

文章编号:1000-0615(2008)05-657-08

吉奥罗非鱼(新吉富罗非鱼♀×奥利亚罗非鱼♂) 和 4 个近缘遗传型罗非鱼的遗传差异的 RAPD、SSR 比较分析

李思发, 陈 林, 蔡完其

(上海海洋大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 200090)

摘要: 以 1 个新型杂交鱼—吉奥罗非鱼(新吉富罗非鱼♀×奥利亚罗非鱼♂)群体, 4 个近缘遗传型罗非鱼群体[奥尼(尼罗罗非鱼♀×奥利亚罗非鱼♂)、新吉富罗非鱼、尼罗罗非鱼、奥利亚罗非鱼]为实验材料, 采用 RAPD 和 SSR 技术, 比较分析这两个杂交种间及它们同亲本间的遗传差异。RAPD 方面: ①群体多态座位比例(P)—吉奥(20.4%)>新吉富(18.5%), 但<奥利亚(21.4%)<奥尼(21.7%)<尼罗(22.3%); ②Nei's 平均遗传相似系数(I_p)—吉奥(0.9086)<新吉富(0.9231), 但>奥利亚(0.8895)>尼罗(0.8588)>奥尼(0.8069); ③香农多样性指数(H_o)—吉奥(0.1326)>新吉富(0.1103), 但<奥利亚(0.1514)<尼罗(0.1742)<奥尼(0.2410); ④群体两两间遗传相似系数(I_{pp})—吉奥—奥尼(0.9444)<吉奥—尼罗(0.9496)<吉奥—新吉富(0.9544), 但>吉奥—奥利亚(0.9383)。SSR 方面: ①平均有效等位基因数(N_e)—吉奥(2.43)>新吉富(2.31)>尼罗(1.94)>奥利亚(1.18), 但<奥尼(2.82); ②平均遗传杂合度(H)—吉奥(0.700)>尼罗(0.570)>奥利亚(0.497)>新吉富(0.398), 但<奥尼(0.816); ③群体的多态信息含量(PIC)—吉奥(0.661)>尼罗(0.568)>奥利亚(0.513)>新吉富(0.420), 但<奥尼(0.692); ④依据遗传距离构建的 NJ 树和 UPGMA 树, 奥利亚罗非鱼单独为一支, 吉奥等 4 种罗非鱼为一支。总的说来, RAPD 和 SSR 两种技术检测结果所反映的群体遗传信息一致。这表明, 无论是吉奥还是奥尼, 两个杂交种在遗传上都同各自的母本较近, 这同作者先前揭示的形态和生长等方面的母本效应一致。

关键词: 罗非鱼; 杂交种; 遗传型; 遗传差异; RAPD; SSR

中图分类号: S917 **文献标识码:** A

RAPD 和 SSR 是两种重要的分子遗传标记技术, 均广泛应用于水生动植物遗传多样性研究、遗传图谱构建以及辅助遗传育种^[1-7]。本研究使用这两种技术, 比较地研究了 1 种新型杂交鱼—吉奥罗非鱼(新吉富罗非鱼 *Oreochromis niloticus* ♀×奥利亚罗非鱼 *O. aureas* ♂)^[8]及其近缘的杂交鱼—奥尼罗非鱼及 3 种亲本罗非鱼的遗传差异。目的—剖析杂交鱼间及同其亲本间遗传结构的异同, 为罗非鱼遗传育种以及种质资源的开

发利用提供科学依据, 二是了解这两种分子遗传技术所反映信息的互补性, 供今后使用借鉴。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

吉奥罗非鱼 新吉富罗非鱼♀×奥利亚罗非鱼♂, 简称吉奥(JA); 是 2005—2006 年上海海洋大学与广东茂名罗非鱼良种场合作研制的杂交鱼; 奥尼罗非鱼 尼罗罗非鱼♀×奥利亚罗非

收稿日期: 2007-07-31

资助项目: 国家“十五”科技攻关项目——尼罗罗非鱼良种选育技术研究(2004BA526B0102); 公益性行业(农业)科研专项—罗非鱼大规模鱼种规模化培育与生态养殖技术研究(nyhyzx 07-044-01)

作者简介: 李思发(1938—), 男, 江苏镇江人, 教授, 博士生导师, 主要从事水产动物种质资源与种苗工程研究。Tel: 021-65710333, E-mail: sfli@shou.edu.cn

鱼♂,简称奥尼(AN);是十多年来我国南方养殖生产流行的杂交鱼;

新吉富罗非鱼 以吉富(GIFT)品系尼罗罗非鱼为基础群体遗传改良了的新品种,简称新吉富(XJ);吉奥的母本。

尼罗罗非鱼 简称尼罗(NL),广东茂名罗非鱼良种场持有的群体;奥尼的母本。

奥利亚罗非鱼 简称奥利亚(AL),广东茂名罗非鱼良种场持有的群体;吉奥、奥尼的父本。

这5种遗传型罗非鱼均采集自广东茂名罗非鱼良种场。各取样本20尾。吉奥、新吉富、尼罗的规格为231~315g,奥尼、奥利亚的规格为123~161g。每尾样本剪取尾鳍约2g,分别编号后于95%乙醇中保存备用。实验用10碱基随机引物购自上海生工生物工程技术有限公司。

1.2 实验方法

基因组DNA提取 基因组DNA提取采用常规的“酚-氯仿”方法进行^[7]。

RAPD分析 参照Williams等^[5]方法,反应在ABI2720型PCR仪上进行。反应混合液总体

积为20 μ L,其中含有10 μ L 2 \times Taq PCR MasterMix(内含0.1U Taq酶 $\cdot\mu$ L⁻¹,500mmol \cdot L⁻¹ dNTP 10 μ L,20mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl,100mmol \cdot L⁻¹ KCl,3mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂),8 μ L 无菌水,1 μ L 引物(5 μ mol \cdot L⁻¹),1 μ L 基因组DNA(40~200ng),最后加入30 μ L 石蜡油。反应循环条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性3min,接着94 $^{\circ}$ C 45s,36 $^{\circ}$ C 45s,72 $^{\circ}$ C 90s,40个循环后72 $^{\circ}$ C 延伸10min,4 $^{\circ}$ C 保温。取10 μ L PCR扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶(含适量EB)电泳,电泳缓冲液为0.5 \times TBE,电压为100V(5V \cdot cm⁻¹)。电泳结束后用Gene genius型凝胶成像系统拍照、记录、分析。根据产物的电泳带型,出现条带的记为1,未出现条带的记为0,统计时仅记录清晰稳定的扩增带。

SSR分析 PCR的扩增程序参照Crooijmans等^[9]的方法,略有改变。参考已发表的罗非鱼遗传连锁图谱^[10-12],按互不连锁的原则,从不同连锁群中选择了11对微卫星。微卫星引物序列、反应条件见表1。所有引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

表1 11对微卫星引物序列、重复序列及特异退火温度

Tab. 1 Sequence of eleven microsatellite marker primers used in this study, specific annealing temperature of PCR amplification, and the repetitive sequences

座位 locus	上游序列 forward primer sequences	下游序列 reverse primer sequences	等位基因数 number of allele	退火温度($^{\circ}$ C) T _{ann}
UNH222	CTCTAGCACACGTGCAT	TAACAGGTGGGA ACTCA	4	54.1
UNH123	CATCATCACAGACAGATTAGA	GATTGAGATTTTCATTCAAG	5	54.1
UNH907	CAGGACCGACTCTGCAAGAT	GAGCTCTTTTGTGTCAAAAATC	4	55
UNH129	ATGCTAGCAAACATCAAAGGTC	GATATGCTGATGATGCACAGAGTC	3	55
UNH172	AATGCCTTTAAATGCCTTCA	CTTTTATAGTCGCCCTTTGTTA	6	55.4
UNH216	GGGAAACTAAAGCTGAAATA	TGCAAGGAATATCAGCA	4	55.4
UNH187	CGGTGATCTATCGGTTA	TCCGATCAGCTGATACA	5	56.8
UNH904	GTCCTGCTGAGCCCTTTA	GCATTCAGAGTGCCAGAGTTC	6	53
GM155	CCCCTCATATAAACACAGCA	CGACTGACATTTCCACACTC	5	53
GM559	GCACCATTTTTAACCAGTGCT	ATTTTCCACCGAGCTCACCT	4	59.2
GM532	CACAGATGCATAGTCTCACG	TCCCAAGAAGAAGGCGAGTA	5	59.2

PCR扩增反应在Eppendorf Mastercycler Gradient PCR仪上进行。每一样品的反应总体积为20 μ L,其中含有10 μ L 2 \times Taq PCR MasterMix(内含0.1U Taq酶 $\cdot\mu$ L⁻¹,500mmol \cdot L⁻¹ dNTP 10 μ L,20mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl,100mmol \cdot L⁻¹ KCl,3mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂),7 μ L 无菌水,正、反向引物各1 μ L(终浓度0.2(mol \cdot L⁻¹)),1 μ L 基因组DNA(50~150ng),加入30 μ L 石蜡油。PCR产

物经3%琼脂糖凝胶水平电泳检测出扩增条带后,使用北京六一仪器厂生产的DYY-10C型电脑三恒多用电泳仪和DYCZ-24A型双垂直电泳槽(凝胶面积:170mm \times 170mm),进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。采用的凝胶浓度为8%,电泳缓冲液为1 \times TBE,一般电压大小为250V,电泳2.5h左右。采用的分子量标准为pBR322DNA/MspI。电泳结束后染色,显色后用CanoScanLiDE

60 扫描仪扫描,并用 AlphaEaseFC 软件相对于分子量标准 pBR322DNA/*Msp*I 就每对微卫星引物扩增的等位基因的分子量大小进行估算。

数据处理与分析

(1) 扫描处理

对扫描图用 Gel-pro analyzer 4.5 软件分析条带大小。根据凝胶上 DNA 泳动距离进行判断,如果电泳条带表现为 1 条,且泳动距离一致,则认为所检测的样本在该基因座位是纯合的;如果为两条带,则认为此样本在该座位是杂合的。不同个体间,如果泳动距离一致则为单态,若条带泳动距离不一致,则该座位多态性,根据泳动距离定义微卫星片段的大小顺序。

(2) 数据处理与分析

① 多态位点比例:

$$P = (\text{多态位点数} / \text{位点总数}) \times 100\%$$

② 遗传相似系数:

群体内个体间的遗传相似系数^[13]:

$$I_o = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$$

相应地,个体间遗传距离:

$$D_o = 1 - I_o$$

群体间的遗传相似系数^[14]:

$$I_{pop} = \sum(X_i Y_i) / \{ \sum(X_i)^2 \sum(Y_i)^2 \}^{1/2}$$

相应地,群体间 Nei 遗传距离:

$$D_{pop} = 1 - I_{pop}$$

③ 香农(Shannon)多样性指数^[15]:

群体内香农多样性指数:

$$H_o = - \sum(X_i \text{Ln} X_i) / N$$

群体间的平均香农多样性指数:

$$H_{pop} = \sum H_o / n, n \text{ 为研究群体数}$$

总群体香农多样性指数:

$$H_{sp} = - \sum(X \text{Ln} X) / n$$

采用 POPGENE version 1.31 软件对上述分析进行统计。使用 Arlequin 软件进行分子方差分析(AMOVA)。群体内及群体间平均遗传相似系数、平均遗传距离、多态座位比例和群体内香农氏指数用 *t* 检验予以比较^[14]。

④ 有效等位基因数^[16]:

$$N_e = \frac{1}{\sum_{i=1}^n p_i^2}$$

⑤ 群体遗传杂合度^[17]:

$$H = 1 - \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right)$$

⑥ 多态信息含量^[18]:

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \left(\sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2 \right)$$

⑦ 个体间遗传相似指数^[19]:

$$I = \frac{2n_{xy}}{(n_x + n_y)}$$

⑧ Nei's 标准遗传距离^[20]:

$$D_s = -\text{Ln} I; \quad I = \frac{J_{xy}}{\sqrt{J_x J_y}}$$

$$J_x = \frac{1}{r} \sum_j^r \sum_i^m X_{ij}^2; \quad J_y = \frac{1}{r} \sum_j^r \sum_i^m Y_{ij}^2;$$

$$J_{xy} = \frac{1}{r} \sum_j^r \sum_i^m X_{ij} Y_{ij}$$

根据群体间的遗传距离,用 MEGA 3.0 软件包^[21]中的“NJ”和“UPGMA”程序进行聚类分析。

2 结果

2.1 RAPD 分析

PCR 扩增结果 本实验所用引物共计 70 条,其中 18 条能够稳定重复扩增,18 条引物的序列及编号见表 2。

表 2 实验用 18 条 RAPD 引物序列及编号

Tab. 2 Sequences and numbers of 18 random primers used in the study

引物序号 primers	5'~3'序列 sequences	引物序号 primers	5'~3'序列 sequences
S301	CTGGGCACGA	S93	CTGGGCACGA
S60	ACCCGGTCAC	S303	TGGCGCAGTG
S61	TTCGAGCCAG	S306	ACGCCAGAGG
S62	GTGAGGCGTC	S316	CTCTGTTCGG
S65	GATGACCGCC	S319	TGGCAAGGCA
S66	GAACGGACTC	S323	CAGCACCGCA
S67	GTCCCGACGA	S326	GTGCCGTTCA
S73	AAGCCTCGTC	S333	GACTAAGCCC
S92	CAGCTCACGA	S440	GGTGCTCCGT

这 18 条引物在 5 个遗传型群体中共扩增出 197 个位点,平均每条引物扩增 10.9 个位点。扩增片段大小为 200~3 000 bp。吉奥、奥尼、新吉富、尼罗和奥利亚的多态座位比例分别为:20.4%、21.7%、18.5%、22.3%、21.4%,5 个遗传型罗非鱼群体间不存在显著差异($P > 0.05$)。具体扩增结果见表 3。图 1 为引物 S₁₈₈ 的部分扩增产物的电泳带型图谱。

表3 18条随机引物在罗非鱼5个遗传型群体中PCR扩增结果

Tab.3 Number of bands amplified by 18 random primers in five genotypes of tilapia

	扩增条带数 (条) amplified bands	多态性条带数 (条) polymorphism bands	多态座位比例 (%) percentage of polymorphism loci
吉奥 JA	125	30	20.4
奥尼 AN	123	26	21.7
新吉富 XJ	125	23	18.5
尼罗 NL	123	27	22.3
奥利亚 AL	129	28	21.4

遗传差异分析

(1) 5种遗传型罗非鱼群体内的遗传相似系

数及香农多样性指数

吉奥、奥尼、新吉富、尼罗、奥利亚5个遗传型罗非鱼群体内的 Nei 平均遗传相似系数分别为: 0.9086、0.8069、0.9231、0.8588、0.8895, 群体间差异不显著($P>0.05$)。若以群体内的遗传相似度来表示纯度, 那么吉奥、奥尼、新吉富、尼罗、奥利亚5个遗传型罗非鱼群体的纯度分别为 90.9%、80.7%、92.3%、85.9%、89.0%。

吉奥、奥尼、新吉富、尼罗、奥利亚5个遗传型罗非鱼群体内的香农多样性指数分别为: 0.1326、0.2410、0.1103、0.1742、0.1514, 群体间差异不显著($P>0.05$)。

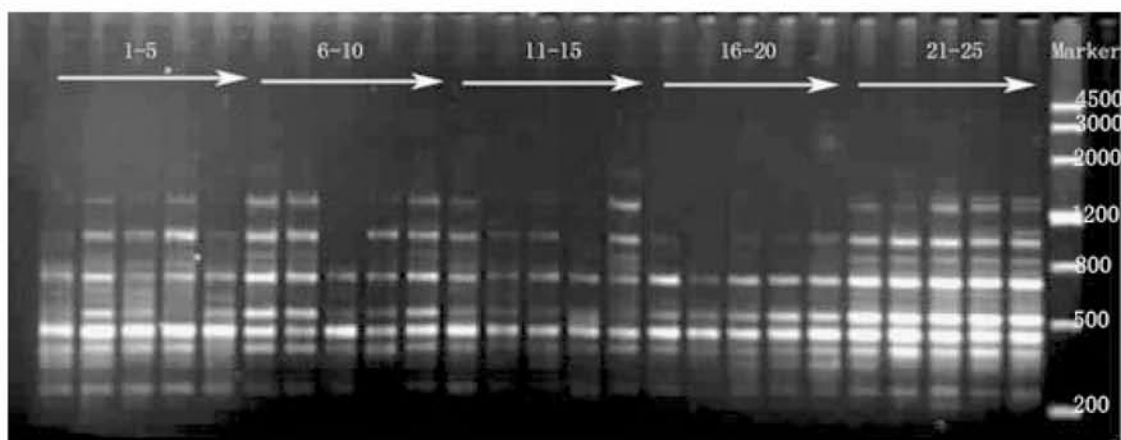


图1 引物 S₃₀₁ 在罗非鱼5个遗传型群体的扩增产物的电泳带型

1~5:新吉富; 6~10:吉奥; 11~15:尼罗; 16~20:奥尼; 21~25:奥利亚

Fig.1 The electrophoresis patterns by primer S₃₀₁ in five genotypes of tilapia

1-5: XJ; 6-10: JA; 11-15: NL; 16-20: AN; 21-25: AL; Marker: Marker III

(2) 5种遗传型罗非鱼群体两两间遗传相似系数及遗传距离

吉奥-奥尼间、吉奥-新吉富间、吉奥-尼罗间、吉奥-奥利亚间的遗传相似系数分别为 0.9444、0.9544、0.9496、0.9383; 遗传距离分别为 0.0573、0.0467、0.0517、0.0637。遗传相似系数吉奥-新吉富间最大, 吉奥-奥利亚间最小; 遗传距离吉奥-奥利亚间最大, 吉奥-新吉富间最小(表4)。

2.2 微卫星分析

PCR 扩增结果 11 对微卫星引物都扩增出较好的谱带, 案例如图 2。因引物的不同, 各引物扩增得的等位基因数分别为 3~6 个, 共 51 个等位基因, 大小在 76~235 bp, 平均每个引物等位基因数为 4.64 个(表 5)。

表4 罗非鱼5个遗传型群体两两间 Nei 遗传相似系数及遗传距离

Tab.4 Genetic similarity and distance in five genotypes of tilapia

	吉奥 JA	奥尼 AN	新吉富 XJ	尼罗 NL	奥利亚 AL
吉奥 JA	-	0.9444	0.9544	0.9496	0.9383
奥尼 AN	0.0573	-	0.9363	0.9541	0.9537
新吉富 XJ	0.0467	0.06580	-	0.9546	0.8992
尼罗 NL	0.0517	0.0470	0.0464	-	0.8977
奥利亚 AL	0.0637	0.0474	0.1063	0.1079	-

注: 对角线右上方数字为遗传相似系数, 对角线左下方数字为遗传距离

Notes: The figures right above the diagonal represent genetic similarities, left below the diagonal represent genetic distances

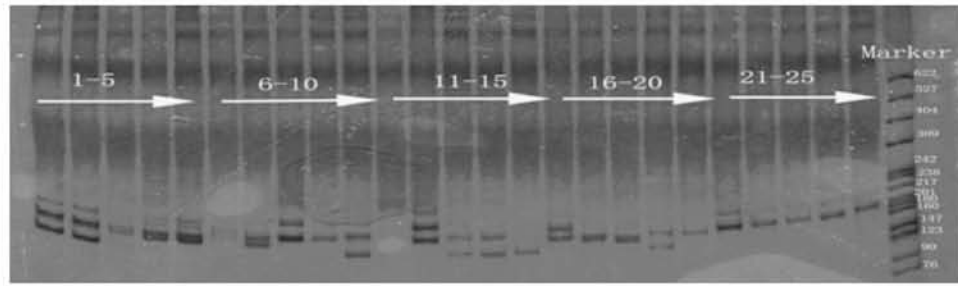


图2 引物 UNH123 在罗非鱼 5 个遗传型群体的扩增产物的电泳带型

1~5;吉奥;6~10;奥尼;11~15;新吉富;16~20;尼罗;21~25;奥利亚

Fig. 2 The electrophoresis patterns by primer UNH123 in five genotypes of tilapia

1-5;JA;6-10;AN;11-15;XJ;16-20;NL;21-25;AL;Marker;PBR322/*Msp* I

表5 吉奥等5个遗传型罗非鱼群体的11个微卫星座位的有效等位基因数、基因杂合度和多态信息含量

Tab. 5 Effective numbers of alleles, gene heterozygosity and polymorphism information content of eleven microsatellite locus in five genotypes of tilapia

座位 locus	遗传指标 genetic indexes	吉奥 (<i>n</i> = 20) JA	奥尼 (<i>n</i> = 20) AN	新吉富 (<i>n</i> = 20) XJ	尼罗 (<i>n</i> = 20) NL	奥利亚 (<i>n</i> = 20) AL	平均值 mean
UNH904	<i>N_e</i>	2.589	3.376	2.477	1.882	1.225	2.310
	<i>H_e</i>	0.732	0.950	0.300	0.600	0.602	0.637
	<i>PIC</i>	0.682	0.753	0.335	0.573	0.505	0.570
GM155	<i>N_e</i>	2.089	2.817	2.703	3.571	1.000	2.426
	<i>H_e</i>	0.750	0.900	0.500	0.800	0.000	0.590
	<i>PIC</i>	0.663	0.757	0.666	0.786	0.000	0.574
GM532	<i>N_e</i>	2.439	2.778	1.947	1.882	1.000	2.010
	<i>H_e</i>	0.631	0.800	0.200	0.494	0.000	0.425
	<i>PIC</i>	0.585	0.763	0.183	0.372	0.000	0.381
GM559	<i>N_e</i>	2.000	3.463	1.663	2.100	1.105	2.066
	<i>H_e</i>	0.568	0.952	0.100	0.200	0.698	0.504
	<i>PIC</i>	0.527	0.779	0.112	0.241	0.674	0.467
UNH123	<i>N_e</i>	2.556	1.536	3.434	2.005	1.782	2.263
	<i>H_e</i>	0.550	0.400	0.550	0.654	0.697	0.570
	<i>PIC</i>	0.660	0.320	0.663	0.538	0.669	0.570
UNH129	<i>N_e</i>	1.831	2.556	2.100	2.432	1.000	1.984
	<i>H_e</i>	0.800	0.600	0.550	0.654	0.000	0.521
	<i>PIC</i>	0.735	0.412	0.489	0.566	0.000	0.440
UNH172	<i>N_e</i>	2.623	3.150	1.956	1.802	1.000	2.106
	<i>H_e</i>	0.800	0.900	0.450	0.621	0.000	0.554
	<i>PIC</i>	0.737	0.753	0.531	0.599	0.000	0.524
UNH187	<i>N_e</i>	2.292	2.036	1.835	1.000	1.051	1.643
	<i>H_e</i>	0.750	0.700	0.700	0.000	0.661	0.562
	<i>PIC</i>	0.742	0.559	0.666	0.000	0.613	0.516
UNH216	<i>N_e</i>	2.930	2.640	1.663	1.600	1.000	1.967
	<i>H_e</i>	0.500	0.900	0.100	0.280	0.000	0.356
	<i>PIC</i>	0.585	0.763	0.109	0.246	0.000	0.341
UNH222	<i>N_e</i>	3.347	3.150	2.640	1.966	1.512	2.523
	<i>H_e</i>	0.500	0.953	0.150	0.858	0.698	0.632
	<i>PIC</i>	0.527	0.779	0.134	0.758	0.676	0.575
UNH907	<i>N_e</i>	2.000	3.556	3.042	1.105	1.727	2.286
	<i>H_e</i>	0.401	0.830	0.650	0.532	0.697	0.622
	<i>PIC</i>	0.321	0.610	0.440	0.528	0.669	0.514
平均值 mean	<i>N_e</i>	2.427	2.823	2.314	1.940	1.177	2.136
	<i>H_e</i>	0.700	0.816	0.398	0.570	0.497	0.596
	<i>PIC</i>	0.661	0.692	0.420	0.568	0.513	0.571

2.3 罗非鱼 5 个遗传型群体的遗传多样性

罗非鱼 5 个遗传型群体的遗传多样性指标见表 5。平均有效等位基因数(N_e)高低顺序为:奥尼(2.823)>吉奥(2.427)>新吉富(2.314)>尼罗(1.940)>奥利亚(1.177);平均遗传杂合度(H_e)高低顺序为:奥尼(0.816)>吉奥(0.700)>尼罗(0.570)>奥利亚(0.497)>新吉富(0.398)。11 个微卫星位点多态信息含量(PIC)高低顺序为奥尼(0.692)>吉奥(0.661)>尼罗 0.568>奥利亚 0.513>新吉富 0.420。两种杂交鱼都显示有比双亲更为丰富的多态性。

罗非鱼 5 个遗传型群体间的遗传距离和遗传相似系数 吉奥、奥尼、新吉富、尼罗和奥利亚 5 个遗传型群体间的 Nei's 遗传相似系数和 Nei's 遗传距离如表 6 所示。吉奥-奥尼、吉奥-新吉富、吉奥-尼罗、吉奥-奥利亚间的遗传相似系数分别为 0.700、0.833、0.645 和 0.450;吉奥-奥尼、吉奥-新吉富、吉奥-尼罗和吉奥-奥利亚间的 Nei's 遗传距离分别为 0.324、0.245、0.347 和 0.661。

表 6 罗非鱼 5 个遗传型群体间的遗传距离和遗传相似系数

Tab. 6 Genetic distances and genetic similarity among five genotypes of tilapia

	吉奥 JA	奥尼 AN	新吉富 XJ	尼罗 NL	奥利亚 AL
吉奥 JA	-	0.700	0.833	0.645	0.450
奥尼 AN	0.324	-	0.780	0.816	0.668
新吉富 XJ	0.245	0.314	-	0.852	0.330
尼罗 NL	0.347	0.261	0.233	-	0.348
奥利亚 AL	0.661	0.372	0.712	0.689	-

注: 对角线右上方数字表示遗传相似性系数, 对角线左下方数字表示遗传距离

Notes: The figures right above diagonal represent genetic similarities, left below represent genetic distances

罗非鱼 5 个遗传型群体的聚类分析 通过 MEGA 3.0 软件, 根据 5 个遗传型群体间的 Nei's 遗传距离矩阵(表 6), 用 UPGMA 法和 NJ 法构建的 5 种罗非鱼的分子系统树大体一致(图 3)。5 个群体的罗非鱼明显分成两支, 奥利亚单独为

一支, 其它 4 群体罗非鱼为一支, 其中, 吉奥同其母本新吉富的遗传距离较近, 奥尼则同其母本吉富的遗传距离较近。

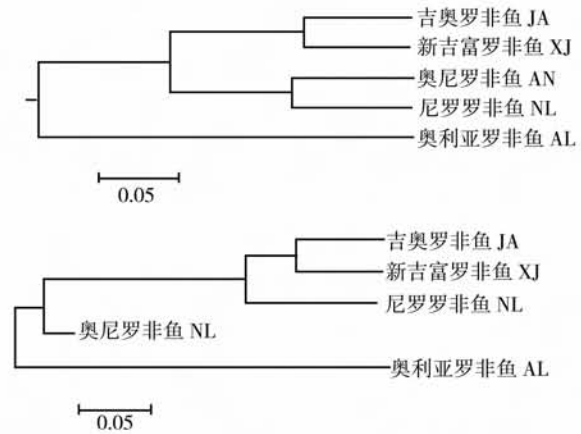


图 3 Nei's 遗传距离在罗非鱼 5 个遗传型群体间的聚类关系(UPGMA 树-上, NJ 树-下)

Fig. 3 Culster relationship of five genotypes of tilapia by UPGMA(upper)and NJ(lower) method based on Nei's genetic distance

3 讨论

采用 RAPD 方法, 分析得吉奥等 5 个遗传型罗非鱼群体的多态座位比例、群体间遗传相似系数和香农多样性指数三项指标值, 发现新吉富的多态座位比例(18.5%)和香农多样性指数(0.1103)最低; 而 Nei's 平均遗传相似系数(0.9231)最高, 仍是意料中的结果, 因为新吉富通过长期选育得到了纯化^[22-23]。同奥尼的这三个指标(21.7%, 0.2410, 0.8069)相比, 杂交种吉奥的这三个指标(20.4%, 0.1326, 0.9086)相应地两个较低, 一个较高; 若以群体内的遗传相似度来表示纯度, 新吉富(92.3%)最高, 其杂交种吉奥的(90.9%)次之, 但高于奥尼(80.7%)、尼罗(85.9%)及奥利亚(89.0%), 应是合乎逻辑的结果。而 SSR 分析结果表明, 吉奥的平均基因杂合度(0.700)最高, 奥尼(0.816)次之, 都远高于尼罗(0.570)、奥利亚(0.497)及新吉富(0.398); 但多态信息含量则是奥尼(0.692)最高, 吉奥(0.661)次之, 也都远高于尼罗(0.568)、奥利亚(0.513)及新吉富(0.420)。RAPD 和 SSR 一致表明两种杂交鱼都具有比双亲更为丰富的多态性, 这是杂交种表型性状产生杂种优势的缘由。研究结果还一致表明, 两种杂交鱼都比较靠近其母本, 这一结果

同形态学的分析结果^{[8]①}大体一致。这种母本效应应对今后的定向育种提供了有益启示。

又根据 Botstein 等^[24]提出的衡量基因变异程度高低的多元信息含量指标,即 $PIC > 0.5$ 示高度多态, $0.25 < PIC < 0.5$ 为中度多态, $PIC < 0.25$ 为低度多态。本研究中罗非鱼 5 个群体的 11 个微卫星标记的多元信息含量的范围是 0.420~0.692,平均值为 0.571,应视为高度多态。表明本研究所涉及的罗非鱼 5 个群体的遗传多样性总体上是丰富的,这是罗非鱼进一步遗传改良的潜力所在。

参考文献:

- [1] 项超美,陆仁后,谢浩,等. 四种十足目甲壳动物遗传差异的 RAPD 分析[J]. 水生生物学报, 1998, 22(3): 251-256.
- [2] 冯亮,廖翔华. 我国不同地域鲤鱼和草鱼头槽绦虫的亲缘关系[J]. 动物学报, 2000, 46(4): 385-391.
- [3] 段修军. 5 个鹅品种微卫星遗传多样性分析[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2006, 27(3): 41-46.
- [4] Martin G B. Rapid identification of markers linked to a Pseudomonas resistance gene in tomato by using random primer and near isogenic lines [J]. Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 2336-2340.
- [5] Williams D J, Kazianis S, Walter R B. Use of random DNA (RAPD) for identification of largemouth bass amplified polymorphic subspecies and their intergrades [J]. Trans Am Fish Soc, 1998, 127: 825-832.
- [6] 黄磊,王义权. 微卫星分子标记在濒危动物保护遗传学研究中的应用[J]. 生物多样性, 2004, 12(5): 528-533.
- [7] Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning: a laboratory manual (3rd edition) [M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [8] 陈林,李思发,简伟业,等. 吉奥罗非鱼(新吉富罗非鱼♀×奥利亚罗非鱼♂)生长性能的评估[J]. 上海水产大学学报, 2008, 17(3): 257-262.
- [9] Crooijmans R P M A, Bierbooms V A F, Komen J, et al. Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Anim Genet, 1997, 28: 129-134.
- [10] Kocher T D, Lee W J, Sobolewska H, et al. A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Genetics, 1988, 148: 1225-1232.
- [11] Agresti J J, Seki S, Cnaani A, et al. Breeding new strains of tilapia: development of an artificial center of origin and linkage map based on AFLP and microsatellite loci [J]. Aquaculture, 2000, 185: 43-56.
- [12] Young Lee, Woo-Jai Lee J, et al. A second-generation genetic linkage map of tilapia (*Oreochromis* spp.) [J]. Genetics, 2005, 170: 237-244.
- [13] Nei M. Genetic distance between populations [J]. Am Nat, 1972, 106: 283-292.
- [14] Wachira F N, Waugh R, Hackett C A, et al. Detection of genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) using RAPD markers [J]. Genome, 1995, 38(2): 201-210.
- [15] 李春喜. 生物统计学 [M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [16] 顾万春. 统计遗传学 [M]. 北京: 科学出版社, 2004: 165-196.
- [17] Nei M, Roychoudury A K. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance [J]. Genetics, 1997, 76(2): 379-390.
- [18] Nei M, Maruyama T, Chakraborty R. The bottleneck effect and genetic variability in population [J]. Evolution, 1975, 29: 1-10.
- [19] 王成树,李增智. 分子数据的遗传多样性分析方法 [J]. 安徽农业大学学报, 2002, 29(1): 90-94.
- [20] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individual [J]. Genetics, 1978, 89: 583-590.
- [21] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment briefings [J]. Bioinformatics, 2004, 5: 150-163.
- [22] Li S F, He X J, Hu G C, et al. Improving growth performance and caudal fin stripe pattern in selected F6-F8 generation of GIFT Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) using mass selection [J]. Aquaculture Research, 2006, 37: 1165-1171.
- [23] 颜晓勇. 新吉富罗非鱼选育过程中遗传变异跟踪研究 [D]. 上海水产大学博士学位论文, 2006, 19-47.

① 李思发,李光红,陈林,等. 吉奥罗非鱼(新吉富罗非鱼♀×奥利亚罗非鱼♂)同其亲本及近缘杂交罗非鱼的形态差异比较: 兼析杂交鱼的母本效应, 2008.

[24] Bolstein D, White R L, Skolnick M, *et al.*
Construction of a genetic linkage map in man using

restriction fragmentlength polymorphisms [J]. *Am J Ham Genet*, 1980, 32: 314 - 331.

Genetic variations among a new tilapia hybrid [NEW GIFT Tilapia (*Oreochromis niloticus*) ♀ × blue tilapia (*O. aureas*) ♂] and four closed genotypes of tilapia by RAPD and SSR analysis

LI Si-fa, CHEN Lin, CAI Wan-qi

(The Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Ecological Systems Certificated by the Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Using a new hybrid [NEW GIFT Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) ♀ × blue tilapia (*O. aureas*) ♂, short term JA] and closed hybrid (common Nile tilapia ♀ × blue tilapia ♂, short term AN) as well as their parents (GIFT Nile tilapia, short term XJ; common Nile tilapia, short term NL; blue tilapia, short term AL) as study materials, their genetic variations were studied by RAPD and SSR technologies. By RAPD: ① Percentage of polymorphism loci (P) - JA (20.4%) > XJ (18.5%), but < AL (21.4%) < AN (21.7%) < NL (22.3%); ② Nei's average genetic similarity (I_p) - JA (0.9086) < XJ (0.9231), but > AL (0.8895) > NL (0.8588) > AN (0.8069); ③ Shannon diversity index (H_o) - JA (0.1326) > XJ (0.1103), but < AL (0.1514) < NL (0.1742) < AN (0.2410); ④ The paired population genetic similarity (I_{pop}) - JA-AN (0.9444) < JA-NL (0.9496) < JA-XJ (0.9544), but > JA-AL (0.9383). By SSR: ① Average effective numbers of alleles (N_e) - JA (2.43) > XJ (2.31) > NL (1.94) > AL (1.18), but < AN (2.82); ② Average heterozygosity (H) (JA (0.700) > NL (0.570) > AL (0.497) > XJ (0.398), but < AN (0.816); ③ Polymorphism information content (PIC) - JA (0.661) > NL (0.568) > AL (0.513) > XJ (0.420), but < AN (0.692); ④ The NJ and UPGMA tree based on genetic distance showed that, AL goes to one branch separately, JA etc. 4 genotypes run together into a branch. In general, the information by RAPD and SSR all revealed that, the hybrids, never mind JA or AN, all closed to their mother side, which is coincident with our previous study results from morphology and growth.

Key words: tilapia; hybrid; genotype; genetic variation; RAPD; SSR