

·综述·

鱼类种质鉴定技术与渔业管理*

A technique of fish germplasm identification and its application in fishery management

郑光明 朱新平 张跃

(农业部热带亚热带鱼类选育与养殖重点实验室, 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广州 510380)

Zheng Guangming Zhu Xinping Zhang Yue

(Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fish Breeding & Cultivation,

Pear River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380)

关键词 鱼类, 种质鉴定, 渔业管理

Key words fish, germplasm identification, fishery management

自80年代,我国开始了对鱼类种质资源的研究,如李思发等进行“三江”原始种群收集与考种和10种淡水经济鱼类种质标准的研究^[1,2];对一些主要经济淡水鱼类的同工酶、mtDNA以及RAPD也进行了初步研究^[3~8]。但我国鱼类种质鉴定与渔业管理的研究与发达国家相比起步较晚。为了更好地保存和利用现存的渔业资源,本文对鱼类种质鉴定技术与渔业管理研究进行探讨。

1 鱼类种质鉴定技术

鱼类种质鉴定技术是通过试验测定鱼类的标准参数,制定种质标准,作为鉴定鱼类种质的各种手段,实际上是进行鱼类种群遗传结构的研究。它伴随着鱼类种群遗传学的发展,由形态水平发展到蛋白质和DNA分子水平。

1.1 表型鉴定

是对鱼类种群间、种群内可遗传形态性状(含数量性状)的研究,将同一物种分出不同体系,如生殖种群与洄游种群。该方法为传统方法,不能反映种群遗传结构,种群间遗传分化量的变化信息,不能满足原种鉴定和遗传趋异的定量估计或进化关系的评定。

1.2 血型遗传

据研究,人类血型遗传属于简单孟德尔遗传,其中1个血型抗原的基因座位上同时存在几个等位基因,这些等位基因频率和基因型的分布符合哈代-温伯格(Hardy-Weinberg)定律,其等位基因遗传变异信息可作为种质遗传标记。50年代曾将血型遗传用于海洋鱼类种质鉴定的研究,如鳕鱼、金枪鱼等的研究^[9,10]。但由于制备抗血清复杂且血型抗

原基因座位数有限,故仍不能满足种质鉴定的需要。

1.3 蛋白质电泳

蛋白质(含同工酶)电泳可以快速检测分散于整个基因组中非连锁座位的等位基因变异,可从凝胶上直接读出纯合子与杂合子基因型。国内外学者对鲤、鲢、鳊、鳙等许多鱼类同工酶电泳的研究表明它适合于鱼类遗传变异与原种鉴定的研究^[5,6,11,12]。但其检测的基因在全部结构基因中只是很少一部分且是间接的,编码蛋白的结构基因仅占整个基因组的1%,大量的遗传变异信息仍然贮存在核基因组中,非编码序列的突变率远远高于结构基因的突变率,这与种质鉴定的要求还存在差距。

1.4 mtDNA之RFLPs

RFLPs即限制性片段长度多态性(Restriction Fragment Length Polymorphisms),是利用限制性内切酶把DNA分子降解成许多长短不等的较小片段,分析其多态性。适合于分子量较小的DNA,如动物mtDNA(线粒体DNA)多态性的研究。在鱼类种质的研究中,目前多是检测mtDNA多态性,通常1个个体只含1种类型的mtDNA,因此种质特征易确定,但鲢鱼、鳊鱼都存在杂合质^[13,14]。该方法在种群间、近缘种间的差异、物种分类、系统发生的研究方面更有效,如解决了传统方法分类白鲢亚科鱼类难的问题和系统发生关系^[13],以及蛋白质电泳很难分清养殖与野生大西洋鲑的种群鉴定^[15];对于种群遗传渐渗与漂变的研究也很适用,如硬头鲂不同产卵期会发生基因漂变,产生mtDNA多态性^[16]。但属核外遗传物质的mtDNA不能反映父本的种质信息,反映有效种群大小仅为核DNA的1/4,易发生遗传漂变,祖先的遗传信息更易在后代中丢失,因此mtDNA之RFLPs也有一些局限性。

1.5 DNA指纹

收稿日期:1998-07-17

*“九五”国家攻关项目(96-008-01-03-06)资助

DNA 指纹(DNA fingerprint)又名遗传指纹(Genetic fingerprint),由于 1 个 DNA 指纹能同时提供十几个独立的遗传标记,具有高度变异性、简单的稳定遗传和体细胞稳定性。且随着多核小卫星探针多样化以及利用微卫星探针进行 DNA 指纹分析即 SSRP(Simple Sequence Repeats Polymorphism;简单重复序列多态性),使得 DNA 指纹技术特别适合于种质鉴定的研究,如对虹鳟、三棘刺鱼、罗非鱼等多种经济鱼类进行 DNA 指纹研究,表明 DNA 指纹技术提供的遗传变异信息远远高于同工酶及 mtDNA^[17~19]。目前 DNA 指纹的探针除了放射性标记外,还有地高辛、荧光素、生物素等标记。

1.6 DNA 之 RFLPs

是对基因组中诸多单拷贝 DNA(Single-copy nDNA; scnDNA)利用 RFLPs 技术,用限制性内切酶消化核 DNA,再与特异的探针杂交,从而确定这部分 DNA 的遗传变异。它包含有 DNA 指纹技术与 RFLPs 技术,联合应用多种探针和多种限制性内切酶,才可满足种质鉴定的需要。

1.7 PCR

PCR(Polymerase Chain Reaction;DNA 聚合酶链式反应)只需少量 DNA 样品就可于体外快速大量合成所需的 DNA 片段,在鱼类种质鉴定和种群遗传结构的研究中主要是联合 RFLPs 形成的所谓扩增片段长度多态性(Amplified Fragment Length Polymorphic DNAs; AFLPs),即利用限制性内切酶产生的多态性片段进行 PCR 扩增,扩增的 DNA 片段可以反映遗传结构的多样性,如在大西洋鲑鱼和 2 种鲑鱼的 mtDNA 遗传多样性研究^[20,21]。PCR 和 AFLP 可以解决制备 mtDNA 需要大量组织样品的难题,更加适应于鱼类 mtDNA 多态性研究,为鱼类种质鉴定建立更新的方法。

1.8 RAPD

RAPD(Randomly Amplified Polymorphic DNA;随机扩增多态性 DNA)是在 PCR 基础上用单一引物对基因组 DNA 片段进行随机扩增,能检测出大量的 DNA 遗传变异,克服了 PCR 中双引物合成的难题, RAPD 快速、简便、有效。在鱼类种质研究中,有对荷包红鲤特殊 DNA 检测、草鱼种群遗传结构、罗非鱼种内与种间遗传相似度、斑马鱼基因组高密度连锁图谱等的研究^[7,8,22,23]。但必需严格控制实验条件,增加实验结果的重复性,且 RAPD 只产生显性标记,故适合自交系和回交群体而不能确定杂合子。

1.9 其它衍生技术

以 PCR、RAPD、RFLPs 为基础衍生出诸如 SCARs、STS、SSCP、In Situ PCR 等技术,适合于基因组 DNA 和特殊 DNA 片断的分析(引自 M. Mohan 等),也可作为鱼类种质鉴定技术。

1.9.1 SCARs(Sequence Characterized Amplified Regions;特征序列扩增区域) 首先克隆基因组两端序列并测序,设计与两端序列相对应的引物,然后将引物直接用于基因组 DNA 的 PCR,产生扩增多态性区域,若没发生扩增片断多态

性,那么扩增片断就易于用限制性内切酶酶切,从而检测出扩增片断的多态性。它比 RAPD 更优越,若将 RAPD 标志的片断转化为 SCARs 就更可靠。

1.9.2 STS(Sequence-Tagged Sites;染色体序列标志位点)

是基因组中单拷贝 DNA 短片断,序列和染色体位置已知,该位点可作为染色体上特异位标,其排列次序与间隔就构成 STS 物理图谱。

1.9.3 SSCP(Single-Strand Conformation Polymorphism;单链构象多态性) 该方法测定 DNA 多态性更快速、有效,它仅用于相对短的 DNA 片断,能鉴定同等分子量 DNA 片断的杂合性,甚至能检测少量核苷酸的变化,可用于人类遗传疾病诊断,转基因鱼中外源 DNA 片断的检测。

1.9.4 In Situ PCR(原位 PCR) 是直接于细胞或组织上原位扩增目的 DNA 或 RNA 片断,并在原位检测其扩增产物。可用于转基因鱼中外源 DNA 或 mRNA 检测和定位。

2 种质鉴定技术在渔业管理中的应用

渔业管理的核心问题是如何最大限度开发利用现存的渔业资源,同时又要保护鱼类的遗传多样性,使其基因库免受破坏。而鱼类种质鉴定的研究能为渔业管理提供科学依据。

2.1 渔业资源状况的分析

渔业管理实际上是鱼类种群资源的管理,涉及到种群基因频率和基因型分布、近交、遗传瓶颈、选择、突变和迁移等对种群结构的影响。种质鉴定能反映鱼类种群资源状况,如用蛋白质电泳对大西洋鲑的洲际起源、银鱼、罗非鱼种群鉴定的研究^[3,24,25],用 mtDNA 之 RFLPs 对溯河与非溯河性产卵鲑鱼和 DNA 指纹对条纹鲈种群鉴定和渔业管理加以分析^[26,27],以及同工酶与 mtDNA 联合鉴定大西洋鲑与褐鲈种群间杂交与遗传渐渗的研究^[28]。

2.2 人为活动对渔业资源的影响

由于过度捕捞,造成渔业资源衰退甚至枯竭。如同工酶电泳研究发现过度捕捞的红大麻哈鱼雄性个体占优势且小型化,又如用 mtDNA 之 RFLPs 研究产卵非常相似的美洲鳗和欧洲鳗子代群体中的不同鳗种,方便人工养殖、捕捞和资源保护^[29]。种质鉴定也适合混合渔业,通过渔获物中不同来源种群遗传变异信息的研究,确定合理的捕捞方案,以免微弱种群衰退或灭绝^[9,30]。另外,水体中各种毒害物质能引起 mtDNA 碱基的置换导致鱼类遗传结构发生改变,资源衰退及枯竭。对于污染水域中的鱼类可以通过 mtDNA 之 RFLPs 进行监控,分析有害物质对鱼类的毒害作用,以改进渔业环境监测管理^[31]。

2.3 养殖种群对野生种群资源的影响

逃逸入天然水体中的各种养殖种群必然会对野生种群遗传结构产生影响,通过种质鉴定可以弄清原始种群与养殖种群的遗传结构和变异情况,以确定原种保护和开发利用措施,如用 mtDNA 之 RFLPs 对大西洋鲑养殖种群和野生种群

的研究发现,逃逸的特别是起源于不同野生种群的养殖种群会对野生种群产生负面影响^[15];或开辟新途径使野生种群与养殖种群不发生遗传结构的改变,如吴清江等研究出天然雌核发育特性的三倍体鲤鱼不会与野生种群产生杂交和遗传渐渗^[32]。另外一些转基因鱼、多倍体鱼也会对野生种群遗传结构产生影响,用DNA指纹和原位PCR可以研究特异外源DNA片段对野生种群的影响,如克隆二倍体香鱼的DNA指纹鉴定的研究^[33]。

2.4 引种和移植驯化的渔业管理

引种和移植驯化,必须通过种质鉴定预先了解它们和原始种群的遗传结构,避免产生遗传污染,降低其适应性而消亡。如利用同工酶电泳就可检测出引入虹鳟向当地山鲮的遗传渐渗,并发现山鲮的纯种已几乎不存在^[34],DNA指纹了解条纹鲈野生种与引进种的种间遗传差异及子代关系^[27]。因此,引种和移植驯化遗传管理的关键是要进行种质鉴定。

2.6 濒危鱼类的保护和鱼类基因库构建

濒危鱼类的保护,最好的方法是建立鱼类基因库,这必须利用种质鉴定研究其遗传结构及种群遗传学。如对花鲮属一个濒危种(*Poeciliopsis occidentalis*)的遗传结构分析,发现其存在3个主要遗传群体,这样对其类似种群遗传结构的了解,才可能作出保护遗传资源和构建基因库的有效方案^[35]。为此,建立鱼类基因库要监测建库种群和野生种群的遗传结构;保持建库种群拥有最大遗传可塑性的有效种群大小;对于较小的建库种群通过选择交配来避免近交;应即时将建库种群保持在人工养殖环境中;将特有种群保持为隔离种群,以保持种间变异。

综上所述,种质鉴定与渔业管理关系密切,应用现代分子生物技术是研究种质鉴定与渔业管理的未来发展方向。我国应首先开展常见的重要经济鱼类、濒危鱼类(如中华鲟)以及其它经济水生动植物种质资源研究,建立其分子遗传标记;建立人工和天然生态库,完善人工和天然水域及低温种质资源库和种质资源数据库,在群体、个体、细胞、分子水平上保存鱼类种质资源,并不遗余力地进一步探索新的种质鉴定和渔业管理方法。

参 考 文 献

- 李思发,等.长江、珠江、黑龙江鲢、鳙、草鱼种质资源研究.上海:上海科学技术出版社,1990
- 李思发,等.中国淡水主要养殖鱼类种质研究.上海:上海科学技术出版社,1998
- 朱蓝菲,蒋一陆.银鲫种内的遗传标记及其在选种中的应用.水生生物学报,1987,11(2):105~106
- 张四明,等.方正鲫、白鲫与鲫线粒体DNA限制性内切酶酶切比较.水产学报,1992,16(2):120~129
- 张辉,等.鲤鱼转铁蛋白和血清酯酶多态性研究.水生生物学报,1993,17(3):278~281
- 余来宁,等.长江白鲢酯酶同工酶的类型与生长的相关性及其在原种中的应用.中国水产科学,1995,2(5):8~14
- 梁利群,等. RAPD 技术分析荷包红鲤抗品系与亲本的基因组变化.中国水产科学,1998,5(1):6~9
- 薛国雄,等.三江水系草鱼种群 RAPD 分析.中国水产科学,1998,5(1):1~5
- Møller D. Red blood cell antigen in cod. Sarsia, 1967, 29:413~430
- Suzuki A. On the blood types of yellow fin and bigeye tuna. Am Nat, 1962, 96(89):2239~2246
- Walps R S, D J Teel. Conservation genetics of endangered fish populations in Arizona. Science, 1986, 228:400~402
- Winans G. Geographic variation in the milkfish *Chanos chanos* L. Biochemical evidence. Evolution, 1980, 34:558~574
- Bernatchez L, et al. Polygenetic relationships among the subfamily Corgoninae as revealed by mitochondrial DNA restriction analysis. J of Fish Biol, 1991, 39(Suppl. A):283~290
- Buroder N E, et al. length heteroplasmy of sturgeon mitochondrial DNA: An illegitimate elongation model. Genetic, 1990, 124:157~163
- Knox D, E Verspoor. A mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphism of potential use for discrimination of farmed Norwegian and wild Atlantic salmon populations in Scotland. Aquat, 1991, 98:249~257
- Ferguson M M, et al. Mitochondrial DNA and allozyme variation in Ontario cultured rainbow trout spawning in different seasons. Aquat, 1993, 117:217~259
- Carter R E, et al. The application of DNA fingerprinting in the analysis of gonogenesis in tilapia. Aqua, 1991, 95:41~52
- Fields R W, et al. DNA fingerprinting in rainbow trout detected by hybridization with DNA of bacteriophage M13. Trans Am Fish Soc, 1989, 118:8~81
- Rico C, et al. Characterization of hypervariable microsatellite loci in the threespine stickleback *Gasterosteus aculeatus*. Mol Eco, 1991, 12:271~271
- Carr S M, H D Marshall. Detection of interspecific DNA sequence variation in the mitochondrial cytochrome b gene of Atlantic cod (*Gadus morhua*) by the polymerase chain reaction. Can J Fish Aquat Sci, 1991, 48:48~52
- Cronin M A, et al. Mitochondrial DNA variation in chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) and chum salmon (*O. deta*) detected by restriction enzyme analysis of polymerase chain reaction (PCR) productions. Can J Fish Aquat Sci, 1993, 50:708~715
- Dinesh K R, et al. Genetic variation inferred from RAPD fingerprinting in three species of Tilapia. Aquacult, 1996, 4(1):19~30
- Postlethwait J H, et al. A genetic linkage map for the zebrafish. Science, 1994, 264(29):699~730
- Bank F H V, et al. Electrophoretically detectable genetic data for fifteen southern African cichlids. J Fish Biol, 1989, 34:465~483
- Payne R H, et al. Geographical variation in the Atlantic salmon. Nature, 1979, 231:250~252
- Palva T K, et al. Identification of anadromous and nonanadromous

- salmon stocks in Finland by mitochondrial DNA analysis. *Aqua*, 1989, 81:237~244
- 27 Wirgin I I, et al. Use of DNA fingerprinting in the identification and management of a striped bass population in the Southeastern United States. *Trans Am Soc*, 1991, 120:273~282
- 28 Solomon D J, A R Child. Identification of juvenile natural hybrids between Atlantic salmon (*Salmo salar* L) and trout (*Salmo trutta*). *Can J Fish Biol*, 1978, 12:499~501
- 29 Kroyius F V. On the relationship between freshwater and marine life - spans of sockeye salmon from Lake Dal' neye. *Biol Morya*, 1979, 3:24~29
- 30 Hallerman E M, J S Beckman. DNA - level polymorphism as a tool in fisheries science. *Can J Fish Aqua Sci*, 1988, 45:645~654
- 31 郑光明, 李新辉. 鱼类线粒体 DNA 的研究及其应用. *中国水产科学*, 1995, 2(5):159~163
- 32 吴清江, 等. 具有天然雌核发育特性的人工复合三倍体鲤鱼. *自然科学进展*, 1997, 7(3):340~344
- 33 Hon - sob Han, et al. Application of DNA fingerprinting to confirmation of clone in Ayu. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1992, 58(11):2 027~2 031
- 34 Nelson K, M Soule. Genetic conservation of exploited fishes. In: Ryman N, F M Utter, eds. *Population Genetics and Fishery Management*. Seattle: University of Weashington Press, 1987. 345 -- 368
- 35 Vrijenhoek R C. Conservation genetics of endangered fish populations in Arizona. *Science*, 1986, 228:400~402

《中国水产科学》第三届编辑委员会组成

在第二届《中国水产科学》编委会任期已满之时,本刊顺应当前的改革形势和水产科学的发展,经过广泛征求意见和协商,组成了第三届《中国水产科学》编辑委员会。

新一届编委会由中国水产科学研究院院长雷茂良任主任委员,副院长张铭羽、张荣权及主编吴万夫任副主任委员,编委会由 31 名委员组成,其中两院院士 7 名,研究员、教授及博导 20 名。为提高本届编委会的学术层次,编委会对在水产及相关学科作出了杰出贡献的专家学者发出了邀请,得到了他们的大力支持,应邀加入本届编委会的中国科学院和中国工程院院士有著名的水生生物学家刘筠、海洋生物学家刘瑞玉、原生动物学家沈韞芬、细胞生物学家林浩然、海洋生物学家赵法箴、鱼类学家曹文宣、海洋药物学家管华诗等。本届编委会向一些水产科研机构 and 高等院校发出了邀请,一批有建树、有影响的学科带头人被推荐到本届编委会中,从而对扩大本刊的读者和作者面,扩大本刊在国内外的影响将产生积极的作用。本届编委会还根据编委所在的地区和单位的均衡分布、学科专业的合理结构以及老中青结合的原则对编委组成进行了调整,从而给编委会注入了新的活力和生机。

总之,新一届编委会是一个全国性的、高学术层次的、学科领域覆盖面广的、充满活力和生机的编委会。我们相信,在新一届编委会的领导和指导下,《中国水产科学》的学术水平将会更上一层楼。本刊愿为水产科技工作者提供这块园地进行学术交流,攀登新的科学高峰,为水产科技创新和迎接知识经济时代的到来作出更大的贡献。

《中国水产科学》编辑部

1999 年 6 月 30 日