

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2015.14505

瓦氏雅罗鱼耐碱性状相关分子标记的筛选

王楠^{1,2}, 常玉梅¹, 唐然¹, 何强^{1,2}, 张利民¹, 梁利群¹

1. 淡水鱼类育种国家地方联合工程实验室, 农业部淡水水产生物技术与遗传育种重点实验室, 中国水产科学研究院 特殊生境鱼类种质特性与抗逆育种重点实验室, 中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070;
2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 本研究以来自达里湖(碱水)和松花江(淡水)的瓦氏雅罗鱼(*Leuciscus waleckii*)杂交 F₂ 为实验材料, 通过碱度耐受实验进行性状测定, 以 39 对多态的 EST-SSR 和 SSR 为标记, 对 77 个 F₂ 个体进行基因分型, 根据 Fisher 确切概率法对 F₂ 基因型和耐碱性状进行关联分析。结果发现, 有 2 个标记与耐碱性状显著相关($P < 0.05$), 其中 1 个标记为 EST-SSR, 从瓦氏雅罗鱼转录组数据库中调取该 EST 序列, 基因注释结果显示该序列与团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)低氧诱导因子 *HIF-3 α* 基因、草鱼的低氧诱导因子 *HIF-4 α* 基因具有很高的同源性。该基因的主要功能是参与鱼类的耐低氧反应过程, 加强鱼类的耐低氧能力。本研究对于今后深入研究此功能基因的作用机制及培育适于盐碱水域养殖的鱼类新品种具有重要的意义。

关键词: 瓦氏雅罗鱼; 微卫星标记; 耐碱性状; 关联分析

中图分类号: S96

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2015)06-1105-10

中国作为水产养殖大国, 淡水鱼类养殖在其中占据了很大份额。然而近年来, 中国云南、贵州、广西、四川等省份又相继遭受严重干旱, 甚至危及到人们饮水困难, 一些河流、湖泊水位急剧下降, 有的几近干涸, 导致可供水产养殖使用的淡水资源逐渐减少; 此外, 水域盐碱化的进一步加剧, 使得一些低洼盐碱水域的生物贫瘠, 生产力十分低下, 大部分水域甚至不能被生产和生活所利用, 处于荒弃状态。在淡水资源量下降, 盐碱水域日益增加的大环境下, 内陆水产养殖的未来发展面临着巨大的挑战, 同时也蕴藏着新的机遇。适应高盐碱高 pH 水域的耐盐碱物种的发现, 为开发利用盐碱水域、拓宽宜渔水面, 改善和修复生态环境、发展节约式水

产养殖经济提供了新的契机。当前, 了解这些耐盐碱物种的适应性遗传机理, 筛选耐盐碱的功能基因是利用高新技术培育耐盐碱鱼类新品种的首要问题。

瓦氏雅罗鱼(*Leuciscus waleckii*)隶属鲤形目, 鲤科, 雅罗鱼亚科的雅罗鱼属, 亦称东北雅罗鱼, 俗称华子鱼、滑鱼、白鱼^[1]。主要分布于黑龙江流域各水系, 此外, 黄河下游、滦河、岱海、内蒙古达里湖等亦产此鱼。瓦氏雅罗鱼具有极强的盐碱适应能力, 例如, 生活在内蒙古达里湖的瓦氏雅罗鱼, 可耐受碱度 53.57 mmol/L, pH 高达 9.69 的恶劣水域条件^[2], 吸引了众多研究学者的关注。近年来, 针对其耐高盐碱的特性, 从生理生化^[3]、群体遗传学^[4-5]、转录组学^[6-7]等方面开展了一些

收稿日期: 2014-12-19; 修订日期: 2015-01-30.

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(2011AA100402-3); 黑龙江省科技攻关项目(GCI2B307).

作者简介: 王楠(1989-), 女, 硕士研究生, 专业方向为鱼类分子生物学与基因工程育种. E-mail: wn890531@163.com

通信作者: 梁利群(1965-), 女, 研究员, 博士生导师, 研究方向为水产动物基因工程育种. Tel: 0451-84861434; E-mail: llq-1019@163.com

研究, 尤其随着高通量测序技术的发展, 瓦氏雅罗鱼的基因组、转录组等遗传信息正逐渐被破译。基因组信息的破译, 为大量多态性分子标记的开发、候选基因的发掘提供了捷径。大量功能基因的发掘积累及其机理研究将弥补基因工程定向育种研究中基因元件资源缺乏的现状。Xu 等^[6]和 Chang 等^[7]通过转录组差异表达谱分析, 得到了大量与雅罗鱼耐碱性状相关的候选基因。鉴于与耐碱性状相关的候选基因范围较大以及微卫星、SNP 等分子标记手段^[8]在鱼类群体遗传学方面的应用较成熟的前提下, 本研究从经典遗传学角度出发, 利用基因的重组交换原理筛选出与耐碱性状紧密相关的分子标记, 通过分子标记来选择和定位功能基因, 缩小候选基因范围, 为今后深入开展基因功能定向研究提供依据。

笔者所在研究团队, 前期利用磁珠富集法开发了一批微卫星标记^[9], 对来自不同水域的瓦氏雅罗鱼群体进行了遗传结构和适应性分化的研究。结果发现, 达里湖群体和黑龙江流域群体具有不同的遗传背景, 而且产生了较明显的遗传分化; 碳酸盐碱度耐受实验发现, 达里湖群体的耐碱能力是松花江群体的 1.5 倍^[4]。上述研究说明, 来自达里湖的瓦氏雅罗鱼和来自黑龙江流域的瓦氏雅罗鱼已在盐碱耐受力、遗传结构等方面产生了明显的分化。以此为出发点, 本研究团队构建了二者的杂交 F_2 研究体系, 获得了适于开展瓦氏雅罗鱼耐碱性状分子机制研究的重要材料。本研究根据瓦氏雅罗鱼的转录组数据, 挖掘了一批 EST-SSR, 同时结合前期发表的基因组 SSR 标记,

对具有不同盐碱耐受力表现的杂交 F_2 进行标记和性状的关联分析, 旨在为后续的耐盐碱候选基因的筛选、表达及功能分析提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

实验鱼为达里湖瓦氏雅罗鱼(♀)与松花江瓦氏雅罗鱼(♂)杂交 F_1 经自交产生的 F_2 , 平均体重 48.5 g, 共计 77 尾。碱度耐受实验前, 实验鱼在循环可控水族箱内(96.5 cm×52.5 cm×45.5 cm)暂养 1 周。实验用水为过滤、曝气 24 h 的自来水, 水温(20±2)℃, pH 7.25, 溶解氧 9.2 mg/L, 氨氮 0.26 mg/L, 盐度 0.1, 总碱度 0.44 mmol/L, 总硬度 80.08 mg/L。

1.2 碳酸盐碱度耐受实验

根据预实验结果以及课题组之前对于碱耐受实验的研究结果, 初始碱度设置为 50 mmol/L(盐酸滴定法标定为 48 mmol/L), 以 10 mmol/L 为间距, 历时 40 d, 缓慢提升碱度至实验鱼开始出现死亡, 停止并维持相应碱度 26 d, 结束碱胁迫实验(图 1)。实验鱼密度控制在 7.5 g/L 以内。实验期间水温保持在 18~20℃。实验开始后每隔 24 h 定时观测一次, 观察实验鱼在实验水质条件下的生存状况及生理反应, 同时记录实验鱼死亡的时间和数量, 实时测定碱度和 pH 并剪取死亡实验鱼鳍条于 95%乙醇中保存。实验期间采取 24 h 不间断曝气和循环过滤的方式, 每隔一周更换 1/3 相应碱度的新水, 及时移出死亡个体并清理水槽中的杂质, 以保证水质的清洁与稳定。

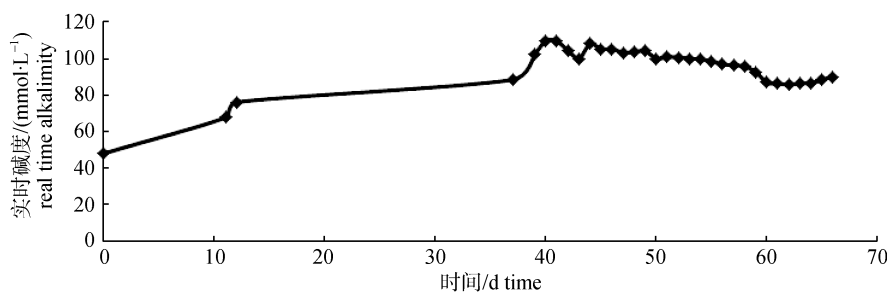


图 1 实时碱度变化

Fig. 1 Real-time change of alkalinity

1.3 EST-SSR 和 SSR 标记来源与筛选

根据瓦氏雅罗鱼的转录组数据, 选取瓦氏雅罗鱼在盐碱胁迫下鳃组织显著高表达的 EST 序列设计引物。首次合成 200 对, 经分析有 53 对可以获得清晰的扩增条带, 其中多态性引物 19 对; 选取刘金亮等^[9]开发的 SSR 多态性标记 20 对, 共计 39 对标记用于后续研究。标记具体信息见表 1。

1.4 微卫星标记的 PCR 扩增及检测

用蛋白酶 K 消化, 酚氯仿抽提的方法从保存的鱼鳍组织中提取 F₂ 个体 DNA。PCR 扩增体系为 15 μ L, 包括自制 buffer 缓冲液 11 μ L (内含 15 mmol/L MgCl₂, 2 mmol/L dNTP), 微卫星上下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, Taq DNA 聚合酶 (Fermentas) 0.2 μ L, DNA 模板 (25 ng/ μ L) 2 μ L, 无菌水 0.8 μ L。反应程序为, 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 50~60 $^{\circ}$ C 复性 30 s (表 1), 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 28 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。扩增产物用 8% 的聚丙烯凝胶电泳检测。

1.5 标记与耐碱性状的关联分析

用筛选到的 39 对多态性标记对杂交 F₂、父母本、祖父母本进行基因型分析, 结合碱耐受结果, 采用 SPSS 19.0 软件的 Fisher 检验, 获得与耐碱性状紧密相关的分子标记。

1.6 碱性性状关联分子标记的定量 PCR 检测

根据筛选到的与耐碱性状紧密相关的 EST-SSR, 从瓦氏雅罗鱼转录组数据中调取该 EST 序列, 设计定量 PCR 引物; 对淡水瓦氏雅罗鱼 (松花江) 和碱水瓦氏雅罗鱼 (达里湖) 进行 48 mmol/L 碱度耐受实验, 实验期间, 分别采集两种鱼在 1 h、3 h、8 h 和 24 h 的鳃组织样品, 提取总 RNA, 反转录成 cDNA, 采用 ABI 7500 定量 PCR 仪检测候选基因的表达量差异。PCR 反应体系为 20 μ L: SYBR premix Ex Taq (TaKaRa) 10 μ L, Rox Reference Dye II 0.4 μ L, 引物 1.6 μ L, cDNA 模板 2 μ L, RNase-free water 6 μ L。PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s。实验数据结果分析采用的方法是基因表达定量分析中常用的 $\Delta\Delta C_t$ 相对定量法, 公式如下:

$$F = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

$$\Delta\Delta C_t = (C_{\text{待测组目的基因平均}} - C_{\text{待测组内参基因平均}}) - (C_{\text{对照组目的基因平均}} - C_{\text{对照组内参基因平均}})$$

2 结果与分析

2.1 碱耐受实验结果

实验鱼放入实测碱度 48 mmol/L 的水体中, 24 h 之内出现应激反应, 具体表现为: 急游、躁动异常、鳃盖扇动频率加快, 呈狂躁环游状态, 有个别个体会跳出水面产生严重的痉挛现象。维持 10 d, 待实验鱼稳定后, 继续缓慢提升碱度至 109.6 mmol/L 时, 第 40 天实验鱼出现死亡 (图 1), 具体表现为: 焦躁不安, 沿着水槽边缘狂游, 随后身体失去平衡, 侧翻或倒游; 体表和鳃部均有大量黏液分泌, 部分鱼体扭曲, 以尾部最为明显; 死后实验鱼头部发黑, 体表泛青色, 鳃片暗红或紫褐色, 眼部充血 (图 2), 部分实验鱼腹部膨大或胸部呈微黄色; 持续死亡 15 d 后, 基本不出现新的死亡现象, 最后存活 14 尾个体 (图 3)。

2.2 标记的筛选与鉴定

用筛选到的 39 对多态性标记对杂交 F₂ (77 尾) 及其父母本、祖父母本进行 SSR-PCR 扩增, 从结



图 2 瓦氏雅罗鱼碱中毒表型特征

Fig. 2 The phenotypic characteristics of the experimental fish alkalosis

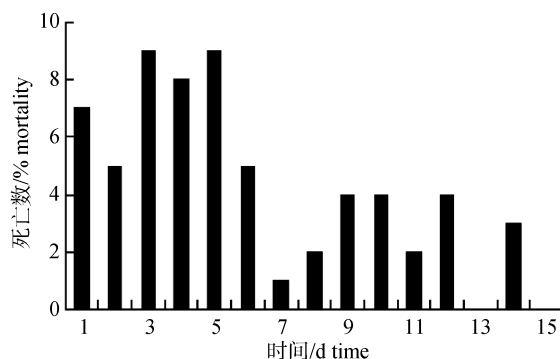


图 3 实验瓦氏雅罗鱼死亡情况

Fig. 3 The death situation of the experimental fish

表 1 筛选鉴定的 39 对瓦氏雅罗鱼微卫星引物信息
Tab. 1 Thirty-nine SSR primers available to PCR amplification in *Leuciscus waleckii*

位点 locus	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	核心序列 motif	退火温度/℃ annealing temperature	GenBank 登录号 GenBank accession No.
HLJYL007	F: ACACGTGCAGACCTGTGGAT R: TTTGCCAGCAGATGAAGATG	(CAT) ₅	55	HM467015
HLJYL010	F: TCTCTTCCATACGTACCTGTC R: TGTGGCTGACAGCTTGAAAC	(TCA) ₁₁	55	HM467016
HLJYL017	F: GGGACATTCAACAACATTCAAC R: GAGGCTTCCTGGTTTCATCA	(AC) ₈	55	HM467018
HLJYL026	F: CTAAGACATCCGTCAAGCA R: TGCCTATTCTCTTCCCATC	(AGAT) ₁₇	55	HM467020
HLJYL031	F: AGGGACTCCCACTCCACATA R: AGACAGACGGATGGATGGAT	(ATCC) ₅	60	HM467021
HLJYL035	F: AAACCACTGGACACAGGTACA R: ACCAACCAACACATCAACCA	(TCTA) ₇	55	HM467022
HLJYL042	F: CGGTTCAATAAACAGGATGCAG R: AACATAAGGTTGCGACAAACG	(TGGA) ₆ /(TGGA) ₈	60	HM467023
HLJYL046	F: CAGCTGATTCACATGCACAA R: TGCACCTCTGCTACAGCCAAT	(GATA) ₁₅	60	KF312878
HLJYL048	F: CACGACCACTAGAAGGCAGTC R: GAGGGTTCATGGGAGTTTGA	(AGAT) ₁₅	60	KF312879
HLJYL052	F: AGAATGTGACGGACGGATGT R: ATTGCATGCAGCCATCTTTC	(ATGG) ₈	60	HM467024
HLJYL100	F: CAGAAACGTCGCACCTCATA R: CTACACGCAGGTGAAGGTGA	(AGAT) ₁₇	60	HM467026
HLJYL101	F: TCGTTCTATCATCGGTTCTGTC R: TGGTGGCCCAACAACATA	(CATC) ₇	60	HM467027
HLJYL106	F: CATTGCTGCAGGTATGGTGT R: CTCTGAGTCTGAGCCGATCC	(CT) ₆ /(CT) ₁₇	60	HM467029
HLJYL110	F: AACAACGGTCGGATGAAGAG R: ATCAGGCTCCAACCAATGA	(TGA) ₈ /(GAC) ₅ /(GAT) ₅	60	HM467030
HLJYL018	F: TAGACGTCTGGGTGTGTTGC R: GGGACAGACAAGGACTCCAA	(GT) ₁₈	60	KF312877
HLJC57	F: GACCTGGCCTGTGTTTCATCT R: TCGACGATCTCTGCATCATC	(CT) ₃₁ /(GT) ₂₆	60	FJ213552
HLJC87	F: GAAACTGAGACCGTTGCACA R: TCGACGATCAAAGCAATCTCT	(GT) ₂₃	60	FJ213562
HLJC91	F: TGGAGAAAAGGGCTGTAGGA R: ACTCCCTCCCTTCCTCATA	(GA) ₂₂	60	FJ213564
HLJC114	F: GTTCTGTCAAGTGTGCATTCT R: GTCGACGATCTCAGAGCTATAAA	(GA) ₉	60	KF312876
HLJYL01	F: ACTTTACATTGGTGCTA R: GATTTGGTCAAAGAAGA	(TGTT) ₄	55	专利号 ZL201310494896.9 ^[10]
HLJYL022	F: TGTCTGAGAAAGGTgTGTGCA R: CAGCACAGTCCTGATCCCTG	(TG) ₆	55	KP168468

(待续 to be continued)

(续表 1 Tab.1 continued)				
位点 locus	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	核心序列 motif	退火温度/℃ annealing temperature	GenBank 登录号 GenBank accession No.
HLJYLe24	F: TCTGCTGTTCTCTGCTCTCC R: GTCTCATTTTAGAATCTTAAGAGCTACA	(ATTC) ₃	55	KP168469
HLJYLe25	F: GGTGAATTCAGGTAAAGTGGGC R: AGACACTTGTTGCGGTTTTCA	(AT) ₆	55	KP168470
HLJYLe26	F: GGTGAATTCAGGTAAAGTGGGC R: AGACACTTGTTGCGGTTTTCA	(AT) ₆	55	KP168471
HLJYLe64	F: CCTGTTTGCACCTTTTGACCA R: TCTCAACCCAACCAAACCCG	(TGTT) ₅	55	KP168472
HLJYLe94	F: GCCTCGATGTAGGTGCTCAA R: ACTCAAACGCGGGACTAGAA	(CA) ₆	55	KP168473
HLJYLe114	F: AAAGGACCATGCAACTACAGT R: GCAGGGGCTTCAAGTGGTTA	(TAT) ₄	55	KP168474
HLJYLe115	F: CCTAAACCTACCGCCACAGG R: GACGGACTTAGAGGCTTTTGC	(TA) ₁₂	55	KP168475
HLJYLe118	F: CTCAAAATCTGTTCTGCTGGgT R: AGAACAGACATTCCACAATTGGT	(TTTTC) ₄	55	KP168476
HLJYLe140	F: TTGACTGGAGCAGGTGTGAC R: GAGGCCAAAGCTGAGGTGAT	(TG) ₉	52	KP168477
HLJYLe153	F: TGACGAGTCTTATTGATGGCA R: TAACACATCAGTGCTGGCCA	(AT) ₁₉	55	KP168478
HLJYLe175	F: CACTCGACAACATCAGAACGC R: AAGGTATGGCTCATAAGCGC	(GT) ₉	55	KP168479
HLJYLe181	F: GATGCTCTGCGGATGGAGTT R: TGGGCAGAGAATTGTGGGTC	(TGC) ₄	52	KP168480
HLJYLe192	F: GGGCTATTTAACCTCTAGTAATTGTACA R: GACACTTGTTGCGGTTTTCA	(AAAAT) ₂₀	55	KP168481
HLJYLe234	F: AGCTGGGAGAAAATATTTATTTTGGGT R: GGCGGTCAGGACAAGACTTT	(TAAAA) ₃	55	KP168482
HLJYLe242	F: TTGACACAGTTGCTCAGCTT R: GTCTCTTTCTGTGCTCCAGTCA	(GA) ₇	55	KP168483
HLJYLe254	F: GGGCTATTTAACCTCTAGTAATTGTACA R: GACACTTGTTGCGGTTTTCA	(AAAAT) ₂₀	55	KP168484
HLJYLe274	F: GGCAGCAATCATTGGCTCAC R: CCACAATGACATATCCCAATAGCA	(CA) ₆	52	KP168485
HLJYLe289	F: TGCACGAAACACAGGAGGAT R: GTATCCACTTCAAATGTTGACGT	(CA) ₁₃	52	KP168486

果可以看出, 杂交 F₂ 呈现典型的孟德尔分离规律(图 4, 图 5)。

2.3 杂交 F₂ 碱耐受力与标记的关联分析

根据实验鱼死亡个数的变化趋势(图 3), 将前 6 d 内死亡鱼体(编号 1~43, 43 尾)耐碱性状定义为 1, 7~14 d 内死亡鱼体(编号 44~63, 20 尾)耐碱

性状定义为 2, 之后的存活个体(编号 64~77, 14 尾)定义为 3。分别统计每种耐碱性状下各个基因型的实验鱼个数, 使用 Fisher 确切概率分析法, 进行耐碱性状与标记的关联分析, 获得 2 个与耐碱性状显著相关的标记, HLJYLe289 ($P=0.043$)和 HLJYL100 ($P=0.023$)(表 2)。

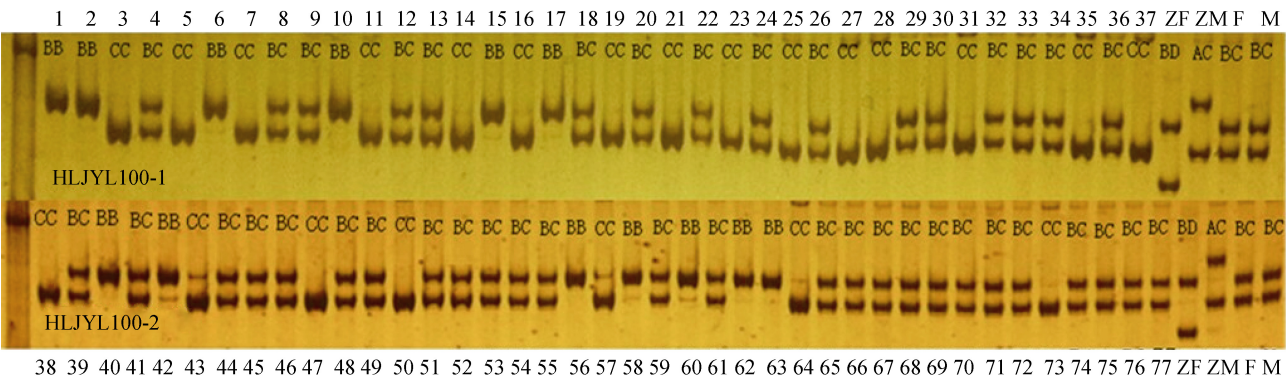


图 4 标记 HLJYL100 在杂交 F₂ 中的电泳指纹图谱

1~77: 实验鱼的编号; ZF: 祖父本; ZM: 祖母本; F: 父本; M: 母本; BB, CC, BC: 实验鱼的基因型.

Fig. 4 Electrophoresis fingerprint locus HLJYL100 in hybridized F₂

1~77: Number of the experimental fishes; ZF: Grandfather; ZM: Grandmother; F: Father; M: Mother; BB, CC, BC: Genotypes of the experimental fishes.

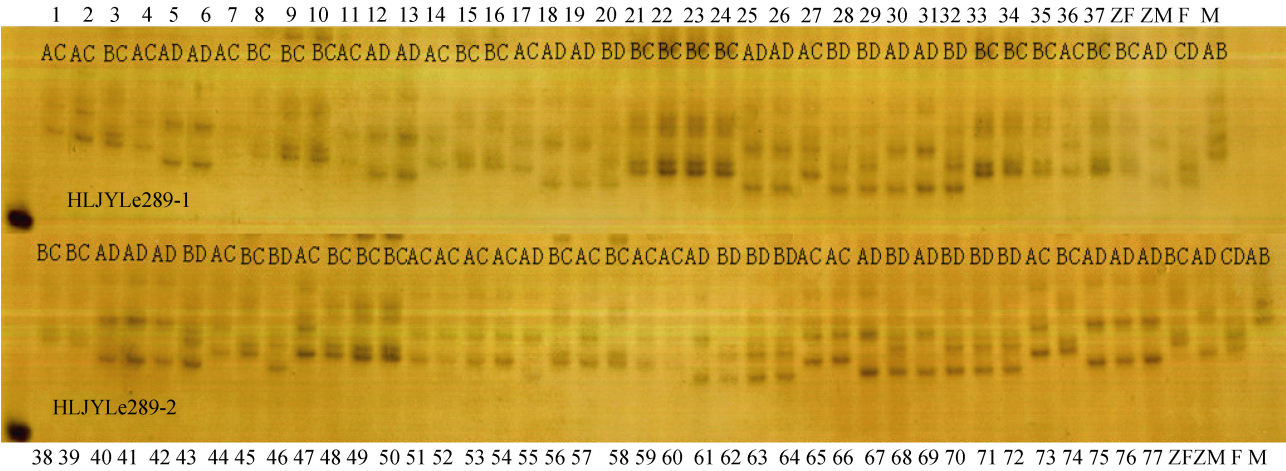


图 5 标记 HLJYL289 在杂交 F₂ 中的电泳指纹图谱

1~77: 实验鱼的编号; ZF: 祖父本; ZM: 祖母本; F: 父本; M: 母本; AC, AD, BC, BD: 实验鱼的基因型.

Fig. 5 Electrophoresis fingerprint locus HLJYL289 in hybridized F₂

1~77: Number of the experimental fishes; ZF: Grandfather; ZM: Grandmother; F: Father; M: Mothe; AC, AD, BC, BD: Genotype of the experimental fishes.

表 2 标记 HLJYL289 和 HLJC100 Fisher 确切概率分析结果
Tab. 2 Fisher exact probability analysis results of HLJYL289 and HLJYL100

标记 marker	基因型 genotype	个体数统计 the number of individuals			合计 total	Fisher 精确检验 Fisher's exact test
		性状 1	性状 2	性状 3		
HLJYL289	AC	9	9	3	21	0.043
	AD	13	2	5	20	
	BC	16	6	1	23	
	BD	5	3	5	13	
HLJYL100	BB	8	5	0	13	0.023
	BC	18	12	12	42	
	CC	17	3	2	22	

基因注释结果显示, HLJYL289 所对应的序列与团头鲂低氧诱导因子 *HIF-3 α* 基因、草鱼低氧诱导因子 *HIF-4 α* 基因具有很高的同源性, 根据 blast (nucleotide sequence) 比对, 其与团头鲂同源率达到 89%, 与草鱼同源率为 80%。HLJYL100 所对应的序列功能尚不明确。

2.4 候选基因 RT-PCR 结果

以实验时间为横坐标, 表达量为纵坐标, 用柱形图将候选基因在淡水瓦氏雅罗鱼和碱水瓦氏雅罗鱼中的表达量表示出来(图 6)。由图 6 可以看出, 淡水种和碱水种的候选基因的表达量、表达方式明显不同。淡水种从 3 h 开始, 呈上调表达; 而碱水种全部下调表达, 而且下调幅度较明显。

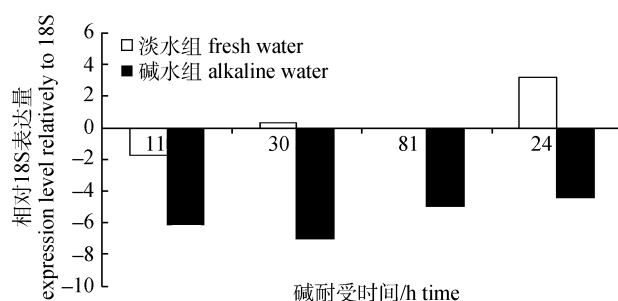


图 6 候选基因表达量差异

Fig. 6 Differential expression of the candidate gene

3 讨论

对于鱼类耐碱的分子生理机制的探索, 从半个世纪前就已经开始, 随着 20 世纪 90 年代分子生物学的发展, 鱼类耐碱的分子生理机制的研究有了较快的进步。以往的研究发现, 高盐碱胁迫会改变鱼类的渗透压和酸碱平衡, 对免疫系统产生一定的抑制作用, 对此, 鱼类通常通过增强离子的调控、提高血清尿素氮的浓度(排氨)^[11-12]、合成应激蛋白^[13]等, 来维持渗透压和酸碱平衡, 机体在受到碱胁迫时也会产生一种自我调节机制来缓解应激反应^[14]。鱼类酸碱调节机制中有种类繁多的功能基因、转运蛋白、离子通道参与多种离子的转运、调节。然而具体哪些基因和蛋白参与这一过程、具有何种功能, 各种离子在转运过

程中的协作、影响机制等仍然没有明确^[15]。因此, 研究酸碱调节相关功能基因并确定其在调节机制中所起的作用, 是目前亟待解决的问题, 也是进一步揭开鱼类酸碱调节整体机制、培育耐盐碱新品种的必要先决条件。Bayaa 等^[16]对斑马鱼的研究表明, SLC26 家族的 3 个成员 A3、A4 和 A6 在鳃表皮细胞中表达, 环境中的低 Cl^- 浓度或高 HCO_3^- 浓度能够使编码这几种蛋白的 mRNA 丰度显著升高, 对 3 个基因的选择性沉默会显著降低鳃对 Cl^- 的吸收, 3 种蛋白编码基因在接受不同程度的 HCO_3^- 胁迫时, 均会出现表达量变化, 但是变化程度并不一致; Chang 等^[7]在进行瓦氏雅罗鱼数字差异表达谱分析时发现, 大部分涉及离子调节、酸碱平衡、渗透压维持以及氨排泄等相关基因显著高表达, 其中参与氨转运的水通道蛋白家族(aquaporin family, AQP)全部下调表达, 而 Rh 蛋白家族(Rhag, Rhbg, Rhcg1 和 Rhcg2)全部富集上调表达。

本研究筛选到的雅罗鱼耐碱候选基因 *HIF-3 α* 是缺氧诱导因子(HIF)家族的成员。已知的 HIF 家族包括 HIF-1, HIF-2 和 HIF-3 三个成员, 它们是 bHLH-PAS (basic helix loop helix-Per/ARNT/SIM) 转录因子超家族的一员, 由一个调节表达的亚基(HIF- α)和持续表达的亚基(HIF- β)所组成, HIF- α 蛋白表达受氧浓度即时调节, 而 HIF- β 则为持续表达不受氧浓度的影响^[17]。Law 等^[18]克隆出了全新的 *HIF- α* 基因序列——*HIF-4 α* 。作为缺氧诱导家族的新成员, *HIF-4 α* 很可能不属于目前已知的任何一种 HIF- α 类型, 可能是鱼类特有的 HIF- α 亚基。对于 *HIF-4 α* 的报道很罕见, Law 等^[18]发现草鱼经过 4 h 或 96 h 缺氧胁迫后, *HIF-4 α* mRNA 在许多组织和肌肉中的含量都明显升高。然而对于 HIF 家族其他成员的报道则相对较多。Law 等^[18]发现草鱼缺氧后, 鳃和肾中的 *HIF-1 α* mRNA 明显上调, 大脑、心脏和肝中的含量却下降; Heidbreder 等^[19]发现大鼠缺氧后, *HIF-3 α* mRNA 的表达水平在大脑、肺、肾和心脏中明显上调, 而在肝中变化不明显, 同时他们还发现一些非缺氧性因素也会影响到 *HIF-3 α* 的表达; Shen

等^[20]对武昌鱼进行缺氧处理,发现 *HIF-1 α* 的表达与对照组在各个检测的器官中均没有显著差异,而在肝和肾中, *HIF-2 α* 的表达显著上升;张鹏^[21]克隆得到了斑马鱼 *HIF-3 α* , 证明了它是转录因子,并首次发现了不受氧气调控的 *HIF- α* 蛋白(H3—513)。根据综合实验结果以及已有的研究报告,我们推测来自达里湖的瓦氏雅罗鱼由于长期耐受高碱极端环境,从而进化出独特的生存机制。有些基因需要高表达^[7],但有些基因可能不需要过量表达,而是通过抑制表达来实现对高碱环境的适应。本研究的实验结果证实了这一点(图 6),同时提醒我们今后对显著低表达的候选基因也应进行重点研究。

基因工程育种是未来水产良种培育的发展方向。可针对某一目标性状进行定向育种是基因工程育种的优势,它可解决现有育种技术选择强度低、育种周期长、培育新品种速度慢和远缘不育等问题。然而作为基因工程育种技术的基础,大量表达某种生理特性、表现特征的功能基因及其机理研究开展基因工程育种的先决条件。李盛文^[22]、贾智英等^[23]运用生物信息学技术成功挖掘到与鲤鱼抗病相关的功能基因及 SNP,促进了鲤鱼抗病育种的高效进行以及保种遗传学的发展;陶然^[24]、常玉梅等^[25]通过微卫星标记、荧光定量 PCR 技术等从具有抗寒性状的黑龙江野鲤脑组织中成功筛选到与抗寒相关的功能基因,并通过转基因技术获得抗寒新品种,以期解决喜温性鱼类的不耐低温问题,这对经济鱼类以及名贵鱼类的扩大养殖和分子遗传育种具有重要的指导意义;中国内陆盐碱水域面积达 1000 多万亩,开辟利用废弃的、广阔的宜渔盐碱水(地)国土资源,培育能够适于盐碱水环境养殖的鱼类优良品种,发展盐碱鱼类养殖,对修复盐碱水(地)域生态环境、拓展渔业发展空间具有重要意义,也是水产养殖业经济发展的新方向^[26]。因此,筛选到与耐碱性状紧密相关的分子标记及候选基因对于培育出适于在特殊生境(高盐碱水域)生存的鱼类新品种,进一步强化我国水产大国的国际地位等都具有重要意义。

参考文献:

- [1] Li Y S, Dong C Z, Zhao C G. Study on the fishery biology of *Leuciscus waleckii* (Dybowski) in Heilongjiang section of the upstream of Heilongjiang River[J]. Heilongjiang Fisheries, 2004(2): 36–38. [李延松, 董崇智, 赵春刚. 黑龙江上游黑河江段瓦氏雅罗鱼渔业生物学研究[J]. 黑龙江水产, 2004(2): 36–38.]
- [2] Qi J W, An X P, Meng H P, et al. Utilization status of *Leuciscus waleckii* (Dybowski) in Dali Lake and its rational exploitation[J]. Journal of Hydroecology, 2011, 32(1): 71–76. [齐景伟, 安晓萍, 孟和平, 等. 达里湖瓦氏雅罗鱼资源现状及合理利用探讨[J]. 水生态学杂志, 2011, 32(1): 71–76.]
- [3] Xu J, Li Q, Xu L M, et al. Gene expression changes leading extreme alkaline tolerance in Amur ide (*Leuciscus waleckii*) inhabiting soda lake[J]. BMC Genomics, 2013, 14: 682.
- [4] Chi B J, Chang Y M, Yan X C, et al. Genetic variability and genetic structure of *Leuciscus waleckii* Dybowski in Wusuli River and Dali Lake[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(2): 228–235. [池炳杰, 常玉梅, 闫学春, 等. 瓦氏雅罗鱼达里湖群体和乌苏里江群体的遗传多样性和遗传结构分析[J]. 中国水产科学, 2010, 17(2): 228–235.]
- [5] Chang Y M, Tang R, Sun X W, et al. Genetic analysis of population differentiation and adaptation in *Leuciscus waleckii*[J]. Genetica, 2013, 141(10): 417–429.
- [6] Xu J, Ji P F, Wang B S, et al. Transcriptome sequencing and analysis of wild Amur ide (*Leuciscus waleckii*) inhabiting an extreme alkaline-saline lake reveals insights into stress adaptation[J]. PLoS ONE, 2013, 8(4): e59703.
- [7] Chang Y M, Tang R, Dou X J, et al. Transcriptome and expression profiling analysis of *Leuciscus waleckii*: an exploration of the alkali-adapted mechanisms of a freshwater teleost[J]. Mol Biosyst, 2014, 10(3): 491–504.
- [8] Du C B, Sun X W, Lou Y D, et al. Application of microsatellite in the research of aquatic animal germplasm resources[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2000, 13(1): 68–73. [杜长斌, 孙效文, 楼允东, 等. 微卫星在水产动物种质资源研究方面的应用[J]. 水产学杂志, 2000, 13(1): 68–73.]
- [9] Liu J L, Chang Y M, Xu L H, et al. Location and characterization of microsatellite from genome of *Leuciscus waleckii* Dybowski[J]. Acta Agriculture Boreali-Sinica, 2011, 26(1): 87–93. [刘金亮, 常玉梅, 徐丽华, 等. 东北雅罗鱼微卫星分子标记的筛选及特征分析[J]. 华北农学报, 2011, 26(1): 87–93.]
- [10] Chang Y M, Tang R, Liang L Q, et al. A detect method of *Leuciscus waleckii* Dybowski primers in Dali lake basin[P]. Patent number: ZL201310494896.9. [常玉梅, 唐然, 梁利

- 群, 等. 一种达里湖流域瓦氏雅罗鱼检测引物及检测方法[P]. 专利号: ZL201310494896.9.]
- [11] Danulat E, Kempe S. Nitrogenous waste excretion and accumulation of urea and ammonia in *Chalcalburnus tarichi* (Cyprinidae), endemic to the extremely alkaline Lake Van (Eastern Turkey)[J]. *Fish Physiol Biochem*, 1992, 9(5): 377–386.
- [12] Zhao L, Xu P, Sun X W. Ammonia excretion related genes expression of common carp under the stress of carbonate alkalinity[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2013, 4(33): 186–193. [赵兰, 徐鹏, 孙效文. 碳酸盐碱度胁迫下鲤鱼氨排泄相关基因的差异表达[J]. *生物技术通报*, 2013, 4(33): 186–193.]
- [13] Ke S X. Heat shock proteins[J]. *Biology Teaching*, 2007, 32(6): 7–9. [柯世省. 热激蛋白[J]. *生物学教学*, 2007, 32(6): 7–9.]
- [14] Wang W B, Li A H. The effect of environmental stress to fish immune system[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2002, 26(4): 368–374. [王文博, 李爱华. 环境胁迫对鱼类免疫系统影响的研究概况[J]. *水产学报*, 2002, 26(4): 368–374.]
- [15] Claiborne J B, Edwards S L, Morrison-Shetlar A I. Acid-base regulation in fishes: cellular and molecular mechanisms[J]. *J Exp Zool*, 2002, 293(3): 302–319.
- [16] Bayaa M, Vulesevic B, Esbaugh A, et al. The involvement of SLC26 anion transporters in chloride uptake in zebrafish (*Danio rerio*) larvae[J]. *J Exp Biol*, 2009, 212: 3283–3295.
- [17] Yuan K. Research on the roles of hypoxia-inducible factor 2 α in human non-small cell lung cancer[D]. Shanghai: Fudan University, 2009. [袁凯. 缺氧诱导因子(HIF)-2 α 在人非小细胞肺癌作用的研究[D]. 上海: 复旦大学, 2009.]
- [18] Law S H W, Wu R S S, Ng P K S, et al. Cloning and expression analysis of two distinct HIF- α isoforms—gcHIF-1 α and gcHIF-4 α —from the hypoxia-tolerant grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*[J]. *BMC Mol Biol*, 2006, 7: 15.
- [19] Heidbreder M, Qadri F, Jöhren O, et al. Non-hypoxic induction of HIF-3 α by 2-deoxy-D-glucose and insulin[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 352(2): 437–443.
- [20] Shen R J, Jiang X Y, Pu J W, et al. HIF-1 α and -2 α genes in a hypoxia-sensitive teleost species *Megalobrama amblycephala*: cDNA cloning, expression and different responses to hypoxia[J]. *Comp Biochem Physiol B—Biochem Mol Biol*, 2010, 157(3): 273–280.
- [21] Zhang P. Molecular cloning, gene expression and function analysis of the zebrafish hypoxia-inducible factor-3 α gene[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012. [张鹏. 斑马鱼缺氧诱导因子-3 α 的克隆、表达和功能研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.]
- [22] Li S W. Carp conservation population genetic structure and transcriptome analysis of carp CyHV-3 infection[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2014. [李盛文. 鲤鱼保种群体遗传结构与鲤感染 CyHV-3 的转录组研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2014.]
- [23] Jia Z Y, Shi L Y, Sun X W. Genetic improvement of disease resistance in common carp[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2012, 21(4): 576–580. [贾智英, 石连玉, 孙效文. 鲤抗病育种研究进展[J]. *上海海洋大学学报*, 2012, 21(4): 576–580.]
- [24] Tao R. The cold resistance research of transgenic zebrafish and tilapia[D]. Ningbo: Ningbo University, 2014. [陶然. 转基因斑马鱼和罗非鱼耐寒性能的研究[D]. 宁波: 宁波大学, 2014.]
- [25] Chang Y M, Gao G Q, Xu L H, et al. Correlation and location of EST markers with cold tolerance trait of common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. *Zoological Research*, 2010, 31(6): 581–586. [常玉梅, 高国强, 徐丽华, 等. 鲤 EST 标记与耐低温性状的相关性分析及定位[J]. *动物学研究*, 2010, 31(6): 581–586.]
- [26] Guo J L, Ma A J, Yue L, et al. Progress of breeding for stress tolerance in fish[J]. *Marine Science*, 2013, 37(10): 148–156. [郭建丽, 马爱军, 岳亮, 等. 鱼类抗逆性状选育研究进展[J]. *海洋科学*, 2013, 37(10): 148–156.]

Screening microsatellite markers associated with alkaline tolerance in *Leuciscus waleckii*

WANG Nan^{1,2}, CHANG Yumei¹, TANG Ran¹, HE Qiang^{1,2}, ZHANG Limin¹, LIANG Liquan¹

1. National & Local United Engineering Laboratory of Freshwater Fish Breeding; Key Laboratory of Freshwater Aquatic Biotechnology and Genetic Breeding, Ministry of Agriculture; Key Laboratory of Fish Stress Resistance Breeding and Germplasm Characteristics on Special Habitats, Chinese Academy of Fishery Sciences; Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Saline-alkaline water use has broadened the development of Chinese fisheries. Breeding new varieties of alkaline-resistant fish is a fundamental task, and elucidating fish alkaline-resistant mechanisms, identifying candidate genes, and exploring their functions are crucial. Decoding genome information promotes the use of molecular markers and selection of candidate genes. *Leuciscus waleckii* (Dybowski) is highly tolerant to high salinity and alkalinity and survives in Dali Lake (Inner Mongolia) with alkalinity up to 53.57 mmol/L (pH 9.6). Therefore, this fish species is a good subject to investigate the evolutionary mechanism of high salinity and alkalinity adaptation. *L. waleckii* in Dali Lake differ from their freshwater counterparts because they are characterized by a breeding migration in which they spawn in freshwater and grow in alkaline water. Marked differences are observed during acute-phase alkaline tolerance between the alkaline population from Dali Lake and the freshwater population from the Songhua River, indicating the genetic heritability of alkaline tolerance. However, the mechanism of high tolerance to alkalinity remains unknown, and very few physiological and genetic studies have been performed. Thus, we prepared a hybrid F₂ system (alkaline Dali *Leuciscus* × freshwater Songhua *Leuciscus*). A large number of candidate genes are associated with alkaline-resistance traits, and microsatellites, single nucleotide polymorphisms, and other molecular markers have been applied in fish population genetics studies. We used the gene recombination principle to select molecular markers closely related to alkaline-resistance traits and located functional genes using molecular markers. In this study, we examined and genotyped alkaline tolerance in 77 hybrid F₂ individuals using 39 simple sequence repeat (SSR) markers, including 19 expressed sequence tag EST-SSRs. The individuals were divided into three groups of 43, 20, and 14 individuals based on their alkaline tolerance. Fisher's exact probability test was used to examine the associations between markers and the trait. The results showed that two markers were strongly linked to alkaline tolerance ($P < 0.05$), and one was an EST-SSR. Sequence alignment of that EST-SSR showed that it was highly homologous with the hypoxia inducible factor *HIF-3α* gene of Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*) and the *HIF-4α* gene of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). These genes are involved in the response to hypoxia and increased hypoxia tolerance in fish. The approach was to select a functional gene using molecular markers, localize the functional gene, and narrow the range of candidate genes to lay the foundation for breeding new varieties of alkaline-resistant fish. In-depth study of this functional gene will be conducted in the future. Our results suggest further analyses of candidate alkaline-responsive genes, which will help in the understanding of teleost adaptation under extreme environmental stress and ultimately benefit future breeding for an alkaline-tolerant fish strain.

Key words: *Leuciscus waleckii*; microsatellite marker; alkaline tolerance; association analysis

Corresponding author: LIANG Liquan. E-mail: llq-1019@163.com