

文章编号:1000 - 0615(2004)05 - 0594 - 05

研究简报 ·

## 奥利亚罗非鱼( )、鳊( )及其子代间遗传关系的研究

杨 弘, 夏德全, 刘 蕾, 吴婷婷

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081)

关键词:奥利亚罗非鱼;鳊;远缘杂交;随机扩增多态性 DNA

中图分类号:S917

文献标识码:A

## Studies on hereditary relationship between *Oreochromis aurea* ( ), *Siniperca chuatsi* ( ) and their offspring

YANG Hong, XIA De-quan, LIU Lei, WU Ting-ting

(Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

**Abstract:** Mature eggs of *Oreochromis aurea* were obtained with artificial reproduction technology, and the hybrids were acquired with *Siniperca chuatsi* ( ) using artificial insemination. Genomic DNA of *O. aurea* ( ), *S. chuatsi* ( ) and their progeny were examined using RAPD method. Only 2 primers (S336, OPZ06) of screened 11 random primers could be amplified into two specifically RAPD bands on progeny which were the same as those of *S. chuatsi* ( ) and did not exist in *O. aurea* ( ), and other amplified bands on progeny were all from *O. aurea* ( ). Genetic similarity index was 0.858 between the progeny and *O. aurea* ( ), while that was 0.049 between the progeny and *S. chuatsi* ( ). This indicated that the genetic substance of progeny was mostly from *O. aurea* ( ). The primary function of sperm from *S. chuatsi* ( ) was stimulating development of eggs from *O. aurea* ( ), at the same time little genetic substance of *S. chuatsi* ( ) appeared in the progeny, which laid the foundation for breeding of fine varieties having characters of *O. aurea* ( ) and *S. chuatsi* ( ).

**Key words:** *Oreochromis aurea*; *Siniperca chuatsi*; remote hybridization; random amplified polymorphism DNA (RAPD)

罗非鱼生长快、味道好,是人们喜爱的鱼类,现已是世界性养殖鱼类,但它不能忍受低温,因此影响其养殖业的进一步发展。鳊则是名贵性鱼类,但其终生摄食活的鱼虾,这也限制了其养殖的发展。奥利亚罗非鱼(*Oreochromis aurea*)属鲈形目、鲷鱼科,鳊(*Siniperca chuatsi*)属鲈形目、脂

科,它们间的杂交为科间杂交。鱼类科间杂交成功率很低,种间杂交有时可获得具有双亲性状的杂种鱼,有时也可发生雌核发育<sup>[1]</sup>。本研究中奥利亚罗非鱼雌性染色体为ZW,其卵子如能在鳊精子刺激下行雌核发育,则可在短时间获得奥利亚罗非鱼纯系。在本文中,利用 RAPD

收稿日期:2003-07-24

资助项目:国家“十五”攻关专题(2001BA505B0502);“863”课题(2001AA243061);国家自然科学基金项目(30371116);中国水产科学研究院重点项目“罗非鱼繁殖生物学和品种改良研究”

作者简介:杨 弘(1966-),男,江苏无锡人,研究员,主要从事鱼类生化和生物技术研究。Tel:0510-5554552, E-mail:yangh@ffrc.cn

通讯作者:吴婷婷(1944-),女,上海市人,研究员,博导,主要从事鱼类育种、生物技术、生理生化研究。Tel:0510-5554552, E-mail:

wutt@ffrc.cn

标记,对奥利亚罗非鱼( )、鳊( )及它们的后代基因组 DNA 进行了研究,分析了它们之间的遗传关系,为奥利亚罗非鱼( ) $\times$ 鳊( )子代鱼的进一步选育提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 远缘杂交亲本

远缘杂交的母本是奥利亚罗非鱼(*Oreochromis aurea*),为 1983 年从美国奥本大学引进鱼种的后代,目前保存在本实验室;远缘杂交的父本是鳊(*Siniperca chuatsi*)。

### 1.2 奥利亚罗非鱼( ) $\times$ 鳊( )远缘杂交

2001 - 2002 年在它们的繁殖季节,挑选成熟度好的奥利亚罗非鱼( )、鳊( ),放于室内大水族箱中,采用垂体、LRHA、HCG、地欧酮等进行罗非鱼的人工催产。经无数次试验,取得了罗非鱼人繁成功。将成熟的罗非鱼卵与鳊精子混匀,干法授精,受精卵在大培养皿中孵化。子代鱼苗出膜后,逐步转移至培养缸和水族箱中,培育至 3 ~ 4cm 后移入野外池塘养殖。共进行了 20 多次实验,人工受精至鱼苗阶段的成活率为 0.3% ~ 0.5%。

### 1.3 亲本及子代基因组 DNA 的提取

本研究中选用了 2 尾奥利亚罗非鱼( )、2 尾鳊( )及它们的 6 尾子代。采取从鳍条中提取 DNA 的方法。将新鲜鳍条剪碎,在消化液(10mmol  $L^{-1}$  Tris-HCl pH8.0, 100 mmol  $L^{-1}$  EDTA pH8.0, 0.5% SDS, 100  $\mu g \cdot mL^{-1}$  蛋白酶 K) 中 55 $^{\circ}C$  消化过夜,再分别用饱和酚、酚氯仿、氯仿/异戊醇抽提除蛋白,乙醇沉淀 DNA, TE 溶解 DNA,紫外分光光度法或电泳法确定浓度。

### 1.4 RAPD 扩增

采用 Williams 等<sup>[2]</sup>的 RAPD 反应体系,随机引物分别购自上海生工生物工程有限公司(引物编号前为 S)和美国 Operon 公司(引物编号前为 OPZ)(见表 1),其余试剂均购自上海生工生物工程有限公司。

RAPD 反应条件为:95 $^{\circ}C$  充分变性 4.5min;94 $^{\circ}C$  变性 1min,36 $^{\circ}C$  退火 1min,72 $^{\circ}C$  延伸 2min,共 40 个循环;最后在 72 $^{\circ}C$  下充分延伸 10min。

扩增产物在含 0.5  $\mu g \cdot mL^{-1}$  EB 的 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳。在 ImageMasterVDS 影像仪中照相、记录、分析。

### 1.5 数据处理

在琼脂糖凝胶上出现的 DNA 片段,按出现片段记为 1,不出现记为 0 进行统计。

群体内、群体间相似系数按 Nei 等的公式进行分析, $S_{xy} = 2N_{ab} / (N_a + N_b) \times 100\%$ ,其中: $N_{ab}$ 为个体 a 和 b 之间共有的扩增条带, $N_a$ 为个体 a 具有的扩增条带总数, $N_b$ 为个体 b 具有的扩增条带总数。 $S_{xy}$ 为两个体间的相似系数。群体内相似系数 S 为种群内所测各个体间相似系数  $S_{xy}$  的平均值。群体间相似系数 S 是两个群体中随机配对的两个体的相似系数的平均值。群体间遗传距离为:

$$D = 1 - S。$$

表 1 实验所用随机引物及其序列

Tab.1 Sequence of RAPD primers

引物 primers	序列(5'-3') sequences	引物 primers	序列(5'-3') sequences
S <sub>67</sub>	GTCCCGACGA	S <sub>336</sub>	TCCCCATCAC
S <sub>87</sub>	GAACCTGCGG	S <sub>337</sub>	CCTTCCCACT
S <sub>92</sub>	CAGCTCACGA	S <sub>339</sub>	GTGCGAGCAA
S <sub>94</sub>	GGATGAGACC	S <sub>340</sub>	ACTTTGGCGG
S <sub>95</sub>	ACTGGGACTC	OPZ-02	CCTACGGGGA
S <sub>96</sub>	AGCGTCCTCC	OPZ-04	AGGCTGTGCT
S <sub>189</sub>	TCCTGGTCCC	OPZ-05	TCCCATGCTG
S <sub>223</sub>	CTCCCTGCAA	OPZ-06	GTGCCGTTCA
S <sub>323</sub>	CAGCACCACA	OPZ-08	GGGTGGGTAA
S <sub>327</sub>	CCAGGAGGAC	OPZ-09	CACCCAGTTC
S <sub>328</sub>	GGGTGGGTAA	OPZ-10	CCGACAAACC
S <sub>329</sub>	CACCCAGTTC	OPZ-11	CTCAGTCGCA
S <sub>330</sub>	CCGACAAACC	OPZ-12	TCAACGGGAC
S <sub>331</sub>	CTCAGTCGCA	OPZ-14	TCGGAGGTTTC
S <sub>332</sub>	TCAACGGGAC	OPZ-20	ACTTTGGCGG
S <sub>334</sub>	TCGGAGGTTTC		

## 2 结果

### 2.1 子代鱼与双亲外部形态比较

子代鱼的外部形态几乎相似于奥利亚罗非鱼,但臀鳍则明显与鳊相似(表 2),说明父本鳊对子代遗传性状具有一定作用。

### 2.2 子代鱼及双亲的 RAPD 扩增图谱

经过用 31 个随机引物对子代鱼及双亲进行扩增筛选,其中有 15 个引物有扩增产物,其中 5 个引物因扩增条带不清晰或过多而难以分辨,最后筛选出 10 个引物,分别为 S<sub>92</sub>、S<sub>323</sub>、S<sub>327</sub>、S<sub>328</sub>、S<sub>336</sub>、S<sub>339</sub>、S<sub>340</sub>、OPZ06、OPZ11 和 OPZ14。对其扩增产物条带进行统计,这 10 个引物共扩增出 401 条清晰的条带,其长度在 200 bp ~ 3,500 bp 之间,其中子代的 6 个 DNA 样品分别扩增出 52、56、55、57、51 和 51 条带,共计 322 条,母本奥利亚罗非鱼 DNA 样品产生 44 条带,父本鳊 DNA 样品中产生 35 条带。其中母本与子代共有的条带数为 40 条,而父本与子代共有的条带数为 2 条(图 2 中 750bp、图 3 中 950bp)。

子代中 750bp 条带(即箭头所指)在母本罗非鱼中没有,但出现在父本鳊中。

子代中 950bp 条带(即箭头所指)在母本罗非鱼中也没有,仅出现在父本鳊中。

上述实验表明,子代鱼主要继承了母本奥利亚罗非鱼的遗传物质,但父本鳊的遗传物质在子代中也出现。

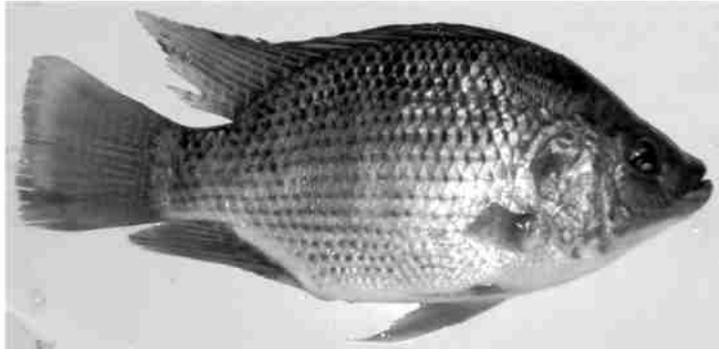


图1 奥利亚罗非鱼( ) × 鳊( )的子代  
Fig. 1 Progeny of *O. aurea* ( ) × *Siniperca chuatsi* ( )

表2 子代鱼与亲本可数性状比较

Tab. 2 Comparison of meristic characters of progeny with their parents

鱼类 Species of fish	背鳍 dorsal fin	胸鳍 pectoral fin	臀鳍 anal fin	侧线鳞 scale on lateral line
奥利亚雌鱼(众数) <i>O. aurea</i> ( )	16,12	13	3,10	30
奥利亚雄鱼(众数) <i>O. aurea</i> ( )	16,12	12	3,9	30
鳊(众数) <i>Siniperca chuatsi</i>	11,14	14	3,11	
子代鱼(众数) progeny	16,13	14	3,11	29
子代鱼1 No. 1 of progeny	14,13	13	3,11	29
子代鱼2 No. 2 of progeny	16,13	14	3,11	29
子代鱼3 No. 3 of progeny	16,14	14	3,11	30
子代鱼4 No. 4 of progeny	15,13	13	3,11	28
子代鱼5 No. 5 of progeny	16,13	14	3,11	29
子代鱼6 No. 6 of progeny	16,13	14	3,13	29

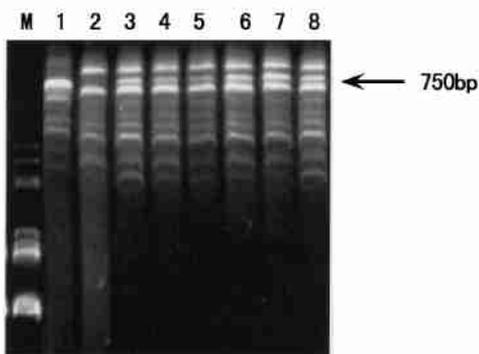


图2 随机引物 OPZ06 的 RAPD 图谱

Fig. 2 RAPD pattern by primer OPZ06

M:Marker, DNA/ EcoRI + HindIII

1. 父本鳊鱼;2. 母本奥利亚罗非鱼;3~8. 子代

1. *Siniperca chuatsi* ( ); 2. *O. aurea* ( ); 3~8. progeny

### 2.3 子代群体遗传结构及其与双亲的遗传差异

对6尾子代鱼的 RAPD 图谱进行统计,其个体间遗传相似系数及群体内平均遗传相似系数见表3。

奥利亚罗非鱼自从1983年被引入我国后,经过我们多年选育,已达到相当高的纯度,该群体遗传相似系数达0.95以上<sup>[3,4]</sup>,且个体间遗传差异很小。而由上表可以看到,6尾子代间的遗传相似系数由0.833到0.973,变动幅度较大,群体内平均相似系数为0.913,低于亲本群体奥利亚罗非鱼0.95,这不但表明了子代由于父本鳊遗传物质的影响而使其与母本奥利亚罗非鱼间的相似性降低,同时也表明各子代个体所继承的父本遗传物质可能并不相同,从而造成子代个体间较大的遗传差异,这表明对它们的子代进行进一步选育是有意义的。

表 3 子代个体间遗传相似系数及群体内遗传相似系数

Tab. 3 Genetic similarity indices between F<sub>1</sub> progeny and intrapopulation genetic similarity indices

杂交鱼编号 no. of progeny	2	3	4	5	6
1	0.944	0.953	0.862	0.932	0.932
2	-	0.973	0.867	0.916	0.916
3	-	-	0.893	0.925	0.925
4	-	-	-	0.833	0.833
5	-	-	-	-	0.961
群体内平均相似系数 intrapopulation genetic similarity indices					0.913

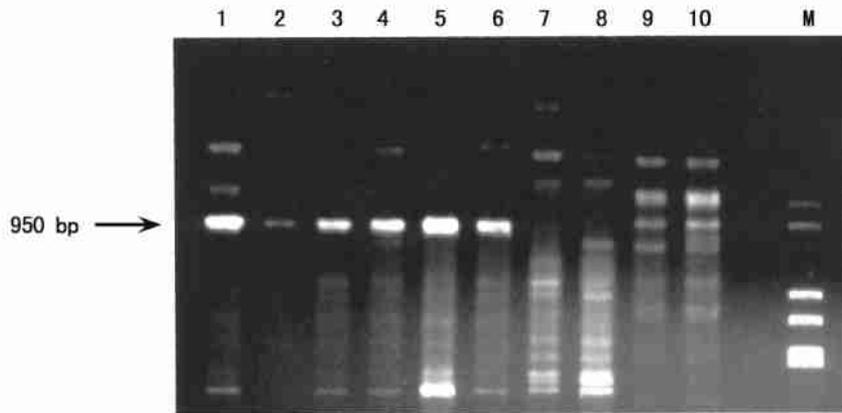


图 3 随机引物 S<sub>336</sub> 的 RAPD 图谱

Fig. 3 RAPD pattern by primer S<sub>336</sub>

M: Marker, DNA/ EcoRI + HindIII

1~6: 子代; 7~8: 母本奥利亚罗非鱼; 9~10: 父本鳊

1~6. progeny; 7~8. *O. aurea* ( ); 9~10. *Siniperca chuatsi* ( )

表 4 子代与母本奥利亚罗非鱼(M)和父本鳊(P)间遗传相似系数和遗传距离

Tab. 4 Genetic similarity indices and genetic distances between F<sub>1</sub> and parents *O. aurea* ( ) and *Siniperca chuatsi* ( )

子代 progeny	亲本 parents			
	母本奥利亚罗非鱼 <i>O. aurea</i> ( )		父本鳊 <i>Siniperca chuatsi</i> ( )	
	相似系数 genetic similarity indices	遗传距离 genetic distances	相似系数 genetic similarity indices	遗传距离 genetic distances
No. 1	0.875	0.125	0.046	0.954
No. 2	0.840	0.160	0.066	0.934
No. 3	0.849	0.151	0.067	0.933
No. 4	0.772	0.228	0.044	0.956
No. 5	0.905	0.095	0.047	0.953
No. 6	0.905	0.095	0.023	0.977
平均值 average	0.858	0.142	0.049	0.951

从上表可以看出,子代鱼主要继承了母本奥利亚罗非鱼的遗传物质,它们间的遗传相似系数达 0.858,而与父本鳊的亲缘关系较远,表明鳊精子在受精卵的发育过程中主要起刺激作用,掺入到受精卵雌性原核中的 DNA 量极少。当然,有关子代与父本鳊鱼间的遗传关系还有待于更深入

的研究。

### 3 讨论

奥利亚罗非鱼为多次产卵型鱼类,通常一年可自然产卵 3~4 次,其性腺成熟难以人工控制,同时,它的受精卵

是在口腔中孵化,因而很难人工获得成熟的鱼卵,这限制了许多育种研究工作的开展。通过鱼卵成熟度鉴定和催产激素筛选、组合、剂量优化等措施,经多年研究终于获得罗非鱼人繁的成功,为远缘杂交成功打下基础。

在本研究中,通过形态学(另文发表)和遗传标记分析证明了奥利亚罗非鱼( ) $\times$ 鳊( )子代在继承大部分母本罗非鱼遗传物质的同时,也融合了来自父本鳊的遗传物质,这表明对子代鱼选育有重要意义。

现代育种学研究成果表明,远缘杂交结果可分为几类:一是发生真正的精卵结合,但杂种一代通常是不育的,如草鱼与鳊杂交<sup>[1]</sup>;二是双亲部分遗传物质发生了合并或交换,如湘华鲮和鳊杂交<sup>[1]</sup>;三是未发生精卵的结合,异源精子只起着刺激卵子发育的作用,即雌核发育,但父本遗传物质仍有部分可以掺入到受精卵,如异育银鲫<sup>[1]</sup>。在本研究中,我们获得的奥利亚罗非鱼( ) $\times$ 鳊( )子代是完全可育的。我们对母本奥利亚罗非鱼、父本鳊及其子代的RAPD标记分析,实验结果表明子代中只有2条扩增带与父本相同而母本中不存在,子代与母本遗传相似数为0.858,与父本的仅为0.049,这说明子代基因组主要来自于母本,形态学测量也支持这一结论。父本鳊精子在受精过程中主要起刺激卵发育的作用,但也通过某种机制将部分遗传物质掺入到受精卵中,使杂交后代具有了一些父本的遗传性状。这种形式的远缘杂交在鱼类上是存在的,如蒋一<sup>[2]</sup>等在用兴国红鲤的精子刺激银鲫卵发育,获得了全雌性子代,称为异育银鲫,并进一步发现了促生长效应,由此揭示了雌核发育的异精效应<sup>[5,6]</sup>,异育银鲫已在生产实践上产生了重要的经济效益;通过对子代及双亲基因组DNA的分析,证实了银鲫在用异源红鲤精子进行雌核发育过程中,精子除了刺激卵子雌核发育外,精子的部分DNA片段也随机进入到受精卵的雌性原核中参与发育,并在子代上表现<sup>[7,8]</sup>。这些实例对本研究中子代鱼的改良具有重要意义。

## 参考文献:

- [1] Lou Y D. Fish breeding[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1999. 83 - 105. [楼允东. 鱼类育种学[M]. 北京:中国农业出版社,1999. 83 - 105.]
- [2] Williams J G, Kubelik A R, Livak K J, *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucl Acids Res, 1990, 18:6531 - 6535.
- [3] Xia D Q, Cao Y, Wu T T, *et al.* A study on genetic variation of tilapia fish with rapd analysis and its application to heterosis[J]. J Fish China, 1999, 23(1):27 - 32. [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[J]. 水产学报,1999,23(1):27 - 32.]
- [4] Xia D Q, Cao Y, Yang H, *et al.* The relationships between F<sub>1</sub> hybrids from tilapia and their parents and the use of their heterosis[J]. J Fish Sci China, 1999, 6(4):29 - 32. [夏德全,曹莹,杨弘,等. 罗非鱼杂交F<sub>1</sub>代与亲本的遗传关系及其杂种优势的利用[J]. 中国水产科学,1999,6(4):29 - 32.]
- [5] Jiang Y G, Liang S C, Chen B D. Biological effects of heterogenous sperm on gynogenesis generation of *C. auratus gibelio*[J]. Acta Hydrobiol Sin, 1983, 8(1):1 - 13. [蒋一<sup>[2]</sup>,梁绍昌,陈本德. 异源精子在银鲫雌核发育子代中的生物学效应[J]. 水生生物学报,1983,8(1):1 - 13.]
- [6] Wu Q J, Gui J F. Fish genetics and breeding engineering[M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999. 81 - 85, 92 - 93. [吴清江,桂建芳. 鱼类遗传育种工程[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999. 81 - 85,92 - 93.]
- [7] Ding J, Xie Y F, Jiang Y G, *et al.* Detection and analysis of foreign genetic substance of allogynogenetic sivler crucian carp and their artificial hybrids[J]. Acta Hydrobiol Sin, 1993, 17(1):22 - 26. [丁军,谢岳峰,蒋一<sup>[2]</sup>,等. 异源银鲫及其人工杂种外源遗传物质的检测分析[J]. 水生生物学报,1993,17(1):22 - 26.]
- [8] Chen H, Yang J, Xue G X, *et al.* Application of RAPD technology in studies on allogynogenetic sivler crucian carp[J]. Chinese Science Bulletin,1994,39(7):661 - 663. [陈洪,杨靖,薛国雄,等. RAPD技术在异精激发方正银鲫比较研究中的应用[J]. 科学通报,1994,39(7):661 - 663.]