

## 四个奥利亚罗非鱼群体的微卫星分析

张庭<sup>1,2</sup> 卢迈新<sup>1</sup> 叶星<sup>1</sup> 全迎春<sup>1</sup> 高风英<sup>1</sup> 黄樟翰<sup>1</sup> 白俊杰<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广州 510380; 2. 广东海洋大学水产学院, 湛江 524025)

**摘要:**应用筛选到的 19对微卫星引物, 对四个不同来源的奥利亚罗非鱼 (*Oreochromis aureus*) 群体 (奥利亚罗非鱼 83系、奥利亚罗非鱼 02系、奥利亚罗非鱼 05系和红色奥利亚罗非鱼) 的基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 分析其群体遗传结构和亲缘关系。根据几个群体在 19个位点上的 PCR 扩增图谱, 统计计算各群体的遗传多样性指数。四个群体的平均观测遗传杂合度值在 0.154—0.391 间; 平均预期杂合度在 0.181—0.428 间; 平均多态信息含量值在 0.1513—0.3882 间, 说明它们的遗传多样性水平较低。遗传偏离指数  $D$  的评估结果显示这 4个群体有多个位点存在不同程度的 Hardy-Weinberg 遗传平衡偏离。运用 MicroChecker 软件进行零等位基因预测, 结果显示除红色奥利亚罗非鱼群体外, 其他 3个群体中均可能存在零等位基因位点。各群体零等位基因的位点数分别为: 83系 1个, 02系 3个, 05系 7个, 红奥群体为 0。零等位基因位点的存在可能是导致位点发生 Hardy-Weinberg 遗传平衡偏离的原因之一。4个群体中, 05系群体与 83系群体间的遗传相似性系数最高 (0.9422), 遗传距离最小 (0.0596), 说明两者亲缘关系最近; 83系群体与红奥群体的遗传相似性系数最低 (0.6977), 遗传距离最大 (0.3599), 可推断两者亲缘关系最远。根据群体间的遗传距离采用 UPGMA 法进行聚类, 结果表明: 83系首先与 05系聚类为一支, 然后与 02系群体聚类, 最后与红奥群体聚类。聚类结果说明红奥群体与其他三个群体亲缘关系最远; 83系群体与 05系群体亲缘关系最近, 与 02系群体次之。

**关键词:**奥利亚罗非鱼; 微卫星; 群体遗传多样性; 遗传距离; Hardy-Weinberg 遗传平衡

**中图分类号:** Q344<sup>+</sup>.1    **文献标识码:** A    **文章编号:** 1000-3207(2009)03-0498-11

微卫星 DNA, 亦称作简单序列重复 (Simple sequence repeats, SSRs), 是指以少数几个核苷酸 (1—6个) 为单位的多次重复简单序列, 由中间核心序列和外围侧翼序列组成。微卫星 DNA 广泛而随机分布于真核生物的基因组中, 与其他分子标记技术相比, 微卫星 DNA 具有更高的多态性, 并且符合孟德尔遗传模式, 呈共显性遗传, 可以区分纯合个体和杂合个体。因此, 在种群遗传结构分析、连锁图谱构建等工作中, 微卫星 DNA 得到了广泛的应用<sup>[1]</sup>。

目前, 我国主要养殖的罗非鱼品种是奥尼鱼, 是尼罗罗非鱼 *Oreochromis niloticus* ( ) 与奥利亚罗非鱼 *Oreochromis aureus* ( ) 的杂交子一代, 该杂交种具有生长快、雄性率高等优点。杂交子一代的性状

直接受父母本遗传特性的影响, 而开展父母本遗传多样性的分析是进行亲本选育的理论依据。运用同工酶<sup>[2]</sup>、AFLP<sup>[3]</sup>、线粒体 DNA<sup>[4]</sup>、RAPD<sup>[5]</sup> 等遗传标记技术对中国奥利亚罗非鱼的遗传变异进行了研究分析。但尚未见运用 SSR 技术进行我国奥利亚罗非鱼遗传变异分析的报道。本研究应用经过筛选, 可在奥利亚罗非鱼中成功扩增的 19对尼罗罗非鱼的微卫星引物, 对本所 2002 年引进的 2 个奥利亚罗非鱼群体 (红色奥利亚罗非鱼和奥利亚罗非鱼 02系) 以及国内原有的奥利亚罗非鱼 83系和奥利亚罗非鱼 05系群体进行遗传结构的比较分析, 为获得优质子一代奥尼杂交鱼以及新的奥尼杂交鱼品系提供依据。

收稿日期: 2007-08-15; 修订日期: 2008-12-19

基金项目: 国家科技支撑计划 (No. 2006BAD01A1201); 广东省农业攻关项目 (No. 2003A2010501; No. 2008A020100006); 广东省科技计划项目 (No. 2006B20201057); 公益性行业 (农业) 科研专项 (3-49); 广东省海洋渔业科技推广专项 (No. A200899B02); 广东省重大

科技兴渔项目 (No. A200501B03; No. A200601B03; No. B200701A06); 农业部引进国际先进农业科学技术项目 (2006-G55C) 资助

作者简介: 张庭 (1983—), 男, 汉族, 山东临清人; 硕士研究生; 专业方向为水产经济动物繁殖生物学。Tel: 020-81617843; E-mail: yatouli

@tom. com

通讯作者: 卢迈新, 男, 研究员; Tel: 020-81617843; E-mail: mx-lu@163. com

## 1 材料与方法

### 1.1 奥利亚罗非鱼的来源与基因组 DNA 的提取

实验鱼由中国水产科学研究院珠江水产研究所高要水产种质工程基地提供。包括:本所 2002 年由美国引进的红色奥利亚罗非鱼,21 尾(简称:红奥);本所 2002 年由美国引进的奥利亚罗非鱼,30 尾(简称:02 系);本所 2000 年由无锡淡水渔业中心引进的奥利亚罗非鱼,30 尾(简称:83 系);本所 2005 年由无锡淡水渔业中心引进奥利亚罗非鱼,30 尾(简称:05 系)。试验鱼采取尾静脉取血,血液和抗凝剂的比例为 1:6。将采集到的血液用天为时代基因组

DNA 提取试剂盒进行基因组 DNA 的提取。提取的基因组 DNA 用去离子水 (ddH<sub>2</sub>O) 溶解,0.8% 琼脂糖凝胶检测,检测完毕 4 保存。

**1.2 引物与试剂** 在 GenBank 上选取经过扩增筛选,能在奥利亚罗非鱼上有效扩增的尼罗罗非鱼微卫星引物 19 对(表 1)<sup>[6]</sup>。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成, *Taq* 酶、dNTPs 购自上海申能博彩生物工程公司, 其他试剂均购自广州化学试剂厂。PCR 仪为 MW G-B DTECH AG 型 Primus 扩增仪;聚丙烯酰胺凝胶电泳槽为北京君意公司 JY-SCZ7 型垂直电泳槽。

表 1 用于扩增的 19 对微卫星引物

Tab. 1 19 pairs of Microsatellite primers applied to *Oreochromis aureus*

位点 Locus	引物序列 (5'-3') Primer sequence	等位基因数 Allele numbers	Mg <sup>2+</sup> 浓度 Mg <sup>2+</sup> concentration (mmol/L)	退火温度 Annealing temperature (°C)
UNH879	SF: GCA TAA GGTGACTGGCTGGT SR: ACAAA GGGGTCTGCCTTTCA	3	1.2	62
UNH909	SF: CTAA TGGTTTCGGGGGTGTT SR: CCAAACACA TTTTGCTTTTCC	3	1.0	62
UNH868	SF: TCCCTGTTCA GACCTTGTGG SR: AGCCA GGCTGAAA GGAAATA	7	1.2	54
UNH940	SF: TTGGCCACATCTTTTGTGTT SR: CACTCACACGTAACACTGTGCA	5	1.2	60
UNH848	SF: TCCCCGTAA TAAA TTAAACCA SR: GCCTGTGAA TAA CAA TGTA TTTCCT	4	1.0	50
UNH985	SF: GCGTCTTGATGCA GGA TACA SR: TCCCGACGAGCAACTGTTAT	2	1.0	54
UNH957	SF: CTCCGTGACACCAA GCTTTC SR: ATGGCA TCCACTACAA GCTG	8	1.2	63
UNH231	SF: GCCTATTA GTCAAA GCGT SR: A TTTCTGCAAAAGTTTCC	3	1.2	55
UNH104	SF: GCA GTTA TTTGTGGTCATA SR: GGTATATGCTAACTGAAA TCC	5	1.0	58
GM354	SF: CGGGAGAGCA GGTCA G SR: CACGTICA GGGTTACTGTGTT	4	1.2	62
GM271	SF: GCA GCTGGA TCA GTCTCTG SR: TGGGAA GTCGTICA TACAAAG	4	1.2	60
UNH890	SF: AAAAGCA TCCCTGCTTCTCA SR: TGGCTGTTGCAA GACACATT	4	1.3	58
UNH973	SF: CACCTCAAA GCA GCTGGTAA SR: A GTGCTCGGGGA TAAA GTCA	3	1.2	62
UNH998	SF: TCAA TTGGTTTACA GGAACACA SR: GCTGA GGTCA GCTTACA TGCT	4	1.2	62

续表

位点 Locus	引物序列 (5'-3') Primer sequence	等位基因数 Allele numbers	Mg <sup>2+</sup> 浓度 Mg <sup>2+</sup> concentration (mmol/L)	退火温度 Annealing temperature ( )
UNH914	SF: CA GCTTGTGGAAA GAAA TACCA SR: CCACGCAC TTGTGGAAAA TA	2	1.0	58
UNH860	SF: ACTGTTACCCACTGCGACA SR: A GA TGTGTC TGA GCCA TCCA	5	1.2	53
UNH846	SF: TGGA GCA GCTTCTTCTACA TCA SR: CACA TGA TGGAA GCCGTGTA	4	1.2	52
UNH907	SF: CAGGACCGACTCTGCAA GAT SR: GAGCTCTTGTGTTCAAA ATC	6	1.0	52
UNH995	SF: CCA GCCCTCTGCA TAAA GAC SR: GCA GCACA ACCACA GTGCTA	6	1.2	52

**1.3 PCR反应体系** 20 μL PCR反应体系包括: 10 × buffer 2.0 μL, 0.2 mmol/L dNTPs, 1.0U *Taq* 酶, 1.0—1.3 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 50 ng DNA 模板, 各0.2 mmol/L 正向、反向引物。PCR反应热循环程序: 94 预变性 3 min, 94 变性 30s, 50—63 退火 30s, 72 延伸 45s, 共 25 次循环, 最后 72 延伸 7 min。在此基础上, 根据各对引物扩增情况, 对Mg<sup>2+</sup>浓度、退火温度两参数分别作调整。

**1.4 电泳与银染** 扩增产物与上样缓冲液按体积比 5 : 1 混匀, 取 5 μL 混合物在 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳, 电泳缓冲液为 0.5 × TBE, 电压 200V, 电泳 2h。然后按照许绍斌<sup>[7]</sup>介绍的快速银染法进行银染。聚丙烯酰胺凝胶银染完毕, 用凝胶成像系统 AlphaImager<sup>TM</sup> (UV525-220K) 进行拍照, 保存。

### 1.5 统计分析

#### 1.5.1 微卫星标记的等位基因频率和等位基因数

由于微卫星标记呈共显性遗传, 其表型可直接反映基因型, 因此, 根据条带的出现情况, 统计每个个体在各微卫星位点的基因型, 即可得出等位基因频率。

有效等位基因数 (*Ne*) 按以下公式计算:  $Ne = 1 / \sum_{i=1}^n P_i^2$  其中, *n* 为某微卫星位点所具有的等位基因数, *P<sub>i</sub>* 表示第 *i* 个等位基因的基因频率。

**1.5.2 多态信息含量 (Polymorphism Information Content, PIC)** 参照文献 [8] 方法计算, 公式为:  $PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2$  式中 *P<sub>i</sub>*, *P<sub>j</sub>* 分别为群体中第 *i* 和第 *j* 个等位基因频率, *n* 为等位基因数。

**1.5.3 群体杂合度计算** 多态位点杂合度 (观测值) *Ho* *Ho* 为杂合子观察数与观察个体总数之比。

多态位点杂合度 (期望值) *He*<sup>[9]</sup>  $He = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$ , *P<sub>i</sub>* 为该位点上第 *i* 个等位基因的频率。

应用软件 SPSS 12.0 中的成对样本 *t* 检验 (Paired-Samples *t* Test), 对 *Ho* 和 *He* 的差距进行差异显著性检验。

**1.5.4 Hardy-Weinberg 平衡检验** 遗传偏离指数 (*D*)  $D = (Ho - He) / He$

使用软件 MicroChecker, 对每个群体的各位点进行零等位基因 (Null allele) 估算<sup>[10]</sup>。

**1.5.5 群体间遗传距离** 由 POPGENE3.2 依据 Nei (1978) 计算群体间的遗传距离和遗传相似性系数。并根据群体间遗传距离, 采用非加权配对算术平均法 (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, UPGMA)<sup>[11]</sup> 构建 4 个群体的系统进化树。

## 2 结 果

### 2.1 微卫星 PCR结果

19 对引物在 4 个群体内的等位基因数在 2—8 个之间, 共获得 82 个等位基因, 平均等位基因数为 4.3 个, 其中位点 UNH914, UNH985 获得 2 个等位基因; 位点 UNH879, UNH909, UNH231, UNH973 有 3 个等位基因; 位点 UNH848, GM354, GM271, UNH890, UNH998, UNH846 有 4 个等位基因; 位点 UNH940, UNH104, UNH860 有 5 个等位基因; UNH907, UNH995 有 6 个等位基因, UNH868 有 7 个等位基因; 位点 UNH957 有 8 个等位基因 (表 1)。图 1 显示了引物 UNH848 在奥利亚罗非鱼 (05 系) 的扩增图谱。

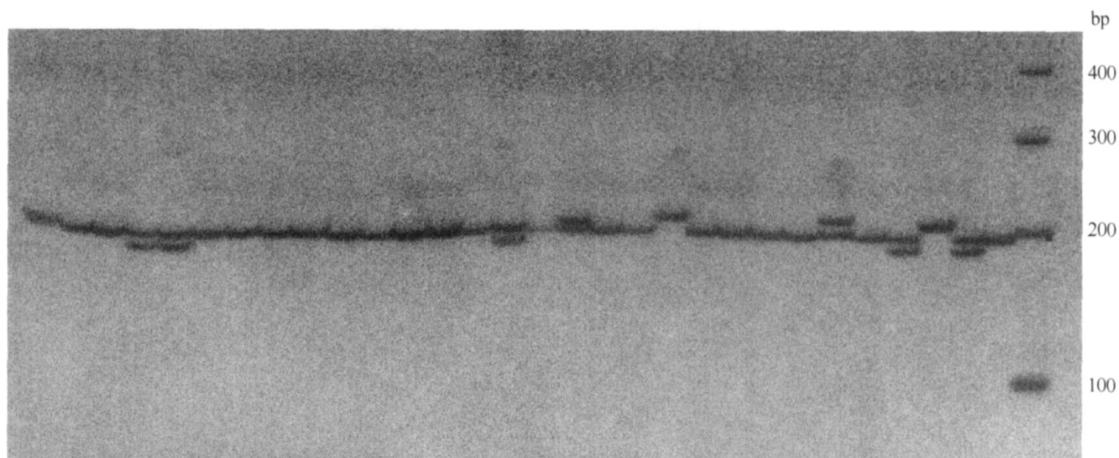


图 1 引物 UNH848 在奥利亚罗非鱼 (05 系) 的电泳图谱

Fig. 1 Demonstration of *O. aureus* (05) microsatellite locus amplified by primer UNH848

## 2.2 群体遗传多样性

**等位基因频率和多态信息含量** 19个位点在4个群体中的等位基因、等位基因频率、多态信息含量(*PIC*)的统计数据(表2)。从位点来看, *PIC*最高的是05系群体在位点UNH868上, 为0.6296; *PIC*最低的是83系群体在UNH909和UNH890上, 红奥群体在UNH879、UNH909、UNH104和UNH890上, 02系群体在UNH879、UNH909和UNH848等8个位点上, 数值为0, 即此位点的扩增为单态; 从群体看, 4个群体19个位点的平均多态信息含量为0.2759,

其中05系群体平均 *PIC*为0.3882, 高度多态占31.58%, 中度多态占52.63%, 低度多态占15.79%; 红奥群体平均 *PIC*为0.3117, 高度多态占26.32%, 中度多态占42.11%, 低度多态占31.58%; 83系群体平均 *PIC*为0.2523, 高度多态占15.79%, 中度多态占36.84%, 低度多态占47.37%; 02系群体平均 *PIC*为0.1513, 其中高度多态占5.26%, 中度多态占21.05%, 低度多态占73.68%。

表 2 奥利亚罗非鱼四个群体 19个微卫星位点的等位基因频率和多态信息含量

Tab. 2 Allele frequencies and *PIC* of 19 microsatellite loci for 4 populations of *O. aureus*

位点 Locus	等位基因 Alleles		等位基因频率 Frequency of alleles				多态信息含量 <i>PIC</i>		
	83系	红奥	02系	05系	83系	红奥	02系	05系	
UNH879	A	0.8500	1.0000	1.0000	0.7833	0.2095	0	0	0.3317
	B	0.1500			0.1500				
	C				0.0667				
UNH909	A		0.6190	1.0000	0.8333	0	0.3604	0	0.2620
	B	1.0000			0.1333				
	C		0.3810		0.0333				
UNH868	A		0.1667	0.1667	0.0500	0.2743	0.2392	0.2392	0.6296
	B	0.7667	0.8333	0.8333	0.4500				
	C	0.2333			0.3333				
	D				0.0500				
	E				0.0167				
	F				0.0500				
	G				0.0500				
UNH940	A	0.4833	0.2857	0.3000	0.4333	0.3747	0.4692	0.3318	0.5790
	B	0.5167	0.0467	0.7000	0.4000				
	C		0.6667		0.0667				
	D				0.0833				
	E				0.0167				

续表

位点 Locus	等位基因 Alleles	等位基因频率 Frequency of alleles				多态信息含量 PIC			
		83系	红奥	02系	05系	83系	红奥	02系	05系
UNH848	A				0.0333	0.1682	0.0454	0	0.3053
	B				0.0667				
	C	0.9000	0.9762	1.000	0.8167				
	D	0.1000	0.0238		0.0833				
UNH985	A	0.9833	0.5000	1.000	0.9333	0.0332	0.3750	0	0.1168
	B	0.0167	0.5000		0.4667				
UNH957	A	0.0167	0.0462		0.0333	0.5058	0.5284	0.0167	0.6290
	B	0.2667	0.6429	0.9833	0.4667				
	C	0.0333		0.0167					
	D	0.0500	0.0952		0.0167				
	E	0.6333	0.1905		0.3833				
	F				0.0333				
	G				0.0167				
	H				0.0500				
UNH231	A	0.1667		0.1000	0.2833	0.2446	0.5714	0.1638	0.3236
	B	0.8333	0.4286	0.9000	0.7167				
	C		0.5714						
UNH104	A	0.6667			0.6167	0.3498	0	0	0.5013
	B	0.3333	1.000	1.000	0.2500				
	C				0.0167				
	D				0.0833				
	E				0.0333				
GM354	A	0.0667	0.5238	0.6333	0.1000	0.1202	0.5570	0.3566	0.3290
	B	0.9333	0.2857	0.3667	0.8000				
	C		0.1905		0.0500				
	D				0.05				
GM271	A	0.0667	0.1667	0.1667		0.5000	0.6152	0.6593	0.2044
	B	0.3167	0.2143	0.4167	0.8667				
	C	0.6167	0.0714	0.0667	0.1333				
	D		0.5476	0.3500					
UNH890	A	1.0000		1.0000	0.8333	0	0	0	0.2820
	B				0.0833				
	C				0.0833				
	D		1.0000						
UNH973	A	0.1833	0.5714		0.0833	0.2891	0.3700	0.374	0.3314
	B	0.8000	0.4286	0.5333	0.7833				
	C	0.0167			0.1333				
UNH998	A				0.0667	0.3750	0.3250	0.0323	0.5249
	B	0.4833	0.7143		0.0667				
	C	0.5167	0.2857	0.9833	0.5500				
	D			0.0167	0.3167				
UNH914	A	0.0167	0.1905		0.1167	0.0332	0.2610	0	0.2044
	B	0.9833	0.8095	1.0000	0.8833				
UNH860	A	0.0500			0.2500	0.0932	0.1238	0	0.3588
	B	0.9500	0.9286	1.0000	0.7167				
	C		0.0714						
	D				0.0167				
	E				0.0167				
	A	0.6667	0.1954	0.1667	0.4333	0.3364	0.2610	0.2392	0.4656
UNH846	B	0.3333	0.8095	0.8333	0.5000				
	C				0.0333				
	D				0.0333				

续表

位点 Locus	等位基因 Alleles	等位基因频率 Frequency of alleles				多态信息含量 PIC			
		83系		红奥		02系		05系	
		83系	红奥	02系	05系	83系	红奥	02系	05系
UNH907	A	0.1500	0.2143		0.0833	0.3841	0.2800	0.2688	0.4430
	B	0.0833		0.8000	0.0333				
	C	0.7667	0.7857	0.2000	0.7333				
	D				0.0167				
	E				0.0500				
	F				0.0833				
UNH995	A	0.6167	0.4524	0.1000	0.6333	0.5024	0.5410	0.1935	0.5540
	B	0.0333	0.0467		0.0333				
	C	0.3500	0.5000	0.8833	0.1833				
	D			0.0167	0.0333				
	E				0.0333				
	F				0.0833				
平均	Average				0.2523	0.3117	0.1513	0.3882	

**有效等位基因和遗传杂合度** 表3显示,奥利亚罗非鱼4个群体平均等位基因数依次为05系(4.0)、红奥(2.3)、83系(2.263)、02系(1.7);平均有效等位基因数依次为05系(1.9)、红奥(1.7)、83系(1.509)、02系(1.3);平均观测杂合度依次为红奥(0.391)、05系(0.263)、83系(0.204)、02系

(0.154);平均预期杂合度依次为05系(0.428)、红奥(0.353)、83系(0.294)、02系(0.181)。4个群体的 $H_e$ 和 $H_o$ 值进行差异显著性检验,结果显示83系、05系、红奥差异显著( $p < 0.05$ ),而02系差异不显著( $p > 0.05$ )。

表3 19个微卫星位点在各群体的遗传特性

Tab. 3 Genetic characteristics of 19 microsatellite loci in each population

座位 Locus	83系			红奥			02系			05系		
	A( Ne )	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	A( Ne )	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	A( Ne )	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	A( Ne )	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>
UNH879	2(1.3)	0.233	0.259	1(1.0)	0.000	0.000	1(1.0)	0.000	0.000	3(1.6)	0.233	0.365
UNH909	1(1.0)	0.000	0.000	2(1.9)	0.476	0.483	1(1.0)	0.000	0.000	3(1.4)	0.067	0.292
UNH868	2(1.6)	0.133	0.264	2(1.4)	0.333	0.285	2(1.4)	0.200	0.283	7(3.1)	0.267	0.688
UNH940	2(2.0)	0.367	0.508	3(1.9)	0.620	0.483	2(1.7)	0.400	0.427	5(2.8)	0.433	0.651
UNH848	2(1.2)	0.200	0.183	2(1.0)	0.048	0.048	1(1.0)	0.000	0.000	4(1.5)	0.233	0.326
UNH985	2(1.0)	0.033	0.033	2(2.0)	0.524	0.512	1(1.0)	0.000	0.000	2(1.1)	0.067	0.127
UNH957	5(2.1)	0.600	0.533	5(2.2)	0.620	0.552	2(1.0)	0.033	0.033	7(2.7)	0.700	0.641
UNH231	2(1.4)	0.000	0.283	2(2.0)	0.667	0.502	2(1.2)	0.000	0.183	2(1.7)	0.033	0.413
UNH104	2(1.8)	0.333	0.452	1(1.0)	0.000	0.000	1(1.0)	0.000	0.000	5(2.2)	0.333	0.558
GM354	2(1.1)	0.133	0.127	3(2.5)	0.714	0.623	2(1.9)	0.600	0.472	4(1.5)	0.233	0.351
GM271	3(2.1)	0.100	0.524	4(2.6)	0.620	0.637	4(3.0)	0.633	0.683	2(1.3)	0.200	0.235
UNH890	1(1.0)	0.000	0.000	1(1.0)	0.000	0.000	1(1.0)	0.000	0.000	3(1.4)	0.100	0.297
UNH973	3(1.5)	0.267	0.332	2(2.0)	0.571	0.502	2(2.0)	0.333	0.506	3(1.6)	0.267	0.368
UNH998	2(2.0)	0.233	0.508	2(1.7)	0.381	0.418	2(1.0)	0.033	0.033	4(2.4)	0.300	0.598
UNH914	2(1.0)	0.033	0.033	2(1.4)	0.381	0.316	1(1.0)	0.000	0.000	2(1.3)	0.033	0.210
UNH860	2(1.1)	0.100	0.097	2(1.2)	0.048	0.136	1(1.0)	0.000	0.000	4(1.7)	0.467	0.431
UNH846	2(1.8)	0.333	0.452	2(1.4)	0.381	0.316	2(1.4)	0.200	0.282	4(2.3)	0.467	0.570
UNH907	3(1.6)	0.400	0.389	2(1.5)	0.429	0.345	2(1.5)	0.267	0.325	6(1.8)	0.267	0.452
UNH995	3(2.0)	0.367	0.505	3(2.2)	0.619	0.556	3(1.3)	0.233	0.213	6(2.2)	0.300	0.564
平均	2.263	0.204	0.294	2.3	0.391	0.353	1.7	0.154	0.181	4.0	0.263	0.428
Average	(1.590)			(1.7)			(1.3)			(1.9)		

注:A:等位基因数;Ne:有效等位基因数;Ho:观测杂合度;He:预期杂合度

Note: A: number of alleles; Ne: effective alleles; Ho: observed heterozygosity; He: expected heterozygosity

**Hardy-Weinberg平衡遗传偏离指数** 检验各群体的 Hardy-Weinberg平衡指数(表 4),结果显示 UNH909、UNH914 在 83 系群体,UNH848 在红奥群体,UNH957、UNH998 在 02 系群体中表现为平衡,其他位点均表现为不同程度的偏离,而且多数位点在 4 个群体中表现为杂合子缺失。

通过软件 MicroChecker 进行零等位基因估算,

结果发现,采用 100%置信区间估算时,83 系中存在 1 个零等位基因的位点 UNH231,红奥群体中无零等位基因位点,02 系中存在 3 个零等位基因位点 UNH868、UNH231、GM271,05 系中存在 7 个零等位基因的位点 UNH909、UNH868、UNH231、UNH890、UNH998、UNH914、UNH995。

表 4 四个奥利亚罗非鱼群体遗传偏离指数(*D*)

Tab. 4 *D* assessed on the four populations of *O. aureus*

座位 Locus	<i>D</i> 值			
	83 系	红奥	02 系	05 系
UNH879	- 0.1004	/	/	- 0.3616
UNH909	0.0000	- 0.0145	/	- 0.7706
UNH868	- 0.4962	0.1684	- 0.2933	- 0.6119
UNH940	- 0.2776	0.2836	- 0.0632	- 0.3349
UNH848	0.0929	0.0000	/	- 0.2853
UNH985	/	0.0234	/	- 0.4724
UNH957	0.1257	0.1232	0.0000	0.092
UNH231	- 1.0000	0.3287	- 1.0000	- 0.9201
UNH104	- 0.2633	/	/	- 0.4032
GM354	0.0472	0.1461	0.2712	- 0.3362
GM271	- 0.8092	- 0.0267	- 0.0732	- 0.1489
UNH890	/	/	/	- 0.6633
UNH973	- 0.1958	0.1375	- 0.3419	- 0.2745
UNH998	- 0.5413	- 0.0885	0.0000	- 0.4983
UNH914	0.0000	0.2057	/	- 0.8429
UNH860	0.0309	- 0.6471	/	0.0835
UNH846	- 0.2633	0.2057	- 0.2908	- 0.1807
UNH907	0.0283	0.2435	- 0.1785	- 0.4093
UNH995	- 0.2733	0.1133	0.0939	- 0.4681

注:“/”表示 *He* 为零

Note: “/”means *He* = 0

**遗传相似系数,遗传距离与聚类分析** 根据 POPGENE3.2 依据 Nei(1978)计算群体间的遗传距离和遗传相似性系数,结果显示:83 系与 05 系遗传相似度最高,为 0.9422,说明这两个群体亲缘关系最近;83 系与红奥遗传相似度最低,为 0.6977,说明

这两个群体亲缘关系最远(表 5)。根据群体间的遗传距离矩阵,用 UPGMA 法得出 4 个群体间的系统进化树,4 个群体聚成了两支,83 系群体与 05 系群体、02 系群体聚为一支,而红奥群体则单独聚为一支(图 2)。

表 5 四个奥利亚罗非鱼群体的遗传距离与遗传相似系数

Tab. 5 Genetic distance and similarity of four populations of *O. aureus*

	02 系	红奥	83 系	05 系
02 系	/	0.7687	0.8009	0.8078
红奥	0.2631	/	0.6977	0.7120
83 系	0.2220	0.3599	/	0.9422
05 系	0.2134	0.3396	0.0596	/

注:对角线以下为遗传距离,对角线以上为相似性系数

Note: Figures under and above the diagonal line are genetic distance and similarity, respectively

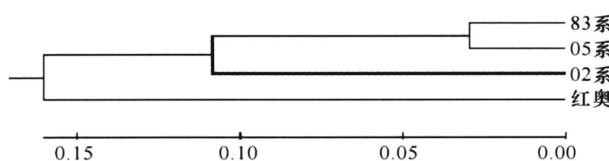


图 2 UPGMA 法构建四个奥利亚罗非鱼的谱系关系图

Fig. 2 UPGMA dendrogram showing the relationships among four populations of *O. aureus*

### 3 讨 论

#### 3.1 关于奥利亚罗非鱼遗传多样性

多态信息含量 ( $PIC$ ) 是度量群体遗传变异的常用参数, 其值大小反映群体遗传多样性的高低<sup>[12, 13]</sup>。Botstein, *et al.*<sup>[8]</sup>首先提出了衡量基因变异程度高低的多态信息含量指标: 当  $PIC > 0.5$  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;  $PIC < 0.25$  时为低度多态位点。本试验中, 4个群体的平均  $PIC$  为 0.2759, 其中 05 系群体 (0.3882) 最高, 红奥群体 (0.3117) 与 83 系群体 (0.2523) 次之, 02 系群体 (0.1513) 最低。马洪雨等<sup>[14]</sup>得出山东东平湖野生黄颡鱼的  $PIC$  为 0.488, 表明东平湖黄颡鱼种群结构合理, 群体遗传多样性较丰富, 种质资源处于安全状态。鲁双庆等<sup>[15]</sup>得出我国 4 个鲫鱼养殖群体的平均  $PIC$  为 0.584, 认为 4 个鲫鱼群体的遗传多样性较高。梁利群等<sup>[16]</sup>得出乌苏里江野生哲罗鱼平均  $PIC$  为 0.4178, 认为乌苏里江哲罗鱼的遗传多样性程度处于中等偏下水平。本试验四个群体的平均  $PIC$  值比以上报道均低, 可见本试验的 4 个奥利亚罗非鱼群体总体遗传多样性处于中等偏低水平。

遗传杂合度 ( $H$ ) 又称基因多样性, 是指微卫星座位为杂合子的比例, 它能较好地反映群体中等位基因的丰富程度和均匀程度, 其大小可以反映群体遗传变异的高低, 普遍认为杂合度是度量群体遗传变异的一个最适参数<sup>[12]</sup>。4 个奥利亚罗非鱼群体的预期杂合度  $e$  在 0.181—0.428 间, 平均为 0.314; 观测杂合度值在 0.154—0.391 间, 平均为 0.2596。遗传杂合度均比鲫鱼养殖群体 (0.6523)<sup>[15]</sup>、东平湖野生黄颡鱼 (0.5833)<sup>[14]</sup>、黑龙江野鲤 (0.6400)<sup>[17]</sup>、长江水系野生草鱼 (0.5613)<sup>[18]</sup>、乌苏里江野生哲罗鱼 (0.4980)<sup>[16]</sup> 等的要低, 因此可以看出 4 个群体总体的遗传多样性处于中等偏低水平。

$e$  量化了基因的遗传多样性, Hardy-Wein-

berg 平衡指数 ( $D$ ) 则反映两者的平衡关系。 $D$  值越接近于零, 基因型分布越接近于平衡状态,  $D$  值的正负直观地反映了种群内杂合子的过剩或缺失状态,  $D$  值为正杂合子过剩,  $D$  值为负杂合子处于缺失状态。除 UNH909、UNH914 在 83 系群体, UNH848 在红奥群体, UNH957、UNH998 在 02 系群体中表现为平衡外, 其他位点均表现为不同程度的偏离, 而且大多数位点在 4 个群体中表现为杂合子缺失, 纯合子过剩。许多原因可能导致 Hardy-Weinberg 平衡指数的偏离, 比如人工选择 (育)、零等位基因、迁移、突变与近交等<sup>[18]</sup>, 对于本研究所分析的奥利亚罗非鱼群体而言在有限的奠基群体中所进行的人工选育可能是 Hardy-Weinberg 平衡指数偏离的主要原因, 另外零等位基因分析的结果, 显示除红奥群体外其他 3 个群体都存在零等位基因位点, 尤其是 05 系群体的零等位基因位点最多, 因此零等位基因也可能是 Hardy-Weinberg 平衡指数偏离的原因之一, 也不排除多种因素共同作用的可能性。

综上所述, 本实验所分析的 4 个奥利亚罗非鱼群体的遗传多样性处于中等偏低水平。4 个群体遗传多样性以 05 系、红奥、83 系、02 系的顺序依次降低, 这与其引进过程以及人工选育的强度有关。本研究的 83 系是淡水渔业中心 (无锡) 1983 年由美国引进、珠江水产研究所于 2000 年由淡水渔业中心引进。当年美国首先从以色列引进、1983 年又从美国引进我国, 经历了两次瓶颈效应, 使得奥利亚罗非鱼的遗传变异大量丢失<sup>[19]</sup>。在我国奥利亚罗非鱼作为杂交奥尼鱼的父本 (尼罗罗非鱼  $\times$  奥利亚罗非鱼), 经历着高强度的人工选育, 且由于奠基群体很小, 因此导致其群体遗传多样性偏低。RAPD 方法分析也同样显示奥利亚罗非鱼 83 系的遗传多样性偏低<sup>[20, 21]</sup>。本研究分析结果显示 05 系的遗传多样性高于 83 系, 05 系和 83 系均源于同一美国引进群体。83 系引进本所的时间较长, 可能由于选育群体较小, 经过连续多代的选育, 导致群体遗传多样性降低。红奥群体是作为一个品系进行单独养殖, 并没有与尼罗罗非鱼进行杂交生产奥尼鱼, 虽进行人工选育, 但强度不高, 因而遗传多样性比 02 系要高。在本实验室选育过程中, 红奥群体内繁殖后代出现了红色、黑色、花色 3 种体色表型, 这也从另外一方面说明红奥群体的遗传多样性丰富, 具较大的选育空间。

#### 3.2 四个群体的亲缘关系

遗传相似系数是衡量群体间遗传变异程度的可

靠参数,群体间亲缘关系越近,则遗传变异性越低,相似系数值越大<sup>[22]</sup>。对4个群体进行亲缘关系的比较分析显示83系与05系遗传相似度最高,为0.9422,说明这两个群体亲缘关系最近;83系与红奥遗传相似度最低,为0.6977,说明这两个群体亲缘关系最远。根据微卫星分析结果建立的系统进化树显示83系群体与05系群体的亲缘关系最近,其次是与02系群体,与红色罗非鱼群体亲缘关系最远。此结果与群体的来源和种属关系相符,也说明本实验所选用的微卫星位点可用于分析奥利亚罗非鱼群体间的亲缘关系。

### 3.3 遗传多样性分析及在实际生产上的应用

罗非鱼繁殖能力很强,很容易造成鱼池中群体过密,影响产量和商品规格的提高,且雌鱼的生长速度明显慢于雄鱼,因而单性养殖雄鱼是罗非鱼的发展方向。采用尼罗罗非鱼雌鱼和奥利亚罗非鱼雄鱼杂交产生奥尼罗非鱼,理论上应该产生100%奥尼罗非鱼雄鱼,但是实际只有90%—95%。鱼类的性别遗传机制处于分化的初级阶段,其性别决定受环境因素和遗传因素的共同控制,性别决定机制比较复杂<sup>[23]</sup>。研究发现罗非鱼的性别决定除了受染色体遗传机制的控制外也与水温有密切的关系<sup>[24]</sup>。此外也有学者认为子代雄性率的高低与亲本的种质纯度有关,亲本纯度越高其产生后代的雄性率就越高,对罗非鱼的养殖越有利<sup>[25]</sup>。本研究分析的4个群体中,02系群体的遗传多样性最低,也就是说02系群体相对于其他3个群体来说具有更高的遗传相似性,在杂交育种中选用02系群体作为父本是否可获得更高的雄性率仍需进一步的实验来证实。

致谢:

本论文的完成得到了美国佛罗里达州大沼地研究处高级研究员古滨河博士的帮助,特致谢忱!

### 参考文献:

- [1] Xu P, Zhou L H, Tian L P, et al Isolation of microsatellite markers from *Fennepenaeus chinensis* ESTs [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2003, 27(3): 213—219 [徐鹏,周令华,田丽萍,等.从中国对虾ESTs中筛选微卫星标记的研究.水产学报,2003,27(3): 213—219]
- [2] Li Z Z, Wu T T, et al Genetic mark of *Oreochromis aureus* and *Oreochromis niloticus* [J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2000, 35(1): 29—32 [李志忠,吴婷婷.奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼的遗传标记.甘肃农业大学学报,2000,35(1): 29—32]
- [3] Zhou Y Y, Ye X, Lu M X, et al AFLP analysis of two tilapia hybridization combinations and their hybrids F<sub>1</sub> [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2007, 15(3): 537—538 [周远扬,叶星,卢迈新,等.两个罗非鱼杂交组合亲本群体与子一代的AFLP分析.农业生物技术学报,2007,15(3): 537—538]
- [4] Cao Y, Xia D Q, Wu T T, et al Studies on the genetic variation in mitochondrial DNA of *Oreochromis niloticus* and *O. aureus* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 1997, 21(4): 360—365 [曹莹,夏德全,吴婷婷,等.尼罗非鲫和奥利亚非鲫线粒体DNA遗传差异的研究.水产学报,1997,21(4): 360—365]
- [5] Wang T, Li Z, Xia D. Analysis of the gene polymorphism of *O. aureus* and *O. niloticus* by using RAPD [J]. *Developmental & Reproductive Biology*, 1999, 2(19): 19—24
- [6] Zhang T, Lu M X, Ye X, et al Selection of microsatellite loci of *Oreochromis aureus* [J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2007, 27(3): 6—10 [张庭,卢迈新,叶星,等.奥利亚罗非鱼微卫星位点的筛选.广东海洋大学学报,2007,27(3): 6—10]
- [7] Xu S B, Tao Y F, Yang Z Q. A simple and rapid methods used for silver staining and gel preservation [J]. *Hereditas*, 2002, 24(3): 335—336 [许绍斌,陶玉芬,杨昭庆.简单快速的DAN银染和胶保存方法.遗传,2002,24(3): 335—336]
- [8] Botstein D, White R L, Skolnick M. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. *Am J Hum Genet*, 1980, 32: 314—331
- [9] Nei M, Roychoudhury A K. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance [J]. *Genetics*, 1974, 76(2): 379—390
- [10] Van O C, Hutchinson W F, Willis D P M, et al Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2004, 4: 535—538
- [11] Nei M, Maruyama T, Chakraborty R. The bottleneck effect and genetic variability in populations [J]. *Evolution*, 1975, 29: 1—10
- [12] Xiao T Y, Zhang X W, Zhang H Y, et al RAPD analysis of genetic diversity on genomic DNA among 4 species of *pelteobagrus* of Dongting Lake [J]. *China Biotechnology*, 2004, 24(3): 85—89 [肖调义,张学文,章怀云,等.洞庭湖四种黄颡鱼基因组DNA遗传多样性的RAPD分析.中国生物工程杂志,2004,24(3): 85—89]
- [13] Li J L, Mang L, Shi Y F. Evaluation of genetic diversity of Mongolian horse and thoroughbred horse using microsatellite marker [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2005, 36(1): 6—9 [李金莲,芒果,石有斐.利用微卫星标记对蒙古马和纯血马遗传多样性的研究.畜牧兽医学报,2005,36(1): 6—9]
- [14] Ma H Y, Jiang Y L, Guo J F, et al Genetic diversity analysis on *Pseudobagrus fulvhtaco* in Dongping Lake using microsatellite markers [J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2006, 15(2): 136—139 [马洪雨,姜运良,郭金峰,等.利用微卫星标记分析东平湖黄颡鱼的遗传多样性.激光生物学报,2006,15(2): 136—139]
- [15] Lu S Q, Liu Z, Liu H Y, et al Microsatellite DNA analysis of genetic diversity and the phylogenetic relationships of four breed varieties of *Carassius* sp. [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2005, 12(4): 371—376 [鲁双庆,刘臻,刘红玉,等.

- 鲫鱼4群体基因组DNA遗传多样性及亲缘关系的微卫星分析.中国水产科学,2005,12(4):371—376]
- [16] Liang L Q, Chang Y M, Dong C Z, et al. Genetic analysis for *Hucho taimen* in Wusuli River with microsatellites [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2004, 28(3): 241—244 [梁利群,常玉梅,董崇智,等.微卫星DNA标记对乌苏里江哲罗鱼遗传多样性的分析.水产学报,2004,28(3):241—244]
- [17] Du C B, Sun X W, Lou Y D, et al. The genetic heterozygosity analysis to wild carp and two cultivated strains of common carp using microsatellite technique [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2000, 9(4): 285—289 [杜长斌,孙孝文,楼允东,等.应用微卫星技术对野鲤和两种鲤选育品系的遗传多样性分析.上海水产大学学报,2000,9(4):285—289]
- [18] Liao X L, Yu X M, Tan D Q, et al. Microsatellite DNA analysis of genetic diversity of grass carp in Yangtze River system [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, 29(2): 113—119 [廖小林,俞小牧,谭德清,等.长江水系草鱼遗传多样性的微卫星DNA分析.水生生物学报,2005,29(2):113—119]
- [19] Li J L, Zhou Z J. Introduction and research of blue tilapia in China mainland [J]. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2000, 19(3): 261—265 [李家乐,周志金.中国大陆奥利亚罗非鱼的引进和研究.浙江海洋学院学报(自然科学版),2000,19(3):261—265]
- [20] Xu Y D, Zhong J X, Zheng S L, et al. RAPD study of testes genomic DNA from *T. aurea* and *T. nilotica* [J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 1999, 38(5): 793—796 [许玉德,钟建新,郑森林,等.尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼性腺的RAPD分析.厦门大学学报,1999,38(5):793—796]
- [21] Xia D Q, Cao Y, Wu T T, et al. A study on genetic variation of tilapia fish with RAPD analysis and its application to heterosis [J]. *Journal of Fisheries of China*, 1999, 23(1): 27—32 [夏德全,曹莹,吴婷婷,等.用RAPD分析对罗非鱼遗传变异的研究及其对杂种优势的应用.水产学报,1999,23(1):27—32]
- [22] Plosky Y, Cahner A, Haberfeld A. DNA Fingerprint bands applied to linkage analysis with quantitative trait loci in chickens [J]. *Animal Genetics*, 1993, 24: 105—110
- [23] Baroiller J F, D'Cotta H. Environment and sex determination in farmed fish [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2001, 130: 399—499
- [24] Ge X P, Xia D Q, Yu J H. Research progress of fish sex determination [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2002, 9(4): 371—374 [戈贤平,夏德全,俞菊华.鱼类性别决定的研究进展.中国水产科学,2002,9(4):371—374]
- [25] Zhu J, Min K H. The general study of China tilapia breeding development [J]. *Fisheries Science and Technology Industry*, 2003, 1: 6—8 [朱健,闵宽洪.我国罗非鱼育种研究发展概况.渔业科技产业,2003,1:6—8]

## THE GENETIC STRUCTURE OF FOUR POPULATIONS OF OREOCHROMIS AUREUS BY MICROSATellite DNA ANALYSIS

ZHANG Ting<sup>1,2</sup>, LU Mai-Xin<sup>1</sup>, YE Xing<sup>1</sup>, QUAN Ying-Chun<sup>1</sup>, GAO Feng-Ying<sup>1</sup>, HUANG Zhang-Han<sup>1</sup> and BAI Jun-Jie<sup>1</sup>

(1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Guangzhou 510380, China;

2. Fishery College of Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

**Abstract:** Genetic diversity and phylogenetic relationships among four breed varieties of *Oreochromis aureus* (83), *O. aureus* (02), *O. aureus* (05) and red *O. aureus* were studied using microsatellite analysis technology. 19 pairs of microsatellite DNA primers of *Oreochromis niloticus* registered in GenBank which were selected and proved to amplify successfully on *Oreochromis aureus* by pre-experiment were used.

The PCR reaction condition especially concentration of  $Mg^{2+}$  and annealing temperature were adjusted for each pair of primers. Amplified PCR products were electrophoresed in PAGE and stained according to the silver stain procedures and then imagined by Alphalmager A. A total of 82 alleles were obtained from the four populations. The number of alleles for each locus ranged from 2~8, and the average alleles was 4.3 each locus. Average observed heterozygosity and average expected heterozygosity were calculated by POPGENE3.2 software. The results showed that the observed value of average heterozygosity of the four *O. aureus* populations ranged from 0.154 to 0.391. The expected value of average heterozygosity ranged from 0.181 to 0.428, and the average polymorphism information contents ranged from 0.1513 to 0.3882, respectively. The lowest genetic diversity level was found in the *O. aureus* (02). The highest genetic similarity index (0.9422) and the lowest genetic distance (0.0596) were found between *O. aureus* (05) and *O. aureus* (83), which indicated a closer phylogenetic relationship between these two populations. On the other hand, the lowest genetic similarity index (0.6977) and the highest genetic distance (0.3599) existed between *O. aureus* (83) and red *O. aureus*, which suggested a farthest phy-

logenetic relationship between these two populations. The evaluation results of the genetic deviation index D revealed that there were loci departed from Hardy-Weinberg equilibrium in all the four *O. aureus* populations. Results of null allele analysis by MicroChecker showed that there were loci showing evidences for null alleles in the populations except red *O. aureus* population, including one locus for *O. aureus* (83), two for *O. aureus* (02) and seven for *O. aureus* (05). Such results suggested that locus with evidence for null alleles in the populations except red *O. aureus* might be one of the reasons causing deviation of Hardy-Weinberg equilibrium. Phylogenetic relationship of the four populations was analyzed by using UPGMA methods based on their genetic distances and the results showed that *O. aureus* (83) and *O. aureus* (05) populations were clustered in the first group, the *O. aureus* (02) in the second group, while the red *O. aureus* was in a separate group.

**Key words:** *Oreochromis aureus*; Microsatellite DNA; Genetic diversity; Genetic distance; Hardy-Weinberg equilibrium