

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00565

## 利用 SSR、EST-SSR、SNP 标记对鲤食物转化率、体厚、体质量 3 种性状的分析

王宣朋<sup>1,2</sup>, 张晓峰<sup>1</sup>, 李文升<sup>1,2</sup>, 张天奇<sup>1,3</sup>, 孙效文<sup>1</sup>

1. 中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070;

2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306;

3. 大连水产学院 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023

**摘要:** 利用 Windows Map Manager2.0 的标记回归法对鲤(*Cyprinus carpio* L.)F<sub>2</sub> 群体进行单标记定位分析。用 91 个 SSR 标记、33 个 EST 标记、364 个 SNP 标记对鲤进行全基因组扫描, 结果得到与食物转化率、体厚、体质量 3 个性状显著相关( $P < 0.05$ )的标记, 分别为 27、35、27 个, 其中与食物转化率相关的标记 SNP0041、SNP0044, 其相关性达到极显著水平( $P < 0.001$ ), 贡献率分别达到 15%、16%。这些标记可作为分子标记辅助育种的参考标记。将得到的与食物转化率显著相关的 EST 座位 HLJE14、HLJE253 和与体质量显著相关的 HLJE253 座位在 NCBI 上进行 BLAST 比对, 结果显示 HLJE253 与斑马鱼上编码 ORF2 结构蛋白的基因相关, 相关程度达 61%。将得到的与 3 种性状相关的 SNP 标记在 NCBI 上进行序列查找, 通过 Blast 比对找到相关的基因, 并对可能的功能作了注释。

**关键词:** 鲤; EST-SSR; SNP; 食物转化率; 体厚; 体质量

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)03-0565-09

DNA 分子标记(DNA molecular marker)是指可遗传并可检测的 DNA 序列, 以个体间遗传物质核苷酸序列变异为基础, 是 DNA 水平遗传变异的直接反映。DNA 分子标记的检测不受组织特异性及发育阶段等因素的影响, 并具有数量大、多态性高、遗传稳定等优势, 因此在遗传育种、基因定位、基因克隆等方面应用广泛。微卫星(SSR)、表达序列标签(EST)、单核苷酸多态性(SNP)是 3 种常见的标记类型, 具有分布广泛、共显性、呈孟德尔遗传、多态性高、重复性好和能用 PCR 扩增等优点<sup>[1]</sup>, 在遗传和物理图谱的构建<sup>[1-4]</sup>、基因定位<sup>[1-6]</sup>、物种进化分析<sup>[7]</sup>、亲缘关系鉴定<sup>[8]</sup>、DNA 指纹图谱构建<sup>[9]</sup>和比较基因组学<sup>[10]</sup>等方面得到广泛应用。目前这 3 种标记已成为研究重要

经济性状定位<sup>[11]</sup>、遗传作图<sup>[12-13]</sup>、遗传多样性<sup>[14]</sup>及比较基因组学<sup>[15]</sup>的新型工具。

鲤是重要的经济鱼类, 在中国水产养殖业中占有相当大的比重, 近年来鲤养殖的人工选择负面效应非常明显, 种质资源退化严重, 养殖个体生长缓慢, 远远达不到生产的需要, 所以迫切需要探究决定鲤生长性状的基因以求从根本上解决其生长问题<sup>[16]</sup>。鲤数量性状方面的研究已经取得了很大的进展, 张研等<sup>[17]</sup>找到了与体长相关的标记, 张仪凤等<sup>[18]</sup>找到与体质量相关的几个标记, 但对食物转化率及体厚性状相关标记的研究报道却很少。食物转化率和体厚是水产养殖鱼类的重要经济性状, 其中食物转化率的提高能够节省饲料用量, 降低生产成本, 从而提高经济效益。目前

收稿日期: 2010-07-17; 修订日期: 2010-10-05.

基金项目: 国家 973 计划项目(2010CB126305); 农业部公益性行业科研专项(200903045).

作者简介: 王宣朋(1983-), 男, 硕士研究生, 专业方向为水产养殖. Tel: 15045819248; E-mail: pengwx2008@126.com

通信作者: 孙效文(1955-), 研究员, 博士生导师, 研究方向为水产动物基因工程育种. Tel: 0451-84862646; E-mail: sunxw2002@163.com

关于鱼类食物转化率的 QTL 定位研究仅在少数鱼类中有报道,如 Bergot 等<sup>[19]</sup>发现幽门盲囊数的增加,会显著提高虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的食物转化效率,加快虹鳟的生长,Zimmerinan 等<sup>[20]</sup>在后续的研究中找到影响虹鳟鱼幽门囊数的 3 个 QTL 位点等。

本研究用 91 个 SSR 标记、33 个 EST 标记、364 个 SNP 标记对鲤全基因组进行扫描,采用标记回归方法确定与食物转化率、体厚、体长、体质量等性状连锁的标记,旨在为与鲤生长性状相关的基因定位和分子辅助育种(MAS)提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本实验选用的镜鲤均采自黑龙江水产研究所松浦试验站,构建的实验群体为  $F_2$  群体。 $F_0$ (祖父母本)为早期被国家原种和良种审定委员会鉴定为良种的德国镜鲤选育系的后代,经微卫星分子标记检测遗传差异,构建  $F_1$ ,  $F_1$  经 2 个冬季强化培育达 2 龄成熟,自交产生  $F_2$ ,随机取 68 个  $F_2$  个体作为实验对象。

### 1.2 研究方法

**1.2.1 食物转化率的测定和计算** 将 68 个个体分别饲养在 68 个水族箱中,每天投饵,每个个体均投喂同种饲料,投喂量以饱食为准。每月定期测定体质量。测定结果用如下公式计算:

$$\text{食物转化率(FCR)} = (W - W_0) \times 100 / Id^{[21]}$$

式中,  $W_0$  为初始体质量(g),  $W$  为终末体质量(g),  $Id$  为摄入饲料的干物质总量(g)。

**1.2.2 其他表型性状的度量** 根据伍献文<sup>[22]</sup>的测量方法进行体厚、体长、体质量性状的测定和计算。

**1.2.3 基因型分析** 利用 PCR 扩增方法对本实验研究群体进行基因型检测。引物来自: (1)本实验室开发的 91 对微卫星标记; (2)NCBI 数据库中的 33 对 EST 标记(EST-SSR); (3)本实验室利用鲤基因组测序结果开发的 364 个 SNP 标记。引物由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 反应体系为 15  $\mu$ L, 其中包括: 1 U *Taq* DNA 聚合酶(Sangon), 1 $\times$ PCR buffer (10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl,

2.0 mmol/L  $MgCl_2$ , 0.01% gelatin, pH 8.3), dNTPs 各 200 mmol/L, 上下游引物各 0.1 mmol/L, 100 ng 的模板 DNA。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 退火温度 48~64 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。扩增产物经 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染后进行个体基因型检测。采用 QualitySNP 软件以鲤全基因组测序获得的 EST 序列和 NCBI 的 GenBank 数据库中下载的鲤 EST 序列为源序列,开发 SNP 标记,再用武汉达邦生物科技公司的 LightScanner 高分辨熔解曲线检测系统(HRM)进行基因型分型。

**1.2.4 数据分析** 选用在群体中具有多态性并且符合孟德尔分离比的分子标记,用 Gel-Pro Analyzer<sup>[13]</sup>等软件进行数据统计,应用 Windows Map Manager 2.0<sup>[23]</sup>软件进行标记回归分析,采用最大似然比法,以  $P < 0.05$  为显著性阈值检测单个分子标记分别与体厚、体质量、食物转化率间的连锁关系。

## 2 结果与分析

### 2.1 微卫星标记扫描

从 68 个个体中随机抽取 10 个个体用于扫描 SSR 和 EST-SSR 标记的多态性。用根据各多态性标记设计的引物对基因组 DNA 进行 PCR 扩增和电泳检测,结果显示,91 个 SSR 标记和 33 个 EST-SSR 标记在 68 个个体中均获得了稳定、清晰的 DNA 条带,并在个体间表现出不同程度的多态性(图 1)。HLJ384 标记在杂交  $F_2$  68 个个体中有 4 种分离类型,以片段大小(单位为 bp)表示分别为 286/253、319/253、319/286 和 253/253。图中最后 2 个为父母本,基因型为 286/253 和 319/253。根据片段大小可看出子代完全符合孟德尔分离规律。

### 2.2 性状分布

鲤体质量(BW)、体厚(BT)、食物转化率(FCR) 3 种性状均为数量性状,呈现连续变异的特点,且表型性状测量值符合正态分布。采用 SPSS11.5<sup>[24]</sup>软件中的 Shapiro-Wilk 检验(W 检验)方法,检验 3 种表型性状的频率是否符合正态分布,检验结果

如表 1 所示。3 种性状的偏度、峰度值均大于 0,  $P$  值均大于 0.05, 表明体厚、体质量、食物转化率 3 种性状均符合正态分布, 且属于尖峰顶、右偏型正态曲线。相关系数( $r$ )表示 2 组变量间相关程度, 用 SPSS11.5<sup>[24]</sup>软件中 Pearson 相关检测性状间的相关性, 结果见表 2。体厚和体质量间的相关性最大( $r=0.896$ ); 其次是体质量和食物转化率( $r=0.720$ ); 体厚和食物转化率间的相关性最小( $r=0.398$ )。

2.3 标记回归分析结果

利用 Windows Map Manager 2.0 软件对与体厚、体质量、食物转化率性状相关的微卫星、EST、SNP 标记进行标记回归分析(表 3)。结果显示, 35 个标记与体厚性状相关( $P<0.05$ ), 解释表型变异

为 6%~15%, 其中 6 个相关性达到极显著水平( $P<0.01$ ); 27 个标记与体质量性状相关( $P<0.05$ ), 解释表型变异分别为 6%~15%, 有 6 个相关性达极显著水平( $P<0.01$ ); 与食物转化率相关的标记有 27 个( $P<0.05$ ), 其中 SNP0041、SNP0044 解释表型变异分别达到 15%和 16%( $P<0.01$ )。

2.4 标记与性状分析结果

用 Windows Map Manager2.0 软件中提供的单标记回归分析方法, 进行标记与性状间相关分析, 结果显示多个标记与不同性状同时显著相关(表 4), 其中 SNP0041、SNP0044、SNP0094 和 SNP0137 这 4 个标记同时与体厚、体质量、食物转化率 3 个性状显著相关( $P<0.05$ )。共有 14 个标记同时与体厚、体质量显著相关; 有 7 个标记同

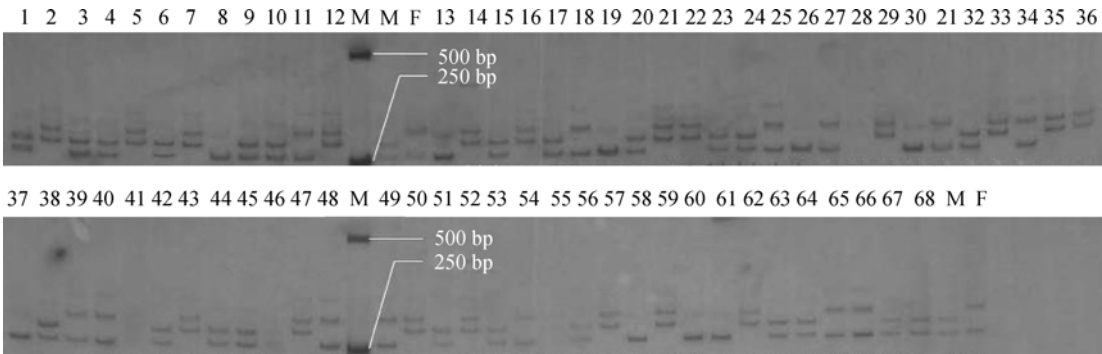


图 1 微卫星标记 HLJ384 在 68 个鲤样本的扩增结果

M: 分子量标准; M:父本; F: 母本.

Fig.1 Amplification result of HLJ384 in 68 *Cyprinus carpio* samples  
M: DNA marker ladder; M: male parent; F: female parent.

表 1 鲤体质量、体厚、食物转化率正态分布检验

Tab. 1 Gaussian distribution of body weight, body thickness and feed conversion ratio

| 项目<br>item                  | 最大值<br>maximum | 最小值<br>minimun | 平均值<br>mean       | 偏度<br>skewness | 峰度<br>kurtosis | $P$ 值<br>$P$ value |
|-----------------------------|----------------|----------------|-------------------|----------------|----------------|--------------------|
| 体质量 body weight             | 389            | 141            | 243.4265±44.13017 | 0.717          | 1.802          | 0.052              |
| 体厚 body thickness           | 5.28           | 3.38           | 4.2281±0.35980    | 0.516          | 0.736          | 0.062              |
| 食物转化率 feed conversion ratio | 1              | 0.48           | 0.7019±0.11623    | 0.582          | 0.519          | 0.071              |

表 2 鲤体质量、体厚、食物转化率之间的相关系数

Tab.2 Linear correlation coefficients between bodyweight, body thickness and feed conversion ratio

| 项目<br>item                  | 体质量<br>body weight | 体厚<br>body thickness | 食物转化率<br>feed conversion ratio |
|-----------------------------|--------------------|----------------------|--------------------------------|
| 体质量 body weight             | 1                  |                      |                                |
| 体厚 body thickness           | 0.896              | 1                    |                                |
| 食物转化率 feed conversion ratio | 0.720              | 0.398                | 1                              |

表 3 标记与性状间回归的分析结果及遗传效应估计  
 Tab.3 Significance of marker regression with traits and estimation of genetic effects

| 性状<br>trait          | 微卫星座位<br>locus | 似然比<br>likelihood ratio | P 值<br>P value | 解释表型变异/%<br>explaining variation | 加性效应<br>additive effect |
|----------------------|----------------|-------------------------|----------------|----------------------------------|-------------------------|
| 体厚<br>body thickness | HLJ057         | 4                       | 0.045          | 6                                | 0.17                    |
|                      | HLJ076         | 4.3                     | 0.038          | 6                                | 0.17                    |
|                      | HLJ190         | 5.7                     | 0.017          | 8                                | -0.20                   |
|                      | HLJ334         | 4.2                     | 0.039          | 6                                | 0.18                    |
|                      | HLJ401         | 4.7                     | 0.031          | 7                                | 0.18                    |
|                      | HLJ429         | 7.8                     | 0.005          | 11                               | -0.24                   |
|                      | HLJ495         | 5.5                     | 0.019          | 8                                | -0.20                   |
|                      | HLJ697         | 4.2                     | 0.041          | 6                                | 0.17                    |
|                      | HLJ1145        | 4.1                     | 0.044          | 6                                | 0.18                    |
|                      | HLJ1170        | 4.8                     | 0.016          | 8                                | 0.21                    |
|                      | CKFE10         | 5.3                     | 0.021          | 8                                | 0.20                    |
|                      | SNP0027        | 4.9                     | 0.027          | 7                                | 0.19                    |
|                      | SNP0041        | 4.7                     | 0.030          | 7                                | -0.18                   |
|                      | SNP0044        | 4.2                     | 0.039          | 6                                | -0.18                   |
|                      | SNP0065        | 6                       | 0.015          | 8                                | -0.21                   |
|                      | SNP0066        | 6                       | 0.010          | 9                                | -0.22                   |
|                      | SNP0094        | 4                       | 0.045          | 6                                | 0.17                    |
|                      | SNP0137        | 5.5                     | 0.019          | 8                                | 0.20                    |
|                      | SNP0138        | 7.2                     | 0.007          | 10                               | 0.23                    |
|                      | SNP0153        | 4.7                     | 0.031          | 7                                | 0.18                    |
|                      | SNP0178        | 7.2                     | 0.007          | 10                               | 0.23                    |
|                      | SNP0277        | 5.6                     | 0.018          | 8                                | 0.20                    |
|                      | SNP0375        | 4                       | 0.047          | 6                                | -0.17                   |
|                      | SNP0389        | 4                       | 0.046          | 6                                | 0.17                    |
|                      | SNP0500        | 4.3                     | 0.037          | 6                                | -0.18                   |
|                      | SNP0530        | 11                      | 0.004          | 15                               | -1.19                   |
|                      | SNP0556        | 6.5                     | 0.011          | 9                                | -0.22                   |
|                      | SNP0594        | 8.1                     | 0.004          | 11                               | 0.24                    |
|                      | SNP0674        | 5.1                     | 0.023          | 7                                | -0.21                   |
|                      | SNP0760        | 5.3                     | 0.021          | 8                                | -0.20                   |
|                      | SNP1167        | 5.5                     | 0.019          | 8                                | 0.20                    |
|                      | SNP1207        | 6.7                     | 0.030          | 9                                | 0.09                    |
|                      | SNP1425        | 7.2                     | 0.007          | 10                               | 0.23                    |
|                      | SNP1448        | 5.8                     | 0.016          | 8                                | 0.21                    |
|                      | SNP1477        | 6.6                     | 0.010          | 9                                | -0.22                   |
| 体质量<br>body weight   | HLJE253        | 10.9                    | 0.004          | 15                               | -22.26                  |
|                      | HLJ057         | 4.9                     | 0.027          | 7                                | 23.02                   |
|                      | HLJ076         | 5                       | 0.025          | 7                                | 23.40                   |
|                      | HLJ190         | 3.9                     | 0.049          | 6                                | -20.70                  |
|                      | HLJ401         | 5.4                     | 0.019          | 8                                | 24.35                   |
|                      | HLJ602         | 6.7                     | 0.036          | 9                                | -10.16                  |
|                      | HLJ697         | 3.9                     | 0.046          | 6                                | 20.70                   |
|                      | HLJ1042        | 5.6                     | 0.018          | 8                                | -26.31                  |

(续表 3)

| 性状<br>trait                    | 微卫星座位<br>locus | 似然比<br>likelihood ratio | P 值<br>P value | 解释表型变异/%<br>explaining variation | 加性效应<br>additive effect |
|--------------------------------|----------------|-------------------------|----------------|----------------------------------|-------------------------|
|                                | SNP0019        | 6.8                     | 0.009          | 10                               | 27.45                   |
|                                | SNP0041        | 4                       | 0.044          | 6                                | -21.07                  |
|                                | SNP0044        | 3.9                     | 0.049          | 6                                | -20.68                  |
|                                | SNP0094        | 5                       | 0.025          | 7                                | 23.40                   |
|                                | SNP0137        | 8.7                     | 0.003          | 12                               | 30.58                   |
|                                | SNP0138        | 4.4                     | 0.035          | 6                                | 22.01                   |
|                                | SNP0153        | 5.8                     | 0.016          | 8                                | 25.07                   |
|                                | SNP0167        | 8.7                     | 0.003          | 12                               | 30.53                   |
|                                | SNP0178        | 4.4                     | 0.035          | 6                                | 22.01                   |
|                                | SNP0217        | 4.1                     | 0.042          | 6                                | -21.31                  |
|                                | SNP0513        | 7.1                     | 0.007          | 10                               | 26.67                   |
|                                | SNP0524        | 4.3                     | 0.038          | 6                                | -21.80                  |
|                                | SNP0530        | 8.5                     | 0.004          | 15                               | -16.83                  |
|                                | SNP0533        | 6.1                     | 0.014          | 9                                | 25.76                   |
|                                | SNP0674        | 7                       | 0.008          | 10                               | -29.19                  |
|                                | SNP0675        | 7.3                     | 0.026          | 10                               | 17.06                   |
|                                | SNP0789        | 6.8                     | 0.034          | 9                                | -11.00                  |
|                                | SNP1198        | 4.9                     | 0.026          | 7                                | 23.24                   |
| 食物转化率<br>feed conversion ratio | HLJE014        | 7.6                     | 0.006          | 11                               | 0.08                    |
|                                | HLJE253        | 7                       | 0.030          | 10                               | -0.05                   |
|                                | HLJ370         | 6.2                     | 0.045          | 9                                | 0.02                    |
|                                | HLJ827         | 7                       | 0.049          | 8                                | 0.02                    |
|                                | HLJ938         | 7.2                     | 0.026          | 10                               | 0.03                    |
|                                | HLJ1042        | 4.2                     | 0.040          | 6                                | -0.06                   |
|                                | HLJ1161        | 8.8                     | 0.012          | 12                               | -0.05                   |
|                                | HLJ1394        | 6.2                     | 0.013          | 9                                | 0.07                    |
|                                | SNP0003        | 4.8                     | 0.026          | 7                                | -0.06                   |
|                                | SNP0041        | 11.3                    | 0.000          | 15                               | -0.09                   |
|                                | SNP0044        | 11.7                    | 0.000          | 16                               | -0.09                   |
|                                | SNP0094        | 6.7                     | 0.009          | 9                                | 0.07                    |
|                                | SNP0137        | 6.9                     | 0.008          | 10                               | 0.07                    |
|                                | SNP0157        | 5.1                     | 0.024          | 7                                | 0.06                    |
|                                | SNP0167        | 7.7                     | 0.021          | 11                               | 0.02                    |
|                                | SNP0375        | 5.7                     | 0.016          | 8                                | -0.07                   |
|                                | SNP0524        | 5.4                     | 0.019          | 8                                | -0.06                   |
|                                | SNP0657        | 6.1                     | 0.046          | 9                                | -0.03                   |
|                                | SNP0658        | 5.2                     | 0.022          | 7                                | 0.06                    |
|                                | SNP0662        | 5.2                     | 0.022          | 7                                | -0.06                   |
|                                | SNP0692        | 4.7                     | 0.029          | 7                                | 0.06                    |
|                                | SNP0723        | 11.6                    | 0.003          | 16                               | 0                       |
|                                | SNP0799        | 4.8                     | 0.028          | 7                                | -0.06                   |
|                                | SNP0818        | 4.2                     | 0.041          | 6                                | 0.06                    |
|                                | SNP1167        | 6.9                     | 0.008          | 10                               | 0.07                    |
|                                | SNP1183        | 5.2                     | 0.022          | 7                                | 0.06                    |
|                                | SNP1392        | 4.5                     | 0.034          | 6                                | -0.06                   |

时与体质量、食物转化率显著相关;与体厚、食物转化率同时显著相关的标记数最少,为 5 个。经 SPSS11.5 软件包计算得到体厚和体质量间的相关性最大( $r=0.896$ ),而同时与这 2 个性状显著相关的标记数也最多。

表 4 与鲤体厚、体质量、食物转化率相关的标记  
Tab.4 Markers significantly related with body thickness, body weight and feed conversion ratio

| 标记<br>marker | 性状 trait                  |                    |                                     |
|--------------|---------------------------|--------------------|-------------------------------------|
|              | 体厚<br>body thick-<br>ness | 体质量<br>body weight | 食物转化率<br>feed conver-<br>sion ratio |
| HLJ057       | *                         | *                  |                                     |
| HLJ076       | *                         | *                  |                                     |
| HLJ190       | *                         | *                  |                                     |
| HLJ401       | *                         | *                  |                                     |
| HLJ697       | *                         | *                  |                                     |
| HLJ1042      |                           | *                  | *                                   |
| HLJE253      |                           | *                  | *                                   |
| SNP0041      | *                         | *                  | *                                   |
| SNP0044      | *                         | *                  | *                                   |
| SNP0094      | *                         | *                  | *                                   |
| SNP0137      | *                         | *                  | *                                   |
| SNP0138      | *                         | *                  |                                     |
| SNP0153      | *                         | *                  |                                     |
| SNP0167      |                           | *                  | *                                   |
| SNP0178      | *                         | *                  |                                     |
| SNP0375      | *                         |                    | *                                   |
| SNP0530      | *                         | *                  |                                     |
| SNP0674      | *                         | *                  |                                     |
| SNP1167      | *                         |                    | *                                   |

注: \*代表标记与相应性状显著相关( $P<0.05$ ).  
Note: \*donates the marker significantly correlates with corresponding trait( $P<0.05$ ).

2.5 Blast 比对结果

将 HLJE14、HLJE253、HLJE398 标记的核酸序列在美国国家生物技术信息中心(NCBI)的核酸库和蛋白库中分别检索发现,HLJE253 标记与斑马鱼基因组中编码 ORF2(开放阅读框)结构蛋白的核酸序列同源,相似程度达到 61%。将分别与体厚、体质量、食物转化率显著相关( $P<0.05$ )的 SNP 标记在 NCBI 核酸库和蛋白库中分别检索<sup>[25-26]</sup>,发现有 22 个 SNP 找到相关基因而且有相应功能注释(表 5)。有 15 个 SNP 序列在斑马鱼

基因中找到相关注释,均是与功能性蛋白或酶的基因相关。SNP0500、SNP0556、SNP0217、SNP0003 与斑马鱼 60s 核糖体蛋白 L 家族的基因相关。SNP0760、SNP1425、SNP0723 分别与编码鲤肌红蛋白 2 亚型、型性激素结合球蛋白和 a-2-巨球蛋白-2 的基因相关。

3 讨论

3.1 实验群体的构建

本研究  $F_0$ (祖父母本)为早期被国家原种和良种审定委员会鉴定为良种的镜鲤选育系的后代,经微卫星分子标记检测遗传差异,繁育产生  $F_1$ 。 $F_1$  经 2 个冬季强化培育达 2 龄成熟后,自交产生  $F_2$ ,将  $F_2$  作为本研究实验群体。由于  $F_0$  并不是纯合的,所以  $F_2$  杂合度较高,个体间差异较大,群体在短期内建成,且存在很强的连锁不平衡性,所以能检测到更多分布很广的标记<sup>[27]</sup>。选取符合 1:1、1:2:1 分离的标记分别与鲤食物转化率、体厚、体质量 3 个性状进行单标记回归分析。

鲤的基因组存在着广泛的基因复制现象<sup>[28]</sup>。David 等<sup>[29]</sup>研究发现,远缘杂交的  $F_1$  个体中,34% 座位出现了 3 个以上的等位基因;张研等<sup>[17]</sup>发现,远缘杂交的  $F_1$  个体中,47.83% 座位出现了 3 个以上的等位基因。因此远缘杂交的  $F_1$  鲤群体难以成为理想的实验群体。同时,鲤的远缘杂交使得  $F_1$  个体间表现出高度杂合性,部分个体之间的基因组信息差异较大,在每个位点上一般都可以产生来自于双亲的 4 个不同的等位基因<sup>[27]</sup>。本研究利用 SSR 对  $F_1$  个体的基因组进行扫描,筛选出在每个位点上具有 2 个等位基因并且遗传差异较大的雌雄个体,作为构建  $F_2$  的父母本。这样不仅避免了由于基因复制而产生的复杂的分离模式,同时又得到了具有较高杂合度的实验群体。

3.2 性状与标记相关分析

本研究用 SPSS11.5 软件对 3 种性状作了两两相关性检验(表 2)。相关系数( $r$ )是用来表示 2 个变量间相关性密切程度的参数。其绝对值愈接近 1,两个变量间的相关愈密切;愈接近 0,相关愈不密切。本研究中体质量和体厚相关系数最大, $r$  为

表 5 SNP 序列 Blast 结果  
Tab.5 Blast results of SNP sequence

| SNP 标记<br>SNP marker | 相似序列号<br>similar number | 相似度/%<br>identity | E 值<br>E value | 相关功能<br>function                                                           |
|----------------------|-------------------------|-------------------|----------------|----------------------------------------------------------------------------|
| SNP0065              | XP 002815875.1          | 70                | 1e-07          | 半茎脱氢酶 semialdehyde dehydrogenase(Zebrafish)                                |
| SNP0027              | AAI17651.1              | 75                | 1e-07          | 通讯蛋白(斑马鱼) communication protein(Zebrafish)                                 |
| SNP0066              | NP997889.1              | 90                | 0.004          | a-半茎脱氢酶(斑马鱼) a-semialdehyde dehydrogenase (zebrafish)                      |
| SNP0094              | CAF91864.1              | 94                | 0.16           | 无名蛋白(黑青斑河豚)unnamed protein( <i>Tetraodon nigroviridis</i> )                |
| SNP0137              | AAH67638.1              | 88                | 9.0            | Agxt 蛋白(斑马鱼) agxt protein(zebrafish)                                       |
| SNP0138              | AAH45504.1              | 100               | 5e-08          | Tpm1 蛋白(斑马鱼) Tpm1 protein (zebrafish)                                      |
| SNP0178              | NP 957228.2             | 100               | 5e-08          | 原肌球蛋白 a1 链(斑马鱼) a1-tropomyosin(zebrafish)                                  |
| SNP0375              | ACI69350.1              | 78                | 0.62           | 卵母细胞延长因子 1-a(大西洋鲑) oocyte elongation factor 1-a( <i>Salmo salar</i> )      |
| SNP0500              | NP 775340.1             | 92                | 5e-12          | 60s 核糖体蛋白 L35(斑马鱼) 60s ribosomal protein L35(zebrafish)                    |
| SNP0556              | NP 001001590.1          | 100               | 2e-07          | 60s 核糖体蛋白 L3(斑马鱼) 60s ribosomal protein L3(zebrafish)                      |
| SNP0594              | NP 001003446.1          | 85                | 0.019          | 胰腺羧肽酶 A2(斑马鱼) pancreatic carboxypeptidase A2(zebrafish)                    |
| SNP0760              | ABC69306.1              | 100               | 2e-06          | 肌红蛋白 2 亚型(鲤) myoglobin 2( <i>Cyprinus carpio</i> )                         |
| SNP1207              | XP 416535.2             | 90                | 5e-04          | 假定蛋白 conserved hypothetical protein( <i>Gallus gallus</i> )                |
| SNP1425              | BAE48781.1              | 96                | 8e-06          | II 型性激素结合球蛋白 sex hormone-binding globulin II (鲤)( <i>Cyprinus carpio</i> ) |
| SNP0167              | AAI54035.1              | 94                | 3e-07          | Apoeb 蛋白 Apoeb protein(斑马鱼)(zebrafish)                                     |
| SNP0217              | NP 001038800.1          | 100               | 0.004          | 核糖体蛋白 L22-1(斑马鱼) ribosomal protein L22-1(zebrafish)                        |
| SNP0533              | AAI65224.1              | 85                | 1e-11          | ProC 蛋白(斑马鱼) ProC protein(zebrafish)                                       |
| SNP0675              | NP 001002367.1          | 95                | 3e-09          | 线粒体载体蛋白(斑马鱼) mitochondrial carrier protein (zebrafish)                     |
| SNP0789              | NP 571591.1             | 100               | 2e-07          | 小清蛋白(斑马鱼) parvalbumin (zebrafish)                                          |
| SNP0003              | NP 001002106.1          | 91                | 9e-05          | 核糖体蛋白 L5(斑马鱼) ribosomal protein L5 (zebrafish)                             |
| SNP0723              | BAA85039.1              | 95                | 6e-09          | a-2-巨球蛋白-2(鲤) a-2-macroglobulin( <i>Cyprinus carpio</i> )                  |
| SNP0818              | ACO51161.1              | 92                | 1e-06          | 受精壁蛋白(鲮) fertilization wall protein( <i>Aristichthys nobilis</i> )         |

0.896, 体厚和食物转化率相关性最小,  $r$  为 0.398。Windows Map Manager2.0 软件分析结果(表 4)显示, SNP0041、SNP0044、SNP0137 这 3 个标记与 3 个性状均显著相关( $P<0.05$ ), HLJ057 等 8 个标记与其中 2 个性状显著相关( $P<0.05$ ), 12 个标记与其中 1 种性状显著相关( $P<0.05$ )。体厚与体质量相关系数最大, 同时与这 2 性状显著相关的标记也最多(14 个); 而体厚与食物转化率相关性最小, 同时与二者显著相关的标记也最少(6 个)。同一个标记与多种性状显著相关, 证明这些基因可以控制多种性状即一因多效。

3.3 标记与性状连锁分析

标记-性状连锁分析是根据标记位点的基因型以及数量性状的表型对个体进行显著性检验,

差异显著则说明标记与数量性状存在相关性。其遗传基础是该标记与控制性状的 QTL 或主效基因连锁。

本研究应用 Windows Map Manager2.0 软件中的单标记回归分析方法, 得到 27 个与鲤的食物转化率性状相关、35 个与体厚性状相关、27 个与体质量性状相关的标记。将这些与该 3 种性状连锁的遗传标记同鲤遗传连锁图进行比较, 结果显示, 与食物转化率相关的标记分别位于 6 个连锁群上, 12 个 QTLs 区间内, 其他 2 种性状也存在同样现象, 说明几个标记同时与 1 个性状相关, 这些位点存在多因一效的现象, 从而进一步证明食物转化率、体厚、体质量性状是由多基因控制的数量性状。由于还没有其他鲤控制食物转化率的 QTL

定位结果进行比较, 本研所得遗传标记结果还有待进一步的分析和验证, 这些标记也可以通过鲤的标记辅助育种进行进一步的功能验证。顾颖等<sup>[27]</sup>利用 EST-SSR 标记对鲤拟测交群体的体厚性状进行 QTL 检测, 并得到了 12 个与鲤体厚性状相关的 EST 标记。本实验采用的标记是其研究中未使用的, 所得结果丰富了与鲤体质量、体厚性状相关的标记数量。

### 3.4 EST、SNP 标记的 BLAST 结果分析

EST、SNP 是功能性标记, 大多直接与基因相连或本身就是基因的一部分, 序列保守性强, 便于在家系间和物种间进行比较基因组研究<sup>[30]</sup>。本研究找到并加以注释的 EST、SNP 等标记中有 18 个 SNP 序列与斑马鱼基因中控制功能性蛋白或酶的基因相关。其中 SNP0500、SNP0556、SNP0217、SNP0003 与斑马鱼 60s 核糖体蛋白 L 家族的基因相关。SNP0760、SNP1425、SNP0723 分别与编码鲤肌红蛋白 2 亚型、型性激素结合球蛋白、a-2-巨球蛋白-2 的基因相关, 可以作为分子标记辅助育种的参考标记。

### 参考文献:

- [1] Chistiakov D A, Hellemans B, Haley C S, et al. A Microsatellite linkage map of European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. [J]. Genetics, 2005, 170:1821-1826.
- [2] Coimbra M R M, Kobayashi K, Koretsugu S, et al. A genetic linkage map of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. Aquaculture, 2003, 220:203-218.
- [3] Gilbey J, Verspoor E, Mclay A, et al. A microsatellite linkage map for Atlantic salmon (*Salmon salar*) [J]. Anim Genet, 2004, 35:98-105.
- [4] Inami M, Hatanaka A, Mitsuboshi T, et al. Microsatellite linkage map of red sea bream (*Pagrus major*) and mapping of QTL markers associated with resistance to Red Sea Bream Iridovirus (RSIV) [C]. Plant & Animal Genomes XII Conference, 2005.
- [5] Nichols K M, Wheeler P A, Thorgaard G H. Quantitative trait loci analyses for meristic traits in *Oncorhynchus mykiss* [J]. Environ Biol Fish, 2004, 69:317-331.
- [6] 汪桂玲, 袁一鸣, 李家乐. 中国五大湖三角帆蚌群体遗传多样性及亲缘关系的 SSR 分析[J]. 水产学报, 2007, 31(2): 152-158.
- [7] 孙昭宁, 刘萍, 李健, 等. 微卫星 DNA 标记用于中国对虾亲子关系的鉴定[J]. 海洋水产研究, 2007, 28(3):8-14.
- [8] 闫晗, 侯林, 毕相东, 等. 扩增仿刺参 SSR 和 ISSR 指纹技术的初步研究[J]. 海洋湖沼通报, 2006(1): 68-74.
- [9] Naruse K, Tanaka M, Mita K, et al. A medaka gene map: The trace of ancestral vertebrate protochromosomes revealed by comparative gene mapping [J]. Genome Res, 2004, 14: 820-828.
- [10] Varshney R K, Craner A, Sorrells M E. Genie microsatellite markers in plants: features and applications [J]. Trends Biotechnol, 2005, 23(1): 48-55.
- [11] Li S S, Jia J Z, Wei X Y, et al. A intervarietal genetic map and QTL analysis for yield traits in wheat [J]. Mol Breed, 2007, 20(2): 167-178.
- [12] Sledge M, Ray I, Mian M. EST-SSRs for genetic mapping in Alfalfa [J]. Mol Breed Forage Turf, 2006, 11: 239-243.
- [13] Han Z G, Wang C B, Song X L, et al. Characteristics, development and mapping of *Gossypium hirsutum* derived EST-SSRs in allotetraploid cotton [J]. TAG Theor Appl Genet, 2005, 112(3): 430-439.
- [14] Gupta P K, Rustgi S, Sharma S, et al. Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat [J]. Mol Genet Genom, 2004, 270(4): 315-323.
- [15] Yu J K, La Rota M, Kantety R V, et al. EST derived SSR markers for comparative mapping in wheat and rice [J]. Mol Genet Genom, 2004, 271(6): 742-751.
- [16] Gibum Y, Je M L, Sanghyeob L, et al. Exploitation of pepper EST-SSRs and SSR-based linkage map [J]. Theor Appl Genet, 2006, 114: 113-130.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] Bergot P, Blanc J, Escaffre A. Relationship between number of pyloric caeca and growth in rainbow trout [J]. Aquaculture, 1981, 22: 81-96.
- [20] Zimmerman A M, Wheeler P A, Ristow S S, et al. Composite interval mapping reveals three QTL associated with pyloric caeca number in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. Aquaculture, 2005, 247: 85-95.
- [21] Sherman E L, Nkrumah J D, Murdoch B M, et al. Identifi-

- cation of polymorphisms influencing feed intake and efficiency in beef cattle [J]. Anim Genet, 2007, 39: 225–231.
- [22] 伍献文. 中国鲤科鱼类志[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1964.
- [23] Dragos-Wendrich M, Stratil A, Hojny J, et al. Linkage and QTL mapping for *Sus scrofa* chromosome 18 [J]. Anim Breed Genet, 2003, 120(s1): 138–143.
- [24] 马斌荣. SPSS for Windows Ver.11.5 在医学统计中的应用[M]. 第3版. 北京: 北京科学出版社, 2005.
- [25] Wright J M, Bentzen P. Microsatellites: genetic markers for the future[J]. Rev Fish Biol Fish, 1994, 4(3): 384–388.
- [26] Sherman E L, Nkrumah J D, Murdoch B M, et al. Identification of polymorphisms influencing feed intake and efficiency in beef cattle [J]. Anim Genet, 2007, 39: 225–231.
- [27] 顾颖, 曹顶臣, 孙效文, 等. 鲤与生长性状相关的 EST-SSR 标记筛选[J]. 中国水产科学, 2009, 16(1): 15–22.
- [28] Zhang Y, Liang L Q, Jiang P, et al. Genome evolution of common carp (*Cyprinus carpio*) as revealed by the analysis of microsatellite loci in a gynogenetic family [J]. J Genet Genom, 2008, 35: 97–103.
- [29] David L, Blum S, Feldman M W, et al. Recent duplication of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) genome as revealed by analyses of microsatellite loci [J]. Mol Biol Evol, 2003, 20(9): 1425–1434.
- [30] 刘云国. 水产生物 DNA 分子标记技术[M]. 北京: 科学出版社, 2008.

## Analysis of feed conversion ratio, bodyweight, body thickness traits of common carp (*Cyprinus carpio* L.) using SSR, EST-SSR, SNP markers

WANG Xuanpeng<sup>1,2</sup>, ZHANG Xiaofeng<sup>1</sup>, LI Wensheng<sup>1,2</sup>, ZHANG Tianqi<sup>1,3</sup>, SUN Xiaowen<sup>1</sup>

1. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. College of Aqua-life Science and Technology, Dalian Fisheries University, Dalian 1160023, China

**Abstract:** An F<sub>2</sub> hybrid common carp gynogenetic line including 68 individuals was used as mapping panel. Markers were used to make marker regression analysis based on pseudo-testcross strategy using Windows Map Manager2.0. Ninety-one SSR markers and 33 EST makers and 364 SNP markers were selected to analyze the genomic DNA of 68 progenies derived from common carp full-sib family. Twenty-seven loci were discovered that had significant impact on feed conversion efficiency and thirty-five loci were significantly related with body thickness ( $P < 0.05$ ), while twenty seven loci had significant impact on body weight ( $P < 0.05$ ). SNP0041 and SNP0044 were related with feed conversion ratio significantly ( $P < 0.01$ ), contributing to 15% and 16%, respectively. These markers can be used as molecular marker assisting breeding. Markers were used to screen the protein and nucleotide database in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) in order to find the homologies. Blasting results showed that HLJ253 is highly correlated (61%) with the gene encoding structural protein (ORF2) of zebrafish. SNP makers associated with three traits were sequenced on NCBI in order to find related genes and possible functions.

**Key words:** *Cyprinus carpio* L.; EST-SSR; SNP; feed conversion ratio; body thickness; body weight

**Corresponding author:** SUN Xiaowen. Tel: 0451-84862646; E-mail: sunxw2002@163.com