

台湾海区斜带石斑鱼群体遗传学的等位酶研究

丁少雄^{1,2}, 王 军¹, 郭 丰¹, 王德祥¹, 王世锋¹

(1. 厦门大学海洋与环境科学学院, 2. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要:应用聚丙烯酰胺凝胶和淀粉凝胶技术对台湾海区斜带石斑鱼的遗传结构和遗传多样性水平进行了等位酶分析. 对 18 种酶系统共 27 个等位酶基因座位的检测表明, ADH-1、ODH-2、FDH-1 和 Est-3 等 5 个基因座位具多态性, 其群体的多态位点百分率 P 为 18.5%, 有效等位基因平均数 N_e 为 1.185, 平均杂合度的观测值 H_o 为 0.0469, 预期值 H_e 为 0.0662, 反映了该群体的遗传多样性水平在鱼类中处于中等程度, 而其 Hardy-Weinberg 遗传偏离指数 (D) 为 -0.246, 表明该群体仍存在着明显的杂合子缺失现象. 相对于捕捞压力, 海岸线的工程改造是对其资源的更主要威胁.

关键词:斜带石斑鱼; 等位酶; 遗传多样性

中图分类号: S 932.4

文献标识码: A

斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 俗称青斑, 是我国南方传统的名贵海水鱼, 主要分布在太平洋和印度洋的热带亚热带海区, 我国的台湾海峡及南海均有分布. 由于需求量的迅速增加, 人们已着手进行斜带石斑鱼的规模化人工育苗研究, 目前养殖的斜带石斑鱼正逐步取代野生捕捞的斜带石斑鱼而成为主要商品鱼来源^[1]. 目前国内外尚未见有关斜带石斑鱼群体遗传学方面的研究报道. 本文应用等位酶分析技术, 对以采自台湾海区斜带石斑鱼为亲鱼人工繁育子一代的群体遗传结构和群体内遗传多样性进行研究, 其结果不仅可为合理利用和保护斜带石斑鱼的野生资源提供科学依据, 也可为其科学的人工繁育和遗传育种提供借鉴.

1 材料与方法

斜带石斑鱼采集于漳浦石斑鱼鱼种场, 为台湾海区野生种群人工繁殖子一代, 共 60 尾, 体重 (130 ~ 170 g). 试验鱼在鲜活状态下运回实验室暂养. 取

试验鱼肝脏、肌肉和心脏组织, 编号后装入小袋并迅速放入液氮保存至分析. 分析用样品加 3 倍体积磷酸缓冲液 (0.2 mol/L, pH 8.0, 0.1% - 巯基乙醇), 冰浴匀浆后于 4 °C, 15 000 r/min 离心 10 min, 上清液用于电泳.

酶电泳过程采用聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) 和淀粉凝胶 (SG) 两种支持物, 聚丙烯酰胺凝胶电泳参考莽克强等 (1975)^[2] 的方法, 为高 pH 不连续系统, 以 TG 为电泳缓冲体系; 淀粉凝胶电泳参考徐成等^[3] 的方法, 分别采用 TC 和 EBT 两种缓冲体系. 凝胶的染色方法分别参考王中仁^[4], Harris 等^[5] 的方法.

数据处理采用 Nei (1978)^[6] 的方法, 公式如下:

1) 多态位点比例 (P) = 多态位点数 / 所测位点总数.

2) 群体平均杂合度的观测值: (H_o) = H_o / n , 其中 H_o = 杂合子观测值 / 观察个体的总数; 群体的平均杂合度的预期值: (H_e) = $(1 - \sum x_i^2) / n$.

3) 位点有效等位基因数: N_e = 每位点等位基因观测数的和 / n .

4) Hardy-Weinberg 遗传偏离指数: $D = (H_o - H_e) / H_e$

以上 x_i 为 x 种群的第 i 个等位基因的频率, n 为所测位点的总数;

收稿日期: 2003-01-21

基金项目: 863 计划资助项目 (2001AA621010) 及福建省科技重大资助项目 (2001N009)

作者简介: 丁少雄 (1973 -), 男, 讲师.

2 结果

2.1 同工酶电泳结果

本实验共对 25 种酶系统进行电泳检测,并对其 18 种电泳酶谱清晰、表达稳定的酶系统进行等位酶分析(表 1)。在 18 种酶系统中共检测到 27 个基因座位,根据 Nei 对多态基因座位的定义标准^[7],27 个基因座位中,ADH-1、ODH-2、FDH-1 和 Est-2 及 Est-3 等 5 个基因座位上都有两个以上的等位基因,且每个等位基因的频率均在 0.01 以上,因此它们都为多态性基因座,而其余的基因座位均为单态。

2.2 遗传多样性度量

对斜带石斑鱼台湾种群的等位酶分析表明,在所测定的 27 个基因座位中,有 5 个是多态基因座,其群体的多态位点百分率 P 为 18.5%,有效等位基因平均数 N_e 为 1.185,平均杂合度的观测值 H_o 为 0.0469,预期值 H_e 为 0.0622,结果表明了在该群体中,18.5%左右的座位是多态的,平均每个位点有 1.185 个等位基因,若群体为随机交配则应该有 6.22%的杂合体。而由于其杂合度的观测值小于预期值,其平均的 Hardy-Weinberg 遗传偏离指数 (D)

为 -0.246,说明该群体存在着明显的杂合子缺失现象。其群体的各基因座位的等位基因频率及多态位点上的变异水平如表 2 和表 3 所示。

3 讨论

由于生化特性的不同,不同基因座位的同工酶可能应采用不同的电泳方法,不同的电泳介质、缓冲体系和电泳条件都可能对酶的活性造成很大影响,从而获得不同的电泳图谱。目前最常用的两种电泳介质是淀粉凝胶和聚丙烯酰胺凝胶。其中聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)具有分辨率高,易于染色的等特点,适合于分析活性较弱的同工酶,但由于其不能切割,工作效率要低于淀粉凝胶。在本研究中由于所分析的多种酶均易于失活,因此本研究仍以 PAGE 法为主,对部分不适合于 PAGE 法电泳的同工酶则以淀粉凝胶电泳法分析。

在本研究中所取样品虽然是野生斜带石斑鱼的人工繁殖子一代,但是在人工繁育时保持着较大的有效亲本数(大于 100 尾)并进行自由交配。根据 Frankel 等^[8]的理论,经过这次繁育“瓶颈”保存下来的遗传变异仍大于 99.5%。其次,由于取样空间对遗

表 1 所分析的 18 种酶体系及其电泳体系
Tab.1 Enzymes system and its buffer systems used

同工酶	国际编号	亚基组成	所用组织	电泳支持物	缓冲系统
乳酸脱氢酶(LDH)	EC1.1.1.27	二聚体	眼球或肌肉	PAG	TG
苹果酸脱氢酶(MDH)	EC1.1.1.37	二聚体	肌肉	PAG	TG
醇脱氢酶(ADH)	EC1.1.1.1	二聚体	肝脏	PAG	TG
酯酶(Est)	EC3.1.1.-	单体或二聚体	肝脏	PAG	TG
超氧化物歧化酶(SOD)	EC1.15.1.1	二聚体	肝脏	PAG	TG
甲醛脱氢酶(FDH)	EC1.2.1.1	二聚体	肝脏	PAG	TG
葡萄糖脱氢酶(GCDH)	EC1.1.1.118	二聚体	肝脏	PAG	TG
山梨醇脱氢酶(IDDH)	EC1.1.1.14	二聚体	肝脏	PAG	TG
黄嘌呤脱氢酶(XDH)	EC1.1.1.204	单体或二聚体	肝脏	PAG	TG
辛醇脱氢酶(ODH)	EC1.1.1.73	二聚体	肝脏	PAG	TG
过氧化物酶(PER)	EC1.11.1.7	二聚体	红细胞或心脏	PAG	TG
磷酸葡萄糖变位酶(PGM)	EC5.4.2.2	单体	肌肉	SG	TC
酸性磷酸酶(ACP)	EC3.1.3.2	单体或二聚体	肝脏	SG	TC
甘油 3 磷酸脱氢酶(G3PDH)	EC1.1.1.8	二聚体	肌肉	SG	TC
葡萄糖磷酸异构酶(GPI)	EC5.3.1.9	二聚体	肝脏	SG	EBT
天冬氨酸转氨酶(AAT)	EC2.6.1.1	二聚体	肝脏	SG	TC
己糖激酶(HK)	EC2.7.1.1	单体	肝脏	SG	TC
6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G6PDH)	EC1.1.1.49	二聚体	肌肉	SG	EBT

表 2 斜带石斑鱼台湾种群各基因座位的等位基因频率
Tab. 2 The allele frequencies in Taiwan population of *Epinephelus coioides*

基因座位	等位基因	基因频率	基因座位	等位基因	基因频率
LDH _a	100	1.000	IDDH	100	1.000
HK	100	1.000	G3PDH	100	1.000
sMDH	100	1.000	Per	100	1.000
mMDH	100	1.000	GCDH	100	1.000
AA T-1	100	1.000	SOD-1	100	1.000
AA T-2	100	1.000	SOD-2	100	1.000
XDH	100	1.000	SOD-3	100	1.000
ACP	100	1.000	G ₆ PDH	100	1.000
ADH-1	100	0.900	PGM	100	1.000
	120	0.100	FDH-1	100	0.792
ADH-2	100	1.000		80	0.208
Est-1	100	1.000	FDH-2	100	1.000
Est-2	100	0.700	ODH-1	100	1.000
		0.300	ODH-2	100	0.758
Est-3	100	0.550		120	0.242
		0.450	GPI	100	1.000

传参数估算也有着重要影响,样品覆盖面积占整个群体分布面积的比例越大,对遗传参数估算引起的偏差越小,而我们所取样品的亲本基本上来自台湾沿海垂钓所获,具有较大的样品覆盖面积.在进行等位酶分析时,理论上讲,取样个体数对群体遗传水平的估算也有着较大影响,Sjogren 等^[9]曾经就取样个体数对群体遗传学研究的影响进行了一些计算机模拟,结果认为对大群体取样数至少要大于 30 才能得到较准确的遗传参数估算,在本研究中所取样品数大于 30,也可在一定程度上弥补由于繁育“瓶颈”和取样空间不足所带来的估算偏差.因此,通过本研究所获结果来评估台湾野生斜带石斑鱼的遗传结构仍具有较高的可信度.

表 3 斜带石斑鱼多态位点的遗传变异

Tab. 3 Genetic variability at each polymorphic locus of *Epinephelus coioides*

多态位点	H_0	H_e	D
ADH-1	0.133	0.180	-0.261
Est-2	0.333	0.420	-0.207
Est-3	0.366	0.496	-0.262
FDH-1	0.250	0.329	-0.240
ODH-2	0.417	0.366	0.139

迄今通过酶电泳技术已对许多物种的遗传多样性和群体遗传结果进行了检测,积累了大量资料,在鱼类的群体遗传学研究中也是如此.一般说来,海水鱼类的遗传变异要高于淡水鱼类.据统计,淡水鱼类的多态位点比例为 11.8%~33.3%^[3];鲤科鱼类平均杂合度平均为 0.052;106 种海水鱼类的平均杂合度平均值为 0.055;海水鱼类的平均杂合度(0.063)高于淡水鱼类(0.043 0),洄游性鱼类的平均杂合度与淡水鱼类相似,平均值为 0.041^[10]. Innocentiis 等曾运用同工酶技术对地中海 *Epinephelus marginatus* 的 3 个不同群体的多样性水平进行检测,它们的多态位点比例 P 为 14%~29%,杂合度 H 为 0.026~0.059,并由此认为该石斑鱼资源量虽遭到极大破坏,但其群体遗传多样性仍居中等水平^[11]. 本研究结果显示,斜带石斑鱼台湾群体的多态位点比例为 18.5%,平均杂合度为 0.062 2,也可说明该斜带石斑鱼群体的遗传多样性水平在鱼类中处于中等程度.由于斜带石斑鱼为近岸和岛礁定居性鱼类,生态环境的复杂多变及没有大群体被捕捞的威胁可能是其仍能保持一定的遗传多样性水平的主要原因.但其遗传偏离指数(D)为 -0.246,在 5 个出现多态位点的基因座位中,ADH-1、Est-2、Est-3、FDH-1 的遗传偏离指数均为负值,仅有 ODH-2 的偏离指数为正值,反映了该群体已存在着明显的杂合子缺失现象.

结合近年来日见减少的捕获量,该野生群体资源状况并不容乐观.就目前来说,垂钓方式的捕捞压力并不能对斜带石斑鱼的野生资源造成太大影响,其最主要的人为干扰来自海岸带的建设对其长期适应的生境造成的严重破坏.天然的岸礁浅滩越来越多地被平整的公路护堤所取代是野生斜带石斑鱼面临的最大威胁.因此,对斜带石斑鱼野生资源进行保护的工作重点,应该是加强对天然岛礁环境的保护.

参考文献:

- [1] 刘付永忠,王云新,黄国光,等.斜带石斑鱼亲鱼强化培育及自然产卵研究[J].中山大学学报(自然科学版),2000,39(6):81-85.
- [2] 莽克强,徐乃正,方荣祥.聚丙烯酰胺凝胶电泳[M].北京:科学出版社,1975.26-27.
- [3] 徐成,王可玲,尤锋,等.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):42-49.
- [4] 王中仁.等位酶分析的遗传基础[J].生物多样性,1994,2(3):149-156.
- [5] Harris H, Hopkinson D A. Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics[M]. Amsterdam, Oxford: Nor Holland Publishing Com, 1976.
- [6] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. [J] Genetics. 1978,89:583-590.
- [7] Nei M. Genetic distance between populations[J]. Amer. Natu., 1972,106:283-292.
- [8] 李思发.鱼类繁育群体遗传性能的保护[J].水产学报,1988,3:283-292.
- [9] Sjogren P, Wyoni P. Conservation genetics and detection of rare alleles in finite populations[J]. Conserv Biol, 1994, 8:167-170.
- [10] 徐成,王可玲,张培军,等.鲈鱼群体生化遗传学研究 II.种群生化遗传结构及变异[J].海洋与湖沼,2001,32(3):248-254.
- [11] Innocenti S De, Sola L, Cataudella S, et al. Allozyme and microsatellite loci provide discordant estimates of population differentiation in the endangered dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) within the Mediterranean Sea[J]. Molecular Ecology, 2001, 10:2163-2175.

Genetic Structure of *Epinephelus coioides* in Taiwan Sea Area by Allozyme Analysis

DING Shao-xiong^{1,2}, WANG Jun¹, GUO Feng¹,
WANG De-xiang¹, WANG Shi-feng¹

(1. College of Oceanography and Environment,
2. School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: The genetic variation of *Epinephelus coioides* from Taiwan coast was assessed at 27 enzymatic loci by allozyme analysis using PAGE and horizontal starch gel electrophoresis. Among the 27 loci, 5 loci (ADH-1, ODH-2, FDH-1 and Est-3) were detected polymorphic. The result showed that considerable genetic variability still kept in *Epinephelus coioides* from Taiwan coast when compared to other fish. Mean proportions of polymorphic loci, average number of alleles per locus, mean expected heterozygosity and mean observed heterozygosity were 18.5%, 0.0622 and 0.0469 respectively. But the negative Hardy-Weinberg index (-0.246) indicated that there is an obvious absence of heterozygotes in the nature resource of this fish. The rebuilt of the coastline might be more threaten to the resource of *E. coioides* rather than fishing stress.

Key words: *Epinephelus coioides*; genetic variability; allozyme