

文章编号: 1004-7271(2007)03-0293-04

· 研究简报 ·

我国引进萨罗罗非鱼群体的 AFLP 遗传指纹

赵金良^{1,2}, 王伟伟¹, 李思发¹, 李学军¹, 赵丽丽¹

(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. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心农业部水生动物遗传育种与
养殖生物学重点开放实验室, 江苏 无锡 214081)

摘要:应用 AFLP 技术初步分析了我国引进的萨罗罗非鱼群体的遗传指纹特征, 8 对选择性引物在 25 个个体中共检测到 247 个扩增片段, 每对引物扩增出的片段数目为 27~34, 平均扩增片段数目为 30.9。群体的平均多态位点比例为 16.6%。共检测出 25 个基因型, 每个个体含有独自的基因型。群体内个体间的遗传相似度为 0.929~0.995, 群体遗传变异较小。本研究结果可为我国萨罗罗非鱼的种质保存与管理提供科学依据。

关键词:萨罗罗非鱼; AFLP; 遗传指纹; 遗传变异

中图分类号: S 917 文献标识码: A

AFLP fingerprinting of the introduced stock of *Sarotherodon melanotheron* in China

ZHAO Jin-liang^{1,2}, WANG Wei-wei¹, LI Si-fa¹, LI Xue-jun¹, ZHAO Li-li¹

(1. Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecosystem Certified
by the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;

2. Key Laboratory of Aquatic Heredity Breeding & Breed Biology, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries
Research Center, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Wuxi 214081, China)

Abstract: The genetic fingerprinting of the introduced stock of *Sarotherodon melanotheron* in China was analyzed using AFLP technique. A total of 247 fragments were detected in the 25 samples using eight primer pairs, the number of fragments produced by each pair of primers were 27-34, the average fragments was 30.9, the average polymorphic loci of this stock were 16.6%. 25 genotypes were found with each sample owning one genotype. The genetic similarities of the introduced stock of *S. melanotheron* varied from 0.925 to 0.995. These results could be served as genetic base for its management and conversation.

Key words: *Sarotherodon melanotheron*; AFLP; genetic fingerprinting; genetic variation

萨罗罗非鱼 (*Sarotherodon melanotheron* Rüppell) 又称黑颊罗非鱼, 原产于西非海岸泻湖^[1]。因具有极强的耐盐性^[2], 成为培育耐盐品种的育种材料。在成功引进我国的基础上, 李学军^[3]对萨罗罗非鱼耐盐生态、生理及相关基因做了较系统的研究。然而, 关于萨罗罗非鱼的遗传特性研究仅见有血液学指标^[4]、同工酶^[5-8]、微卫星^[3]方面的少量报道。扩增片段长度多态性技术 (AFLP)^[9]以重复性好、信息

收稿日期: 2006-09-04

基金项目: 农业部水生动物遗传育种与养殖生物学重点开放实验室开放课题 (2003-2005); 上海市重点学科建设项目 (Y1101)

作者简介: 赵金良 (1969-), 男, 安徽全椒人, 副教授, 主要从事水产动物种质资源与遗传育种方面的研究。Tel: 021-65710705,
E-mail: jlzhao@shfu.edu.cn

量大成为遗传多样性研究的最佳手段,已在水产生物的遗传指纹图谱研究中得到应用^[10-12]。本文应用 AFLP 技术初步分析我国新引进萨罗罗非鱼的 DNA 遗传指纹,了解引进群体的遗传特征,为萨罗罗非鱼的种质保存、管理及遗传改良提供科学依据和指导。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验用鱼取自河北省中捷罗非鱼良种场保种基地。新鲜的肌肉组织以 95% 乙醇固定, -20 ℃ 冷藏备用。

1.2 基因组 DNA 的提取

总 DNA 的提取参照《分子克隆实验指南》,取 20 ~ 30 mg 酒精固定的尾鳍,剪碎。待酒精完全挥发后,用蛋白酶 K(20 mg/mL)56 ℃ 消化 10 h,酚-氯仿法提取总 DNA。

1.3 AFLP 实验

AFLP 实验步骤参照 Vos 等^[9]的方法进行。总 DNA 用 6 碱基 *EcoR* I 和 4 碱基 *Mse* I 限制性内切酶进行双酶酶切 4 h,酶切产物先与人工接头连接 12 h。采用 E + A/M + C 引物组合进行预扩增。预扩增产物稀释 100 倍后作为选择性扩增的模板进行选择性扩增,PCR 反应条件为:94 ℃ 预变性 2 min;94 ℃ 变性 30 s,65 ℃ (以后每循环降低 1 ℃)退火 30 s,72 ℃ 延伸 80 s 进行 10 个循环;然后 94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 60 s,23 个循环;72 ℃ 延伸 10 min;4 ℃ 保存。接头、引物、接头序列均由上海生工生物工程有限服务公司合成。限制性内切酶和连接酶购自 New England Biolab 公司, *Taq* DNA 聚合酶和 dNTP 购自北京天为时代公司。

选择性扩增产物用 6% 聚丙烯酰胺变性凝胶进行电泳分离。电泳结束后,采用银染技术染色和显色,10% 冰醋酸固定。用 15% 甘油溶液浸泡的玻璃纸包胶,室温下自然干燥。

1.4 数据统计与分析

统计各样品中清晰和稳定的扩增条带,以“1,0”分别表示扩增带的有或无。计算依照 Lynch 的公式^[13],计算个体间的遗传相似系数(S)。 $S = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$,其中, N_{xy} 为个体 X 和个体 Y 共有的片段数, N_x 为 X 个体所扩增的片段总数, N_y 为 Y 个体所扩增的片段总数。

2 结果

利用筛选的 8 对 AFLP 引物扩增了 25 尾萨罗罗非鱼样品,每对引物均获得了比较清晰的条带,共计 247 条带(仅统计 150 ~ 600 bp 区域间的清晰片段)(表 1)。每对引物扩增出的片段数目为 27 ~ 34 不等,平均 30.9。每对引物检测出的多态性片段数目为 3 ~ 8 个, E-AAG/M-CTC 引物的多态位点比例最高(25.9%), E-AAC/M-CTC 引物的最低(9.7%),平均多态位点比例为 16.6%。E-AAG/M-CTC 引物扩增的结果见图 1。

表 1 8 对选择性引物扩增萨罗罗非鱼的条带数和基因型数

Tab.1 Number of fragments and genotypes observed in *S. melanotheron* using 8 pairs of primers

引物	检出片段	多态位点数	多态位点比例	基因型数
E-AAC/M-CTC	31	3	9.7%	4
E-AAG/M-CTC	27	7	25.9%	10
E-ACA/M-CTC	34	8	23.5%	10
E-ACT/M-CTG	32	6	18.8%	7
E-ACC/M-CTA	33	5	15.2%	6
E-ACG/M-CTG	31	4	12.9%	5
E-ACG/M-CTT	30	7	23.3%	7
E-AGC/M-CAG	29	6	20.7%	8

每对引物中观察到 4 ~ 10 种不同基因型。将所有引物的基因型合并一起统计,25 尾样品中共有 25 个基因型,即每尾鱼的基因型均不相同。表 2 显示了在多态位点上不同个体的表型。

群体内个体间的遗传相似性最高为 0.995,最低为 0.922,平均遗传相似性为 0.969。

3 讨论

本研究利用 8 对 AFLP 引物共检测出 247 个扩增片段,每对引物的扩增片段数目为 27 ~ 34 个,多态性片段为 3 ~ 8 个,表明了 AFLP 技术具有较高的信息位点的检测效率与灵敏度;25 个样品中,共检测出 25 种基因型,这表明使用多对引物组合即可较好地获得萨罗罗非鱼个体的遗传指纹,可为萨罗罗非鱼的遗传监测和种质管理提供了可靠的依据。

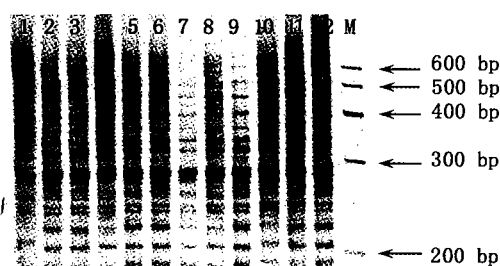


图 1 萨罗罗非鱼引物 E-AAG/M-CTC 的 AFLP 扩增图谱
Fig. 1 AFLP fingerprinting of *S. melanotheron* by primers E-AAG/M-CTC

表 2 萨罗罗非鱼多态位点的表型

Tab. 2 Phenotypes of polymorphic loci observed in *S. melanotheron*

样品	表型
SM01	0101000100 0001011100 0110000010 0101100010 000001
SM02	0101000100 0000011101 1110001100 0000000011 100111
SM03	0101000100 0000010000 0101111100 0000001010 100001
SM04	0101000000 0000011000 0110000000 0100000010 000000
SM05	0101000100 0001010000 0110000000 0100000010 010001
SM06	0101000111 0011111101 1111101111 1100000111 111011
SM07	0101000100 0100110000 0110101000 0100000010 000001
SM08	0101000000 0001111010 0110101000 0000000000 000001
SM09	0101000111 1011111101 1110011111 1011101111 101011
SM10	0101000000 0000011101 1110011110 0000001111 100001
SM11	0101000000 0001111010 0100001100 0000010010 000001
SM12	0101000111 1111111100 0011101111 1111111011 111001
SM13	0100000000 0000011000 0110101000 0000000010 000001
SM14	0101000000 0000011000 0110101100 0000000010 000001
SM15	0101000000 0001111010 0110000000 0001100000 000001
SM16	0101000100 0001111000 0100000000 0000000010 000001
SM17	1110111000 0000011000 0110000000 0100000010 000001
SM18	0101000100 0000010000 0110001100 0100000000 000001
SM19	1010000100 0000011010 0110000000 0000000000 000001
SM20	1110111000 0001001010 0100000000 0100000010 000001
SM21	1011111000 0001011001 1110000000 0000000000 000001
SM22	0001111100 0000011010 0110000000 0000000010 000001
SM23	0100000000 0000011000 0110000000 0000000010 000001
SM24	1110111100 0001011000 0110000000 0000000000 000001
SM25	1110000000 0000011000 0110000000 0100000010 010001

Pouyaud 等^[8]利用同工酶技术研究了萨罗罗非鱼西非(科特迪瓦、加纳、卡比亚)7 个群体的遗传结构,28 个检测座位中发现有 11 个多态位点,认为该种的遗传杂合性较高。而李学军^[3]利用微卫星技术得出我国引进萨罗罗非鱼群体的有效等位基因数、平均杂合度期望值和多态信息含量值分别为 1.812、0.331 和 0.326,低于我国引进的尼罗罗非鱼、以色列红罗非鱼、台湾红罗非鱼、奥利亚罗非鱼、齐氏罗非鱼等其他群体。本研究结果表明,我国引进的萨罗罗非鱼群体平均多态位点比例为 16.6%,群体内个体间的平均遗传相似性为 0.922 ~ 0.995。这说明我国引进的萨罗罗非鱼群体的遗传变异不高,可能与

多次引进(加纳—美国—中国)过程中,存在一定的瓶颈效应或奠基群效应有关。此外,Pouyaud等^[14]研究不同栖息水域萨罗罗非鱼群体的遗传变异中发现泻湖型群体的遗传多样性明显低于江河型群体;进一步研究发现在泻湖环境中,萨罗罗非鱼具有明显的同族相聚与近交现象,可能是泻湖型群体杂合性低下的主要原因。

与我国已引进的其他罗非鱼品种相比,新引进的萨罗罗非鱼具有以下特征:(1)耐盐性最优,高于尼罗罗非鱼、奥利亚罗非鱼、莫桑比克罗非鱼、红罗非鱼等^[15],使其成为耐盐罗非鱼品种选育的最佳育种材料。(2)生长速度较慢,平均日增重率仅为 $0.5 \sim 0.7 \text{ g}^{[16]}$,使其养殖推广受到一定限制。(3)孵化方式为雌、雄亲鱼皆营口腔孵化,尤以雄鱼占优势^[17],不易与其他种类罗非鱼进行交配繁殖而混杂,种质保存与管理相对简单,但也增加了利用属间杂交手段改良品种的难度。

参考文献:

- [1] Trewavas E. Tilapiine fishes of the Genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* and *Danakilia* [M]. London: Brit Mus Nat Hist, 1983: 583.
- [2] Jennings D P, Willama J D. Factors influencing the distribution of blackchin tilapia *Sarotherodon melanotheron* (Osteichthys: Cichlidae) in the Indian River system [J]. Florida Northeast-Gulf-Sci, 1992, 12(2): 111 - 117.
- [3] 李学军. 萨罗罗非鱼耐盐性能研究[D]. 上海水产大学博士学位论文, 2004.
- [4] LeaMaster B R, Brock J A, Fujioka R S, et al. Hematologic and blood chemistry values for *Sarotherodon melanotheron* and a red hybrid tilapia in freshwater and seawater [J]. Comp Biochem Physiol, 1990, 97A(4): 525 - 529.
- [5] Falk T M, Abban E K, Villwock W. Population genetics analysis of the haemoglobins of the black-chinned tilapia [J]. J Fish Biol, 1999, 55: 232 - 242.
- [6] Sodsuk P, McAndrew B J. Molecular systematics of the three Genera *Tilapia*, *Sarotherodon* and *Oreochromis* using allozyme data [J]. J Fish Biol, 1991, 39(Suppl.): 301 - 308.
- [7] Pouyaud L, Agnase J F. Phylogenetic relationships between 21 species of three tilapiine genera *Tilapia*, *Sarotherodon* and *Oreochromis* using allozyme data [J]. J Fish Biol, 1995, 47(1): 26 - 38.
- [8] Pouyaud L, Agnase J F. Genetic differentiation in several stock of *Sarotherodon melanotheron* from Cote d'Ivoire, Senegal and Cambodia [C]//The Third International Symposium on Tilapia in Aquaculture, 1996, 41: 368 - 376.
- [9] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23: 4407 - 4414.
- [10] Kocher T D, Lee W J, Sobolewska H, et al. Genetic linkage map of a cichlid fish, the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Genetics, 1998, 148: 1225 - 1232.
- [11] 王志勇, 王艺磊, 林利民, 等. 利用 AFLP 指纹技术研究中国沿海真鲷群体的遗传变异[J]. 水产学报, 2001, 25(4): 289 - 293.
- [12] 王志勇, 王艺磊, 林利民, 等. 福建官井洋大黄鱼 AFLP 指纹多态性的研究[J]. 中国水产科学, 2002, 9(3): 198 - 202.
- [13] Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting [J]. Mol Biol Evol, 1990, 7: 478 - 484.
- [14] Pouyaud L, Desmarais E, Chenuil A, et al. Kin cohesiveness and possible inbreeding in the mouthbrooding tilapia *Sarotherodon melanotheron* (Pisces Cichlidae) [J]. Mol Ecol, 1999, 8(5): 803 - 812.
- [15] 李家乐, 李思发. 罗非鱼类耐盐性研究进展[J]. 中国水产科学, 1999, 6(3): 81 - 84.
- [16] Campbell D. A review of the culture of *Sarotherodon melanotheron* in West Africa [R]//Prot Harcourt, Nigeria, UNDP/FAO Working Report, 1987, 20.
- [17] Eyeson K N. Residual biparental oral-brooding in the blackchin fish, *Sarotherodon melanotheron* Rüppell [J]. J Fish Biol, 1992, 41: 145 - 146.