

银鲫种内的遗传标记及其在选种中的应用*

朱 蓝 菲 蒋 一 瑛

(中国科学院水生生物研究所, 武汉)

提 要

用聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳分析了银鲫和异育银鲫的血清蛋白和肝脏酯酶, 发现这两种鱼的血清蛋白和肝脏酯酶各具有 4 种不同的表型。由同一母本银鲫繁殖的子代——银鲫或异育银鲫, 具有与母本相同的表型, 只是在异育银鲫的肝脏酯酶谱型中另有一些无规律的变化, 显然这是异源精子的作用所致。此外, 这 4 种不同表型的鱼具有不同的生长能力, 其差距最大可达 50%。这些结果表明, 天然雌核发育的银鲫种内含有若干个不同的雌核发育系, 这对于开展银鲫的选育研究具有重要的实践意义。

关键词 银鲫, 雌核发育系, 遗传标记, 血清蛋白, 肝脏酯酶, 选种

银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 主要分布在我国黑龙江水系, 是一种野生的经济鱼类。七十年代初江浙一带作过引种养殖尝试^[2]。近期, 对于银鲫繁殖生物学和细胞学的研究表明, 银鲫是进行天然雌核发育的两性型种群^[3-4]。用异源精子(兴国红鲤精子)授精, 不仅能激发银鲫卵进行雌核发育, 而且还能影响雌核发育子代的某些性状, 如加快了子代的生长速度^[7]。由方正银鲫(♀)和兴国红鲤(♂)通过人工授精而产生的子代——异精雌核发育银鲫(简称异育银鲫), 已在国内广泛推广养殖, 成为一种新兴的鲫鱼养殖业。

然而, 当前用于生产异育银鲫的母本银鲫(采捕于黑龙江省方正县双凤水库), 是一小群未经选择的野生银鲫。据报道^[1,20,21], 银鲫含有不同类型的个体, 它们在形态特征和生长性能上均存在差异。因此从遗传育种意义来说, 研究银鲫种内的遗传变异, 寻找区别银鲫中不同类型的遗传标记, 比较不同类型间的生产性能, 从而选育出银鲫优良品系, 无疑对于改进以银鲫为母本的异育银鲫的经济性状是十分重要的。

在一些天然雌核发育的鱼类中, 常用组织移植方法研究其遗传结构^[11,12,15]。也常有选用蛋白质或酶的多态性作为遗传标记, 以鉴别种内遗传变异^[10,18,19]。此外也有人对一些多态性座位与某些经济性状之间的相关性进行了探索^[6]。本文采用电泳方法比较了银鲫的血清蛋白和酯酶等 8 种生化指标, 观察到血清蛋白和肝脏酯酶同工酶的电泳图谱在银鲫个体间有明显的差异, 并对这些差异能否作为银鲫选种的遗传标记进行了实验。

材 料 与 方 法

银鲫(亲本)的来源与鉴定 银鲫来源于黑龙江省方正县双凤水库, 分别在 1976、

* 本工作得到湖北省科委和中国科学院武汉分院的经费资助。
1986 年 3 月 11 日收到。

1977 和 1982 年运回。有的是本所自行繁殖的银鲫后代。雄性兴国红鲤 (*Cyprinus carpio L.* red variety) 取自本所关桥试验场。为了防止人工繁殖时把鲫 (*Carassius auratus auratus*) 误用为亲本, 按已报道过的方法^[6], 将所用的银鲫卵用经过紫外线照射后的精液授精, 如果不出现辐射雌核发育单倍体胚胎的畸形症状, 并能正常发育存活的, 即证明所用亲本是天然雌核发育的银鲫。

人工繁殖和实验组合 采用人工催产, 卵子经干法授精后粘在塑料网片上, 放入盆内静水孵化。将产卵后的亲鱼从尾动脉抽取血样, 进行电泳分析。为了较准确地进行子代的生长对比实验, 材料均取自同在两天内产卵孵出的鱼苗, 进行同池生长比较。具体做法是将每尾银鲫所产的卵分成两份: 一份用银鲫的精子授精获得银鲫子代, 另一份卵用兴国红鲤的精子授精, 所得子代为异育银鲫。出苗一周后, 按亲鱼血清蛋白测定的结果, 将不同表型的银鲫子代各取 60 尾混养在一池; 不同表型的异育银鲫各取 60 尾混养在另一池。

血清蛋白的分析 采血后离心 10 分钟 (1500r/min), 收取血清在 -10℃ 左右保存备用。采用 4—30% 的聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳法进行血清蛋白的分离。用考马斯亮蓝 R250 显色。

肝酯酶的分析 取肝 0.3 克, 加入 0.6 毫升的 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液, 在匀浆器中反复匀浆, 离心 30 分钟 (10,000r/min), 取上清液在 -10℃ 左右保存备用。电泳分离的方法与血清蛋白电泳相同。电泳后用 1-醋酸萘酯为底物, 固蓝 RR 盐显色。

生长实验在年底结束。干塘捕鱼, 分别称量鱼体重及空体壳重(除内脏后的体重)。取肝脏和血液样品进行电泳分析, 将子代的图谱与亲鱼的图谱进行对照、归类和分析比较。

实 验 结 果

1. 个体间血清蛋白的异质性

银鲫的血清蛋白电泳图谱大致可分为 3 个区段 (图版 I: 上图)。靠近阳极的为第 I 区段, 有 7—12 条比较清楚的区带, 它随着不同的季节, 区带的数目和含量都有一些变化。在这区段之前, 即泳动最快的部分还有许多细微的区带。但是由于图谱中各区带着色的深浅相差甚远, 很难在照片中同时都显现清楚, 因此在图 1 中没有包括这些细微的区带。也因其较难分辨, 对它也不作讨论。第 III 区段是靠近阴极, 约占整个图谱五分之三的区域。其中一些组分随着季节的不同, 含量上有些变化, 但可看出, 第 III 区段图谱在银鲫个体间没有明显的区别。在这两个区段之间的是第 II 区段, 这里含有一些较为稳定的区带, 它们显示了银鲫个体间的蛋白质异质性。根据谱型特征鉴定出 4 种不同的表型, 分别编号为 A、B、C 和 D。为了更清楚地表示这 4 种不同的表型, 特将第 II 区段放大 (图版 I: 下图), 同时将这些较稳定的区带特征绘制成模式图 (图 1)。从这些图可以看出: 表型 A 含有大致等距离的五条区带, 区带的含量有时有些变化; 表型 B 靠阴极端有两条着色深而分离清晰的区带; 表型 C 在靠阳极端的位置, 出现两条几乎靠在一起的深色区带; 表型 D 在靠阴极位置的四条区带中, 最靠阴极的一条区带是这 4 种表型中泳动最慢的区带, 而其它三条带靠的较紧, 区带的含量常有些变化。在生长实验结束以后, 对池中不同表型银鲫雌亲繁殖的子代银鲫进行血清蛋白电泳分析结果表明, 除了在某些个体中区带的含量有些差异

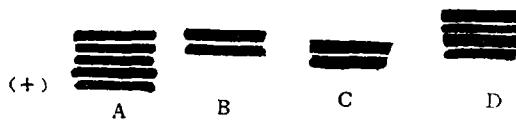


图1 银鲫血清蛋白的几种表型
Fig. 1 Phenotypes of serum proteins of crucian carp

外，子代的谱式均与母本相同。这说明在银鲫种内存在的血清蛋白异质性是遗传的。

异育银鲫血清蛋白的电泳分析，同样可测出4种不同表型，并分别与其雌亲银鲫的表型相同。这说明从同一母本（银鲫）得到的银鲫子代或异育银鲫子代，它们的血清蛋白表型是相同的。

2. 肝脏酯酶同工酶的多态现象

鱼类酯酶的多态现象已有大量的报道。一些研究工作表明酯酶是单聚体的酶类^[13,14]，因此由一个座位进行遗传控制时，在纯合子中出现一条酶带，而在异型合子中则同时出现双亲酶谱——两条酶带。淡水鱼类的酯酶一般是由二个座位控制的。生活在不同河流里的鱼，在这两个座位上都出现了等位基因的变异，因而在表型中区带最多是出现4条带，形成两两相对的典型谱型^[15]。而在银鲫中则出现了较为复杂的酶谱。

在银鲫血清蛋白的4种不同表型的个体间，相应地存在着肝脏酯酶同工酶的一些区别（图4）。为了叙述方便，将4种不同表型的银鲫共同出现的酯酶区带，从靠近阳极起分别称为Est1、Est2…Est6。其中Est4-Est6明显地表现出谱型差别。按血清蛋白表型编号为A的银鲫及其子代（银鲫），其肝脏酯酶的谱型如图版II-a所示，没有成对的酶带出现；同样，在表型编号为B的Est4处有较淡的两条区带（图版II-b）；在表型编号为C的Est5处有两条酶活性既强而又有明显差异的带，其中朝阳极的一条特别宽（图版II-c）；表型编号为D的Est5和Est6处，各有两条靠得很近、活性相等的酶带（图版II-d），如果显色时间延长，这两处酶带可因区带间的互相掩盖而各自染成一条酶带。肝脏酯酶同工酶的分析结果表明，子代和雌亲的表型一致，因此这4种肝脏酯酶同工酶的表型特征是稳定的。从图谱分析，银鲫肝脏酯酶的这些区别，可能由于不同座位上出现的等位基因所致。

以上资料说明，银鲫血清蛋白特异性图谱的差异，可与肝脏酯酶同工酶多态性图谱的差异相互对应，并能通过繁殖传给后代，获得表型与母体一致的子代。也就是说某一表型仅为银鲫中的某一群个体所特有并能传给后代。这一事实说明：在以雌核发育方式繁殖的银鲫中，包含了若干个雌核发育系，各系之间在某些基因座位上已有不同的变异。

异育银鲫基本上也具有上述银鲫的4种肝脏酯酶表型特征，但在同一雌亲银鲫繁殖的子代异育银鲫个体之间，谱式不尽相同，出现了下述几种情况：①多数个体的酶谱与雌亲银鲫相同；②图谱的不同位置出现多1—2条酶带的现象；③Est2酶带之前显色弱的一些区带消失；④酶谱中某些区带变得特别宽，酶活性成倍增加。从这些结果看出，异育银鲫肝酯酶出现的差异目前还找不出规律，但与银鲫相比，这种差异无疑是来自异源精子的作用。

3. 不同表型个体之间的生长对比实验

生产能力是养殖上的一个重要经济性状。以血清蛋白和肝脏酯酶为遗传标记鉴定出的4种不同的银鲫表型，那一种表型在生长上最有优势？这种生长优势在异育银鲫中是否也同样可以显示出来？这是银鲫选种中的两个重要问题。

银鲫从鱼苗下塘到出池共饲养220天，分析和测量了77尾鱼。异育银鲫饲养169天，分析和测量了78尾鱼。在实验中观察到不同表型个体的肝脏大小不一样，所以除了考察平均体重外，同时还考察了除去内脏后的平均空体壳重（表1）。

表1 银鲫和异育银鲫不同表型个体的生产能力

Tab. 1 The growth capacity of crucian carp and allogynogenetic crucian carp according to serum protein phenotypes

		银鲫 crucian carp		异育银鲫 allogynogenetic crucian carp	
血清蛋白的表型编号 Codes for serum protein phenotypes	A group	平均体重(克)±标准差 average weight per fish(g.)±σ	平均空体壳重±标准差 average weight per eviscerated fish(g.)±σ	平均体重(克)±标准差 average weight per fish(g.)±σ	平均空体壳重±标准差 average weight per eviscerated fish(g.)±σ
	B group	101.9±9.4	78.8±7.5	87.9±5.3	69.7±4.3
	C group	106.0±11.9	85.3±8.0	98.9±9.8	83.1±8.2
	D group	148.1±18.2	124.6±9.7	133.0±11.5	101.6±10.7

从表1可看出，这4种不同表型的鱼具有不同的生产能力。首先看银鲫，无论是平均体重或平均空体壳重均是D组和A组生长较好，其中D组最优，B组最差。在异育银鲫中，D组的平均体重仍然最优，但从平均空体壳重的数据看来，则D组与A组的平均空体壳重相似，经样品平均数差异显著性的检验，两组差异不显著，这是因为D组个体的肝脏比较大，所以在除去内脏后D组值便接近于A组。经平均体重和平均空体壳重的差异显著性检验，无论是银鲫或是异育银鲫，D组和A组均优于另外两组，差异极显著。

表2 银鲫和异育银鲫不同表型个体的平均体重的比较

Tab. 2 Comparison of average weight of crucian carp and allogynogenetic crucian carp of different phenotypes

	银鲫 crucian carp		异育银鲫 allogynogenetic crucian carp	
	为B组的百分数 percentage of B group	为C组的百分数 percentage of C group	为B组的百分数 percentage of B group	为C组的百分数 percentage of c group
A 组 A group	127.5	122.5	140.4	124.8
D 组 D group	145.3	139.7	151.3	134.5

表2列出了银鲫和异育银鲫不同表型个体平均体重的比值。银鲫中生长较优的D组和A组比生长较差的B组和C组，平均体重可增加22.5—45.3%。同样，异育银鲫可增加24.8—51.3%。由此可见，银鲫经过选育其增产潜力是显著的。

讨 论

1. 银鲫种内的遗传结构及其在选种中的意义

在全雌性天然雌核发育鱼类 *Poecilia formosa* 和 *Poeciliopsis 2 monacha-lucida* 中，曾用组织移植方法证实它们各自由若干个无性繁殖系 (clone) 组成^[11,12,13]。本文利用血清蛋白和酯酶同工酶表型差异作为遗传标记，也可在银鲫种内区分出 4 个不同而又各自遗传的类型，我们称之为雌核发育系 (gynogenetic clone)。这些资料表明，天然雌核发育鱼类的遗传性(基因型)并不完全一致，在其进化过程中曾发生过基因变异，也可能由于其复杂的起源所造成。因此，在这些鱼类中包含若干个雌核发育系，可能是一个带有普遍意义的现象。

另外，银鲫卵与异源精子(兴国红鲤精子)受精而产生的异育银鲫，其肝脏酯酶同工酶谱发生了一些无规律变异的这一事实，为鱼类天然雌核发育机制只具有相对稳定性的假设^[7]进一步提供了佐证。因此在自然界，与雌核发育鱼类同地共居的近缘种雄鱼，或者是银鲫群体中的少部分雄性银鲫，它们参与繁殖，可能具有保护雌核发育鱼类延续种质的意义。

具有生产实践意义的是，银鲫的不同雌核发育系各与该系的生长性状相联系，呈现出生长差别，而且这种差别能在由它们产生的子代异育银鲫之间相应地表达出来，这就为银鲫的选种提供了可能并赋予实际意义。因为在生产中，可以选出最优经济性状的银鲫雌核发育系作为亲本，再由它们生产出大量最优经济性状的异育银鲫，达到增产的目的。

2. 应用遗传标记加快鱼类选育步伐

利用一些特异的蛋白质或酶作为遗传标记，曾对鱼类良种选育起了重要的作用^[14,15]。因为首先可赖以鉴别和选择原种的优良品系，例如罗非鱼的选种^[8,9]。其次，有了合适的遗传标记，便能同池饲养几个需要比较的不同品系，既可大量减少所用鱼池，又能满足在相同环境条件下比较经济性状的实验要求。同时有了遗传标记，还可进一步追究相关的外部形态特征，以便找出易于鉴别的形态指标，用于生产实践。

参 考 文 献

- [1] 大连水产专科学校养殖系，1975。我国几个水域鲫鱼的主要形态性状和生长比较。淡水渔业，(4): 9—13。
- [2] 江苏省吴兴县水产养殖场，1974。东北银鲫的移植和饲养。淡水渔业，(5): 21—23。
- [3] 余志堂、何麟善、肖理仁、王精豹，1959。黑龙江流域鲫鱼的种群变异和生态资料。水生生物学集刊，(2): 200—209。
- [4] 周嘉申、沈俊宝、刘明华，1983。黑龙江一种银鲫(方正银鲫)雌核发育的细胞学初步探讨。动物学报，29(1): 11—16。
- [5] 俞豪祥，1982。银鲫 (*Carassius auratus gibelio* Bloch) 雌核发育的细胞学观察。水生生物学集刊，7(4): 481—487。
- [6] 蒋一珪、俞豪祥、陈本德、梁绍昌、杨德龙、林绥恩，1982。鲫鱼的人工和天然雌核发育。水生生物学集刊，7(4): 471—477。
- [7] 蒋一珪、梁绍昌、陈本德、俞豪祥、单仕新、杨德龙、林绥恩、沈根泉，1983。异源精子在银鲫雌核发育子代中的生物学效应。水生生物学集刊，8(1): 1—16。
- [8] Avtalion, R. R., Duczmin, M., Wogdani, A. and Y. Pruginin, 1976. Determination of allogenic and xe-

- nogeneic markers in genus of *Tilapia*. II. Identification of *T. aurca*, *T. vulcani* and *T. nilotica* by electrophoretic analysis of their serum proteins. *Aquaculture*, 7(3): 255—265.
- [9] Avtalion, R. R., 1982. Genetic markers in *Sarotherodon* and their use for sex and species identification, 269—272. In S. R. V. Pullin and R. H. Lowe-McConnell (eds.) *The biology and culture of tilapias*. ICLARM Conference Proceedings 7, International Center for Living Aquatic Resources Management. Manila, Philippines.
- [10] Balsano, J. S., Darnell, R. M. and P. Abramoff, 1972. Electrophoretic evidence of triploidy associated with populations of the gynogenetic teleost *Poecilia formosa*. *Copeia*, (2): 292—297.
- [11] Darnell, R. M., Lamb, E. and P. Abramoff, 1967. Matroclinal inheritance and clonal structure of a Mexican population of the gynogenetic fish, *Poecilia formosa*. *Evolution*, 21: 168—173.
- [12] Kallman, K. D., 1962. Population genetics of the gynogenetic teleost, *Mollisensia formosa* (Girard). *Evolution*, 16: 497—504.
- [13] Kochn, R. K. and D. W. Johnson, 1967. Serum transferrin and serum esterase polymorphisms in an introduced population of the bigmouth buffalo fish, *Ictalurus cyprinellus*. *Copeia*, (4): 805—809.
- [14] McAndrew, B. J. and K. C. Majumdar, 1983. *Tilapia* stock identification using electrophoretic markers. *Aquaculture*, 30(1—4): 249—261.
- [15] Moore, W. S., 1977. A histocompatibility analysis of inheritance in the unisexual fish *Psephiliopsis 2 monacha-lucida*. *Copeia*, (2): 213—223.
- [16] Reinitz, G. L., 1977. Tests for association of transferrin and lactate dehydrogenase phenotypes with weight gain in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Board Can.*, 34: 2333—2337.
- [17] Starmach, J., 1976. Electrophoretic separation of proteins of blood serum and esterases in gudgeon (*Gobio gobio* L.) living in various rivers. *Acta Hydrobiol.*, 18(2): 167—173.
- [18] Starmach, J., 1979. Electrophoretic separation of blood serum lactate dehydrogenase, transferrin and esterases on polyacrylamide gel in seven carp breed lines (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Hydrobiol.* (Caracow), 21(3): 237—242.
- [19] 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.
- [20] Астанин, Л., 1959. О форме тела карасей. *Рыбоводство и рыболовство* (2): 28—29.
- [21] Никольский, Г. В., 1956, Рыбы Бассейна Амура. Изд. АН СССР. Москва. стр. 330—348.

INTRASPECIFIC GENETIC MARKERS OF CRUCIAN CARP (*CARASSIUS AURATUS GIBELIO*) AND THEIR APPLICATION TO SELECTIVE BREEDING

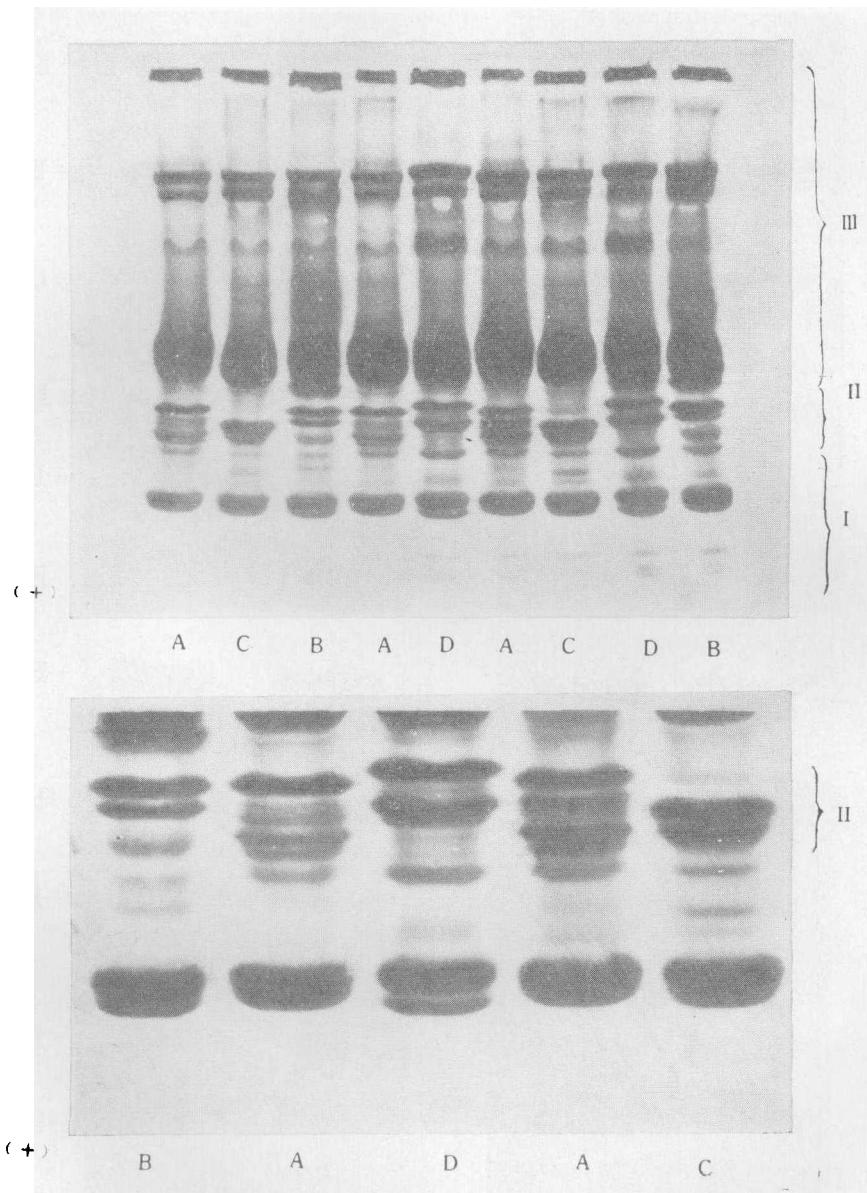
Zhu Lanfei and Jiang Yigui

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan)

Abstract

The electrophoretic separation of serum proteins and liver esterases on polyacrylamide gradient gel was carried out for gynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) and allogynogenetic crucian carp (progeny of gynogenetic crucian carp ♀ × red carp ♂). It was found that the serum proteins and liver esterases of both fishes assumed four different phenotypes. The crucian carp and the allogynogenetic crucian carp, both being the progenies of the same maternal crucian carp, possessed the same phenotype as their mother. But in allogynogenetic crucian carp, there were some irregular variations in the electrophoretic patterns of the liver esterase, and this was obviously caused by the action of the heterologous sperm. Moreover, it was found that the growth capacity of these fishes having different phenotypes was diverse from. Their growth differences could be as high as 50%. These results suggested that the natural gynogenetic crucian carp consists of some gynogenetically different clones, and this is very important for the selective breeding of the crucian carp.

Key words Crucian carp, gynogenetic clone, genetic marker, serum protein, liver esterase, selective breeding



银鲫的血清蛋白电泳图谱(上图)

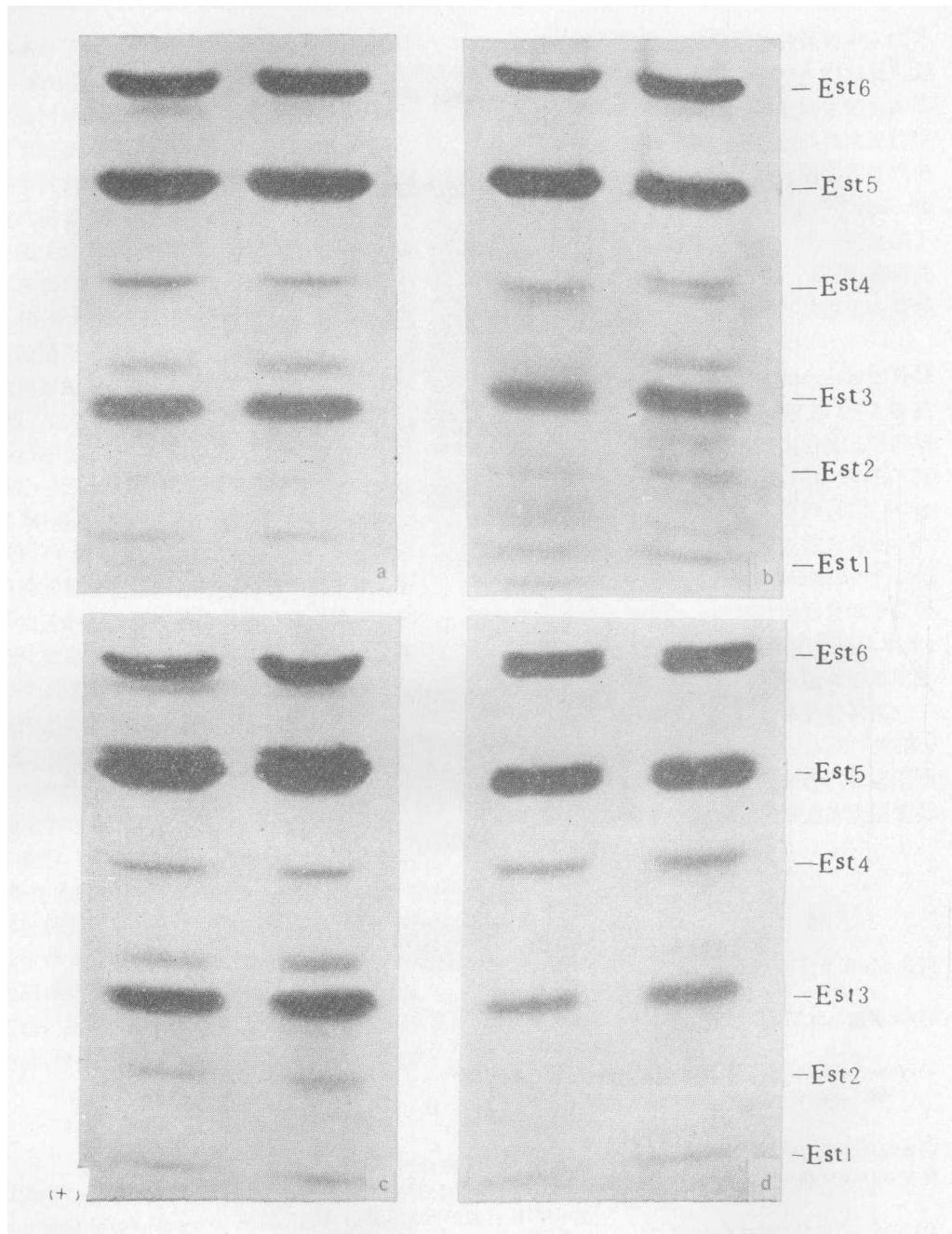
A, B, C, D——血清蛋白的表型编号

上图中第 II 区段的放大图谱(下图)

Electrophoretic patterns of serum proteins of crucian carp

A, B, C, D-codes for serum protein phenotypes

Amplified electrophoretic patterns of bands II of above Fig.



银鲫的肝脏酯酶同工酶电泳图谱
a—A 组的酶谱; b—B 组的酶谱; c—C 组的酶谱; d—D 组的酶谱。
(A, B, C, D—按血清蛋白的表型编号)

Fig. Electrophoretic patterns of liver esterase isozyme of crucian carp
a—zymogram of group A; b—zymogram of group B; c—zymogram of group C;
d—zymogram of group D.
(A, B, C, D—codes for serum protein phenotypes)