

蔡添財¹，陳榮華¹，余廷基²，廖一久²

¹ 台灣省水產試驗所 鹿港分所

² 台灣省水產試驗所

(1997年6月11日接受)



以粒線體去氧核糖核酸之限制酶切割圖譜鑑別台灣養殖之吳郭魚

摘要

利用 10 種限制酶切割 5 種台灣養殖之吳郭魚 (尼羅吳郭魚、歐利亞吳郭魚、賀諾奴吳郭魚、莫三比克吳郭魚及一般紅色吳郭魚) 及其雜交種之粒線體去氧核糖核酸進行試驗，結果發現 *Bgl* II、*Hind* III、*Pst* I、*Acc* I 及 *Ava* I 等 5 種限制酶切割所得之圖譜，具有種之變異性，因此，可作為品種判別之用。其中，尤其以 *Acc* I 及 *Ava* I 切割所得之圖譜，在各品種間均皆不同，因此，更適合作為各品種之判別圖譜。雜交種之 mt DNA 切割圖譜均與親代雌魚相同，顯示為母系遺傳，同時，由於紅色吳郭魚與尼羅吳郭魚之 mt DNA 之圖譜相同，此項可為紅色吳郭魚係出自尼羅吳郭魚之雜交後代做佐證。由上述 5 種具有認識 6 鹼基對限制酶 (6-base pair recognized restriction enzyme) 分析估算長度約為 17140 鹼基的台灣養殖之吳郭魚粒線體去氧核糖核酸，估算其核苷酸分歧度約為 0.234，鹼基對替代率約為 0.246，但種內差異極低，此即顯示台灣養殖之吳郭魚顯著存在引進外來種之瓶頸效應。綜上，本研究之結果除可作為台灣重要養殖種之吳郭魚之品種鑑別外，並可供作品種保存及雜交種之重要參考資料以及品種遺傳標識之用。

關鍵詞：吳郭魚，紅色吳郭魚，粒線體去氧核糖核酸，限制酶，台灣

在台灣，吳郭魚為引進的魚種，因此，品種之保存關係到未來養殖的雜交應用，而紅色吳郭魚為一亟待判別的吳郭魚品系。總之，探討吳郭魚的來源，並進行探討其品系的基礎資料及研究確立判別方法，為吳郭魚養殖上極為重要的課題。

形質分析是藉由鰓耙，側線鱗片數，體高等之比較，用來判別品種之不同，然而，形質很容易受外界環境的影響，隨時會改變，故其結果常受質疑⁽¹⁾；酵素電泳分析 (Allozyme) 的結果較能說明品種之差異，也可用來區分吳郭魚品系⁽²⁻⁴⁾，但酵素電泳分析探討的是基因產物之變異，並經由族群基因頻率 (Allele frequency) 統計之結果說明其差異性，與基因座 (Locus) 多型性個數有關，這些基因座又經常分布在魚類不同組織中，因此，在取樣或讓標本魚之活存上均較困難。而經特殊生化性狀標識之魚生存於其他不同性狀魚種之環境中，其性狀只能維持一世代⁽⁵⁾。mt DNA (粒線體去氧核糖核酸) 之限制酶

(Restriction endonuclease) 切割圖譜能深入瞭解影響族群的遺傳結構，因此，在相近的品系或相關的品種間，mt DNA 分析較酵素電泳分析具有較顯著的差異性，這是因為 mt DNA 探討的是核酸水準之變異，分析是以個體為基本單位，而且具有遺傳性，可穩定的維持很多世代。同時，mt DNA 之演化較之細胞核 DNA (Nuclear DNA) 更為快速 5-10 倍以上⁽⁶⁾，在有性生殖時沒有核酸重組 (Recombination) 情形⁽⁷⁾，且為母系遺傳 (Maternal inheritance)^(6,8,9)，因此，只要具有相同的基因型，均可視為相同之母系種源。mt DNA 不但在脊椎動物間具有變異性，在魚類品種間亦具有很大之變異，近年來，mt DNA 之變異性研究已有很多應用於魚類族群判別，對資源管理非常有用，亦可作為品種之判別及遺傳標識^(5,10-12)。

本報告主要探討台灣重要的養殖種吳郭魚，如尼羅吳郭魚、歐利亞吳郭魚、賀諾奴吳郭魚、莫三比克吳郭魚及紅色吳郭魚等及其雜交種之 mt DNA 限制酶切割圖譜之變異性及其應用於品種判別之能力 (Ability)。

蔡添財，陳榮華，余廷基，廖一久 (1997) 以粒線體去氧核糖核酸之限制酶切割圖譜鑑別台灣養殖之吳郭魚。水產研究, 5(1): 1-10.

材料與方法

一、供試魚之來源

試驗用魚為保存在台灣省水產試驗所鹿港分所之尼羅吳郭魚 *Oreochromis niloticus* (以下以 N 代表之)、歐利亞吳郭魚 *O. aureus* (以下以 A 代表之)、賀諾奴吳郭魚 *O. hornorum* (以下以 H 代表之)、莫三比克吳郭魚 *O. mossambicus* (以下以 M 代表之)，及其雜交種如：尼羅吳郭魚×歐利亞吳郭魚 (N × A)，莫三比克吳郭魚×尼羅吳郭魚 (M × N)，尼羅吳郭魚×莫三比克吳郭魚 (N × M) 及一般紅色吳郭魚 (Red hybrid tilapia) 等，試驗魚出生後均飼養於室外 3.0 × 5.0 × 0.6 m 及 3.0 × 5.0 × 1.2 m 水泥池中。

二、粒線體 DNA 之抽取

本試驗抽取粒線體 DNA 所用的方法主要根據 Gonzalez-Villasenor et al.⁽¹³⁾ 及 White and Densmore III⁽¹⁴⁾ 之方法。試驗時將成魚移入試驗室中摘取肝臟、生殖腺及腦等之組織，以 1:5 (wt/v) 之比例加入 TEK (Tris-HCl 50mM, EDTA 10 Mm, KCl 1.5%, PH 7.5) 緩衝液，以電動研磨器 (Polter-Elvehjem homogenizer) 磨碎後，將其組織懸浮液緩緩倒入含有 15% Sucrose 溶液的離心管底部後，以 500 × g 在 4 °C 下離心 10 分鐘，上澄液再以 1,500 × g 離心一次，而後再將其上澄液以 23,000 × g 在 4 °C 下離心 20 分鐘，沉澱物以 TEK 緩衝液清洗後，以 0.7 ml TEK 緩衝液溶解後加入 Triton-100 使成 1% 濃度之溶液在室溫下反應 10 分鐘後，以 12,500 × g 離心 20 分鐘，上澄液加入等量之酚 (Phenol)，PH 介於 7.5 - 8.0 之間。抽取兩次後，以 Choloform: isoamyl alcohol (24:1) 清除 phenol，上澄液加入 2 倍之 95% 酒精在 -20 °C 中貯存，隔天再以 12,500 × g 在 4 °C 離心 40 分鐘，沉澱物以 70% 酒精清洗後經真空乾燥，最後加入 100 μl 之 TEK 緩衝液。然後再以 *EcoR* I、*Hind* III、*Pst* I、*Hinf* I、*Ava* I、*Bgl* II、*Acc* I、*Bam*HI、*Sau*3AI 及 *Msp* I 等限制酶 (Toyobo Co. LTD.)，在 37 °C 下進行作用 1 小時，並以 0.8% 洋菜膠片以 100 v 進行電泳分析，最後以 Ethidium bromide 染色後，以 Polaroid 照相機在 UV 光下照相，並量取各電泳片段之大小，電泳時以 λ DNA 經 *Hind* III 所切之片段為大小標準。

結果

由 10 種內切限制酶 (*EcoR* I、*Hind* III、*Pst* I、*Acc* I、*Ava* I、*Bgl* II、*Bam*HI、*Hinf* I、*Msp* I、及 *Sau* 3AI) 切割目前在台灣養殖之吳郭魚的 mt DNA 進行分析研究。Table 1 為由 5 種具有認識 6 個鹼基對 (Six base recognition) 的限制酶 (*Hind* III、*Pst* I、*Acc* I、*Ava* I 及 *Bgl* II) 切割所得片段之大小。由此估算所得台灣養殖之吳郭魚的 mt DNA 大小約為 17,140 ± 850 鹼基長度，此與非洲慈鯛魚類 (Tilapiine cichlid fish) 得到之長度 17,300 bp 相近似⁽¹⁵⁻¹⁶⁾，並且與其他研究過之魚種的結果也相似^(11,17)。本研究以具有認識 6 個鹼基對的限制酶切割所得圖譜總共得到 71 個不同片段，分析長度為 426 bp (Base pair) 佔全部 mt DNA 之 2.5%。

由 *EcoR* I 及 *Bam*HI 限制酶作用得到的結果，發現在各不同品種之吳郭魚的 mt DNA 出現了同樣大小的一個帶，可能是這些吳郭魚的 mt DNA 同樣起源自一相同的祖先。而由限制酶 *Bgl* II 所得的圖譜可以看出尼羅吳郭魚、歐利亞吳郭魚及莫三比克吳郭魚及紅色吳郭魚均具相同的 mt DNA 片段，但賀諾奴吳郭魚圖譜則具有與之不同大小的片段，可用為賀諾奴吳郭魚與其他品種間之判別 (Fig. 1)。至於 *Pst* I 所切得之圖譜中歐利亞吳郭魚僅得一片，尼羅吳郭魚與賀諾奴吳郭魚得到三個同樣大小的片段，莫三比克吳郭魚則得到另一型態三個不同大小的片段，所以可作為歐利亞吳郭魚與莫三比克吳郭魚之兩品種間判別之用 (Fig. 2)。

另外，*Hind* III、*Acc* I 及 *Ava*I 切割之 mt DNA 圖譜中，4 種品系之吳郭魚各具有不同的切割圖譜，可作為各品系間之判別圖譜。其中 *Acc* I 及 *Ava*I 之切割圖譜，因為品系間之差異有較大之片段，容易分辨，為最具種別特性之圖譜，可用來判別所有台灣養殖之吳郭魚。*Hinf* I 及 *Sau* 3AI、*Msp* I 分別屬於認識 5 及 4 個鹼基對之限制酶，經這些限制酶切割後，很多片段過小無法檢測，但四種吳郭魚間亦可看到不同之 mt DNA 圖譜。M × N 雜交種與莫三比克吳郭魚具有相同之圖譜，而 N × A 及 N × M 二種雜交種以及紅色吳郭魚均具有與尼羅吳郭魚相同之圖譜，顯示紅色吳郭魚係由尼羅吳郭魚雜交而來的同源性⁽¹⁸⁾，而且也顯示吳郭魚 mt DNA 為母系遺傳之結果 (Fig. 1 - 4)。由圖中各 mt DNA 切割的片段情形顯示，台灣養殖之吳郭魚應是起源於一個同樣大小

Table 1. Fragment sizes (base pair) produced by restriction endonuclease digestion of mt DNA isolated from Taiwan farmed tilapias.

	<i>N</i>	<i>A</i>	<i>M</i>	<i>H</i>
<i>EcoR</i> I				
	18150	18150	18150	18150
Σ	18150	18150	18150	18150
<i>Hind</i> III				
	13700	6500	11300	13700
	4240	4820	4100	4400
		2800	2800	
		1100		
		1000		
Σ	17940	16220	18200	18100
<i>Acc</i> I				
	7430	6560	9420	13390
	3810	3470	5780	1870
	3000	2150	1030	1330
	1330	1230	880	
		1030		
		880		
Σ	15570	15320	17110	16590
<i>Ava</i> I				
	4900	5900	4900	6690
	4200	5220	4200	5900
	3740	4860	2750	3910
	1790	1500	1500	1240
	1390		1390	
	1240		1240	
			1120	
Σ	17260	17480	17100	17740
<i>Bgl</i> II				
	7700	7700	7700	11500
	5500	5500	5500	5500
	3800	3800	3800	
Σ	17000	17000	17000	17000
<i>Pst</i> I				
	9600	18280	7640	9600
	4710		5410	4710
	2950		4200	2950
Σ	17260	18280	17250	17260

N = *O. niloticus* *M* = *O. mossambicus**H* = *O. hornorum* *A* = *O. aureus*

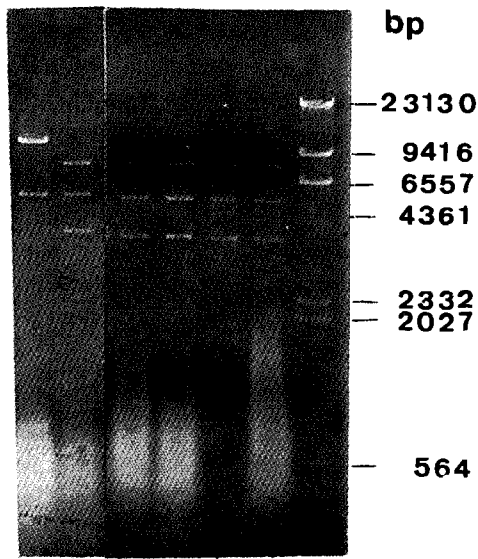


Fig. 1. Fragment sizes produced by *Bgl* II digestion of mt DNA isolated from four Taiwan farmed tilapias and their hybrids.

From left to right are H, A, M, N, Bl, R and λ /*Hind* III DNA size marker. Bl and R are represented the black and red offspring of red hybrid tilapia. H, A, M, N are represented the same tilapia stocks as shown in Table 1.

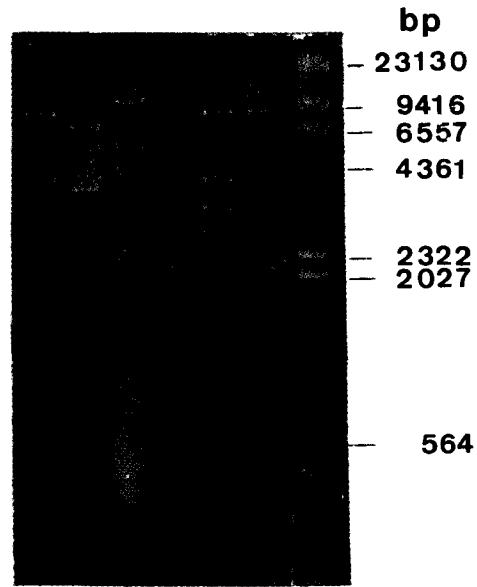


Fig. 3. Fragment sizes produced by *Acc* I digestion of mt DNA isolated from five Taiwan farmed tilapias.

From left to right are N, A, M, H, Bl, R and λ /*Hind* III DNA size marker. Abbreviated of species are the same as shown in Fig. 1.

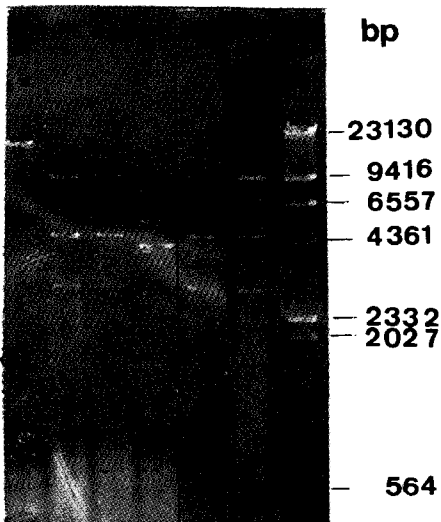


Fig. 2. Fragment sizes produced by *Pst* I digestion of mt DNA isolated from four Taiwan farmed Tilapias and their hybrids.

From left to right are A, N-A, N, M, H-M, H and λ /*Hind* III DNA size marker. A, N, M, H are represented the same tilapia stocks as shown in Table 1.

N-A: Hybrid of *O. niloticus* female and *O. aureus* male.
H-M: Hybrid of *O. hornorum* female and *O. mossambicus* male.

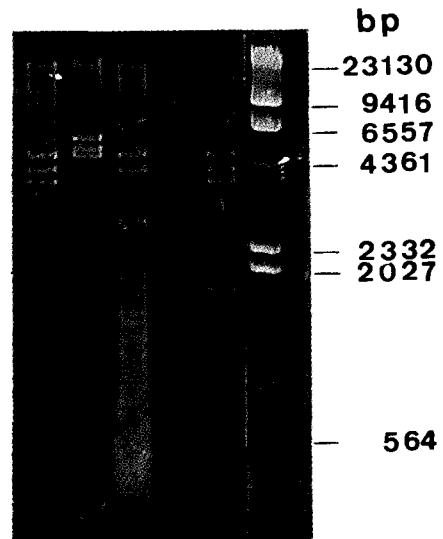


Fig. 4. Fragment sizes produced by *Ava* I digestion of mt DNA isolated from five Taiwan farmed tilapias.

From left to right are N, A, M, H, and Bl, the last one is λ /*Hind* III DNA size marker. Abbreviated of species are the same as shown in Fig. 1.

的，同時，各品系間之限制酶切割圖譜之差異符合單一核酸得或失 (Gain or lose) 之結果^(19,20)。四種吳郭魚間成對分析所得核苷酸變異 (Nucleotide diversity)⁽²¹⁾由 0.138 至 0.357 平均為 0.234。每個切割位置取代之核苷酸數 (Number of nucleotide substitution per site)⁽²¹⁾由 0.172 至 0.383，平均為 0.246。

Figure 7 是以 Table 1 計算所得之遺傳距離 (Genetic distance) 並以 Midpoint-rooted neighbor-joining 法⁽²²⁾繪製成之樹狀圖，其結果顯示與先前之形質分析相同，即賀諾奴吳郭魚與莫三比克吳郭魚間之遺傳距離較接近而與尼羅吳郭魚較遠。Table 2 顯示四種主要養殖吳郭魚具有不同 mt DNA 之單倍體型 (Haplotype)，因此，可推測各品系之吳郭魚可能各有不同來之母系，而且各具有不同的 mt DNA 基因型 (Genotype)。

在本試驗中，mt DNA 是由腦、肝及生殖腺抽出，均可得到可用之 mt DNA。唯腦之量少，一般重量在 0.12g 至 0.3g 之間，所抽取之 mt DNA 量，無法供應較多的限制酶分析，因此，還是以肝及生殖腺為主，尤其是生殖腺抽得之 mt DNA 之品質似乎較肝所抽出者為佳。

討論

本研究由 5 種認識 6 個鹼基對的限制酶切割所得的 mt DNA 圖譜，發現品種間之核苷酸變異，平均為 0.234 (Table 2)，序列差異百分率 (Percent sequence difference) 為 3.76%。此種 mt DNA 之變異顯然低於其他養殖魚類，養殖的虹鱒 (Rainbow trout) 為 0.423⁽²³⁾，紅鼓魚 (Red drum) 更高為 0.943⁽²⁴⁾；天然族群較低，黑斑鱈 (Haddock) 為 0.87⁽²⁵⁾，而歐洲鰻 (European eel) 之序列差異百分率為 0.8%⁽²⁶⁾，蟹 (Horseshoe crab) 為 2.0%⁽²⁷⁾。可見不同魚種與不同棲息環境之間之差異很大。一般在天然環境下，如大洋中地理界限少，種間 (Interspecific) 之接觸多而且容易時，其 mt DNA 之種內遺傳分散性 (Genetic divergence) 相對較低^(19,20,28)。反之，環境受限制或者行動力較弱之品種，其種間接觸少則種內相似性 (Similarity) 會較高⁽²⁷⁾。台灣養殖之吳郭魚均自國外引進⁽²⁹⁾且其當初引進之尾數有限，因此，形成一種瓶頸效應 (Bottleneck effects)，另外，因為同一雌親魚所生之同一批魚苗，具有相同 mt DNA 序列。臺灣養殖之吳郭魚種魚引進之後，由於長期飼養在水泥池中施行人工選種交配，因此品種間完全被隔離，自然間的

基因流動 (Gene flow) 完全不存在，所以會造成品種內 (Intraspecific) 變異降低，此種因族群數量少而減少種內變異的效應，在尼羅吳郭魚混合選種 (Mass

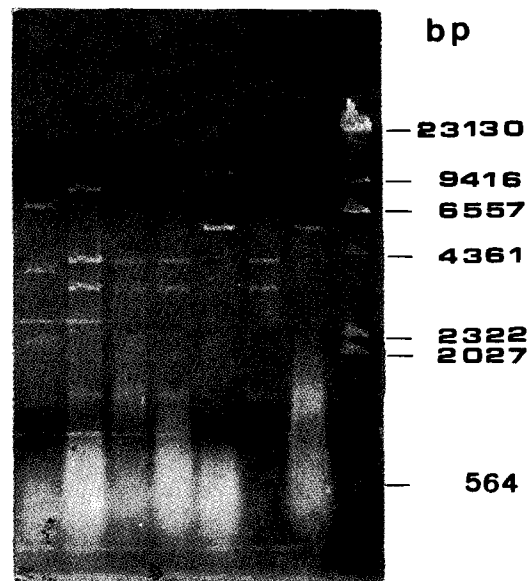


Fig. 5. Fragment sizes produced by *Acc* I digestion of mt DNA isolated from three tilapias and their hybrids farmed in Taiwan. From left to right are A, N-A, N-A (salt water), N, M-N, N-M, M and λ / *Hind* III DNA size marker. A, N-A, N, M are represented the same as shown in Fig. 1. M-N: Hybrid of *O. mossambicus* female and *O. niloticus* male. N-M: Hybrid of *O. niloticus* female and *O. mossambicus* male

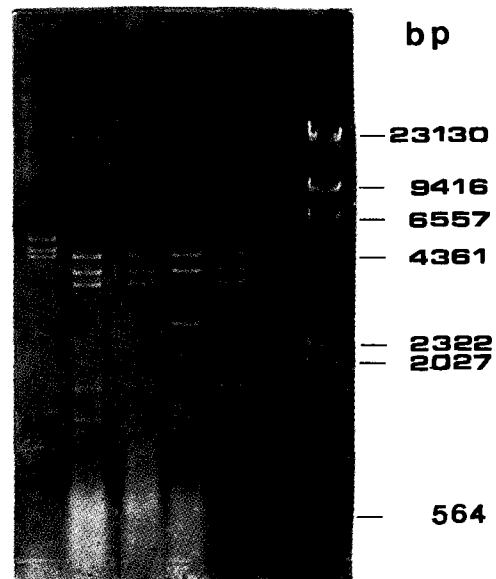


Fig. 6. Fragment sizes produced by *Ava* I digestion of mt DNA isolated from three Taiwan farmed tilapias and their hybrids. From left to right are A, N-A, N, M-N, N-M, M and λ / *Hind* III DNA size marker. Abbreviated of species are the same as shown in Fig. 5.

selection) 的成長率上亦被指出⁽³⁰⁾。臺灣養殖之吳郭魚之品系間 (Interspecific) 維持在約 24% 的自然變異水準。此種品種內趨同現象與其他養殖或繁殖魚類的研究結果一樣，是由於人工繁殖時所用的種魚尾數

太少而造成的瓶頸效應以及人工選種所導致^(8,9,31)。這種結果會使品種對自然環境的適應能力減弱⁽³²⁾。相關研究結果顯示因 mt DNA 的遺傳僅來自母魚，當親魚數少時即使基因流動很高，變異的消失亦

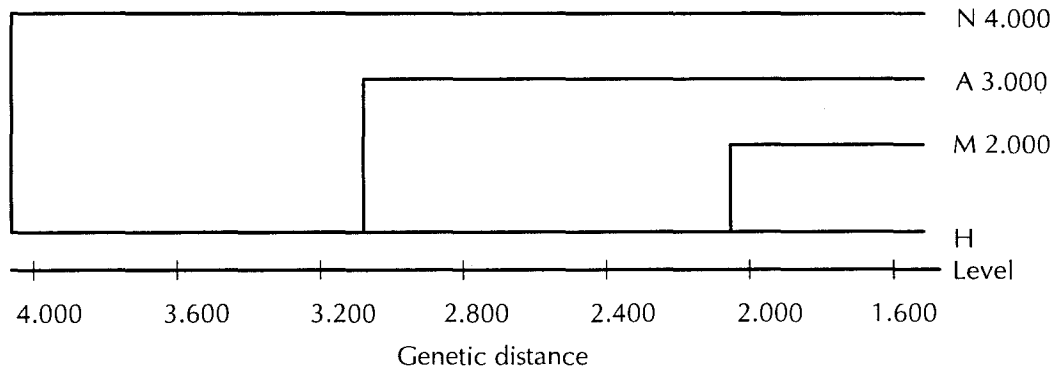


Fig. 7. Phenogram of mt DNA genetic distances among four farmed tilapia in Taiwan by midpoint-rooted neighbor-joining method. N、A、M、H are represented the same tilapia stock as shown in Table 1.

Table 2. Description of mt DNA composite digestion patterns (haplotype) in five farmed tilapia species in Taiwan. Composites represent the following order of enzyme: *Acc I*、*Ava I*、*Hind III*、*Bgl II*、*Pst I*.

Species	No. of					
	fish	<i>Acc I</i>	<i>Ava I</i>	<i>Hind III</i>	<i>Bgl II</i>	<i>Pst I</i>
<i>O. niloticus</i>	17	A	A	A	A	A
<i>O. aureus</i>	13	B	B	B	A	B
<i>O. mossambicus</i>	16	C	C	C	A	C
<i>O. hornorum</i>	15	D	D	D	B	A

Note: A capital letter (A, B, C, etc.) denotes a particular fragment pattern obtained with a given restriction enzyme. The same letter for different enzymes are not related.

Table 3. Estimated genetic distance (above diagonal) and numbers of shared restriction sites (below diagonal) between mt DNA haplotypes in four farmed tilapias in Taiwan.

	N	A	M	H
N	-	0.227	0.172	0.141
A	0.218	-	0.176	0.337
M	0.166	0.171	-	0.383
H	0.138	0.352	0.357	-

會較有雄魚參與的細胞核 DNA 快而且敏感^(31,33-35)。因此，有些研究結果認為以 100 尾雌魚生殖所得子代的核苷酸變異較能與自然族群相等⁽³⁶⁾，有些則認為必需 200 尾左右的親魚才能維持族群不變，或者至少雌雄 25 對同時產卵排精才能保持基因頻率的平衡⁽³⁷⁾。這是人工育種養殖上值得注意的因素。

Figure 7 為以 Table 3 的資料所繪製的樹狀圖，其結果顯示四種吳郭魚的遺傳距離以莫三比克吳郭魚與賀諾奴吳郭魚較為接近，而與尼羅吳郭魚距

離最遠，此結果與先前的形質及酵素電泳分析研究結果相似⁽²⁾，這項結果顯示台灣養殖之吳郭魚之形質已具有相當程度的遺傳性，且能代表品種之特徵，同時，表示台灣引進的吳郭魚之形質對其成長環境已產生其適應性。

mt DNA 經由限制酶切割所得之圖譜，顯示在台灣養殖之吳郭魚具有相當程度的遺傳變異性，其中有一些限制酶切割所得之圖譜可直接用為品種間之判別。尤其是 *Acc I* 及 *Ava I* 所切得之圖譜，非但各品種間均不相同，而且彼等之間之差異均屬於較大的片段可以很容易的檢測到，因此，mt DNA 限制酶切割圖譜可說是一種直接有效的品種判別方法^(5,10-13,17,38,39)。同時，更進一步可作為族群間之標誌⁽¹²⁾。不過，由於 mt DNA 只是單由母系遺傳，缺乏父系方面的訊息，如要進一步瞭解整個基因資料則有必要同時進行細胞核 DNA 之分析或其他基因之序列分析，才會有更好的效果。

謝辭

首先感謝台大動物學系陳秀男教授及生化所黃銓珍博士在粒線體 DNA 抽取技術上之協助及建言。Dr. Peter M. Grewe 和 Dr. Paul D. N. Hebert 惠贈大作參考，曾分林君協助試驗魚之餵飼及吳旻益君協助樣品之處理，在此一併致謝。

參考文獻

1. Clayton, J. W. (1981) The stock concept and the uncoupling of organismal and molecular evolution. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **38**: 1515-1522.
2. 蔡添財 (1982) 台灣養殖吳郭魚品種之生化遺傳及形質的變異. 台灣海洋大學水產養殖研究所碩士論文, 78PP.
3. Brummett, R. E., M. L. Halstrom, R. A. Dunham and R. O. Smitherman (1988) Development of biochemical dichotomous keys for identification of American populations of *Oreochromis aureus*, *O. mossambicus*, *O. niloticus*, *O. urolepis hornorum* and red tilapia. In *The Second International Symposium on Tilapia in Aquaculture*, (R. S. V. Pullin, T. Bhukasawan, K. Touguhahi and J. L. Maclean eds.). ICLARM Conference Proceeding International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, Philippines, 135-141.
4. Taniguchi, N., J. M. Macaranas and R. S. V. Pullin (1985) Introgressive hybridization in culture tilapia stocks in the Philippines. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **51**: 1219-1224.
5. Grewe, P. M. and P. D. N. Hebert (1988) Mitochondrial DNA diversity among brood stocks of the lake trout, *Salvelinus namaycush*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **45**: 2114-2122.
6. Brown, W. N., J. R. George and A. C. Wilson (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 1967-1971.
7. Bermingham, E. (1990) Mitochondrial DNA and the analysis of fish population structure. In *Electrophoretic and Isoelectric Focusing Techniques in Fisheries Management*, (D. H. Whitmore ed.). CRC Press, Inc., 197-221.
8. Brown, W. N., E. M. Prager, A. Wang and A. C. Wilson (1982) Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *J. Mol. Evol.*, **18**: 225-239.
9. Lansman, R. A., R. O. Shade, J. F. Shapira and J. C. Avise (1981) The use of restriction endonuclease to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations: III. The techniques and potential applications. *J. Mol. Evol.*, **17**: 214-226.
10. Berg, W. J. and S. D. Ferris (1984) Restriction endonuclease analysis of salmonid mitochondrial DNA. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **41**: 1041-1047.
11. Billington, N. and P. D. N. Hebert (1988) Mitochondrial DNA variation in Great Lakes Walleye (*Stizostedion vitreum*) populations. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **45**: 643-654.
12. Hynes, R. A., E. J. Duke and P. Joyce (1989) Mitochondrial DNA as a genetic marker for brown trout, *Salmo trutta* L., populations. *J. Fish Biol.*, **35**: 687-701.
13. Gonzalez-Villasenor L. I., Amanda M. Burkhoff Victor Corces, and D. A. Powers (1986) Characterization of cloned mitochondrial DNA from the teleost *Fundulus heteroclitus* and its usefulness as an interspecies hybridization probe. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **43**: 1866-1872.
14. White, P. S. and L. D. Densmore III (1992)

- Mitochondrial DNA isolation. *In* Molecular Genetic Analysis of Population: A Practical Approach Series, (A. R. Hoelzler ed.). Oxford University Press, Oxford New York, USA, 25-57.
15. Seyoum, S. and I. Kornfield (1992) Taxonomic notes on the *Oreochromis niloticus* subspecies complex (Pisces:Cichlidae), with a description of a new subspecies. *Can. J. Zool.*, **70**: 2161-2165.
 16. Moran, P., I. Kornfield and P. N. Reinthal (1994) Molecular systematics and radiation of the haplochromine cichlids (Teleostei:Perciformes) of Lake Malawi. *Copeia*, **2**: 274-288.
 17. Avise, J. C., J. E. Neigel and J. Arnold (1984) Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. *J. Mol. Evol.*, **20**: 99-105.
 18. Kuo, H. (1988) Progress in genetic improvement of red hybrid tilapia in Taiwan. *In* The Second International Symposium on Tilapia in Aquaculture, (R. S. V. Pullin, T. Bhukasawan, K. Touguhhai and J. L. Maclean eds.). ICLARM Conference Proceedings Department of Fisheries, Bangkok, Thailand and International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, Philippines, 219-221.
 19. Kornfield, I. and S. M. Bogdanowicz (1987) Differentiation of mitochondrial DNA in Atlantic herring, *Clupea harengus*. *Fish. Bull.*, **85**: 561-568.
 20. Bermingham, E., T. Lamb and J. C. Avise (1986) Size polymorphism and heteroplasmy in mitochondrial DNA of lower vertebrates. *J. Hered.*, **77**: 249-252.
 21. Nei, M. and W. H. Li (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 5269-5273.
 22. Saitou, N. and M. Nei (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, **4**: 406-425.
 23. Ferguson, M. M., R. G. Danzmann and S. K. A. Arndt (1993) Mitochondrial DNA and allozyme variation in Ontario cultured rainbow trout spawning in different seasons. *Aquaculture*, **117**: 237-259.
 24. Gold, J. R. and L. R. Richardson (1991) Genetic studies in marine fishes-IV: An analysis of population structure in the red drum (*Sciaenops ocellatus*) using mitochondrial DNA. *Fish. Res.*, **12**: 213-241.
 25. Zwanenburg, K. C. T., P. Bentzen and J. M. Wright (1992) Mitochondrial DNA differentiation in western North Atlantic population of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *Can. J. Aquat. Sci.*, **49**: 2527-2537.
 26. Avise, J. C., G. S. Helfman, N. C. Saunders and L. S. Hales (1986) Mitochondrial DNA differential in North Atlantic eels: Population genetic consequences of an unusual life history pattern. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 4350-4354.
 27. Saunders, N. C., L. G. Kessler and J. C. Avise (1986) Genetic variation and geographic differentiation in mitochondrial DNA of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. *Genetics*, **112**: 613-627.
 28. Graves, J. E. and A. E. Dizon (1989) Mitochondrial DNA sequence similarity of Atlantic and Pacific albacore tuna (*Thunnus alalunga*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **46**: 870-873.
 29. Liao, I. C. and T. P. Chen (1983) Status and prospects of tilapia culture in Taiwan. *In* Compilers International Symposium on Tilapia in Aquaculture, (L. Fishelson and Z. Yaron eds.). Tiberias, Israel, May 8-13, 1983, 588-598.
 30. Huang, C. M. and I. C. Liao (1990) Response to mass selection for growth rate in *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, **85**: 199-205.
 31. Smith, P. J., A. J. Birley, A. Jamieson and C. A. Bishop (1989) Mitochondrial DNA in the Atlantic cod, *Gadus morhua*: lack of genetic divergence between eastern and western populations. *J. Fish Biol.*, **34**: 369-373.
 32. Meffe, G. (1987) Conserving fish genomes: Philosophies and practices. *Environ. Biol. Fish.*, **18**: 3-9.
 33. Ferris S. D. and W. J. Berg (1987) The utility of mitochondrial DNA in fish genetics and fishery management. *In* Population Genetics and Fishery Management, (N. Ryman and F. Utter eds.). Univ. Washington Press, Seattle, WA, 277-299.
 34. Avise, J. C., R. M. Ball and J. A. Arnold (1988) Current versus historical population size in vertebrate species with high gene flow: a comparison based on mitochondrial DNA lineages and inbreeding theory for

- neutral mutation. *Mol. Biol. Evol.*, **5**: 331-344.
35. Gyllensten, U. and A. C. Wilson (1987) Mitochondrial DNA of salmonids: Inter- and intraspecific variability detected with restriction enzymes. *In* Population Genetics Fishery Management, (N. Ryman and F. Utter eds.). Univ. Washington Press, Seattle, WA, 301-317.
36. Ferguson, M. M. and P. E. Ihssen (1991) Distribution and phenotypic correlates of variation at enzyme coding loci in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from the lower Laurentian Great Lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **48**: 1308-1315.
37. Allendorf, F. W. and N. Ryman (1987) Genetic management of hatchery stocks. *In* Population Genetics and Fishery Management, (N. Ryman and F. Utter eds.). Univ. Washington Press, Seattle, WA, 141-159.
38. Palva, T. K., H. Lehtasalmi and E. T. Palva (1989) Identification of anadromous and non-anadromous salmon stocks in Finland by mitochondrial DNA analysis. *Aquaculture*, **81**: 237-244.
39. Graves, J. E., J. Michelle, C. Paul, A. Oeth and R. S. Waples (1989) Biochemical genetics of southern California basses of the genus *paralabrax*: specific identification of fresh and ethanol-preserved individual eggs and early larvae. *Fish. Bull.*, **88**(1): 59-66.

Tian-Tsair Tsay¹, Rong-Hwa Chern¹, Ting-Chi Yu²,
and I Chiu Liao²

¹Lu-Kang Branch, Taiwan Fisheries Research Institute,
Changhwa 505, Taiwan.

²Taiwan Fisheries Research Institute, Keelung
202, Taiwan.

(Accepted 11 June 1997)



Identification of Farmed Tilapia Stocked in Taiwan by Mitochondrial DNA Restriction Fragment Length Polymorphism

Abstract

Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA (mt DNA) from five stocks of Taiwan farmed tilapia *Oreochromis niloticus*, *O. aureus*, *O. hornorum*, *O. mossambicus* and red hybrid tilapia and their crossed hybrids revealed a clear polymorphism. Four different restriction fragment patterns were observed with each enzymes of *Ava* I and *Acc* I. Other enzymes such as *Pst* I, *Bgl* II and *Hind* III showed only two restriction fragment patterns, and *EcoR* I and *BamH* I gave only one cut site. The nucleotide diversity from the analysis of five 6-base pair recognized restriction enzyme within sample was estimated to be 0.234, and the base pair substitution rate was 0.246. No heterogeneity was detected within species indicating that the farmed tilapia in Taiwan were affected by the bottleneck effects. The restriction enzyme patterns of red hybrid tilapia showed all of the patterns same as Nile fish, demonstrating that the origin was from hybridized Nile female fish. The study revealed several mitochondrial genotypes variant which may have potential for use as stock identification and genetic marker of farmed tilapia stocked in Taiwan.

Key words: Tilapia, Red tilapia hybrid, Mitochondrial DNA, Restriction endonuclease, Nucleotide diversity, Taiwan