig.2 Some special bands amplified by SRAP primers(M2E4, M5E4)

M: 100 bp DNA Ladder Marker; S: Sensitive group; T: Tolerant group; Arrows showed special SRAP markers.

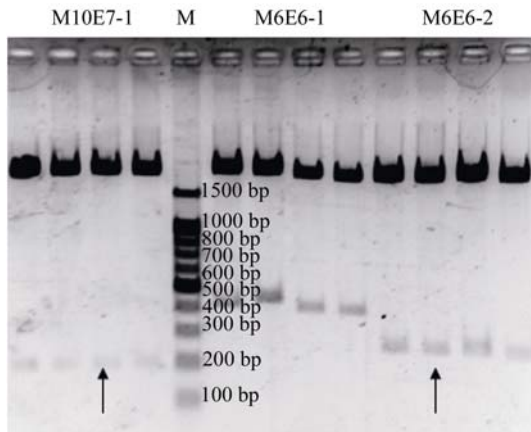


图 3 部分特异片段质粒 DNA 酶切结果检测

自左到右(每 4 泳道为同一片段)依次为: M10E7-1, M6E6-1, M6E6-2; 中间 M 为 100 bp DNA Marker; 箭头所示为酶切出的目的片段。

Fig.3 Some restriction enzyme digestion of special plasmid DNA

From left to right (each 4 lanes from the same fragment) were M10E7-1, M6E6-1, M6E6-2; the middle was 100 bp DNA Marker; the arrows mean the target fragment via restriction enzyme digestion.

表 2 中国明对虾抗逆性状相关特异标记的克隆与测序
Tab.2 Cloning and sequencing for some special markers related to tolerance trait in *F. chinensis*

序号 no.	引物组合 primer combination	GenBank 序列号 GenBank accessing no.	片段大小/bp fragment length
1	M8E3	GU570681	166
2	M2E4-3	GU570682	571
3	M2E4-4	GU570683	480
4	M6E6-1	GU570684	418
5	M6E6-2	GU570685	243
6	M10E7-2	GU570686	198
7	M6E2	GU570687	327
8	M7E9-2	GU570688	104
9	M1E10	GU570689	1093
10	M2E2-2	GU570690	377
11	M2E4	GU570691	480
12	M4E8	GU570692	381
13	M2E1	GU570693	269

工具。本研究将 SRAP 技术与 BSA 法相结合, 依据标记在敏感组和耐受组中出现的频率及变化规律, 共筛选出 6 个与抗高氨氮性状相关的特异性遗传标记, 占总位点数的 0.52%, 标记大小在 166~571 bp 之间; 7 个与抗高 pH 性状相关标记, 占总

位点数的 0.45%, 标记大小自 104 bp 至 1 093 bp。不足 1% 的特异标记频率发生改变也说明, 本研究进行抗高氨氮和抗高 pH 群体选育的潜力还很大, 可为进一步地选育研究提供丰富的材料。

研究表明^[17], 氨氮胁迫影响对虾免疫相关基因的表达。细角滨对虾暴露于氨氮溶液后, 酚氧化酶原和细胞黏附蛋白的转录编码量下降了 50%~60%。SRAP 的鲜明特点之一是依靠特定设计的引物结合基因组开放阅读框进行 PCR 扩增。本研究利用 SRAP 对获得特异条带序列进行分析证实了该理论, 发现每条序列中至少含有 1 个开放阅读框, 多者可达 3~4 个。理论上开放阅读框中是外显子区域, 包含大量功能基因, 但本研究筛选出的共 13 个特异性遗传标记经 BLAST 比对后未发现与之相似性很高的功能基因组, 基本上相似性都低于 15%, 这一结果与利用 RAPD 和 AFLP 技术筛选中国明对虾生长性状和抗病标记研究中结论类似^[18-21]。未发现相似性高的功能基因可能有以下几方面原因: 首先, 因为抗高氨氮和高 pH 功能由数量性状遗传位点控制, 即由许多小的有效基因进行控制, 而目前关于氨氮和 pH 的研究主要集中在毒性和免疫等影响方面, 对于抗逆性相关基因研究报道很少; 其次是目前对中国明对虾基因组的功能基因尚未完全清楚, 研究中获得 SRAP 标记所对应功能基因可能未被认识。对于已找到的特异性分子标记进行 BLAST 分析时虽未发现与其同源性较高的功能基因, 但可推测其与高氨氮或高 pH 耐受性状密切相关。由于抗逆机理的复杂性, 抗逆反应中的许多细节尚不清楚, 亟需更深入的研究和探索; 最后, 所获得序列片段长度在 600 bp 内, 而在 NCBI 所比对的已知基因序列长度为上万甚至十万级, 所以会出现相似性低的现象。实验室正在对获得的 SRAP 序列片段进行大规模群体相关性验证研究, 确定合适稳定的序列特征性片段扩增区域(sequence characterized amplified region, SCAR)遗传标记, 同时尽快利用共显性分子标记技术建立高密度、兼容性好的遗传连锁图谱, 将获得的性状相关标记定位于连锁图谱, 为分子标记辅助育

种奠定坚实基础。

与传统育种方法相比,分子标记辅助育种具有缩短育种周期、提高育种效率以及受环境影响小等明显优势。本研究获得的 SRAP 分子标记可为选育适应力更强、适应范围更广的中国明对虾新品系提供技术支持和理论参考,对于加速中国明对虾的分子标记辅助育种进程具有基础推动作用。植物在逆境(干旱、盐碱、低温、病害等)胁迫下的生理变化和抗逆反应研究已基本清楚^[22],且随着分子生物学的发展,人们已从基因组成、表达调控和转录表达等方面进行了抗逆机理的研究,已经克隆出一些抗逆相关基因^[23]。而这些都是中国明对虾乃至动物关于抗逆研究的方向和重点。

参考文献:

- [1] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*[J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103:455-461.
- [2] Uzun A, Yesiloglu T, Aka-Kacar Y, et al. Genetic diversity and relationships within *Citrus* and related genera based on sequence related amplified polymorphism markers (SRAPs) [J]. *Scientia Horticulturae*, 2009, 121(3): 306-312.
- [3] Liu L W, Zhao L P, Gong Y Q, et al. DNA fingerprinting and genetic diversity analysis of late-bolting radish cultivars with RAPD, ISSR and SRAP markers[J]. *Scientia Horticulturae*, 2008, 116(3):240-247.
- [4] Gao L X, Liu N, Huang B H, et al. Phylogenetic analysis and genetic mapping of Chinese *Hedychium* using SRAP markers[J]. *Scientia Horticulturae*, 2008, 117(4): 369-377.
- [5] Sun Z, Wang Z, Tu J, et al. An ultradense genetic recombination map for *Brassica napus*, consisting of 13551 SRAP markers[J]. *Theor Appl Genet*, 2007, 114(1): 305- 317.
- [6] Jiang H F, Ren X P, Huang J Q. Acid components in arachis species and interspecies hybrids with high oleic and low palmitic acids[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2009, 3(1): 25-32.
- [7] Riaz A, Li G, Quresh Z. Genetic diversity of oilseed *Brassic napu* inbred lines based on sequence-related amplified polymorphism and it s relation to hybrid performance [J]. *Plant Breeding*, 2001, 120 (5): 411-415.
- [8] Jin M Y, Li J N, Fu F Y, et al. QTL analysis of the oil content and the hull content in *Brassica napus* L[J]. *Agricultural Sciences in China*, 2007, 6(4): 414-421.
- [9] Carr W, Sweeney J, Swingle J. The Oceanic Institute's SPF shrimp breeding program status[C]. USMSFP (US Marine Shrimp Farming Program) 10th Anniversary Review, GCRL: Special Publication, 1994, 47-54.
- [10] Wyban J A, Swingle J S, Sweeney J N, et al. Specific pathogen-free *Penaeus vannamei*[J]. *World Aquaculture*, 1995, 24: 39-45.
- [11] 李健, 刘萍, 何玉英, 等. 中国对虾快速生长新品种“黄海 1 号”的人工选育[J]. *水产学报*, 2005, 29(1):1-5.
- [12] 刘萍, 徐怀恕. 中国对虾黄、渤海沿岸地理群的 RAPD 分析[J]. *海洋学报*, 2000, 22(5):88-93.
- [13] 雷剑, 柳俊. 一种与马铃薯青枯病抗病连锁的 SRAP 标记的筛选[J]. *中国马铃薯*, 2006, 20(3): 150-153.
- [14] 张丽, 姜树坤, 张喜娟, 等. 水稻沈农 606 抗稻瘟病基因遗传分析及 SRAP 标记筛选[J]. *分子植物育种*, 2007, 5(1): 64-68.
- [15] Michelmore R W. 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[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1991, 88: 9828-9832.
- [16] 张天时, 刘萍, 李健, 等. 中国对虾与生长性状相关微卫星 DNA 分子标记的初步研究[J]. *海洋水产研究*. 2007, 27(5): 34-39.
- [17] Le M G, Haffner P. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea[J]. *Aquaculture*, 2000, 191(1-3): 121-131.
- [18] 刘萍, 孟宪红, 孔杰, 等. 对虾抗病性状遗传标记的 RAPD 分析[J]. *水产学报*, 2002, 26(3): 268-274.
- [19] 孟宪红, 孔杰, 刘萍, 等. 中国明对虾抗白斑综合症病毒分子标记的筛选[J]. *中国水产科学*, 2005, 12(1): 14-19.
- [20] 何玉英, 刘萍, 李健, 等. 中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 与生长性状相关 SCAR 标记的筛选[J]. *海洋与湖沼*, 2007, 38(1): 42-48.
- [21] Yue Z Q, Wang W J, Kong J, et al. Isolation, cloning and sequencing of AFLP markers related to disease-resistance trait in *Fenneropenaeus chinensis*[J]. *Chin J Oceanol Limnol*, 2005, 23(4): 442-447.
- [22] 齐宏飞, 阳小成. 植物抗逆性研究概述[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(32): 13943-13946.
- [23] 周宜君, 冯金朝, 马文文, 等. 植物抗逆分子机制研究进展[J]. *中央民族大学学报. 自然科学版*, 2006, 15(2): 169-176.

Sequence-related amplified polymorphism markers related to stress resistance traits in “Huanghai No.1” *Fenneropenaeus chinensis*

CHEN Huazeng^{1,2}, LI Jian¹, WANG Qingyin¹, HE Yuying¹, LI Jitao¹, DAI Fangyu¹, WANG Xuezhong³

1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306;

3. Changyi Haifeng Aquaculture Co., Ltd., Weifang 262600, China

Abstract: The sequence-related amplified polymorphism (SRAP) molecular marker technique and BSA were used to investigate molecular markers related to stress resistance traits in *Fenneropenaeus chinensis*. The markers, which were based on differences between sensitive and tolerant samples, will be used to provide information and tools for the protection of the *F. chinensis* germplasm resource and for molecular marker-assisted breeding. We used 110 SRAP primers to screen for molecular markers. We selected 77 and 102 SRAP primers to screen ammonia nitrogen and pH-BSA gene pools, respectively. According to the frequency and pattern of bands in the samples, six markers associated with resistance to high ammonia nitrogen were selected; one from sensitive samples and five from tolerant samples. These markers ranged in length from 166 to 571 bp. Similarly, seven markers associated with resistance to high pH were selected; two from sensitive samples and five from tolerant samples. These 13 genetic markers were cloned into the pMD-18T vector, transformed into *Escherichia coli* TOP10, and sequenced. The sequence data has been submitted to GenBank under the accession numbers GU570681–GU570693. Sequence and BLAST analyses showed that there was low similarity (<15%) between the markers and known functional genes, indicating that these markers are tightly linked to stress resistant traits but are not functional genes. Further research has been carried out to validate these results. These markers can be used to screen for stress resistance traits in *F. chinensis*, and provide a valuable tool for marker-assisted selection breeding.

Key words: *Fenneropenaeus chinensis*; ammonia nitrogen; pH; SRAP; BSA; stress resistance

Corresponding author: WANG Qingyin. E-mail: qywang@public.qd.sd.cn