

刺参微卫星标记与生长性状体重、体长的相关分析

孙国华¹, 杨建敏^{1*}, 孙孝德^{1,3}, 宋志乐², 王卫军¹, 刘小静¹

(1. 山东省海洋水产研究所, 山东 烟台 264006;

2. 山东烟台市芝罘区渔业技术推广站, 山东 烟台 264001;

3. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 运用单标记分析法分析了10个微卫星位点与控制体重、体长数量性状的QTL的连锁关系。10对微卫星引物在8月龄具有生长性状差异的60个刺参个体基因组DNA中扩增得到50个等位基因,每个微卫星位点等位基因数3~7个,平均有效等位基因个数5.0。10个微卫星位点的多态信息含量为0.2680~0.8256不等,观测杂合度为0.0833~0.6667。采用SPSS软件对刺参的体重、体长生长性状和微卫星位点相关性进行分析,结果显示,微卫星位点AjSSR02基因型AB、AD、CD与体重和体长相关,AjSSR04标记中等位基因A对生长性状有正面影响,位点AjSSR06基因型FF个体仅平均体重与其他基因型个体显著差异,AjSSR09标记的A和B等位基因分别对生长性状具有正面和负面不同影响。

关键词: 刺参; 微卫星; 遗传多样性; 生长性状; 相关分析

中图分类号: Q 958.1; S 968.9

文献标识码: A

海参产业作为我国渔业中一个新兴产业,已成为我国水产养殖业内产值、利润最高的产业之一,目前年产值已超200亿元。作为海参主要养殖品种的刺参(*Apostichopus japonicus*),在分类上隶属棘皮动物门(Holothuroidea)、海参纲(Echinodermata)、楯手目(Aspidochirotida),其养殖规模近几年发展迅速,但目前刺参养殖所用的亲参由于没有进行系统的品种选育和改良,刺参苗种质量参差不齐,生长性状差异显著,刺参种质问题成为阻碍刺参养殖业健康可持续发展的首要因素。

研究表明控制经济性状的数量性状基因座(quantitative trait locus, QTL)存在主效基因^[1],一或两个主效基因可反映一个数量性状表型变异的10%~50%以上。利用分子遗传标记进行标记辅助选择(marker assisted selection, MAS),找到与这些数量性状位点相连锁的分子遗传标记,实现缩短世代间隔、早期选种及提高选种准确性,并加快新品种的培育,是当今动物遗传育种研究

的热点之一。微卫星又称简单序列重复(simple sequence repeats, SSR),广泛而随机分布于真核生物的基因组中^[2-3]。作为第二代分子标记手段,微卫星标记具有等位基因突变快、多态性高、杂合度大、信息含量丰富、呈共显性等显著优点^[4-5],在水产动物的种质鉴定、遗传进化、连锁图谱构建、QTL定位等方面得到广泛应用^[6-9]。作为分析与重要经济性状的遗传连锁关系最理想的标记,国内已有鲤(*Cyprinus carpio*)、大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)等与生长性状相关微卫星标记的研究^[10-12]。

本实验以10个微卫星座位的多态性为基础,分析其与刺参体重、体长的相关性,采用单标记分析法筛选与刺参生长性状相关分子标记,为刺参体重和体长的间接选择提供参考数据,同时也为刺参经济性状的QTL定位和进一步分子标记辅助育种奠定基础。

收稿日期:2010-11-05 修回日期:2011-01-17

资助项目:山东省良种工程项目(2008—2011);山东省优秀中青年科学家奖励基金(博士基金)项目(2008BS06004);山东省科技攻关项目(2008GG10005023)

通讯作者:杨建敏, E-mail: ladderup@126.com

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用的刺参群体来自蓬莱刺参养殖场。同批次亲本刺参亲本繁育后代,随机选取同一养殖池中8月龄刺参60头,个体编号,测量体长体重生长数据,剖取纵肌,液氮保存。

1.2 实验方法

生长表型性状度量 由于不同条件下刺参体形变化差异巨大,为保证测量数据的有效性和一致性,所有受试个体每10头暂养于80 cm × 45 cm × 60 cm玻璃缸中,在无刺激自然伸展状态下测量刺参头至尾全长为体长;刺参捞出海水10 min(期间排出腹腔大量海水)后,以吸水滤纸除去表面水分,测量刺参体重。

基因组DNA的提取 刺参纵肌100 mg,液氮研磨,加入700 mL CTAB提取缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl pH 8.0,20 mmol/L EDTA-Na₂,1.4 mol/L NaCl,2% CTAB,0.1% β-巯基乙醇)

和终浓度为100 μg/mL蛋白酶K,55 °C消化3 h或37 °C过夜,等体积酚氯仿(酚:氯仿=1:1)、氯仿抽提,二倍体积乙醇沉淀,TE溶解,紫外分光光度计定量,-20 °C保存备用。

微卫星引物的设计及筛选 实验所用微卫星引物序列来自刺参基因组磁珠法富集及GeneBank刺参EST序列筛选所得微卫星位点设计^[13],引物在上海生工生物技术公司合成,筛选出10对多态性较高的引物用于后续研究(表1)。

微卫星DNA的扩增 以60头刺参个体基因组DNA为模板,每个PCR反应体系总体积为25 μL,其中含约100 ng的基因组DNA,10 pmol的引物,2.5 μmol MgCl₂,0.2 μmol dNTP,Taq DNA聚合酶1 U。PCR反应条件为:94 °C预变性4 min,94 °C变性40 s,按每对引物的退火温度反应40 s,72 °C延伸40 s,30个循环;之后72 °C 10 min,4 °C保温。PCR产物1%琼脂糖凝胶电泳,对明确有扩增产物的引物对通过8% (W/V)聚丙烯酰胺凝胶电泳和硝酸银染色检测其多态性。

表1 刺参所选微卫星引物的名称、序列及PCR反应条件

Tab.1 Microsatellite loci, primer sequence and conditions of PCR in *A. japonicus*

位点 locus	GeneBank 索引号 GeneBank accession no.	中心重复序列 core sequence	扩增片段长度(bp) fragment length	引物序列(5'-3') primer sequences(5'→3')	退火温度(°C) annealing temperature
AjSSR01	AB106631	(ca) ₁₅	286	ACTAAAAAGTCATGGACACCC AATCATAGCCCATTTTCTGT	53
AjSSR02	AB106637	(ca) ₁₁ ...(at) ₆	305	GCAGGAGGATCTAAAATACAT ATCGAACACAACACACTTATC	53
AjSSR03	AB106628	(ca) ₉	398	CAAACGCATACAATTACACA CGATCGATAGTCTCAATC	54
AjSSR04	AB106638	(ca) ₈	322	GCTGAAGGCAAAAGGAATCT GTAGCAAATGTGGCAAGGAT	52
AjSSR05	GH550573	(gat) ₈	305	GTTGTAGGGTTGTTTGAC AACCACTGCCACAAATCG	55
AjSSR06	GH550563	(gtat) ₁₃	315	CCAGCCTTGCATGTACTGC TGGTCTGACCTTCCCTTCT	55
AjSSR07	GO270691	(tat) ₉	279	TTGGTGCCTGCGGACATA TCGCTCCGTGCCACAAACA	55
AjSSR08	FJ863049	(gat) ₁₄	231	CTGAGGCACGGTGTCTTT ACTCCTGTCTGGGCAAT	53
AjSSR09	FJ863087	(ta) ₁₉ ...(ta) ₁₄	340	AGTTTCAAGTAGAGGCAATG GTTCGGACTGACATTTGG	53
AjSSR10	FJ863053	(at) ₈	245	GCCAGAGTTTCTACAGGG GGCAATACGGCACAGTTA	54

数据统计与分析 将电泳谱带中的每一条DNA片段作为该座位的一个等位基因来处理,每

个座位扩增的等位基因按其迁移率的不同,从小到大依次定义为:A、B、C、...Z。统计各群体样本

基因型,用 Popgen32 计算各位点在 60 个个体中的等位基因数(a)、有效等位基因数(ae)、多态信息含量(PIC)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、Hardy-weinberg 遗传偏离指数(d)。

有效等位基因数^[14]:

$$a_e = 1 / \sum p_i^2$$

式中, p_i 为第 i 个等位基因的频率。

多态信息含量的计算方法^[15]:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2p_i p_j^2 = 2 \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k p_i p_j (1 - p_i p_j)$$

式中, k 为等位基因数目, p_i 和 p_j 分别为第 i 和第 j 个等位基因的频率。

平均杂合度观测值: $H_o =$ 观察到的杂合个体总数/观察到的个体总数;

期望杂合度^[16]: $H_e = 1 - \sum p_i^2$;

固定指数(F_{is}): $F_{is} = 1 - (H_o/H_e)$ 。

标记相关性分析 采用 SPSS 软件对实验数据进行统计分析,应用一般线性模型(GLM)过程对刺参生长性状与微卫星位点的关联性进行最小二乘分析,对不同标记基因型之间生产性状指标差异显著性进行检验并进行多重比较(LSD),进而分析等位基因的效应。采用 $y_{ij} = \mu + a_i + e_{ij}$ 线性模型公式,进行最小二乘法分析。式中 y_{ij} 为某性状第 i 个标记第 j 个个体的观测值; μ 为实验观测所有个体的平均值(即总体平均值); a_i 为第 i 个标记的效应值; e_{ij} 为随机误差。

2 结果

2.1 刺参 DNA 的提取

刺参基因组 DNA 提取部分个体电泳结果显示(图 1),基因组条带清晰无拖尾降解情况,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值均在 1.6~1.9,基本上没有蛋白质和 RNA 污染,提取的基因组 DNA 质量较好,适于 PCR 反应。

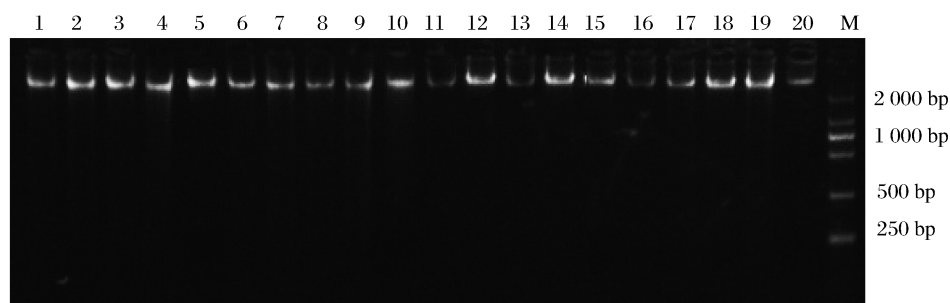


图 1 部分刺参个体基因组 DNA

Fig. 1 Genome DNA of some individuals of *A. japonicus*

2.2 PCR 扩增结果及各位点多态信息

运用 10 对微卫星引物对刺参群体 60 头个体进行了 PCR 扩增,其中 SSR10 位点的微卫星检测图谱见图 2。10 对引物在 60 头个体中表现出较高的多态性(表 2),共获得了 50 个等位基因;每个位点获得的等位基因从 3 到 7 个不等,SSR02 和 SSR07 最多,均有 7 个;每个位点平均获得 5.000 0 个等位基因,平均有效等位基因个数为 3.445 5。实验中发现个别位点出现了无效等位基因(null allele)现象,这种情况在本实验统计分析中按照纯合个体来计算杂合度的观测值。10 个微卫星位点的多态信息含量从 0.268 0~0.825 6 不等,观测杂合度最小值为 SSR07 位点的 0.083 3,最大观测杂合度为 SSR10 位点的 0.666 7,观测杂

合度普遍小于期望杂合度。反应杂合子缺乏或过量固定指数 F_{is} 显示,除位点 SSR07 之外,其他位点均存在杂合子缺失现象。

2.3 微卫星座位与体重、体长的相关分析

利用 SPSS 软件包中广义线性模型(GLM)对 60 头 8 月龄刺参的体重、体长生长性状和 10 对微卫星标记进行相关分析(表 4),在 10 个微卫星位点中,AjSSR02、AjSSR04、AjSSR09 与体重、体长具有显著相关($P < 0.05$),AjSSR06 位点仅与体长显著相关($P < 0.05$),对差异显著的标记进行不同基因型间的不同性状的多重比较。由于一些位点中某些基因型出现太少,缺少分析价值,在实际统计分析中,每种基因型样本至少有 4 次观察值才被考虑。

在微卫星位点 AjSSR02 上,60 头个体检测到 9 个基因型,其中基因型 AC 观察值少于 4 而舍去分析,基因型 AB、AD、CD 个体体重均值显著高于其他基因型个体,同时其体长也大于其他基因型。在标记 AjSSR04 中,含有等位基因 A 的基因型 AA 和 AC 体长和体重均显著高于其他基因型个体,可以推测等位基因 A 对体重和体长两种生长性状有重要正面影响。位点 AjSSR06 基因型 FF 平均体重与其他各基因型个体有显著差异,但

各基因型个体平均体长间无显著差异。在微卫星位点 AjSSR09,除去观察值小于 4 的基因型只有 AA、AB 和 BB 三个基因型。AA 基因型体重均值最大,且与其他两个基因型差异显著;BB 基因型体重均值最小,且与其他两基因型差异显著,AB 基因型居中;据此可以推测等位基因 A 与体重正相关而等位基因 B 正好相反。AA 基因型体长均值与 BB 基因型体长均值之间也具有显著差异。

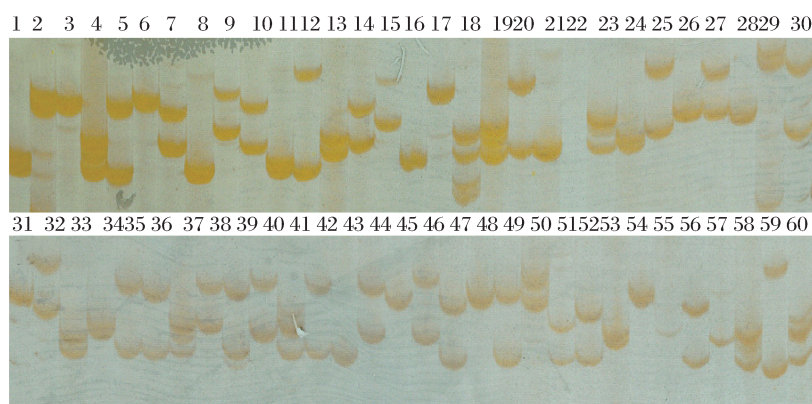


图 2 60 个刺参个体 SSR10 位点的微卫星检测图谱

Fig. 2 Demonstration of microsatellite locus amplified by primer SSR10 in 60 individuals of *A. japonicus*

表 2 60 个刺参个体中 10 个微卫星位点的遗传参数

Tab. 2 Genetic diversity parameters at the 10 microsatellite loci in 60 individuals of *A. japonicus*

座位 locus	等位基因数 (<i>a</i>) allele	有效等位基因数 (<i>ae</i>) effective numbers of allele	多态信息含量 (<i>PIC</i>) polymorphic information content	观测杂合度 (<i>H_o</i>) observed heterozygosity	期望杂合度 (<i>H_e</i>) expected heterozygosity	固定指数 (<i>F_{is}</i>) fixation index
AjSSR01	5	3.527 7	0.678 7	0.283 3	0.722 5	0.604 6
AjSSR02	7	6.040 3	0.825 6	0.366 7	0.841 5	0.560 6
AjSSR03	4	3.073 0	0.658 7	0.566 7	0.680 3	0.160 0
AjSSR04	4	3.740 3	0.702 8	0.300 0	0.738 8	0.590 5
AjSSR05	4	1.369 1	0.268 0	0.283 3	0.271 8	-0.051 0
AjSSR06	7	5.787 8	0.819 4	0.350 0	0.834 2	0.576 9
AjSSR07	4	2.470 8	0.544 7	0.083 3	0.600 3	0.860 0
AjSSR08	5	3.456 6	0.685 6	0.450 0	0.716 7	0.366 8
AjSSR09	4	2.207 2	0.445 1	0.300 0	0.551 5	0.451 5
AjSSR10	6	3.765 7	0.724 4	0.666 7	0.740 6	0.092 3
平均值 mean	5.00	3.445 5	0.635 3	0.365 0	0.669 8	0.421 2

表 3 10 个微卫星位点不同基因型与体重、体长的多重比较
 Tab.3 Multiple comparisons of body weight and length in 10 microsatellite loci

座位 locus	基因型 genotype	个体数 number of individuals	体重 body weight	体长 body length	座位 locus	基因型 genotype	个体数 number of individuals	体重 body weight	体长 body length	
AjSSR01	BB	13	8.90 ± 3.32	5.28 ± 1.15	AjSSR06	AA	5	11.85 ± 1.77a	6.04 ± 1.77	
	CC	16	11.06 ± 4.71	6.49 ± 1.84		AB	7	10.93 ± 1.71 ^a	6.81 ± 2.62	
	BD	4	10.68 ± 4.22	5.67 ± 2.21		CC	9	11.79 ± 1.54 ^a	7.27 ± 2.08	
	DD	14	13.83 ± 1.73	6.40 ± 1.49		DD	6	13.85 ± 2.79 ^{ab}	6.08 ± 2.04	
AjSSR02	AB	4	24.40 ± 3.64 ^d	8.30 ± 1.54 ^b		EE	10	7.72 ± 1.75 ^a	5.11 ± 1.60	
	BB	6	13.37 ± 1.03 ^{abc}	7.35 ± 1.96 ^{ab}		FF	6	15.84 ± 2.64 ^b	7.27 ± 2.08	
	CC	8	7.78 ± 1.60 ^{ab}	4.98 ± 1.01 ^a		BC	4	3.97 ± 1.44 ^a	6.63 ± 1.84	
	AD	5	17.11 ± 2.39 ^{bcd}	7.98 ± 0.85 ^b		CE	10	10.65 ± 2.85 ^a	5.38 ± 1.94	
	CD	4	20.04 ± 4.21 ^{cd}	8.40 ± 2.12 ^b		AjSSR07	AA	7	13.20 ± 2.52	7.31 ± 1.36
	DD	8	10.75 ± 2.75 ^{abc}	5.98 ± 1.54 ^{ab}			BB	15	13.48 ± 2.47	7.11 ± 1.40
	BE	7	4.91 ± 1.43 ^a	4.28 ± 0.57 ^a	BC		5	10.04 ± 1.80	6.36 ± 1.92	
	AjSSR03	EE	6	5.45 ± 4.78 ^a	4.45 ± 2.48 ^a	CC	33	7.97 ± 2.24	5.30 ± 1.52	
EF		7	5.12 ± 1.39 ^a	4.62 ± 0.39 ^a	AjSSR08	AB	5	17.93 ± 2.46	7.10 ± 1.34	
AA		6	8.93 ± 1.26	5.97 ± 1.03		BD	12	6.39 ± 1.69	5.84 ± 1.55	
AB		8	7.25 ± 2.07	6.44 ± 0.75		CC	5	12.63 ± 1.43	6.86 ± 1.26	
AC		14	10.61 ± 1.97	5.98 ± 1.68		DD	10	12.34 ± 2.16	6.36 ± 1.49	
CC		17	12.75 ± 1.89	6.88 ± 1.64		DE	8	13.17 ± 2.44	7.07 ± 1.71	
AD		4	13.60 ± 2.63	5.90 ± 1.21	EE	18	8.85 ± 1.62	5.46 ± 1.06		
CD		5	11.12 ± 1.53	7.36 ± 1.33	AjSSR09	AA	19	15.92 ± 3.56 ^a	7.13 ± 1.93 ^b	
AA	9	17.25 ± 2.22 ^b	7.90 ± 0.91 ^b	AB		23	7.93 ± 2.96 ^c	5.87 ± 0.64 ^{ab}		
AjSSR04	BB	7	12.78 ± 2.84 ^{ab}	5.83 ± 1.51 ^{ab}	AjSSR10	BB	12	4.18 ± 1.43 ^b	4.29 ± 1.01 ^a	
	AC	4	16.93 ± 1.93 ^b	7.08 ± 1.02 ^b		AA	10	11.30 ± 1.87	7.38 ± 2.21	
	BC	9	9.22 ± 1.73 ^{ab}	5.99 ± 1.28 ^{ab}	AE	9	9.48 ± 1.16	6.24 ± 1.45		
	CC	17	9.59 ± 2.52 ^{ab}	5.78 ± 1.07 ^{ab}	BE	20	6.28 ± 2.06	5.06 ± 1.26		
	CD	5	4.82 ± 1.58 ^a	3.22 ± 0.92 ^a	CE	6	15.41 ± 1.16	6.20 ± 1.18		
	DD	9	11.91 ± 3.10 ^{ab}	5.98 ± 1.08 ^{ab}	EE	5	13.63 ± 2.32	6.88 ± 0.92		
	AjSSR05	AA	43	10.06 ± 2.01	6.59 ± 1.22					
AC		7	7.63 ± 1.59	5.80 ± 1.03						
AD		7	14.06 ± 1.52	7.46 ± 2.05						

3 讨论

3.1 分析方法

基于标记的分析方法(marker-based analysis, MBA)^[17]是 QTL 定位的主要方法途径,如果某标记与 QTL 连锁,该标记与 QTL 在一定程度上共分离,不同标记基因型的表型存在差异,分析这种差异,即可推测标记与 QTL 的连锁关系,确定数量性状基因在染色体上的位置,可实现从表型到基因型选择育种的转变。MBA 方法通常有三类^[18],即单标记分析法,性状-标记回归法和性状-QTL 回归法(区间作图、复合区间作图)。单标记分析法就是通过方差分析、回归分析或似然比检验,比较不同标记基因型数量性状均值的差异。如存在显著差异,则说明控制该数量性状的

QTL 与标记有连锁^[19]。由于单一标记分析法不需要完整的分子标记连锁图谱,因而是目前普遍缺乏遗传图谱的水产动物中快速寻找某些数量性状关联的遗传标记的直接有效的方法,是当前分子标记技术结合到育种方案中去的基本思路之一。

3.2 微卫星标记与经济性状

水产动物的体长、体重等经济性状属于数量性状。与质量性状不同,数量性状受多基因控制,遗传基础复杂,且易受环境影响,表现为连续变异。分子数量遗传学发展改变了传统数量遗传学将控制某个数量性状的多个基因作为一个整体研究的方法^[20],直接将研究目标指向各个基因位点,借助各种遗传标记,运用统计学手段将影响数量性状的多个基因剖分开来。从理论上讲,任何

一个可观察表型性状的基因座都存在与之连锁的 DNA 标记,随着近年来分子标记技术的发展,人们已可将复杂的数量性状进行分解,借助连锁的分子标记,能够在育种中对有关数量性状的遗传动态进行跟踪,从而大大增强人们对数量性状的遗传操纵能力。

本实验以 10 对微卫星标记对 60 头具生长差异的刺参个体进行了遗传多样性分析,并利用 SPSS 软件对不同的基因型和刺参的生长性状体长和体重相关关系进行了分析。本实验 10 个微卫星多态位点中,8 个微卫星位点等位基因数大于 4,可能较好地用于群体遗传多样性的评估^[21]。根据 BOTSTEIN 等^[22]提出的衡量多态性信息含量(PIC)变异高低程度指标,7 个位点都为高度多态位点($PIC > 0.5$),其他 2 个为中度多态位点($0.25 < PIC < 0.5$),平均多态性信息含量大于 0.5,表明这些微卫星位点所包含的或能提供的遗传信息容量大,多态信息含量和群体杂合度高,可较好的用于下步相关分析。分析结果表明,4 个微卫星位点 AjSSR02、AjSSR04、AjSSR06、AjSSR09 的差异基因型与刺参的生长性状体重、体长显著相关。其中既有对生长性状起正面作用的等位基因,也有起负面作用的等位基因;有单独对体长显著相关的基因型,也有跟体长和体重均相关的基因型;推测这些微卫星标记与影响刺参生长性状的效应基因连锁。

3.3 展望

目前在刺参中已有不少微卫星标记的筛选及群体遗传分析的研究^[23-27],但是应用这些标记寻找与数量性状连锁的标记的研究甚少。刺参的遗传图谱构建及相关 QTL 定位方面的工作较其他水产重要经济品种而言还比较薄弱,已精确定位的数量性状基因座位还没有,我们的研究是刺参生长经济性状 QTL 与微卫星标记连锁关系的首次探索,是 QTL 准确定位的前提。随着刺参分子遗传研究工作的加深,更多重要经济性状分子标记的获得和高密度遗传图谱的构建,最终可实现分析标记辅助选择(marker assisted selection, MAS),加快性状遗传进展,培育出具有多种优良性状的刺参新品种。

参考文献:

[1] 李宁. 动物基因组研究计划及其对动物育种的影响[J]. 遗传,1997,19(增刊1):7-10.

- [2] 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(21):6465-6469.
- [3] TAUTA D, RENZ M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes [J]. Nucleic Acids Res, 1984, 25(10):4127-4138.
- [4] TOTH G, GASPARI Z, JURKA J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis [J]. Genome Research, 2000, 10:967-981.
- [5] XU Z, PRIMAVERA J P, PENA L D, et al. Genetic diversity of wild and cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites [J]. Aquaculture, 2001, 199:13-40.
- [6] 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.
- [7] 高国强, 常玉梅, 匡友谊, 等. 利用 OneMap 软件构建鲤遗传连锁图谱 [J]. 水产学报, 2010, 34(5):649-655.
- [8] NICHOL K M, YOUNG W P, DANZMANN R G. A consolidated linkage map for rainbow trout [J]. Animal Genetics, 2003, 34:102-115.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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术 [J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(5):5777-583.
- [12] 王霞, 刘小林, 张继泉, 等. 微卫星用于凡纳滨对虾育种过程中亲权分析及遗传多样性监测 [J]. 水产学报, 2009, 33(5):832-839.
- [13] 孙国华, 杨建敏, 宋志乐, 等. 刺参 (*Apostichopus japonicus*) EST 序列中微卫星分布分析及其标记的筛选 [J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(1):133-139.
- [14] CROW A J, KIMURA M. Evolution in sexual and asexual population [J]. Am Nat, 1965, 99:439-450.
- [15] BOTSTEIN D, WHITE R L, SCKOLNICK M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism [J]. Amer J Human Genetic, 1980, 32(3):314-331.

- [16] NEI M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. *Genetics*, 1978, 89: 583 - 590.
- [17] KEIGHTLEY P D, BLFIELD G. Detection of quantitative trait loci from frequency changes of marker alleles under selection [J]. *Genet Res*, 1993, 62: 195 - 203.
- [18] 邢永忠,徐才国. 作物数量性状基因研究进展[J]. *遗传*, 2001, 23(5): 498 - 502.
- [19] SOLLER M, BRODY T, GEAIZI A. On the power of experimental design for the detection of linkage between marker loci and quantitative loci in crosses between inbred lines [J]. *Theor Appl Genet*, 1976, 47: 35 - 39.
- [20] 徐云碧,朱立煌. 分子数量遗传学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1994: 3 - 5.
- [21] BARKER J S F. A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds [M] // *Proceeding of the 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*. Canada: Guelph, Ontario, 1994: 501 - 508.
- [22] BOTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism [J]. *Amer J Human Genetic*, 1980, 32: 314 - 331.
- [23] 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.
- [24] KANNO M, KIJIMA A. High genetic variability of isozymes in Japanese sea cucumber *Stichopus japonicus* [J]. *Fish Genet Breed Sci*, 2002, 31: 7 - 12.
- [25] CALLEN D F, THOMPSON A D, SHEN Y, *et al.* Incidence and origin of null alleles in the (AC)_n microsatellite markers [J]. *Amer J Human Genetic*, 1993, 52: 922 - 927.
- [26] KANNO M, KIJIMA A. Genetic differentiation among three color variants of Japanese sea cucumber *Stichopus japonicus* [J]. *Fish Sci*, 2003, 69: 806 - 812.
- [27] KANNO M, LI Q, KIJIMA A, *et al.* Isolation and characterization of twenty microsatellite loci in Japanese Sea cucumber (*Stichopus japonicus*) [J]. *Mar Biotechnol*, 2005, 7(3): 179 - 183.

Correlation analysis of microsatellite DNA markers with growth traits of body weight and length in *Apostichopus japonicus*

SUN Guo-hua¹, YANG Jian-min^{1*}, SUN Xiao-de^{1,3},
SONG Zhi-le², WANG Wei-jun¹, LIU Xiao-jing¹

(1. Shandong Marine Fisheries Research Institute, Yantai 264006, China;

2. Zhifu Fishery Technical Extension Station, Yantai 264001, China;

3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Ten microsatellite loci were selected to analyze the correlation with quantitative trait locus of body weight and length genomic of *Apostichopus japonicus* using single marker-based analysis. DNA of 60 eight months old individuals of *Apostichopus japonicus* which have differences in growth traits were analyzed by 10 microsatellite markers. The results showed that a total of 50 different alleles were found, the number of alleles in each locus was 3 to 7, and the number of mean valid alleles was 5.0. The polymorphism information content (PIC) of ten microsatellite loci was 0.0833 to 0.6667, and the value of heterozygosity was 0.2361 to 0.7677, which proved the ten loci can be adopted to make correlation analysis. SPSS program was used to analyze the effects of these 10 microsatellites on body weight and length of *Apostichopus japonicus*. The results showed that AB, AD and CD genotypes of AjSSR02 had significant difference in body weight and length with other types, allele A of AjSSR04 played a positive role in both body weight and length, FF genotype of AjSSR06 had a significant impact on weight but not on length, and A and B allele of AjSSR09 played positive and negative roles in growth traits respectively.

Key words: *Apostichopus japonicus*; microsatellite; genetic diversity; growth traits; correlation analysis

Corresponding author: YANG Jian-min. E-mail: ladderup@126.com