

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16071

半滑舌鳎抗哈维氏弧菌病相关微卫星标记筛选及 QTL 定位

戴欢^{1,2,3}, 刘洋^{2,3}, 王文文^{2,3}, 位战飞^{2,3}, 高进^{2,3}, 高峰涛^{2,3}, 李祥孔^{1,2,3},
刘洋¹, 陈松林^{2,3}

1. 大连海洋大学 水产与生命学院, 辽宁 大连 116023;
2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;
3. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266237

摘要: 为了筛选出与抗哈维氏弧菌病相关的微卫星标记并进行 QTL 定位, 以 2014 年感染实验中存活率为 52.22% 的半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)家系 F1412(Family+年份+家系号)为材料, 采用混合分离分子分析法(bulked segregant analysis, BSA)对 169 个微卫星标记(SSR)进行筛选, 得到 1 个可能与哈维氏弧菌病相关的微卫星标记 scaffold479_23523。用 scaffold479_23523 所在的连锁群 LG18 上的 37 个 SSR 对 94 尾抗病、感病个体进行基因分型, 得到 3 个图谱: 整合图谱(LG18)、雌性图谱(LG18F)和雄性图谱(LG18M), 并用两种不同的模式进行单标记分析和 QTL 定位。模式一得到 3 个显著性相关标记($P<0.05$)和 1 个极显著性相关标记($P<0.01$), 图谱 LG18F 定位出一个区间 qE-F1; 模式二得到 4 个显著相关标记($P<0.05$)和 1 个极显著相关标记($P<0.01$), 图谱 LG18M 定位出两个区间 qE-M1、qE-M2。在全基因组序列的分布范围上, 区间 qE-F1 包含了 qE-M1 及 qE-M2, 因此 qE-F1 更可能与抗病性状相关。本研究开发出了抗哈维氏弧菌病性状相关微卫星标记及 QTL 区间, 为抗病新品种的培育奠定了基础。

关键词: 半滑舌鳎; 哈维氏弧菌; 微卫星标记 SSR; 混合分离分子分析法 BSA; 数量性状基因座 QTL

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)01-0022-09

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)隶属鲽形目(Pleuronectiformes), 舌鳎科(Cynoglossidae), 舌鳎属(*Cynoglossus*), 主要分布于我国的黄海、渤海海域。其肉质鲜嫩, 味道鲜美, 具有极高的营养价值^[1]。近年来, 随着半滑舌鳎人工育苗技术的日渐成熟, 半滑舌鳎养殖业快速发展^[2]。然而, 由细菌和寄生虫所引起的如腹水、烂鳍、烂尾和腐皮等疾病的发生给半滑舌鳎养殖业造成了巨大损失, 严重制约了半滑舌鳎养殖业的持续发展^[3]。哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)是半滑舌鳎细菌性疾病的重要病原之一, 引起半滑舌鳎体表溃疡、烂鳍等疾病^[1,4-7]。目前, 对于鱼类哈维氏弧菌病, 主要采取以预防为主、治疗为辅的方法, 防治主要依赖于

抗生素, 但药物的滥用导致耐药性的产生, 并对人体健康造成危害^[8]。结合家系选育、分子标记等辅助育种技术, 筛选和培育出抗哈维氏弧菌优良品种, 是解决半滑舌鳎感染哈维氏弧菌疾病问题的良好方式。

混合分离分子分析法(bulked segregant analysis, BSA)是一种快速筛选分子标记的方法, 在 1991 年第一次被提出和运用, 具有成本低、效率高、操作方便等优点^[9], 现广泛与 QTL 结合起来, 对养殖鱼类重要经济性状进行 QTL 定位。在鱼类中, BSA-QTL 方法主要被用于筛选性别^[10-12]、生长^[13-15]和抗逆^[16-17]等性状相关的分子标记及 QTL 区间定位。抗病性状是生长性状中一个重要的方面,

收稿日期: 2016-03-04; 修订日期: 2016-04-20。

基金项目: 国家自然科学基金项目(31530078); 山东省农业良种工程重大课题和山东省泰山学者攀登计划专项。

作者简介: 戴欢(1992-), 男, 硕士研究生, 主要从事海洋生物技术研究. E-mail: daihuan0121@163.com

通信作者: 陈松林, 研究员. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

Ozaki 等^[18]以虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)抗病家系和易感家系构建的回交家系为材料, 从 51 个微卫星标记中定位到了 2 个与虹鳟抗传染性胰脏坏死病(IPNV)性状具有显著相关性的 QTL 区间, 并且又在 RT12 连锁群检测到一个与抗病性状密切相关的主效 QTL 区间^[19]; Fuji 等^[20]对于牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)抗淋巴囊肿病的性状位点进行了定位, 得到一个主效位点; Wang 等^[21]以抗病家系与易感家系的杂交 F₁ 家系为资源家系, 定位得到 4 个与牙鲆抗鳃弧菌病性状相关的 QTL 区间。目前, 在半滑舌鲷中的 QTL 定位主要集中于生长与性别方面; 半滑舌鲷全基因组序列的破译^[22]及半滑舌鲷高密度遗传连锁图谱的建立^[23], 为重要性状的 QTL 定位奠定了基础。Song 等^[23]定位到了 4 个与半滑舌鲷生长性状(体重和全长)相关的 QTL 区间, 均定位于 LG4f 连锁群, 两个与生长性状具有极显著相关性的微卫星标记; Chen 等^[24]利用扩增片段长度多态性(AFLP)技术筛选得到 7 个雌性特异标记, 并将其中一个标记成功转化为特定序列扩增(SCAR)标记, 在其他半滑舌鲷个体中也扩增出雌性的特异条带。但是关于半滑舌鲷抗病相关的微卫星标记筛选及 QTL 定位尚未见报道。本研究主要从两个方面对半滑舌鲷抗哈维氏弧菌病进行研究: 一方面通过 BSA 筛选得到与抗哈维氏弧菌病相关的微卫星标记; 另一方面进行 QTL 定位, 以期对半滑舌鲷分子标记辅助选择抗病育种(MAS)提供基础和依据。

1 材料及方法

1.1 实验材料

半滑舌鲷家系建立按照陈松林实验室建立的方法进行^[3]。本研究所用的半滑舌鲷家系是 2014 年 3 月在山东省莱州市明波水产有限公司建立的家系, 亲本中父本是当年捕捞用于半滑舌鲷繁殖的野生正常雄鱼, 母本是在山东省莱州市明波水产有限公司养殖的用于 2014 年半滑舌鲷人工繁殖的适龄雌鱼。在 2014 年 12 月对 54 个半滑舌鲷家系进行哈维氏弧菌感染实验, 分别剪取感病群体和抗病群体鳍条, 放于无水乙醇中, -20℃ 条件下保存。本研究采用的 100 尾半滑舌鲷取自家系 F1412 (2014 年 12 号家系命名为 F1412), 其中感

病 151 尾、抗病 165 尾, 存活率为 52.22%。

1.2 实验方法

1.2.1 微卫星标记 从半滑舌鲷全基因组序列^[22]中筛选微卫星序列, 利用这些微卫星序列构建了高密度遗传连锁图谱^[23]。从该连锁图谱上平均每隔 10 cM 左右选取 1 个微卫星标记(SSR), 共 169 个。微卫星引物由华大科技有限公司和金唯智生物科技有限公司合成。

1.2.2 基因组 DNA 制备 本实验提取半滑舌鲷鳍条 DNA, 使用经典的酚-氯仿抽提法^[25], 并用紫外分光光度计测量 DNA 浓度, 将浓度稀释至 50 ng/μL。

1.2.3 BSA 分池 按照范彩霞等^[26]的方法, 取 F1412 家系中抗病、感病个体各 15 尾, 每个样本 DNA 取 20 μL 加入离心管, 保证各管中 DNA 浓度相同, 建成抗病基因池(R)及感病基因池(S)。

1.2.4 PCR 扩增及聚丙烯酰胺凝胶电泳 将 169 个微卫星标记分别以抗病、感病基因池为模板进行 PCR 扩增, PCR 反应体系为 16 μL, 包括模板 DNA 1.0 μL、10×buffer 1.6 μL、dNTPs (2.5 mmol/L) 0.8 μL、上下游引物(10 μmol/L)各 0.4 μL、ddH₂O 12 μL, 最后加入 rTaq 酶 (5 U/μL) 0.15 μL。PCR 反应程序为 95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 58.5℃ 30 s, 72℃ 30 s, 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 7 min, 4℃ 保存。每个 PCR 产物加入 6 μL 变性剂后在 6% 聚丙烯酰胺凝胶上点样 4 μL, 电泳 1.5 h, 银染, 显色, 寻找差异条带。

1.2.5 个体验证 用组成抗病、感病基因池的 30 尾抗病、感病个体, 对筛选的微卫星标记进行第一次单个体验证。对在第一次单个体验证中表现出差异性的微卫星标记进行第二次扩大验证, 感病、抗病个体各取 50 尾。

微卫星标记在抗病、感病群体中的基因条带频率采用 SPSS4.0 软件进行卡方检验, 若卡方检验 $P < 0.05$, 则这个微卫星标记在半滑舌鲷抗病、感病群体中差异显著; 若 $P > 0.05$, 则差异不显著; 若 $P < 0.01$, 则差异极显著。

1.2.6 差异条带的克隆与测序 对聚丙烯酰胺凝胶电泳中抗病个体的 15 条差异条带进行切胶回收, 加 100 μL 双蒸水, 捣碎, 95℃ 金属浴 5 min 后, 室温放置 14 h, 然后 12000 r/min 离心 5 min, 以管中液体为模板做 PCR 扩增, 进行琼脂糖凝胶(浓

度为 2%~3%)电泳,切胶后用 DNA 琼脂糖胶回收试剂盒做胶回收,连接到 pMD18-T 载体上,转化到 TOP10 感受态细胞中,然后送单克隆到金唯智公司测序。将所测序列使用 NCBI BLAST 在线工具进行比对分析,确认差异片段是否为该微卫星标记的目的片段。

1.2.7 QTL 定位及表型数据处理 取抗病、感病个体各 47 尾,感病个体取最开始死亡的 47 尾,对差异显著的微卫星标记所在连锁群上的全部微卫星标记进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,银染显色,统计基因分型。在目标条带区域从上至下以 A、B、C、D 命名,先读父母本基因型,从而推测子代基因型,确认无误后,记录微卫星标记名称、父母本基因型及子代基因型。

采用 Joinmap4.0 软件构建新的遗传连锁图谱,用 WinQTLCart2.5 进行单标记分析和 QTL 定位,设定 LOD 值为 3,记录似然比值、显著水平 P 值、表型变异率等 QTL 区间相关数据。根据实验中半滑舌鲷感染哈维氏弧菌死亡时间,按照 Wang 等^[21]采用的两种不同模式进行分析,在模式一中,将死亡的 47 尾半滑舌鲷定义为“1”,存活下来的 47 尾个体定义为“0”;模式二中,实验所用 47 尾感病个体在 108 h 内死亡,将 36 h 内死亡的半滑舌鲷个体定义为“3”,每隔 36 h 记录一次并依次定义为“2”、“1”,存活下来的个体定义为“0”。

2 结果与分析

2.1 半滑舌鲷抗哈维氏弧菌病 SSR 筛选

2.1.1 BSA 初筛结果 169 个微卫星标记经过抗病、感病基因池筛选后,有 1 个微卫星标记 scaffold479_23523 在抗病、感病基因池间表现出了差异性(图 1),并且差异条带出现在抗病池,大小为 105~115 bp。

2.1.2 第一次单个体验证 对 scaffold479_23523 进行第一次单个体验证,结果发现在 15 尾抗病个体中有 12 尾抗病个体出现差异条带,比例为 80%;15 尾感病个体中有 3 尾感病个体出现差异条带,比例为 20%,具有显著性差异($P<0.05$),差异条带位于 100~115 bp 处(图 2A)。

2.1.3 扩大验证 对 scaffold479_23523 进行第二次扩大样本验证,结果发现 scaffold479_23523 仍然

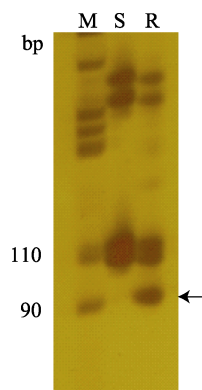


图 1 微卫星标记 scaffold479_23523 在感病、抗病基因池中的扩增

M: 分子量标记; S: 感病基因池样品; R: 抗病基因池样品; 黑色箭头表示差异条带。

Fig. 1 Amplification of scaffold479_23523 in susceptible bulk and resistance bulk

M: marker; S: the susceptible one; R: the resistant one; Black arrow indicates differential bands.

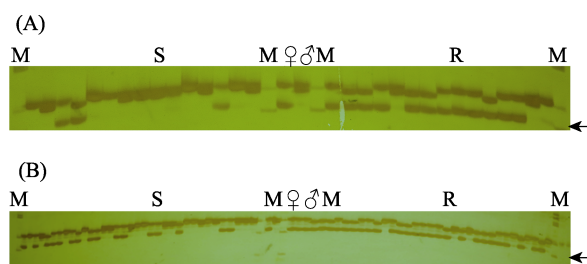


图 2 scaffold479_23523 在 50 尾感病个体和 50 尾抗病个体中的扩增

M: 分子量标记; S: 感病个体; R: 抗病个体; ♂: 父本; ♀: 母本; 黑色箭头: 差异条带; A: S : R=15 : 15; B: S : R=35 : 35.

Fig. 2 Amplification of scaffold479_23523 in 50 susceptible and 50 resistant individuals.

M: marker; S: individuals in susceptible pool; R: individuals in resistant pool; ♂: father; ♀: mother; black arrow: differential bands; A: S*R=15*15; B: S*R=35*35.

表现出极显著差异($P<0.01$)。在 50 尾抗病个体中有 41 尾出现差异条带,比例为 82%;而 50 尾感病个体中只有 19 尾出现差异条带,比例为 38%(图 2B)。

2.1.4 差异条带的克隆测序 对 scaffold479_23523 的差异条带做胶回收,取单克隆送到生物公司测序后,得到 1 段 101 bp 的序列: 5'-AATATA-TTTGCTGACATTTGAGTGCGTGTGTGTGCGTG-TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGCTCCAGCAGACAGACGACTCCGTGCTCCACACAGACAGTCAGTC-3',经与 scaffold479_23523 序列进行 BLAST 比对后,同源性高达 98%,确认其为半滑舌鲷微卫星标记

scaffold479_23523 中的一段序列。

2.2 QTL 结果

根据 Song 等^[23]构建的遗传连锁图谱, scaffold479_23523 位于连锁群 LG18, LG18 上共有 37 个微卫星标记, 最终有 32 个标记统计得到基因分型结果, 采用 Joinmap4.0 软件进行分析, 得到整合图谱、雌性图谱和雄性图谱, 分别命名为 LG18、LG18F、LG18M (图 3, 表 1)。

采用 WinQTLCart2.5 进行单标记分析和 QTL

定位。单标记分析模式一中, 有 3 个标记与抗病性状存在显著的相关性($P<0.05$), 1 个标记与抗病性状存在极显著相关性($P<0.01$), 其中 scaffold479_23523 在 LG18M 中 $P=0.0516$, 接近显著相关性; 模式二中, 有 4 个标记与抗病性状存在显著相关性, 1 个为极显著相关性标记。其中 scaffold080437 在模式一及模式二中的 LG18、LG18F 均表现出极显著相关性, 在 LG18M 中表现出显著相关性 (表 2, 表 3)。

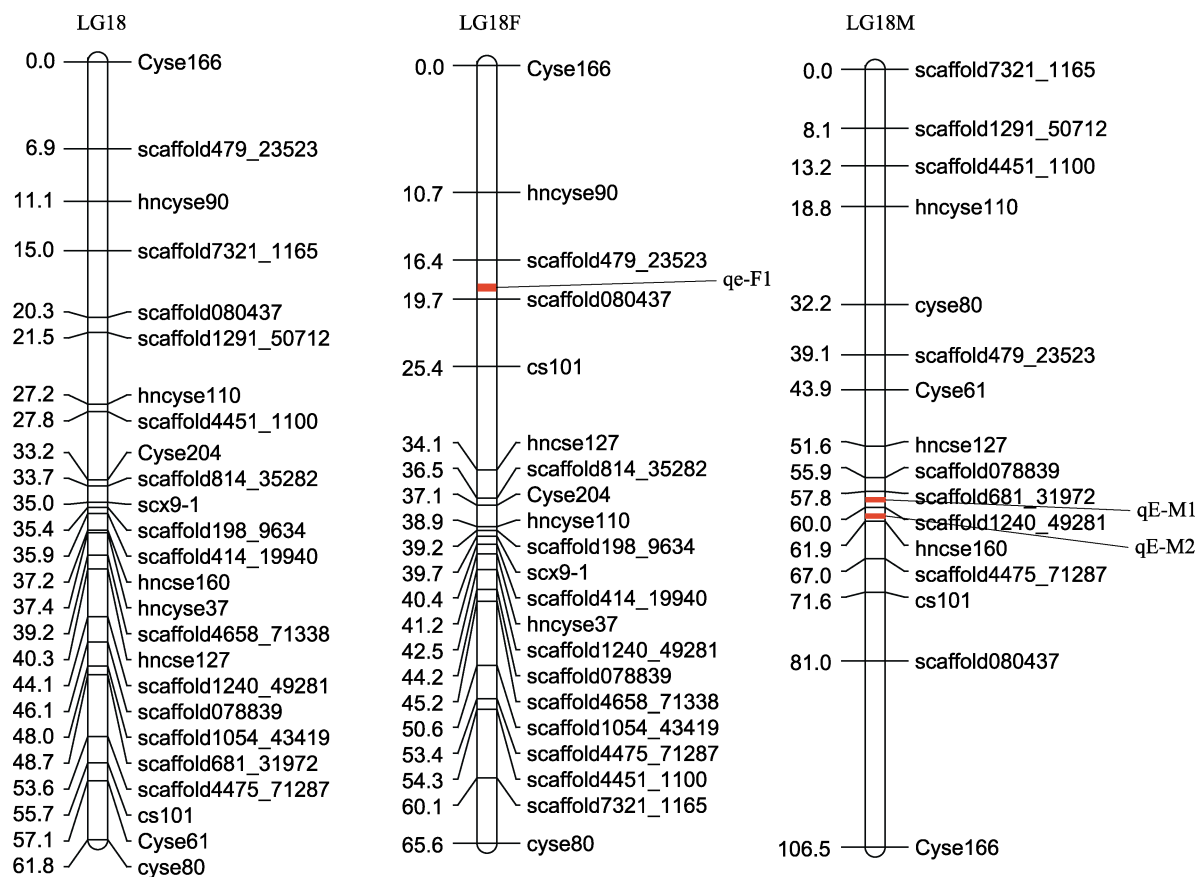


图 3 整合图谱、雌性图谱和雄性图谱及相关 QTL 区间示意图

红色区域: QTL 区间.

Fig. 3 Genetic linkage map for LG18、LG18F、LG18M and related QTL location

Red area: QTL area.

表 1 连锁群参数和覆盖率
Tab. 1 Parameters of linkage groups and the coverage

连锁群 linkage group	标记数 number of markers	标记平均间隔/cM average marker interval	观测长度/cM observed consensus map length	期望长度/cM estimated consensus map length	覆盖率/% coverage
整合图谱 LG18	25	2.38	61.75	66.52	92.83
雌性图谱 LG18F	21	3.28	65.61	72.17	90.91
雄性图谱 LG18M	16	7.10	106.48	120.67	88.24

表 2 模式 1 中单标记分析结果
Tab. 2 Result of single marker analysis at model 1

标记 marker	连锁群 link group	似然比值/% likelihood ratio	P	表型变异率/% variation
scaffold080437 **	LG18	7.851	0.006	8.014
scaffold4475_71287*	LG18	4.405	0.038	4.414
scaffold080437 **	LG18F	7.851	0.006	8.014
scx9-1*	LG18F	4.210	0.006	4.214
cyse80*	LG18M	4.353	0.040	4.361
scaffold080437*	LG18M	4.613	0.034	4.628

注: *代表显著水平为 5%, **代表显著性水平为 1%。
Notes: * and ** indicate significance at 5% and 1% level, respectively.

表 3 模式 2 中单标记分析结果
Tab. 3 Result of single marker analysis at model 2

标记 marker	连锁群 linkage group	似然比值/% likelihood ratio	P	表型变异率/% variation
scaffold080437**	LG18	7.634	0.006	7.784
hncyse110*	LG18	4.638	0.034	4.653
scaffold414_19940*	LG18	4.102	0.046	4.104
scaffold4475_71287*	LG18	4.640	0.034	4.655
cyse80*	LG18	4.660	0.033	4.675
scaffold080437**	LG18F	7.634	0.006	7.784
hncyse110*	LG18F	4.638	0.034	4.653
scaffold4475_71287*	LG18F	4.469	0.037	4.480
cyse80*	LG18F	4.660	0.033	4.675
scaffold080437*	LG18M	4.440	0.038	4.449

注: *代表显著水平为 5%, **代表显著性水平为 1%。
Notes: * and ** indicate significance at 5% and 1% level, respectively.

采用复合区间作图法(CIM)定位 QTL 区间并分析了微卫星位点与抗病性状之间的连锁关系,设置 LOD 为 3.0,共定位出 3 个与抗病性状相关的 QTL 区间,图谱 LG18F 在模式一中定位得到 1 个 QTL 区间 qE-F1,图谱 LG18M 在模式二中定位得到 2 个 QTL 区间 qE-M1、qE-M2(表 4,图 4)。

以 3 个 QTL 区间两端微卫星标记为端点,对半滑舌鲷全基因组进行扫描,筛选可能与免疫相关的基因,在 qE-F1 区间扫描得到 3 个与免疫相关的基因,分别是 meteorin-like、WD repeat domain, phosphoinositide interacting 2 (Wipi2)、Toni

beta-propeller repeat containing 1 (*Tecpr1*)。

3 讨论

3.1 抗哈维氏弧菌相关微卫星标记筛选

在微卫星标记 scaffold479_23523 的第二次扩大验证中,50 尾抗病个体中有 9 尾个体没有扩增出与抗哈维氏弧菌病正相关的差异条带,而在感病个体中有 19 尾具有差异条带,个体中含有抗病基因但在表型上并不表现出抗病性状,这与范彩霞等^[26]关于牙鲆抗淋巴囊肿病相关 SSR 标记筛选的实验结果类似。微卫星引物 scaffold185_597

表 4 QTLs 相关参数及遗传效应
Tab. 4 Parameters of QTLs and estimation of the genetic effects

连锁群 linkage group	模式 model	QTL	最高 LOD 值位置/cM peak position of LOD	最高 LOD 值 peak of LOD	覆盖区域/cM covered area	表型变异率/% variation
LG18F	model 1	qE-F1	18.5	46.5	17.6–19.5	87.36
LG18M	model 2	qE-M1	58.9	3.7	58.7–59.2	64.18
LG18M	model 2	qE-M2	61.0	5.0	60.7–61.6	65.26

在第二次扩大验证中, 46 尾抗病个体中只有 28 尾扩增出差异条带型, 而在 56 尾感病个体有 8 尾扩增出差异条带。许可等^[27]在研究中表明, 生物的很多性状由多基因控制, 并且受到周围环境的影响, 生物的表现型与基因型之间不存在明确的对应关系。本研究采用的样品鱼采用同池混养的方法, 排除了外界环境因素对实验的干扰。

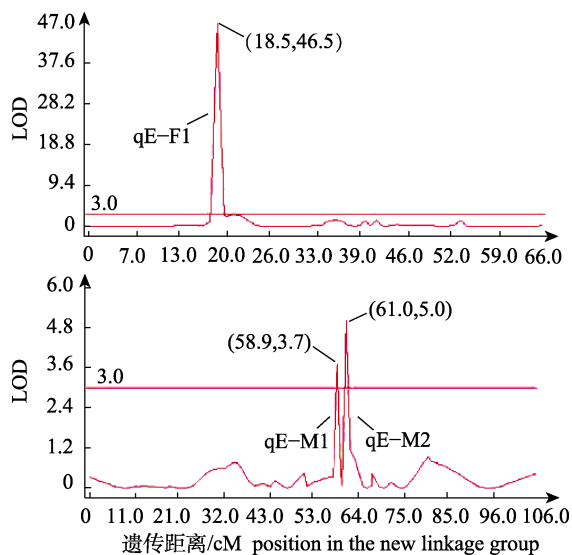


图 4 3 个 QTL 区间(模型 1 中的 qE-F1 及 模型 2 中的 qE-M1、qE-M2)的 LOD 值曲线图
括号里的数据: 在连锁群的位置及 LOD 值。

Fig. 4 LOD curve graphs of three QTLs (qE-F1 in model 1 and qE-M1、qE-M2 in model 2)

The figure in parentheses: position and the value of LOD.

本研究所用家系 F1412 有感病群体 151 尾、抗病群体 165 尾, 在筛选中抗病、感病个体均选用了 50 尾, 进行了三级验证: 基因池初筛、基因池内第一次单体验证、第二次扩大样本验证。其中扩大样本验证抗病、感病个体均为 50 尾, 是大样本, 样本容量大于 30, 有统计学意义; 进一步扩大验证的结果应该与第二次扩大样本验证的结果一致, 所以未将家系全部样本进行验证。Yue^[28]认为大多数在同一个家系筛选到的分子标记仅在家系内特异, 极少数具有普遍适用性。范彩霞等^[26]在筛选牙鲆抗淋巴囊肿病相关分子标记中采用了 3 个牙鲆家系进行筛选, 并且验证了 Fuji 等^[20]筛选出来的牙鲆抗淋巴囊肿病相关分子标记并不适用于范彩霞等^[26]实验中的牙鲆群体, 不具有广适

性。因此需要将筛选到的微卫星标记 scaffold479_23523 放到更多的群体中进行进一步验证。本研究筛选到的半滑舌鳎抗哈维氏弧菌病相关的微卫星标记, 是首次开发出的可能适用于半滑舌鳎抗哈维氏弧菌病的微卫星标记, 为今后半滑舌鳎分子标记辅助选择育种(MAS)奠定了基础。

3.2 QTL 定位

Doerge^[29]的研究表明, 在同一个群体中定位的 QTL 的检测效率一般不高, 需在不同的独立群体中进行验证。本研究得到的 3 个 QTL 区间均未在其他群体中验证, 为了提高检测效率, 应增加更多的群体数量。本研究采用两种模式进行 QTL 数据分析, 模式一常被用来分析质量性状或个别主效基因控制的数量性状, 用于鱼类抗病相关标记的筛选^[18, 20-21]; 模式二常被用来分析由微效多基因控制的性状, 用于植物抗病相关分子标记的筛选^[30], 也可运用于鱼类^[21, 31]。本研究共得到 3 个 QTL 区间: 雌性图谱 LG18F 定位得到 1 个 QTL 区间 qE-F1, 雄性图谱 LG18M 有 2 个 QTL 区间 qE-M1、qE-M2, 其中区间 qE-F1 表型变异率最大 (87.36%), 在半滑舌鳎全基因组序列上的分布范围也最大, 与区间 qE-M1 及 qE-M2 重合。与 Wang 等^[21]的实验结果相似, 区间 qVT-0 (覆盖区域为 48.3~48.6) 与 qVT-2 (覆盖区域为 46.9~49.1) 部分重合, 这表明区间 qE-F1 可能存在更多或更重要的与半滑舌鳎抗哈维氏弧菌病相关的基因。

了解养殖鱼类对疾病的抗病机制是解决疾病问题的关键, 通过 QTL 定位, 从而对全基因组扫描得到与抗病相关的候选基因可为抗病机制的研究提供理论基础。对 3 个 QTL 区间进行全基因组扫描, 得到 3 个与免疫相关的基因, 分别是 Meteorin-like、Wipi2 及 Tecpr1。Ushach 等^[32]和 Rao 等^[33]的研究表明, Meteorin-like 是一种可能参与先天或者后天免疫的细胞因子, 在皮肤、黏膜及 M2 型巨噬细胞中高量表达, 与牛皮癣、痒疹等皮肤性疾病及风湿性关节炎相关, 具有治疗组织炎症、调节代谢的潜能; 并且 Ogawa 等^[34]和 Proikas-Cezanne 等^[35]的研究表明, Wipi2 及 Tecpr1 通过 WIP12-Tecpr1-Atg5 的信号通路, 针对

病原体的侵入发送警报信号给先天免疫系统, 本研究为今后探讨 Meteorin-like、Wipi2 和 Tecpr1 在半滑舌鲷抗哈维氏弧菌病中的作用及其机制奠定了重要基础。

本研究单标记分析中, 显著相关性标记的解释表型变异率最高为 8.014%, 比 Wang 等^[21]研究中的单标记分析最高的解释表型变异率(9.73%)要低, 这对于分子标记辅助选择育种是不够的^[28]。在将来, 必须建立更为精密的图谱, 才能提高育种的准确性。单核苷酸多态性(SNP)具有遗传稳定性高、位点丰富且分布广泛、易于基因分型等优点, 是第三代分子标记技术^[36], 与微卫星标记相比, 能够建立起更加密集的 SNP 图谱, 从而定位出与目的性状更加紧密相关的标记或 QTL 区间。全基因组关联分析(GWAS)技术可检测到标记与性状间极细微的联系, 与 SNP 结合起来可以对影响复杂性状的遗传变异进行分析^[37]。GWAS 技术与 SNP 相结合未来可能在分子标记辅助选择育种(MAS)中发挥出更大的作用。

参考文献:

- [1] Xu X L, Shao P, Li H M, et al. Isolation and identification of the pathogens of the skin ulceration disease of *Cynoglossus semilaevis*[J]. Periodical of Ocean University of China, 2015, 45(11): 29–35. [徐晓丽, 邵蓬, 李贺密, 等. 半滑舌鲷体表溃疡病病原的分离鉴定[J]. 中国海洋大学学报, 2015, 45(11): 29–35.]
- [2] Sun Z Z, Liu X Z, Xu Y J, et al. Technique and technology of productive scale seedling rearing of *Cynoglossus semilaevis* Günter[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(2): 244–248. [孙中之, 柳学周, 徐永江, 等. 半滑舌鲷工厂化人工育苗工艺技术研究[J]. 中国水产科学, 2007, 14(2): 244–248.]
- [3] Chen S L, Du M, Yang J F, et al. Development and characterization for growth rate and disease resistance of families in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(12): 1789–1794. [陈松林, 杜民, 杨景峰, 等. 半滑舌鲷家系建立及其生长和抗病性测定[J]. 水产学报, 2010, 34(12): 1789–1794.]
- [4] Xiao H, Li J, Wang X H, et al. Studies on pathogens of rotted gill and rotted caudal fins of seaperch (*Lateolabrax japonicus*) Fry[J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 1999, 29(1): 87–93. [肖慧, 李军, 王祥红, 等. 鲈鱼苗烂鳃、烂尾病病原菌的研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1999, 29(1): 87–93.]
- [5] Wu H B. A rapid identification method for *Vibriosis* pathogens in marine cage-culture fishes[J]. Tropic Oceanology, 1997, 16(4): 99–103. [吴后波. 海水网箱养殖鱼类弧菌病病原菌快速诊断方法的初步研究[J]. 热带海洋, 1997, 16(4): 99–103.]
- [6] Wang B K, Yu J H, Li Y, et al. Isolation and identification of pathogen (*Vibrio harveyi*) from sea perch, *Lateolabrax japonicus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2002, 9(1): 52–55. [王保坤, 余俊红, 李筠, 等. 花鲈弧菌病病原菌(哈维氏弧菌)的分离与鉴定[J]. 中国水产科学, 2002, 9(1): 52–55.]
- [7] Zhang X H, Zhong Y B, Chen J X. The biological characteristics, epidemiology and detection techniques of *Vibrio Harveyi*[J]. Periodical of Ocean University of China, 2007, 37(5): 740–748. [张晓华, 钟英斌, 陈吉祥. 哈维氏弧菌的生物学特性, 流行病学及检测技术[J]. 中国海洋大学学报, 2007, 37(5): 740–748.]
- [8] Yang S L, Wang Y G, Dong S G. Progress of research on *Vibriosis* in marine cultured fish[J]. Marine Fisheries Research, 2005, 26(4): 75–83. [杨少丽, 王印庚, 董树刚. 海水养殖鱼类弧菌病的研究进展[J]. 海洋水产研究, 2005, 26(4): 75–83.]
- [9] Michelmores R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(21): 9828–9832.
- [10] Pedersen S, Berg P R, Culling M, et al. Quantitative trait loci for precocious parr maturation, early smoltification, and adult maturation in double-backcrossed trans-Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. Aquaculture, 2013, 410–411: 164–171.
- [11] Lee B Y, Penman D J, Kocher T D, et al. Identification of a sex-determining region in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using bulked segregant analysis[J]. Anim Genet, 2003, 34(5): 379–383.
- [12] Eshel O, Shirak A, Weller J I, et al. Fine-mapping of a locus on linkage group 23 for sex determination in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Anim Genet, 2011, 42(2): 222–224.
- [13] Wang C M, Lo L C, Zhu Z Y, et al. A genome scan for quantitative trait loci affecting growth-related traits in an F₁ family of Asian seabass (*Lates calcarifer*)[J]. BMC Genom, 2006, 7: 274.
- [14] Zhang Y, Liang L Q, Chang Y M, et al. Mapping and genetic effect analysis of quantitative trait loci related to body size in common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. Hereditas, 2007, 29(10): 1243–1248. [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): 1243–1248.]
- [15] 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(2): 166–172.
- [16] Sun X W, Liang L Q. A genetic linkage map of common carp (*Cyprinus carpio* L.) and mapping of a locus associated with cold tolerance[J]. *Aquaculture*, 2004, 238(1–4): 165–172.
- [17] 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(1–4): 117–128.
- [18] Ozaki A, Sakamoto T, Khoo S, et al. Quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance/susceptibility to infectious pancreatic necrosis (IPNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Mol Genet Genom*, 2001, 265(1): 23–31.
- [19] Ozaki A, Khoo S K, 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(3): 131–140.
- [20] Fuji K, Kobayashi K, Hasegawa O, et al. Identification of a single major genetic locus controlling the resistance to lymphocystis disease in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Aquaculture*, 2006, 254(1–4): 203–210.
- [21] Wang L, Fan C X, Liu Y, et al. A genome scan for quantitative trait loci associated with *Vibrio anguillarum* infection resistance in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) by bulked segregant analysis[J]. *Mar Biotechnol*, 2014, 16(5): 513–521.
- [22] Chen S L, Zhang G J, Shao C W, et al. Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle[J]. *Nat Genet*, 2014, 46(3): 253–260.
- [23] Song W T, Li Y Z, Zhao Y W, et al. Construction of a high-density microsatellite genetic linkage map and mapping of sexual and growth-related traits in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(12): e52079.
- [24] Chen S L, Li J, Deng S P, et al. Isolation of female-specific AFLP markers and molecular identification of genetic sex in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *Mar Biotech*, 2007, 9(2): 273–280.
- [25] Asahida T, Kobayashi T, Saitoh K, et al. Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea[J]. *Fish Sci*, 1996, 62(5): 727–730.
- [26] Fan C X, Chen S L, Wang L, et al. Screening and identification of SSR markers associated with lymphocystis disease resistance in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(4): 576–582. [范彩霞, 陈松林, 王磊, 等. 牙鲆抗淋巴囊肿病相关 SSR 标记的筛选与鉴定[J]. *水产学报*, 2014, 38(4): 576–582.]
- [27] Xu K, Ma A J, Wang X A, et al. Microsatellites molecular markers and the correlation to growth trait of *Scophthalmus maximus*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2009, 40(5): 577–583. [许可, 马爱军, 王新安, 等. 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)生长性状相关的微卫星标记筛选[J]. *海洋与湖泊*, 2009, 40(5): 577–583.]
- [28] Yue G H. Recent advances of genome mapping and marker-assisted selection in aquaculture[J]. *Fish Fish*, 2014, 15(3): 376–396.
- [29] Doerge R W. Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations[J]. *Nat Rev Genet*, 2002, 3(1): 43–52.
- [30] Shoba D, Manivannan N, Vindhiyavarman P, et al. SSR markers associated for late leaf spot disease resistance by bulked segregant analysis in groundnut (*Arachis hypogaea* L.)[J]. *Euphytica*, 2012, 188(2): 265–272.
- [31] Wang X, Xu W, Liu Y, et al. Quantitative trait loci detection of *Edwardsiella tarda* resistance in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) using bulked segregant analysis[J]. *Chin J Oceanol Limnol*, 2016, 34(6): 1279–1308.
- [32] Ushach I, Burkhardt A M, Martinez C, et al. Meteorin-like is a cytokine associated with barrier tissues and alternatively activated macrophages[J]. *Clin Immunol*, 2015, 156(2): 119–127.
- [33] Rao R R, Long J Z, White J P, et al. Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis[J]. *Cell*, 2014, 157(6): 1279–1291.
- [34] Ogawa M, Sasakawa C. The role of Tecpr1 as a cargo receptor in selective autophagy[J]. *Autophagy*, 2011, 7(11): 1389–1391.
- [35] Proikas-Cezanne T, Robenek H. Freeze-fracture replica immunolabelling reveals human WIPI-1 and WIPI-2 as membrane proteins of autophagosomes[J]. *J Cell Mol Med*, 2011, 15(9): 2007–2010.
- [36] Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases[J]. *Science*, 1996, 273(5281): 1516–1517.
- [37] Wang J Y, Wang H X, Chi R B, et al. Progresses in research of genome-wide association studies in livestock and poultry[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(4): 819–829. [王继英, 王海霞, 迟瑞宾, 等. 全基因组关联分析在畜禽中的研究进展[J]. *中国农业科学*, 2013, 46(4): 819–829.]

Detection of SSR and a QTL analysis of *Vibrio harveyi* resistance in *Cynoglossus semilaevis*

DAI Huan^{1,2,3}, LIU Yang^{2,3}, WANG Wenwen^{2,3}, WEI Zhanfei^{2,3}, GAO Jin^{2,3}, GAO Fengtao^{2,3}, LI Xiangkong^{1,2,3}, LIU Yang¹, CHEN Songlin^{2,3}

1. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;
2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
3. Laboratory for Marine Fisheries, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China

Abstract: The bacterium *Vibrio harveyi* has caused tremendous losses in the *Cynoglossus semilaevis* aquaculture industry. The fundamental approach has been to cultivate a new disease-resistant strain by combining traditional breeding methods with molecular techniques. In this study, bulked segregant analysis and quantitative trait loci (QTL) mapping were used to screen for disease-resistance markers. A total of 100 individuals were selected to form the F1412 family (nomenclature rule: F + year + family number: survival rate, 52.22%), which was challenged with *V. harveyi*, and 169 microsatellite loci were detected across all chromosomes. Following the genomic scan, the scaffold479_23523 marker in the DNA pool was significantly different between the resistant and susceptible groups ($P=0.000006$). Ninety-four individuals were genotyped using all 32 simple sequence repeat markers on LG18, where scaffold479_23523 was located. Three new linkage groups (LG18, LG18F, and LG18M) were identified. Furthermore, two different analytical models were applied to perform a single marker analysis and composite interval mapping with different levels of significance in LG18, LG18F, and LG18M, respectively. In model 1, three significant markers (scaffold4475_71287, scx9-1, and cyse80) and one very significant marker (scaffold080437) were identified, and the qE-F1 resistance-related QTL was detected. The scaffold479_23523 marker was the left LG18F marker with a p -value of 0.0516 in model 1. Model 2 detected four significant markers (hncyse110, scaffold414_19940, scaffold4475_71287, and cyse80), one very significant marker (scaffold08043), and the qE-M1 and qE-M2 QTLs. Both scaffold080437 markers were significantly different ($P<0.001$) in the two models. Four markers (scaffold080437, scaffold479_23523, scaffold4475_71287, and cyse80) may be closely associated with resistance to *V. harveyi* infection in *C. semilaevis*. qE-F1 explained 87.36% of the phenotypic variance and contained G18M qE-M1 and qE-M2. Thus, qE-F1 was considered a major candidate region for *V. harveyi* resistance. After scanning the *C. semilaevis* genome, three immunity-related genes, such as meteorin-like, the WD repeat domain phosphoinositide interacting 2, and Toni beta-propeller repeat containing 1, were detected inside qE-F1. This is the first study to identify *V. harveyi* resistance-related markers and conduct a related QTL analysis in *C. semilaevis*. These results provide a foundation for selective breeding of disease-resistant *C. semilaevis*.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; *Vibrio harveyi*; simple sequence repeats (SSR); bulked segregant analysis (BSA); quantitative trait loci (QTL)

Corresponding author: CHEN Songlin. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn