

合浦珠母贝2个野生种群的遗传多样性

杜晓东¹, 李广丽², 刘志刚², 叶富良², 王如才¹

(1. 青岛海洋大学水产学院, 山东 青岛 266003; 2. 湛江海洋大学水产学院, 广东 湛江 524025)

摘要:用形态特征比较与同工酶电泳分析相结合的方法, 对产于我国北部湾和大亚湾的野生合浦珠母贝(*Pinctada martensii*)的遗传多样性进行研究。结果表明, 在贝壳形态方面, 北部湾种群的平均壳长与壳高都略大于大亚湾种群, 壳高与壳长呈乘幂相关, 壳宽与壳长呈对数相关。大亚湾种群的壳宽指数、壳重指数和肥满度指标都大于北部湾种群。用聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳检测由26个位点编码的12种同工酶, 2种群都显示出较高的多态性, 北部湾种群多态位点的比率为38.46%, 大亚湾种群则为46.15%。都表现出明显的杂合子缺失现象, 北部湾种群的平均杂合度(0.099 9)小于大亚湾种群(0.124 3)。2种群之间的遗传距离为0.015 9。本文还讨论了引起2种群杂合子缺失现象的原因, 并认为生化遗传分析的结果与2个种群的形态特征是相关联的。

关键词:合浦珠母贝; 野生种群; 遗传多样性; 形态特征; 同工酶

中图分类号: Q959.215

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737(2002)02-0100-06

合浦珠母贝(*Pinctada martensii*)主要分布于广东、广西和海南沿海。自20世纪70年代始, 由于捕捞过度及栖息环境恶化, 致使合浦珠母贝自然资源日渐枯竭, 在台湾和福建2省已难见到野生种群^[1]。近30年的人工养殖使数量庞大的养殖贝来源于数目有限的亲贝, 出现了性早熟、贝体变小等较严重的品种退化现象, 从而导致人工培育的珍珠质量日益下降, 珍珠产量大幅度减少。因此需要从遗传资源和育种方面对合浦珠母贝进行深入研究。但迄今为止, 国内外对合浦珠母贝的遗传学研究仅有零星报道^[1-5]。本文以产于我国大亚湾和北部湾的野生种群为研究对象, 以形态学特征结合同工酶分析法对其遗传多样性进行系统比较, 以便为制定相应的资源保护措施, 保证养殖业的健康、稳步发展提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用贝分别采自大亚湾(约22°30'N、114°30'

E)和北部湾(约21°N、109°E)海域, 水深10 m左右。采样时间分别是1998年7月和11月。实地打捞以确保实验材料来自野生群体。打捞海区选择在北部湾的涠洲岛附近和大亚湾的大鹏附近远离人工养殖场处。在每个海区各自获取实验贝300个左右, 贝龄1~4年; 体重6.7~96.7 g。

1.2 形态特征量度

分别随机选取北部湾和大亚湾实验贝50个, 用游标卡尺测量壳长、壳高、壳宽、韧带槽长等数值, 精确到0.1 mm。电子天平称量总重、软体部重(滤纸尽量吸去水)和壳重, 精确到0.1 g。比较壳长与壳高、壳宽和壳重的相关关系^[1-3], 并进行回归分析。

壳重量指数(I_{SW}) = $W_S / (L \times H \times W) \times 10^5$;

壳宽指数(I_S) = $W / (L + H + W)^{[3-4]}$

肥满度(C_F) = $W_F / (L \times H \times W) \times 10^{[6]}$ 。

式中 L 、 H 和 W 分别代表壳长、壳高和壳宽, 单位mm; W_S 和 W_F 分别表示壳重和软体部重量, 单位g。

1.3 同工酶电泳

1.3.1 材料处理与保存 活贝运回实验室后暂养1夜, 次日解剖, 取鳃、闭壳肌、消化腺和外套膜4种组织, 磷酸缓冲液清洗, 置低温冰箱(-75℃)保存待用。两地各取30只贝, 贝龄1.5~4年。

收稿日期: 2001-07-12。

基金项目: 广东省教育厅重点科技攻关项目。

作者简介: 杜晓东(1962-), 男, 博士, 现为湛江海洋大学副教授, 从事无脊椎动物生物学与增养殖研究。

1.3.2 样品制备和电泳方法 见文献[7]。

1.3.3 酶位点与等位基因的编号 见文献[7]。

1.3.4 基因变异的度量 多态位点比例(Proportion of polymorphic loci) $P = \text{多态位点数} / \text{总位点数}$ 。

平均杂合度(Mean heterozygosity) $H = \sum (1 - \sum X_i^2) / n$, 其中 X_i 为等位基因 i 的频率; n 为所测位点数。

群体间遗传一致性(Genetic identity, $I = \sum \sum X_{ij} Y_{ij} / (\sum \sum X_{ij}^2 \cdot \sum \sum Y_{ij}^2)^{1/2}$, 其中 X_{ij} 、 Y_{ij} 分别为 X 、 Y 2 个种群中第 j 个基因位点上第 i 个等位基因频率。

遗传距离(Genetic distance) $D = -\ln I$

基因分化系数(Coefficient of gene differentiation) $D_{st} = (H_T - H_S) / H_T$, 其中 H_T 为总群体基因多样性; H_S 为亚群内基因多样性。

表1 合浦珠母贝形态特征

Table 1 Morphological measurement of *P. martensii*

项目 Item	北部湾种群 Beibu Bay population	大亚湾种群 Daya Bay population
平均壳长/mm Mean shell length	69.4 ± 11.8	60.3 ± 9.2
平均壳宽/mm Mean shell width	22.2 ± 3.8	24.9 ± 4.7
平均壳高/mm Mean shell height	70.3 ± 11.3	64.9 ± 10.0
壳宽指数 Shell width index	0.136 9 ± 0.007 5	0.165 3 ± 0.011 1
壳高/壳长 Height/Length	壳高(H) ≥ 壳长(L): 62.0% 壳高(H) < 壳长(L): 38.0%	壳高(H) ≥ 壳长(L): 96.0% 壳高(H) < 壳长(L): 4.0%
肥满度 Condition factor	7.805 3 ± 1.640 6	13.958 0 ± 4.763 6
壳重指数 Shell weight index	22.626 8 ± 2.508 8	27.961 5 ± 7.221 1

2 结果

2.1 形态特征

2 个种群的形态特征参数如表 1 和图 1~3。回归分析表明体重与壳长呈乘幂相关关系: $T_{WB} = 0.253 L_B^{2.6175}$, ($R^2 = 0.8955$, $P < 0.05$), $T_{WD} = 1.236 8 L_D^{1.988}$, ($R^2 = 0.8146$, $P < 0.05$)。壳宽与壳长呈对数相关关系: $W_B = 19.86 \ln(L_B)$

-61.716 , ($R^2 = 0.8778$, $P < 0.05$); $W_D = 28.28 \ln L_D - 90.667$, ($R^2 = 0.8469$, $P < 0.05$)。壳高与壳长呈乘幂相关关系: $H_B = 1.548 1 L_B^{0.9001}$, ($R^2 = 0.9195$, $P < 0.05$); $H_D = 1.188 6 L_D^{0.9756}$, ($R^2 = 0.8999$, $P < 0.05$)。

表2 合浦珠母贝韧带槽长与壳长比值的分布

Table 2 Ratio of hinge length to shell length of *P. martensii*

韧带槽长/壳长 L_{10}/L_S	北部湾种群 Beibu Bay population		大亚湾种群 Daya Bay population	
	观察数 Observed number	百分比/% Frequency	观察数 Observed number	百分比/% Frequency
1.10~1.19	1	2.0	7	14.0
1.00~1.09	2	4.0	19	38.0
0.90~0.99	19	38.0	16	32.0
0.80~0.89	19	38.0	7	14.0
0.70~0.79	9	18.0	1	2.0
总计 Total	50	100	50	100

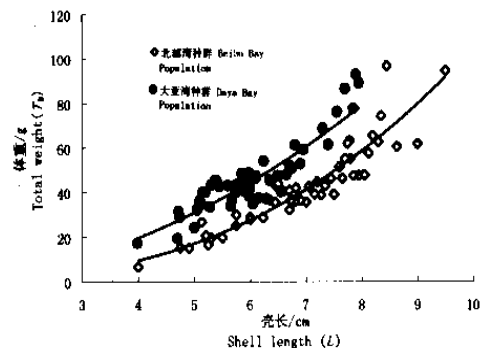


图1 合浦珠母贝体重与壳长的关系

Fig.1 Relationship between total weight and shell length of *P. martensii*

2.2 同工酶电泳

计算显示北部湾种群多态位点和多态酶的比率分别为 38.46% 和 50.0%; 大亚湾种群则分别为 46.15% 和 66.7%。2 个种群的期望杂和度 H_e 、杂合子缺失指数 F 、基因分化系数 G_{st} 、遗传一致性 I 和遗传距离 D 等的计算结果见表 3。

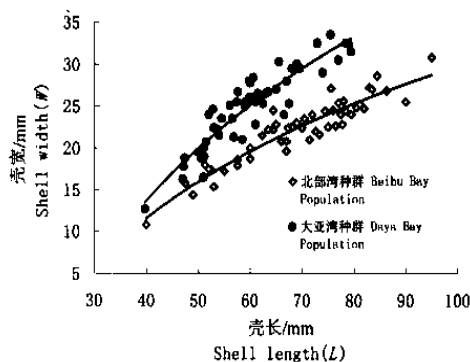


图2 合浦珠母贝壳宽与壳长的关系

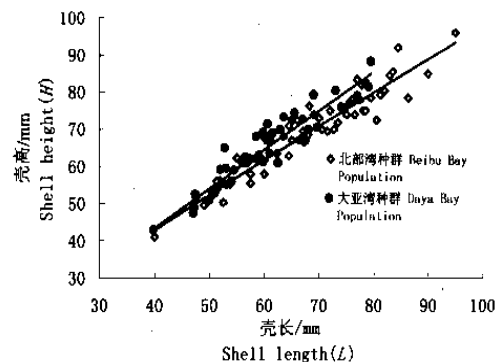
Fig. 2 Relationship between shell width and shell length of *P. martensii*

图3 合浦珠母贝壳高与壳长的关系

Fig. 3 Relationship between shell height and shell length of *P. martensii*

表3 合浦珠母贝同工酶图谱的分析结果

Table 3 Analyzed results of isozyme patterns of *P. martensii*

多态位点 Polimor- phic loci	种群 Population	期望 杂合度 H_e	观察 杂合度 H_o	杂合子 缺失指数 F	亚群体基 因多样性 H_s	总群体基 因多样性 H_t	基因分 化系数 G_{st}
Alp-1	DBP	0.048 7	0.050 0	0.026 7	0.024 4	0.024 7	0.013 2
	BBP	0	0				
Sod-1	DBP	0.375 0	0.100 0	-0.733 3	0.361 9	0.362 2	0.000 9
	BBP	0.348 8	0.050 0	-0.856 6			
Sod-2	DBP	0.288 8	0.250 0	-0.134 2	0.331 9	0.334 7	0.008 4
	BBP	0.375 0	0.300 0	0.200 0			
Sod-3	DBP	0.095 0	0	-1.000	0.137 5	0.138 8	0.009 0
	BBP	0.180 0	0	-1.000			
Sod-4	DBP	0.095 0	0.100 0	0.052 6	0.071 9	0.072 2	0.004 3
	BBP	0.048 8	0.050 0	0.025 6			
Aat-1	DBP	0.357 4	0.333 0	-0.068 3	0.294 0	0.299 0	0.016 7
	BBP	0.230 6	0.133 0	-0.423 3			
Aat-2	DBP	0.357 4	0.200 0	-0.440 4	0.294 0	0.299 0	0.016 7
	BBP	0.230 6	0.133 0	-0.423 3			
m-Mdh-c	DBP	0.218 8	0.250 0	0.142 9	0.156 9	0.159 7	0.017 6
	BBP	0.095 0	0.100 0	0.052 6			
Ak-1	DBP	0.218 8	0.150 0	-0.314 3	0.319 4	0.334 7	0.045 8
	BBP	0.420 0	0.200 0	-0.523 8			
Me-2	DBP	0.391 4	0	-1.000	0.391 4	0.391 4	0
	BBP	0.391 4	0	-1.000			
G6pdh-1	DBP	0.393 3	0.300 0	-0.237 2	0.196 6	0.232 8	0.155 4
	BBP	0	0	-			
6Pgdh-1	DBP	0.393 3	0.538 0	0.368 0	0.335 8	0.341 0	0.015 3
	BBP	0.278 2	0.333 0	0.196 9			
平均	DBP	0.124 3	0.189 3	-0.278 1	0.243 0	0.249 2	0.025 3
Average	BBP	0.099 9	0.108 3	-0.346 0			
遗传相似度(I) Genetic identity				0.984 2			
遗传距离(D) Genetic distance				0.015 9			

注:DBP—大亚湾种群 Daya Bay population;BBP—北部湾种群 Beibu Bay population.

3 讨论

3.1 形态特征

从形态学或表型性状上来检测遗传变异是最古老也最简便易行的方法。由于表型和基因型之间存在着基因表达、调控、个体发育等一系列复杂的中间环节,如何根据表型性状上的差异来反映基因型上的差异就成为用形态学方法检测遗传变异的关键。通常所利用的表型性状主要有2类,即符合孟德尔遗传规律的单基因性状,或根据多基因决定的数量性状(如大多数形态性状、生活史性状)^[8]。对贝类不同群体进行生长规律和遗传学的研究时,最常用的还是壳长、壳高、壳宽、壳重、软体重、韧带槽长和韧带槽宽等可量特征^[1~5,9,10]。本文所涉及的贝壳性状都是数量性状,它们的表达既受遗传的控制也受环境的影响,因此需比较性状间的相互关系并采用统计、回归等方法进行分析。从实验结果可以看出:(1)北部湾种群贝壳呈浅黄褐色,放射线很醒目;大亚湾种群壳色偏青黄色,放射线较淡。贝壳的颜色往往与珍珠的颜色密切相关。据报道^[1]北部湾种群多产白色系统的珍珠,而大亚湾种群多产黄色系统的珍珠。(2)北部湾种群的平均壳长(69.4 mm)和平均壳高(70.3 mm)略大于大亚湾种群(壳长60.3 mm,壳高64.9 mm),不难看出,北部湾种群的个体较大。回归分析表明,2个种群的壳高与壳长都呈幂相关,即壳高的增长随壳长的增加而越来越显著。(3)北部湾种群的平均壳宽(22.2 mm)比大亚湾种群小(24.9 mm)。(4)大亚湾种群的壳宽指数(0.165 3)非常显著地高于北部湾种群(0.136 9)。这一结果与金启增^[1]报道相似。本研究的回归分析表明壳宽与壳长呈对数相关,说明壳宽在早期(低龄)增加较快,而在晚期(高龄)增长缓慢。(5)北部湾种群壳重指数较小(22.626 8),贝壳较薄;大亚湾种群壳重指数较大(27.961 5),贝壳较厚。Wada等^[11]的研究表明,贝壳重量与珍珠的重量呈正相关,这也是选育的性状之一。(6)由于取样季节相同,从肥满度数值相差近1倍的情况来看,北部湾种群软体部较轻(7.805 3);大亚湾软体部较重(13.958 0),这与前者具有较大壳宽指数的形态特征相符。国内外学者^[1~4]常把总体重与壳长的相关关系做为珍珠贝的群体特征之一,本实验结果表明它们呈乘幂相关。从图1可见2个种群之间在明显区别。(7)北部湾种群韧带槽长大都小

于壳长(94%),因此,贝壳形状更象较扁的梨形。大亚湾种群韧带槽长大于壳长的占一半以上(52%),另有32%的韧带槽长仅略小于壳长(其比值 ≥ 0.9),因此,其贝壳看起来略呈正方形,见表2。

利用数量性状来研究贝类的遗传变异在国外不乏先例^[4,6,12]。Wada等^[4]在分析9组配对交配形成的珠母贝家族的数量性状的遗传力后,指出了除了韧带槽深度的遗传力较低外,壳宽、壳高、韧带槽长以及壳重都有较高的遗传力。

3.2 同工酶电泳

在所分析的12种同工酶系统所代表的26个座位中,2种群的8种同工酶系统(AK、ALP、MDH、G6PD、6PGD、ME、AAT、SOD)共12个座位具有多态性,多态位点酶的比例分别为50.0%(北部湾种群)和66.7%(大亚湾种群),其中9个多态性座位上的基因型频率与Hardy-Weiberg定律相符,只有Me、Sod-1和Sod-3明显偏离。

大亚湾种群的多态位点比例及平均期望杂合度略高于北部湾种群。从表3可见,除6Pgdh-1、m-Mdh-c、Sod-4和Alp-1等4个位点显示轻微的杂合子过量外,Sod-1、Sod-3、Aat-2、Ak-1和Me-2位点在2群体都表现出较高的杂合子缺失,北部湾的缺失(-0.346 0)比大亚湾的(-0.278 1)更严重。有关报道已表明双壳类天然群体中杂合子缺失的现象较普遍^[13,14],但对该现象还未取得一致的解释,其说法包括“0”等位基因、自然选择、选型交配和种群混杂等。本实验所检测的同工酶系统中,G6PD、6PGD、SOD和AAT都有“0”等位基因(null allele),这种现象在其他贝类的同工酶研究中^[5,15]都有过报道。Zouros等^[13]认为由于不同基因型产卵时间的差异导致选型交配(assortative mating),从而产生较多的纯合性。这可以解释北部湾种群的杂合度略低于大亚湾种群,因为北部湾的面积比大亚湾大得多,选型交配现象更可能发生。至于种群混杂产生Wahlund效应而导致的杂合子缺失现象,李刚等^[5]也作过讨论。沿岸的珍珠场在引种过程中可能会导致不同种群的混杂。从表面看,合浦珠母贝野生群体杂合子缺失现象并非由单一原因造成,但每种解释都需进一步验证。

本实验结果还表明,2群体形态特征上的明显差异在生化遗传上具有对应关系。虽尚未发现1条特殊酶带能将2群体区分开,但ALP的89号带和G6pdh-1的100号带只出现在大亚湾种群中。

Zouros 等^[14]通过对牡蛎的研究, Koehnet 等^[16]对贻贝野生群体的研究, 发现平均杂合度与生长率成正相关; Oniwa 等^[12]在研究 19 个虾夷扇贝的种群间遗传变异时, 发现总重和软体部重等数量性状与平均杂合度呈正相关。本实验结果也充分证实了这点, 大亚湾的平均杂合度高于北部湾群体, 形态特征上表现在壳宽指数、壳重量指数以及肥满度也是前者高于后者。至于北部湾种群的平均壳长和壳高都大于大亚湾种群, 则表明杂合子缺失指数高的群体的个体较大。李刚等^[5]的报道亦提到在北部湾的合浦珠母贝种群中, 大个体组的杂合子缺失指数高于小个体组。Durand 等^[17]认为在生活史的不同阶段自然选择对基因型的作用有所差异, 从而导致杂合子缺失。我们认为北部湾和大亚湾的环境差异较显著, 2 种群受到的选择压力也有差别, 结果使二者的基因杂合度出现差异。尽管这 2 个群体在形态特征上以及同工酶基因型分布方面都有明显区别, 但它们之间的遗传距离依然很小(0.015 9), 属正常群体间的变化范围^[18]。

参考文献:

- [1] 金启增. 珍珠贝种苗生物学[M]. 北京: 海洋出版社, 1992. 84 - 90.
- [2] Hynd J S. An analysis of variation in Australian specimens of *Pinctada albina* (Lamarck) (*Lamellibranchia*) [J]. Aust J Mar Freshwat Res, 1960, 11(3): 98 - 137.
- [3] Alagarswami K, Chellam A. Change of form and dimensional relationship in the pearl oyster *Pinctada fucata* from Gulf of Mannar [J]. Indian J Fish, 1977, 24(1 - 2): 1 - 14.
- [4] Wada K T, Komaru A. Estimation of genetic variation in shell traits of the Japanese pearl oyster [J]. Bull Natl Res Inst Aqua, 1991, 20: 19 - 24.
- [5] 李刚, 金启增, 姜卫国, 等. 合浦珠母贝和长耳珠母贝的生化遗传变异[J]. 遗传学报, 1985, 12(3): 204 - 212.
- [6] Yokogawa K. Morphological variability and genetic features in Japanese common clam *Ruditapes philippinarum* [J]. Venus, 1998, 57: 121 - 131.
- [7] 李广丽, 杜晓东, 叶富良. 合浦珠母贝同工酶的电泳分析[J]. 中国水产科学, 2001, 8(2): 17 - 22.
- [8] 葛颂, 洪德元. 遗传多样性及其检测方法[A]. 生物多样性研究的原理与方法[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994. 123 - 140.
- [9] Wada K T, Komaru A. Effect of selection for shell coloration on growth rate and mortality in the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii* [J]. Aquaculture, 1994, 125: 59 - 65.
- [10] Day A J, Hawkins A J S, Visootiviset P. The use of allozymes and shell morphology to distinguish among sympatric species of the rock oyster *Saccostrea* in Thailand [J]. Aquaculture, 2000, 187: 51 - 72.
- [11] Wada K T, Komaru A. Color and weight of pearls produced by grafting the mantle tissue from a selected population for white shell color of the Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii* (Dunker) [J]. Aquaculture, 1996, 142: 25 - 32.
- [12] Oniwa K, Kijima A, Fujio Y. Relationship between genetic variability and quantitative traits in Japanese scallop, *Patinopecten yessoensis* [J]. Tohoku J Agri Res, 1994, 45: 1 - 10.
- [13] Zouros E, Foltz D W. Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve molluscs [J]. Malacologia, 1984, 25: 583 - 591.
- [14] Zouros E, Singh S M, Miles H E. Growth rate in oysters: an overdominant phenotype and its possible explanations [J]. Evolution, 1980, 34: 856 - 867.
- [15] English L J, Maguire G B, Ward R D. Genetic variation of wild and hatchery populations of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in Australia [J]. Aquaculture, 2000, 187: 283 - 298.
- [16] Koehnet R K, Gaffney P M. Genetic heterozygosity and growth rate in *Mytilus edulis* [J]. Mar Biol, 1984, 82: 1 - 7.
- [17] Durand P, Blanc F. Genetic diversity in a tropical marine bivalve: *Pinctada margaritifera* (Linne, 1758) [J]. Bull Soc Zool France, 1988, 113(3): 293 - 304.
- [18] Nei M. Molecular Evolutionary Genetics [M]. New York: Columbia Univ Press, 1987.

Genetic diversity of two wild populations in *Pinctada martensii*

DU Xiao-dong¹, LI Guang-li², LIU Zhi-gang², YE Fu-liang², WANG Ru-cai¹

(1. Fisheries College, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China;

2. Fisheries College, Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Abstract: The genetic diversity of two wild populations of *Pinctada martensii* from Beibu Bay and Daya Bay in South China Sea were studied by comparison of their morphological characters and isozyme analysis. Morphologically, the mean shell length (L) and shell height (H) of Beibu Bay population (BBP) are slightly larger than those of Daya Bay population (DBP). The relationships between shell length and shell height can be described by a power function: $H_B = 1.5481 L_B^{0.9001}$ ($R^2 = 0.9195$, $P < 0.05$) for Beibu Bay population; $H_D = 1.1886 L_D^{0.9756}$ ($R^2 = 0.8999$, $P < 0.05$) for Daya Bay population. The relationships between shell width (W) and shell length (L) are described by a logarithmic function: $W_B = 19.86 \ln(L_B) - 61.716$ ($R^2 = 0.8778$, $P < 0.05$) for Beibu Bay population; $W_D = 28.28 \ln(L_D) - 90.667$ ($R^2 = 0.8469$, $P < 0.05$) for Daya Bay population. The indexes of shell width and shell weight and the condition factor value of DBP are higher than those of BBP. The electrophoretic analysis of 12 isozymes at 26 loci in both of the populations suggests significant genetic variation. The rate of polymorphic locus is 38.46% in BBP and 46.15% in DBP. Both of the populations indicate strikingly heterozygote deficiency. The mean heterozygosity value of BBP is 0.0999, and that of DBP is 0.1243; the genetic distance between them is 0.0159. The authors also discuss the reasons for the deficiency of heterozygote and suggest that the result from biochemical analysis be correlated with the morphological characters.

Key words: *Pinctada martensii*; wild population; genetic diversity; morphological character; isozyme

中国水产学会渔业信息专业委员会工作会议暨 科技期刊编辑学研讨会纪要

中国水产学会渔业信息专业委员会工作会议暨科技期刊编辑学研讨会于2002年5月16-18日在上海水产大学召开,来自全国27家相关期刊编辑部和12家信息单位的45位同志参加了会议。会议由信息专业委员会副主任委员刘统锦、卢怡、陈述平、欧阳海鹰同志主持。上海水产大学叶骏书记、周应祺校长和中国水产学会秘书长张铭羽同志出席了会议。张铭羽秘书长对今后信息专业委员会的工作提出了宝贵的意见和建议。

本次大会就WTO对中国渔业的影响、高新科技知识的网络传播模式、高校图书馆信息系统的建立、基于Web的水产期刊信息系统的构建与使用、期刊编辑中量和单位使用的若干问题、科技期刊论文统计分析与比较研究、《科技期刊发展史》调查和撰写等进行了专题报告和研讨。

会议期间渔业信息专业委员会还召开了工作会议,就今后专业委员会工作,包括全国渔业期刊评比、渔业期刊的数字化和网络应用、渔业信息网站的建设和评比、渔业信息专业委员会委员和秘书的调整及增补问题进行了讨论。委员会一致认为期刊评比活动对于提高办刊质量、促进科技期刊的发展将起到积极的促进作用。

中国水产学会渔业信息专业委员会

2002年5月18日