

文章编号:1000 - 0615(2001)01 - 0016 - 04

杂交一代(尼罗罗非鱼 × 奥利亚罗非鱼) 及其亲本基因组 DNA 的比较

许玉德¹, 许莉¹, 钟建兴²

(1. 厦门大学生物学系, 福建 厦门 361005; 2. 福建省水产研究所, 福建 厦门 361016)

摘要: 采用 RAPD 技术, 用 20 个随机引物对尼罗罗非鱼、奥利亚罗非鱼及其杂交一代的精巢 DNA 进行扩增反应, 发现引物 OPZ-14 和 OPZ-18 在尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼之间扩增出有差异的 DNA 片段, 作为鉴定两种鱼的分子标记有较高可信度。对这两种鱼的杂交一代基因组 DNA 的 RAPD 扩增能获得足够的多态性, 20 个引物中有 8 个引物扩增出差异性产物, 表明杂交一代基因杂合性增强, 这是杂种优势得以形成的重要遗传物质基础之一。

关键词: 尼罗罗非鱼; 奥利亚罗非鱼; 杂交一代; 基因组 DNA; 随机扩增多态 DNA

中图分类号: S917 **文献标识码:** A

Comparison of genomic DNA of hybrid (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) and its parents

XU Yu-de¹, XU Li¹, ZHONG Jian-xing²

(1. Department of Biology, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. Fujian Institute of Fisheries, Xiamen 361016, China)

Abstract: Using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) technique with 20 kinds of random primers, genomic DNA of hybrid (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*) and its parents were analysed. The results showed that only with the two kinds of primers, OPZ-14 and OPZ-18, species-specific fragments were produced between parent fishes, even between different fish belonging to the same species, and some of them could be used as molecular markers to identify *O. niloticus* and *O. aureus*. And 8 primers generate polymorphic products among hybrid fish and its parents. DNA fragments amplified from the hybrid fish were more abundant than those from its parents, which may be the result of more abundant genes in the hybrid fish, because of heredity or mutation. These results provide some molecular biological basis for species identification and heterosis effect in fish.

Key words: *Oreochromis niloticus*; *Oreochromis aureus*; hybrid; genomic DNA; Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

自然界中, 罗非鱼雌雄个体的经济性状诸如体形大小、生长速度、繁殖周期及肉品质量等有着较大的差异, 因此单性鱼苗的培育倍受人们的关注^[1-4]。研究表明, 决定鱼类性别的性染色体有两种类型^[5]: 一种是雄性异质型, 雄性由异质的 XY 性染色体决定, 而雌性由同质的 XX 性染色体决定, 如尼罗

收稿日期: 2000-03-16

资助项目: 福建省水产厅资助(闽水外经 9664)

第一作者: 许玉德(1942-), 男, 福建漳平人, 副教授, 主要从事动物生理及遗传育种研究。E-mail: lixu@jingxian.xmu.edu.cn

罗非鱼、莫桑比克罗非鱼等;另一种是雌性异质型,雄性由同质的 ZZ 性染色体决定,而雌性由异质的 ZW 性染色体决定,如奥利亚罗非鱼等。采用罗非鱼种间杂交法繁育高雄性率的杂种鱼实际上就是雄性异质型和雌性异质型两种鱼之间进行杂交,即用雌性的尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)和雄性的奥利亚罗非鱼(*Oreochromis aureus*)杂交而获得杂交一代^[6]。这个杂交一代具有显著的雄性优势和杂种优势:如雄性率可高达 95%;没有因自交而造成密度过大或个体良莠不齐的现象,生长速度比普通鱼苗快,年产量高;抗寒,耐低氧,抗病力强等。我们于 1997 年 - 1998 年间,引进一批原产于埃及的尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼,通过形态学鉴定和生化表现型检测,筛选出种质优良的个体进行纯化培育,并以其为亲本获得高雄性率的罗非鱼苗。本文以上述两种罗非鱼及杂交一代为材料,用 20 个随机引物对其精巢基因组 DNA 进行 RAPD 分析,寻找罗非鱼种质鉴定及其杂交一代杂优效应的分子标记,为进一步阐明罗非鱼杂交一代优势性状的形成机理提供分子生物学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物:尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼及其杂交一代各 6 尾,由福建省水产研究所罗非鱼种苗场提供,测试个体经严格的形态学鉴定和生化表型检测^[7]。

主要试剂:随机引物购自 Operon 公司, Taq 酶购自 Promega 公司,琼脂糖为 Sigma 公司产品,其余均为国产分析纯试剂。

仪器:PCR 仪为美国 PE 公司产品,型号为 Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler 480。

1.2 方法

精巢组织 DNA 的提取和纯化:将鱼致死后将精巢分离,每种鱼分成两组等量混匀, PBS 液漂洗,取 2g 样品加 2mL TE 缓冲液,冷冻匀浆,加 1/10 体积 10% SDS 混匀, 70℃ 水浴 20min。离心,取上清,用等体积酚/氯仿抽提,取上清, 2 倍乙醇沉淀 DNA, 70% 乙醇漂洗后,溶于 TE 缓冲液,加 RNaseA 至终浓度为 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 37℃ 保温 1.5h,加蛋白酶 K 20 μg , 50℃ 保温 3h,等体积酚/氯仿抽提, 2 倍体积无水乙醇漂洗,风干后溶于 20 μL 超纯水, 4℃ 保存。

RAPD 扩增反应总体积为 25 μL ,其中含有 10mmol L^{-1} Tris - HCl (pH9.0), 20mmol L^{-1} KCl, 0.1% TritonX-100, 2mmol L^{-1} MgCl₂, dATP、dCTP、dTTP、dGTP 各 0.1mmol L^{-1} , 1.2 ng μL^{-1} 引物,约 25ng DNA, 1.5 U Taq 酶。扩增反应在 Perkin Elmer Cetus DNA 扩增仪上进行。反应程序为 94℃, 3min; 94℃, 1min, 36℃, 1min, 72℃, 2min, 35 个循环; 72℃ 延伸 5min。扩增产物经 1.4% 琼脂糖凝胶电泳分离,经 EB 染色后在紫外灯下观察结果。

数据处理:随机引物的扩增产物根据如下公式^[8]计算:

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

式中 F 值为共享度(也称遗传相似指数), N_{xy} 是 x 、 y 两物种共有的扩增带, N_x 和 N_y 是物种 x 和 y 分别拥有的扩增带。当 $F = 1$ 时,两物种的扩增带完全相同,即两者有高度相同的 DNA 序列;当 $F = 0$ 时,两物种的扩增带完全不同,此时两者具有高度相异的遗传性。两物种间的遗传距离指数为 $1 - F$ 。

2 结果分析

用 20 个随机引物对尼罗罗非鱼、奥利亚罗非鱼及其杂交一代精巢基因组 DNA 进行扩增反应,均能产生明显扩增带,不同引物对不同种罗非鱼 DNA 的扩增产物各不相同(图 1)。

在 20 个引物中,有 12 个引物所扩增出的 DNA 片段在所测的三种鱼之间没有差异,扩增出有差异片段的 8 个引物见表 1。

统计 20 个引物在三种鱼基因组 DNA 的扩增带数目,并按 Nei 氏公式计算在三种鱼之间的扩增产物共享度列于表 2。

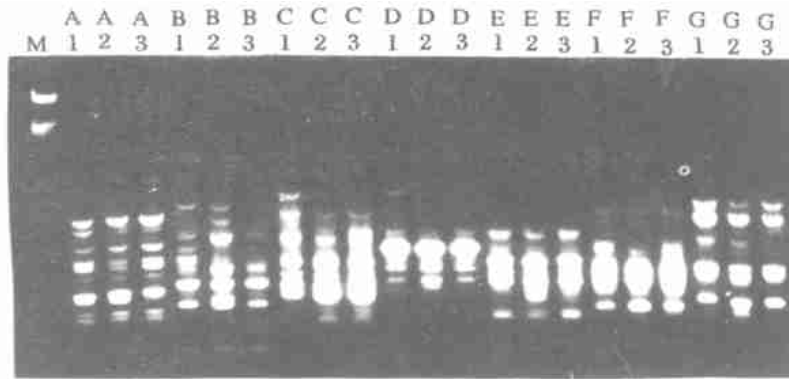


图 1 部分随机引物对三种鱼基因组 DNA 的扩增电泳图

Fig. 1 The electrophoresis patterns of RAPDs of three species of fish amplified by some primers

A: OPU - 06 B: OPZ - 14 C: OPZ - 18 D: OPY - 01 E: OPU - 05 F: OPG - 01 G: OPG - 02
 1. 尼罗罗非鱼; 2. 奥利亚罗非鱼; 3. 杂交一代; M. Marker

表 1 RAPD 反应中扩增产物出现差异的引物名称

Tab. 1 Names of arbitrary primers that are amplified different fragments in three species of fish

引物名	序列	引物名	序列
OPU - 05	TTGGCGGCCT	OPY - 16	GGGCCAATGT
OPU - 06	ACCTTCGGAC	OPZ - 04	AGGCTGTGCT
OPY - 01	GTGGCATCTC	OPZ - 14	AGGGTCCCTC
OPY - 15	AGTCGCCCTT	OPZ - 18	GAGGTCCACA

表 2 三种鱼随机扩增多态性 DNA 片段共享度 (F)

Tab. 2 The proportion of RAPD fragments shared (F) by three fishes

组别	A	B	C	D	E	F
	DNA 片段数	127	126	122	125	123
B	126	125 (0.9881)				
C	122	112 (0.8996)	110 (0.8871)			
D	125	111 (0.8809)	109 (0.8617)	120 (0.9639)		
E	123	120 (0.9600)	118 (0.9478)	110 (0.8980)	113 (0.9113)	
F	126	114 (0.9012)	117 (0.9294)	115 (0.9274)	116 (0.9243)	118 (0.9478)

注: 括号内数字为共享度; A、B 组为尼罗罗非鱼, C、D 组为奥利亚罗非鱼, E、F 组为杂交一代。

由表 2 可见, 尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼基因组 DNA 扩增产物的共享度为 0.8617 ~ 0.8996, 遗传距离指数为 0.1383 ~ 0.1004, 而杂交一代与其亲本的扩增产物共享度为 0.8980 ~ 0.9478, 遗传距离指数为 0.1020 ~ 0.0522。

采用最短距离法对三种鱼 6 个组分析, 则三种鱼被聚在同一类(图 2)。杂交一代群体内个体差别相对大些, 差值为 5.22%, 而尼罗罗非鱼及奥利亚罗非鱼的种内个体差异较小, 差值分别为 1.19% 和 3.60%。表明种间差异大于种内差异, 而杂交一代个体差异也大于亲本种内个体差异。杂交一代与尼罗罗非鱼相对较近, 差值为 9.80%, 而与奥利亚罗非鱼差值则达到 13.81%。

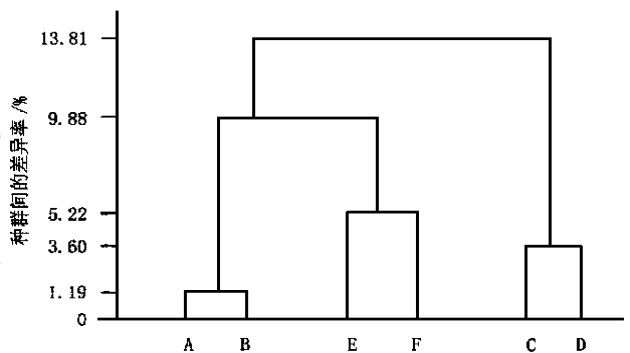


图 2 根据最短距离得到的系统树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on the genetic distance method
 A、B: 尼罗罗非鱼; C、D: 奥利亚罗非鱼; E、F: 杂交一代

3 讨论

在淡水鱼养殖业中,最先考虑的问题之一是种的选择和种的鉴定。从遗传角度上说,加强罗非鱼遗传育种,保持优良经济性状的稳定,是保护种质资源的重要措施。从生产角度上说,定向选育或培育鱼种是鱼类资源综合利用的基本前提。目前,将外部形态特征以及受基因控制的生理生化表现型作为种内遗传结构稳定性和种群差异鉴定的主要指标已有较多的报道,但由于罗非鱼种类多样,来源比较复杂,容易发生种间杂交,纯种的保存相对较难,种的特异性和种的遗传变异性较难界定。因此,寻求新的分子标记物和分子标记技术极为重要^[9]。本文用 20 个引物对尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼的精巢 DNA 进行扩增反应,结果发现有 12 个引物在三种鱼间的扩增带型相同,两亲本鱼的共享度达到 0.861 7~0.899 6,其差异主要表现在 OPU-05、OPY-01、OPZ-14 和 OPZ-18 等 4 个引物所扩增的 DNA 片段上。特别是引物 OPZ-14 和 OPZ-18,经 3 次重复实验,都能扩增出清晰的特异区带,再现性好。这些结果说明,引物能否在不同物种之间揭示出足够的多态性是很重要的,本实验所用的引物 OPZ-14 和 OPZ-18 能够在尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼之间揭示出显著多态性,并在同一鱼种的不同个体间也找到差异,因此作为鉴定两种鱼的分子标记具有较高的可信度。

根据杂种优势的显性学说,杂交改变了杂交后代的基因组合,增加了基因的杂合性,改变了不同位点上基因互作,在绝大多数基因型和环境之间获得一种相互协调的平衡,因而提高了杂种的生活力、繁殖力和生长速度等重要遗传性状。将尼罗罗非鱼与奥利亚罗非鱼及其杂交一代用 20 个引物随机扩增的多态性 DNA 片段作对比分析,可以看到,尼罗罗非鱼所特有的 14 条扩增片段有 11 条为杂交一代所继承,特征带的遗传率为 71.43%,差异出现在引物 OPU-06、OPZ-04 和 OPZ-14 的扩增产物上;奥利亚罗非鱼特有的 10 条扩增片段中有 2 条在杂交一代中体现,特征带的遗传比率为 16.67%,差异发生在引物 OPU-05、OPU-06、OPY-01、OPZ-04 和 OPZ-18 上。母本尼罗罗非鱼特有扩增片段在杂交一代上的表达高于父本。显然,杂交一代的基因组 DNA 产生了更为丰富的多态性,其基因杂合性增强了,而这些多态性的形成既源于双亲的遗传又源于杂交后遗传性的变异,这是杂种优势得以形成的重要分子生物学基础。在鱼类育种工作中,正确选择杂交亲本,使杂交后代 DNA 产生足够的多态性,不失为获得较高杂种优势率的重要技术之一。

由于 RAPD 反应中各成分之间的动态相互作用直接决定着产物的质量与数量,使得 RAPD 重复性一直成为研究者普遍关注的问题。因此,严格控制反应条件至关重要,特别是在采用随机引物寻找 RAPD 标记时,欲要获得含有特定带型的扩增产物,应当使用固定的扩增条件,选用适宜的随机引物,甚至同一批次的反应试剂。

参考文献:

- [1] 张中英,杨永铨,林克宏. 鱼类性别的人工控制研究介绍[J]. 动物学杂志,1983,(5):55-57.
- [2] 吴融. 鱼类性别控制在水产养殖上的应用[J]. 生物学通报,1991,1:10-14.
- [3] Chen T P. Preliminary studies on the sex-determining mechanism of *Tilapia mossambica* Peters and *T. homorum* Trewavas[J]. Verh Int Ver Theor Agnew Limnol, 1996,17: 719-724.
- [4] Kallman K D. Evidence for the existence of transformer genes for sex in the teleost xiphorus maculatus[J]. Genetics, 1968,60:811-828.
- [5] 张玉书. 鱼类性别分化的遗传学和发生生理学研究[J]. 淡水渔业,1979,(4):32-35.
- [6] 王楚松. 奥尼鱼(*S. nilotica* × *S. aurea*)杂种优势利用的研究[J]. 淡水渔业,1989,(6):14-15.
- [7] 许玉德,钟建兴,郑森林. 尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼性腺的 RAPD 分析[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1999,38(5):793-796.
- [8] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979,76: 5269-5273.
- [9] 林万明,杨瑞馥,黄尚志,等. PCR 技术操作和应用指南[M]. 北京:人民军医出版社,1995. 61-64.