

王 腾,肖 炜,李天宇,等. 埃及品系尼罗罗非鱼不同选育世代间遗传潜力分析[J]. 江苏农业科学,2014,42(2):184-188.

埃及品系尼罗罗非鱼不同选育世代间遗传潜力分析

王 腾¹,肖 炜²,李天宇²,邹芝英²,祝璟琳²,乐贻荣²,杨 弘^{1,2}

(1. 南京农业大学无锡渔业学院,江苏无锡 214081;

2. 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,江苏无锡 214081)

摘要:选用 25 个微卫星基因座对连续 3 个选育世代的埃及品系尼罗罗非鱼进行检测,通过分析世代间的遗传差异来探讨埃及品系尼罗罗非鱼的保种现状和遗传潜力。结果表明,3 个世代群体在 25 个微卫星基因座中共检测出 105 个等位基因,不同基因座上的等位基因数为 2~7,3 个世代群体的平均有效等位基因数(A_e)分别为 2.59、2.52、2.30 个,平均期望杂合度(H_e)分别为 0.547、0.545、0.518,平均观测杂合度(H_o)分别为 0.479、0.457、0.451,平均多态信息含量(PIC)分别为 0.487、0.480、0.458,3 个世代群体遗传多样性水平较高,世代间各遗传参数随世代数增长呈略微下降趋势,但差异不显著($P>0.05$);3 个世代间遗传分化指数(F_{st})在 0.017~0.048 之间,均小于 0.05,遗传分化程度相对较低;通过分子方差对遗传变异来源分析表明,经过选育群体世代间的遗传分化较小,世代间变异仅占总变异的 3.34%,分化主要来源于世代内个体间的遗传差异。目前,采用保种选育方法对埃及品系尼罗罗非鱼世代间的遗传信息较为稳定,具有较高的遗传潜力。

关键词:埃及品系;尼罗罗非鱼;选育世代;微卫星;遗传多样性;遗传潜力

中图分类号:S917.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)02-0184-04

尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)原产于非洲,具有生长速度快、食性杂及抗病力强等优点,是联合国粮农组织(FAO)向世界各国推荐的主要养殖品种之一。自 1978 年引进我国以来,罗非鱼养殖在我国得到迅速发展,现已成为我国淡水养殖的重要品种。优良的苗种是保证罗非鱼成鱼品质的关键,因此,良种的选择和培育是保障优良苗种供给、实现我国罗非鱼产业稳定发展的决定性因素。为此,1999 年,中国水产科学研究院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尼罗罗非鱼基础群体 5 000 尾,在南泉养殖基地采用闭锁群体继代选育法,以生长速度和尾鳍条纹为主要选择目标,2 年 1 个世代,选择总强度为 30% 左右。经过多年选育,该群体生长、经济性状进一步得到提高,现已成为 1 个新的优良品系^[1]。目前,群体选育法已经较多地用于罗非鱼的选育工作,往往重视经济性状的选择,在分子水平上对遗传变化的跟踪研究却较少,忽略了群体遗传型变化可能会导致遗传多样性的降低,从而降低遗传效应,造成遗传瓶颈效应。

近年来,分子标记技术已经广泛应用于水产动物的亲缘关系鉴定、物种多样性检测、种质资源的保护以及基因连锁图谱的构建和基因定位等领域^[2-5],在开展品种选育时,对群体遗传结构影响的研究也有一些成果。Romana-Eguia 等利用微卫星标记对尼罗罗非鱼不同选育世代的研究、Patricia 等利

用 RAPD 技术对不同世代凡纳滨对虾群体遗传多样性的分析,结果均显示选育世代遗传多样性有逐代降低的趋势^[6-7];颜晓勇等对吉富品系尼罗罗非鱼选育群体遗传变异分析发现,随着选育的进行,群体遗传参数逐渐降低,群体呈现出纯化趋势^[8]。本研究拟采用微卫星标记对埃及品系尼罗罗非鱼 3 个世代保种群遗传变异进行检测,初步评价埃及品系尼罗罗非鱼在现有选育方式下的保种现状及遗传潜力,了解尼罗罗非鱼在保种选育过程中遗传型的变化,为制定更加合理的保种方案提供理论依据,为其他品种的引种和保种工作提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验选用埃及品系尼罗罗非鱼,来自于中国水产科学研究院淡水渔业研究中心南泉保种基地。从 2006 年开始,连续进行 3 个世代的跟踪研究,随机采样,雌雄各半。 F_1 :由 F_0 代于 2006 年产的鱼苗,30 尾; F_2 :由 F_1 代于 2008 年产的鱼苗,24 尾; F_3 :由 F_2 代于 2010 年产的鱼苗,30 尾。分别采集 3 个群体的血液样本,取得的血样与 ACD 抗凝剂按 5:1 充分混合,-70℃ 保存备用。

PCR 反应所用的 *Taq*-DNA 聚合酶、dNTPs、DNA Marker 等生化试剂购自 TaKaRa 生物公司;PCR 仪为 Eppendorf Mastercycler gradient;电泳仪为 BIO-BAD PowerPac Universal;电泳槽为北京六一公司 DYCZ-B2 型垂直电泳槽;成像仪为 Gene Company Limited Gbox 型凝胶成像系统。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的制备 采用常规酚-氯仿法制备基因组 DNA,并通过琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测其浓度和纯度,稀释至 100 ng/μL,作为 PCR 扩增的模板。

1.2.2 微卫星引物的设计 本研究使用的引物均从已发

收稿日期:2013-07-29

基金项目:现代农业产业技术体系专项(编号:CARS-49);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(编号:2013JBFM01);现代农业人才支撑计划(编号:2130106)。

作者简介:王 腾(1990—),女,山东临沂人,硕士,研究方向为鱼类遗传育种。E-mail:wangteng0416@163.com。

通信作者:杨 弘(1966—),男,江苏无锡人,研究员,主要从事鱼类育种工作。E-mail:yangh@ffrc.cn。

表的尼罗罗非鱼遗传连锁图谱中选取^[9],按照互不连锁的原则,从不同的连锁群中选择具有多态性的 25 个微卫星基因座,相关信息见表 1。引物由上海申能博彩公司合成。

1.2.3 PCR 扩增及电泳检测 反应体系:10 × Buffer (Mg²⁺ Free)2.5 μL,MgCl₂ (25 mmol/L)1.5 μL,微卫星上下游引物 (10 μmol/L)各 1.5 μL,dNTP (2.5 mmol/L)2 μL,Taq - DNA 聚合酶 1 U,DNA 模板 (100 ng/μL)1 μL,补无菌去离子水至

25 μL。反应程序:94 ℃ 变性 5min;94 ℃ 变性 30 s,各引物 55 ~ 62 ℃ 复性 30 s,72 ℃ 延伸 35 s,30 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min。

PCR 扩增反应产物用 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,5 V/cm 电泳 4 h 左右,GelRed 染色,GBox 凝胶成像系统记录电泳结果,Gel - Pro Analyzer 软件 (Version 4.5) 分析扩增条带的分子量差异。

表 1 25 对微卫星引物特征

基因座	引物序列 (5'→3')		退火温度 (℃)	GenBank 注册号
	F	R		
UNH190	F:CGCGATCGAGCATTCTAA	R:TGTCTGCACGCGCTTTTGT	58	G12342
UNH222	F:CTCTAGCACACGTGCAT	R:TAACAGGTGGGAACCTCA	55	G12373
UNH846	F:TGGAGCAGCTTCTTCTACATCA	R:CACATGATGGAAGCCGTGTA	62	G68185
UNH853	F:TAAAGCTCGTCCCCGTAACA	R:TGCGTCTCATCACTGTCTGC	57	G68189
UNH874	F:AGTAAATGGGCGAACCTGT	R:TGAAGCTGGGAGTTTCCTGT	58	G68202
UNH879	F:GCATAAGGTGACTGGCTGGT	R:ACAAAGGGTCTCTGCAATTT	58	G68206
UNH896	F:CCTCTGTCCCTCCATGTGTT	R:AGCCTGGCTTTAGAGGCAAT	61	G68214
UNH899	F:ACGTCACATGGAGGTGCTTA	R:GCTAGACCTCTGTCCCCTGA	61	G68216
UNH906	F:AACATGCTTTTCAGCCTTCGT	R:TGAGCAAATCCCGTCCATA	60	G68220
UNH913	F:CAATGACTGTTTTTGTCTCTGTG	R:GCTTTCCTGACATGCAGTC	61	G68225
UNH914	F:CAGCTTGTGGAAGAAATACCA	R:CCACGCACTGTGGAATAATA	58	G68226
UNH932	F:AGCGCTAAATGAGCCAGTGT	R:TTCTTTAATGCCTGCCAGTG	60	G68238
UNH933	F:GGGGTGAGGTGTTCACAGAT	R:GGGGCCTTAGTTTCACITCA	62	G68239
UNH968	F:ACTGCTCCTCTGTGTCTGG	R:TCTTGCTGCTTCTCTCCACA	62	G68257
UNH971	F:GGTGGGCAGTGTGTCTTTTT	R:TTTTATCCAGGCCTCAGTT	57	G68259
UNH990	F:GCCACAGGTGACCATGTTAG	R:GGTGTCTGATTGCACTGACC	60	G68270
UNH995	F:CCAGCCCTCTGCATAAAGAC	R:GCAGCACAACCACAGTGCTA	61	G68274
UNH999	F:TGCAAAGTCACAAATCCACAA	R:CTCCCATTCATTACCCCAAA	60	G68278
GM012	F:TGACAGTCAGTGGCCATAACT	R:GCCTAAACGGGAACATCACA	60	BV005569
GM030	F:CCATTGGGTGTTCAATAAAA	R:GGCTAACAGGGCACTTCTTA	60	BV005278
GM076	F:CGGTGATGAAGCACAC	R:AGCTAAACTTAAGGTAATGCC	60	BV005298
GM134	F:ATAAGGTGGGTGACCAT	R:AGGGCAACAGACTATCTCCTA	60	BV005324
GM221	F:TACAGAAGTCGAGGCGAGATG	R:GTGGTGGCGATTGTGTCAT	60	BV200558
GM277	F:TGTTGTGAGAGACGAGGAGA	R:GTTGAAGCCTTTGTAAAATGC	60	BV005390
GM542	F:CGTCTTCTGAGGAATATGAGCA	R:TGATCATCAGGGAGCACTTG	60	BV005488

1.3 数据分析

使用 PopGene 1.32 软件计算每个群体的等位基因数 (observed number of alleles, N_a)、有效等位基因数 (effective number of alleles, A_e)、观测杂合度 (observed heterozygosity, H_o)、期望杂合度 (expected heterozygosity, H_e)、群体间遗传距离 (genetic distance, D_s) 和遗传相似性系数 (genetic similarity index, I)。利用 ARLEQUIN 3.1 软件,计算群体遗传分化指数 F_{st} ,估计群体间的遗传分化,分析群体内和群体间的分子方差 (AMOVA)。根据 Botstein 等计算多态信息含量 (polymorphism information content, PIC)^[10], PIC 计算公式为:

$PIC = 1 - (\sum_{i=1}^n P_i^2) - (\sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2)$ 。式中, n 为某一位点上等位基因数, P_i 、 P_j 分别为第 i 和第 j 个等位基因在群体中的频率, $j = i + 1$ 。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

采用 25 对微卫星引物对 3 个世代共 84 尾样本进行分析

比较。由表 2 可见,25 个基因座在 3 个群体中共检测到了 105 个等位基因,大多集中在 100 ~ 300 bp 之间,不同基因座位上的等位基因数在 2 ~ 7 个之间,平均每个基因座上的等位基因数为 4.2 个。采用 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,得到清晰且重复性较好的产物。图 1 所示为引物 GM277 分别在 3 个群体中的扩增图谱。

2.2 3 个世代间的遗传多样性

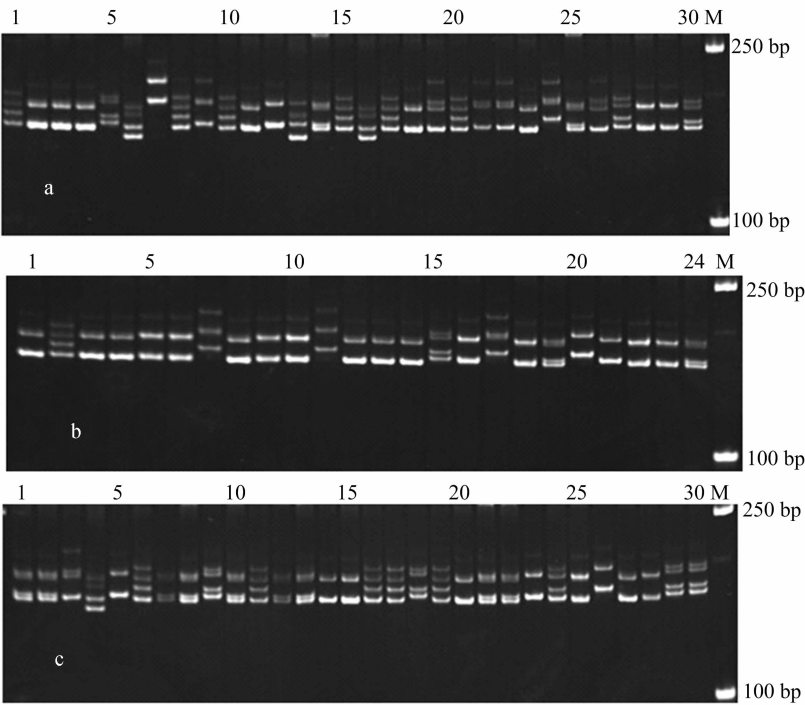
由表 3 可见,3 个世代的平均有效等位基因数 (A_e) 分别为 2.59、2.52、2.30,平均期望杂合度 (H_e) 分别为 0.547、0.545、0.518,平均观测杂合度 (H_o) 分别为 0.479、0.457、0.451,平均多态信息含量 (PIC) 分别为 0.487、0.480、0.458,3 个罗非鱼保种选育群体的遗传多样性均属于中度偏高水平。其中, F_1 代遗传多样性最高, F_3 代最低,呈现出略微下降的趋势。经 t 检验 $P > 0.05$,3 世代间无明显差异。

2.3 3 个世代间的遗传差异

3 个罗非鱼群体间的 Nei's 遗传距离 (D_s) 和遗传相似系数见表 4。在 F_1 、 F_2 、 F_3 3 个世代中, F_1 和 F_3 的遗传距离最大,为 0.077,遗传相似系数最小,为 0.926,说明两者亲缘关

表 2 3 个罗非鱼群体在 25 个微卫星基因座的等位基因片段

基因座	等位基因片段位置(bp)			总计数 (个)
	F ₁	F ₂	F ₃	
UNH190	146,151,159,166,170	146,151,159,166,170	146,151,159,166,170	5
UNH222	173,183,190,196,200	173,183,190,196	173,183,190,196	5
UNH846	167,177,200	167,177,200	167,177,200	3
UNH853,	160,164,173,181	160,164,173,181,191	160,164,173,181	5
UNH874,	183,187,190,200,207	183,187,190,200	183,187,190,200	5
UNH879	180,186	180,182,186	180,182,186	3
UNH896	151,157	151,157,164,170	151,157,164,170	4
UNH899,	140,151,157,162,170	140,151,157,162,170	151,157,162,170	5
UNH906,	152,157	152,157	152,157	2
UNH913	106,113,115,121	106,113,115,118,121	106,113,115,118,121	5
UNH914	158,168,177	168,177	168,177	3
UNH932	117,131,134,144	117,131	117,131	4
UNH933	223,230,235	223,230,235	230,235	3
UNH968	178,182,185,189	178,182,185,189	178,182,185,189	4
UNH971	206,214,217,220,223,230	206,214,217,220,230	206,214,217,220,230	6
UNH990,	141,143,148	141,143,148	141,143,148	3
UNH995,	175,186	175	175,186	2
UNH999	98,107,112,121,124	98,107,112,116,121,124,132	98,107,112,116,121,124	7
GM012	163,181,185,196	181,185,189,196	181,185,189,196,200	6
GM030	205,214,221,225,234	205,214,221,225	205,214,221,225,234	5
GM076	200,210,219,225	200,210,219,225	200,210,219,225,230	5
GM134	158,164	158,164	164	2
GM221	241,220,231	241,220,231	241,220,231	3
GM277	156,164,167,172,183	164,167,172,183	156,164,167,172,183	5
GM542	242,250,263,269,278	242,250,263,269,278	242,250,263,269,278	5



a: F₁; b: F₂; c: F₃; 泳道号为样品号
图1 基因座 GM277 在 3 个选育世代的 PCR 扩增结果

系较远;F₂ 与 F₃ 的遗传距离最小,为 0.040,遗传相似系数最大,为 0.961,说明两者亲缘关系较近。

Wright 认为,遗传分化指数 $F_{st} \leq 0.05$ 表示群体间遗传分化微弱; $0.05 < F_{st} \leq 0.15$ 表示群体间遗传分化中等; $0.15 <$

表 3 3 个罗非鱼群体在 25 个微卫星座位的遗传参数

代数	PIC	A_e	H_o	H_e
F_1	0.487	2.59	0.479	0.547
F_2	0.480	2.52	0.457	0.545
F_3	0.458	2.30	0.451	0.518

表 4 3 个罗非鱼群体间 Nei's 遗传距离和遗传相似性系数

世代	遗传距离	相似性系数
$F_1 - F_2$	0.062	0.940
$F_1 - F_3$	0.077	0.926
$F_2 - F_3$	0.040	0.961

$F_{st} \leq 0.25$ 表示群体间遗传分化较大; $F_{st} > 0.25$ 表示群体间遗传分化极大^[11]。由表 5 可见,各群体间遗传分化指数(F_{st}) 在 0.017~0.048 之间, F_1 、 F_2 、 F_3 3 个世代间配对比较 F_{st} 值均小于 0.05,表明 3 个世代群体间无明显的遗传分化。

表 5 3 个群体间遗传分化指数 F_{st} 值

群体	F_1	F_2	F_3
F_1	0		
F_2	0.032	0	
F_3	0.048	0.017	0

分子方差分析(AMOVA)结果由表 6 可见,群体间方差占总方差的 3.34%,而群体内方差占总方差的 96.66%,表明各世代群体的遗传变异绝大部分来源于群体内个体间的遗传变异。

表 6 3 个罗非鱼群体的 AMOVA 分析

变异来源	自由度	方差总和	变异组分	所占比例(%)
群体间	2	38.775	0.229 00	3.34
群体内	165	1 093.767	6.628 89	96.66
总和	167	1 132.542	6.857 89	100.00

3 小结与讨论

3.1 埃及尼罗罗非鱼各世代保种群的遗传分析

通过对埃及品系尼罗罗非鱼 3 个世代保种选育群体进行遗传多样性检测,对遗传多样性参数进行比较,结果显示,3 个罗非鱼选育群体平均多态信息含量(PIC) 分别为 0.487、0.480、0.458,均处于中度偏高的遗传多样性水平^[10],与 Hassanien 等研究埃及尼罗罗非鱼 5 个野生群体遗传多样性得出的结果($A_e = 8.4$ 、 $H_o = 0.702$ 、 $H_e = 0.869$)^[12] 相比,这 3 个罗非鱼选育群体的遗传多样性水平较低($A_e = 2.47$ 、 $H_o = 0.462$ 、 $H_e = 0.537$),这可能与引种后尼罗罗非鱼为人工养殖群体,并且经历了选育有关。Macaranas 等对尼罗罗非鱼非洲野生群体和亚洲养殖群体进行了遗传差异分析发现,养殖群体遗传多样性高于野生群体,推测是由于尼罗罗非鱼养殖群体与莫桑比克罗非鱼发生了渐渗杂交的原因^[13]。本试验尼罗罗非鱼遗传多样性虽然低于其他学者的研究结果,但其遗传多样性仍处于较高水平,3 个保种世代群体的遗传多样性有逐代降低的趋势,世代间无明显差异($P > 0.05$),这反映了埃及品系尼罗罗非鱼保种群体的遗传多样性得到了很好的保存,保种选育效果较好。

埃及品系尼罗罗非鱼从 F_1 至 F_3 代遗传差异很小($F_{st} <$

0.05),通过分子方差对遗传变异来源分析,经过人工选育,群体世代间遗传分化并不大,世代间变异仅占总变异的 3.34%,分化主要来源于世代内个体间的遗传差异。 F_3 与 F_2 之间的分化小于 F_2 与 F_1 之间的分化,推测相邻世代间的分化随着世代增加可能呈现出逐渐降低的趋势,群体遗传结构逐渐趋于稳定。从 3 个选育世代间的遗传距离和遗传相似性结果可以看出,随着选育的进行, F_2 、 F_3 与 F_1 之间的遗传距离逐渐增大,而遗传相似性系数逐渐减小,这表明埃及品系尼罗罗非鱼经过 3 代群体选育,人工选择压力在一定程度上改变了选育群体的遗传结构,部分基因座上等位基因频率发生改变,可以获得具有更稳定遗传水平的选育良种。

3.2 保种选育方法的可行性探讨

保种就是有效地控制群体的近交和遗传漂变,尽可能多地保存群体原有的基因和杂合度,群体规模是决定保种效果的基本因素^[14]。为了避免种群中某些基因的丢失,生产单位多以大量的群体进行保种和引种。2003 年,广西水产研究所从南京农业大学无锡渔业学院引进埃及品系尼罗罗非鱼种苗 51 360 尾,经多代选育已获得较为理想的苗种繁育亲本^[15],其遗传多样性也得到了良好的保存^[16]。从维持种群遗传多样性的角度来讲,保留群体的规模越大越好,而在实际生产中,如果保留群体规模过大,就不可避免造成人力、物力资源的大量浪费。本研究以雌鱼 600 尾、雄鱼 300 尾进行保种,群体规模较小,亲鱼群体有效大小可达 500 尾以上,近交增量在 0.1% 以内,理论上可基本避免近亲交配^[17-18]。从微卫星检测结果来看,埃及尼罗罗非鱼保种群体遗传多样性得到了很好的保存,本研究的保种选育方法具有一定的可行性,由于受选育保种数目所限,选育世代遗传多样性发生了一定程度的变化和下降。另外,本研究仅通过微卫星标记对 3 个世代进行了遗传方面的分析和探讨,还应结合生长指标、血液生化指标等其他生物学指标对保种效果进行进一步分析,从而制定出更为合理有效的保种方案。

参考文献:

[1] 夏德全. 论罗非鱼产业发展[J]. 海洋与渔业,2003(8):7-9.
[2] Naish K A, Skibinski D O F. Tetranucleotide microsatellites loci for Indian major carp[J]. Journal of Fish Biol,1998,53(4):886-889.
[3] 王婷婷,宋学宏,许爱国,等. 应用微卫星标记分析 4 个黄颡鱼群体的遗传多样性[J]. 江苏农业科学,2012,40(4):41-45.
[4] Banks M A, Blouin M S, Baldwin B A, et al. Isolation and inheritance of novel microsatellites in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) [J]. The Journal of Heredity,1999,90(2):281-288.
[5] Kocher T D, Lee W J, Sobolewska H, et al. A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Genetics,1998,148(3):1225-1232.
[6] Romana-Eguia M R, Ikeda M, Basiao Z U, et al. Genetic changes during mass selection for growth in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), assessed by microsatellites [J]. Aquaculture Research,2005,36(1):69-78.
[7] Patricia D F, Pedrom M J. Assessment of the genetic diversity in five generations of a commercial broodstock line of *Litopenaeus vannamei* shrimp [J]. African Journal of Biotechnology,2005,4(12):1362-1367.

张 芹, 宋 威, 屈长义. 伊河团头鲂染色体的组型[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(2): 188–189.

伊河团头鲂染色体的组型

张 芹¹, 宋 威², 屈长义¹

(1. 河南省水产科学研究院, 河南郑州 450044; 2. 河南工业大学, 河南郑州 450001)

摘要:利用腹腔注射秋水仙素制备肾细胞染色体的方法, 对伊河团头鲂的染色体组型进行研究。结果表明, 其二倍体数目为 $2n=48$, 核型公式为 $2n=10m+30sm+8st$, 染色体总臂数为 88。

关键词:伊河团头鲂; 染色体; 核型

中图分类号: S965.119.1; S917.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2014)02–0188–02

古语有“洛鲤伊鲂, 贵于牛羊”的美称, 这其中的“伊鲂”, 就是产于河南伊河的团头鲂(简称伊河鲂)。伊河鲂历史悠久, 味道鲜美, 是款待贵宾的佳肴。19 世纪 20 年代以来, 由于生态环境的恶化、水域的污染和过度捕捞等, 使黄河流域生物多样性遭到严重破坏, 渔业资源不断衰减。不仅如此, 近十几年来由于黄河连年断流, 给中下游乃至河口地区的渔业资源和生态环境造成灾难性的影响, 一些名贵鱼类品种已难见踪迹。河南省境内黄河支流上的洛河鲤鱼和伊河鲂如今也已基本绝迹, 对于这些珍稀品种的保护工作刻不容缓。本研究对伊河鲂染色体进行了研究, 逐步开展该种质资源的鉴定工作。

1 材料与方法

1.1 材料

伊河鲂取自河南省嵩县陆浑水库, 共 10 尾, 体长 26.4 ~ 56.5 cm, 体重为 256.6 ~ 2 381.6 g。试验用鱼暂养在温室中,

水温 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。

1.2 试验方法

1.2.1 染色体标本的制备 参照林义浩植物血细胞凝集素(PHA)体内注射法^[1], 并根据实际情况加以改进。按照 $2\text{ }\mu\text{g/g}$ 的剂量向试验鱼注射秋水仙素, 2.5 h 后剖腹取肾脏。肾脏在 0.75% 生理盐水中清洗 2 ~ 3 遍, 充分剪碎, 用纱布过滤除去血块及其他组织, 再加入适量生理盐水, 反复吹打, 制成细胞悬液, $1\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 5 min, 收集细胞; 加入预热的低渗液 $(0.037\text{ }5\text{ mol/L KCl})$, 37°C 低渗 25 ~ 30 min。在低渗后的细胞悬液中加入固定液(甲醇: 冰醋酸 = 3: 1) 1 mL , $1\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 8 min, 弃上清; 加固定液 5 mL, 吹打均匀后室温固定 30 min, 离心, 重复固定 1 次; 最后一次离心保留约 5 倍细胞体积的上清液制成细胞悬液, 取 -20°C 预冷载玻片倾斜 45° 滴片, 每片 1 ~ 2 滴, 迅速在酒精灯上烤干。10% Giemsa 液(pH 值 = 6.8)染色 20 min, 蒸馏水冲洗, 自然干燥后封片。

1.2.2 核型分析 选取 100 个分散良好的细胞, 观察统计, 确定染色体 $2n$ 数目。选取 10 个数目完整、长度适中、着丝点清楚、2 条单体适度分开、形态清晰的分裂相进行显微摄影, 对每条染色体确认着丝点位置, 分别测量长臂和短臂。计算其相对长度和臂比值, 并按 Levan 提出的标准^[2]进行配对、分类排列组型。

收稿日期: 2013–05–29

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项(编号: nycytx–49–34); 国家科技基础条件平台–水产种质资源平台项目; 河南省重点攻关项目(编号: 112102110054)。

作者简介: 张 芹(1980—), 女, 河南辉县人, 硕士, 畜牧师, 主要从事鱼类遗传育种研究。E-mail: zhangqin.2007@163.com。

[8] 颜晓勇, 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.

[9] Lee B Y, Lee W J, Streelman J T, et al. A second-generation genetic linkage map of tilapia (*Oreochromis* spp.) [J]. Genetics, 2005, 170(1): 237–244.

[10] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. American Journal of Human Genetics, 1980, 32(3): 314–331.

[11] Wright S. Evolution and the genetics of populations [M]. Chicago: University of Chicago Press, 1978: 1–30.

[12] Hassanien H A, Gilbey J. Genetic diversity and differentiation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) revealed by DNA microsatellites [J]. Aquaculture Research, 2005, 36(14): 1450–1457.

[13] Macaranas J M, Agustin L Q, Ablan M A, et al. Genetic improve-

ment of farmed tilapias; biochemical characterization of strain differences in Nile tilapia [J]. Aquaculture International, 1995, 3(1): 43–54.

[14] Wright S. Evolution in mendelian populations [J]. Genetics, 1931, 16(2): 97–157.

[15] 曹瑾玲, 陈剑杰, 杨 弘, 等. 埃及品系尼罗罗非鱼的选育及其效果分析[J]. 水生生物学报, 2010, 34(4): 866–871.

[16] 肖 炜, 杨 弘, 李大大, 等. 同种罗非鱼 (*Tilapia*) 不同地区选育群体的遗传多样性分析 [J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(4): 530–537.

[17] 李思发. 鱼类繁育群体遗传性能的保护 [J]. 水产学报, 1988, 12(3): 283–290.

[18] Franklin I R. Evolutionary change in small populations [C]//Soule M E, Wilcox B A. Conservation biology: An evolutionary–ecological perspective. Sunderland: Sinauer Associate, 1980: 135–150.