

罗非鱼杂交 F_1 代与亲本的遗传关系 及其杂种优势的利用*

夏德全 曹 莹 杨 弘 吴婷婷

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 无锡 214081)

摘 要 用 RAPD 技术研究奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼杂交子代和亲本的遗传关系及其在杂种优势中的应用。在所用的 16 个随机引物中, 有 11 个引物在罗非鱼亲代和杂交子代间呈现多态。遗传相似性指数和遗传距离的计算结果表明, 正交子代(尼罗罗非鱼♀×奥利亚罗非鱼♂)在遗传关系上界于亲代之间, 不表现出明显的倾向性; 而反交子代(奥利亚罗非鱼♀×尼罗罗非鱼♂)却与母本奥利亚罗非鱼极其相似。说明正、反交子代与两亲本遗传相似性有明显的不同, 表明遗传性状介于两亲本之间的杂交子代更有可能形成显著的杂种优势。同时发现, 扩增片段 OPA07₁₉₀₀、OPA07₉₆₀、OPZ14₇₂₀ 和 OPZ14₆₀₀ 可以作为鉴别尼罗罗非鱼、奥利亚罗非鱼和正交子代的遗传标记。

关键词 罗非鱼, 杂交子代, 遗传关系, 杂种优势, RAPD

奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼是我国重要的养殖鱼类。选育新的优良品种是罗非鱼养殖业高产增效的途径之一。罗非鱼在自然条件下极易杂交, 而且外形不易区分, 造成种的混杂, 区别纯种和杂交种在生产有着重要意义, 因而有必要建立分子遗传标记, 以便于对罗非鱼及杂交后代进行鉴别, 确保罗非鱼养殖业的健康发展。

1 材料和方法

1.1 实验鱼

亲本尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼均来自本所试验场。1997 年 6 月, 以尼罗罗非鱼作为母本, 奥利亚罗非鱼作为父本进行自然杂交获得奥(奥利亚罗非鱼)尼(尼罗罗非鱼)杂交鱼, 称正交 F_1 代; 同时以奥利亚罗非鱼作为母本, 尼罗罗非鱼作为父本进行自然杂交, 获得杂交鱼, 称反交 F_1 代。在杂交子代生长 6 个月后, 分别取亲本、正交子代和反交子代各

4 尾, 运用 RAPD 技术进行分析。实验用亲本鱼体长 13~16 cm, 体重 200~300 g; 杂交鱼体长 7~10 cm, 体重 60~100 g。

1.2 实验方法

1.2.1 试剂和仪器 随机引物购自上海 Sangon 生物工程公司, 各引物序列见表 1; Taq DNA 聚合酶、dNTP 等是华美生物工程公司产品。PCR 仪系美国 PE 公司的 PE-480。

表 1 研究所用的随机引物及其序列

Table 1 Random primers used in the study and their sequences

引物 primer	序列(5'→3') sequence	引物 primer	序列(5'→3') sequence
OPA04	AATCGGGCTG	OPZ08	GGGTGGGTAA
OPA07	GAAACGGGTG	OPZ09	CACCCAGTC
OPP02	TCGGCACGCA	OPZ10	CCGACAAACC
OPP05	CCCCGGTAAC	OPZ12	TCAACGGGAC
OPY02	CATCGCCGCA	OPZ14	TCGGAGGTTC
OPY15	AGTCGCCCTT	OPZ17	CCTTCCCACT
OPZ03	CGACACGCA	OPZ19	GTGCGAGCAA
OPZ06	GTGCCGTTCA	OPZ20	ACTTTGGCGG

收稿日期: 1998-06-18

* 本研究得到国家自然科学基金(No. 39670583)和农业部科学基金(渔 95-生-96-04)资助

1.2.2 罗非鱼核 DNA 制备 从每尾罗非鱼的尾静脉中取血液制备核 DNA, 在血中加 1/6 体积的酸性柠檬酸葡萄糖溶液(ACD)作抗凝剂。

将 30 μL 全血加入 470 μL SET 缓冲液(150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris·HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)中, 混匀后依次加入 SDS 和蛋白酶 K 分别至终浓度 0.5% 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。轻轻混匀后置于 55℃ 水浴中过夜, 而后将混合物用等体积的酚、酚/氯仿/异戊醇(25/24/1)以及氯仿/异戊醇(24/1)各抽提 1 次。弃有机相, 向水相中加入 2 倍体积预冷的无水乙醇沉淀 DNA。将所得沉淀清洗、干燥, 溶于 150 μL TE 缓冲液(10 mmol/L Tris·HCl, pH 7.4, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)中。用紫外分光光度计测量 DNA 样品的浓度和纯度, 再稀释至 10 ng/ μL 。置于 4℃ 保存备用。

1.2.3 RAPD 反应 扩增反应在 25 μL 体积中进行, 其中含有 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris·HCl, 2.0 mmol/L MgCl_2 , 0.1% Triton-X-100, dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 0.2 mmol/L, 15 ng 引物, 20 ng 核 DNA, 1.2 单位 Taq DNA 聚合酶。反应液覆以 25 μL 液体石蜡油。反应条件是: 将加入模板的反应混合物在 94℃ 下预变性 4 min, 然后加入 Taq 酶, 进行循环扩增。循环程序为 94℃ 变性 1 min, 36℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 经过 45 个循环之后, 再于 72℃ 延伸 10 min。扩增产物在含 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EB 的 1.4% 琼脂糖凝胶中电泳。在紫外灯下观察并照相记录结果。

1.3 分析方法

据 RAPD 产物的电泳带型, 进行群体内和群体间的比较分析。在相同的迁移率上, 出现的带记为 1, 未出现的带记为 0, 按公式 $S_{xy} = 2n_{xy}/(n_x + n_y)$ 计算个体间遗传相似性指数, 式中 n_{xy} 是个体 x 和 y 的共有带数, n_x 、 n_y 分别是个体 x 和 y 的扩增带数^[1]。

群体内的相似性指数(S)是群体内所有的 2 个个体间相似指数的平均值。群体间的遗传相似性指数(S_{ij})为群体 i 中的个体和群体 j 中的个体随机组合所得相似指数的平均值。用公式 $D_{ij} = -\ln(S_{ij}/\sqrt{S_i S_j})$ 可将群体间的相似性指数转换成群体间的遗传距离^[5]。统计时仅记录清晰稳定的扩增带。

2 结果

所用的 16 个随机引物均得到了扩增产物, 5 个

引物的扩增产物不呈现多态现象, 其它 11 个引物 OPA07、OPP02、OPP05、OPY02、OPY15、OPZ03、OPZ06、OPZ12、OPZ14、OPZ17 和 OPZ19 在所检测的样品间产生了多态现象。根据 11 个引物的扩增结果, 计算出 2 种罗非鱼及其子代的遗传相似性指数和遗传距离(表 2)。

表 2 奥利亚罗非鱼(A)和尼罗罗非鱼(N)亲本及其正交(F_E)、反交子代(F_R)之间的遗传相似性指数和遗传距离

Table 2 Genetic similarity indices and genetic distances between blue tilapia, Nile tilapia, and their F_1 hybrid

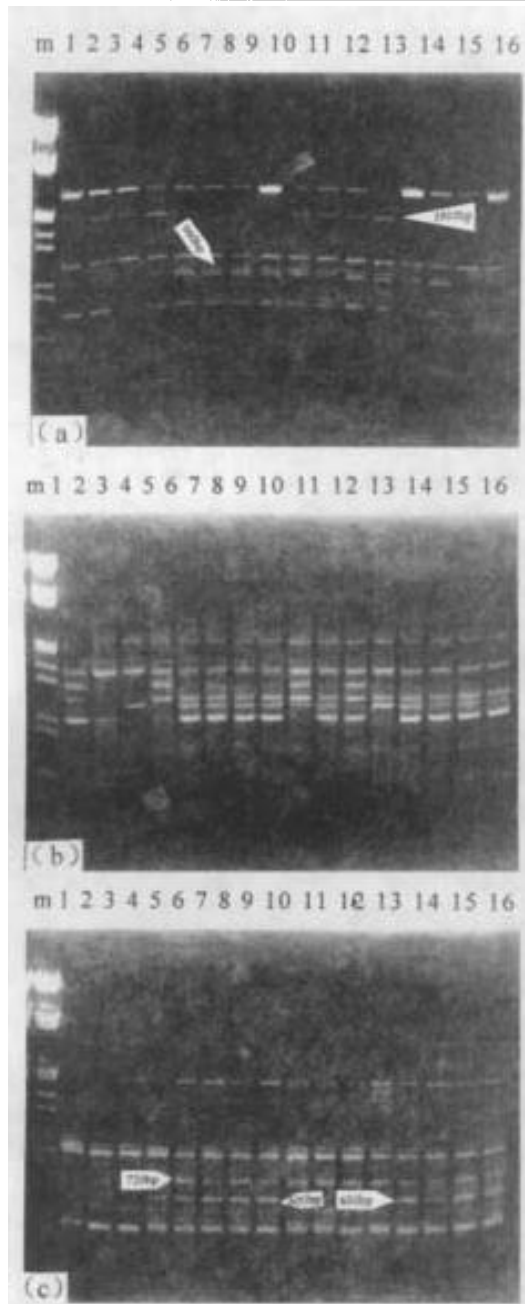
	N	A	F_R	F_E
N	0.872	0.771	0.851	0.780
A	0.173	0.963	0.880	0.958
F_E	0.064	0.080	0.944	0.868
F_R	0.160	0.004	0.093	0.961

注: 数字矩阵中对角线上的数字表示群体内遗传相似性指数, 对角线以上的数字表示群体间的相似性指数, 对角线以下的数字表示群体间的遗传距离。Data on the diagonal represent genetic similarity indices within population; above the diagonal are the similarity indices between populations and below the diagonal are the genetic distances between populations.

图 1-a、b、c 是引物 OPA07、OPZ03 和 OPZ14 的扩增图谱, 显示在检测的样品间扩增片段呈现多态现象, 在 OPZ03 的图谱中尼罗罗非鱼和正交子代的多态性更为显著。引物 OPA07 和 OPZ14 的扩增带可以用来鉴别 2 种罗非鱼及其子代。在 OPA07 的扩增产物中, 有 1 条约 1 900 bp 的片段(根据命名法^[2], 将此片段称为 OPA07₁₉₀₀, 下同)为尼罗罗非鱼特有, 在正交子代中出现; 另 1 条约 960 bp 的片段(OPA07₉₆₀)为奥利亚罗非鱼特有, 但此片段在正、反交子代中均出现。在 OPZ14 的产物中, 存在 1 条约 720 bp 的片段(OPZ14₇₂₀)为奥利亚罗非鱼特有, 在正、反交子代中均出现; 然而 1 条约 600 bp 的片段(OPZ14₆₀₀)在尼罗罗非鱼的部分个体、奥利亚和反交子代的全部个体中出现, 在正交子代中没有此片段。

3 讨论

16 个随机引物中的 11 个在 2 种罗非鱼及其杂交子代间呈现出多态现象。在图 1-a、b、c 中, 显见尼罗罗非鱼和正交子代拥有较丰富的多态性, 在图 1b 中表现尤为明显; 而奥利亚罗非鱼和反交子代的多态性较少。表 2 的计算结果也显示了这一趋势: 尼罗罗非鱼和正交子代的群内遗传相似指数(S =



m λ DNA/EcoR I + Hind III; 1~4 尼罗罗非鱼 Nile tilapia; 5~8 奥利亚罗非鱼 blue tilapia; 9~12 正交子代 Nile tilapia $\times$ blue tilapia σ ; 13~16 反交子代 blue tilapia $\times$ Nile tilapia σ .

图1 引物 OPA07(a)、OPZ03(b) 和 OPZ14(c) 对尼罗罗非鱼、奥利亚罗非鱼、正交子代、反交子代的扩增图谱

Fig.1 RAPD patterns of Nile tilapia, blue tilapia, and their hybrid offsprings F_1 generated with primers OPA07 (a), OPZ03(b) and OPZ14(c).

0.872、0.944) 小于奥利亚罗非鱼和反交子代的这一指数 ($S=0.963, 0.961$)。同时发现, 正交子代 ($S=0.944$) 和反交子代 ($S=0.961$) 群体内的遗传相似性指数介于 2 亲本之间。这反映了奥利亚罗非鱼群内的遗传变异较小, 尼罗罗非鱼的群内遗传变异较大, 由于杂交子代的核 DNA 分别来自 2 亲本, 因而也各自继承了 2 亲本的遗传变异。

表 2 显示, 正交子代与父本(奥)和母本(尼)的遗传相似性指数分别是 0.880 和 0.851, 两者相差甚微, 因此正交子代与 2 亲本的相似程度没有明显的倾向性; 然而反交子代与父本(尼)、母本(奥)的遗传相似性指数分别是 0.780 和 0.958, 说明反交子代与母本奥利亚罗非鱼相似, 而且相似性指数相差很大, 因此反交子代极明显的倾向于母本。正交子代、反交子代与奥利亚罗非鱼的遗传相似性指数分别是 0.880 和 0.958, 这也表明了反交子代比正交子代与奥利亚罗非鱼更加相似。事实上, 在各引物的扩增图谱中, 奥利亚罗非鱼的图谱与反交子代的图谱几乎完全相同。另外, 从观察的 22 尾正交子代和 4 尾反交子代的外部形态中发现, 4 尾反交子代与奥利亚罗非鱼十分相似; 而在 22 尾正交子代中, 9 尾鱼的尾鳍条纹颜色较浅, 1 尾鱼的条纹颜色较深, 1 尾鱼的条纹不规则, 11 尾鱼的条纹颜色浅黄, 这也反映了正交子代在形态上没有明显的倾向性。这与对它们的核基因组的研究结果吻合。

上述现象可以对罗非鱼的杂交选育提供有益的启示, 因为在反交中奥利亚罗非鱼对子代的影响十分显著, 调控反交子代生长发育的基因可能主要是调控奥利亚罗非鱼生长发育的那些基因, 所以选育到继承双亲优良性状的后代的可能性较小, 在奥尼杂交选育中不应采用反交组合。在正交组合中, 父本和母本对子代的影响没有显著差异, 因而子代的生长发育可能受来自双亲的基因的共同调控, 所以更有机会得到具备双亲优良性状的杂交子代。在农作物杂种优势利用的研究中曾有过类似的报道^[3~6]。

由于罗非鱼可以进行种间杂交, 建立遗传标记对其进行鉴别, 这对保护其遗传资源十分重要。本研究中建立了分子标记, 分别是 OPA07₁₉₀₀、OPA07₉₆₀、OPZ14₇₂₀ 和 OPZ14₆₀₀, 可以鉴别奥利亚罗非鱼、尼罗罗非鱼及其正交子代。但未能找到鉴别奥利亚罗非鱼和反交子代的遗传标记, 显然是因为这两者之间相似性甚高的缘故 ($S=0.958$)。

参 考 文 献

- 1 Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting. *Mol Biol Evol*, 1990, 7: 478~484
- 2 王京兆, 王 斌, 徐琼芳, 等. 用 RAPD 方法分析水稻光敏核不育基因. *遗传学报*, 1995, 22(1): 53~58
- 3 孙其信, 黄铁城, 倪中福. 小麦杂种优势群研究 I. 利用 RAPD 标记研究小麦品种间遗传差异. *农业生物技术学报*, 1996, 4(2): 103~109
- 4 李文彬, 周小梅, 张 健, 等. 水稻三系及其杂种的 RAPD 指纹图谱分析. *农业生物技术学报*, 1995, 3(2): 1~6
- 5 Lynch M. DNA fingerprinting approaches and applications. Switzerland: Basel, 1991, 7: 113~126
- 6 Melchinger A E, et al. Genetic diversity for restriction fragment length polymorphisms and heterosis for two diallel sets of maize inbreds. *Thor Appl Genet*, 1990, 80: 488~496

The relationships between F_1 hybrids from tilapia and their parents and the use of their heterosis

Xia Dequan Cao Ying Yang Hong Wu Tingting

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

Abstract Genetic relationships between the parental fishes Nile tilapia, blue tilapia and their hybrids were assayed with RAPD analysis using 16 primers, of which 11 generated polymorphic products. Genetic similarity indices demonstrated that the offsprings of Nile tilapia ♀ × blue tilapia ♂ were genetically intermediate between the parental fishes, while the offsprings of blue tilapia ♀ × Nile tilapia ♂ were extremely similar to blue tilapia. This suggested that hybrids F_1 have high possibility to develop heterosis if they are intermediate between the parental fishes in genetic characteristics. In addition, products OPA07₁₉₀₀, OPA07₉₆₀, OPZ14₇₂₀ and OPZ14₆₀₀ were found to be molecular markers for identifying blue tilapia, Nile tilapia and the offspring of Nile tilapia ♀ × blue tilapia ♂.

Key words tilapia, hybrid, genetic relationship, heterosis, RAPD

欢迎订阅《齐鲁渔业》

《齐鲁渔业》为水产科技刊物,辟有海水养殖、淡水养殖、苗种培育、病害防治、饵料肥料、捕捞技术、保鲜加工、资源环境、渔船渔机、专题讲座等栏目。适于水产科技人员、行政干部、院校师生及广大养殖户、渔船民、水产加工技术人员阅读。《齐鲁渔业》面向科技,面向生产,面向基层,面向渔民,是广大技术人员和渔民信得过、看得懂、学得会、用得上的科技期刊。

《齐鲁渔业》既发表了一大批水产科学前沿课题报告,注重首报性;又报道了一大批最新实用技术,注重实用性。近年来,先后荣获山东省优秀科技期刊一等奖、全国水产优秀报刊一等奖、全国优秀科技期刊三等奖和华东地区优秀期刊二等奖。《齐鲁渔业》是全国渔业水产类的核心期刊,是联合国水科学和渔业情报系统(ASFIS)和《水科学与渔业文摘》(ASFA)长期固定收录刊物,并被国内数家检索性期刊收录。

《齐鲁渔业》为双月刊,大16开48页,每册定价4.5元,全年共27元(含邮资)。国内外公开发行,订阅代号24-78,请您到当地邮局办理订阅手续,也可直接与《齐鲁渔业》杂志社联系,地址:山东烟台四马路63号,邮政编码:264001,电话:(0535)6217079,联系人:王 华,李雪梅。