

两种不同地方种群尼罗罗非鱼 遗传差异和分子遗传标记*

夏德全 吴晓渊

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 无锡, 214081)

摘要 用 Apa I, Bcl I, Bgl II, Dra I, EcoR I, EcoR V, Hind III, Kpn I, Pst I, Pvu II, Sac I, Xba I, Xho I 等 13 种限制性核酸内切酶对来自尼罗河上游和下游的两种不同地方种群尼罗罗非鱼的线粒体 DNA(mtDNA) 进行酶切分析, 得到这两种罗非鱼的 mtDNA 分子大小为: 上游尼罗为 $16\ 909 \pm 90\text{bp}$, 下游尼罗为 $16\ 912 \pm 100\text{bp}$ 。研究中还发现我国养殖的这两种不同地方种群尼罗罗非鱼, 每一群体内个体间均存在 mtDNA 酶切片段长度多态现象, 而且群体间在 mtDNA 水平上具有一定差异, 依此构建了这两种不同地方种群尼罗罗非鱼 mtDNA 限制性内切酶酶切图谱, 建立了识别它们的分子遗传标记。

关键词 尼罗罗非鱼, mtDNA, 限制性内切酶酶谱, 分子遗传标记

尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 自 70 年代引入我国以来, 已成为我国淡水养殖重要对象。目前我国有从不同国家和地区引进的尼罗罗非鱼。由于罗非鱼很容易在种间自行杂交, 罗非鱼的退化和混杂现象相当严重, 为了更好地保护、利用和开发罗非鱼种质资源, 罗非鱼的种质遗传研究尤为必要。

线粒体 DNA 遵循严格的母系遗传^[6], 一个个体代表一个群体, 故它可作为动物种质鉴定的遗传标记。线粒体 DNA 酶切片段技术可提供更详细、可靠、稳定的数据, 目前在国外已被用于鱼类群体遗传结构和品种鉴定^[3], 国内在这方面研究不多, 在罗非鱼上至今尚未见到研究报道。本文采用 13 种限制性内切酶对两种不同地方种群尼罗罗非鱼 mtDNA 进行了分析, 并且构建了相应的酶切图谱, 确定了识别它们的分子遗传标记, 为罗非鱼的遗传分析提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

实验用两种不同地方种群尼罗罗非鱼, 一种是 1978 年长江水产研究所从苏丹境内尼罗河上游引进的(以下简称上游尼罗, 以 *O. niloticus* (N) 表示); 一种是 1992 年淡水渔业研究

收稿日期: 1996-08-01。

* 本研究系中国水产科学研究院基金资助。

中心从美国引进的原产于尼罗河下游的(以下简称美尼,以 *O. niloticus* (A)表示)。两种鱼均取于淡水渔业研究中心试验场。限制性内切酶及缓冲液均购自华美生物工程公司。

1.2 mtDNA 的分离纯化

取新鲜肝组织,按 Palva 等的方法^[7]并作适当修改后提取 mtDNA。

1.3 mtDNA 的限制性内切酶酶解

按内切酶生产厂家提供的方法进行 mtDNA 的单、双酶解,分别用 0.9% 和 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离及鉴定酶解产物,经 EB 染色后照相记录结果。

1.4 酶切片段大小计算及限制酶图谱的建立

根据 Southern 的公式^[9]计算酶解片段大小。利用单、双酶解结果推算限制酶切位点,构建两种不同地方种群尼罗罗非鱼 mtDNA 的酶切图谱。

2 结果

2.1 上游尼罗与美尼 mtDNA 大小

通过对上游尼罗与美尼 mtDNA 单、双酶切片段的综合分析,得出二者 mtDNA 大小相似,分别为:上游尼罗 $16\ 909 \pm 90\text{bp}$,美尼 $16\ 912 \pm 100\text{bp}$,这表明两个不同地方种群尼罗罗非鱼进化上亲缘关系极为相近。

2.2 上游尼罗与美尼 mtDNA 单酶酶切片段分析

本实验中共用 13 种内切酶,它们酶切两种不同地方种群尼罗罗非鱼 mtDNA 结果如下: *Bcl* I、*Bgl* II、*EcoR* I、*EcoR* V、*Pvu* II 五种酶单独酶切上游尼罗与美尼 mtDNA 时,所产生的片段数目相同,即每种酶在两者 mtDNA 上的酶切位点数目分别相等,但切点位置并不一定相同,也就是说片段数目相同,酶切片段大小并不一样。而经另外三种酶 *Apa* I、*Pst* I、*Sac* I 单独酶切后,片段数目和大小在两种罗非鱼上出现了明显的差异。*Apa* I 酶切时,在上游尼罗上产生分子大小不同的多条片段,而在美尼上没有切点;*Pst* I 酶切时,在上游尼罗上也产生多条片段,而美尼上仅一个切点;*Sac* I 酶切时,上游尼罗有三条分子大小不同的片段,而在美尼上仅一个切点(图 1、图 2、表 1)。

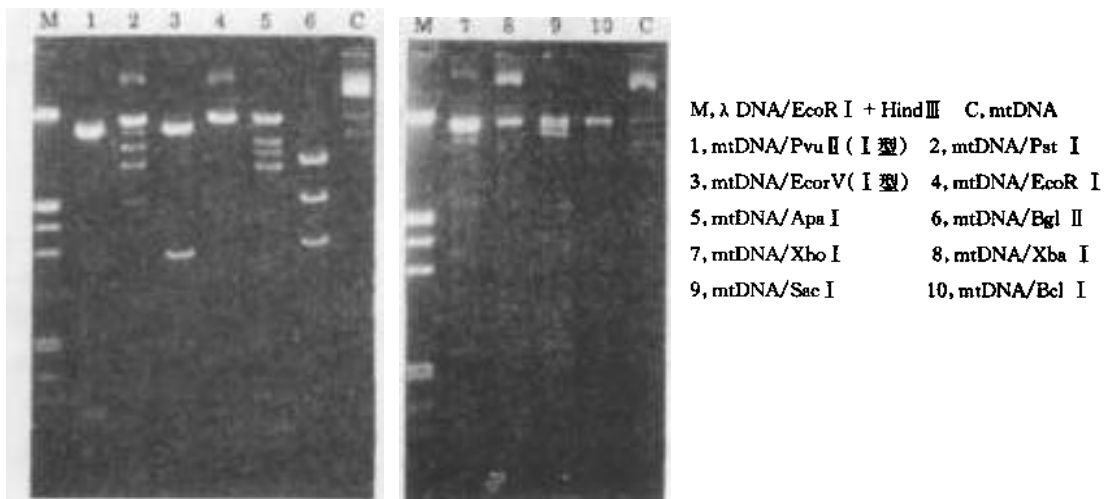
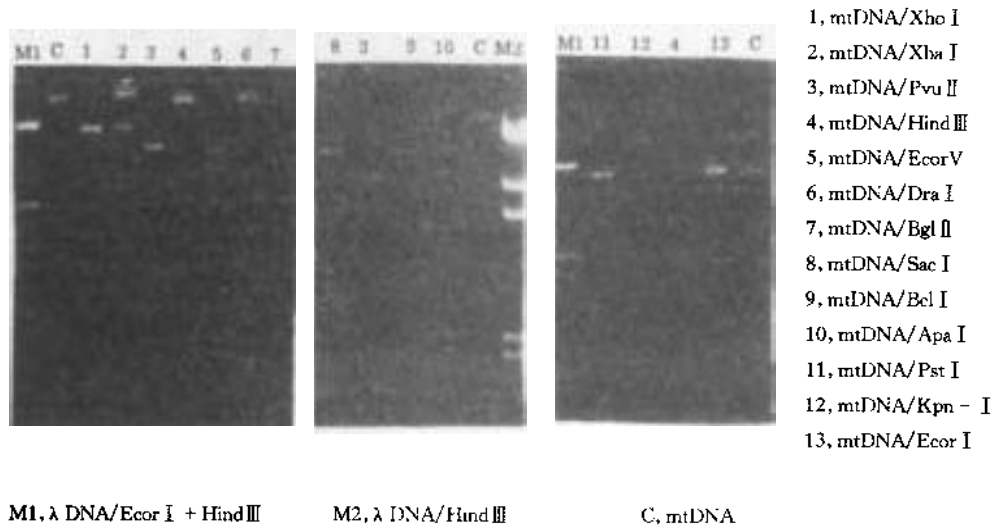


图 1 上游尼罗(N) mtDNA 单酶酶切电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretic patterns of mtDNAs from *O. niloticus* (N) obtained with single-enzyme digestion

其它五种内切酶, Kpn I 对这两种尼罗罗非鱼酶切效果不好, 另外四种酶 Dra I、Hind III、Xba I、Xho I, 酶切后产生的片段很杂, 故很难进行定量分析。

M1, λ DNA/EcoRI + Hind IIIM2, λ DNA/Hind III

C, mtDNA

图 2 美尼(A) mtDNA 单酶酶切电泳图谱

Fig. 2 Electrophoretic patterns of mtDNAs from *O. niloticus* (A) obtained with single-enzyme digestion

表 1 上游尼罗与美尼 mtDNA 单酶酶切片段大小

Table 1 Fragment size of mtDNA of *O. nilotica* (N) and *O. nilotic* (A) obtained with single enzyme digestion

酶 Enzymes	鱼名 Species	酶切片段大小(kb) Fragment size	合计 Total
Apa I	N	8.30 + 7.10 + 1.31 + <u>16.7</u> + 9.6	16.71
	A	没切点(no recognition site)	
Bcl I	N	16.90	16.90
	A	17.00	17.00
Bgl II	N	7.80 + 5.20 + 3.80	16.80
	A	7.80 + 5.20 + 3.80	16.80
EcoRI	N	16.90	16.90
	A	16.90	16.90
EcoRV	N I 型	13.30 + 3.40	16.70
	N II 型	9.50 + 4.00 + 3.40	16.90
	A	9.40 + 7.50	16.90
Pst I	N	7.50 + 5.30 + 4.10 + <u>16.80</u> + 12.80 + 9.40	16.80
	A	17.10	
Pvu II	N I 型	13.80 + 1.30 + 1.10 + 0.90	17.10
	N II 型	8.60 + 5.10 + 1.28 + 1.10 + 0.90	16.98
	A I 型	10.20 + 3.00 + 2.60 + 1.00	16.80
	A II 型	8.00 + 2.20 + 3.00 + 2.70 + 1.00	16.70
Sac I	N	12.70 + 2.30 + 2.10	17.10
	A	17.10	17.10
总计 Total	N		16.909 ± 0.09
	A		16.912 ± 0.10

注: 数据下有横线者表示不完全酶切片段, 具体如下:

Note: under lined data indicate incomplete digestion fragments, as follows: 16.7 = 8.30 + 7.10 + 1.31; 9.60 = 8.30 + 1.31; 16.80 = 7.50 + 5.30 + 4.10; 12.80 = 7.50 + 5.30; 9.40 = 5.30 + 4.10

从表1中看到,个体间多态现象在这两种不同地方种群罗非鱼中均存在。上游尼罗罗非鱼中不同个体 mtDNA 经 EcoR V 酶切后产生 13.30 + 3.40kb (NI 型)和 9.50 + 4.00 + 3.40kb(N II 型)两种不同酶切类型,而经 Pvu II 酶切后产生 13.80 + 1.30 + 1.10 + 0.90kb(NI 型)和 8.60 + 5.10 + 1.28 + 1.10 + 0.90kb(II 型)两种不同酶切类型。美尼中不同个体 mtDNA 经 Pvu II 酶切后产生 10.20 + 3.00 + 2.60 + 1.00 kb(AI 型)和 8.00 + 2.20 + 3.00 + 2.70 + 1.00kb(A II 型)二种不同类型(图3)。这结果表明两种不同地方种群尼罗罗非鱼种群间 mtDNA 存在差异,而且每种罗非鱼种群内也存在个体间差异。



1. mtDNA/Pvu II (I 型)
2. mtDNA/Pvu II (II 型)
M. λ DNA/EcoR I + Hind III

图3 美尼(A)的 Pvu II 酶切电泳图谱

Fig.3 Electrophoretic maps of mtDNAs from *O. niloticus* (A) digested by Pvu II

2.3 遗传标记

上游尼罗和美尼两种不同地方种群尼罗罗非鱼在形态上难于区分,但其 mtDNA 限制性内切酶酶切结果具有明显差异。除了 EcoR I, Bcl I 两个酶在 mtDNA 上只有一个切点外,其它限制酶酶切结果都有一定的差异。Apa I 酶切上游尼罗有三切点,美尼无切点;Pst I 和 Sac I 酶切上游尼罗有多个切点,美尼均只有一个切点;EcoR V, Pvu II 对这两种不同地方种群尼罗罗非鱼 mtDNA 酶切时,产生的片段数量相同,但大小不同。本文分别构建了上游尼罗和美尼六种酶的酶切图谱,根据图谱可以明确区分这两种不同地方种群尼罗罗非鱼。用单酶切结果分析更简单易行,Apa I 酶切上游尼罗有三切点,8.30 + 7.10 + 1.31kb,美尼无切点。EcoR V 酶切上游尼罗 I 型有二切点,13.30 + 3.40kb, II 型有三切点,8.50 + 4.00 + 3.40kb;酶切美尼有二切点,9.40 + 7.50kb。Pvu II 酶切上游尼罗有四切点,13.80 + 1.30 + 1.10 + 0.90kb,酶切美尼有四切点,10.20 + 3.00 + 2.60 + 1.00kb。这表明 Apa I, EcoR V, Pvu II 三种酶可作为检测尼罗和美尼的分子遗传标记。

2.4 上游尼罗和美尼 mtDNA 限制性内切酶酶切图谱的建立

构建了上游尼罗 Apa I、Bcl I、Bgl II、EcoR I、EcoR V 和 Sac I 六种限制性内切酶图谱,其中由于 EcoR V 有多态,且尤为普遍,因此图谱上出现了 EcoR V 的多态位点。构建了美尼 Bcl I、Bgl II、EcoR I、EcoR V、Sac I 和 Pst I 六种限制性内切酶图谱,由于 Pvu II 酶切所得的小片段位置难以确定,只确定了 Pvu II 二个切点的位置(图4)。

3 讨论

3.1 尼罗罗非鱼的个体间多态现象

实验中 EcoR V 和 Pvu II 酶切上游尼罗 mtDNA 分别产生 EcoR V - I 型(二条片段:13.30 + 3.4kb)、EcoRV - II 型(三条片段:9.50 + 4.00 + 3.40kb)、Pvu II - I 型(四条片段:13.80 + 1.30 + 1.10 + 0.90kb)、Pvu II - II 型(五条片段:8.60 + 5.10 + 1.28 + 1.10 + 0.90kb),这表明在上游尼罗个体间存在多态性,而且发现了 EcoRV 和 Pvu II 多态性表现出一定相关性,实验所用七尾上游尼罗中,五尾为 EcoRV - I 型和 Pvu II - I 型,二尾为 EcoRV - II 型和 Pvu II - II 型,为何出现这一情况有待进一步研究。美尼中,Pvu II 酶切片段也存在两种类型,I 型为四片段,II 型为五片段,这也表明了在美尼中也存在个体间多态性。线

粒体 DNA 酶切片段长度多态性在许多淡水鱼中也广泛存在^[2,4,5]。mtDNA 多态性与种群内遗传多样性相关,自然种群保持大量变异对种群生存有利。对 mtDNA 多态性的系统研究,更有助于了解它们各种遗传结构品系的分布及品种复壮工作,促进鱼类育种的研究。

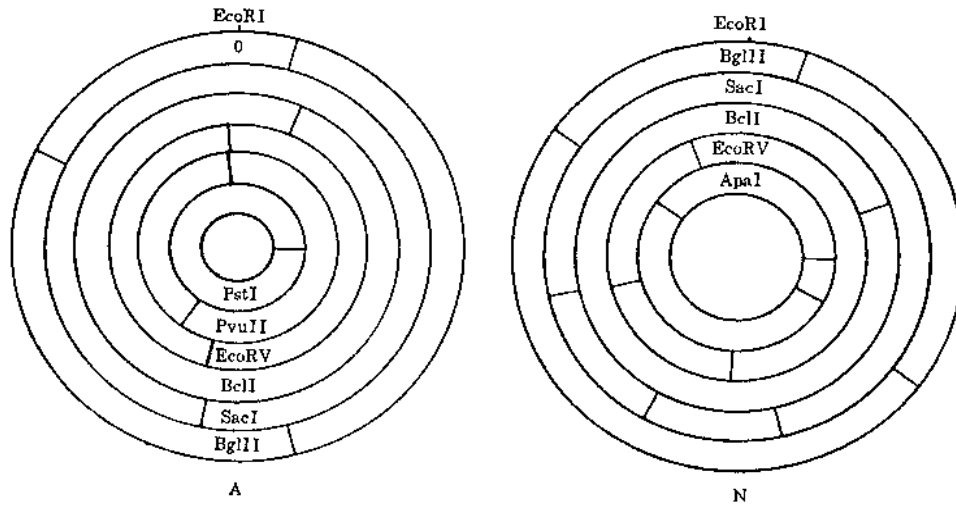


图 4 尼罗(N)和美尼(A)mtDNA 限制酶酶切图谱

Fig.4 Restriction maps of mtDNAs from *O. niloticus* (N) and *O. niloticus* (A)

3.2 mtDNA 是研究群体遗传学的有效方法

70 年代到 80 年代主要依靠同工酶研究鱼类群体遗传结构^[1],由于同工酶反映蛋白质水平变化,限制了该技术在群体遗传结构和品种鉴定方面进一步应用^[8]。线粒体 DNA 是核外遗传物质,呈母系遗传,一个个体就代表一母系群体。mtDNA 限制性内切酶实验,取样方便,步骤简单,工作量小,更符合大批量的研究,特别是它反映分子水平上变化,mtDNA 限制性内切酶技术是研究鱼类种群遗传结构最有效的方法。

参 考 文 献

- [1] 李思发等,1990。长江、珠江、黑龙江草鱼、鲢鱼、鳙鱼种质资源研究。上海科学技术出版社。
- [2] 戴建华等,1994b。黄鳝 mtDNA 的分离纯化及多态性的检测。湖北师范学院学报(自然科学版),14(3):77-82。
- [3] Carvalho, G.R., and L. Hauser, 1994. Molecular genetics and the stock concept in fisheries. Rev. Fish Biol. Fish, 4: 326-350.
- [4] Fundenstein, B., et al., 1990. Restriction site polymorphism of mitochondrial DNA of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) broodstock in Eilat, Israel. Aquaculture, 89:217-223.
- [5] Grewe, P.M., and P.D.N. Hebert, 1988. Mitochondrial DNA diversity among broodstocks of the lake trout, *Salvelinus namaycush*. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 45:2114-2122.
- [6] Gyllenaten, V., et al., 1985. Maternal inheritance of mitochondrial DNA during back crossing of two species of mice. J. Hered., 76:214-226.
- [7] Palva, T.K. and E.T. Palva, 1985. Rapid isolation of animal mitochondrial DNA by alkaline extraction. FEBS letters, 192(2):267-270.
- [8] Park, L. R., and P. Moran, 1994. Development in molecular genetic techniques in fisheries. Rev. Fish Biol. Fish, 4:

272 - 299.

[9] Southern, E. M., 1979. Measurement of DNA Length by Gel Electrophoresis. *Analytical biochemistry*, 100;319 - 323.

STUDY ON THE GENETIC VARIATION BETWEEN TWO GEOGRAPHIC POPULATIONS OF NILE TILAPIA AND THEIR MOLECULAR MARKERS

Xia Dequan Wu Xiaoyuan

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

ABSTRACT Thirteen restriction endonucleases, Apa I, Bcl I, Bgl II, Dra I, EcoR I, EcoRV, Hind III, Kpn I, Pst I, Pvu II, Sac I, Xba I, and Xho I, were employed in the study on cleaving the mtDNAs of two geographic populations of Nile tilapia, one of which originated from the upperstream of the Nile River, and the other from the lower - stream. The size of mtDNA of upper - stream Nile tilapia was figured out to be $16,909 \pm 90$ bp according to the final mtDNA restriction fragments, and that of lower - stream tilapia was $16,912 \pm 100$ bp. Further, the inter - and intra - population restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) were also observed in the study, which means that there existed a certain degree of genetic variation between and within the populations of Nile tilapia cultured in China. The restriction maps were constructed and the molecular genetic markers for identifying different tilapiine populations were established based on the cleavage results.

KEYWORDS *Oreochromis niloticus*, Mitochondrial DNA, Restriction map, Molecular genetic marker