

文章编号: 1004-7271(2007)05-0490-05

· 研究简报 ·

我国主要养殖罗非鱼的 16S rRNA 序列特征分析

郭奕惠¹, 黄桂菊¹, 喻达辉¹, 李莉好¹, 符云², 叶卫²

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300;

2. 国家级广东罗非鱼良种场, 广东 广州 511453)

摘要:对我国主要养殖的尼罗、奥利亚、莫桑比克、杂交种尼罗(尼罗♀×奥利亚♂)和红罗非鱼(莫桑比克×尼罗)的线粒体 16S rRNA 部分序列进行了 PCR 扩增和测序分析,探讨罗非鱼种间亲缘关系和种类鉴别标记。PCR 产物经直接测序,5 种罗非鱼中大部分个体均获得长 546 bp 的基因序列。其碱基组成 GC 含量为 47.4%。序列比对分析显示变异位点 18 个,没有插入/缺失位点,转换/颠换比率为 2.7。序列分析表明,红和奥利亚各有 2 个单倍型,尼罗、莫桑比克与尼罗各有 1 个单倍型。其中,尼罗与奥利亚的单倍型序列相同,莫桑比克与红罗非鱼的 1 个单倍型序列相同。表明部分红罗非鱼的母本为莫桑比克。UPCMA 聚类分析表明,尼罗与奥利亚聚成一支,红罗非鱼与莫桑比克成一支,奥利亚独成一支。

关键词:罗非鱼;16S rRNA 基因;种类鉴定;序列特征

中图分类号:S 917

文献标识码:A

Sequence analysis of mitochondrial 16S rRNA in *Oreochromis* species in China

GUO Yi-hui¹, HUANG Gui-ju¹, YU Da Hui¹, LI Li-hao¹, FU Yun², YE Wei²

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of

Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;

2. National Tilapia Breeding Farm of Guangdong Province, Guangzhou 511453, China)

Abstract: Mitochondrial 16S rRNA gene sequence variation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), blue tilapia (*O. aureus*), Mozambique tilapia (*O. mossambicus*), hybrid tilapia (*O. niloticus* ♀ × *O. aureus* ♂) and red tilapia (*O. mossambicus* × *O. niloticus*) was investigated in order to understand the genetic relationship among them as well as to provide interspecific molecular markers for breeding practice. The partial sequence of 16S rRNA was 546 bp long for the five species as revealed by directly sequencing the PCR products. GC content was 47.4%. Alignment revealed 18 variable sites including 15 parsimony-informative sites and 3 singletons but no insertion/deletions with transition/transversion ratio of 2.7. Sequence analysis indicated that there are five haplotypes; haplotype 1 and 2 (blue tilapias), haplotype 3 (the hybrid and Nile tilapias), haplotype 4 (the red and Mozambique tilapias) and haplotype 5 (red tilapia). Accordingly the five

收稿日期: 2006-11-30

基金项目: 广州番禺区科技计划项目(2004-Z-61-1)

作者简介: 郭奕惠(1981-), 女, 广东汕头人, 研究实习员, 主要从事分子标记辅助选育技术研究。E-mail: yihuiguodith@163.com

通讯作者: 喻达辉, Tel: 020-89103420, E-mail: pearlydh@163.com

species can be divided into three groups. It also suggests that *O. mossambicus* is the female parent of some red tilapias. Phylogenetic analysis suggested that the group of *O. niloticus* and the hybrid *O. niloticus* × *O. aureus* are closely related with the group of *O. mossambicus* and the red tilapia, whereas *O. aureus* is genetically distinct from the other four species.

Key words: *Oreochromis species*; 16S rRNA; species identification; sequence characteristics

目前,我国进行大规模养殖的主要种类有尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、奥利亚罗非鱼(*O. aureus*)、莫桑比克罗非鱼(*O. mossambicus*),杂交种尼罗罗非鱼(*O. niloticus* ♀ × *O. aureus* ♂)和红罗非鱼(*O. mossambicus* × *O. niloticus*)等,年产量占世界罗非鱼年产量的 70% 以上^[1-2]。目前,罗非鱼是我国出口最大宗的淡水养殖鱼类,因此其遗传育种受到高度重视。但罗非鱼原产于非洲,在我国没有自然分布,养殖种群源于引种驯养,加上其种间差异较小,形态鉴定有一定难度,因此其种间水平和种群水平的遗传多样性和分子鉴别标记研究受到广泛重视^[3-4]。但有关我国主要养殖罗非鱼的线粒体 16S rRNA 序列及其亲缘关系尚未有研究报道。16S rRNA 基因是动物线粒体非编码基因,变异较大,适合于遗传多样性、种类鉴定和亲缘关系的研究^[5-6]。本文对我国主要养殖罗非鱼线粒体 16S rRNA 的序列特征进行分析,以探讨其种间亲缘关系和遗传多样性,为罗非鱼的分子标记辅助选育提供有关资料。

1 材料和方法

1.1 实验材料与基因组 DNA 的提取

尼罗、奥利亚、尼罗(尼罗 ♀ × 奥利亚 ♂)和红罗非鱼(莫桑比克 × 尼罗)样品采集于广东省国家级罗非鱼良种场(广州番禺),莫桑比克罗非鱼采自海南陵水(表 1)。活体运回实验室,取肌肉保存在超低温冰箱 -70 °C 备用。DNA 提取按郭奕惠等^[7]方法。

1.2 PCR 扩增与电泳观察

所用 16S rRNA 基因引物序列为^[8]:16SAR:5' - CGC CTG TTT AHY AAA AAC AT - 3';16SBR:5' - CCG GTC TGA ACT CAG MTC AyG - 3'。扩增反应总体积 50 μL。其中包括 10 × 扩增缓冲液(10 mmol/L Tris·HCl, pH 9.0, 50 mmol/L KCl, 0.001% 的明胶)5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 4 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 4 μL, 引物 10 pmol/L 各 1 μL, 模板 1 μL, *Taq* DNA 聚合酶 1 U, 补足超纯水至终体积 50 μL。

在扩增仪(德国 Bio-metra)上反应。扩增参数为:94 °C 预变性 2 min,接着 94 °C 45 s, 50 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min,共运行 35 个循环;最后 72 °C 延伸 5 min。每次反应均设不含模板 DNA 的空白对照。扩增产物用 1.5% 琼脂糖胶电泳检测(1 × TBE, 5 V/cm 恒压),溴化乙锭染色,凝胶成像系统观察和拍照。

1.3 测序和数据分析

PCR 产物纯化后送上海联合基因科技有限公司进行直接测序。所测的序列经校对在 GenBank 数据库中进行比对(Blastn)分析^[9],用 Clustral X 软件^[10]进行多重比对分析。用 MEGA3 软件计算多态位点、简约信息位点,统计序列的碱基组成和转换/颠换比率(Ts / Tv ratios),根据 Kimura 双参数模型计算遗传距离(D)。用鲷鱼科雅鲷鱼属的长体雅鲷鱼(*Lepidiolamprologus elongatus*) 16S rRNA 序列(AF215464)作外群,通过 MEGA 3 软件构建 UPGMA、NJ、ME 和 MP 系统树,用 Bootstrap1000 次重复检

表 1 罗非鱼样品种类、数量及其 16S rRNA 序列的 GenBank 登录号

Tab.1 Species, sample size and GenBank accession numbers of 16S rRNA sequences of tilapias used in this study

种名	样品量	GenBank 登录号
尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	3	DQ426664
奥利亚罗非鱼 <i>O. aureus</i>	3	DQ426663 DQ838652
尼罗罗非鱼 ♀ × 奥利亚罗非鱼 ♂ <i>O. niloticus</i> ♀ × <i>O. aureus</i> ♂	2	DQ426660
莫桑比克罗非鱼 <i>O. mossambicus</i>	2	DQ426661
红罗非鱼 <i>O. mossambicus</i> × <i>O. niloticus</i>	3	DQ426662 DQ851854

验分子系统树各分枝的可信度。

2 结果

2.1 扩增结果与序列变异

5种罗非鱼中大部分个体均获得长546 bp的基因序列。每个种所获得的序列均已在GenBank数据库注册,其序列号见表1。其中,尼罗罗非鱼3个个体的序列相同,获得1个单倍型。尼奥罗非鱼和莫桑比克罗非鱼各2个个体均只获得1个单倍型。红罗非鱼和奥利亚罗非鱼各3个个体均获得2个单倍型,单倍型之间的碱基差异分别为6个和1个。其中,尼罗罗非鱼和尼奥罗非鱼单倍型的序列相同,莫桑比克罗非鱼与红罗非鱼的1个单倍型的序列相同。各单倍型序列的位点变异见图1。比对长度包括546个位点,其中有18个变异位点(图1),包括15个简约信息位点和3个单突变子,转换/颠换比为2.7。

	111222222 22333333
	8669023445 56027899
	9789482035 63138901
	ACATACGGTG GTACTACA
尼罗罗非鱼♀×奥利亚罗非鱼♂ (<i>Oreochromis niloticus</i> ♀× <i>O. aureus</i> ♂)	
尼罗罗非鱼 (<i>O. niloticus</i>)
奥利亚罗非鱼单倍型1 (<i>O. aureus</i> haplotype 1)	.TT.G.AAC. C.C.C.T.
奥利亚罗非鱼单倍型2 (<i>O. aureus</i> haplotype 2)	GTT.G.AAC. C.C.C.T.
莫桑比克罗非鱼 (<i>O. mossambicus</i>)	...CGT...A CC....C
红罗非鱼单倍型1 (<i>O. mossambicus</i> × <i>O. niloticus</i> haplotype 1)	...CGT...A CC....C
红罗非鱼单倍型2 (<i>O. mossambicus</i> × <i>O. niloticus</i> haplotype 2)	...CGG.... C..T.G.T

图1 5种罗非鱼的16S rRNA单倍型序列变异位点

Fig. 1 Variable sites in haplotypes of 16S rRNA sequences in the five *Oreochromis* species

2.2 碱基组成和遗传距离

罗非鱼5个种的碱基组成差别不大(表2),平均为T:23.2%,C:24.7%,A:29.4%,G:22.7%,G+C含量为47.4%,低于AT含量。

表2 5种罗非鱼16S rRNA基因部分序列的碱基组成和GC含量

Tab. 2 Base composition and GC content of 16S rRNA partial sequence in the five *Oreochromis* species %

种类	碱基组成				GC含量
	T	C	A	G	
尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	23.3	24.4	29.5	22.9	47.3
奥利亚罗非鱼 <i>O. aureus</i>	23.3	24.7	29.6	22.4	47.1
莫桑比克罗非鱼 <i>O. mossambicus</i>	23.1	24.9	29.3	22.7	47.6
红罗非鱼 <i>O. mossambicus</i> × <i>O. niloticus</i>	23.2	24.7	29.2	22.9	47.6
尼奥罗非鱼 <i>O. niloticus</i> ♀ × <i>O. aureus</i> ♂	23.3	24.4	29.5	22.9	47.3
平均	23.2	24.6	29.4	22.8	47.4

根据Kimura双参数模型得到的尼罗罗非鱼和尼奥罗非鱼遗传距离为0,莫桑比克罗非鱼和红罗非鱼的遗传距离为0.0041。奥利亚罗非鱼分别与莫桑比克罗非鱼和红罗非鱼的遗传距离最大,都为0.0277。

表 3 5 种罗非鱼的 Kimura 双参数遗传距离(对角线下方)及其标准误差(对角线上方)
 Tab.3 Pairwise genetic distance based on Kimura 2-parameter model(below diagonal) and the standard errors (above diagonal)

种类	1	2	3	4	5
1. 莫桑比克罗非鱼 <i>Oreochromis mossambicus</i>	-	0.0016	0.0051	0.0051	0.0072
2. 红罗非鱼 <i>O. mossambicus</i> × <i>O. niloticus</i>	0.0041	-	0.0048	0.0048	0.0070
3. 尼奥罗非鱼 <i>O. niloticus</i> ♀ × <i>O. aureus</i> ♂	0.0144	0.0144	-	0.0000	0.0064
4. 尼罗罗非鱼 <i>O. niloticus</i>	0.0144	0.0144	0.0000	-	0.0064
5. 奥利亚罗非鱼 <i>O. aureus</i>	0.0277	0.0277	0.0214	0.0214	-

2.3 系统发育分析

聚类分析得到的 5 种罗非鱼的 UPGMA、NJ、ME、MP 系统树的拓朴结构相同,这里给出 UPGMA 系统树(图 2)。尼罗罗非鱼与尼奥罗非鱼聚成一支,红罗非鱼与莫桑比克罗非鱼聚为一支,奥利亚罗非鱼独成一支。根据聚类分析结果可将这 5 个(杂)种分为 3 个组,其中尼罗-尼奥罗非鱼组与红罗-莫桑比克罗非鱼组亲缘关系较近,而与奥利亚罗非鱼组相距较远。

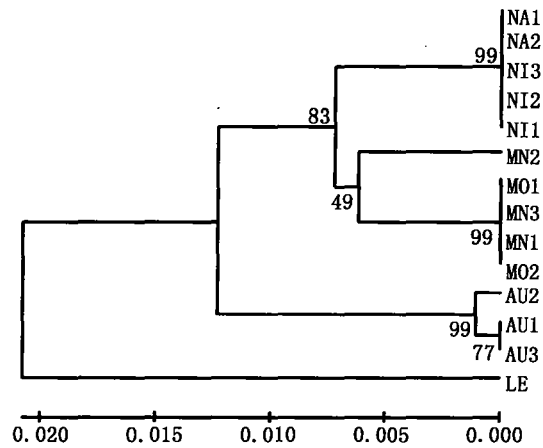


图 2 5 种罗非鱼的 UPGMA 系统树

Fig.2 An UPGMA tree for the five *Oreochromis* species
 MO:莫桑比克罗非鱼;MN:红罗非鱼;NA:尼奥罗非鱼;
 NI:尼罗罗非鱼;AU:奥利亚罗非鱼;
 LE:长体雅丽鱼;1,2,3:代表个体编号

3 讨论

目前,未见国内有关罗非鱼 16S rRNA 序列的报道,而国外也甚少有关罗非鱼属 (*Oreochromis*) 罗非鱼 16S rRNA 序列的研究。Sparks^[11] 报道了罗非鱼 *Tilapia* sp. 的 16S rRNA 序列,Farias 等^[12] 报道了尼罗罗非鱼序列,Sparks 等^[13] 报道了莫桑比克罗非鱼和美味口孵罗非鱼 *Oreochromis esculentus* (Singida tilapia) 的序列,本文首次报道了奥利亚罗非鱼、杂交种尼奥罗非鱼和红罗非鱼的 16S rRNA 序列,可为罗非鱼类的种类鉴别、遗传多样性和分子进化等研究提供基础资料。

红罗非鱼 3 个个体的 2 个单倍型之间碱基相差 6 个,而奥利亚罗非鱼的 2 个单倍型只差 1 个碱基,表明红罗非鱼种内个体之间的差异较大、遗传多样性较高。而尼罗罗非鱼(3 个个体)和莫桑比克罗非鱼(2 个个体)均只有 1 个单倍型,表明它们个体之间的遗传变异比前 2 种更小。尼奥罗非鱼的线粒体由于遗传于母本尼罗罗非鱼,所以尼奥罗非鱼相当于尼罗罗非鱼。由于 2 个尼奥罗非鱼也只有 1 个单倍型,且与尼罗罗非鱼的单倍型序列相同,所以实际上相当于 5 个尼罗罗非鱼个体只有 1 个单倍型,表明尼罗罗非鱼的遗传多样性较低,可能是引种过程中母本数量较少造成的,因为不同引种来源其雌雄亲本数量不同^[14]。聚类分析表明奥利亚罗非鱼与其余 4 种罗非鱼的亲缘关系较远,序列也相差较大,遗传距离达 0.0214 ~ 0.0277,并大于这 4 种罗非鱼之间的差异,原因之一可能与它们的性染色体核型不同有关。奥利亚罗非鱼性染色体核型为 ZW(雌)/ZZ(雄)^[15],而其它 4 种罗非鱼的性染色体核型为 XX(雌)/XY(雄)^[16-17]。这种较大的遗传差异可能是产生杂交优势的遗传基础。但由于本实验中样品量较少,种间遗传多样性差异有待进一步分析。

关于红罗非鱼的起源,说法不一^[18]。大多认为红罗非鱼由莫桑比克罗非鱼的橘红色突变种与正常体色的奥利亚罗非鱼、尼罗罗非鱼或霍诺鲁姆罗非鱼杂交而来^[19-20]。Liao 等认为台湾红罗非鱼是由野生型尼罗罗非鱼与红色莫桑比克罗非鱼杂交选育出来的杂交种^[21],但谁是父、母本未见报道。16S rRNA 基因为线粒体 DNA,表现为母系遗传,因此可用线粒体 DNA 来鉴定亲本关系。在本实验中,其中一条红罗非鱼 16S rRNA 基因序列与莫桑比克罗非鱼完全一致,表明部分红罗非鱼的母本应为莫桑比克罗非鱼,同时也表明红罗非鱼的来源确实比较复杂^[10,15-17]。

参考文献:

- [1] 李思发. 中国大陆罗非鱼养殖业发展对策[J]. 中国渔业经济研究,1999,(1): 13-15.
- [2] 岑剑伟,李来好,杨贤庆,等. 美国罗非鱼贸易现状及展望[J]. 南方水产,2006,2(2): 71-75.
- [3] 胡隐昌,宋平,李懋,等. 尼罗罗非鱼 RAPD 标记及其遗传多样性分析[J]. 华中科技大学学报(自然科学版),30(5): 94-97.
- [4] 许玉德,钟建兴,郑森林,等. 尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼性腺的 RAPD 分析[J]. 厦门大学学报(自然科学版),1999,38(5): 793-796.
- [5] 郭宪光,张耀光,何舜平,等. 16S rRNA 基因序列变异与中国鲮科鱼类系统发育[J]. 科学通报,2004,49(14): 1371-1379.
- [6] 江世贵,张殿昌,吕俊霖,等. 3种野鲮亚科鱼类 16S rRNA 基因序列分析[J]. 南方水产,2005,1(1): 1-5.
- [7] 郭奕惠,黄桂菊,喻达辉. 合浦珠母贝 DNA 的抽提和 RAPD 反应体系的优化[J]. 南方水产,2006,2(4): 59-64.
- [8] Anderson F E. Phylogeny and historical biogeography of the loliginid squids (Mollusca; Cephalopoda) based on mitochondrial DNA sequence data [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2000, 15(2): 191-214.
- [9] Wheeler D L, Chappey C, Lash A E, et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information [J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(1): 10-14.
- [10] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [11] Sparks J S. Molecular phylogeny and biogeography of the Malagasy and South Asian cichlids (Teleostei; Perciformes; Cichlidae) [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2004,30(3): 599-614.
- [12] Farias I P, Orti G, Sampaio I, et al. Mitochondrial DNA phylogeny of the family Cichlidae: monophyly and fast molecular evolution of the neotropical assemblage [J]. Molecular Evolution, 1999,48(6): 703-711.
- [13] Sparks J S, Smith W L. Phylogeny and biogeography of cichlid fishes (Teleostei; Perciformes; Cichlidae) [J]. Cladistics, 2004,20(6): 501-517.
- [14] 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.
- [15] 吴婷婷. 奥利亚罗非鱼养殖和生产潜力[J]. 淡水渔业,1996,(2): 16-18.
- [16] 万松良,黄二春,齐彩霞,等. YY型莫桑比克罗非鱼雌性转化后测交筛选的研究[J]. 水产科技情报,1994,21(5): 195-199.
- [17] 赵永志. 提高奥尼罗非鱼雄性率的主要措施[J]. 水产养殖,2001,(4): 33-34.
- [18] 黄种持,李金秋,钟建兴. 红罗非鱼体色分离及生长的初步观察[J]. 淡水渔业,1997,27(4): 3-6.
- [19] Fitzgerald W J. The red orange tilapia - a hybrid that could become a world favorite [J]. Fish Farming International, 1979, 6(1): 26-27.
- [20] Behrends L L, Nelson R G, Smitherman R O, et al. Breeding and culture of the red-gild color phase of tilapia[J]. Journal of World Mariculture Society, 1982, 13: 210-220.
- [21] Liao I C, Chen T P. Proceedings of the international symposium on tilapia in aquaculture[C]//Status and prosperts of tilapia culture in Taiwan. Nazareth Israel. Tel Aviv University, 1983,588-598.