

文章编号: 1004-7271(2007)03-0207-05

丁鲈不同群体的生化遗传多样性分析

凌去非^{1,2}, 李思发², 赵金良², 张海军³

- (1. 苏州大学生命科学学院, 江苏 苏州 215123;
2. 上海水产大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 200090;
3. 新疆生产建设兵团农十师额河特种鱼类繁育场, 新疆 北屯 836000)

摘要: 2002年10-11月,应用聚丙烯酰胺凝胶水平电泳,对我国新疆丁鲈群体和从捷克引进的丁鲈群体各30尾个体的ADH、IDH、LDH、SDH、SOD、EST、MDH、ME、6PGDH、G3PDH等10种同工酶和1种肌蛋白进行分析。结果发现,我国丁鲈群体在EST-2、SOD、ADH和IDH等4种同工酶存在多态,捷克群体在EST-1、ADH和IDH等3种同工酶存在多态。我国新疆丁鲈群体多态位点比例为28.57%,比捷克丁鲈群体高(21.43%)。平均杂合度分别为0.0619,也比捷克丁鲈群体高(0.0357)。捷克丁鲈群体存在一定的杂合子缺失现象。因此,从遗传保护角度,应防止引入我国的捷克丁鲈群体进入新疆额尔齐斯河流域进行人工养殖,以免对我国丁鲈天然资源造成污染。

关键词: 丁鲈; 群体; 生化遗传多样性; 同工酶

中图分类号: S 917 文献标识码: A

Analysis of biochemical genetic diversity of different populations of tench

LING Qu-fei^{1,2}, LI Si-fa², ZHAO Jin-liang², Zhang Hai-jun³

- (1. School of Life Sciences, Suzhou University, Suzhou 215123, China;
2. Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquaculture Ecosystem Certificated by Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;
3. Eltrix River Fish Breeding Farm, 10th Subgroup of Xinjiang Construction Group, Beitun 836000, China)

Abstract: Thirty wild individuals of tench, *Tinca tinca* of Xinjiang population of China and thirty individuals of tench of Czech population, which were introduced into China in 1999, were collected in 2002. The isozymes of ADH, IDH, LDH, SDH, SOD, EST, MDH, ME, 6PGDH, G3PDH and Muscle protein in their livers, muscles and other tissues were analyzed by using polyacrylamide gel electrophoresis. The loci of EST-2, SOD, ADH and IDH in Xinjiang population and loci of EST-1, ADH and IDH in Czech population were found to be polymorphic. The percentages of polymorphic loci of Xinjiang population and Czech population were 28.57% and 21.43% respectively, the mean heterozygosity were 0.0619 and 0.0357 respectively. It was found that there were some losses of heterozygosity in Czech population. Therefore, from the view of the genetic conservations, it was suggested that it should be forbidden to extend culture of tench of Czech population in

收稿日期: 2006-05-09

基金项目: 新疆生产建设兵团科委农业科学研究与技术开发项目(NKB02N10NK16XM)

作者简介: 凌去非(1965-), 男, 江苏丹阳人, 副教授, 博士, 主要从事鱼类种质资源方面的研究。E-mail: lingqf@suda.edu.cn

通讯作者: 李思发, E-mail: lisifak@online.sh.cn

Xinjiang Eltrix River basin.

Key words: *Tinca tinca*; population; biochemical genetic diversity; isozyme

丁鲃(*Tinca tinca*)隶属于鲤科、雅罗鱼亚科、丁鲃属^[1]。广泛分布于欧洲各地,在我国仅分布于新疆额尔齐斯河流域。近年来,丁鲃与其它额尔齐斯河土著鱼类一样,由于人类的活动,其资源量正趋于衰退^[2]。而且,1998年湖北省水产研究所从捷克引进丁鲃进行养殖,并在我国西部地区进行推广。由于此前对我国丁鲃群体的遗传背景几乎一无所知,外来丁鲃群体是否会对我国原有丁鲃群体的遗传多样性造成影响急待研究。鱼类同工酶基因座位多态性的研究始于二十世纪六十年代中期,在其后的30多年以来,同工酶技术在鱼类群体遗传分析中得到了广泛的应用^[3-5]。本文报道了我国新疆丁鲃群体和捷克丁鲃群体生化遗传的比较研究结果。

1 材料和方法

新疆丁鲃群体样本于2002年11月由新疆生产建设兵团农十师额河特种鱼类繁育场基地提供(以下简称新疆群体)。捷克丁鲃群体样本由湖北省水产研究所于2002年10月提供,该群体系于1998年从捷克引进,2002年繁殖的子代(以下简称捷克群体)。两群体各取30尾,新疆群体平均体重(69.2 ± 3.7)g,捷克群体平均体重(61.0 ± 2.4)g。对每尾鱼进行常规的生物学测量和框架测量后,活体将鱼杀死,取背部肌肉、肝脏,编号后放入小塑料袋中,低温冰箱中($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$)保存,在1个月时间内做完试验。

1.1 样品制备

取肌肉0.3g,以1:3比例(重量g:体积mL)加入0.3%NAD液,在匀浆机中以4000r/min速度匀浆2min后,在冷冻离心机中以10000r/min离心20min,最后,吸取离心后的上清液进行电泳。

肝脏样取0.3g,以1:3比例(重量g:体积mL)加入0.3%NAD液,匀浆,10000r/min离心2次,第一次离心后,吸取上清液,再进行第二次离心,至上层溶液澄清为止。整个制样过程均在低温下操作。

1.2 电泳

共分析了10种同工酶:醇脱氢酶(ADH)、异柠檬酸脱氢酶(IDH)、乳酸脱氢酶(LDH)、山梨醇脱氢酶(SDH)、超氧化物歧化酶(SOD)、酯酶(EST)、苹果酸脱氢酶(MDH)、苹果酸酶(ME)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(6PGDH)、甘油-3-磷酸脱氢酶(G3PDH)和肌蛋白(Muscle protein),电泳方法参照李思发^[6]的方法。用4%的聚丙烯酰胺凝胶在LKB公司产平板电泳仪上进行电泳,酯酶用5%的聚丙烯酰胺凝胶。

每次电泳前20min,先打开多用恒温循环仪,降温至 $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。将预先制备好的聚丙烯酰胺凝胶放在冷却板上,在50mA电流下预电泳30min。预电泳结束后,关闭电源,在每个加样孔内加入8 μL 样品,25mA电泳下,前电泳10min后,进行正式电泳。正式电泳电压为275V,电泳时间依不同酶(或蛋白质)有所不同。

1.3 染色

电泳结束后,将电泳板放入预先配好并在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中保温的染色液中,染色时间依不同酶(或蛋白质)有所不同,染色至所有酶带均清晰显示时为止。各种不同的同工酶和蛋白质的染色配方参照李思发^[6]。

1.4 褪色

染色后的电泳胶板放入2.5%冰醋酸进行褪色。其中,酯酶EST和肌蛋白褪色用5%冰醋酸。

1.5 固定保存

褪色至底板清晰时,放入保存液中(乙醇:冰醋酸:甘油:蒸馏水=3:1:1:5)固定。

固定好后,胶板用透明玻璃纸包裹好,阴凉处晾干,以利长期保存。最后进行拍照,记录下带型。

1.6 酶带分析与数据处理

根据酶的结构组成和同工酶在各组织所表现的酶谱,确定每种同工酶的编码座位数和多态座位的等位基因数。

为便于统计分析,按 Allendorf & Utter^[7]的方法对各位点和等位基因进行编号。位点的编号依迁移率速度的快慢而定,迁移慢的座位编号为 A 座位,较快的编为 B 座位,更快的编为 C 座位,依次类推。基因频率按其表现型频率的高低而定,对出现最多的等位基因 100 的中点的等位基因编为 50,超过等位基因迁移率 10% 的编为 110,移向了阴极的编为负号。

采用多态位点比例(P)和平均杂合度(H)两个参数度量丁鲟两群体的遗传变异。多态位点的标准按 Nei^[8]的 0.99 划分,即实测等位基因的出现频率小于或等于 0.99 时,即视为多态。多态位点比例(P)和平均杂合度(H)计算公式分别为:

(1) 多态座位比例(P)

$$P = \text{多态位点数} / \text{所测位点总数};$$

(2) 群体平均杂合度的观测值

$$H_0 = \sum H'_0 / n, \quad H'_0 = \text{杂合子观测值} / \text{观察个体的总数}$$

$$\text{群体平均杂合度的预期值 } H_e = \sum (1 - \sum X_i^2) / n;$$

(3) 位点有效等位基因数 $N_e = \text{每位点等位基因观测数的和} / n$;

(4) Hardy-Weinberg 遗传偏离指数 $D = (H_0 - H_e) / H_e$;

以上 X_i 为 X 种群的等位基因 i 的频率; n 为检测位点数。

2 结果

2.1 等位基因频率

对我国新疆和捷克 2 个丁鲟群体肌肉和肝脏 10 种同工酶和 1 种肌蛋白的电泳分析,除 ME、SDH 同工酶染色未显带外,在显带清晰的 8 种同工酶和肌蛋白中,ADH、EST-1、EST-2、SOD 和 IDH 为多态位点(表 1,图 1,图 2)。

表 1 两丁鲟群体所测的多态位点及其等位基因频率

Tab. 1 Allele frequencies at polymorphic loci of two populations of tench

位点	等位基因	新疆群体	捷克群体
EST-1	100	1.000 0	0.966 7
	95	0.000 0	0.033 3
EST-2	100	0.983 3	1.000 0
	110	0.016 7	0.000 0
SOD	100	0.950 0	1.000 0
	65	0.050 0	0.000 0
ADH	100	0.833 3	0.933 3
	115	0.166 7	0.066 7
IDH	100	0.650 0	0.800 0
	75	0.350 0	0.200 0

2.2 群体的遗传变异

丁鲟新疆群体多态位点比例(P)、种群有效等位基因数和平均杂合度(H)要略高于捷克群体(表 2)。

表 2 两丁鲟群体所测的多态位点比例及杂合度

Tab. 2 Percentage of polymorphic loci and mean heterozygosity of two populations of tench

参数	多态位点比例	位点有效等位基因数	实际杂合度	预期杂合度	遗传偏离指数
新疆	28.57%	1.29	0.061 9	0.061 5	0.006 5
捷克	21.43%	1.21	0.035 7	0.036 4	-0.019 2

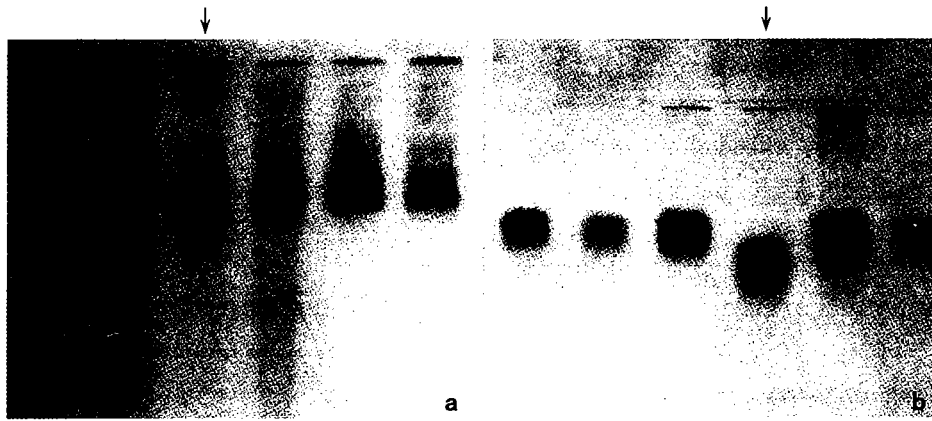


图1 丁鲷肝脏中 EST(a)和 ADH(b)同工酶的电泳图谱

Fig.1 Electrophoretogram of EST(a) and ADH(b) in the liver of tench

注:图中箭头所示为多态位点

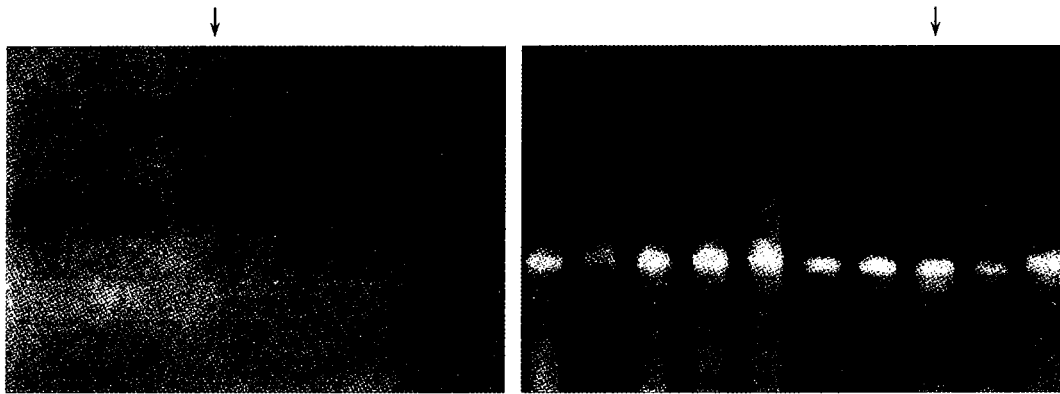


图2 丁鲷肝脏中 IDH(a)和 SOD(b)同工酶的电泳图谱

Fig.2 Electrophoretogram of IDH(a) and SOD(b) in the liver of tench

注:图中箭头所示为多态位点

3 讨论

本研究对丁鲷 2 个群体 10 种酶和 1 种肌蛋白进行了电泳分析,其中我国新疆群体表现在 EST-2、SOD、ADH 和 IDH 等 4 种同工酶的 4 个位点上有多态,捷克群体在 EDT-1、ADH 和 IDH 等 3 种同工酶中的 3 个位点存在多态,我国新疆群体多态位点比例和种群有效等位基因数均高于捷克群体。同时,我国新疆群体位点有效等位基因与平均杂合度均比捷克群体高,进一步说明了我国新疆群体具有相对较高的遗传变异。这一结果与对新疆丁鲷群体和捷克丁鲷群体的随机扩增多态 DNA 分析结果相一致^[9]。

在自然种群中,如果个体间的随机交配没有受到干扰,种群的平均杂合度应该与 Hardy-Weinberg 平衡相吻合,本文的研究结果表明,新疆群体杂合子分布接近于平衡状态,而捷克群体 D 值为 -0.0192 ,说明群体中存在杂合子缺失现象,这与捷克群体是引进的人工繁殖群体有关。Šlechtová^[10]、Kohlmann^[11]对捷克丁鲷野生群体和家养群体的研究结果也表明,野生群体与家养群体相比,有较高的遗传变异。

Fisher^[12]证明了群体中遗传变异的量同自然选择所引起的进化速率之间的直接相关性,即在生物体中可变位点越多,每个可变基因位点上等位基因越多,其适应环境的能力越强,进化速率越大。同时,在野生生物的管理中,从保持完整性和纯洁性看,通常不应将遗传分歧大的物种或种群进行杂交。本研

究显示 2 个丁鲷群体遗传背景存有一定的差异,而且,捷克丁鲷群体遗传多样性比我国新疆的丁鲷群体遗传多样性要小。因此,从资源保护角度出发,应防止引入我国的捷克丁鲷群体进入新疆额尔齐斯河流域进行人工养殖,以免对我国丁鲷天然资源造成污染。

致谢:湖北省水产研究所王佳喜研究员馈赠了丁鲷捷克群体样品。

参考文献:

- [1] 杨干荣,黄宏金. 雅罗鱼亚科[M]//伍献文. 中国鲤科鱼类志. 上海:上海科学与技术出版社,1982: 10 - 11.
- [2] 任慕莲,郭 焱,张秀善,等. 中国额尔齐斯河鱼类资源及渔业[M]. 乌鲁木齐:新疆卫生科技出版社,2002.
- [3] Beacham T, Withler R, Gould A. Biochemical genetic stock identification of pink salmon (*Oncorhynchus gorbusha*) in Southern British Columbia and Puget Sound[J]. Can J Fish Aquat Sci, 1985, 42: 1474 - 1483.
- [4] Levy J A, Maggioni R, Conceicao M B. Close genetic similarity among populations of the white croaker in the South and South - eastern Brazilian coast[J]. Fisheries Research,1998,39(1): 87 - 94.
- [5] Gjaever M, Stien J. Population genetic substructure in blue whiting based on allozyme data[J]. Journal of Fish Biology, 1998, 52(4): 782 - 795.
- [6] 李思发. 中国淡水养殖鱼类种质研究[M]. 上海:上海科学与技术出版社,1998.
- [7] Allendorf F W, Utter F M. Population Genetics [M]//Fish physiology. New York: Academic Press, 1979: 407 - 454.
- [8] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76(10): 5 269 - 5 273.
- [9] 凌去非,李思发,乔德亮. 丁鲷不同群体间形态学差异比较与随机扩增多态 DNA[J]. 水生生物学报,2006,30(5):578 - 586.
- [10] Šlechtová V, Šlechta V, Valenta M. Genetic protein variability in tench (*Tinca tinca* L.) stocks in Czech Republic[J]. Pol Arch Hydrobiol, 1995, 42: 133 - 140.
- [11] Kohlmann K, Kerstern P. Enzyme variability in a wild population of tench (*Tinca tinca*) [J]. Pol Arch Hydrobiol,1998, 45: 303 - 310.
- [12] Fisher R A. The Genetical Theory of Natural Selection[M]. Oxford: Oxford University Press,1930.