

长江中下游鲢、鳙、草鱼、青鱼 种群分化的同工酶分析

赵金良 李思发

(上海水产大学, 200090)

摘要 为查明长江中下游鲢、鳙、草鱼、青鱼有无不同种群,用聚丙烯酰胺凝胶电泳测定了长江中游天鹅洲故道、汉阳、瑞昌江段和下游安庆江段鲢、鳙、草鱼、青鱼各4个群体间的生化遗传变异。同种鱼各群体间的遗传变异未见有显著差异,遗传距离D值均小于0.001。由此,初步认为长江中下游的鲢、鳙、草鱼、青鱼应各属一个没有显著遗传分化的种群,我们称之为“长江种群”。因而,在长江中下游选择一处优良保护场所就有可能达到就地保护长江“四大家鱼”遗传资源的目的。

关键词 鲢,鳙,草鱼,青鱼,种群,分化,同工酶,长江

长江水系鱼类资源丰富,是我国淡水鱼的集中产区。它不仅为江湖渔业提供了雄厚的渔业资源,而且也是我国淡水养殖业赖以存在的种子库和基因库。鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙(*Aristichthys nobilis*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)以下简称“四大家鱼”)是我国水产养殖业的柱石,其产量一直在我国淡水总产量中占首位。近三十年来,由于水利建设、过度捕捞及污染等原因,使得长江鱼类资源处于不断衰退之中,主要表现在群体结构简单化,群体数量显著减少[刘乐和等,1986]。长江中下游鲢、鳙、草鱼及青鱼在总渔获物中的比例已从60年代中期的20%~30%下降到现在的5%左右,天然鱼苗的数量下降到1965年的五分之一左右[易伯鲁等,1988]。从近几年的调查来看,情况更为严重(李思发和吕国庆,1993)。“四大家鱼”天然资源的加剧衰退将会对其遗传资源产生严重不利影响,对它们的种质资源进行保护的要求越来越迫切。这就提出了长江中下游“四大家鱼”有无不同种群及如何对其种质予以保护的问题。

近年来,长江“四大家鱼”种质资源保护问题已开始受到人们的高度重视。1982~1989年,李思发等[1986,1990]对长江、珠江、黑龙江鲢、鳙、草鱼种质资源进行的比较研究证明,三水系三种鱼的种群之间存在着明显的生化遗传差异,该研究中的长江种群是以在湖口江段采集的标本为代表,未考虑长江内部的种群差异。吴力钊和王祖熊[1988,1991]曾对武汉江段草鱼、南京江段鳙的生化遗传作过研究,也未涉及长江内部“四大家鱼”有无不同种群的问题。

本研究旨在以前研究的基础上,对长江干流中下游的“四大家鱼”的群体问题作进一步的研究,以期查明长江“四大家鱼”是否有不同种群,为有的放矢地保护长江“四大家鱼”遗传资源提供依据。

收稿日期:1995-03-28。

(1)李思发、吕国庆,1993。长江鱼类原良种开发利用协作组1993年年会纪要。长江鱼类原良种通讯。7:1~4。

1 材料与方法

1.1 标本的采集与保存

鲢、鳙、草鱼、青鱼鱼苗于1993年6月~7月分别从长江中游的天鹅洲故道、汉阳、瑞昌和下游的安庆4个江段采集(图1)。饲养长大后,每种鱼的每个采集群体分别取样31~35尾,共计532尾。取样时,活鱼用剪刀剪断腹大动脉放血,随即取背侧的白肌1~2g,肝脏全部。分别编号放入小塑料袋中,液氮保存。运回实验室后,于低温水箱(-20℃)保存。

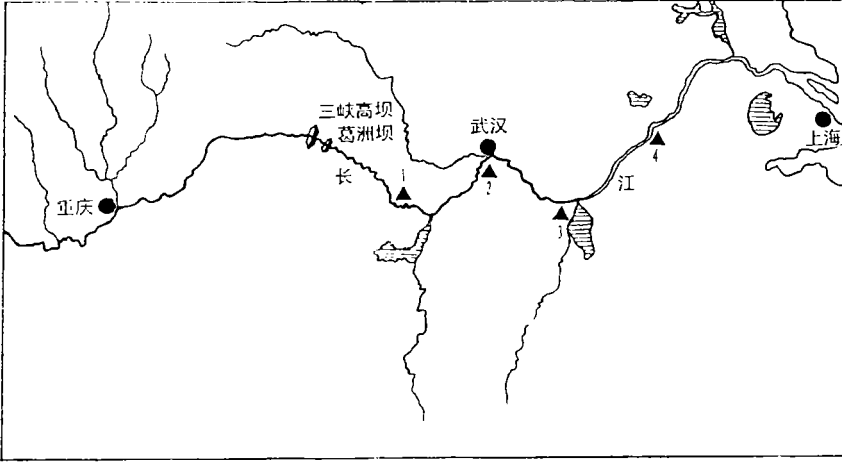


图1 长江中下游鲢、鳙、草鱼、青鱼采苗站位(▲)

Fig.1 The sampling stations of silver carp, bighead carp, grass carp and black carp in the middle and lower stream of Changjiang River
1. 天鹅洲故道; 2. 汉阳; 3. 瑞昌; 4. 安庆。

1.2 电泳方法

电泳使用瑞典LKB公司产平板电泳仪及4%的聚丙烯酰胺凝胶,在LKB2209恒温循环仪控制的5℃下进行。对不同酶采用的组织及缓冲系统见表1。为减少实验偏差和便于横向比较群体间的差异,每电泳板均点四个采样群体各5尾鱼的样品。染色方法主要仿Philipp等[1979]。

1.3 计算公式

群体间等位基因频率差异用2×2列联表 χ^2 检验[林德光,1982]:

$$\chi^2 = \frac{(|a_{11} \cdot a_{22} - a_{12} \cdot a_{21}| - n/2)^2 \cdot n}{C_1 \cdot C_2 \cdot R_1 \cdot R_2}$$

标准遗传距离(D)计算公式为[根井正利,1975;郭平仲,1993;梅里尔,1991]:

$$D = -\ln I_N \quad I_N = \frac{\frac{1}{L} \sum \sum P_{Xij} \times P_{Yij}}{\sqrt{(\sum \sum P_{Xij}^2)(\sum \sum P_{Yij}^2)/L^2}}$$

式中, P_{Xij} 是群体X中第i个座位上第j个等位基因的频率; P_{Yij} 是群体Y中第i个座位上

第 j 个等位基因的频率; L 为座位数, I_N 为遗传相似指数。

种群的多态座位比例(P)和平均杂合度(H)的计算公式分别为[根井正利, 1975; 梅里尔, 1991年中译本]:

$$P = \text{多态座位数} / \text{总座位数} \quad H = \frac{\sum(1 - \sum X_i^2)}{n}$$

式中, X_i 为等位基因 i 的频率; n 为检测座位数。

表 1 酶类、组织及缓冲液系统

Table 1 Enzymes, tissues and buffer systems used in this study

酶或蛋白质	酶号	结构	组织	缓冲系统	被检座位
ADH	1.1.1.1	D	肝	EBT	1
α -GPDH	1.1.1.8	D	肌	TC	1
SDH	1.1.1.14	D	肝	HC	1
LDH	1.1.1.27	T	肝	TC	3
MDH	1.1.1.37	D	肌	TC	4
ME	1.1.1.40	D	肌	EBT	1
G-6-PDH	1.1.1.49	T	肝	TC	2
SOD	1.15.1.1	D	肌或肝	EBT	1或3
EST	3.1.1.1	M	肝	EBT	1
肌蛋白			肌	TC	

注: (1) M—单体; D—二聚体; T—四聚体。

(2) 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。

2 结果

2.1 群体间的等位基因频率差异

对长江中下游不同江段鲢、鳙、草鱼、青鱼各 4 个采样群体 10 种酶和白肌蛋白进行了电泳分析。其中, LDH 电泳未显带, 在显带清楚的 9 种酶中, 仅发现鲢 Ldh-C、鳙 Adh、 α -Gpdh、Est-2, 草鱼 Sod、青鱼 Est-2 为多态座位, 不同群体的多态座位的等位基因频率见表 2, 其余各种同工酶在每种鱼的各群体中均表现为单态。

多态座位的基因频率均与按 Hardy-Weinberg 基因平衡定律的估算结果相符。对四种鱼各群体间的等位基因频率差异的计算结果表明, 鲢、鳙、草鱼、青鱼各采样群体间的等位基因频率均无显著差异, 说明各采样群体间无明显遗传差异。

白肌蛋白的电泳结果也未发现同种鱼各采样群体间有差异。

2.2 群体间的遗传相似指数和遗传距离

表 3~6 分别列出了鲢、鳙、草鱼、青鱼各 4 个群体的遗传相似指数和遗传距离。每种鱼的不同群体间都有非常高的遗传相似性, $I_N > 0.999$; 而遗传距离 D 一般小于 0.001。这说明它们分别同属一个种群, 无明显的遗传分化。

2.3 种群的遗传变异

长江中下游鲢、鳙、草鱼、青鱼种群的多态座位比例和平均杂合度汇总于表 7。

表 2 长江中下游鲢、鳙、草鱼、青鱼所测的多态座位及其等位基因频率

Table 2 Polymorphic loci and allelic frequencies of the studied enzymes of silver carp, bighead carp, grass carp and black carp in the middle and lower stream of Changjiang River

鱼别	座位	等位基因	等位基因频率			
			采 样 江 段			
			天鹅洲	汉阳	瑞昌	安庆
鲢	LDH-C	-100	0.8500	0.7500	0.7833	0.8500
		0	0.1500	0.2500	0.2167	0.1500
鳙	ADH	100	0.5600	0.6600	0.6200	0.5600
		105	0.4400	0.3400	0.3800	0.4400
	α -GPDH	100	0.6167	0.5167	0.6167	0.5167
		50	0.3833	0.4833	0.3833	0.4833
	EST-2	100	0.9000	0.9500	0.9667	0.9333
草鱼	SOD	97	0.1000	0.0500	0.0333	0.0667
		100	0.7500	0.7667	0.7667	0.7833
青鱼	EST-2	100	1.0000	0.9667	1.0000	1.0000
		97	0.0000	0.0333	0.0000	0.0000

表 3 天鹅洲、汉阳、瑞昌和安庆 4 个江段鲢的遗传相似指数和遗传距离

Table 3 Genetic similarity and distance among silver carp of Swan Oxbow, Hanyang, Ruichang and Anqing river sections

	天鹅洲	汉阳	瑞昌	安庆
天鹅洲		0.00059	0.00026	0.00000
汉阳	0.99941		0.00007	0.00059
瑞昌	0.99974	0.99993		0.00026
安庆	1.00000	0.99941	0.99974	

注:左下方是遗传相似指数,右上方是遗传距离。

表 4 天鹅洲、汉阳、瑞昌和安庆 4 个江段鳙的遗传相似指数和遗传距离

Table 4 Genetic similarity and distance among bighead carp of Swan Oxbow, Hanyang, Ruichang and Anqing river sections

	天鹅洲	汉阳	瑞昌	安庆
天鹅洲		0.00141	0.00050	0.00070
汉阳	0.99859		0.00074	0.00064
瑞昌	0.99950	0.99926		0.00091
安庆	0.99930	0.99936	0.99908	

注:左下方是遗传相似指数,右上方是遗传距离。

表 5 天鹅洲、汉阳、瑞昌和安庆 4 个江段草鱼的遗传相似指数和遗传距离

Table 5 Genetic similarity and distance among grass carp of Swan Oxbow, Hanyang, Ruichang and Anqing river sections

	天鹅洲	汉阳	瑞昌	安庆
天鹅洲		0.00002	0.00002	0.00007
汉阳	0.99998		0.00000	0.00002
瑞昌	0.99998	1.00000		0.00002
安庆	0.99993	0.99998	0.99998	

注:左下方是遗传相似指数,右上方是遗传距离。

表 6 天鹅洲、汉阳、瑞昌和安庆 4 个江段青鱼的遗传相似指数和遗传距离

Table 6 Genetic similarity and distance among black carp of Swan Oxbow, Hanyang, Ruichang and Anqing river sections

	天鹅洲	汉阳	瑞昌	安庆
天鹅洲		0.00006	0.00000	0.00000
汉阳	0.99994		0.00006	0.00006
瑞昌	1.00000	0.99994		0.00000
安庆	1.00000	0.99994	1.00000	

注:左下方是遗传相似指数,右上方是遗传距离。

表7 长江中下游鲢、鳙、草鱼、青鱼种群的多态座位比例(P)及平均杂合度(H)

Table 7 Mean proportion of polymorphic(P) and average heterozygosity(H) per locus of silver carp, bighead carp, grass carp and black carp populations from the middle and lower stream of Changjiang River

鱼别	检查座位数	多态座位数	多态座位比例 (P)	平均杂合度 (H)
鲢	17	1	0.0588	0.0180
鳙	17	3	0.1765	0.0674
草鱼	15	1	0.0666	0.0237
青鱼	17	1	0.0588	0.0010

3 讨论

3.1 对长江中下游“四大家鱼”种群无明显分化的分析

种群是在特定空间内相互间能彼此交配繁殖后代的同种生物个体的集合体。它的遗传特征是具有的基因组成,即享有一个共同的基因库。不同种群的基因库不同。

本研究所用的鱼苗分别采自天鹅洲故道、汉阳、瑞昌及安庆江段,根据易伯鲁等[1964]和余志堂等[1985]的论述推断,其相应的产卵江段为:宜昌—枝城江段、荆沙—监利江段、城陵矶—鄂城—武穴江段、九江—湖口—彭泽江段,基本上复盖了长江中、下游“四大家鱼”的繁殖群体。

本研究对采自不同江段鲢、鳙、草鱼、青鱼的同工酶和蛋白质电泳表型研究结果均表明,各江段“四大家鱼”的生化遗传变异无显著差异。未发现每种鱼各群体间的等位基因频率有何明显差异。这表明,长江中下游“四大家鱼”种内群体间的遗传相似性很高。根井正利[1975]利用遗传相似指数 I_N 和遗传距离 D 值对物种的不同分类单位间的遗传分异水平作过定量性估计,并指出种群间遗传距离 D 值的范围是 0~0.05;亚种间是 0.02~0.2。Shaklee 等[1982]综合已发表的资料,提出鱼类在属、种和种群三级水平上的遗传距离 D 值分别为 0.90,0.30 及 0.05 的分类判据。在本研究中,长江中下游“四大家鱼”种内群体间的遗传距离 D 值都低于 0.001,即位于种群遗传距离划分标准的下限。这证明,每种鱼的采样群体间没有明显的遗传分化,没有出现符合上述种群遗传特征的分化。由此可以认为,长江中下游的“四大家鱼”应各属一个种群,可称之为“长江种群”。

造成长江中下游“四大家鱼”种群缺少明显遗传分化的原因主要是:长江从宜昌到彭泽各江段间没有任何地理分隔障碍,生态环境相似;“四大家鱼”可随意在不同江段间迁移,相互混合、交配,各自成为一个大的种群。在这种情况下,种群的各部分(如本试验的采样群体)与整个种群的平均基因频率不致太悬殊,各采样群体间的生化遗传也不可能有显著差异。

本研究的目的是对某种鱼的某一群体的遗传变异调查,而是弄清同一时期在不同江段采样的群体间的遗传差异,即查明长江“四大家鱼”群体内有无明显的遗传分化。为减少试验偏差,我们采用了严格一致的电泳方法,尤其是把不同群体的样本放在同一电泳板上比较,这种横向的比较能有效地区别群体的异同,其结果是可靠的。

3.2 关于同工酶技术研究鱼类种群的问题

鱼类种群的确定和划分,以往主要是从生物学和生态学的方面研究鱼类群体的形状特征

和生态特征的异同。随着能够定量分析群体遗传变异的同工酶电泳技术的完善,开始了从遗传方面对生物群体的更深入研究。大量文献资料证明,同工酶电泳能快速、简便、较为实用地测定群体的遗传变异,并被公认为是研究群体遗传学的一种好方法。

用凝胶电泳的方法可以根据平均杂合度(H)和多态座位的比例(P)值的大小来估计种群内的遗传变异,同时还可以比较不同种群的遗传变异量和估算它们的遗传分化程度。本次实验中长江中下游的“四大家鱼”种群内群体间的遗传距离都较低,鲢的群体间遗传距离为0~0.000 59,鳙为0.000 50~0.001 41,草鱼为0~0.000 07,青鱼为0~0.000 06。这一结果比李思发等[1986]计算的长江、珠江、黑龙江鲢、鳙、草鱼三个水系种群间的遗传距离(鲢0.005 7~0.010 2,鳙0.040 7,草鱼0.029 0~0.075 8)小得多,证明了同种鱼在长江水系内(种群内)的遗传分化要比水系间(种群间)低得多。

本次测定的多态座位比例和平均杂合度低于李思发等[1986]报道的数值。自然种群本身就是一个非常复杂的大群体,每次试验所采样本数仅是其中的极少数代表,由于研究时间已相隔十年,所采集的样本不可能雷同,虽然测法一致,前后测定结果不完全一致也是可能的。

由于电泳分析所测定的位点,只是遗传变异的很小部分;而且电泳方法只能检测出全部核苷酸代换数目(即全部遗传变异)的1/4~1/3[根井正利,1975年中译本;梅里尔,1991年中译本]。所以,同工酶电泳在更全面、更深刻提供关于群体遗传变异和特征的信息方面还存在着一定的局限性。还有待于用其它实验技术和方法进一步确证和补充。我们将进一步从线粒体DNA、核酸DNA等多方面进行测定,以确证同工酶的研究结果。

3.3 长江“四大家鱼”的遗传保护

长江“四大家鱼”天然资源正处于严重衰竭之中。不论是成鱼捕捞还是天然鱼苗产量均急剧下降,与此同时,“四大家鱼”鱼苗成色也发生了相应的变化;特别是鲢、鳙的比例大大减少[长江四大家鱼产卵场调查队,1982]。据近年的调查结果,鲢的天然鱼苗已不能满足现有的几个“四大家鱼”原种场的正常生产需要(李思发和吕国庆,1993)。

鱼类资源的保护,不仅指数量上,而且包括物种的遗传资源即全部基因库的保护。“四大家鱼”天然资源的日益衰竭使得遗传资源保护问题尤显紧迫。对“四大家鱼”天然种群的保护,我们提倡建立自然保护区。本次实验查明长江中下游的“四大家鱼”都只有一个种群。在我国人力、物力、财力都很有有限的情况下,我们认为,选择和建立一处保护区就有可能达到保护长江“四大家鱼”基因库这一基本目的。

由于三峡大坝建成后,坝下江段水位降低,洪峰减少,预计中游江段尤其是宜昌一城陵矶江段的“四大家鱼”产卵场(产卵量占全江段的42%)将受到严重影响,甚至可能会消失。拟在宜昌一城陵矶江段兴建的天鹅洲故道(湖北省石首市)“四大家鱼”种质资源天然生态库和已建成的老江河(湖北省监利县)“四大家鱼”种质资源库也将受到严重影响,它们的原先设计功能将难以全部实现。另一方面,预计长江干流“四大家鱼”主要繁殖场所将有可能下移。所以从长远来看,“四大家鱼”遗传保护区的地址可能需要随之调整。

本研究是加拿大国际发展研究中心(IDRC)资助合作研究项目“长江鱼类多样性”成果之一。

参 考 文 献

- [1] 长江四大家鱼产卵场调查队, 1982. 葛洲坝水利枢纽工程截流后长江四大家鱼产卵场调查. 水产学报, 6(4):237 ~ 305.
- [2] 刘乐和等, 1986. 葛洲坝水利枢纽兴建后对青、草、鲢、鳙繁殖生态效应的研究. 水生生物学报, 10(4):353 ~ 364.
- [3] 吴力钊、王祖熊, 1988. 草鱼同工酶基因座位多态性的初步研究. 水生生物学报, 12(2):116 ~ 124.
- [4] 吴力钊、王祖熊, 1991. 长江下游鱮鱼天然种群的生化遗传变异. 水生生物学报, 15(1):94 ~ 96.
- [5] 李思发等, 1986. 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. 水产学报, 10(4):351 ~ 372.
- [6] 李思发等, 1990. 长江、珠江、黑龙江鲢、鳙、草鱼种质资源研究, 49 ~ 101. 上海科学技术出版社.
- [7] 余志堂等, 1985. 葛洲坝水利枢纽截流后的长江家鱼产卵场. 鱼类学论文集, 4:1 ~ 12.
- [8] 林德光, 1982. 生物统计的数学原理, 99 ~ 126. 辽宁人民出版社(沈阳).
- [9] 易伯鲁等, 1964. 长江家鱼产卵场的自然条件和促使产卵的主要外界因素. 水生生物学集刊, 5(1):1 ~ 15.
- [10] 易伯鲁等, 1968. 葛洲坝水利枢纽与长江四大家鱼, 47 ~ 68. 湖北科技出版社(武汉).
- [11] 根井正利(王家玉译), 1975. 分子群体遗传学与进化论, 121 ~ 203. 农业出版社(京).
- [12] 郭平仲, 1993. 群体遗传学导论, 333 ~ 373. 农业出版社.
- [13] 梅里尔(黄瑞复译), 1991. 生态遗传学, 265 ~ 302. 科学出版社(京).
- [14] Philipp, D. P. *et al.*, 1979. Evolution of pattern of differential gene expression; a comparison of the temporal and spatial patterns of isozymes locus expression in two closely related fish species(Northern largemouth bass, *Micropterus salmoides salmoides*, and smallmouth bass, *Micropterus salmoides*) in the United States. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 38:1715 ~ 1723.
- [15] Shaklee, J. B. *et al.*, 1982. Speciation and evolution of marine fishes studied by the electrophoresis analysis of proteins. *Pac. Sci.*, 36:141 ~ 157.

ISOENZYME ANALYSIS OF POPULATION DIVERGENCE OF SILVER CARP, BIGHEAD CARP, GRASS CARP AND BLACK CARP IN THE MIDDLE AND LOWER STREAM OF CHANGJIANG RIVER

Zhao Jinliang and Li Sifa

(Shanghai Fisheries University, 200090)

ABSTRACT In order to ascertain the genetic divergence level of populations of silver carp, bighead carp, grass carp and black carp in the middle and lower stream of Changjiang River, the biochemical genetic variation of four species sampled from Swan Oxbow, Hanyang, Ruichang and Anqing River sections of Changjiang River were analysed by LKB horizontal acrylamide gel electrophoresis. There was no significant difference of genetic variation among the four sampling river sections of each species and the genetic distance was lower than 0.001. Based on this result, silver carp, bighead carp, grass carp and black carp in the middle and lower stream of Changjiang River was considered as one population without genetic divergence, respectively. Therefore, one conservation area in the main stream of Changjiang River for genetic conservation *in situ* of silver carp, bighead carp, grass carp and black carp could be enough.

KEYWORDS Silver carp, Bighead carp, Grass carp, Black carp, Population, Divergence, Isoenzyme, Changjiang River