

文章编号: 1000-0615(2007)04-0539-06

· 研究简报 ·

5 个虹鳟群体的生化遗传分析

庞艳红¹, 孙中武¹, 尹洪滨², 王炳谦²

(1. 东北林业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040;

2. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070)

关键词: 虹鳟; 群体; 同工酶; 遗传结构; 遗传变异

中图分类号: S 917 文献标识码: A

Biochemical genetics among 5 populations of rainbow trout

PANG Yan-hong¹, SUN Zhong-wu¹, YIN Hong-bin², WANG Bing-qian²

(1. Northeast Forestry University, College of Life Sciences, Harbin 150040, China;

2. Heilongjiang River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China)

Abstract: The levels of genetic variation at 40 genic loci of 15 isozymic systems in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) were determined among Donaldsons super rainbow trout, rainbow trout from California of USA, rainbow trout from Norway, rainbow trout from Denmark, and Jalo rainbow trout respectively. The genetic parameters would be important in selective breeding programs. As a main research means, the discontinuous vertical plate polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was used to analyze the biochemical genetics status of 5 populations of rainbow trout. The P of 5 populations of rainbow trout ranged from 43.24% to 47.37%; the H_e' of 5 populations of rainbow trout ranged from 0.1917 to 0.2178; the H_o' ranged from 0.2703 to 0.3291; the D ranged from 0.4100 to 0.5331; the N_e ranged from 1.4865 to 1.5385. The chi-Square test showed all polymorphic loci from the 5 populations of rainbow trout were in Hardy-Weinberg equilibrium. Various genetic indexes showed that resource quality of the 5 populations of rainbow trout resource quality was still good. Phylogenetic tree showed rainbow trout from Norway, rainbow trout from Denmark, rainbow trout from California of USA and Donaldsons super rainbow trout belonged to the same clade, and Jalo rainbow trout belonged to another clade.

Key words: rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*); population; isozyme; genetic structure; genetic variation

虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 系山河流中的冷水性鱼类, 属鲑形目、鲑科、大麻哈鱼属。从 20 世纪 90 年代起, 黑龙江水产研究所陆续从国外引种芬

兰虹鳟、道氏虹鳟、挪威虹鳟、丹麦虹鳟和美国加州虹鳟, 经多年选育养殖成功, 为我国冷水鲑鳟增殖及游钓业增加了新品种。目前, 关于虹鳟生

收稿日期: 2006-10-23

资助项目: 国家技术基础条件平台建设项目(2004DKA30470-005); 国家科技攻关项目(2004BA526B0111)

作者简介: 庞艳红(1982-), 女, 山西太原人, 硕士, 主要从事生物化学研究。Tel: 0451-82190621, E-mail: pangyanhong@163.com

通讯作者: 孙中武, Tel: 0451-82190621, E-mail: szw511123@yahoo.com.cn

殖^[1-2]、发育^[3]、病理^[4]、以及遗传标记^[5-6]等方面的研究均有报道,而这5个品系虹鳟的研究多见于育种^[7]和生殖生理^[8-9]等方面,有关它们的生化遗传学研究未见报道。本研究采用同工酶电泳分析技术对5个虹鳟养殖群体的生化遗传结构进行初步研究,比较了这5个虹鳟群体的遗传差异,并对它们的亲缘关系进行分析。同工酶分析技术以其实验结果稳定、可操作性强等特点在鱼类的种质资源、遗传育种、遗传标记等研究中广泛运用。比起直接在DNA水平研究物种的遗传多样性,同工酶分析则能从酶基因角度对物种的遗传多样性研究,建立基因库和复壮濒危种提出有遗传学根据的建议^[10]。本研究以期对虹鳟系统研究积累遗传学资料,同时为它们的人工增殖、品种改良及其遗传多样性的保护提供理论依据,加速虹鳟养殖业的推广和发展。

1 材料与方 法

1.1 材 料

本实验所用5个虹鳟群体样本均取自黑龙江水产研究所渤海冷水鱼实验站,是由国外引进不同品系虹鳟经过多年选育而得的成鱼。其中道氏虹鳟60尾,全长(587.5±12.5)mm;挪威虹鳟60尾,全长(445.2±15.2)mm;丹麦虹鳟60尾,全长(525.1±13.4)mm;美国加州虹鳟60尾,全长(426.7±26.7)mm;芬兰虹鳟60尾,全长(381.4±23.6)mm。所取样本均用于实验。

1.2 实验方 法

样本活体解剖后取其眼睛、肝脏、肾脏3种组织,低温保存。样品制备、电泳及染色采用参考文献^[11]的方法而稍加修改。同工酶的命名及谱型分析依据参考文献^[12]的方法稍加修改。凝胶成像及分析采用GeneGenius凝胶分析系统。

1.3 基因变异的量度

多态座位比例(P)等相关生化遗传参数的计算依据参考文献^[12]和^[13]的方法。

2 结果与分析

2.1 5个虹鳟群体同工酶的表达

实验测定了5个虹鳟群体的15种同工酶,共检测出40个基因座位。

醇脱氢酶(ADH E.C.1.1.1.1) ADH为二聚体,共3个位点。Adh-1上有1个等位基因

a,Adh-2上有3个等位基因b、c、d,Adh-3上有唯一的等位基因e。此酶的组织特异性比较强(图1-1)。

α -淀粉酶(α -AMY E.C.3.2.1.1) α -AMY是由1个位点编码的单体酶。道氏虹鳟,美国加州虹鳟,挪威虹鳟,丹麦虹鳟的肝脏中位点 α -Amy基因型为ab。另外在丹麦虹鳟和芬兰虹鳟的眼睛中基因型为aa。5个虹鳟群体的肝脏中 α -AMY活性极高(图1-2)。

过氧化氢酶(CAT E.C.1.11.1.6) CAT为二聚体,由2个基因位点编码,均为单态。在5个虹鳟群体的眼睛中Cat-2基因型为bb。5个群体的肝脏中Cat-1和Cat-2基因型为aa,bb。在美国加州虹鳟的肾脏中只有Cat-2位点,基因型为bb。其他4个群体的肾脏中Cat-1和Cat-2位点基因型分别为aa,bb(图1-3)。

细胞色素氧化酶(COX E.C.1.9.3.1) COX为二聚体。在芬兰虹鳟的肾脏中Cox-1,Cox-2上的基因型为aa,bb,而在其他4个群体的肾脏中基因型为bb(图1-4)。

酯酶(EST E.C.3.1.1.1) EST为单体酶,共有4个位点。每个位点上都有2个等位基因。Est-1在5个群体的肝脏、肾脏中表现出的基因型都为ab。Est-2在5个群体的眼睛、肝脏、肾脏中表现的基因型分别为cc,cd,cc。Est-3在5个群体的眼睛中均没有表达。而Est-4在它们的眼睛、肝脏、肾脏中基因型分别为gh,gh,hh(图1-5)。

甲酸脱氢酶(FDH E.C.1.2.1.2) FDH为二聚体,共3个基因位点。Fdh-1仅在5个虹鳟群体的眼睛中有表现,基因型都为ab。Fdh-2、Fdh-3在不同个体间表现出明显的差异性(图1-6)。

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH E.C.1.1.1.49) G6PDH为二聚体,有3个基因位点。G6pdh-1在道氏、挪威、丹麦虹鳟肾脏中的基因型为aa。G6pdh-2在道氏虹鳟的眼睛、肝脏、肾脏中的基因型都为bb,在美国加州虹鳟的眼睛、肝脏、肾脏中基因型分别为cc,bc,bb,而在挪威、丹麦、芬兰虹鳟的三种器官中基因型都分别为bc,bc,bb。G6pdh-3在5个群体中的基因型都为ff,ef,ef(图1-7)。

谷氨酸脱氢酶(GDH E.C.1.4.1.2) GDH为四聚体,有3个基因位点。Gdh-1仅在5个群体的眼睛和丹麦虹鳟的肾脏中基因型为aa。Gdh-2

在它们的眼睛中基因型都表现为 bd,在肝脏和肾脏中基因型都为 ee(图 1-8)。

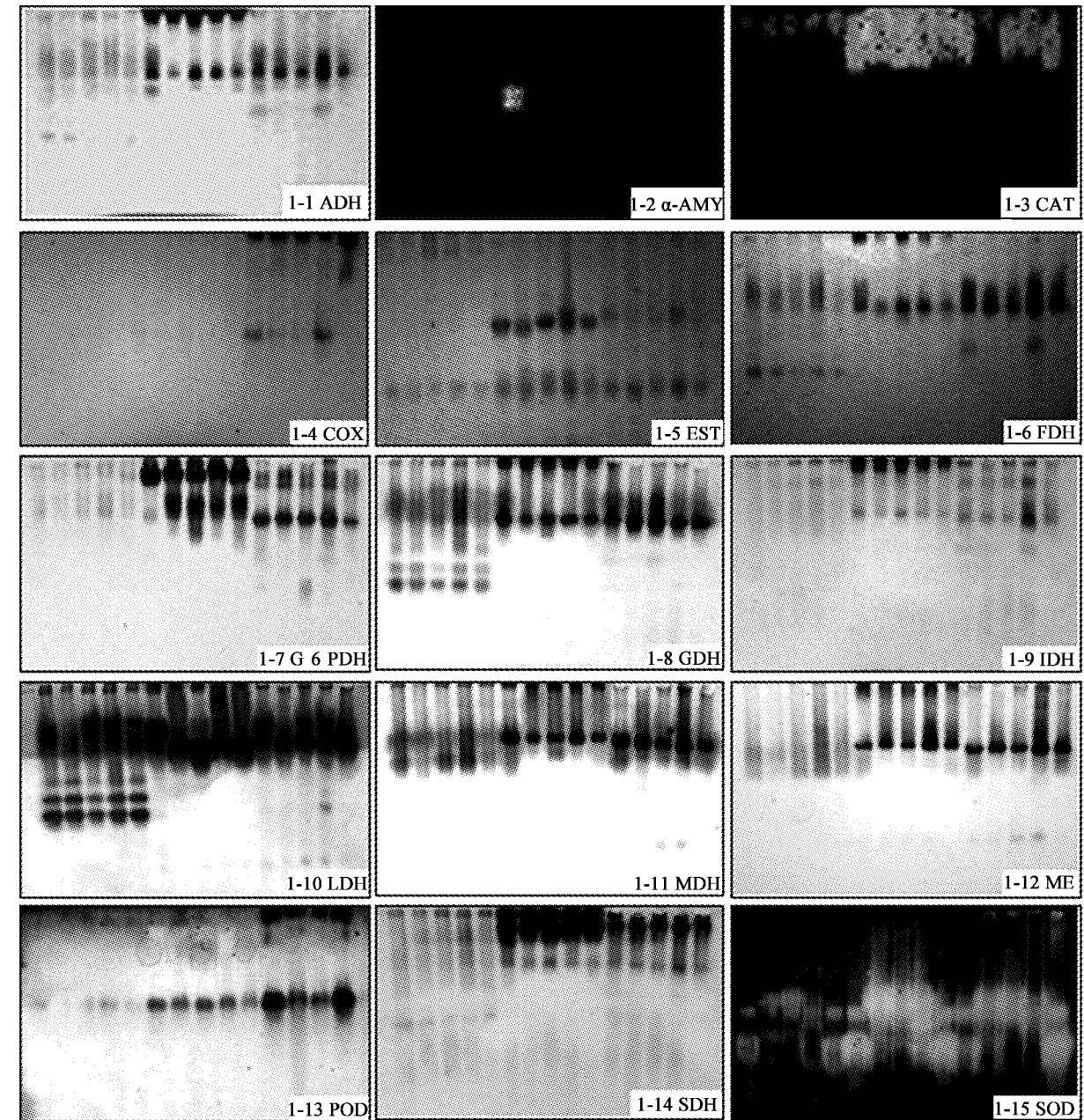


图 1 5个虹鳟群体 15种同工酶电泳图谱

Fig.1 15 isoenzyme electrophoregrams of five populations of rainbow trout

每幅电泳图谱从左至右,1~5、6~10和11~15分别为5个虹鳟群体的眼睛、肝脏和肾脏组织样品,排序依次为道氏虹鳟、美国加州虹鳟、挪威虹鳟、丹麦虹鳟、芬兰虹鳟

Each isoenzyme electrophoregram from left to right,1-5,6-10 and 11-15 samples were eyes, livers and kidneys samples about 5 populations of rainbow trout. The order is Donaldsons super rainbow trout, rainbow trout from California of USA, rainbow trout from Norway, rainbow trout from Danmark and Jalo rainbow trout

异柠檬酸脱氢酶(IDH E. C. 1. 1. 1. 42) IDH为二聚体,共2个位点。Idh-1位点除在道氏

虹鳟的眼睛中没表达,在其他组织中5种虹鳟均表现出了相同的基因型。Idh-2在5种虹鳟的3

种组织中基因型都为 cc(图 1-9)。

乳酸脱氢酶(LDH E.C.1.1.1.27) LDH 为四聚体,共 3 个位点,5 个虹鳟群体的眼睛中有重复位点表现。Ldh-1 在肾脏中基因型都为 aa。Ldh-2 在 5 个群体的眼睛和丹麦虹鳟的肾脏中基因型都为 bc + cd,其他组织中为 cd。Ldh-3 在 5 个群体的所有器官中基因型都为 ee(图 1-10)。

苹果酸脱氢酶(MDH E.C.1.1.1.37) MDH 为二聚体,有 3 个位点。Mdh-1 除芬兰虹鳟的肾脏中没表达外,在其余 4 个群体的肾脏中基因型均为 aa。Mdh-2、Mdh-3 在 5 个群体之间酶谱没有表现出差异(图 1-11)。

苹果酸酶(ME E.C.1.1.1.40) ME 为四聚体,共 3 个位点,每个位点上有 1 个等位基因。眼睛中表现的酶活性比较低。Me-1 在除芬兰虹鳟的其余 4 种虹鳟肾脏中基因型为 aa。Me-2、Me-3 在 5 个群体的酶谱间无差异(图 1-12)。

过氧化物酶(POD E.C.1.11.1.7) POD 为二聚体,共 2 个位点。Pod-1 除美国加州虹鳟的眼睛中没表现外,在其余虹鳟中基因型都为 aa,活性较弱。Pod-2 除在芬兰虹鳟的肾脏中没表现外,其余虹鳟基因型都为 bb(图 1-13)。

山梨醇脱氢酶(SDH E.C.1.1.1.14) SDH 为二聚体,共 3 个位点。Sdh-1 在 5 个群体的

眼睛中基因型为 aa。Sdh-2 在它们的 3 种器官中基因型都为 bb。而 Sdh-3 除在道氏虹鳟的眼睛中表现为 dd 外,在其余的器官中都为 cd(图 1-14)。

超氧化物歧化酶(SOD E.C.1.15.1.1) SOD 为二聚体,共 3 个位点。Sod-1 上有等位基因 a,b。Sod-2 有等位基因 c,d。Sod-3 有 3 个等位基因 e,f,g。3 个位点上的等位基因编码的酶带都表现出明显的组织和个体差异性(图 1-15)。

2.2 5 个虹鳟群体遗传变异的度量

群体内遗传变异的度量 5 个虹鳟群体遗传学多样性进行评估的参数指标见表 1。美国加州虹鳟多态座位比例最高,位点有效基因数也仅次于挪威虹鳟和丹麦虹鳟。这 5 个群体的种群平均杂合度的观测值与预期值之比(H_o'/H_e')均大于 1,其中以道氏虹鳟最高,表明其杂合子相对过剩最明显。5 个群体的 Hardy-Weinberg 遗传偏离指数(d)都为正值,其中道氏虹鳟值最大,表明其具有较高的遗传变异水平。 χ^2 检验表明 5 个群体多态座位基因频率均符合 Hardy-Weinberg 平衡。在 5 个群体中挪威虹鳟与丹麦虹鳟的 N_e 值最大。而在各度量指标中,芬兰虹鳟均处于末位,表明芬兰虹鳟在这 5 个品系中表现出相对较低的遗传多样性。如不加以足够的重视,其品质可能有退化的趋势。

表 1 5 个虹鳟群体内遗传变异的主要度量指标

Tab.1 Genetic variability in 5 populations of rainbow trout

鱼种 species	P	H_o'	H_e'	H_o'/H_e'	D	N_e
道氏虹鳟 Donaldsons super rainbow trout	43.59%	0.3034	0.1979	1.5331	0.5331	1.4872
美国加州虹鳟 rainbow trout from California of USA	47.37%	0.2982	0.2050	1.4546	0.4546	1.5263
挪威虹鳟 rainbow trout from Norway	46.15%	0.3077	0.2040	1.5083	0.5083	1.5385
丹麦虹鳟 rainbow trout from Danmark	46.15%	0.3291	0.2178	1.5111	0.5110	1.5385
芬兰虹鳟 Jalo rainbow trout	43.24%	0.2703	0.1917	1.4100	0.4100	1.4865

群体间遗传变异的度量 根据 Nei(1972) 公式得出 5 个虹鳟群体的遗传学一致度(I)和遗传距离(D)(表 2)。丹麦虹鳟与挪威虹鳟的生化遗传一致度最高,遗传距离最小;而芬兰虹鳟与挪威虹鳟遗传一致度最低,相互间的遗传距离最大。

根据 5 个虹鳟群体的遗传一致度对它们进行聚类分析。

从构建的 5 个虹鳟群体的 UPGMA 聚类关系图(图 2)得出,挪威虹鳟、丹麦虹鳟、美国加州虹

鳟、道氏虹鳟为同一聚类支,芬兰虹鳟为另一聚类支。通常,种内群体间的遗传一致度 ≥ 0.90 ,属内种间的遗传一致度 ≤ 0.67 ^[12]。通过聚类可知这 5 个虹鳟群体的关系属于同一种内不同群体间的关系,为种群一级差异。

3 讨论

3.1 5 个虹鳟群体的遗传变异

多态座位比例是群体遗传多样性的一个重要指标。据报道鱼类多态座位比例最高的可达

50%,最低的只有9%^[14]。与已报道的其他鱼类相比,本文检测的5个虹鳟群体的多态座位比例远高于一般水平。其中,美国加州虹鳟多态座位

比例最高。由于美国加州虹鳟是2001年在国内首次引进,2004年实现人工繁殖,养殖时间较短,所以保留了原种的优良性状。

表2 5个虹鳟群体遗传一致度(左下角)与遗传距离(右上角)

Tab.2 Genetic identity (below diagonal) and genetic distance(above diagonal) between 5 populations of rainbow trout

群体 group	道氏虹鳟 Donaldsons super rainbow trout	美国加州虹鳟 rainbow trout from California of USA	挪威虹鳟 rainbow trout from Norway	丹麦虹鳟 rainbow trout from Denmark	芬兰虹鳟 Jalo rainbow trout
道氏虹鳟 Donaldsons super rainbow trout		0.0473	0.0246	0.0284	0.0937
美国加州虹鳟 rainbow trout from California of USA	0.9538		0.0182	0.0297	0.0833
挪威虹鳟 rainbow trout from Norway	0.9757	0.9820		0.0108	0.0999
丹麦虹鳟 rainbow trout from Denmark	0.9720	0.9708	0.9893		0.0959
芬兰虹鳟 Jalo rainbow trout	0.9106	0.9201	0.9049	0.9086	

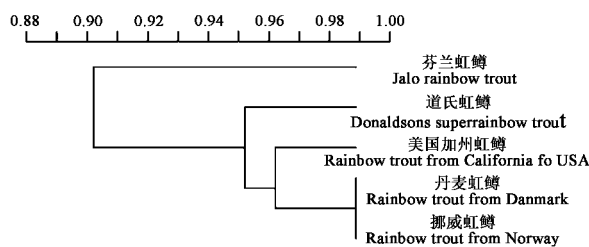


图2 5个虹鳟群体的聚类图
Fig.2 The UPGMA dendrogram of 5 populations of rainbow trout

位点平均杂合度是评估鱼类群体遗传变异最简单直接、最富信息的参数。据Avisé^[15]报道,鲤科鱼类的平均杂合度为0.052,李思发等^[16]报道长江、珠江、黑龙江水系鲢、鳙、草鱼8种群体的杂合度在0.0454~0.1133之间。与上述数据相比,本研究的5个群体的杂合度在0.1917~0.2178之间,种群平均杂合度均处于很高的水平,5个虹鳟群体有较丰富的遗传变异。在遗传上具体体现在多态座位的等位基因多(ADH-2、G6pdh-2、GDH-2、LDH-2、SOD-3上均有3个等位基因),杂合度高。

进行群体生化遗传结构研究时,一般要检验多态座位的基因型分布是否符合Hardy-Weinberg遗传平衡^[12]。5个虹鳟群体多态基因座位经 χ^2 检验后, $P(\chi^2)$ 值均大于 $P(0.05)$,表明5个群体多态座位的基因型分布均符合Hardy-Weinberg遗传平衡。另外,遗传偏离指数(d)也能正确、全面地反映群体的遗传平衡状况。5个虹鳟群体的d值在0.4100~0.5331之间,均为正数。其中道氏

虹鳟偏离零值最远,表明其基因型分布偏离平衡状态较大,具有较高的遗传变异水平。5个群体的 H_o'/H_e' 值均大于1,属杂合子过剩状态,其中以道氏虹鳟最高,表明其杂合子相对过剩最明显。本研究的道氏虹鳟在黑龙江水产研究所渤海冷水性鱼增殖试验站养殖已久,作为一个传统的优良养殖品种,该品系仍保持良好的种质状况。可见道氏虹鳟的繁育及增殖养殖方面的经验是值得肯定的。

5个虹鳟群体的位点有效等位基因数(N_e)为1.4865~1.5385,在目前硬骨鱼类的多样性($N_e = 1.16 \sim 1.58$)研究资料^[17]中均处于上限值,说明5个虹鳟群体的遗传多样性都处于较高水平。从5个虹鳟群体内主要的遗传学度量参数来看,虹鳟的这5个群体的各参数值在鱼类中均处于较高水平,遗传多样性较高。说明目前这5个群体的繁育方式较为可行,能使它们的种质资源状况维持在较好的状态。这提示我们,在虹鳟原种场的建设和保种工作中要加强不同种群之间的基因交流,定期更换亲鱼,实施科学的遗传管理措施,长期保持虹鳟的生物多样性。

3.2 5个虹鳟群体在遗传学上的相互关系

表2结果显示,丹麦虹鳟与挪威虹鳟亲缘关系最近,芬兰虹鳟与挪威虹鳟亲缘关系最远。根据群体间生化遗传学差异分析,在鱼类遗传育种时,可有意识地选择遗传差异大的群体进行杂交,其子代可在生长性能、抗病性能等方面表现出较大的杂交优势^[18]。这提示我们,在人工繁殖选择

虹鳟亲鱼时,要尽可能避免近亲交配,避免因为小群体亲鱼繁育产生的瓶颈效应导致遗传多样性降低,从而造成养殖虹鳟的种质衰退。因此,可以考虑将遗传差异最大的芬兰虹鳟与挪威虹鳟进行杂交,来获得具有杂交优势的新品种。5个群体之间的亲缘关系研究,为预测杂交育种效果提供参考依据,可以避免盲目的或不必要的品系间试验检测工作。目前,我国的虹鳟养殖已经初具规模。然而,由于在生产方式和养殖技术等方面的不规范性或随意性,造成鲑鳟鱼生产性能低,品质差,难以达到国际水准。迄今为止,我国尚未建立起理想的鲑鳟鱼优良品种选育体系。本研究的5个品系的虹鳟均由国外引进,虽然其遗传多样性指标尚处于较高水平,但若想使其长期保持下去,需根据它们种质资源状况不断地改善其选育及养殖方式。

参考文献:

- [1] Deng G Y, Chen L Q, Wang X M. Sex reversal and gonadal development of triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2001, 47(1):71-78.
- [2] 王炳谦,徐连伟,贾钟贺.热休克诱导全雌虹鳟三倍体[J].水产学杂志,2005,18(2):22-27.
- [3] 黄金善,范兆廷,贾忠贺.沉性大卵径鱼卵的观察方法与虹鳟的胚胎发育[J].经济动物学报,2005,9(4):235-238.
- [4] Hou Y Y, Han X D. Effects of estradiol-217 β on immunocompetence in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2001, 47(3):285-291.
- [5] Concepcion B, Helda A, Mar F. DNA Fingerprint Comparison of rainbow Trout and RTG-2 Cell Line Using Random Amplified Polymorphic DNA [J]. *Ecotoxicology*, 2001, 10:115-124.
- [6] Takashi S, Roy G, Nobuaki O, et al. Linkage analysis of quantitative trait loci associated with spawning time in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Aquaculture*, 1999, 173:33-43.
- [7] 王丙乾,贾钟贺,徐连伟.日本金鳟(*Oncorhynchus mykiss*)和道氏虹鳟及其杂交后代生产性能的比较研究[J].水产学杂志,2005,18(1):38-42.
- [8] 张涛,章龙珍,庄平.美国金鳟和日本鳟精浆的化学组成和渗透压[J].海洋渔业,2006,28(1):1-4.
- [9] 牟振波,徐革锋,黄金善.金鳟和道氏虹鳟耗氧率和窒息点的比较研究[J].东北农业大学学报,2005,36(3):345-349.
- [10] 王中仁.等位酶分析的遗传学基础[J].生物多样性,1994,2(3):149-156.
- [11] 周宗汉,林金榜,朱婉华.介绍鱼类组织中蛋白质及同工酶的电泳方法[J].淡水渔业,1983,2:35-40.
- [12] 王中仁.植物等位酶分析[M].北京:科学出版社,1996:95-106.
- [13] 熊全沫.同工酶电泳数据的分析及其在群体遗传上的应用[J].遗传,1986,8(1):1-5.
- [14] 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:上海科学技术出版社,1998:71-90.
- [15] Avise D G. Evolutionary genetics of fishes[M]. New York and London: Plenum Press, 1984:561-590.
- [16] 李思发,吴力钊,王强.长江、珠江、黑龙江鲢、鳙、草鱼种质资源研究[M].上海:上海科学技术出版社,1990:49-101.
- [17] 毕冰,尹洪滨,孙中武,等.怀头鲢的同工酶[J].东北林业大学学报,2006,34(3):67-69.
- [18] 徐成,王可玲,尤锋.鲑鱼群体生化遗传学研究[J].海洋与湖沼,2001,32(1):42-49.