

文章编号: 1000-0615(2012)05-0641-06

DOI:10.3724/SP.J.1231.2012.27788

牙鲆骨骼生长性状与微卫星标记的相关性分析

安泉泉^{1,2}, 刘海金^{2,3*}, 王桂兴², 刘永新³, 刘 奕⁴, 司 飞²

- (1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;
2. 中国水产科学研究院北戴河中心实验站, 河北 秦皇岛 066100;
3. 中国水产科学研究院, 北京 100039;
4. 东北农业大学动物科学技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 利用 106 对牙鲆微卫星标记, 对 62 尾双单倍体牙鲆的基因组 DNA 进行检测; 用 X 射线检测仪对其骨骼进行成像, 以骨骼图片测量体高和体长; 用 SPSS 13.0 软件对双单倍体牙鲆的体质量、体长、体高进行相关分析和回归分析; 用最小二乘法对微卫星标记与体质量、体长、体高作相关性分析。结果获得 17 个与体质量、体长、体高显著相关的标记, 其中, Poli162TUF 与体质量、体长、体高显著相关($P<0.05$); Poli72HFSM、Poli106TUF 与体质量、体高显著相关($P<0.05$); Poli2023TUF、Poli1013TUF 与体长、体高显著相关($P<0.05$); Poli2042TUF、Poli1980TUF、Poli2045TUF、Poli2039TUF、Poli34TUF、PoGT17、HLJYP45、HLJYP81 与体长显著相关($P<0.05$); Poli102TUF、Poli136TUF、Poli62MHFS、6-G3 与体高显著相关($P<0.05$)。这些标记反映了牙鲆的生长优势性状, 可作为辅助育种的参考标记。

关键词: 牙鲆; 双单倍体; 生长性状; 骨骼; 微卫星

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)是分布于我国沿海的大型经济鱼类, 个体大、生长快, 自古以来被誉为高档鱼类。近年牙鲆已经开发为养殖对象, 并在海水养殖中占有重要地位。目前养殖用的亲本或是直接捕获的野生鱼, 或是经累代养殖的后代, 均未经人工选育, 其生长速度、抗病性、对集约化养殖的适应能力远不能满足人们的需要。因此, 对牙鲆进行良种选育, 改善其经济性状, 提高其养殖性能对推动养殖业的发展具有重要意义。

人工雌核发育是快速建立纯系的有效手段, 通过抑制第一次卵裂获得的有丝分裂雌核发育二倍体为纯合体, 又称双单倍体(doubled haploid, DH)。同一母本的 DH 后代, 虽然都为纯合体, 但是, 彼此间基因型完全不同, 是进行遗传连锁分析的好材料。利用分子标记进行辅助育种(marker assisted selection, MAS), 筛选与数量性状位点相连

锁的分子标记, 对实现良种选育、加快新品种的开发及遗传改良具有重要作用。微卫星 DNA (micro-satellite)作为分析与重要经济性性状遗传连锁关系的理想标记, 已经广泛用于鲤(*Cyprinus carpio*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)等与生长性状相关的微卫星标记研究^[1-3]。王桂兴等^[4]曾得到 8 个与牙鲆体质量、体长、体高性状显著相关的微卫星位点。随着牙鲆遗传连锁图谱中标记密度的增加^[5-6], 找到目的基因并定位逐渐成为可能。

动物的骨骼具有复杂的内在和外在结构, 骨骼的生长发育依赖多种细胞类型的分化, 充分体现了生命的协调性^[7-9], 因而, 骨骼发育水平是整体发育成熟度的良好指征。骨骼的生长受外环境影响小, 受遗传因素的影响较大^[10-11]。因此, 应用骨骼参数寻找与牙鲆重要经济性性状紧密连锁的相关标记具有重要价值。

收稿日期: 2011-10-28

修回日期: 2012-01-21

资助项目: 国家鲆鲽类产业技术体系资助(CARS-50-G2); 国家公益性农业行业专项资助(200903046)

通讯作者: 刘海金, E-mail: liuhaijin2005@126.com

本实验以 DH 牙鲆的骨骼生长性状为材料, 分析微卫星位点与体质量、体长、体高的相关性, 筛选密切相关的分子标记, 为牙鲆经济性状的 QTL 定位及分子标记辅助育种提供基础数据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验鱼由中国水产科学研究院北戴河中心实验站培育, 即利用同一尾雌亲鱼的同一批卵子, 诱导有丝分裂雌核发育, 即用紫外线灭活的真鲷 (*Pagrosomus major*) 精液激活卵子, 静置 3 min 后加入 17 °C 海水培育 60 min, 然后转移至静水压力机 (5406R, 日本大岳公司) 中, 施压 650 MPa, 持续 6 min, 完成雌核发育诱导后, 移至常温海水中孵化^[12]。实验材料在水泥池内培育 2 年, 本实验使用 62 尾 DH 个体, 进行表型和基因型分析。

1.2 实验方法

骨骼生长性状的度量 用电子天平称量其体质量, 精确到 0.1 g; 用 X-射线机 (LX-20A 型, 朗安公司) 获得牙鲆骨骼的 X 射线胶片。用直尺测量胶片上的骨骼性状, 获得体长、体高等生长性状, 精确到 0.1 mm。体长是自上吻端至最后一枚脊椎骨的长度, 体高为躯干部最高处背鳍基部至腹鳍基部的垂直长度。

牙鲆基因组 DNA 及微卫星分子标记 DNA 提取参考 Salah 等^[13]报道的方法略有改动。基因组 DNA 利用尾鳍组织提取, 将裂解液 [100 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L EDTA (pH 8.0), 1% SDS, 200 mg/L 的蛋白酶 K] 加入剪碎的尾鳍中, 50 °C 消化至澄清, 等体积的饱和酚、氯仿混合液抽提 1 次, 等体积的异丙醇沉淀, 75% 乙醇清洗沉淀, TE 溶解后, -20 °C 保存待用。106 个微卫星标记均来自 NCBI 的 GenBank 数据库, 参照牙鲆遗传连锁图谱, 选择 24 个连锁群上的微卫星标记^[5-6], 由上海生工生物工程技术有限公司合成。

PCR 反应及电泳 PCR 反应体系为 15 μL, 包括 10 × buffer 1.5 μL、Mg²⁺ (25 mmol/L) 1 μL、dNTPs (2 mmol/L) 各 1 μL、上下游引物各 0.6 μL、模板 DNA 1 μL (30~50 ng)、Taq DNA 聚合酶 1 U, 加适量 ddH₂O。PCR 反应程序为 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 30 s, 52~64 °C 退火 30 s, 72 °C 30 s, 25 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增产物经 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 电泳后 1% 的硝酸银染色 10 min, 显色液 (1% 甲醛, 2% 氢氧化钠, 0.04% 无水碳酸钠) 显色 10 min。凝胶在 HP scanjet

G4010 扫描仪上成像, 使用 Gel-Pro Analyzer 4.5 软件对电泳谱带进行分析。

1.3 统计分析

群体等位基因频率、杂合度及多态信息含量的计算 用 PopGene (Version 3.2) 软件统计各微卫星基因座的等位基因频率 (allele frequency, P)、等位基因数 (observed number of alleles, N_a)、有效等位基因数 (effective number of alleles, N_e)、群体杂合度 (heterozygosity, H)、多态信息含量 (polymorphism information content, PIC)。

根据 Nei 氏公式计算杂合度:

$$H = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$$

式中, n 为某一位点上的等位基因数, i 为位点数, P_i 为等位基因频率。

多态信息含量 PIC 可根据 Botstein 公式计算:

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n P_i^2 \right) - \left(\sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n 2P_i P_j \right)$$

式中, n 为某一位点上等位基因数, P_i 、 P_j 分别为第 i 和第 j 个等位基因在群体中的频率, $j = i + 1$ 。

牙鲆微卫星标记与各经济性状间的相关性分析 采用 SPSS13.0 软件包中双变量相关分析 (bivariate correlation analysis) 对牙鲆的体质量、体长、体高进行相关性分析, 并与微卫星位点的基因型进行最小二乘方差分析。以体长、体高为自变量对体质量进行多元回归分析, 建立理想的多元回归方程, 并对方程进行拟合度检验。

2 结果

2.1 牙鲆骨骼生长性状分布

骨骼生长性状分布状态通过 Shapiro-Willk 检验, 利用 SPSS 完成。平均值、标准差、偏度、峰值和 P 值见表 1。

2.2 微卫星基因位点的等位基因数、等位基因频率、杂合度和多态信息含量

用微卫星引物对基因组 DNA 进行 PCR 扩增和电泳检测, 均获得稳定、清晰的 DNA 条带, 且母本都具有多态性, 检测个体均为纯合。106 对微卫星标记, 共检测到 124 个等位基因, 等位基因片段大小为 77~293 bp。平均有效等位基因数 1.817 4。平均多态信息含量为 0.349 9, 平均杂合度为 0.450 8。本研究仅摘取其中 30 个位点作表, 其平均多态信息含量和平均杂合度均是 106 个位点所得出的结果 (表 2)。

表 1 体质量、体长、体高正态分布检验
Tab. 1 The test of Gaussian distribution in body weight, length and height

	平均值 mean \pm σ	偏度 skewness	峰度 kurtosis	最小值 minimum	最大值 maximum	P 值 P value
体质量 body weight	908.242 \pm 411.213	0.594	0.238	178.100	2013.800	<0.05
体长 body length	33.940 \pm 4.945	0.147	0.419	21.900	48.400	<0.05
体高 body height	15.658 \pm 2.425	-0.428	-0.061	9.100	20.500	<0.05

表 2 群体在 30 个微卫星标记基因位点的统计信息
Tab. 2 Statistics information of 30 microsatellites genetic loci in population

位点 locus	等位基因数 alleles	等位基因片段/bp fragment	有效等位基因数 Ne	杂合度 H	多态信息含量 PIC	等位基因频率 allele frequency	
						A	B
Poli13-2TUF	2	96~120	1.949 3	0.491 0	0.368 4	0.580 6	0.419 4
Poli002-HFS	2	177~188	1.981 4	0.499 3	0.372 6	0.451 6	0.548 4
Pol-4 *	2	196~201	1.967 2	0.495 7	0.370 8	0.564 5	0.435 5
Poli77HFSM	2	267~289	1.700 9	0.415 4	0.327 2	0.709 7	0.290 3
Poli9-22TUF	2	155~165	1.661 2	0.401 3	0.318 8	0.725 8	0.274 2
6-B4	2	120~125	1.739 4	0.428 5	0.334 8	0.693 5	0.306 5
Poli9-48TUF	2	114~118	1.844 5	0.461 6	0.353 0	0.354 8	0.645 2
Poli9-67TUF	2	125~135	1.579 3	0.369 8	0.299 5	0.758 1	0.241 9
Poli9-62TUF	2	94~124	1.991 7	0.502 0	0.374 0	0.467 7	0.532 3
Poli59MHFS	2	209~244	1.875 1	0.470 5	0.357 8	0.629 0	0.371 0
Poli111HFSM	2	148~199	1.811 5	0.451 6	0.347 6	0.338 7	0.661 3
Poli110TUF	2	125~155	1.620 6	0.386 0	0.309 6	0.258 1	0.741 9
Poli112HFSM	2	184~211	1.875 1	0.470 5	0.357 8	0.629 0	0.371 0
Poli113HFSM	2	108~118	1.495 7	0.334 1	0.276 5	0.790 3	0.209 7
Poli111TUF	2	79~110	2.000 0	0.504 1	0.375 0	0.500 0	0.500 0
Pol-3	2	182~202	2.000 0	0.504 1	0.375 0	0.500 0	0.500 0
Poli50MHFS	2	199~217	1.991 7	0.502 0	0.374 0	0.467 7	0.532 3
Po25A	2	219~234	1.927 8	0.485 2	0.365 5	0.596 8	0.403 2
PoGT15	2	221~225	1.776 3	0.440 6	0.341 5	0.677 4	0.322 6
Poli38TUF	2	104~139	1.997 9	0.503 5	0.374 7	0.483 9	0.516 1
Poli147TUF	2	136~158	1.949 3	0.491 0	0.368 4	0.580 6	0.419 4
8-F8	2	189~196	1.661 2	0.401 3	0.318 8	0.725 8	0.274 2
HLJYP62	2	154~161	1.997 9	0.503 5	0.374 7	0.483 9	0.516 1
6-G3	2	197~203	1.032 8	0.032 0	0.031 2	0.983 9	0.016 1
8-C3	2	156~166	1.844 5	0.461 6	0.353 0	0.354 8	0.645 2
HLJYP100	2	144~160	1.927 8	0.485 2	0.365 5	0.403 2	0.596 8
HLJYP101	2	222~232	2.000 0	0.504 1	0.375 0	0.500 0	0.500 0
PoGT17	2	223~230	1.875 1	0.470 5	0.357 8	0.371 0	0.629 0
Poli151TUF	2	108~131	1.981 4	0.499 3	0.372 6	0.548 4	0.451 6
Poli166TUF	2	151~158	1.981 4	0.499 3	0.372 6	0.451 6	0.548 4

2.3 牙鲆微卫星标记与体质量、体长和体高的相关性分析

利用最小二乘法对标记位点与牙鲆体质量、体长和体高性状进行连锁显著性检验, 在 106 个微卫星位点中, 有 17 个标记分别与体质量、体长、体高显著相关。其中, Poli162TUF 与体质量、体长、体高三性状显著相关; Poli72HFSM、Poli106TUF 与体质量、体高两性状显著相关; Poli2023TUF、Poli1013TUF 与体长、体高两性状显著相关($P <$

0.05); Poli2042TUF、Poli1980TUF、Poli2045-TUF、Poli2039TUF、Poli34TUF、PoGT17、HLJYP45、HLJYP81 与体长显著相关($P < 0.05$); Poli102TUF、Poli136TUF、Poli62MHFS、6-G3 与体高显著相关($P < 0.05$)。其中 Poli72HFSM 与体质量相关系数达极显著水平($P < 0.01$), Poli 2023TUF、Poli2042TUF 与体长相关系数达极显著水平($P < 0.01$), Poli162TU、Poli106TUF 与体高相关系数达极显著水平($P < 0.01$)(表 3)。

表 3 17 个微卫星位点不同基因型体质量、体长、体高的平均值
 Tab. 3 Means of body weight, length and height in 17 microsatellite loci

位点 locus	基因型/bp genotype	个体数 no.	体质量/g body weight	体长/cm body length	体高/cm body height
Poli162TUF	120	28	775.13±434.43*	32.51±5.73*	14.64±2.71**
	164	34	1017.86±361.58*	35.12±3.90*	16.50±1.80**
Poli72HFMS	248	37	798.11±362.68**		15.06±2.51*
	293	25	1 071.24±431.40**		16.54±2.02*
Poli106TUF	129	33	1 005.14±368.38*		16.45±1.89**
	137	29	797.10±435.48*		14.76±2.68**
Poli1013TUF	130	21		31.93±4.62*	14.70±2.47*
	144	41		34.97±4.84*	16.15±2.27*
Poli2039TUF	178	40		34.95±4.47*	
	194	22		32.11±5.33*	
Poli2042TUF	174	26		35.87±4.80**	
	194	36		32.55±4.63**	
Poli2045TUF	165	40		34.10±4.83*	
	174	22		32.02±4.66*	
Poli2023TUF	189	23		31.65±5.37**	14.70±2.92*
	209	39		35.29±4.18**	16.22±1.91*
Poli1980TUF	212	25		32.16±5.05*	
	217	37		35.14±4.56*	
HLJYP81	162	40		34.86±4.46*	
	180	22		32.26±5.43*	
HLJYP45	233	22		32.26±5.43*	
	238	40		34.86±4.46*	
Poli34TUF	183	34		32.75±4.87*	
	203	28		35.39±4.72*	
PoGT17	223	39		34.90±4.97*	
	230	23		32.31±4.55*	
Poli136TUF	138	27			14.94±2.50*
	144	35			16.21±2.24*
Poli102TUF	130	26			14.85±2.49*
	168	36			16.24±2.23*
6-G3	197	1			10.90±0.00*
	203	61			15.74±2.37*
Poli62MHFS	100	27			14.94±2.50*
	109	35			16.21±2.24*

注: *表示显著性差异; **表示极显著性差异。

Notes: *represents significant difference; **represents high significant difference.

2.4 多元回归方程的建立

设体质量为 Y , 体长为 X_1 , 体高为 X_2 , 采用双变量相关分析对牙鲆的体质量、体长、体高之间的相关系数求解。体质量与体长的相关系数 $\gamma_{yx_1}=0.797$; 体质量与体高的相关系数 $\gamma_{yx_2}=0.939$; 体长与体高的相关系数 $\gamma_{x_1x_2}=0.799$; 各性状间表型相关系数均达极显著水平。对体质量进行回归分析, 得到估计体质量的多元回归方程:

$$Y = -1\ 674.681 + 10.781 X_1 + 141.589 X_2 (R^2 = 0.887)$$

方差分析表明, 牙鲆体长、体高对体质量的回

归关系均达极显著水平 ($P < 0.01$)。

3 讨论

骨骼发育水平是机体发育成熟度的良好指征, 鱼类骨骼的异常发育可导致畸形, 影响个体的生长甚至存活。目前, 对于鱼类骨骼的研究多集中在骨骼畸形发育的种类及其影响因素上^[14-16], 利用骨骼生长性状进行分子标记辅助育种尚未有报道。本实验通过分析骨骼生长性状与 106 个微卫星标记间的相关性, 找到了 17 个与牙鲆主要经济性状

显著相关的微卫星位点。

生物体不同性状间因基因连锁、一因多效和一效多因的存在, 会发生不同程度的相互关联, 如果能研究清楚各表型性状间的相关程度, 就能为良种选育提供有价值的参考。王凯等^[17]对牙鲆的研究结果表明, 5 月龄牙鲆体质量与体长的相关系数为 0.937, 体质量与体高的相关系数为 0.913; 8 月龄牙鲆体质量与体长的相关系数为 0.930, 体质量与体高的相关系数为 0.933。本实验结果显示, 牙鲆 DH 群体的体质量与体长的相关系数为 0.797, 与王凯等^[17]的研究结果相比, 相关系数稍小, 原因是本研究使用的参数是骨骼, 该方法可以精确测量吻端到最后一枚脊椎骨的长度, 但不包括全部尾柄长, 这与从体表测量的体长有一定区别, 两者是不同的长度性状。依骨骼测量的体长所得相关系数较低, 反而暗示出依体表测量体长时, 尾柄长对体长有不可或缺的影响。依本实验结果, 体质量与体高的相关系数为 0.939, 呈极显著相关, 与已得实验结果^[17]相一致, 说明骨骼的体高度量值与体表测量的数值是一致的, 另一方面也说明利用骨骼进行选育具有较高的准确性。

在 106 对牙鲆微卫星标记中找到 17 个与体质量、体长、体高呈显著性相关的标记, 这些达显著水平的相关在一定程度上说明这些遗传标记与特定性状之间存在关联^[18]。分析结果中很多位点存在一因多效和多因一效的现象, 说明这些性状可能由一个以上的 QTL 所控制。其中, 与体质量、体高显著相关的标记 Poli162TUF、Poli106TUF、Poli136TUF、Poli62MHFS 均分布于第 8 号连锁群上^[6], 与体长显著相关的标记 Poli2023TUF、Poli1980TUF、Poli2045TUF 均分布于第 17 号连锁群上^[6], 此集中趋势暗示 8 号和 17 号连锁群很可能存在控制牙鲆体质量与体长、体高关系的主效基因。王桂兴等^[4]得到的 8 个与牙鲆体质量、体长、体高显著性相关的微卫星位点 Poli30TUF、Poli107-TUF、Poli108TUF、Poli116TUF、Poli123TUF、Poli130TUF、Poli145TUF、Poli9-8TUF 分别位于第 2、6、18、8、20、1、13、15 号连锁群上^[6], 没有集中趋势。本实验所得标记在连锁群上的分布较集中, 可能是由于标记数量的不同, 王桂兴等^[4]利用的是 26 对微卫星标记, 本实验所用微卫星标记数量较大, 得到的显著性标记数量较多, 较易发现其分布趋势; 另外, 所用实验群体不同, 王桂兴等^[4]

使用的是减数分裂雌核发育二倍体家系, 本实验群体为有丝分裂雌核发育二倍体家系, 纯合度高, 隐性有害基因更易被淘汰, 有利基因因此被加强; 第三, 王桂兴等^[4]使用的是仔鱼, 而此实验群体均为 2 龄成熟牙鲆, 体质量与体长、体高的相关关系在成熟个体中将显现得更为准确。由此可见, 较多的标记数量和完全纯合的成熟群体使本实验获得了与其他学者不同的数据特征。

鱼类的体质量、体长等是重要的遗传性状, 也是容易受环境影响的经济性状, 尽管动物育种学家努力用 BLUP 等统计学方法, 剔除环境影响已取得较好的效果^[19-21], 但是, 寻找与经济性状密切相关, 且又不易受环境影响的性状也是育种学者的重要任务之一。本研究利用骨骼参数筛选出多个与经济性状显著相关的分子标记, 这些标记的分布又具比较明显的规律性, 与测量体表所得数据的分析结果有很大不同。尽管这些标记还没有经过验证, 但其分布特征对经济性状的标记研究很有参考价值, 反映出的骨骼生长性状的特殊性和优越性, 为分子标记辅助育种提供了新的研究方法。

参考文献:

- [1] Cnaani A, Hallerman 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.
- [2] 张义凤, 张研一, 鲁翠云, 等. 鲤鱼微卫星标记与体质量、体长和体高性状的相关分析[J]. *遗传*, 2008, 30 (3): 359-366.
- [3] 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]. *海洋与湖沼*, 2009, 40 (5): 577-583.
- [4] 王桂兴, 刘永新, 孙效文, 等. 牙鲆微卫星分子标记与生长性状的相关性分析[J]. *东北农业大学学报*, 2009, 40 (7): 77-84.
- [5] Coimbra M R, Kobayashi K, Koretsugu S, *et al.* A genetic linkage map of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. *Aquaculture*, 2003, 220 (1-4): 230-218.
- [6] Castaño-Sánchez C, Fuji K, Ozaki A, *et al.* A second generation genetic linkage map of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *BMC Genomics*, 2010, 11 (1-4): 554-564.
- [7] Karsenty G, Wagner F. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development [J]. *Developmental Cell*, 2002, 2 (4): 389-406.
- [8] Fisher S, Jagadeeswaran P, Halpern E. Radiographic analysis of zebrafish skeletal defects [J]. *Developmental Biology*, 2003, 264 (1): 64-76.
- [9] Kronenberg M. Developmental regulation of the growth

- plate [J]. *Nature*, 2003, 423 (6937): 332–336.
- [10] 姜若萍, 傅民魁. 安式Ⅱ类 1 分类错牙合患者亲人间相似性的个体研究[J]. *中华口腔医学杂志*, 2001, 36 (2): 143–145.
- [11] 李九军, 李勤, 贺永春, 等. 遗传因素对同卵双生子颅颌面部软硬组织形态的影响研究[J]. *同济大学学报: 医学版*, 2009, 30 (3): 70–73.
- [12] 刘海金, 刘永新, 王玉芬, 等. 牙鲆减数分裂与有丝分裂雌核发育的遗传差异[J]. *水产学报*, 2010, 34 (6): 898–904.
- [13] Salah A, Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR - based techniques [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25 (22): 4692–4693.
- [14] Eissa E A, Moustafa M, El-Husseiny I N, *et al.* Identification of some skeletal deformities in freshwater teleosts raised in Egyptian aquaculture [J]. *Chemosphere*, 2009, 77 (3): 419–425.
- [15] Haga Y, Du S J, Satoh S, *et al.* Analysis of the mechanism of skeletal deformity in fish larvae using a vitamin A-induced bone deformity model [J]. *Aquaculture*, 2010, 315 (1–2): 26–33.
- [16] 李凯彬, 刘春, 常藕琴, 等. 剑尾鱼侏儒突变的骨骼异常及其遗传[J]. *水产学报*, 2011, 35 (6): 809–815.
- [17] 王凯, 刘海金, 刘永新, 等. 牙鲆形态性状对体质量的影响效果分析[J]. *上海海洋大学学报*, 2008, 17 (6): 655–660.
- [18] 王高富, 吴登俊. 凉山半细毛羊微卫星标记与羊毛性状的相关分析[J]. *遗传*, 2009, 28 (12): 1505–1512.
- [19] 张天时, 栾生, 孔杰, 等. 中国对虾体质量育种值估计的动物模型分析[J]. *海洋水产研究*, 2008, 29 (3): 7–13.
- [20] 马爱军, 王新安, 雷霖霖. 大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 生长阶段体质量的遗传参数和育种值估计[J]. *海洋与湖沼*, 2009, 40 (2): 187–193.
- [21] Mathilde D N, Marc V, Alain V, *et al.* Heritabilities and G×E interactions for growth in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) using a marker-based pedigree [J]. *Aquaculture*, 2008, 275 (1–4): 81–87.

Correlation analysis of microsatellite DNA markers with skeletal growth traits of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)

AN Quan-quan^{1,2}, LIU Hai-jin^{2,3*}, WANG Gui-xing², LIU Yong-xin³, LIU Yi⁴, SI Fei²

(1. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Beidaihe Central Experiment Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qinhuangdao 066100, China;

3. Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100039, China;

4. Animal Science and Technology College, Northeast Agricultural University, Harbin 150070, China)

Abstract: In this article, 106 microsatellite markers were used to analyze the genotype of sixty-two mitotic gynogenetic doubled haploids of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Measurement results of body length and height were got by directly measuring skeleton during the process of X-ray imaging. Correlation and regression analysis of the body weight, length and height were conducted by utilizing SPSS 13.0 software. Least square method was used to analyze the effects of these 106 microsatellites on body weight, length and height of these 62 doubled haploids. Results revealed that 17 microsatellites were discovered to be very significantly related to body weight, length and height. During these 17 markers, Poli2042TUF, Poli1980TUF, Poli2045TUF, Poli2039TUF, Poli34TUF, PoGT17, HLJYP45, HLJYP81 had a significant impact on body length ($P < 0.05$), Poli102TUF, Poli136TUF, Poli62MHFS, 6-G3 had a significant impact on body height ($P < 0.05$), Poli72HFSM、Poli106TUF had a significant impact on body weight and height ($P < 0.05$), Poli2023TUF, Poli1013TUF had a significant impact on body length and height ($P < 0.05$), Poli162TUF had a significant impact on body weight, length and height ($P < 0.05$). These microsatellite markers had an advantageous effect on growth traits and these loci could be used as the reference markers for marker-assisted breeding of Japanese flounder.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; doubled haploid; growth trait; skeleton; microsatellite marker

Corresponding author: LIU Hai-jin. E-mail: liuhaijin2005@126.com