

我国尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼 养殖群体的遗传渐渗

李思发 蔡完其

(上海水产大学, 200090)

摘 要 用 LKB 平板电泳仪、4.4%聚丙烯酰胺凝胶对南京罗非鱼良种场尼罗罗非鱼、奥利亚罗非鱼养殖群体肌、肝、脑、心、眼中的10种同工酶进行电泳分析的结果表明,奥利亚罗非鱼的群体未见多态位点,平均杂合度为0,是超“纯”的养殖群体;尼罗罗非鱼群体中有20%的尼奥杂交鱼,其体形酷似尼罗,难以肉眼鉴别。由此可见,我国尼罗罗非鱼养殖群体中已存在遗传渐渗问题,须注意防杂和提纯。在剔除了杂交鱼后,该场尼罗罗非鱼群体的平均杂合度为0.040,EST有多态现象。

关键词 尼罗罗非鱼,奥利亚罗非鱼,种群,同工酶,电泳,遗传渐渗

尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*, 以下简称尼罗)和奥利亚罗非鱼(*Oreochromis aureus*, 以下简称奥利亚)均属鲈形目,丽鱼科,罗非鱼属。具有适应性强、繁殖力高、食性广杂、抗病力强及肉味鲜美等特点,为世界重要养殖鱼类。自七十、八十年代分别引进我国以来,已成为我国淡水重要养殖对象。罗非鱼类很容易在种间自行杂交。近年来,由于近亲繁殖、亲本混杂等原因,引起了罗非鱼类的退化和混杂,造成生长速度降低、体色变杂、性成熟提早。罗非鱼的退化和混杂现象在国外相当普遍[Taniguchi 等, 1985; Pullin, 1988], 在我国的养殖业者中,虽早有传闻,但尚无研究报导。

江苏省南京罗非鱼良种场既生产尼罗和奥利亚的亲本,也生产“全雄”的尼奥鱼,是在我国具有较大生产规模和社会影响的场家,被列入国家级良种场。

为保证养殖生产的顺利发展,需要对我国罗非鱼的种质资源进行检测和保护,以便对良种进行提纯复壮。我们选择江苏省南京罗非鱼良种场的尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼的繁育群体进行种质遗传分析,试图通过同工酶的分析,了解该场及我国两种罗非鱼的遗传变异程度,以便采取对策。

1 材料和方法

1.1 材料来源

尼罗、奥利亚于1992年2月采于南京罗非鱼良种场。尼罗体长23.4—29.6 cm,体重445.8—864.5 g;奥利亚体长21.5—28.6 cm,体重376.4—737.6 g。均为保种亲鱼。

收稿日期:1994-05-30。

在进行形态测量后,在鱼尚未死之前,剪断鳃动脉放血,然后取下两只眼睛、一块背部白肌、部分肝脏、全部心脏及脑,分别装于小塑料袋中,编号,放于液氮罐中保存。运回室内后,立即放入低温冰箱,于 -25°C 下保存。

为了估计一个群体的遗传变异量,通常要研究大约20个基因位点[阿耶拉等,1987年中译本]。本次实验测定了肌、肝中10种酶的18或19个位点。两种鱼的样本各30尾。

两种鱼各组织、各种同工酶的实测样本大小如表1所示。

表1 实测样本大小(尾)
Table 1 Sample size analysed

同工酶	尼 罗					奥 利 亚				
	肌	肝	心	脑	眼	肌	肝	心	脑	眼
LDH	30	30	5	5	5	30	30	5	5	5
MDH	30	30				30	30			
IDH		30					30			
6PGDH		30					30			
α -GPDH	30					30				
EST	30	30				30	30			
SOD	30	30				30	30			
ADH		30					30			
SDH		30					30			
ME	30					30				

1.2 电泳方法

所测酶类、组织及使用缓冲系统如表2所示。

表2 实测酶类、组织及缓冲系统
Table 2 Enzymes, tissues and buffer systems used

酶	简称	酶号	结构	组织	缓冲系统	位点数
乳酸脱氢酶	LDH	1.1.1.27	四聚体	肌、肝、心、脑、眼	TC	2
苹果酸脱氢酶	MDH	1.1.1.37	二聚体	肌、肝	TC	4
异柠檬酸脱氢酶	IDH	1.1.1.42	二聚体	肝	TC	1
6-磷酸葡萄糖脱氢酶	6PGDH	1.1.1.43		肝	TC	2
甘油-3-磷酸脱氢酶	α -GPDH	1.1.1.8	二聚体	肌	TC	1
酯酶	EST	3.1.1.1	二聚体	肌、肝	EBT	2
超氧化物歧化酶	SOD	1.15.1.1	二聚体	肌、肝	EBT	3
醇脱氢酶	ADH	1.1.1.1	二聚体	肝	EBT	1*或2**
山梨醇脱氢酶	SDH	1.1.1.4		肝	HC	1
苹果酸酶	ME	1.1.1.40		肌	EBT	1
					合计	18或19

* 尼罗肝 ADH 具1个位点。

** 奥利亚肝 ADH 具2个位点。

制胶、电泳、图谱的定性、定量分析均按既定方法(李思发,1994)进行。

2 结果

2.1 酶谱分析

在电泳的10种酶中,LDH、MDH、EST、IDH、ADH、SOD 显带清晰,故对这些酶重点进行分析。

2.1.1 乳酸脱氢酶(LDH)

两种鱼各有2个LDH位点,即Ldh-A,Ldh-B。在白肌、肝脏、心脏和眼中,两个位点结合成3种同工酶—— A_4, A_2B_2, B_4 ;在脑中,两个位点结合成5种同工酶—— $A_4, A_3B_1, A_2B_2, A_1B_3, B_4$ 。两种罗非鱼五种组织的LDH均未见多态现象,LDH的谱带数列示于表3。

2.1.2 苹果酸脱氢酶(MDH)

两种鱼的肌、肝中均有两种不同的MDH,即移动较快的细胞质型s-MDH与移动较慢的线粒体型m-MDH,彼此不能杂合,容易区分。为了鉴别哪些谱带是s-MDH,哪些谱带是m-MDH,特对肌、肝及血清进行同板电泳分析。由于血清中不存在m-MDH,故通过比较,即可清楚地确认s-MDH和m-MDH。

两种鱼的m-MDH都有2个位点,即m-MDH-C₂和m-MDH-D₂,结合成3种同工酶—— C_2, C_2D_2, D_2 ;而s-MDH只有一个位点。两种鱼肌、肝的MDH均未见多态现象,MDH的谱带数列示于表4。

表3 尼罗和奥利亚 LDH 谱带数

Table 3 Band numbers of LDH in *O. niloticus* and *O. aureus*

种类	肌	肝	心	眼	脑
尼罗	2	3	2	3	5
奥利亚	2	3	2	3	5

表4 尼罗和奥利亚 MDH 谱带数

Table 4 Band numbers of MDH in *O. niloticus* and *O. aureus*

种类	肌肉		肝	
	m-MDH	s-MDH	m-MDH	s-MDH
尼罗	3	1	3	1
奥利亚	3	1	3	1

2.1.3 异柠檬酸脱氢酶(IDH)

两种鱼肝的IDH均只具有1个位点,表现出1条酶带。未见多态现象。奥利亚IDH的迁移率比尼罗的快7.6%(表5)。迁移率居于两种之间的可能是杂种。

2.1.4 6-磷酸葡萄糖脱氢酶(6PGDH)

两种鱼的肝中均显出了6PGDH,具2个位点:6Pgdh-A和6Pgdh-B,表现出3条谱带(AA、AB、BB),未见多态现象。

2.1.5 酯酶(EST)

两种鱼白肌中EST活力不强,故显带很浅,本文从略。肝中酯酶的活力强,显带清楚。尼罗、奥利亚肝中的EST均有Est-1和Est-2两个位点,分别显示为快带和慢带。尼罗的2个位点均有多态现象,奥利亚两位点均未见多态现象。

(1) 李思发编,1994,《上海水产大学水产种质资源研究室鱼类电泳手册》。

表5 尼罗和奥利亚肝 IDH 迁移率同板比较
Table 5 Comparison of mobility of liver IDH of
O. niloticus and *O. aureus*

种类	序号										范围	平均值±标准差
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
尼罗	18	18	18	17.2	17	17	18	*	*	*	17-18	17.6±0.5033
奥利亚	18.6	19.5	18.7	19.3	19	18.5	18.7	19	19.2	19.2	18.6-19.5	18.93±0.3335

注：* 迁移率分别为18.2、18.3、18.5；可能是杂交种。

2.1.6 超氧化物歧化酶(SOD)

两种鱼白肌和肝中均显出了 SOD。两种鱼的肌中 SOD 均具有3个位点。表现出3条酶带；而两种鱼的肝中 SOD 仅有1个位点，表现出1条酶带。在肌、肝中均未见多态现象。

2.1.7 山梨醇脱氢酶(SDH)

两种鱼肝的 SDH 均显带，都只有1个位点，表现出1条酶带，移向阳极，未见多态现象。

2.1.8 甘油-3-磷酸脱氢酶(α -GPDH)

两种鱼白肌的 α -GPDH 均显带，都只具有1个位点，表现出1条谱带，未见多态现象。

2.1.9 醇脱氢酶(ADH)

尼罗肝 ADH 具有1个位点，显示出1条酶带，未见多态现象；奥利亚肝 ADH 具有2个位点，显示出2条酶带(图 1)，未见多态现象。在两种鱼的白肌中，未发现此同工酶。此酶可作为区分尼罗与奥利亚的标志酶之一。

2.1.10 苹果酸酶(ME)

研究中发现，此酶的染色需过夜，显带不甚清楚。

2.2 两种罗非鱼养殖群体的遗传变异

在对30尾尼罗的电泳分析过程中发现，有6条不纯，为杂交种。为此，补做了6尾，使两种罗非鱼的群体分析的样本大小都是30。表 6是对尼罗、奥利亚等位基因频率的分析结果。

在测定的30尾奥利亚中，未见任何多态，平均杂合度为0；在测定的30尾尼罗中，仅 EST 有多态，平均杂合度为0.040。

对尼罗表现出多态的两个 EST 位点的观察值与期望值作卡方检验(表7)，未见显著差别，即观察值与期望值相符。

3 讨论

(1)罗非鱼类原来主要产于非洲，以色列也有少数几种自然分布。50年代以来，逐渐引入

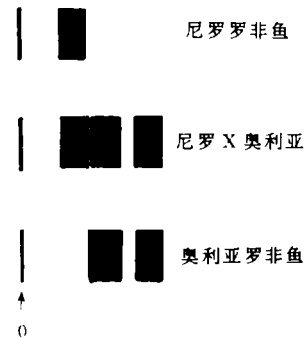


图1 尼罗罗非鱼、奥利亚罗非鱼及其杂交鱼的醇脱氢酶(ADH)酶谱

Fig. 1 Electrophoretogram of ADH of *Oreochromis niloticus* and *O. aureus* and their hybrid

他国。1957年,美国奥本大学从以色列引入奥利亚10尾,仅1雌3雄成活,这便是奥利亚在美国的奠基群(Foundational populations)。1983年,我国从奥本大学引入奥利亚33尾鱼种。1985年引入南京水产良种场,该场现在保存的奥利亚便是这33尾鱼种在我国繁殖的后代。由于奥利亚在移入美国和移入我国时先后通过了二次瓶颈,遗传变异先损失了16.7%,再损失了1.67%。这可能是形成目前南京罗非鱼良种场的奥利亚群体呈现近交超“纯”养殖群体的主要原因。

表6 尼罗和奥利亚的测定位点的等位基因频率

Table 6 Allelic frequency in analysed loci of *O. niloticus* and *O. aureus*

位点	等位基因	尼罗	位点	等位基因	奥利亚
Ldh-A	100	1.000	Ldh-A	100	1.000
Ldh-B	100	1.000	Ldh-B	100	1.000
m-Mdh-C	100	1.000	m-Mdh-C	100	1.000
m-Mdh-D	100	1.000	m-Mdh-D	100	1.000
s-Mdh-A	100	1.000	s-Mdh-A	100	1.000
s-Mdh-B	100	1.000	s-Mdh-B	100	1.000
IDH	100	1.000	IDH	100	1.000
Est-1	100	0.6833	Est-1	100	1.000
	115	0.0667			
	130	0.2500			
Est-2	90	0.0690	Est-2	100	1.000
	100	0.8793			
	105	0.0517			
Sod-A	100	1.000	Sod-A	100	1.000
Sod-B	100	1.000	Sod-B	100	1.000
Sod-C	100	1.000	Sod-C	100	1.000
6Pgdh-A	100	1.000	6Pgdh-A	100	1.000
6Pgdh-B	100	1.000	6Pgdh-B	100	1.000
Adh-A	100	1.000	Adh-A	100	1.000
			Adh-B	100	1.000
SDH	100	1.000	SDH	100	1.000
α -GPDH	100	1.000	α -GPDH	100	1.000

表7 尼罗肝脏 EST 多态性位点的基因型分布、等位基因频率及 χ^2 检验

Table 7 Genotypic distributions, allelic frequencies and chi-square tests at polymorphic loci of liver of *O. niloticus*

位点	基因型	观察值	期望值	χ^2	P	等位基因频率
Est-1	100/100	11	14	0.6428	0.70—0.80	$1^{100}=0.6833$
	100/115	4	4			$1^{115}=0.0667$
	100/130	15	15			$1^{130}=0.2500$
Est-2	100/100	24	22	1.5151	0.20—0.30	$2^{100}=0.8793$
	100/90	2	4			$2^{90}=0.0690$
	90/105	2	3			$2^{105}=0.0517$

我国长江水产研究所和湖北省水产局于1978年从苏丹尼罗河分二批(各27与34尾)引入尼罗罗非鱼原种,这是我国尼罗的奠基群。同年,广东也从泰国引进了尼罗。但目前我国养殖的

尼罗大多是从引入湖北的奠基群繁衍而来的。南京罗非鱼良种场于1984年从长江水产研究所引进的已是该奠基群的若干代(不详)。看来,在我国,尼罗的遗传瓶颈不如奥利亚那样严重,所以仍然表现一定的遗传变异,南京罗非鱼良种场的尼罗的杂合度尚有0.040。这同国外有关资料比较,尚属一般。据报导,1962年从埃及引入而繁殖于日本的尼罗群体的杂合度为0.014 [Basiao 和 Taniguchi, 1984]。后来,这批鱼又引入了泰国,所形成的 Chitralada 品系的杂合度还是0.014 [Pullin, 1988]。菲律宾自1972年以来,多次从国外数处引进尼罗,14个尼罗鱼养殖群体的平均杂合度为0.073 [李思发, 1993]。

(2)在对30尾尼罗电泳时,发现有6尾为杂种,这表明该尼罗养殖群体中,杂交种已占20%左右。它们在外表上酷似尼罗,误被当作尼罗而混入其繁育群体。这种杂种同正宗尼罗肉眼难以区分。在养殖生产上,生产和使用“全雄”尼罗是提高罗非鱼养殖产量的重要手段之一。用雌性尼罗与雄性奥利亚生产的杂交种,俗称尼奥罗非鱼,雄性比可达95%左右。同尼罗相比,尼奥鱼生长较快,群体产量可高出30%。但父母本的纯度对尼奥鱼的雄性性比的高低、养殖性能和外部形态的好坏有很大影响。如果不纯的尼罗与奥利亚,或者其杂交种混杂进了它们的父母本群体,尼奥鱼的雄性比将大大降低,养殖性能将变差。

一个物种的基因引入到另一个物种的基因库中的现象叫“渐渗杂交”(introgressive hybridization)。如果这两个物种在自然界里重叠分布,或在同一养殖系统里养殖,而且能产生可育的后代,那么,杂交后代一般倾向于同较为繁盛的物种回交。这样就造成了群体内的大多数个体同较为繁盛的物种相似,但也保留着另一亲本物种的一些性状。这就是我国罗非鱼养殖群体发生上述渐渗杂交的原因。

(3)为保持种的纯度,必须首先从生产管理着手,对亲本严加隔离,杜绝混杂。在担负有国家保种任务的罗非鱼良种场,原则上,不应该同时养殖尼罗和奥利亚。由于生产中难以做到长期地彻底地杜绝混杂,必要时,定期地根据生化遗传标志予以甄别,也应是有效手段之一。本研究表明,由于尼罗与奥利亚在肝 EST、肝 IDH、肝 ADH 的酶谱上有一定差异,而尼罗与奥利亚的杂交种在这些遗传标志上往往表现为中间型,两者是不难鉴别的。因此,应用生化遗传标志技术甄别罗非鱼亲本和杂交种是可行的。如能发展一种无伤害采样技术,使检验鱼得以保存就更好。

承南京罗非鱼良种场提供尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼材料,李先才、严银辉场长等大力支持。我校淡水养殖专业1988届杨晓荣同学参加工作。特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 李思发, 1993. 主要养殖鱼类种质资源研究进展, 水产学报, 17(4):344-358.
- [2] 阿耶拉等(蔡武诚等译), 1987. 现代遗传学, 147-160. 湖南科学技术出版社(长沙).
- [3] Basiao, Z. U. and N. Taniguchi, 1984. An investigation of enzyme and other protein polymorphism in Japanese stocks of the tilapia *Oreochromis niloticus* and *Tilapia zilli*. *Aquaculture*, 38:335-345.
- [4] Pullin, R. S. V. (ed.), 1988. *Tilapia Genetic Resources for Aquaculture*. ICLARM, Malina, Philippines. pp 108.
- [5] Taniguchi, N. J. et al., 1985. Introgressive hybridization in cultured tilapia stocks in the Philippines. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 51(8): 1219-1224.

INTROGRESSION IN HATCHERY STOCKS OF TILAPIA NILOTICA AND TILAPIA AUREA IN CHINA

Li Sifa and Cai Wanqi

(Shanghai Fisheries University, 200090)

ABSTRACT With LKB horizontal electrophoresis, 4.4% polyacrinomide gel, 10 enzymes in the muscle, liver, brain, heart and eye of tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) and tilapia aurea (*Oreochromis aureus*) from the Nanjing Tilapia Seed Farm, a national level fish seed farm, were analyzed. No polymorphic locus was found in tilapia aurea, and the average heterozygosity was 0. It indicated that the analyzed tilapia aurea stock is a "super pure" cultivated one. In the tilapia nilotica stock, 20% individuals were found as hybrid between nilotica and aurea, which external appearance closed to the nilotica extremely, and was very difficult to distinguish by eyes. It proves that the introgressive hybridization has happened in hatchery stocks of tilapia in China. Introgression must be prevented by safety keeping of "pure strain" and prevention of uncontrolled hybridization. After sorting out the part of hybrids, the heterozygosity of tilapia nilotica reached 0.040. Enzyme EST showed polymorphism.

KEYWORDS Tilapia nilotica, tilapia aurea, stock, enzyme, electrophoresis, introgression