

橙色莫桑比克罗非鱼微卫星遗传多样性分析及其与尼罗罗非鱼差异位点的筛选

宋红梅^{1,2}, 白俊杰¹, 叶星¹, 刘宇飞

(1. 中国水产科学研究院 珠江水产研究所, 热带亚热带鱼类选育与养殖重点开放实验室, 广东 广州 510380; 2. 上海水产大学, 上海 200090)

摘要: 用 33 对在尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 中能有效扩增的微卫星引物, 对橙色莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*) 进行 PCR 扩增, 结果有 32 对引物能获得稳定的特异性条带, 占总数的 97.0%, 其中 15 个微卫星位点具多态性, 表明大部分尼罗罗非鱼的微卫星位点存在于橙色莫桑比克罗非鱼中。用具多态性的 15 个微卫星位点, 对橙色莫桑比克罗非鱼 30 尾个体进行扩增分析, 结果共检测到 44 个等位基因, 大小在 113~232 bp 之间, 平均多态信息含量 (PIC) 为 0.430 8, 平均观测杂合度 (H_o) 为 0.548 9, 平均期望杂合度 (H_e) 为 0.524 8, 个体间平均遗传距离为 0.313 2, 表明所选橙色莫桑比克罗非鱼群体遗传多样性较丰富, 种群结构比较合理。本研究还对尼罗罗非鱼和橙色莫桑比克罗非鱼间特异位点进行了分析, 发现有 7 个位点 (UNH899、UNH208、UNH853、UNH876、UNH222、UNH933、UNH773) 可有效区分莫桑比克罗非鱼和尼罗罗非鱼, 可作为罗非鱼种质鉴定的分子标记。[中国水产科学, 2008, 15(3): 400-406]

关键词: 微卫星标记; 橙色莫桑比克罗非鱼; 尼罗罗非鱼; 遗传多样性

中图分类号: Q959.483

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)03-0400-07

莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*) 隶属于鲈形目 (Perciformes), 鲈形亚目 (Labroidei), 丽鱼科 (Cichlidae), 山丽罗非鱼属 (*Oreochromis*)。20 世纪 50 年代中国从越南引进第一批罗非鱼——莫桑比克罗非鱼, 从而开始了罗非鱼的养殖。20 世纪 70 年代台湾学者将其作为母本与尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 进行杂交, 获得了生长比父母本快的福寿鱼^[1-2], 成为当时重要的罗非鱼养殖群体。橙色莫桑比克罗非鱼是莫桑比克罗非鱼的一个突变种, 橙色莫桑比克罗非鱼 (♀) 与尼罗罗非鱼 (♂) 可产生体形近似真鲷 (*Pagrosomus major*)、适应性强、生长迅速、体色鲜艳、抗病力强的杂交一代红罗非鱼^[3-4]; 用橙色莫桑比克罗非鱼 (♀) 和荷那龙罗非鱼 (*O. hornorum* ♂) 杂交, 可获得生长快、高雄性率的杂种一代——莫荷鱼^[5]。莫桑比克罗非鱼主要作为亲本进行杂交罗非鱼的生产, 而亲本的纯度和质量会直接影响杂交后代雄性率^[6]。同时罗非鱼杂交后代大多是可育的, 因而生产中容易出现罗非鱼种质混杂, 部分杂交种体形与亲本又很相似^[2]。对于罗非鱼杂交亲本种质是否已有混杂很

难用传统方法加以检测。目前在中国有关莫桑比克罗非鱼种质结构和用于检测纯度的特异性分子标记的研究还很少见, 本研究采用微卫星标记技术对橙色莫桑比克罗非鱼进行遗传结构分析, 旨在为莫桑比克罗非鱼的遗传资源保护及选择育种提供相关的信息和依据, 为罗非鱼的种质鉴定奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验鱼 橙色莫桑比克罗非鱼 30 尾 (以下简称 M 群), 取自珠江水产研究所高要水产科技园。尼罗罗非鱼 30 尾 (以下简称 N 群), 其中 02 美国尼罗罗非鱼 10 尾, 取自高要水产科技园; 83 淡水中心尼罗罗非鱼 10 尾, 吉福品系尼罗罗非鱼 10 尾, 均取自广东省国家级罗非鱼良种场。

1.1.2 引物与试剂 微卫星引物由上海生物工程技术服务有限公司合成; PCR 反应所用的 *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs 等生化试剂购自上海申能博彩生物工程公司; 电泳过程中所用的 SSR DNA Marker II 购自北京鼎国生物公司; PCR 仪为 MWG-BIO-

收稿日期: 2007-07-25; 修订日期: 2007-09-14.

基金项目: 国家科技支撑计划 (2006BAD01A1209); 国家科技基础条件平台工作项目 (2005DKA21103); 农业部“948”项目 (2006-G55).

作者简介: 宋红梅, 女, 在读硕士. E-mail: shm1227@126.com

通讯作者: 白俊杰. Tel: 020-81616129; E-mail: baiji2005@21cn.com

TECH 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; 成像仪为 Alpha image (uv5254-220k) 型凝胶成像系统。

1.2 方法

1.2.1 罗非鱼基因组 DNA 的制备 注射器尾静脉取血, 血液和 ACD 抗凝剂体积比为 1:6, 参考《分子克隆实验指南》^[6]。按照天为试剂盒全血基因组 DNA 的提取方法, 从新鲜血液中提取基因组

DNA, 用 ddH₂O 溶解, 用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性和纯度, 并用分光光度计测量浓度, 4 °C 冰箱保存备用。

1.2.2 微卫星引物序列 按照参考文献 [8] 及美国汉普郡大学 Hubbard 基因研究中心网站 (<http://hcg.unh.edu/>) 数据, 选取尼罗罗非鱼微卫星位点共 40 个, 引物送上海生物工程技术服务有限公司合成, 引物序列和扩增参数详见表 1。

表 1 微卫星分子标记及扩增参数
Tab.1 Characterization of tilapia microsatellites

引物 Primer	引物序列 (5'-3') Primer sequence	退火温度 / °C T_m	Mg ²⁺ 浓度 (mmol·L ⁻¹) Con. of Mg ²⁺
UNH971	F: GGTGGGCAGTGTGTGTTTTT R: TTTTCATCCAGGCTCAGTT	57	0.8
UNH931	F: ACGTTGGTTTGTGCGGTAAG R: TAAGTCAGTGCACAGACG	50	0.8
UNH911	F: AAGAGGAGAGCACGGAACA R: GTCACAAACCACAGCCAAGA	53	0.8
UNH927	F: GGTGGGCAGTGTGTGTTTTT R: TTTTCATCCAGGCTCAGTT	53	0.8
UNH968	F: ACTGCTCCTCTGTGTCTGG R: TCTTGCTGCTTCTCTCCACA	55	0.8
UNH899 [#]	F: ACGTCACATGGAGGTGCTTA R: GCTAGACCTCTGTCCCCTGA	58	0.8
UNH178	F: GTCACACCTCCATCATC R: AGTTGTTTGGTCGTGTAAG	55	0.8
UNH932	F: AGCGCTAAATGAGCCAGTGT R: TTCTTAAATGCCTGCCAGTG	53	0.8
UNH990	F: GCCACAGGTGACCATGTTAG R: GGTGTCTGATTGCACTGACG	58	0.8
UNH874	F: AGTAAATGGGCGAACGTGT R: TGAAGCTGGGAGTTTCCTGT	59	0.8
UNH123*	F: GATTGAGATTTCATTCAAG R: GATTGAGATTTCATTCAAG	55	0.8
UNH954	F: GGAAAACGTTTGGAGAGACG R: AAACGGAGCTCCTGTCTGAA	55	0.8
UNH989	F: CCACCTCATACACGCAAATG R: CAGCAGCAGCTGTCCACTAA	55	0.8
UNH880	F: GGCAGCAGTATAACAATCACCA R: TTCTGACATCCATCCAGCAG	55	0.8
UNH1003*	F: CAGTGTTAAGTGGCTTCACCA R: AGCAAGGAACCTCGAGAGCTG	55	0.8
UNH211	F: CAAGGAAAACAATGGTGATA R: CTTCCTGGCCTACAATT	55	0.8
UNH208 [#]	F: CTCTTGGCCTACAATT R: CAGATGGGTGATAGCAA	55	1.0
UNH856	F: CAGCCTCACACATCTCAG R: GATGCATCATCACGTAACCT	58	0.8
UNH919	F: TGACAGCCTGGCATAATGAG R: CACTGAGACTGGAAGGCACA	57	0.8
UNH106	F: CCTTCAGCATCCGTATAT R: GTCTCTTCTCTCTGTGACAAG	58	1.0
UNH132	F: ATATAAGAACTGAGTCGGTGAG R: TGGAAATAGAGGGTGGGTGAG	56	0.8
UNH190	F: CGCGATCGAGCATTCTAA R: TGTCTGCACGCGCTTTGT	53	0.8
UNH214	F: TTCCATAATTGCTTTCTG R: GCACGTTTCCATCACTTCAA	57	0.8
UNH222 [#]	F: CTCTAGCACACGTGCAT R: TAACAGGTGGGAACCTCA	58	0.8
UNH773 [#]	F: TGGCGGTAAAAATGAAAATGG R: CGATCCCAGACTTGACACA	52	0.8
UNH853 [#]	F: TAAAGCTCGTCCCCGTAACA R: TCGCTCTCACTGTCTGC	55	0.8
UNH855	F: ATCCCGCTGTTGCTGTTAG R: GAGGGGAGCCTACAACGTAA	55	0.8
UNH876 [#]	F: TCCAAAGCAGAAAAATGTGAGG R: TTTCTCCTCTGGCCCCCTTAT	52	0.8
UNH878*	F: TTTCAGGAGGACGAGCAGTT R: CAGGCGGCAGATATTCATT	55	0.8
UNH901	F: CATCAGGGCTTTCTGTACTGC R: TTTGATGGAAGCAAGGCTCT	55	0.8
UNH906	F: AACATGCTTTCAGCCTTCGT R: TGAGCAAATCCCGTCCATA	51	0.8
UNH916	F: TCCAACTTATTCCTGGACA R: ATGGCTGAGTTTGACAGACAG	52	0.8
UNH933 [#]	F: GGGGTGAGGTGTTACAGAT R: GGGGCCTTAGTTTCACTTCA	57	0.8
UNH958*	F: TGCTTGTCTGACAGGAAAA R: TTCCAGCGAGTCACACATTC	55	0.8
UNH980	F: GAAGATATGCATGCGGACAC R: CACTCCCATTTCTGTGTTG	55	1
UNH986*	F: AAATCGAGGTACCGCACACT R: TTTCTCAAAGGTCCCAATT	55	1
UNH988	F: TCTGTGTGCTTGTCTTGCT R: CAGGGGTTTGCAGACAGAAC	55	0.8
UNH997	F: ATTCCCCAACATTTGTGTGC R: ACAGCAGCATCCCTGAAAAG	59	1
UNH999 [#]	F: TGCAAAGTCACAAATCCACAA R: CTCCCATTCATTACCCAAA	55	1
UNH1004 [#]	F: CATCTGAGTCACGCAGGTTT R: GCTGAGGTGAGTGTGATGGA	55	1

注: “*”表示没能扩增出结果, “#”表示能鉴别出橙色莫桑比克罗非鱼, “—”表示多态。

Note: “*” means no result, “#” means identification, “—” means polymorphism.

1.2.3 PCR反应程序 PCR反应总体积为20 μL , 含有10 $\times$ Buffer 2.0 μL , MgCl_2 (25 mmol/L) 0.8~1.0 μL , dNTPs (10 mmol/L) 0.3 μL , 上、下游引物 (20 pmol/L) 各 0.5 μL , *Taq* 酶 1 u, 模板 DNA 60 ng 左右。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min 后进入循环体系 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 各引物退火温度 45~60 $^{\circ}\text{C}$, 退火时间 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 25 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。

1.2.4 电泳与银染 电泳: PCR 扩增产物在 80 mg/mL (8%) 的非变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳检测, 电泳缓冲液为 0.5 $\times$ TBE, 电压 250 V, 电泳 2 h。产物上样量均为 4 μL (样品与 buffer 按体积比 3:1 混合), DNA Marker 上样量为 0.5 μL 。

银染: 电泳后进行硝酸银染色, 染色方法参考文献 [9] 略加改进, 将凝胶放入盛有蒸馏水的塑料容器中轻轻漂洗 5 s, 倒掉蒸馏水; 加入 10 mg/mL AgNO_3 溶液, 静置 2.5 min, 倒掉 AgNO_3 溶液; 用少许蒸馏水漂洗两次, 每次不超过 10 s, 倒掉蒸馏水; 快速加入少许配好的显色液 (NaOH 12 g, Na_2CO_3 0.5 g, HCHO 3 mL, 加蒸馏水定容至 500 mL) 约 50 mL 漂洗两次, 振荡时间不超过 5 s, 倒掉漂洗液; 加入一定量的显色液 (须没过胶面), 显色 3~5 min。待带型清晰时, 立即将胶取出, 将胶拖出放于 Alpha image 凝胶成像系统拍照, 然后将其做成干胶, 长久保存。

1.2.5 微卫星位点初步筛选 随机选取尼罗罗非鱼 10 尾、橙色莫桑比克罗非鱼 10 尾, 进行退火温度 (50~59 $^{\circ}\text{C}$) 及 MgCl_2 (25 mmol/L、0.8~1.0 μL) 的调节, 优化 PCR 扩增条件, 挑选能稳定扩增, 且在橙色莫桑比克罗非鱼上有多态性的微卫星位点进行群体遗传多样性分析。

1.2.6 微卫星鉴别位点的筛选 用初步筛选的能稳定扩增的引物, 分别对 02 美国尼罗罗非鱼 10 尾, 吉福品系尼罗罗非鱼 10 尾, 83 淡水中心尼罗罗非鱼 10 尾以及橙色莫桑比克罗非鱼 30 尾进行扩增, 筛选能鉴别尼罗罗非鱼和橙色莫桑比克的微卫星位点。

1.2.7 数据统计与分析 用 Alpha Ease FC 软件分析微卫星条带大小。根据电泳图上 DNA 泳动距离判断个体的基因型, 就个体而言, 如果电泳条带表现为一条, 则所检测的样本在该基因座为纯合; 如果为两条带则此样本在该座位为杂合。不同个体间, 如果泳动距离一致, 则为单态, 若电泳条带泳动距离不一致, 则有多态性。

统计每个微卫星位点的等位基因数, 用 Popgene (Version 3.2) 进行数据处理, 计算以下参数:

等位基因频率 (allele frequency, P), 即一个群体中某一基因占其等位基因的相对比率;

观测杂合度 (Observing value of heterozygosity, H_o), 即实际观测到的杂合子数占观测个体总数的比例;

期望杂合度 (Expected value of heterozygosity, H_e):

$$H_e = 1 - \sum p_i^2$$

参照 Botstein 等 [12] 的方法计算多态信息含量 (Polymorphism Information Content, PIC)

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

式中 P_i 、 P_j 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。

2 结果与分析

2.1 橙色莫桑比克罗非鱼微卫星位点筛选及PCR扩增结果

用 40 对微卫星引物, 对橙色莫桑比克罗非鱼和尼罗罗非鱼各 10 尾个体的基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 结果有 33 对引物在尼罗罗非鱼中能够获得稳定有效的扩增条带, 占总数的 82.5%。在这 33 对引物中有 32 对引物在橙色莫桑比克罗非鱼上也可获得清晰稳定的条带, 占有效引物总数的 97%, 其中有 17 个位点呈单态, 15 个位点呈多态, 部分结果见图 1。

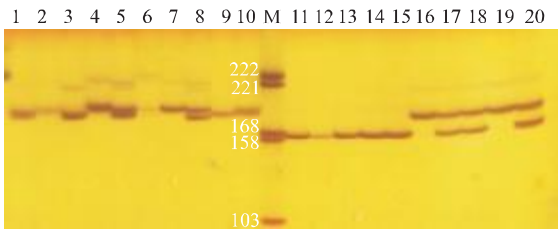


图1 微卫星引物 UNH968 的筛选结果
1~10: 尼罗罗非鱼; 11~20: 橙色莫桑比克罗非鱼; Marker 为北京鼎国 ssr marker II.

Fig.1 UNH968 amplified in *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) and *Oreochromis mossambicus*
1 10; *Oreochromis niloticus* (Linnaeus); 11 20; *Oreochromis mossambicus*; M stands for ssr marker II of Dingguo company.

2.2 各微卫星位点的等位基因、多态信息含量和基因杂合度

表2中列出了橙色莫桑比克罗非鱼群体在各个微卫星位点的等位基因数目。15个多态性位点共找到等位基因44个,平均每个位点等位基因为2.93个,最多为4个(UNH855),最少为2个

(UNH927等),等位基因大小在113~232 bp之间。15个微卫星位点的平均多态信息含量为0.4308,平均观测杂合度为0.5489,平均期望杂合度为0.5248,这表明15个微卫星位点在莫桑比克罗非鱼群体中具有较高的多态性。

2.3 橙色莫桑比克罗非鱼各样品间的遗传距离

根据15个具多态性微卫星位点的扩增结果,橙色莫桑比克罗非鱼个体间平均遗传相似系数为0.6868(0.3192~0.9147);平均遗传距离为0.3132(0.0665~0.9416),说明橙色莫桑比克罗非鱼群体的近交程度不高。

2.4 橙色莫桑比克罗非鱼与尼罗罗非鱼群体鉴别位点的筛选

用32对有效扩增的引物,对尼罗罗非鱼和橙色莫桑比克罗非鱼各30尾个体进行扩增筛选,其中UNH899、UNH208等6个在橙色莫桑比克罗非鱼中表现为纯合的基因座以及对尼罗罗非鱼特异扩增的位点UNH773,其在两种鱼中等位基因大小也不同,可将橙色莫桑比克罗非鱼与尼罗罗非鱼区别开(表3),部分结果见图2。

表2 橙色莫桑比克罗非鱼微卫星分析统计结果								
Tab.2 Summary of statistics for <i>Oreochromis mossambicus</i> population with microsatellite analysis								
位点 Locus	等位基因数 Nos.of alleles	等位基因大小范围 Size range of alleles/bp	观测及期望杂合度 $H_o(H_e)$	多态信息含量 PIC	等位基因频率 Allele frequency			
					A	B	C	D
UNH990	3	147-160	0.5667(0.5181)	0.4619	0.6500	0.2333	0.1167	
UNH880	2	138-147	0.6667(0.4994)	0.3705	0.5667	0.4333		
UNH980	3	192-271	0.6667(0.5966)	0.5134	0.1333	0.5333	0.3333	
UNH855	4	149-158	0.5333(0.6565)	0.6237	0.5167	0.1833	0.2167	0.0833
UNH214	2	182-200	0.5000(0.4627)	0.3514	0.6500	0.3500		
UNH932	3	120-134	0.6000(0.6051)	0.5329	0.2500	0.5500	0.2000	
UNH874	2	210-212	0.5333(0.4723)	0.3566	0.3667	0.6333		
UNH954	3	129-167	0.7667(0.6605)	0.5935	0.4167	0.3500	0.2333	
UNH927	2	210-232	0.4333(0.4401)	0.3391	0.6833	0.3167	0.0500	
UNH968	2	167-185	0.4000(0.4881)	0.3648	0.4000	0.6000	0.1000	
UNH971	2	207-228	0.4333(0.4401)	0.3391	0.6833	0.3167		
UNH106	2	113-138	0.7333(0.4994)	0.3705	0.5667	0.4333		
UNH211	3	116-160	0.4000(0.5384)	0.4334	0.3833	0.5667		
UNH989	3	149-167	0.4000(0.5672)	0.4799	0.3333	0.5667		
UNH208	2	119-134	0.6000(0.4271)	0.3318	0.3000	0.7000		
平均值 Mean	2.53		0.5489(0.5248)	0.4308				

表 3 可用于橙色莫桑比克罗非鱼与尼罗罗非鱼种质鉴定的微卫星位点及其等位基因大小
Tab.3 Microsatellite loci for identification of *O.mossambicus* and *O.niloticus* and their allele size

位点 Locus	等位基因大小 /bp Length of allele								
	橙色莫桑比克罗非鱼 <i>O. mossambicus</i>				尼罗罗非鱼 <i>O. niloticus</i>				
UNH899	201	182	180	176	170	166	158		
UNH208	119	108	105	98					
UNH853	207	195	183	179	175	171	168	160	156
UNH876	159	245	217	204	201	199	193	185	164
UNH222	178	218	210	206	201	193			
UNH 999	88	137	127	124	118	115	110	105	
UNH 773 *	0	257	233	227	216				

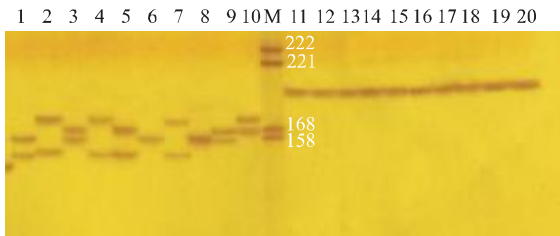


图 2 微卫星引物 UNH899 鉴定的检测结果
1~10 为尼罗罗非鱼; 11~12 为橙色莫桑比克罗非鱼; Marker 为北京鼎国 ssr marker II.
Fig.2 UNH899 amplified in *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) and *Oreochromis mossambicus*
1~10 *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) ; 11~20 *Oreochromis mossambicus*; M is ssr marker II in Dingguo Company.

3 讨论

3.1 尼罗罗非鱼微卫星引物在橙色莫桑比克罗非鱼中的适用性

由于物种之间的 DNA 序列具有同源性,微卫星座位两侧的侧翼序列在相近物种间具有很高的保守性,一个物种产生的引物可应用于相近物种成为微卫星的一个潜在价值^[10-11],通过已知相近物种的微卫星位点来寻找试验物种的微卫星位点是可行的。马洪雨等^[10]利用 27 对鲤微卫星引物研究了山东麦穗鱼的遗传多样性,结果有 19 对引物能获得稳定的特异条带,其中 6 个位点具有多态性。本研究中,筛选得到尼罗罗非鱼的微卫星引物 33 对,其中能在橙色莫桑比克罗非鱼中稳定扩增出条带的引物有 32 对,占总数的 97%,可见尼罗罗非鱼微卫星引物在橙色莫桑比克罗非鱼中具有很好的适用性,现已开发的尼罗罗非鱼 SSR 引物已有 500

多对,可用于橙色莫桑比克罗非鱼的种质资源研究和分子标记辅助育种。

3.2 橙色莫桑比克罗非鱼群体的遗传多样性

本研究中,橙色莫桑比克罗非鱼群体 15 个多态性微卫星位点的平均等位基因为 2.53 (2~4) 个,比尼罗罗非鱼平均等位基因数 6.4 (3~12) 要低。这可能是由于微卫星侧翼序列保守,但其中间重复序列在种间已发生变化,且趋于稳定;另外尼罗罗非鱼引进的群体与次数也较多,奠基群体的数量较大,基因型相对较多。

根据等位基因数得出的多态信息含量 (PIC) 是衡量片段多态性的较好指标,能反映出某个遗传标记所含的遗传信息容量。Botstein 等^[12] (1980) 认为:当 $PIC > 0.5$ 时,该位点为高度多态位点,当 $0.25 < PIC < 0.5$ 时,该位点为中度多态位点;当 $PIC < 0.25$ 时,该位点为低度多态位点。本研究选用的 33 个微卫星位点中,橙色莫桑比克群体在 15 个具多态性位点上的平均 PIC 值为 0.430 8 (0.331 8~0.623 7),多态位点数占总位点数的 45.5%。由表 2 可知,其中有 4 个位点 (UNH980、UNH954、UNH932、UNH855) 属于高度多态位点,其余 11 个位点属于中度多态位点。可见,15 个位点在橙色莫桑比克罗非鱼中 PIC 整体水平较高,遗传多样性丰富。

另外,遗传杂合度 (H),又称基因多样性,是指所检测微卫星位点上杂合子基因型占该位点所有基因型的比例,能反映群体在各个位点的遗传变异水平,一般认为它是度量群体遗传变异的一个最适参数^[13],其大小可反应群体遗传变异的高低。杂合度越高的群体对环境变化的适应能力就越大,其进化及选育的潜力也就愈大,也就更有利于物种的

稳定和延续^[14-15]。本研究中,橙色莫桑比克罗非鱼的平均观测杂合度为 0.548 9,平均期望杂合度为 0.524 8,均高于 Dewoody 和 Avise^[16] 基于 13 种淡水鱼类统计得出的平均杂合度 (0.460 0)。综上所述,本实验所用橙色莫桑比克罗非鱼的遗传变异水平较高,遗传结构合理,有潜力进行进一步的选育。

3.3 橙色莫桑比克罗非鱼和尼罗罗非鱼的鉴别

本实验还对橙色莫桑比克罗非鱼和尼罗罗非鱼的特异位点进行了分析,发现有 7 个微卫星位点 (UNH899、UNH208、UNH853、UNH876、UNH222、UNH933、UNH773) 在橙色莫桑比克罗非鱼和尼罗罗非鱼上的扩增条带大小明显不同 (表 3),且只在橙色莫桑比克罗非鱼中呈单态,可作为橙色莫桑比克罗非鱼与尼罗罗非鱼的鉴别位点。目前,对于罗非鱼良种的种质混杂,以及杂交种的亲本是否种质已有混杂都很难用传统的方法加以检测,亟待弄清这些原良种的遗传结构和背景,建立一套新的能准确鉴定原良种的分子标记鉴定体系。本研究筛选的几个品种间出现明显差异的微卫星位点,可作为种质鉴定的基础标记,更多的鉴别位点有待进一步的实验筛选。

致谢: 广东省国家级罗非鱼良种场叶卫研究员提供部分尼罗罗非鱼材料,特此致谢。

参考文献:

- [1] 梁幼嫦,戴佛生. 福寿鱼、尼罗罗非鱼、莫桑比克罗非鱼的生长对比试验 [J]. 珠江水产研究所论文报道选辑 [C], 1983: 16-23.
- [2] 唐国盘,曾春芳,齐子鑫,等. 福寿鱼的生物学特性及养殖前景 [J]. 水利渔业. 2006, 26(6): 70-71, 81.
- [3] 李家乐,李思发,韩风进. 台湾红罗非鱼和尼罗罗非鱼的生长特性与养殖效果的比较 [J]. 上海水产大学学报, 2002, 11(1): 1-5.
- [4] 李学军,李思发,等. 同盐度下尼罗罗非鱼、萨罗罗非鱼和以色列红罗非鱼幼鱼生长、成活率及肥满系数的差异 [J]. 中国水产科学, 2005, 12(3): 245-251.
- [5] 杨淞,叶星,卢迈新,等. 橙色莫桑比克罗非鱼和荷那龙罗非鱼 AFLP 分析 [J]. 中国海洋大学学报, 2006, 36(6): 937-940.
- [6] 谢忠明. 淡水良种鱼类增殖技术 [M]. 北京: 农业出版社, 1995: 265-269.
- [7] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南: 第 3 版 [M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [8] Carleton K L, Streelman J T, Lee B Y, et al. Rapid isolation of CA microsatellites from the tilapia genome [J]. Int Soc Anim Genet, Anim Genet, 2002, 33: 140-144.
- [9] 霍金龙,曾嵘,潘伟荣,等. 微卫星 PCR 聚丙烯酰胺凝胶银染法影响因素的分析研究 [J]. 云南农业大学学报, 2005, 20(1): 67-71.
- [10] 马洪雨,郭金峰,岳永生. 东平湖麦穗鱼群体遗传结构的微卫星标记分析 [J]. 生命科学研究, 2006, 10(1): 67-70.
- [11] 李明芳,郑学勤. 开发 SSR 引物方法之研究动态 [J]. 遗传, 2004, 26(5): 769-776.
- [12] Nei M, Maruyama T, Chakraborty R. The bottleneck effect and genetic variability in populations [J]. Evolution, 1975, 29: 1-10.
- [13] 李莉,孙振兴,杨树德,等. 用微卫星标记分析皱纹盘鲍群体的遗传变异 [J]. 遗传, 2006, 28(12): 1549-1554.
- [14] Beardmore J A, Mair G C, Lewis R I. Biodiversity in aquatic systems in relation to aquaculture [J]. Aqu Res, 1997, 28: 829-839.
- [15] Xu Z, Primavera J P, Pena L D, et al. Genetic diversity of wild and cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites [J]. Aquaculture, 2001, 199: 13-40.
- [16] Dewoody J A, Avise J C. Microsatellite variation in macine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals [J]. J Fish Biol, 2000, 56: 461-473.

Genetic diversity analysis of red *Oreochromis mossambicus* with microsatellites and selection of differential loci between red *O. mossambicus* and *O. niloticus*

SONG Hong-mei^{1,2}, BAI Jun-jie¹, YE Xing¹, LIU Yu-fei

(1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fish Breeding & Cultivation, Guangzhou 510380, China; 2. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: The genetic diversity of red *Oreochromis mossambicus* was evaluated by 15 polymorphic microsatellite loci. These loci were screened from 33 microsatellites which were isolated from *O. niloticus* and produced stable and specific bands in *O. niloticus*, while 32 of 33 (97%) successfully amplified in red *O. mossambicus*. It suggested that most microsatellite loci of *O. niloticus* existed in *O. mossambicus*. Totally 44 alleles were detected in the 15 polymorphic microsatellite loci, with length ranging from 113 bp to 232 bp. The average polymorphism information content (PIC), average observed heterozygosity (H_o), average expected heterozygosity (H_e) and average genetic distance (D_s) among 30 individuals were 0.430 8, 0.548 9, 0.524 8, and 0.313 2 respectively. These results indicated that red *O. mossambicus* bears a high genetic diversity and a reasonable population structure. In addition, special microsatellite loci between *O. niloticus* and the red *Oreochromis mossambicus* were analyzed in this study. Seven loci (UNH899, UNH208, UNH853, UNH876, UNH222, UNH933, UNH773) that can identify *O. mossambicus* and *O. niloticus* were detected. These 7 loci would be used as molecular markers for germplasm identification of tilapia. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (3): 400–406]

Key words: microsatellite; *Oreochromis mossambicus*; *O. niloticus*; genetic diversity

Corresponding author: BAI Jun-jie. Tel: 020-81616129; E-mail: baijj2005@21cn.com

会 讯

“2008 年中国水产学会学术年会”将于 2008 年 11 月下旬在云南省昆明市召开, 本届年会主题为“促进科技创新, 发展现代渔业”, 专题包括: “1. 水产健康养殖与疫病防控; 2. 水产种质资源保护与良种选育; 3. 水产动物营养与饲料; 4. 水产品加工与质量监控; 5. 渔业资源环境、经济与管理; 6. 渔业装备、工程与制冷技术”。

详情请关注中国水产学会网站 (www.csfish.org.cn)。联系人: 李振兴, 电话: 010-64194233, 传真: 010-64194231。通讯地址: 北京市朝阳区麦子店街 22 号; 邮政编码: 100026; E-mail: csfish@agri.gov.cn。