

牙鲆抗淋巴囊肿病相关 SSR 标记的筛选与鉴定

范彩霞^{1,2}, 陈松林^{1*}, 王磊^{1,3}, 刘洋^{1,2}, 张英平^{1,2}

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

3. 河南师范大学水产学院, 河南 新乡 453007)

摘要: 为了筛选出中国牙鲆群体的抗淋巴囊肿病相关 SSR 标记, 实验采用分群分析法对 102 个牙鲆个体(感病 56 个, 抗病 46 个)进行了抗淋巴囊肿病相关 SSR 标记的筛选。首先构建了抗、感基因池(抗病个体和感病个体各 15 个), 并利用 178 对微卫星引物对其进行了扫描; 对于在抗、感池间扩增出差异条带的引物, 用构建基因池的 30 个个体对其进行了第一次单个体验证; 对于在第一次单个体验证中差异显著的引物用 102 个个体进行了第二次验证。结果显示, 有 4 对引物(scaffold440_22585、scaffold826_5003、scaffold703_4284 和 scaffold185_597)在抗、感基因池间扩增出了差异条带; 经第一次单个体验证, 表明 scaffold826_5003 ($P = 0.023$) 和 scaffold185_597 ($P_{178bp} = 0.028$, $P_{173bp} = 0.009$) 的差异条带在抗、感个体中呈显著性差异; 经第二次单个体验证, 发现 scaffold185_597 的差异条带在抗、感个体中出现的频率分别为 60.9% 和 14.3% ($P = 0.001$), 差异显著; 对 scaffold185_597 在 10 个抗病个体中扩增出的差异条带进行了克隆并测序, 经 BLAST 比对, 证实其为黄海水产研究所水产基因组与细胞工程研究室公布的牙鲆微卫星标记 scaffold185_597 中的一段, 同源性达到 96%。研究表明, 微卫星标记 scaffold185_597 可能与牙鲆抗淋巴囊肿病相关。

关键词: 牙鲆; 淋巴囊肿病; 微卫星标记; 分群分析法

中图分类号: S 941.41

文献标志码: A

牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 是一种重要的海水养殖鱼类, 属鲽形目 (Pleuronectiformes)、鲽科 (Bothidae)、牙鲆亚科 (Paralichthyinae)、牙鲆属 (*Paralichthys*), 生长速度快、个体大、肉质鲜美且繁殖力强, 深受消费者和养殖户欢迎, 经济价值很高。因此, 牙鲆作为一种重要的海水经济鱼类而被广泛养殖于中国、日本和韩国等亚洲国家。但是, 近年来随着牙鲆养殖产业的不断壮大, 各类疾病也开始频繁暴发, 从牙鲆苗种到养成阶段几乎均有病害的发生, 最高死亡率可达 80% 以上, 给养殖户造成了巨大的经济损失^[1]。淋巴囊肿病就是危害较为严重的疾病之一。

鱼类淋巴囊肿病是由淋巴囊肿病毒

(lymphocystis disease virus, LCDV) 感染引起的, 它是第一个被发现的鱼类病毒性疾病^[2]。据记载, 此病在欧洲、南美洲、北美洲和亚洲均暴发过^[3]。1997 年, 牙鲆淋巴囊肿病第一次在我国暴发^[4], 其主要病症是在病鱼的口唇部、鳍条和体表等处长出肿瘤状的囊肿物, 有时也会长在鳃部和内脏器官上。患病牙鲆由于肿瘤物的附着而摄食不自主, 导致生长缓慢、鱼体瘦弱, 外表极其难看。虽然该病死亡率并不高, 但患病鱼几乎丧失其全部的经济价值^[1,5-6]。近年来, 该病在工厂化牙鲆养殖中频繁暴发, 传播快, 蔓延迅速。目前还没有治疗该病的有效药物, 主要以预防为主^[7]。培育抗淋巴囊肿病苗种成为控制乃至攻克此病的一种可行性手段。日本学者 Fuji 等^[8-9]开发出了

收稿日期: 2013-12-09

修回日期: 2014-02-20

资助项目: 国家“九七三”项目(2010CB126303); 国家“八六三”高技术研究发展计划(2012AA10A408); 农业部“九四八”项目(2011-SS); 山东省自主创新重大专项(2013CX80202); 山东省泰山学者工程专项

通信作者: 陈松林, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

<http://www.scxuebao.cn>

日本牙鲈群体抗淋巴囊肿病相关分子标记技术并进行了应用。Yue^[10]认为分子标记的选择在家系内是比较有效的,因为大多数被筛选到的标记都是家系内特异的,仅有极少数具有普遍适用性。因此亟待筛选出适合于中国牙鲈群体的抗淋巴囊肿病相关标记。

Michelmore 等^[11]开发了一种分群分析法(bulked segregant analysis, BSA),可用于快速鉴别与基因组特定区域相连锁的标记。该方法基于某等位基因的分离群体,按其表型分类建立基因池,即将每一种表型内一定数量极端个体 DNA 等量混合组成相应的基因池。此方法具有高效性、耗费少等优点,现已被广泛应用。初期,BSA 以在植物研究中应用为主,陈忠明等^[12]用 BSA 方法鉴别出了与秋稻(*Oryza sativa*)品种 Aus373 广亲和基因连锁的标记;王建设等^[13]获得了一个与甜瓜(*Cucumis melo*)白粉病抗病基因位点连锁的分子标记;Xie 等^[14]筛选出了与稻草耐酸性去垢纤维相关的微卫星标记;丁成龙等^[15]获得了与多花黑麦草(*Lolium multiflorum*)抗叶斑病基因连锁的 EST-CAPS 标记;桂金山等^[16]将此方法运用到了牧草基因的定位中;宋鹏举等^[17]将该方法运用到了玉米(*Zea mays*)生态核雄性不育的发现与遗传研究中。近年来,BSA 方法在水产动物研究中的应用也较多,卢钟磊等^[18]结合 BSA 技术筛选出 9 个与褐牙鲈耐热相关的分子标记;刘改艳等^[19]筛选出 3 个与乌鳢(*Channa argus*)性别相关的微卫星标记;马爱军等^[20]筛选出与大菱鲈(*Scophthalmus maximus*)耐高温性状相关的分子标记。但有关牙鲈抗淋巴囊肿病相关微卫星分子标记的研究在国内尚未见报道。本研究采取 SSR (simple sequence repeats, 简单重复序列)结合 BSA 技术,首先在抗、感基因池间筛选出有差异的标记,再通过个体验证来确定初步筛选出的标记的可靠性,为牙鲈分子标记辅助育种提供支持。

1 材料与与方法

1.1 样品采集

实验牙鲈养殖在山东省海阳市黄海水产有限公司。将 2009 年 5 月建立的牙鲈家系注射荧光标记之后进行同池混养,2010 年 3 月自然暴发了淋巴囊肿病,同年 6 月分别剪取感病个体和抗病个体部分鳍条(中间未采取治疗措施),放置于无

水乙醇中,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存。本实验采用的 102 个牙鲈个体(感病 56 个、抗病 46 个)取自 F0905(2009 年第 5 号家系命名为 F0905)、F0990 和 F0927 3 个家系的全部存活个体。

1.2 微卫星引物

从 Song 等^[21]基于全基因组建立起来的高密度微卫星连锁图谱上平均每隔 10cM 左右选取 1 个微卫星标记,共 178 个微卫星标记。相应的微卫星引物由南京金瑞斯生物科技有限公司合成。

1.3 基因组 DNA 制备

采用经典的酚-氯仿抽提法^[22]进行牙鲈 DNA 的提取。提取的 DNA 用紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳进行浓度和质量的测定,用灭菌去离子水稀释至 $50\text{ ng}/\mu\text{L}$ 。

1.4 BSA 分池

取 F0905 抗病个体和感病个体各 15 个,每个取等量的 DNA 溶液构成相应的抗病和感病基因池。

1.5 PCR 扩增及聚丙烯酰胺凝胶电泳

利用 178 对微卫星引物分别对抗、感基因池进行 PCR 扩增,寻找差异条带。PCR 总体系为 $15\text{ }\mu\text{L}$: $10\times\text{ buffer }1.5\text{ }\mu\text{L}$, $\text{dNTP mixture }0.4\text{ }\mu\text{L}$, 上、下游引物($10\text{ }\mu\text{mol/L}$)各 $0.3\text{ }\mu\text{L}$, $\text{rTaq 酶 }0.5\text{ U}$, 基因组 DNA 大约 50 ng 。PCR 反应程序为 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min , $30\text{ s }95\text{ }^{\circ}\text{C}$, $30\text{ s }57.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ^[21], $30\text{ s }72\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 个循环,最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min 。PCR 产物经变性后在 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳进行基因型分型,上样量为 $3.6\text{ }\mu\text{L}$, 恒压 1000 V , 电泳 1.5 h 。电泳结束后进行银染显色,并统计带型。

1.6 差异条带的个体验证

对在抗、感基因池中扩增出差异常条带的微卫星标记进行单个体验证。首先在组成抗、感基因池的 30 个个体中进行第一次单个体验证;30 个个体中扩增差异显著的微卫星标记在 F0905、F0990 和 F0927 3 个家系的共 102 个个体中进行第二次单个体验证。

1.7 差异条带的克隆与测序

对 10 个扩增出差异常条带的抗病个体重新进行 PCR 扩增、电泳、银染,显色后立即从聚丙烯酰胺凝胶上切下目的条带,加 $100\text{ }\mu\text{L}$ 双蒸水,用枪头捣碎凝胶, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min , 室温过夜。 12000 r/min 离心 2 min , 吸取上清液作为再次 PCR 反应的模

板。再次 PCR 反应产物在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳,电泳条带用 DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒回收、纯化。将纯化产物与 PMD18-T 载体进行连接,转化进入 TOP10 大肠杆菌感受态细胞,挑取阳性克隆进行测序。测序结果通过 BLAST 比对,验证差异片段是否为微卫星位点的序列。

1.8 数据分析

通过 BANDSCAN 软件对电泳结果进行分析,获取差异条带的分布情况、碱基数及泳动位置。

用 SPSS 18.0 软件对微卫星引物在抗、感个体中所扩增出的差异条带频率进行卡方检验,若卡方检验 $P < 0.05$ 就认为这个条带在牙鲈抗、感个体中分布差异显著,若 $P < 0.01$ 就认为差异极显著。

2 结果

2.1 日本牙鲈群体抗淋巴囊肿病相关分子标记的验证

分别选取 F0905、F0990、F0927 家系中抗、感个体各 15、8、3 共 52 个个体对 Fuji 等^[9]开发出来的牙鲈抗淋巴囊肿病相关标记进行验证,发现 Poli9-8TUF 的 147 bp 条带在抗病个体和感病个体中差异不显著 ($P = 0.258 < 0.05$); 在 Poli121TUF 和 Poli-RC15-35TUF 中也未发现在两个群体中有显著差异的条带(图 1)。因此认为 Fuji 等^[9]筛选出的日本牙鲈群体抗淋巴囊肿病相关分子标记并不适用于本实验室的中国牙鲈选育群体。

2.2 BSA 分池及 PCR 扩增结果

利用 178 对微卫星引物对所构建的抗、感基因池进行 PCR 扩增,有 4 对引物在抗、感基因池间扩增出了差异条带(图 2)。其中 scaffold826_5003 和 scaffold440_22585 的差异条带出现在感病池中,scaffold703_4284 的差异条带出现在抗病池中,而 scaffold185_597 在抗、感基因池中均扩

增出了差异条带。使用 BANDSCAN 软件计算出了差异条带的碱基数(表 1)。

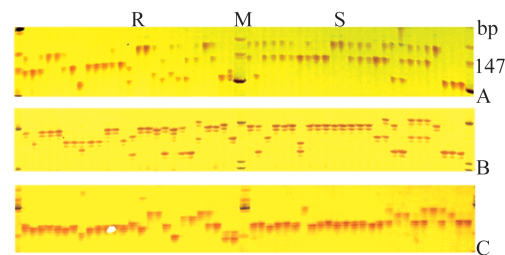


图 1 Poli9-8TUF (A)、Poli-RC15-35TUF (B) 和 Poli121TUF (C) 在抗病个体和感病个体中的扩增
M. PBR322 分子标记; R. 抗病个体; S. 感病个体

Fig. 1 Amplification of Poli9-8TUF (A), Poli-RC15-35TUF (B) and Poli121TUF (C) in disease resistant individuals and disease susceptible individuals
M. PBR322 DNA Marker; R. disease resistant individuals; S. disease susceptible individuals

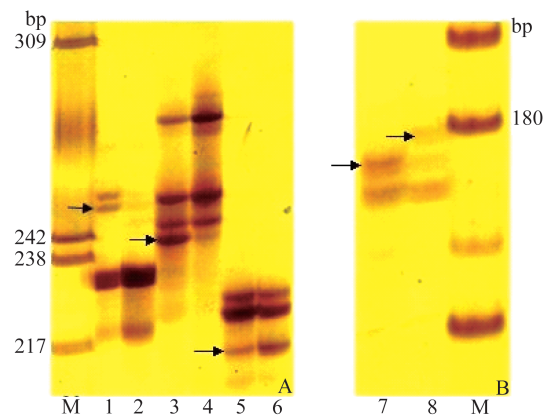


图 2 引物 scaffold440_22585 (1, 2), scaffold826_5003 (3, 4), scaffold703_4284 (5, 6) 和 scaffold185_597 (7, 8) 在抗、感基因池中的扩增
1, 3, 5, 7. 感病基因池; 2, 4, 6, 8. 抗病基因池; M. PBR322 分子标记; 黑色箭头. 差异条带

Fig. 2 The bands amplified by primers scaffold440_22585 (1, 2), scaffold826_5003 (3, 4), scaffold703_4284 (5, 6) and scaffold185_597 (7, 8) in gene pools
1, 3, 5, 7. disease susceptible; 2, 4, 6, 8. disease resistance; M. PBR322DNA marker; black arrow. differential bands

表 1 BSA 分池的 PCR 扩增差异条带统计

Tab. 1 The statistics of the differential bands from PCR-amplification by means of the BSA analysis

位点 locus	scaffold440_22585	scaffold826_5003	scaffold703_4284	scaffold185_597
差异片段/bp fragment size	253	243	215	178
出现基因池 gene pool	S	S	R	R

注:R 代表抗病基因池;S 代表感病基因池

Note: R represents the gene pool of disease resistance and S for disease susceptible

3 讨论

鱼类的很多性状属于数量性状,受多基因控制,且受环境的影响,表现为连续的变异,表现型和基因型之间没有明确的对应关系^[23]。在本实验中,有8个表型感病的牙鲆个体扩增出了与抗病正相关的差异条带,而有18个表型抗病的牙鲆个体却未扩增出与抗病性状呈正相关的差异条带。这与总体趋势存在一定的偏差,即个体本身含有某个与抗病相关的基因在表型上并不一定是抗病的。因此,在研究抗病等数量性状时需要以一定数量的样本为基础,在总体趋势上归纳得出结论。本实验选用的是存活个体总数大于20的3个家系,样本数量较大,可为牙鲆抗病分子标记辅助育种提供一定的参考。

家系内分子标记辅助育种已成为改良水产品的一种重要手段^[24],因为大多数标记是家系内特异的,并不具有广泛的适用性^[10]。据报道,目前只有大西洋鲑(*Salmo salar*)抗传染性胰腺坏死病相关标记具有一定的广适性^[25]。对Fuji等^[9]筛选出来的牙鲆抗淋巴囊肿病相关标记进行验证发现,这些标记并不适用于本实验室的牙鲆育种群体。这可能是由于本实验室的中国牙鲆群体与日本牙鲆群体遗传背景不同,遗传差异较大。同时Fuji等^[9]开发的抗淋巴囊肿病相关分子标记是基于一个回交家系,由于不同群体间具有遗传分层现象,因此此标记可能只适用于日本群体。对于同一物种的不同育种群体,特别是遗传差异较大的育种群体,应当分别筛选适合这些育种群体的相关分子标记。

从本研究结果来看,在牙鲆抗淋巴囊肿病相关SSR标记的筛选中,178个微卫星标记中只有1个可能与牙鲆抗淋巴囊肿病相关。这可能是因为本研究所用材料是亲缘关系较近的3个家系,即F0905、F0990和F0927都是F0750的后代,遗传背景相似;另外,这3个家系是同池混养,外界的环境条件相同。因此,理论上个体之间只表现出遗传物质某一方面的差异,比如抗病性能。同时F0750是抗鳃弧菌能力较强的牙鲆家系^[26],而本研究采用的材料全部是F0750的后代,所以本实验筛选到的牙鲆抗淋巴囊肿病相关标记有可能是一个双抗标记。

本研究采用SSR-BSA技术得到了一个与牙

鲆抗淋巴囊肿病相关的候选标记,这是国内开发出的第一个有可能适用于中国牙鲆群体的抗淋巴囊肿病相关SSR标记。这为研究中国牙鲆抗淋巴囊肿病相关机制及发掘抗病相关基因,进而开展分子标记辅助育种工作打下了良好的基础。

参考文献:

- [1] Xiao G H, Wang Y M, Zhu Q J, *et al.* Investigation of bastard halibut epidemiology[J]. Hebei Fisheries, 2007(10):44-46,54. [肖国华,王玉梅,朱青杰,等.牙鲆流行病学调查研究.河北渔业,2007(10):44-46,54.]
- [2] Zheng F R, Sun X Q, Liu H Z, *et al.* Distribution and expression *in vitro* and *in vivo* of DNA vaccine against lymphocystis disease virus in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2010, 28(1): 67-74.
- [3] Wang X L, Song S S, Hu G B, *et al.* Progress of search on lymphocystis disease in fish [J]. Life Science Instruments, 2009, 7(3):38-43. [王锡亮,宋珊珊,胡国斌,等.鱼类淋巴囊肿病的研究进展.生命科学仪器,2009,7(3):38-43.]
- [4] Qu J, Shen H P, Li X G, *et al.* Epidemiological investigation for lymphocystis disease in *Parilichthys olivaceus* [J]. Inspection and Quarantine Science, 2001, 11(6):34-35. [曲径,沈海平,李笑刚,等.威海地区养殖牙鲆鱼淋巴囊肿病流行病学调查.检验检疫科学,2001,11(6):34-35.]
- [5] Qu J, Jiang Y L, Shen H P, *et al.* A preliminary report on lymphocystis disease in *Paralichthys olivaceus*[J]. China Animal Health Inspection, 1998, 15(2):1-3. [曲径,江育林,沈海平,等.牙鲆鱼淋巴囊肿病初报.中国动物检疫,1998,15(2):1-3.]
- [6] Xu J. Control of lymphocystosis in culture of Olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Hebei Fisheries, 2005(4):39-40. [许杰.养殖牙鲆淋巴囊肿病及防治.河北渔业,2005(4):39-40.]
- [7] Zhou L, Gong Q L, Yu K K. Disease of *Paralichthys olivaceus*[J]. Journal of Qingdao Ocean University: Natural Science, 1997, 27(2):173-180. [周丽,宫庆礼,俞开康.牙鲆的疾病.青岛海洋大学学报:自然科学版,1997,27(2):173-180.]
- [8] Fuji K, Hasegawa O, Honda K, *et al.* Marker-assisted breeding of a lymphocystis disease-resistant Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Aquaculture,

- 2007,272(1-4):291-295.
- [9] 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.
- [10] Yue G H. Recent advances of genome mapping and marker-assisted selection in aquaculture[J]. *Fish and Fisheries*,2013,DOI:10.1111/faf.12020.
- [11] Michelmores R W, Paran I, Kesseli R V. 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]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,1991,88(21):9828-9832.
- [12] Chen Z M, Zou J S, Zhu L H, *et al.* Identification of Aus373 and RFLP marker's genetic linkage for autumn rice varieties by bulked segregant analysis [J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*,1996,12(4):1-6. [陈忠明,邹江石,朱立煌,等.用分群分析法(BSA)鉴别与秋稻品种 Aus373 广亲和基因连锁的 RFLP 标记. *江苏农业学报*,1996,12(4):1-6.]
- [13] Wang J S, Song S H, Tang X W, *et al.* Genetics and molecular marker of the fene for disease resistance to powdery mildew on *Cucumis melo*. L [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*,2005,20(1):89-92. [王建设,宋曙辉,唐晓伟,等.甜瓜白粉病抗性基因的遗传与分子标记. *华北农学报*,2005,20(1):89-92.]
- [14] Xie J K, Wu X L, Jin L, *et al.* Identification of simple sequence repeat (SSR) markers for acid detergent fiber in rice straw by bulked segregant analysis [J]. *Agricultural and Food Chemistry*,2006,54(20):7616-7620.
- [15] Ding C L, Shen Y X, Gu H R, *et al.* Identification of an EST-CAPS marker linking to the resistance gene of Italian ryegrass gray-leaf-spot disease by bulked segregant analysis [J]. *Acta Agrestia Sinica*,2006,14(1):9-13,23. [丁成龙,沈益新,顾共如,等.分群分析法获得与多花黑麦草抗叶斑病基因连锁的 EST-CAPS 标记. *草地学报*,2006,14(1):9-13.]
- [16] Gui J S, Wang Y W, Fang C. Application of bulked segregant analysis to gene mapping in forage [J]. *Pratacultural Science*,2007,24(11):26-31 [桂金山,王赞文,方程.混合分群分析法及其在牧草基因定位中的应用. *草业科学*,2007,24(11):26-31.]
- [17] Song P J, Ji H Q, Pei D M, *et al.* Discovery and genetic analysis of a new ecological-sensitive genic male sterile line in maize [J]. *Journal of Henan Agricultural University*,2011,45(2):133-136. [宋鹏举,季洪强,裴东明,等.玉米生态核雄性不育系的发现与遗传研究. *河南农业大学学报*,2011,45(2):133-136.]
- [18] Lu Z L, Chi X C, Wang Y Q, *et al.* The screening of microsatellites molecular markers with correlation to heat-resistance of *Paralichthys olivaceus* [J]. *Journal of Xiamen University: Natural Science*,2007,46(3):396-402. [卢钟磊,池信才,王义权,等.褐牙鲆耐热性状相关的微卫星分子标记筛选. *厦门大学学报:自然科学版*,2007,46(3):396-402.]
- [19] Liu G Y, Chen K C, Zheng G M, *et al.* Screening and identification of female-specific DNA fragments in *Channa argus* using SSR-BSA [J]. *Journal of Fisheries of China*,2011,35(2):170-175. [刘改艳,陈昆慈,郑光明,等.SSR-BSA 技术对乌鳢性别差异标记的初步筛选. *水产学报*,2011,35(2):170-175.]
- [20] Ma A J, Xu K, Huang Z H, *et al.* Screening of microsatellite molecular marker associated with heat-resistance of Turbot (*Scophthalmus maximus* L.) [J]. *Advances in Marine Science*,2011,29(3):370-378. [马爱军,许可,黄智慧,等.大菱鲆与耐高温性状相关的微卫星标记筛选. *海洋科学进展*,2011,29(3):370-378.]
- [21] Song W T, Pang R Y, Niu Y Z, *et al.* Construction of high-density genetic linkage maps and mapping of growth-Related quantitative trait loci in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *PLoS One*,2012,7(11):e50404.
- [22] Liu Y G, Chen S L, Li B F. Genetic structure analysis for the cultured stock of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) by microsatellite marker [J]. *Marine Fisheries Research*,2005,26(5):27-33. [刘云国,陈松林,李八方.牙鲆养殖群体遗传变异的微卫星标记研究. *海洋水产研究*,2005,26(5):27-33.]
- [23] Xu K, Ma A J, Wang X A. 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.大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)生长性状相关的微卫星标记筛选. *海洋与湖沼*,2009,

- 40(5):577-583.]
- [24] Sonesson A K. Within-family marker-assisted selection for aquaculture species [J]. *Genetics Selection Evolution*, 2007, 39(3):301-317.
- [25] Moen T, Sonesson A K, Hayes B, *et al.* Mapping of a quantitative trait locus for resistance against infectious salmon anaemia in Atlantic salmon (*Salmo Salar*): comparing survival analysis with analysis on affected/resistant data [J]. *BMC Genetics*, 2007, 53(8):1-13.
- [26] Chen S L, Tian Y S, Xu J, *et al.* Development and characterization for growth rate and disease resistance of disease-resistance population and family in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32(5):665-673. [陈松林, 田永胜, 徐田军, 等. 牙鲆抗病群体和家系的建立及其生长和抗病性能初步测定. 水产学报, 2008, 32(5):665-673.]

Screening and identification of SSR markers associated with lymphocystis disease resistance in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)

FAN Caixia^{1,2}, CHEN Songlin^{1*}, WANG Lei^{1,3}, LIU Yang^{1,2}, ZHANG Yingping^{1,2}

(1. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fishery Resources Certificated by the Ministry of Agriculture, 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, China;

3. College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: In order to screen out lymphocystis disease resistance-related SSR markers in Chinese flounder population, 102 individuals were used (56 disease susceptible and 46 disease resistant individuals) in the present study. Firstly, two gene pools were constructed using 15 susceptible individuals and 15 resistant individuals, respectively. The two gene pools were scanned using 178 pairs of microsatellite primers. Secondly, the differential bands amplified in gene pools were verified using 30 individuals which were used to construct the gene pools for the first time. Lastly, a second verification for 102 individuals was performed to verify the difference significance of the differential bands identified in the first verification. Results of BSA analysis demonstrated that some differential bands were amplified using four pairs of primers (scaffold440_22585, scaffold826_5003, scaffold703_4284 and scaffold185_597). The first verification indicated that the differential bands are significantly different in the SSR markers scaffold826_5003 ($P = 0.023$) and scaffold185_597 ($P_{178bp} = 0.028$, $P_{173bp} = 0.009$). And in the second verification, the difference was extremely significant in the totally 102 individuals with the SSR marker scaffold185_597, the frequency of differential bands in disease resistant individuals and disease susceptible individuals was 60.9% and 14.3%, respectively ($P = 0.001 < 0.01$). The differential bands amplified from ten disease resistant individuals using primer scaffold185_597 were cloned and sequenced. Sequence alignment by BLAST confirmed that the bands were fragments of microsatellite marker scaffold185_597 published by lab for aquatic genomics and cell engineering in Yellow Sea Fisheries Research Institute, homology of which was up to 96%. The present study has shown that the microsatellite marker scaffold185_597 may be associated with lymphocystis disease resistance in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*), providing some basis for the molecular marker-assisted selection in Chinese flounder.

Key words: Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*); lymphocystis disease; SSR; BSA

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