

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.01245

镜鲤体长性状的 QTL 定位分析

张天奇^{1,2}, 张晓峰², 谭照君^{1,2}, 曹柱^{1,2}, 王宣朋^{2,3}, 李文升^{2,3}, 储志远^{1,2}, 孙效文²

1. 大连海洋大学生命科学与技术学院, 大连 116023;
2. 中国水产科学研究所黑龙江水产研究及农业部北方鱼类生物工程育种重点开放实验室, 哈尔滨 150070;
3. 上海海洋大学水产与生命技术学院, 上海 201306

摘要: 以镜鲤良种后代为祖父母本所培育的杂交F₂群体的 68 个个体为材料, 利用 553 个分子标记(217 个SSR 和 336 个SNP标记)对其进行基因型检测, 运用JoinMap4.0 软件包对遗传连锁图谱进行构建。利用MapQTL5.0 区间作图法(Interval mapping)进行QTL检测, 通过置换实验(1 000 次重复)确定连锁群显著性水平阈值。在对体长的区间定位中共检测到 12 个与体长性状相关的QTLs区间, 分布在BL-1-1(SNP0137-SNP1481)、BL-4-1(SNP0092-HLJ797)、BL-5-1(SNP1268-HLJ423)、BL-7-1(HLJ870-SNP0702)、BL-12-1(SNP0922-HLJ639)、BL-16-1(HLJE351-SNP0674)、BL-25-1(SNP0394-SNP0862)、BL-35-1(HLJ668-SNP0832)、BL-43-1(SNP0389-SNP1425)、BL-47-1(HLJ057-HLJ1113)、BL-47-2(HLJ1439-HLJ1418)等 11 个连锁群上, 解释表型变异范围是 13.8%~64.9%, 其中贡献率大于 20%的主效QTLs有 8 个, 是体长性状的主效QTLs区间。

关键词: 镜鲤; 体长; 数量性状定位; 分子辅助育种

Mapping and genetic effect analysis of quantitative trait loci related to body length in mirror carp (*Cyprinus carpio* L.)

ZHANG Tian-Qi^{1,2}, ZHANG Xiao-Feng², TAN Zhao-Jun^{1,2}, CAO Zhu^{1,2}, WANG Xuan-Peng^{2,3}, LI Wen-Sheng^{2,3}, CHU Zhi-Yuan^{1,2}, SUN Xiao-Wen²

1. College of Life Science and Technology, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;
2. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;
3. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: A group of F₂ hybrids of mirror carp including 68 individuals was used to construct a linkage map using JoinMap4.0 software. Of 560 markers genotyped, 507 markers (143 SSR markers, 33 EST-SSR markers, and 321 SNP markers) were assigned to the map, which comprised of 62 linkage groups. Quantitative traits loci (QTLs) associated with body length were identified by interval mapping of the software MapQTL 5.0. A linkage group wide permutation test (1 000 replicates) determined the significance of the maximum LOD value over the various intervals analyzed for each linkage group. Twelve QTLs were identified for body length on the linkage groups of BL-1-1 (SNP0137-SNP1481), BL-4-1 (SNP0092-HLJ797), BL-5-1 (SNP1268-HLJ423), BL-7-1 (HLJ870-SNP0702), BL-12-1 (SNP0922-HLJ639), BL-16-1

收稿日期: 2010-12-16; 修回日期: 2011-03-30

基金项目: 国家重大基础研究发展规划(973)项目(编号: 2010CB126305)资助

作者简介: 张天奇, 硕士研究生, 专业方向: 生物化学与分子生物学。Tel: 13624247297; E-mail: applehermit@163.com

通讯作者: 孙效文, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 分子生物学与基因组学。E-mail: sunxw2002@163.com

网络出版时间: 2011-8-17 14:16:38

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20110817.1416.001.html>

(HLJE351-SNP0674), BL-25-1 (SNP0394-SNP0862), BL-35-1 (HLJ668-SNP0832), BL-43-1 (SNP0389-SNP1425), BL-47-1 (HLJ057-HLJ1113), BL-47-2 (HLJ1439-HLJ14180), which explained 13.8% to 64.9% of the total variation of body length. Eight major QTLs explained over 20% of the phenotypic variation, which were major QTLs associated with the body length of mirror carp.

Keywords: mirror carp (*Cyprinus carpio* L.); body length; quantitative trait locus mapping; molecular marker-assisted selection

镜鲤是重要的经济鱼类,在我国水产养殖业中占有很大的比重,但现今育种中出现种质资源退化,产量减少等现象^[1]。传统的育种技术效率低、时间长,易受环境影响,已经不能满足生产需要。DNA 分子标记的发展和 QTL 定位方法的形成及应用^[2,3],为从分子水平上研究鲤鱼数量性状的遗传基础提供了有效手段。

当前,水产动物经济性状 QTL 定位是分子育种领域研究的热点。体长是鲤鱼的重要经济性状,也是进行鲤鱼选择育种的主要参考指标。张研等^[4]利用重组自交家系和 123 个微卫星标记对鲤鱼遗传连锁图谱进行了一个初步的构建,并利用区间作图法找到了 6 个与体长性状相关的 QTL 位点。侯宁等^[5]利用 20 个微卫星标记对德国镜鲤的遗传潜力进行分析,得到 2 个与镜鲤体长相关的微卫星座位。张义凤等^[6]利用 40 个微卫星标记对鲤鱼体长性状的相关性进行分析,鉴定出 7 个与体长性状相关的标记。刘继红等^[7]利用 SSR、EST-SSR、AFLP、RAPD 多种分子标记手段,构建一个相对饱和的鲤鱼遗传连锁图谱,并对体长性状进行初步的 QTL 定位,找到了 2 个体长性状的 QTL 位点。

本文利用 217 个微卫星标记和 336 个 SNP 标记,以德国镜鲤选育系 F₂ 代作为作图群体构建鲤鱼遗传连锁图谱并对体长性状进行了 QTL 定位,确定了 16 个与体长性状相关的 QTL 位点,为进一步开展相关图位克隆和 QTL 的精细定位打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

本实验所用的鲤鱼样本均采自黑龙江水产研究所松浦实验站。以德国镜鲤选育系为亲本,选取体长性状上有明显差异的两个雌雄个体先生产出 F₁ 代,再

生产出 F₂ 代共 68 个个体,在水族箱内饲养,测量各个体体长性状的表型值并取其新鲜血液,提取基因组 DNA。

1.2 表型值的测量

根据伍献文^[8]的测量方法进行体长性状的测量和计算。利用精度为 0.02 mm 的游标卡尺测量各个体的体长:自吻端至尾鳍基部(最后一枚椎骨末端的垂直距离)。

1.3 基因型分析

1.3.1 微卫星标记的筛选

对所用 SSR 标记进行多态性筛选,筛选出的多态性标记对群体进行基因型检测。其中多态性筛选中每一个标记用 10 个个体进行检测,多态性筛选和群体检测均采用 PCR 扩增法,反应程序为:94℃ 预变性 3 min; 然后 94℃ 变性 30 s; 复性温度 48~65℃ 30 s, 72℃ 延

伸 30 s, 共 25~28 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。采用 135 V 恒压、再用 8% 聚丙烯凝胶电泳检测每个个体的基因型。

1.3.2 SNPs 标记的筛选

SNP 标记的筛选采用 Illumina 公司基因芯片技术检测 SNP 位点,检测各项指标参数要求(仅对 design score 大于 0.6 的 SNP 位点) 转化率(Conversion rate, 能检测出的 SNP 位点占总的 SNP 位点的比例) 大于 85%; 成功率(Call rate, 实际检测出的 SNP 位点占应该检测出的 SNP 位点的比例) 大于 97%; 准确率(Accuracy rate, 检测准确的 SNP 位点占检测出的 SNP 位点的比例) 大于 99%。

1.4 遗传图谱的构建和 QTL 分析

选用多态性符合孟德尔分离比的分子标记,用

JoinMap 4.0 软件对遗传连锁图谱进行构建。应用 Map QTL5.0 区间作图法(Interval mapping)进行 QTL 检测, 通过置换实验(1 000 次重复)确定连锁群显著性水平阈值, 取 LOD 值 2.0 为 QTL 存在的阈值。

2 结果与分析

2.1 体长性状测量结果

对镜鲤进行体长性状的测量和计算, 数据见表 1。正态分布检测 P 值为 0.523, 说明数据符合正态分布, 未发生偏分离, 可以进行下一步的 QTL 定位分析。

表 1 体长正态分布检验

	平均值	偏度	峰度	最小值	最大值	P 值
体长	18.81±1.59	0.325	0.511	13.33	24.94	0.523

2.2 遗传连锁图谱的构建

筛选出多态性在 10% 以上的 SSR 和 SNP 座位用于构建连锁图谱和 QTL 定位分析的候选标记, 结果共筛选出 336 个 SNPs 标记和 217 个多态性微卫星座位。通过 JoinMap 4.0 软件对 553 个分子标记进行连锁分析, 其中 507 个标记(SNPs 标记 321 个, SSR 标记 186 个)共组成 62 个连锁群, 覆盖基因组总长度为 2 805.85 cM, 标记间平均距离为 6.31 cM。有 46 个标记未能定位到相应连锁群上, 作图位点效率为 91.68%。构建连锁群中最大的为第 11 连锁群, 由 19 个标记组成, 图距为 119.5 cM, 标记间平均距离为 6.64 cM; 最小的为第 21、52、53、61 和 62, 5 个连锁群, 平均图距为 1.5 cM。

2.3 体长性状的 QTL 定位

在对鲤鱼体长性状的 QTL 定位分析中, 共检测到与鲤鱼体长相关的 16 个 QTLs 区间, 分别定位到鲤鱼连锁图谱的 BL-1-1(SNP0137-SNP1481)、BL-4-1(SNP0092-HLJ797)、BL-5-1(SNP1268-HLJ423)、BL-7-1(HLJ870-SNP0702)、BL-12-1(SNP0922-HLJ639)、BL-16-1(HLJE351-SNP0674)、BL-25-1(SNP0394-SNP0862)、BL-35-1(HLJ668-SNP0832)、BL-43-1(SNP0389-SNP 1425)、BL-47-1(HLJ057-HLJ1113)、BL-47-2(HLJ1439- HLJ1418)共计 11 个连锁群上, 这些体长相关 QTLs 在 11 个连锁群上的分布示意图见

图 1。其中 BL-5-1 的 LOD 值最大(6.13), 可解释的表型变异为 64.9%; BL-4-1 的 LOD 值最小(2.07), 可解释的表型变异为 13.8%, 解释表型变异范围是 13.8%~64.9%, 其中贡献率大于 20%的主效 QTLs 有 8 个, 是体长性状的主效 QTLs 区间(表 2)。

表 2 体长性状的 QTL 定位

QTL 位点	连锁群	位置	最大 LOD 值	置信区间	贡献率 (%)
BL-1-1	Group1	51.2	2.6	2.0	22.7
BL-4-1	Group4	12.3	2.1	3.1	13.8
BL-5-1	Group5	28.8	6.1	10.0	64.9
BL-7-1	Group7	0.0	2.2	2.9	18.0
BL-12-1	Group12	27.2	2.6	5.0	17.7
BL-16-1	Group16	20.0	3.1	12.4	26.3
BL-25-1	Group25	0.0	3.3	5.1	28.8
BL-32-1	Group32	68.6	2.6	9.4	16.5
BL-35-1	Group35	27.7	3.4	11.7	20.6
BL-43-1	Group43	2.0	2.1	5.0	33.7
BL-47-1	Group47	0.0	2.7	11.5	25.2
BL-47-2	Group47	38.8	2.3	10.0	32.6

3 讨论

3.1 遗传连锁图谱

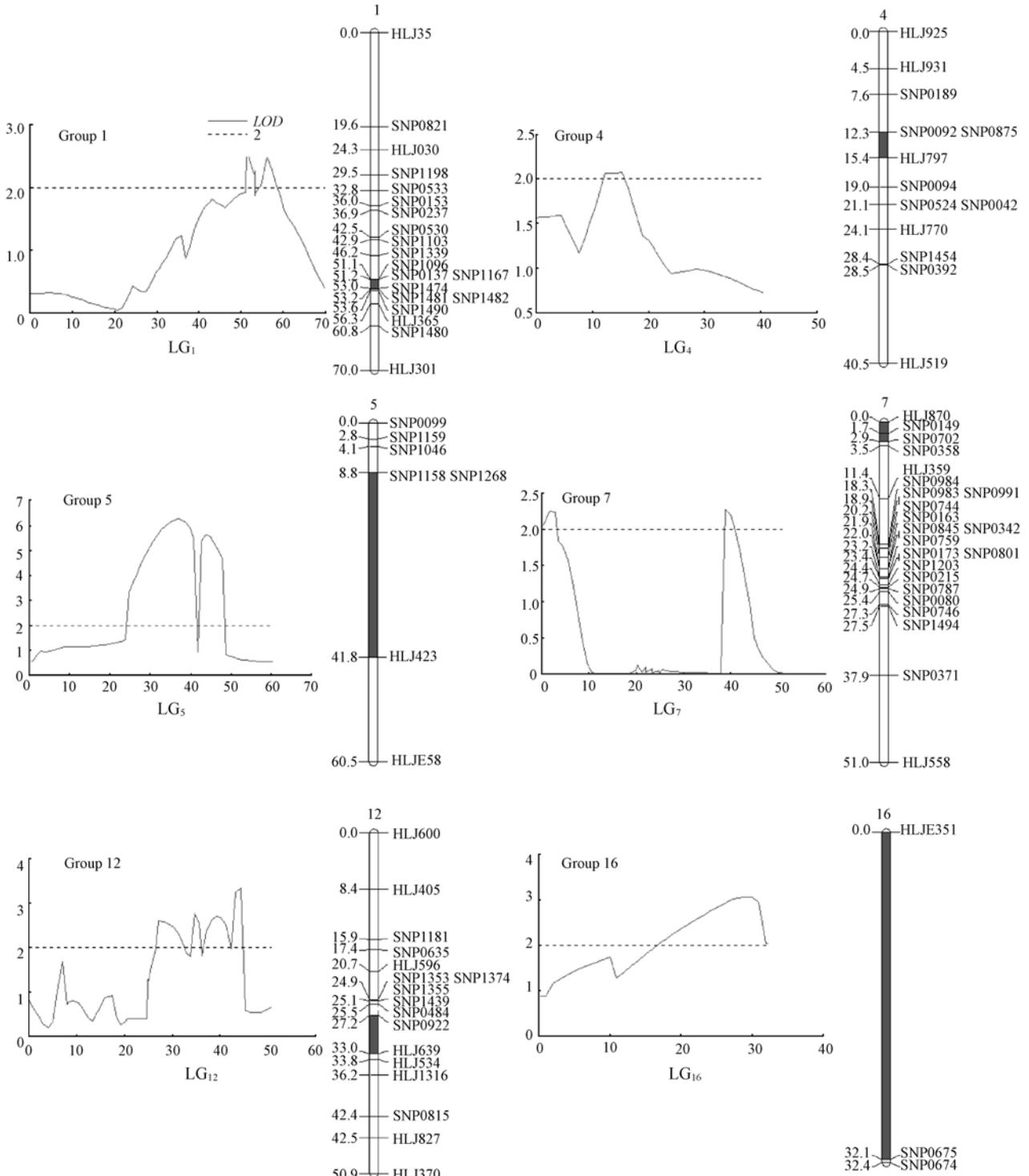
理想的分子标记应该达到以下几个要求: 遗传多态性高、共显性遗传信息完整、在基因组中大量存在且分布均匀、稳定性和重现性好、信息量大、分析效率高、检测手段简单快速、易于实现自动化、重复性好、便于数据交换等^[10]。本文使用的微卫星和 SNPs 两种分子标记基本具备以上要求。本研究利用 186 个 SSR 和 321 个 SNP 标记构建的遗传连锁图谱由 62 个连锁群组成, 总图距为 2805.85 cM, 标记间的平均图距是 7.21 cM。刘继红等^[2]利用 127 个 SSR 标记, 37 个 EST-SSR 标记, 265 个 AFLP 标记, 16 个 RAPD 标记, 构建的遗传连锁图谱包含 50 个连锁群, 总图距为 3 732.53 cM, 平均距离为 8.39 cM。并利用该图谱对鲤鱼体长性状进行了初步的 QTL 定位, 与之相比本文构建的图谱标记数多, 标记间的平均距离更小, 可为鲤鱼经济性状 QTL 的初步定位提供可靠依据。鲤鱼的染色体数为 $2n=100\sim 104$ ^[9], 而连锁群数目应该与相应物种单倍体的染色体数一致, 所以本研究构建的连锁群数目偏多, 原因可能是作图所用的标记数目偏少, 导致一些连锁群被分

割为两个或者更多个小的连锁群。

3.2 体长性状的 QTL 分析

在鲤鱼体长性状相关分析的研究中, 张义凤等^[6]得到了 6 个与体长性状显著相关的分子标记(K16、

HLJ695、HLJ716、HLJ739、HLJ759、HLJ774); 杨晶等^[11]对荷包红鲤和柏氏鲤抗寒品系回交子代的研究中找到 2 个与体长性状显著相关的分子标记(HLJ107、HLJ1098), 但这些标在本研究中均未得到扩增, 原因可能是电泳检测方法的和分析群体的差异所



(转下页)

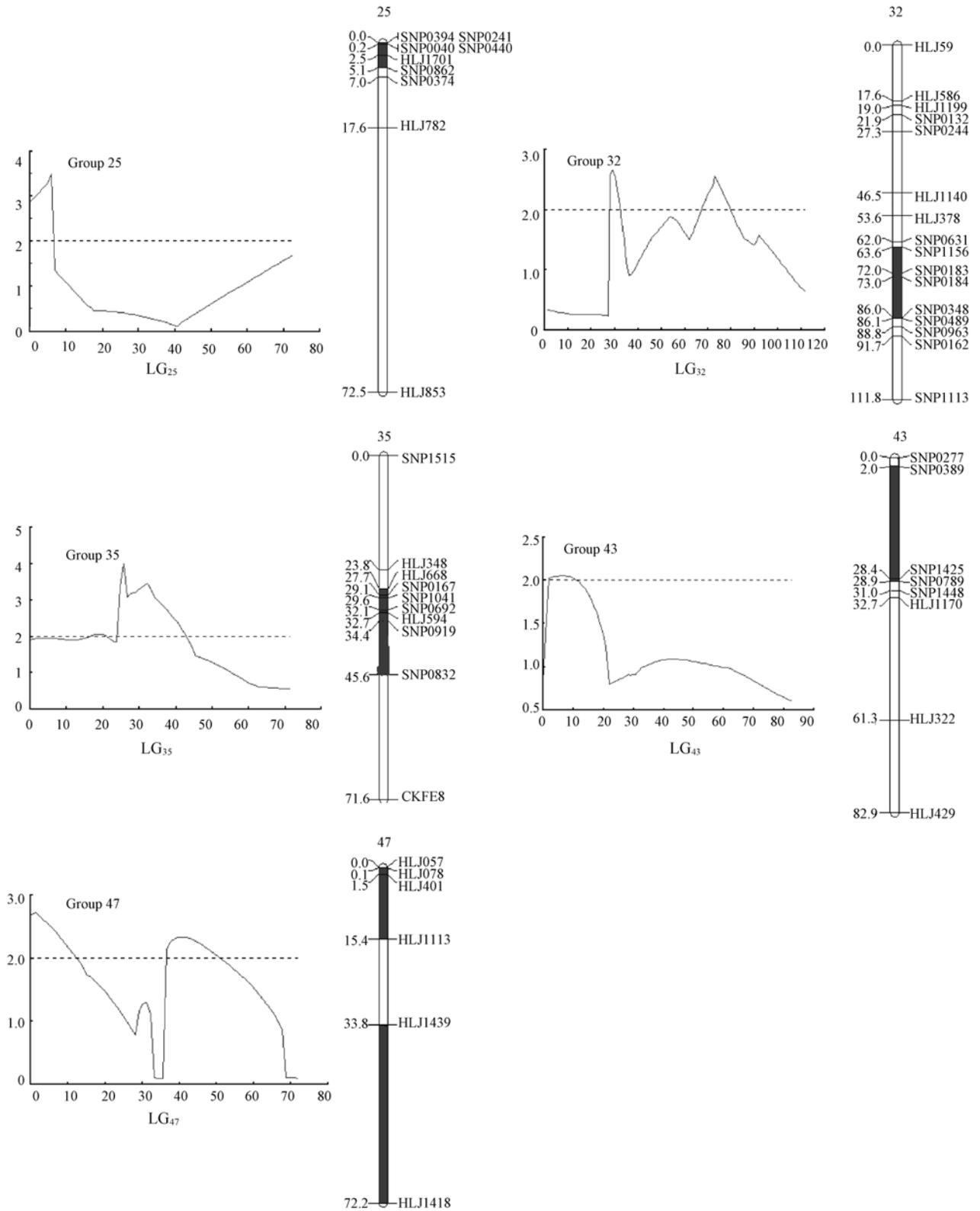


图 1 体长性状 QTL 的定位及其 LOD 值曲线

X轴表示标记的位置; Y轴表示LOD值; (---)代表LOD(阈值 2.0)。图中黑色区域表示连锁群上QTL位置。

致。在对水稻经济性状QTL定位研究过程中^[12,13]发现所能解释的表型变异超过 20%的QTL区间为该性状的主效QTL区间。本研究中共有 11 个解释的表型变异超过 20%的 QTL 区间。其中 BL-5-1 (SNP1268-HLJ423)的解释的表型变异达到 64.9 为影响体长性状的主效区间。刘继红等^[4]在对荷包红鲤 × 大头鲤雌核发育群体QTL定位研究中共检测到 2 个与体长性状相关的QTL分别定位于鲤连锁图谱的 LG2 和 LG20 上,可解释的表型变异分别为 5.69%和 12.69%。与之相比,本研究所获得的体长QTL区间置信图距较小,可解释的表型变异较大。有研究指出数量性状的一个重要特点是易受环境的影响^[14],本实验采用的镜鲤处于相同的发育时期,并且在相同的饲养环境中生长排除了环境因子的影响,实验结果可靠。其中BL-16-1、BL-47-1、BL-35-1QTL区间较大原因,其原因为标记的数量还不够,近期鲤鱼的全基因组测序已经完成,可以得到大量的标记进一步缩小QTL区间,提高QTL的精确定位。

3.3 分子标记辅助育种

分子标记辅助育种(MAS)是根据与基因或某一性状紧密连锁的标记的出现来推断该性状或基因从而进行选育,分子标记辅助育种是在DNA水平上而不是根据表型进行选择,可以克服传统育种技术许多不足,大大提高育种效率和选择强度,提高选择的准确性,从而加快育种进程^[15]。水产动物的分子育种技术报道的不多,目前的研究进展较为缓慢,主要原因在于缺少足够的标记^[16]。本研究共检测到与鲤鱼体长相关的 12 个QTLs,其中贡献率大于 20%的主效QTLs 有 8 个。共找到 32 个可能与体长性状相关的分子标记,丰富了以前研究的结果。QTL定位中置信区间接近或小于 10 cM的QTL可直接用于图位克隆的研究^[7]。因此本研究中BL-1-1 (SNP0137-SNP1481)、BL-4-1(SNP0092-HLJ797)、BL-5-1(SNP1268-HLJ423)、BL-7-1(HLJ870-SNP0702)、BL-12-1 (SNP0922-HLJ639)、BL-25-1(SNP0394-SNP0862)、BL-43-1(SNP0389-SNP1425)、BL-47-2(HLJ1439-HLJ1418)共 8 个QTLs可直接用于图位克隆的研究,对于镜鲤分子标记辅助育种具有潜在的应用价值。

参考文献(References):

[1] 孙效文,鲁翠云,匡友谊,金万昆,沈俊宝,朱晓东,李

大宇,马海涛,于东梅. 镜鲤两个繁殖群体的遗传结构和几种性状的基因型分析. 水产学报, 2007, 31(3): 273-279. DOI

- [2] 梁利群,孙效文. 鲤耐寒性状分子标记在遗传连锁图上的定位. 大连水产学院学报, 2003, 18(4): 278-281. DOI
- [3] Sun XW, Liang LQ. A genetic linkage map of common carp (*Cyprinus carpio* L.) and mapping of a locus associated with cold tolerance. *Aquaculture*, 2004, 238(1-4): 165-172. DOI
- [4] 张研,梁利群,常玉梅,侯宁,鲁翠云,孙效文. 鲤鱼体长性状的QTL定位及其遗传效应分析. 遗传, 2007, 29(10): 1243-1248. DOI
- [5] 侯宁,张研,鲁翠云,李勇,李大宇,季旭,丁雷,孙效文. 微卫星DNA标记分析德国镜鲤的遗传潜力. 遗传, 2007, 29(12): 1509-1518. DOI
- [6] 张义凤,张研,鲁翠云,曹顶臣,孙效文. 鲤鱼微卫星标记与体重、体长和体高性状的相关分析. 遗传, 2008, 30(5): 613-619. DOI
- [7] 刘继红,张研,常玉梅,梁利群,鲁翠云,张晓峰,徐美佳,孙效文. 鲤鱼 (*Cyprinus carpio* L.) 头长、眼径、眼间距QTL的定位. 遗传, 2009, 31(5): 508-514. DOI
- [8] 伍献文. 中国鲤科鱼类志:上卷. 上海: 科学技术出版社, 1964: 4(绪论). DOI
- [9] Ohno S. The enormous diversity in genome sizes of fish as a reflection of nature's extensive experiments with gene duplication. *Trans Amer Fish Soc*, 1970, 99: 120-130. DOI
- [10] 孙效文. 鱼类分子育种学. 北京: 海洋出版社, 2010, 5. DOI
- [11] 杨晶,张晓峰,储志远,孙效文. 鲤的微卫星标记与体质量、体长、体高和吻长的相关分析. 中国水产科学, 2010, 17(4): 2-10. DOI
- [12] Tan YF, Xing YZ, Li JX, Yu SB, Xu CG, Zhang QF. Genetic bases of appearance quality of rice grains in Shanyou 63, an elite rice hybrid. *Theor Appl Genet*, 2000, 101(5-6): 823-829. DOI
- [13] Xing YZ, Tan YF, Xu CG, Hua JP, Sun XL. Mapping quantitative trait loci for grain appearance traits of rice using a recombinant inbred line population. *Acta Bot Sin*, 2001, 43(8): 840-845. DOI
- [14] Reid DP, Szanto A, Glebe B, Danzmann RG, Ferguson MM. QTL for body weight and condition factor in Atlantic salmon (*Salmo salar*): comparative analysis with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Heredity*, 2005, 94(2): 166-172. DOI
- [15] 岳志芹,孔杰,戴继勋. 水产动物遗传连锁图谱的研究现状及应用展望. 遗传, 2004, 26(1): 97-102. DOI
- [16] 孙效文,张晓峰,赵莹莹,张研,贾智英,常玉梅,鲁翠

云, 梁利群. 水产生物微卫星标记技术研究进展及其应用. 中国水产科学, 2008, 15(4): 689-703. [DOI](#)