

• 研究简报 •

## 基于微卫星标记的5个尼罗罗非鱼品系的遗传多样性分析

梁宏伟<sup>1,2</sup> 李 忠<sup>1,2</sup> 罗相忠<sup>1,2</sup> 王长忠<sup>1,3</sup> 呼光富<sup>1,3</sup> 邹桂伟<sup>1,2</sup> 杨永铨<sup>4</sup>

1 (中国水产科学研究院长江水产研究所农业部淡水生物多样性保护与利用重点开放实验室, 荆州 434000)

2 (中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 无锡 214081)

3 (华中农业大学水产学院, 武汉 430070)

4 (厦门鹭业水产有限公司, 厦门 361000)

**摘要:** 为了对生产上应用的5个尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)品系的遗传背景进行本底调查, 以期育种工作提供基础数据, 本文用19对微卫星引物对5个尼罗罗非鱼品系(苏丹品系、台湾品系、吉富品系、超雄品系 I 和超雄品系 II)进行了遗传多样性分析, 计算并统计了等位基因数、多态信息含量(PIC)、杂合度、遗传相似性系数、遗传距离等参数。结果表明19个微卫星位点在5个罗非鱼品系中共检测到113个等位基因, 平均期望杂合度在0.578–0.692之间, 平均多态信息含量在0.473–0.628之间。5个尼罗罗非鱼品系有较丰富的遗传多样性, 而超雄品系 I 的遗传多样性相对较为贫乏。

**关键词:** *Oreochromis niloticus*, 遗传育种, 遗传变异, 超雄品系

## Genetic diversity based on microsatellite markers in five Nile tilapia strains

Hongwei Liang<sup>1,2</sup>, Zhong Li<sup>1,2</sup>, Xiangzhong Luo<sup>1,2</sup>, Changzhong Wang<sup>1,3</sup>, Guangfu Hu<sup>1,3</sup>, Guiwei Zou<sup>1,2</sup>, Yongquan Yang<sup>4</sup>

1 Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation and Utilization, Ministry of Agriculture, Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000

2 Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081

3 College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070

4 Xiamen Luye Fisheries Co., Ltd., Xiamen 361000

**Abstract:** To provide background on the genetics of cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) strains and basic information for breeding, we surveyed five Nile tilapia strains (Sudan, Taiwan, GIFT, Supermale I and Supermale II) using 19 microsatellite loci to estimate the genetic variation. A total of 113 alleles were detected. Mean expected heterozygosity ( $H_e$ ) ranged between 0.578 and 0.692, and mean polymorphism information content (PIC) ranged between 0.473 and 0.628, indicating that these five Nile tilapia strains were genetically diverse. Of the five strains, the supermale I had less genetic variation compared with other strains.

**Key words:** *Oreochromis niloticus*, genetic breeding, genetic variation, supermale strains

尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)隶属于鲈形目丽鱼科, 原产于非洲和中东, 属于温水性鱼类, 具有繁殖力强、生长速度快、食性杂、病害少、环境适应力强等优点, 是世界重要的养殖品种之一,

其产量占到世界养殖罗非鱼产量的80%左右, 目前已成为我国重要的淡水养殖鱼类。但是罗非鱼具有性成熟早的特点, 个体长到5个月甚至更短时间就开始繁殖, 造成个体规格偏小, 产量和效益下降。

收稿日期: 2008-10-20; 接受日期: 2009-01-12

基金项目: 国家科技基础条件平台专项(2006DKA30470-002)

\* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: zougw@yfi.ac.cn

罗非鱼雌雄个体生长差异较大, 雄性罗非鱼的生长速度较雌性快30–40%, 因而养殖雄性罗非鱼的效益更高。多年来, 众多研究致力于提高罗非鱼的雄性比例或进行全雄罗非鱼的诱导工作, 大部分是通过杂交获得高雄性率的苗种(王楚松等, 1989; Müller-Belecke & Horstgen-Schwarz, 1995; Wes-sels & Hörstgen-Schwarz, 2007), 而通过人工诱导获得超雄罗非鱼及利用超雄罗非鱼作为父本进行繁殖获得全雄罗非鱼的研究方面较为贫乏(Mair *et al.*, 1997; 容寿柏等, 2001)。厦门鹭业水产有限公司经过多年的研究, 以台湾品系为亲本, 通过人工诱导成功获得2个尼罗罗非鱼超雄品系。本研究通过对这2个超雄品系以及分别从苏丹、中国台湾、菲律宾等地引种繁育的3个尼罗罗非鱼品系进行微卫星分析, 旨在比较它们的遗传多样性, 为罗非鱼进一步选育和利用提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

苏丹品系、台湾品系、吉富品系以及以台湾品系为亲本获得的超雄品系 I 和超雄品系 II 的采样地点和样本数量见表1。剪取实验鱼的尾鳍条放在装有无水乙醇的离心管里, 带回实验室, -20℃保存备用。

1.2 基因组DNA的提取

参考Sambrook等(1989), 用苯酚—氯仿抽提法进行基因组DNA提取。

1.3 PCR扩增的引物、反应体系与程序

根据Carleton等(2002)报道的微卫星引物序列, 由上海生工生物工程技术有限公司合成19对引物。微卫星引物序列及引物筛选后的退火温度见表2。反应体系总体积为15 μL, 其中10×Buffer 1.5 μL, 10 mM dNTPs 0.2 μL, 5 U/μL *Taq* DNA聚合酶

0.2 μL, 10 μM的上下游引物各0.5 μL, DNA模板0.2 μL, ddH<sub>2</sub>O 11.9 μL。PCR扩增程序为: 94℃预变性5 min; 94℃变性30 s, 50–60℃退火30 s, 72℃延伸1 min, 共34个循环; 最后72℃延伸10 min, 4℃保存。

1.4 PCR产物的电泳检测和基因分型

采用12%(39:1)的非变性聚丙烯酰胺凝胶, 80 V电压电泳过夜, 然后进行银染照相。根据每个个体电泳结果显示的条带位置的不同作基因分型。

1.5 数据统计处理

利用POPGEN32进行统计分析, 计算微卫星位点的观测等位基因数、有效等位基因数、基因观测杂合度、基因期望杂合度、固定指数、遗传距离和遗传相似系数等遗传参数。用MEGA3.1软件构建系统进化树。多态信息含量(PIC)按Botstein等(1980)的公式计算。

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^m p_i^2 - \sum_{i=1}^{m-1} \sum_{j=i+1}^m 2p_i^2 p_j^2$$

其中 $P_i$ 和 $P_j$ 分别为第*i*和第*j*个等位基因在群体中的频率,  $m$ 为等位基因数。

2 结果与讨论

2.1 品系的遗传多样性

19个微卫星标记在检测的5个品系中均表现多态, 共检测到113个等位基因, 其中在苏丹品系共检测到107个等位基因, 台湾品系80个, 超雄品系 I 50个, 超雄品系 II 70个, 新吉富品系85个。19个微卫星位点中, UNH738检测到的等位基因最多(11个), UNH851最少(2个)。苏丹品系的等位基因数为2–11, 平均为5.63; 台湾品系为2–7, 平均为4.21; 超雄品系 I 为2–5, 平均为2.63; 超雄品系 II 2–6, 平均为3.68; 吉富罗非鱼为2–7, 平均为4.47。

19个微卫星位点在5个品系中的观测杂合度、

表1 5个尼罗罗非鱼品系的样本量和来源  
Table 1 Sample size and origin of the five Nile tilapia strains studied

品系 Strains	样本量 Sample size	样本来源 Origin
苏丹品系 Sudan (SLF)	48	中国水产科学研究院长江水产研究所 Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences
台湾品系 Taiwan (TLF)	30	厦门鹭业水产有限公司 Xiamen Luye Fisheries Co., Ltd.
超雄品系 I Supermale I (YY I)	30	厦门鹭业水产有限公司 Xiamen Luye Fisheries Co., Ltd.
超雄品系 II Supermale II (YY II)	30	厦门鹭业水产有限公司 Xiamen Luye Fisheries Co., Ltd.
吉富品系 GIFT	48	上海海洋大学 Shanghai Ocean University

表2 19个微卫星位点引物序列及退火温度  
Table 2 Primer sequence and annealing temperature for 19 microsatellite loci

座位 Locus	引物序列(5'→3' ) Primer sequence (5'→3' )	退火温度 Annealing tem- perature (°C)	片段大小 Allele size (bp)	等位基因数 Number of alleles	登录号 GenBank acces- sion no.
UNH719	F: AAACCATTCATCCTTCACTCG R: GAATGCTTAGTGCCCATCAAT	50	124, 126	8	G63968
UNH735	F: GTGCACACAGCAGAGGCTAA R: CTTTGCTGCTGTGCGAGTTT	60	168, 178, 182	7	G63984
UNH738	F: TGCTGTGCAAATAAAGTGCTG R: TCTTTGCCAGGTTGTCCATT	52	157, 171	11	G63987
UNH773	F: TGGCGGTAAAATGAAAATGG R: CGATCCCAGACTTTGACACA	50	207, 211, 253	6	G64061
UNH817	F: CCTCTTTCTGTGGGTTTCTCC R: CCCAGCTGCAGTGATACTT	52	99, 119	8	G64035
UNH840	F: TTTCTGTTCACCCAGTTTT R: GGGCTGAGCAGTCTGGTATT	50	131, 138, 140	3	G68180
UNH841	F: GCGACGCCTACTTCTGAGAG R: TTGTTATTGTCCCTGCTGTCC	58	114, 156	10	G68181
UNH843	F: CGTTCTACTCTGAAGAAAGACATGA R: CCACTCGACGGACGTTTTAG	55	109, 120, 124	6	G68182
UNH844	F: GCCACAATGTCAAGGTTTCA R: GCAGCTGCTCACACACTCTT	58	98, 104, 116	8	G68183
UNH845	F: GCCGACTCCAACCTTGCTACT R: ATCCCTACACGGACAAGTG	55	178, 181	8	G68184
UNH846	F: TGGAGCAGCTTCTTCTACATCA R: CACATGATGGAAGCCGTGTA	55	173, 203	6	G68185
UNH848	F: TCCCCGTAATAAATTAAACCA R: GCCTGTGAATAACAATGTATTTCCT	55	180, 192, 205	4	G68186
UNH849	F: CCCAGGTGCATATTTCCCTA R: CTTGCTCTGCTTTGCTGAAA	55	155, 191	7	G68187
UNH851	F: TGGCTGTACATAATCTGGTG R: CCTATCGTCGGTGATTGGTC	55	111, 117, 122	2	G68188
UNH853	F: TAAAGCTCGTCCCCGTAACA R: TGGCTCTCATCACTGTCTGC	55	172, 174, 186	7	G68189
UNH854	F: GGCAAAGAAAGCGATACTGC R: TTCTTAGCTTGTGGTGCCTG	55	225, 229	8	G68190
UNH855	F: ACTCCCGCTGTTGCTGTTAG R: GAGGGGAGCCTACAACGTAA	55	152, 162	3	G68191
UNH856	F: GCAGCTCACAACATCTCAG R: GATGCATCATCACGGTAACCT	55	189, 197	4	G68192
UNH858	F: TTCAAACAGCTTCACGGTCA R: CTATGCCATGGCTAAAGTCAC	60	257, 280	8	G68194

期望杂合度和多态信息含量见表3。从表3可以看出, 19个微卫星位点观测杂合度均较高, 大部分位点的观测杂合度为1.000。5个罗非鱼品系的平均观测杂合度均在0.900以上, 苏丹品系、台湾品系、吉富品系、超雄品系 I 和超雄品系 II 的平均期望杂合度分别为0.692、0.647、0.649、0.578和0.637, 以苏丹品系最高, 依次为吉富品系、台湾品系、超雄品系 II、超雄品系 I, 其中超雄品系 I 与其他4个品系之间的平均期望杂合度的差异达到了显著水平( $P<0.05$ ), 其他4个品系两两之间差异均不显著( $P>0.05$ ), 表明5个品系的遗传多样性均较高, 以苏丹品系的遗传多样性最为丰富, 超雄品系 I 最为贫乏。Romana-Eguia等(2004)利用微卫星标记对养殖的亚洲尼罗罗非鱼和红色杂种罗非鱼群体进行研究发现, 吉富

罗非鱼的平均期望杂合度为0.813, 本研究中的吉富罗非鱼的平均期望杂合度为0.649, 低于Romana-Eguia等的研究结果, 这可能与研究的品系和位点不同有关, 但遗传多样性均较高。李莉好等(2008)利用7对微卫星引物对广东国家级罗非鱼良种场的吉富品系尼罗罗非鱼检测得到平均期望杂合度为0.622, 与本实验结果相近。本实验所研究的5个品系均呈现出较高的杂合度, 遗传变异较大, 具有进一步选育的潜力。

从表3可以看出, 5个品系的平均多态信息含量由高到低依次为苏丹品系(0.628)、吉富品系和台湾品系(均为0.567)、超雄品系 II (0.551)、超雄品系 I (0.473), 超雄品系 I 与其余4个品系之间存在明显的差异( $P<0.05$ ), 其余4个品系的平均多态信息含

表3 19个微卫星位点在5个品系中的遗传多样性参数  
Table 3 Genetic diversity in five Nile tilapia strains detected by 19 microsatellite loci

座位 Locus	苏丹品系 Sudan			台湾品系 Taiwan			吉富品系 GIFT			超雄品系 I Supermale I			超雄品系 II Supermale II		
	PIC	观测杂合度 $H_o$	期望杂合度 $H_e$	PIC	观测杂合度 $H_o$	期望杂合度 $H_e$	PIC	观测杂合度 $H_o$	期望杂合度 $H_e$	PIC	观测杂合度 $H_o$	期望杂合度 $H_e$	PIC	观测杂合度 $H_o$	期望杂合度 $H_e$
UNH719	0.764	1.000	0.800	0.790	1.000	0.831	0.744	1.000	0.789	0.711	1.000	0.762	0.749	1.000	0.796
UNH 735	0.726	1.000	0.773	0.687	1.000	0.746	0.779	1.000	0.816	0.554	1.000	0.635	0.710	1.000	0.763
UNH 738	0.771	1.000	0.804	0.696	1.000	0.757	0.487	1.000	0.584	0.375	1.000	0.509	0.538	1.000	0.625
UNH 773	0.604	0.979	0.663	0.375	1.000	0.509	0.608	1.000	0.673	0.375	1.000	0.509	0.375	1.000	0.509
UNH 817	0.691	0.596	0.741	0.327	0.423	0.363	0.699	0.729	0.749	0.572	0.800	0.656	0.357	0.267	0.472
UNH 840	0.505	1.000	0.596	0.554	1.000	0.637	0.375	1.000	0.505	0.375	1.000	0.509	0.460	1.000	0.567
UNH 841	0.774	1.000	0.811	0.544	1.000	0.631	0.592	1.000	0.673	0.548	1.000	0.631	0.655	1.000	0.720
UNH 843	0.596	0.896	0.665	0.399	0.966	0.525	0.405	1.000	0.526	0.375	1.000	0.509	0.479	1.000	0.581
UNH 844	0.755	1.000	0.770	0.751	0.963	0.799	0.624	1.000	0.689	0.375	1.000	0.509	0.554	1.000	0.635
UNH 845	0.596	1.000	0.668	0.718	1.000	0.770	0.694	1.000	0.750	0.550	1.000	0.632	0.701	1.000	0.753
UNH 846	0.447	1.000	0.556	0.667	1.000	0.730	0.414	1.000	0.534	0.554	1.000	0.635	0.652	1.000	0.718
UNH 848	0.568	0.457	0.650	0.359	0.607	0.477	0.387	0.830	0.509	0.324	0.567	0.413	0.361	0.500	0.481
UNH 849	0.614	1.000	0.675	0.652	1.000	0.710	0.788	1.000	0.823	0.553	1.000	0.635	0.698	1.000	0.753
UNH 851	0.375	1.000	0.505	0.375	1.000	0.509	0.375	1.000	0.505	0.375	1.000	0.509	0.375	1.000	0.509
UNH 853	0.568	1.000	0.642	0.684	1.000	0.741	0.774	1.000	0.812	0.698	1.000	0.758	0.697	1.000	0.753
UNH 854	0.683	1.000	0.733	0.506	1.000	0.601	0.652	1.000	0.702	0.554	1.000	0.635	0.375	1.000	0.509
UNH 855	0.432	1.000	0.534	0.375	1.000	0.509	0.375	1.000	0.505	0.375	1.000	0.509	0.548	1.000	0.631
UNH 856	0.678	1.000	0.736	0.593	1.000	0.670	0.375	1.000	0.505	0.375	1.000	0.509	0.581	1.000	0.658
UNH 858	0.783	1.000	0.817	0.729	1.000	0.780	0.621	1.000	0.683	0.375	1.000	0.509	0.596	1.000	0.671
平均	0.628	0.944	0.692	0.567	0.945	0.647	0.567	0.977	0.649	0.473	0.967	0.578	0.551	0.935	0.637
Mean															

PIC: 多态信息含量 Polymorphism information content

量均大于0.500。蒋家金等(2008)采用微卫星标记分析了吉富罗非鱼的2个品系,显示其遗传多样性较为丰富。本实验得到了相同的结论。

本实验所研究的5个品系的遗传多样性与其选育过程有很大关系。苏丹品系经中国水产科学院长江水产研究所从苏丹引进后进行了较为系统的选育;吉富罗非鱼由上海海洋大学1994年从菲律宾引进,它是由8个尼罗罗非鱼品系(以色列、新加坡、中国台湾、泰国、肯尼亚、埃及、加纳和塞内加尔)选育而成的新品系(Eknath *et al.*, 1993),它有台湾品系的血统,但与其他品系之间的杂交使其遗传多样性较台湾品系丰富。两个超雄品系是由台湾品系选育而来的,并且超雄鱼只含有一套父本的染色体(YY),没有母本的染色体(X),因而其遗传多样性较其他3个品系低。

2.2 品系间的遗传变异与杂种优势预测

19个微卫星位点在所有品系内各个亚群体的固定指数( $F_{st}$ )为0–0.1755,均值为0.0906;整个品系的个体固定指数( $F_{it}$ )为–1.0000–0.2552,均值为

–0.3732;亚群体内的个体固定指数( $F_{is}$ )为–1.0000–0.0423,均值为–0.5100。这表明5个尼罗罗非鱼品系的遗传变异主要来源于品系内部,这可能是因为是由于苏丹品系、吉富品系和台湾品系在引入后分别养殖在荆州、上海和厦门3个不同的地方,群体之间缺乏交流的缘故。

利用软件POPGEN32计算出的不同品系间遗传距离见表4。超雄品系 I 和超雄品系 II 的遗传相似度最高(0.8974),而超雄品系 II 和苏丹品系的遗传相似度最低(0.7487)。基于Nei's遗传距离构建的UPGMA树(图1)显示,5个品系的尼罗罗非鱼聚为两个分支,超雄品系 I、超雄品系 II 和台湾品系聚为一支;苏丹品系和吉富品系聚为另一支。本研究中5个品系两两之间的遗传距离均小于0.3000。吉富品系与超雄品系 II 之间的遗传距离最大(0.2972),苏丹品系与超雄品系 II 之间的遗传距离次之(0.2895)。预期吉富品系与超雄品系 II 进行杂交可以获得较好的杂种优势,此结果可供进行新品系(种)选育时选择亲本的参考。

表4 5个尼罗罗非鱼品系间的遗传相似度(对角线上方)和遗传距离(对角线下方)  
Table 4 Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) among the five Nile tilapia strains

	吉富品系 GIFT	苏丹品系 Sudan	台湾品系 Taiwan	超雄品系 I Supermale I	超雄品系 II Supermale II
吉富品系 GIFT	***	0.8336	0.7645	0.7747	0.7429
苏丹品系 Sudan	0.1820	***	0.7565	0.7577	0.7487
台湾品系 Taiwan	0.2685	0.2790	***	0.7829	0.8355
超雄品系 I Supermale I	0.2553	0.2775	0.2448	***	0.8974
超雄品系 II Supermale II	0.2972	0.2895	0.1797	0.1082	***

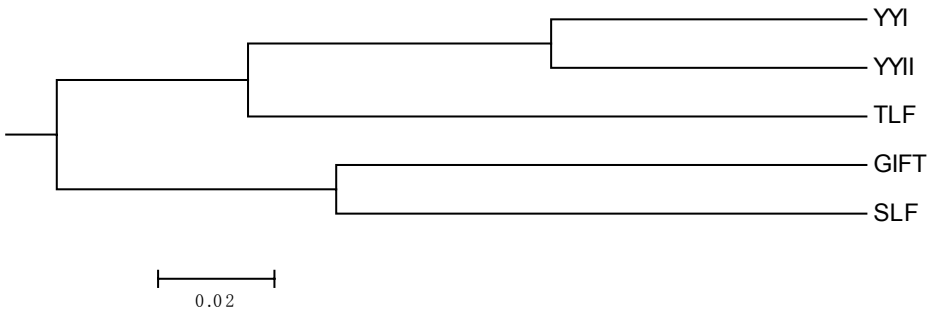


图1 基于Nei's遗传距离构建的5个尼罗罗非鱼品系的UPGMA树,品系代号同表1。  
Fig. 1 A UPGMA dendrogram of five Nile tilapia strains based on Nei's genetic distance. Strain codes see Table 1.

## 参考文献

- Botstein D, White RL, Skolnick M, David RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, **32**, 314–331.
- Carleton KL, Streelman JT, Lee BY, Garnhart N, Kidd M, Kocher TD (2002) Rapid isolation of CA microsatellites from the tilapia genome. *Animal Genetics*, **33**, 140–144.
- Eknath AE, Tayamen MM, Palada-de Vera MS, Danting JC, Reyes RA, Dionisio EE, Capili JB, Bolivar HL, Abella TA, Circa AV, Bentsen HB, Gjerde B, Gjedrem T, Pullin RSV (1993) Genetic improvement of farmed tilapias: the growth performance of eight strains of *Oreochromis niloticus* tested in different farm environments. *Aquaculture*, **111**, 171–188.
- Jiang JJ (蒋家金), Li RW (李瑞伟), Ye FL (叶富良) (2008) Genetic diversity of four groups of selected tilapia as revealed by microsatellites. *Journal of Guangdong Ocean University* (广东海洋大学学报), **28**(4), 10–14. (in Chinese with English abstract)
- Li LH (李莉好), Yu DH (喻达辉), Huang GJ (黄桂菊), Ye W (叶卫), Du B (杜博), Fu Y (符云), Tong X (童馨), Guo YH (郭奕惠) (2008) Genetic diversity of *Oreochromis niloticus*, *O. aureus* and their reciprocally crossed hybrid stocks. *Journal of Fishery Sciences of China* (中国水产科学), **15**, 585–592. (in Chinese with English abstract)
- Mair GC, Abucay JS, Skibinski DOF, Abella TA, Beardmore JA (1997) Genetic manipulation of sex ratio for the large-scale production of all-male tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, **54**, 396–404.
- Müller-Belecke A, Horstgen-Schwark G (1995) Sex determination in tilapia (*Oreochromis niloticus*) sex ratios in homozygous gynogenetic progeny and their offspring. *Aquaculture*, **137**, 57–65.
- Romana-Eguia MRR, Ikeda M, Basiao ZU, Taniguchi N (2004) Genetic diversity in farmed Asian Nile and red hybrid tilapia stocks evaluated from microsatellite and mitochondrial DNA analysis. *Aquaculture*, **236**, 131–150.
- Rong SB (容寿柏), Li JC (李景常), Zhuang SX (庄松兴), Liang ZC (梁振昌), Wang WY (王文勇), Mo SM (莫尚名) (2001) Artificial production of ZY heterogamous super-male tilapia. *Freshwater Fisheries* (淡水渔业), **31**(2), 15–17. (in Chinese)
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Wang CS (王楚松), Xia DQ (夏德全), Hu M (胡玫), Wang HH (王和海) (1989) Heterosis utilization in *S. nilotica* ♀ × *S. aurea* ♂. *Freshwater Fisheries* (淡水渔业), **19**(6), 14–15. (in Chinese)
- Wessels S, Horstgen-Schwark G (2007) Selection experiments to increase the proportion of males in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by means of temperature treatment. *Aquaculture*, **272**, S80–S87.

(责任编辑: 周开亚 责任编辑: 时意专)