

文章编号:1000-0615(2007)03-0411-05

·研究简报·

## 尼罗罗非鱼与萨罗罗非鱼及其正反杂交后代的微卫星分析

颜 标, 李思发, 蔡完其

(上海水产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)

关键词: 尼罗罗非鱼; 萨罗罗非鱼; 杂交后代; 基因组 DNA; 微卫星标记

中图分类号: S 917 文献标识码: A

### Microsatellite analysis of *Oreochromis niloticus*, *Sarotherodon melanotheron* and their reciprocal hybrids

YAN Biao, LI Si-fa, CAI Wan-qi

(Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecosystem Certificated by the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

**Abstract:** Using microsatellite markers with 10 pairs of primers, genetic structure of *Oreochromis niloticus*, *Sarotherodon melanotheron* and their hybrids were analyzed. The results suggested that: ① Six pairs of primers showed a rich polymorphic, which can be used as genetic markers for the genetic diversity study of these tilapias. ② The analysis based on the six pairs of primers showed that the average heterozygosity (H) ranged as: *O. niloticus* ♀ × *S. melanotheron* ♂ (0.725), *S. melanotheron* ♀ × *O. niloticus* ♂ (0.692), *S. melanotheron* (0.537), *O. niloticus* (0.485). The highest effective numbers of alleles ( $N_e$ ) existed in *O. niloticus* ♀ × *S. melanotheron* ♂ (3.79), the lowest existed in *S. melanotheron* (1.92). The average polymorphism information content (PIC) of 4 tilapias was 0.584, the rank from high to low as, *O. niloticus* ♀ × *S. melanotheron* ♂ (0.668), *S. melanotheron* ♀ × *O. niloticus* ♂ (0.643), *O. niloticus* (0.375), *S. melanotheron* (0.333). ③ The fact of enhanced heterozygosity of hybrids suggested that there were the genetic basement of cross breeding in tilapia.

**Key words:** *Oreochromis niloticus*; *Sarotherodon melanotheron*; hybrids; genomic DNA; microsatellite markers

微卫星 (microsatellite) 技术是近年来广泛应用的 DNA 标记, 具有重复性好、较易操作和共显性的特点<sup>[1]</sup>。在硬骨鱼类中表现出高度多态性, 已在家系鉴定、遗传作图、群体遗传分析、育种以及系统发生研究等多个领域得到应用。尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 是我国主要淡水养殖鱼

类, 生长快, 耐盐能力一般; 萨罗罗非鱼 (*Sarotherodon melanotheron*) 耐盐能力强, 适合咸淡水养殖, 但生长较慢。我们期望通过这两种鱼的人工杂交, 筛选和培育出既有较高耐盐性, 又有较快生长速度的罗非鱼养殖新品种。本文利用 10 对微卫星引物对尼罗罗非鱼、萨罗罗非鱼及其正

收稿日期: 2006-04-07

资助项目: 国家“十五”攻关项目——尼罗罗非鱼选育技术 (2001BA505B0513)

作者简介: 颜 标 (1982-), 男, 山东曲阜人, 硕士, 主要从事水产动物种质资源与种苗工程研究。E-mail: byan@stmail.shfu.edu.cn

通讯作者: 李思发, Tel: 021-65710333, E-mail: sfl@shfu.edu.cn

反杂交子一代的遗传结构进行研究,寻找罗非鱼种质鉴定的分子标记,探讨罗非鱼杂种优势的分子遗传基础,以期耐盐罗非鱼新品种的选育提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料与 DNA 提取

尼罗罗非鱼(以下简称尼罗)、萨罗罗非鱼(以

下简称萨罗)、尼罗罗非鱼♀ × 萨罗罗非鱼♂(以下简称尼罗 × 萨罗)以及萨罗罗非鱼♀ × 尼罗罗非鱼♂(以下简称萨罗 × 尼罗),均采自上海水产大学种质试验站。基因组 DNA 的提取采用稍加修改的酚/氯仿法<sup>[2]</sup>。

### 1.2 微卫星引物

根据文献[3-5]提供的微卫星序列,在上海生工合成如下引物,如表 1。

表 1 10 对微卫星引物序列、特异退火温度

Tab.1 Sequence of ten microsatellite marker primers used in this study, specific annealing temperature of PCR amplification

基因座位 locus	上游序列 forward primer sequences	下游序列 reverse primer sequences	退火温度(℃) T anneal
PRL1	GTTAGCCCCCTCCTCACTCT	ACCTTGCTCGTCACACCTG	53.8
PRL2	TCGTGTCTTGTGGGGAAACC	TGAATGGATGCAACAGGATG	60.5
PRL3	CTTAACATTTTCACCTTCACG	CTTGCCTCCATTTTATAGTTCCTT	65.5
IGF	ATGCTAGCAAACATCAAAGGTC	GATATGCTGATGATGCACAGAGTC	67.0
ISP	TGAGCTGAGCAGATGGAGCAGAAG	ATGAACAGCCCTGTGAAGAGAGG	62.5
Os-7	TGTCTGCTGCCTCGGCCTGACTG	TGCCGCATCGCCAG	58
Os-7R	AGAGGAAATGAGCAGCCTC	GATGCGGCAACAGTTATGTC	54
Os-25	TTGTGAAATTGCATTGCACTC	AACTCCCTTTGATCCTCTGC	53
Os-64	CAGTGTCTTCAGTTCCTTGC	CAGAAGCATCTTATTGATGAC	54
Os-75	AGCTAAAATAATGGAATCAC	CCACAGAGTCATGGTTTAC	49

### 1.3 微卫星 PCR 扩增及产物检测

反应体系为:3 μL buffer(10 mmol · L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 9.0, 50 mmol · L<sup>-1</sup> KCl, 3.0 mmol · L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 0.001% 的明胶), 0.1 mmol · L<sup>-1</sup> 每种 dNTP, 引物浓度为 0.2 μmol · L<sup>-1</sup>, 约 100 ng 基因组 DNA, 1 单位 Taq 酶, 反应总体积为 25 μL, 加入 30 μL 石蜡油。反应在 Eppendorf Mastercycler Gradient PCR 仪上进行。

PCR 反应程序为:94 ℃ 预变性 4 min, 接着 94 ℃ 30 s, 49 ~ 70 ℃ (根据引物的退火温度进行调整)30 s, 72 ℃ 30 s。35 个循环后, 72 ℃ 延伸 10 min。扩增产物在 8% (w/v) 的非变性聚丙烯酰胺电泳检测, 银染, 利用数码相机拍照。

### 1.4 数据统计分析

根据电泳图谱进行微卫星的多态性分析。

(1) 群体平均杂合度期望值:

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

(2) 有效等位基因数:

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

(3) 多态信息含量:

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

其中  $p_i$ 、 $p_j$  分别为第  $i$  和第  $j$  个等位基因的频率,  $n$  为等位基因数目。

(4) 个体间遗传相似指数<sup>[10]</sup>:

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

其中  $n_x + n_y$  是两个材料所有的等位基因数,  $n_{xy}$  为个体  $X$ 、 $Y$  共有位点数。

(5) 遗传距离:  $D = 1 - I$

### 1.5 聚类分析

根据群体间遗传距离, 采用非加权配对算术平均法(UPGMA)构建尼罗、萨罗及其杂交后代的系统树<sup>[11]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 微卫星 PCR 结果

在 10 对引物中, 引物 Os-64 和 Os-75 只能在尼罗和尼罗 × 萨罗中扩增出条带, 而引物 Os-25 和 IGF 只能在萨罗和萨罗 × 尼罗中扩增出条带。其他 6 对引物(PRL1, PRL2, PRL3, Os-7, Os-7R, Os-25, ISP)在 4 种鱼中都可扩增出条带, 除 Os-7 在萨罗中表现出单态外, 其他均呈多态。扩增产物片段大小范围为 92 ~ 350 bp(图 1)。

### 2.2 有效等位基因数、遗传杂合度和多态信息含量

4 种鱼中, 尼罗♀ × 萨罗♂ 的有效等位基因数最大(3.79), 其次是萨罗♀ × 尼罗♂ (3.53)

和尼罗(2.21),萨罗最小(1.92)。

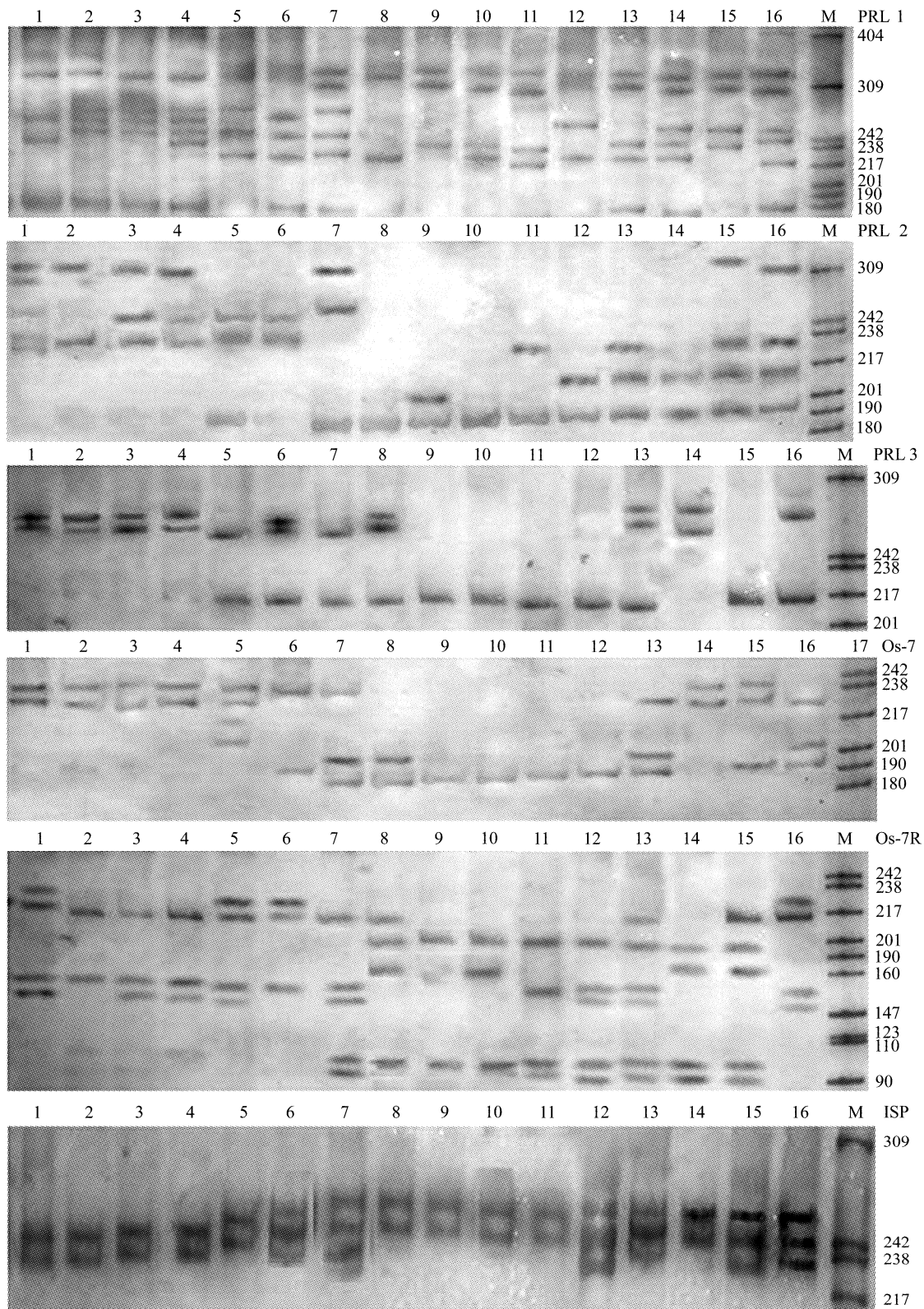


图 1 4 种罗非鱼 6 对微卫星引物部分电泳结果

Fig.1 The electrophoresis results of six microsatellite primers in part individuals of four tilapias

1~4: 尼罗罗非鱼; 5~8: 尼萨罗非鱼; 9~12: 萨罗罗非鱼; 13~16: 萨尼罗非鱼; 2~M: 分子标记(PBR322/MSP I)  
 1~4: *O. niloticus*; 5~8: *O. niloticus* ♀ × *S. melanotheron* ♂; 9~12: *S. melanotheron*; 13~16: *S. melanotheron* ♀ × *O. niloticus* ♂; M: Marker(PBR322/MSP I)

平均遗传杂合度最高的是尼罗♀×萨罗♂(0.725),其次是萨罗♀×尼罗♂(0.692)、萨罗(0.537),尼罗最低(0.485)。

从位点来看,多态信息含量最高的为萨罗♀×尼罗♂的PRL1位点(0.753),最低的为萨罗的Os-7位点(0);从群体来看,4个群体鱼6个微卫星位点的PIC平均为0.584,其中萨罗为0.333,高度多态性位点占总位点的16.7%,中度多态性位点占总位点的66.7%,低度多态位点占总位点的16.7%;萨罗♀×尼罗♂PIC为0.643,高度多态性位点占总位点的88.3%,中度多态性位点占总位点的11.7%;尼罗PIC为0.375,高度多态性位点占总位点的16.7%,中度多态性位点占总位点的83.3%;尼罗♀×萨罗♂PIC为0.673,高度

多态性位点占总位点的66.7%,中度多态性位点占总位点的33.3%。以上结果表明,本实验所选的6个微卫星位点具有丰富的多态性,可作为尼罗罗非鱼与萨罗罗非鱼及其杂交后代的遗传标记,用来分析四种鱼的遗传多样性。

### 2.3 遗传距离和遗传相似指数

4种罗非鱼的遗传相似指数的平均值依次为:萨罗(0.358)、尼罗(0.349)、萨罗♀×尼罗♂(0.341)、尼罗♀×萨罗♂(0.232)。

由表2和图2可以看出:萨罗同萨罗♀×尼罗♂的遗传距离最近,聚为一支,然后是尼罗同尼罗♀×萨罗♂聚为一支,萨罗罗非鱼同尼罗罗非鱼相隔最远。

表2 4种罗非鱼间的遗传距离和遗传相似指数

Tab.2 Genetic distances and genetic similarity among four populations of tilapias

	萨罗罗非鱼 <i>S. melanotheron</i>	萨罗♀×尼罗♂ <i>S. melanotheron</i> ♀× <i>O. niloticus</i> ♂	尼罗♀×萨罗♂ <i>O. niloticus</i> ♀× <i>S. melanotheron</i> ♂	尼罗罗非鱼 <i>O. niloticus</i>
萨罗罗非鱼 <i>S. melanotheron</i>	-	0.176	0.245	0.654
萨罗♀×尼罗♂ <i>S. melanotheron</i> ♀× <i>O. niloticus</i> ♂	0.824	-	0.234	0.523
尼罗♀×萨罗♂ <i>O. niloticus</i> ♀× <i>S. melanotheron</i> ♂	0.745	0.766	-	0.218
尼罗罗非鱼 <i>O. niloticus</i>	0.346	0.477	0.782	-

注:对角线以上的数字表示遗传距离,对角线以下的数字表示遗传相似性指数

Notes: The datas above diagonal mean genetic distances and below mean genetic similarity

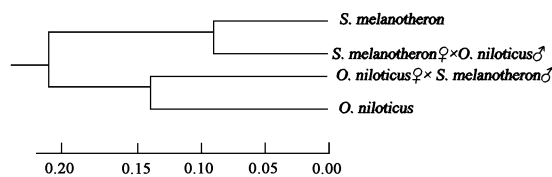


图2 4种罗非鱼的聚类分析图

Fig.2 Cluster dendrogram of four populations of tilapias

### 3 讨论

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定性和种群差异鉴定的主要指标已有较多报道<sup>[12-14]</sup>,但由于罗非鱼种类较多,来源比较复杂,容易发生种间杂交,纯种的保存相对较难,物种的特异性和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。

本文用10对微卫星引物对尼罗罗非鱼和萨罗罗非鱼及其杂交子一代进行遗传结构研究,6对引物在4种鱼间的扩增带型出现了差异。通过电泳发现:引物PRL1和PRL3在萨罗中扩增出特有条带;引物PRL3和ISP在萨罗♀×尼罗♂鱼中扩增出特有条带;PRL2在尼罗鱼中扩增出特有条带;ISP在尼罗♀×萨罗♂中扩增出特有条带。因此,用较少的微卫星遗传标记即可鉴别萨罗罗非鱼、尼罗罗非鱼及其杂交种。

遗传连锁分析中,PIC值大于0.70的微卫星被认为是最理想的标记<sup>[15]</sup>,这种情况下,双亲在该位点通常是杂合的,在其后代中可以清楚地观察到等位基因的分离。萨罗♀×尼罗♂和尼罗♀×萨罗♂在PRL1座位、PRL2座位的PIC均大于

0.70,所以可作为这 2 种杂交鱼进一步连锁分析的候选标记座位。

有效等位基因数是基因纯合度的倒数,反映了等位基因间的相互影响,可作为群体遗传变异的一个指标。杂交后代萨罗♀×尼罗♂和尼罗♀×萨罗♂明显大于亲本尼罗和萨罗的有效等位基因数。说明杂交后代的基因杂合性明显增强,这是杂种优势得以形成的重要遗传物质基础之一。Heame 等<sup>[16]</sup>指出,等位基因在群体中分布越均匀,有效等位基因数就越接近所检测到的等位基因的绝对数。萨罗、萨罗×尼罗、尼罗和尼罗×萨罗在 6 个微卫星座位平均等位基因数分别为 1.9、3.6、2.1 和 3.8。而平均有效等位基因频率分别为 1.92、3.53、2.21 和 3.79。说明每种鱼的等位基因在各自群体中的分布比较平均。

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。当基因型和环境之间获得一种相互协调的平衡时,就能提高杂种的生活力、生长速度等重要遗传性状。本试验发现:尼罗所特有的 19 条扩增片段分别在 16 条和 9 条在尼罗♀×萨罗♂和萨罗♀×尼罗♂中得到了继承,特征带的遗传率分别为 84.2% 和 47.4%;而萨罗所特有的 19 条扩增片段分别在 8 条和 12 条在尼罗♀×萨罗♂和萨罗♀×尼罗♂中得到了继承,特征带的遗传率分别为 42.1% 和 63.2%。而在尼罗♀×萨罗♂和萨罗♀×尼罗♂,都扩增到 26 条带,杂交一代的基因组 DNA 具有更为丰富的多态性,基因杂合性显著增强。这一更丰富的多态性的形成,既源于双亲的遗传,又源于杂交后遗传性的变异,仍是杂种优势得以形成的重要分子生物学基础。

Ambali 等<sup>[3]</sup>在研究 Malawi 地区罗非鱼遗传特性改变时,使用了 6 对微卫星引物,Yue 等<sup>[4]</sup>对尼罗罗非鱼和莫桑比克罗非鱼的研究中使用了 6 对微卫星引物进行多态性分析,Hesham 等<sup>[17]</sup>在对两种罗非鱼的遗传多样性和分化进行的研究也使用了 6 对微卫星引物。因此本试验从多态性较高的 10 对微卫星引物中挑选 6 对引物进行尼罗罗非鱼与萨罗罗非鱼及其正反杂交后代的遗传结构分析,应该是有一定说服力和可比性的。

#### 参考文献:

- [1] 徐晋麟,徐沁,陈淳. 现代遗传学原理[M]. 北京:科学出版社,2003:224-225.
- [2] 黄培堂,俞炜源,陈添弥,(译). 分子克隆实验指南(第三版)[M]. 北京:科学出版社,2003:463-466.
- [3] Ambali A J D, Doyle R W, Cook D I. Genetic changes in *Oreochromis shiranus* (Trewavas) associated with the early stages of national aquaculture development in Malawi [J]. *Aquaculture Research*,1999, 30(8):579-588.
- [4] Yue G H, Orban L. Microsatellites from genes show polymorphism in two related *Oreochromis* species [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2002,2:1-2.
- [5] Streehman J T, Kocher T D. Microsatellite variation associated with prolactin expression and growth of salt-challenged tilapia[J]. *Physiol Genomics*, 2002,9:1-4.
- [6] Nei M, Roychoudury A K. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance[J]. *Genetics*,1997,76(2):379-390.
- [7] 储明星,程金华,过纬. 微卫星标记 OarAEI01 和 BM1329 在五个绵羊品种中的初步研究[J]. *遗传学报*, 2001,28(6):510-517.
- [8] 顾万春. 统计遗传学[M]. 北京:科学出版社,2004:165-196.
- [9] Botstein D, White R L, Skolnick M. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism[J]. *Am J Hum Genet*,1980,32:314-331.
- [10] Nei M, Maruyama T, Chakraborty R. The bottleneck effect and genetic variability in population[J]. *Evolution*, 1975,29:1-10.
- [11] Ambali A J D, Doyle R W, Cook D I. Development of polymorphic microsatellite DNA loci for characterizing *Oreochromis shiranus* subspecies in Malawi[J]. *Journal of Applied Ichthyology*,2000,16(3):121-125.
- [12] 李思发,李晨虹,李家乐. 尼罗罗非鱼品系间形态差异分析[J]. *动物学报*,1998,44(4):450-457.
- [13] Turner G F, Pitcher T J, Grimm A S. Identification of the Lake Malawi *Oreochromis* (*Nyasalapia*) spp. using multivariate morphometric techniques[J]. *Journal of Fish Biology*, 1989,35(6):799-812.
- [14] Witten P E, Falk T M, Abban E K. The use of xenoantigenic antisera for the identification of tilapia species: comparative laboratory and field studies [J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2003,19(6):352-358.
- [15] Shoniwa F F, Howard J H. Electrophoretic identification and phylogenetic relationships of indigenous tilapia species of Zimbabwe[J]. *Journal of Fish Biology*, 1998, 53(6):1178-1206.
- [16] Heame C M, Ghosh S, Todd J A. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits[J]. *Trends in Genetics*, 1992, 8: 288-294.
- [17] Hesham A H, John G. Genetic diversity and differentiation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) revealed by DNA microsatellites[J]. *Aquaculture Research*, 2005,35(6):587-593.

## 会议预告

### 第八届全国水产青年学术年会 暨首届中国水产大学生论坛的第一轮通知

#### 各有关单位:

为进一步活跃全国水产青年科技工作者、及与水产相关专业的大学生、研究生之间的学术交流,促进学术进步及青年水产科技工作者、水产学子的成长,我会拟定于2007年7月中旬在西南大学举办第八届全国水产青年学术年会暨首届中国水产大学生论坛,会期3天(具体时间地点请见第二轮通知)。请各单位特别是大会指导委员会成员单位认真组织本单位青年科技工作者(45周岁以下),大学生、研究生参会交流,并欢迎港、澳、台相关人员参会交流。现将有关事宜通知如下:

一、主办单位:中国水产学会,西南大学

二、承办单位:西南大学,重庆水产学会,中国水产学会西南大学学生会会员工作站

#### 三、大会指导委员会

主任委员:唐启升院士(中国科协副主席,中国水产学会理事长、黄海水产研究所所长)

副主任委员:王小佳教授(西南大学校长),司徒建通研究员(中国水产学会副理事长兼秘书长),赵法箴院士(黄海水产研究所),雷霖霖院士(黄海水产研究所),徐洵院士(国家海洋局第三海洋研究所),林鹏院士(厦门大学),林浩然院士(中山大学),刘筠院士(湖南师大),张合成院长(中国水产科学研究院)

委员:董双林教授(中国海洋大学副校长),黄硕琳教授(上海水产大学副校长),李鸿鸣教授(大连水产学院院长),吴灶和教授(广东海洋大学副校长),关瑞章教授(集美大学副校长),苗振清教授(浙江海洋学院院长),张跃光教授(西南大学党委副书记),谢平教授(华中农大水产学院院长),阎斌伦教授(淮海工学院海洋学院副院长),桂建芳研究员(中科院水生所所长),张国范研究员(中科院海洋研究所副所长),黄良民研究员(中科院南海海洋研究所副所长),王清印研究员(黄海水产研究所党委书记),陈雪忠研究员(东海水产研究所所长),贾晓平研究员(南海水产研究所所长),陈儒贤研究员(黑龙江水产研究所党委书记),张显良研究员(长江水产研究所所长),吴淑勤研究员(珠江水产研究所所长),徐跑研究员(淡水渔业研究中心副主任),徐皓研究员(渔业机械仪器研究所所长),谢小军教授(重庆水产学会副理事长)

#### 四、主题报告

大会将邀请我国水产界院士及著名专家就我国及世界水产业的学科前沿、发展方向、先进技术应用等作主题报告。

#### 五、专题交流:

1. 水产养殖学专题
2. 水生生物学专题
3. 水产动物营养与饲料专题
4. 水产动物疾病与免疫专题(含水产质量安全控制)
5. 水产遗传育种及生物技术专题
6. 渔业资源与环境专题(含微生态制剂应用)
7. 渔业管理、海洋渔业及水产品加工专题

#### 六、专场交流会:

1. 大学生学习及创业经验交流会
2. 渔业新技术新成果交流会
3. 企业专场交流会

#### 七、大会秘书组

组长:吴青, 成员:郑宗林、王莲瑾、李萍、刘鸿艳、朱小勋、潘文彬、马军

#### 八、征文要求及提交

请于2007年5月31日前提交论文中文和英文摘要(300-500字),以便会前编辑“第八届全国水产青年学术年会暨首届中国水产大学生论坛论文摘要集”。报到时请将论文全文电子版交给会务组。所有提交论文全文经大会学术委员会评选后,对获奖论文予以表彰奖励。优秀论文将收入《水产学报》、《西南大学学报》(自然科学版)等。

论文摘要请提交给“第八届全国水产青年学术年会暨首届中国水产大学生论坛秘书组”。

邮编:402460, 联系人:吴青 电话 13509473487;刘鸿雁 电话 13996466806;郑宗林 电话 13996250061, 电子邮件: csfxn@163.com, 电话(传真):023-46751091

#### 九、会议费

注册分为提前注册和现场注册两种。提前注册费为每人600元,现场注册费为每人700元,学生代表注册费为每人100元。中国水产学会会员优惠20%。会议期间,食宿费自理(学生代表由大会资助)。

提前注册代表请将注册费汇至:

收款单位:西南农业大学, 开户行:工商银行重庆分行北碚朝阳分理处, 账号:3100028109024965648