

澥浦大弹涂鱼群体生化遗传分析

张春丹¹, 李凌云¹, 黄福勇¹, 汪美贞¹, 张海琪²

(1. 宁波大学 生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211; 2. 浙江省水产引种育种中心, 浙江 杭州 310012)

摘要: 于 2004 年 4 月, 在浙江省宁波市镇海区澥浦滩涂采集野生大弹涂鱼 (*Boleophthalmus pectinirostris*) 30 尾, 采用聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) 电泳方法, 分析了乳酸脱氢酶 (LDH)、甲酸脱氢酶 (FDH)、谷氨酸脱氢酶 (GDH)、D-葡萄糖脱氢酶 (GCDH)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G6PDH)、苹果酸脱氢酶 (MDH)、苹果酸酶 (ME)、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 和酯酶 (EST) 等 10 种酶在大弹涂鱼肝脏组织中的表达, 并对同工酶表型进行了生化遗传分析。实验结果表明, 大弹涂鱼 10 种同工酶中除 CAT 外的另 9 种酶都得到了清晰的酶谱。该 9 种酶共记录了 23 个基因座位, 筛选出 LDH-1, FDH-1, G6PDH-1, ME-1, SOD-1, EST-1, EST-2, EST-3 等 8 个多态基因座位。澥浦大弹涂鱼多态座位比例 (P) 为 34.78%, 平均杂合度 (H) 为 0.059 4, 与其他海水鱼类相比, 遗传多样性水平相对较低。

关键词: 大弹涂鱼 (*Boleophthalmus pectinirostris*); 自然群体; 同工酶; 遗传多样性

中图分类号: S965

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)02-0047-04

大弹涂鱼 (*Boleophthalmus pectinirostris*), 俗称花跳、星跳、花弹涂鱼等, 隶属于鲈形目 (Perciformes)、鰕虎鱼亚目 (Gobioidei)、弹涂鱼科 (Periopthalmidae)、大弹涂鱼属 (*Boleophthalmus*), 系沿岸暖水广温广盐性两栖鱼类。有关其生物学特性、生理学以及繁育生物学已有较多报道^[1-5], 生化遗传方面仅见不同组织器官同工酶研究^[6], 群体生化遗传方面尚未见报道。同工酶作为一种重要的生化指标, 在鱼类遗传育种、种质资源保护以及生物进化等方面有较多应用。作者应用聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) 电泳方法, 对浙江澥浦大弹涂鱼进行了生化遗传分析, 充实了这方面研究资料, 为制定相应的资源保护措施, 以及今后的人工选种和定向育种提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料

试验所用的野生大弹涂鱼样本于 2004 年 4 月采自浙江省宁波市镇海区澥浦滩涂, 共 30 尾, 全长 11.4~15.8 cm, 体质量 25.8~48.6 g。活鱼运回实验室后, 立即解剖, 每尾鱼取肝脏 0.3 g, 用生理盐水清洗后, 加重蒸水 800 μ L, 4 $^{\circ}$ C 冰浴匀浆, 移入离心管, 15 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 按 1:2 的比例加入 40% 甘油和 0.1% 溴酚蓝指示剂, 用于电泳分析。

1.2 方法

同工酶电泳采用聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) 电泳, 电泳方法参照周宗汉等^[7]的方法, 略作改进。分离胶质量分数为 7%, 浓缩胶质量分数为 3.1%, 电极缓冲液为 Tris-甘氨酸 (TG), pH 为 8.3。染色液配制参照文献^[8], 并加以改进。

1.3 结果记录

凝胶用 7% 醋酸溶液脱色固定后进行酶谱分析, 利用 FR 复日紫外/可见光分析生物凝胶成像系统观察、拍照, 对凝胶测量后按酶带迁移率手工记录。各基因座位命名以各酶谱的相对 R_f 迁移率由小到大依次命名, 即从向阳极运动的酶谱带开始依次命名为 1, 2, 3, …… $R_f = l/L$, l 为阴极端至各谱带中点的距离, L 为阴极端至指示剂终点的距离。

1.4 数据分析与处理

数据处理采用文献^[9]的方法, 统计多态座位比例 P (mean proportion of polymorphic loci) 和每个座位的平均杂合度 H (average heterozygosity per locus)。其计算式如下:

收稿日期: 2005-12-13; 修回日期: 2006-03-30

基金项目: 浙江省财政厅和浙江省海洋与渔业局资助项目 (503050005)

作者简介: 张春丹 (1982), 女, 江西乐平人, 硕士, 研究方向为鱼类生理生化遗传学, E-mail: zhcd1982@163.com; 李凌云, 通讯作者, 教授, E-mail: limingyun@nbip.net.cn

(1) $P = \text{多态位点数} / \text{总座位数}$;

(2) $H = \sum(1 - \sum x_i^2) / n$

以上 x_i 为 x 种群的第 i 个等位基因的频率, n 为所测位点的总数。

2 结果

2.1 大弹涂鱼群体的同工酶

乳酸脱氢酶(LDH, E. C. 1. 1. 1. 27): 四聚体酶, 由 3 个基因座位编码, LDH-1 和 LDH-3 均为单态; LDH-2 为多态, 存在 79, 100 和 115 3 种等位基因, 观察到 79/ 79, 100/ 100, 115/ 100 3 种表型(图 1-1, 1-2)。

甲酸脱氢酶(FDH, E. C. 1. 2. 1. 2): 二聚体酶, 由 2 个基因座位编码, FDH-2 基因座位为单态; FDH-1 基因座位为多态, 存在 75, 100 和 125 3 种等位基因, 检测到 75/ 100, 100/ 100, 125/ 100 3 种表型(图 1-3, 1-4)。

谷氨酸脱氢酶(GDH, E. C. 1. 4. 1. 2): 四聚体酶, 由 2 个基因座位编码, 各基因座位均为单态(图 1-5, 1-6)。

D-葡糖脱氢酶(GcDH, E. C. 1. 1. 1. 118): 二聚体酶, 由 2 个基因座位编码, 各基因座位均为单态(图 1-7, 1-8)。

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH, EC. 1. 1. 1. 49): 由 3 个基因座位编码, G6PDH-2, G6PDH-3 均为单态; 仅 G6PDH-1 为多态, 存在 100 和 150 两种等位基因, 观察到有 100/ 100, 150/ 100 两种表型(图 1-9, 1-10)。

苹果酸脱氢酶(MDH, E. C. 1. 1. 1. 37): 二聚体酶, 由 2 个基因座位编码, 各基因座位均为单态(图 1-11, 1-12)。

苹果酸酶(ME, E. C. 1. 1. 1. 40): 四聚体酶, 由 2 个基因座位编码, 各基因座位均为单态(图 1-13, 1-14)。

超氧化物歧化酶(SOD, E. C. 1. 15. 1. 1): 二聚体酶, 由 2 个基因座位编码, 且 SOD-2 为单态; SOD-1 为多态, 存在 60 和 100 两种等位基因, 观察到有 60/ 60, 100/ 100 两种表型(图 1-15, 1-16)。

酯酶(EST, E. C. 3. 1. 1. 1): 二聚体酶, 由 5 个基因座位编码, 其中 EST-4, EST-5 为单态; EST-1, EST-2 和 EST-3 均为多态, EST-1 具有 71 和 100 两种等位基因, 检测到有 71/ 71, 100/ 100 两种表型; EST-2 存在 86 和 100 两种等位基因, 观察到有 86/ 86, 100/ 100 两种表型; EST-3 具有 77, 82, 100 3 种等位基因, 检测到有 77/ 77, 82/ 100, 100/ 100 3 种表型(图 1-17, 1-18)。

2.2 群体遗传多样性的指标

在大弹涂鱼种群 9 种同工酶系统中, 共记录出 23 个基因座位, 其中 LDH-1, FDH-1, G6PDH-1,

SOD-1, EST-1, EST-2, EST-3, ME-1 座位为多态, 多态座位比例为 34. 78%。根据大弹涂鱼群体等位基因频率(表 1), 计算出大弹涂鱼种群的平均杂合度为 0. 059 4。

表 1 溲浦大弹涂鱼种群多态位点等位基因频率

Tab. 1 Allelic frequencies at 12 polymorphic loci in population of *Boleophthalmus pectinirostris*

基因座位	等位基因	频率	基因座位	等位基因	频率
LDH-2	79	0. 100	SOD-1	50	0. 117
	100	0. 867		100	0. 883
	115	0. 033	EST-1	71	0. 067
FDH-1	75	0. 050	100	0. 933	
	100	0. 916	EST-2	86	0. 033
	125	0. 033	100	0. 964	
G6PDH-1	100	0. 983	EST-3	77	0. 133
	150	0. 017	82	0. 100	
	ME-1	50	0. 083	100	0. 767
	100	0. 916			

3 讨论

3.1 大弹涂鱼 CAT, SOD, EST 同工酶的表达

SOD 和过氧化氢酶(CAT) 是生物体内重要的抗氧化防御性功能酶, 与机体的免疫机能密切相关, SOD 催化 O_2^- 发生歧化反应, 生成 H_2O_2 和 O_2 , CAT 可以催化 H_2O_2 分解为 H_2O 与 O_2 , 所以 SOD 和 CAT 作为生物体的保护系统而被广泛地研究。 H_2O_2 和 O_2^- 对许多有机物不容易发生反应, 但 H_2O_2 和 O_2^- 可以形成毒性更强的 OH^- , 而 CAT 和 SOD 在生物体内的水平可影响 O_2^- 的变化, 消除或减少毒性。目前已在许多种动物体内检测到了 CAT 活性的存在, 包括一些重要的鱼类^[10]。本研究虽然检测到了较强活性的 SOD 同工酶, 但 CAT 同工酶只显示微弱不清晰的条带, 表明大弹涂鱼肝脏 CAT 活性比较低。与 CAT 相比, SOD 在大弹涂鱼肝脏防御系统扮演着更为重要的角色。

EST 在酯代谢和生物膜的结构等方面发挥作用, 在硬骨鱼类中酯酶有单体和二聚体的类型^[11], 它是由染色体上的不同的基因或共显性的等位基因译制的, 是直接的基因产物, 所以在种属的鉴定和遗传的研究方面作用重大。溲浦大弹涂鱼肝脏中的 EST 有 5 条酶带, 且 EST-3 活性最强, 与金春华等^[6] 报道的三门湾大弹涂鱼肝脏中 EST 有 4 条酶带有差异, 这是否说明 EST 可作为区分这两个不同地理种群大弹涂鱼的标记, 还有待进一步研究。

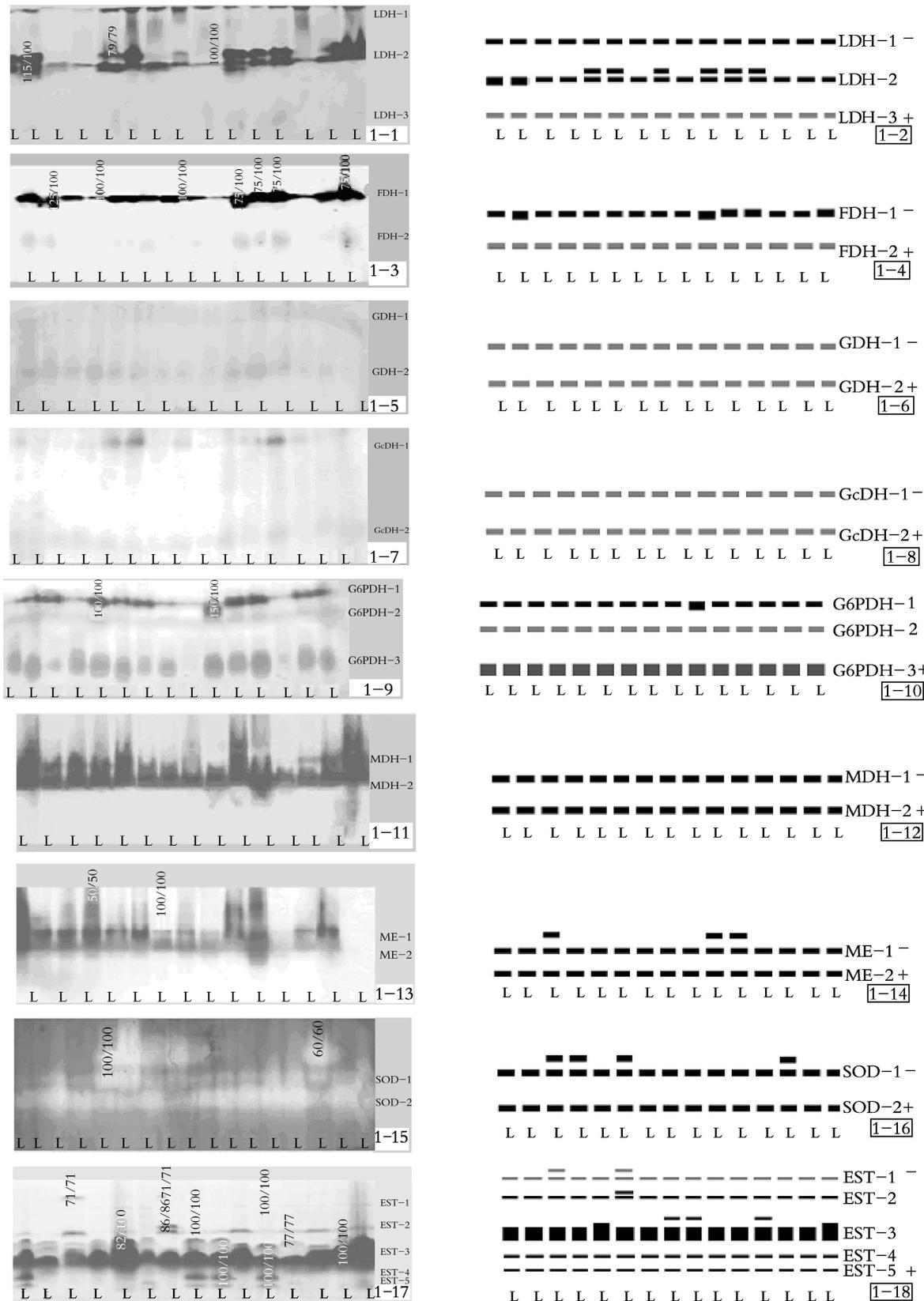


图1 野生大弹涂鱼群体同工酶电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretic patterns of isozymes of wild *Boleophtalmus pectinirostris* population

1~ 2. LDH; 3~ 4. FDH; 5~ 6. GDH; 7~ 8. GcDH; 9~ 10. G6PDH; 11~ 12. MDH; 13~ 14. ME; 15~ 16. SOD; 17~ 18. EST; L: 肝脏(liver)

3.2 大弹涂鱼有效遗传标记筛选

自 20 世纪 90 年代以来,浙江沿海大部分地区都在广泛开展大弹涂鱼的人工繁育、养殖工作,但由于自然海区大弹涂鱼滥捕现象日趋严重及海水污染等原因,大弹涂鱼自然资源大幅度减少,已趋衰退。海水养殖种类自然群体的种质资源是苗种生产和良种培育必不可少的物质基础,因此急需从遗传资源和育种方面对大弹涂鱼进行深入研究。本试验对 LDH, FDH, GDH, GCDH, G6PDH, MDH, ME, SOD, EST 等 9 种同工酶进行了分析,筛选出了 LDH-1, FDH-1, G6PDH-1, SOD-1, EST-1, EST-2, EST-3, ME-1 等 8 个多态基因座位。这些多态基因座位经深入研究后可作为大弹涂鱼野生群体的种群标记,用于大弹涂鱼遗传育种。

3.3 澥浦地区大弹涂鱼自然种群的遗传多样性

多态基因座位是种群遗传多样性的一个指标,脊椎动物多态位点比例一般在 15%~30%^[12];徐成等^[13]报道鲈鱼群体的多态座位比例为 25.8%,而大弹涂鱼多态座位比例为 34.78%,高于上述报道。评价一种群遗传多样性平均杂合度较多态位点比例更为真实,因为平均杂合度与测定样本的大小关系不太大,比多态座位比例能更直接、有效地度量群体遗传变异的情况。带鱼属鱼类不同种群的平均杂合度为 0.042~0.103^[13];海水鱼类的平均杂合度(0.029~0.088,平均 0.063)高于淡水鱼类(0.010~0.080,平均 0.043)^[14]。对比上述数据,澥浦大弹涂鱼群体的平均杂合度为 0.0594,低于海水鱼类平均杂合度的平均值,说明澥浦大弹涂鱼种群遗传多样性相对较低。

一般认为,物种的遗传变异的大小往往与物种的群体大小成一定的比例关系,与物种对环境的适应能力密切相关^[15]。作者曾对宁海三门湾大弹涂鱼群体进行遗传多样性 RAPD 分析,研究发现其遗传多样性水平比较低(另文发表),与本试验得出的结论一致。这可能是由于过度捕捞和环境污染使自然海区大弹涂鱼数量急剧减少,有效亲本群体变小,定向选择增强,从而可能产生不同程度的“瓶颈”、漂变和近交效应,导致种质资源的遗传组成趋向同质化,资源衰退。另外,近年来澥浦地区将人工养殖繁育的大弹涂鱼苗直接放养在自然滩涂地带,这些鱼苗成熟后极有可能与野生大弹涂鱼“杂交”造成自然海区大弹涂鱼种群的遗传稀释或遗传渐渗,降低其遗传多样性水平。根据试验分析结果,澥浦大弹涂鱼

的平均杂合度虽然低于海水鱼类的平均值,但明显高于其下限,且多态座位比例相对较高,这说明该大弹涂鱼种群仍具有遗传变异潜力。为避免大弹涂鱼遗传多样性的进一步丧失,应在现有的基础上加强对野生大弹涂鱼资源的保护,同时避免人工繁育的大弹涂鱼对野生种群的污染,以期恢复自然群体的种质资源。

参考文献:

- [1] 洪万树,张其永,黄富铁.大弹涂鱼受精卵孵化技术[J].厦门大学学报(自然科学版),2000,39(2):241-245.
- [2] 张其永,洪万树.大弹涂鱼人工繁殖和仔稚鱼培育研究[J].厦门大学学报(自然科学版),1987,26(3):366-371.
- [3] 林叔森,方家仲.大弹涂鱼养殖技术研究[J].浙江水产学院学报,1995,14(2):96-104.
- [4] 李长玲,曹伏君,刘楚吾,等.大弹涂鱼血细胞发生的研究[J].中国水产科学,2001,8(1):10-14.
- [5] 谢湘筠,张其永.大弹涂鱼雌性性腺发育研究[J].台湾海峡,1990,9(3):221-217.
- [6] 金春华,钟爱华,张海琪,等.大弹涂鱼不同组织器官的同工酶研究[J].海洋科学,2004,28(3):35-40.
- [7] 周宗汉,林金榜,朱婉华.鱼类组织中蛋白质及同工酶的电泳方法[J].淡水渔业,1983,2:35-40.
- [8] 相建海.海洋动物细胞和种群生化遗传学[M].济南:山东科学技术出版社,1999.70-80.
- [9] 李思发,吴力钊,王强,等.长江,珠江,黑龙江鲢、鳙、草鱼种质资源研究[M].上海:上海科学技术出版社,1990.51-101.
- [10] 尤锋,王可玲,相建海,等.山东近海褐牙鲈自然与养殖群体生化遗传结构及其遗传变异的比较分析[J].海洋与湖沼,2001,32(5):512-518.
- [11] 朱蓝菲,陈湘,王祖熊.20种鲤科鱼类同工酶的表型分析及有关进化问题的探讨[J].水产学报,1983,7(2):145-152.
- [12] Kirpichnikov V S. Genetic Bases of Fish Selection[M]. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 1981. 143-200.
- [13] 徐成,王可玲,尤峰,等.鲈鱼群体生化遗传学研究同工酶的生化遗传分析[J].海洋与湖沼,2001,32(1):42-49.
- [14] Gyllensten U. The genetic structure of fish: differences in the intraspecific distribution of biochemical genetic variation between marine, anadromous and freshwater species[J]. Fish Biol, 1985, 26(6): 691-699.
- [15] 马波,石连玉,董崇智.乌苏里白鲑的生化遗传结构[J].中国水产科学,2003,10(3):195-200.

(下转第 68 页)

Biochemical genetic analysis of isozymes in *Boleophthalmus pectinirostris* population in Xiepu

ZHANG Chun-dan¹, LI Ming-yun¹, HUANG Fu-yong¹, WANG Mei-zhen¹, ZHANG Hai-qi²

(1. Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 2. Zhejiang Fisheries Introduction and Inbreeding Center, Hangzhou 310012, China)

Received: Dec. 13, 2005

Key words: *Boleophthalmus pectinirostris*; natural population; isozymes; genetic diversity

Abstract: In April 2004, 30 *Boleophthalmus pectinirostris* samples were collected from the lagoon in Xiepu Village, Zhenhai Town, Ningbo City, Zhejiang Province. Polyarylamide gel electrophoresis was used to detect the expression of isozymes in liver tissue. LDH, FDH, GDH, GCDH, G6PDH, MDH, ME, SOD, CAT and EST were analyzed and the biochemical genetic results showed that, among the 10 isozymes in this paper, 9 of which obtained clear enzyme patterns except for CAT. And 9 enzymes were coded by 23 genetic loci, 8 of which (LDH-1, FDH-1, G6PDH-1, SOD-1, EST-1, EST-2, EST-3, ME-1) were found in polymorphic. The population of *B. pectinirostris* in Xiepu showed the lower genetic diversity compared with other seawater fishes, with 34.78% of the proportion of polymorphic loci and 0.0594 of the average heterozygosity per locus.

(本文编辑: 张培新)