

## 牙鲆遗传作图及生长性状 QTL 定位

牛余泽<sup>1,2</sup>, 廖小林<sup>1</sup>, 宋文涛<sup>1,2</sup>, 王磊<sup>1</sup>, 赵永伟<sup>1</sup>, 高峰涛<sup>1</sup>, 陈松林<sup>1\*</sup>

(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)

**摘要:** 采用牙鲆日本群体和韩国群体杂交的 92 个 F<sub>1</sub> 个体作为分离群体, 利用微卫星标记和 Joinmap 4.0 作图软件构建了牙鲆遗传连锁图谱。共有 221 个 SSR 标记用于连锁图谱构建, 雌性图谱中, 共 178 个微卫星标记定位到 22 个连锁群上, 观测总长度为(G<sub>oa</sub>)599.0 cM, 覆盖率(C<sub>oa</sub>)达 76.27%。雄性图谱中, 共 194 个微卫星标记定位到 23 个连锁群上, G<sub>oa</sub> 为 693.4 cM, C<sub>oa</sub> 为 78.82%。对全长、体质量、体高 3 组数据进行主成分分析处理, 得到可解释 3 个性状的 89.6%特征的一组数据, 命名为牙鲆生长性状 GT。用 WinQTLCart 2.5 软件的复合区间作图, 在已构建的遗传连锁图谱上对牙鲆生长性状 GT 进行 QTL 定位, 取 LOD 经验值 2.5 为 QTL 存在的阈值; 对微卫星标记进行性状—标记之间的回归分析。本研究共定位 3 个与牙鲆生长性状 GT 相关的 QTLs, qGT-f4 qGT-m20 qGT-f20, 可解释表型变异率分别为 27.60%, 13.74%, 10.27%。在性状—标记之间的回归分析中, 得到 22 个与生长性状 GT 相关(P<0.05)的微卫星标记, 单个标记可解释表型变异率介于 3.70%~10.42%, 其中 6 个微卫星标记 scaffold558\_51720、scaffold558\_26183、scaffold903\_69232、scaffold485\_47120、scaffold1262\_77386、scaffold809\_65154 与生长性状 GT 之间呈极显著相关(P<0.01), 可解释表型变异率分别为 10.42%、7.31%、10.07%、10.07%、8.39%和 11.26%。

**关键词:** 牙鲆; 微卫星; 生长性状; QTL 定位

**中图分类号:** Q 785; S 917.4

**文献标志码:** A

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*), 俗名比目鱼、偏口、牙片, 是一种经济价值很高的海水养殖鱼类, 在长期养殖过程中, 由于近亲繁殖、养殖条件差、亲本质量差等使得人工养殖多代的牙鲆苗种的抗病力下降、生长速度减缓, 因此, 牙鲆优良品种的选育工作已尤为重要。鱼类的经济性状一般受多个微效基因控制, 加上表型性状对环境因素非常敏感, 所以传统的家系选育、群体选育等良种选育方法效率较低, 选育周期也长。

随着现代分子生物学技术的进步与完善, 分子标记辅助家系选育的育种方法成为主流, 数量性状定位(QTL)的研究越来越多, 其利用现代分子

标记技术, 建立一定密度的遗传连锁图谱, 通过对控制生长、抗病等数量性状基因相连锁的分子标记进行检测, 以选育出具有优良数量性状的新品系。目前, 世界上已有很多关于 QTL 定位研究的报道, 并发现了多个与经济性状基因相连锁的分子标记, 如 Shirak 等<sup>[1]</sup>发现 3 个微卫星标记( UNH159, UNH231 和 UNH216)与尼罗罗非鱼性别比率失常相关; O' Malley 等<sup>[2]</sup>用 201 个微卫星标记构建了含有 26 个连锁群的虹鳟图谱, 并定位到与体质量和性成熟时间相关的 QTL; Sun 等<sup>[3]</sup>建立了鲤(*Cyprinus carpio*)遗传连锁图谱, 并在其第 5 号连锁群上定位了一个与抗寒性状相连锁的随机扩增

收稿日期: 2012-03-10 修回日期: 2012-04-25

资助项目: 国家“九七三”计划(2010CB126303); 国家“八六三”高技术研究发展计划(2012AA10A408); 国家公益性行业(农业)科研专项(200903046); 山东省泰山学者工程专项

通讯作者: 陈松林, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

http://www.scxuebao.cn

多态性标记(RAPD)。

微卫星标记数量丰富, 在遗传上呈共显性、无上位性效应等优点, 已逐渐替代其他分子标记, 成为目前用于构建遗传连锁图最先进的第二代分子标记。早在 2003 年, Coimbra 等<sup>[4]</sup> 建立了一个包含 111 个 SSR 标记和 352 个 AFLP 标记的中密度牙鲆遗传连锁图, Fuji 等<sup>[5]</sup> 将一个与抗淋巴囊肿病相连锁的分子标记 (Poli.9-8TUF) 定位到第 15 号连锁群上。2008 年, Kang 等<sup>[6]</sup> 采用 180 个 SSR 标记和 31 个 EST 来源的标记构建了包含 24 个连锁群的牙鲆遗传连锁图谱。Castaño-Sánchez 等<sup>[7]</sup> 用 1268 个微卫星标记、105 个 SNP 标记和 2 个基因, 建立了高密度牙鲆连锁图谱, 但这些研究都未对牙鲆的经济性状进行 QTL 定位。鱼类的生长性状直接关系到其经济价值, 进行生长性状相关 QTL 定位, 对于牙鲆高产良种选育具有重要意义。本实验采用拟测交<sup>[8-9]</sup> 方法, 利用牙鲆微卫星标记进行遗传连锁图谱的构建, 并在构建的连锁图谱上对生长性状相关 QTL 进行定位和分析, 以期为今后牙鲆其它经济性状相关 QTL 的定位研究提供借鉴, 并为牙鲆基因定位及其分子标记辅助育种(MAS)奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料及其表型测量

牙鲆家系建立按照已报道的方法进行<sup>[10]</sup>。从 2010 年 4—6 月建立的 33 个牙鲆家系中选取双亲及子代性状差异显著的 16 个家系的亲本, 用 8 对 SSR 引物分析多样性, 获得 1 号家系的亲本构建分离群体。将该家系鱼苗培养 1 年后, 随机选取 92 个个体, 进行全长、体质量、体高测定, 并取鳍条保存, 用于个体基因型检测。全长为 19.3~28.0 cm, 平均值为(23.67±2.12) cm; 体质量为 30.2~207.0 g, 平均为(118.29±37.89) g; 体高为 6.4~10.0 cm, 平均为(8.36±0.87) cm。

### 1.2 模板 DNA 提取与引物来源

采用 Tiangen 海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒提取 94 个牙鲆样本的 DNA。引物来自本实验室开发的 400 个微卫星标记, 用 Primer3 对含有微卫星位点的序列设计引物, 并由上海生工生物

工程技术服务有限公司合成。

### 1.3 微卫星位点分离的检测

PCR 扩增体系为 15  $\mu$ L, 包括 ddH<sub>2</sub>O 10.6  $\mu$ L, PCR Buffer(含镁离子)1.5  $\mu$ L, dNTP(2.5 mmol/L)0.8  $\mu$ L, 上下游引物各 0.5  $\mu$ L, Taq DNA 聚合酶 1U。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 退火温度 57.5 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min; 降至 4 $^{\circ}$ C, 保存。用 8% 非变性聚丙烯酰胺对 PCR 扩增产物进行电泳分离, 1 200 V 电泳 1.5 h, 0.2% AgNO<sub>3</sub> 染色 6 min, 2% NaOH, 0.5% 甲醛混合液显色直到条带清晰, 用水冲洗, 晾干, 图像经过拍照保存。

### 1.4 表型性状的处理

用 SPSS 软件对全长、体质量、体高性状进行正态检验及两两之间相关性分析, 3 组数据全部符合正态分布, 两两性状之间存在极显著相关, Pearson 相关系数从 0.810~0.880。对 3 组数据进行因子分析, 提取主成分, 结果得到 1 组可以代表全长、体质量、体高 3 组性状 89.6% 特征的数据, 定名为牙鲆生长性状 GT。

### 1.5 微卫星图谱的构建与生长 QTL 定位

利用 Joinmap 4.0 软件对所有分离的微卫星标记进行连锁分析, 以极大似然法构建遗传连锁图谱, LOD 值取大于或等于 3.0, 使用 Kosambi 函数实现重组率对图距单位的转换, 用 Map-chart version 绘制遗传图谱。用 WinQTLCart 2.5 软件的复合区间作图<sup>[11]</sup>, 在构建的牙鲆遗传连锁图谱上对牙鲆生长性状 GT 进行 QTL 定位。取 LOD 经验值 2.5 为 QTL 存在的阈值, 搜索步值设置为 1 cM。置信度为  $P=0.01$ , 控制背景的标记设为 5, 采用模型 6 进行分析。对微卫星标记进行性状-标记之间的回归分析。

## 2 结果

### 2.1 表型因子分析

对全长、体质量、体高 3 个性状进行相关分析, 结果显示三者之间极显著相关(表 1), 为避免出现多个 QTL 重合使问题复杂化, 又对 3 个性状提取公因子, 进行主成分分析(表 2), 3 个性状提取一个主成分就可解释 3 个性状的 89.6% 特征。

对提取的成分矩阵各数据除以主成分相对应

的特征值开平方根得到在主成分中全长、体质量、体高的系数(表3),最终得到牙鲆生长性状 GT 值 =  $0.979 \times \text{全长值} + 0.966 \times \text{体质量值} + 0.973 \times \text{体高值}$ 。

表1 全长、体质量、体高之间的两两相关性检测结果  
Tab. 1 The result of correlation test among overall length, weight and body depth

	全长 overall length	体质量 body weight	体高 body depth
全长 overall length	1	0.842**	0.880**
体质量 body weight		1	0.810**
体高 body depth			1

注:\*\*表示在0.01水平上显著相关。

Notes:\*\* indicates significance at 0.01 level.

## 2.2 牙鲆遗传连锁图谱的构建

400对微卫星引物经过多态性筛选,PCR扩增样本后,取带型清晰的微卫星标记共221个用于连锁图谱构建。其中用于构建雌性图谱的标记共185个,构建雄性图谱的标记共202个,可以同时用于构建雌雄图谱的标记共166个。

在雌性图谱中,共178个微卫星标记定位到22个连锁群上,其中包含一个三联体。雌性图谱观测总长度为( $G_{oa}$ )599.0 cM,平均距离( $s$ )为3.84 cM。连锁群上的标记数为3~16个,单条连锁群的图距为6.1~59.5 cM。图谱的预期长度为( $G_e$ )785.4 cM,总的图谱覆盖率达( $C_{oa}$ )达76.27%(图1)。

表2 提取主成分结果

Tab. 2 Results of Principal component analysis

成分 component	合计 total	方差/% variance	累积/% accumulated variance	提取平方和载入(累积方差) obtained accumulated variance
1	2.688	89.592	89.592	89.592%
2	0.196	6.544	96.136	
3	0.116	3.864	100.000	

表3 全长、体质量、体高在主成分中的系数  
Tab. 3 The coefficient of overall length, weight and body depth in principal component

	成分矩阵 component matrix	在主成分中的系数 the coefficient in principal component
全长 overall length	0.959	0.979
体质量 body weight	0.933	0.966
体高 body depth	0.947	0.973

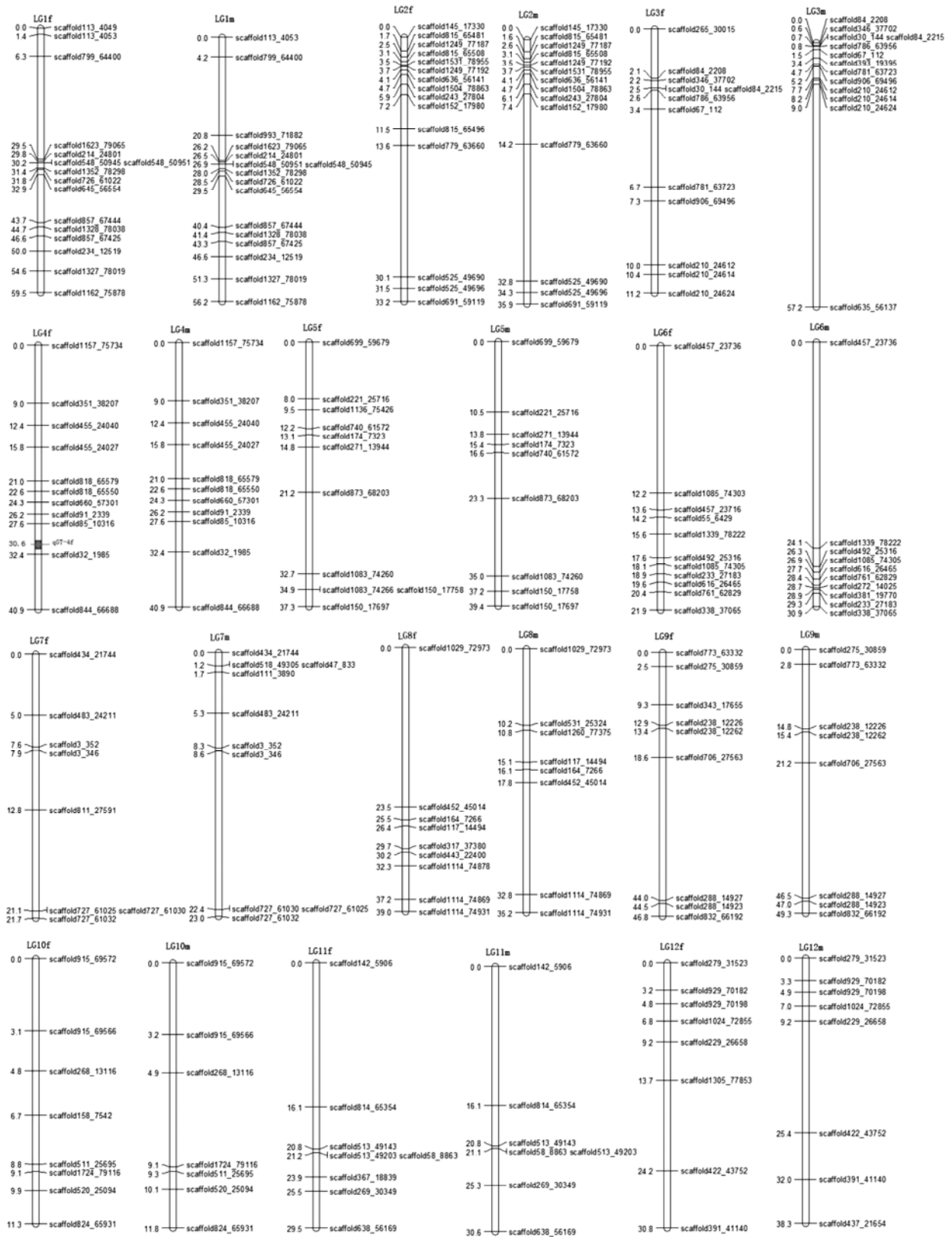
在雄性图谱中,共194个微卫星标记定位到23个连锁群上,其中包含一个三联体。雄性图谱观测总长度( $G_{oa}$ )为693.4 cM,平均距离为( $s$ )4.05 cM。连锁群上的标记数为3~16个,单条连锁群的图距为9.6~57.2 cM。图谱的预期长度( $G_e$ )为879.7 cM,总的图谱覆盖率达( $C_{oa}$ )78.82%(图1)。

## 2.3 牙鲆生长性状 QTL 定位

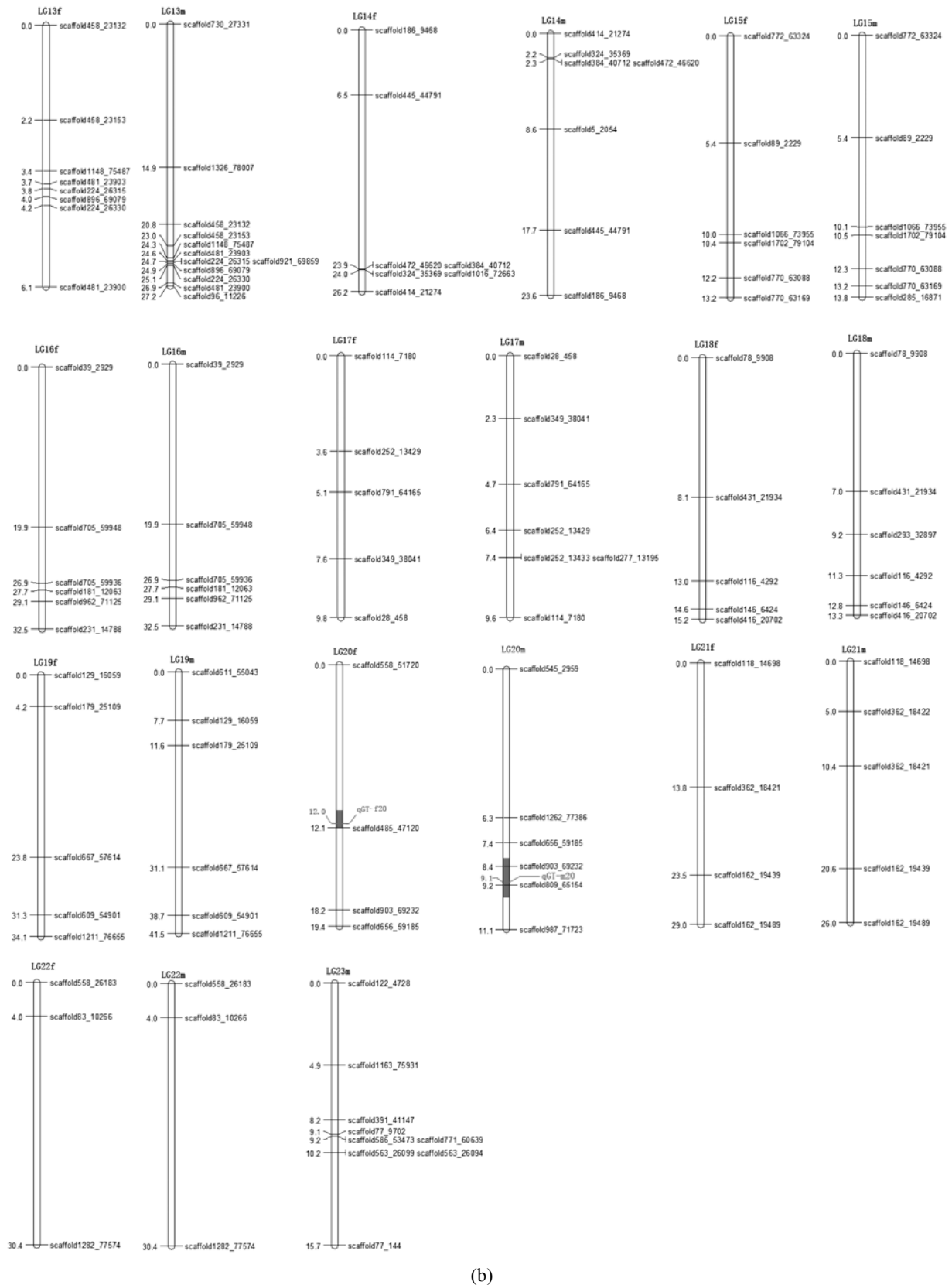
本研究共定位3个与牙鲆生长性状 GT 相关的 QTL。雌性图谱上定位了两个 QTLs,分别位于第4号和第20号连锁群上(图1),其中 qGT-f4 最高 LOD 值为2.69,可解释表型变异率为27.60%,加性效应为正值41.7,相邻标记左侧是 scaffold85\_10316,与

其重组率为3%;右侧标记是 scaffold32\_1985,与其重组率为1.8%(图2)。qGT-f20 最高 LOD 值为2.80,可解释表型变异率为10.27%,加性效应为正值24.4,相邻标记左侧是 scaffold558\_51720,与其重组率为12%,右侧标记 scaffold485\_47120,与其重组率为0.1%。雄性图谱中定位了1个 QTL(qGT-m20),最高 LOD 值为3.39,可解释表型变异率为13.74%,加性效应为负值-31.07,相邻的左侧标记是 scaffold903\_69232,与其重组率为0.7%,相邻的右侧标记是 scaffold809\_65154,与其重组率为0.1%。各个 QTLs 的遗传效应的具体参数见表4和表5。

对221个微卫星标记进行性状-标记之间的回归分析表明, scaffold32\_1985等22个微卫星标记与生长性状 GT 之间的连锁显著相关( $P < 0.05$ ),单个标记可解释表型变异率介于3.70%~11.26%,且其中 scaffold558\_51720、scaffold558\_26183、scaffold903\_69232、scaffold485\_47120、scaffold1262\_77386、scaffold809\_65154 6个标记与 GT 之间的连锁呈现极显著相关( $P < 0.01$ ),可解释表型变异率分别为10.42%、7.31%、10.07%、10.07%、8.39%和11.26%(表6)。



(a)



(b)

图 1 牙鲆遗传连锁图谱

阴影部分表示与生长性状 GT 相关 QTL 的大致分布, 并标注最大 LOD 值的位置。

Fig. 1 The genetic linkage map of *P. olivaceus*

The probable regions of QTLs associated with growth trait GT were showed as shadow, the peak values of LOD were also marked

表 4 QTLs 的特征值及其遗传效应的估计  
Tab. 4 Parameters value of QTLs and estimation of genetic effects

QTL	连锁群 linkage group	覆盖区域/cM covered area	标记区间 marker interval	最高 LOD 值 peak of LOD	解释表型变异率/% variation	加性效应 add.
qGT-f4	4	30.5~30.9	scaffold85_10316 ~scaffold32_1985	2.69	27.60	+41.7
qGT-f20	20	8.8~12.1	scaffold558_51720 ~scaffold485_47120	2.80	10.27	+24.4
qGT-m20	20	7.9~10.3	scaffold656_59185 ~scaffold987_71723	3.39	13.74	-31.07

表 5 QTLs 的相邻标记及与其重组率  
Tab. 5 Markers adjacent to QTLs and recombination frequency between markers and QTLs

QTL	连锁群 linkage group	左侧相邻标记 adjacent to the left	重组率/% recombination frequency	右侧相邻标记 adjacent to the right	重组率/% recombination frequency
qGT-f4	4	scaffold85_10316	3	scaffold32_1985	1.8
qGT-f20	20	scaffold558_51720	12	scaffold485_47120	0.1
qGT-m20	20	scaffold903_69232	0.7	scaffold809_65154	0.1

表 6 性状-标记回归分析结果与单个标记的遗传效应估计  
Tab. 6 Results of trait-marker regression analysis and estimation of single marker genetic effects

标记 marker	连锁群 linkage group	似然比值 likely ratio	显著水平 P 值 P-value	解释表型变异率 variation	加性效应 add.
scaffold32_1985 *	Group 4	5.207	0.0244	2.66%	18.352
scaffold558_51720 **	Group 20	10.127	0.0017	10.42%	-25.115
scaffold485_47120 **	Group 20	9.768	0.0021	10.07%	24.672
scaffold656_59185 *	Group 20	4.947	0.0283	5.93%	17.786
scaffold903_69232 **	Group 20	9.768	0.0021	10.07%	-24.672
scaffold 699_59679*	Group 5	5.747	0.0180	6.06%	-19.130
scaffold 1136_75426*	Group 5	4.669	0.0331	4.95%	17.305
scaffold740_61572*	Group 5	4.669	0.0331	4.95%	17.305
scaffold 174_7323*	Group 5	5.894	0.0166	6.21%	19.361
scaffold 873_68203*	Group 5	5.459	0.0212	4.75%	-18.661
scaffold 269_30349*	Group 11	3.955	0.0498	3.70%	16.004
scaffold 896_69079*	Group 13	4.299	0.0408	4.57%	-16.863
scaffold 224_26330*	Group 13	4.297	0.0409	3.98%	-16.860
scaffold1262_77386**	Group 20	8.063	0.0051	8.39%	-25.634
scaffold809_65154**	Group 20	10.431	0.0014	11.26%	-25.644
scaffold 558_26183**	Group 22	6.985	0.0091	7.31%	21.340
scaffold 1282_77574*	Group 22	4.261	0.0417	4.79%	-16.989
scaffold224_26315*	Group 13	4.299	0.0408	3.98%	16.863
scaffold481_23900*	Group 13	4.632	0.0338	4.44%	17.475
scaffold586_53473*	Group 23	4.460	0.0372	4.73%	16.943
scaffold771_60639*	Group 23	4.460	0.0372	4.73%	16.943
scaffold77_144*	Group 23	4.233	0.0424	4.50%	16.515

注: \*代表性状与标记之间的连锁显著相关( $P < 0.05$ ); \*\*代表性状与标记之间的连锁极显著相关( $P < 0.01$ )。

Notes: \* indicates the linkage significance at 0.05 level between traits and markers; \*\* indicates the linkage significance at 0.01 level between traits and markers.

### 3 讨论

#### 3.1 材料选取

在构建遗传连锁图谱时, 材料选取至关重要, 它关系到工作效率和图谱的经济价值。材料群体的多态性越高, 构建图谱的效率越高; 图谱上与标记连锁的性状越多, 图谱的经济价值也就越大。另外, 做 QTL 定位的研究还要考虑到表型性状, 因此, 本实验选材时要考虑的问题较为复杂。实验室在 2010 年建立了 33 个牙鲆家系, 使得可选材料非常丰富。首先, 观察选取子代生长性状差异明显的 16 个家系, 然后再对此 16 个家系的亲本进行筛选,

筛选原则是选取微卫星标记多态性丰富的亲本。一般情况下, 亲本的亲缘关系越远, 其微卫星多态性越丰富, 16 个家系全部是日本群体和韩国群体杂交建立的, 最终通过用 8% 非变性聚丙烯凝胶电泳后选取多态性最丰富的 2010 年 1 号家系中的个体作为本实验的分离群体。构建遗传图谱用的分离群体最好的是纯系, 如重组自交系(RIL)、加倍单倍体(DH)等。目前, 只有较少的几种鱼类用纯系作为分离群体, 如 Young 等<sup>[12]</sup>利用来自两个降海品系的纯系杂交产生的 76 个双单倍体作为分离群体建立了含 476 个标记的虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)图谱, Nichols 等<sup>[13]</sup>用降海品系“OSU”和“Arlee”杂交

雄核发育双单倍体  $F_1$  作为分离群体建立了一张含 1359 个遗传标记的虹鳟遗传连锁图谱; 另外, 有研究用 6 条鲤采用人工雌核发育建立了一个重组自

交系群体, 并做了鲤体质量和体长性状的 QTL 定位及分析<sup>[14-15]</sup>。然而, 大部分水生动物较难获得自交系, 而一般水生动物  $F_1$  代的群体已经具有较高

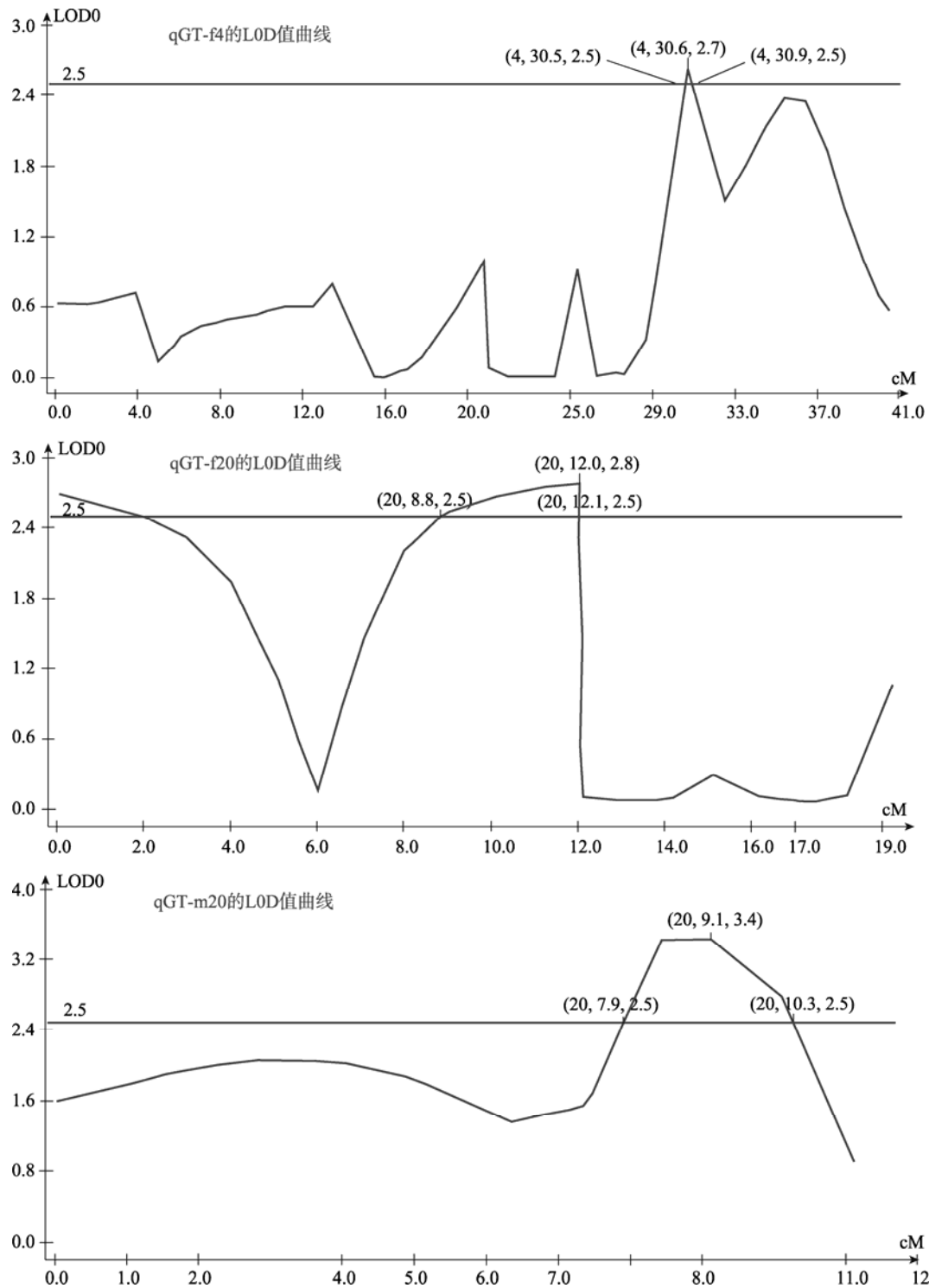


图 2 3 个 QTLs 的 LOD 值曲线

横坐标表示连锁群上的相对位置, 纵坐标表示 LOD 值; LOD 为 2.5 处的红色直线表示 QTL 的显著性阈值; “()”里的数字表示(连锁群, 位置, LOD 值)。

Fig. 2 LOD curve graph of three QTLs

Abscissa indicates the relative position on the linkage groups, vertical coordinates indicates the value of LOD; the red line whose value of LOD is 2.5 represents significant threshold of QTLs; the figure in “()” represents (group, position, value of LOD).

表 7 与 QTLs 相邻标记的遗传效应的估计  
Tab. 7 Genetic effects estimation of markers adjacent to QTLs

标记 marker	似然比值 likely ratio	显著水平 <i>P</i> 值 <i>P</i> -value	解释表型变异率/% variation	加性效应 add.
scaffold85_10316	0.016	0.8994	0.20	-1.039
scaffold32_1985 *	5.207	0.0244	2.66	18.352
scaffold558_51720 **	10.127	0.0017	10.42	-25.115
scaffold485_47120 **	9.768	0.0021	10.07	24.672
scaffold809_65154 **	10.431	0.0014	11.26	-25.644
scaffold903_69232 **	9.768	0.0021	10.07	-24.672

的多态性, 所以很多遗传连锁图谱都是用  $F_1$  代作为分离群体, 如 Castaño-Sánchez 等<sup>[7]</sup>在 2010 年建立高密度的牙鲆连锁图谱、葛学亮等<sup>[16]</sup>建立的黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 遗传连锁图谱等, 都是用  $F_1$  分离检测微卫星标记。牙鲆建立纯系的方法复杂、周期很长, 加上牙鲆  $F_1$  群体已经具有非常高的多态性, 所以本实验采用拟测交的方法, 用日本牙鲆×韩国牙鲆杂交  $F_1$  1 号家系作为分离群体来构建遗传连锁图谱。

### 3.2 主成分分析

在本实验, 为了尽可能全面分析与生长相关的 QTLs, 测量了全长、体质量、体高 3 个性状, 每个性状都能在不同程度上反映生长信息。性状之间具有一定的相关性, 当两个性状之间超过一定相关阈值时, 则两个性状反映的生长信息就会有一定重叠。这里一般认为当两组数据的 Pearson 相关系数大于 0.8 时, 可以做主成分分析。在分析了全长、体质量、体高 3 个性状的相关性后, 结果显示三者之间极显著相关。若用 WinQTLCart 2.5 软件分别对 3 个性状进行 QTL 定位时, 可能会出现两种情况: 一是多个 QTLs 重合或部分重合, 二是不同性状定位得到 QTL 位置不同, 但各性状包含该 QTL 的连锁群的 LOD 值曲线的形状基本一致。出现第一种情况可能是因为 QTL 的一因多效作用, 第二种情况也可能是 QTL 的一因多效作用, 只是在初步 QTL 定位中, 由于受图谱密度、分离群体大小、分析方法等原因, QTL 的位置发生了偏移。所以, 即使一个 QTL 为一因多效, 当它在某一性状定位到某区域时, 在另一性状的定位中未必会定位到该区域。主成分分析则可以尽量避免这种情况的发生。假若出现第二种情况, 则在分子标记辅助育种的应用中, 既无法兼顾选择多个 QTLs, 也将不确定用哪个 QTL 去替代另外的 QTLs。为避免问题复杂化, 可对 3 个性状提取公因子, 进行主成分分析, 将全长、体质量、体高 3 个性状变

量通过线性变换以选出较少个数的主要变量, 并命名, 用此表型变量做 QTL 定位, 所得结果即可在很大程度上代表 3 个性状可反映的生长信息。生长信息的大小是用方差来衡量。如果性状数量很多, 在进行主成分分析后, 可能会提取两个或两个以上两两不相关的主成分。Guo 等<sup>[17]</sup>从 10 个牡蛎 (*Ostrea gigas thunberg*) 的生长性状中提取了 3 个主成分。本研究由于测量的生长性状较少, 最终只得得到一个可解释 3 个性状的 89.6% 特征的主成分。

### 3.3 遗传连锁图谱

本实验共用 221 个微卫星标记构建遗传连锁图谱。牙鲆共有 24 对染色体, 但雌雄图谱分别共有 22 和 23 个连锁群, 连锁群数小于单倍体染色体个数, 原因可能是微卫星标记不足所导致。尽管标记数量不够多, 但是雌性图谱的平均距离(*s*)分别达到 3.84 cM 和 4.05 cM, 雌雄图谱覆盖率( $C_{oa}$ )达 76.27% 和 76.83%, 此密度已经可用来做牙鲆的 QTL 定位等研究。本实验仅用了 SSR 一种分子标记来构建遗传连锁图谱, 因 SSR 标记有其独特的优点。SSR 标记在遗传中呈共显性, 且保守性强, 这使得利用各种类型群体构建的遗传图谱之间以及雌雄图谱之间可以得到整合。

### 3.4 QTL 定位

Fuji 等<sup>[5]</sup>找到一个与抗淋巴囊肿病相连锁的分子标记(Poli.9-8TUF)。Akiyuki 等<sup>[18]</sup>筛选到 22 个抗链球菌感染的 SSR 标记。本研究是首次开展牙鲆生长性状 QTL 定位的报道, 用复合区间作图的方法共定位到 3 个与生长性状 GT 相关的 QTLs, 利用性状-标记之间的标记回归分析筛选到 22 个与生长性状相关的微卫星标记, 但由于用于 QTL 定位的牙鲆遗传连锁图谱的密度较低, 样本数量较少等原因, 实验用 LOD 值为 2.5 作为 QTL 存在的阈值, 此阈值得到的 QTLs 虽可信, 但随着遗传图谱密度的加大, 样本个数的增加, 测量表型性状技术提高, 可提高 LOD



阈值或通过大量置换试验来确定阈值, 阈值越高得到的 QTLs 将会更为准确。

本研究用两种方法做了生长性状 GT 相关 QTL 定位, 用复合区间作图的方法得到的 3 个 QTLs, 与它们相邻微卫星标记共有 6 个, 此 6 个标记 scaffold85\_10316、scaffold32\_1985、scaffold558\_51720、scaffold809\_65154、scaffold485\_47120、scaffold903\_69232 性状-标记的标记回归分析结果(表 7)显示, 只有 scaffold85\_10316 与 GT 无相关性, scaffold32\_1985 与 GT 之间显著相关( $P < 0.05$ ), scaffold485\_47120、scaffold903\_69232、scaffold558\_51720、scaffold809\_65154 与 GT 之间极显著相关( $P < 0.01$ ), 这也在一定程度上验证了本文定位的 3 个 QTLs 的准确性。

本文利用性状-标记之间的标记回归分析筛选到 22 个与生长性状相关的微卫星标记, 其单个标记可解释表型变异率之和大于 1, 出现悖论, 原因可能是软件分析时并没有考虑各个标记之间的相互作用, 各个标记可解释的表型变异有重合现象。

数量性状易受环境因素影响, 不同生活环境或不同时期的材料所得的 QTL 位置和遗传效应有一定的差别<sup>[19]</sup>, 在今后的研究中, 可以取多种生长环境、多种时期的材料, 来进行多方位的 QTL 定位, 以获得更准确、更稳定的 QTL<sup>[20]</sup>。另外, 很多植物是用家系中大量个体的均值作为该家系的表型, 然后用大量的家系来做 QTL 定位的研究, 然而, 在水产动物的研究中, 却只能用个体来评价性状表型, 因为不同于植物能产生自交纯系, 水产动物一般为异交杂合后代, 其本身在同一个家系内的个体已经存在较大的差异性(植物纯系后代性状差异不明显), 若用家系均值来评价性状则会忽略这种差异, 所以只能用个体来评价性状, 这样可以与个体的基因型一一对应, 进而进一步分析。

由于水产动物遗传连锁图谱的分辨率较低, 数量性状的研究远远落后于畜牧动物, 仍旧停留在初级水平。为进一步实现 QTL 的精细定位, 今后的工作是加大图谱的密度、缩小 QTL 在连锁群上的区域。

#### 参考文献:

- [1] Shirak A, Palti Y, Cnaani A, *et al.* Association between loci with deleterious alleles and distorted sex ratios in an inbred line of tilapia (*Oreochromis aureus*) [J]. *Journal of Heredity*, 2002, 93(4): 270-276.
- [2] O'Malley K G, Sakamoto T, Danzmann R G, *et al.* Quantitative trait loci for spawning date and bodyweight in rainbow trout: testing for conserved effects across ancestrally duplicated chromosomes [J]. *Journal of Heredity*, 2003, 94(4): 273-284.
- [3] 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.
- [4] Coimbra M, Kobayashi K, Koretsugu S, *et al.* A genetic linkage map of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. *Aquaculture*, 2003, 220(4): 203-218.
- [5] 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: 203-210.
- [6] Kang J H, Kim W J, Lee W J. Genetic linkage map of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2008, 4(3): 143-149.
- [7] 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: 554.
- [8] Grattapaglia D, Sederoff R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD marker [J]. *Genetics*, 1994, 137(2): 1121-1137.
- [9] Hemmat M, Weeden N F, Manganaris A G, *et al.* Molecular marker linkage map for apple [J]. *Journal of Heredity* 1994, 85(1): 4-11.
- [10] 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 [J]. *水产学报*, 2008, 32(5): 665-673。
- [11] Zeng Z B. Precision mapping of quantitative trait loci [J]. *Genetics*, 1994, 136(4): 1457-1468.
- [12] Young W P, Wheeler P A, Coryell V H, *et al.* A detailed linkage map of rainbow trout produced using doubled haploids [J]. *Genetics*, 1998, 148(2): 839-850.
- [13] Nichols K M, Young W P, Danzmann R G, *et al.* A consolidated linkage map for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Animal Genetics*, 2003, 34(2): 102-115.
- [14] 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] 刘继红, 张研, 常玉梅, 等. 鲤鱼体重和体长 QTL 的定位 [J]. *广东海洋大学学报*, 2009, 29(4): 19-25.

- [16] 葛学亮, 尹洪滨, 毕冰. 黄颡鱼遗传图谱构建及生长相关性状的 QTL 定位[J]. 水产学报, 2010, 34(2): 185-193.
- [17] Guo X, Li Q, Wang Q Z, *et al.* Genetic mapping and QTL analysis of growth-related traits in the Pacific oyster [J]. Mar Biotechnol, 2012, 14 (2) : 218-226.
- [18] Akiyuki O, Hiroyuki O, Toshiyuki Y, *et al.* Linkage analysis of resistance to *Streptococcus iniae* infection in Japanese flounder(*Paralichthys olivaceus*)[J]. Aquaculture, 2010, 308(1): 62-67.
- [19] Somorjai I M, Danzmann R G, Ferguson M M, *et al.* Distribution of temperature tolerance quantitative trait loci in Arctic Charr (*Salvelinus alpinus*) and inferred homologies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Genetics, 2003, 165(3): 1443-1456.
- [20] 徐鹏, 王慧, 李群, 等. 大豆油份含量 QTL 的定位[J]. 遗传, 2007, 29(1): 92-96.

## Genetic mapping and QTLs analysis of growth traits in olive flounder(*Paralichthys olivaceus*)

NIU Yu-ze<sup>1,2</sup>, LIAO Xiao-lin<sup>1</sup>, SONG Wen-tao<sup>1,2</sup>, WANG Lei<sup>1</sup>,  
ZHAO Yong-wei<sup>1</sup>, GAO Feng-tao<sup>1</sup>, CHEN Song-lin<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, 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)

**Abstract:** Using a population including 92 F<sub>1</sub> individuals obtained from the cross olive flounder from Japan × olive flounder from Korea as the segregating population, genetic linkage maps of flounder were constructed using the SSR marker by joinmap4.0 software. A total of 221 SSR markers were fixed to the genetic linkage map. 178 SSR markers were linked to 22 linkage groups in female map and 194 SSR markers are linked to 23 linkage groups in male map. The lengths of the female and male maps are 599.0 cM and 693.4 cM and covered 76.27% and 78.82% of the genome, respectively. Principal component analysis was handled with three sets of data, overall length, weight and body depth. 1 set of data that can explain 89.6% of the three traits was obtained, which was named growth-trait, GT of flounder. Based on the linkage maps, trait-marker regression and complexity interval mapping were analyzed to fix QTLs related to growth traits by WinQTLCart 2.5 software, the experiential LOD-value of 2.5 was the threshold value of existing QTLs. Three QTLs related to growth traits were obtained from this research, qGT-f4, qGT-m20 and qGT-f20, and the variance explained by the three loci were 27.60%, 13.74%, 10.27%, respectively. Twenty-two SSR markers related to growth traits ( $P < 0.05$ ) were obtained from trait-marker regression analyzing. The variance explained by single SSR, ranged from 3.70% to 11.26%. The six markers, scaffold558\_51720, scaffold558\_26183, scaffold903\_69232, scaffold485\_47120, scaffold1262\_77386 and scaffold809\_65154 were highly significantly ( $P < 0.01$ ) correlated with growth traits, and the variance explained by the six were 10.42%, 7.31%, 10.07%, 10.07%, 8.39%, 11.26% respectively.

**Key words:** *Paralichthys olivaceus*; microsatellites; growth traits; quantitative trait location

**Corresponding author:** CHEN Song-lin. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn