

文章编号: 1004 - 7271(2008)04 - 0396 - 06

## 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

李腾云, 李思发

(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:**用6对微卫星引物对尼罗罗非鱼、萨罗罗非鱼及其正反杂交鱼的正反回交子代共6种遗传型(genotype)罗非鱼进行了遗传变异分析,探讨回交的遗传效应。结果表明:(1)6对引物均有较好的多态性,可用于这6种罗非鱼的遗传变异分析;(2)6个微卫星位点在6种鱼中的平均杂合度为0.562~0.731,其中正反回交鱼萨尼×尼罗最高(0.731),原始亲本尼罗最低(0.562);多态信息含量为0.510~0.685,也是萨尼×尼罗最高(0.685),尼罗(0.510)最低;有效等位基因范围是2.71~3.85,也是萨尼×尼罗(3.85)最高,原始亲本尼罗最低(2.71)。(3)两种反回交子代的Nei's遗传距离都与亲本尼罗接近,采用UPGMA和NJ法构建的聚类图表明,回交种与原始母本尼罗罗非鱼为一组,原始父本萨罗罗非鱼为另一组。萨尼×尼罗群体内遗传变异水平最高,是最有育种潜力的回交种;母本尼罗对回交子代的遗传影响大于父本萨罗,回交子代表现了一定的母本效应。

**关键词:**尼罗罗非鱼;萨罗罗非鱼;回交;微卫星;遗传变异

中图分类号:S 917 文献标识码:A

## Microsatellite marker analysis of genetic variation in the backcross progenies from *Oreochromis niloticus* and *Sarotherodon melanotheron*

LI Teng-yun, LI Si-fa

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

**Abstract:** 6 pairs of microsatellite primers were used to study genetic variation of *Oreochromis niloticus*, *Sarotherodon melanotheron* and their reciprocal backcross progenies. The results indicated: (1) Six pairs of primers showed rich polymorphic, which can be used as good genetic markers for the genetic variation study of these tilapias. (2) The average heterozygosity (H) was 0.562 - 0.731, the highest value was in (*S. melanotheron* ♀ × *O. niloticus* ♂) ♀ × *O. niloticus* ♂ (0.6727), the lowest existed in *O. niloticus*. The average polymorphism information content (PIC) was 0.510 - 0.685, the highest existed in (*S. melanotheron* ♀ × *O. niloticus* ♂) ♀ × *O. niloticus* (0.685) and the lowest was in the *O. niloticus* (0.51). The effective

收稿日期: 2007-12-07

基金项目: 国家科技支撑计划专题(2006BAD01A1203)

作者简介: 李腾云(1982-), 男, 河北邢台人, 硕士研究生, 专业方向为水产动物种质资源与种苗工程。E-mail: tyli@stmail.shou.edu.cn

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

numbers of alleles was 2.71 - 3.85, the highest value existed in (*S. melanotheron* ♀ × *O. niloticus* ♂) ♀ × *O. niloticus* ♂ (3.85), the lowest existed in *O. niloticus* (2.71). (3) Both negative backcross progenies have the closest genetic distance with *O. niloticus*; UPGMA and NJ trees showed that the backcross progenies and *O. niloticus* were grouped together, *S. melanotheron* comprised the other clade. The result that the highest genetic diversity existed in (*S. melanotheron* ♀ × *O. niloticus* ♂) ♀ × *O. niloticus* ♂ indicated this cross has the largest potential for further breeding; The maternal line of *O. niloticus* has made more genetic impact on the backcross progenies than the paternal line of *S. melanotheron*. The backcross progenies showed obvious maternal effect.

**Key words:** *Oreochromis niloticus*; *Sarotherodon melanotheron*; backcross; microsatellite markers; genetic variation

微卫星 DNA 具有分布广泛、多态性丰富、呈共显性遗传和检测方便快捷等特点<sup>[1]</sup>, 在水生经济动物的良种培育、群体遗传分析、亲子鉴定、遗传图谱构建、系统发育等方面表现出了广泛的应用价值<sup>[2-5]</sup>。尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)是我国主要淡水养殖鱼类,生长快,但耐盐能力一般;萨罗罗非鱼(*Sarotherodon melanotheron*)耐盐能力强,适合咸水养殖,而生长较慢。为了培育出既耐盐又生长快的罗非鱼新品种,本实验室用尼罗和萨罗进行杂交,杂交种的耐盐能力较尼罗有了提高,但生长速度比尼罗慢;为了进一步提高其生长速度,又用杂交种与尼罗回交。本文是以 4 种正、反回交鱼及其原始亲本为材料,用 6 对微卫星引物对它们进行遗传变异分析,评价回交的遗传效应,以期耐盐罗非鱼新品种的选育提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

原始亲本:尼罗罗非鱼(以下简称“尼罗”)、萨罗罗非鱼(以下简称“萨罗”);

正反回交子一代:

① (尼罗 ♀ × 萨罗 ♂) ♀ × 尼罗 ♂, 简称“尼萨 × 尼罗”

② 尼罗 ♀ × (尼罗 ♀ × 萨罗 ♂) ♂, 简称“尼罗 × 尼萨”

③ (萨罗 ♀ × 尼罗 ♂) ♀ × 尼罗 ♂, 简称“萨尼 × 尼罗”

④ 尼罗 ♀ × (萨罗 ♀ × 尼罗 ♂) ♂, 简称“尼罗 × 萨尼”

上述 2 个原始亲本和 4 种正反回交鱼(共 6 个遗传型群体),均采自河北沧州中捷农场罗非鱼良种场。每群体随机选取 30 尾(共 180 尾),剪尾鳍放入 95% 酒精保存,然后进行微卫星 DNA 分析。

### 1.2 DNA 提取

DNA 提取采用传统的酚/氯仿法<sup>[6]</sup>, TE (pH8.0) 溶解备用。

### 1.3 微卫星引物

根据文献<sup>[7-9]</sup>提供的微卫星引物序列,在上海生物工程有限公司合成(表 1)。

表 1 6 对微卫星引物序列、特异退火温度  
Tab.1 Sequence, specific annealing temperature of six microsatellite primers

微卫星标记	上游序列	下游序列	退火温度(℃)
UNH216	GGGAACTAAAGCTGAAATA	TGCAAGGAATATCAGCA	56.0
UNH129	AGAAGTCGTGCATCTCTC	TGTACATCATCTGTGGG	51.6
GM532	CACAGATGCATAGTCCCTCAGG	GACTTTACATATGCATATTTCTG	50.7
GM155	CCCACATATATAAACACAGCA	CGACTGACATTTCCACACTC	59.2
GM354	CGGGAGAGCAGGTCAG	CACGTTACAGGTTACTGTGT	55.4
GM559	GCACCATTTTTAACCAGTGCT	ATTTTCCACCGAGCTCACCT	60.0

## 1.4 PCR 扩增及产物检测

每一样品的反应总体积 25  $\mu\text{L}$ , 含 2.5  $\mu\text{L}$  10  $\times$  buffer (含 100 mmol/L Tris-HCl, pH 9.5, 500 mmol/L KCl, 30 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.001% 明胶, pH=9.0), 2  $\mu\text{L}$  dNTP 混合液 (每种 dNTP 的终浓度 0.2 mmol/L), 正、反向引物各 1  $\mu\text{L}$  (终浓度 0.2  $\mu\text{mol/L}$ ), 2  $\mu\text{L}$  基因组 DNA (约 50 ~ 150 ng), 0.5  $\mu\text{L}$  Taq DNA 聚合酶 (1.25 单位), 16  $\mu\text{L}$  去离子水, 加入 20  $\mu\text{L}$  石蜡油。PCR 扩增反应在 Eppendorf Mastercycler Gradient PCR 仪上进行。

参照 Crooijmans 等 (1997) 的方法<sup>[10]</sup>, PCR 反应程序为: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 49 ~ 70  $^{\circ}\text{C}$  (根据引物的退火温度进行调整) 退火 45 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 60 s。35 个循环后, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。扩增产物在 8% 的非变性聚丙烯酰胺电泳分离, 电压为 8 V/cm, 电泳后进行银染, 用扫描仪扫描电泳图谱。

## 1.5 数据统计分析

由 POPGENE1.32 软件计算六个群体的等位基因频率, 等位基因数 (A), 有效等位基因数 (Ne)。群体平均杂合度 (H) 按公式 (1)<sup>[11]</sup>, 多态信息含量 (PIC) 按公式 (2)<sup>[12]</sup> 计算。

$$(1) \text{ 群体平均杂合度 (H)} \quad H = 1 - \left( \sum_{i=1}^n P_i^2 \right)$$

$$(2) \text{ 多态信息含量 (PIC)}$$

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

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

## 1.6 遗传距离及聚类分析

计算出 6 个群体间的 Nei's 标准遗传距离 (Nei's standard genetic distance,  $D_S$ )<sup>[13]</sup> 和 Nei's 遗传距离 (Nei's genetic distance,  $D_A$ )<sup>[14]</sup>。采用 UPGMA 和 NJ 法构建群体间的系统树<sup>[15]</sup>。

# 2 结果与分析

## 2.1 微卫星 PCR 结果

用筛选出的 6 对微卫星引物对 6 种遗传型罗非鱼进行 PCR 扩增, 都能扩增出相应的产物, 部分微卫星引物扩增产物的电泳结果见图 1。在 6 个基因座位中共检测出 31 个等位基因, 平均为 5.17。扩增产物片段的大小在 93 ~ 270 bp。

## 2.2 群体的遗传多样性

6 个群体的遗传多样性指标列于表 2, 尼萨  $\times$  尼罗的平均等位基因数最大 (4.83), 萨尼  $\times$  尼罗的有效等位基因数最大 (3.85); 尼罗的平均等位基因数 (3.33) 和有效等位基因数 (2.71) 都最小。平均遗传杂合度期望值最高的是萨尼  $\times$  尼罗 (0.73), 最低的是尼罗 (0.56)。PIC 平均值均大于 0.5, 其中最高的为萨尼  $\times$  尼罗 (0.65), 最低的为尼罗 (0.51)。

由表 3 可以看出, 6 个引物在 6 群体的多态信息含量平均值在 0.532 ~ 0.694, 其中尼罗在 GM532 位点最低 (0.129), 萨尼  $\times$  尼罗在 GM532 位点最高 (0.755)。

## 2.3 遗传距离和聚类分析

尼罗  $\times$  尼萨与尼罗遗传距离最小, 萨尼  $\times$  尼罗与尼罗遗传距离最大, 具体见表 4。

采用 Nei's 遗传距离  $D_A$  进行 UPGMA 和 NJ 聚类分析的结果见图 2、图 3。从聚类图中可以看出: 回交种与尼罗罗非鱼聚为一支, 萨罗罗非鱼另聚为一支。

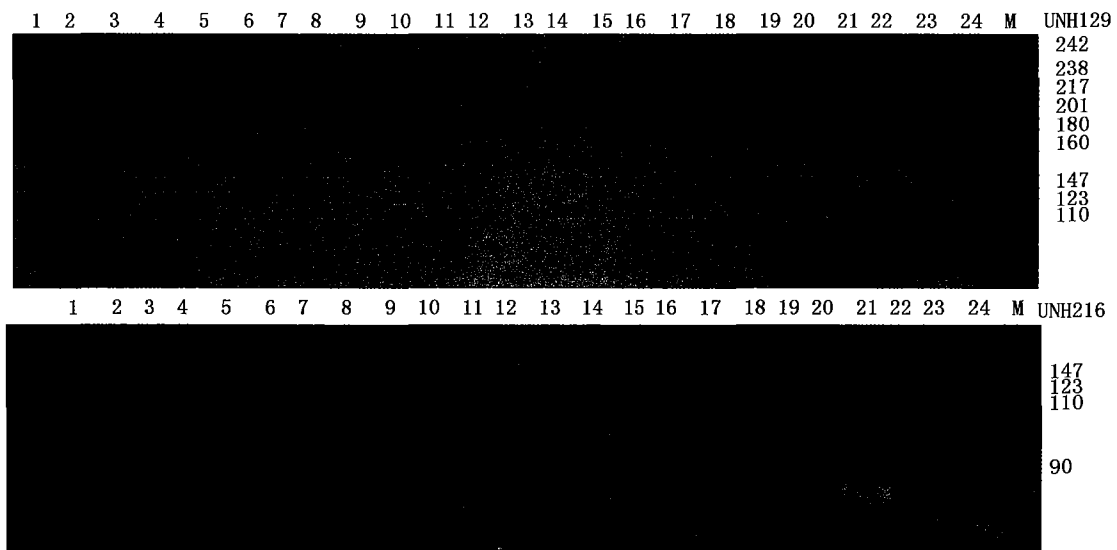


图 1 引物 UNH129(上)和 UNH216(下)的部分个体电泳结果

Fig. 1 The electrophoresis profiles in some individuals amplified by the primers UNH129 (up) and UNH216 (down)  
1-4: 尼罗罗非鱼; 5-8 尼罗 × 尼萨; 9-12 尼罗 × 萨尼; 13-16: 萨罗罗非鱼; 17-20: 尼萨 × 尼罗; 21-24: 萨尼 × 尼罗; M: 分子标记 (PBR322/ MSP I)

表 2 6 种遗传型罗非鱼的有效等位基因数、多态信息含量 (PIC) 和群体平均杂合度 (H)

Tab. 2 Effective allele numbers, polymorphism information content and mean heterozygosity in 6 genotypes of tilapias

群体	平均等位基因数	有效等位基因数	多态信息含量 PIC	群体平均杂合度 H
尼罗	3.33	2.71	0.510	0.562
尼罗 × 尼萨	4.17	2.86	0.560	0.611
尼罗 × 萨尼	4.33	3.05	0.608	0.669
萨罗	4.17	3.00	0.576	0.637
尼萨 × 尼罗	4.83	3.44	0.650	0.700
萨尼 × 尼罗	4.50	3.85	0.685	0.731

表 3 6 个微卫星基因座在 6 种遗传型罗非鱼的多态信息含量 (PIC)

Tab. 3 Polymorphism information content for six microsatellite loci in 6 genotypes of tilapias

	尼罗	尼罗 × 尼萨	尼罗 × 萨尼	萨罗	尼萨 × 尼罗	萨尼 × 尼罗	均值
GM532	0.129	0.558	0.638	0.447	0.663	0.755	0.532
GM155	0.691	0.714	0.593	0.716	0.723	0.724	0.694
GM354	0.427	0.419	0.653	0.643	0.607	0.679	0.571
GM559	0.677	0.718	0.578	0.704	0.731	0.704	0.686
UNH129	0.511	0.555	0.539	0.539	0.564	0.553	0.544
UNH216	0.638	0.397	0.649	0.406	0.610	0.694	0.566

表 4 6 种遗传型罗非鱼的 Nei's 遗传距离 ( $D_A$ , 对角线上方) 和 Nei's 标准遗传距离 ( $D_S$ , 对角线下方)

Tab. 4 Nei's genetic distance (above diagonal) and Nei's standard genetic distance (below diagonal) between 6 genotypes of tilapias

	尼罗	尼罗 × 尼萨	尼罗 × 萨尼	萨罗	尼萨 × 尼罗	萨尼 × 尼罗
尼罗		0.125	0.211	0.606	0.183	0.245
尼罗 × 尼萨	0.144		0.129	0.248	0.031	0.154
尼罗 × 萨尼	0.232	0.152		0.149	0.066	0.130
萨罗	0.625	0.270	0.173		0.146	0.221
尼萨 × 尼罗	0.206	0.062	0.094	0.172		0.097
萨尼 × 尼罗	0.271	0.182	0.160	0.250	0.130	

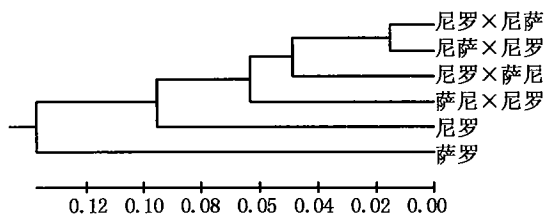


图2 基于 Nei's 遗传距离( $D_A$ )的 6 个遗传型罗非鱼群体间的 UPGMA 聚类图

Fig. 2 UPGMA tree from 6 genotypes of tilapias based on Nei's genetic distance ( $D_A$ )

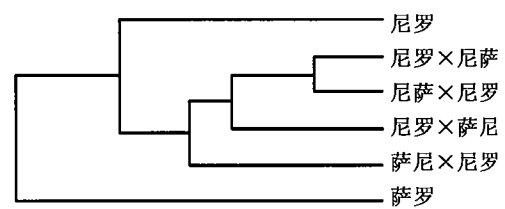


图3 基于 Nei's 遗传距离( $D_A$ )的 6 个遗传型罗非鱼群体间的 NJ 聚类图

Fig. 3 NJ tree from 6 genotypes of tilapias based on Nei's genetic distance ( $D_A$ )

### 3 讨论

#### 3.1 回交种及其原始亲本的群体内遗传变异分析

目前,国内已将 SSR 技术运用于畜禽杂交种、回交种遗传多样性的研究<sup>[16-17]</sup>,但对水产动物的杂交种、回交种的 SSR 分析报导很少。本研究采用 6 对微卫星引物对尼罗罗非鱼和萨罗罗非鱼以及它们回交子代进行遗传多样性研究,6 对引物在六种鱼的扩增带型都出现了差异。通过电泳发现六对微卫星引物扩增的等位基因数在 3~6,平均值为 5.17,可以用于群体遗传变异的分析。

度量群体遗传变异大小的一个重要指标是有效等位基因数,它反映了基因座等位基因间的相互作用,通常检测到的等位基因数往往大于有效等位基因数。本研究中的结果也是如此,这是由于一般把所检测到的等位基因都作为相同效应来分析,但实际上这是不可能的,因此出现了有效等位基因数小于等位基因数的现象。本研究检测到的等位基因数平均为 5.17,有效等位基因数平均为 3.54,两者有一定差距,这有可能是所检测的基因座的等位基因的分布不均匀。

杂合度是度量群体变异的另一个重要参数。平均杂合度的大小反映群体遗传结构变异程度的高低。杂合度越高,表明该群体的遗传多样性越高;反之,说明群体的遗传一致性越高。本研究得出的 6 种鱼平均杂合度在 0.562~0.731,其中尼罗最低,萨尼×尼罗最高,这说明萨尼×尼罗的遗传多样性最丰富。

多态信息含量(PIC)是衡量等位基因片段多态性的理想指标。按 Bostein 等<sup>[18]</sup>提出的衡量基因变异程度高低的的多态信息含量指标,当  $PIC \geq 0.5$  时该座位为高度多态性座位,  $0.25 \leq PIC < 0.5$  时为中度多态性座位,  $PIC < 0.25$  时为低度多态性座位。本实验的 6 个微卫星座位的平均多态性大于 0.5,均为高度多态性,可以提供较为丰富的遗传信息,可以作为遗传分析的有效工具。在一个群体中,多态信息含量越大,表明该座位杂合子比例越大,提供的遗传信息越多。在本研究中 6 个罗非鱼种在 6 个微卫星座位的平均多态信息含量在 0.510~0.685,为高度多态,其中尼罗最低,萨尼×尼罗最高,可见 PIC 的高低与群体平均杂合度的研究结果基本一致。

#### 3.2 回交种及其原始亲本的群体间遗传距离及聚类关系

群体间遗传关系一般表现为以等位基因频率计算的两两群体间的遗传距离,微卫星 DNA 具有高度多态性,加上目前大量公布的可供选择的微卫星序列,使得我们可以用微卫星来测定群体间的遗传距离并能得到较为准确的结果。在本实验中采用  $D_A$  和  $D_S$  两种遗传距离进行分析,两种遗传距离得出一致的结果,其中尼罗和萨罗的遗传距离最大,在回交种中尼罗×尼萨与尼罗最小,萨尼×尼罗与尼罗最大。

Tkashashi<sup>[19]</sup>和 Nei 等<sup>[20]</sup>通过计算机模拟对各种遗传距离进行研究,证明在分析物种内群体间的遗传变异时,运用  $D_A$  和  $D_S$  遗传距离是获得准确系统发育树的最有效方法。本研究分别采用  $D_A$  遗传距离进行 UPGMA 和 NJ 聚类分析,得出了相同的结果,萨罗独自为一支,回交种与尼罗为另一支。本试验室用 6 对微卫星对尼罗、萨罗及其正反杂交后代的聚类结果表明,杂交后代与萨罗为一支(结果待发

表)。这表明,萨罗对杂交种的遗传影响大于尼罗,而通过回交,尼罗的遗传影响开始大于萨罗。

### 3.3 回交效应的遗传分析

回交是指杂交后代与双亲之一进行再次杂交。其目的在于加强轮回亲本的优良性状。为了提高杂交种的生长性能,我们以尼罗为轮回亲本进行杂交。结果发现,在两个杂交种与尼罗的正反回交子代中,都是反回交子代(尼罗×尼萨、尼罗×萨尼)的遗传距离与其尼罗亲本接近,这表明母本对回交子代遗传的影响略大于父本,回交表现了一定的母本效应。在回交子代中,尼罗×尼萨的各遗传指标与尼罗亲本最接近,萨尼×尼罗的有效等位基因数、平均杂合度、多态信息含量等遗传指标比其他回交种高,表明其群体内遗传变异水平较高,因此其还具有一定的回交选育潜力。本研究的结果将对耐盐罗非鱼进一步的选育具有积极的指导意义。

### 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] 孙效文,梁利群. 鲤鱼的遗传连锁图谱[J]. 中国水产科学,2000,7(1):1-5.
- [3] 朱滨,常剑波,谭细畅,等. 湖鲟微卫星引物应用于中华鲟亲子关系分析的初步研究[J]. 水生生物学报,1999,23(6):547-553.
- [4] 赵莹莹,朱晓琛,孙效文. 虹鳟6个养殖群体遗传多样性的微卫星分析[J]. 遗传,2006,(08):956-962.
- [5] Herwerden L V, John B, Lesapeplow, et al. Microsatellite markers for coral trout (*Plectropomus laevis*) and red throat emperor (*Lethrinus miniatus*) and their utility in other species of reef fish[J]. Molecular Ecology,2000,9:1919-1952.
- [6] 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.
- [7] 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(1-2): 43-56.
- [8] Kocher T D, Lee W J, Sobolewska H, et al. A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Genetics, 1998, 148: 1225-1232.
- [9] Lee B Y, Lee W J, Streeman J T. A Second-Generation Genetic Linkage Map of Tilapia (*Oreochromis spp.*) [J]. Genetics, 2005, 170: 237-244.
- [10] 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.
- [11] Nei M, Roychoudury A K. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance [J]. Genetics, 1997, 76(2): 379-390.
- [12] 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.
- [13] Nei M. Genetic distance between populations [J]. Am Nat, 1972, 106: 283-292.
- [14] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. Genetics, 1978, 89: 583-590.
- [15] 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.
- [16] 杨国忠, 张嘉保, 任文陟, 等. 草原红牛及其杂种牛群体遗传变异与肉用性能的微卫星标记研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2006, (2): 128-133.
- [17] 刘国庆, 孙业良, 杨利国, 等. 级进杂交绵羊微卫星基因杂合度与生长性能的关系 [J]. 南京农业大学学报, 2006, (1): 67-71.
- [18] Bolstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. Am J Hum Genet, 1980, 32: 314-331.
- [19] Takahashi H, Nirasawa K, Nagamine Y, et al. Genetic relationship among Japanese native breeds of chicken based on microsatellite DNA polymorphisms [J]. Journal of Heredity, 1998, 89(6): 543-546.
- [20] Nei M, Tajima F, Tatenos Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data [J]. Mol Evol, 1983, 19: 153-157.