

同种罗非鱼(*Tilapia*)不同地区选育群体的遗传多样性分析*

肖 炜¹ 杨 弘^{1①} 李大宇¹ 罗永巨² 邹芝英¹ 祝璟琳¹

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心 农业部淡水鱼类遗传育种和养殖生物学重点开放实验室 无锡 214081;
2. 广西水产研究所 南宁 530021)

提要 采用微卫星标记分析技术, 选用 36 对微卫星引物对罗非鱼原始群体和引种群体进行遗传多样性分析, 原始群体为中国水产科学研究院淡水渔业研究中心保种的奥利亚罗非鱼(“夏奥 1 号”, ZA)、埃及尼罗罗非鱼(“99 品系”, ZN), 引种群体为广西水产研究所从淡水渔业研究中心引进培育的奥利亚罗非鱼群体(GA)和埃及尼罗罗非鱼群体(GN)。结果显示 19 对引物具备多态性, 比率为 52.8%, ZA 与 GA 两个群体的平均观测杂合度、平均期望杂合度、平均多态信息含量分别为 0.10、0.15、0.12, 遗传相似性系数为 0.9867, 平均近交系数(F_{ST})与基因流(N_m)分别为 0.0379、6.3408; 而 ZN 与 GN 两个群体平均观测杂合度、平均期望杂合度、平均多态信息含量分别为 0.37、0.49、0.43, 遗传相似性系数为 0.7696, 平均近交系数(F_{ST})与基因流(N_m)分别为 0.1146、1.9309。分析结果表明: (1) 两个奥利亚群体中 ZA 与 GA 遗传多样性小, 群体间遗传距离小, 相似度较高, 选育出的奥利亚群体遗传结构相对稳定; (2) 两个尼罗群体中 ZN 与 GN 遗传多样性适中, 群体间存在一定的遗传距离, 相似度低, ZN 与 GN 两个埃及尼罗群体具备进一步选育出新品系的潜力; (3) 基因座 UNH896、UNH995、UNH999 可应用为鉴别奥利亚群体与埃及尼罗群体的特异性标记。

关键词 奥利亚罗非鱼, 埃及尼罗罗非鱼, 微卫星, 遗传多样性

中图分类号 Q176

罗非鱼(*Tilapia*)又称非洲鲫鱼, 隶属于鲈形目(Perciformes)、丽鱼科(Cichlidae), 具有繁殖力强、生长快、耐粗饲、抗病力强以及肉质细腻等诸多优点, 是联合国粮农组织(FAO)向世界各国推荐的主要养殖品种之一。自 20 世纪 50 年代以来, 我国多次从世界各地引进优良性状的罗非鱼品种, 加上国内产、学、研的结合, 国内罗非鱼养殖产业发展迅猛, 形成一条包括苗种繁育、健康养殖、营养与饲料、疾病防控、加工运输等诸多关键环节的完整产业链, 推动了我国罗非鱼产业稳步、快速的发展。2008 年底我国罗非鱼产量已占全球的一半, 出口量高居世界第一位(崔和, 2008)。

罗非鱼养殖中作为首要环节的苗种繁育环节尤为重要, 优良的罗非鱼养殖苗种是保证成鱼品质的关键, 因此选育优良性状的罗非鱼亲鱼至关重要。1983 年中国水产科学研究院淡水渔业研究中心从美国奥本大学引进奥利亚罗非鱼(*Oreochromis aureus*) (王进科等, 2000), 经 20 多年的连续选育, 突破雄性化关键技术, 培育出的体格健壮的奥利亚新品种“夏奥 1 号”。1999 年淡水渔业研究中心又从埃及农业和农垦部水产研究中心实验室引进尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*), 经过多年选育纯度进一步提高, 选育成为一个新的优良品系“99 品系”(夏德全, 2003)。2002 年广西水产研究所从中国水产科学研究

* 国家科技支撑计划, 2006BAD01A1202 号; 2007 年公益性行业(农业)科研专项, 3-49 号; 现代农业产业技术体系建设专项资金, nycytx-48 号; 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目, 2007JBFA02 号。肖 炜, 硕士, E-mail: xiaow@ffrc.cn

① 通讯作者: 杨 弘, 研究员, E-mail: yangh@ffrc.cn

收稿日期: 2009-10-09, 收修改稿日期: 2009-12-15

院淡水渔业研究中心引进奥利亚罗非鱼与埃及尼罗罗非鱼群体, 经过多代选育已获得较为理想的苗种繁育亲本, 为广西地区的罗非鱼养殖推广提供了极大的助力。本文旨在利用微卫星遗传标记技术探讨这两种罗非鱼原始群体与引种群体在不同的地理纬度、不同的选育手法、不同的选育压力下经数年选育后所得群体遗传多样性指标是否已经出现差异, 旨在为其它品种的引种和保种工作提供参考。

微卫星 (Microsatellite), 又称简单序列重复 (Simple sequence repeats, SSRs), 具备共显性遗传、多态性高、信息含量丰富、引物通用性、位点特异性等一系列特点, 是近年来鱼类遗传多样性分析的重要手段 (O'Connell *et al*, 1997), 已被广泛应用于罗非鱼遗传学研究 (李腾云等, 2008; Rutten *et al*, 2004; Romana-Eguia *et al*, 2004; Yue *et al*, 2002)。本文通过查阅已有的尼罗罗非鱼微卫星序列, 筛选对本研究的奥利亚群体与埃及尼罗群体具备有多态性引物, 挑选合适的微卫星引物对 4 个罗非鱼群体进行遗传多样性分析。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用群体分析样品分别采自淡水渔业研究中心保种的“夏奥 1 号”奥利亚罗非鱼群体 (ZA, 30 尾)、埃及尼罗罗非鱼群体 (ZN, 24 尾), 以及广西水产研究所保种的奥利亚罗非鱼群体 (GA, 30 尾)、埃及尼罗罗非鱼群体 (GN, 30 尾)。广西水产研究所保种的两个罗非鱼群体是 2002 年从淡水渔业研究中心引种获得的, 4 个群体均为选育群体。

PCR 反应所用的 Taq-DNA 聚合酶、dNTP、20bp-ladder Marker 等生化试剂购 TaKaRa 生物公司; PCR 仪为 Eppendorf Mastercycler gradient; 电泳仪为 BIO-RAD PowerPac Universal; 电泳槽为北京六一公司 DYCZ-B2 型垂直电泳槽; 成像仪为 Gene Company Limited Gbox 型凝胶成像系统。

1.2 基因组 DNA 的制备

尾静脉取全血 (ACD 抗凝), 50 μ l 血液加裂解液 (0.5%十二烷基肌氨酸钠、0.02%蛋白酶 K、10mmol/L EDTA) 200 μ l, 50 $^{\circ}$ C 温育 2h (其间不时摇动混匀), 酚-氯仿法抽提 DNA, 无水乙醇-20 $^{\circ}$ C 过夜沉淀一次, 70%酒精洗涤一次, 干燥后加 0.1 $\times$ TE 50 μ l 溶解 DNA, 0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测, 稀释至 100ng/ μ l, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3 微卫星引物设计合成

按照参考文献 (Lee *et al*, 2005) 及美国汉普郡大学 Hubbard 基因研究中心网站 (<http://hcgs.udn.edu/>) 数据, 选取 UNH106、UNH159、UNH166、UNH172、UNH178、UNH190、UNH197、UNH211、UNH214、UNH216、UNH222、UNH846、UNH853、UNH856、UNH874、UNH879、UNH880、UNH896、UNH899、UNH901、UNH906、UNH908、UNH913、UNH914、UNH919、UNH932、UNH933、UNH958、UNH968、UNH971、UNH980、UNH990、UNH995、UNH997、UNH999、UNH1004 尼罗罗非鱼微卫星基因座共 36 个, 引物由上海博彩生物科技有限公司合成。

1.4 微卫星位点的初步筛选

随机选取 GA、GN、ZA、ZN 各 10 尾进行 PCR 扩增, 反应体系: 10 $\times$ PCR 混合缓冲液 2.0 μ l, 微卫星上下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ l, dNTP (2.5mmol/L) 2.5 μ l, Taq-DNA 聚合酶 1U, DNA 模板 (100ng/ μ l) 1 μ l, 补无菌去离子水至 20 μ l。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 变性 4min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 各引物 50—64 $^{\circ}$ C 复性 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 28 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。PCR 扩增反应产物用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 5V/cm 电泳 4h 左右, GelRed (Biotium 公司) 染色, GBox 记录电泳结果, 筛选出具备多态性的微卫星引物以及合适的反应温度。

1.5 群体 PCR 扩增与电泳

筛选出的微卫星引物对群体进行 PCR 扩增, 反应体系: 10 $\times$ PCR 混合缓冲液 2.0 μ l, 微卫星上下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ l, dNTP (2.5mmol/L) 2.5 μ l, Taq-DNA 聚合酶 1U, DNA 模板 (100ng/ μ l) 1 μ l, 补无菌去离子水至 20 μ l。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 变性 4min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 各引物 50—64 $^{\circ}$ C 复性 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 28 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

PCR 扩增反应产物用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 5V/cm 电泳 4h 左右, GelRed 染色, GBox 记录电泳结果, Gel-Pro Analyzer 软件 (Version 4.5) 分析扩增条带的分子量差异。

1.6 数据分析

使用 PopGene 1.32 软件计算每个群体的等位基因数 (Observed number of alleles, N_a)、有效等位基因数 (Effective number of alleles, A_e)、观测杂合度 (Observed heterozygosity, H_o)、期望杂合度 (Expected heterozygosity, H_e)、群体间近交系数 (F_{ST}) 和基因流 (N_m)、遗传相似系数 (Genetic similarity index, I)、群体间遗传距离 (Genetic Distance, D_s)。

根据 Bostein 等(1980)计算多态信息含量(PIC, polymorphism information content),

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n P_i^2 \right) - \left(\sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2 \right),$$

式中, n 为某一基因座上等位基因数, P_i 、 P_j 分别为第 i 和第 j 个等位基因在群体中的频率, $j = i + 1$ 。

根据群体间遗传距离, 用 MEGA3 UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic means, 类平均法)绘制聚类图。

2 结果

2.1 扩增结果

筛选结果表明 36 对尼罗罗非鱼微卫星中共有 28 对(77.8%)均可在所有 4 个群体中扩增出清晰可见的稳定条带, 其中 19 对(52.8%)具有多态性(表 1), 扩增产物片段在 90—251bp 之间, 其中 UNH999 多态性最高(8 个), UNH906 最低(2 个)(表 2), 4 个群体中 ZA 等位基因 1—2 个, ZN 等位基因 1—6 个, GA 等位基因 1—5 个, GN 等位基因 2—5 个, 同时 GN、ZN 两个尼罗罗非鱼群体中引物 UNH896、UNH995、UNH999 的 95%以上产物片段大小不同于(大于或小于)GA、ZA 两个奥利亚群体中同引物的产物片段, 部分聚丙

烯凝胶电泳结果见图 1。

2.2 连锁分析

计算各个基因座在相应群体间的两两配对的基因型不平衡值(genotypic disequilibrium value), 100%的基因座 $P > 0.05$, 表明这些基因座间连锁关系不显著。

2.3 群体遗传多样性分析

4 个罗非鱼群体中, 检测到的有效等位基因(A_e) 在 1.00—3.78 个不等, GA、GN、ZA、ZN 平均值依次为 1.29、2.33、1.21、2.04; 无偏期望杂合度(H_e) 在 0.00—0.75 之间, 平均值为 0.16、0.53、0.13 和 0.44; 观测杂合度(H_o) 在 0.00—0.87 之间, 平均值为 0.11、0.39、0.09 和 0.34; 多态信息含量(PIC)在 0.00—0.70 之间, 平均值为 0.13、0.47、0.11 和 0.38; 具体各项指标见表 3。以上各个群体的多样性指标说明 GA、ZA 两个群体的遗传多样性属低度多态水平, GN、ZN 两个群体属中度多态水平。由表 3 可见, 几种统计参数在 4 个群体间有一定的差异, 但方差分析发现并未达到显著水平($P > 0.05$)。

2.4 群体间遗传分化

用配子间相关系数或称近交系数(F_{ST})与基因流(N_m)分析这几个群体间的遗传分化情况, ZN 与 GN 群体在 19 个基因座上有 13 个位点(68.4%)的近交系数

表 1 19 对有效扩增的多态性微卫星引物特征

Tab.1 Characteristic of nineteen pairs of polymorphic microsatellite primers for PCR amplification

基因座	引物序列		退火温度(°C)	GenBank注册号
UNH159	F:TTGTTT TAGGAGCTTCTTTTGTC	R:ATATTCATCTGGATTGGCTCTAA	62	G12311
UNH190	F:CGCGATCGAGCATTTCTAA	R:TGTCTGCACGCGCTTTTGT	58	G12342
UNH222	F:CTCTAGCACACGTGCAT	R:TAACAGGTGGGAACCTCA	55	G12373
UNH846	F:TGGAGCAGCTTCTTCTACATCA	R:CACATGATGGAAGCCGTGTA	62	G68185
UNH853	F:TAAAGCTCGTCCCCGTAACA	R:TGCGTCTCATCTGTCTGTC	57	G68189
UNH874	F:AGTAAATGGGCGAACGTGT	R:TGAAGCTGGGAGTTTCCTGT	58	G68202
UNH879	F:GCATAAGGTGACTGGCTGGT	R:ACAAAGGGTGCTGCAATTT	58	G68206
UNH896	F:CCTCTGTCCCTCCATGTGTT	R:AGCCTGGCTTTAGAGGCAAT	61	G68214
UNH899	F:ACGTCACATGGAGGTGCTTA	R:GCTAGACCTCTGTCCCCTGA	61	G68216
UNH906	F:AACATGCTTTCAGCCTTCGT	R:TGAGCAAATCCCGTCCATA	60	G68220
UNH913	F:CAATGACTGTTTTTGTCTCTGTG	R:GCTTCTTGCACATGCAGTC	61	G68225
UNH914	F:CAGCTTGTGGAAGAAATACCA	R:CCACGCACTTGTGGAAAATA	58	G68226
UNH932	F:AGCGCTAAATGAGCCAGTGT	R:TTCTTTAATGCCTGCCAGTG	60	G68238
UNH933	F:GGGTGAGGTGTTTACAGAT	R:GGGGCCTTAGTTTCACTTCA	62	G68239
UNH968	F:ACTGCTCCTCTGTGTCTGG	R:TCTTGCTGCTTCTCTCCACA	62	G68257
UNH971	F:GGTGGCAGTGTGTGTTTTT	R:TTTTCATCCAGGCCTCAGTT	57	G68259
UNH990	F:GCCACAGGTGACCATGTTAG	R:GGTGTCTGATTGCACTGACG	60	G68270
UNH995	F:CCAGCCCTCTGCATAAAGAC	R:GCAGCACAAACCACAGTGCTA	61	G68274
UNH999	F:TGCAAAGTCACAAATCCACAA	R:CTCCCATTCATTACCCCAAA	60	G68278

表 2 四个罗非鱼群体在 19 个微卫星基因座的等位基因片段
Tab.2 Alleles sizes amplified by primer pairs at nineteen microsatellite loci in four tilapia populations

基因座	GA	GN	ZA	ZN	总计
UNH159	230 243	230 237 243 251	230 237	237 243	4
UNH190	161 173	149 161 173	161 173	149 161 173	3
UNH222	164	164 180 197 203 219	164	180 197 203	5
UNH846	202 207	175 185 207 225	202 207	175 185 207	5
UNH853	167	152 167 175 180 185	167	167 175 180 185	5
UNH874	216 225 239	177 183 192 199 216	225 239	177 183 192 199 225	7
UNH879	196 202	174 185 196 202	202	185 196 202	4
UNH896	219	155 162 170 178 195	219	155 162 178	6
UNH899	142	142 155 162 167	142	142 155 162 167	4
UNH906	155	155 161	155	155 161	2
UNH913	97	97 110 117 121	97	110 117 121	4
UNH914	160	160 175 183	160	160 175 183	3
UNH932	121	121 140 145	121	121 140 160	4
UNH933	242	235 242 247 251	242	242 247	4
UNH968	158 185 191 200 225	191 195 200 209 225	191 225	191 195 200	7
UNH971	202 215 221	190 195 202 215	202 221	195 202 215 221	5
UNH990	141 149 155	149 155 160	141 149	141 149	4
UNH995	214 234	168 178 192 234	214 234	178	5
UNH999	90 95	110 115 120	90 95	95 115 120 125 130 135	8

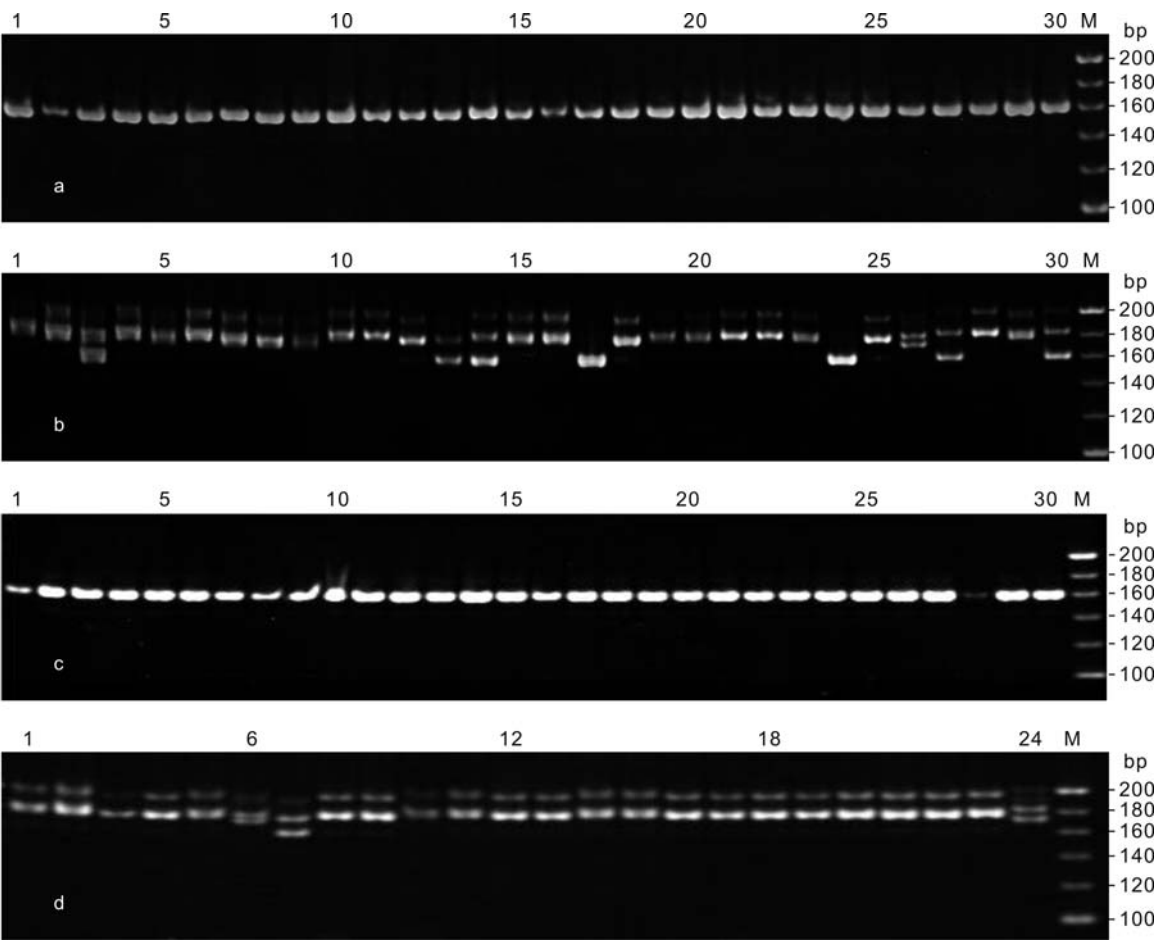


图 1 罗非鱼四个群体基因座 UNH914 的扩增图谱
Fig.1 Demonstration of microsatellite locus amplified by UNH914 primer pairs in four tilapia populations
a: GA; b: GN; c: ZA; d: ZN

表 3 罗非鱼 4 个群体在 19 个微卫星基因座的遗传多样性指数
Tab.3 The polymorphic information at nineteen microsatellite loci in four tilapia populations

基因座	GA (n=30)				GN (n=30)				ZA (n=30)				ZN (n=24)			
	PIC	A _e	H _o	H _e	PIC	A _e	H _o	H _e	PIC	A _e	H _o	H _e	PIC	A _e	H _o	H _e
UNH159	0.25	1.43	0.17	0.31	0.52	2.32	0.14	0.58	0.29	1.56	0.27	0.36	0.19	1.28	0.17	0.22
UNH190	0.18	1.26	0.23	0.21	0.36	1.76	0.38	0.44	0.12	1.14	0.13	0.13	0.43	1.92	0.25	0.49
UNH222	0.00	1.00	0.00	0.00	0.67	3.46	0.62	0.73	0.00	1.00	0.00	0.00	0.46	2.19	0.46	0.56
UNH846	0.37	1.99	0.13	0.51	0.67	3.59	0.87	0.73	0.32	1.68	0.23	0.41	0.38	1.83	0.29	0.46
UNH853	0.00	1.00	0.00	0.00	0.51	2.19	0.43	0.52	0.00	1.00	0.00	0.00	0.59	2.92	0.38	0.67
UNH874	0.09	1.11	0.10	0.10	0.55	2.58	0.27	0.62	0.06	1.07	0.07	0.07	0.51	2.38	0.42	0.59
UNH879	0.03	1.03	0.03	0.03	0.58	2.76	0.50	0.65	0.00	1.00	0.00	0.00	0.27	1.41	0.33	0.30
UNH896	0.00	1.00	0.00	0.00	0.52	2.49	0.47	0.61	0.00	1.00	0.00	0.00	0.39	1.71	0.29	0.43
UNH899	0.00	1.00	0.00	0.00	0.56	2.62	0.43	0.63	0.00	1.00	0.00	0.00	0.58	2.89	0.58	0.67
UNH906	0.00	1.00	0.00	0.00	0.31	1.64	0.27	0.40	0.00	1.00	0.00	0.00	0.15	1.18	0.08	0.16
UNH913	0.00	1.00	0.00	0.00	0.66	3.54	0.69	0.73	0.00	1.00	0.00	0.00	0.48	2.30	0.40	0.58
UNH914	0.00	1.00	0.00	0.00	0.25	1.39	0.20	0.29	0.00	1.00	0.00	0.00	0.12	1.14	0.13	0.12
UNH932	0.00	1.00	0.00	0.00	0.25	1.39	0.20	0.29	0.00	1.00	0.00	0.00	0.44	2.13	0.58	0.54
UNH933	0.00	1.00	0.00	0.00	0.35	1.60	0.21	0.38	0.00	1.00	0.00	0.00	0.08	1.09	0.08	0.08
UNH968	0.48	2.30	0.33	0.58	0.69	3.74	0.40	0.75	0.33	1.72	0.00	0.43	0.37	1.84	0.42	0.47
UNH971	0.41	2.07	0.47	0.53	0.40	1.77	0.37	0.44	0.37	1.92	0.47	0.49	0.68	3.76	0.75	0.75
UNH990	0.15	1.19	0.10	0.16	0.46	2.26	0.67	0.57	0.06	1.07	0.07	0.07	0.37	1.95	0.50	0.50
UNH995	0.37	2.00	0.30	0.51	0.25	1.37	0.20	0.27	0.31	1.62	0.22	0.39	0.00	1.00	0.00	0.00
UNH999	0.14	1.18	0.17	0.16	0.38	1.74	0.13	0.43	0.19	1.26	0.23	0.21	0.70	3.78	0.42	0.75
平均值	0.13	1.29	0.11	0.16	0.47	2.33	0.39	0.53	0.11	1.21	0.09	0.13	0.38	2.04	0.34	0.44

大于群体间无遗传分化的标准($F_{ST} = 0-0.05$)(Wright, 1978), 各基因座的近交系数的均值为 0.1146, 基因流的均值为 1.9309; ZA 与 GA 在 19 个基因组上有 3 个位点(15.8%)的近交系数大于群体间无遗传分化标准, 各基因组的近交系数的均值为 0.0379, 基因流的均值为 6.3408。

2.5 聚类分析

4 个群体间两两比较的遗传距离(D_s)和遗传相似系数(I)结果见表 4, ZA 与 GA 间遗传相似度最高, 相似系数为 0.9867(遗传距离 $D_s = 0.0134$); GA 与 GN 间遗传相似度最低, 相似系数为 0.3698(遗传距离 $D_s = 0.9949$)。用 MEGA 3 绘制 UPGMA 聚类图(图 2), 4 个群体明显分为两大支, ZA 与 GA 两个首先聚类为一支, GN 和 ZN 聚类为一个分支, 两个分支再聚在

一起。

3 讨论

3.1 尼罗罗非鱼引物的适用性

通常微卫星引物的获得有以下两种方式: (1) 建立基因文库, 用人工合成的寡核苷酸探针杂交, 获得阳性克隆, 提出质粒后利用载体插入位点两端的已知序列设计引物, 测定插入片段的序列, 以获得某一微卫星基因座及其侧翼序列结构, 最后在微卫星 DNA 两端侧翼序列选出合适 PCR 引物(Carleton *et al*, 2002; Lee *et al*, 1996), 但此方法耗费比较大, 也比较烦琐, 适用于没有任何合适的相关物种微卫星位点的情况下; (2) 由于物种间 DNA 序列具有同源性, 相近物种之间的微卫星基因座两侧序列具有很高的保

表 4 罗非鱼 4 个群体的 Nei 氏标准遗传距离(左下)与遗传相似系数(右上)

群体	GA	GN	ZA	ZN
广西奥利亚 GA	—	0.3698	0.9867	0.4388
广西埃及尼罗 GN	0.9949	—	0.3934	0.7696
中心奥利亚 ZA	0.0134	0.9330	—	0.4475
中心埃及尼罗 ZN	0.8238	0.2619	0.8041	—

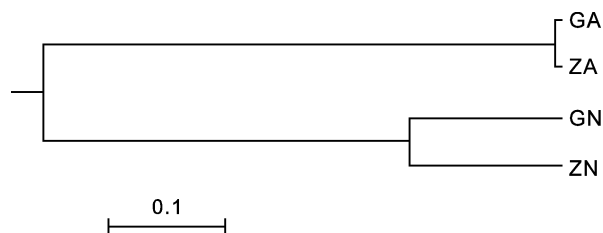


图 2 四个罗非鱼群体的 UPGMA 聚类图

Fig.2 The UPGMA cluster analysis on four tilapia populations

守性, 一个物种的微卫星引物具有适用于相近物种的微卫星分析的潜力, 通过已知相近物种的微卫星引物来寻找实验物种的微卫星基因座是可行的(李明芳等, 2004), 属内尼罗罗非鱼微卫星引物适用于其它罗非鱼品种也有相关报道(李腾云等, 2008)。本研究中 36 对尼罗罗非鱼微卫星中共筛选出 28 对(77.8%)引物可在所有 4 个群体中扩增出清晰可见的稳定条带, 其中 19 对(52.8%)具有多态性, 结果表明尼罗罗非鱼微卫星引物在 4 个罗非鱼群体中具有较好的适用性, 目前开发的尼罗罗非鱼微卫星引物已有 500 多对, 可进一步筛选适用于奥利亚等罗非鱼品种种质资源研究和分子标记辅助育种。

3.2 罗非鱼种群的遗传多样性水平

生物群体的遗传多样性是评价物种资源状况的一个重要依据, 它是物种适应多变的环境条件、维持长期生存和进化的遗传基础。最大限度地维持种内遗传多样性水平, 是持续利用种质资源的前提(李大宇等, 2009)。 A_e 、 H_o 、 H_e 和 PIC 等都是反映群体遗传多样性的参数, 其数值越大, 说明基因丰富度越高。与 Dewoody 等(2000)统计了 78 个物种的 524 个微卫星近 40000 个个体数据后, 得出淡水鱼类 $A_e = 7.50$ 、 $H_e = 0.46$ 的结论相比, 这 4 个罗非鱼群体的多样性水平总体偏低($A_e = 1.72$, $H_e = 0.32$)。多态信息含量(PIC)是衡量多态性的较好指标, Botstein 等(1980)首先提出了衡量基因变异程度高低的的多态信息含量指标: 当 $PIC \geq 0.5$ 时, 该位点为高度多态位点; $0.25 < PIC < 0.5$ 时为中度多态性位点; $PIC \leq 0.25$ 时为低度多态位点。研究结果显示 GA($\overline{PIC} = 0.13$)与 ZA($\overline{PIC} = 0.11$)多态信息含量属于低度多态水平。张庭等(2009)筛选已有的部分尼罗罗非鱼引物对从淡水渔业研究中心引种到珠江水产研究所的奥利亚罗非鱼群体进行遗传多样性分析, 其群体的 $\overline{PIC}$ 值为 0.25, 同属低度多态水平, 综上可推奥利亚罗非鱼群体整体遗传变异水平甚小。对于生活在自然界各类水体中的鱼类来说, 较低的遗传多样性常常不利于其发展和进化, 甚至

很有可能会带来灭顶之灾; 但对于养殖鱼类来说, 遗传多样性降低意味着群体内变异较小、个体间同一性较高、遗传性状较稳定, 这对于养殖鱼类的繁殖群体来说具有重要意义。同时, 单一的遗传多样性对奥利亚罗非鱼的进一步选育是不利的, 因此有必要从国外继续引进更多优良性状的奥利亚罗非鱼群体。此外, GN($\overline{PIC} = 0.47$)与 ZN($\overline{PIC} = 0.38$)处于中度多态水平, 相比 GA、ZA 群体具备较高的遗传多样性水平, 这对罗非鱼的幼苗生产是不利的, 因此有必要进行进一步的选育, 逐渐筛选出群体中稳定遗传优良性状的尼罗罗非鱼。

3.3 两地群体间的亲缘关系与遗传分化

聚类分析结果表明淡水渔业研究中心、广西水产研究所两地 GA 和 ZA 两个群体的遗传相似性仍极高(0.9867), 遗传分化不明显; 而 ZN、GN 两个尼罗群体遗传距离为 0.2619, 各位点的近交系数的均值为 0.1146, 大于 Wright(1978)提出的群体间无分化的尺度, 存在一定遗传分化。根据基因流计算公式 $N_m = (1 - F_{ST}) / 4F_{ST}$, 计算出 ZN、GN 群体间基因流的均值为 1.9309。理论上 $N_m < 1$ 时, 遗传漂变是群体间遗传分化的主要因素; $N_m > 1$, 基因流起主要作用。本研究中 ZN、GN 群体间基因流均值大于 1, 阻止了由遗传漂变而引起的种群间的分化。由于埃及尼罗群体(ZN、GN 群体原种)本身具备较高的遗传多样性, 而人工选育又是一个复杂的过程, 每一代选育会造成群体遗传变异水平的波动。因此 ZN、GN 两个群体虽然是同一起来源, 但群体间存在一定的遗传距离, 正是由于分别保种于两个不同的单位, 在地理隔离、选育方式、选育强度等一系列破坏遗传平衡的因素下, 使基因和基因型频率发生改变, 类似的情况在对虾中出现过(张天时等, 2005)。

3.4 引种后群体遗传多样性之变化

自 2002 年广西水产所从淡水渔业研究中心引种奥利亚罗非鱼和埃及尼罗罗非鱼以来, 经过不同的方法多代选育, GA 和 ZA 两个群体的遗传相似性仍极高, 其遗传多样性参数 A_e 、 H_o 、 H_e 和 PIC 并未有显著差异, 奥利亚罗非鱼的 H_e 和 PIC 两个指标经多代保种后并未发生变化, 这说明淡水渔业研究中心经长期多代选育出的奥利亚罗非鱼群体品质稳定, 即使经其他单位引种并多代选育后, 其种质资源也不会发生衰退或混杂现象, 能够将其优良的经济性状稳定地遗传给下一代, 这对于一个品种来说非常重要, 遗传稳定是维持品种基本特征的重要因素, 某品种如不能将其优良性状稳定地遗传给下一代, 则该

品种只在其原代有利用价值,其后代的利用价值不大。多年来我国从国外多次引进优良性状的罗非鱼品种,但有些因为不能稳定遗传,给养殖户造成了经济损失,浪费了国家的人力物力。而淡水渔业研究中心所培育的奥利亚罗非鱼现主要用于作为父本与尼罗罗非鱼进行杂交,其稳定性直接决定其杂交子代雄性率高低,目前其杂交子代雄性率可达 95%以上,基本满足渔业生产上雄性罗非鱼单性养殖的需求,可稳定获得雄性率高、生长速度快、抗逆性强、出池规格一致性的幼苗,这些优点与其奥利亚父本优良性状的遗传稳定性是分不开的。

而两地 GN、ZN 尼罗罗非鱼群体间保留了一定水平的遗传距离(0.2619),两个群体出现一定程度的改变,GN 各项遗传参数值较 ZN 原种有细微程度的升高,这与埃及尼罗罗非鱼本身遗传多样性水平较高有直接关系。遗传多样性水平高,基因型丰富程度就高,出现新的基因型的几率也就相应提高了。广西水产研究所引入埃及尼罗罗非鱼后主要用于作为母本生产苗种,出于大批量生产苗种的需求,扩大了埃及尼罗罗非鱼繁殖群体容量,遗传多样性较高的群体一经扩大,群体内本来较稀有的基因型个体即会随之增加,遗传多样性也就逐渐升高了。

3.5 种群特异性微卫星遗传标记初探

理想的特异性遗传标记是只用一个或几个遗传标记就能鉴别几个、十几个乃至几十个不同的群体。本次研究同时发现 GN、ZN 两个尼罗罗非鱼群体中在基因座 UNH896、UNH995、UNH999 上的 95%以上扩增产物片段大小不同于(大于或小于)GA、ZA 两个奥利亚群体中同基因座的产物片段大小,可作为相关标记,适用于奥利亚群体与埃及尼罗群体的遗传标记鉴别方法的建立,但这也仅限于对本文涉及的罗非鱼选育群体,要想鉴别除此之外的罗非鱼群体,还需要大量的研究工作。在若干群体范围之内,利用已知的单个或多个微卫星标记组合来探讨群体特异性遗传标记已较为可行,已出现了一些相关研究(McConnell *et al*, 2000),利用已知引物组合在区别不同地区的罗非鱼亚种群体等方面取得了一定的研究成果。

参 考 文 献

王进科,夏德全,2000. 中国奠基群奥利亚罗非鱼遗传多态性的 DNA 指纹图谱. 南京农业大学学报, 23(3): 61—63

- 李大宇,殷倩茜,侯 宁等,2009. 黄颡鱼(*Pelteobagrus eupogon*)不同生态地理分布群体遗传多样性的微卫星分析. 海洋与湖沼, 40(4): 460—469
- 李明芳,郑学勤,2004. 开发 SSR 引物方法之研究动态. 遗传, 26(5): 769—776
- 李腾云,李思发,2008. 尼罗罗非鱼与萨罗罗非鱼回交子代遗传变异的微卫星分析. 上海水产大学学报, 17(4): 396—401
- 张 庭,卢迈新,叶 星等,2009. 四个奥利亚罗非鱼群体的微卫星分析. 水生生物学报, 33(3): 498—508
- 张天时,王清印,刘 萍等,2005. 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)人工选育群体不同世代的微卫星分析. 海洋与湖沼, 36(1): 72—80
- 夏德全,2003. 论罗非鱼产业发展. 海洋与渔业, 8: 7—9
- 崔 和,2008. 中国罗非鱼产业现状. 海洋与渔业, 1: 3—5
- Botstein D, White R L, Skolnick M *et al*, 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics, 32: 314—331
- Carleton K L, Streelman J T, Lee B Y *et al*, 2002. Rapid isolation of CA microsatellites from the tilapia genome. Animal Genetics, 33(2): 140—144
- Dewoody J A, Avise J C, 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. Journal of Fish Biology, 56(3): 461—473
- Lee B Y, Lee W J, Streelman J T *et al*, 2005. A Second-Generation genetic linkage map of tilapia (*Oreochromis spp.*). Genetics, 170: 237—244
- Lee W J, Kocher T D, 1996. Microsatellite DNA markers for genetic mapping in *Oreochromis niloticus*. Journal of Fish Biology, 49(1): 169—171
- Romana-Eguia M R R, Ikeda M, Basiao Z U *et al*, 2004. Genetic diversity in farmed Asian Nile and red hybrid tilapia stocks evaluated from microsatellite and mitochondrial DNA analysis. Aquaculture, 236: 131—150
- McConnell S K J, Beynon C, Leamon J *et al*, 2000. Microsatellite markers based genetic linkage maps of *Oreochromis aureus* and *O. niloticus* (Cichlidae): extensive linkage group segment homologies revealed. Animal genetics, 31(3): 214—218
- O'Connell M, Wright J M, 1997. Microsatellite DNA in fishes. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 7: 331—363
- Rutten M J M, Komen H, Deerenberg R M *et al*, 2004. Genetic characterization of four strains of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) using microsatellite markers. Animal Genetics, 35(2): 93—97
- Wright S, 1978. Evolution and the genetics of populations. University of Chicago Press, 1—30
- Yue G H, Orban L, 2002. Microsatellites from genes show polymorphism in two related *Oreochromis* species. Molecular Ecology Notes, 2(2): 99—100

GENETIC DIVERSITY ANALYSIS OF THE SAME SPECIES OF TILAPIA CULTURED IN DIFFERENT REGIONS

XIAO Wei¹, YANG Hong¹, LI Da-Yu¹, LUO Yong-Ju², ZOU Zhi-Ying¹, ZHU Jing-Lin¹

(1. Key Laboratory of Genetic Breeding and Aquaculture Biology of Freshwater Fishes, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi, 214081; 2. Guangxi Institute of Fisheries, Nanning, 530021)

Abstract Thirty-six pairs of microsatellite primers for *Oreochromis niloticus* from GenBank were tested on four populations, including *O. aureus* ("Xia Ao 1 Hao", ZA) and Egypt *O. niloticus* ("99 Series", ZN), which were cultured in the Chinese Academy of Fishery Sciences Freshwater Fisheries Research Center, and other two populations (GA and GN), which was introduced and cultured in the Guangxi Institute of Fisheries. It was showed that 19 pairs (52.8%) display polymorphism. In the *O. aureus* populations, the average observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e) and polymorphism information content (PIC) were 0.10, 0.15, and 0.12, respectively; the genetic similarity between the two populations was 0.9867; the average inbreeding coefficient (F_{ST}) and gene flow (N_m) of ZA and GA were 0.0379 and 6.3408, respectively. In the Egypt *O. niloticus* populations, the average observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e) and polymorphism information content (PIC) were 0.37, 0.49, and 0.43, respectively; the genetic similarity within these two populations was 0.7696; the average inbreeding coefficient (F_{ST}) and gene flow (N_m) of ZN and GN were 0.1146 and 1.9309, respectively. The results showed that 1) In the two *O. aureus* populations, the genetic diversity was low, the similarity was high, and the genetic variation between the ZA and GA was low, indicating the information of *O. niloticus* populations were relatively stable; 2) In the two Egypt *O. niloticus* populations, the genetic diversity was moderate, the similarity was relative low, and the genetic distance between ZN and GN was relative high, indicating some genetic variation existed in the Egypt *O. niloticus* populations, and there was a certain degree of cultivation potential in these Egypt *O. niloticus* populations; 3) Primers UNH896, UNH995, and UNH999 could be used as unique microsatellites markers to distinguish *O. aureus* and *O. niloticus*.

Key words *Oreochromis aureus*, Egypt *O. niloticus*, Microsatellites, Genetic diversity