

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*

李思发

(上海水产大学)

王强 陈永乐

(黑龙江水产研究所) (珠江水产研究所)

摘要 用 LKB 平板电泳仪聚丙烯酰胺凝胶电泳测定了长江、珠江及黑龙江的鲢、鳙及草鱼的原种 8 个种群 16 个酶位点的遗传变异。同种鱼不同水系种群之间存在着明显的生化遗传差异。长江、珠江、黑龙江鲢鱼种群的多态位点的比例分别是 13.3%、26.7%、13.3%，平均杂合度分别是 0.0493、0.0484、0.0511；长江、珠江鳙鱼种群的多态位点的比例都是 31.3%，平均杂合度分别是 0.1375、0.0977；长江、珠江、黑龙江草鱼种群的多态位点比例分别是 30%、38%、23.1%，平均杂合度分别是 0.1241、0.0961、0.0525。南方种群的多态位点比例有比北方的高的趋向。长江鲢—珠江鲢，长江鲢—黑龙江鲢，珠江鲢—黑龙江鲢的遗传相似度依次是 0.9957、0.9955 及 0.9696；长江鳙—珠江鳙的遗传相似度是 0.9955；长江草鱼—珠江草鱼，珠江草鱼—黑龙江草鱼，长江草鱼—黑龙江草鱼的遗传相似度依次是 0.9679、0.9483 及 0.9324。长江种群与珠江种群这两个中央群体间的遗传差异较小，边缘群体黑龙江种群与中央群体长江、珠江种群间的遗传差异较大。黑龙江草鱼种群很小，其资源的保护工作应引起注意。

主题词 长江, 珠江, 黑龙江, 鲢, 鳙, 草鱼, 种群, 电泳, 同工酶, 蛋白质, 位点, 等位基因, 多态, 杂合度, 遗传相似度, 遗传距离

鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙(*Aristichthys nobilis*)及草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)是我国特产鱼类,为中国江河平原鱼类的代表。它们主要分布于长江、珠江、黑龙江等江河及附属水体,既是淡水捕捞的主要对象,更是我国淡水养鱼的重要对象,无论在池塘养鱼,还是在湖泊水库养鱼的产量中,都占有很大的比重。它们在长江和珠江中的鱼苗资源,在 1958 年以前,一直是鲢、鳙、草鱼养殖业的唯一苗种来源。自 1958 年人工繁殖成功之后,从江河中张捞的鱼苗在苗种供应中虽已退居次要地位,但仍然是各地更新或补充人工繁殖亲鱼群体的主要来源。总之,鲢、鳙、草鱼的天然资源在任何时候都是我国宝贵的物种资源。但对这些重要鱼类资源的种群遗传结构从未作过研究。近二十年

* 本文是国家鱼类繁育攻关研究课题的部分结果,上海水产大学得到国际科学基金会(International Foundation for Science)科研项目 A/507 的资助。上海水产大学蔡正纬、何希、陆伟民、周碧云等同志曾参加部分工作。张敏同志拍摄照片。黑龙江水产研究所李丽坤同志做了大量工作。上海第一医科大学费正同志协助扫描。文稿承中国科学院海洋研究所王可玲同志审阅并提出意见。特此一并致谢。

来,由于水利建设及江河污染等各种原因,这些鱼类的资源正处于严重衰退之中;部分江河已开始人工放流或放养,但这样做时,对其遗传学后果缺乏周密的研究,对于原产种群和放流种群可能产生的影响难以预测,致使原种种群的基因资源有遭到遗传污染的可能。在这种情况下,对我国鲢、鳙、草鱼原种的生化遗传结构及变异进行研究是极为必要的。

本研究旨在测定分析长江、珠江及黑龙江的鲢、鳙、草鱼的生化遗传结构及其变异特点,以期为保护和利用物种资源或基因资源及开展遗传改良工作提供遗传学的根据。上海水产大学从1982年开始准备和试验,并从上述三条江河采集标本进行分析。此后,黑龙江水产研究所、珠江水产研究所也先后在黑龙江或珠江采集标本和分析。为保证研究结果的可比性与可靠性,1985年,三个单位的有关人员决定按统一要求和标准,从三条江河分别采集标本,在上海水产大学使用同一仪器和同一方法集中进行测定和分析。本文所报道的,就是在1982至1984年研究基础上,1985年的研究结果。

材料与方 法

1. 标本的采集与保存

在长江的湖口江段,珠江的桂平江段及黑龙江的抚远至同江江段(图1),于5—7月间采集鲢、鳙、草鱼的成鱼标本。测定标本鱼的长度、体重及性别等。在鱼尚未死亡之前,用剪刀剪断腹大动脉放血,随即取背侧的白肌和肝脏各5—10克,眼球一颗,分别置于小塑料袋内,编号,放入液氮罐保存。运达室内后,转移至低温冰箱,于 -25°C 条件下保存。

由于黑龙江原无鳙鱼,只是自1952年从南方移养后,少数鳙鱼流窜入江,此后才有时捕到大个体鳙鱼,并且也发现有小个体鳙鱼,不过尚不清楚是否已在江中自行繁殖。由于黑龙江鳙鱼数量极少,故没有列入原种研究分析。所以,本研究的对象为长江和珠江的鲢、鳙、草鱼及黑龙江的鲢、草鱼,共8个种群。在未弄清这三条江河中有无不同的亚(种)群之前,我们把标本采集地限止在上述江段,并把在这些江段捕到的鱼视为该江的原种。

2. 电泳方法

称取肌、肝组织样品0.2—0.3克,眼球的水晶体则全部摘出,按3:1比例(体积/重量)加入30%辅酶I液,匀浆。肌肉组织低温(5°C)离心(15000转/分)20分钟。肝组织离心两次,第一次10分钟,吸出油面下的清液再离心20分钟(两次均为 5°C ,15000转/分)。上清液 4°C 保存。使用期不超过次日。

电泳使用瑞典LKB公司产平板电泳仪及4%聚丙烯酰胺凝胶。上清液与溴酚蓝蔗糖混合后点样。每个点样孔加样 $10\mu\text{l}$,每一样品点二个孔作为重复对照。电泳经过预电泳(点样前,电流50mA,30分钟),前电泳(点样后,电流25mA,10分钟)及正式电泳(电压275V,酶60—100分钟,肌蛋白50分钟)。

对不同酶及肌蛋白采用的组织及缓冲系统等见表1。

染色方法主要仿照Philipp et al.(1979)^[14]和Magee & Philipp(1982)^[11],略有改变。

电泳结果用CS-910型岛津双波薄层层析扫描仪扫描,积分以供数量分析。

各原种种群电泳分析样本数如表2。

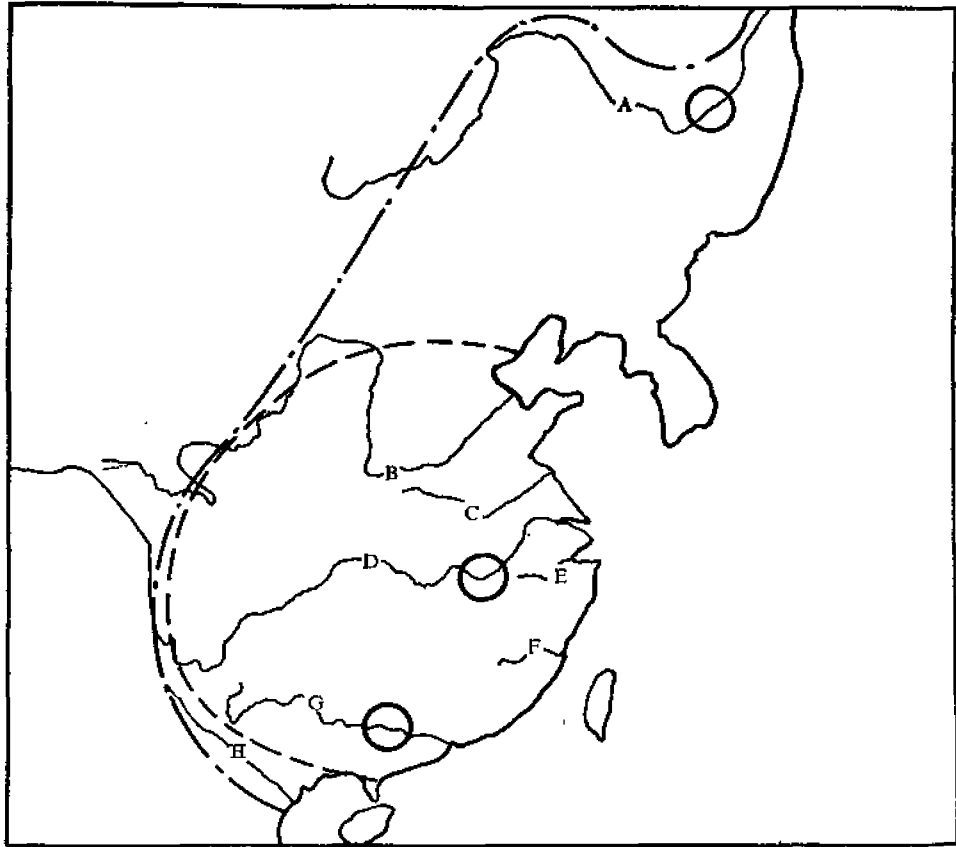


图1 鲢鳙草鱼自然分布区和原种采集江段示意图

Fig. 1 A map showing the natural distribution area and sampling area

----- 鲢、草鱼自然分布范围 Scale of natural distribution of silver carp and grass carp

----- 鳙鱼自然分布范围 Scale of natural distribution of big head

○ 原种采集江段 Sampling area

A. 黑龙江 Heilong Jiang River(H) B. 黄河 Huang He River

C. 淮河 Huai He River D. 长江 Chang Jiang River(C)

E. 钱塘江 Qiantang Jiang River F. 闽江 Min Jiang River

G. 珠江 Zhu Jiang River(Z) H. 红河 Hong He River (元江 Yuan Jiang River)

3. 酶位点与等位基因的编号

为便于统计分析,对各位点或等位基因按 Allendorf & Utter(1979)^[9]的方法予以编号。即把出现最多的位点或等位基因编为 100,其余的均按相对于位点或等位基因 100 的迁移率编号。例如,位于起点与等位基因 100 的中点的等位基因编为 50,超过等位基因 100 迁移率 10% 的编为 110。移向阴极的则编以负号。

4. 基因变异的度量

(1) 一个群体的基因变异 用多态位点比例(mean proportion of polymorphic loci— p)、每个位点的平均杂合度(average heterozygosity per locus— H)及每个位点的密码子

表1 酶类、组织及缓冲液系统
Table 1. Enzymes, tissues and buffer systems used in this study

蛋 白 Enzyme or protein	简 称 Abbrevia- tion	酶 号 Enzyme council number	结 构 Structure	组 织 Tissue	缓冲系统* Buffer system	位 点 数 Number of loci
醇脱氢酶 Alcohol dehydrogenase	ADH	1.1.1.1	二聚体 Dimeric	肝 Liver	EBT	1
-甘油-3-磷酸脱氢酶 Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	α -GPDH	1.1.1.8	二聚体 Dimeric	肝 Liver	TC	1
山梨醇脱氢酶 Sorbitol dehydrogenase	SDH	1.1.1.14	单聚体 Monomeric	肝 Liver	HC	1
乳酸脱氢酶 Lactate dehydrogenase	LDH	1.1.1.27	四聚体 Tetrameric	肌,肝,眼 Muscle Liver,eye	TC	3
苹果酸脱氢酶 Malate dehydrogenase	MDH	1.1.1.37	二聚体 Dimeric	肌 Muscle	TC	4
异柠檬酸脱氢酶 Isocitrate dehydrogenase	IDH	1.1.1.42	二聚体 Dimeric	肝 Liver	TC	2
6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 6-phosphogluconate dehydrogenase	6PGDH	1.1.1.44	二聚体 Dimeric	肝 Liver	TC	1
超氧化物歧化酶 Superoxide dismutase	SOD	1.15.1.1	二聚体 Dimeric	肌,肝 Muscle Liver	EBT	2
酯酶 Esterase	Est	3.1.1.1	单或二 Dimeric or monomeric	肌,肝 Muscle, Liver	EBT	2
肌蛋白 muscle protein				肌 Muscle	TC	

* T—三羟甲基氨基甲烷; C—柠檬酸; E—乙二胺四乙酸; B—硼酸; H—组氨酸

差数(difference of codon per locus— D_x)来度量^[4,8]。其计算式分别为:

$$P = \frac{\text{多态位点数}}{\text{总位点数}}$$

$$H = \frac{\sum(1 - x_i^2)}{n}$$

$$D_x = -\ln \frac{\sum x_i}{n}$$

式中:

x_i ——等位基因 i 的频率

n ——所测位点数

(2) 种群间的基因差异 用遗传相似度(genetic similarity— S)和遗传距离(genetic distance— D)来度量。本研究选用了比较适合于鱼类种群研究的 Rogers^[18]公式,并用 Nei^[4,8,12]的公式进行了验证。

遗传相似度(Rogers, 1972)

$$S = 1 - \frac{1}{L} \sum_{i=1}^L \left[\frac{1}{2} \sum_{j=1}^{A_i} (P_{ijx} - P_{ijy})^2 \right]^{\frac{1}{2}}$$

式中:

L ——位点数

A_i ——第 i 个位点上的等位基因数

P_{ijx} ——种群 x 第 i 个位点的第 j 个等位基因的频率。

P_{ijy} ——种群 y 第 i 个位点的第 j 个等位基因的频率。

遗传距离 $D = 1 - S$

表 2 有效分析样本大小及来源

Table 2. Source and effected size analysed of samples*

酶 Enzyme	鱼 别 Fish			鲢 Silver carp									鳙 Big head									草 Grass carp											
	种 群 Population			黑 龙 江 H			长 江 C			珠 江 Z			长 江 C			珠 江 Z			黑 龙 江 H			长 江 C			珠 江 Z								
	组 织 Tissues			肝	肌	眼	肝	肌	眼	肝	肌	眼	肝	肌	眼	肝	肌	眼	肝	肌	眼	肝	肌	眼	肝	肌	眼	肝	肌	眼			
	L	M	E	L	M	E	L	M	E	L	M	E	L	M	E	L	M	E	L	M	E	L	M	E	L	M	E	L	M	E	L	M	E
ADH	20			20			20			20			20			20			10			15			15								
α -GPOH	30			30			30			30			30			10			24			30			30								
SDH	30			30			30			20			20			14			30			30			30								
LDH	35	25	3	30	25	3	45	25	4	30		5	30		5	14	4	3	30	5	4	35	4	3	35	4	3						
MDH		50			30			50			25			25			14			30						36							
ME		—			—			—			—			—			—			—			—			—			—				
IDH	30				30			30			25			25			14			30						35							
6PGOH	30				30			30			—			—			—			—			—			—			—				
SOD		50			30			50			5	30		5	30		12			28						25							
AAT					—			—			—			—			—			—			—			—			—				
AK					—			—			—			—			—			—			—			—			—				
PGM		—			—			—			—			—			—			—			—			—			—				
EST	49				30			50			25			25			14			30						35							
GPI					—			—			—			—			—			—			—			—			—				
肌蛋白 Protien		30			30			30			30			30			30			30			30			30			30				

* H—Heilong Jiang River's; C—Chang Jiang River's; Z—Zhu Jiang River's; L—liver; M—muscle; E—eye

结 果

对长江、珠江、黑龙江的鲢、鳙、草鱼的原种的 8 个种群的 14 种酶和白肌的蛋白进行了电泳分析。14 种酶中, 辅酶 II 型乳酸脱氢酶 (ME)、天冬氨酸转氨甲酰酶 (AAT)、腺苷酸激酶 (AK)、葡糖磷酸变位酶 (PGM) 及磷酸葡糖异构酶 (PGI) 的电泳未显带或显带不明显。本文报道的是显带清楚的由 16 个位点编码的 9 种酶与肌蛋白的 2000 多个样品的测定结果的总结。

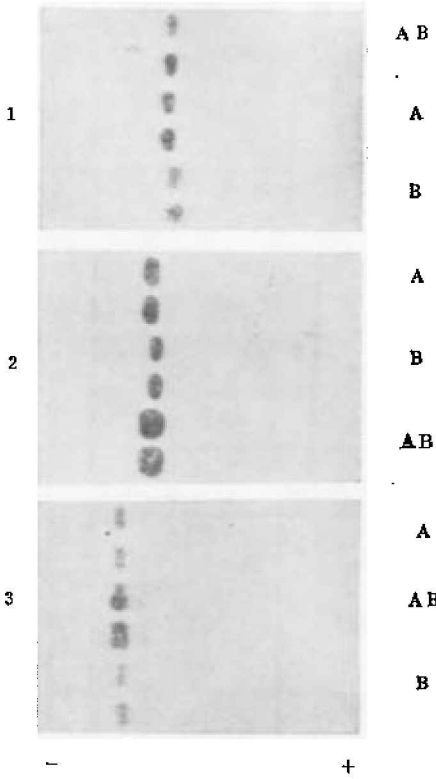


图2 鲢(1)鳊(2)草鱼肝中ADH同工酶电泳图 A,B 分别为纯合型,AB为杂合型

Fig. 2 Electropherograms of ADH isozymes in liver of silver carp (1) big head (2) and grass carp (3) A, B-homozygote; AB-heterozygote

1. 酶的表达

(1) 醇脱氢酶(ADH) 在鲢、鳊、草鱼的肝中,有一个ADH位点,二个等位基因,即Adh-A与Adh-B。表型为一条或二条谱带(图2)。有杂合与多态。此酶一般在取样后数周就丧失大部分活性。

(2) 甘油-3-磷酸脱氢酶(α -GPDH) 三种鱼都只有一个 α -GPDH位点—— α -GPDH-A。白肌与肝中均有。表型为一条谱带(图3)。未发现有多态。

(3) 山梨醇脱氢酶(SDH) 三种鱼都只有一个SDH位点——Sdh-A。表现于肝中。在电场中移向阴极。表型为一条谱带(图4)。未见有多态。

(4) 乳酸脱氢酶(LDH) 三种鱼各有三个LDH位点——Ldh-A, Ldh-B及Ldh-C。肌肉与眼晶体中只有Ldh-A与Ldh-B,组合成5种同工酶—— $A_4, A_3B_1, A_2B_2, A_1B_3$ 及 B_4 ,表型都是5条谱带(图5)。但三种鱼的肌、眼的LDH均未发现有多态现象(图6)。在三种鱼的肝脏中,除了Ldh-A与Ldh-B外,还有Ldh-C。肝脏的LDH的表型比较复杂。鳊肝LDH表型仅一种,Ldh-C位点有 C_1 与 C_2 两个等位基因, C_1 向阴极移动,而 C_2 向阳极移动(图7)。鲢肝的Ldh-C位点也有 C_1 与 C_2 两个等位基因,根

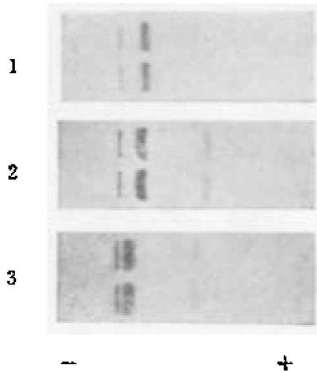


图3 鲢(1)鳊(2)草鱼(3)白肌中 α -GPDH同工酶电泳图

Fig. 3 Electropherograms of α -GPDH in white muscle of silver carp (1), big head (2) and grass carp (3)

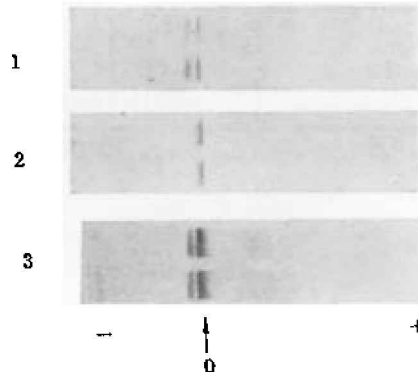


图4 鲢(1)鳊(2)草鱼(3)肝中SDH同工酶电泳图

Fig. 4 Electropherograms of SDH in liver of silver carp (1), big head (2) and grass carp(3)

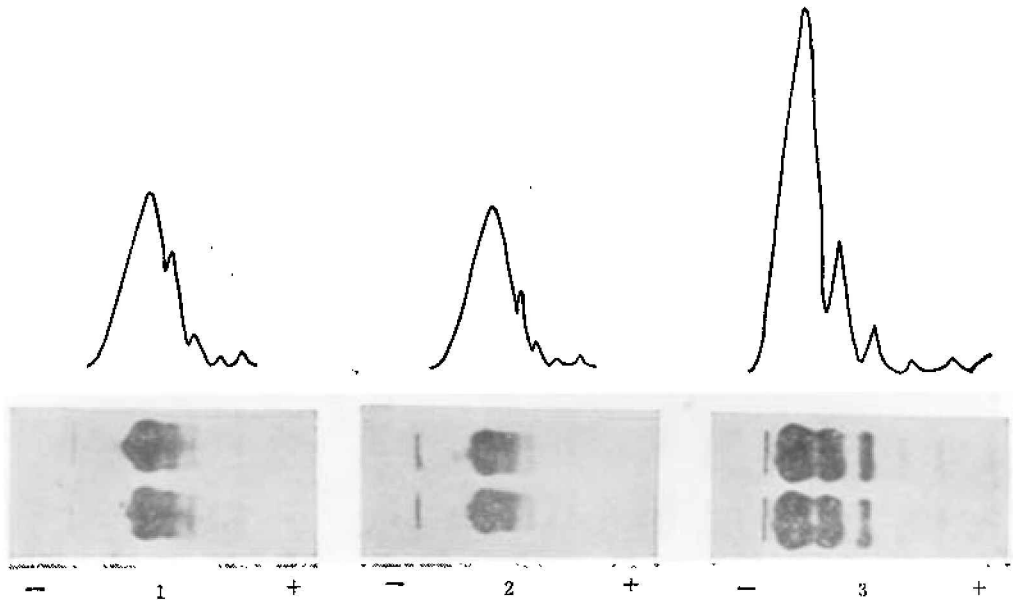


图5 鲢(1)鳊(2)草鱼(3)白肌中 LDH 同工酶电泳及扫描图

Fig. 5 Electropherograms and scanning of LDH in white muscle of silver carp (1), big head(2)and Grass carp(3)

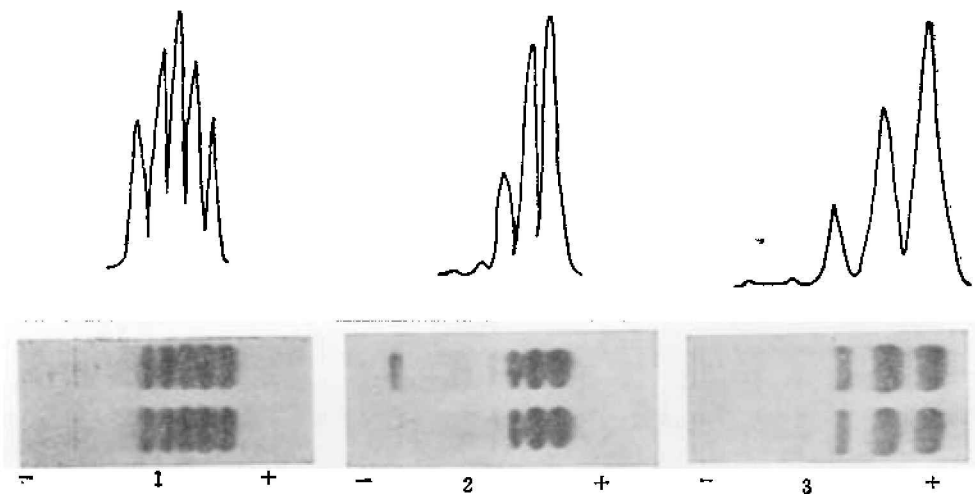


图6 鲢(1)鳊(2)草鱼(3)眼中 LDH 同工酶电泳及扫描图

Fig. 6 Electropherograms and scanning of LDH in eye of silver carp (1), big head (2) and Grass carp(3)

据它们的出现和组合情况,可把鲢肝 LDH 分为三种表型(图 8),除了 C_1 、 C_2 、 A_4 、 A_3B_1 、 A_2B_2 、 A_1B_3 及 B_4 等主要谱带以外,在 C_1 、 C_2 - A_4 之间, A_4 - A_2B_2 之间、 A_2B_2 - A_1B_3 之间往往可以看到副带,初步假定是等位基因 C_1 或 C_2 与 A 或 B 的结合物。草鱼肝的 Ldh-C 只有一个等位基因,向阴极移动。在 A_4 - A_3B_1 之间, A_3B_1 - A_2B_2 之间也可见到副带,初步假定是等位基因 C 与 B 的结合物。按照这些副带出现的位置和多少,可把草鱼肝的表型分为三种(图 9)。

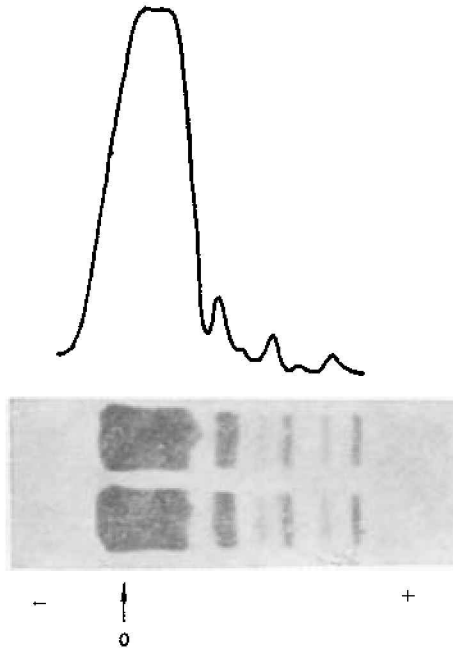


图7 鲮肝中 LDH 同工酶电泳及扫描图

Fig. 7 Electropherogram and scanning of LDH in liver of big head

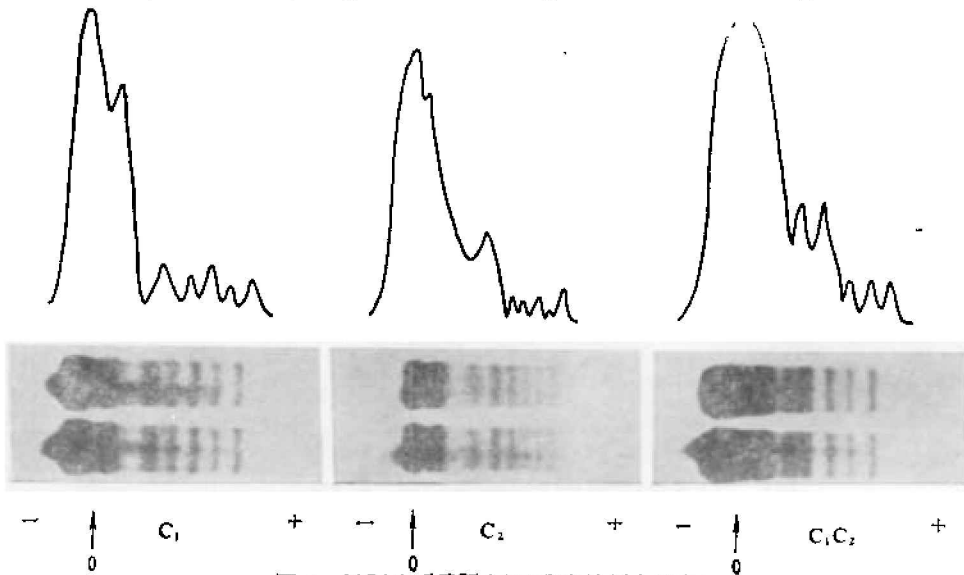


图8 鲢肝中 LDH 同工酶电泳及扫描图

Fig. 8 Electropherograms and scanning of LDH in liver of silver carp

(5) 苹果酸脱氢酶(MDH) 在三种鱼的肌肉与肝脏中都有两种不同的 MDH, 即细胞质型 Mdh_c 与线粒体型 Mdh_m , 彼此不能杂合, 各有二个位点, 每个位点又有二个等位基因。鲢、鲮、草鱼的肌肉的 MDH 都基本上可分为有二种表型(图 10, 11, 12)。

(6) 异柠檬酸脱氢酶(IDH) 大多数脊椎动物的辅酶 II-IDH 有细胞质型(S, 主要在肝中)与线粒体型(M, 主要在心中)两种。三种鱼肝脏中的 Idh_c 有二个位点, 即 Idh_{c1} 、

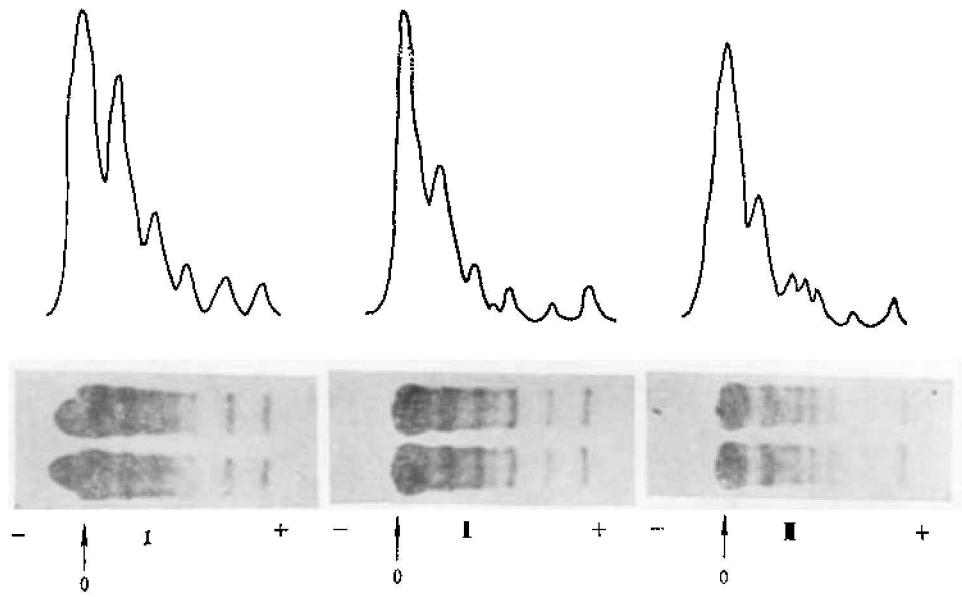


图9 草鱼肝中 LDH 同工酶电泳及扫描图

Fig. 9 Electropherograms and scanning of LDH in liver of grass carp

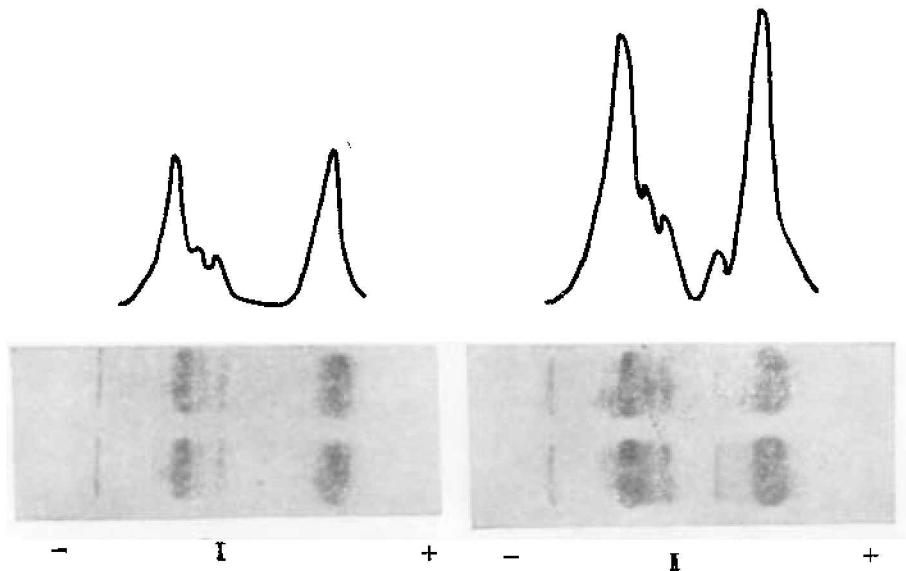


图10 鲢白肌中 MDH 同工酶电泳及扫描图

Fig. 10 Electropherograms and scanning of MDH in white muscle of silver carp

A 与 Idh_B -B。 Idh_A -A 只有一个等位基因,无多态; Idh_B -B 则有二个等位基因,并有多态(图 13)。

(7) 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6PGDH) 三种鱼中,本研究仅在鲢鱼肝中显出了 6PGDH, 具一个位点——6Pgdh-A, 表型为单带,未见多态(图 14),鳊、草鱼的未显,原因不明。

(8) 超氧化物歧化酶(SOD) 电泳了三种鱼肌、肝中的 SOD,均显现。超氧化物歧化酶并不着色,而整个底板染上了深蓝色。鲢、鳊鱼肌中 SOD 显现得比肝中的好,各有三个 SOD

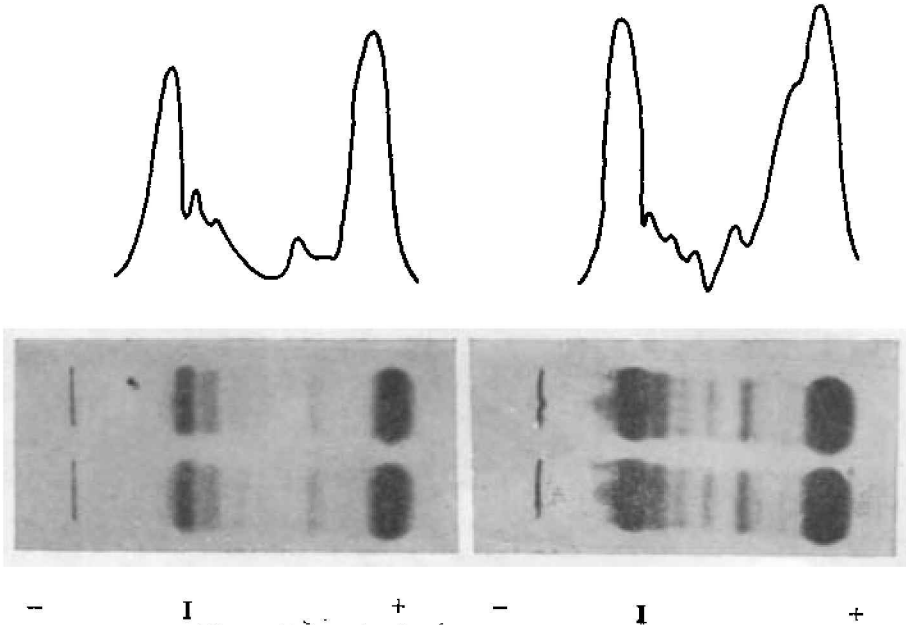


图 11 鱖白肌中 MDH 同工酶电泳及扫描图
 Fig. 11 Electropherograms and scanning of MDH in white muscle of big head

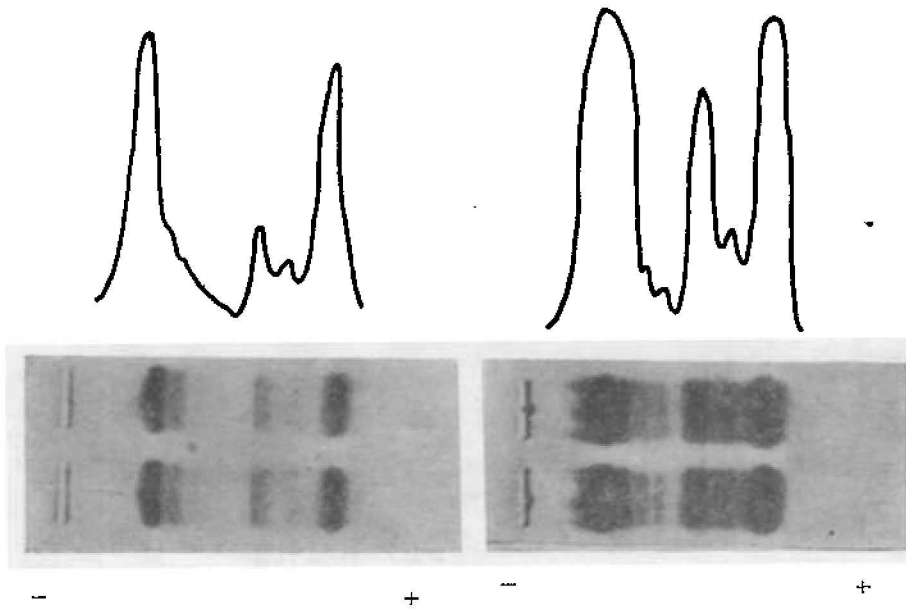


图 12 草鱼白肌中 MDH 同工酶电泳及扫描图
 Fig. 12 Electropherograms and scanning of MDH in white muscle of grass carp

位点——SOD-A, SOD-B 及 SOD-C。各有一种表型。未见有多态(图 15)。草鱼肝中 SOD 显现得比肌中的好。长江、珠江草鱼的 SOD 有一个位点, 二个等位基因——Sod-A₁ 与 Sod-A₂, 有三种表型, 有多态; 黑龙江草鱼只有 Sod-A₁, 一种表型, 未见有多态, 与长江、珠江草鱼的表型有显著不同(图 16)。

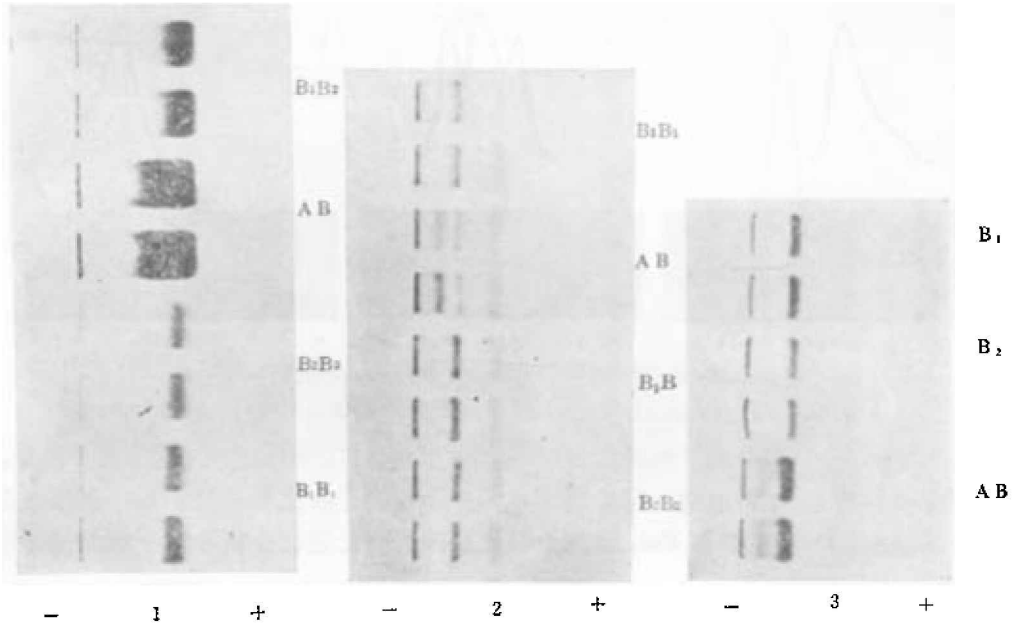


图 13 鲢(1)鳊(2)草鱼(3)肝中 IDH 同工酶电泳图

Fig. 13 Electropherograms of IDH in liver of silver carp(1), big head (2) and grass carp(3)

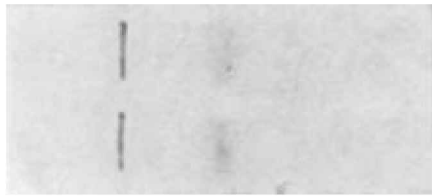


图 14 鲢肝中 6 PGDH 同工酶电泳图
Fig. 14 Electropherograms of 6 PGDH in liver of silver carp

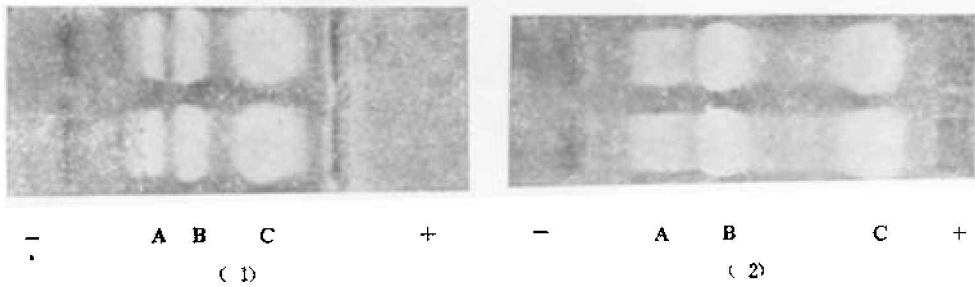


图 15 鲢(1)鳊(2)白肌中 SOD 同工酶电泳及扫描图

Fig. 15 Electropherograms and scanning of SOD in white muscle of silver carp (1) and big head(2)

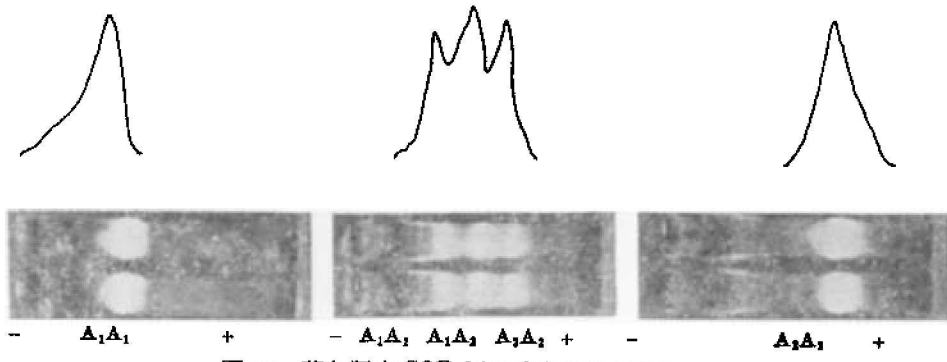


图 16 草鱼肝中 SOD 同工酶电泳及扫描图

Fig. 16 Electropherograms and scanning of SOD in liver of grass carp

(9) 酯酶(Est) 分析了三种鱼的肝、肌中的酯酶,以肝中的酯酶最强,显带清楚。三种鱼的酯酶各有 2—4 种表型,可能属 Est₁ 与 Est₂ 两个位点所控制。Est₁ 的等位基因变化较不规则,本文现根据 Est₂ 的两个等位基因的变化进行分析并划分为 2—3 种表型(图 17)。

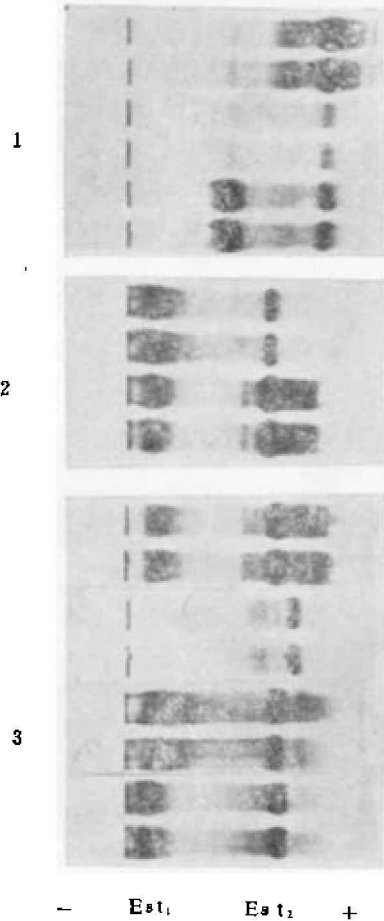


图 17 鲢(1)鳊(2)草鱼(3)肝中酯酶电泳图

Fig. 17 Electropherograms of Est in liver of silver carp (1), big head(2) and grass carp(3)

(10) 肌蛋白 未见三条江河中的三种鱼的肌蛋白的电泳图谱(图 18)在种群间有显著差异。这同 Паусова 与 Целккова(1981)^[22] 关于移养于苏联的黑龙江源和长江源的鲢、草鱼的后代的肌蛋白电泳图谱有明显不同的报道不一致。由于方法与材料不一致,难以比较和解释。

2. 种群间等位基因频率的差异

对三条江河中三种鱼的八个种群, 所测位点及测得的等位基因频率结果如表 3。实测频率与按 Hardy Wisberg 基因平衡定律的估算值相符。

三条江河鲢鱼种群的有多态的酶的等位基因频率的差异如表 4 所示。相互间大多有显著差异。

长江与珠江鳊鱼种群的有多态的酶的等位基因频率的差异如表 5 所示。相互间有显著差异。

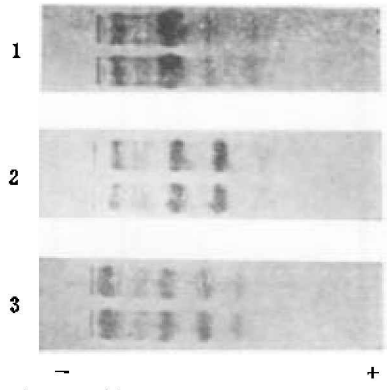


图 18 鲢(1)鳊(2)草鱼(3)肌蛋白电泳图

Fig. 18 Electropherograms of white muscle protein of silver carp (1), big head(2) and Grass carp(3)

表 3 测定的位点及其等位基因的频率
Table 3 Loci and alleles frequencies of the enzymes studied

位点 Locus	等位基因 Allele	鲢 Silver carp			位点 Locus	等位基因 Allele	鳊 Big head		位点 Locus	等位基因 Allele	草鱼 Grass carp				
		长江 C	珠江 Z	黑龙江 H			长江 C	珠江 Z			长江 C	珠江 Z	黑龙江 H		
ADH	100	0.7000	0.7000	0.7250	ADH	100	0.8000	0.7105	ADH	100	0.7000	0.7333	0.6000		
	140	0.3000	0.3000	0.2750		140	0.4000	0.2894		160	0.3000	0.2666	0.4000		
α -GPDH	100	1.0000	1.0000	1.0000	α -GPDH	100	1.0000	1.0000	α -GPOH	100	1.0000	1.0000	1.0000		
SDH	100	1.0000	1.0000	1.0000	SDH	100	1.0000	1.0000	SDH	100	1.0000	1.0000	1.0000		
Ldh-A	100	1.0000	1.0000	1.0000	Ldh-A	100	1.0000	1.0000	Ldh-A	100	1.0000	1.0000	1.0000		
	-B	100	1.0000	1.0000		-B	100	1.0000		1.0000	-B	100	1.0000	1.0000	1.0000
	-C ₁	100	0.8000	0.8558		0.7871	-C	100		1.0000	1.0000	-C	100	1.0000	1.0000
-C ₂	90	0.2000	0.1444	0.2429											
Mdh _m -A	100	1.0000	1.0000	1.0000	Mdh _m -A	100	1.0000	1.0000	Mdh _m -A	100	1.0000	1.0000	1.0000		
	-B	100	1.0000	1.0000		-B	100	0.8000		0.9800	-B	100	0.5883	0.7778	0.9842
	-C							0.2000		0.0200		120	0.4167	0.2222	0.0857
Mdh _s -C	100	1.0000	0.9800	1.0000	Mdh _s -C	100	0.7000	0.9000	Mdh _s -C	100	0.8167	0.9722	0.9285		
	75		0.0200			95	0.3000	0.1000		90	0.1833	0.0278	0.0714		
					-D	100	1.0000	1.0000	-D	100	1.0000	1.0000	1.0000		
Idh _s -B	100	1.0000	1.0000	1.0000	Idh _s -B	100	0.6000	0.6400	Idh _s -B	100	1.0000	1.0000	1.0000		
						180	0.4000	0.3600							
6PGDH	100	1.0000	1.0000	1.0000											
Sod-A	100	1.0000	1.0000	1.0000	Sod-A	100	1.0000	1.0000	Sod-A	100	0.7143	0.7200	1.0000		
	-B	100	1.0000	1.0000		-B	100	1.0000		1.0000	185	0.2857	0.2800		
	-C	100	1.0000	1.0000		-C	100	1.0000		1.0000					
Est ₁	100	1.0000	0.9900	1.0000	Est ₂	100	0.5000	0.6200	Est ₂	100	1.0000	0.9714	1.0000		
	105		0.0100			105	0.5000	0.3800		80			0.6285		

表4 三条江河鲢鱼种群间等位基因频率差异*

Table 4 Differences of allele frequencies among 3 populations of silver carp

	Adh					Ldh-C				
	100	140	差异显著水平 (P) Significant level(P)			-100	90	差异显著水平 (P) Significant level (P)		
			珠-长 Z-C	长-黑 C-H	珠-黑 Z-H			珠-长 Z-C	长-黑 C-H	珠-黑 Z-H
珠江鲢 Zhujiang River	0.70	0.30	1.0			0.86	0.14	<0.001		
长江鲢 Changjiang River	0.70	0.30		<0.001		0.80	0.20		<0.001	
黑龙江鲢 Heilongjiang River	0.73	0.28			1.0	0.76	0.24			<0.001

	Mdh ₂ -C					Est ₂				
	100	75	差异显著水平 (P) Significance level (P)			100	105	差异显著水平 (P) Significance level (P)		
			珠-长 Z-C	长-黑 C-H	珠-黑 Z-H			珠-长 Z-C	长-黑 C-H	珠-黑 Z-H
珠江鲢 Zhujiang River	0.98	0.02	<0.001			0.99	0.01	<0.001		
长江鲢 Changjiang River	1.00	0		1.0		1.00	0		1.0	
黑龙江鲢 Heilongjiang River	1.00	0			<0.001	1.00	0			<0.001

* P 值系根据表型值用 2 × 2 卡方计算而得

The P values are from conventional 2x2 chi-square contingency comparisons (Yates' correction, df = 1)

表6 三条江河草鱼种群间

Table 6 Differences of allele frequencies

	Adh					Mdh _m -B				
	100	160	P			100	120	P		
			珠-长 Z-C	长-黑 C-H	珠-黑 Z-H			珠-长 Z-C	长-黑 C-H	珠-黑 Z-H
珠江草鱼 Zhu Jiang River	0.73	0.27	<0.001			0.78	0.22	<0.001		
长江草鱼 Chang Jiang River	0.70	0.30		<0.001		0.58	0.42		<0.001	
黑龙江草鱼 Heilong Jiang River	0.60	0.40			<0.001	0.96	0.04			<0.001

讨 论

1. 关于种群的生化遗传差异及其测定

在遗传学上, 种群通常定义为自繁自育的个体的组合。基因频率与基因库是种群的

表 5 长江珠江鳊鱼种群间等位基因频率差异
Table 5 Differences of allele frequencies between 2 populations of big head

	Adh			Mdh _m -B			Mdh _s -C			Idh			Est ₂		
	100	140	P	100	110	P	100	95	P	100	130	P	100	105	P
珠江鳊 Zhujiang River	0.71	0.29	<0.001	0.98	0.02	<0.001	0.90	0.10	<0.001	0.64	0.36	<0.001	0.62	0.38	<0.001
长江鳊 Changjiang River	0.60	0.40		0.90	0.20		0.70	0.30		0.60	0.40		0.50	0.50	

三条江河草鱼种群的有多态的酶的等位基因频率的差异如表 6 所示。相互间有显著差异。

3. 多态位点比例、平均杂合度及密码子差数

三种鱼八个种群的多态位点比例、平均杂合度及密码子差数如表 7 所示。

4. 遗传相似度与遗传距离

(1) 三条江河鲢鱼种群间 结果如表 8。对角线右上方是遗传相似度, 左下方是遗传距离。黑龙江鲢对珠江鲢的遗传距离最大, 对长江鲢的遗传距离次之, 长江鲢与珠江鲢间的遗传距离最小。三种群的相对遗传关系可用聚类分析图(图 19)表示。

(2) 长江珠江鳊鱼种群间 遗传相似度为 0.9953, 遗传距离为 0.0047。

(3) 三条江河草鱼种群间 结果如表 9。黑龙江草鱼对长江草鱼的遗传距离最大, 对珠江草鱼的次之, 长江草鱼与珠江草鱼间的遗传距离最小。三种群的相对遗传关系示于图 20。

等位基因频率差异
among 3 populations of grass carp

Mdh _s -C			Sod-A						Est ₂					
100	90	P			100	185	P			100	80	P		
		珠-长 Z-C	长-黑 C-H	珠-黑 Z-H			珠-长 Z-C	长-黑 C-H	珠-黑 Z-H			珠-长 Z-C	长-黑 C-H	珠-黑 Z-H
0.97	0.08	<0.001	<0.001	<0.001	0.72	0.28	<0.001	<0.001	<0.001	0.97	0.03	<0.001	1.0	<0.001
0.82	0.18				0.71	0.29				1.00	0			
0.98	0.07				1.00	0				1.00	0			

两个重要属性。简单地说,前者指种群的某一基因的各种等位基因的比例,后者则指种群的配子的基因的总数。大多数生物群体在自然条件下的遗传和变异大体有两类。一类是几乎全由遗传因子控制的质量性状与数量性状变异,如血型、肤色、鳞被等,另一类是由遗传因子与环境因子共同作用决定的生产性状变异,如生长速度、性成熟年龄及繁殖力大小等。遗传变异在 DNA 水平上是基因变异引起的。这些基因变异只有用遗传学(如染色

表7 三条江河鲢草鱼多态位点比例、平均杂合度及密码子差数
 Table 7 Mean proportion of polymorphic (P), average heterozygosity (H) and difference of codon (Dx) in different populations of silver carp, big head and grass carp

鱼 别 Fish	种 群 Population	检查位点数 Number of loci examined	多态位点数 Number of po- lymorphic loci	多态位点比例 P	平均杂合度 H	密码子差数 Dx
鲢 Silver carp	珠 江 Zhujiang	15	4	26.7	0.0484 ± 0.0009	0.0496
	长 江 Changjiang	15	2	13.3	0.0498 ± 0.0010	0.0506
	黑龙江 Heilongjiang	15	2	13.3	0.0511 ± 0.0011	0.0525
鳊 Big head	珠 江 Zhujiang	16	5	31.3	0.0977 ± 0.0016	0.1028
	长 江 Changjiang	16	5	31.3	0.1375 ± 0.0020	0.1479
草鱼 Grass carp	珠 江 Zhujiang	18	5	28.0	0.0961 ± 0.0016	0.1010
	长 江 Changjiang	18	4	22.0	0.1241 ± 0.0021	0.1325
	黑龙江 Heilongjiang	18	3	16.7	0.0525 ± 0.0012	0.0589
		范 围 Range		13.3 - 33.0	0.0484 - 0.1375	0.0496 - 0.1479
		平均值 ± 标准差 Mean ± S.D.		25.9 ± 8.8	0.0821 ± 0.0129	0.0864 ± 0.0142

表8 三条江河鲢鱼遗传相似度与遗传距离
 Table 8 Genetic similarity and distance matrix among 3 populations of silver carp

Dx 种群 Population	S 种群 Population	珠 江 鲢 Zhujiang	长 江 鲢 Changjiang	黑 龙 江 鲢 Heilongjiang
	珠 江 鲢 Zhujiang		—	0.9957
长 江 鲢 Changjiang		0.0043	—	0.9955
黑 龙 江 鲢 Heilongjiang		0.0304	0.0045	—

体分析和生物化学[如电泳和组化染色技术(histochemical staining methods)]等方法才能测定出来。自从60年代以来,综合蛋白质电泳分离(electrophoretic separation of proteins)、组化染色及生物统计为一体的生化遗传技术,为测定蛋白质与酶的遗传差异,从而为了解基因变异,提供了一种有效手段,再加上群体生态遗传学这一分支学科的出现,生物学家已能从分子水平和群体水平来研究小至果蝇、大至哺乳动物的种间、种群间的遗

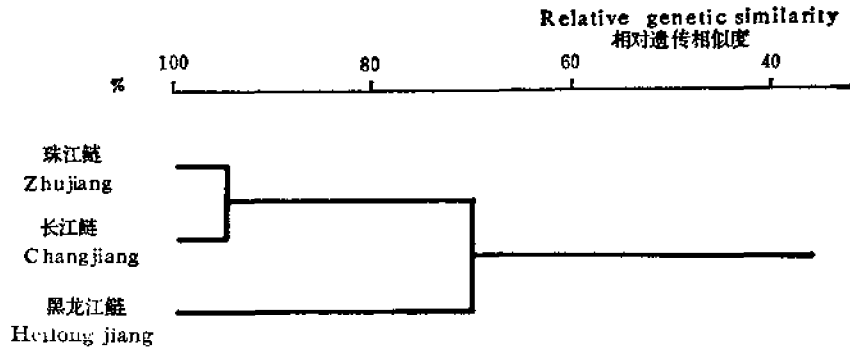


图 19 三条江河鲢鱼种群的遗传相似度聚类分析图

Fig 20: Genetic similarity dendrogram showing relationship among 3 populations of silver carp

表 9 三水系草鱼种群的遗传相似度与遗传距离

Table 9. Genetic similarity dendrogram showing relationship among 3 populations of grass carp

种群 Population		珠江草鱼 Zhujiang	长江草鱼 Changjiang	黑龙江草鱼 Heilongjiang
珠江草鱼 Zhujiang		—	0.9679	{0.9483
长江草鱼 Changjiang		0.0321	—	0.9324
黑龙江草鱼 Heilongjiang		0.0517	0.0676	—

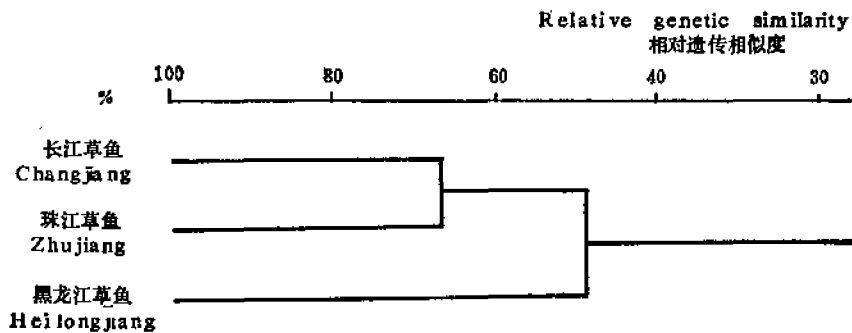


图 20 三水系草鱼种群的相似度聚类分析图

Fig. 20 Genetic similarity dendrogram showing relationship among 3 populations of grass carp.

传关系和进化关系^[4,14],并已积累了较多的资料,大大丰富了达尔文的进化论和孟德尔的遗传学说。在鱼类,Clayton(1974)^[7]、Utler等(1980)^[21]、Phillipp等(1981,1983)^[16,18]、Beacham等(1985)^[6]、Wright等(1985)^[22]及熊全沫(1986)^[2]曾先后报道了加拿大大眼狮鲈(*Stizostedion vitreum*)、太平洋鲑鳟鱼类(*Oncorhynchus. spp.*)、美国大咀鲈鱼(*Mic-*

ropterus salmoides)、加拿大红大麻哈鱼(*Oncorhynchus gorbuscha*)、北美海七鳃鳗(*Petromyzon marinus*)及美国鲮鱼(*Lucania parva*, *L. goodei*)等种群的生化遗传差异。但对我国丰富的淡水鱼类,特别是主要淡水经济鱼类种群的生化遗传差异却未见报道。

如果一个物种的两个种群由于地理或繁殖上的原因而彼此隔离,这两个群体就会积累不同的基因^[4]。长江、珠江、黑龙江是三个地理上隔离的水系,栖居其中的鲢、鳙、草鱼是彼此隔离的种群。我们已经发现,不同水系的鲢、鳙鱼在生长性能上^[9]、*¹和某些形态特征上*²有显著差异。从理论上,这些不同水系的种群也可能积累有不同的基因。问题是如何测定和度量群体内和群体间的基因差异。在测定技术方面,我们四年来在现有基础上结合具体情况,试验总结了可行的技术,在度量方面,比较和选用了前人使用过的方法。结果表明,本研究所采用的测定技术和度量方法是可靠而适用的。

2. 关于不同水系鲢、鳙、草鱼的生化遗传差异及有关问题

(1) 一般认为^[4],平均杂合度是度量遗传变异的最简单、最直接、最富信息的方法,由于它与测定样本的大小的关系不太大,因而比多态位点要好一些^[16]。Allendorf & Utler (1979)^[6]统计了41个种群的虹鳟的平均杂合度在0.02—0.098之间,9种鲑鳟鱼的平均杂合度在0—0.06之间。本研究的鲢、鳙、草鱼的8个种群的平均杂合度的范围是0.048—0.138,平均0.082。据Kirpichnikov(1981)^[9],脊椎动物的平均杂合度在0.03—0.08间,而Ayala(1976)报道平均杂合度在0.042—0.083%之间,可能因鱼是最低等的脊椎动物,在鱼类中,属于鲤科的鲢、鳙、草鱼又属较低等,故其平均杂合度在脊椎动物中居于上限附近。

平均杂合度的大小可能与种群的大小有些关系。根据渔获量和鱼苗产量等资料来综合判断,可认为三种鱼的种群大小依次是长江—珠江—黑龙江。本研究测得的平均杂合度的大小顺序是,草鱼:长江(0.1241) > 珠江(0.0961) > 黑龙江(0.0525),在此值得提及的是,长江与珠江草鱼的SOD都有二个等位基因和多态,而黑龙江草鱼只发现一个等位基因,且无多态;鳙鱼:长江(0.1375) > 珠江(0.0977);鲢鱼:黑龙江(0.0511) > 长江(0.0493) > 珠江(0.0484)。对于黑龙江鲢鱼平均杂合度高于长江与珠江的这一与上述关系有矛盾的现象,尚难解释。

(2) Nevo(1978)^[18]曾指出,热带种类的多态位点比例要比温带种类的大些,那是泛指物种而言的。我们的结果表明,同一种鱼不同种群的多态位点比例似有从南向北变小的趋势。鲢、草鱼种群的多态位点比例的大小顺序是,草鱼:珠江(38.0%) > 长江(30.0%) > 黑龙江(23.1%);鲢鱼:珠江(26.7%) > 长江(13.3%)与黑龙江(13.3%)。基本趋势与Nevo的论点一致。

三种鱼的多态位点比例范围在13.3—38.0%,平均25.88%。据Kirpichnikov(1981)^[9],脊椎动物的多态位点比例为15—31%。

(3) 遗传相似度与遗传距离的分析表明,黑龙江鲢、草鱼对长江、珠江鲢、草鱼的遗传

*₁: 李思发等,长江珠江水系鲢鱼生长速度的比较及其遗传因子环境因子分析。1985.10.北京。亚洲淡水养鱼学术讨论会宣读论文(发表中)。李思发等,长江、珠江水系鳙鱼生长性能比较研究(未刊稿)

*₂: 李思发等,长江珠江黑龙江鲢鳙草鱼原种形态特征比例研究(手稿)

相似度较小,遗传距离较大;长江与珠江两水系的鲢、草鱼的遗传相似度较大,遗传距离小。用 Rogers 与 Nei 的两种方法计算的结果基本一致,进一步确证了上述遗传远近关系。

鲢、草鱼的自然分布区北至黑龙江,南至红河(元江)(图 1)。黑龙江鲢、草鱼对长江珠江鲢、草鱼的遗传距离较大这一现象,可认为是与黑龙江鲢、草鱼种群位于其自然分布区的最北端,属地理分布上的边缘群体(marginal population),因而其生态遗传有别于长江、珠江水系的中央群体(Central population)的生态遗传的反映。

3. 关于种群生化遗传差异在渔业生产上的应用价值

同工酶和蛋白质电泳分析技术已越来越普遍地使用于鱼类遗传学和分类学的研究^[4],但有关鱼类种群生化遗传差异的研究,迄今仍基本上局限于理论研究。我们更关心的是,这一工作在渔业生产上有何实际应用价值。根据我们的认识,以为在以下几个方面应用可能是现实的或可能的。

(1) 根据种群间生化遗传差异的测定与分析,选择差异较大的两个群体进行“杂交”,它们的 F_1 代应比差异较小的两个种群的“杂交”后代有较大的“杂种”优势。

(2) 比较不同养殖群体的平均杂交度,可直接估计近交的相对程度。常规地登记繁殖群体的基因频率,将是把生化遗传方法运用于亲鱼管理与培育、人工繁殖等的可行手段。

(3) 同工酶电泳分析技术是鉴别杂交后代与亲本、雌核发育或雄核发育后代与亲本的有效手段。

(4) 根据群体生化遗传结构及差异,可为判断种群大小及有无遗传渐渗现象(introgression)提供证据,从而改善物种或种群的渔业管理。例如,根据我们的研究结果,黑龙江草鱼的平均杂合度在三水系中最小,而且其 SOD 中没有发现长江、珠江草鱼都具有的等位基因 Sod-A₂,也没有其它两水系都有的多态现象。据此可以认为,黑龙江草鱼种群是很小的,这与我们三年来的采样印象一致,因此有必要引起注意并研究对策。

(5) 种群是鱼类数量变动的的基本单元,同工酶分析是用生化方法鉴别种群的有力手段,对于混合群体的鉴别更是一种好方法。

(6) 放养(放流)对象的遗传标志等。

(7) 关于应用的存在问题。我们已经发现,三水系三种群在生产性能、形态特征及生化遗传这三个方面都确有某些差异,但迄今,除有人报道过虹鳟、鲤鱼的生长、肥满度等与转铁蛋白(transferrin)的表型有关外(Reinitz, 1977)^[17],无论在我们的研究里,还是他人的研究中,都尚未找到同工酶等生化遗传差异与生长性能在一个或几个位点上有直接关联的理论上或实践上的证明。这主要是因为,第一,大多数生产性状是多基因控制的,并为基因-基因相互作用这一复杂状况所制约;第二,基因差异中可用电泳方法测出的仅占 25—30%^[4],欲取得可靠的平均杂合度等度量值,就需要测定大量的位点,这些位点在理论上应是基因组的随机样本,但这又不能不受到人力、物力及时间等的限制。对于样本的大小,Nei(1975)^[4]主张 20 左右,Ihssen et al^[9]在 1981 年的国际群体(Stock)概念讨论会上提出 50 以上。本研究选用的随机样本为 30 左右。即使这样的样本已属大样

本,对于基因频率小的位点(如草鱼的 Est_3-A_2 , 计算值为 1%),仍然是很难发现的。尽管存在这些问题和困难,我们相信,随着科学理论和实验技术的进一步发展,生化遗传差异与生长性状等差异之间的联系是有可能被发现并被人们所利用的。

参 考 文 献

- [1] 熊全洙, 1986. *Lucania* 同工酶的研究。中国科学B辑, 1: 48-54。
- [2] 李思发, 1983. 遗传育种的理论和技术在鲤科鱼类增殖业中的应用。水产学报, 7(2): 175-184。
- [3] 李思发等, 1984. 长江水系鲢鱼和珠江水系鲢鱼的生长差异。水产学报, 8(3): 211-218。
- [4] 根井正利(Nei, M), 1975. 分子群体遗传学与进化论。王家玉译, 农业出版社。121-203。
- [5] Allendorf, F. W. & F. M. Utter. 1979. Population genetics. 407-454. In W. S. Hoar, D. S. Randall, and J. R. Brett (ed.) *Fish physiology*. Vol. 8. Academic Press, Inc., New York, NY.
- [6] Beacham, T. D. et al., 1985. Biochemical genetic stock identification of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) in Southern British Columbia and Puget Sound. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42: 1474-1483.
- [7] Clayton, J. W. et al., 1974. Geographical distribution of alleles for supernatant malate dehydrogenase in walleye (*Stizostedion vitreum vitreum*) populations from Western Canada. *J. Fish. Res. Board Can.* 31: 342-345.
- [8] Ihssen, P. E. et al., 1981. Stock identification: materials and methods. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 38: 1838-1855.
- [9] Kirpichnikov, V. S. 1981. Genetic bases of fish selection. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. 143-200.
- [10] Harris H. & D. A. Hopkinson, 1976. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. North-Holland Publishing Com. Amsterdam, Oxford.
- [11] Magee, S. M. & D. P. Philipp. 1982. Biochemical genetic analyses of the grass carp ♀ × bighead carp ♂ F₁ hybrid and the parental species. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 111: 593-602.
- [12] Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 89: 583-590.
- [13] Nevo, E. L., 1978. Genetic variation in natural populations: patterns and theory. *Theoretical population biology*. 13: 121-177.
- [14] Philipp, D. P. et al., 1979. Evolution of pattern of differential gene expression: a comparison of the temporal and spatial patterns of isozyme locus expression in two closely related fish species (Northern largemouth bass, *Micropterus salmoides salmoides*, and smallmouth bass, *micropterus dolomieu*) *J. Exp. Zool.* 210: 473-488.
- [15] Philipp, D. P. et al., 1981. Management implications for different genetic stocks of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) in the United States. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 38: 1715-1723.
- [16] Philipp, D. P. et al., 1983. A biochemical genetic evaluation of the Northern and Florida subspecies of largemouth bass. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 112: 1-20.
- [17] Reinitz, G. L. 1977. Tests for assesiation of transferrin and lactate dehydrogenase pheotypes with weight gain in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Board Can.* 34: 2333-2337.
- [18] Rogers, J. S. 1972. Measures of genetic similarity and genetic distance. *Studies in genetics*. VII (Univ. Texas Publ. No. 7213), 145-153.
- [19] Utter, F. M. et al., 1973. Genetic variability and relationships in pacific salmon and related trout based on protein variations. *Systematic Zoology*. 22: 257-270.
- [20] Utter, F. M. et al., 1974. Biochemical genetic studies of fishes: Potentialities and limitations p. 213-238. in *Biochemical and biophysical perspectives in marine biology*, Vol. I. Academic Press N. Y.
- [21] Utter, F. M. et al., 1980. Population structures of indigenous salmonid species of the pacific northwest. p. 285-304. In W. J. McNeil and D. C. Himsworth (ed.) *Salmonid ecosystem of the Nor-*

th Pacific. Oregon State University Press.

- [22] Wright, J. et al., 1985. Sea lamprey (*Petromyzon marinus*) populations in Northeastern North America: Genetic differentiation and affinities. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42: 776-784.
- [23] Павлова, А. Н., Т. Н. Целикова. 1981. Различия и дифференциация стад разного происхождения белого амура, белого и пестрого толстолобиков по электрофоретическим спектрам мизоенов. *Вопросы Ихтиологии*. 2(4): 608-615.

BIOCHEMICAL GENETIC STRUCTURES AND VARIATIONS IN NATURAL POPULATIONS OF SILVER CARP, BIG HEAD AND GRASS CARP IN CHANGJIANG RIVER, ZHUJIANG RIVER AND HEILONGJIANG RIVER*

Li Sifa

(Shanghai Fisheries University)

Wang Jiang

Chang Yongle

(Heilongjiang Fisheries Research Institute) (Zhujiang Fisheries Research Institute)

ABSTRACT The genetic structures and variations of 16 enzyme loci in 8 populations of silver carp, big head and grass carp from Chang Jiang River, Zhu Jiang River and Heilong Jiang River were analyzed by LKB horizontal acrylamide gel electrophoresis. A marked biochemical genetic differences were found among different populations of same species from different water systems.

The mean proportion of polymorphic loci (P) was 13.3%, 26.7% and 13.3%, the average heterozygosity per locus was 0.0493, 0.0484 and 0.0511 for silver carp populations from Chang Jiang River, Zhu Jiang River and Heilong Jiang River respectively; For big head populations from Chang Jiang River and Zhu Jiang River, the P was both 31.3%, but the H was 0.1375 and 0.0977 respectively; For grass carp populations from Chang Jiang River, Zhu Jiang River and Heilong Jiang River, the P was 30.0%, 38.0% and 21.3%, the H was 0.1241, 0.0961 and 0.0525 respectively. There was a trend that the mean proportion of polymorphic loci in southern population was higher than that in northern population.

The genetic similarity (S) of silver carps between Chang Jiang River and Zhu Jiang River, Chang Jiang River and Heilong Jiang River, Zhu Jiang River and Heilong Jiang River was 0.9957, 0.9955 and 0.9696 successively; The S of big head populations between Chang Jiang River and Zhu Jiang River was 0.9955; The S of grass carp populations between Chang Jiang River and Zhu Jiang River, Zhu Jiang River and Heilong Jiang River, Chang Jiang River and Heilong Jiang River was 0.9679, 0.9483 and 0.9324 respectively. The genetic distance was smaller within the central populations (Chang Jiang River and Zhu Jiang River), but was larger between the marginal

populations (Heilong Jiang River) and the central population. The population size of grass carp in Heilong Jiang River was very small, which should be given enough attention too.

KEY WORDS Chang Jiang River, Zhu Jiang River, Heilong Jiang River. silver carp, big head, grass carp, population, electrophoresis, enzyme, protein, locus, allele, polymorphic, heterozygosity, genetic similarity, genetic distance.

* In this research, Shanghai Fisheries University was partly supported by the "International Foundation for Science" grant No. A/507.