

尼罗罗非鱼与萨罗罗非鱼正反杂交后代耐盐性能的杂种优势及其与遗传的相关性的 SSR 分析

李思发¹, 颜标¹, 蔡完其¹, 李腾云¹, 英金华², 张艳红²

(1. 上海水产大学 农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 200090; 2. 中捷罗非鱼良种场, 河北 沧州 061108)

摘要: 对尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) ♀ × 萨罗罗非鱼 (*Sarotherodon melanotheron*) ♂ (F₂)、萨罗罗非鱼 ♀ × 尼罗罗非鱼 ♂ (F₂)、尼罗罗非鱼、萨罗罗非鱼 4 个遗传型群体的耐盐性实验表明: (1) 4 个遗传型群体的平均成活时间 (MST)、50% 成活时间 (ST₅₀) 以及 96 h 半数致死浓度 (MLS-96) 由高到低依次为: 萨罗、萨罗 × 尼罗 (F₂)、尼罗 × 萨罗 (F₂)、尼罗, 死亡率与盐度具有显著的回归关系 ($P < 0.05$); (2) 两个杂交种超越尼罗的超亲杂种优势值 (H_N) 表现为正值, 超越萨罗的超亲杂种优势值 (H_S) 表现为负值, 说明它们的耐盐力都超过了尼罗, 但都未超过萨罗; (3) 尼罗 × 萨罗 (F₂) 的平均杂种优势值 (H_M) 表现为负值, 萨罗 × 尼罗 (F₂) 的 H_M 除其 MLS-96 表现为负值, 其 MST 和 ST₅₀ 均为正值, 说明萨罗 × 尼罗 (F₂) 的耐盐性能略优于尼罗 × 萨罗 (F₂)。对尼罗 × 萨罗 (F₂)、萨罗 × 尼罗 (F₂)、尼罗 × 萨罗 (F₁)、萨罗 × 尼罗 (F₁)、尼罗、萨罗 6 个遗传型群体的 SSR 分析发现: (1) 有效等位基因数 (N_e)、平均遗传杂合度 (H_e) 及多态信息含量 (PIC) 3 项指标一致, 表明 F₁ 遗传多样性比亲本增强 2/3 左右, 这与杂交种的基因重组有关; F₂ 又比 F₁ 增强 1/10 左右, 初步认为这与 F₂ 的遗传分化有关; (2) 引物 Os-64 和 Os-75 仅在尼罗、尼罗 × 萨罗 (F₁) 及尼罗 × 萨罗 (F₂) 中扩增出条带, 表现出强烈的尼罗母系遗传; 引物 Os-25 和 IGF 仅在萨罗、萨罗 × 尼罗 (F₁) 及萨罗 × 尼罗 (F₂) 中扩增出条带, 表现出强烈的萨罗母系遗传, 这 4 条引物可作为判别杂交鱼母本来源的遗传标记。[中国水产科学, 2008, 15(2): 189-197]

关键词: 尼罗罗非鱼; 萨罗罗非鱼; 正反杂交种; 耐盐; 杂种优势; SSR

中图分类号: S917

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)02-0189-09

20 世纪末以来, 世界海水和咸淡水鱼类养殖有了较大发展, 其中咸淡水罗非鱼的养殖产量从 1996 年的 65 989 t 增长到 2001 年的 190 187 t^[1], 占世界罗非鱼总产量的比例由 8.1% 提高到 13.7%, 这主要是发展罗非鱼-对虾混养的结果^[2]; 在中国, 海水和咸淡水鱼类养殖产量则从 1996 年的几乎为零增长到 2005 年的 658 928 t^[3], 在对虾池中混养罗非鱼以改善虾池生态环境也引起了重视。但耐盐优良品种的短缺限制了其持续发展。

尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 是目前中国主要养殖鱼类之一, 其生长快, 耐盐能力一般, 适合淡水养殖; 萨罗罗非鱼 (*Sarotherodon melanotheron*) 耐盐能力强, 适合咸淡水生活, 但生长慢, 难以成为养殖对象, 作者于 2002 年将其作为育种材料引进中国, 开始耐盐罗非鱼的杂交选育研究。

尼罗罗非鱼和萨罗罗非鱼分别隶属于 2 个不同的属, 前者为雌鱼口孵, 后者主要为雄鱼口孵, 两者不能自然交配, 人工杂交也很困难。2004 年终于获得了正反交子一代^[4-5], 由于受精和出苗率太低, 无法获得足够数量的苗种做耐盐性实验。后发现 F₁ 能自然繁殖, 于 2005 年产生了 F₂ 代, 得以扩种并进行生长性能和耐盐性能等实验。本实验一方面对萨罗罗非鱼 ♀ × 尼罗罗非鱼 ♂ (F₂) 与尼罗罗非鱼 ♀ × 萨罗罗非鱼 ♂ (F₂) 耐盐性能的杂种优势进行评估, 实验材料包括两个杂交 F₂ 和两个亲本, 共 4 个遗传型群体; 另一方面通过微卫星分析来探讨耐盐力这一生理特征变化同杂交过程中基因型变化的相关性。这部分实验除包括上列 4 种遗传型外, 还加进了两个杂交 F₁, 共 6 个遗传型群体, 以助了解从原始亲本到 F₁ 到 F₂ 间的遗传变化。

收稿日期: 2007-07-11; 修订日期: 2007-10-21.

基金项目: 国家科技支撑计划专题—罗非鱼耐盐新品种选育 (2006BAD01A1203).

作者简介: 李思发 (1938-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事水产动物种质资源与种苗工程研究. Tel: 021-65710333; E-mail: sfli@shfu.edu.cn

1) 李思发, 颜标, 英金华, 等, 尼罗罗非鱼与萨罗罗非鱼正反杂交鱼自繁后代耐盐性和生长性能评估 (待发表).

1 材料与方法

1.1 材料

2006年5月,选择性腺发育较好的萨罗罗非鱼(以下简称萨罗)、尼罗罗非鱼(以下简称尼罗)、尼罗罗非鱼♀×萨罗罗非鱼♂(F_1)(以下简称尼

萨 F_1)、萨罗罗非鱼♀×尼罗罗非鱼♂(F_1)(以下简称萨尼 F_1)的亲鱼进行配组(表1)。配组20 d后,相继有鱼苗孵出。鱼苗培育30 d左右,筛选规格相近的实验鱼,放入网箱备用。

表1 4种遗传型罗非鱼的繁殖配组
Tab. 1 The mating of 4 genotype of tilapias

♀	♂	萨罗	尼罗	尼罗×萨罗(F_1)	萨罗×尼罗(F_1)
		<i>S. melanotheron</i>	<i>O. niloticus</i>	<i>O. niloticus</i> × <i>S. melanotheron</i>	<i>S. melanotheron</i> × <i>O. niloticus</i>
萨罗 <i>S. melanotheron</i>		萨罗			
尼罗 <i>O. niloticus</i>			尼罗		
尼罗×萨罗(F_1)	<i>O. niloticus</i> × <i>S. melanotheron</i>			尼罗×萨罗(F_2)	
萨罗×尼罗(F_1)	<i>S. melanotheron</i> × <i>O. niloticus</i>				萨罗×尼罗(F_2)

注: F_1 为2004年所产。

Note: F_1 was bred in 2004.

1.2 方法

1.2.1 耐盐性能评估

(1) 耐盐致死实验 采用4×3随机区组设计。4个遗传型罗非鱼群体(萨罗、尼罗、尼萨 F_1 、萨尼 F_1)各设3个重复,每个重复各放实验鱼30尾。分别挑选体质健壮的稚鱼,体质量1.00~1.27 g,由淡水直接移入盐度为32的海水中。发现死鱼即捞出,记录死亡时间和尾数。实验在40 cm×40 cm×30 cm的泡沫箱中进行。

(2) 半致死盐度实验 采用4×4×3随机区组设计。对尼萨 F_2 和萨尼 F_2 ,设15、20、25和30共4个盐度梯度,每个盐度设3个重复;对萨罗设30、35、40和45共4个盐度梯度,每个盐度设3个重复;对尼罗设10、15、20和25共4个盐度梯度,每个盐度设3个重复。每个重复各放实验鱼30尾。分别挑选体质健壮的稚鱼,体质量1.00~1.27 g,由淡水直接移入上述各种盐度的水体中。实验在40 cm×40 cm×30 cm的泡沫箱中进行。记录96 h内各箱内实验鱼死亡时间和尾数。并且建立实验鱼死亡率(%)与盐度的线性回归方程。

实验期间,水温变动范围为25.0~26.5℃;溶解氧变动范围为3.5~7.0 mg/L; pH值变动范围为7.5~8.5;氨态氮变动范围为0.4~2.3 mg/L。

通过耐盐致死实验和半致死盐度实验计算如下耐盐指标^[6-7]:

①平均成活时间(Mean survival time, MST):

将健康实验鱼从淡水直接移入盐度32水中,观察和记录每尾实验鱼的成活时间,然后计算其平均值,即为平均成活时间。

②50%成活时间(Median survival time, ST_{50}):将健康实验鱼从淡水直接移入盐度32水中,观察、记录正好只有一半鱼存活的时间。

③96 h半致死盐度(Median lethal salinity-96 h, MLS-96):将健康实验鱼直接移入各种盐度梯度中,观察、记录饲养96 h后各盐度实验鱼的死亡数目,一半实验鱼死亡所对应的盐度即为96 h半致死盐度。

(3) 杂种优势的评估

参考Tave^[8]用于评估杂种优势的公式:

①平均杂种优势 H_M (%) = $[(F-MP)/MP] \times 100$

式中 F 为杂交种某性状的平均值, MP 为双亲相应性状的平均值。

为了充分评估 F_2 的杂种优势,设计了公式②和③,用于评估杂种相对于每种原始亲本所表现的优势。

② F_2 超过亲本甲方(本实验为尼罗)的超亲杂种优势

$$H_N(\%) = [(F-NP)/NP] \times 100$$

③ F_2 超过亲本乙方(本实验为萨罗)的超亲杂种优势

$$H_S(\%) = [(F-SP)/SP] \times 100$$

式中 F 为杂交种某性状的平均值, NP 、 SP 分别为

亲本尼罗、萨罗相应性状的平均值。如 $H>0$, 表示有杂种优势。 H 值越大, 优势越强。

1.2.2 微卫星分析

(1) 微卫星引物 根据文献 [9-11] 提供的微卫星序列, 在上海生工合成如下引物, 如表 2 所示。

表 2 10 对微卫星引物序列及特异退火温度
Tab.2 Sequence of ten microsatellite marker primers and specific annealing temperature

引物 Primer	上游序列 (5'-3') Forward primer sequences	下游序列 (5'-3') Reverse primer sequences	退火温度 /℃ T_{am}
PRL1	GTTAGCCCCCTCCTCACTCT	ACCTTGCTCGTCACACCTG	53.8
PRL2	TCGTGTCTTGTGGGGAACCC	TGAATGGATGCAACAGGATG	60.5
PRL3	CTTAACATTTTCCACCTTCACG	CTTGCCCTCCATTTTATAGTTCCTT	65.5
IGF	ATGCTAGCA AACATCAAAGGTC	GATATGCTGATGATGCACAGAGTC	67.0
ISP	TGAGCTGAGCAGATGGAGCAGAAG	ATGAACAGCCCTGTGAAGAGAGG	62.5
Os-7	TGTCTGCTGCCTCGGCCTG	ACTGTGCCGCATCGCCAG	58
Os-7R	AGAGGAAATGAGCAGCCTC	GATGCGGCAACAGTTATGTC	54
Os-25	TTGTGAAATTGCATTGCACTC	AACTCCCTTTGATCCTCTGC	53
Os-64	CAGTGTCTTCAGTTCCTTGC	CAGAAGCATCTTATTGATGAC	54
Os-75	AGCCTAAAATAATGGAATCAC	CCACAGAGTCATGGTTTAC	49

(2) 微卫星 PCR 扩增及产物检测 PCR 反应程序为: 94 ℃ 预变性 4 min, 接着 94 ℃ 30 s, 49~70 ℃ (根据引物的退火温度进行调整) 30 s, 72 ℃ 30 s。35 个循环后, 72 ℃ 延伸 10 min。扩增产物在 8% (W/V) 的非变性聚丙烯酰胺电泳检测, 银染, 数码相机拍照。

(3) 数据统计分析 每个遗传型群体各自分析了 20 尾个体。根据电泳图谱进行微卫星的多态性分析。并作以下计算:

有效等位基因数 (N_e)^[12-13]

$$N_e=1/\sum_{i=1}^np_i^2$$

群体平均杂合度期望值 (H_e)^[14]

$$H_e=1-\left(\sum_{i=1}^nP_i^2\right)$$

多态信息含量 (PIC)^[15]

$$PIC=1-\left(\sum_{i=1}^nP_i^2\right)-\left(\sum_{i=1}^{n-1}\sum_{j=i+1}^n2P_i^2P_j^2\right)$$

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。

群体内个体间遗传距离^[16] $D=1-I$

遗传相似指数 $I=2n_{xy}/(n_x+n_y)$

式中 n_x+n_y 是两个材料所有的等位基因数, n_{xy} 为个体 X、Y 共有等位基因数。

2 结果与分析

2.1 耐盐性能

4 个遗传型罗非鱼群体的平均体质量、MST、ST₅₀ 及 MLS-96 如表 3 所示。MST、ST₅₀ 和 MLS-96 与体质量间的相关性不显著 ($P>0.05$)。故体质量差异对实验结果的影响可以排除。

在 MST 和 ST₅₀, 4 个遗传型罗非鱼群体差异显著 ($P<0.05$), 萨尼 F₂ 比尼萨 F₂ 的耐盐指标稍好, 比尼罗显著提高 ($P<0.05$)。

在 MLS-96, 萨罗最高, 尼罗最低。在尼萨 F₂ 与萨尼 F₂, 死亡率与盐度的回归关系显著 ($P<0.05$)。尼萨 F₂ 稍低于萨尼 F₂, 分别为尼罗的 1.71 倍、1.75 倍, 萨罗的 0.69 倍、0.70 倍。

4 个遗传型罗非鱼群体的 MST、ST₅₀ 和 MLS-96 由高至低顺序为: 萨罗、萨尼 F₂、尼萨 F₂、尼罗。

表3 罗非鱼4个遗传型群体耐盐性能实验结果

Tab.3 Examination results of salt tolerance of 4 genotypes of tilapia

n=90; $\bar{X} \pm SD$

遗传型 Genotype	平均体质量 /g Mean body weigh	平均存活时间 /min MST	50% 存活时间 /min ST ₅₀	96 h 半致死盐度 MLS-96	死亡率 (y)- 盐度 (x) 回归关系 Salinity-mortality regression
萨罗 <i>S. melanotheron</i>	0.987±0.158 ^b	359.33±32.81 ^a	305.33±7.02 ^a	33.9	y=4.96x-118.25 R ² =0.970
尼罗 <i>O. niloticus</i>	1.271±0.186 ^a	75.87±16.83 ^d	74.33±1.15 ^d	13.8	y=4.14x-7.20 R ² =0.978
尼萨 F ₂ <i>O. niloticus</i> × <i>S. melanotheron</i> (F ₂)	1.254±0.173 ^a	185.28±42.12 ^c	188.00±2.65 ^c	22.8	y=5.46x-74.49 R ² =0.972
萨尼 F ₂ <i>S. melanotheron</i> × <i>O. niloticus</i> (F ₂)	1.076±0.137 ^b	233.45±31.45 ^b	232.67±6.43 ^b	23.3	y=5.78x-84.75 R ² =0.955

注: 同一列内平均值后具有相同字母的两组间差异不显著 (P>0.05)。

Note: Means in the same column followed by the same letter are not significantly different (P>0.05).

根据测定的耐盐指标,对4个遗传型罗非鱼群体的耐盐性能进行聚类分析,结果如图1所示。

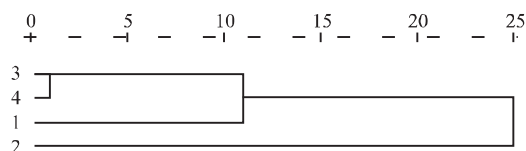


图1 4个遗传型罗非鱼群体耐盐性能的聚类分析图

1. 萨罗; 2. 尼罗; 3. 尼罗 × 萨罗 (F₂); 4. 萨罗 × 尼罗 (F₂)。

Fig. 1 Cluster dendrogram of salt tolerance performances of four genotypes of tilapias

1. *S. melanotheron*; 2. *O. niloticus*; 3. *O. niloticus* × *S. melanotheron* (F₂); 4. *S. melanotheron* × *O. niloticus* (F₂).

由4个遗传型罗非鱼群体耐盐性能的聚类分析图和表3可以看出,4群体罗非鱼明显地分为2

类;第一类为尼罗,耐盐性能很差,各项耐盐指标都显著地低于其他罗非鱼;第二类是萨罗、尼罗 × 萨罗 (F₂) 和萨罗 × 尼罗 (F₂),耐盐性能较强。其中尼罗 × 萨罗 (F₂) 与萨罗 × 尼罗 (F₂) 的耐盐能力最为相近。

2.2 耐盐性杂种优势的分析

依据表3的数据,计算两种杂交鱼的 MST、ST₅₀ 和 MLS-96 指标的杂种优势值 (表4)。两个杂交种超越尼罗的超亲杂种优势值 (H_N) 表现为正值,超越萨罗的超亲杂种优势值 (H_S) 表现为负值,说明它们的耐盐力都超过了尼罗,但都未超过萨罗。尼萨 F₂ 的平均杂种优势值 (H_M) 表现为负值,萨尼 F₂ 的 H_M 除在 MLS-96 表现为负值,在 MST 和 ST₅₀ 均为正值,说明萨尼 F₂ 的耐盐性能略优于尼萨 F₂,即更具有耐盐方面的杂种优势。

表4 正反杂交鱼耐盐性能的杂种优势估算值

Tab.4 Estimated heterosis of salt tolerance performance of two reciprocal hybrids

杂交种类型 Reciprocal hybrid	耐盐指标 Salt tolerance index	平均杂种优势 /% H _M	超过尼罗的 超亲杂种优势 /% H _N	超过萨罗的 超亲杂种优势 /% H _S
尼萨 F ₂ <i>O. niloticus</i> × <i>S. melanotheron</i> (F ₂)	MST	14.85	144.2	-48.4
	ST ₅₀	-0.96	152.9	-38.4
	MLS-96	-4.4	65.2	-32.7
萨尼 F ₂ <i>S. melanotheron</i> × <i>O. niloticus</i> (F ₂)	MST	7.28	207.7	-35.0
	ST ₅₀	22.60	213.0	-23.8
	MLS-96	-2.31	68.8	-31.3

2.3 微卫星分析

2.3.1 微卫星 PCR 结果 在 10 对引物中, 引物 Os-64 和 Os-75 只在尼罗、及以尼罗为母本的杂交后代 (尼萨 F₁ 及尼萨 F₂) 中扩增出条带, 表现出强烈的尼罗母系遗传; 引物 Os-25 和 IGF 只在萨罗、及以萨罗为母本的杂交后代 (萨尼 F₁ 及萨尼

F₂) 中扩增出条带 (图 2), 表现出强烈的萨罗母系遗传。可作为判别杂交鱼母本的遗传标记。其他 6 对引物 (PRL1, PRL2, PRL3, Os-7, Os-7R, Os-25, ISP) 在 6 种遗传型中均可以扩增出条带, 且均呈现为多态性。扩增产物片段的大小范围为 92~350 bp。

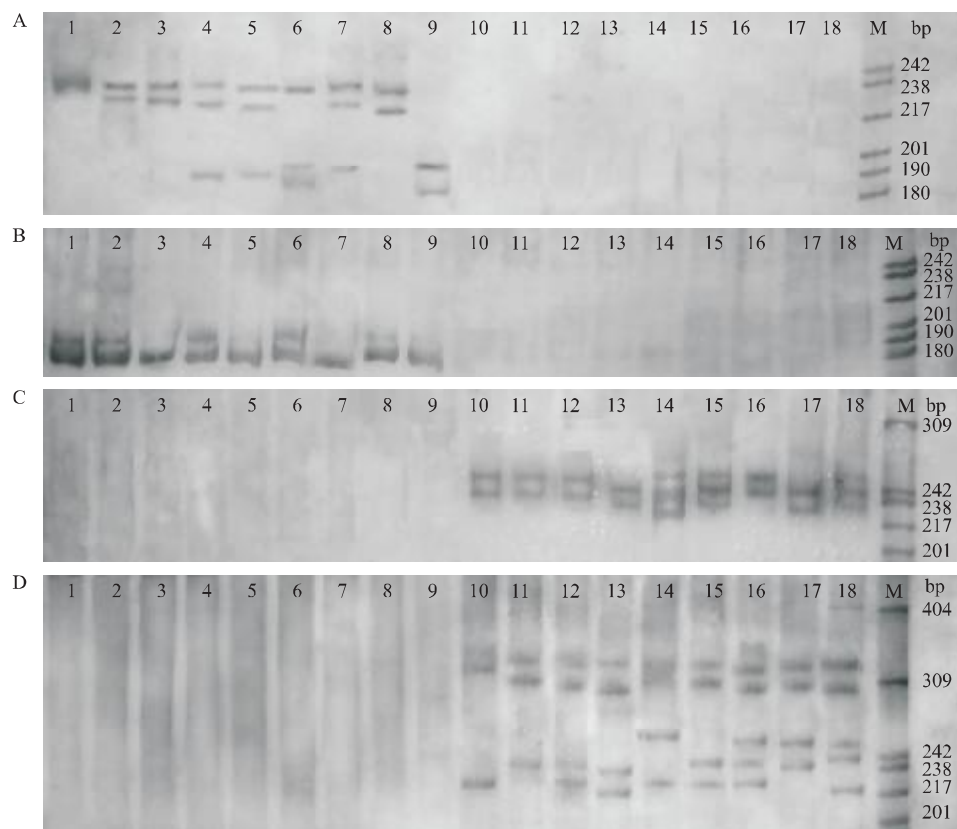


图 2 4 对微卫星引物 (A: Os-64, B: Os-75, C: IGF, D: Os-25) 在罗非鱼 6 个遗传型群体中扩增产物的电泳带型

1-3: 尼罗; 4-6: 尼萨 F₁; 7-9: 尼萨 F₂; 10-12: 萨罗; 13-15: 萨尼 F₁; 16-18: 萨尼 F₂; M: DNA 分子标记 (PBR322/MSP I)。

Fig.2 The microsatellite electrophoresis patterns by four primers (A: Os-64, B: Os-75, C: IGF, D: Os-25) in 6 genotypes of tilapia 1 3: *O.niloticus*; 4 6: *O.niloticus* ♀ × *S.melanotheron* ♂ (F₁); 7 9: *O.niloticus* ♀ × *S.melanotheron* ♂ (F₂); 10 12: *S.melanotheron*; 13 15: *S.melanotheron* ♀ × *O.niloticus* ♂ (F₁); 16 18: *O.niloticus* ♀ × *S.melanotheron* ♂ (F₂); M: DNA Marker (PBR322/MSP I)。

2.3.2 有效等位基因数、遗传杂合度和多态信息含量 6 个微卫星位点在 6 个遗传型罗非鱼群体的平均有效基因数、遗传杂合度以及多态信息含量统计结果如表 5 所示。

有效等位基因数是基因纯合度的倒数, 反映了等位基因间的相互影响, 可作为群体遗传变异的一个指标。尼萨 F₂ (4.21) 与萨尼 F₂ (4.03) 的有效等位基因数分别高出尼萨 F₁ (3.79) 与萨尼

F₁ (3.53) 11.1% 和 14.1%; 更高出原始亲本尼罗 (2.21) 与萨罗 (1.92) 90.5% 和 110%。简言之, 杂交后代 (F₁) 基因杂合性比亲本增强了 67%, 这是杂种优势得以形成的重要遗传物质基础之一; 而 F₁ 自繁后代 (F₂) 的基因杂合性比 F₁ 又进一步增强约 11.2%, 这是一个有趣的现象, 应同其遗传分化有关。

在平均遗传杂合度 H_e 期望值方面, 尼萨 F₂ (0.748) 与萨尼 F₂ (0.770) 都分别高出尼萨 F₁

(0.725) 与萨尼 F_1 (0.692), 更高出原始亲本尼罗 (0.485) 和萨罗 (0.537)。

多态信息含量 (PIC) 是衡量基因变异程度的指标之一。依据 Nei 等^[12] 的界定, $PIC > 0.5$ 为高度多态; $0.25 < PIC < 0.5$ 为中度多态; $PIC < 0.5$ 为低度多态。本实验 6 个微卫星位点在 4 个遗传型

罗非鱼群体中均表现为高度多态。尼萨 F_2 (0.687) 与萨尼 F_2 (0.730) 分别高出尼萨 F_1 (0.674) 与萨尼 F_1 (0.643) 6.8% 和 13.5%; 更高出中度多态的原始亲本尼罗 (0.375) 与萨罗 (0.333) 83.2% 和 119%。高度多态性位点数量在尼萨 F_2 与萨尼 F_2 中有了很大的增加。

表 5 罗非鱼 6 个遗传型群体在 6 个微卫星座位的有效等位基因数 (N_e)、遗传杂合度 (H_e) 和多态信息含量 (PIC)
Tab.5 Effective numbers of alleles (N_e), genetic heterozygosity (H_e) and polymorphism information content (PIC) of six microsatellite locus in 6 genotypes of tilapia

座位 / 基因 Locus / alleles	遗传指数 Genetic indices	萨罗 <i>S.melanotheron</i>	萨尼 F_1 <i>S. melanotheron</i> × <i>O.niloticus</i> (F_1)	萨尼 F_2 <i>S. melanotheron</i> × <i>O.niloticus</i> (F_2)	尼罗 <i>O. niloticus</i>	尼萨 F_1 <i>O.niloticus</i> × <i>S.melanotheron</i> (F_1)	尼萨 F_2 <i>O. niloticus</i> × <i>S. melanotheron</i> (F_2)
PRL1	N_e	3.050	5.045	2.587	3.140	4.685	4.295
	H_e	0.533	0.785	0.812	0.681	0.786	0.767
	PIC	0.510	0.753	0.780	0.302	0.752	0.509
PRL2	N_e	1.658	4.025	4.670	2.480	4.179	4.920
	H_e	0.397	0.752	0.786	0.577	0.761	0.797
	PIC	0.318	0.709	0.751	0.541	0.721	0.764
PRL3	N_e	1.895	1.935	3.607	1.890	3.560	2.630
	H_e	0.343	0.483	0.723	0.472	0.719	0.619
	PIC	0.395	0.434	0.672	0.360	0.668	0.645
ISP	N_e	1.980	2.870	3.720	1.860	2.750	3.98
	H_e	0.496	0.652	0.732	0.463	0.636	0.749
	PIC	0.373	0.577	0.682	0.356	0.563	0.722
Os-7	N_e	1.000	3.780	3.840	1.660	3.660	3.69
	H_e	1.000	0.735	0.739	0.397	0.734	0.729
	PIC	0.000	0.687	0.692	0.318	0.686	0.681
Os-7R	N_e	1.780	3.920	5.780	3.575	3.495	5.762
	H_e	0.450	0.745	0.827	0.720	0.714	0.826
	PIC	0.403	0.698	0.803	0.67	0.651	0.802
平均值 Mean							
	N_e	1.920	3.530	4.030	2.210	3.790	4.210
	H_e	0.537	0.692	0.770	0.485	0.725	0.748
	PIC	0.333	0.643	0.730	0.375	0.674	0.687

2.3.3 遗传距离和遗传相似指数 计算得到 6 个遗传型罗非鱼群体的遗传距离 (D) 和遗传相似指数 (I) 的矩阵 (表 6)。萨尼 (F_2) 与萨尼 (F_1) 关系最近, 尼萨 (F_2) 与尼萨 (F_1) 关系最近, 表明 F_2 对

于 F_1 的遗传在一定程度上是稳定的。而由两个原始亲本与 F_2 的遗传相似度来看, 萨尼 F_2 和尼萨 F_2 更接近于萨罗。

表 6 罗非鱼 6 个遗传型群体的遗传距离和遗传相似系数
Tab.6 Genetic distances and genetic similarities among 6 genotypes of tilapia

	萨罗 <i>S.melanotheron</i>	萨尼 F ₁ <i>S. melanotheron</i> × <i>O.niloticus</i>	萨尼 F ₂ <i>S. melanotheron</i> × <i>O.niloticus</i>	尼罗 <i>O. niloticus</i>	尼萨 F ₁ <i>O. niloticus</i> × <i>S.melanotheron</i>	尼萨 F ₂ <i>O. niloticus</i> × <i>S.melanotheron</i>
萨罗 <i>S.melanotheron</i>	—	0.176	0.265	0.654	0.245	0.198
萨尼 F ₁ <i>S. melanotheron</i> × <i>O.niloticus</i>	0.824	—	0.109	0.523	0.234	0.201
萨尼 F ₂ <i>S. melanotheron</i> × <i>O.niloticus</i>	0.735	0.891	—	0.454	0.217	0.371
尼罗 <i>O. niloticus</i>	0.346	0.477	0.546	—	0.218	0.307
尼萨 F ₁ <i>O. niloticus</i> × <i>S.melanotheron</i>	0.745	0.766	0.783	0.782	—	0.132
尼萨 F ₂ <i>O. niloticus</i> × <i>S. melanotheron</i>	0.802	0.789	0.629	0.693	0.868	—

注: 对角线以上的数字表示遗传距离, 对角线以下的数字表示遗传相似性指数。
Note: Data above diagonal mean genetic distances and below mean genetic similarity.

3 讨论

3.1 耐盐性能的杂种优势

根据杂种优势的显性学说, 杂交可改变后代的基因组合, 提高基因的杂合性。当基因型和环境之间达到一种相互协调的平衡时, 就能提高杂种的生活力、生长速度等重要经济性状。本研究发现, 尼萨 F₂ 和萨尼 F₂ 的耐盐能力较尼罗有了很大提高, 表明杂交后代的基因组中融合了萨罗的基因, 从而改善了子代的耐盐性能。4 个遗传型罗非鱼群体的耐盐能力表现出显著差异, 表明耐盐性能与遗传因素具有紧密相关性。本实验还发现, 尼萨 F₂ 在 6 个微卫星的位点扩增出 27 条条带, 比尼萨 F₁ (26 条) 以及原始亲本尼罗 (19 条) 和萨罗 (19 条) 都要多, 分别遗传了尼萨 F₁ 特征带的 96.3%, 尼罗和萨罗特征条带的 70.4%; 萨尼 F₂ 在 6 个微卫星的位点扩增出 28 条条带, 比其亲本萨尼 F₁ (25 条) 以及原始亲本尼罗 (19 条) 和萨罗 (19 条) 都要多, 分别遗传了萨尼 F₁ 特征带 89.3%, 尼罗和萨罗特征条带的 67.9%。以上表明尼萨 F₂ 和萨尼 F₂ 的基因组 DNA 具有更为丰富的多态性, 基因的杂合性显著增强。

3.2 杂种优势与亲本遗传距离的关系

杂种优势与遗传距离之间的关系问题, 一直是

国内外学者研究的重点。许多研究结果都表明, 杂种优势和遗传距离之间呈显著正相关^[17-18]。本研究的尼罗和萨罗分别属于 2 个不同的属, 亲缘关系较远, 染色体数分别为 2n=44^[19] 和 2n=32^[20]; 二者不能进行自然交配; 且前述微卫星分析也表明二者的遗传距离较远 (0.654)。按上述杂种优势和遗传距离正相关原理, 杂交后代应该具有杂种优势。本研究的耐盐评估实验证明尼萨 F₂ 与萨尼 F₂ 均具较好的耐盐性能。

通过对耐盐性能和微卫星分析的结果所作聚类分析显示, 与原始亲本尼罗相比, 尼萨 F₂ 和萨尼 F₂ 均较为接近于萨罗。表型和基因型的分析结果一致。

3.3 从 F₁ 到 F₂ 遗传多态性的提高现象的初步认识

实验发现, 与 F₁ 相比, F₂ 的遗传多态性增大。与 F₁ 相比, 无论是尼萨 F₂ 还是萨尼 F₂, 基因条带数的表现稳定, 继承率在 90% 左右, 相对原始亲本尼罗和萨罗, 继承率也在 70% 左右, 即大多数基因得以继承; 另一方面, F₂ 又扩增出一定数目的特异条带, 这些特异条带可能是基因重新组合的结果, 这使群体的多态性进一步增强。而这些新增的多态性扩增条带, 既源于双亲的遗传, 又源于杂交后遗

传性状的变异,可以认为是杂种优势得以形成的重要分子生物学基础。

因此在未来的研究中,通过回交,强化其生长性能和耐盐性能,克服性状分离的现象,增强杂交优势,是有待深入的课题。

3.4 F_2 的应用前景

尼罗和萨罗不能自然杂交,人工杂交的难度又很大。考虑到产生杂交 F_1 的数量限制和获得几率小,批量地生产 F_1 的苗种用于养成生产的可能性不大。然而 F_1 却能自繁并扩种,只要能获得少量 F_1 ,就能批量地生产 F_2 用于养成生产。在此, F_2 的经济性状是否能基本符合生产要求是能否生产应用的关键。本研究已证明:① 20~25 是适宜尼萨 F_2 与萨尼 F_2 生长的盐度,两种杂交鱼在这一盐度范围内日均增重率为尼罗罗非鱼 0 盐度时的 75% 左右、萨罗罗非鱼盐度 25 时的 4 倍左右,表明它们的生长速度接近尼罗罗非鱼,远优于萨罗罗非鱼;② 尼萨比萨尼生长速率快 7% 左右;③ 未发现盐度 0、15、20、25 会导致这两种杂交鱼成活率有何显著变化。因此可以初步认为,尼萨 F_2 已具备中试推广的基础。

参考文献:

- [1] FAO Fisheries Department, Fishery Information Data and Statistics Unit. Fishestat Plus: universal software for fishery statistical time series[R]. Version 2.3.2000. Roman, 2002.
- [2] Fitzsimmons K. 2001. Polyculture of tilapia and penaid shrimp[J]. Global Aquac Adv, 2001, 4(3): 43-44.
- [3] 中华人民共和国农业部渔业局. 2005 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2006.
- [4] 李学军, 李思发, 么宗利, 等. 不同盐度下尼罗罗非鱼、萨罗罗非鱼和以色列红罗非鱼幼苗生长、成活率及肥满系数的差异[J]. 中国水产科学, 2005, 12(3): 245-251.
- [5] 颜标, 李思发, 蔡完其. 尼罗罗非鱼与萨罗罗非鱼及其正反杂交后代的微卫星分析[J]. 水产学报, 2007, 31(3): 411-415.
- [6] Watanabe W O, Kuo C M, Huang M C. Salinity resistance of the tilapias *Oreochromis aureus*, *O. niloticus* and an *O. mossambicus* $\times$ *O. niloticus* hybrid[J]. ICLARM Tech Rep, 1985, 16: 12-16.
- [7] Watanabe W O, Kuo C M, Huang M C. Salinity resistance of Nile tilapia fry (*Oreochromis niloticus*), spawned and hatched at various salinities [J]. Aquaculture, 1985, 48: 159-176.
- [8] Tave D. Genetics for Fish Hatchery Managers[M]. 2ed. New York: Van Nostrand, Reinhold. 212-213.
- [9] Ambali A J D, Doyle R W, Cook D I. Genetic changes in *Oreochromis shiranus* (Trewavas) associated with the early stages of national aquaculture development in Malawi [J]. Aquac Res, 1999, 30(8): 579-588.
- [10] Yue G H, Orban L. Microsatellites from genes show polymorphism in two related *Oreochromis* species[J]. Mol Ecol Notes, 2002, 2: 1-2.
- [11] Streelman J T, Kocher T D. Microsatellite variation associated with prolactin expression and growth of salt-challenged tilapia[J]. Physiol Genomics, 2002, 9: 1-4.
- [12] Nei M, Roychoudury A K. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance [J]. Genetics, 1997, 76(2): 379-390.
- [13] 储明星, 程金华, 过纬. 微卫星标记 OarAE101 和 BMI329 在五个绵羊品种中的初步研究 [J]. 遗传学报, 2001, 28(6): 510-517.
- [14] 顾万春. 统计遗传学 [M]. 北京: 科学出版社, 2004: 165-196.
- [15] 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.
- [16] Nei M, Maruyama T, Chakraborty R. The bottleneck effect and genetic variability in population [J]. Evolution, 1975, 29: 1-10.
- [17] 朱庆, 张义正, 刘继霞, 等. 黄羽肉鸡群体遗传变异的微卫星分析及其与体质量杂种优势的关系 [J]. 畜牧与兽医, 2006, 38(3): 8-10.
- [18] 张敬虎, 熊远著, 邓昌彦, 等. 微卫星标记对杂种优势研究杂交猪群的遗传评价 [J]. 农业生物技术学报, 2006, 14(4): 462-467.
- [19] 陈敏容, 陈宏溪. 三种罗非鱼染色体组型的比较研究 [J]. 遗传学报, 1983, 10(1): 56-62.
- [20] Kornfield I L. Descriptive genetics of cichlid fishes[M]. New York: Evolutionary Genetics of Fishes, 1984, 12: 591-616.

Heterosis and related genetic analysis by SSR for the salt tolerance of reciprocal hybrids between Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and blackchin tilapia (*Sarotherodon melanotheron*)

LI Si-fa¹, YAN Biao¹, CAI Wan-qi¹, LI Teng-yun¹, JIA Jin-hua², ZHANG Yan-hong²

(1. The Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecosystem, Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 2000902, China; 2. National Tilapia Seed Farm in Zhongjie, Hebei Cangzhou 061108, China)

Abstract: Part one: By using 4 genotype tilapias [*Oreochromis niloticus* × *Sarotherodon melanotheron* (F_2), *Sarotherodon melanotheron* × *Oreochromis niloticus* (F_2), *Oreochromis niloticus* and *Sarotherodon melanotheron*], a comparative study was conducted for the trait of salt tolerance. The results showed that: (1) The MST, ST_{50} and MLS-96 of above 4 genotypes ranked as: *S. melanotheron* > *S. melanotheron* × *O. niloticus* (F_2) > *O. niloticus* × *S. melanotheron* (F_2) > *O. niloticus*. There is a significant regression relationship between mortality and salinity in all the 4 genotypes ($P < 0.05$). (2) As for the surpass parent heterosis value vs Nile (H_N), both reciprocal hybrids value showed positive but the value vs blackchin (H_S) showed negative. It indicated that the salt tolerance of both hybrids exceed that of Nile, but not the blackchin. (3) As the average heterosis value (H_M), in Nile × blackchin (F_2) all three salt tolerant indices were negative, but in blackchin × Nile (F_2) the MST and ST_{50} were positive, except for MLS-96. It indicated that the salt tolerance of blackchin × Nile (F_2) slightly surpassed Nile × blackchin (F_2). Part two: Through SSR analysis for the above 4 genotypes, and other two genotypes (reciprocal F_1), it was found that: (1) For effective allele number (N_e), average heterozygosity (H_e) and polymorphism information content (PIC), F_1 all increased by 2/3 compared with parents, which was due to the recombination of genes, and F_2 increased by 1/10 compared with F_1 again, which could be related with the genetic differentiation from F_1 to F_2 . (2) The amplified bands by primers Os-64 and Os-75 were only found in Nile, Nile × black (F_1) and (F_2), showing a strong heredity from the female parent Nile; on the other side, the amplified bands by primers Os-25 and IGFs were found in blackchin, blackchin × Nile (F_1) and (F_2), showing a strong heredity from the female parent blackchin; this character could be used as a criterion to identify female origin of hybrids. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (2): 189–197]

Key words: salt tolerance; heterosis; reciprocal hybrids; *Oreochromis niloticus*; *Sarotherodon melanotheron*