

文章编号: 1004 - 7271(2007)01 - 0007 - 04

吉富品系尼罗罗非鱼选育系 $F_6 \sim F_9$ 遗传变异的 RAPD 分析

张传涛, 李思发, 颀晓勇

(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)

摘要:利用随机扩增多态 DNA(RAPD)技术对连续选育的吉富品系尼罗罗非鱼 F_6 、 F_7 、 F_8 、 F_9 4 个世代群体的遗传变异进行了分析。结果表明:(1)17 条引物在 4 个世代的 88 尾个体间共检测到 172 个位点。(2) F_6 、 F_7 、 F_8 、 F_9 4 世代的多态座位比例分别为:23.4%、21.1%、19.4%、18.3%,呈递减状态, U 检验差别不显著($P > 0.05$);4 世代的 Nei 遗传相似系数分别为:0.896 1、0.908 4、0.918 6、0.925 4,呈递增状态, t 检验差别不显著($P > 0.05$);Shannon 多样性指数分别为:0.148 5、0.131 4、0.117 8、0.108 3,呈递减状态, t 检验差别不显著($P > 0.05$)。(3)4 世代间的遗传变异占群体总变异的比是 23.9%(Shannon 多样性指数分析)和 12.5%(AMOVA 分析)。以上结果表明,4 代选育虽未导致选育群体遗传多样性产生显著的差异,但却清楚地显示了逐代选育使选育系群体趋于纯化,选育系 F_8 、 F_9 世代已表现出较好的遗传稳定性。

关键词:尼罗罗非鱼;选育;世代;遗传变异;RAPD

中图分类号:S 917 文献标识码:A

RAPD analysis of genetic variation of GIFT strain *Oreochromis niloticus* from 6th to 9th generation

ZHANG Chuan-tao, LI Si-fa, XIE Xiao-yong

(Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecosystem Certificated by
the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) was used to detect the variation of four successively selected generations (F_6 , F_7 , F_8 , F_9) of GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). The results showed that: (1) 172 loci (300 - 2800 bp) were examined by 17 random primers from 88 individuals of four generations. (2) The proportions of polymorphic loci of F_6 , F_7 , F_8 , F_9 were 23.4%, 21.1%, 19.4% and 18.3% respectively, decreased generation by generation, but no significant differences among generations (U test, $P > 0.05$); the Nei genetic identities of F_6 , F_7 , F_8 , F_9 were 0.896 1, 0.908 4, 0.918 6, 0.925 4 respectively, increased generation by generation, but no significant differences among generations (t -test, $P > 0.05$); Shannon genetic diversity indices of F_6 , F_7 , F_8 , F_9 were 0.148 5, 0.131 4, 0.117 8, 0.108 3, decreased generation by generation, but no significant differences among generations (t -test, $P > 0.05$). (3)

收稿日期:2006-02-26

基金项目:国家“十五”攻关项目;尼罗罗非鱼良种选育(科 0514)

作者简介:张传涛(1980-),男,山东枣庄人,硕士研究生,专业方向为水产动物种质资源与种苗工程。E-mail:ctzhang@stmail.shfu.edu.cn

通讯作者:李思发, E-mail:slfi@shfu.edu.cn

The contribution of the variation among four generations to the total variations of four generation was 23.1% in Shannon genetic diversity index and 12.5% in AMOVA analysis. The above results showed that, although a selection of four generations did not cause a significant difference of genetic diversities, it caused a clear trend in genetical purification, and the F_8 and F_9 generations have reached a rather high genetic stability as a genetic improved variety.

Key words: *Oreochromis niloticus*; selection; generation; genetic variation; RAPD

1994年7月,上海水产大学从菲律宾引进了吉富品系尼罗罗非鱼。从1996年起,以引入的吉富品系尼罗罗非鱼为基础群体,在青岛、蚌埠、广州三个实验基地进行逐年系统选育^[1-3]。至2005年,吉富品系尼罗罗非鱼已选育到 F_9 。自从吉富品系尼罗罗非鱼引入我国,并进行系统选育后,本实验室对选育各世代一直进行了跟踪研究。如李思发等^[4]、赵金良等^[5]和胡国成等^[6]对选育效应的检测结果表明:选育群体的生长速度逐代提高、代表性尾鳍条纹逐代趋于整齐。但是这些研究主要是从生长、形态等方面对选育各世代进行分析,对于他们的遗传变异方面的研究较少。本文采用RAPD的方法对吉富品系尼罗罗非鱼选育系 $F_6 - F_9$ 4世代的遗传变异情况进行了分析,这对于监测尼罗罗非鱼遗传多样性在选育过程中的变化、指导选育工作的顺利开展具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

取吉富品系尼罗罗非鱼选育系 F_6 、 F_7 、 F_8 和 F_9 共4个世代的样本各22尾。 $F_6 \sim F_8$ 世代的规格为250~400 g, F_9 世代的规格为100~140 g。每尾样本剪取尾鳍约2 g,分别编号后于95%乙醇中保存备用。实验用10碱基随机引物购自上海生物工程有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组DNA的提取与PCR反应

基因组DNA提取和PCR扩增反应参照李思发等^[7]描述方法。

1.2.2 数据处理与分析

多态位点比例: $P = \text{多态位点数} / \text{位点总数} \times 100\%$ 。

根据Nei和Li^[8]的公式,计算各群体内个体间的遗传相似系数: $I = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ 。式中 N_{xy} 为两个体间共有条带数, N_x 、 N_y 分别为X个体和Y个体各自条带数。

任意两个体间遗传距离: $D = 1 - I$ 。

群体内的平均遗传相似系数与平均遗传距离为群体内所有个体间I和D的平均值。

根据Nei^[9]的公式,计算群体间的遗传相似系数:

$$I = \sum (X_i Y_i) / \{ \sum (X_i)^2 \sum (Y_i)^2 \}^{1/2}$$

其中, X_i 、 Y_i 分别为X和Y群体第i个位点的等位基因频率。

群体间Nei遗传距离: $D = 1 - I$ 。

香浓(Shannon)多样性指数分析^[10]

群体内Shannon多样性指数: $H_0 = - \sum (X_i \ln X_i) / N$

其中 X_i 为位点i在某一群体中出现的频率,ln为自然对数,N为所测座位数。

n个不同群体内的平均Shannon多样性指数: $H_{POP} = \sum H_0 / n$

n为研究群体数。

总群体Shannon多样性指数: $H_{sp} = - \sum (X \ln X) / n$

其中,X为位点i在n个群体中的总显性频率。

根据以上公式分别计算群体内(H_{POP} / H_{sp})及群体间($(H_{sp} - H_{POP}) / H_{sp}$)遗传多样性所占的比例。

采用 POPGENE version 1.31 软件对上述分析进行统计。

利用 Arlequin 软件进行分子方差分析(AMOVA),分析选育群体的遗传分化。群体内及群体间平均遗传相似系数、平均遗传距离、多态座位比例和群体内 Shannon 指数用 t 检验和 U 检验进行比较^[11]。

2 实验结果

2.1 RAPD-PCR 扩增结果

本实验所用引物共计 40 条,其中 17 条能够稳定重复扩增。这 17 条引物在 4 个选育群体中共扩增出 172 个条带,平均每条引物扩增 10.12 条带。扩增片段大小为 300~2 800 bp。 $F_6 \sim F_9$ 世代的多态座位比例分别为:23.4%、21.1%、19.4%、18.3%, U 检验结果: $0.24 < P < 0.8$,四世代间差别不显著($P > 0.05$)。具体结果见表 1。

表 1 17 条随机引物在选育四世代的 PCR 扩增结果
Tab.1 Number of bands amplified by 17 random primers in the four selected generations

选育世代	扩增条带数 (条)	多态性条带数 (条)	多态座位比例 (%)
F_6	171	40	23.4
F_7	171	36	21.1
F_8	170	33	19.4
F_9	169	31	18.3

2.2 遗传差异分析

2.2.1 四世代内遗传相似系数及 Shannon 多样性指数

$F_6 \sim F_9$ 各世代内的 Nei 平均遗传相似系数分别为:0.896 1、0.908 4、0.918 6、0.925 4, t 检验结果: $0.05 < P < 0.7$,4 世代间遗传差别不显著($P > 0.05$);其中 F_6 与 F_9 间 t 检验结果为 $0.05 < P < 0.1$,表明 F_6 与 F_9 间遗传差别明显,但未达显著水平($P > 0.05$); F_8 与 F_9 间 t 检验 P 值最大($0.6 < P < 0.7$),表明 F_8 与 F_9 之间遗传差别最小。

$F_6 \sim F_9$ 各世代内的 Shannon 多样性指数分别为:0.148 5、0.131 4、0.117 8、0.108 3, t 检验结果: $0.1 < P < 0.8$,4 世代间遗传差别不显著($P > 0.05$)。 F_6 与 F_9 世代间 t 检验值最小, $0.1 < P < 0.2$; F_8 与 F_9 世代间 t 检验值最大, $0.7 < P < 0.8$;表明 F_6 与 F_9 世代间遗传差别最大, F_8 与 F_9 世代间遗传差别最小,这与 Nei 遗传相似系数法分析结果相似。

选育系 $F_6 \sim F_9$ 世代 Nei 平均遗传相似系数关系为 $F_6 < F_7 < F_8 < F_9$ 、Shannon 多样性指数关系为 $F_9 < F_8 < F_7 < F_6$,这表明随着选育世代的积累, F_8 、 F_9 世代的遗传差异有所下降、遗传纯合度有所提高,且这种变化是稳步的。

2.2.2 四世代间的遗传相似系数及遗传距离

$F_6 \sim F_9$ 4 世代间的遗传相似系数为 0.947 8~0.981 9,遗传距离为 0.018 3~0.053 6,其中 F_9 与 F_6 世代间的遗传相似系数最小,遗传距离最远; F_9 与 F_8 世代间的遗传相似系数最大,遗传距离最小(表 2)。

2.2.3 选育系的遗传分化

根据 Shannon 多样性指数来分析选育系 4 世代的遗传变异,发现世代内个体间遗传变异占群体总变异的比(H_{POP}/H_{SP})为 76.1%,而世代间的遗传变异占群体总变异的比($H_{SP} - H_{POP})/H_{SP}$ 为 23.9%。

分子方差分析(AMOVA)发现:吉富品系尼罗罗非鱼选育系 $F_6 \sim F_9$ 4 世代的遗传变异有 87.5% 来自选育世代内部,而仅有 12.5% 来自于世代间(表 3),表 3 表明,选育 4 世代的遗传变异主要来源于各选育世代内个体间的遗传差别。

表 2 基于 Hardy-Weinberg 平衡假设的选育系 4 世代间 Nei 遗传相似系数及遗传距离

Tab.2 Genetic identity and distance in the four selected generations based on the Hardy-Weinberg equilibrium

	F_6	F_7	F_8	F_9
F_6	—	0.975 0	0.955 6	0.947 8
F_7	0.025 3	—	0.971 2	0.957 2
F_8	0.045 4	0.029 2	—	0.981 9
F_9	0.053 6	0.043 7	0.018 3	—

注:对角线以下为遗传距离,对角线以上为遗传相似系数。

表 3 选育系 4 世代的 AMOVA 分析
Tab.3 AMOVA of the four selected generations

变异来源	自由度	方差总和	变异组分	所占比例(%)
世代间	3	103.341	1.188 41	12.5
群体内	84	697.364	8.301 95	87.5
总和	87	800.705	9.490 36	

3 讨论

一般情况下,鱼类要经过连续6代以上的选育才能达到经济性状明显改善且遗传稳定的效果。长期的选育工作需要被选择的育种群体保持足够的遗传变异水平及一定的遗传响应。但人工选育是一个极复杂的过程,每一代的外部环境及人工选择压力均会造成选育群体遗传变异水平的波动。许多不确定因素的发生,如随机遗传漂变、近亲杂交、瓶颈效应等,均会导致选择种群遗传多样性的丧失^[12,13]。如日本对虾引入意大利后,Sbordoni等^[14]利用同工酶技术研究发现其第1代至第6代的平均杂合度从0.102持续下降至0.039。其原因是日本对虾引入意大利后不久即发生了遗传瓶颈效应,实际产卵亲虾数仅为4尾。通过对吉富品系尼罗罗非鱼选育系 $F_6 \sim F_9$ 4世代的遗传变异的研究,是否可以及时了解选育对罗非鱼选育群体遗传多样性的影响呢?

本研究用RAPD方法揭示了吉富品系尼罗罗非鱼选育系 $F_6 \sim F_9$ 4世代内及世代间的遗传变异情况。多态座位比例、群体间的遗传相似系数和Shannon多样性指数三项指标值均表明:选育系4世代的遗传差别虽未达显著水平($P > 0.05$),但4世代的遗传多样性有逐代下降的明显趋势。应当指出,同千万年的进化相比,这是在短短四年间出现的变异,虽然微弱但却是可以检测到的,因而是有意义的。

另一方面,本研究所计算的 F_6 群体平均遗传相似系数(0.896 1)略高于何学军^[15]用RAPD方法计算 F_5 群体的平均遗传相似系数(0.892 4),这表明经过连续4~5代的系统选育,选育系尼罗罗非鱼的遗传纯度虽有所提高,但却是微弱的;可以认为, $F_6 \sim F_9$ 4世代的遗传水平已达到了相对稳定的状态。选育系 F_8 、 F_9 世代已具备作为选育良种的遗传稳定性。

本研究得到王成辉副教授的热情帮助,谨致谢忱。

参考文献:

- [1] 李思发,李家乐. 养殖新品种简介吉富品系尼罗罗非鱼[J]. 中国水产,1998(4):36,27.
- [2] 李思发. 吉富品系尼罗罗非鱼引进史[J]. 中国水产,2001,10:52-53.
- [3] 李家乐,李思发. 中国大陆尼罗罗非鱼引进及其研究进展[J]. 水产学报,2001,25(1):90-95.
- [4] 李思发,李晨虹,李家乐,等. 尼罗罗非鱼选育三代效果评价[J]. 上海水产大学学报,2001,10(4):289-292.
- [5] 赵金良,李思发,何学军,等. 吉富品系尼罗罗非鱼选育 F_6 评估[J]. 上海水产大学学报,2003,12(3):201-204.
- [6] 胡国成,李思发,何学军,等. 吉富品系尼罗罗非鱼选育 $F_6 \sim F_8$ 生长改良效果[J]. 上海水产大学学报,2005,14(3):327-331.
- [7] 李思发,邹曙明. 中国大陆沿海六水系绒螯蟹(中华绒螯蟹、日本绒螯蟹)群体亲缘关系:RAPD指纹标记[J]. 中国水产科学,2000,7(1):6-11.
- [8] Nei M, Li W M. Mathematical model for studying genetic distance in terms of restriction endonuclease[J]. Proceeding of the National Academy of Sciences,1979,76(5):269-273.
- [9] Nei M. Genetic distance between populations[J]. Am Nat,1972,106:283-292.
- [10] Wachira F N, Waugh R, Hackett C A, et al. Detection of genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) using RAPD markers[J]. Genome,1995,38(2):201-210.
- [11] 刘光祖. 概率论与应用数理统计[M]. 北京:高等教育出版社,2000.
- [12] 岳志芹,王伟继,孔杰,等. 用AFLP方法分析中国对虾抗病选育群体的遗传变异[J]. 水产学报,2005,29(1):13-19.
- [13] 张天时,刘萍,李健,等. 用微卫星DNA技术对中国对虾人工选育群体遗传多样性的研究[J]. 水产学报,2005,29(1):6-12.
- [14] Sbordoni V, Mattaeis E De, Sbordoni M C, et al. Bottleneck effects and the depression of genetic variability in hatchery stocks of *penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda)[J]. Aquaculture,1986,57:239-251.
- [15] 何学军. 台湾红罗非鱼与吉富品系尼罗罗非鱼杂交育种研究[D]. 上海水产大学硕士论文,2002:57-58.