

# 山东沿海褶牡蛎与太平洋牡蛎 等位基因酶的遗传变异

杨 锐<sup>1</sup> 喻子牛<sup>1</sup> 陈再忠<sup>1</sup> 孔晓瑜<sup>1</sup> 戴继勋<sup>1</sup>

(青岛海洋大学海洋生命学院, 266003)

(青岛海洋大学国家教委水产养殖开放实验室, 266003)<sup>1</sup>

**摘 要** 采用水平淀粉凝胶电泳技术研究了山东沿海莱州(LZ)、俚岛(LD)和青岛(QD)三地褶牡蛎自然群体以及荣成的太平洋牡蛎(TP)养殖群体的等位基因酶遗传变异。进行测试的 9 种酶中共检测到 20 个位点。LZ 与 QD 群体的多态位点比例为 60.0%, 其余两群体均为 55.0%。LZ、LD、TP 和 QD 各位点平均有效等位基因数分别为  $1.422 \pm 0.165$ 、 $1.238 \pm 0.085$ 、 $1.207 \pm 0.086$  和  $1.326 \pm 0.119$ 。平均杂合度观察值分别为  $0.216 \pm 0.050$ 、 $0.165 \pm 0.036$ 、 $0.139 \pm 0.034$  和  $0.195 \pm 0.042$ 。结果表明, LZ 和 QD 群体的遗传变异水平高于 LD 和 TP 群体。同时, 各群体中普遍存在杂合子缺失现象。太平洋牡蛎群体与其它三个褶牡蛎群体的遗传距离很小, 甚至小于莱州和青岛的两个褶牡蛎群体间的遗传距离 0.050 0, 尤其是与俚岛褶牡蛎群体遗传相似度最大, 遗传距离小于其它各群体之间的距离, 仅为 0.009 9。

**关键词** 褶牡蛎, 太平洋牡蛎, 等位基因酶, 遗传变异, 平均杂合度

## Allozyme variation within *Crassostrea plicatula* and *Crassostrea gigas* from Shandong coastal waters

Yang Rui, Yu Ziniu<sup>1</sup>, Chen Zaizhong<sup>1</sup>, Kong Xiaoyu<sup>1</sup>, Dai Jixun

(College of Marine Life Science, Ocean University of Qingdao, 266003)

(Open Laboratory for Aquaculture Research of the State Educational Committee, Ocean University of Qingdao, 266003)<sup>1</sup>

**ABSTRACT** Allozyme variation within three natural populations of *Crassostrea plicatula* from Shandong coastal waters (LZ, LD and QD) and one cultured population of *C. gigas* from Rongcheng (TP) were investigated by horizontal starch gel electrophoresis. 20 loci were detected in 9 enzymes. The percentages of polymorphic loci were 60% in LZ and QD populations and 55% in the other two. High variation was shown in LZ and QD populations. Mean heterozygosity observed in LZ, LD, TP and QD was  $0.216 \pm 0.050$ ,  $0.165 \pm 0.036$ ,  $0.139 \pm 0.034$  and  $0.195 \pm 0.042$  respectively. Mean effective number of alleles varied from  $1.207 \pm 0.086$  to  $1.422 \pm 0.165$ . More genetic variations were shown in LZ and QD populations than in LD and TP populations. Heterozygous deficiency was common in all populations. Nei distance between TP and the other three populations of *C. plicatula* were very similar to each other, but the largest one still below that of LZ and QD (0.0500). The smallest Nei distance was between LD and TP populations (0.0099). The research indicated that *C. plicatula* and *C. gigas* might belong to the same species of *C. gigas*.

**KEYWORDS** *Crassostrea plicatula*, *Crassostrea gigas*, allozyme, genetic variation, mean heterozygosity

国家自然科学基金资助项目(莱州湾及黄渤海渔业生物多样性及其保护研究), 39630260 号和国家自然科学基金资助项目(栉孔扇贝自然群体遗传变异研究), 39600113 号。

第一作者简介: 杨 锐, 女, 1972 年 8 月生, 博士生。Tel: 0532-2032105, E-mail: niyang@mail.ouqd.edu.cn

收稿日期: 1999-05-11

褶牡蛎(*Crassostrea plicatula* Gmelin)和太平洋牡蛎(*C. gigas* Thurberg)属牡蛎科(Ostridae)、巨蛎属(*Crassostrea*)是我国沿海地区重要养殖贝类,具有较高的经济价值,其中褶牡蛎被认为是广泛分布的我国本地种。由于近年来工业发展,海洋污染日益严重,牡蛎的繁殖生长受到严重影响,因此了解分析各群体的遗传结构和变异特点就成为当务之急。而且,由于地理分布不同群体也会表现出遗传变异的差别,所以也有必要对牡蛎不同地理居群是否存在可鉴别的遗传差异及其数量关系加以探讨。此外,在牡蛎分类问题上国内外学术界一直存在严重分歧。这种状况在我国巨蛎属牡蛎中尤为突出<sup>[1-5]</sup>,而且有关的争论仍在继续。我们也希望通过本研究为此提供等位基因酶水平的数据,并进行进一步讨论。本文采用水平淀粉凝胶电泳技术研究了山东沿海莱州(LZ)、俚岛(LD)和青岛(QD)三地褶牡蛎自然群体以及荣成的太平洋牡蛎(TP)养殖群体的等位基因酶,期望了解这些群体的遗传变异情况并为今后的工作提供进一步的资料。

## 1 材料与方法

褶牡蛎成体分别于1997年4~7月采自山东莱州、俚岛和青岛三地自然海区,太平洋牡蛎成体为同期采取的荣成海水养殖育苗场用亲贝。各群体样本大小为40~50个或更多。样本活体用低温桶冷藏带回实验室立即处理(或取实验组织于-80℃保存至匀浆)。取内脏团组织于0.1mol/L的pH 7.0磷酸缓冲液中匀浆(V/W=1:1)。15 000 r/min离心(4℃)15min,取上清酶液电泳。实验用淀粉凝胶浓度为12%,凝胶厚度为1.2cm(TC 7.0缓冲系统)和0.6cm(EBT 8.7缓冲系统)。电泳过程分别于恒流1.28mA/cm和0.64mA/cm(4℃)进行,电泳12h。电泳后将凝胶割成0.15cm厚的胶片进行染色并记录酶谱<sup>[6]</sup>。所分析的9种酶见表1。

表1 所分析酶与电泳条件一览表

Tab. 1 Enzyme assayed, buffer systems, number of loci

| 酶                | 酶编号      | 亚基结构 | 缓冲系统    | 记录位点数 |
|------------------|----------|------|---------|-------|
| 磷酸葡糖异构酶(GPI)     | 5.3.1.9  | 二聚体  | TC 7.0  | 2     |
| 葡糖 6 磷酸脱氢酶(G6PD) | 1.1.1.49 | 二聚体  | TC 7.0  | 2     |
| 异柠檬酸脱氢酶(IDH)     | 1.1.1.42 | 二聚体  | TC 7.0  | 2     |
| 亮氨酸氨肽酶(LAP)      | 3.4.11.1 | 单体酶  | TC 7.0  | 2     |
| 苹果酸酶(ME)         | 1.1.1.40 | 四聚体  | TC 7.0  | 3     |
| 苹果酸脱氢酶(MDH)      | 1.1.1.37 | 二聚体  | TC 7.0  | 3     |
| 磷酸葡糖脱氢酶(PGD)     | 1.1.1.44 | 二聚体  | TC 7.0  | 2     |
| 磷酸葡糖变位酶(PGM)     | 2.7.5.1  | 单体酶  | TC 7.0  | 2     |
| 超氧化物歧化酶(SOD)     | 1.15.1.1 | 二聚体  | EBT 8.7 | 2     |

等位基因酶命名以各位点出现频率最高者为100,其它等位基因以与等位基因100的相对迁移率百分比命名。基因位点以其编码等位基因酶的缩写字母表示,若该酶由一个以上位点编码时则各位点按其从阴极向阳极迁移的顺序命名为1,2,...<sup>[7]</sup>。电泳原始数据用来计算等位基因频率、多态位点比例、多态位点杂合度、Hardy-Weinberg平衡下的杂合度期望值、杂合子缺失指数和有效等位基因数,并进一步计算各群体间的遗传相似性系数和遗传距离。

## 2 结果

四个群体9种酶中共检测到20个位点。以最普遍等位基因频率 $\leq 95\%$ 为标准,LZ群体的GPI-1、G6PD-1、G6PD-2、IDH-1、IDH-2、LAP-1、ME-1、ME-2、MDH-1、PGD-1、PGD-2和PGM-1位点及QD群体的GPI-1、G6PD-1、G6PD-2、IDH-2、LAP-1、ME-1、ME-2、MDH-1、PGD-1、PGD-2和PGM-1、PGM-2等各12个位点;LD群体的GPI-1、G6PD-1、G6PD-2、IDH-2、LAP-2、ME-2、ME-3、MDH-1、PGD-1、PGD-2和PGM-2位点及TP群体的GPI-1、G6PD-2、IDH-2、

LAP- 1、ME- 2、ME- 3、MDH- 1、PGD- 1、PGD- 2 和 PGM- 1、PGM- 2 等各 11 个位点是多态位点。

表 2 总结了各群体的遗传变异指数。其中 TP 群体平均杂合度最低, 为  $0.139 \pm 0.034$ , 其余三个群体平均杂合度分别为: LD 群体  $0.165 \pm 0.036$ 、QD 群体  $0.195 \pm 0.042$  以及 LZ 群体  $0.216 \pm 0.050$ 。对等位基因频率进行  $\chi^2$ - 检验, LD 群体 55%、TP 群体 45%、QD 群体 40% 以及 LZ 群体 35% 的位点极显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡。杂合子缺失现象在四个群体中普遍存在, 平均杂合子偏离指数在 LD 和 TP 群体较高, 为  $-0.507 \pm 0.125$  和  $-0.489 \pm 0.115$ 。该值在 QD 和 LZ 群体分别为  $-0.312 \pm 0.131$  和  $-0.357 \pm 0.122$ 。杂合子在各位点的分布不均匀, 杂合度从单态位点的 0.000 到 LZ 群体的 PGM- 2 位点的 0.633。在 LZ 群体的 PGM- 1、IDH- 1 和 ME- 1; LD 群体的 ME- 2、ME- 3 和 PGD- 2; TP 群体的 ME- 2、ME- 3 和 MDH- 2; QD 群体的 ME- 1、ME- 2 位点杂合子普遍缺失。在 LZ 群体的 IDH- 2、MDH- 1、PGM- 2; LD 群体的 MDH- 1、PGM- 1; TP 群体的 GPI- 1、ME- 1、MDH- 1 以及 QD 群体的 GPI- 1、G6PD- 1、IDH- 2 和 PGM- 2 位点杂合子过剩。平均有效等位基因数 LZ 群体最高为  $1.422 \pm 0.165$ , TP 最低为  $1.207 \pm 0.086$ 。综合而言, LZ 和 QD 群体的遗传多样性程度较高, TP 和 LD 群体遗传多样性程度较低。

表 2 四个群体遗传变异总结

Tab. 2 Summary of genetic variation in four populations

| 群体 | 多态位点比例 | 平均杂合度观测值          | 平均杂合度期望值          | 平均有效等位基因数         | 平均杂合子偏离指数          |
|----|--------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| LZ | 0.60   | $0.216 \pm 0.050$ | $0.293 \pm 0.036$ | $1.422 \pm 0.165$ | $-0.357 \pm 0.122$ |
| LD | 0.55   | $0.165 \pm 0.036$ | $0.300 \pm 0.041$ | $1.238 \pm 0.085$ | $-0.507 \pm 0.125$ |
| TP | 0.55   | $0.139 \pm 0.034$ | $0.259 \pm 0.043$ | $1.207 \pm 0.086$ | $-0.489 \pm 0.115$ |
| QD | 0.60   | $0.195 \pm 0.042$ | $0.305 \pm 0.043$ | $1.326 \pm 0.119$ | $-0.312 \pm 0.131$ |

自表 3 列出的四个群体的遗传相似系数与遗传距离来看, 四个群体遗传距离相差不大。太平洋牡蛎群体与其它三个褶牡蛎群体的遗传距离很近, 而与其 LD 褶牡蛎的群体遗传相似系数最大、遗传距离最近, 仅为 0.009 9, 与 LZ 和 QD 的遗传距离为 0.046 9 和 0.016 6。莱州和青岛两地的褶牡蛎群体是四个群体中遗传相似系数最小、遗传距离最远的, 为 0.050 0。LD 与 LZ、QD 的遗传距离为 0.045 0 和 0.016 9。就此而言 LZ 褶牡蛎群体与其它三个群体的遗传距离都比较远。

表 3 四个群体遗传相似度 ( $I^*$ ) 和遗传距离

Tab. 3 Genetic similarity ( $I^*$ ) and genetic distance (Dnei)

|     | LZ (1)  | LD (2)  | TP (3)  | QD (4)  |
|-----|---------|---------|---------|---------|
| (1) | -       | 0.955 9 | 0.952 9 | 0.951 2 |
| (2) | 0.045 0 | -       | 0.990 1 | 0.983 3 |
| (3) | 0.046 9 | 0.009 9 | -       | 0.983 6 |
| (4) | 0.050 0 | 0.016 9 | 0.016 6 | -       |

注:  $I^*$  为- 上方数据。

### 3 讨论

从四个群体的平均有效等位基因数来看, 该值在  $1.207 \pm 0.086$  到  $1.422 \pm 0.165$  之间。其中 GPI- 1、IDH- 2、PGD- 1、PGM- 1、PGM- 2 位点实际观察的等位基因数多达 6 个, G6PD- 2 和 LAP- 1 位点等位基因数也有 5 个, 为多变异位点。由此可以认为牡蛎的遗传变异水平较高。尽管各群体的平均杂合度期望值接近, 且在三个褶牡蛎群体中呈现从北向南递增的趋势, 但是杂合度的观察值并未体现这一趋势。平均杂合度观察值在 LZ 和 QD 群体较高, 达  $0.216 \pm 0.050$  和  $0.195 \pm 0.042$ ; 在 LD 群体也达  $0.165 \pm 0.036$ , 表现出较丰富的遗传多态性, 与 Beaumont<sup>[8]</sup> 所作的双壳贝类具有较高遗传多态性的报道相一致。并且高于张国范等<sup>[9]</sup> 曾经统计的 48 种海洋贝类的平均杂合度范围:  $0.147 \pm 0.059$ 。TP 群体平均杂合度期望值和观察值均最低, 这可能是由于养殖和育苗过程中存在一定程度的近交造成的<sup>[10]</sup>。

在多数贝类中普遍存在杂合子缺失现象, 即约有 90% 的种类或群体的杂合度负向偏离期望值

Hardy-Weinberg 平衡( $D < 0$ )<sup>[11-15]</sup>。本研究的结果表明各群体约有 40% 的位点极显著偏离该平衡, 也符合这一规律。四个群体的平均杂合度偏离指数高于 14 种牡蛎的平均杂合度偏离指数 - 0.009 ~ - 0.315<sup>[9]</sup>。而且这种偏离在太平洋牡蛎群体和俚岛褶牡蛎群体表现尤为明显。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。

统计数据表明, 四个群体的遗传距离随地理位置远近表现出一定的正相关关系: 地理距离越近则遗传距离越小, 遗传相似程度越高。莱州褶牡蛎群体较其它三个群体的遗传距离远, 表明莱州湾独特的地理环境造成了莱州褶牡蛎与其它海域群体间的基因流动较少。同时各群体之间的遗传距离最大不超过 0.050 0, 而太平洋牡蛎群体与其它三个褶牡蛎群体的遗传距离很近, 甚至小于莱州与青岛两个褶牡蛎群体的遗传距离, 尤其与俚岛褶牡蛎群体之间遗传距离最近, 仅 0.009 9, 遗传相似系数高达 0.990 1。这些结果表明太平洋牡蛎与褶牡蛎之间属于同种之间不同群体的差异<sup>[16-17]</sup>。形态分类学家从外部表型特征出发认为我国北方水域分布有僧帽牡蛎、近江牡蛎、大连湾牡蛎和密鳞牡蛎等, 后来又将僧帽牡蛎更名为褶牡蛎。李孝绪对十四种牡蛎的 6 个系统进行比较解剖研究后指出, 所谓僧帽牡蛎、褶牡蛎、大连湾牡蛎和长牡蛎与引进种太平洋牡蛎是同一种, 即 *C. gigas*<sup>[1]</sup>。本研究的四个群体虽然在形态上存在一定差异, 但是在等位基因酶水平上并未出现太大差异。因此我们的结果更倾向于支持李孝绪的结论, 即太平洋牡蛎与褶牡蛎是同一种。

## 参 考 文 献

- 1 李孝绪. 中国牡蛎的比较解剖学及系统分类和演化的研究. 海洋科学集刊, 1995, 35: 143~ 178
- 2 刘必谦, 戴继勋, 喻子牛. 巨蜆属牡蛎遗传多样性研究. 水产学报, 1998, 23(3): 193~ 197
- 3 齐钟彦, 马绣同, 王祯瑞等. 黄渤海的软体动物. 北京: 农业出版社. 1989, 176~ 179
- 4 王如才, 王昭萍, 张建中等. 海水贝类养殖学. 青岛: 青岛海洋大学出版社. 1993, 72~ 118
- 5 张 玺. 中国牡蛎的研究. 动物学报, 1956, 8(1): 65~ 94
- 6 Aebersold P B, Winans G A, Teel D J, et al. Manual for starch gel electrophoresis: a manual for the detection of genetic variation. NOAA Techn Rep NMFS 61, 1987, 2~ 18
- 7 Leary R F, Booke H E. Starch gel electrophoresis and species distinctions. In: Schreck C B, ed. Methods for Fish Biology. Am Fish Soc, 1990, 141~ 169
- 8 Beaumont A R. Allozyme data and scallop stock identification. J Con Int Explor Mer, 1991, 47: 333~ 338
- 9 张国范, 张福绥. 海洋贝类遗传多样性及其永续性利用. 海洋科学, 1993, (5): 17~ 21
- 10 Zouros E, Singh S M, Miles H E. Growth rate in oysters: an overdominant phenotype and its possible explanations. Evolution, 1980, 34: 856~ 867
- 11 Beaumont A R. The application and relevance of genetics in aquaculture. In: Beaumont A R, ed. Genetics and evolution of aquatic organisms. Chapman and Hall, London. 1994, 467~ 486
- 12 Beaumont A R. Genetic studies of laboratory reared *Mytilus edulis* III. Scored loci act as markers for genotype-specific mortalities which are unrelated to temperature. Mar Biol, 1990, 106: 227~ 233
- 13 Beaumont A R, Pether S M J. Allozyme variation and gene flow between cockle *Cerastoderma edule* populations in Southern United Kingdom. Fish Res, 1996, 28: 263~ 275
- 14 Gaffney P M, Scott T M. Genetic heterozygosity and production traits in natural and hatchery populations of bivalves. Aquac, 1984, 42: 289~ 302
- 15 Zouros E, Foltz D W. Possible explanation of heterozygosity deficiency in bivalve molluscs. Malacologia, 1984, 25: 583~ 591
- 16 Buroker N E, Hershberger W K, Chew K K. Population genetics of the family *Ostridae* I. Intraspecific studies on *Crassostrea gigas* and *Saxostrea commercialis*. Mar Biol, 1979, 54: 157~ 169
- 17 Buroker N E, Hershberger W K, Chew K K. Population genetics of the family *Ostreidae* II. Intraspecific studies of the genera *Crassostrea* and *Saxostrea*. Mar Biol, 1979, 57: 171~ 184.