

# 花鲈冷冻精液受精鱼苗与鲜精受精鱼苗 的同工酶比较分析

陈艳翠<sup>1,2,3</sup>, 高天翔<sup>1</sup>, 陈松林<sup>2</sup>, 季相山<sup>2</sup>, 田永胜<sup>2</sup>, 邓寒<sup>2</sup>

- (1. 中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东青岛 266003;  
2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所农业部海洋渔业资源可持续利用重点实验室,  
山东青岛 266071; 3. 漳州市海洋与渔业局, 福建漳州 363000)

**摘要:** 采用水平凝胶电泳技术对花鲈 (*Lateolabrax maculatus*) 冷冻精液受精鱼苗与鲜精受精鱼苗进行了同工酶分析。本实验选取肌肉和肝脏两种组织, 检测了 IDHP、PGM、LDH、GPI、MDH、G3PDH、ME、HK、SOD、G6PD 和 SDH 等 11 种酶, 得到 13 个位点: IDHP\*、PGM-1\*、PGM-2\*、LDH\*、GPI-1\*、GPI-2\*、MDH\*、G3PDH\*、ME\*、HK\*、SOD\*、G6PD\* 和 SDH\*。结果显示在 0.99 水平, SDH\* 和 PGM-2\* 位点在两种受精鱼苗中均表现为多态, 多态位点比例均为 0.1538; 平均预期杂合度分别为 0.0460 和 0.0407, 但未观测到杂合子, 观测杂合度均为 0, 遗传偏离指数均为 -1; 有效等位基因数分别为 1.0720 和 1.0850, 花鲈冷冻精液受精鱼苗与鲜精受精鱼苗的遗传相似度为 0.9991, 遗传距离为 0.0010。由此可见, 花鲈的冷冻精液受精鱼苗和鲜精受精鱼苗间未出现同工酶水平上的遗传差异, 冷冻保存精液完全适用于花鲈育苗生产。

**关键词:** 花鲈 (*Lateolabrax maculatus*); 冷冻精液受精鱼苗; 鲜精受精鱼苗; 同工酶

**中图分类号:** Q959.473; S965.211

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-6907-(2008)03-0027-05

## Isozyme Analysis of Spotted Sea bass (*Lateolabrax maculatus*) Artificially Fertilized by Cryopreserved Spermatozoa and Normal Spermatozoa

CHEN Yan-cui<sup>1,2,3</sup>, GAO Tian-xiang<sup>1</sup>, CHEN Song-lin<sup>2</sup>, JI Xiang-shan<sup>2</sup>,  
TIAN Yong-sheng<sup>2</sup>, DENG Han<sup>2</sup>

- (1. The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003;  
2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, Shandong 266071;  
3. Ocean and Fishery Bureau of Zhangzhou, Zhangzhou, Fujian 363000)

**Abstract:** Horizontal starch gel electrophoresis was used to investigate the genetic difference on isozyme level between spotted sea bass artificially fertilized by cryopreserved spermatozoa and normal spermatozoa. Muscle and liver samples from two populations were chosen for the isozyme electrophoresis. 13 putative enzymes coding loci (IDHP\*, PGM-1\*, PGM-2\*, LDH\*, GPI-1\*, GPI-2\*, MDH\*, G3PDH\*, ME\*, HK\*, SOD\*, G6PD\* and SDH\*) were obtained based on 11 enzymes (IDHP, PGM, LDH, GPI, MDH, G3PDH, ME, HK, SOD, G6PD and SDH) examined in this experiment and two of them were determined to be polymorphic, i. e., SDH\* and PGM-2\* when the most common allele is less than or equal to 0.99. The proportions of polymorphic loci of spotted sea bass artificially fertilized by cryopreserved spermatozoa and normal spermatozoa were both 0.1538, respectively. There was no heterozygote appeared in individuals, and the average observed heterozygosities was therefore 0. The expected heterozygosities were 0.0460 and 0.0407, respectively for spotted sea bass artificially fertilized by cryopreserved spermatozoa and normal spermatozoa. The Nei's genetic distance of two populations was 0.0010. The average effective numbers of alleles were 1.0720 and 1.0850, respectively.

**收稿日期:** 2007-11-7

**资助项目:** 国家 863 项目(2001AA621100); 国家自然科学基金项目(39970578); 山东省博士基金项目(02BS018)资助

**第一作者简介:** 陈艳翠(1979-), 女, 硕士研究生, 专业方向为种质资源。E-mail: cui8012@yahoo.com.cn

**通讯作者:** 陈松林。E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

The results showed that there was no difference on isozyme level in the spotted sea bass artificially fertilized by cryopreserved spermatozoa and normal spermatozoa, so the cryopreserved spermatozoa is fit for spotted sea bass production completely.

**Key words:** *Lateolabrax maculatus*; artificially fertilized by cryopreserved spermatozoa; artificially fertilized by normal spermatozoa; isozyme analysis

花鲈(*Lateolabrax maculatus*)属脊索动物门、硬骨鱼纲鲈形目鮨科花鲈属,分布于中国沿海,南到越南与中国的边界,北到朝鲜。花鲈为广温、广盐、肉食性经济鱼类,是海水养殖的主要种类之一<sup>[1]</sup>。

自1949年以来,精液的超低温冷冻保存技术得到广泛应用,精液的冷冻与解冻技术逐步发展起来<sup>[2]</sup>,国外报道了对大西洋鲱、虹鳟、美洲红点鲑、大麻哈鱼等的精液超低温冷冻保存的研究;相对而言,国内主要集中在淡水鱼类的研究上<sup>[3,4]</sup>,极少数学者研究了花鲈、大菱鲆、真鲷、黑鲷等海水鱼类精液的超低温保存技术<sup>[5]</sup>,有学者等报道了花鲈的超低温冷冻精液的冷冻与解冻技术以及防冻剂和精液的稀释倍数对受精率的影响,结果表明精子与卵子在一定比例范围内,其受精率与鲜精的受精率没有很大差异<sup>[6]</sup>。

有关冷冻保存对冻精受精鱼苗遗传结构影响的研究方面,陈松林等采用微卫星分析技术研究表明冷冻保存对大菱鲆冻精受精鱼苗的遗传结构没有明显影响<sup>[7]</sup>。但采用同工酶技术研究冷冻保存对鱼类冷冻精液受精后代的影响的报道,迄今极少。而有关花鲈冷冻精液受精鱼苗的生化遗传研究,目前尚未见报道。为检测超低温冷冻精液在水产育种方面的可行性,本实验拟采用水平凝胶电泳技术,对花鲈冷冻精液受精鱼苗和鲜精受精鱼苗进行了同工酶比较分析,以检验花鲈冷冻精液受精情况及其子一代的遗传结构,旨在为进一步的水产遗传育种提供基础依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验鱼为黄海水产研究所用冷冻保存1年的花鲈冷冻精液与花鲈卵授精获得的鱼苗F1代,花鲈精子的冷冻保存按已建立的方法进行<sup>[6]</sup>。冷冻精液授精鱼苗F1代和鲜精授精鱼苗(与冷冻精液授精鱼苗的亲鱼相同)饲养在山东烟台海阳黄海水产研究所实验基地。取冷冻精液授精获得的花鲈30尾,其体长为33~41 cm,体重为630~860 g;取

鲜精授精花鲈19尾,体长为28~43 cm,体重为616~880 g。在采样地点取肌肉和肝脏两种组织冷冻带回实验室,-80℃保存待用。

### 1.2 实验方法

本实验凝胶所用的淀粉是Smithies公司生产的水解马铃薯淀粉,凝胶浓度约为11%。缓冲液系统为:CT-8.0,电泳在恒温4℃的冰箱内进行,约6 h。电泳条件:稳压,恒电流100 mA,600 v。本实验是按照日本水产资源保护协会<sup>[8]</sup>和Pasteur等<sup>[9]</sup>推荐的方法进行水平淀粉凝胶电泳和染色。具体的染色方法、酶的命名和电泳技术分别参照日本水产资源保护协会<sup>[8]</sup>和Shaklee<sup>[10]</sup>方法,实验检测的酶的名称、缩写和代码见表1。

表1 酶的名称、缩写和国际编号及样品来源  
Tab. 1 Enzyme names, abbreviations, E. C. numbers and sources

酶的名称	缩写	国际编号	来源
异柠檬酸脱氢酶	IDHP	1. 1. 1. 42	肌肉
磷酸葡萄糖变位酶	PGM	5. 4. 2. 2	肌肉
乳酸脱氢酶	LDH	1. 1. 1. 27	肌肉
6-磷酸葡萄糖异构酶	GPI	5. 3. 1. 9	肌肉
苹果酸酶	ME	1. 1. 1. 40	肌肉
苹果酸脱氢酶	MDH	1. 1. 1. 37	肌肉
甘油醛-3-磷酸脱氢酶	G3PDH	1. 1. 1. 8	肌肉
己糖激酶	HK	2. 7. 1. 1	肝脏
超氧化物歧化酶	SOD	1. 15. 1. 1	肝脏
6-磷酸葡萄糖脱氢酶	G6PD	1. 1. 1. 49	肝脏
山梨醇脱氢酶	SDH	1. 1. 1. 14	肝脏

本研究中采用肝脏和肌肉(尾部右侧)两种组织,对11种同工酶进行了筛选检测了,肌肉(尾部右侧)组织:IDHP、PGM、LDH、GPI、ME、MDH和G3PDH;肝脏组织:HK、SOD、G6PD和SDH。

### 1.3 遗传学分析

参照Nei<sup>[11]</sup>和日本水产资源保护协会<sup>[8]</sup>的方法计算多态位点比例( $P$ )、平均预期杂合度、平均观测杂合度、Hardy-Weinberg遗传偏离指数( $d$ )、遗传相似度和遗传距离。

## 2 实验结果

### 2.1 异柠檬酸脱氢酶(IDHP)

冷冻精液受精鱼苗: 一个位点  $IDHP^*$ , 为单态, 只出现等位基因  $a$ , 观测到的基因型为  $a/a$ 。  
鲜精受精鱼苗: 一个位点  $IDHP^*$ , 为单态, 只出现等位基因  $a$ , 观测到的基因型为  $a/a$  (见表 1 和表 2)。在  $IDHP^*$  位点上均为单态且酶谱的迁移率完全相同, 未表现出差异。酶谱见图 1。

表 2 基因位点、基因型、基因型观测值、多态位点比例、平均杂合度和有效等位基因数

Tab. 2 Loci, genotypes, observed numbers, the proportions of polymorphic loci, the expected observed heterozygosities and the average effective numbers of alleles

位点	基因型	冷冻精液受精鱼苗	鲜精受精鱼苗
		观测值	观测值
$IDHP^*$	$a/a$	30	19
$PGM-1^*$	$a/a$	30	19
$PGM-2^*$	$a/a$	29	18
	$b/b$	1	1
$LDH^*$	$a/a$	30	19
$GPI-1^*$	$a/a$	30	19
$GPI-2^*$	$a/a$	30	19
$MDH^*$	$a/a$	30	19
$G3PDH^*$	$a/a$	30	19
$ME^*$	$a/a$	30	19
$HK^*$	$a/a$	30	19
$SOD^*$	$a/a$	30	19
$G6PD^*$	$a/a$	30	19
$SDH^*$	$a/a$	11	9
	$b/b$	19	10
-----			
$P_{0.99}$		0.1538	0.1538
$H_0$		0.0000	0.0000
$H_e$		0.0460	0.0407
$A_e$		1.0720	1.0850

## 2.2 磷酸葡萄糖变位酶 (PGM)

$PGM-1^*$ : 冷冻精液受精鱼苗为单态, 只出现等位基因  $a$ , 观测到的基因型为  $a/a$ 。鲜精受精鱼苗为单态, 只出现等位基因  $a$ , 观测到的基因型为  $a/a$  (见表 1 和表 2)。

$PGM-2^*$ : 冷冻精液受精鱼苗表现为多态位点, 2 个等位基因分别为  $a$  和  $b$ , 基因型为  $a/a$  和  $b/b$ 。在检测的 30 个个体中, 只有一个个体出现的基因型为  $b/b$ , 但无杂合子。鲜精受精鱼苗为多态, 其等位基因为  $a$  和  $b$ , 基因型为  $a/a$  和  $b/b$ 。在检测的 19 个个体中, 只有一个个体出现的基因型为  $b/b$ , 但无杂合子。

冷冻精液受精鱼苗与鲜精受精鱼苗在  $PGM-1^*$  和  $PGM-2^*$  位点上无遗传差异。

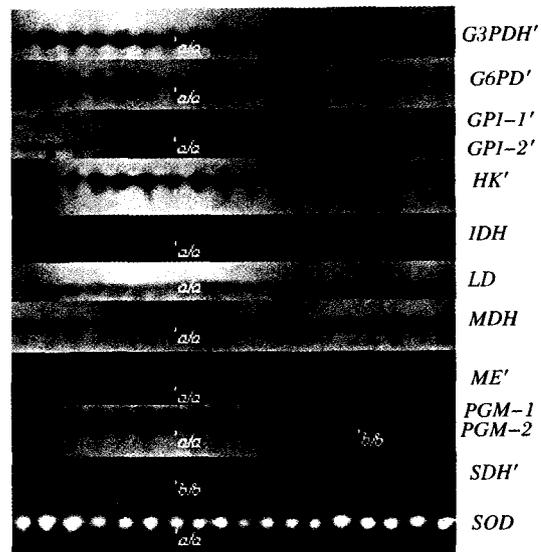


图 1 冷冻精液受精鱼苗与鲜精受精鱼苗的 11 种酶的电泳谱带

Fig. 1 Electrophoretic pattern of eleven enzymes

## 2.3 乳酸脱氢酶 (LDH) 和苹果酸酶 (ME)

$LDH^*$  和  $ME^*$  均表现为单态, 只出现等位基因  $a$ , 观测到的基因型为  $a/a$ 。ME 酶谱较其它酶的酶谱稍弱, 但在冷冻精液受精鱼苗与鲜精受精鱼苗中未表现出差异。

## 2.4 6-磷酸葡萄糖异构酶 (GPI)

$GPI-1^*$ : 单态, 只出现等位基因  $a$ , 观测到的基因型为  $a/a$ 。 $GPI-2^*$ : 单态, 只出现等位基因  $a$ , 观测到的基因型为  $a/a$ 。在花鲈冷冻精液受精鱼苗与鲜精受精鱼苗中无差异。

## 2.5 苹果酸脱氢酶 (MDH)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (G3PDH)、己糖激酶 (HK)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和 6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (G6PD)

这 5 种酶均呈单态,  $MDH^*$ 、 $G3PDH^*$ 、 $HK^*$ 、 $SOD^*$  和  $G6PD^*$  在冷冻精液受精鱼苗与鲜精受精鱼苗中表现一致: 为单态, 只出现等位基因  $a$ , 观测到的基因型为  $a/a$ 。

## 2.6 山梨醇脱氢酶 (SDH)

冷冻精液受精鱼苗:  $SDH^*$  表现为多态, 2 个等位基因分别为  $a$  和  $b$ , 基因型为  $a/a$  和  $b/b$ 。30 个个体中, 出现了 11 个  $a/a$  和 19 个  $b/b$ 。鲜精受精鱼苗在  $SDH^*$  位点也表现为多态, 其等位基因亦为  $a$  和  $b$ , 基因型为  $a/a$  和  $b/b$ 。19 个个体中, 出现了 9 个  $a/a$  和 10 个  $b/b$ 。详见表 1 和表 2。

## 2.7 遗传分析

实验筛选了适用于花鲈冷冻精液受精鱼苗与鲜

精受精鱼苗同工酶分析的 11 种酶 IDHP、PGM、LDH、GPI、MDH、G3PDH、ME、HK、SOD、G6PD 和 SDH, 检测到 13 个位点: IDHP\*、PGM-1\*、PGM-2\*、LDH\*、GPI-1\*、GPI-2\*、MDH\*、G3PDH\*、ME\*、HK\*、SOD\*、G6PD\* 和 SDH\*。在 0.99 水平上(即某位点的主基因频率  $\leq 0.99$ ), 13 个位点中, 只有 SDH IDHP\*、PGM-1\*、PGM-2\*、LDH\*、GPI-1\*、GPI-2\*、MDH\*、G3PDH\*、ME\*、HK\*、SOD\*、G6PD\* 和 SDH\* 和 PGM-2 IDHP\*、PGM-1\*、PGM-2\*、LDH\*、GPI-1\*、GPI-2\*、MDH\*、G3PDH\*、ME\*、HK\*、SOD\*、G6PD\* 和 SDH\* 2 个位点在花鲈冷冻精液受精鱼苗与鲜精受精鱼苗中表现为多态。冷冻精液受精鱼苗与鲜精受精鱼苗的多态位点比例均为 0.1538, 平均预期杂合度分别为 0.0460 和 0.0407, 但未观察到杂合子, 观测杂合度均为 0。有效等位基因数分别为 1.0720 和 1.0850, 遗传偏离指数均为 -1(表 3)。冷冻精液受精鱼苗与鲜精受精鱼苗间遗传相似度为 0.9991, 遗传距离为 0.0010。

表 3 等位基因频率和遗传偏离指数

Tab. 3 The allele frequencies and Hardy-Weinberg genetic d values

位点	等位基因	冷冻精液受精鱼苗		鲜精受精鱼苗	
		等位基因频率	d	等位基因频率	d
IDHP*	*a	1.0000		1.0000	
PGM-1*	*a	1.0000		1.0000	
PGM-2*	*a	0.9667	-1	0.9474	-1
	*b	0.0333		0.0526	
LDH*	*a	1.0000		1.0000	
GPI-1*	*a	1.0000		1.0000	
GPI-2*	*a	1.0000		1.0000	
MDH*	*a	1.0000		1.0000	
G3PDH*	*a	1.0000		1.0000	
ME*	*a	1.0000		1.0000	
HK*	*a	1.0000		1.0000	
SOD*	*a	1.0000		1.0000	
G6PD*	*a	1.0000		1.0000	
	*b	0.0000		0.0000	
SDH*	*a	0.3667	-1	0.4737	-1
	*b	0.6333		0.5263	

### 3 讨论

多态位点比例和平均杂合度是遗传多样性研究的重要指标。海洋鱼类的多态位点比例一般在 30% 左右<sup>[12]</sup>。李明云等<sup>[13,14]</sup>对山东日照和福建厦门沿海花鲈的研究结果表明, 其多态位点比例分别

为 0.2110 和 0.3118, 两群体的平均预期杂合度分别为 0.1112 及 0.0939。楼东等<sup>[15,16]</sup>研究了国产花鲈与东京湾日本鲈群体生化遗传变异, 中日鲈鱼多态位点比例分别为 0.4375 和 0.3750, 预期杂合度分别为 0.0473 和 0.0782。本实验的花鲈冷冻精液受精鱼苗和鲜精受精鱼苗的多态位点比例均为 0.1538, 平均预期杂合度分别为 0.0460 和 0.0407, 低于海洋鱼类和楼东等<sup>[15,16]</sup>的研究结果。用于同工酶分析的个体中未出现杂合子, 观测杂合度为零, 杂合子严重缺失, 这与冷冻精液受精鱼苗和鲜精受精鱼苗的亲本选择有关, 亲本数量极少, 造成近亲交配, 可能是杂合子缺失的主要原因。

遗传距离是一种常用的度量遗传分化的指标, Nei<sup>[11]</sup>归纳物种内的遗传距离为 0~0.05, 亚种间一般为 0.02~0.2。李明云等<sup>[13,14]</sup>得到山东日照和福建厦门花鲈间的遗传距离为 0.0098。楼东等<sup>[15]</sup>研究的中国产花鲈和日本鲈间的遗传距离为 0.1918, 而花鲈群体间的遗传距离仅为 0.0004~0.0011。冷冻精液受精鱼苗与鲜精受精鱼苗的遗传距离为 0.0010, 结果显示花鲈的冷冻精液受精鱼苗与鲜精受精鱼苗的遗传分化非常小, 与已有的结果吻合<sup>[15]</sup>, 比山东日照和福建厦门沿海花鲈群体间的遗传距离小<sup>[13,14]</sup>。

因此表明, 花鲈冷冻精液受精鱼苗和鲜精受精鱼苗间无遗传差异, 仍属同一群体, 冷冻精液适合于花鲈的苗种生产。

#### 参考文献:

- [1] Kim Y U, Myoung J G, Kim Y S, et al. The marine fishes of Korea [M]. Hangeul, Busan, 2001. 90~222.
- [2] 陈松林. 鱼类配子和胚胎冷冻保存研究进展和前景展望 [J]. 水产学报, 2002, 26(2): 161~168.
- [3] 陈松林, 刘宪亭. 鱼类精液超低温冷冻保存的基本原理、研究现状及应用前景 [J]. 淡水渔业, 1991, 5: 43~46.
- [4] 陈松林, 刘宪亭. 鱼卵和胚胎冷冻保存研究进展 [J]. 淡水渔业, 1991, 1: 44~46.
- [5] Chen S L, Ji X S, Yu G C, et al. Cryopreservation of spermatozoa from turbot (*Scophthalmus maximus*) and application to large scale fertilization [J]. Aquaculture, 2004, 236(1~4): 547~556.
- [6] Ji X S, Chen S L, Tian Y S, et al. Cryopreservation of sea perch (*Lateolabrax japonicus*) spermatozoa and feasibility for production-scale fertilization [J]. Aquaculture, 2004, 241(1~4): 517~528.
- [7] 陈松林, 刘云国, 季相山. 精子冷冻保存对大菱鲆后代遗传结构影响的微卫星分析 [J]. 高技术通讯, 2005, 15(6): 87~91.

- [8] Japan Fisheries Conservation Association. Population differentiation of marine organism by isozyme analysis [A]. Report on the Genetic Assessment Project [M], Tokyo: Kyoritsu press, 1989. 28 ~ 209.
- [9] Pasteur N, Pasteur G, Bonhomme F, Catalan J, et al. Practical isozyme genetics [M]. New York: Halsted press. Chichester, 1988. 215.
- [10] Shaklee J B, Allendorf F W, Morrizot D C, et al. Gene nomenclature for protein-coding loci in fish [J]. Transactions of the American Fisheries Society, 1990, 119: 2 ~ 15.
- [11] Nei M. Molecular Evolutionary Genetics [M]. New York: Columbia University Press, 1987, 128 ~ 134.
- [12] 尤锋, 王可玲, 相建海, 等. 山东近海褐牙鲈自然和养殖群体生化遗传结构及其遗传变异的比较分析 [J]. 海洋与湖沼, 2000, 32(5): 512 ~ 518.
- [13] 李明云, 赵明忠, 钟爱华, 等. 山东日照和福建厦门沿海花鲈 (*Lateolabrax japonicus*) 遗传多样性的 RAPD 研究 [J]. 海洋与湖沼, 2003, 11: 618 ~ 624.
- [14] 李明云, 赵明忠, 钟爱华, 等. 山东日照和福建厦门沿海花鲈同工酶的遗传变异分析 [J]. 浙江海洋学院学报, 2003, 6: 121 ~ 124.
- [15] 楼东, 高天翔, 张秀梅, 等. 中日花鲈生化遗传变异的初步研究 [J]. 中国海洋大学学报, 2003, 33(1): 22 ~ 28.
- [16] 楼东, 高天翔, 张秀梅. 花鲈种质资源的研究进展 [J]. 浙江海洋学院学报, 2006, 6: 162 ~ 167.
- [17] 孟庆闻, 苏锦祥, 缪学祖. 鱼类分类学(第1版) [M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- [18] 王中仁. 植物等位酶分析 [M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [19] 冯昭信, 姜志强. 花鲈研究(第1版), [M]. 北京: 海洋出版社, 1998. 69 ~ 73.
- [20] 根井正利(王家玉译). 分子群体遗传学与进化论 [M]. 北京: 农业出版社, 1975. 121 ~ 203.