

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00801

鲤改良品系与体质量、体长性状相关的 TRAP 标记筛选

董在杰^{1,2,3}, 曲疆奇³, 袁新华^{2,3}, 苏胜彦², 谢庄¹

1. 南京农业大学 动物科技学院, 江苏 南京 210095;

2. 中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心, 农业部淡水鱼类遗传育种和养殖生物学重点开放实验室, 江苏 无锡 214081;

3. 南京农业大学 无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081

摘要: 应用 TRAP 标记对一个鲤(*Cyprinus carpio*)改良品系 72 个个体进行扩增, 采用其中 25 个多态性较好引物组合用于该群体遗传多样性分析。运用卡方检验分析 25 对引物在体质量差异显著的 2 组鱼中频率差异显著的位点, 初步筛选出与体质量和体长性状相关的 TRAP 标记。将初步筛选的 TRAP 标记用于随机群体 132 个个体进行位点性状间的关联分析。结果表明, 25 个 TRAP 分子标记共扩增出 353 个位点, 其中多态性位点 230 个, 平均多态性比率 65%, 平均多态性信息含量为 0.28, Nei's 遗传多样性指数平均值为 0.219, Shannon 信息指数平均值为 0.329, 表明该群体遗传多样性较为丰富。在初步筛选出的 3 个 TRAP 位点(*gh1Trap04-140*、*4rTrap04-308*、*igf4Ga5-135*)中, *4rTrap04-308* 与体质量、体长呈极显著相关($P<0.01$)。本研究利用 TRAP 这一新型分子标记对 1 个鲤改良群体进行遗传分析, 并寻找出 1 个可能与鲤体质量、体长性状相关的功能基因位点, 旨在为鲤体质量、体长性状的 QTL 定位和分子标记辅助育种奠定基础。

关键词: 鲤; TRAP 标记; 遗传多样性; 体质量; 体长; 关联分析

中图分类号: S917; Q953

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)04-0801-08

鲤(*Cyprinus carpio*)是世界上养殖范围最广的重要经济鱼类, 在中国的淡水渔业生产中也占据着重要地位。中国鲤品种(品系)众多, 有着丰富的遗传资源。建鲤(*C. carpio* var. *jian*)是中国第一个人工培育的养殖鱼类优良品种, 它具有遗传性状稳定, 抗病力强, 适应性强, 易起捕等特点^[1-2]。黄河鲤(*C. carpio haematopterus* Temminck et Schlegel)同松江鲈鱼(*Trachidermus fasciatus* Heckel)、兴凯湖白鱼(*Erythroculter ilishaeformis*)、松花江鲑鱼(*Oncorhynchus keta*)被共誉为中国四大名鱼, 是中国北方黄河水系鲤的著名地方品种, 具有抗寒力强, 饲料转化率高, 易起捕等优点, 与建鲤的原始亲本荷包红鲤(*C. carpio* var. *wu-*

yuanensis)和元江鲤(*C. carpio yuankiang*)分属差异较大的地方品系^[3]。本实验室以建鲤和黄河鲤为选育的基础群体, 采用完全双列杂交的方法, 在 PIT(passive integrated transponder)标记的辅助下开展家系选育。根据 BLUP 法设计适宜的模式, 按估算育种值的大小和鱼的家系背景挑选下一代鱼的亲本进行配对繁殖, 建立下一代家系。经过连续 3 代的家系选育, 得到性状优良、遗传较稳定的鲤改良品系(*C. carpio* spp.), 具备新品种推广的潜质。

体质量和体长等生长性状是鲤良种培育的最直接目的性状, 这些性状是受微效多基因控制和环境因素影响的数量性状^[4], 寻找与这些性状紧

收稿日期: 2010-12-28; 修订日期: 2011-02-21.

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目专题(2006BAD01A1208); 现代农业产业技术体系建设专项资金项目(nycytx-49); 农业部淡水鱼类遗传育种和养殖生物学重点开放实验室开放课题(BZ2009 -06).

作者简介: 董在杰(1967-), 男, 研究员. 研究方向为鱼类遗传与育种. E-mail: dongzj@ffrc.cn

密连锁的分子标记进行辅助选择,可能大幅度提高选择效率,缩短育种年限^[5]。虽然鲤的第一个遗传连锁图谱已有报道^[6],但该连锁图谱密度不高,所含标记数目较少。因此,要构建高密度的鲤遗传连锁图,达到可以进行数量性状位点定位的目的,还必须继续开发大量分子遗传标记。

目标区域扩增多态性(target region amplified polymorphism, TRAP)亦称靶位区域扩增多样性,是由美国农业部北方作物科学实验室 Hu 和 Vick 开发的一种基于 PCR 的新型分子标记技术^[7],迄今该标记技术主要应用于植物的遗传图谱构建、重要农艺性状分子标记筛选和标记辅助选择育种中^[8-9]。与以往的标记技术如 RAPD、AFLP、SRAP 等无须任何序列信息即可直接 PCR 扩增不同,TRAP 技术所用固定引物(fixed primer)是依据生物信息学数据库中的 EST 或 cDNA 序列设计而来,通过对目标区域 PCR 扩增,产生围绕目标候选基因序列的多态性标记,因而利用 TRAP 技术对鱼类重要性状进行分子标记具有潜在优势。目前 NCBI 上有大量的鲤原始 EST 序列数据,这为鲤 TRAP 标记的开发提供了一个巨大而有价值的来源。

GH 基因、*GHR* 基因和 *IGF* 基因作为生长激素轴的重要因子,对调节动物生长起着至关重要的作用^[10]。在硬骨鱼类中,*GH* 不仅具有促生长作用,还有调节渗透压和维持体内电解液平衡的功能^[11]。在畜禽上,已经有许多研究证明 *GH*、*GHR* 和 *IGF* 基因的多态性与一些生产性状具有相关性^[12],但相关研究在淡水鱼类上迄今未见报道。目前 TRAP 标记在动物上的应用研究也只局限于草鱼、鲤反应体系的建立上^[13-14]。因此,本研究利用鲤 *GH*、*GHR* 和 *IGF* 基因序列信息设计 TRAP 固定引物,开发 TRAP 这一新型分子标记,旨在寻找与鲤体质量、体长性状相关联的 TRAP 标记,为鲤分子辅助育种提供一种新的标记选择。

1 材料与方法

1.1 实验鱼群体

实验鱼为鲤改良品系 F_4 ,取自中国水产科学

研究院淡水渔业研究中心宜兴实验基地。2008 年 4 月繁育鲤改良品系 F_4 ,鱼苗养至体质量 10 g 左右,用 PIT 标记后于同一池塘继续养殖。2009 年 11 月 25 日随机选取 72 尾鱼用于引物筛选,并分析鲤群体遗传多样性;2009 年 12 月 16 日,对总共 2 926 尾鱼的体质量、体长、体高等生长参数进行测量。将体质量平均值+2×标准差的高值个体即体质量为 1 050 g 以上的记为“体质量大群体”,体质量平均值-2×标准差的低值个体即体质量为 450 g 以下的记为“体质量小群体”,从这个极端群体中各随机选择 12 尾鱼用于与生长性状相关 TRAP 标记的初步筛选。另从相同鱼塘中随机选择 132 尾鱼记为“随机群体”,将初步筛选出的差异显著的标记在随机群体中进行性状关联分析。

1.2 引物设计

依据 Hu 和 Vick^[7]引物设计原则,选择鲤 *GHR* (GenBank, AY741100.1)、*GH* (GenBank, M27000.1)和 *IGF* (GenBank, D83272.1)的 cDNA 序列,将这些基因序列调入 PCR 引物设计软件 (Primer3),根据软件提示,分别设置引物最适、最大和最小长度为 18、20 和 16 个碱基;引物最适、最大和最小退火温度(T_m)为 53℃、55℃和 50℃,将软件中产生的引物作为固定引物(表 1);随机引物针对外显子或内含子中富含 GC 或 AT 核心区的任意序列设计,本实验 TRAP 随机引物(表 1)依据 Hu^[15]的文献设计合成。引物由南京力生生物技术有限公司合成。

1.3 基因组 DNA 的提取和纯化

剪取新鲜尾鳍,参照 Promega 基因组试剂盒说明进行 DNA 提取并检测 DNA 的质量和浓度,-20℃冰箱中保存备用。

1.4 PCR 扩增和产物检测

扩增反应在 Takara 梯度 PCR 扩增仪上进行,采用本实验室优化确立的鲤 TRAP 反应体系和扩增参数^[14]。扩增产物在 100 V 电压下 8%聚丙烯酰胺凝胶电泳 3 h,用 GoldView 染料(上海赛百盛生物科技有限公司)染色 15 min,在 UVP 凝胶成像系统照相并保存。

表 1 实验所用引物的序列
Tab.1 Sequences of ten fixed primers and four arbitrary primers used in the current study

引物 primer	序列 (5'-3') sequence (5'-3')
2f	AGTGATTCACACCAGCA
4f	CATCCCTGATCTTGGTTT
4r	TCAGTTGTCCGGTGAAA
固定引物 fixed primer	gh1 GGCCGACTTGAAAATG
	gh2 AGCCAGCAGACGAAAAG
	gh3 GCCGACTTGAAAATGG
	gh4 AGCCAGCAGACGAAAAG
	igf2 GCCAAATTCCAGCAAC
	igf3 ACCATGCGCTGTCTCT
	igf4 AAAAGCCCTGTCTCC
随机引物 arbitrary primer	Ga5-800 GGAACCAAACACATGAAGA
	Sa12-700 TTCTAGGTAATCCAACAACA
	Trap04-700 CGTAGTGATCGAATTCTG
	Trap13-800 GCGCGATGATAAATTATC

1.5 统计分析

1.5.1 遗传多样性分析 TRAP 为显性标记, 电泳条带按 1/0 形式进行数据转换, 清晰可辨的 100 ~ 800 bp 的电泳条带用于统计分析。有带赋值为“1”, 无带、弱带均赋值为“0”^[16]。利用 PopGen32 计算多态性条带数、多态性比率、Nei 遗传多样性指数和 Shannon 信息指数。多态性信息量 (polymorphism information content, PIC)^[17] $PIC = 1 - \sum f_i^2$, 是指一个标记可检测的等位基因数及其分布频率, 其中 f_i 为单个位点上的等位基因的频率^[18]。

1.5.2 TRAP 标记与性状间的关联分析 本实验借鉴樊佳佳等^[19]筛选与生长性状相关标记的研究方法, 即先寻找极端群体中基因型分布差异显著的多态标记, 然后将这些差异显著的标记在随机群体中进行关联分析, 验证其有效性。

先统计每个位点出现条带的个体数, 得出该位点在体质量大和体质量小群体中出现的频率,

运用 SPSS15.0 软件进行 χ^2 检验, 初步筛选出与鲤质量、体长性状相关的 TRAP 标记。然后利用 SAS9.1 软件 GLM 过程进行最小二乘方差分析, 将初步筛选的 TRAP 标记位点与鲤体质量、体长性状进行连锁显著性检验。最小二乘分析的数学模型为: $Y_{ij} = \mu + g_i + e_{ij}$, 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); g_i 为第 i 个标记的效应值; e_{ij} 为随机误差。

2 结果与分析

2.1 鲤群体的性状分布特征

单因素方差(one-way ANOVA)分析表明, 本实验中体质量大群体平均体质量为(1 161.33±49.89)g, 体质量小群体平均体质量为(348.42±41.73)g, 两组体质量差异极显著($P<0.001$)。该分析过程由 SAS9.1 计算完成。

随机群体的性状分布特征检验是在 SPSS15.0 中完成。所有测量的性状都显示出这些与生长相关的性状都是典型的数量性状或者多基因遗传。表型性状的频率分布是否显著偏离正态分布通过 Shapiro-Willk 检验, 结果见表 2。

2.2 鲤群体的遗传多样性分析

利用 40 对 TRAP 引物组合(10 条固定引物和 4 条随机引物的组合)对鲤改良品系 72 个个体进行扩增, 其中 25 对引物组合(表 3)的扩增条带清晰且易于识别, 多态性好, 片段大小在 100~800 bp 之间(图 1), 这些引物组合可用于分析鲤群体遗传多样性。

从表 3 可以看出, 25 对 TRAP 引物组合在鲤改良群体中共扩增出 353 个位点, 每引物组合产生的位点数在 10~21 个之间, 平均扩增 14.1 个。多态性位点 230 个, 每引物组合扩增出多态性条带数在 5~18 个之间, 平均扩增 9.2 个。不同引物

表 2 鲤的体质量和体长性状正态分布检验
Tab. 2 Normal distribution test for body weight and length

指标 index	$\bar{x} \pm SD(n=132)$	最大值 Max.	最小值 Min.	偏度 skewness	峰度 Kurtosis	P
体质量/g body weight	718.18 ± 22.21	1265.00	289.00	0.065	-0.945	0.022
体长/mm body length	301.52 ± 3.52	393.00	222.00	-0.166	-0.952	0.037

组合产生的多态性条带比例为 46.67%~85.71%，平均为 65%。不同引物组合产生的多态信息量 (PIC)介于 0.23~0.33 之间，平均为 0.28。Nei 遗传多样性指数和 Shannon 信息指数是度量遗传多样性水平的常用指标。本研究鲤群体的 Nei 遗传多样性指数平均值为 0.219，Shannon 信息指数平均值为 0.329。

2.3 与鲤体质量、体长性状关联的 TRAP 位点的初步筛选

将筛选出的 25 对引物在体质量大群体和体质量小群体中进行扩增，获得所有标记中，经 χ^2 检验，有 3 个标记在大小两组群体间表现出明显的频率差异。

在出现显著差异的标记位点中，位点 *4rTrap04-308* 在体质量小群体出现的频率显著高于在体质量大群体出现的频率($P<0.05$)，而 *gh1Trap04-140* 和 *igf4Ga5-135* 位点在体质量大群体出现的频率显著高于在体质量小群体出现的频率($P<0.05$ 或 $P<0.01$)(表 4)，将这 3 个差异显著标记用于下一步随机群体中，验证其有效性。

2.4 与鲤体质量、体长关联的 TRAP 位点的验证

将上述初步筛选的 TRAP 位点与随机群体 132 尾鲤鱼体质量、体长性状进行连锁显著性检验，结果发现在 3 个标记位点中，只有 *4rTrap04-308* 与体质量、体长呈极显著相关($P<0.01$)(图 2)。而 *gh1Trap04-140* 和 *igf4Ga5-135* 对体质量、体

表 3 25 对 TRAP 引物组合的扩增效率
Tab.3 Amplification efficiency of 25 TRAP primer combinations

引物组合 primer combination	扩增条带数 bands observed	多态性条带数 polymorphic bands	多态性比率/% polymorphism percentage	多态信息含量 PIC	Nei 遗传多 样性指数 Nei's gene diversity	Shannon 信息指数 Shannon's index
2f+Ga5-800	21	18	85.71	0.31	0.336	0.488
2f+Sa12-700	17	11	64.71	0.24	0.193	0.289
4f+Ga5-800	13	11	84.62	0.29	0.304	0.457
4f+Trap04-700	10	5	50.00	0.25	0.169	0.256
4f + Trap13-800	10	5	50.00	0.25	0.099	0.174
4r + Ga5-800	14	11	78.57	0.27	0.264	0.398
4r + Sa12-700	10	5	50.00	0.29	0.182	0.273
4r + Trap04-700	12	7	58.33	0.30	0.213	0.320
gh1 + Ga5-800	13	7	53.85	0.28	0.194	0.286
gh1 + Trap04-700	15	7	46.67	0.30	0.175	0.260
gh2 + Ga5-800	15	7	46.67	0.31	0.185	0.271
gh2 + Trap04-700	12	8	66.67	0.30	0.255	0.374
gh2 + Trap13-800	16	11	68.75	0.27	0.229	0.349
gh3 + Ga5-800	17	13	76.47	0.31	0.303	0.442
gh3 + Trap04-700	14	10	66.67	0.29	0.238	0.356
gh3 + Trap13-800	12	8	66.67	0.23	0.192	0.294
gh4 + Ga5-800	13	8	61.54	0.33	0.259	0.375
gh4 + Trap13-800	17	13	76.47	0.28	0.267	0.402
gh4 + Trap04-700	19	16	84.21	0.31	0.334	0.484
igf2 + Ga5-800	13	6	46.15	0.25	0.140	0.216
igf2 + Trap13-800	15	11	73.33	0.23	0.205	0.321
igf3 + Ga5-800	12	8	66.67	0.26	0.208	0.318
igf3 + Trap13-800	16	8	50.00	0.25	0.157	0.239
igf4 + Ga5-800	15	10	66.67	0.27	0.223	0.339
igf4 + Trap13-800	12	6	50.00	0.33	0.161	0.247
总计 total	353	230				
平均 average	14.12	9.2	0.65	0.28	0.219	0.329

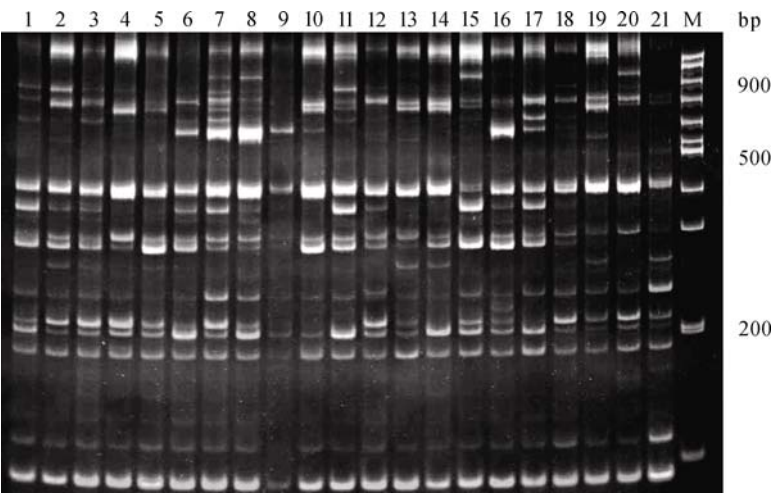


图 1 引物 4f + Ga5-800 的 PCR 扩增部分结果

M: 分子量标记; 1-21: 21 尾鲤鱼个体.

Fig.1 A portion of PCR result produced by the primer 4f + Ga5-800
M: DNA marker ladder; 1-21: simpling individuals.

表 4 在鲤体质量大群体和体质量小群体中出现显著频率差异的位点特征

Tab.4 Characters of loci showing significant differences in frequency between large and small body weight groups of common carp

引物组合 primer combination	位点/bp locus	出现频率 frequency		χ^2	P
		体质量小组	体质量大组		
		small body weight	large body weight		
4r + Trap04-700	308	0.583	0.083	6.750	0.027
gh1 + Trap04-700	140	0.083	0.667	8.711	0.009
igf4 + Ga5-800	135	0.167	0.750	8.224	0.012

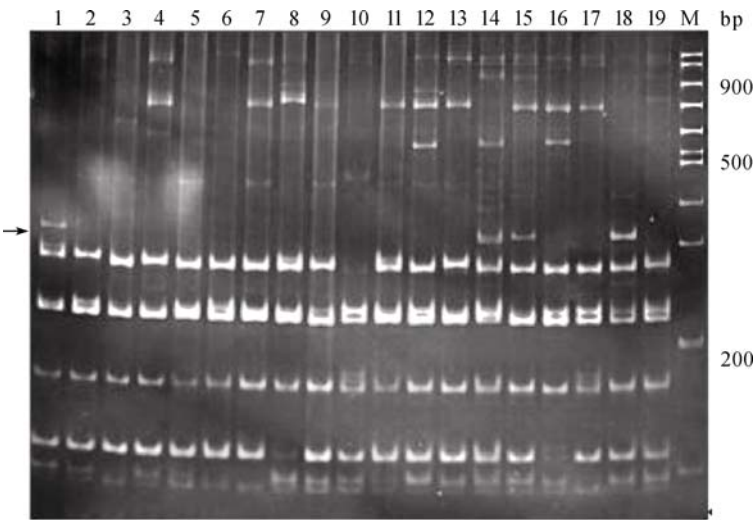


图 2 引物 4r+Trap04-700 的 PCR 扩增部分结果

M: 分子量标记; 1-19: 19 尾鲤鱼样本; 箭头示不同体质量不同体长鱼样本的差异异常.

Fig.2 A portion of PCR result produced by the primer 4r+Trap04-700
M: DNA marker ladder; 1-19: 19 individuals of samples; arrow shows different band in the fish with different body weight and body length.

长均没有显著贡献($P>0.05$)。

3 讨论

3.1 鲤的遗传多样性

本研究 25 对多态性较好引物组合在鲤改良品系群体中共扩增出 353 个位点, 其中多态性位点 230 个, 平均多态位点比例为 65%, 说明 TRAP 标记检测效率较高, 适合鲤的遗传多样性研究。

Alwala 等^[20]研究表明, TRAP 分子标记技术在遗传多样性研究方面与 AFLP 标记具有相似性, 两者的遗传参数可进行比较。Nei's 遗传多样性指数又称遗传杂合度, 它反映了群体遗传结构变异程度高低, 是度量群体遗传变异的一个较为合适的参数^[21]。钟立强等^[22]采用 AFLP 技术对 4 个鲤种群进行了遗传多样性分析, 其中建鲤和黄河鲤的 Nei's 遗传多样性指数分别为 0.123 5 和 0.122 5。本研究 Nei's 遗传多样性指数为 0.219, 高于前者。这可能说明通过 BLUP 育种值进行家系选育的鲤改良品系的遗传多样性较为丰富, 遗传变异水平较高。

由 Hu 和 Vick^[7]开发的 TRAP 技术扩增出的产物可能有 3 种类型: 在目标区域结合的固定引物与随机引物扩增出来的条带; 在非目标区域结合的固定引物与随机引物扩增出来的条带; 随机引物与随机引物扩增出的条带; 其中第 1 种类型为目标区域扩增产物, 在这部分区域的多态标记反映出目标功能基因的多态性; 第 2 种类型为非目标区域扩增产物; 第 3 种类型可能包含目标区域扩增产物。因此, TRAP 不仅能反映基因组多态性, 而且也可能反映功能基因的多态性。本研究中 25 个引物组合对鲤群体进行了遗传多样性分析, 反映出鲤群体基因组多态性; 而在关联分析中, 位点 *4rTrap04-308* 与体质量、体长性状相关联, 反映出功能基因的多态性。

3.2 TRAP 标记

TRAP 标记的固定引物是基于 EST 序列设计的, 但是扩增产物中仅有一小部分 TRAP 位点能和 EST 有关^[8]。Hu 等^[9]研究发现, 经测序约有 1% 的 TRAP 特异片段与 EST 或目标功能基因同源。

这主要是由于 2 个原因引起的: ①扩增的片段可能是由随机引物自身组合在基因组不同区域扩增而来; ②可能因为 TRAP 反应条件采用复性变温法, 起始复性温度较低(35℃), 会扩增出非特异的片段, 在随后的严谨条件下进一步扩增放大^[8]。因此, 可能得不到已知 EST 片段上的多态性位点, 或者不和表型性状 QTL 相关联。本研究测序后发现, *4rTrap04-308* 位点上的标记没有和鲤 *GHR* 基因的 cDNA 同源, 但是该位点与体质量、体长关联紧密, 而且与体质量小的关联, 推测该标记可能是一段对生长有抑制作用的未知功能基因 EST 序列。与体质量小相关的标记同样对生产实践具有应用价值, 不容忽视。因此, 下一步工作将该标记在其他鲤群体验证和多代验证, 进一步确认其使用范围。

分离群体标记关联分析法和随机选择群体标记关联分析法是目前对淡水鱼类与性状相关分子标记研究的 2 种主要方法^[19], 前者可以快速获得与目的性状连锁的分子标记, 缺点是灵敏度和精确度都较低; 后者是准确度和精确度较好, 缺点是需要检测标记量较大, 分析费用较高^[23]。由于 TRAP 标记像 AFLP 一样在一个反应体系中可以产生大量的标记, 对于大样本中标记-性状关联分析工作量极大, 因此本研究选用分离群体标记关联分析法和随机选择群体标记关联分析法相结合的方法既可以提高标记筛选效率, 又可提高标记与性状的关联性和准确性。

相对于陆生植物和动物来说, 在淡水鱼类上分子标记与经济性状的关联研究处于初级研究阶段, 目前也多采用微卫星标记筛选与生长性状相关联的基因座或基因型^[24-26]。本实验针对这一状况, 开发 TRAP 这一新型分子标记, 筛选出 25 对多态性较好的鲤 TRAP 标记, 并找到一个与体质量和体长显著关联的位点。在植物上研究表明, TRAP 标记在构建遗传图谱中是一种理想的分子标记, 并能与其他类型的标记如 AFLP 和 SSR 标记很好地整合^[27]。因此, 开发鲤 TRAP 标记, 可用于将来的鲤遗传图谱构建和分子辅助育种中。

参考文献:

- [1] 朱健, 王建新, 龚永生. 建鲤一代选育效果的分析[J]. 浙江海洋学院学报:自然科学版, 2002, 21(2): 30-32.
- [2] 董在杰, 朱健, 袁新华, 等. 建鲤基因组 DNA 的 RAPD 分析[J]. 湛江海洋大学学报, 2002, 22(1): 3-6.
- [3] 冯建新, 张西瑞, 刘国印, 等. 池养黄河鲤的经济性状及遗传性能[J]. 河南水产, 1997(1): 18-21.
- [4] Wang CM, Lo LC, Zhu ZY, et al. A genome scan for quantitative trait loci affecting growth-related traits in an F1 family of Asian seabass (*Lates calcarifer*) [J]. BMC Genomics, 2006, 7: 274.
- [5] 栾会妮, 姚维志, 孙志明. 分子标记技术在水产育种与种质鉴定中的应用[J]. 水利渔业, 2004, 24(4): 4-7.
- [6] 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, 238:165-172.
- [7] Hu J, Vick B A. TRAP (target region amplification polymorphism): a novel marker technique for plant genotyping[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2003, 21:289-294.
- [8] Liu Z, Anderson J A, Hu J, et al. A wheat intervarietal linkage map based on microsatellite and target region amplified polymorphism markers and its utility for detecting quantitative trait loci[J]. Theoret Appl Genet, 2005, 111:782-794.
- [9] Hu J, Ochoa O E, Truco M J, et al. Application of the TRAP technique to lettuce (*Lactuca sativa* L.) genotyping[J]. Euphytica, 2005, 144:225-235.
- [10] Sellier P. Genetically caused retarded growth in animals[J]. Domest Anim Endocrinol, 2000, 19:105-109.
- [11] Suttie J M, Fennessy P F, et al. Recent advances in the physiological control of velvet antler growth[C]// Brown R D. The biology of deer. New York: Springer-Verlag, 1992: 471-486.
- [12] Federica S, Luigi O, Francesco N, et al. Exploring polymorphisms and effects on milk traits of the DGAT1, SCD1 and GHR genes in four cattle breeds[J]. Livestock Sci, 2009, 125: 74-79.
- [13] 张志伟, 韩曜平, 曹哲明. 草鱼 TRAP-PCR 反应体系的建立[J]. 生物技术, 2006, 16(2): 31-34.
- [14] 曲疆奇, 苏胜彦, 董在杰, 等. 鲤 TRAP 分子标记反应体系的建立与优化[J]. 动物学杂志, 2010, 45(2): 99-105.
- [15] Hu J. Defining the sunflower (*Helianthus annuus* L.) linkage group ends with the Arabidopsis-type telomere sequence repeat-derived markers[J]. Chromosome Res, 2006, 14: 535-548.
- [16] 阙友雄, 陈天生, 许莉萍, 等. 甘蔗重要种质的 TRAP 标记遗传多样性分析[J]. 农业生物技术学报, 2009, 17(3): 496-503.
- [17] Vuylsteke M, Mank R, Brugmans B, et al. Further characterization of AFLP data as a tool in genetic diversity assessments among maize (*Zea mays* L.) inbred lines[J]. Mol Breed, 2000, 6: 265-276.
- [18] Weir B S. Genetic data analysis: Methods for discrete population genetic data[M]. Sunderland: Sinauer Associates, 1990.
- [19] 樊佳佳, 白俊杰, 李小慧, 等. 大口黑鲈生长性状的微卫星 DNA 标记筛选[J]. 遗传, 2009, 31(5): 515-522.
- [20] Alwala S, Kimbeng C A, Gravois K A, et al. Trap, a new tool for sugarcane breeding: comparison with AFLP and coefficient of parentage[J]. Am Soc Sug Cane Technol, 2006, 26: 61-86.
- [21] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals[J]. Genetics, 1978, 89: 583-590.
- [22] 钟立强, 张成锋, 朱健, 等. 四个鲤鱼种群遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(2): 259-265.
- [23] 唐辉. 从数量性状基因座位到标记辅助选择[J]. 中国畜牧杂志, 2003, 39(2): 44-45.
- [24] 李建林, 唐永凯, 俞菊华, 等. 吉富罗非鱼微卫星标记与体质量、体形性状相关性分析[J]. 中国水产科学, 2009, 16(6): 824-831.
- [25] 杨晶, 张晓峰, 储志远, 等. 鲤的微卫星标记与体质量、体长、体高和吻长的相关分析[J]. 中国水产科学, 2010, 17(4): 721-730.
- [26] 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.
- [27] 金梦阳, 刘列钊, 付福友, 等. 甘蓝型油菜 SRAP、SSR、AFLP 和 TRAP 标记遗传图谱构建[J]. 分子植物育种, 2006, 4(4): 520-526.

Screening of TRAP markers associated with body weight and body length in an improved strain of common carp (*Cyprinus carpio*)

DONG Zaijie^{1,2,3}, QU Jiangqi³, YUAN Xinhua^{2,3}, SU Shengyan², XIE Zhuang¹

1. College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Key Open Laboratory of Genetic Breeding and Aquaculture Biology of Freshwater Fishes, Ministry of Agriculture; Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

3. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China

Abstract: Growth-related traits such as body weight, body length and condition factor are quantitative traits influenced by a number of genes with relatively small effects, and environmental effects. These traits could be improved by phenotypic selection, but the genetic gain can be increased more rapidly with marker-assisted selection. Up to now, the genetic and molecular basis of growth-related traits is poorly understood in fish. A few QTL for growth-related traits have been detected with low density and fewer markers. Thus, more markers are needed to develop for mapping QTL. Recently, the newly developed TRAP (target region amplified polymorphism) marker is a reliable, stable and rapid PCR-based molecular marker technique. There are several advantages of TRAP over other DNA marker techniques. It has the favorable feature that combines high informativeness from the AFLP technique and easily performing from the RAPD method. TRAP markers use bioinformatics tools and EST database information to generate polymorphic markers around target gene sequences, while RAPD and AFLP are generated by random anonymous sequences. TRAP marker has been effectively used in plant genetic research.

In this study, the TRAP markers were used to analyze the genetic diversity and detect significant association between growth-related traits and polymorphism in an improved strain of common carp. The nucleotide sequences of three growth-related genes, including *GH*, *GHR* and *IGF*, were used to design fixed primer for pairing with four arbitrary primers. Finally, twenty-five combinations of primer were screened to be able to produce clear banding patterns and polymorphisms. The results showed that a total of 353 bands were scored with the 25 pairs of primer, of which 230 bands (65%) were polymorphism. The average of polymorphism information content (PIC), Nei's gene diversity and Shannon's Information index was 0.28, 0.219 3 and 0.328 9, respectively. Genotypic differences of the 25 TRAP markers were analyzed using χ^2 test between the large body weight group and small body weight group. Three loci (*gh1Trap04-140*, *4rTrap04-308* and *igf4Ga5-135*) showing significant differences in frequency in two groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) were used in screening 132 individuals, and the associations between the loci and growth traits were examined by the procedures of generalized linear modeling (GLM) using SAS program. The result indicated that only the locus *4rTrap04-308* probably correlated with both body weight and body length significantly ($P < 0.01$). This study presents the first example of growth-related trait-markers detection in common carp using TRAP markers, and a possible functional gene locus related to growth was found in the population. It provided basis for localization of QTL concerning important traits and marker-assisted selection.

Key words: *Cyprinus carpio*; TRAP marker; genetic diversity; body weight; body length; correlation analysis