

象山缢蛭养殖群体和野生群体遗传多样性的比较

王冬群, 李太武, 苏秀榕

(宁波大学 生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211)

摘要:于2001年4月,在浙江象山港虾塘和象山外海滩涂分别采集100个缢蛭(*Sinonovacula constricta* Lamarck)样品,采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,分析了2个群体各38个样本的EST、ADH、MDH、IDH、ME、LDH、GDH、SOD、SDH、ATP等10种同工酶,分别记录了30、29个基因位点。其中s-MEH-1、SDH、s-ME、ATP-1、ATP-2等5个位点为多态位点。象山野生缢蛭群体的多态位点比例(17.24%)和群体平均杂合度观察值(0.0377)都明显高于养殖群体(16.67%, 0.0314)。结果表明,与其他贝类比较缢蛭象山养殖和象山野生群体拥有较低的遗传变异水平,其中象山野生群体比养殖群体遗传变异水平高。

关键词:缢蛭;同工酶;遗传变异

中图分类号:Q959.215 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2005)02-0138-06

缢蛭(*Sinonovacula constricta* Lamarck)俗称蛭子,隶属于软体动物门(Mollusca)、瓣鳃纲(Lamellibranchia)、真瓣鳃目(Eulamellibranchia)、竹蛭科(Solenidae),是我国与日本、韩国特有的种类。100多年来,缢蛭一直是浙江贝类养殖重要种类之一。据统计,1997年,浙江缢蛭养殖面积达20 447 km²,产量为186 390 t^[1],目前缢蛭是浙江养殖面积和产量最大的贝类。象山港一带由于其优越的地理环境,一直以来是浙江缢蛭的主要养殖基地。但是近几年来,象山缢蛭抗病力不断下降,养殖病害时有发生。有关资料表明,一个物种病害频发与该物种遗传多样性的丧失有直接的关系。有关水产动物野生与养殖群体的遗传多样性的研究已有较多的报道^[2-3]。目前,对缢蛭的研究主要集中在养殖技术、苗种培育和核型分析等方面。有关缢蛭在养殖与野生群体分子遗传水平上的差异,尚无报道。养殖缢蛭与野生缢蛭外型明显不同,前者一般比较肥,壳呈灰黑色;而后者比较瘦,壳呈嫩绿色,口味明显好于前者。在李太武等^[4]对缢蛭同工酶组织特异研究的基础上,本研究进一步在同工酶水平上对象山养殖和象山外海的野生缢蛭群体进行了遗传多样

性检测,以期进一步揭示养殖缢蛭和野生缢蛭的遗传背景,从而为解释养殖缢蛭种质退化现象和保护缢蛭种质资源提供科学依据。

1 材料与方法

缢蛭于2001年4月采自宁波象山港虾塘和象山外海滩涂,活体带回实验室。解剖,取缢蛭的外套膜组织,称重后按质量体积比1:3(g/mL)加入含0.05%巯基乙醇的预冷重蒸水冰浴上研磨,然后在4℃条件下离心,12 000 r/min, 30 min,取上清液分装编号,置-70℃冰箱中备用。

电泳方法参照文献[5]略做改动。浓缩胶(3.6%)pH 6.7,分离胶(8.2%)pH 8.9。选择外套膜和MDH、ME、ADH等10种谱带清晰同工酶进行种群分析(图1)。实验所测酶的名称及电泳情况见表1。染色方法参照文献[5]、[6]进行。复日SmartView 2002生物图像分析系统摄影分析。同工酶的命名方法参照文献[7]进行,酶谱的遗传学解释参照文献[7]。数据的分析与处理参照文献[8]、[9]。

收稿日期:2004-06-29; 修订日期:2004-09-06。

基金项目:宁波市科技局重点资助(00ND100-01)。

作者简介:王冬群(1976-),男,硕士,主要从事贝类遗传育种与病害防治研究。E-mail:wdq1213@sohu.com

通讯作者:李太武。E-mail:LiTaiwu@hotmail.com

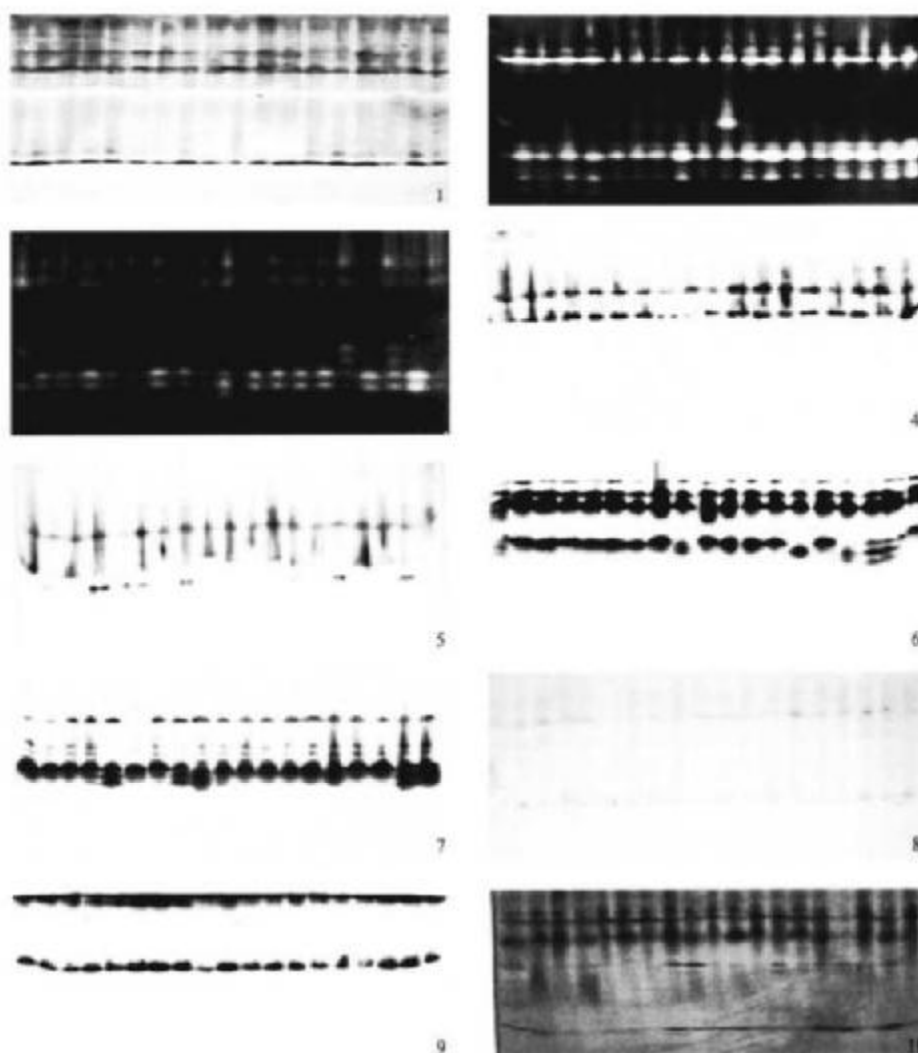


图1 缙蛭群体同工酶图谱

Fig.1 Electropherograms of isozymes of *Sinonovacula constricta*

1.ADH;2.SOD;3.ATP;4.GDH;5.SDH;6.ME;7.MDH;8.LDH;9.IDH;10. EST

表1 缙蛭10种同工酶及其电泳情况

Tab.1 Names and electrophoretic methods of analyzed isozymes in *Sinonovacula constricta* Lamarck

同工酶 Isozyme	结构 Structure	酶编号 E. C. No.	缓冲系统 Buffer system	记录位点数 No. of loci
苹果酸脱氢酶 MDH	二聚体 Dimer	EC1.1.1.37	TG 8.3	4
醇脱氢酶 ADH	二聚体 Dimer	EC1.1.1.1	TG 8.3	4
腺苷-5'-三磷酸酶 ATP	四聚体 Tetramer	EC3.6.1.8	TG 8.3	4
异柠檬酸脱氢酶 IDH	二聚体 Dimer	EC1.1.1.42	TC 7.0	2
谷氨酸脱氢酶 GDH	二聚体 Dimer	EC1.4.1.2	TG 8.3	1-2
苹果酸酶 ME	四聚体 Tetramer	EC1.1.1.40	TG 8.3	2
酯酶 EST	单聚体 Monomer	EC3.1.1.1	TG 8.3	4
超氧化物歧化酶 SOD	二聚体 Dimer	EC1.15.1.1	TG 8.3	5
山梨醇脱氢酶 SDH	四聚体 Tetramer	EC1.1.1.14	TG 8.3	1
乳酸脱氢酶 LDH	二聚体 Dimer	EC1.1.1.27	TG 8.3	2

注: TG 8.3 为 Tris-甘氨酸电极缓冲系统 pH 8.3, TC 7.0 为 Tris-柠檬酸电极缓冲系统 pH 7.0.

Note: TG 8.3, Tris-glycine pH 8.3; TC 7.0, Tris-citrate pH 7.0.

2 结果

2.1 生化指标

所测基因座位、等位基因频率、各位点杂合度观测值、杂合度预期值和杂合子缺失指数统计结果见表2。

2.2 群体内遗传变异的度量

2.2.1 多态座位比例 共检测了养殖群体和野生群体缙蛭的10种同工酶,分别记录了30、29个位点。根据表2统计结果可知,象山养殖和野生群体缙蛭的多态比例($P_{.95}$)分别为16.67%和17.24%。

表2 缙蛭两个群体多态位点等位基因频率、杂合度的观测值、预期值和杂合子偏离指数

Tab.2 Allele frequencies, observed and expected heterozygosities and indexes of heterozygote deficiency at five polymorphic loci in the two populations of *Sinonovacula constricta* Lamarck

基因位点 Locus	等位基因 Allele	基因频率 Allele frequency	
		养殖群体 Hatchery stock	野生群体 Wild population
s-MDH-1	100	0.709 7	0.681 8
	121	0.290 3	0.318 2
	H_o	0.315 8	0.368 4
	H_e	0.412 1	0.433 9
	d	-0.233 7	-0.151 0
SDH	75	0.413 8	0.360 0
	100	0.586 2	0.640 0
	H_o	0.263 2	0.157 9
	H_e	0.485 1	0.460 8
	d	-0.352 8	-0.657 3
s-ME	100	0.758 9	0.646 3
	121	0.241 1	0.363 6
	H_o	0.236 8	0.368 4
	H_e	0.365 9	0.462 8
	d	-0.352 8	-0.204 0
ATP-1	86	0.130 4	0.130 4
	100	0.869 6	0.869 6
	H_o	0.105 3	0.105 3
	H_e	0.226 8	0.226 8
	d	-0.535 7	-0.535 7
ATP-2	100	0.928 6	0.843 8
	112	0.071 4	0.156 2
	H_o	0.052 6	0.131 6
	H_e	0.132 6	0.263 6
	d	-0.603 3	-0.500 8

2.2.2 群体多态座位平均杂合度的观察值(H_o)、预期值(H_e)和遗传偏离指数(d) H_o 、 H_e 量化了基因的遗传多样性, d 值则反映了种群内杂合子的过剩或缺失状态,在 Hardy-Weinberg 平衡假设下, d 值为正表示杂合子过剩; d 值为负表示杂合子处于缺失状态。由表2可知,本实验检测的各位点 d 值均为负值,两种群遗传偏离指数较大的位点有 ATP-2、ATP-1。两个群体遗传偏离指数均明显低于海湾扇贝4个养殖群体的平均值-0.043^[9],高于魁蛭两个群体的平均值-0.474^[10]。杂合子缺失会导

致某些基因从基因库中消失,造成种群遗传多样性的降低,从而降低物种适应环境变化的能力。

从表3各统计数据来看,象山野生群体比象山养殖群体遗传多样性指数高,存在着更丰富的遗传变异。一般认为物种遗传多样性的大小与物种对环境的适应能力和进化潜力密切相关,可见,象山野生群体比象山养殖群体更能适应环境和具有更多的进化潜力。不过象山野生缙蛭群体在 GDH 丧失了 GDH-1,可能是受外海特有的环境影响,长期演化的结果。

表3 象山养殖和象山外海野生缢蛏群体的遗传变异性水平

Tab.3 Genetic variability in natural population and hatchery population of *Sinonovacula constricta* Lamarck

遗传变异参数 Genetic variability	象山养殖群体 Hatchery stock	象山野生群体 Wild population
多态位点比例($P_{.95}$)	0.166 7	0.172 4
平均杂合度观测值(H_o')	0.031 4	0.037 7
平均杂合度期望值(H_e')	0.052 3	0.061 6
平均杂合子偏离指数(d)	-0.399 9	-0.387 8
平均有效等位基因数(N_e)	1.161 3	1.166 7
综合指数(CIGV)	0.005 9	0.007 3

2.3 群体间遗传差异的度量

根据文献[6]中公式得出象山养殖群体与野生

群体间遗传相似度(I)和遗传距离(D),从表4可以看出两群体间具有非常相近的亲缘关系。

表4 两个群体间的遗传相似度和遗传距离

Tab.4 Genetic similarity(I) and genetic distance(D_{gen}) between two populations of *Sinonovacula constricta* Lamarck

	象山养殖群体 Hatchery stock	象山野生群体 Wild population
象山养殖群体 Hatchery stock	* * * * *	0.993 0
象山野生群体 Wild population	0.007 0	* * * * *

3 讨论

3.1 遗传多样性比较

一般认为海洋无脊椎动物的平均杂合度为0.1,薛钦昭^[12]对49种主要海洋贝类群体的遗传变异统计表明,海洋贝类有效等位基因数 N_e 大多在1.0~1.5,多态位点比例平均为0.46,杂合度观测值平均为0.147,Hardy-Weinberg平衡偏离指数 d 平均为-0.117,认为海洋贝类具有较高的遗传变异。与之相比较,本实验所测得的缢蛏养殖群体和野生群体平均杂合度观测值分别为0.031 4和0.037 7,平均杂合度期望值分别为0.052 3和0.061 6。多态位点比例分别为16.67%和17.24%,遗传偏离指数分别为-0.399 9和-0.387 8,均低于49种贝类遗传变异指标的平均值,也低于我国大量养殖的其他经济贝类,如泥蚶(*Tegillarca granosa*)^[13]和栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)^[14],由此可见,象山缢蛏群体遗传多样性现状的确不容乐观。

3.2 贝类养殖与野生群体遗传变异研究

一般来说,人工条件下的养殖群体比野生群体容易发生自交和少雄多雌受精效应,从而容易引起遗传多样性的降低和衰退。养殖群体的遗传变异水平的下降,在贝类曾有报道,对黑珍珠牡蛎(*Pincta-*

da margaritifera)的18个蛋白编码位点的电泳分析发现,与野生原种群相比,人工繁育养殖群体的第二代、第三代等位基因的数目分别下降了17%和18%^[15];对大砗磲(*Tridacna gigas*)等位酶分析发现,人工培育的群体比野生群体的遗传多样性程度低,有明显的基因频率偏斜^[16]。宋林生等^[17]用RAPD技术对栉孔扇贝野生与养殖种群的研究表明,野生种群在多态座位和杂合度方面明显高于养殖种群;在牡蛎也有类似的发现^[18-19]。

人工养殖群体中遗传多样性的丧失,将导致种质资源的遗传同质化程度的加剧,增大某些劣质隐性基因的纯合化的几率,最终将导致群体的适合度下降,具体表现为种质资源生产性状的衰退、抗病力差、繁殖力减弱等现象。沈琪^[20]等采用淀粉凝胶电泳对欧洲牡蛎(*Ostrea edulis*)的自然和养殖群体研究发现,由于人为作用,其中包括人工育苗和养殖,会对自然群体的遗传结构产生影响。当前,缢蛏养殖具有以下特点:①由以前的蛏田养殖为主改为现在的以池塘肥水高密度养殖为主;②在繁殖季节,池塘养殖缢蛏由于水位的变化,常造成集中排卵,并漂散到沿海滩涂上,影响了近海滩涂缢蛏的种质;③浙江沿海的虾蟹育苗厂利用空闲季节,普遍开展了缢蛏的育苗工作,但却常常不注意亲本的选择,常常就

近选择亲本,就近养殖。因此,本研究中缢蛭养殖群体比野生群体遗传多样性低,可能与上述养殖特点造成的人工累代养殖过程中,群体较小,近交机会增加有关。20世纪80年代中期以来,在我国沿海地区,由于对虾养殖业的兴起,筑坝、围海建塘,导致了生态因子的改变,使缢蛭栖息的生态环境发生了很大变化,加上过度捕捞和工业污染致使缢蛭野生种群数量急骤下降,病害频发,遗传多样性受到威胁。如果不及时进行适当的保护,很有可能出现像野生大黄鱼一样的种质严重退化。目前,应该加大力度调查缢蛭野生资源的分布范围,利用有多态位点丰富的基因座位 $x-MDH-1$ 、 $x-ME$ 、 $ATP-1$ 、 $ATP-2$ 为遗传育种中的有效标记,用于挖掘有价值或潜在价值的良种缢蛭。同时建立缢蛭的物种资源保护区,用以保存和保护缢蛭的野生资源。

参考文献:

- [1] 尤仲杰,徐善良,谢起浪. 浙江沿岸的贝类资源及其增养殖[J]. 东海海洋,2000,18(1):50-56.
- [2] 尤 伟,王可玲,相建海,等. 山东近海褐牙鲷自然与养殖群体生化遗传结构及其遗传变异的比较分析[J]. 海洋与湖泊,2001,32(5):512-518.
- [3] 王伟雄,孔 杰,庄志猛,等. 真鲷野生群体和人工繁殖群体的同工酶差异[J]. 生物多样性,2000,8(4):391-396.
- [4] 李太武,王冬群,苏秀榕. 缢蛭生化遗传特征分析[J]. 海洋湖泊,2003,34(6):640-647.
- [5] 胡能书,万贤国. 同工酶技术及其应用[M]. 长沙:湖南科学技术出版社,1985. 30-47,70-85.
- [6] 王中仁. 植物等位酶分析[M]. 北京:科学出版社,1996. 95-112.
- [7] 喻子牛,孔晓瑜. 同工酶电泳技术与遗传变异研究[J]. 海洋湖泊通报,1997,2:32-42.
- [8] 徐 成,王可玲,张培军. 鲈鱼群体生化遗传学研究Ⅱ种群生化遗传结构及变异[J]. 海洋与湖泊,2001,32(3):248-254.
- [9] 张真昌,梁玉波,刘仁浩,等. 海湾扇贝养殖群体遗传多样性的研究[J]. 海洋学报,2002,24(2):107-113.
- [10] 喻子牛,孔晓瑜,杨 锐,等. 魁蛸等位基因酶遗传变异研究[J]. 青岛海洋大学学报,1998,28(1):51-58.
- [11] Nei M. Genetic distance between populations [J]. Amer Nat, 1972,106:283-292.
- [12] 薛欣明. 海洋动物细胞和种群生化遗传学[M]. 济南:山东科学技术出版社,1999. 112-123.
- [13] 喻子牛,孔晓瑜,杨 锐,等. 泥蛸等位基因酶遗传变异研究[J]. 中国水产科学,1997,4(5):15-21.
- [14] 李太武,孙修勤,刘 艳,等. 栉孔扇贝种群的遗传变异分析[J]. 高技术通讯,2001,4:25-27.
- [15] Patrick D, Wada K T, Frerese B. Genetic variation in wild and hatchery stocks of the black pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, from Japan [J]. Aquaculture, 1993, 110:27-40.
- [16] Berrie J A H, William S T. Limitation in the genetic variation of hatchery produced batches of the giant clam *Tridacna gigas* [J]. Aquaculture, 1996, 139:225-241.
- [17] 宋林生,李俊强,李红雷,等. 用 RAPD 技术对我国栉孔扇贝野生种群与非纯群体的遗传结构及其遗传分化的研究[J]. 高技术通讯,2002,7:83-88.
- [18] Hodgcock D, Sly F. Genetic drift and effective population size of hatchery propagated stock of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* [J]. Aquaculture, 1990, 88:21-28.
- [19] Wada K T. Genetic variability at four polymorphic loci in hatchery stock mussel oysters, *Pinctada fucata martensii*, selected for six generations [J]. Aquaculture, 1986, 59:139-146.
- [20] 沈 斌, Beaumont A R. 欧洲牡蛎两个种群的遗传变异[J]. 热带海洋, 1999, 18(3):45-50.

Comparison of genetic diversity between hatchery stock and wild population of *Sinonovacula constricta* Lamarck in Xiangshan Bay

WANG Dong-qun, LI Tai-wu, SU Xiu-rong

(Life Science and Biotechnology School, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: *Sinonovacula constricta* Lamarck is an important economical species along the coast of China. In recent years, it has suffered heavy decrease in its resources, and the wild stocks and their genetic diversity have been threatened to some extent due to overfishing and changes of ecological environment. It is the time to investigate the genetic diversity of *Sinonovacula constricta*. In April 2001, samples of *Sinonovacula constricta* Lamarck were collected from the coast of Xiangshan Bay (Zhejiang Province). Mantle was fetched from each of the samples and tested at once or stored in refrigerator (-70°C) for test. Tissues were homogenized in mercaptoethanol buffer (0.05%) at a ratio of 1:3 (g/mL) with ice-bath and centrifuged at 12×10^3 r/min for 30 min. The supernatant of samples was used as the enzyme source and analyzed by electrophoresis and specific enzyme staining methods. Electrophoresis was carried out on vertical polyacrylamide gels at 300 V (TG buffer) or 100 V (TC buffer) for approximately 4 or 5 h at the temperature of 4°C . Thirty and twenty-nine loci of 10 enzymes were detected in the hatchery stock and the wild population respectively, and allele frequencies of each loci in the hatchery stock and the wild population were calculated, of which, five loci such as *s-MDH-1*, *SDH*, *s-ME*, *ATP-1*, and *ATP-2* were found polymorphic in the hatchery stock and the wild population. The proportion of polymorphic loci ($P_{.95}$) in the hatchery stock and the wild population was 16.67% and 17.24%, respectively. The mean heterozygosity observed was 0.031 4 and 0.037 7, respectively. The mean heterozygosity expected was 0.052 3 and 0.061 6, respectively. The mean effective number was 1.161 3 and 1.166 7, respectively. The deviation index from Hardy-Weinberg equilibrium was $-0.399 9$ and $-0.387 8$, respectively. The CIGV was 0.005 9 and 0.007 3, respectively. The genetic diversity of the *Sinonovacula constricta* was lower than the average of bivalve. The wild population possessed higher genetic variation than the hatchery stock. Genetic variability showed that *Sinonovacula constricta* resource quality was bad, and overfishing should be prohibited to protect the resources of *Sinonovacula constricta* in Xiangshan Bay.

Key words: *Sinonovacula constricta* Lamarck; isozyme; genetic diversity

Corresponding author: LI Tai-wu. E-mail: litaiwu@hotmail.com