

长江白鲢酯酶同工酶的类型与生长的相关性及其在原种保存中的应用

余来宁 方耀林 宁宗德 郑卫东 倪朝辉

(中国水产科学研究院长江水产研究所淡水鱼类种质资源与生物技术国家重点实验室, 沙市 434000)

摘要 用聚丙烯酰胺垂直板电泳分析了长江白鲢肝脏酯酶同工酶 (EST), 发现 9 种类型, (代号: A, B, C, D, E, F, G, H, I 型)。测得 9 种表型的频率分别为: 0.210, 0.095, 0.133, 0.048, 0.095, 0.057, 0.305, 0.019, 0.038。在 EST_3 和 EST_4 两个位点上存在多态性, 等位基因频率分别为: EST_3^{100} 0.571, EST_3^{92} 0.286, EST_3^0 0.143, EST_4^{100} 0.431, EST_4^0 0.274, EST_4^{93} 0.295, 通过生长能力测定, 五种常见表型的生长速度排列次序为: $B > A > C > G > E$, B 型比 E 型生长快 47.1%, 有显著差异。以酯酶为遗传标志, 指导长江白鲢原种的人工繁殖和原种保存, 有一定的理论意义和应用价值。

关键词 白鲢、长江、酯酶、同工酶、生长、遗传标志、原种保存

白鲢是我国重要的淡水养殖鱼类, 具有悠久的养殖历史和广泛的地理分布, 在养殖上有重要的经济价值。而长江则是白鲢最大的天然种质资源库。从群体遗传学的角度来看, 白鲢虽然已有 1300 多年的养殖历史, 但它并不是一种经过选育的纯种, 而仍然是具有多种等位基因存在的野生 (原种) 种群。根据哈代——温伯格遗传平衡定律: 在没有其它影响而随机交配的大群体中, 各种基因的基因频率都处于一种平衡状态, 基因频率在各代中保持不变。实际上长江白鲢就是这样的一种大群体。直至五十年代末期人工繁殖成功之前, 养殖上用的苗种基本上是从长江等大江河中捕捞获得的, 从种质方面讲, 这些苗种保持着原种的遗传结构, 当然遗传性状也是相对稳定的, 这正是白鲢长期以来能保持优良性状的内在原因。但一旦出现外来因素的干扰或者随机交配的基础被打破, 原有的平衡就会失去, 这一点已被事实所证实, 在白鲢人工繁殖技术广泛应用的近几十年来, 养殖上使用的大部分苗种由原来的天然苗种转变为人工繁殖的苗种, 而有些生产单位却在有限的小群体中进行近亲繁殖, 造成有些养殖群体的基因丢失和基因频率的改变, 破坏了种群的遗传平衡, 导致部分地区出现了白鲢的退化现象。这不能归罪于人工繁殖技术, 而最主要的原因是由于我们对白鲢原种种群的遗传结构和种质性状研究得太少, 同时还缺乏对种质监测的手段。因此, 加强研究长江白鲢种群的遗传结构, 找出一些明显而稳定的基因 (特别是具多态性的等位基因) 作为监测白鲢种群种质性状的遗传标记是十分必要的。

随着电泳同工酶技术的日臻完善, 国内外很多学者, 已将它作为研究种群生化遗传结构的重要手段^[1, 4, 5, 9], 近十几年来, 李思发 (1984, 1986, 1988, 1989), 吴力钊 (1989) 等人在白鲢种质方面作了不同程度的研究。本文在前人研究的基础上, 进一步

深入研究了长江白鲢酯酶同工酶的生化类型, 各类型的表型频率和等位基因频率, 以及五种常见表型的生长能力, 并以酯酶为遗传标记, 在长江白鲢的原种繁殖中进行了初步的应用。旨在探索出一条行之有效的人工条件下保存白鲢原种的途径, 并为今后生产上合理的进行白鲢的人工繁殖和良系选育提供参考依据。

材 料 与 方 法

(一) 材料鱼 所用白鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 系从长江中游石首江段捕捞的鱼苗。在沙市郊区的“鱼类种质人工生态库”中饲养而成。一部分白鲢为直接从长江中游江段捕捞的成鱼。

(二) 样品处理 将随机抽样的白鲢, 先测定体重、体长等形态学可数性状。然后从尾动脉抽血(抗凝)。最后解剖鱼体, 取出肝脏组织, 用生理盐水漂洗干净, 按重量比加5倍双蒸水, 在冰浴中, 用玻璃匀浆器匀浆, 10000g 离心 30 分钟, 取上清液置于-20℃冰室备用。

(三) 电泳条件 采用9%的聚丙烯酰胺凝胶垂直夹芯板电泳(电泳仪为北京六一仪器厂生产)。凝胶缓冲液为 pH8.9 的 Tris-HCl, 电泳电极缓冲液为 pH8.3 的 Tris-甘氨酸。电压 400V, 电泳 2 小时。

(四) 染色 按参考文献[2]的方法。

(五) 生长比较 同一批捕捞的长江鱼苗, 在同一池塘中经一段时间饲养, 随机抽样。编号测量体重和体长, 然后根据电泳酶谱分类, 分别计算各类型的平均体重, 进行比较分析。

(六) 基因位点和等位基因的命名 参照 Utter 等的方法, 文献[12]。

结 果 与 讨 论

(一) 长江白鲢肝脏酯酶同工酶的生化类型

酯酶 EST (EC3, 1, 1, 1), 一般多为单聚体酶类^[5, 9], 每条酶带是由单个基因控制的。很多鱼类的酯酶存在着多态性^[1, 5], 即在一个座位上有两个以上的等位基因存在。从长江白鲢肝脏酯酶同工酶的电泳图谱(图1), 可以看出, 所测样品中最多出现6条酶带, 有迁移率较慢而染色很深的2条带和迁移率较快染色较浅的4条酶带。分别由4个基因位点编码, 其中2个座位(EST₄, EST₃)具有多态性, 这与吴力钊(1989)研究的结果基本相同。染色很深的2条带, 由 EST₁, EST₂ 两个座位控制, 暂未发现多态性, 本文对它们不作讨论。为了便于分析, 我们将染色较浅具有多态性的4条区带部分, 绘制出模式图(图2)。从图2可以看出, 在抽样的105个样品中出现了9种不同的表现型。其中有4带型的一种, 三带型和二带型的各3种, 一带型的有2种, 分别编号为 A, B, C, D, E, F, G, H, I。表型 A 有4条区带, (即 4¹⁰⁰, 4⁹³, 3¹⁰⁰ 和 3⁹² 带), 是典型的杂合型。三带型的有 B, C, D 三种类型。表型 B 缺 3⁹² 带, C 型缺 4¹⁰⁰ 带, D 型缺 4⁹³ 带。二带型的有 E, F, G 三种表型, 表型 E 含 3¹⁰⁰ 和 3⁹² 带, F 型含 4⁹³ 和 3⁹² 带, G 型含 4¹⁰⁰ 和 3¹⁰⁰ 带。表型 H 仅含 4¹⁰⁰ 一条带。I 型仅含 3¹⁰⁰ 一条带。通过分析, 迁移率最快

(靠近阳极)的两条带 (4^{100} , 4^{93}) 由 EST_4 决定, 该位点有三个等位基因; EST_4^{100} , EST_4^{93} 和 EST_4^n , 其中 EST_4^{100} 与 EST_4^{93} 是该位点上的两个共显性等位基因。而 EST_4^n 为隐性无效等位基因 (Nallallele), 该基因不指导合成蛋白质, 当它为纯合态时, 电泳图谱中 EST_4 位点无带。另外迁移率较慢的两条带由 EST_3 决定, 该位点上也有三个等位基因, 即 EST_3^{100} , EST_3^{92} 和 EST_3^n , 其中前两者为共显性等位基因, EST_3^n 同 EST_4^n 一样也是隐性无效等位基因。从理论上推导, 由这样各含 3 个等位基因的两个位点控制的遗传, 应该有 16 种类型, 我们只测出了 9 种, 这可能是由于所测样品较少的原因, 也有可能是这两个位点有一定的连锁关系, 还有待于进一步的研究。

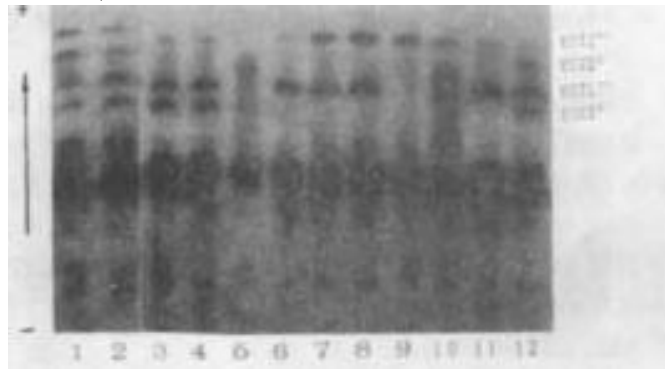


图 1 长江白鲢肝脏酯酶同工酶电泳图谱

Fig.1 Electrophoretogram of EST in silver carp

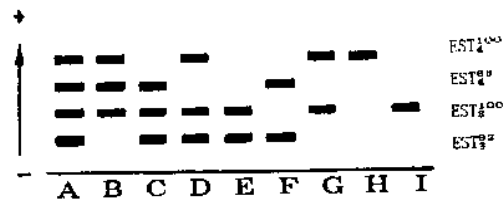


图 2 长江白鲢肝脏酯酶同工酶电泳模式图

Fig.2 The illustrated diagram of Fig. 1

(二) 长江白鲢肝脏酯酶同工酶的表型频率和等位基因频率

在 105 尾样品中, 目前共检出 9 种表型, 其表型分布和表型频率如表 1。对 EST_3 和 EST_4 两个位点上的等位基因频率进行了统计, 由于各位点上存在着隐性无效基因, 不便作 X^2 检验, 现仅将等位基因频率汇入表 2。

表 1 长江白鲢肝脏酯酶同工酶的表型分布和频率

Tab.1 Distribution and Frequency of EST phenotypes in the liver tissues of silver carp of Yangtze River

表型 Phenotypes	A	B	C	D	E	F	G	H	I	Total
观察值 No.obs.	22	10	14	5	10	6	32	2	4	105
表型频率 Frequency	0.210	0.095	0.133	0.048	0.095	0.057	0.305	0.019	0.038	1.000

表 2 长江白鲢肝脏酯酶同工酶等位基因频率

Tab.2 Allelic frequency of EST in the liver tissues of silver carp of Yangtze River

位 点 Locus	等位基因 Alleles	等位基因频率 Frequency	位 点 Locus	等位基因 Alleles	等位基因频率 Frequency
EST ₄	EST ₄ ¹⁰⁰	0.431	EST ₃	EST ₃ ¹⁰⁰	0.571
	EST ₄ ⁹²	0.295		EST ₃ ⁹²	0.286
	EST ₄ ⁰	0.274		EST ₃ ⁰	0.143

从表 1 可以看出: G 型出现频率最大为 0.305, 其次为 A 型 0.210。出现最少的是 H 型, 频率为 0.019。

从表 2 可以看出: 等位基因频率最大的是 EST₃¹⁰⁰ 为 0.571, 其次为 EST₄¹⁰⁰ 为 0.431, 频率最小的是 EST₃⁰, 0.143。

(三) 表型与生长的相关性

无论是从长江中渔获的白鲢, 还是池塘中饲养的白鲢, 总是有个体大小差异。人们曾试图从形态学上找到某些标志来挑选那些生长较快的个体, 但是, 至今仍没有较有效的方法。那么, 是否能利用酯酶作为遗传标志, 来选择具生长优势的品系呢? 这也是本试验的主要目的之一。

我们将长江中同批捕捞的白鲢鱼苗, 在池塘中同池养殖一段时间, 在生长期 7 个月和 11 个月时分两批随机抽样, 第一批为 57 尾, 第二批为 48 尾, 进行生长测定、编号, 然后根据电泳结果分类, 对出现频率较多的 5 种表型的生长情况, 进行了统计分析和比较。结果如表 3 所示。

表 3 长江白鲢五种表型生长能力比较

Tab.3 Comparison of the growth capacity of silver carp among 5 EST phenotypes

抽样 Sample 体重 Weight 表型 Phenotypes		第一批(生长期 7 个月) No. 7months growth		第二批(生长期 11 个月) No 2. 11 months growth		
		n	平均体重(克)±标准差 $\bar{X}(g) \pm Q$	与 E 型比增重百分比 (%)percentage of E type	n	平均体重(克)±标准差 $\bar{X}(g) \pm Q$
A		13	244.7 ± 72.5	11.7	9	655.6 ± 135.3
B		5	258.8 ± 60.3	18.2	5	706.2 ± 134.9
C		6	231.5 ± 30.2	5.7	8	585.8 ± 172.2
G		19	225.8 ± 31.9	3.10	13	573.1 ± 162.2
E		5	219.0 ± 21.6	0.00	5	480.0 ± 85.7
生长比较 Comparison of growth		B > A > C > G > E			B > A > C > G > E	

从表 3 我们可以看出, 在第一批抽样的样品中 (生长期为 7 个月), 各表型之间生长存在着差异, 但差异不大, 从直观看, 生长最快的 B 型经生长最慢的 E 型平均体重增长 18.2%。经统计分析和差异显著性检验 (T 检验), 5 种表型之间差异不显著,

($P < 0.05$)。但随着生长期的延长,各表型之间的差异却越来越大。在第二批抽样的样品中(生长期 11 个月)。B 型比 E 型生长快 47.1%,经差异显著性检验(T 检验),B 型与 E 型, A 型与 E 型,差异显著($P > 0.05$)。另外,我们发现,在两批样品中,各表型的生长快慢的排列次序均为: $B > A > C > G > E$ 。这进一步说明,各表型之间生长确实存在着差异,而且这种差异是有一定规律的。即长江白鲢 EST 的表型与生长有明显的相关性。

经分析和归纳说明:白鲢肝脏酯酶同工酶,区带多,等位基因呈杂合状态的类型(如 B, A 型),其一般生长较快,以此可以指导我们在生产和人工繁殖中,该如何选择亲本,以及如何根据亲本的类型进行配种。

(四)以白鲢肝脏酯酶同工酶为遗传标志在原种保存和繁殖以及生产中的应用

从群体遗传学的角度来看,保存原种,主要是保持种群的遗传结构,即保持种群的遗传平衡。在自然界中,一个大的随机交配群体,在没有其它因素干扰(如突变、迁移、扩散、选择)的情况下,其基因和基因频率将世代保持不变,即保持遗传平衡(哈代-温伯格定律)。但在人工繁殖情况下,就很难作到这一点,然而,如果我们能摸清种群的遗传结构,来监测和指导原种的繁殖,将能使我们在人工条件下保存原种,具有一定的计划性和预见性。从这点出发,我们选择了酯酶作为遗传标志,来进行长江白鲢原种的繁殖和保种的研究,试验中,选用了 A 型 $\times$ A 型, H 型 $\times$ I 型, G 型 $\times$ F 型, I 型 $\times$ I 型 4 种组合进行了繁殖。试验结果如表 4:

表 4 白鲢 4 种繁殖组合的 F1 代表型结果

Tab.4 EST phenotypes of F1 in 4 breeding combination of silver carp.

亲本组合 Breeding combination	基因型 Genotype	F1 代的表型 Phenotypes of F1
A δ $\times$ A φ	$4^{100}4^{93}3^{100}3^{92}$	A,B,C,D,E,F
G δ $\times$ F φ	$4^{93}3^{100} \times 4^{100}3^{92}$	A
H δ $\times$ I φ	$4^{100} / 3^n \times 3^{100} / 4^n$	G,H,I
I δ $\times$ I φ	$3^{100} / 4^n \times 3^{100} / 4^n$	I

通过表 4,可以看出,当用纯合态的 I 型(EST_3^{100})自交时,后代仍为 I 型。当用杂合型的 A 型($EST_4^{100}3^{100}3^{92}$)自交时,后代出现分离,出现多种类型(A, B, C, D, E, F, 而且以 A, B 型出现的次数为多,当用纯合型的 G 型与 F 型交配时,后代出现 1 种表型 A。通过分析,进一步证明,在 EST_3 , EST_4 两个基因位点上却存在着一对共显性的等位基因和一个隐性无效基因。根据以上遗传规律,我们可以根据繁殖的目的来进行白鲢的人工繁殖。如果以原种保存为目的,我们可选择具备多种等位基因的表型作为繁殖亲本,使后代基因库丰富,表型多样,而且尽量保持各种等位基因频率不变。避免选用那些单纯缺乏等位基因的个体进行繁殖,否则,将会丢失很多的等位基因,使遗传结构和遗传平衡遭到破坏。如果繁殖后主要用于生产为目的,可以选用一定的基因型个体作为亲本,使繁殖的后代为生长快的 A 型和 B 型,这样可以大幅度提高产量,今后可以将 A, B 型作为良系培育,用于生产。因此,以白鲢酯酶作为遗传标志,在原种保存和繁殖以及优良品系的选育上应用均有较大的价值。另外,以白鲢酯酶作为遗传标志,可以监测生产单位

养殖群体的遗传结构, 辨别群体遗传结构是否合理, 这对指导和改进白鲢的养殖生产也有较大的实践意义。

参 考 文 献

- [1] 李思发等, 1990. 长江、珠江、黑龙江鲢、鳙、草鱼种质资源研究. 上海科学技术出版社。
- [2] 北京大学生物系遗传学教研室, 1993. 遗传学实验方法和技术. 高等教育出版社。
- [3] 王强, 沈俊宝, 1991. 白鲢的同工酶研究. 遗传, 13 (3): 22-23。
- [4] 黄炳权, 陆士伟, 1983. 水稻酯酶同工酶EST₃位点的遗传. 遗传学报, 10 (6): 459-464。
- [5] 朱蓝非, 蒋一珪, 1987. 银鲫种内的遗传标记及其在选种中的应用. 水生生物学报, 11 (2): 105-109。
- [6] 钱德杞等, 1982. 遗传学基础和育种原理. 农业出版社。
- [7] 王祖熊, 刘峰, 1985. 白鲢不同繁殖群体中乳酸脱氢酶 (LDH) 和酯酶 (EST) 同工酶个体发生多态性的研究. 水生生物学报, 9 (3): 285-292。
- [8] 仇潜如等, 1991. 主要淡水养殖鱼类种质研究. 中国科学技术出版社。
- [9] 张辉等, 1993. 鲤铁蛋白和血清酯酶多态性研究. 水生生物学报, 17 (3): 278-281。
- [10] McAndrew, B. J. and K. C. Majumdar, 1983. Tilapia stock identification using electrophoretic markers. Aquaculture, 30(1-4): 249-261.
- [11] Valenta, M., 1978. Protein polymorphism in European fish species of the cyprinidae family and utilization of polymorphic proteins for breeding in fish, 37-78. In Olah, J. and Z. krasznai (eds) Increasing the productivity of fishes by selection and hybridisation. Szarvas, Hungary.
- [12] Utter F, Aebersold P, Winans G, Interpreting genetic variation detected by electrophoresis. PP. 21-47. in: Population Genetics and Fishery Management. Edited by Ryman and Utter. University of Washington Press, Seattle, 1987.

CORRELATION BETWEEN PATTERNS OF ESTERASE ISOZYME AND GROWTH IN SILVER CARP (*HYPOPHthalmichthys molitrix*) FROM YANGTZE RIVER AND ITS APPLICATION TO ORIGINAL BRED PRESERVATION

Yu Laining Fang Yaolin Ning Zongde Zheng Weidong Ni Zhaohui

(State Key Laboratory of Freshwater Fish Germplasm Resources & Biotechnology,
Yangtze River Institute of Fishery, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shashi 434000)

ABSTRACT Polyacrylamide gel electrophoresis analyses shows that there are nine patterns of esterase isozyme (EST) in the liver tissue of silver carp from the Yangtze River, namely patterns A, B, C, D, E, F, G, H, I. The frequencies measured for the nine patterns are 0.210, 0.095, 0.133, 0.048, 0.095, 0.057, 0.305, 0.019, and 0.038, respectively. There exists polymorphism in both EST3 and EST4 loci. The allelic frequencies for

EST_3^{100} , EST_3^{92} , EST_3^n , EST_4^{100} , EST_4^n and EST_4^{93} , are 0.571, 0.286, 0.143, 0.431, 0.274 and 0.295, respectively. Growth performance determination demonstrates that the order of growth rates for the five common phenotypes is $B > A > C > G > E$. The individuals with pattern B grow faster than those with pattern E by 47.1%, indicating a significant difference. Thus, the use of esterase as genetic marker has a theoretical significance and a practical value in directing the artificial propagation and preservation of the original breed of silver carp from the Yangtze River.

KEY WORDS Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), Yangtze River, Esterase, Isozyme, Growth, Genetic marker, Original breed preservation