

# 山东近海褐牙鲂自然与养殖群体生化遗传结构及其遗传变异的比较分析\*

尤 锋 王可玲 相建海<sup>1)</sup> 徐 成

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

**提要** 山东近海褐牙鲂自然群体活样本共 79 尾, 分别于 1996 年 5 月、1997 年 1 月和 1998 年 4 月采自青岛近海; 养殖群体活样本 52 尾于 1997 年 12 月采自山东荣成寻山养鱼场。采用水平淀粉胶和垂直聚丙烯酰胺凝胶电泳方法及 3 种缓冲系统(TC、EBI 和 TG) 分别对自然和养殖群体的 15 种同工酶进行生化遗传分析。结果表明, 山东近海牙鲂自然群体的多态基因座位比例(31.0%)和群体平均杂合度(0.0802)都明显高于养殖群体(24.1%, 0.0788); 在自然群体的 9 个多态基因座位、养殖群体的 7 个多态基因座位中, 除了 *Cat* ( $P < 0.05$ ) 和 *Idhp-1* ( $P < 0.05$ , 养殖群体中) 有显著差异, *Ldh-C* ( $P < 0.01$ ) 完全偏离 Hardy-Weinberg 定律外, 其余多态座位基因频率均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律。

**关键词** 褐牙鲂, 同工酶, 生化遗传结构, 自然与养殖群体, 遗传变异

**中图分类号** Q178.53

褐牙鲂主要分布于北太平洋, 在中国沿海均有分布, 以渤海、黄海居多, 其中又以山东近海为主要捕捞地。由于褐牙鲂经济价值高, 近十年来逐渐成为我国北方海域重要的增养殖鱼类品种, 其养殖规模不断扩大, 如何保持其养殖群体的遗传品质已引起人们的日益关注。另一方面, 对褐牙鲂自然群体的过度捕捞, 以及由于疏于管理、养殖个体逃逸到海中的现象也屡见不鲜, 这些都将对褐牙鲂自然群体的生化遗传结构进而其遗传本底、种质资源和遗传多样性产生很大的影响。已有许多有关其他鱼种的研究(Hindar *et al.*, 1991; Taniguchi, 1980; Sugama *et al.*, 1988; Shaklee *et al.*, 1985), 但褐牙鲂的相关群体生化遗传结构尚未见报道。本文通过用淀粉胶和聚丙烯酰胺凝胶电泳方法在对山东近海褐牙鲂同工酶生化遗传研究(尤锋等, 1999)的基础上, 对其自然和养殖群体进行生化遗传结构比较分析, 以为褐牙鲂种质资源的保护和有效利用、海水鱼类养殖业管理和发展规范的制定提供理论依据。

## 1 材料与方 法

山东近海褐牙鲂(*Paralichthys olivaceus*) 自然群体样本于 1996 年 5 月、1997 年 1 月和 1998 年 4 月分别取自青岛近海, 共 79 尾; 养殖群体样本则是 1997 年 12 月采自山东荣成

\* 国家重点基础研究项目 G1999012000 课题资助; 国家科委攀登计划 B 资助项目, PDB6-5-2 号。尤锋, 女, 出生于 1963 年 4 月, 硕士, 副研究员, Fax: 0086-0532-2870882

1) 通讯作者

收稿日期: 2000-06-15, 收修改稿日期: 2001-03-28

寻山养鱼场共 52 尾, 为当年一批苗种, 其亲本全部捕自山东近海。两群体样本均为活样本。每尾鱼解剖取其眼睛、肌肉、肝脏和心脏 4 种组织编号后直接进行分析或立即置于液氮中(-196℃)保存至分析。样品制备、电泳、组化染色以及实验结果处理的方法等参见王可玲等(1994)和徐成等(2001a, b)的报道。经过对 25 种同工酶在 4 种缓冲系统中的筛选, 选出 3 种缓冲系统中的 15 种同工酶用于褐牙鲈群体生化遗传结构分析(尤锋等, 1999)。这 15 种同工酶的名称、编号、亚基数、所用组织、缓冲系统及有效样本数等分别列于表 1, 表中各项缩写含义见尤锋等(1999)。

群体遗传变异的统计分析采用的多态座位比例( $P$ )、多态座位杂合度的观察值( $H_o$ )与预期值( $H_e$ )、Hardy-Weinberg 遗传偏离指数( $d$ )以及群体平均杂合度( $H$ )分别以下列公式统计计算, 每个多态基因座位的等位基因频率与 Hardy-Weinberg 平衡拟合度用  $\chi^2$  一致性检验, 多态座位以其主要的等位基因频率低于 0.9900 为标准:

$$P = \text{多态座位个数} / \text{总的测试基因座位数} \times 100\%;$$

$H_o = \text{观察到的杂合个体数} / \text{观察到的个体总数}$ ,  $H_e = 1 - \sum i^2$ ,  $i$  为该座位第  $i$  等位基因频率,  $d = (H_o - H_e) / H_e$ ;

$$H = \sum (1 - \sum X_i^2) / n, X_i \text{ 为第 } X \text{ 座位、第 } i \text{ 个等位基因的频率, } n \text{ 为所测座位总数。}$$

表 1 褐牙鲈生化遗传结构分析的同工酶、电泳条件及其有效样本数

Tab. 1 Isozymes, electrophoretic systems and sample sizes used for biochemical genetic structure analysis on *Paralichthys olivaceus*

酶的名称	缩写	编号	亚基数	电泳支持物	缓冲系数	组织 <sup>1)</sup>	有效样本数	
							自然群体	养殖群体
乳酸脱氢酶	LDH	1. 1. 1. 27	4	SG	TC	e, m, h, l	77	52
苹果酸脱氢酶	MDH	1. 1. 1. 37	2	SG	TC	e, m, h, l	76	52
苹果酸酶	MEP	1. 1. 1. 40	4	SG	TC	e, m, h, l	54	52
异柠檬酸脱氢酶	IDHP	1. 1. 1. 42	2	SG	TC	e, m, h, l	73	52
甘油-3-磷酸脱氢酶	G3PDH	1. 1. 1. 8	2	SG	TC	e, m, h, l	72	51
腺苷激酶	AK	2. 7. 4. 3	1	SG	TC	e, m, h, l	47	52
肌酸激酶	CK	2. 7. 3. 2	2	SG	TC	e, m, h, l	48	52
酸性磷酸酶	ACP	3. 1. 3. 2	1, 2	SG	TC	e, m, h, l	53	52
磷酸葡萄糖变位酶	PGM	5. 4. 2. 2	1	SG	TC	e, m, h, l	75	52
山梨醇脱氢酶	SDH	1. 1. 1. 14	2	SG	EBT	1	47	52
醇脱氢酶	ADH	1. 1. 1. 1	2	SG	EBT	1	61	49
过氧化氢酶	CAT	1. 11. 1. 6	2	SG	EBT	1	54	52
超氧化物歧化酶	SOD	1. 15. 1. 1	2	PAG	TG	1	50	48
葡萄糖脱氢酶	GDH	1. 1. 1. 47	2	SG	EBT	1	71	46
葡萄糖磷酸异构酶	GPI	5. 3. 1. 9	2	SG	EBT	1	61	52

1) e: 眼睛(eye); m: 肌肉(muscle); h: 心脏(heart); l: 肝脏(liver)

## 2 结果

### 2.1 褐牙鲈自然与养殖群体所测基因座位和等位基因频率统计(表 2)

表 2 褐牙鲈自然与养殖群体的等位基因频率

Tab.2 The allelic frequencies of natural and cultured stocks on *Paralichthys olivaceus*

基因座位	等位基因	等位基因频率		基因座位	等位基因	等位基因频率	
		自然群体	养殖群体			自然群体	养殖群体
<i>Ldh - A</i>	100	0.9740	0.8558	<i>Acp - 2</i>	100	1.0000	1.0000
	167	0.0260	0.1442		<i>Pgm</i>	100	0.9800
<i>Ldh - B</i>	100	1.0000	1.0000	<i>Sdh</i>		200	0.0200
	<i>Ldh - C</i>	98	0.3492		0.4038	100	0.9787
<i>m - Mdh - 1</i>		100	1.0000	1.0000	<i>Adh</i>	125	0.0213
	100	0.6508	0.5962	70		0.0160	0.0000
<i>m - Mdh - 2</i>	100	1.0000	1.0000	100	0.9750	0.9900	
<i>s - Mdh - 1</i>	100	1.0000	1.0000	<i>Cat</i>	150	0.0100	0.0100
<i>s - Mdh - 2</i>	100	1.0000	1.0000		93	0.3333	0.0289
<i>Mcp - 1</i>	100	1.0000	1.0000	100	0.4537	0.2596	
<i>Mcp - 2</i>	100	1.0000	1.0000	140	0.2130	0.7115	
<i>ldhp - 1</i>	78	0.4922	0.4808	<i>Sod - 1</i>	100	1.0000	1.0000
	100	0.5078	0.5192		<i>Sod - 2</i>	100	1.0000
<i>ldhp - 2</i>	100	1.0000	1.0000	<i>Sod - 3</i>	100	1.0000	1.0000
	<i>G3pdh</i>	100	1.0000		1.0000	<i>Gdh</i>	100
<i>Ak - 1</i>		100	1.0000	1.0000	130		0.5141
	<i>Ak - 2</i>	100	1.0000	1.0000	<i>Gpi - 1</i>	100	1.0000
<i>Ck</i>		100	1.0000	1.0000		<i>Gpi - 2</i>	100
	<i>Acp - 1</i>	78	0.0283	0.0000	<i>Gpi - 3</i>	100	1.0000
100		0.9717	1.0000	<i>Gpi - 4</i>	100	1.0000	1.0000

2.2 多态基因座位比例

由表 2 可知, 所分析的 15 种同工酶共记录出 29 个基因座位。自然群体中, *Ldh - A*、*Ldh - C*、*ldhp - 1*、*Acp - 1*、*Pgm*、*Sdh*、*Adh*、*Cat*、*Gdh* 共 9 个基因座位为多态, 其多态座位比例:  $9/29 = 31.0\%$ ; 而养殖群体中的 *Ldh - A*、*Ldh - C*、*ldhp - 1*、*Sdh*、*Adh*、*Cat*、*Gdh* 共 7 个基因座位为多态, 其多态座位比例:  $7/29 = 24.1\%$ 。

2.3 自然群体和养殖群体多态座位杂合度的观察值、预期值和遗传偏离指数(表 3)。

表 3 褐牙鲈自然和养殖群体多态基因座位杂合度的观察值、预期值和遗传偏离指数

Tab.3  $H_o$ ,  $H_e$ , and  $d$  values at polymorphic loci of natural and cultured stocks on *Paralichthys olivaceus*

	群体	<i>Ldh - A</i>	<i>Ldh - C</i>	<i>ldhp - 1</i>	<i>Acp - 1</i>	<i>Pgm</i>	<i>Sdh</i>	<i>Adh</i>	<i>Cat</i>	<i>Gdh</i>
$H_o$	自然	0.0519	0.0000	0.4531	0.0566	0.0400	0.0426	0.0492	0.5000	0.4085
	养殖	0.2885	0.0000	0.3461			0.2692	0.0204	0.2500	0.2391
$H_e$	自然	0.0506	0.4546	0.4998	0.0550	0.0392	0.0416	0.0482	0.6377	0.4996
	养殖	0.2468	0.4814	0.4992			0.3106	0.0198	0.2053	0.2962
$d$	自然	0.0252	- 1.0000	- 0.0935	0.0291	0.0204	0.0229	0.0201	- 0.2160	- 0.1823
	养殖	0.1690	- 1.0000	- 0.3067			- 0.1334	0.0303	- 0.4126	- 0.1968

## 2.4 群体平均杂合度

由表 2 可知, 褐牙鲈自然、养殖群体的平均杂合度分别为:  $H_{\text{自然}} = 0.0802$ ;  $H_{\text{养殖}} = 0.0788$ 。

## 2.5 各多态基因座位等位基因频率的 Hardy-Weinberg 平衡的 $X^2$ 检验结果(表 4)。

表 4 褐牙鲈自然和养殖群体多态基因座位的  $X^2$  检验结果

Tab. 4 Contingency  $X^2$  analysis with significance level ( $P$ ) at polymorphic loci on *Paralichthys olivaceus*

基因 座位	基因型	观察值		预期值		$X^2$ 值		自由度		$P$	
		自然	养殖	自然	养殖	自然	养殖	自然	养殖	自然	养殖
<i>Ldh</i> - A	100/100	73	37	75.08	38.08						
	100/167	4	15	3.90	12.83	0.053	1.488	1	1	0.90-	0.50- 0.10
	167/167	0	0	0.05	1.09						
<i>Ldh</i> - C	98/98	22	21	7.68	8.48						
	98/100	0	0	28.64	25.04	63.027	52.007	1	1	< 0.01	< 0.01
	100/100	41	31	26.68	18.48						
<i>Idhp</i> - 1	78/78	17	16	15.50	12.02						
	78/100	29	18	32.00	25.96	0.563	4.888	1	1	0.50-	0.10 < 0.05
	100/100	18	18	16.50	14.02						
<i>Acp</i> - 1	78/78	0		0.04							
	78/100	3		2.92		0.042		1		0.90-	0.50
	100/100	50		50.04							
<i>Pgm</i>	100/100	72		72.03							
	100/200	3		2.94		0.031		1		0.90-	0.50
	200/200	0		0.03							
<i>Sdh</i>	100/100	45	35	45.02	33.92						
	100/125	2	14	1.96	16.16	0.021	0.931	1	1	0.90-	0.50 0.50- 0.10
	125/125	0	3	0.02	1.92						
<i>Ach</i>	70/70	0	0	0.02	0						
	70/100	2	0	1.95	0						
	100/100	58	48	58.04	48.02	0.021	0.002	2	1	0.90-	0.50 0.98- 0.95
	100/150	1	1	0.98	0.97						
	150/150	0	0	0.01	0.01						
<i>Cat</i>	70/150	0	0	0.01	0						
	93/93	11	0	6.00	0.04						
	93/100	14	3	16.33	0.78						
	100/100	11	7	11.12	3.50						
	100/140	13	10	10.44	19.21	7.721	8.818	2	2	< 0.05	< 0.02
<i>Gdh</i>	140/140	5	32	2.45	26.33						
	93/140	0	0	7.66	2.14						
	100/100	20	3	16.76	1.57						
	100/130	29	11	35.47	13.86	2.362	0.980	1	1	0.50-	0.10 0.50- 0.10
	130/130	22	32	18.77	30.57						

### 3 讨论

#### 3.1 山东近海褐牙鲈自然与养殖群体遗传结构及其遗传变异的比较

多态座位比例和群体平均杂合度是反映群体生化遗传变异及其多样性的重要参数。脊椎动物多态基因座位比例一般为 15%—30% (Kirpichnikov, 1981), 平均杂合度为 0.03—0.08。鱼类的多态座位比例会因种或同种的不同种群而异, 据报道最高的可达 50%, 最低只有 9%。山东近海褐牙鲈自然群体的多态比例为 31.0%, 而养殖群体的则为 24.1%, 后者明显低于前者; 其自然群体的平均杂合度为 0.0802, 养殖群体为 0.0788, 也是养殖群体的较低。在自然群体中, *Pgm* 与 *Acp-1* 都是多态座位, 在养殖群体中这两个座位却是单态, 因为这两个座位的多态等位基因频率在自然界中本来就低, 养殖群体的亲本数量又少, 使得该稀有等位基因缺失。所以, 人工养殖群体的遗传变异程度, 相对于自然群体来说, 其遗传组成会发生变化 (Waples, 1991)。Sugama 等 (1988) 也发现人工繁殖的真鲷的等位基因数减少了 12.2%, 多态座位数减少了 40%, 多态性减少了 18%; 又如 Vuorive (1984) 比较过一种鳟鱼 *Salmo trutta* 的人工繁殖和天然种群的遗传变异, 结果发现其多态座位由原来的 7 个减少到 5 个, 平均杂合度由 0.062 降至 0.042。

由于国际市场的大量需求, 80 年代末至 90 年代初期, 山东近海褐牙鲈遭到大肆捕捞, 使得近几年自然群体数量骤减, 即使是在繁殖季节 (4、5 月份) 数量也很少 [由 50 年代初期的年产 2000t 锐减至现今的不足 100t (估计值)], 所产卵的质量越来越差, 受精率、孵化率也变得很低, 与 80 年代末以前的情形截然不同, 究其原因, 可能是自然群体数量大量减少, 导致瓶颈或建立者效应, 进而引发遗传漂变和近交衰退。而养殖鱼苗或鱼种不断逃逸到自然水体中也会影响到自然界鱼类的遗传多样性, Clifford 等 (1998) 就曾报道过由于人工孵化的大西洋鲑苗种逃逸到自然界使得自然群体平均杂合度明显下降。因此, 褐牙鲈自然群体种质资源的保护已迫在眉睫。

#### 3.2 Hardy-Weinberg 平衡

在对所测的 9 个 (养殖群体 7 个) 多态基因座位进行的  $X^2$  检测中, *Cat* 和养殖群体的 *ldhp-1* 观察的基因型频率不与 Hardy-Weinberg 定律相符, 其实测值与预期值有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 这可能与近交或自交、Wahlund 效应及自然选择等原因有关<sup>1)</sup>; *Ldh-C* 由于属于 allozyme, 其变异和出现频率已达到多态座位的标准, 但它们之间尚未形成杂合子, 因而其  $X^2$  检测有显著差异不能符合 Hardy-Weinberg 定律 ( $P < 0.01$ )。

从另一个反映群体遗传变异的参数——Hardy-Weinberg 遗传偏离指数  $d$  来看, *Ldh-C*、*ldhp-1*、*Cat*、*Gdh* 在两个群体中均为负数, 可视为杂合子缺失; 而 *Sdh* 则只在养殖群体为负数, 亦属杂合子缺失。由此可见, 山东近海褐牙鲈自然群体的遗传多样性现状的确不容乐观。

### 参 考 文 献

王可玲, 张培军, 刘兰英等, 1994. 中国近海带鱼种群生化遗传结构研究. 海洋学报, 15(2): 77—83

1) 吴霞琦, 1997. 中国近海真鲷、黑鲷生化遗传结构及其群体中蛋白质多态保持机制的研究. 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 33—47

- 尤 锋, 王可玲, 相建海等, 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
- 吴力钊, 王祖熊, 1988. 草鱼同工酶基因座位多态性的初步研究. 水生生物学报, 12(2): 116—124
- 徐 成, 王可玲, 尤 锋等, 2001a. 鲈鱼群体生化遗传学研究 I. 同工酶的生化遗传分析. 海洋与湖沼, 32(1): 42—49
- 徐 成, 王可玲, 张培军, 2001b. 鲈鱼群体生化遗传学研究 II. 种群生化遗传结构及变异. 海洋与湖沼, 32(3): 248—254
- Clifford S L, McGinnity P, Ferguson A, 1998. Genetic changes in an Atlantic salmon population resulting from escaped juvenile farmed salmon. J Fish Biology, 52: 118—127
- Hindar K, Ryman N, Utter F, 1991. Genetic effects of cultured fish on natural fish populations. Can J Fish Aquat Sci, 48: 945—957
- Kirpichnikov V S, 1981. Genetic Bases of Fish Selection. Berlin: Springer-Verlag, 143—200
- Shaklee J B, Salini J P, 1985. Genetic variation and population subdivision in Australian Barramundi: *Lates calcarifer* (Bloch). Aus J Mar Fresh Res, 36: 203—218
- Sugama K, Taniguchi N, Umeda S, 1988. An experimental study on genetic drift in hatchery population of red sea bream. Nippon Suisa Gakkaishi, 54(5): 739—744
- Taniguchi N, Okada Y, 1980. Genetic study on the biochemical polymorphism in red sea bream. Bull Jap Soc Sci Fish, 46: 437—443
- Vuorinen J, 1984. Reduction of genetic variability in a hatchery stock of brown trout. J Fish Biol, 24(3): 339—348
- Waples R, S 1991. Genetic interactions between hatchery and wild Salmonids: lessons from the Pacific Northwest. Can J Fish Aquat Sci, 48(Suppl. 1): 124—133

## COMPARATIVE ANALYSIS OF BIOCHEMICAL GENETIC STRUCTURE AND VARIANCE BETWEEN NATURAL AND CULTURED STOCKS ON THE LEFT-EYED FLOUNDER, *PARALICHTHYS OLIVACEUS* (T. & S.) OFF SHANDONG COASTAL WATERS

YOU Feng, WANG Ke-Ling, XIANG Jian-Hai, XU Cheng  
(Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

**Abstract** Expressions of 15 isozymes (LDH, MDH, MEP, IDHP, G3PDH, AK, CK, ACP, PGM, SDH, ADH, CAT, SOD, GDH and GPI) on the left-eyed flounder, *Paralichthys olivaceus*, including natural and cultured stocks off Shandong coastal waters of China, were tested by horizontal starch gel and vertical polyacrylamide gel electrophoresis in 3 buffer systems (TC, pH= 6.9; EBF, pH= 8.9; TG, pH= 8.3). The natural sample size is 79 live left-eyed flounders, collected from the coastal waters of Qingdao from May in 1996 to April in 1998. The cultured samples (52 live left-eyed flounders) were collected from a fish farm in Rongcheng of Shandong Province in December, 1997, the parental generation of which was also captured in the coastal waters of Shandong. Four tissues and organs i. e. eye, muscle, heart and liver were fetched from each of the samples after regular morphological measurement and tested at once or stored in liquid nitrogen (-196 °C) for test. The biochemical genetic structures of both stocks have been studied and compared. Altogether 29 loci in each stock were recorded, among which 9 gene loci (*Ldh-A*, *Ldh-C*, *Idhp-1*, *Acp-1*, *Pgm*, *Sdh*, *Adh*, *Cat* and *Gdh*) belong to the polymorphic loci in the natural stock and its mean proportion of polymorphic loci (*P*) was 31.0%. In the cultured stock, 7 gene loci (*Ldh-A*, *Ldh-C*, *Idhp-1*, *Sdh*, *Adh*, *Cat* and *Gdh*) belong to the polymorphic loci and its *P* value was 24.1%. The allelic frequencies of both stock were also gained, with the average heterozygosities (*H*) of stock being 0.0802 in natural stock

and 0.0788 in cultured stock. The values of  $P$  and  $H$  in the cultured stock were all lower than those in the natural stock; hence the way to keep the quality of the cultured filial generation and then to increase fish production are very important for fish farming. The chi-square test shows that polymorphic loci but  $Cat$  ( $P < 0.05$ ),  $Idhp-1$  ( $P < 0.05$ ), only in the cultured population) and  $Ldh-C$  ( $P < 0.01$ ) in both the natural and cultured stock were in Hardy-Weinberg equilibrium. In the mean time, the values of observed heterozygosity ( $H_o$ ), Hardy-Weinberg expected heterozygosity ( $H_e$ ) and genetic deviate index ( $d$ ) also expressed the difference in genetic variance of these two stocks.

**Key words** *Paralichthys divaceus*, Isozyme, Biochemical genetic structure, Natural and cultured stocks, Genetic variance

欢迎订阅 欢迎投稿

## 《应用与环境生物学报》(双月刊)

刊号 ISSN 1006-687X  
CN 51-1482/Q

国内邮发代号: 62-15

本刊是中国科学院主管、中国科学院成都生物研究所主办、科学出版社出版、国内外公开发行的全国性学术科技期刊(学报级),是我国应用生物学和环境生物学的核心刊物。主要报道我国应用生物学、环境生物学及相关科学领域的基础研究、应用基础研究和应用研究的成果,包括研究论文、研究简报和本刊邀约的综述或述评。读者对象主要为本学科的科研人员、大专院校师生和科研管理干部。本刊获中国科学院科学出版基金资助。

《应用与环境生物学报》为双月刊(1999年由季刊改为双月刊)。双月25日出版,每期96页,2001年起改为大16开,高档铜板纸印刷。定价仍为每期11.00元,年定价66.00元。全国各地邮局(所)均可订阅。新订户可向本刊编辑部补购1995、1996、1997、1998、1999、2000年各卷(卷价分别为32.00元、44.00元、44.00元、44.00元、66.00元、66.00元和66.00元),以及1999年增刊(环境微生物学研究)(订价为每册22.00元)。编辑部地址:成都市人民南路4段9号,中国科学院成都生物研究所学报编辑部。邮编:610041,电话:(028)5229903,5237341(联系人:刘东渝)。