

漠斑牙鲆引进种群同工酶的遗传多态性分析

李鹏飞^{1,2}, 刘 萍¹, 柳学周¹, 高天翔², 王清印¹

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国海洋大学 生命科学与技术学部, 山东 青岛 266003)

摘要:采用聚丙烯酰胺不连续凝胶垂直板电泳技术对引进种漠斑牙鲆(*Paralichthys lethostigma*)子一代的同工酶进行检测。分析了48个样本的15种同工酶在漠斑牙鲆肌肉和肝脏两种组织或器官中的表达情况,以期为其种质资源的保护和开发以及遗传育种方面的研究提供基础资料。15种同工酶共记录了33个基因座位,其中Me-1、Adh-1、Sdh-1、Sdh-2、Gdh-1、G6pd-1、Pgm-1、Idh-1、Cat-1、Pcd-1和Pgi-1共11个座位呈多态,多态座位百分数是33.3%。平均每个座位的等位基因有效数值 A_e 为1.2196,预期杂合度 H_e 为0.1219,实际杂合度 H_o 为0.1547。同时还分析了漠斑牙鲆各个多态座位的Hardy-Weinberg遗传偏离指数 d 。这些数据说明,漠斑牙鲆群体拥有较高的遗传变异水平,还处于种质资源维持较好的状态,有利于对其资源进行开发以及对其遗传育种工作的展开。[中国水产科学,2006,13(1):13-19]

关键词:漠斑牙鲆;同工酶;多态性

中图分类号:Q959.486 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2006)01-0013-07

牙鲆属(*Paralichthys*)鱼类俗称比目鱼、牙片、偏口等,隶属于鲽形目(Pleuronectiformes)、鲽亚目(Pleuronectoidei)、鲆科(Bothidae)。牙鲆属鱼类多分布在南北美洲东西两岸,近20种。亚洲沿岸仅有牙鲆1种,主要分布于中国渤海、黄海、东海和南海。近年来过度捕捞已使牙鲆的野生资源严重衰减,但同时牙鲆工厂化养殖已经在中国大面积展开,养殖技术日臻成熟。其增殖养殖业的迅猛发展对牙鲆自然群体的遗传本质、种质资源和遗传多样性产生了不可低估的影响。为改变品种单一的局面,引进新品种进行种质改良已势在必行。

漠斑牙鲆(*Paralichthys lethostigma*)俗称南方鲆(southern flounder),是牙鲆属的主要经济鱼类,在西大西洋均有分布,属亚热带种类,但主要分布在北卡罗来纳至得克萨斯。2001年中国水产科学研究院黄海水产研究所首次从美国引进漠斑牙鲆。作为新的养殖对象,尽快对漠斑牙鲆的遗传结构进行基础性研究显得极为重要。本实验应用同工酶电泳技术研究漠斑牙鲆同工酶的遗传规律,以期了解漠斑牙鲆的生化遗传特征和遗传结构,为本物种的种质资源保护和开发、合理利用和遗传育种研究提供基础理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品

漠斑牙鲆于2004年9月22日取自黄海水产研究所2001年引种的51尾亲鱼生产的子一代,共48尾。平均体长12.2 cm,平均体重35.04 g。活体解剖分别取肌肉和肝脏组织适量,编号,迅速放入-70℃保存。

1.2 电泳方法

1.2.1 电泳材料 肌肉及肝脏样品适量,分别加入约3倍体积(mL/g)的0.05%巯基乙醇组织提取缓冲液,在冰浴条件下匀浆,4℃离心机中12000 r/min离心15 min,取上清液,按需要量分装于小管中置于-70℃备用。

1.2.2 方法 同工酶电泳采用不连续聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳。电泳在4℃冰箱中进行。对凝胶浓度、电压、电极缓冲液、点样量的多少和染色条件进行摸索和优化,最终确立电泳参数。

凝胶浓度(T):T_{浓缩胶}=3.6%(pH 6.7),

T_{分离胶}=8.2%(pH 8.9);

电压:Tris-甘氨酸(TG, pH 8.3)系统,恒压280 V,电泳时间4~5 h。点样量视不同种酶类而

收稿日期:2005-05-08; 修订日期:2005-06-27。

基金项目:科技部基础研究专项(2002E3110053);农业部“948”引进项目(2001-479-4)。

作者简介:李鹏飞(1978-),女,硕士,主要从事海水养殖生物种质资源与遗传多样性研究。

通讯作者:刘 萍,主要从事种质资源与遗传育种研究。E-mail:liuping@ysfri.ac.cn

异。染色方法参照王中仁^[1]和胡能书^[2]的方法。

从所做的同工酶中选出 15 种用于常规的分析。同工酶的名称及电泳情况见表 1。

1.2.3 结果纪录 同工酶的缩写、基因座位和等位基因的命名基本参照 Shaklee^[3]和 Whitmore^[4]方

法。以同工酶缩写名称的大写代表酶蛋白,小写代表编码基因。控制同一种酶的不同基因座位按照从阳极到阴极的顺序依次标记为 1、2、3...,同一基因座位的不同等位基因按照从阳极到阴极的顺序依次标记位 a、b、c...

表 1 漠斑牙鲆 15 种同工酶及其电泳情况

Tab.1 Names and electrophoretic methods of 15 analyzed isozymes in *Paralichthys lethostigma*

同工酶 Isozyme	酶国际代码 E.C.No.	组织 Tissue	缓冲系统 Buffer system
苹果酸脱氢酶 MDH	E.C.1.1.1.37	肌肉 Muscle	TG
乳酸脱氢酶 LDH	E.C.1.1.1.27	肌肉 Muscle	TG
苹果酸酶 ME	E.C.1.1.1.40	肌肉 Muscle	TG
超氧化物歧化酶 SOD	E.C.1.15.1.1	肌肉 Muscle	TG
酯酶 EST	E.C.3.1.1.1	肌肉 Muscle	TG
淀粉酶 AMY	E.C.3.2.1.1	肌肉 Muscle	TG
谷氨酸脱氢酶 GDH	E.C.1.4.1.2	肝脏 Liver	TG
山梨醇脱氢酶 SDH	E.C.1.1.1.14	肝脏 Liver	TG
异柠檬酸脱氢酶 IDH	E.C.1.1.1.42	肝脏 Liver	TG
6-磷酸葡萄糖异构酶 GPI	E.C.5.3.1.9	肝脏 Liver	TG
磷酸葡萄糖变位酶 PGM	E.C.2.7.5.1	肝脏 Liver	TG
乙醇脱氢酶 ADH	E.C.1.1.1.1	肝脏 Liver	TG
过氧化物酶 POD	E.C.1.11.1.7	肝脏 Liver	TG
过氧化氢酶 CAT	E.C.1.11.1.6	肝脏 Liver	TG
6-磷酸葡萄糖脱氢酶 G6PD	E.C.1.1.1.49	肝脏 Liver	TG

1.3 数据处理

采用王中仁^[1]和相建海等^[5]的数理统计方法。

(1)多态座位比例(mean proportion of polymorphic loci, P)

$$P = \text{多态座位数} / \text{所测座位总数} \times 100\%$$

多态座位以其主要的等位基因频率低于 0.99 为标准(Nei, 1972)^[6]

(2)平均每个座位的等位基因的有效数目(mean effective number of alleles per locus, A_e)

$$A_e = \sum (1 / \sum q_i^2) / n$$

式中, q_i 为第 i 个等位基因的频率, n 为所测座位的总数。

(3)平均每个座位的预期杂合度(mean expected heterozygosity per locus, H_e)和实际杂合度(mean observed heterozygosity per locus, H_o)

$$H_e = \sum (1 - \sum q_{ij}^2) / n$$

q_{ij} 为第 i 个座位上第 j 个等位基因的纯合基因型的频率

$$H_o = \sum (1 - \sum q_{ij}) / n$$

q_{ij} 为第 i 个座位上第 j 个等位基因纯合基因型的频率

(4)多态座位杂合度的实际值(H_o)和预期值(H_e)

$$H_o = \text{观察到的杂和个体数} / \text{观察的个体总数}$$

$$H_e = 1 - \sum q_i^2$$

q_i 为该座位第 i 个等位基因的频率

(5)Hardy-Weinberg 遗传偏离指数(d)

$$d = (H_o - H_e) / H_e$$

2 结果

2.1 同工酶的表达

对漠斑牙鲆同工酶的电泳图谱进行拍照纪录,选择 15 种同工酶进行了分析。图 1 是漠斑牙鲆的部分电泳图谱。

2.1.1 苹果酸脱氢酶(MDH) 为二聚体酶。在漠斑牙鲆只观察到 s-MDH,由 2 个基因座位 s-Mdh-1 和 s-Mdh-2 编码,迁移率相近。每个座位都观察到 1 种等位基因 a 和 1 种基因型 aa。

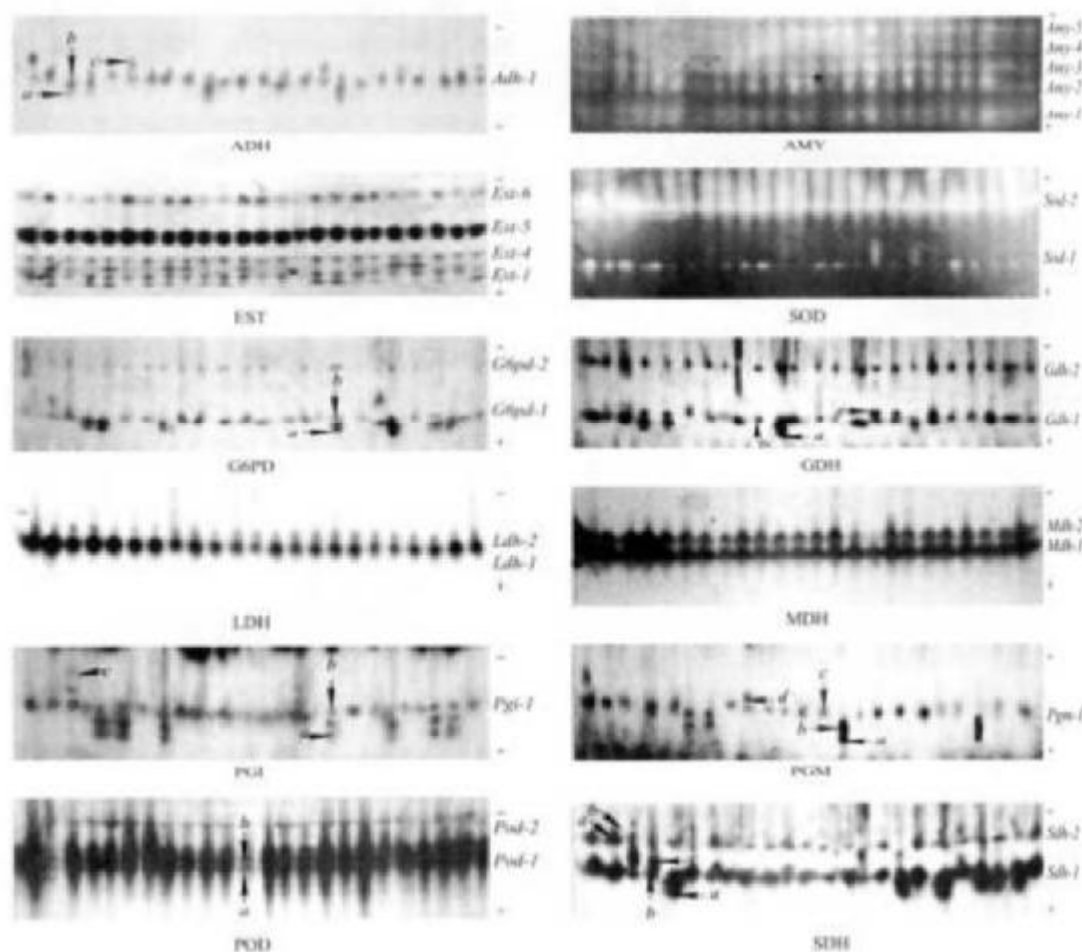


图1 漠斑牙鲆同工酶的电泳图谱

Fig.1 Isoelectric electropherograms of *Paralichthys lethostigma*

2.1.2 乳酸脱氢酶(LDH) 为四聚体酶,有A、B和C 3个基因座位编码。在漠斑牙鲆检测到2个基因座位,由基因座位 *Ldh-A* 和 *Ldh-B* 编码,都为单态。基因座位 *Ldh-A* 在肌肉中超显性。漠斑牙鲆的A、B两个基因座位的表达产物在电泳中表现为2条区带 A_4 和 B_4 。

2.1.3 苹果酸酶(ME) 为四聚体酶,有2个基因座位编码。座位 *Me-1* 由a、b和c 3个等位基因编码,观察到ac、bc、ab和bb 4种基因型。座位 *Me-2* 由a 1种等位基因编码,观察到aa 1种基因型。

2.1.4 超氧化物歧化酶(SOD) 为二聚体酶或四聚体酶。漠斑牙鲆的SOD有2个基因座位 *Sod-1* 和 *Sod-2* 编码,每个座位观察到1种等位基因a和1种基因型aa。座位 *Sod-2* 所产生的同工酶的活性

高于座位 *Sod-1* 所产生的同工酶的活性。

2.1.5 酯酶(EST) 为单体酶或二聚体酶。漠斑牙鲆的酯酶表现为单体酶,有6个基因座位编码,6个座位都分别观察到1种等位基因a和1种基因型aa。

2.1.6 淀粉酶(AMY) 为单体酶或二聚体酶。对鱼类的淀粉酶介绍很少,实验发现漠斑牙鲆的淀粉酶存在,有5个明显的区带(负带),所以有5个基因座位编码,每个座位都只观察到1种等位基因a和1种基因型aa。

2.1.7 谷氨酸脱氢酶(GDH) 为二聚体酶,有2个基因座位编码。座位 *Gdh-1* 由a、b和c 3种等位基因编码,观察到ab、bb和bc 3种基因型。座位 *Gdh-2* 由1种等位基因a编码,观察到1种基因型aa。

2.1.8 山梨醇脱氢酶(SDH) 为二聚体酶,有两个基因座位编码。座位 *Sdh-1* 由 a、b 和 c 3 个等位基因编码,观察到 ab、bb、bc 和 cc 4 种基因型。座位 *Sdh-2* 由 a 和 b 2 种等位基因编码,观察到 2 种基因型 aa 和 ab。

2.1.9 异柠檬酸脱氢酶(IDH) 为二聚体酶。漠斑牙鲆的 IDH 只在肝脏中表达,肌肉中未检出,有 2 个基因座位编码。座位 *Idh-1* 由 a 和 b 2 种等位基因编码,观察到 ab 和 bb 2 种基因型。座位 *Idh-2* 观察到 1 种等位基因 a 和 1 种基因型 aa。

2.1.10 6-磷酸葡萄糖异构酶(PGI) 为二聚体酶,有 1 个基因座位 *Pgi-1* 编码。该座位由 a、b 和 c 3 个等位基因编码,观察到 ab、bb 和 bc 3 种基因型。

2.1.11 磷酸葡萄糖变位酶(PGM) 为单体酶,有 1 个基因座位 *Pgm-1* 编码。该座位由 a、b、c 和 d 4 个等位基因编码,观察到 ab、bb 和 cd 3 种基因型。

2.1.12 乙醇脱氢酶(ADH) 为二聚体酶,有 1 个基因座位编码。该座位由 a、b 和 c 3 个等位基因编码,观察到 ab、bb、bc 和 cc 4 种基因型。

2.1.13 过氧化物酶(POD) 为单体或二聚体酶,漠斑牙鲆的过氧化物酶表现为二聚体酶。有 *Pod-1* 和 *Pod-2* 2 个基因座位编码。座位 *Pod-1* 由 a 和 b 两个等位基因编码,只观察到 ab 一种基因型。座位 *Pod-2* 由 1 个等位基因 a 编码,观察到 1 种基因型 aa。

2.1.14 过氧化氢酶(CAT) 为二聚体酶,只有 1 个基因座位编码。该座位由 a 和 b 2 个等位基因编码,观察到 aa 和 ab 2 种基因型。

2.1.15 6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G6PD) 为二聚体酶,有 *G6pd-1* 和 *G6pd-2* 两个基因座位编码。座位 *G6pd-1* 由 a 和 b 两个等位基因编码,观察到 ab 和 bb 两种基因型。座位 *G6pd-2* 由 a 一个等位基因编码,观察到 aa 一种基因型。

2.2 群体遗传参数分析

2.2.1 漠斑牙鲆同工酶的等位基因频率 15 种同工酶共检测出 51 个等位基因,其中座位 *Me-1*、*Adh-1*、*Sdh-1*、*Sdh-2*、*Gdh-1*、*G6pd-1*、*Pgm-1*、*Idh-1*、*Cat-1*、*Pod-1* 和 *Pgi-1* 是多态的。所测基因座位和等位基因频率的结果见表 2。

表 2 漠斑牙鲆 33 个同工酶座位的等位基因频率
Tab.2 Allele frequencies of 33 isozyme loci in *Paralichthys lethostigma*

基因座位 Locus	等位基因 Allele	基因频率 Frequency	基因座位 Locus	等位基因 Allele	基因频率 Frequency
<i>Ldh-1</i>	a	1.0000	<i>Mdh-1</i>	a	1.0000
<i>Ldh-2</i>	a	1.0000	<i>Mdh-2</i>	a	1.0000
<i>Me-1</i>	a	0.4063	<i>Gdh-1</i>	a	0.0938
	b	0.1771		b	0.8229
	c	0.4166		c	0.0833
<i>Me-2</i>	a	1.0000	<i>Gdh-2</i>	a	1.0000
<i>Adh-1</i>	a	0.1042	<i>Pgi-1</i>	a	0.1562
	b	0.7396		b	0.7919
	c	0.1562		c	0.0521
<i>Sdh-1</i>	a	0.1042	<i>Amy-1</i>	a	1.0000
	b	0.8229	<i>Amy-2</i>	a	1.0000
	c	0.0729	<i>Amy-3</i>	a	1.0000
<i>Sdh-2</i>	a	0.9167	<i>Amy-4</i>	a	1.0000
	b	0.0833	<i>Amy-5</i>	a	1.0000
<i>G6pd-1</i>	a	0.1354	<i>Pod-1</i>	a	0.5000
	b	0.8646		b	0.5000
<i>G6pd-2</i>	a	1.0000	<i>Pod-2</i>	a	1.0000
<i>Est-1</i>	a	1.0000	<i>Pgm-1</i>	a	0.1042
<i>Est-2</i>	a	1.0000		b	0.7292
<i>Est-3</i>	a	1.0000		c	0.0833
<i>Est-4</i>	a	1.0000		d	0.0833
<i>Est-5</i>	a	1.0000	<i>Cat-1</i>	a	0.6563
<i>Est-6</i>	a	1.0000		b	0.3437
<i>Idh-1</i>	a	0.1354	<i>Ssd-1</i>	a	1.0000
	b	0.8646	<i>Ssd-2</i>	a	1.0000
<i>Idh-2</i>	a	1.0000			

2.2.2 多态座位的比例 P 根据表2的统计结果,分析的15种同工酶共记录了33个基因座位,其中 *Me-1*、*Adh-1*、*Sdh-1*、*Sdh-2*、*Gdh-1*、*G6pd-1*、*Pgm-1*、*Idh-1*、*Cat-1*、*Pod-1* 和 *Pgi-1* 共11个座位是多态,多态座位百分数是33.3%。

2.2.3 平均每个座位的有效等位基因数 A_e 根据等位基因频率计算了漠斑牙鲆平均每个座位的有效等位基因数,漠斑牙鲆平均每个座位的有效等位基因数为1.2196。

2.2.4 平均每个座位的预期杂合度 H_e 、实际杂合度 H_o 根据等位基因频率得出漠斑牙鲆群体的平均杂合度 H_e 为0.1219, H_o 为0.1547。

2.2.5 多态座位的杂合度的实际值 (H_o)、预期值 (H_e) 和 Hardy-Weinberg 遗传偏离指数 (d) 计算了多态座位的 d 值,除了 *Adh-1*、*Gdh-1* 和 *Pgm-1* 的 d 值为负值外,其余多态座位的 d 值都为正值。 H_o 、 H_e 和 d 的数据见表3。

表3 漠斑牙鲆多态座位杂合度的实际值(H_o)、预期值(H_e)和遗传偏离指数(d)

Tab.3 H_o , H_e and d of polymorphic loci in *Paralichthys lethostigma*

座位 Locus	H_o	H_e	d
<i>Me-1</i>	0.8958	0.6299	0.4221
<i>Adh-1</i>	0.3542	0.4177	-0.1520
<i>Sdh-1</i>	0.3125	0.3066	0.0192
<i>Sdh-2</i>	0.1667	0.1528	0.0910
<i>Gdh-1</i>	0.3542	0.3701	-0.0430
<i>Pgm-1</i>	0.3750	0.4436	-0.1564
<i>Pgi-1</i>	0.4167	0.3461	0.2040
<i>G6pd-1</i>	0.2708	0.2342	0.1563
<i>Idh-1</i>	0.2708	0.2342	0.1563
<i>Pod-1</i>	1.0000	0.5000	1.0000
<i>Cat-1</i>	0.6875	0.4512	0.5237

3 讨论

3.1 漠斑牙鲆同工酶的表达

3.1.1 LDH 的表达 漠斑牙鲆的 LDH 图谱在肌肉中表现为2条带(图1)。近阳极带为超显性,可以认为是 A_4 ,第2条带虽然距离第1条带很近,但认为可能是基因座位 B_4 。不同的鱼类 LDH 的表达差异较大,鲤科鱼类肌肉一般有4~5条区带^[7]。但是 Lush^[8]分析过欧洲12种鲆鲽类(不包括牙鲆)的

LDH,发现10种鱼在肌肉中只表现出1条区带,只有 A_4 。尤峰等^[9]分析的山东近海牙鲆的肌肉中,LDH 也只有1个区带,只是呈多态现象。本实验得到漠斑牙鲆的肌肉中有两个基因座位,表明漠斑牙鲆在进化的过程中并没有把 B 基因位点丢失,可以作为本物种的标识或有效遗传标记。

3.1.2 MDH 的表达 一般来说,鱼类在肌肉组织中存在两类 MDH,有4个基因座位编码,有细胞质型(s-MDH)和线粒体型(m-MDH)两种类型^[9]。黎中宝等^[10]报道了牙鲆肌肉中仅有 s-MDH 表达,只有一个座位 *s-MDH-1*。本研究表明,漠斑牙鲆的 MDH 也仅有 s-MDH 表达,但有 *s-MDH-1* 和 *s-MDH-2* 两个座位,这与尤峰等^[9]研究的山东近海牙鲆的 MDH 的情况相似。

3.2 漠斑牙鲆遗传多样性

多态座位比例 P 和平均杂合度 H 是评价鱼类种群生化遗传变异及其种质资源状况的两个主要参数。与其他的高等脊椎动物相比,鱼类的遗传变异性有较大的差异。Kirpichnikov^[11]报道,脊椎动物的多态座位比例一般在0.15~0.30,平均杂合度为0.03~0.08。海洋鱼类多态座位比例在0.30左右,平均杂合度在0.060左右^[4]。鱼类的多态座位比例会因种或同种的不同种群而有差异,但仍有规律可循,据报道最高可达0.50,最低只有0.09。一般来说,海水鱼类的遗传变异要高于淡水鱼类。Smith^[12]报道了106种海水鱼类的平均杂合度的平均值为0.055,Gyllenstein^[13]发现海水鱼类的平均杂合度为0.063,据估计,鲤科鱼类平均杂合度平均值为0.052^[14]。另外,野生群体的遗传变异高于养殖群体。王伟继等^[15]分析了真鲷野生群体和人工繁殖群体的同工酶差异,野生群体和人工繁殖群体的多态座位比例分别为45%和25% ($P_{0.05}$),群体平均实际杂合度分别为 0.141 ± 0.044 和 0.095 ± 0.043 。

尤峰等^[9]对山东近海牙鲆的同工酶进行了遗传分析,获得其多态位点比例为31.03%,黎中宝^[16]研究了牙鲆养殖群体的生化遗传结构,获得其多态位点百分数变化为14.29%~23.81%,预期杂合度的变化为0.056(0.036)~0.057(0.033),实际杂合度的变化为0.099(0.065)~0.104(0.065)。

对比以上数据,本实验结果 P 为33.3%,尤峰等研究的山东近海牙鲆虽然部分为野生群体,但其多态座位比例比漠斑牙鲆的多态座位比例低,说明

漠斑牙鲆的多态座位比例在牙鲆属中居于高等水平,在海水鱼类中居于中等水平。本实验的另一结果 H_e 为 0.121 9 和 H_o 为 0.154 7,说明漠斑牙鲆的杂合度很高,在遗传上具体体现在多态座位的等位基因较多,例如漠斑牙鲆的 PGM 检测到 4 个等位基因,SDH、GDH 和 PGI 等都检测到 3 个等位基因。

Hardy-Weinberg 遗传偏离指数 d 反映了 H_e 和 H_o 两者之间的平衡关系。虽然到目前为止还没有明确的 d 值范围来表明是否符合 Hardy-Weinberg 遗传定律,但 d 值越接近于零,基因型分布越接近于平衡状态; d 值的正负直接反映了种群内杂合子的过剩或缺失状态, d 值为正则杂合子过剩; d 值为负则处于杂合子缺失状态。由表 3 可以看出,漠斑牙鲆的 $Psd-1$ 的 d 值为 1.000 0,说明杂合子明显过多,在表型上表现为全是杂合子状态。

同工酶作为基因表达的直接或间接产物,它们的丰富程度直接影响生物体的机能和对环境的适应能力。同工酶多态性越高,越复杂,表明其遗传型越丰富,群体更能适应环境。另外,同工酶多态性越高,其作为分子标记研究生物多样性就越有意义^[17]。本研究用同工酶电泳技术对漠斑牙鲆的遗传多态性进行了初步分析,由实验结果可以看出,漠斑牙鲆还处于种质资源维持较好的状态,有利于对其资源进行开发和对其遗传育种工作的展开,但同时也应该采取保护措施,以免今后导致其资源的衰竭。

参考文献:

- [1] 王中仁. 植物等位酶分析[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [2] 胡能书, 万贯国. 同工酶技术及其在应用[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985. 73-85.
- [3] Shukla J B, Allendorf F W, Moritz D C, et al. Genetic Nomenclature for Protein-Coding Loci in Fish[J]. Trans Am Fish Soc, 1990, 119: 2-15.
- [4] Whitmore. Electrophoretic and isoelectric focusing technique in fisheries management [M]. Boston: CPC Press, 1990. 28-30.
- [5] 曹呈奎, 相建海. 海洋生物技术[M]. 济南: 山东科技出版社, 1998. 238-309.
- [6] Nei M. Genetic distance between population [J]. Am Nat, 1972, 106: 283-292.
- [7] 朱道非. 几种鲤科鱼类及杂种的乳酸脱氢酶同工酶的比较[J]. 水生生物学集刊, 1982, 7(4): 539-545.
- [8] Lush I E, Cowey C B, Knox D. The lactate dehydrogenase isoenzymes of twelve species of flatfish (*Heteromutata*) [J]. J Exp Zool, 1977, 171: 105-118.
- [9] 尤 峰, 王可玲, 相建海, 等. 山东近海牙鲆同工酶的生化学遗传分析[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(2): 127-133.
- [10] 黎中宝. 牙鲆群体生化学遗传学研究[J]. 中国生态农业学报, 2003, 11(3): 9-12.
- [11] Kirpichnikov V S. Genetic Bases of Fish Selection [M]. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1981. 143-200.
- [12] Smith P J, Fujino Y. Genetic variation in marine teleosts: high variability in habitat specialists and low variability in habitat generalists [J]. Mar Biol, 1982, 69 (1): 7-20.
- [13] Gyllenstein U. The genetic structure of fish: differences in the intraspecific distribution of biochemical genetic variation between marine, anadromous, and freshwater species [J]. J Fish Biol, 1985, 26(6): 691-699.
- [14] Bush D G. Allozymes of the Cyprinid Fish: Variation and Application [A]. In: Truett B J ed. Evolutionary Genetics of Fishes [M]. New York, London: Plenum Press, 1983. 561-590.
- [15] 王伟增, 孔 杰, 庄志猛, 等. 真鲷野生群体和人工繁殖群体的同工酶遗传差异[J]. 生物多样性, 2000, 8(4): 391-396.
- [16] 黎中宝. 牙鲆养殖群体遗传结构的研究[J]. 海洋学报, 2004, 26(3): 102-108.
- [17] 王志铮, 李太武, 刘 艳, 等. 穆孔鲷属六种同工酶的生化学遗传分析[J]. 海洋与湖沼, 2002, 33(3): 232-238.

Isozyme polymorphism in paralichthys, *Paralichthys lethostigma*

LI Peng-fei^{1,2}, LIU Ping¹, LIU Xue-zhou¹, GAO Tian-xiang², WANG Qing-yin¹

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. College of Life Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: *Paralichthys lethostigma* is an important economical species of *Paralichthys* in America. In recent years, the *Paralichthys* along the coast of China have suffered heavy decrease in their resources, and the wild stocks and their genetic diversity have been threatened to some extent due to the overfishing and fish culture. To change the situation, *Paralichthys lethostigma* was introduced to China by the Yellow Sea Fisheries Research Institute (YSFRI). It is very important to investigate the polymorphism of *Paralichthys lethostigma*. In September 2004, 48 samples of the second generation of *Paralichthys lethostigma* were collected from the experiment farm of YSFRI. Muscle and liver were collected from each of the samples and stored at -70°C for the test. Tissues were homogenized in mercaptoethanol buffer (0.05%) at a ratio of 1:3(g/mL) with ice-bath and centrifuged at 12 000 r/min for 30 min, 4°C . The supernatant samples were used as the isozyme source and electrophoresis was carried out on vertical polyacrylamide gels in Tris-gly buffer system (TG, pH 8.3) at 280 V for approximately 5 h at 4°C . The isozymes were analyzed by specific isozyme staining methods. Fifteen isozymes (i. e. MDH, LDH, ME, ADH, SDH, EST, POD, SOD, IDH, GDH, AMY, CAT, G6PD, PGM and PGI) were selected. The genetic variations were analyzed in terms of their locus number, structure, alleles etc. Altogether 33 loci were scored. Among the scored loci, 11 (*Me-1*, *Adh-1*, *Sdh-1*, *Sdh-2*, *Gdh-1*, *G6pd-1*, *Pgm-1*, *Idh-1*, *Cat-1*, *Pod-1* and *Pgi-1*) were polymorphic and the mean proportion of polymorphic loci (P) was 33.3 %. The mean effective number of alleles per locus (A_e) was 1.219 6; the mean expected heterozygosity per locus (H_e) was 0.121 9 and the mean observed heterozygosity (H_o) was 0.154 7. In the mean time, the deviation indexes from Hardy-Weinberg equilibrium (d value) of polymorphic locus were tested. The results show that the genetic diversity of *Paralichthys lethostigma* is higher than the average of marine fish, and the genetic diversity is the highest among *Paralichthys* species. All these results indicate that the *Paralichthys lethostigma* has high genetic variability, and it is worth being developed as the farming resource and protected at the mean time. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(1): 13–19]

Key words: *Paralichthys lethostigma*; isozyme; polymorphism

Corresponding author: LIU Ping. E-mail: liuping@ysfri.ac.cn