

上海水产大学

第二届研究生学术报告会论文集

The Proceedings of the Second
Postgraduate Academic Forum, SFU



上海水产大学研究生部编

贾晓平 述

前 言

为激发我校研究生献身水产、振兴水产事业的热情,加强研究生的学术交流、拓宽研究生的知识面,培养和提高研究生的创新精神和综合科研素质,在研究生部的主持下,于2000年5月16-20日举办了“上海水产大学第二届研究生学术报告会”,主题为“新世纪的水产科技”。报告会共收到学术论文22篇,论文内容涉及水产养殖、水产品加工及贮藏工程、制冷及低温工程、渔业资源、捕捞学、产业经济学、水生生物学等学科。《上海水产大学第二届研究生学术报告会论文集》就是在此基础上编辑而成的。

在上海水产大学第二届研究生学术报告会的举办和论文集编辑过程中,受到了学校领导、图书馆、宣传部、渔业学院、食品学院、海洋学院、经济贸易学院、研究生会的大力支持和帮助,在此一并表示感谢。

上海水产大学研究生部

2000年5月

目 录

鲂属团头鲂、三角鲂、广东鲂亲缘关系的研究	朱泽闻 (1)
尼罗、奥利亚、尼奥三种罗非鱼对温和气单胞菌苗的抗体效价比较	马江耀 (10)
温度对牙鲆仔鱼变态阶段甲状腺激素水平及生长、变态的影响	张臻宇 (15)
应用微卫星标记技术对野鲤和两个鲤鱼选育品系的遗传分析	杜长斌 (22)
从鲂鱼羽状壳中制备 β -壳聚糖的研究	蒋霞云 (28)
鲢及其加工废弃物发酵鱼露的比较	张雪花 (33)
氨基葡萄糖硫酸盐制备及一些性质研究	耿作献 (40)
α -壳聚糖的抑菌性能及其在鱼品保鲜应用上的研究	宋献周 (48)
杭州湾粪大肠杆菌和异养细菌的分布特征及其环境因子	焦俊鹏 (52)
北太平洋西经海域大型柔鱼的生物学特性	张圣海 (57)
我国城镇居民水产品消费支出与其它农副食品消费支出结构的模型对比分析	李同月 (63)
二种微生物在养殖水处理中的应用研究 (摘要)	毕永红 (67)
纤维素酶对团头鲂生长性能的影响 (摘要)	余丰年 (68)
不同喂养条件及营养强化对大型蚤脂肪酸组成的影响 (摘要)	黄显清 (70)
β 雌二醇对中华绒螯蟹精巢及促雄腺影响的初步研究 (摘要)	常林瑞 (72)
白鲢、草鱼在贮藏中肌肉的系列化变化初控 (摘要)	邓德文 (73)
不同发酵工艺对黄原胶发酵的影响 (摘要)	胡德亮 (74)
AutoCAD 二次开发在冷风机绘图中的应用 (摘要)	何 为 (75)
蟹冻复鲜肉与冷却肉质量的比较研究 (摘要)	方 敏 (76)
赤壳龙眼气调包装实验研究 (摘要)	张 青 (77)
鸡粪再生饲料开发与应用的进展及改进初探 (摘要)	孙建岐 (78)
高强度捕捞对东海带鱼资源的负面影响 (摘要)	郭振华 (79)

鲂属团头鲂、三角鲂、广东鲂亲缘关系的研究

水产养殖专业 朱泽闻

摘要 从形态和生化遗传方面对三种鲂的种间差异和亲缘关系进行研究。形态指标的判别分析、聚类分析及主成分分析的结果表明：团头鲂与三角鲂的比较接近；广东鲂与其他两种鲂差别较大。生化遗传的同工酶谱和遗传距离分析的结果表明：团头鲂和三角鲂的生化遗传差异较小；而广东鲂与其他两种鲂差异较大。两方面的结果一致表明：团头鲂和三角鲂的亲缘关系比较接近；而广东鲂与其他两种鲂亲缘关系较远。

关键词 团头鲂 三角鲂 广东鲂 形态 同工酶 亲缘关系

Study on phylogensis relationship of *Megalobrama amblycephala*, *Megalobrama terminalis*, *Megalobrama hoffmanni*

Zhu zhenwen

Abstract This paper study interspecies difference and phylogensis relationship of *M.amblycephala*, *M.terminalis*, *M.hoffmanni* by morphologic discriminant analysis and biochemical genetic difference analysis. The results of cluster, discriminant, principal component analysis from the morphologic parameters indicate *M.amblycephala* is close to *M.terminalis*; but *M.hoffmanni* have great difference with others. Results of isoenzymes and genetic distance from biochemical genetic difference analysis also indicated there is a small difference in biochemical genetic characters between *M.amblycephala* and *M.terminalis*; but *M.hoffmanni* have significant difference with others. In general, *M.amblycephala* have closely relationship to *M.terminalis*, but *M.hoffmanni* is far from the others.

Keyword *Megalobrama amblycephala* *M.terminalis* *M.Hoffmann* Morphology Isoenzyme
Phylogensis relationship

鲂类团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)、三角鲂(*Megalobrama terminalis*)、广东鲂(*Megalobrama hoffmanni*)为我国特有鱼类。其肉质细腻、味道鲜美，受到人们的喜爱。60年代我国就开始了三种鲂人工繁殖和放流，增殖效果显著，已成为我国重要的淡水增养殖对象，具有较高的经济价值。

三种鲂是形态相似的近缘种，建立三种鲂可量化的种质鉴定标准，研究三种鲂种间亲缘关系对三种鲂的养殖长久持续的发展有较大的现实意义。

1. 材料和方法

1.1 采样地点和时间

团头鲂原产于湖北公安县淤泥湖，现保种于上海水产大学上海南汇团头鲂选育实验基地；三角鲂原产于浙江钱塘江杭州江段，现保种于浙江杭州水产研究所三角鲂原种场；广东鲂原产于广东珠江番禺江段，现保种于广东罗非鱼原种场。

从1999年到2000年，于冬季捕捞季节随机采集鲂鱼的实验样本，每种鲂的样本数均为30尾。体长10.6~46.8厘米，体重47.5~1341.1克。

1.2 形态数据测量

实测鱼共90尾(30尾×3种)，3420个形态数据。这些数据可分为两大类。

一类为传统形态学数据，包括可数性状数据和可量性状数据，共17项。可数性状数据有侧线鳞数，侧线上鳞、侧线下鳞、背鳞棘数、背鳞条数、臀鳞棘数、臀鳞条数，共7项；可量性状数据有全长、体长、体高、头长、吻长、眼径、眼间距、尾柄长、尾柄高和体重，共10项。

另一类为框架数据,共 21 项。2-4,4-6……及 1-2,共 21 项(图 1)。框架测定位点的选择参照李思发[1998]。

可数性状直观计数,可量性状用两脚规测量直线距离,测量精度到 mm。

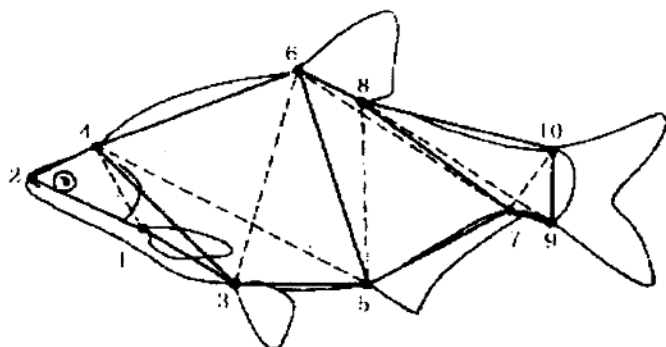


图 1 团头鲂、三角鲂、广东鲂框架图
测点标有号码,测点间距离分别以实线(框周)和虚线(框内)表示
Fig.1 Truss network of *Megalobrama amblycephala*,
Megalobrama terminalis, *Megalobrama hoffmanni*

Morphological landmarks are numbered and morphometric distances between landmarks are denoted by black and dashed lines

1.3 分析方法

对框架数据和传统形态可量性状数据,分析前须进行预处理,即将所有数据先转化成对体长或头长的比值,以消除鱼体大小不同的影响,然后再取自然对数(ln),以削除方差齐性,提高正态分布性[Sokal 与 Rohlf,1981]。

计算和分析选用的形态参数为:(1)传统测定,包括体重/体长³×100、全长/体长、体长/体高、体长/头长、头长/吻长、头长/眼径、头长/眼间距、体长/尾柄长、尾柄长/尾柄高,共 9 个参数,表示为 V1、V2、……V9;(2)框架测定,包括体长和各项框架数据的比数,共计 21 个参数,表示为 V1、V11、……V30。传统参数加框架参数共计 30 个。

所有形态参数用 SYSTAT 软件[Wildinson,1989]进行聚类分析,判别分析和主成分分析。传统可数性状数据用 χ^2 检验其显著性。

本实验还用传统鱼类学分类方法[潘炯华等,1990]对 90 条鲂鱼进行分类判别,以比较两种方法的判别效果。

2. 结果

2.1 可数性状

三种鲂的可数性状的平均值及其标准差如表 1。

经卡方检验 3 种鲂鱼间两两配对比较的卡方值是 $\chi^2_{\text{团头鲂-三角鲂}}=0.650$ 、 $\chi^2_{\text{团头鲂-广东鲂}}=0.493$ 、 $\chi^2_{\text{三角鲂-广东鲂}}=0.099$,都小于 $\chi^2_{4,0.95}=0.711$,表明三种鲂鱼的可数性状的相互差异均不显著。这表明他们是形态相似的近缘种。

表 1 团头鲂、广东鲂、三角鲂可数性状均值和方差

Tab.1 Overall means and standard deviation of meristic characters of *Megalobrama amblycephala*, *Megalobrama terminalis*, *Megalobrama hoffmanni*

性状	侧线鳞数	侧线上鳞	侧线下鳞	背棘条数	背鳍条数	臀棘条数	臀鳍条数
团头鲂	52.30±0.70	11.33±0.48	9	3	7	3	25.37±0.49
三角鲂	49.13±0.33	11.23±0.43	7	3	7	3	25.930±.25
广东鲂	51.33±0.35	11.07±0.25	7	3	0.69±0.19	3	26.13±0.35

2.2 可量性状和框架参数

2.2.1 聚类分析

形态距离见表 2。三角鲂和团头鲂的形态较接近，广东鲂与前两者的形态差异较大。他们的聚类分析图(图 2)也显示三角鲂与团头鲂形态距离较近。

表 2 用聚类分析方法计算的团头鲂、三角鲂、
广东鲂形态距离

Tab.2 Morphological distances of *Megalobrama amblycephala*, *Megalobrama terminalis*, *Megalobrama hoffmanni* calculated by clustering method

形态距离	团头鲂	三角鲂	广东鲂
团头鲂	--	0.321	0.528
三角鲂	0.321	--	0.575
广东鲂	0.528	0.575	--

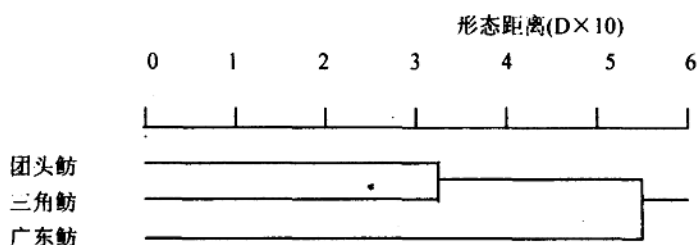


图 2 团头鲂、三角鲂、广东鲂的聚类分析图

Fig.2 Clustering dendrogram of *Megalobrama amblycephala*, *Megalobrama terminalis*, *Megalobrama hoffmanni*

2.2.2 判别分析

用判别分析程序对 3 种鲂的 30 个形态参数进行分析，判别准确率为 100%，判别效果极显著($p < 0.01$)。

依据 9 个传统鱼类学测定参数对 3 种鲂的判别结果如表 3。

表3 团头鲂、三角鲂和广东鲂判别结果(采用传统鱼类学形态学测定参数)

Tab.3 Results of discriminant analysis of *Megalobrama amblycephala*,
Megalobrama terminalis, *Megalobrama hoffmanni*
(by conventional ichthyological parameters)

种类 (尾)	广东鲂	三角鲂	团头鲂	判别准确率		平均拟合概率 (%)
				P1(%)	P2(%)	
广东鲂(30)	30	0	0	100	100	
三角鲂(30)	0	26	4	86.66	100	96.66
团头鲂(30)	0	2	28	100	93.33	
合计	30	28	32			
%	33.33	31.11	35.55			

形态判别分析方法较传统鱼类学分类方法能提供判别率的定量指标。

2.2.3 判别公式的建立

为提高判别公式在实际生产应用的简便性和实用性,从上述30个形态参数中选出对判别贡献最大的7个参数(V3,V7,V14,V9,V4,V2,V5),按F检验值大小排列,见表4。

表4 判别分析中贡献较大的参数(按单因子F检验值由大到小排列)

Tab.4 Variables (ranked by F test values) with high contribution in discriminant analysis

显著差异参数	V3	V7	V9	V14	V4	V2	V5
对应形态指标	体长/体高	头长/眼间距	尾柄长/尾柄高	D(2-4)/体长	体长/头长	全长/体长	头长/吻长
F检验值(F)	97.43	45.47	17.27	11.21	9.99	5.99	4.47
判别率(P>F)	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0023	0.0374	0.014

利用挑选后的7个形态参数进行判别分析,判别效果极显著($P<0.01$)。判别准确率P1为96.66%~100%;判别准确率P2为96.77%~100%,平均判别拟合概率高达98.90%(表5),比前述利用传统鱼类形态分类参数的判别率(96.66%)提高了2.24个百分点。

表5 团头鲂、三角鲂和广东鲂判别结果(选用优选后的7个参数)

Tab.5 Results of discriminant analysis of *Megalobrama amblycephala*,
Megalobrama terminalis, *Megalobrama hoffmanni*
(based on 7 optimized parameters)

种类 (尾)	广东鲂	三角鲂	团头鲂	判别准确率		平均拟合概率 (%)
				P1(%)	P2(%)	
广东鲂(30)	30	0	0	100	100	
三角鲂(30)	0	29	1	96.66	100	98.90
团头鲂(30)	0	0	30	100	96.77	
合计	30	29	31			
%	33.33	32.23	34.44			

利用优选后的7个参数建立团头鲂、广东鲂和三角鲂的判别公式如下:

(1) 广东鲂

$$Y1 = -1552.88 + 1199V2 + 273.23V3 + 70.88V4 + 61.38V5 + 38.07V7 + 169.51V9 + 576.51V14$$

(2) 三角鲂

$$Y1 = -1399.16 + 1183.2V2 + 205.9V3 + 83.68V4 + 70.02V5 + 46.13V7 + 148.61V9 + 258.86V14$$

(3) 团头鲂

$$Y1 = -1372.93 + 1244.35V2 + 185.81V3 + 82.24V4 + 73.11V5 + 33.79V7 + 116.70V9 + 22.46V14$$

以上判别公式可以判别 3 种鲂的所属, 方法是将其可量参数与框架参数经线形函数校正后的数值代入上列公式, 函数值最大的即为其所属。

2.2.4 主成分分析

从主成分分析图(图 3), 团头鲂、广东鲂和三角鲂之间存在显著的差异, 其中三角鲂与团头鲂较为接近, 而它们和广东鲂离异较大。

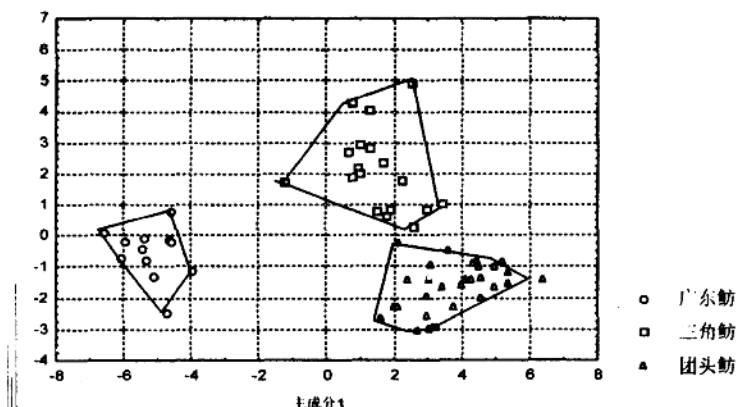


图 3 团头鲂、三角鲂和广东鲂主成分分析图

Fig.3 Map of principal component analysis of

Megalobrama amblycephala, *Megalobrama terminalis*, *Megalobrama hoffmanni*

3. 讨论

3.1.3 种鲂形态差异和亲缘关系的研究

判别分析能有效地鉴别 3 种鲂, 判别率均为 100%。形态参数的定量分析结果表明: 广东鲂与团头鲂, 三角鲂差异较大, 亲缘关系较远; 而三角鲂和团头鲂之间差异小, 亲缘关系较近。主要表现(1)在聚类分析中, 广东鲂和团头鲂, 三角鲂间形态距离分别为 0.528 和 0.575, 而三角鲂和团头鲂间的形态距离为 0.321; (2)在用 7 个优选的形态学参数进行的判别分析中, 广东鲂和其他两种鲂没有误判, 而在三角鲂和团头鲂之间有少量的误判; (3)在主成分分析中, 广东鲂与其他两种鲂差距较大, 而三角鲂和团头鲂间差距不大。

以上结果从形态学角度反映了 3 种鱼的亲缘关系, 这同它们的地理分布有一定的联系。三角鲂分布在长江、黄河、黑龙江水系, 团头鲂的自然群体分布在长江中游附属湖泊, 而广东鲂则自然分布在珠江、海南岛水系, 地理隔离, 可能是造成它们之间形态差异大小的原因。

形态学研究对建立 3 种鲂的种质鉴定标准和探讨它们的亲缘关系提供了形态学方面的依据, 但并非绝对的标准, 还须结合 3 种鲂生化遗传和分子遗传方面研究的结果才能对其补充, 更准确的评判。

3.2 团头鲂, 三角鲂, 广东鲂的形态鉴别

团头鲂、三角鲂、广东鲂是形态相似的近缘种。3 种鲂在自然条件下有可能与其他种交配[罗俊烈, 1990; 楼允东等, 1999], 因此很容易造成种类混杂。如何鉴别原种是许多单位尤其是保种单位迫切需要解决的问题。

传统分类方法主要从上、下颌角质缘发达的程度；背鳍硬刺与头长比；鳃耙数；尾柄长和尾柄高的比；鳃盖后有无黑带等形态指标作为判别3种鲂的依据[潘炯华等, 1990]。这种方法虽能对3种鲂进行定性的判别, 但局限性很大。因为传统方法仅考虑了鱼体头部, 背部, 尾部少数部位的形态学信息, 无法对与鱼的整体形态进行有效的概括, 另一方面, 传统分类方法只能对3种鲂进行定性的判别, 无法对其之间的形态差异建立量化的指标, 更无法反映其亲缘关系。因此, 传统分类方法作为种质鉴定的方法是远远不够的。

本次实验采用传统测定结合框架测定的方法, 选择了30个形态参数, 含盖了鱼体的长, 宽, 高及体型方面的形态学信息, 判别率均为100%, 较传统分类方法有了显著的提高。因此, 该法可以作为3种鲂种质鉴定的有效方法。

为提高判别的实用性, 我们建立了判别公式(1), (2)和(3)。只需测定7个形态学参数, 判别率即可达98.99%。

4. 材料和方法

4.1 样品采集

样品鱼采集地点、时间及其规格如前述。

电泳标本共90尾(30尾×3种)。电泳组织有白肌和肝脏。样品从活鱼放血后摘取, 于零下25℃冰箱中保存。

1.2 材料和方法

0.2~0.3克组织加3倍体积的NAD液。15000r.p.m 5℃离心20分钟。肝组织离心2次以去脂肪。上清液4℃保存, 24小时内使用。

电泳在LKB水平电泳仪上进行。4%聚丙烯酰胺凝胶。预电泳30分钟, 50mA; 前电泳10分钟, 25mA; 正式电泳约2小时, 275V。电泳温度5℃。按李思发[1998]的方法染色, 本文所测定的同工酶及其座位如表6。

表6 本实验测定的同工酶及其座位

Tab.1 Loci and a enzymes observed in experiment

编号	名称	简称	分析组织	缓冲系统	座位
1.1.1.1	醇脱氢酶	ADH	肝	EBT	Adh
1.1.1.8	甘油-3-磷酸脱氢酶	α -GPDH	肌	TC	α -Gpdh
1.1.1.27	乳酸脱氢酶	LDH	肝, 肌	TC	Ldh-A Ldh-B Ldh-C ₁
1.1.1.37	苹果酸脱氢酶	MDH	肝, 肌	TC	Mdh-A Mdh-B Mdh-C Mdh-D
1.1.1.42	异柠檬酸脱氢酶	IDH	肝	TC	Idh
1.15.1.1	超氧化物歧化酶	SOD	肝, 肌	EBT	Sod
3.1.1.1	酯酶	EST	肝	EBT	Est-A Est-B

注: EBT—三羟甲基氨基甲烷-硼酸-乙二胺四乙酸; TC—三羟甲基氨基甲烷-柠檬酸。

1.3 遗传差异计算

对3种鲂种内的基因差异用多态位点比例(P)和每位点的平均杂合度(H)来度量, 其计算方法[根井正利, 1976]分别为:

$$P = \frac{\text{多态位点数}}{\text{总位点数}} \quad H = \frac{\sum (1 - \sum X_i^2)}{n}$$

式中: X_i 为第 i 个等位基因的频率;

n 为所测位点数。

种间的基因差异用遗传相似度 (I) 和遗传距离 (D) 来度量. 本研究选用了比较适合鱼类种群研究的 Nei 的距离公式 [根井正利, 1976]。

Nei 公式:

$$I = \frac{\sum_{i=1}^n X_i Y_i}{\sqrt{\sum X_i^2 \sum Y_i^2}}$$

$$D = -\ln I$$

式中: I 为遗传相似度;

n 为座位数;

X_i 为种群 X 第 i 个等位基因的频率;

Y_i 为种群 y 第 i 个等位基因的频率。

2. 结果

2.1 酶的表达

本次实验电泳的 7 种酶中, 显现出清晰酶带的有, 肌肉中的 LDH、MDH、SOD; 肝脏的 LDH、MDH、G3PDH、ADH、IDH、EST 及 SOD。在 7 种酶中, 发现同工酶 MDH 在 3 种鲂的肌肉中有明显的种间差异 (图 4)。该酶在 3 种鲂中有两种表型: 三角鲂和团头鲂表型相同, 表现有 m-Mdh-A、m-Mdh-B、s-Mdh-C、s-Mdh-D 四条酶带; 广东鲂只表现出 m-Mdh-A、m-Mdh-B、s-Mdh-C 三条酶带, 未见 s-Mdh-D, 故 s-Mdh-D 为团头鲂和三角鲂所特有, 可作为团头鲂和三角鲂区分广东鲂的生化遗传标志。

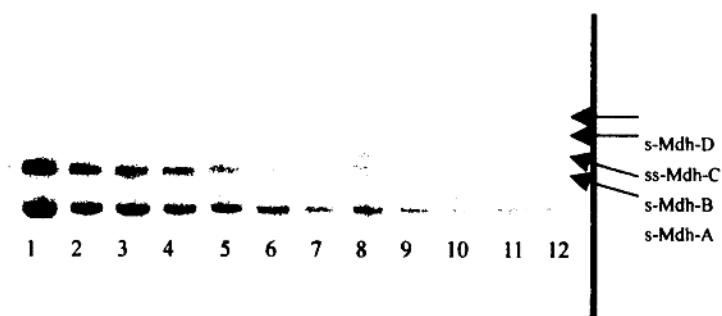


图 4 3 种鲂肌肉 MDH 同工酶电泳图

1~4: 广东鲂 5~8: 团头鲂 9~12: 三角鲂

Fig.4 Electrophoretogram of MDH in muscles of *Megalobrama hoffmanni*(1-4) *Megalobrama amblycephala*(5-8), *Megalobrama terminalis*(9-12),

2.2 种间等位基因差异

本实验对三种鲂的 7 种同工酶进行了电泳分析, 共检得 13 个基因位点, 其中 Adh、Idh、Est-B 位点表现有多态。各种鲂鱼的基因位点及其等位基因频率见表 7。

表 7 3 种鲂鱼的等位基因频率
Tab.7 Loci and allelic of enzyme of

Megalobrama amblycephala, *Megalobrama terminalis*, *Megalobrama hoffmanni*

座位	等位基因	种群		
		团头鲂	三角鲂	广东鲂
Adh	100	1.0000	0.4375	0.3750
	80	0.0000	0.5625	0.6250
α -Gpdh	100	1.0000	1.0000	1.0000
Ldh-A	100	1.0000	1.0000	1.0000
Ldh-B	100	1.0000	1.0000	1.0000
Ldh-C ₁	100	1.0000	1.0000	1.0000
Idh	100	0.6250	0.7500	1.0000
	80	0.3750	0.2500	0.0000
Sod	100	1.0000	1.0000	1.0000
Est-A	100	1.0000	1.0000	1.0000
Est-B	100	0.5294	0.5556	0.8542
	80	0.4706	0.4446	0.1458
m-Mdh-A	100	1.0000	1.0000	1.0000
m-Mdh-B	100	1.0000	1.0000	1.0000
s-Mdh-C	100	1.0000	1.0000	1.0000
s-Mdh-D	100	1.0000	1.0000	0.0000

2.3 多态位点比例和平均杂合度

团头鲂多态位点比例均为 15.38%，广东鲂的多态位点比例为 16.67%，三角鲂多态位点比例略高为 20.08%；团头鲂和广东鲂平均杂合度分别为 0.0744 和 0.0552，三角鲂的平均杂合度为 0.1047(表 8)。

表 8 3 种鲂的多态位点比率 and 平均杂合度

Tab.8 Mean proportion of polymorphic(P) and average heterozygosity(H) of
Megalobrama amblycephala, *Megalobrama terminalis*, *Megalobrama hoffmanni*

种类	检查座位	多态座位	多态座位比率	平均杂合度
团头鲂	13	2	15.38%	0.0744
三角鲂	13	3	20.08%	0.1047
广东鲂	12	2	16.67%	0.0552

2.4 遗传距离

表 9 为 3 种鲂遗传距离和遗传相似度。Nei 氏法遗传距离范围为 0.0284~0.1021，如将计算值放大 100 倍后绘制成聚类分析图(图 5)，可以清楚的团头鲂与三角鲂生化遗传差异小，而广东鲂与其他两种鲂生化遗传差异较大。

表 9 3 种鲂相互之间的遗传距离和遗传相似度(Nei)

Tab.9 Genetic similarities and genetic distances of
Megalobrama amblycephala, *Megalobrama terminalis*, *Megalobrama hoffmanni*

Nei 距离	团头鲂	三角鲂	广东鲂
团头鲂	--	0.0284	0.1021
三角鲂	0.9721	--	0.0588
广东鲂	0.9030	0.9429	--

注：对角线右上方为遗传距离，对角线左上方为遗传相似度。

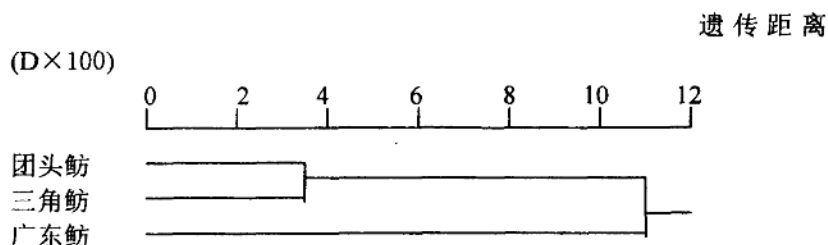


图 5 团头鲂、三角鲂、广东鲂遗传关系图

Fig.5 Dendrogram construed by the genetic distance values of

Megalobrama amblycephala, *Megalobrama terminalis*, *Megalobrama hoffmanni*

3. 讨论

3.1 团头鲂、三角鲂、广东鲂亲缘关系

实验结果表明, 三角鲂和团头鲂之间差异较小, 亲缘关系近, 而广东鲂与其它两种鲂差异较大, 亲缘关系较远。主要表现为: (1)从同工酶酶带图谱看, 团头鲂、三角鲂均具有 *Mdh* 同工酶的 *s-Mdh-D* 位点, 而广东鲂未见。而团头鲂和三角鲂间的差异没有找到, 这可能与样本数较小或检测的位点不够有关, 但也一定证明团头鲂同三角鲂生化遗传差异较小, 有差异的位点不宜发现。(2)在聚类分析中, 广东鲂和团头鲂, 三角鲂间遗传距离分别为 0.1021 和 0.0588, 而三角鲂和团头鲂间的遗传距离为 0.0284。可见团头鲂和三角鲂在生化遗传上较接近, 而广东鲂与其它两种鲂生化遗传差异较大。

生化遗传分析的结论与形态学研究的结果吻合。所以我们认为团头鲂、三角鲂亲缘关系近, 而广东鲂与其他两种鲂亲缘关系较远。

3.2 3 种鲂种内遗传多样性的分析

多态位点是进化中变异活跃的片段, 群体的多态位点比例和平均杂合度反映了群体分化和变异的程度 [程立生, 1987]。团头鲂、广东鲂、三角鲂种内存在着较高的多态性, 遗传多样性丰富。本研究测得的多态位点比例和平均杂合度的大小顺序是: (1)多态位点比例: 三角鲂(20.08%)>广东鲂(16.67%)>团头鲂(15.38%); (2)平均杂合度: 三角鲂(0.1047)>团头鲂(0.0744)>广东鲂(0.0552)。从以上结果可以看出, 三角鲂在多态位点比例和平均杂合度两个指标均高于团头鲂和广东鲂, 说明三角鲂群体内的遗传多样性较团头鲂和广东鲂丰富。从 3 种鲂地理分布的情况看, 三角鲂天然群体的分布较广, 长江水系、黄河水系、黑龙江水系均有分布, 而团头鲂局限于长江中游的少数湖泊, 广东鲂仅在珠江、海南岛有天然分布。这也许可以作为三角鲂的群体遗传多样性高的一个解释。

尼罗、奥利亚、尼奥三种罗非鱼对温和气单胞菌疫苗的抗体效价比较

水产养殖专业 马江耀 蔡完其 孙佩芳

摘要 将致病性温和气单胞菌(99-5-A)制成疫苗,给体重60克左右,健康无病的尼罗罗非鱼、奥利亚罗非鱼、尼奥杂交鱼(尼罗罗非鱼(♀)×奥利亚罗非鱼(♂))三种罗非鱼各30尾,按0.25ml/尾的剂量作腹腔注射。试验鱼在同等环境条件下饲养、观察3个月。每隔一定时间测定三种罗非鱼血清中抗体的含量,比较其动态变化。结果为:(1)免疫后第10天,三种罗非鱼血清的抗体效价分别为1:8、1:16和1:16。(2)抗体含量的高峰期分别出现在第22天,1:64维持6天;第22天,1:32维持3天;第16天,1:64维持9天。(3)3个月后免疫鱼血清抗体效价分别为:1:8、1:4和1:16。而对照组三个月内均没有检测到抗体。(4)3个月后免疫保护率分别为100%、75%和100%。从免疫高峰期的长短及维持情况来看,在特异性免疫保护能力方面:尼奥杂交种>尼罗罗非鱼>奥利亚罗非鱼,与免疫保护率试验结果相符。

关键词 罗非鱼, 温和气单胞菌, 疫苗, 抗体效价, 免疫保护率

Comparative Study on Agglutinating Antibody Titre of *Aeromonas Sobria* Vaccine Among Nile Tilapia, Blue Tilapia and Nile Tilapia(♀) × Blue Tilapia(♂)

Ma jiangyao Chai wanqi Sun peifang

Abstract Three tilapias, Nile tilapia, Blue tilapia and Nile tilapia and Nile tilapia(♀) × blue tilapia(♂), healthy and about 60g/ind, were vaccinated with *Aeromonas sobria* vaccine by intraperitoneal injection at the dosage of 0.25ml/fish, while the fish of control group were injected with physiological saline at the same dosage. All these fishes were cultured and observed under the same conditions. Agglutinating antibody titer were measured periodically in three experimental months. The result showed that:(1)10days after vaccinated, the titre of Nile tilapia, blue tilapia and Nile tilapia(♀) × blue tilapia(♂) was 1:8,1:16 and 1:16 respectively.(2)the titre of Nile tilapia reached its level on the 22nd day, keeping 1:64 for 6 days, while in blue tilapia, reached its level on 22nd day. Keeping 1:32 for 3days, in Nile tilapia(♀) × blue tilapia(♂), reached its level on 16th day, keeping 1:64 for 9days.(3)Three months after vaccinated, the titre of Nile tilapia, blue tilapia and Nile tilapia(♀) × blue tilapia(♂) was 1:8, 1:4 and 1:16 respectively, but the agglutinating antibody was not found in control fish.(4)After three months of vaccination, the immunity protective rate of Nile tilapia, blue tilapia, and Nile tilapia(♀) × blue tilapia(♂) was 100% and 75% respectively. We can say that in the side of peculiar immunity: Nile tilapia(♀) × blue tilapia(♂) > Nile tilapia > blue tilapia.

Keywords Tilapia, *Aeromonas sobria*, Vaccine, Agglutinating-antibody titre, Immunity protectiver

在过去几十年里,免疫学取得了惊人的成就,但都是以哺乳类和鸟类为对象进行研究所获得的,而鱼类的免疫学研究则不多。1942年Duff用杀鲑气单胞菌苗免疫鳟鱼获得成功,揭开了鱼类免疫接种的历史篇章。由于化学药物存在着鱼体残留、抗药菌株出现及破坏生态环境等诸多不足,欧美和日本等许多先进国家都严格限制化学药物在渔业生产上的应用,从而推动了鱼类免疫学及鱼类疫苗的研究和发展。

国外,鱼用疫苗的研制起步较早,发展较快。到目前为止,国外已批准上市的鱼类疫苗有近30种,主要是针对鲑科鱼的疝疮病、弧菌病及红嘴肠炎等。有关国外鱼用疫苗的研究历史及现状,徐海德(1992),陈胜香(1993),杨先乐(1996)等有过详细的报道。国内在鱼类免疫预防研究方面起步较晚,最早有草鱼细菌性肠炎、烂鳃和赤皮三

种病的病鱼肝脾肾组织浆灭活苗(又称土法疫苗)的报道(湖北省水生生物研究所鱼病研究室, 1975)。到了80年代末, 中国水产科学研究院长江水产研究所采用瓶转瓶培养法, 浙江省水产研究所采用微载体生物反应器培养法率先在国内成功地研制出草鱼出血病细胞培养灭活菌苗, 并进行了较大规模的生产和应用, 把我国的鱼类病害的免疫预防研究向前推进了一大步。最近几年, 郑国风(1993)报道了三种病原菌的三联苗, 殷战等(1993)、陈月英等(1993, 1996)、孙金生等(1993)研制出鲢、鳙鱼暴发病菌苗, 并在室内外免疫试验中取得了较好的效果, 使我国的鱼类免疫预防研究又上一个新台阶。

目前, 随着我国罗非鱼集约化养殖的不断发展, 疾病危害日益严重, 极大地危害了我国罗非鱼的养殖生产, 日益受到广大生产者和科研工作者的重视。温和气单胞菌病就是其中的主要疾病之一, 病鱼的主要症状表现为反应迟钝, 摄食量减少, 直至拒食; 体表发黑, 吻、眼眶及鳃盖等部位充血、出血; 内脏也发生各种病变: 胆囊肿大, 呈墨绿色, 肝暗褐色。温和气单胞菌广泛存在于水、土壤中, 毒力较强, 一旦致病, 用药物难以防治, 且易产生抗药性。今后运用免疫学方法防治该病将势在必行。

本试验在借鉴前人研究成果的基础上, 结合罗非鱼高密度集约化养殖条件下易患温和气单胞菌病的生产实际, 研制温和气单胞菌苗, 对罗非鱼进行免疫预防试验。测定比较了尼罗罗非鱼、奥利亚罗非鱼及尼奥罗非鱼对温和气单胞菌苗的抗体效价的不同, 以期从特异性免疫力方面比较三种罗非鱼对温和气单胞菌病的抗病能力的差异, 为罗非鱼的疾病预防和良种推广提供一定的理论依据。

1. 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验鱼

尼罗罗非鱼(以下简称“尼罗”)、奥利亚罗非鱼(以下简称“奥利亚”)及尼罗罗非鱼(♀)×奥利亚罗非鱼(♂)杂交鱼(以下简称“尼奥”)均来自广东省国家级罗非鱼良种场, 在上海市南汇县水产养殖场上海水产大学种质资源试验站同等养殖条件下饲养1个月, 以消除环境因子对试验的影响。试验鱼体重60g左右, 无发病史。运回实验室后, 在水族箱中驯养一周后进行试验。

1.1.2 试验菌株

温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)由本实验室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 血清抗体检查

在免疫试验开始之前, 随机抽取3种罗非鱼各2尾, 从尾动脉抽血分别制备三种罗非鱼的混合血清进行血清抗体检查。具体方法是采用玻片凝集法: 试验A—在凹玻片上滴加试验鱼血清1滴, 生理盐水1滴及菌液1滴。轻摇玻片, 混匀后静置于室温中10—15分钟, 用高倍镜观察是否产生凝集现象。试验B—阴性对照, 用生理盐水。试验C—阳性对照, 用被温和气单胞菌感染过的鱼的血清。

1.2.2 菌苗的制备

制备菌苗时严格进行无菌操作, 严防菌苗受污染。配制营养肉汤培养基, 彻底灭菌处理, 过滤, 并将PH值调至7.2—7.4。将温和气单胞菌(99-5-A)适量接种于营养肉汤, 28℃, 振荡培养24小时, 用活菌计数法对细菌计数后, 用0.2%的福尔马林32℃灭活48小时制成全菌苗。将菌苗密封于灭过菌的瓶中备用。按0.25毫升/尾的剂量腹腔注射接

种健康的三种罗非鱼各 2 尾, 于水温 28℃ 的水族箱中饲养 10 天, 观察鱼体的反应, 以检查疫苗对鱼体的安全性。取菌苗 0.2 毫升涂布于平板表面, 28℃ 培养, 检查有无菌落生长。

1.2.3 试验鱼的免疫

选用健康无病、规格均匀的三种罗非鱼各 30 尾, 在水温 28℃ 下, 从腹腔注射菌苗 0.25 毫升/尾进行免疫。免疫鱼分置三个水族箱中室内 28℃ 左右水温饲养, 对照组注射营养肉汤培养液, 每种鱼 10 尾, 注射剂量同上, 也分置三个水族箱中 28℃ 左右水温饲养。养殖环境经消毒处理, 排除传染源, 养殖用水清洁可靠。所有试验鱼都在同样的管理模式下饲养, 将环境因素对试验造成的误差降低到最小。

1.2.4 试验鱼的血清抗体动态检测

免疫后三个月内, 从第 10 天开始每隔 3 天取三种免疫罗非鱼各 2 尾, 尾动脉抽血制备混合血清, 用试管凝集法测定血清抗体效价。第 31-46 天开始, 每隔 5 天检测一次。之后, 于第 70 天和第 90 天各检测一次。对照组方法同上。

试管凝集法为一种定量试验, 用以检测待测血清中是否存在相应抗原和测定该抗原的含量。操作时, 严格执行无菌操作, 以防受到杂菌污染。先分别吸取 0.5ml 灭菌的生理盐水于若干灭菌的小试管中, 然后向第一个试管中滴加制备好的混合血清 0.5ml, 用振荡器摇匀后, 从中吸取 0.5ml 加入第二个试管, 将第二个试管用振荡器摇匀后, 吸取 0.5ml 加入第三个试管, 以此类推, 到最后一个试管摇匀后, 吸取 0.5ml 弃之。这样, 就用生理盐水将混合血清作了倍比稀释。然后向每个试管中加入 1×10^7 CFU/ml 的温和气单胞菌悬液 0.5ml。之后将小试管放入 28℃ 的恒温箱中过夜观察凝集程度。视不同凝集程度记录为 4+ (100%凝集)、3+ (75%凝集)、2+ (50%凝集)、1+ (25%凝集) 和 - (不凝集)。以 2+ 以上的血清最大稀释度为该血清的抗体效价 (或称滴度)。每次试验三种罗非鱼都按以上方法在同等条件下同时进行试验。

1.2.5 免疫保护率的测定

在免疫后三个月, 用浓度为 6×10^8 CFU/ml 的温和气单胞菌 (99-5-A) 菌悬液, 按 0.35 毫升/尾的剂量腹腔注射感染体重在 100 克左右的三种免疫罗非鱼各 5 尾。于水温 28℃ 的水族箱中饲养 10 天, 记录感染鱼 10 天内的发病和死亡情况。同时每种罗非鱼设有未免疫鱼的感染对照组, 每种罗非鱼也取 5 尾, 注射剂量和方式同免疫组。试验中所有试验鱼的管理均保持一致。免疫保护率的测定公式为: 免疫保护率 = $(1 - \text{免疫组死亡率} / \text{对照组死亡率}) \times 100\%$ 。

2. 结果

2.1 试验鱼的血清抗体检查结果

在前述的三种凝集反应中, 试验 A 和试验 B 测得的结果相同, 均无凝集现象, 而试验 C 有凝集现象, 故此可证实试验鱼均为没有感染过温和气单胞菌的健康鱼。

2.2 菌苗的制备

活菌计数法显示菌苗的含菌量为 2×10^9 CFU/ml, 取菌苗 0.2ml 接种于营养琼脂平板上, 28℃ 48 小时无菌落生长, 表明菌苗中的细菌已全部被灭活。安全实验显示, 腹腔注射菌苗后三种实验罗非鱼均无不良反应, 菌苗对鱼体安全。

2.3 试验鱼的血清抗体动态

三种免疫鱼在室内自然水温饲养三个月内的血清抗体效价检测结果如表 1, 变化趋势如图 1 所示。对照鱼血清三个月内均没有测到抗体。从表中可知: 三种罗非鱼在免疫后第 10 天, 血清中即可检测到抗体, “尼罗” — 1:8、“奥利亚” — 1:16、“尼奥” — 1:16。“尼奥” 鱼抗体升高最快, 于第 16 天达到最高值 1:64, 维持 9 天后缓慢下降; “尼罗” 升高较快, 于第 22 天达到最高值 1:64, 维持 6 天后缓慢下降; “奥利亚” 升高最慢, 于第 22 天达到最高值 1:32, 维持 3 天后缓慢下降。直至免疫后第 90 天, 三种罗非鱼的血清中仍含有一定量的抗体, 效价分别为“尼罗” — 1:8、“奥利亚” — 1:4、“尼奥” — 1:16。

由图 1 可以看出三种免疫罗非鱼对温和气单胞菌菌苗都产生一定量的抗体, 在其效价的大小和高峰值维持期方面都显示出: “尼奥” > “尼罗” > “奥利亚”。

表 1 免疫后三个月内三种罗非鱼血清抗体效价定期检测结果 (1:)

Table 1 Measuring results of agglutinating antibody titre of 3 tilapias in three months after been vaccinated

免疫后天数	10	13	16	19	22	25	28	31	36	41	46	70	90
“尼罗”	8	16	32	32	64	64	64	32	16	16	16	16	8
“奥利亚”	16	16	16	16	32	32	16	8	4	4	4	4	4
“尼奥”	16	16	64	64	64	64	32	32	16	16	16	16	16

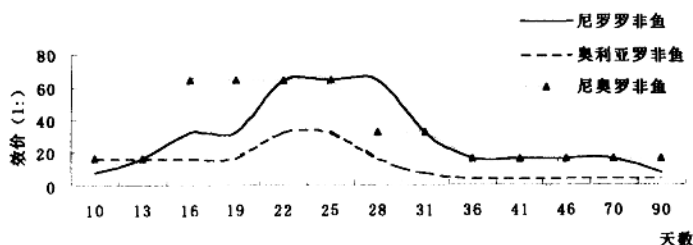


图 1 三种免疫罗非鱼三个月内血清抗体效价动态图

Fig.1 Agglutinating antibody kinetics curves of 3 tilapias in three months after been vaccinated

2.4 三种罗非鱼的免疫保护率的测定

免疫后第 90 天, 用 6×10^8 CFU/ml 的温和气单胞菌 (99-5-A) 菌悬液 0.35ml/尾腹腔注射攻击三种罗非鱼的免疫组和对照组。28℃下, 同等饲养条件下观察记录试验鱼 10 天内的发病死亡情况。测得的免疫保护率分别为: “尼罗” — 100%、“奥利亚” — 75%、“尼奥” — 100%, 详见表 2。从结果来看, 经过免疫注射的罗非鱼获得了较好的保护率, 而对照组鱼在遭受病菌感染后出现了较高的死亡率。“尼罗”和“尼奥”的免疫保护率要明显高于“奥利亚”。

表 2 三个月后三种罗非鱼的免疫保护率

Table2 Immunity protective of 3 tilapias after been vaccinated for 3 months

组别	攻毒剂量 (ml/尾)	攻毒鱼尾数	存活鱼尾数	存活率 (%)	免疫保护率 (%)
“尼罗”	免疫 0.35	5	5	100	100
	对照 0.35	5	0	0	
“奥利亚”	免疫 0.35	5	4	80	75
	对照 0.35	5	1	20	
“尼奥”	免疫 0.35	5	5	100	100
	对照 0.35	5	0	0	

3. 讨论

3.1 三种罗非鱼特异性体液免疫力的强弱

本次试验的抗体效价测定结果显示：三种罗非鱼对温和气单胞菌（99-5-A）菌苗的体液免疫应答能力有差异，免疫后，不论是血清抗体形成的快慢，还是血清抗体含量的高峰值大小及维持期方面都表现为：“尼奥”>“尼罗”>“奥利亚”。免疫能力较强的“尼奥”在遭受温和气单胞菌的侵害下，血清中能较快地产生较多的特异性抗体，加速了机体对有害抗原的清除作用。这同本论文第一部分所测得的半数致死量的顺序相一致，再一次表明“尼奥”在对温和气单胞菌的抗病力上，有较强的优势，母本“尼罗”次之，父本“奥利亚”较弱。

3.2 温和气单胞菌菌苗的免疫效果

本试验用温和气单胞菌（99-5-A）菌苗腹腔注射免疫“尼罗”、“奥利亚”以及“尼奥”三种罗非鱼，血清抗体含量动态测定和免疫保护率试验结果表明：免疫效果良好，免疫后三种罗非鱼的血清内均出现一定量的血清凝集抗体，血清抗体含量能够维持较长的时间，三个月后的免疫保护率试验也取得了较高的免疫保护率。事实证明该菌苗效果良好，用免疫接种的方法预防罗非鱼温和气单胞菌病切实可行。为防治罗非鱼温室高密度养殖条件下温和气单胞菌病的危害提供了一条有效的途径。使用这种方法不但能克服通常药物防治中出现的药效不高、鱼体残留、耐药性增强及破坏生态环境等诸多不足，而且能提高“尼罗”和“奥利亚”的越冬成活率，为来年的鱼苗繁殖提供优质、健康的亲鱼，实现更高的经济价值。

由于缺乏对温和气单胞菌致病机理及保护性抗原成分的足够认识，所以本试验只是利用温和气单胞菌全菌苗进行免疫，测定全菌抗体，有关抗原成分的分析、鉴别及纯化等更深层次的研究还有待于进一步研究。

3.3 免疫鱼血清抗体含量动态检测的意义

有关鱼类体液免疫应答的报道很多。与哺乳类和鸟类相比，其应答反应一般比较缓慢。但是在初次免疫应答后，血液中的抗体水平可以可持续较长的时间。

本试验通过对三种免疫罗非鱼的血清抗体效价动态变化的观察，找到了接种鱼免疫力的形成时间，达到免疫高峰期的时间以及免疫保护的维持情况。有助于我们在疾病流行之前，选择合适的时间进行免疫接种，以期达到最佳防病效果。这对菌苗的推广使用有所启迪。

3.4 有待探讨的问题

本试验只进行了一次腹腔注射免疫，另外由于时间的关系，免疫后的血清抗体效价只测定了3个月，没有进行更长时间的跟踪测定，也就没有了解到更长时间三种罗非鱼血清抗体效价的变化态势。我们估计，腹腔注射免疫如分两次进行，可能会产生更好的免疫效果，这方面有待进一步的研究探讨。

4. 小结

三种免疫罗非鱼免疫后三个月内的血清抗体效价动态测定结果表明：杂交鱼“尼奥”对温和气单胞菌菌苗的体液免疫应答强于其父母本。

三种罗非鱼免疫后的抗体效价测定和免疫保护率试验表明：所制温和气单胞菌菌苗免疫效果良好，用免疫学方法防治罗非鱼疾病切实可行。