

# 萨罗罗非鱼(*Sarotherodon melanotheron*)与其他 5 种罗非鱼遗传多样性比较研究\*

李学军<sup>1,2</sup> 李爱景<sup>1</sup> 李思发<sup>2</sup> 蔡完其<sup>2</sup>

(1. 河南师范大学生命科学学院 新乡 453007; 2. 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 201306)

**提要** 根据已知罗非鱼相关基因序列设计了 5 对微卫星引物, 对萨罗罗非鱼、尼罗罗非鱼、以色列红罗非鱼、台湾红罗非鱼、奥利亚罗非鱼和齐氏罗非鱼 6 种罗非鱼进行遗传多样性分析, 结果表明: (1) 6 种罗非鱼在 5 个微卫星座位上共发现 22 个等位基因和 49 种基因型, 萨罗罗非鱼、台湾红罗非鱼及齐氏罗非鱼的等位基因数和基因型数较少, 萨罗罗非鱼特有的等位基因是 190 和 204, 特有的基因型为 190/190、204/204、270/223 和 270/243; (2) 与另外 5 种罗非鱼相比, 萨罗罗非鱼的有效等位基因数( $N_e$ )、平均杂合度期望值( $H_e$ )和多态信息含量值( $PI_C$ )都较低, 分别为 1.812、0.331 和 0.326; (3) 6 种罗非鱼明显分为 2 支, 萨罗罗非鱼单独为一支, 另外 5 种罗非鱼聚为一支; (4) 萨罗罗非鱼保种的主要问题是要特别防止近亲繁殖。

**关键词** 萨罗罗非鱼, 微卫星标记, 遗传多样性, 种质资源保护  
**中图分类号** Q959.468

依照 Trewavas(1983)的分类方法, 罗非鱼(*Tilapias*)可划分为底质产卵的 *Tilapia* 属、雄鱼口育的 *Sarotherodon* 属和雌鱼口育的 *Oreochromis* 属。*Oreochromis* 属和 *Tilapia* 属罗非鱼我国引进较早, 种类也较多。为了利用我国丰富的海水资源, 2002 年作者引进了西非耐盐能力强的萨罗罗非鱼(*Sarotherodon melanotheron*)(李学军等, 2005)。罗非鱼大都具有很强的繁殖能力, 属间、种间容易混杂, 为防止引进的萨罗罗非鱼与其它种类罗非鱼混杂, 非常有必要确定萨罗罗非鱼与其它种罗非鱼间的差异特征, 以保持原种的优良品质。

目前国内外对罗非鱼的种、属间差异的研究大多依据其生态习性和形态学指标(Trewavas, 1983; 陈素芝等, 1994; 李学军等, 2008a)。微卫星 DNA 是一种遍布于真核生物基因组的重复序列, 数量多、分布广、多态性丰富、呈共显性遗传、检测迅速方便, 作为分子标记, 已经广泛用于遗传育种及生物多样性

分析(徐莉等, 2002)。本文对我国新引进的萨罗罗非鱼与其它 5 种罗非鱼的 5 个微卫星位点差异进行了初步研究, 以期寻找萨罗罗非鱼种质特异性的遗传标记并进行科学保种提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

6 种罗非鱼均随机采自河北中捷国家级罗非鱼良种场。*Sarotherodon* 属的萨罗罗非鱼是 2002 年由美国引进, *Oreochromis* 属的尼罗罗非鱼(*O. niloticus*)是 1994 年由 ICLARM 引进, 以色列红罗非鱼(*Israel red tilapia*)是 *Oreochromis* 属罗非鱼的种间杂交后代, 2001 年由以色列引进, 奥利亚罗非鱼(*O. aureus*)是 1998 年由埃及引进, *Oreochromis* 属的台湾红罗非鱼(*O. niloticus*×*O. mossambica*)和 *Tilapia* 属的齐氏罗非鱼(*T. zillii*)引进时间不详。每种罗非鱼各取样 30 尾。剪尾鳍, 用 95%乙醇保存。

\* 农业部“948”国际引进合作项目, 993125 号; 河南省动物学重点学科资助, 2005—2007。李学军, 博士, 副教授, E-mail: xjli67@126.com

收稿日期: 2008-12-23, 收修改稿日期: 2009-03-15

## 1.2 实验方法

**1.2.1 基因组 DNA 的提取及 PCR 引物合成** 取保存的尾鳍材料, 剪其边缘部分, 切碎。采用酚/氯仿法提取基因组 DNA(迪芬巴赫等, 2006)。根据相关文献(Kocher *et al*, 1998; Yue *et al*, 2002)提供的罗非鱼催乳素基因(PRL)、类胰岛素生长因子基因(IGF)和胰岛素前体基因的(ISP)序列设计选择了 5 对微卫星引物, 由上海生工生物公司合成。引物微卫星引物序列、反应条件见表 1。

**1.2.2 PCR 及产物的电泳检测** 反应体系为: 3 $\mu$ l buffer (10mmol/L Tris-HCl, pH 9.0, 50mmol/L KCl, 3.0mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.001% 明胶), 0.1mmol/L 每种 dNTP, 引物浓度为 0.2 $\mu$ mol/L, 约 50—100ng 基因组 DNA, 1U *Taq* DNA 聚合酶(Biostar 产品), 反应总体积为 25 $\mu$ l, 加入 30 $\mu$ l 石蜡油。反应在 Eppendorf Mastercycler Gradient PCR 仪上进行, 循环程序为: 94 预变性 4min, 接着 94 30s, 53.8 (60.5、65.5、67.0、62.5) 30s, 72 30s。35 个循环后, 72 延伸 10min。取 10 $\mu$ l 扩增产物经 3.0% 高浓度琼脂糖凝胶电泳, E.B 染色, 于 Syngene 凝胶成像系统中照相、GeneTools 软件分析。

### 1.2.3 数据处理与分析

(1) 群体的遗传多样性指标(顾万春, 2004):

$$\text{有效等位基因数}(N_e) = \frac{1}{\sum_{i=1}^m p_i^2}$$

群体的平均杂合度期望值

$$(H_e) = \frac{1}{r} \sum_{i=1}^r \left( 1 - \sum_{i=1}^m p_i^2 \right)$$

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  $i$  个和第  $j$  个等位基因的频率,  $r$

为群体中的基因座数目,  $m$  为等位基因数目。

### (2) 遗传距离

Nei 氏标准遗传距离( $D_n$ )(Nei, 1978):

$$D_n = -\ln I, I = \frac{J_{xy}}{\sqrt{J_x J_y}}, J_x = \frac{1}{r} \sum_j \sum_i X_{ij}^2,$$

$$J_y = \frac{1}{r} \sum_j \sum_i Y_{ij}^2, J_{xy} = \frac{1}{r} \sum_j \sum_i X_{ij} Y_{ij}$$

其中,  $X_{ij}$ 、 $Y_{ij}$  分别为群体  $X$ 、 $Y$  第  $j$  座位第  $i$  个等位基因频率,  $r$  为群体中的基因座数目,  $m$  为等位基因数目。

**1.2.4 聚类分析** 根据群体间的遗传距离, 用 MEGA2 软件包非加权的组平均法(UPGMA)和邻接法(NJ)程序对三个群体进行聚类分析(Nei *et al*, 2002)。

## 2 结果

### 2.1 微卫星 PCR 结果

5 对微卫星引物都扩增出较好的谱带(图 1)。其中 PRL1 和 PRL2 在萨罗罗非鱼, PRL3 和 IGF 在齐氏罗非鱼中表现出单态, 其它均呈现多态性。扩增产物片段的大小范围为 190—307bp, 等位基因大小差异范围为 197bp。

### 2.2 6 种罗非鱼微卫星标记的基因频率和基因型

6 种罗非鱼在 5 个微卫星位点上共发现 22 个等位基因和 49 种基因型。萨罗罗非鱼、尼罗罗非鱼、以色列红罗非鱼、台湾红罗非鱼、奥利亚罗非鱼和齐氏罗非鱼 5 个微卫星座位平均等位基因数分别为 2、4.2、4.8、2.6、4.4 和 2; 基因型平均数分别为 2.4、4.4、5、2.4、5 和 2。萨罗罗非鱼、台湾红罗非鱼及齐氏罗非鱼的等位基因数和基因型数较少, 另外 3 种罗非鱼的等位基因数和基因型数较多。萨罗罗非鱼特有的等位基因是 190 和 204; 特有的基因型为 190/190、204/204、270/223 和 270/243。

表 1 5 对微卫星引物序列、重复序列及特异退火温度

Tab.1 Sequence and its repeats of five microsatellite marker primers used in this study, and specific annealing temperature of PCR amplification

基因座	引物序列(5'—3')	重复序列	退火温度( )
PRL1	F: GTTAGCCCCCTCCTCACTCT R: ACCTTGCTCGTCACACCTG	TG	53.8
PRL2	F: TCGTGTCTGTGGGGAAACC R: TGAATGGATGCAACAGGATG	CA	60.5
PRL3	F: CTTAACATTTCCACCTTCACG R: CTTGCCTCCATTTTATAGTTCCTT	CA	65.5
IGF	F: ATGCTAGCA AACATCAAAGGTC R: GATATGCTGATGATGCACAGAGTC	ATCT	67.0
ISP	F: TGAGCTGAGCAGATGGAGCAGAAG R: ATGAACAGCCCTGTGAAGAGAGG	CA	62.5

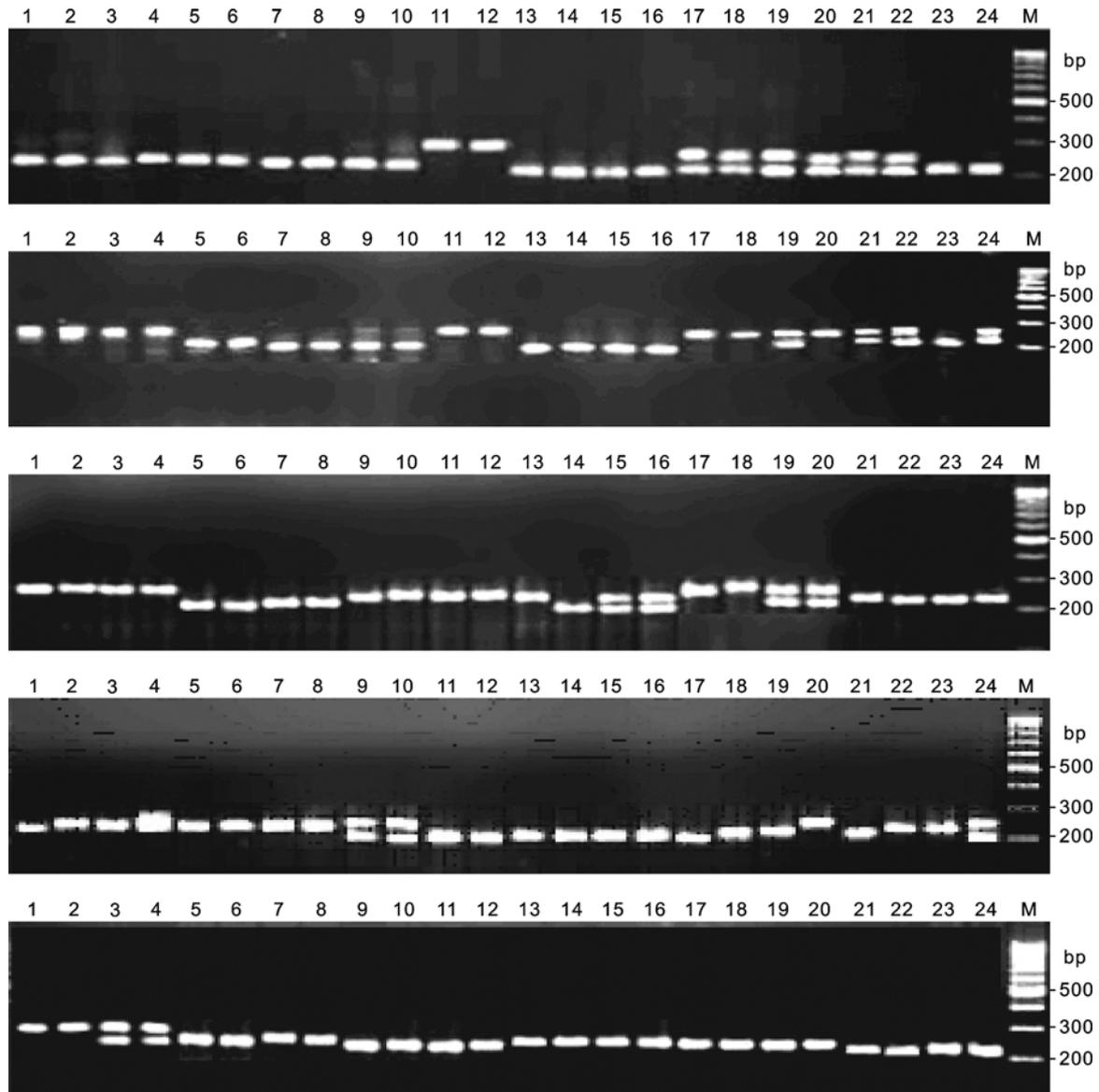


图 1 6 种罗非鱼 5 对微卫星引物部分电泳结果

Fig.1 The partial electrophoresis results of five microsatellite primers in six tilapias species  
各小图自上至下分别为: PRL1、PRL2、PRL3、IGF、ISP。1—4: 奥利亚罗非鱼; 5—8: 齐氏罗非鱼; 9—12: 尼罗罗非鱼;  
13—16: 萨罗罗非鱼; 17—20: 以色列红罗非鱼; 21—24: 台湾红罗非鱼; M: 分子标记(GeneRuler™ 100bp Ladder)

### 2.3 6 种罗非鱼的遗传多样性

6 种罗非鱼 5 个微卫星座位的遗传多样性指标平均值见表 2。萨罗罗非鱼的有效等位基因数( $N_e$ )、平均杂合度期望值( $H_e$ )和多态信息含量值( $PIC$ )都较低, 尤其是在 PRL1 和 PRL2 座位,  $H_e$ 、 $PIC$  值都为 0。另外值较小的还有台湾红罗非鱼和齐氏罗非鱼, 而尼罗罗非鱼、以色列红罗非鱼和奥利亚罗非鱼这 3 项多样性指标值较高。

### 2.4 6 种罗非鱼间的遗传距离

6 种罗非鱼间的 Nei 氏标准遗传距离见表 3 和图

2。结果表明: 6 种罗非鱼明显分为 2 支, 萨罗罗非鱼单独为一支, 其它 5 种罗非鱼聚为一支。其中, 台湾红罗非鱼和齐氏罗非鱼的遗传距离最近, 聚为一支, 然后与奥利亚罗非鱼聚在一起, 尼罗罗非鱼和以色列红罗非鱼聚为一支。

## 3 讨论

3.1 萨罗罗非鱼基于微卫星标记的遗传多样性特点  
本研究中, 除萨罗罗非鱼和齐氏罗非鱼的个别位点外, 5 个微卫星座位的等位基因频率分布都不均

表 2 6 种罗非鱼 5 个微卫星座位的遗传多样性指标平均值  
Tab.2 Mean indices of genetic diversity of five microsatellite locus in six tilapias species

座位和多态指标	萨罗罗非鱼(n=24)	尼罗罗非鱼(n=24)	以色列红罗非鱼(n=23)	台湾红罗非鱼(n=21)	奥利亚罗非鱼(n=23)	齐氏罗非鱼(n=21)
$N_e$	1.812	3.211	3.235	1.867	2.747	1.370
$H_e$	0.331	0.667	0.684	0.430	0.576	0.215
$PI_C$	0.326	0.692	0.676	0.366	0.619	0.210

表 3 6 种罗非鱼间的 Nei 氏标准遗传距离  
Tab.3 The Nei's standard genetic distances among six tilapias species

种类	萨罗罗非鱼	尼罗罗非鱼	以色列红罗非鱼	台湾红罗非鱼	奥利亚罗非鱼	齐氏罗非鱼
萨罗罗非鱼	0					
尼罗罗非鱼	1.903	0				
以色列红罗非鱼	1.241	0.816	0			
台湾红罗非鱼	2.358	1.071	1.039	0		
奥利亚罗非鱼	2.062	1.359	0.961	0.997	0	
齐氏罗非鱼	1.865	1.415	1.339	0.608	1.053	0

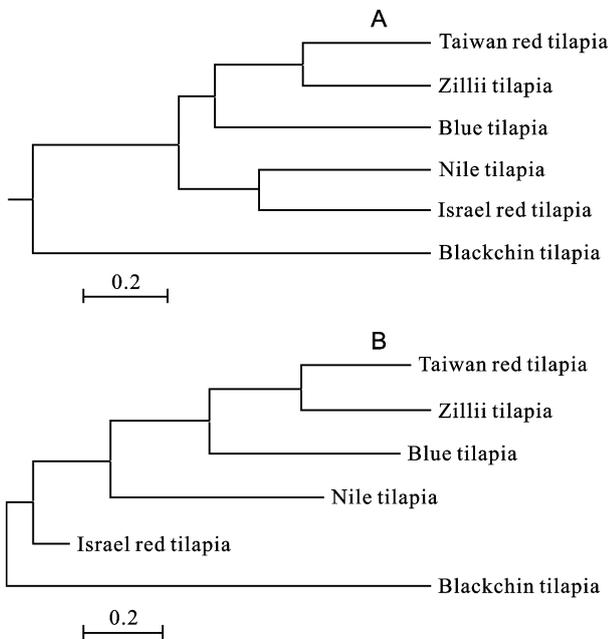


图 2 6 种罗非鱼遗传距离的 UPGMA 和 NJ 聚类图

Fig.2 Dendrogram of six tilapia species using UPGMA and NJ method for clustering

A. 遗传距离 UPGMA 图, B. 遗传距离 NJ 图

匀, 每个座位都有一种或几种等位基因频率较高。微卫星的多态性能够反映物种的进化历史, 群体中频率最高的等位基因是该物种中最原始、最保守的, 其余的等位基因是进化过程中由该等位基因突变形成的(Nei *et al.*, 2002)。据此, 萨罗罗非鱼 PRL1 座位的 204 基因、PRL2 座位的 190 基因、IGF 座位的 239 基因和 ISP 座位的 250 基因频率都超过 0.5, 可能是

该鱼相应微卫星座位最原始的等位基因。6 种罗非鱼中, 尼罗罗非鱼、以色列红罗非鱼和奥利亚罗非鱼的等位基因频率分布较均匀, 进化速度较快, 而萨罗罗非鱼、台湾红罗非鱼和齐氏罗非鱼的等位基因频率分布较集中, 进化速度较慢。对于台湾红罗非鱼和齐氏罗非鱼来说, 这个结果也有可能是因为长期的小群体繁育造成。

Soduck 等(1991)用同工酶的方法, 分析了罗非鱼 3 个属、15 种鱼之间的遗传距离, 结果是 *Tilapia* 属与 *Oreochromis* 属、*Tilapia* 属与 *Sarotherodon* 属、*Sarotherodon* 属与 *Oreochromis* 属间的平均遗传距离分别是  $0.688 \pm 0.150$ 、 $0.571 \pm 0.132$  和  $0.366 \pm 0.100$ 。在进化关系上, 底质产卵的 *Tilapia* 罗非鱼最原始, 首先进化出雄性口育的 *Sarotherodon* 罗非鱼, 然后, 后者又进化出雌性口育的 *Oreochromis* 罗非鱼, 也就是说 *Oreochromis* 属罗非鱼和 *Sarotherodon* 属罗非鱼的亲缘关系比与 *Tilapia* 属罗非鱼近。但是本研究中以及采用形态学方法(李学军等, 2008a)的研究结果都表明: 在 6 种罗非鱼中, 萨罗罗非鱼与其它 5 种罗非鱼之间的亲缘关系最远, 其中, 与奥利亚罗非鱼及尼罗罗非鱼的遗传距离最大; 在另外 5 种罗非鱼中, 尼罗罗非鱼、以色列红罗非鱼与台湾红罗非鱼之间亲缘关系较近, 这说明以色列红罗非鱼与台湾红罗非鱼类似, 其杂交亲本来源之一有可能是尼罗罗非鱼; 本研究中, 齐氏罗非鱼和 *Oreochromis* 属的罗非鱼遗传距离较近, 出现这种情况的原因可能是由于所用的齐氏罗非鱼种质不纯, 已经与其它罗非鱼混杂, 因为从

体色上, 本研究所使用的齐氏罗非鱼就与奥利亚罗非鱼很相近, 尤其是尾鳍花纹, 也是散射的星状或花纹很少(李学军等, 2008a)。事实上, 齐氏罗非鱼的引进并未正式报道(陈素芝等, 1994), 也未进行大规模的养殖和专门保种, 因此与其它罗非鱼混杂的可能性是非常大的。

### 3.2 萨罗罗非鱼的种质保护

本研究中, 5 个微卫星座位都表明萨罗罗非鱼的遗传多样性相对其它 5 种罗非鱼要低, 尼罗罗非鱼、以色列红罗非鱼和奥利亚罗非鱼的遗传多样性较高。Pouyaud 等(1999)根据 4 个微卫星标记、Pouyaud 等(1995)根据 24 个同工酶座位的资料, 研究发现萨罗罗非鱼的遗传多样性较低, 这与作者的研究结果近似。赵金良等(2007)利用 AFLP 技术的研究结果表明, 我国引进的萨罗罗非鱼群体平均多态位点比例为 16.6%, 群体内个体间的平均遗传相似度为 0.922—0.995。这说明我国引进的萨罗罗非鱼群体的遗传变异不高, 可能与多次引进(加纳—美国—中国)过程中, 存在一定的瓶颈效应或奠基群效应有关。

在作者所用的实验材料中, 萨罗罗非鱼为 2002 年引进, 引进群体较大, 共 2670 尾, 引进后未与其它种罗非鱼混杂, 杂合度较低的实验结果也说明保持了原种的基因库。一个物种在自然环境中, 其种质资源库主要会受到两方面的影响: 一是渐渗杂交, 另一是近亲繁殖(李思发等, 1995)。由于罗非鱼产卵周期短, 世代间隔小, 对于一般的罗非鱼群体, 这两方面的影响都很容易发生(李思发等, 1995)。引入我国的萨罗罗非鱼, 奠基群体较大, 研究结果表明其种质较纯, 遗传变异较小。另外通过实验发现, 萨罗罗非鱼和目前我国已有的其它种罗非鱼之间很难进行自然繁殖(李学军等, 2008b), 因此, 其自然遗传渐渗的可能性较小, 这对保持其种质纯度非常有利。但是, 随着与尼罗罗非鱼人工杂交的成功(李学军等, 2008b), 今后是否会发生遗传渐渗, 还有待于进一步研究观察; 另外, 由于养殖性能的制约, 萨罗罗非鱼进行大规模单养的可能性也不大, 保种的目的可能大多用于杂交育种, 因此留种的数量不会太多。这种情况将会导致近亲交配机会增多, 在遗传上可能会产生某些等位基因的丢失或导致个别基因座位表达时受抑, 表现为生活力降低, 生长受抑制, 以及某些经济性状的衰退, 这可能是目前威胁萨罗罗非鱼优良种质的最主要问题, 因此, 制定合理的保种计划非常必要和迫切。从维持种群的遗传多样性角度讲, 作者认为罗

非鱼保种有效群体大小可参照我国鲤科鱼类的标准(李思发, 1996), 即繁育群体的大小宜保持在 500 尾(雌、雄各半)以上, 这样, 一代随机交配的近交系数可不超过 0.1%。

### 参 考 文 献

- 李学军, 李思发, 么宗利等, 2005. 不同盐度下尼罗罗非鱼、萨罗罗非鱼和以色列红罗非鱼幼鱼生长、成活率及饱满系数差异的研究. 中国水产科学, 12(3): 245—251
- 李学军, 李爱景, 李思发, 2008a. 萨罗罗非鱼(*Sarotherodon melanotheron*)与其它 5 种罗非鱼形态差异的多元统计分析. 海洋与湖沼, 39(6): 683—688
- 李学军, 李爱景, 王阅雯等, 2008b. 萨罗罗非鱼与尼罗罗非鱼正反杂交代间的分子遗传学差异. 四川动物, 27(5): 777—780
- 李思发, 1996. 中国淡水鱼类种质资源和保护. 北京: 中国农业出版社, 131—144
- 李思发, 蔡完其, 1995. 我国尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼养殖群体的遗传渐渗. 水产学报, 19(2): 105—111
- 陈素芝, 叶 卫, 1994. 我国引进的罗非鱼类的初步研究. 动物学杂志, 29(3): 18—23
- 赵金良, 王伟伟, 李思发等, 2007. 我国引进萨罗罗非鱼群体的 AFLP 遗传指纹. 上海水产大学学报, 16(3): 293—296
- 顾万春, 2004. 统计遗传学. 北京: 科学出版社, 165—196
- 徐 莉, 赵桂仿, 2002. 微卫星 DNA 标记技术及其在遗传多样性研究中的引用. 西北植物学报, 22(3): 714—722
- 迪芬巴赫 C W, 德维克斯勒 G S 著, 仲 康, 瞿礼嘉译, 2006. PCR 技术实验指南. 北京: 科学出版社, 201—218
- Nei M, Kumar S 著, 吕宝忠, 钟 扬, 高丽萍译, 2002. 分子进化与系统发育. 北京: 高等教育出版社, 67—128
- Kocher T D, Lee W J, Sobolewska H *et al*, 1998. A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). Genetics, 148: 1225—1232
- Nei M, 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individual. Genetics, 89: 583—590
- Pouyaud L, Agnese J F, 1995. Phylogenetic relationships between 21 species of three tilapiine genera *Tilapia*, *Sarotherodon* and *Oreochromis* using allozyme data. J Fish Biol, 47(1): 26—38
- Pouyaud L, Desmarais E, Chenuil A *et al*, 1999. Kin cohesiveness and possible inbreeding in the mouthbrooding tilapia *Sarotherodon melanotheron* (Pisces Cichlidae). Molecular Ecology, 8(5): 803—812
- Soduck P, McAndrew B J, 1991. Molecular systematics of three tilapiine genera *Tilapia*, *Sarotherodon* and *Oreochromis* using allozyme data. J Fish Biol, 39(supplement A): 301—308
- Trewavas E, 1983. Tilapiine Fishes of the Genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* and *Danakilia*. London: British Museum (Natural History), Publ Num 878. Comstock Publishing Associates, 583
- Yue G H, Orban L, 2002. Microsatellites from genes show polymorphism in two related *Oreochromis* species. Molecular Ecology Notes, 2: 1—2

## COMPARISON ON GENETIC DIVERSITY BETWEEN *SAROTHERODON MELANOTHERON* AND OTHER FIVE TILAPIAS SPECIES

LI Xue-Jun<sup>1,2</sup>, LI Ai-Jing<sup>1</sup>, LI Si-Fa<sup>2</sup>, CAI Wan-Qi<sup>2</sup>

(1. *College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang, 453007*; 2. *The Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecology Certificated by the Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306*)

**Abstract** Five microsatellite primers were designed for six tilapia species based on the sequence of related gene of known tilapia for PCR amplification and genetic diversity, including blackchin, Nile tilapia, Israel red tilapia, Taiwan red tilapia, blue tilapia and Zilii tilapia. The results indicate that: (1) 22 alleles and 49 genotypes were found in five microsatellite locus of all tilapias. Blackchin tilapia, Taiwan red tilapia and Zilii tilapia have less alleles and genotypes. Specific alleles of blackchin tilapia are 190 and 204, and its specific genotypes are 190/190, 204/204, 270/223 and 270/243, respectively; (2) compared with other five tilapias, blackchin tilapia has lower effective number of alleles ( $N_e$ ), mean gene heterozygosity ( $H_e$ ), and polymorphism information content ( $PIC$ ), which is 1.812, 0.331 and 0.326, respectively; (3) In genetic distance, the six species can be divided into two groups: blackchin tilapia and other five tilapias; (4) inbreeding is considered the primary issue for the genetic resources conservation.

**Key words** Blackchin tilapia, Microsatellite marker, Genetic diversity, Genetic resources conservation