

泥蚶等位基因酶遗传变异研究*

喻子牛 孔晓瑜 杨锐 王如才 刘必谦

(国家教委水产养殖研究开放实验室, 青岛海洋大学 266003)

摘要 采用水平淀粉凝胶电泳技术研究了山东荣成、青岛、浙江温州三个泥蚶群体样本的等位基因酶遗传变异。在12种等位基因酶中共检测到了27个基因位点, 三个群体的多态位点比例($P_{0.99}$)分别为37.00%、40.70%和48.15%, 平均杂合度观察值分别为 0.062 ± 0.031 、 0.068 ± 0.026 和 0.097 ± 0.034 , 平均位点有效等位基因数分别是 1.409 ± 0.275 、 1.301 ± 0.142 和 1.407 ± 0.192 。比较了三个群体之间的遗传相似度(I)和遗传距离(D_{Nei}), 表明荣成和青岛群体遗传同一性较大, 而它们与温州群体的遗传分歧较明显。三个群体在多个位点上都存在明显的杂合子缺失现象。

关键词 泥蚶, 等位基因酶, 遗传变异

等位基因酶是一种稳定且灵敏的生化遗传标记之一, 其电泳技术被广泛用于调查、评估、监测生物种质资源的遗传变异, 检测生物群体的遗传分化或进行种群、种间鉴定^[7]。这方面的研究多集中在牡蛎^[5,6,8]、扇贝^[2,12]、贻贝^[3,9,13]、蛤^[4], 在蚶类这方面报道极少。泥蚶(*Tegillarca granosa*)俗称血蚶、花蚶、粒蚶, 属瓣鳃纲、翼形亚纲、蚶科, 广泛分布于我国山东以南诸地区沿海, 是我国四大传统养殖贝类之一。其肉含有丰富的蛋白质和维生素B₁₂, 蚶血鲜红, 肉味鲜美, 具有很高的经济价值。80年代中期以来, 在我国沿海特别是北方沿海地区, 由于对虾养殖业的兴起, 筑坝、围海建池, 导致了许多生态因子的改变, 使泥蚶的栖息生态环境发生了很大变化, 加上过度捕捞和工业污染致使泥蚶种群数量急剧下降, 产量锐减, 遗传多样性受到威胁, 因此, 认识泥蚶自然群体的遗传多样性现状, 对泥蚶的自然资源恢复和遗传改良具有重要意义。

1 材料和方法

实验泥蚶样本从山东荣成、青岛和浙江温州三地区滩涂自然群体采得或购得, 群体样本大小为50~60余个, 样本活体常温带回实验室进行处理。取个体消化腺组织于磷酸缓冲液(pH7.0)中1:1(W/V)匀浆(或暂置-70℃), 于冷冻离心机4℃以下15,000rpm离心15min, 取

收稿日期: 1996-07-01。

* 本研究受国家自然科学基金(3960013)和国家教委水产养殖研究开放实验室基金资助。

上清酶液电泳。实验采用水平淀粉(淀粉为美国 Starch Art 公司产品)凝胶电泳方法, 凝胶浓度 12%, 在稳压条件下, 于 4℃ 冰箱中以 8v/cm(TC 缓冲液 pH7.0)或 15v/cm(BET 缓冲液 pH8.7)分别电泳 5 或 6 小时。凝胶厚度 12 或 6mm, 电泳结束后分别切成 6 片或 3 片, 分别进行各种酶的染色^[1,7,10]。共对 12 种酶进行了分析(表 1)。

表 1 所分析的等位基因酶和电泳条件及其记录位点数
Table 1 Enzymes assayed, buffer systems used and number of loci scored in the study

酶 Enzyme	酶编号 E. C. No.	缓冲系统 Buffer	记录位点数 No. of loci scored
腺苷酸激酶 Adenylate kinase(AK)	2.7.4.3	TC	2
酯酶 Esterase(EST)	3.1.1.1	EBT	7
磷酸葡萄糖异构酶 Glucosephosphate isomerase(GPI)	5.3.1.9	TC	1
己糖激酶 Hexokinase(HK)	2.7.1.1	TC	2
异柠檬酸脱氢酶 Isocitrate dehydrogenase(IDH)	1.1.1.42	TC	2
乳酸脱氢酶 Lactate dehydrogenase(LDH)	1.1.1.27	EBT	1
苹果酸酶 Malic enzyme(ME)	1.1.1.40	TC	3
苹果酸脱氢酶 Malate dehydrogenase(MDH)	1.1.1.37	TC	2
磷酸葡萄糖变位酶 Phosphoglucomutase(PGM)	2.7.5.1	TC	2
磷酸葡萄糖脱氢酶 Phosphogluconate dehydrogenase(PGD)	1.1.1.44	TC	1
山梨醇脱氢酶 Sorbitol dehydrogenase(SDH)	1.1.1.14	TC	1
超氧化物歧化酶 Superoxide dismutase(SOD)	1.1.1.15	EBT	3
合计 Total:	12Enzymes		27

等位基因命名以该位点出现频率最高者为 100, 其它等位基因则以相对于等位基因 100 的相对迁移率的百分率命名; 基因位点以它编码的等位基因酶的缩写斜体字母表示。若该酶由一个以上位点编码时, 各位点按它编码酶的从阴极向阳极迁移顺序命名(1、2、3……)。电泳原始数据用来计算等位基因频率、多态位点比例(P)、多态位点杂合度观察值(H_0), Hardy - weinberg 平衡下杂合度预期值(H_e), 杂合子缺失指数(D), 有效等位基因数(N_e), 这些参数用于评价各群体的遗传变异。遗传距离(D_{Nei})采用 Phylogeny inference package (version 3.5c) 中的 Gendist 软件在微机上计算。

2 结果

2.1 荣成群体

共检测出 27 个基因位点, 其中 10 个位点为多态位点, 表 2 列出了其 10 个多态位点的等位基因频率及 H_0 、D 值。EST - 1、2、3、5、7, HK - 1、2, IDH - 1, LDH、ME - 1、2、3, MDH - 1、2 和 SOD - 1、2、3, 共计 17 个位点为单态位点, 多态位点比例 $P_{99} = 37.00\%$, $P_{95} = 22.20\%$ (表 3)。各位点的等位基因观察数变化较大, 从 17 个单态位点的 1 至 GPI 位点的 11, 而各位点的 H_0 值差异也较大, 最小是 EST - 4 位点为 0.000, 最大为 GPI 位点为 0.739; 其次为 AK - 2 的 0.354 和 PGM - 2 的 0.262, 因而平均杂合度观察值 H_0 为 0.062 ± 0.031 , 平均杂合度预期值为 0.120 ± 0.043 (表 3); D 值分布为从 -1.000 至 0.019, 尤其在 AK - 1, EST - 4, EST - 6, PGM - 1 和 SDH 位点 D 值达到相当低的水平, 分别为 -0.667、-1.000、-0.717 和 -0.948 (表 2)。

2.2 青岛群体

表 2 列出了青岛群体检测出的 11 个多态位点的等位基因频率及其它参数。其它 16 个单态位点为: AK - 1, EST - 1、2、3、5, IDH - 1, HK - 1、2, LDH、ME - 1、2、3, MDH - 1, SOD - 1,

表2 泥蚶三个群体多态位点等位基因频率及杂合度和杂合子偏离指数

Table 2 Allelic variation at 16 polymorphic loci in three populations of *Tegillarca granosa*

位点		等位基因 Allele		位点		等位基因 Allele	
Locus	RN	QN	WN	Locus	RN	QN	WN
AK-1	N	130	132	58			
	72	0.023	0.000	0.000	112	0.008	0.030
	100	0.977	1.000	1.000	121	0.000	0.008
	H _o	0.015	0.000	0.000	H _o	0.031	0.076
	D	-0.667***	0.000	0.000	D	-0.031	0.027
	N	130	132	58	ME-1	N	130
	80	0.008	0.038	0.000	100	1.000	1.000
	87	0.046	0.106	0.086	120	0.000	0.000
	100	0.769	0.574	0.724	H _o	0.000	0.000
	106	0.115	0.083	0.000	D	0.000	0.000
AK-2	110	0.016	0.174	0.190	ME-2	N	130
	116	0.046	0.015	0.000	100	1.000	1.000
	H _o	0.354	0.485	0.552	105	0.000	0.000
	D	-0.095	-0.217**	-0.277**	112	0.000	0.000
	N	86	88	168	H _o	0.000	0.000
	91	0.000	0.091	0.101	D	0.000	0.000
	96	0.233	0.068	0.000	MDH-1	N	130
	100	0.697	0.727	0.899	100	1.000	1.000
	105	0.070	0.114	0.000	114	0.000	0.000
	H _o	0.000	0.000	0.036	166	0.000	0.000
EST-4	D	-1.000***	-1.000***	-0.802**	H _o	0.000	0.000
	N	86	88	114	D	0.000	0.000
	91	0.058	0.193	0.272	MDH-2	N	130
	97	0.303	0.239	0.158	78	0.000	0.008
	100	0.639	0.568	0.570	92	0.000	0.015
	H _o	0.140	0.114	0.333	100	1.000	0.977
	D	-0.717***	-0.804***	-0.422**	H _o	0.000	0.046
	N	86	88	114	D	0.000	0.022
	94	0.000	0.068	0.000	PGD	N	130
	100	1.000	0.932	1.000	70	0.008	0.000
EST-6	H _o	0.000	0.091	0.000	82	0.008	0.000
	D	0.000	-0.283**	0.000	100	0.968	0.985
	N	130	132	130	140	0.016	0.015
	46	0.046	0.000	0.000	H _o	0.062	0.030
	58	0.092	0.091	0.131	D	-0.016	0.024
	70	0.039	0.000	0.000	PGM-1	N	130
	84	0.008	0.121	0.000	68	0.000	0.000
	91	0.039	0.038	0.039	79	0.077	0.000
	100	0.292	0.235	0.000	84	0.015	0.000
	109	0.000	0.038	0.054	89	0.200	0.000
EST-7	119	0.015	0.000	0.031	95	0.046	0.114
	133	0.023	0.038	0.046	100	0.585	0.447
	142	0.185	0.204	0.092	105	0.077	0.439
	151	0.046	0.038	0.031	H _o	0.031	0.076
	158	0.000	0.008	0.008	D	-0.948***	-0.872***
	166	0.000	0.000	0.062	PGM-2	N	130
	175	0.215	0.129	0.408	88	0.123	0.144
	193	0.000	0.000	0.008	92	0.000	0.023
	216	0.000	0.000	0.085	100	0.853	0.803
	263	0.000	0.000	0.008	108	0.008	0.023
GPI	H _o	0.739	0.591	0.692	116	0.016	0.007
	D	-0.096	-0.311**	-0.122*	H _o	0.262	0.258
	N	86	88	70	D	0.019	-0.225**
	90	0.000	0.000	0.014	SDH	N	130
	100	1.000	1.000	0.886	45	0.000	0.008
	114	0.000	0.000	0.100	64	0.000	0.000
	H _o	0.000	0.000	0.229	78	0.008	0.000
	D	0.000	0.000	0.117*	88	0.016	0.008
	N	130	132	156	100	0.960	0.976
	85	0.008	0.000	0.013	111	0.008	0.008
IDH-2	92	0.000	0.000	0.006	136	0.008	0.000
	100	0.984	0.962	0.969	H _o	0.046	0.061
				D	-0.410**	-0.298**	
							-0.738***

N:基因取样数, H_o:位点杂合度观察值, D:杂合子缺失指数, RN:荣成群体, QN:青岛群体, WN:温州群体;根据 Hardy-Weinberg 平衡进行卡方检验: * 为显著差异(p<0.05), ** 为差异非常显著(p<0.01), *** 为差异极显著(p<0.001)。N: the number of genes sampled at each locus, H_o: the observed heterozygosity at each locus, D: the heterozygous deficiency index. RN: Rongcheng; QN: Qingdao; WN: Wenzhou.

2.3。多态位点比例 $P_{99} = 40.70\%$, $P_{95} = 25.90\%$ (表 3)。各位点的等位基因观察数最大的也是 PGI 为 10, 而各位点的 H_o 值最小的是 EST - 4 的 0.000, 最大为 GPI 位点的 0.591; 其次是 AK - 2 位点的 0.485 和 PGM - 2 位点的 0.258, 因而平均杂合度观察值 H_o 为 0.068 ± 0.026 , 预期值为 0.138 ± 0.045 (表 3); D 值变化从 -1.000 至 0.298, 在 AK - 2, EST - 4, 6, 7, GPI, PGM - 1, 2 位点, D 值分别达 -0.217, -1.000, -0.804, -0.283, -0.311, -0.872, -0.225 (表 2)。

2.3.1 温州群体

温州群体中检测出了 13 个多态位点, 其它 14 个单态位点为: AK - 1, EST - 1, 2, 3, 5, 7, HK - 1, IDH - 1, LDH, ME - 3, MDH - 1, SOD - 1, 2, 3。多态位点比例 $P_{99} = 48.15\%$, $P_{95} = 33.33\%$ (表 3)。各位点的等位基因观察数最大的也是 GPI 为 13, 而各位点的 H_o 值最小的为 0.000, 最大为 GPI 位点的 0.692; 其次是 AK - 2 位点的 0.552 和 EST - 6, PGM - 2 位点的 0.333, 因而平均杂合度观察值 H_o 为 0.097 ± 0.034 , 预期值为 0.150 ± 0.046 (表 3); D 值变化从 -1.000 至 0.277, 在 EST - 4, 6, MDH - 1, ME - 1, 2, PGM - 1 和 SDH, D 值达 -0.802, -0.422, -1.000, -0.678, -0.259, -0.940 和 -0.738 (表 2)。

表 3 泥蚶三个群体遗传变异总结

Table 3 Summary of genetic variation in 3 samples of *T. granosa*

群体 pops.	位点数 L	多态位点比例		平均杂合度 (观察值) H_o	平均杂合度 (预期值) H_e	平均位点有效 等位基因数 N_e	平均杂合子 偏离指数 D
		P_{99}	P_{95}				
RN	27	37.00	22.22	0.062 ± 0.031	0.120 ± 0.043	1.409 ± 0.275	-0.396
QN	27	40.70	25.93	0.068 ± 0.026	0.138 ± 0.045	1.301 ± 0.142	-0.303
WN	27	48.15	33.33	0.097 ± 0.034	0.150 ± 0.046	1.407 ± 0.192	-0.338

P_{99} 和 P_{95} : Percentages of polymorphic loci, L: Number of loci studied, H_e : Mean expected heterozygosity, N_e : Mean effective number of alleles.

三个群体之间的遗传相似度 (I) 和遗传距离 (D_{Nei}), 从表 4 中可见, 青岛群体与温州群体之间 I 值最小, D_{Nei} 值最大; 荣成群体与温州群体间的 I 和 D_{Nei} 值居中, 而荣成群体与青岛群体间 I 值最大, D_{Nei} 值最小。

表 4 泥蚶三个群体的遗传相似度 [对角线以上] 和遗传距离

Table 4 Genetic similarity (I) and genetic distance (D_{Nei}) among 3 populations in *T. granosa*

样品 Samples	RN	QN	WN
RN		0.9848	0.9714
QN	0.0153		0.9695
WN	0.0290	0.0310	

3 讨论

3.1 从三个泥蚶群体样品的结果来看, 在检测与毛蚶、魁蚶同样的 12 个等位基因酶条件下, 许多多态位点杂合度较低, 同时由于多态位点比例 (分别为 37.00%, 40.70% 和 48.15%) 低于毛蚶和魁蚶, 因而其平均杂合度比较低, 约比毛蚶低一倍多, 比魁蚶低近一倍。从泥蚶

三个群体来看,温州群体的平均杂合度观察值略高,其次是青岛群体,荣成群体最低。虽然它们之间差异并不大,但呈现由南向北逐步降低的趋势;平均杂合度预期值也呈同样趋势。由于北方较大的筑坝围海建虾池的规模,所造成泥蚶遗传变异的损失也比南方略大一些(表3)。

3.2 从各位点情况看, IDH-2 这一位点在魁蚶和毛蚶中都属杂合度中等偏高程度的位点,杂合度在 0.240~0.600 之间,而在泥蚶 IDH-2 位点杂合度位于 0.031~0.076 之间,属低杂合度位点。魁蚶和毛蚶在 GPI 位点属中等杂合度位点,杂合度在 0.180~0.460 之间,等位基因数为 2~3 之间;而在泥蚶这一位点具有非常高的遗传变异:等位基因数目大,该位点共有等位基因 17 个,由北向南 3 个群体分别有 11、10 和 13 个,杂合度观察值分别为 0.739、0.591 和 0.692,预期值分别为 0.818、0.858 和 0.788,为所测位点杂合度最高位点。GPI 位点另一个度量遗传变异的参数有效等位基因数 N_e 分别为 3.831、2.445 和 3.247,也明显大于其他位点。在贝类中 GPI 位点一直是比较多变异的位点之一,但具有如此多的等位基因数却比较少见;在大扇贝中 GPI 位点检测到 13 个等位基因, H_o 值达 0.776^[2];在美洲牡蛎 GPI 位点检测到了 10 个等位基因^[6]。另外,在魁蚶和毛蚶中 HK-1、2 和 LDH 位点均为多态位点,而在泥蚶中却为单态位点,这也是泥蚶的特点之一。

3.3 在温州群体 GPI 位点最常见的等位基因与另外两个群体的不同,不是 100,而是 175;从 HK-2、ME-1、ME-2 和 MDH-1 位点来看,它们在荣成和青岛群体皆为单态位点,而在温州群体为多态位点,说明荣成和青岛群体与温州群体之间存在一定差异,基因交流相对较少。从三个群体之间的遗传相似度和遗传距离来看,它们的差异属种内地理群体的差异水平,但荣成和青岛群体遗传同一性较大,而它们与温州群体的遗传分歧较明显。这与三者之间的地理距离是一致的。

3.4 杂合子缺失指数 D 值为正数表示杂合子过剩或纯合子缺失,为负数时表示杂合子缺失。和其他海洋贝类一样,泥蚶中也明显存在杂合子缺失现象,三个群体的 D 值较低,分别达 -0.396、-0.303 和 -0.376,海洋贝类中杂合子缺失达到这种程度的种类比较少。在 48 种海洋贝类中,总平均 D 值为 -0.099,其中在 *Crassostrea corteziensis*、近江牡蛎和合浦珠母贝中,杂合子缺失程度较大,D 值分别达 -0.315、-0.299 和 -0.446^[11]。在三个泥蚶群体中,主要的杂合子缺失非常明显的共同位点是 EST-4、6,PGM-1 三个位点,而其它位点情况有不同,对于 SDH 位点,在荣成和温州群体中为杂合子缺失非常明显的位点,而在青岛群体中却是杂合子明显过剩位点,AK-2、PGM-2 位点在青岛群体中杂合子缺失明显位点,而在温州群体则为杂合子过剩位点,这种情况在美洲牡蛎也存在^[6]。一般认为,杂合子缺失与以下几种原因有关:(1)群体存在自交或近交,即非随机交配,导致纯合子增加,杂合子减少;泥蚶为雌雄异体、体外受精,基本属随机交配,即使存在近交,也极为有限,因此,近交造成杂合子缺失可能性很小;(2)样品来自两个以上等位基因频率不同的群体混合群体,即 Wahlund 效应。泥蚶有 2~3 周的浮游幼虫期,有可能随着海流漂散到较远的地方产生 Wahlund 效应。但研究的三个群体间等位基因频率差异较小,不存在大的变化,同时三个相互距离较远的群体其杂合子缺失程度却基本相似,表明存在明显的 Wahlund 效应可能性较小^[14,15];(3)电泳图谱的阅读对杂合子不利。在实验中发现,某些位点等位基因酶染色很浅,而且样品间存在酶活性差异,同时某些等位基因酶在选定的电泳条件下迁移率很相近。在这些情况下,有可能把杂合子记录为纯合子;(4)自然选择对杂合子不利,一般认为某种或

某些方式的自然选择是造成杂合子缺失最可能的原因^[16]。

参 考 文 献

- [1] Aebersold, P.B. et al., 1987. Manual for Starch Gel Electrophoresis: A Method for the Detection of Genetic Variation. U.S. Department of Commerce, NTIS.
- [2] Beaumont, A.R. et al., 1984. Electrophoretic survey of genetic variation in *Pecten maximus*, *Chlamys opercularis*, *C. varia* and *C. distorta* from the Irish Sea. Mar. Biol., (81): 299 - 306.
- [3] Beaumont, A.R. et al., 1988. Genetic studies of laboratory reared *Mytilus edulis*. I. Genotype specific selection in relation to salinity. Heredity, (61): 389 - 400.
- [4] Borsig, P. et al., 1990. Karyological and allozymic characterization of *Ruditapes philippinarum*, *R. aureus* and *R. decussatus*. Aquaculture, (90): 209 - 227.
- [5] Burroker, N.E. et al., 1975. Genetic variation in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. J. Fish. Res. Bd Can. (32): 2471 - 2477.
- [6] Burroker, N.E. 1983. Population genetics of the American oyster *Crassostrea virginica* along the Atlantic coast and the Gulf of Mexico. Mar. Biol. (75): 99 - 112.
- [7] Bush, D.G., 1990. Genetic Principles and the interpretation of electrophoretic data. In: Electrophoretic and isoelectric focusing techniques in fisheries management.
- [8] Hedgecock, D. et al., 1984. Genetic diversity within and between populations of American oyster (*Crassostrea*). Malacologia, (25): 535 - 549.
- [9] Koehn, R.K., 1991. The genetics and taxonomy of species in the genus *Mytilus*. Aquaculture, (94): 125 - 145.
- [10] Leary, R.F. et al., 1990. Starch gel electrophoresis and species distinctions. In: Methods for fish biology, American Fisheries Society, U.S.A.
- [11] Li, G. et al., 1985. Biochemical genetic variation of *Pinctada fucata* Gould and *P. chrysoptera* Philippi. Acta Genetica Sinica, 12(3): 204 - 212.
- [12] Macleod, J.A. et al., 1985. A biochemical genetic study of population structure in queen scallop (*Chlamys opercularis*) stock in the Northern Irish Sea. Mar. Biol., (82): 77 - 82.
- [13] Mallet, A.L. et al., 1986. Genetics of growth in blue mussels family and enzyme heterozygosity effects. Mar. Biol., (92): 475 - 482.
- [14] Powell, J.R., 1975. Protein variation in natural populations of animal. Evolutionary Biol. (8): 79 - 119.
- [15] Singh, S.M. & R.H. Green, 1984. Excess of allozyme homozygosity in marine molluscs and its possible biological significance. Malacologia, 25(2): 569 - 581.
- [16] Zouras, E. and D.W. Foltz, 1984. Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve molluscs. Malacologia, 25(2): 583 - 591.

ALLOZYME VARIATION WITHIN POPULATIONS OF *TEGILLARCA GRANOSA*

Yu Ziniu Kong Xiaoyu Yang Rui Wang Rucai Liu Biqian

(Open Lab for Aquaculture Research of the State Educational Committee of China, Ocean University of Qingdao, 266003)

ABSTRACT Allozyme variation within three populations (Rongcheng, Qingdao and Wenzhou) of

Tegillarca granosa from Chinese coast was investigated using starch gel electrophoresis. 27 loci in 12 enzymes were detected, and the percentage of polymorphic loci per population was 37.00% ,40.70% and 48.15% respectively, mean heterozygosity observed in three population samples was 0.062 ± 0.031 , 0.068 ± 0.026 and 0.097 ± 0.034 separately, mean effective number of alleles varied between 1.301 and 1.409. Variation comparisions for several loci were made among three populations in which GPI locus showed highly variation. In addition, the genetic similarity and genetic distance among them were caculated, and it was indicated that the genetic divergence of Wenzhou sample from the other two samples was greater than that between the other two samples.

KEY WORDS *Tegillarca granose*, Allele enzyme , Genetic variation