

乌苏里白鲑的生化遗传结构

马波, 石连玉, 董崇智

(中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要:2001年10月于黑龙江中游抚远江段捕获野生乌苏里白鲑(*Coregonus ussuriensis* Berg)30尾, 体长30~45 cm。采用淀粉凝胶电泳法对其肝脏、肌肉等组织的LDH、MDH、ME、IDH、G3PDH、ADH、GDH、PGI、CAT、AAT、EST、SOD等同工酶进行电泳, 并对其表型进行生化遗传分析。结果表明, LDH同工酶的3个位点上都有基因复制, 位点间不杂合; 在其他同工酶上未见有位点复制或加倍。在检测到的12种同工酶是由26个基因位点编码; 其中G3pdh-1、Pgi-3和Est-1等基因位点呈多态, 其多态座位比例为11.5%, 平均杂合度为0.043。与大多数其他鱼类相比较, 乌苏里白鲑在生化遗传水平上表现出较低的遗传变异。

关键词:乌苏里白鲑; 同工酶; 多态座位

中图分类号:S965.232; Q342

文献标识码:A

文章编号:1005-8737-(2003)03-0195-06

乌苏里白鲑(*Coregonus ussuriensis* Berg)属鲑形目, 鲑科, 白鲑亚科, 为北极淡水鱼类区系复合体的鱼类, 其肉质细嫩鲜美, 营养价值高, 具有较高的经济价值和广阔的开发应用前景, 是黑龙江水系特产的冷水性珍稀名贵经济鱼类^[1]。但近20年来, 由于过度捕捞和环境的恶化, 乌苏里白鲑的资源量呈明显的下降趋势, 已被列入《中国濒危动物红皮书鱼类》名录^[2]。目前, 国内外学者仅对黑龙江水系乌苏里白鲑的生物学进行过研究^[3], 但有关其生化遗传学方面的研究尚未见报道。本研究采用同工酶电泳技术, 对乌苏里白鲑生化遗传结构和遗传多样性进行探讨, 以期积累有关生化遗传学资料, 为该鱼种质资源的保护和开发及遗传育种等研究提供遗传理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品的采集与处理

乌苏里白鲑于2001年10月采自黑龙江中游抚远江段的野生群体, 共30尾样本, 体长30~45 cm。活鱼解剖, 取肝脏、肌肉等组织, 分别编号后置于小

塑料袋中, 放入液氮中带回实验室, 将样品转移到低温冰箱(-70℃)保存待用。用于分析的样品加1~2倍体积的Tirs-HCl缓冲液(0.01 mol/L, pH 7.0), 匀浆后离心(4℃, 150×10³ r/min, 10 min), 取上清液用于点样电泳。

1.2 电泳方法

采用水平切片淀粉凝胶电泳。淀粉胶电泳参照王可玲等^[4]方法, 采用TC(pH 6.9)和TBE(pH 8.9)2种缓冲系统。选取的同工酶与缓冲系统的电泳组合参照徐成等^[5]。染色方法参照王中仁^[6], 略加改进。

1.3 酶位点与等位基因的编号

同工酶的缩写、基因位点和等位基因的命名基本采用Shaklee^[7]推荐的方法, 以同工酶缩写名称的大写代表酶蛋白, 小写代表编码基因。

1.4 基因变异的度量

用多态位点比例(P)和每个位点的平均杂合度(H)来度量, 其计算公式分别为: $P = \text{多态位点数} / \text{位点总数}$; $H = \sum (1 - \sum X_i^2) / n$; X_i - 等位基因 i 的频率; n - 所测位点数。

2 结果

2.1 同工酶的表达

图1~12为各组织中显带清楚且重复性较好的

收稿日期: 2002-08-16; 修订日期: 2002-12-05.

基金项目: 中国水产科学研究院科研基金项目(2001-1-10).

作者简介: 马波(1974-), 男, 助理研究员, 主要从事鱼类遗传育种研究.

LDH、MDH、ME、IDH、G3PDH、ADH、GDH、PGI、CAT、AAT、EST、SOD 等同工酶谱。

2.1.1 乳酸脱氢酶(LDH, E. C. 1.1.1.27) 乌苏里白鲑的 LDH 同工酶由 3 个基因座位 LDH-A、LDH-B 和 LDH-C 编码,在肌、肝、心和眼组织中共分为 3 个区域(I 区、II 区和 III 区),具显著的组织特异性。肌中 LDH 分为 2 个区(I 区和 II 区),分别由 LDH-A 和 LDH-B 座位编码,各表现为 5 条谱带;肝和心中 LDH 处于 II 区由 LDH-B 编码,表型为 5 条谱带;眼中 LDH 处于 II 区和 III 区,由 LDH-B 和 LDH-C 编码,各表型为 5 条谱带(图 1)。

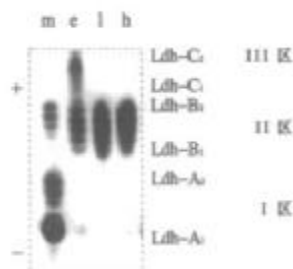


图1 乌苏里白鲑肌(m)、眼(e)、肝(l)和心(h)中 LDH 同工酶图谱

Fig.1 LDH isozyme patterns in muscle(m), eye(e), liver (l) and heart(h) of *C. ussuriensis*

2.1.2 苹果酸脱氢酶(MDH, E. C. 1.1.1.37) 肝中 MDH 有 s-MDH(细胞质型)和 m-MDH(线粒体型)2 种类型,各由 2 个座位编码,均为单态。座位间杂合,各表型为 3 条谱带;肌中 s-MDH-A 座位表型为 2 条谱带(图 2)。

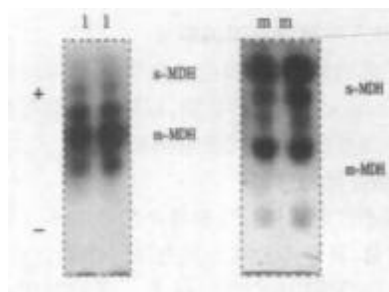


图2 乌苏里白鲑肝(l)、肌(m)中 MDH 同工酶图谱

Fig.2 MDH isozyme patterns in liver(l) and muscle(m) of *C. ussuriensis*

2.1.3 苹果酸酶 (ME, E. C. 1.1.1.40) 乌苏里

白鲑肌中和肝中 ME 由 1 个基因座位编码,表型为 1 条带,未见多态,活性较弱(图 3)。

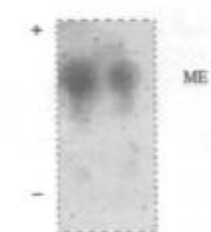


图3 乌苏里白鲑肌中 ME 同工酶图谱

Fig.3 ME isozyme patterns in muscle of *C. ussuriensis*

2.1.4 异柠檬酸脱氢酶 (IDH, E. C. 1.1.1.42)

肝中 IDH 有 s-IDH(细胞质型)和 m-IDH(线粒体型)2 种类型,各由 1 个座位编码,均为单态。m-IDH 表型为 3 条谱带,s-IDH 表型为 1 条谱带;肌中只有 m-IDH,为 3 条谱带(图 4)。

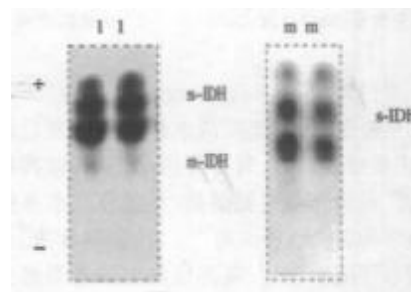


图4 乌苏里白鲑肝(l)、肌(m)中 IDH 同工酶图谱

Fig.4 IDH isozyme patterns in liver(l) and muscle(m) of *C. ussuriensis*

2.1.5 醇脱氢酶 (ADH, E. C. 1.1.1.1) 肝中 ADH 由 1 个基因座位编码,单态,表型为 1 条谱带(图 5)。

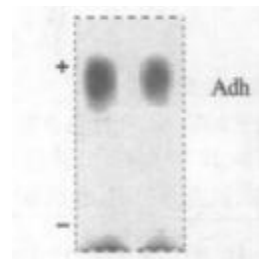


图5 乌苏里白鲑肝中 ADH 同工酶图谱

Fig.5 ADH isozyme patterns in liver of *C. ussuriensis*

2.1.6 甘油-3-磷酸脱氢酶(G3PDH, E. C. 1.1.1.8)

乌苏里白鲑肝中 G3PDH 同工酶由 3 个座位编码。G3pdh-2 和 G3pdh-3 为单态,各表型为 1 条谱带;G3pdh-1 为多态,有 2 个等位基因,相互不杂合,表型为 1 条或 2 条谱带(图 6)。

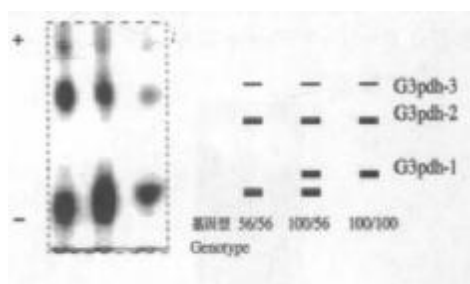


图 6 乌苏里白鲑 G3PDH 同工酶及肝中 G3pdh-1 座位多态性示意图

Fig. 6 G3PDH isozyme patterns and diagram of polymorphism of G3pdh-1 loci in liver of *C. ussuriensis*

2.1.7 天冬氨酸转氨酶(AAT, E. C. 2.6.1.1)

肝中 AAT 由 2 个基因座位编码,均为单态,各表型为 1 条谱带(图 7)。

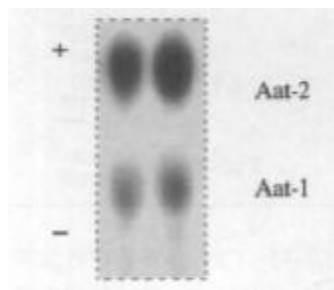


图 7 乌苏里白鲑肝中 AAT 同工酶图谱

Fig. 7 AAT isozyme patterns in liver of *C. ussuriensis*

2.1.8 谷氨酸脱氢酶(GDH, E. C. 1.1.1.27)

GDH 在肌中有 2 个基因座位,均为单态。Gdh-1 表型为 3 条谱带,Gdh-2 为 1 条谱带(图 8)。

2.1.9 磷酸葡萄糖异构酶(PGI, E. C. 5.3.1.9)

乌苏里白鲑肝中 PGI 同工酶有较复杂的表达形式,由 4 个基因座位编码。Pgi-1 和 Pgi-2 为单态,表型分别为 1 条和 3 条谱带;Pgi-3 为多态,有 2 个等位基因,相互间可杂合,表型为 1 条或 3 条谱带(图 9)。

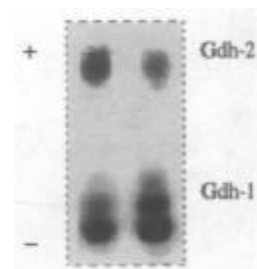


图 8 乌苏里白鲑肌中 GDH 同工酶图谱

Fig. 8 GDH isozyme patterns in muscle of *C. ussuriensis*

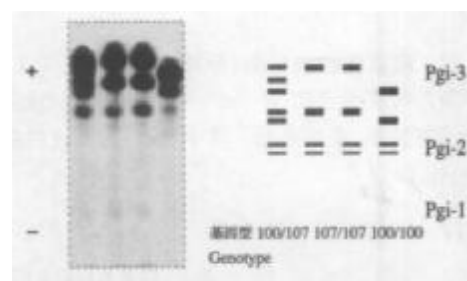


图 9 乌苏里白鲑 PGI 同工酶及肝中 Pgi-3 座位多态性示意图

Fig. 9 PGI isozyme patterns and diagram of polymorphism of Pgi-3 loci in liver of *C. ussuriensis*

2.1.10 过氧化氢酶(CAT, E. C. 1.11.1.6) 肝中 CAT 同工酶由 1 个基因座位编码,为单态,表型为 1 条谱带(图 10)。

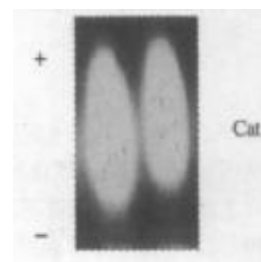


图 10 乌苏里白鲑肝中 CAT 同工酶图谱

Fig. 10 CAT isozyme patterns in liver of *C. ussuriensis*

2.1.11 酯酶(EST, E. C. 3.1.1.1)

EST 在肝中由 2 个座位编码。Est-1 为多态,有 2 个等位基因,表型为 1 条或 2 条谱带;Est-2 为单态,表型为 1 条谱带(图 11)。

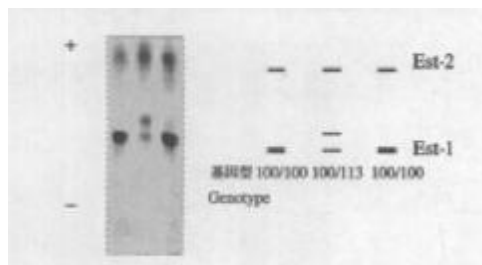


图11 乌苏里白鲑 EST 同工酶及肝中 Est-1 座位多态性示意图

Fig. 11 EST isozyme patterns and diagram of polymorphism of Est-1 in liver of *C. ussuriensis*

2.1.12 超氧化物歧化酶(SOD, E. C. 1.5.1.1)

乌苏里白鲑肝中 SOD 有 Sod-1、Sod-2 两个座位,各为 1 条谱带,未见多态。其中 Sod-2 具较快的迁移率(图 12)。

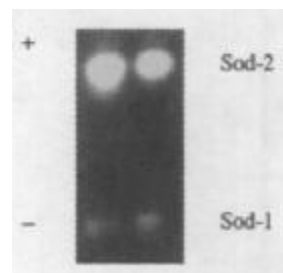


图12 乌苏里白鲑肝中 SOD 同工酶图谱

Fig. 12 SOD isozyme patterns in of liver *C. ussuriensis*

表1 乌苏里白鲑多态基因座位的等位基因频率及 χ^2 检验

Table 1 Allelic frequencies and χ^2 test in polymorphism loci of *C. ussuriensis*

基因座位 Loci	基因型 Genotype	观察值 Observed number	预期值 Expected number	χ^2	P	等位基因频率 Allelic frequency	
G3pdh-1	100/100	10	8.5	1.211	0.25-0.50	100	56
	100/56	12	15.0			0.533	0.467
	56/56	8	6.5				
Pgi-3	100/100	9	8.0	0.534	0.25-0.50	100	107
	100/107	13	15.0			0.517	0.483
	107/107	8	7.0				
Est-1	100/100	26	26.1	0.111	0.50-0.75	100	113
	100/113	4	3.8			0.933	0.067
	100/113	0	0.1				

3 讨论

多倍体鱼类与二倍体鱼类相比虽然许多酶都是由相同数量的基因编码,但多倍体鱼类的每一个酶的位点数及位点上的等位基因数都平均有所增加,如在鲤科^[8]和鲟形目^[9]等多倍体鱼类的 LDH 同工酶上位点加倍;鲟形目在 sLDH 和 mLDH 上,2 倍体有 2 个位点,而在 4 倍体上有 4 位点^[10]。有关鱼类的 LDH 同工酶的研究比较深入,硬骨鱼类的 LDH 一般受 A、B 和 C 3 个基因位点控制,其中 C 位点大多特异性地出现在鱼类的眼或肝组织中。鲑科鱼类为多倍体(四倍体)^[10],乌苏里白鲑的 LDH 是由 A、B 和 C 3 个基因位点控制,各自复制 2 个等位基因(A_1 和 A_2 , B_1 和 B_2 , C_1 和 C_2),位点间不杂合而各

形成 5 种四聚体同工酶,其表型在各组织中可明显分为 3 个区域,具有显著且稳定的组织差异。乌苏里白鲑的 LDH-A 位点仅存在肌中,LDH-C 位点仅存在眼中,而 LDH-B 位点广泛分布于各组织中,这显然是与其在不同的组织中行使不同的生理功能相适应的。

LDH 同工酶 A 和 B 亚基的结合受限制,即 A 和 B 亚基不能随机结合产生 5 种四聚体同工酶,这在鱼类中是普遍存在的现象。Mok 等^[11]报道 12 种鱼的 LDH,50% 以上的 LDH-A 和 LDH-B 的座位不能杂合。Markert 等^[12]认为,这可能是 LDH 的 A、B 和 C 3 个亚基的组成成份及其结构相差很大,导致亚基相互结合部位发生变异而使亚基结合被限制。作为鲑科鱼类的乌苏里白鲑也存在这种现象,LDH

的A、B和C座位间也不能杂合,而各自复制出2个等位基因,产生其特有的LDH表达形式。

在所检测的12种同工酶中,仅在乌苏里白鲑的LDH同工酶上发现有位点加倍或等位基因复制,在SDH、IDH、AAT等同工酶中未见位点复制。在多倍体中,并不是所有的蛋白质都是较二倍体为多的位点编码。虹鳟仅约50%的位点复制(加倍),胭脂鱼科中具特异性种类的复制基因数量降至35%,泥鳅科中低至15%~30%^[10],在鲤科鱼类中也有类似情况^[8]。同样,乌苏里白鲑的许多基因未复制,可能为在进化过程中其中一个基因复制后便消失或成为不起作用的“隐匿”基因而未能表达。

多态座位比例和平均杂合度是能够有效反映鱼类种群生化遗传变异及其种质资源状况的2个重要参数。Kirpichnikov^[13]报道,脊椎动物的多态位点比例为15%~31%,平均杂合度在0.03~0.08。Selander^[14]报道,14种鱼类的多态座位比例平均为30.6%,平均杂合度平均为0.078。李思发等^[8]报道,淡水鱼类的多态位点比例为11.8%~33.3%,3种鱼8个种群的平均杂合度平均为0.082^[15]。对比以上数据,本研究的结果乌苏里白鲑的多态座位比例为11.5%,在鱼类中处于较低水平。平均杂合度为0.043,也低于上述鱼类的平均水平,与同为鲑科的哲罗鱼(*Hunchotaimen* Pallas)($P=10.7\%$, $H=0.048$)¹⁾相近,表明包括乌苏里白鲑在内的鲑科鱼类在生化遗传水平上表现出较低的变异。

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比例关系,与物种对环境的适应能力密切相关。目前,由于环境的不断恶化和人们的过度捕捞,黑龙江水系的乌苏里白鲑的分布区域不断缩小,种群数量正急剧减少,繁殖个体也逐渐趋于小型化²⁾,加之其本身遗传多样性程度较低,种群资源正面临濒危。因此,急需采取措施以保护乌苏里白鲑种群遗传多样性及恢复其渔业资源。

致谢:本文在撰写过程中得到沈俊宝研究员的大力协助和指导,谨致谢忱!

参考文献:

- [1] 张觉民. 黑龙江省鱼类志[M]. 哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1995. 96~108.
- [2] 董崇智,赵春刚. 黑龙江乌苏里白鲑生殖群体生态学特征及资源保护[J]. 水产学杂志,1991(1):14~20.
- [3] 乐佩琦,陈宜瑜. 中国濒危动物红皮书(鱼类)[M]. 北京:科学出版社,1998.
- [4] 王可玲,张培军. 中国近海带鱼种群生化遗传结构及其鉴别的研究[J]. 海洋学报,1994,16(1):93~104.
- [5] 徐 成,王可玲,张培军. 鲈鱼群体生化遗传学研究. I. 同工酶的生化遗传分析[J]. 海洋与湖沼,2001,32(1):42~48.
- [6] 王中仁. 植物等位酶分析[M]. 北京:科学出版社,1996. 95~106.
- [7] Shalklee J B, Allendorf F W, Moritz D C, et al. Genetic Nomenclature for Protein-Coding Loci in Fish[J]. Trans Amer Fish Soc, 1990,119:2~15.
- [8] 李思发,吴力钊,王 强. 中国淡水主要养殖鱼类种质研究[M]. 上海科学出版社,1998. 71~90.
- [9] 张四明,邓 怀,危起伟. 中华鲟天然群体蛋白质水平遗传多样性贫乏的初步证据[J]. 动物学研究,1999,20(20):35~44.
- [10] 张兴忠,仇潜如,陈曾龙,等. 鱼类遗传与育种[M]. 北京:农业出版社,1988. 52~92.
- [11] Mok H, Tsui S, Lee S. Implication of tissue expression of Lactate Dehydrogenase-C Gene in phylogenetic study of *Enmachi K* [J]. Jap J Ichthy, 1988,35(1):31~39.
- [12] Markert C L, Shalee J B, Whit G S. Evolution of gene[J]. Science, 1975,189(419):102~144.
- [13] Kirpichnikov V S. Genetic Bases of Fish Selection[M]. Berlin, Heidelberg, New York:Springer-Verlag, 1981. 143~200.
- [14] Selander R K. Genetic Variations in Natural Populations[A]. Molecular Evolution[C]. Massachusetts: Sinauer Associates, 1976. 21~45.
- [15] 李思发,王 强,陈永乐. 长江、珠江、黑龙江三水系的鲢、鳙、草鱼原种种群的生化遗传结构与变异[J]. 水产学报,1986,10(4):351~370.

1)姜作发,马 波,尹家胜. 哲罗鱼生化遗传学研究[A]. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所,2002.

2)董崇志,马 波. 黑龙江乌苏里白鲑渔业生物学研究[A]. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所,2002.

Biochemical genetic structure in *Coregonus ussuriensis* Berg

MA Bo, SHI Lian-yu, DONG Chong-zhi

(Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China)

Abstract: Thirty wild individuals of *Coregonus ussuriensis* Berg, body length 30–40 cm, were collected from the middle reaches of Heilongjiang River in October 2001. The isozymes of LDH, MDH, ME, IDH, G3PDH, ADH, GDH, GPI, CAT, AAT, EST and SOD in their livers, muscles and other tissues were analyzed by using starch gel electrophoresis. The results show that the three loci in isozyme LDH all have appearance of gene copied, and the hybridization doesn't happen among the loci, but no appearance of loci copied or doubled happens in other loci isozymes. The 12 isozymes detected are determined by 26 loci, and among the 12, only *G3pdh*-1, *Pgi*-3, and *Est*-1 are polymorphic loci, and the proportion of polymorphic loci is 11.5%, the average heterozygosity per loci is 0.043. Compared with other species of fishes, *C. ussuriensis* Berg in biochemical genetics has very low varieties.

Key words: *Coregonus ussuriensis* Berg; isozyme; polymorphic loci

关于开展“2003 年度中国农学会优秀论文评选活动”的通知

各地涉农期刊社、编辑部,有关农业科研、教学单位:

发表学术论文是农业科技工作者阐述学术观点,展示学术成果,进行学术交流的重要手段之一。农业科技期刊发表的论文质量,不仅体现论文作者的自身价值,也直接影响到其办刊质量和学术交流水平。为了配合农业部“全国农业科技年活动”和中国科协开展的“优秀论文评选活动”,提高我国农业科技期刊的编辑质量和办刊水平,鼓励期刊多发表优秀论文;同时,引导和激励广大农业科技工作者多撰写高水平学术论文,中国农学会和中国期刊协会农业期刊分会决定,开展“2003 年度中国农学会优秀论文”评选活动。

现将有关事宜通知如下:

一、参评范围

本次评选,论文题材和内容范围不限。自 2001 年第 1 期起,凡在以下农业期刊上发表的学术论文,均可参评:中国农学会主办的期刊;中国农学会所属分会主办的期刊;中国农学会农业科技期刊分会所属的会员期刊;中国期刊协会农业期刊分会所属的会员期刊。准备投稿或尚未公开发表,但具有一定学术水平的研究论文、软科学论文和自选课题论文,也可以参评。

二、参评办法

已经公开发表的论文,由期刊社(编辑部)和作者联合申报获奖的,将分别予以奖励。由期刊社(编辑部)或作者独立申报获奖的,只进行单项奖励。作者个人申报尚未公开发表的论文,须有 2 名具有副高级职称以上同行专家的推荐意见和本人单位的签章。符合参评要求的论文,将由农业专家、期刊专家组成中国农学会优秀论文评审委员会,根据所刊期刊和论文所属学科的特点,从原始创新、学术水平、论文规范、编辑水平等方面进行评价。

三、奖励办法

本年度在全国范围内,共评选出农学各科优秀论文 100 篇。对获奖论文及其作者,不论论文是否公开发表,将由中国农学会颁发“2003 年度中国农学会优秀论文奖”奖励证书。获奖论文尚未发表的,还可按有关规定在《中国农学通报》正刊或增刊上予以发表。对于期刊社(编辑部)和作者联合申报的论文获奖的,除向作者颁发奖励证书外,还将由中国农学会、中国期刊协会农业期刊分会,对发表该论文的期刊和编辑加工该论文的编辑人员,颁发“中国农学会优秀论文编辑奖”奖励证书。在此基础上,中国农学会还将择优推荐一批获奖论文以及发表该文的期刊,参加 2004 年“中国科协期刊优秀学术论文”评选活动。(下转第 211 页)