

文章编号:1000-0615(2009)02-0177-05

镜鲤体重相关分子标记与优良子代的筛选和培育

孙效文, 鲁翠云, 曹顶臣, 梁利群

(中国水产科学研究院黑龙江水产研究所,农业部北方鱼类生物工程育种实验室,黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要:根据性状相关分子标记的 QTL 分析结果进行品种培育是分子标记用于水产育种研究的重要方向之一。利用镜鲤与体重相关的 3 个基因座(HLJ302, HLJ338, HLJ343)作为快速生长的标记,筛选出一批镜鲤亲本进行繁殖,对得到的子代进行基因分型,并将基因分型结果与检测的最大 10 尾个体与最小 10 尾个体进行比较。结果表明,最大 10 尾具有优势基因型为每尾 1.7 个,最小 10 尾具有优势基因型为每尾 0.7 个,生长速度快群体与生长速度慢群体在体重相关基因型的富集上呈现显著性差异。同时选出具有富集体重相关优势基因型的子代且生长速度快的群体一个,2008 年生产出子二代。综合性状好生长速度更快的镜鲤新品系正在培育之中。

关键词:镜鲤;生长;分子标记;筛选;培育

中图分类号:Q 348;S 917

文献标识码:A

在所有水产养殖鱼类的育种研究中,鲤大概是工作积累最多的。在前苏联地区,在中东欧地区、以色列、东南亚、日本,尤其中国的大陆及台湾等地方,鲤都是重要的养殖对象,也有很多品种培育出来^[1-2]。如前苏联的罗普莎鲤,欧洲中部的德国镜鲤、我国的建鲤、高寒鲤等都是养殖比较广且长期受养殖户欢迎的优良品种。这些品种或经系统选育、或经杂交育种,基本上都是利用“传统”育种技术获得。育种学家很早就提出了基于标记选择育种的设想^[3-4],由于当时可利用的标记主要是同工酶和其他蛋白质标记,标记数量少且多态性低,从而没有产生明显的育种效果,标记辅助育种在被提出的年代没有受到育种学家的足够重视^[5]。近年来数量众多的 DNA 分子标记的开发使基于标记的选择育种技术有了实现的可能性,虽然水产生物经济性的 QTL 研究的进展缓慢,但仍有一些水产动物的 QTL 研究积累到了可以开展育种研究的水平,如 Fuji 等^[6]将牙鲆抗病相关的 QTL 结果用于牙鲆品种选育,获得了很好的育种结果。

本研究利用镜鲤几个与体重相关的基因

座^[7],作为镜鲤快速生长的选择标记,探索了在不损失综合性状的基础上快速生长新品种的培育研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验鱼的选育与取样 本育种的基础群体取自黑龙江水产研究所松浦实验场的镜鲤繁殖群体,这个群体是早期被审定的国家级良种——德国镜鲤选育系的后代,历代的选择强度约 30:1。从繁殖群体中选亲鱼 131 尾,并剪鳍条提取 DNA。其中雌鱼 76 尾,雄鱼 55 尾。用 28 个微卫星标记对 DNA 样本进行 PCR 扩增、基因型分析、雌雄亲本间的遗传距离分析,选出最佳繁殖配组方案,并以体重优势基因型最有可能组合的方式进行了配组。多个配组子代在混合养殖后,经表型测量、基因型分析,建立了体重优势基因型富集群体,并生产出子二代,子二代正在培育中。

微卫星标记 本研究使用了 28 个微卫星标记,这些标记是本课题组克隆鉴定多态性较高且等位基因间的差异较大的标记^[8]。

收稿日期:2008-05-04 修回日期:2008-09-18

资助项目:国家基础研究计划(2004CB117405);农业部引进计划(2007-G55)

通讯作者:孙效文,E-mail: Sunxw2002@163.com

1.2 方法

高分子量基因组 DNA 的提取和纯化 剪取鱼鳍约 0.5 g, 加入裂解液 0.5 mL (0.5% 十二烷基肌氨酸钠; 200 $\mu\text{g/L}$ 蛋白酶 K; 0.5 mol/L EDTA), 50 $^{\circ}\text{C}$ 消化, 等体积的酚/氯仿 (酚/氯仿/异戊醇体积比为 25:24:1) 抽提 2 次。用无 DNA 的 RNA 酶消化其中含有的 RNA, 再用酚/氯仿抽提 2 次。经数次透析 (透析液: 50 mmol/L Tris-Cl, pH 8.0; 10 mmol/L EDTA, 10 mmol/L NaCl), 直到 $\text{OD}_{270} < 0.05$ 。加两倍体积的预冷无水乙醇沉淀, 离心除去上清液, 等体积预冷的 70% 乙醇洗涤, 离心除去上清液, 室温干燥。用适量 1/10 TE 缓冲液溶解, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

PCR 反应程序 PCR 扩增反应总体积为 25 μL , 其中 PCR 反应缓冲液 18 μL (0.25 mmol/L pH 8.3 的 Tris-Cl, 1.25 mmol/L KCl, 0.037 5 mmol/L MgCl_2 , 2.5×10^{-6} Gelatin, 2.5×10^{-5} Tween, 2.5×10^{-5} NP-40, dNTP 各 0.005 mmol/L); 基因组 DNA 约 50 ng, 微卫星引物 1 μL (上游、下游引物各 10 $\mu\text{mol/L}$), Taq 聚合酶 1 U, 无菌超纯水补足总体积至 25 μL 。PCR 反应程序: 预变性 94 $^{\circ}\text{C}$, 3 min; PCR 循环程序为变性 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 退火 54 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 总计 38 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。

扩增产物检测 PCR 扩增反应产物采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 200 V 电泳 2 h, Gold View 染色, 溴酚蓝为上样液, SYNGENE 凝胶成像仪记录电泳结果, 1 Gel Works 软件包 (3.0 版本) 分析每个扩增条带的分子量与产物量的差异性。

统计指标 微卫星是共显性遗传, 可从琼脂糖电泳图上直接判断出个体的基因型, 计算出各个群体各个位点的等位基因频率 (allele frequency, p) 即 1 个群中某一基因占此基因座所有等位基因的相对比率, 按不同基因型个体在全部检测子代中的比例计算出每种基因型的百分比作为这种基因型的频率; 遗传距离的计算, 利用个体间多个基因座的基因型频率数据计算出雌雄个体间的遗传距离, 选取雌雄个体间遗传距离介于 0.50 ~ 0.70 的配组, 同时计算出 3 个基因座 (HLJ302, HLJ338, HLJ343) 的体重优势杂合基因型出现最大几率来生产子代。

用 T 检验法检测体重大的群体和体重小的

群体在富集优势基因型是否具有显著性差异, 也对每个基因型相关体重做 T 检验, 来分析每个基因型对体重是否具有显著贡献。公式为: $T = (X - Y) / \{(s_1^2 + s_2^2) / n\}$, 取自由度为 $2n - 2 = 18$, 置信度 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 育种基础群体的构建

本育种目标是建立两个镜鲤新品系, 一是鳞被保持框鳞体型为长型的群体, 二是鳞被保持框鳞体型为宽体型的群体。

利用 28 个微卫星标记检测松浦实验场的镜鲤繁殖群体的基因型, 计算本群体雌雄个体间的遗传距离, 将与群体内任一个体遗传距离小于 0.2 大于 0.7 的剔除, 选出长体型的个体 40 尾, 宽体型的 30 尾, 建立两个育种基础群体。

2.2 雌雄亲本的选择、子代的繁育和培育

从上述两个选育基础群体内, 选择雌雄个体间遗传距离在 0.4 ~ 0.7 范围内进行配组繁殖子代, 共生产 35 组, 将子代混合在半亩池塘培育至夏花, 每组 250 尾放养在一个 4 669 m^2 大池中, 培育至秋天, 平均体重 389.83 g; 为加快选育速度将秋片转入室内在约 17 ~ 20 $^{\circ}\text{C}$ 的水池中饲养, 第二年春天再转入大池饲养。至 15 月龄时, 平均体重 2 640 g, 部分个体达到 3 350 g。

2.3 子代基因型分析与体重相关分析

2007 年秋在子代 15 月龄时, 对子代进行体重等表型与基因型测量, 选取优势基因比例大, 生长速度快、长体型、框型鳞被标准的个体共 120 尾作为后备亲鱼, 取体重最大 10 尾和体重最小 10 尾及体重优势基因型 (HLJ302, HLJ338, HLJ343) 列在表 1。

表 1 的结果显示虽然没有优势基因型的个体也有生长速度快的, 具有两个优势基因型也有生长速度慢的, 但是给出总的趋势是生长优势基因型多的个体生长速度明显快于生长优势基因型少的个体。其中体重最大 10 尾鱼, 平均具有优势基因型 1.7 个, 而最小的 10 尾平均具有优势基因型 0.7 个。用 T 检验进行统计分析, 以个体优势基因型数为 X_i 和 Y_i , 按公式: $T = (X - Y) / \{(s_1^2 + s_2^2) / n\}$ 计算, $T = 2.5$, 取 $\alpha = 0.05$, 自由度 $2n - 2 = 18$, 查得 $t_{\alpha} = 2.101$, $T \geq t_{\alpha}$, 体重大的一组与体重小的一组在优势基因型富集上具有显著性差

异。

10 尾最大个体的平均体重为 2 820 g,10 尾小个体平均体重为 1 900 g,换算成绝对生长速度即含优势基因型高的比低的快 48%,而优势基因型多 140%。以每个基因型对两组全部个体的体

重值做 T 检验,H302 的 T 值为 3.56,远大于 $t_{\alpha} = 2.101$,对体重有显著性贡献; T 值为 2.95,大于 $t_{\alpha} = 2.101$,对体重有显著性贡献,而 H338 的 T 值小于 t_{α} 值,对体重没有显著贡献。

表 1 10 尾体重最大与 10 尾最小个体在体重优势基因型上的富集
Tab.1 The genotypes linked with body weight dominant in 10 biggest and 10 smallest fish

体重 weight	基因型 genotypes			体重 weight	基因型 genotypes		
	H302	H338	H343		H302	H338	H343
2850	+	+	+	1750	-	+	-
3150	+	+	+	1800	-	-	-
2700	-	+	+	1800	-	-	-
2850	-	-	-	1750	-	-	-
2800	+	-	-	1900	-	+	+
2650	+	-	+	2000	-	-	+
2900	+	-	-	2000	+	-	-
2800	+	-	-	2000	+	+	-
2800	+	+	+	2000	-	-	-
2700	+	-	-	2000	-	-	-

2.4 子二代繁育群体的建立

在 2008 年春天,上述个体平均体重在 3 200 g,一些已经成熟。在子代亲本中选择生长速度快的个体并用 28 个微卫星标记对子代的基因型进行分析,在保持上述基因型可能优势的同时,进行个体间遗传距离的计算,在保持鳞被为框型的同时选体长型的个体间进行交配,选体宽型的个体间进行交配,共进行了 3 个配组的繁殖,第二代经基因型选择生产的镜鲤子代群体正在培育之中。

3 讨论

3.1 体重相关基因型用于育种

经济性状尤其是数量性状相关基因型用于育种研究在家畜中有一些报道^[9],尤其是产奶性状相关 QTL 标记在优质奶牛的选育方面获得了较为成功的育种结果。牙鲆抗病的标记(一个标记)在牙鲆抗病品种的选育方面也取得了成功,镜鲤、虹鳟、沟鲈、罗非鱼利用分子标记及 QTL 结果的育种研究也有报道^[10-11]。但体重性状是受多基因控制的数量性状,相关的基因型类型较多,体重优势基因型用于育种研究还未见报道。本文利用先前获得的镜鲤与体重优势基因型进行新品系的选择虽然取得了初步的进展,但所选体重相关标记是否与体重性状紧密连锁需要更精细的 QTL 分析;虽然这几个体重相关标记在选

育快速生长品系的结果非常有效,但长远应用价值还有待下几代选育结果来验证,本文给出的只是初步结果。其中经统计分析显示 H338 对生长没有显著贡献,尽管先前的研究 H338 具有显著贡献^[7],这些基因型标记在育种中的作用有待进一步检验。

3.2 根据亲本的遗传组成进行配组的意义

用物理标记追踪家系是控制近亲繁殖、获得优良选育结果比较成熟的技术,这在大西洋鲑(*Salmo salar*)和中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)等的选育研究中得到了证实^[12],但多数水生动物初生时非常小无法进行物理标记,在物理标记之前要先分池饲养,这将引起很大的环境差异和带来较大的工作量。本研究对子代没有分池饲养,直接将不同组合的子代混在一个池塘养殖,在长成后进行基因型分析,根据基因型频率计算雌雄后备亲鱼间的遗传距离,作为配组繁殖第二代选择指标也起到了避免近亲繁殖导致生产性能下降的作用。

3.3 利用分子标记选育的优缺点

由于试验没有分池饲养的过程,避免了分池饲养产生的环境差异、饲养过程产生的差异等带来的对遗传差异的影响,所检测到的差异是比较真实地反应了遗传差异,这是分子标记选择育种的优点;本研究忽略了亲本的育种值在子代选择

中的作用,对最终优秀子代的选择会有一定的负面影响,这是本研究技术方法的一个缺点,但这只是本研究的设计问题,实际操作中,利用分子标记选择育种也可以利用标记追溯出祖父母并利用其育种参数来提高子二代选择水平。

利用分子标记开展育种研究的另一个缺点是基因型检测的难度较大,目前多数育种单位还难于大规模开展基因型分析研究,尤其是基层育种单位多没有基因型分析的设备和研究力量,此问题的解决急需建立区域性的分子育种技术服务中心,也需要研究单位将基因型分析工作“傻瓜化”,使基因型分析简单易行。

3.4 分子标记育种可使选择强度极大地提高

本研究中子代初生后就混合在一起养殖,同池可以放养数量相当多的子代,选择强度得到了极大地提高,如果这些子代都进行物理标记,成本会非常高,工作量也非常大。以此类推,分子标记进行育种可以在很小的养殖场就能做到强度非常高的选择。比如用2个6 670 m²大的鱼池可以放几百个家系的20万尾鱼苗一起混养,当年平均长成100 g,按90%淘汰,则留下2万尾,第二年养至平均尾重1 500 g再淘汰90%,留作后备亲鱼的个体再经分子标记鉴定不同家系,根据基因型或遗传距离进行下一代配组,这样选择强度就非常高,且标记分析的工作量并不是很大,如果用物理标记做这么大规模的选育是非常困难的。

用分子标记计算遗传组成,利用雌雄个体间的遗传距离来进行鲤的品种选育是一个可行的、选择强度高、环境干扰小的新型育种技术。基本过程是:将不同组合的子代混合饲养,混合养殖的家系越多群体数量越大则选择强度越高,可根据留种目标每年淘汰一批不合格个体,养成后再选择优秀子代检测其基因型来分析遗传组成,并以此为依据建立下一代后备亲鱼。

参考文献:

- [1] 沈俊宝,刘明华. 鲤鱼育种研究[M]. 哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,2000:132-162.
- [2] 李思发. 遗传育种的理论和技术在鲤科鱼类养殖业中的应用[J]. 水产学报,1983,7(2):175-184.
- [3] Neimann-Sorensen A, Roberstson A. The association between blood groups and several production characters in three Danish cattle breeds [J]. Acta Agric Scand, 1961, 11:163-196.
- [4] Thoday J M. Location of polygenes [J]. Nature, 1961,191: 368-370.
- [5] 方宣钧,吴为人,唐纪良. 作物DNA标记辅助育种[M]. 北京:科学出版社,2000.
- [6] Fuji K, Hasegava O, Honda K, et al. Marker-based breeding of a lymphocytis disease-resistant Japanese flounder [J]. Aquaculture, 2007, 291-295.
- [7] 孙效文,鲁翠云,匡友谊,等. 镜鲤两个繁殖群体的遗传结构和几种性状的基因型分析[J]. 水产学报,2007,31(3):273-279.
- [8] 孙效文,贾智英,魏东旺,等. 磁珠富集法与小片段克隆法筛选鲤微卫星的比较研究[J]. 中国水产科学,2005,12(2):126-132.
- [9] Hospital F. Selection in backcross programmes [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005, 360(1459): 1503-1511.
- [10] Streelman J T, Kocher T D. Method for identifying fast-growing fish [Z]. US Patent #6, 720, 150, 2004.
- [11] Hershberger W K. What history may tell us about the future of aquaculture genetics [J]. Israeli Journal of Aquaculture, 2006, 58(4): 223-229.
- [12] 张天时,孔杰,刘萍,等. 中国明对虾家系建立及不同家系生长发育的初步研究[J]. 海洋学报,2007,29(3):121-124.

Molecular markers associated with body weight of mirror carp and selection and raising of progenies

SUN Xiao-wen, LU Cui-yun, CAO Ding-chen, Liang Li-qun

(*Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China*)

Abstract: It is the one of main directions for aquaculture breeding using molecular markers that stocks were selected by the results of quantitative traits loci of economic traits. The main goal of our long term project is to get a good variety with most economic traits in high quality by marker-assisted selection. We have identified 6 microsatellite loci linked with body weight at high explained variation, and also found three of these 6 loci are homozygous in experimental population in our previous works. In this paper, using other three loci (HLJ302, HLJ338, HLJ343) which associated with body weight of mirror carp in breeding population, a group of mature mirror carp were selected and their progenies were also gotten. When the progenies grow up, the genotypes of those progenies were analyzed with these three loci. This paper compared the genotypes between 10 biggest fish and 10 smallest fish, the results showed that there are significant difference on dominant genotype linked body weight between fast-growth population and slow-growth population. The results showed that 10 biggest fish have the mean positive genotypes 1.7 for body weight. Meanwhile, which proved these markers are effect for breeding again. A big population with these positive dominant genotypes has been selected (also selected by good phenotypes such as good color, good body figure etc), and a big group of progenies of second generation has been produced. A new strain of fast-growing and good-quality mirror carp has been raised.

Key words: mirror carp; growth; molecular markers; selection