

# 奥利亚罗非鱼与尼罗罗非鱼 rDNA 内转录间隔区序列特征

陈雪峰 李红霞 俞菊华\* 唐永凯 李建林

(南京农业大学无锡渔业学院 无锡 214081;

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和养殖生物学重点开放实验室 无锡 214081)

**摘要:**核糖体 DNA 内转录间隔区(internal transcribed spacers, ITS)是经常被用作种和种群水平系统研究的分子序列。本文分离了奥利亚罗非鱼(*Oreochromis aureus*)、尼罗罗非鱼(*O. niloticus*)内转录间隔区,包括部分 18S 序列, ITS1、5.8S、ITS2 全序列及部分 28S 序列。4 尾奥利亚罗非鱼的 10 个克隆序列分析表明,其存在长度不同的 a、b 两种类型 ITS1。a 型长为 536 bp, GC 含量为 69.96%; b 型长为 520 bp, GC 含量为 69.04%~69.42%。4 尾尼罗罗非鱼的 10 个克隆序列分析表明,其只存在 a 型 ITS1, 长为 536~540 bp, GC 含量为 69.42%~70.19%。与 b 型 ITS1 相比, a 型 ITS1 在 16~31 nt 有 16 bp 片段(GGCCCCGCTGCGGCGC)的插入。奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼共 20 条 ITS 序列中, 5.8S 长度均为 157 bp, GC 含量为 56.69%~57.96%; ITS2 为 408 bp, GC 含量为 72.79%~74.26%。奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼 ITS 区序列相似性高达 98.2%, 表明这两种罗非鱼亲缘关系很近。此外, 本文对 14 尾奥利亚罗非鱼、15 尾尼罗罗非鱼以及 15 尾奥尼罗非鱼[*O. aureus* ( ) × *O. niloticus* ( )] ITS1 的扩增结果显示, 奥利亚罗非鱼均有 a、b 两种类型 ITS1; 15 尾尼罗罗非鱼中 1 尾为 a、b 两类型 ITS1, 14 尾为 a 型 ITS1; 15 尾奥尼罗非鱼中则有 6 尾具有 a、b 两类型 ITS1, 9 尾为单一的 a 型 ITS1。分析表明, 奥利亚罗非鱼在 ITS1 这个位点一致性高, 但尼罗罗非鱼中有 1 尾混杂了奥利亚罗非鱼的基因, 同时也说明分子生物学手段应用于种质鉴定比形态学手段更为精确。

**关键词:** 奥利亚罗非鱼; 尼罗罗非鱼; 内转录间隔区; 序列特征; 种质鉴定

**中图分类号:** Q751 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2009)02-92-05

## Analysis on Sequences of Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacers of *Oreochromis aureus* and *O. niloticus*

CHEN Xue-Feng LI Hong-Xia YU Ju-Hua\* TANG Yong-Kai LI Jian-Lin

(Wuxi Fishery College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081;

Key Laboratory of Genetic Breeding of Aquatic Animals and Aquaculture Biology, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

**Abstract:** Internal transcribed spacers in ribosomal DNA were often used as molecular sequence in phylogenetic study at the population and species level. PCR was used to isolate the complete sequence of internal transcribed spacer (ITS1-5.8S-ITS2) and partial 18S and 28S sequence from *Oreochromis aureus* and *O. niloticus*. The analysis of ten

**基金项目** 国家科技基础条件平台项目(No. 2007DKA30470-003), 江苏省自然科学基金项目(No. BK2006029);

\*通讯作者, E-mail: yujh@frc.cn;

**第一作者介绍** 陈雪峰, 男, 硕士; 研究方向: 鱼类遗传育种; E-mail: chenfenghailan@126.com。

**收稿日期:** 2008-09-05, **修回日期:** 2009-01-09

clones from four individuals indicated that *O. aureus* had two types of ITS1 (ITS1a and ITS1b) with different lengths. ITS1a was 536 bp, GC content was 69.96%; ITS1b was 520 bp, GC content was 69.04% - 69.42%. The analysis of ten clones from four *O. niloticus* individuals indicated that only ITS1a existed in *O. niloticus* which was 536 - 540 bp in length, and 69.42% - 70.19% in GC content. Compared with ITS1b, ITS1a had 16 bp sequences (GCCCCGCCTGCGCGC) which was inserted from 16 nt to 31 nt. 5.8S of all the 20 sequences from *O. aureus* and *O. niloticus* was 157 bp, GC content was 56.69% - 57.96%, and ITS2 was 408 bp, GC content was 72.79% - 74.26%. The high identity of ITS between *O. aureus* and *O. niloticus* indicated that the genetic relationship of the two *Oreochromis* was very close. Furthermore, PAGE electrophoresis was used to investigate the ITS1 divergence of *O. aureus*, *O. niloticus* and *O. aureus* ( ) × *O. niloticus* ( ) with distinguished morphological characters. The analysis showed that all of the 14 *O. aureus* individuals had two types of ITS1; 1 individual of the 15 *O. niloticus* and 6 individuals of the 15 *O. aureus* ( ) × *O. niloticus* ( ) had two types of ITS1. This paper showed the population of *O. aureus* had high identity while 1 individual of *O. niloticus* was genetic mixture with *O. aureus* in the locus of ITS1 and it also indicated that the means of molecular biology is more accurate than the means of morphology in germplasm identification.

**Key words:** *Oreochromis aureus*; *O. niloticus*; Internal transcribed spacer (ITS); Sequence character; Germplasm identification

罗非鱼为世界性养殖鱼类,在我国淡水养殖业中占有重要的地位。由于其性成熟早,因此在生产上需要控制其性别。目前除使用激素培育全雄性罗非鱼外,较推崇的是使用纯种雄性奥利亚罗非鱼 (*Oreochromis aureus*) 与雌性尼罗罗非鱼 (*O. niloticus*) 杂交生产高雄性率的奥尼罗非鱼 [*O. aureus* ( ) × *O. niloticus* ( )]。理论上推导 F1 代奥尼罗非鱼应为全雄,但在实际生产中杂交后代雄性率并不能达到理想效果,研究表明,雄性率的高低与两亲本的种质有着很大的关系<sup>[1]</sup>,因此亲本选择受到极大的重视。目前对于亲本的选择主要由技工根据外形特征及凭个人经验判断挑选。由于养殖过程中两亲本以及杂交后代之间互相混杂<sup>[2]</sup>、近交衰退<sup>[3]</sup>、遗传渐渗<sup>[4]</sup>等诸多因素使得罗非鱼的种质出现混杂及退化。因此,确定罗非鱼亲本种质是否混杂,筛选可靠的种质鉴定的分子标记意义重大。

真核生物 rDNA 基因的多拷贝性<sup>[5]</sup>和序列高度一致性<sup>[6]</sup>,使得该基因常被用作种的鉴定标记<sup>[7-9]</sup>。其中分隔 18S、5.8S 和 28S 的内转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 由于所受的选择压力比成熟 RNA 编码区小,因此常被作为一种分子标记来区分种和研究种群间关系。

已有研究报道昆虫<sup>[10]</sup>、植物<sup>[11]</sup>、微生物<sup>[12]</sup>的种质混杂现象可以用 ITS 区序列进行鉴定。目前 ITS 也已经用于水产动物的种质鉴定和遗传多样性的分析。本文分离了奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼 ITS 区全序列,分析各部分序列特征,并调查了形态学上鉴定为奥利亚罗非鱼、尼罗罗非鱼及其杂交后代奥尼罗非鱼在该位点的差异,探讨了 ITS 在 3 种罗非鱼种质鉴定中应用的可行性,以期今后罗非鱼 ITS 的研究提供可靠的依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 奥利亚罗非鱼为 1983 年从美国引进的 38 尾的繁殖选育后代,尼罗罗非鱼 1999 年引自埃及,奥尼罗非鱼为这两个亲本的繁殖后代。所有实验鱼均取自中国水产科学研究院无锡淡水渔业研究中心宜兴养殖基地。

### 1.2 方法

**1.2.1 基因组 DNA 的提取** 从鱼尾静脉抽血 0.2 ~ 0.5 ml,加入 1/6 体积的 ACD 抗凝剂,置于 4 °C 冰箱中沉淀 2 h,吸取 30 μl 血细胞,酚-氯仿法抽提基因组 DNA<sup>[13]</sup>。

**1.2.2 PCR 扩增、产物纯化及克隆测序** 根据 GenBank 已登录的其他鱼类 18S 和 28S 保守区

设计特异性引物扩增 ITS 区全序列。引物序列为:F:5 - TCG CAA TAA GTG TCT CGT AG-3 和 R:5 -CAC GCA CAT ACC ATC TGT TTT CG-3。PCR 反应总体积为 25  $\mu$ l,模板为 50 ng DNA,所有组分按照 LA *Taq* 酶 (TaKaRa) 说明书要求。PCR 反应条件为:94 2 min;94 30 s,55 45 s,72 2 min,30 个循环;72 延伸 10 min;4 保存。扩增产物在 1% 的琼脂糖凝胶 (含 0.5  $\mu$ g/ml EB) 上电泳、回收、克隆,将阳性克隆送南京博亚生物公司测序。根据 GenBank 已登录的其他鱼类 18S 和 5.8S 保守区设计特异性引物 (F:5 - TCG CAA TAA GTG TCT CGT AG-3 和 R:5 -TGT CGA TGA TCA ATG TGT CCT G-3) 扩增 ITS1 区序列。PCR 反应总体积为 10  $\mu$ l,模板为 25 ng DNA,所有组分按照 *Taq* 酶 (申能博彩) 说明书要求。PCR 反应条件:94 2 min;94 30 s,55 30 s,72 1 min,25 个循环;72 延伸 10 min;4 保存。扩增产物进行 PAGE 胶 (8%) 电泳分析。

**1.2.3 数据处理** 用 DNASTar 中的 EditSeq 进行序列拼接,将拼接好的序列用 NCBI 服务器上的 Blast 软件进行同源性检测,确定 ITS 序列的边界及长度。用 Clustalw 1.83 软件进行序列比对,辅以手工校正。个体内差异采用 Clustal W<sub>nj</sub> 下获得的两两序列百分变异度的平均值表示。Mega 4.0 分析核苷酸组成。

## 2 结果

**2.1 奥利亚罗非鱼、尼罗罗非鱼 ITS** 在 4 尾奥利亚罗非鱼和 4 尾尼罗罗非鱼 DNA 中分离 ITS 全序列,PCR 扩增后克隆,测通 20 个克隆。测序结果经过 Blast 分析表明 20 条序列均为罗非鱼的 ITS 区序列,与 GenBank 中奥利亚罗非鱼 (DQ397881) 和尼罗罗非鱼 (DQ397879) ITS1 区序列比对,去除 18S 和 28S 部分序列后得到完整的 ITS1-5.8S-ITS2 全序列。

4 尾奥利亚罗非鱼 10 个克隆包括 2 种类型的 ITS1,长的 ITS1 (a 型) 有 3 个克隆,序列长 536 bp,GC 含量均为 69.96%。短的 ITS1 (b 型) 有 7 个克隆,序列长 520 bp,GC 含量为 69.04% ~

69.42%,个体内平均差异为 0.13% ~ 0.64%,序列比对显示该片段具有 5 个转换位点及 1 个颠换位点。a、b 两型 ITS1 比较,a 型 ITS1 在 16 ~ 31 nt 插入 16 bp 的片段 (GGCCCGCCTGCGCCG)。5.8S 序列长度一致,为 157 bp,GC 含量为 56.69% ~ 57.96%,个体内平均差异为 0 ~ 0.638%,其中包括 4 个转换位点,不存在颠换位点。ITS2 序列长度一致,为 408 bp,GC 含量为 73.84% ~ 74.26%,个体内平均差异为 0 ~ 0.125%,只存在一个转换位点,没有颠换位点 (表 1)。

4 尾尼罗罗非鱼 10 个克隆 ITS1 长为 536 ~ 540 bp,均为 a 型,在 16 ~ 31 nt 存在同奥利亚罗非鱼一样的 16 bp 的片段插入,GC 含量为 69.42% ~ 70.19%,个体内差异为 0.280% ~ 0.528%,存在 3 个转换位点,不存在颠换位点。5.8S 序列长度一致,为 157 bp,GC 含量为 57.05% ~ 57.96%,个体内差异为 0.320% ~ 0.638%,其中含有 2 个转换位点及 1 个颠换位点。ITS2 序列长度一致,为 408 bp,GC 含量为 72.79% ~ 74.26%,个体内差异为 0.25% ~ 1.39%,包括转 4 个转换位点和 7 个颠换位点 (表 1)。

奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼 ITS 区序列比较表明,奥利亚罗非鱼存在 a、b 两种类型 ITS1,尼罗罗非鱼只有 a 型 ITS1。尼罗罗非鱼 ITS1 部分 473 ~ 480 位 CCTT 4 个碱基在不同克隆内重复数存在差异,造成 ITS1 序列长度不同。两种罗非鱼 5.8S 和 ITS2 长度一致,只是存在着少数的转换和颠换位点。两种罗非鱼 ITS 区全序列相似性为 98.2%。

**2.2 群体内 ITS1 检测** 鉴于奥利亚罗非鱼与尼罗罗非鱼在 ITS1 区存在差异,随机选择 14 尾奥利亚罗非鱼、15 尾尼罗罗非鱼、15 尾奥利亚罗非鱼,根据设计的特异引物扩增 ITS1,使用 PAGE 胶 (8%) 电泳检测。结果 14 尾奥利亚罗非鱼皆存在 a、b 两型 ITS1,15 尾尼罗罗非鱼中有 1 尾与奥利亚罗非鱼一样,存在 a、b 两型 ITS1,其余 14 尾均只有 a 型 ITS1,15 尾奥利亚罗非鱼中 6 尾存在 a、b 两型 ITS1,其余均为单一

表 1 不同克隆 ITS 各部分的长度和 GC 含量

Table 1 The lengths and GC contents of ITS fragments in different clones

个体 Individual	克隆 Clones	ITS1			5.8S			ITS2		
		GC 含量 GC content (%)	长度 Length (bp)	个体内差异 Percentage divergence (%)	GC 含量 GC content (%)	长度 Length (bp)	个体内差异 Percentage divergence (%)	GC 含量 GC content (%)	长度 Length (bp)	个体内差异 Percentage divergence (%)
A1		69.96	536		57.32	157		74.26	408	
A2	A2 - 1	69.23	520	0.13	57.32	157	0	74.02	408	0
	A2 - 2	69.23	520		57.32	157		74.02	408	
	A2 - 3	69.04	520		57.32	157		74.02	408	
	A2 - 4	69.96	536		57.32	157		74.02	408	
A3	A3 - 1	69.42	520	0.64	57.69	157	0.638	73.84	408	0.125
	A3 - 2	69.42	520		57.96	157		74.02	408	
	A3 - 3	69.42	520		56.69	157		74.02	408	
	A3 - 4	69.96	536		57.32	157		74.26	408	
A4		69.42	520		56.69	157		74.02	408	
N1		70.19	540		57.69	157		74.26	408	
N2		70.00	540		57.05	157		74.26	408	
N3	N3 - 1	69.42	536	0.528	57.69	157	0.638	74.08	408	1.39
	N3 - 2	69.44	540		57.96	157		72.79	408	
	N3 - 3	69.81	540		57.76	157		73.04	408	
	N3 - 4	70.00	540		57.32	157		74.26	408	
N4	N4 - 1	69.81	540	0.28	57.32	157	0.32	74.26	408	0.25
	N4 - 2	70.00	540		57.32	157		74.26	408	
	N4 - 3	70.00	540		57.32	157		74.02	408	
	N4 - 4	69.81	540		57.69	157		73.77	408	

A1 ~ A4. 奥利亚罗非鱼; N1 ~ N4. 尼罗罗非鱼。A1 - A4. *Oreochromis aureus*; N1 - N4. *O. niloticus*。

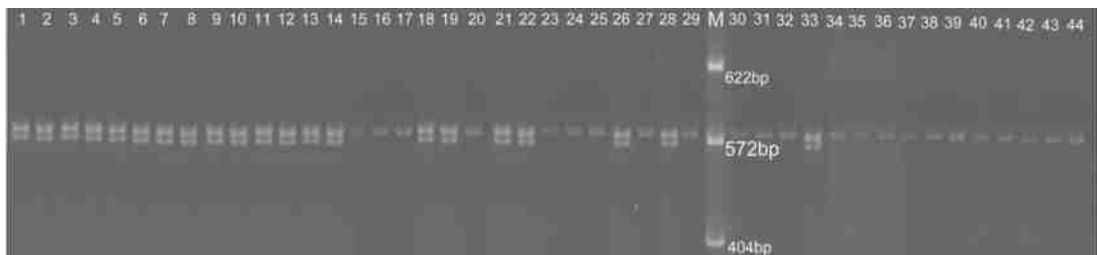


图 1 奥利亚罗非鱼、奥尼罗非鱼、尼罗罗非鱼 ITS1 扩增产物电泳图

Fig.1 Electrophoresis result of ITS1

M. PBR322 DNA 分子量标准; 1 ~ 14. 奥利亚罗非鱼; 15 ~ 29. 奥尼罗非鱼; 30 ~ 44. 尼罗罗非鱼。

M. PBR322 DNA Marker; 1 - 14. *Oreochromis aureus*; 15 - 29. *O. aureus* ( ) × *O. niloticus* ( ); 30 - 44. *O. niloticus*。

的 a 型 ITS1 (图 1)。

### 3 讨论

核糖体 DNA 由于在真核生物体内具有多拷贝性以及协同进化, 因而序列高度一致, 这使得该分子标记容易分离并且无需考虑不同拷贝之间的差异, 但随着研究的广泛和深入, 个体内

差异在很多生物中都有报道, 特别是十足目生物<sup>[14, 15]</sup>。本文结果显示, 在奥利亚罗非鱼体内明显存在长度不同的两类 ITS1, 奥利亚罗非鱼、尼罗罗非鱼同一个体不同克隆之间也存在着碱基的颠换、转换以及少数位点重复序列的拷贝数不一致, 这提醒我们今后研究罗非鱼 ITS 时也应该考虑测定多个克隆。目前在 GenBank 中

奥利亚罗非鱼 (DQ397881) ITS1 为本文的 b 型 ITS1。

使用 ITS1 这个位点对各 14、15、15 尾形态上判定是奥利亚罗非鱼、尼罗罗非鱼以及奥尼罗非鱼的 3 种罗非鱼进行了鉴定,结果显示,所有奥利亚罗非鱼均存在两种类型 ITS1,而 15 尾尼罗罗非鱼中有 1 尾与奥利亚罗非鱼一样有两种类型 ITS1,15 尾奥尼罗非鱼中部分个体为 a、b 两型 ITS1,另外个体为单一 a 型 ITS1。对此,我们认为具有两种类型 ITS1 的尼罗罗非鱼,可能在 ITS1 这个位点混杂了奥利亚罗非鱼的基因。本实验室使用功能基因 *MyoD* 中奥利亚罗非鱼、尼罗罗非鱼有明显差异的内含子序列,对上述 14 尾奥利亚罗非鱼、15 尾尼罗罗非鱼和 15 尾奥尼罗非鱼进行鉴定,结果显示 15 尾尼罗罗非鱼表现一致(结果待发表),由此证明该尾具有两种类型 ITS1 的尼罗罗非鱼并非奥尼罗非鱼。我们推测其很可能是奥尼罗非鱼与尼罗罗非鱼回交多代的后代。本文结果显示,现代分子生物学手段比传统形态学方法更能准确地反映种质混杂现象,在种质鉴定过程中也更为精确。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] 谢忠明. 淡水鱼类增殖技术. 北京:农业出版社,1995, 265 ~ 269.
- [ 2 ] 唐国盘,曾春芳,齐子鑫等. 福寿鱼的生物学特性及养殖前景. 水利渔业,2006,26(6):70 ~ 71,81.
- [ 3 ] Tare D,Smitherman R O. Predicted response to selection for early growth in *Tilapia nilotica*. *Trans Amer Fish Soc*,1980, 109:439 ~ 445.
- [ 4 ] Maearanas J M, Taniguchi N, Pante M J R, et al. Electrophoretic evidence for extensive hybrid gene introgression into commercial *Oreochromis niloticus* L. Stocks in the Philippines. *Aquaculture and Fisheries Management*,1986,17: 248 ~ 258.
- [ 5 ] Reed KM,Hackett J D,Phillips R B. Comparative analysis of intrarindividual and inter-species DNA sequence variation in salmonid ribosomal DNA cistrons. *Gene*,2000,249:115 ~ 125.
- [ 6 ] Dover G A. Molecular drive in multigene families, how biological novelties arise spread and assimilated. *Trends in Genetics*,1986,2:159 ~ 165.
- [ 7 ] Ki J S,Han M S. Cryptic long internal repeat sequences in the ribosomal DNA ITS1 gene of the dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* (dinophyceae): a 101 nucleotide six-repeat track with a palindrome-like structure. *Genes Genet Syst*,2007,82: 161 ~ 166.
- [ 8 ] Fabry S, Kohler A, Coleman A W. Intraspecies analysis: comparison on ITS sequence data and gene intron sequence data with breeding data for a worldwide collection of *Goniumpectorale*. *J Mol Evol*,1999,17:368 ~ 376.
- [ 9 ] Vogler A P, De Salle R. Evolution and phylogenetic information content of the ITS-1 region in the tiger beetle. *Cicindela dorsalis*. *Mol Biol Evol*,1994,11:393 ~ 405.
- [ 10 ] 耿金虎,李正西,沈佐锐. 诊断引物用于我国三种重要赤眼蜂分子鉴定的研究. 昆虫学报,2004,47(5):639 ~ 644.
- [ 11 ] 刘忠权,郝明干. 白花蛇舌草的 rDNA ITS 序列鉴定. 陕西中医,2005,26(2):167 ~ 169.
- [ 12 ] 许超德,李绍兰. 核酸分子系统学方法在酵母菌分类中的应用进展. 微生物学通报,2004,31(3):126 ~ 129
- [ 13 ] Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular Cloning-A Laboratory Manual. New York: Cold Springs Harbor Laboratory Press,1989.
- [ 14 ] Carranza S, Gribet G, Ribera C, et al. Evidence that two types of 18S rDNA coexist in the genome of *Dugesia (Schmidtea) mediterranea* (Platyhelminthes, Turbellaria, Tricladida). *Mol Biol Evol*,1996,13:824 ~ 832.
- [ 15 ] Vogler A P, De Salle R. Evolution and phylogenetic information content of the ITS-1 region in the tiger beetle, *Cicindela dorsalis*. *Mol Biol Evol*,1994,11:393 ~ 405.