

文章编号: 1674 - 5566(2011)03 - 0336 - 06

## 基于 D-Loop 序列的罗非鱼选育群体遗传变异分析

颀晓勇<sup>1</sup>, 李思发<sup>2</sup>, 蔡完其<sup>2</sup>

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300; 2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

**摘要:** 对吉富品系尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 不同世代选育群体 D-loop 序列进行测定和分析, 47 个样本经重排比较后获得 902 bp 的同源序列。共检测到 225 个变异位点, 占分析位点数的 24.94%。同源序列中多态位点比例随着选育世代数的累进, 呈现出降低的趋势。核苷酸多样性指数也呈现出同样的降低趋势,  $F_0$ 、 $F_6$ 、 $F_7$ 、 $F_8$ 、 $F_9$  分别为 0.074 02、0.068 72、0.064 15、0.049 52、0.044 55。多态位点比例、核苷酸多样性指数在不同世代间的变化趋势一致表明, 随选育的进展, 选育群体逐步纯化。选育基础群体  $F_0$  与  $F_6$ 、 $F_7$ 、 $F_8$ 、 $F_9$  之间的遗传距离呈增大趋势, 表明较短时间内的人为选择可以造成与长期地理隔离效应相当的群体遗传分化。

**研究亮点:** (1) 长期以来人们不能清晰地理解选育过程中群体内遗传特征所发生的变化。采用现代分子遗传分析手段对罗非鱼选育种群进行遗传特征分析研究, 是对鱼类育种实践的重要理论补充。(2) 控制区序列变异分析表明随选育的进展, 选育群体出现逐步纯化。(3) 采用 D-loop 序列分析可以检测群体选择压力造成的遗传学效应。

**关键词:** 罗非鱼; 选育; D-loop 序列; 遗传变异

**中图分类号:** S 917

**文献标志码:** A

吉富品系尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 由原上海水产大学引进中国之后, 进行了 9 代的选育改良, 成为一个生产性状优良的新品种, 命名为“新吉富罗非鱼”(品种登记号 GS01-001-2005, 农业部公告第 631 号)。采用 DNA 序列测定等现代分子生物学手段, 对选育过程中尼罗罗非鱼遗传差异进行深入研究, 是深入探索新吉富罗非鱼养殖生产性状改良机理需要解决的重要问题。

线粒体 D-环区 (D-loop 区) 又称控制区 (control region), 属于 mtDNA 中的非编码区, 是整个 mtDNA 分子中进化最快的一个区域, 也是 DNA 序列和长度变异最大、最具多态性的区域<sup>[1]</sup>。这些特点使其成为研究鱼类遗传多样性、分子生态学、进化遗传学和保护生物学的重要标记, 被广泛应用于鱼类类群识别、系统关系、起源分化与扩散等领域的研究<sup>[2]</sup>。鉴于选育世代间亲缘关系很近, 笔者选择线粒体 DNA 的 D-loop

区进行分析, 解析良种选育过程对选育群体细胞核外遗传物质遗传变异的影响, 探讨人为干预对群体进化的意义。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

新吉富罗非鱼的基础群体 ( $F_0$ ) 系是 1994 年从菲律宾引进的 5 000 尾尼罗罗非鱼。从 1996 年开展选育, 每年产生一代。本实验的材料是从  $F_0$ 、 $F_6$  ~  $F_9$  共 5 代的选育群体中随机采样各 20 尾, 剪取尾鳍, 分别编号后以 95% 乙醇保存备用。

#### 1.2 基因组 DNA 提取

基因组 DNA 提取参照常规的酚-氯仿抽提程序进行, 并通过琼脂糖凝胶电泳检测提取的 DNA。

#### 1.3 PCR 扩增

控制区扩增采用引物 HN20 和 LN20, 参考 JEAN 等<sup>[3]</sup>。PCR 反应体系为 50  $\mu$ L: 10  $\times$  Buffer

收稿日期: 2010-09-15 修回日期: 2010-11-21

基金项目: 国家“十五”攻关项目(2001BA505B0513)

作者简介: 颀晓勇(1976—), 男, 博士, 研究方向为水产动物种质资源与养殖技术。E-mail: xiexiaoyongsh@sina.com

溶液 5  $\mu\text{L}$ , dNTP 1  $\mu\text{L}$  (10 mmol/ $\mu\text{L}$ ), 上游引物 2  $\mu\text{L}$  (10 pmol/ $\mu\text{L}$ ), 下游引物 2  $\mu\text{L}$  (10 pmol/ $\mu\text{L}$ ), 模板 DNA 2  $\mu\text{L}$  (100 ng/ $\mu\text{L}$ ), *Taq* DNA 聚合酶 1  $\mu\text{L}$  (2.5 U/ $\mu\text{L}$ ), 用去离子灭菌水补足 50  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件为: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 50  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min; 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。

#### 1.4 DNA 测序

PCR 的扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测, 对特异性的 PCR 扩增产物进行纯化。每代各随机取 10 个纯化产物, 由上海生工生物工程技术服务有限公司用 ABI 377 DNA 自动测序仪进行双向序列测定。

#### 1.5 数据处理与分析

用 Blast 软件<sup>[4]</sup> 搜索 GenBank 中尼罗罗非鱼的线粒体 DNA 控制区序列, 与不同选育群体尼罗罗非鱼的序列结果进行比较; 然后用 Bioedit 软件<sup>[5]</sup> 对测序结果进行编辑, 以 Clustl W 软件<sup>[6]</sup> 进行序列重排和同源性比较, 并辅以人工核对校正。用 Dnasp 4.0 软件<sup>[7]</sup> 进行统计分析。用 Arlequin2.0 软件<sup>[8]</sup> 对重排后的序列进行分子方差分析, 计算群体遗传分化指数  $F_{ST}$ , 并用排列测

验法 (Permutation test) 检验  $F_{ST}$  的显著性 (重复次数为 1 000)。应用 Maga 3.0 软件<sup>[9]</sup> 中的 Kimura 2-parameter 模型计算遗传距离。

## 2 结果

### 2.1 PCR 扩增、序列测定及排序结果

选育系不同世代群体线粒体 DNA 控制区 PCR 扩增片段大小约为 1 000 bp 左右。经优化 PCR 反应体系和反应条件后, 随机取选育系 5 个世代共 50 个样本的 PCR 产物纯化后测序, 其中 3 个样本测序没有结果。对其余 47 个扩增片段 (不包括引物及部分端部序列) 经同源重排后的长度 (不包括插入/缺失) 为 902 bp。

### 2.2 不同世代选育群体线粒体 DNA 控制区序列的碱基组成

在 902 bp 序列中, 选育系尼罗罗非鱼线粒体控制区序列中 A、T、G、C 4 种碱基的组成分别为 32.0%、32.7%、14.1%、21.1%, A + T 含量 (64.8%) 高于 G + C 含量 (35.2%) (表 1), A、T 含量较为接近, 符合脊椎动物线粒体 DNA 基因片段碱基组成的特点<sup>[10]</sup>。

表 1 吉富品系尼罗罗非鱼 5 个选育群体控制区的碱基组成

Tab.1 Base composition of control region of five populations of GIFT strain Nile tilapia

世代	碱基组成/%				
	A	T	G	C	G + C
F <sub>0</sub>	32.0	32.9	14.2	20.9	35.1
F <sub>6</sub>	31.8	32.4	14.2	21.6	35.8
F <sub>7</sub>	32.1	32.8	14.0	21.2	35.2
F <sub>8</sub>	32.4	32.8	13.9	20.9	34.8
F <sub>9</sub>	31.9	32.8	14.2	21.1	35.3
平均	32.0	32.7	14.1	21.1	35.2

吉富罗非鱼不同世代选育群体中, 902 bp 长度的同源序列中共检测到 225 个变异位点, 占分析位点数的 24.94%。通过 Mega 3.0 软件, 统计

控制区序列变异位点在不同选育世代群体中的分布, 结果见表 2。其中, 转换数均大于颠换数, 转换/颠换比率平均为 1.64。

表 2 吉富品系尼罗罗非鱼 5 个选育群体控制区基因序列变异位点数

Tab.2 Number of sequence variation of control region in five populations of GIFT strain Nile tilapia

参数	F <sub>0</sub>	F <sub>6</sub>	F <sub>7</sub>	F <sub>8</sub>	F <sub>9</sub>
转换数	35	37	43	28	25
颠换数	22	25	25	17	14
转换/颠换比率	1.6	1.5	1.7	1.6	1.8

### 2.3 不同世代选育群体遗传结构

五世代尼罗罗非鱼群体内线粒体 DNA 中控制区的单倍型多样性见表 3。在 47 个样本共有 43 种单倍型,单倍型频率为 91.49%,单倍型多样性( $h$ )在 0.867~1.000 之间,表明选育系中单倍型类型丰富。

吉富品系尼罗罗非鱼 5 个选育群体控制区序列所反映的基因多态性见表 3。同源序列中多

态位点比例在  $F_0$  最高,达 19.84%,随选育世代数的累进多态位点比例呈现出降低的趋势, $F_6$ 、 $F_7$ 、 $F_8$ 、 $F_9$  分别为 16.85%、15.52%、15.08%、11.97%。核苷酸多样性指数也呈同样的降低趋势, $F_0$ 、 $F_6$ 、 $F_7$ 、 $F_8$ 、 $F_9$  分别为 0.074 02、0.068 72、0.064 15、0.049 52、0.044 55。多态位点比例、核苷酸多样性指数的差异一致表明随选育的进展,选育群体逐步纯化。

表 3 吉富品系尼罗罗非鱼 5 个选育群体控制区基因单倍型多样性和基因多态性  
Tab.3 Haplotype diversity ( $h$ ) and nucleotide sequence diversity of control region in five populations of GIFT strain Nile tilapia

参数	$F_0$	$F_6$	$F_7$	$F_8$	$F_9$
样本数	10	8	9	10	10
单倍型数	10	7	9	10	7
单倍型多样性( $h$ ,平均值±标准差)	1.000±0.045	0.964±0.077	1.000±0.052	1.000±0.045	0.867±0.107
多态位点比例/%	19.84	16.85	15.52	15.08	11.97
核苷酸多样性指数( $\pi$ ,平均值)	0.074 02	0.068 72	0.064 15	0.049 52	0.044 55

基于吉富品系尼罗罗非鱼 5 个选育群体控制区序列差异的遗传距离见表 4。从表中可以看出, $F_6$  与选育基础群体  $F_0$  的遗传距离最小,为 0.047 89,随选育的进展, $F_7$ 、 $F_8$ 、 $F_9$  与  $F_0$  的遗传

距离呈现出增大的趋势,分别为 0.054 66、0.070 80、0.089 13。 $F_6$  到  $F_9$  选育群体与基础群体  $F_0$  之间的遗传分化指数在 0.032 08~0.327 70 之间,变化范围较大。

表 4 吉富品系尼罗罗非鱼 5 个选育群体间控制区基因序列的平均遗传距离(左下角)和遗传分化指数(右上角)  
Tab.4 Average genetic distances(below diagonal) and fixation index ( $F_{ST}$ ) (above diagonal) from control region among five populations of GIFT strain Nile tilapia

	$F_0$	$F_6$	$F_7$	$F_8$	$F_9$
$F_0$	-	0.032 08	0.039 65	0.131 03	0.327 70
$F_6$	0.047 89	-	0.049 31	0.097 37	0.265 58
$F_7$	0.054 66	0.050 32	-	0.021 78	0.192 14
$F_8$	0.070 80	0.064 47	0.070 04	-	0.024 02
$F_9$	0.089 13	0.076 77	0.082 45	0.067 76	-

对吉富品系尼罗罗非鱼 5 个选育群体线粒体控制区序列差异进行分子方差分析,结果见表 5。在控制区序列差异所体现的遗传变异中,

10.74% 来自群体间的遗传差异,89.26% 来自于群体内的遗传差异。

表 5 吉富品系尼罗罗非鱼 5 个选育群体间控制区基因序列遗传差异的 AMOVA 分析  
Tab.5 AMOVA of five populations of GIFT strain Nile tilapia

变异来源	自由度	方差总和	变异组分	所占比例/%
群体间	4	271.173	3.831 24 Va	10.74
群体内	42	1337.486	31.844 91 Vb	89.26
总和	46	1608.660	35.676 15	

### 3 讨论

系统的选择育种是农业生产中有效的育种手段之一,但有关鱼类选育群体遗传结构分析的研究报道却极少,人们对选育群体遗传性状的变化情况所知有限。在多种遗传分析手段中,LEE 等<sup>[11]</sup>发现对于探讨快速进化的物种时 D-loop 区相对其它 DNA 区域提供的信息可能更有价值。用 D-loop 区来进行亲缘关系较近种类间的系统关系和快速物种形成的探讨,已成为种群遗传结构与分子进化研究的一个重要方面<sup>[2]</sup>。但是到目前为止尚无有关通过 D-loop 区的研究来分析选择育种群体遗传结构的报道。对于罗非鱼类,仅李培等<sup>[12]</sup>研究报道了杂交罗非鱼 D-loop 区的多态性及母系遗传,张传涛等<sup>[13]</sup>采用 RAPD 研究了选育系  $F_6$  的遗传差异,颀晓勇等<sup>[14]</sup>对选育群体采用微卫星方法的分析表明持续的选育过程已在罗非鱼选育世代间造成程度虽小但却可监测到的遗传分化。

李培等<sup>[12]</sup>对奥利亚罗非鱼、尼罗罗非鱼及其杂交子代 3 个群体的 D-loop 区分析结果中突变位点比例为 14.9%,低于本研究中变异位点比例 24.94%,原因可能是其所用的研究材料来自养殖场的杂交生产父、母本群体。在人工繁育过程中由于亲本数量的限制和遗传漂变,导致一些多态和稀有位点的丢失,隐性纯合位点数增加,使人工繁殖群体遗传多样性降低<sup>[15]</sup>。而本研究的材料源自 4 个非洲原产地的野生群体和 4 个养殖群体经种内混合杂交选育而成,而且引入我国的群体数量较大,同时在选育进程中采取了严格的选育措施,整个选育工作分置于华北、华东、华南 3 个基地进行,以尽可能避免近亲交配的发生<sup>[16]</sup>。因此本研究材料具有广泛的遗传基础和丰富的遗传异质性。

采用 mtDNA 来衡量种群的遗传变异时有两个重要的指标:一个是平均遗传距离,另一个是核苷酸多样性。由于核苷酸多样性计算中考虑了各种单倍型在群体中所占的比例,因此在反映一个群体的 mtDNA 多态程度时比单纯用遗传距离的平均值要准确<sup>[17]</sup>。本研究中 5 个选育世代呈现出单倍型多样度高(0.867 ~ 1.000)而核苷酸多样性低(0.044 55 ~ 0.074 02)的特点,这可能是由于在一个较短的历史时期内,群体内部因

少量的碱基突变即可使单倍型多样性得到快速积累,而对于核苷酸多样性的累积贡献却不明显<sup>[18]</sup>,这种状况在对不同地理群体松江鲈鱼 (*Trachidermus fasciatus*)<sup>[19]</sup>、鳊鱼 (*Engraulis japonicus*)<sup>[20]</sup> 研究中也存在。

一个物种遗传多样性的高低与其适应能力、生存能力和进化潜力密切相关。遗传多样性为物种的适应能力、生存能力和进化潜力提供了潜在的遗传基础和储备<sup>[21]</sup>。本研究对尼罗罗非鱼选育群体线粒体 DNA 中控制区序列的多态位点比例、核苷酸多样性指数和平均核苷酸差异数等指标分析表明,随选育世代数的累进,选育群体内遗传差异逐代减小,在选育过程中没有出现瓶颈效应,选育系逐步趋于纯化, $F_9$  代新吉富罗非鱼仍保持一定程度的遗传多样性水平,即系统选育在提高群体生长速度表型的同时,逐渐地提高了罗非鱼选育群体的遗传稳定性。

不同群体间的遗传距离反映了其分化状况的程度,而一个群体内的遗传距离反映了该群体的遗传多样性<sup>[22]</sup>。本研究基于控制区序列差异计算的  $F_6$ 、 $F_7$ 、 $F_8$ 、 $F_9$  与选育基础群体  $F_0$  之间遗传距离表现出逐代增大的趋势。而 AMOVA 分析结果显示遗传差异主要来自于群体内部(89.26%),来自群体间的遗传差异占 10.74%,表明选育过程中近交及瓶颈效应发生的可能性不大,群体遗传结构的改变主要是由人工选择的压力造成的。根据群体遗传学研究的观点,引起群体分化另外一个重要的原因是遗传漂变和自然选择的作用<sup>[23]</sup>。吴常文等<sup>[24]</sup>对中国沿海鳊鱼 (*Ilisha elongata*) 4 个不同地理群体研究发现青岛群体与广州、厦门、舟山 3 个群体间的遗传分化指数达到 0.528 4,表明青岛群体已经因为地理局限与其它群体之间产生了明显的遗传分化,推算分化时间大体在 11.5 ~ 15.3 万年前的更新世晚期。本研究对选育过程中世代间遗传差异的研究表明,不到 10 年的人为选择有效地改变了群体内的遗传结构,有可能促进群体内产生新的遗传平衡,在较短时间内造成与长期地理隔离效应相当的群体遗传分化,与采用微卫星方法研究所得到的结果<sup>[14]</sup>可以互相印证。

### 参考文献:

- [1] MORITZ C, DOWLING T E, BROWN W M. Evolution of animal mitochondrial DNA relevance for population biology

- and systematics[J]. Annual Review of Ecology Evolution and Systematics, 1987, 18: 269-292.
- [2] 谢振宇,杜继增,陈学群,等. 线粒体控制区在鱼类种内遗传分化中的意义[J]. 遗传,2006,28(3): 362-368.
- [3] JEAN F A, BEATRICE A G, EDDIE K A, et al. Genetic differentiation among natural populations of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae)[J]. Heredity, 1997, 79: 88-96.
- [4] ALTSCHUL S F, THOMAS L M, ALEJANDRO A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(17): 3389-3402.
- [5] HALL T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. Nucleic Acids Symposium Series, 1999, 41: 95-98.
- [6] THOMPSON J D, HIGGINS D G, GIBSON T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. Nucleic Acids Research, 1994,22(22): 4673-4680.
- [7] ROZAS J, SANCHEZ-DELBARRIO J C, MESSEGUER X, et al. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods [J]. Bioinformatics, 2003, 19(18): 2496-2497.
- [8] SCHNEIDER S, ROESSLI D, EXCOFFIER L. ARLEQUIN Version 2.000: a software for population genetics data analysis[M]. Switzerland: Genetics and biometry laboratory, University of Geneva, 2000.
- [9] KUMAR S, TAMURA K, NEI M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment briefings[J]. Bioinformatics, 2004, 5(2): 150-163.
- [10] MEYER A. Evolution of mitochondrial DNA in fishes[M]// Hochachka P W Mommsen T P. The biochemistry and molecular biology of fishes. Amsterdam: Elsevier, Amsterdam, 1993: 1-38.
- [11] LEE W J, CONROY J, HOWELL W H. Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions[J]. Journal of Molecular Evolution, 1995, 41(1): 54-66.
- [12] 李培,刘丽,谭围,等. 奥尼罗非鱼杂交子代及亲本 mtDNA D-loop 基因序列的多态性[J]. 广东海洋大学学报,2009, 29(6): 12-15.
- [13] 张传涛,李思发,颀晓勇. 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[J]. 上海水产大学学报, 2007,16(1): 7-10.
- [14] 颀晓勇,李思发,蔡完其. 吉富品系尼罗罗非鱼选育过程中遗传变异的微卫星分析[J]. 水产学报,2007,31(3): 385-390.
- [15] 韩晓磊,徐建荣,李小蕊,等. 感鱼群体遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 南京师范大学学报:自然科学版,2009,32(1): 110-114.
- [16] 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.
- [17] 周慧,李迪强,张于光,等. 藏羚羊 mtDNA D-loop 区遗传多样性研究[J]. 遗传,2006,28(3): 299-305.
- [18] AVISE J C. Phylogeography the History and Formation of Species[M]. Cambridge, Massachusetts London, England: Harvard University Press, 2000: 447-448.
- [19] 刘海林,章群,唐优良,等. 黄渤海松江鲈鱼线粒体控制区结构与序列多态性分析[J]. 海洋通报,2010,29(3): 283-288.
- [20] YU Z N, KONG X Y, GUO T H, et al. Mitochondrial DNA sequence variation of Japanese anchovy *Engraulis japonicus* from the Yellow Sea and East China Sea [J]. Fisheries Science, 2005, 71(2): 299-307.
- [21] 季维智,宿兵. 遗传多样性研究的原理与方法[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社,1999.
- [22] 杨博,陈小勇,杨君兴. 白鱼线粒体 DNA 控制区结构和种群遗传多样性分析[J]. 动物学研究,2008,29(4): 379-385.
- [23] 郑向忠,徐宏发,陆厚基. 动物种群遗传异质性研究进展 [J]. 生物多样性,1997,5(3): 210-216.
- [24] 吴常文,许逸天,吕振明,等. 基于 D-LOOP 基因的中国沿海鳊鱼 (*Ilisha elongata*) 种群遗传结构研究[J]. 海洋与湖沼,2009,40(3): 330-337.

## Analysis of genetic diversity of tilapia during selection processing based on D-loop sequence

XIE Xiao-yong<sup>1</sup>, LI Si-fa<sup>2</sup>, CAI Wan-qi<sup>2</sup>

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, Guangdong, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** The mtDNA control region of GIFT strain *Oreochromis niloticus* in F<sub>0</sub>, F<sub>6-9</sub> generation were amplified and sequenced. 225 loci were polymorphic and accounted for 24.94% in 902 base pairs of 47 samples. The ratio of polymorphic loci was highest in F<sub>0</sub>, and decreased with selection processing. Nucleotide diversity index were 0.074 02, 0.068 72, 0.064 15, 0.049 52, 0.044 55 for F<sub>0</sub>, F<sub>6</sub>, F<sub>7</sub>, F<sub>8</sub>, F<sub>9</sub>, respectively. The ratio of polymorphic loci, nucleotide diversity index among these five generations showed that the selected populations were getting purer after selection procession. Genetic distances between F<sub>0</sub> and these four selected populations were increased with selection procession, which suggested that selection could result in genetic differentiation just as caused by long-term geographical isolation.

**Key words:** tilapia; selection; D-loop sequence; genetic diversity