

应用 SRAP 标记分析福瑞鲤及其原始亲本的遗传结构

曲疆奇^{①③} 毕滢佳^① 董在杰^{①②*} 张清靖^③ 胡一丞^① 袁新华^{①②}

① 南京农业大学无锡渔业学院 无锡 214081; 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 无锡 214081;

③ 北京市水产科学研究所 北京 100068

摘要:应用 SRAP 分子标记对建鲤 (*Cyprinus carpio* var. *jian*)、黄河鲤 (*C. c. haematopterus*) 和福瑞鲤 (FFRC Strain Common Carp, *C. carpio*) 进行遗传结构分析。结果显示,筛选出的 10 个多态性较好的引物组合共扩增出 110 个位点,其中多态性位点 92 个,平均多态性比率 83.6%,平均多态性信息含量为 0.256。对 3 个鲤鱼群体的 Nei's 基因多样指数、Shannon 信息指数和群体多态位点比例等遗传参数进行了分析,3 个鲤鱼群体的 Nei's 基因多样指数分别为 0.221、0.205 和 0.233; Shannon 信息指数分别为 0.332、0.298 和 0.352; 群体多态位点比例分别为 68.1%、65.2% 和 71.2%。结果表明,福瑞鲤群体遗传多样性水平较其原始亲本高,具有较丰富的遗传多样性,因而该群体仍具有一定的选育潜力。遗传相似度和遗传距离结果表明,福瑞鲤继承了更多建鲤的遗传物质。

关键词:鲤; SRAP; 群体; 遗传结构

中图分类号: Q953 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2011)05-120-06

Analysis of Genetic Structure of FFRC Strain Common Carp (*Cyprinus carpio*) and Its Original Parents by SRAP Markers

QU Jiang-Qi^{①③} BI Ying-Jia^① DONG Zai-Jie^{①②*} ZHANG Qing-Jing^③

HU Yi-Cheng^① YUAN Xin-Hua^{①②}

① Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081;

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;

③ Beijing Fisheries Research Institute, Beijing 100068, China

Abstract: SRAP markers were used to amplify and analyze the genomic DNA of three Common Carp populations including Jian Carp (*Cyprinus carpio* var. *jian*), Huanghe Carp (*C. c. haematopterus*), and the FFRC Strain Common Carp (*C. carpio*). Of the 110 bands amplified by 10 primer combinations, 92 (83.6%) were polymorphic. The average of polymorphism information content (PIC) was 0.256. The highest and lowest Nei's diversity indexes were found in FFRC Strain Common Carp population (0.233) and Jian Carp population (0.205), respectively. The average Shannon's indexes were 0.332, 0.298 and 0.352, respectively in three

基金项目 现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (No. CARS-46);

* 通讯作者, E-mail: dongzj@ffrc.cn;

第一作者介绍 曲疆奇, 男, 硕士; 研究方向: 鱼类遗传育种; E-mail: quqi20092009@163.com。

收稿日期: 2011-01-26, 修回日期: 2011-06-30

populations. As to the proportion of polymorphic loci, the most diverse group examined in our work was the FFRC Strain Common Carp population (71.2%), and the least was Huanghe Carp population (65.2%). The results indicate rich polymorphism information content and large genetic diversity in the FFRC Strain Common Carp population. The genetic distance and genetic identity results also suggest that the FFRC Strain Common Carp inherits more genetic material from Jian Carp than from Huanghe Carp.

Key words: Common Carp (*Cyprinus carpio*); SRAP markers; Populations; Genetic structure

建鲤 (*Cyprinus carpio* var. *jian*) 是中国水产科学研究院淡水渔业研究中心的科研人员于 20 世纪 80 年代采用家系选育、系间杂交及雌核发育相结合的方法育成的我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. c. haematopterus*) 是我国北方黄河水系的著名鲤地方品种,具有抗寒力强、饲料转化率高、易起捕等优点^[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,在被动集成收发器 (passive integrated transponder, PIT) 标记的辅助下开展家系选育。首先建立 80 个家系 (包括 20 个建鲤 ♀ × 建鲤 ♂ 家系、20 个建鲤 ♀ × 黄河鲤 ♂ 家系、20 个黄河鲤 ♀ × 建鲤 ♂ 家系和 20 个黄河鲤 ♀ × 黄河鲤 ♂ 家系)。各家系的鱼苗早期在不同的网箱中隔离培育,当鱼苗长至 10 cm 左右时,每个家系取 50 尾鱼进行 PIT 标记,同时测量每尾鱼的体重、体长、体高和体厚等数据。标记好的鱼在室内水泥池暂养 3 ~ 5 d 后,全部放入室外的一个 0.33 hm² 土池中进行培育。养至成鱼后,起捕并测量每尾鱼的数据。根据最佳线性无偏预测 (best linear unbiased prediction, BLUP) 法运用软件设计适宜的动物模型,以体重为主要指标,对各个家系中的鲤鱼个体的育种值进行估算。将雌、雄鱼按育种值从高到低排序,选取育种值排名靠前并且亲缘关系较远 (近交系数较小) 的雌、雄鱼各 90 尾,设计下一代选育系的亲本配对方案,同时选取接近平均育种值 (值在 0 附近) 且亲缘关系较远的雌、雄鱼各 20 尾,作为下一代对照系的亲本。按得到的亲本配对方案建立下一代的家系,进行下一代选育。每代设计、配对 80 ~ 90 个选育家系和 20 个对照

家系 (实际可生产 60 ~ 85 个选育家系和 12 ~ 19 个对照家系),其中 F2 代的选育系是育种值排位靠前的 90 组 F1 代鱼繁殖的后代群体, F3 代以后各代的选育系是上一代的选育系中育种值排位靠前的 90 组亲鱼繁殖的后代群体。F2 代的对照系为平均育种值的 20 组 F1 代鱼繁殖的后代群体, F3 代以后各代的对照系为上一代对照系中平均育种值附近的 20 组亲鱼繁殖的后代群体。经过 1 代群体选育和连续 4 代 BLUP 家系选育后获得的鲤鱼品种于 2010 年通过了全国水产原种和良种审定委员会的审定,定名为福瑞鲤 (FFRC Strain Common Carp, *Cyprinus carpio*)。

序列相关扩增多态性 (sequence related amplified polymorphism, SRAP) 又称基于序列扩增多态性^[4]。该标记技术主要是针对开放阅读框 (open reading frames, ORFs) 进行扩增,正向引物特异扩增外显子,反向引物特异扩增内含子、启动子和间隔序列,因不同个体、物种的内含子、启动子及间隔区长度不同而产生多态性。SRAP 标记操作简便,使用长为 17 ~ 18 bp 的引物以及 50℃ 的退火温度,保证了扩增结果的稳定性。由于多数 SRAP 产生高强带,很少有重叠,而且引物较长,故比 AFLP 标记易测序。SRAP 标记目前已广泛应用于植物遗传多样性分析^[5-8]、种质资源鉴定^[9-10] 和遗传连锁图谱构建等研究^[4,11-12]。在鱼类遗传学研究方面,仅在草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)、团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 遗传多样性分析^[13-14]、草鱼种质相关研究^[15] 和黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 雌雄鉴定方面^[16] 有较少应用报道。

目前,主要应用 RAPD 标记技术和 SSR 标

记技术研究鲤鱼的遗传结构^[17-20]。本研究将 SRAP 标记技术应用于鲤群体遗传学研究中,分析福瑞鲤与其原始亲本间遗传结构的差异,为福瑞鲤这一鲤鱼新品种遗传改良的深入研究提供有价值的信息,也为 SRAP 标记在鱼类分子标记辅助育种中的应用提供参考。

1 材料与方 法

1.1 实验材料和 DNA 的提取 在中国水产科学研究院无锡淡水渔业研究中心试验场分别取福瑞鲤及其原始亲本建鲤和黄河鲤各 30 尾,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。

1.2 SRAP 标记分析 8 个正向引物和 11 个反向引物组成 88 个 SRAP 引物组合(表 1)。经预实验得到稳定的鲤 SRAP 反应体系:在 15 μl PCR 反应体系中, Mg²⁺ 浓度为 2.5 mmol/L、dNTPs 浓度为 0.3 mmol/L、上下游引物浓度为 0.8 pmol/L、DNA 模板 60 ng、Taq DNA 聚合酶 1.0 U。参照 Li 等的 DNA 扩增程序^[4],在 Takara PCR 扩增仪上进行扩增反应。扩增产物采用 8% PAGE 胶分离,在 170 V 电压下电泳 2 h,电泳后用 GoldView 染料(上海赛百盛生物科技公司)染色 15 min,在 UVP 凝胶成像系统照相并保存。

表 1 实验中使用的 SRAP 引物

Table 1 SRAP primers used in the current study

| 正向引物 Forward primer (5'-3') | 反向引物 Reverse primer (5'-3') |
|-----------------------------|-----------------------------|
| F1 tgagtccaaaccggtgc | R1 gactgcgtacgaattcca |
| F2 tgagtccaaaccggtcc | R2 gactgcgtacgaattcag |
| F3 tgagtccaaaccggtaa | R3 gactgcgtacgaattcga |
| F4 tgagtccaaaccggaag | R4 gactgcgtacgaattctg |
| F5 tgagtccaaaccggacc | R5 gactgcgtacgaattcaa |
| F6 tgagtccaaaccggaat | R6 gactgcgtacgaattgca |
| F7 tgagtccaaaccggata | R7 gactgcgtacgaattaac |
| F8 tgagtccaaaccggagc | R8 gactgcgtacgaattga |
| | R9 gactgcgtacgaattgac |
| | R10 gactgcgtacgaattaat |
| | R11 gactgcgtacgaatttgc |

1.3 数据统计与分析 SRAP 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 ~ 1 000 bp 的电泳条带用于统计分析。有带赋值为“1”,无带赋值为“0”,计算每对引物的多态性百分率(percentage of polymorphism bands)及多态性信息量(polymorphism information content, PIC)。PIC 计算公式: $PIC = 1 - \sum f_i^2$,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 i 上的等位基因频率。应用 Popgene 32 计算得出 Nei's 基因多样指数、Shannon 信息指数和群体多态位点比例、遗传距离和遗传相似度。

2 结果与分析

2.1 SRAP 标记多态性引物分析 在 88 对引物组合中,10 对引物组合表现出高多态性(图 1)。如表 2 所示,10 对 SRAP 引物组合共扩增出 110 个位点,平均每个引物组合扩增 11 个条带,各引物组合产生的位点数分布在 7 ~ 15 个之间。其中多态性位点 92 个,平均每个引物组合提供 9.2 个标记信息,各引物组合扩增出多态性条带数分布在 5 ~ 13 个之间。每对引物组合产生的多态性条带比率为 71.4% ~ 92.3%,

表 2 不同 SRAP 引物组合的扩增结果

Table 2 The amplification efficiency of different SRAP 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 value |
|-------------------------|----------------------|--------------------------|-----------------------------------|------------------|
| F2 R1 | 8 | 6 | 75.0 | 0.288 |
| F3 R1 | 7 | 5 | 71.4 | 0.197 |
| F8 R1 | 10 | 9 | 90.0 | 0.230 |
| F1 R2 | 13 | 11 | 84.6 | 0.226 |
| F3 R2 | 15 | 13 | 86.7 | 0.260 |
| F4 R6 | 11 | 9 | 81.8 | 0.284 |
| F4 R8 | 12 | 9 | 75.0 | 0.302 |
| F3 R8 | 9 | 7 | 77.8 | 0.213 |
| F5 R8 | 12 | 11 | 91.6 | 0.336 |
| F3 R10 | 13 | 12 | 92.3 | 0.224 |
| 总计 Total | 110 | 92 | | |
| 平均 Average | 11 | 9.2 | 83.6 | 0.256 |

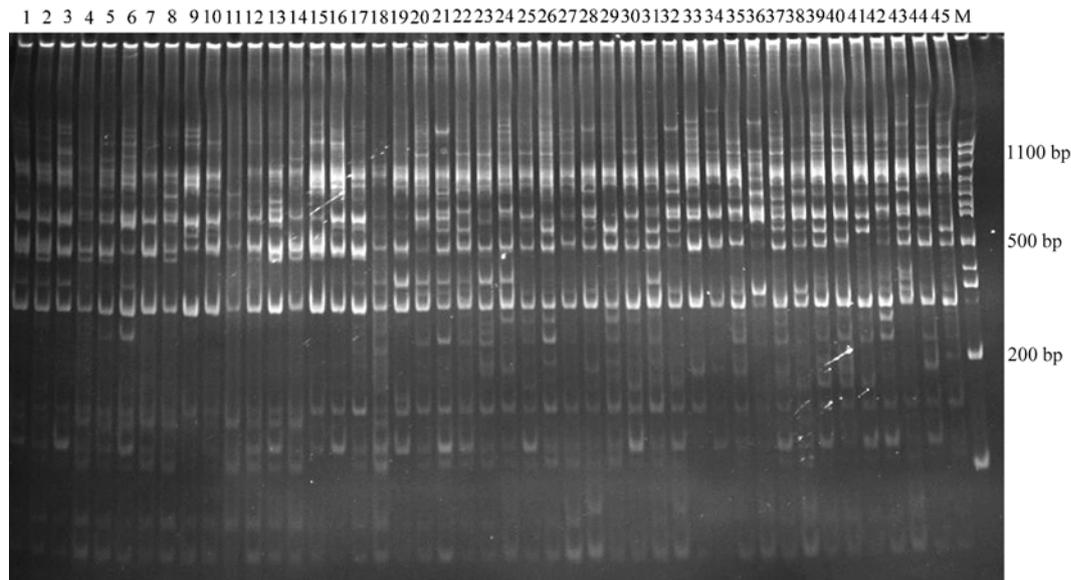


图 1 引物 F4R8 在 3 个鲤鱼群体的 SRAP 扩增图

Fig. 1 The SRAP patterns of 3 different *Cyprinus carpio* populations using primer pair F4R8

M: 100 bp DNA 分子量标准; 1 ~ 15: 建鲤; 16 ~ 30: 黄河鲤; 31 ~ 45: 福瑞鲤。

M: 100 bp DNA marker; Lane 1 - 15: Jian Carp; Lane 16 - 30: Huanghe Carp; Lane 31 - 45: FFRC strain Common Carp.

平均为 83.6%。每对引物组合产生的多态信息量(PIC)介于 0.197 ~ 0.336 之间,平均 PIC 为 0.256。

2.2 群体遗传结构分析 Nei's 基因多样指数、Shannon 信息指数和群体多态位点比例均是衡量遗传变异程度的良好参数。建鲤、黄河鲤和福瑞鲤群体的 Nei's 基因多样指数分别为 0.221、0.205 和 0.233; 3 个鲤鱼群体的 Shannon 信息指数分别为 0.332、0.298 和 0.352; 群体多态位点比例分别为 68.1%、

65.2% 和 71.2%。

2.3 鲤品种间的遗传相似度、遗传距离 遗传相似度是表示 2 个体间亲缘关系的重要参数。从表 3 可以看出,福瑞鲤与建鲤的遗传相似度较高,与黄河鲤的遗传相似度相对较低。遗传距离与遗传相似度相反。这说明福瑞鲤继承了更多建鲤的遗传物质。

3 讨论

SRAP 标记技术简便、稳定、产率高等特点已经在遗传多样性分析中得到证实。Ferriol 等^[6]对甜瓜 (*Cucurbita pepo*) 的 2 个变种 69 份类型代表性材料进行了遗传多样性分析,11 对 SRAP 引物组合共扩增出 88 个位点,其中多态位点为 64 个,多态性比率为 72.7%。冉玮等^[14]利用 SRAP 标记对长江中下游地区淤泥湖、梁子湖、鄱阳湖的 3 个团头鲂自然群体的遗传多样性进行了分析,筛选出 13 对多态性丰富的引物组合,在团头鲂 3 个群体中共检测到 172 个位点,其中 132 个为多态位点,占 76.74%。显示了较高的多态性。张志伟等^[13]

表 3 3 个鲤鱼群体遗传相似度(右上角)和遗传距离(左下角)

Table 3 Genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) among three populations of Common Carp

| | 建鲤 Jian Carp | 黄河鲤 Huanghe Carp | 福瑞鲤 FFRC Strain Common Carp |
|--------------------------------|-----------------|------------------------|-----------------------------------|
| 建鲤 Jian Carp | | 0.783 | 0.946 |
| 黄河鲤 Huanghe Carp | 0.245 | | 0.796 |
| 福瑞鲤 FFRC Strain Common Carp | 0.056 | 0.229 | |

采用 SRAP 标记对草鱼 1 个野生群体和 2 个人工繁殖群体进行遗传多样性分析,从不同引物组合中筛选出 8 组多态性丰富的引物组合,每个引物组检测到的位点数为 12~21 个,在 3 个草鱼群体中共检测到 120 个位点,其中多态性位点有 92 个,多态位点比例为 76.67%。本实验结果发现鲤鱼群体的 SRAP 目的片段主要集中在 100~1 000 bp 之间,10 对多态性较高的引物组合在 3 个鲤群体中共扩增出 110 个位点,多态位点为 92 个,平均多态性比率为 83.6%。与同属于鲤科鱼类的草鱼和团头鲂相比,SRAP 标记同样能够在鲤鱼群体中检测出较多的遗传位点,说明 SRAP 标记是一种检测效率很高的分子标记技术,适用于鲤鱼遗传学的分析研究。

遗传多样性是生物适应环境与进化的基础,它是物种适应多变的环境、维持长期生存和进化的遗传基础。鲤鱼群体遗传多样性研究报道^[19-21]很多,但有关鲤鱼选育群体与其亲本遗传结构差异分析的报道甚少。佟雪红等^[22]利用 RAPD 技术对建鲤、黄河鲤及其杂交子代进行了遗传分析,黄河鲤与正交 F1 具有较高的遗传变异水平,反交 F1 变异最小。Nei's 基因多样指数、Shannon 信息指数和群体多态位点比例均是衡量遗传变异程度的良好参数。颀晓勇等^[23]采用 SSR 标记技术对选育新品种新吉富罗非鱼 (new GIFT strain Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*) (F8-9) 群体、基础群体 (F0)、以及选育中群体 (F6-7) 在选育过程中出现的遗传变异进行观察与分析,发现群体多态位点比例、Nei's 基因多样指数等遗传参数在整体上都呈现出随选育世代数的累进而降低的趋势。本实验中建鲤、黄河鲤和福瑞鲤群体的 Nei's 基因多样指数分别为 0.221、0.205 和 0.233; Shannon 信息指数分别为 0.332、0.298 和 0.352; 多态位点比例分别为 68.1%、65.2% 和 71.2%。通过比较各遗传参数发现,福瑞鲤群体遗传多样性水平较其原始亲本高,说明该鲤群体仍具有较大的选育空间。关于这一现象可能是由于福瑞鲤选育世代较短,也可能与福

瑞鲤选育过程中采用家系选育的方法有关。福瑞鲤主要根据 BLUP 法设计适宜的模式,对不同家系中的鲤鱼个体的育种值进行估算,根据育种值大小和不同的家系背景进行下一代鲤鱼的选种配对。在进行亲本配对时,充分考虑亲本的家系背景,严格控制,避免近亲交配的发生。

本实验的结果表明,福瑞鲤群体具有较丰富的遗传多样性,仍具有一定的选育潜力,可以作为今后进一步选育的基础群体。另外,淡水经济鱼类遗传图谱构建的报道还较少,鲤鱼遗传标记辅助育种研究还处于起步阶段。SRAP 能够在鲤鱼基因组中产生较高的多态性位点,可用于今后鲤鱼 QTL 定位及其遗传连锁图谱构建研究。

参 考 文 献

- [1] 朱健,王建新,龚永生. 建鲤一代选育效果的分析. 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. 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. 河南水产,1997,(1): 18-21.
- [4] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. Tag Theoretical and Applied Genetics, 2001,103(2/3): 455-461.
- [5] Budak H, Shearman R C, Parmaksiz I, et al. Comparative analysis of seeded and vegetative biotype buffalograsses based on phylogenetic relationship using ISSRs, SSRs, RAPDs, and SRAPs. Tag Theoretical and Applied Genetics, 2004,109(2): 280-288.
- [6] Ferriol M, Picó M B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers. Tag Theoretical and Applied Genetics, 2003,107(2): 271-282.
- [7] Ferriol M, Picó M B, Nuez F. Genetic diversity of some accessions of *Cucurbita maxima* from Spain using RAPD and SBAP markers. Genetic Resources and Crop Evolution, 2003,50(3): 227-238.
- [8] 李武,倪薇,林忠旭,等. 海岛棉遗传多样性的 SRAP 标记分析. 作物学报,2008,34(5): 893-898.
- [9] Han X Y, Wang L S, Liu Z A, et al. Characterization of

- sequence-related amplified polymorphism markers analysis of tree peony bud sports. *Scientia Horticulturae*, 2008, 115 (3): 261 - 267.
- [10] 缪体云, 薄天岳, 陈锦绣, 等. 甘蓝种质资源遗传多样性的 SRAP 分析. *分子植物育种*, 2010, 8(1): 94 - 98.
- [11] 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. *分子植物育种*, 2006, 4(4): 520 - 526.
- [12] Lin Z X, Zhang X L, Nie Y C, et al. Construction of a genetic linkage map for cotton based on SRAP. *Chinese Science Bulletin*, 2003, 48(19): 2063 - 2067.
- [13] 张志伟, 韩曜平, 仲霞铭, 等. 草鱼野生群体和人工繁殖群体遗传结构的比较研究. *中国水产科学*, 2007, 14(5): 720 - 724.
- [14] 冉玮, 张桂蓉, 王卫民, 等. 利用 SRAP 标记分析 3 个团头鲂群体的遗传多样性. *华中农业大学学报*, 2010, 29(5): 601 - 606.
- [15] 丁炜东, 曹丽萍, 曹哲明. 草鱼种质相关 SRAP 及 SCAR 的分子标记. *动物学报*, 2008, 54(3): 475 - 481.
- [16] 辛文婷, 孙中武, 尹洪滨, 等. 黄颡鱼雌雄差异的 SRAP 标记. *东北林业大学学报*, 2009, 37(5): 112 - 113.
- [17] 董在杰, 夏德全, 吴婷婷, 等. RAPD 技术在鱼类杂种优势研究中的应用. *中国水产科学*, 1999, 6(1): 37 - 40.
- [18] 董在杰, 夏德全, 吴婷婷, 等. 兴国红鲤和散鳞镜鲤杂种优势的 RAPD 分析. *上海水产大学学报*, 1999, 8(1): 31 - 36.
- [19] Thai B T, Burrige C P, Austin C M. Genetic diversity of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in Vietnam using four microsatellite loci. *Aquaculture*, 2007, 269(1/4): 174 - 186.
- [20] Yan J P, Liu S J, Sun Y D, et al. RAPD and microsatellite analysis of diploid gynogens from allotetraploid hybrids of red crucian carp (*Carassius auratus*) × common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 2005, 243(1/4): 49 - 60.
- [21] 钟立强, 张成锋, 周凯, 等. 四个鲤鱼种群遗传多样性的 AFLP 分析. *基因组学与应用生物学*, 2010, 29(2): 259 - 265.
- [22] 佟雪红, 董在杰, 缪为民, 等. 建鲤与黄河鲤的 RAPD 分子标记及其杂交优势的遗传分析. *广东海洋大学学报*, 2007, 27(1): 1 - 6.
- [23] 颀晓勇, 李思发, 蔡完其. 吉富品系尼罗罗非鱼选育过程中遗传变异的微卫星分析. *水产学报*, 2007, 31(3): 385 - 389.