真鲷野生群体和人工繁殖群体的同工酶遗传差异*

王伟继¹ 孔 杰¹ 庄志猛¹ 孟宪红²

1 (中国水产科学院黄海水产研究所 , 青 岛 266071)

2 (青岛海洋大学 , 青 岛 266003)

摘 要 采用水平淀粉凝胶电泳技术对采集于黄前海州湾海域的真鲷野生群体和经过 2 代人工繁育的养殖群体进行了同工酶遗传变异研究。分析检测了 2 个群体各 50 个样本肌肉和肝脏组织的 13 种同工酶共 20 个基因位点 ,其中 *MDH_a*、*GPI*、*PCG* 等 10 个位点为多态位点 ,*ME* 和 *EST_b* 为变异程度比较高的位点。野生群体和人工繁殖群体的多态位点比例分别为 45% 和 25% ($P_{0.95}$) ;群体平均观察杂合度分别为 0.141 ± 0.044 和 0.095 ± 0.043 。结果表明 ,真鲷的野生群体和养殖群体拥有较高度度的遗传变异水平 ,但是养殖群体的遗传变异水平比野生群体有一定程度的降低。养殖群体遗传变异水平的降低在一定程度上是由于亲鱼数量少所致。比较了同工酶分析和 RAPD 分析的结果。将此两种技术相结合在鱼类群体遗传多样性分析中具有比较实际的意义。

关键词 真鲷 ,同工酶 ,遗传变异 ,水平淀粉凝胶电泳

Iszyme variation of the wild and hatchery populations of Red Seabream/WANG Wei_Ji¹⁾ , KONG Jie¹⁾ , ZHUANG Zhi_Meng¹⁾ , MENG Xian_Hong²⁾

Abstract To reveal isozyme variation of Red Seabream (*Pagrus major*) , each 50 index samples of a wild population and of a hatchery population from Haizhou Bay of Yellow Sea were investigated through starch gel electrophoresis. Twenty loci of 13 enzymes were detected. The proportion of polymorphic loci was 45% and 25% ($P_{0.95}$) , respectively , *ME* and *EST_b* showed the highest genetic variation among the detected loci. The mean heterozygosity (*Ho*) in two populations were 0.141 ± 0.044 and 0.095 ± 0.043 , respectively. The hatchery population possesses lower genetic variation than the wild populations. The relatively small numbers of broodstock may result in the lower genetic variation of hatchery population. For the sustainable development of the mariculture in the future , some appropriate measures , such as enlarging the broodstock number , should be taken in case of the reducing of population genetic variation. The result of isozyme analyzing was compared with that of RAPD technique in this passage , which showed that these two results were identical. So it is meaningful to combine RAPD with isozyme technique in assessing population genetic variation.

Key words red seabream (*Pagrus major*) , isozyme , genetic variation , horizontal starch gel electrophoresis
Author 's address 1)Yellow Sea Fisheries Research Institute , Chinese Academy of Fishery Science , Qingdao 266071
2)Ocean University of Qingdao , Qingdao 266003

真鲷 (*Pagrus major*) 俗称红加吉 (Red Seabream) , 是一种名贵的暖温洄游性鱼类。主要分布于我国东海、黄海和渤海海域 , 是我国海水网箱养殖的主要鱼种。20 世纪 90 年代

* 国家自然科学基金资助项目 (编号 39630260)
收稿日期 2000 - 07 - 24 ; 修改稿收到日期 2000 - 08 - 21
王伟继 e_mail 地址 : wjwang21cn@sina.com

在黄渤海海域还进行了大规模的真鲷种苗人工放流。国外有很多关于海水鱼类群体遗传变异水平的报道 ,Taniguchi (1983)对黑鲷(Black Seabream)第一和第二代人工繁育群体的遗传结构变化进行了同工酶分析。 Allendorf 和 Phelps(1980)采用同工酶手段检测到一种鲑科鱼类养殖群体遗传变异水平比野生群体有所降低 ,并分析了其中的原因。关于分布于我国沿海的真鲷野生群体和养殖群体的同工酶遗传差异至今未见报道。本文采用同工酶手段对分布于黄海海州湾的野生真鲷群体和一个人工繁殖群体进行了遗传结构分析 ,并与同一批样品的 RAPD 分析结果相比较 ,以期为真鲷的人工养殖和品种培育提供相关的遗传背景资料。

1 材料与方法

实验所用真鲷野生群体(WP)于 1999 年 6 月 2 日采集于黄海海州湾 ,共 50 尾 ,体长均值为 6.5 cm。人工繁殖群体(CP)来源于黄海水产研究所麦岛实验基地 ,其亲本为 1993 年捕捞于渤海莱州湾的 26 尾野生真鲷经过人工驯化繁育的 F₁ 的后代 ,即 F₂ 代 ,共 50 尾 ,体长均值为 6.2 cm。所用样品同 RAPD 分析(孟宪红等 2000)。活体运回实验室 , -76℃ 保存备用。实验所用生化药品购自 SIGMA 和 SANGON 公司。

每个样本分别取尾柄肌肉和肝脏组织于 Tris_HCl (pH7.0)组织提取液中冰浴研磨 , 4℃ 条件下 15 000 r/min 离心 15 min ,取上清酶液进行电泳。实验采用水平淀粉(淀粉为国内菱湖食品厂生产的马铃薯淀粉和可溶性淀粉适当比例的混合淀粉)凝胶电泳 ,凝胶浓度为 12% ~ 14%。电泳条件参照喻子牛(1997) ,Lee(1995)的方法进行 ,分别选用 TC8.0 ,TC6.9 和 EBT(pH8.6)三种电泳缓冲系统。实验分析了真鲷的 20 种同工酶 ,其中 ACP、ALP、AAT 等 7 种酶由于活性低或谱带不清楚 ,没有进行分析。从中选择了 LDH、ME、CAT 等 13 种谱带清晰的同工酶进行检测分析(见图 1)。所分析的酶见表 1。同工酶的命名方法参照喻子牛(1997) ,尤锋(1999)的方法进行。

表 1 分析同工酶的电泳条件及记录位点数
Table 1 The enzyme systems and electrophoretic data

酶系统 Enzyme	缩写 Abbreviation	标准代码 E. C. number	记录位点数 No. of loci	缓冲系统 Buffer systems
乳酸脱氢酶	LDH	EC 1. 1. 1. 27	3	TC8. 0
苹果酸脱氢酶	MDH	EC 1. 1. 1. 37	2	TC8. 0
苹果酸酶	ME	EC 1. 1. 1. 40	1	TC8. 0
异柠檬酸脱氢酶	IDH	EC 1. 1. 1. 42	1	TC6. 9
葡萄糖磷酸异构酶	GPI	EC 5. 3. 1. 9	3	EBT
磷酸葡萄糖变位酶	PGM	EC 5. 4. 2. 2	2	EBT
6_磷酸葡萄糖酸脱氢酶	G6PDH	EC 1. 1. 1. 49	2	EBT
酯酶	EST	EC 3. 1. 1. 1	1	EBT
触酶	CAT	EC 1. 11. 1. 6	1	EBT
谷氨酸脱氢酶	GLUDH	EC 1. 4. 1. 2	1	TC8. 0
超氧化物歧化酶	SOD	EC 1. 15. 1. 1	1	EBT
葡萄糖脱氢酶	GC- DH	EC 1. 1. 1. 118	1	EBT
乙醇脱氢酶	ADH	EC 1. 1. 1. 1	1	EBT

图 1 真鲷养殖群体 EST(酯酶)同工酶酶谱
Fig. 1 Electropherograms of EST of Red Seabream hatchery population

图 2 真鲷野生群体 CAT(触酶)同工酶酶谱
Fig. 2 Electropherograms of CAT of Red Seabream wild population

2 结果和分析

2.1 共检测了真鲷野生和养殖群体的 13 种同工酶 ,记录了 20 个基因位点。其中 *CAT*、*EST*、*GPI_a* 等为多态位点(见图 1 ,图 2) ,多态位点比例 *WP* 为 45%($P_{0.95}$) ,*CP* 为 25%($P_{0.95}$)。计算了多态位点的等位基因频率(表 2)。位点有效等位基因值在 *EST* 和 *ME* 两个位点表现为最大 ,说明这两个位点是真鲷变异程度比较高的位点。统计了野生群体和人工繁殖群体的平均杂合度、位点有效等位基因值以及相关的群体遗传变异参数(表 3)。文中真鲷野生群体的平均观察杂合度较另一种鲷科鱼类黑鲷(Black Seabream) $H_o = 0.30 \pm 0.05$)的值高(Taniguchi ,1983)。由表 3 可见 ,人工繁殖群体的平均观察杂合度和位点有效等位基因值比野生群体的值都有一定程度的降低。虽然两个群体在某些位点表现为杂合子过剩状态 ,但在群体水平均表现为不同程度的杂合子缺失状态 ,其中人工繁殖群体杂合子缺失严重。

表 2 真鲷两个群体多态位点等位基因频率
Table 2 Allele frequencies at 10 polymorphic loci in the two populations of Red Seabream

基因位点 Locus	等位基因 Allele	基因频率 Allele frequency	
		野生群体 WP	养殖群体 CP
ADH	100	0. 73	0. 71
	75	0. 27	0. 29
MDH_a	100	0. 89	0. 90
	83	0. 11	0. 10
ME	100	0. 67	0. 59
	109	0. 18	0. 22
	96	0. 07	0. 13
	117	0. 08	0. 06
G6PDH_a	100	0. 92	1. 00
	118	0. 08	0
G6PDH_b	100	0. 95	0. 88
	73	0. 05	0. 12
GPI_a	100	0. 94	0. 97
	108	0. 06	0. 03
GPI_b	100	0. 89	0. 95
	110	0. 03	0. 03
	93	0. 08	0. 02
GPI_c	100	0. 93	0. 99
	69	0. 07	0. 01
EST_b	100	0. 53	0. 75
	113	0. 09	0. 09
	104	0. 21	0. 13
	87	0. 15	0. 03
	78	0. 02	/
CAT	100	0. 44	0. 44
	220	0. 30	0. 34
	178	0. 05	0. 07
	78	0. 05	0. 07
	200	0. 08	0. 04
	111	0. 08	0. 04

表 3 真鲷野生和养殖群体的遗传变异性水平
Table 3 Genetic variability in the wild population and hatchery population of Red Seabream

遗传变异参数 Genetic variability	野生群体 Wild population	养殖群体 Hatchery population
Ho	0. 141 ± 0. 044	0. 095 ± 0. 043
He	0. 156 ± 0. 049	0. 132 ± 0. 047
D	- 0. 092	- 0. 252
Ne	1. 267 ± 0. 105	1. 220 ± 0. 118

2.2 人工繁殖群体遗传变异水平比野生群体降低表现在某些位点等位基因的减少或丢失。本文采用常见等位基因频率 $P_{0.95}$ 为多态位点判读标准。以 *GPI_a* 为例,*GPI_a*¹⁰⁸ 等位基因频率在野生群体为 0.06 ,而在人工繁殖群体为 0.03 ,以稀有等位基因的形式出现 ,判断其为单态位点。在 *GPI_b*、*GPI_c* 位点也类似。其次 ,人工繁殖群体在有些位点上出现了等位基因丢失的现象 ,在 *EST* 位点 ,人工繁殖群体丢失了 *EST*⁷⁸ 等位基因 ,而在 *G6PDH_a* 位点则丢失了 *G6PDH_a*¹¹⁸ 等位基因。表明人工繁殖群体遗传变异水平的降低不仅是由于其杂合子在数量上的减少 ,而且与某些位点上出现稀有等位基因以及等位基因的丢失有很大的关系。

2.3 瓶颈效应(bottleneck effect)和遗传漂变(genetic drift)作用导致了人工繁殖群体遗传多样性的下降。从亲鱼数量上来说 ,如此小的亲本数目 ,有可能由于瓶颈效应导致群体遗传变异水平的降低。现在我国广泛养殖的奥利亚罗非鱼(*Oreochromis aureus*)是经过两次瓶颈作用后的群体 ,这两次瓶颈作用使遗传变异降低 3.3 %。瓶颈作用使数量性状变量减少(李思发 ,1988)。本文分析的人工繁殖群体比野生群体的平均杂合度降低了 4.6 %。瓶颈作用的另一个严重后果就是特殊等位基因(通常是稀有等位基因)的丧失。本文中人工繁殖群体的 *EST*⁷⁸ 等位基因和 *G6PDH_a*¹⁰⁰ 等位基因的丢失就是例子。虽然从群体遗传变异水平上 ,这些等位基因的作用并不是很大 ,但是对于群体的基因库则非常重要。遗传漂变造成基因丢失的现象与群体的大小有关。群体小 ,漂变时间长 ,损失的变异也会增多。李思发(1988)认为 ,一个含 10 尾鱼的群体 ,10 代后保存的变异为 60 % ,而 100 尾鱼则为 95 %。漂变对小群体的遗传变异的保存非常不利。小群体导致的近交衰退(inbreeding depression)作用也不可轻视。需要说明的是 ,人工繁殖群体的亲本是渤海莱州湾 26 尾野生真鲷的子二代 ,本文检测的野生群体捕自黄海海州湾。渔业生物学调查研究发现 ,分布于黄海海州湾和渤海莱州湾的真鲷为同一个地理群体 ,黄海海州湾和渤海莱州湾是真鲷两个不同的产卵场所(邓景耀 ,1988)。

2.4 我国的海水养殖业开展比较晚 ,至今尚未建立起经过人工培育筛选的海水鱼养殖品系。因此 ,从现有的野生群体中筛选、培养适合于人工养殖的海水鱼品系具有很大的潜力。在这方面已有相关的报道(邱高峰 ,1998)。但是在选种中 ,一个不可忽视的问题就是近交效应(inbreeding effect)和有效群体的大小。因此关于海水养殖种类的有效群体的大小研究非常具有实际意义。李思发(1988)认为 ,从短期利益出发(即从二、三代出发) ,亲鱼群体的有效大小应不少于 50 尾 ,雌雄比例相当。本文没有对所分析真鲷的有效群体大小进行细致估算 ,但 26 尾野生真鲷的亲鱼数量显然不足以保证有效群体的大小。

2.5 本文采用同工酶技术从蛋白质水平对真鲷野生和养殖群体进行了遗传变异研究。同工酶技术产生于 20 世纪 60 年代 ,经过近半个世纪的发展 ,同工酶技术已日臻成熟并被广泛应用于群体遗传结构分析、生物分类学、生化遗传学及发育生物学。近 20 年来 ,同工酶技术在评估鱼类的遗传多样性方面仍占有重要的地位(赵金良 ,李思发 ,1996 ;吴力钊 ,王祖熊 ,1992)。但是 ,可供分析的同工酶数量十分有限 ,迄今仅有 50 余种 ,而经常分析的不过 10 余种 ,在鱼类研究方面 ,平均检测的位点数也只有 20 余个(钱迎倩等 ,1994)。因此 ,同工酶技术在一定程度上低估了群体的遗传变异水平。RAPD 技术的出现在很大程度上弥补了同工酶技术的不足。由于使用随机引物检测 ,从理论上来说 ,可以覆盖整个物

种的基因组。因此,该技术很快在鱼类的遗传多样性检测方面得到了较为广泛的应用(丁少雄等,1998;章怀云等,1998)。然而,RAPD技术检测的是显性遗传标记,可以检测到一对等位基因是否存在,却无法检测到其是纯合还是杂合状态。而同工酶可以检测出该位点的存在,并且可检测出纯合或杂合状态。因此将两种技术相结合,分别从蛋白质和DNA水平来评估鱼类的遗传多样性,是现阶段分析物种遗传多样性的一种有效的方法。本文的同工酶分析是对RAPD分析(孟宪红等,2000)的补充和印证,其结果和RAPD分析相一致,在蛋白质水平上,人工繁殖群体比野生群体的遗传变异水平有一定程度的降低。

参 考 文 献

- 邓景耀,1988. 渤海渔业资源增殖与管理的生态学基础. 海洋水产研究,9:1~10
- 丁少雄,王军,全成干,苏永全,1998. 鮰状黄姑鱼养殖群体的遗传多样性. 科学通报,43(21):2294~2299
- 李思发,1988. 鱼类繁育群体遗传性能的保护. 水产学报,12(3):283~290
- 孟宪红,孔杰,庄志猛,王伟继,刘萍,2000. 真鲷野生群体和人工繁殖群体的遗传多样性. 生物多样性,8(3):248~252
- 钱迎倩,马克平编,1994. 生物多样性研究的原理与方法. 北京:中国科学技术出版社,132
- 邱高峰,1998. 虾蟹类遗传育种学研究. 水产学报,22(3):268
- 吴力钊,王祖熊,1992. 长江中游草鱼天然群体的生化遗传结构及变异. 遗传学报,19(3):221~227
- 喻子牛,孔晓瑜,王如才,刘必谦,1997. 泥蚶等位基因酶遗传变异研究. 中国水产科学,4(5):15~21
- 尤锋,王可玲,相建海,徐成,吴谡琦,1999. 山东近海牙鲆同工酶的生化遗传分析. 海洋与湖沼,30(2):127~133
- 赵金良,李思发,1996. 长江中下游鲢、鳙、草鱼、青鱼群体分化的同工酶分析. 水产学报,20(2):104~110
- 章怀云,刘荣宗,张学文,陈韬,肖调义,李晋衡,1998. 草鱼和鲤鱼遗传变异的RAPD指纹分析. 水生生物学报,22(2):168~173
- Allendorf F W, Phelps S R, 1980. Loss of genetic variation in a hatchery stock of cutthroat trout. *Transactions of the American Fishery Society*, 109:537~543
- Lee S C, Chang J T, Tsu Y Y, 1995. Genetic relationships of four Taiwan mullets (Pisces: Perciformes: Mugilidae). *Journal of Fish Biology*, 46:159~162
- Taniguchi N, Sumantadinata K, Iyama S, 1983. Genetic change in the first and second generations of hatchery stock of Black Seabream. *Aquaculture*, 35:309~320

(责任编辑:时意专)

欢迎订阅《动物学报》

欢迎向《动物学报》投稿

《动物学报》于1935年创刊,是我国动物学领域中历史最悠久和最具权威性的学术刊物之一,在国内外有着广泛的影响。《动物学报》由中国科学院动物研究所和中国动物学会共同主办,为动物学研究领域的综合性学术期刊。主要刊登原创性的研究论文,优先发表创新突出、理论性强和中国特有动物的研究论文;刊登特定研究领域中的综述(以特约稿为主)以及新书评介等。主要内容包括:动物形态学、分类学、动物地理分布、生态学和行为学、生理学和生物化学、遗传学和生物进化、动物的生殖、发育和衰老、细胞学和分子生物学以及应用动物学等方面的研究论文、研究简报、专题评述、国内外研究进展、国际学术会议消息等,是动物学研究领域中的有关专家、教师和学生的必备刊物。

《动物学报》自2001年起改为双月刊,大16开本,双月15日出版,国内外公开发行,每期定价18元,全年定价108元。邮发代号2-497,全国各地邮局均可订阅,也可与我刊编辑部联系补订或补刊等有关事项。地址:北京海淀中关村路19号《动物学报》编辑部,邮编:100080,电话:010-62624530,传真:010-62569682, E-mail: zool@panda. ioz. ac. cn