

罗非鱼 mtDNA D-loop 区部分序列结构和种群遗传多样性分析

吴长敬^{①②} 邹芝英^① 杨弘^{①*} 李大宇^① 祝璟琳^① 肖炜^①

(^① 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心 农业部淡水鱼类遗传育种和养殖生物学重点开放实验室 无锡 214081; ^② 南京农业大学无锡渔业学院 无锡 214081)

摘要: 采用 PCR 扩增和测序的方法获得了尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 埃及品系 (简称 AJ 22 尾)、88 品系 (简称 XH 26 尾) 和奥利亚罗非鱼 (*O. aureus*) (简称 ALY 28 尾) “夏奥 1 号”线粒体 DNA 控制区 (mtDNA D-loop) 的部分序列 (575~581 bp)。对照其他已报道的鱼类控制区结构,对序列结构进行分析,成功识别了罗非鱼 mtDNA D-loop 区序列的中央保守区和保守序列区,找到了 4 个特征序列 (CSB-D、CSB1、CSB2、CSB3)。76 个个体共检测出 28 个单倍型。AJ 群体有 12 个单倍型, XH 群体有 10 个单倍型, ALY 群体存在 9 个单倍型。其中 3 个群体共享 1 个单倍型 (XH06), AJ 和 XH 群体共享一个单倍型 (XH10), 其他为各个群体独有。AJ 和 XH ($N_m = 0.77$)、AJ 和 ALY ($N_m = 0.02$)、XH 和 ALY ($N_m = 0.02$) 之间均存在一定的遗传分化。AJ 和 XH 的核苷酸多态性 (P_i) 值 (分别为 0.042 4、0.031 1) 明显高于 ALY 的 P_i 值 (0.001 2)。本实验中的 ALY 品种纯度高, AJ 和 XH 的遗传多样性较丰富。mtDNA D-loop 区能反映出罗非鱼群体的种质特征, 适用于罗非鱼群体内的遗传多样性研究。

关键词: 罗非鱼; mtDNA; D-loop 区; 遗传多样性

中图分类号: Q953 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2010) 05-121-08

Structure of the Mitochondrial DNA D-loop Region and Analysis of Genetic Diversity in Different Strains of Tilapia (*Oreochromis*)

WU Chang-Jing^{①②} ZOU Zhi-Ying^① YANG Hong^{①*} LI Da-Yu^①
ZHU Jing-Lin^① XIAO Wei^①

(^① Key Laboratory of Genetic Breeding and Aquaculture Biology of Freshwater Fishers, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081;

^② Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China)

Abstract: The partial mitochondrial DNA D-Loop sequence was amplified in two populations (Egyptian and 88 strain) of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (AJ and XH) and Blue tilapia ('Xia'ao No. 1', *O. aureus*) (ALY) by PCR technique. The length of this region was 575–581 bp. Compared with its homology, one conserved block (CSB-D) in the central conserved sequence block domain (CSB) and three conserved sequence blocks (CSB1, CSB2, CSB3) in the conserved sequence block domain (CSB) were successfully

基金项目 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (No. 2007JBFA02), 国家科技支撑计划专题 (No. 2006BAD01A1202), 2007 年公益性行业 (农业) 科研专项 (No. 3-49), 现代农业产业技术体系建设专项资金 (No. nycytx-48), 农业部水生生物遗传育种和养殖生物学重点开放实验室开放基金课题 (No. BM2007-14), 国家重点基础研究发展计划 973 计划项目 (No. 2004CB117401);

* 通讯作者, E-mail: yangh@ffrc.cn;

第一作者介绍 吴长敬, 女, 硕士; 研究方向: 生物技术和遗传育种; E-mail: wuchangjing2003@126.com。

收稿日期: 2010-02-22, 修回日期: 2010-04-27

identified. A total of 28 haplotypes were detected in 76 individualities. The number of haplotypes was 12 in the AJ population, 10 in the XH population and 9 in the ALY population. Only one haplotype (XH06) was shared by three populations, and one haplotype (XH10) was shared by AJ and XH populations. Genetic diversity analysis indicated some genetic differentiations between AJ and XH ($N_m = 0.77$), AJ and ALY ($N_m = 0.02$), as well as XH and ALY ($N_m = 0.02$). The nucleotide diversity (P_i) of AJ (0.042 4) or XH (0.031 1) was higher than that of ALY (0.001 2). It could be concluded that the purity of ALY was much higher, and that AJ and XH had a high level genetic diversity. The mtDNA D-Loop region could reflect the genetic resource characteristics and could be used to study genetic diversity of tilapia populations.

Key words: Tilapia (*Oreochromis*); mtDNA; D-loop region; Genetic diversity

罗非鱼 (*Oreochromis*) 为鲈形目 (Perciformes) 丽鱼科 (Cichlidae) 温水性鱼类, 原产于非洲, 具有生长快、繁殖力强、食性杂、抗病力强等优点, 是联合国粮农组织向全世界推广的优良品种, 也是我国水产品出口创汇的主力品种。根据罗非鱼的遗传特性及生产的需要, 目前国内外多以雄性率较高的奥尼鱼 (尼罗罗非鱼 ♀ × 奥利亚罗非鱼 ♂) 为主要的养殖对象^[1]。罗非鱼除了存在性成熟早、繁殖周期短、生殖频繁等缺点外, 其种间杂交很容易进行, 并且杂交可育, 易发生种质退化。因此, 了解罗非鱼的种质情况对做好该鱼种的保种工作并保护种群的遗传多样性具有非常重要的意义。

动物线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 是共价闭合的环状双螺旋 DNA, 是细胞核外具自主复制、转录和翻译能力的遗传因子, 具有分子量小、结构简单、进化速度快、高度多态、母性遗传等特点, 被广泛应用于种群的进化研究和遗传多样性分析中^[2]。mtDNA D-loop 区是线粒体基因组中变异最大、进化最快的区域, 具有较高的突变积累, 因而比较适用于种内、种群或个体间遗传多样性的研究。近年来, 许多学者对很多鱼类的线粒体控制区自身结构以及种内种群遗传结构和遗传分化进行了大量的研究^[3-6]。本研究采用 PCR、克隆结合 DNA 测序技术对 3 个人工养殖的罗非鱼群体, 尼罗罗非鱼埃及品系 (Egyptian *Oreochromis niloticus*)、88 品系 (88 strain *O. niloticus*) 和奥利亚罗非鱼“夏奥 1 号” (‘Xia’ao No. 1’ *O. aureus*) 的线粒体 DNA 控制区的部分序列进行了分析, 以期根据它们的序列多态性来揭示罗

非鱼不同种群、不同群体的遗传多样性, 了解罗非鱼的种质现状, 为罗非鱼的育种工作提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料 尼罗罗非鱼埃及品系 (AJ) 是 1999 年淡水渔业研究中心从埃及农业和农垦部水产研究中心实验室引进并经多代选育以后的尼罗罗非鱼品系。88 品系尼罗罗非鱼 (XH) 是 1988 年湖南湘湖渔场从埃及尼罗河阿斯旺坝下游引进, 经过多代选育后的尼罗罗非鱼品系。“夏奥 1 号”奥利亚罗非鱼 (ALY) 是淡水渔业研究中心培育并获全国水产原种和良种审定委员会审定通过的新品种。3 个群体保存于中国水产科学院淡水渔业研究中心国家罗非鱼现代产业技术体系研发中心。于 2008 年 6 月, 分别对 2 龄的 AJ、XH 和 ALY 群体随机采集了 22 尾、26 尾和 28 尾鱼的血样, -70°C 保存备用。

PCR 反应试剂、DNA 胶回收试剂盒和小剂量抽提质粒试剂盒、pMD19-T 载体、*EcoR* I 和 *Pst* I 内切酶等购自大连宝生物工程有限公司 (TaKaRa), DH5 α 由本实验室保存。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 基因组 DNA 的提取与 mtDNA D-loop 区的 PCR 扩增 取 50 μl 血样, 用等体积苯酚氯仿法抽提总 DNA, 将得到的基因组 DNA 中加适量的 0.1 \times TE 缓冲液溶解, 4°C 保存。

本实验拟扩增并测定罗非鱼线粒体 D-loop 区的序列, 选择了用于扩增 mtDNA D-loop 序列的 4 对引物 344F 与 PHE1R、P1 与 P2、L15923 与 H1067、DF1 与 DR1^[4,7-9], 引物由上海博彩

生物科技有限公司合成。通过进行温度梯度筛选实验,从中选取了较稳定的一对引物 344F: 5'-CTATTACTGGCATCTGGTTCC-3' 和 PHE1R: 5'-ACATCTTCAGTGTACGCTT-3' 进行 PCR 扩增^[4]。PCR 反应体系 (50 μ l): 10 \times PCR (+ Mg²⁺) 缓冲液 5 μ l, dNTP (2.5 mmol/L) 4 μ l, *r-Taq* 酶 2 U, 344F、PHE1R (5 μ mol/L) 均为 4 μ l, 模板 1 μ l (约 10 ng), 最后补充灭菌去离子水至 50 μ l。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 每个循环包括 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 39 个循环; 最后一次循环结束后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.3 PCR 产物纯化与目的片段的克隆及测序

扩增产物用 Spin Column 柱式 DNA 胶回收试剂盒回收纯化目的片段, 连接到 pMD19-Tvector 上, 并转化到 DH5 α 菌株中进行扩大培养。使用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Pst* I 进行双酶切检测阳性克隆。将确定为阳性克隆的菌液送上海基康生物技术有限公司进行正反向测序。

1.4 序列分析

将测定的序列通过 BioWire 软件包去除引物及载体序列, 并进行人工校正。用 BioEdit 软件编辑序列, 并在 GenBank 中进行 BLAST 分析, 确定得到的为罗非鱼线粒体控制区序列。利用 Clustal X (1.81) 程序默认的设置参数对测得的序列进行同源序列比对分析, 确定序列的位置并对其结构进行分析。利用 MEGA 3.1 软件包分析序列特征, 统计碱基组成和转换与颠换值, 计算遗传差异和遗传距离等, 并构建系统树, 系统树各分支的置信度由 1 000 次 Bootstrap 自展法检验。通过 DnaSP 3.14 软件统计种群的遗传多样性参数 K_{xy} (群体间平均核苷酸差异数)、GammaST (群体间遗传分化系数)、 F_{ST} (遗传分化指数)、 D_{xy} (群体间核苷酸的分歧度)、 D_n (核苷酸净遗传距离) 以及群体间的基因流 N_m 值。

2 结 果

2.1 PCR 扩增结果

在对罗非鱼 mtDNA D-loop 扩增时, 选择 344F 和 PHE1R 这对引物, 并对同一个样品进行了退火温度梯度实验 (48.0、

48.9、51.8、55.6、59.3、61.9 $^{\circ}$ C), 结果显示, 该引物扩增产物大小在 600 bp 左右, 且在各个退火温度条带亮度变化不大 (图 1), 所以选择了中间的 55 $^{\circ}$ C 作为退火温度。PCR 扩增结果形成的电泳条带单一, 未发现非特异性条带。在进行群体扩增时, 实验结果重复性好。

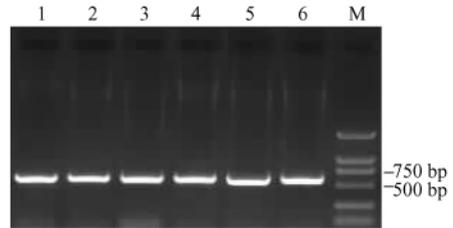


图 1 mtDNA 控制区部分序列 PCR 结果

Fig.1 The amplification result of mtDNA control region partial sequence

M: DL2000 DNA 分子量标准; 1~6: ALY 群体 1 号样品退火温度依次为 48.0、48.9、51.8、55.6、59.3、61.9 $^{\circ}$ C 的 PCR 产物。

M: DL2000 DNA marker; 1-6: PCR product of No. 1 sample in ALY. Annealing temperatures were 48.0, 48.9, 51.8, 55.6, 59.3, 61.9 $^{\circ}$ C in turn.

2.2 罗非鱼 D-loop 区部分序列结构特征

经 Clustal X 比对分析本实验测序所得到的罗非鱼 mtDNA D-loop 序列与从 GenBank 下载的尼罗罗非鱼 (GU238433) 同源序列, 确定本实验中的序列为靠近 tRNA^{phe} 端的一部分序列, 长度为 575~581 bp (去除载体和引物序列), 部分序列出现碱基插入/缺失现象, 导致序列出现长度的多态性。序列递交 GenBank, 序列号为: GQ421259~GQ421280。序列碱基组成见表 1, 3 个群体的碱基组成基本一致, 没有显著变化。A、G、T、C 的平均含量分别为 28.8%、15.4%、35.4%、20.4%, 可见其中碱基 T 的含量最高, 碱基 G 的含量最低。A + T (平均为 64.2%) 的含量明显高于 G + C (平均为 35.8%) 的含量。

鱼类 mtDNA D-loop 区一般分为三个部分: 终止序列区 (termination associated sequences, TAS)、中央保守区 (central conserved sequence block, CSB) 和保守序列区 (conserved sequence block, CSB)。参照其他鱼类控制区结构的分

表 1 罗非鱼 mtDNA 控制区部分序列碱基组成 (%)
Table 1 Nucleotide compositions of mtDNA control region in tilapia

Table with 7 columns: 群体 Population, A, G, T, C, A+T, G+C. Rows include AJ, XH, ALY, and Average.

AJ: 埃及尼罗罗非鱼群体; XH: 88 品系尼罗罗非鱼群体; ALY: “夏奥 1 号” 奥利亚罗非鱼群体。下表同。

AJ: Egyptian O. niloticus population; XH: 88 strain O. niloticus population; ALY: ‘Xia’ao No. 1’ O. aureus population. The same in the following table.

TCTATTACTGGCATCTGGTTCCTATTTCAGGTCCAATAATTGTTATAATTCGCCATCTT 60
CSB-D
TCATCGACGCTTGCATAAGTTAATGGTGTCAATACATACTCCTCATTACCCAACATGCCG 120
AGCGTTCTTCCAGAGGATAGGGGGTTTCTCTTTTTTTTTTCTTTTCACTTGGCATTTC 180
AGAGTGCATACAGAAATGACAGACAAGGTTGAACATTTTCCTTGCTTGAAGTAAATAGT 240
ATGAATGATAGAAGACATTGATAGAAGTATTGCATAACTGATATCTAGAGCATAAAGTTC 300
CSB1
AATCAAATATTTCAATTTTCTCCTAATTTTTCTATTATCTCTCGGTTTTTTCGGCGCTAA 360
ACCCCTTACCCCTACCCCTACCCCTCCTAAGATCTCTAATACTCTGCAAAACCCCTCGGAAA 420
CSB2 CSB3
CAGGAAAAGCTCTAGAAGTGACTTTTAGCGCTTCAGTTTATGCATGTTATATTACTTAAT 480
GTGTGTATAATGAGTATATCAATGACGGGCCATATAATCCAAATGTGTGTATATTATAAT 540
ATTATAATATTGCACATGCTAGCGTAGCTTAAC 575

图 2 罗非鱼 mtDNA D-loop 区部分序列结构

Fig. 2 Structure of mtDNA D-loop region partial sequence in tilapia

2.3 罗非鱼群体遗传结构的分析 多态位点分析结果(表 2、图 3)表明:3 个群体的碱基替换均明显大于插入或缺失,碱基替换中转换大于颠换。AJ 和 XH 的多态位点高于 ALY。76 个个体共检测到 80 个变异位点,占全序列的 13.8%,其中 24 个为单一多态位点,50 个为简约信息位点,转换为 57 个,颠换为 17 个,转换与颠换的比(TS/TV)为 3.4。有 4 个插入或缺失(位点:233、253、360、419),1 个插入(380

析结果[6],推测出本实验得到的罗非鱼 D-loop 区序列属于中央保守区的一部分和保守序列区,以 CSB-D 开始,以 CSB1 作为中央保守区和保守序列区的分界线。全部序列放在一起比对分析,识别了 4 个比较保守的特征序列,分别为中央保守区的 CSB-D 和保守序列区的 CSB1、CSB2、CSB3,图 2 以 AJ 群体其中的一个单倍型为例列出了各个特征序列的情况,其中 CSB2 和 CSB3 富含 AC,CSB1 具有“GAGCATA”特征序列。

位)和 1 个缺失(162 位)。碱基替换与插入或缺失的比为 12.3。

76 个个体共检测出 28 个单倍型,AJ 群体有 12 个单倍型,XH 群体有 10 个单倍型,ALY 群体存在 9 个单倍型,其中 3 个群体共享一个单倍型(AJ04、XH06、ALY03),AJ 和 XH 两个群体共享一个单倍型(AJ05 与 XH10),其他为各个群体独有。

2.4 群体遗传多样性参数的统计 群体遗传

表 2 罗非鱼 mtDNA D-loop 区部分序列变异情况

Table 2 Variations of mtDNA control region partial sequence in tilapia

Table with 6 columns: 群体 Population, 转换 Transition, 颠换 Transversion, 插入/缺失 Insert/deletion, 多态位点比例(%) Ration of polymorphic site, 单倍型数 Number of haplotypes. Rows include AJ, XH, ALY, and Total.

```

!Domain=Data;
[      1111111222 2222222222 2223333333 3333333344 4444444444 4444445555 5555555555]
[      2333345679 0223677334 4455566668 9991223344 4556668900 1233455567 7788990011 1222222567]
[      5356830560 0145208234 5803701398 1784287918 9020480539 9417806800 1218565645 6123468570]
AJ06  CTAATCTTT TAAATTCAC GGGTTTCAA GGATTCCATT TCGTCCCTT CGATACTTAA AATTATTTTA TCTATTTTCA
ALY01 .....T-... .A.....
XH03 .....T.C... .A.....
ALY08 .....C.... .A.....
XH07 .....-... .A.....C...
ALY06 .....C.-... .A.....
ALY05 .....-... .A.....C...
XH06 .....-... .A.....
XH09 .....C.... .A.....
XH08 .....-... .A.....
XH05 .....-... .A.....C...
ALY04 ...T.C... .A.....
ALY07 .....G.... .A.....
ALY09 ..C..... .A.....
ALY02 .....C.... .A.....
AJ02 .....G.... .A.....
AJ07 ..C.T.... .G.... .A.....
AJ08 TC...TC.C..G..CTGTA AAA-C.GTT. .AGC.TTTC. .TT-..-CC -A.ATT..GG TT..GCCAGG CTATCA..G.
AJ12 TC...TCCC..G..CTGTA AAA-C.GTT. .AGC.TTTC. .TT-..-CC -A..TT..GG TT..GCCAGG CTATCA...
AJ01 TC...TC.C..G..CTGTA AAA-C.GTT. .AGC.TTTC. .TT-..-CC -A..TT.CGG TT..GCCAGG CTATCA...
AJ10 TC...TC.C..G..CTGTA AAA-C.GTT. .AGC.TTTC. .TT-..-CC -A..TT..GG TT..GCCAGG CTATCA...
AJ09 TCC...TC.C..G..CTGTA AAA-C.GTT. .AGC.TTTC. .TT-..-CC -A..TT..GG TT..GCCAGG CTATCA...
AJ11 TC...TC.C..GGG-C.GTA AAA-C.GTT. .AGC.TTT.. .TT-..-CC -AG.TT..GG TTC.GCCAGG CTATCA...G
AJ03 TC...TC.C..GGG.C.GTA AAA-C.GTTG .AGC.TTT.. .TT-..-CC -A..TTC.GG TT.GCCAGG CTATCA...
XH10 TC...TC.C..GGG-C.GTA AAA-C.GTT. .AGC.TTT.. .TT-..-CC -A..TT..GG TT..GCCAGG CTATCA...
XH02 TC...TC.C..GGG.CTGTAAA AAA-C.GTT. .AGC.TTT.. .TT-..-CC -A..TT..GG TT..GCCAGG CTATCA...
XH01 TCC...TC.C..GGG-CTGTAAA AAA-C.GTT. .AGC.TTT.. .TT-..-C. -A..TT..GG TT..GCCAGG CTATCA...
    
```

图 3 罗非鱼 mtDNA D-loop 区部分序列变异情况

Fig. 3 Variations of mtDNA D-loop region partial sequence in tilapia

AJ01 ~ AJ12: AJ 的 12 种单倍型; XH01 ~ XH10: XH 的 10 种单倍型; ALY01 ~ ALY09: ALY 的 9 种单倍型; 点(.)表示与第一条序列相同 短横线(-)表示插入或缺失。

AJ01 - AJ12: the twelve haplotypes of AJ; XH01 - XH10: the ten haplotypes of XH; ALY01 - ALY09: the nine haplotypes of ALY; Identity with the first sequence is denoted by dots (•) and insertion/deletion position is denoted by short horizontal lines (-).

多样性参数结果(表 3)表明,各群体的核苷酸多态性(P_i)与单倍型多样性(H)正相关。

用 Kimura 2-parameter 模型计算群体内及群体间的遗传距离值。AJ 群体内的平均遗传距离为 0.047, XH 群体内的平均遗传距离为 0.043, 而 ALY 群体内的平均遗传距离为 0.004。AJ 与 ALY 之间的遗传距离值(0.062)大于 XH 与 ALY 之间的值(0.038)。

利用 DnaSP 3.14 计算群体之间的遗传分化指标,并根据 Hudson 等^[10]的方法得到 3 个群体之间的基因流 N_m (表 4)。

表 3 罗非鱼 3 个群体统计参数

Table 3 Demographic parameters estimated from three tilapia populations

群体 Population	H	K	P_i
AJ	0.866	24.29	0.042 4
XH	0.702	17.80	0.031 1
ALY	0.497	0.714	0.001 2
平均 Average	0.688	14.27	0.024 9

H : 单倍型多样性; K : 平均核苷酸差异数; P_i : 核苷酸多态性。

H : Haplotype diversity; K : Average number of nucleotide differences; P_i : Nucleotide diversity.

表 4 各群体间的基因交流及遗传分化

Table 4 Genetic differentiations and N_m values among different populations

种群 1 Population 1	种群 2 Population 2	K_{xy}	GammaST	F_{ST}	D_{xy}	D_a	N_m
AJ	XH	27.87	0.161 7	0.245 2	0.048 7	0.012 0	0.770 0
AJ	ALY	151.5	0.866 6	0.917 5	0.266 7	0.244 7	0.020 0
XH	ALY	135.6	0.880 4	0.931 7	0.238 3	0.222 1	0.020 0

K_{xy} : 群体间平均核苷酸差异数; GammaST: 群体间遗传分化系数; F_{ST} : 遗传分化指数; D_{xy} : 群体间核苷酸的分歧度; D_a : 核苷酸净遗传距离; N_m : 基因流。

K_{xy} : Average number of nucleotide differences between populations; GammaST: Genetic differentiation between populations; F_{ST} : Genetic differentiation index; D_{xy} : Average number of nucleotide subsequence per site between populations; D_a : Nucleotide net genetic distance; N_m : Gene flow.

3 讨 论

3.1 罗非鱼 D-loop 区序列结构特征 本实验得到的 mtDNA D-loop 序列中, 碱基 T 含量最高, G 的含量最低, A + T 含量明显高于 G + C, 这与脊椎动物 mtDNA 碱基组成一致^[11]。在 3 个群体中共发现 80 个突变位点, 其中有 4 个插入或缺失, 1 个插入和 1 个缺失, 57 个转换, 17 个颠换, 可见碱基的替换明显大于插入或缺失, 这与动物线粒体 DNA 碱基的变异特点相同。

mtDNA 控制区序列结构在许多脊椎动物中都是类似的, 包括终止序列区 (TAS)、中央保守区 (CSB) 和保守序列区 (CSB), 其中两端为高变区, 中间较保守。TAS 存在不同程度的串联重复序列, 是变异最大的部分^[12]。中央保守区是整个控制区最为保守的区域, 它几乎在所有的种类中都十分保守。Lee 等^[13]对众多鱼类的序列进行比较时, 仅识别了 CSB-D 的存在。曾青兰等^[14]也仅识别了大口胭脂鱼 (*Ictiobus cyprinellus*) 的 CSB-D 序列。而在大部分鱼类的研究中都识别出了 CSB-F、CSB-E、CSB-D 的保守序列, 并确定了其关键序列^[6, 15-16]。本实验对照其他鱼类中研究的中央保守区序列, 识别了中央保守区的最后一个保守序列 CSB-D, 确定了 CSB-D 序列 (TATTACTGGCATCTGGTTCCTA)。

保守序列区可能是整个控制区最关键的部分, 因为它包含有重链的复制起点 (H-strand replication origin, OH)、重链启动子 (promoters for the transcription of H-strand, HSP) 和轻链启

动子 (promoters for the transcription of L-strand, LSP) 以及 3 个保守区 CSB1、CSB2 和 CSB3^[16]。CSB 的 3 个保守区在鱼类中一般都存在, 且其排列和序列都很保守, 但有研究认为 CSB1 的存在不具有普遍性^[13, 17]。CSB2 和 CSB3 的序列较稳定, 且其序列中富含 AC 碱基很容易识别^[15-16, 18]。本实验在罗非鱼序列中成功识别了 CSB2 (TAAACCCCCCTACCCCCCAAAA) 和 CSB3 (TGCAAACCCCCCGAAACAGGAAAA)。而 CSB1 的序列变化较大, 普遍认为大部分鱼类中 CSB1 序列存在“GACATA”结构^[15-16, 18], 但曾青兰等^[14]认为大口胭脂鱼的 CSB1 特征基因序列为 GACATT。本实验通过比对分析, 在罗非鱼 CSB1 序列 (ATAACTGATATCTAGAGCAT AA) 上未识别出普遍认为较为保守的 GACATA, 但找到了在罗非鱼中较保守的 GAGCATA 序列, 这与在鲮科鱼类 (Carangidae)^[6] 以及鳊鱼 (*Siniperca*)^[7] 中发现的 CSB1 特征序列一致。另外还发现本研究序列中, 在 530 ~ 551 bp 处一串富含 AT 的序列比较保守。

3.2 罗非鱼群体的遗传分化 一个群体内的遗传距离反映了该群体的遗传多样性, 而不同群体间的遗传距离反映了其遗传组成分化程度。尼罗罗非鱼群体中 AJ 与 XH 之间的遗传距离 D 值为 0.053, 与我国沿海三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 群体间的遗传距离值 (0.018 ~ 0.028 8)^[5]、青海湖裸鲤 (*Gymnocypris przewalskii*) 繁殖群体的遗传距离值 (0.010 93 ~ 0.019 09)^[19] 相比要高, 可见尼罗罗非鱼的

遗传分化水平相对较高。

另外,从群体遗传分化指数(F_{ST})和基因流(N_m)的角度对群体的遗传分化进行分析。Wright^[21]认为无遗传分化发生时的指标 $F_{ST} < 0.05$ 。理论上 $N_m < 1$ 时,遗传漂变是群体间遗传分化的主要因素; $N_m > 1$,基因流为主要作用^[20]。从分析的结果看(表4),AJ与XH($F_{ST} = 0.2452$, $N_m = 0.77$)、AJ与ALY($F_{ST} = 0.9175$, $N_m = 0.02$)、XH与ALY($F_{ST} = 0.9317$, $N_m = 0.02$)之间的 F_{ST} 值均大于0.05,且3个群体之间的 N_m 均小于1,可见3个群体之间的基因交流比较弱,主要是由遗传漂变引起的群体间的分化。3个群体之间均存在一定的遗传分化,且AJ与ALY、XH与ALY之间的分化程度要大于AJ与XH之间,应作为3个独立的群体进行保护。

作为杂交鱼的父母本,双亲需要遗传距离远且群体纯度高,才能生产出雄性率比较高、杂种优势比较大的后代^[22]。奥尼杂交鱼是目前我国养殖最广、已得到广大养殖户认可的罗非鱼养殖品种,父本为奥利亚罗非鱼,母本为尼罗罗非鱼。从遗传距离看,AJ和XH与ALY的遗传距离分别为0.062、0.038,可见AJ与ALY杂交,其后代可能具有较高的杂种优势,杂交后代具有进一步选育的良好基础。从种群纯度的角度来看,AJ和XH的 P_i 值(分别为0.0424、0.0311)均大于ALY的值(0.0012),可见ALY群体的纯度较高,说明该群体引入以后,经过选育和生物技术相结合,育成了品种较纯的群体。纯度高对于自然种群来说,可能意味着淘汰或灭绝;但对于养殖种群来说则具有重要意义,它能将经长期多代选育得到的优良经济性状稳定地遗传给下一代,并在遗传过程中趋于稳定。生产实践上用ALY作父本所获得的杂交鱼雄性率稳定在95%以上。单性养殖雄性罗非鱼有助于大幅提高罗非鱼单位生产面积的产量,是罗非鱼养殖发展的方向^[22]。

3.3 罗非鱼群体的遗传多样性 核苷酸多态性(P_i)是衡量一个种群 mtDNA 遗传多样性的重要指标。从 P_i 值来看,尼罗罗非鱼两个群体

AJ和XH的 P_i 值(分别为0.0424、0.0311)与其他鱼类的研究结果相比略高,比如齐口裂腹鱼(*Schizothorax prenanti*)的平均 P_i 值为0.019^[23],长江口邻近水域刀鲚(*Coilia nasus*)的平均 P_i 值为0.0262^[24],说明本研究中的尼罗罗非鱼群体 mtDNA 控制区存在比较丰富的多态性;而ALY群体(P_i 值为0.0012)与已证实的遗传多样性较低的长江铜鱼(*Coreius heterodon*) (平均 P_i 值0.00218)相比基本上属于同一个水平^[25],可见ALY群体遗传多样性偏低。此结果与前人用同工酶^[26]、RAPD^[27]和 mtDNA 的酶切^[28]等鉴定技术研究罗非鱼群体遗传多样性状况的结果相一致。推测其原因可能与引种时的奠基群体大小有关,因 mtDNA 为母性遗传,原始构建种群的大小对后代种群的核苷酸多样性有很大影响。本实验的尼罗罗非鱼可能原始种群的遗传多样性就高,虽然也经历了遗传瓶颈现象,但引种时的群体较大,影响较小,所以后代表现出较高的遗传多样性^[27]。而“夏奥1号”奥利亚罗非鱼引进时群体较小,经历了引种时的建群者效应、瓶颈效应和遗传漂变等^[27],同时加上地理隔离、生存适应、人工或自然选择等因素的作用,表现出遗传多样性低的特点。本实验中的ALY群体遗传纯度高有利于杂种优势的提高,但对于纯种的保存和复壮是不利的,所以有必要从原产地引进部分奥利亚罗非鱼,以提高ALY群体的遗传多态,避免过度近交造成群体性状的衰退^[29]。

总的来说,本实验研究的尼罗罗非鱼遗传多样性较高,而“夏奥1号”奥利亚罗非鱼的纯度较高且遗传性状稳定。在人工养殖和育种的过程中,应采取大群体繁育、人工选育结合现代生物技术等措施来防止因近交衰退和遗传漂变等导致的遗传多样性水平降低现象,保护罗非鱼的优良种质资源,并进一步开发利用其遗传潜力提高育种价值。

参 考 文 献

- [1] 朱华平,黄樟翰,卢迈新,等. 罗非鱼遗传背景的研究进展. 湛江海洋大学学报, 2003, 23(1): 79-84.

- [2] Brown W M, George M, Wilson A C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *PNAS*, 1979, 76(4): 1967 - 1971.
- [3] Brown K H, Thorgaard G H. Mitochondrial and nuclear inheritance in an androgenetic line of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 2002, 204(3): 323 - 335.
- [4] Gilles A, Lecointre G, Miquelis A, et al. Partial combination applied to phylogeny of European cyprinids using mitochondrial control region. *Mol Phylogenet Evol*, 2001, 19(1): 22 - 33.
- [5] 冯冰冰, 李家乐, 朱东红, 等. 我国沿海三疣梭子蟹 9 个野生群体线粒体 CR 和 CO I 片段比较分析. *动物学杂志*, 2008, 43(2): 28 - 36.
- [6] 朱世华, 郑文娟, 邹记兴, 等. 鲮科鱼类线粒体 DNA 控制区结构及系统发育关系. *动物学研究*, 2007, 28(6): 606 - 614.
- [7] Zhao J L, Wang W W, Li S F, et al. Structure of the mitochondrial DNA control region of the siniperce fish and their phylogenetic relationship. *Acta Genetica Sinica*, 2006, 33(9): 793 - 799.
- [8] 单淇, 董仕, 吴海防, 等. 3 个群体鳙鱼 mtDNA D-loop 区段的限制性片段长度多态性分析. *中国水产科学*, 2006, 13(2): 174 - 180.
- [9] 张学义, 李家乐, 汪桂玲, 等. 八个品种金鱼及野生鲫线粒体控制区遗传差异和亲缘关系的研究. *上海水产大学学报*, 2007, 16(6): 513 - 517.
- [10] Hudson R R, Boos D D, Kaplan N L. A statistical test for detecting population subdivision. *Mol Biol Evol*, 1992, 9(1): 138 - 151.
- [11] Broughton R E, Roe B A. The complete sequence of the zebra fish (*Danio rerio*) mitochondrial genome and evolutionary patterns in vertebrate mitochondrial DNA. *Genome Res*, 2001, 11(11): 1958 - 1967.
- [12] Clayton D A. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell*, 1982, 28(4): 693 - 705.
- [13] Lee W J, Conroy J, Howell W H, et al. Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. *J Mol Evol*, 1995, 41(1): 54 - 66.
- [14] 曾青兰, 刘焕章. 大口胭脂鱼线粒体 DNA 控制区序列的研究. *湖北大学学报: 自然科学版*, 2001, 23(3): 261 - 264.
- [15] Guo X H, Xiu S J, Liu Y. Comparative analysis of the mitochondrial DNA control region in cyprinids with different ploidy level. *Aquaculture*, 2003, 224(1): 25 - 38.
- [16] Sbisa E, Tanzariello F, Reyes F, et al. Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and the functional and evolutionary implications. *Gene*, 1997, 205(1): 125 - 140.
- [17] Chen I S, Hsu C H, Hui C F, et al. Sequence length and variation in the mitochondrial DNA control region of two freshwater fishes belong to *Rhinogobius* (Teleostei: Gobioidae). *J Fish Biol*, 1998, 53(1): 179 - 191.
- [18] Broughton R E, Dowling T E. Length variation in mitochondrial DNA of the minnow *Cyprinella spiloptera*. *Genetics*, 1994, 138(1): 179 - 190.
- [19] 陈大庆, 张春霖, 鲁成, 等. 青海湖裸鲤繁殖群体线粒体基因组 D-loop 区序列多态性. *中国水产科学*, 2006, 13(5): 800 - 806.
- [20] Slatkin M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, 1987, 236(4803): 787 - 792.
- [21] Wright S. *Evolution and the Genetics of Populations. V. Variability within and among Natural Populations*. Chicago: The University of Chicago Press, 1978, 580.
- [22] 杨弘. 罗非鱼繁殖及养殖技术(一). *科学养鱼*, 2006, (1): 16 - 17.
- [23] Song Z, Song J, Yue B. Population genetic diversity of *Prenant's schizothoracin*, *Schizothorax prenanti*, inferred from the mitochondrial DNA control region. *Environ Biol Fish*, 2008, 81(3): 247 - 252.
- [24] 杨金权, 胡雪莲, 唐文乔, 等. 长江口邻近水域刀鲚的线粒体控制区序列变异与遗传多样性. *动物学杂志*, 2008, 43(1): 8 - 15.
- [25] 严莉. 长江铜鱼种群生物学及遗传多样性分析. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2005.
- [26] 赵金良, 李思发, 李晨虹, 等. 不同品系尼罗罗非鱼生化遗传标志研究. *上海水产大学学报*, 1997, 6(3): 166 - 170.
- [27] 夏德全, 曹莹, 吴婷婷, 等. 用 RAPD 分析对罗非鱼遗传变异的研究及其对杂种优势的应用. *水产学报*, 1999, 23(1): 27 - 32.
- [28] 曹莹, 夏德全. 尼罗非鲫和奥利亚非鲫线粒体 DNA 遗传差异的研究. *水产学报*, 1997, 21(4): 360 - 365.
- [29] 王进科, 夏德全, 吴婷婷. 中国莫基群奥利亚罗非鱼遗传多态性的 DNA 指纹图谱. *南京农业大学学报*, 2000, 23(3): 61 - 63.