

贝类遗传多样性及其永续利用(I)

张国范 张福绥

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

生物多样性关系到资源的开发和管理及环境的保护,是当前国际间十分热门的研究课题。生物多样性包括三个层次:生态系统多样性,物种多样性和遗传多样性^[7]。一个物种的消失,首先就是遗传多样性的降低,一个物种或群体的繁盛则常伴以遗传多样性的增加和稳定,而一个物种的兴衰又常决定整个群落生态系统的演替行为。因此,研究生物遗传多样性无论对于保护还是开发并永续利用与未来农业、医学和工业发展密切相关的生命资源都是十分重要的。

如果以一种贝类就是一个独立的基因库来说,其遗传多样性是十分丰富的。而实际上种类的多样性还远不足以反映出遗传多样性的全貌。因为遗传多样性的表现是多层次多水平的。就群体这个层次来源,又分为亚种和地理群体。在这些亚种和地理群体间各具不同遗传类型,存在丰富的遗传多样性。在个体这个层次上可分为外部形态、染色体和分子水平的遗传多样性。贝类的壳色^[42]和刻纹^[66]的多样性是众所周知的。染色体水平的多态性也很普遍。如在 *Thaislapillus* 有两个宗系,染色体数目分别为 $n=13$, $n=18$ 。前者的单倍体核型的端着丝点染色体为 8 条,中部着丝点为 5 条,而后者 18 条染色体全部为端着丝点型^[64]除核型外,带型及 Ag-NORs 的多样性更为普遍^[19]。由于电泳和 DNA 序列分析技术应用于遗传多样性的研究,在分子水平上揭示出贝类遗传多样性是十分丰富的,大大超过人们原先的预料。在分子水平又可分为蛋白质(酶)及 DNA 遗传多样性。目前的资料大多是蛋白质水平的研究结果,DNA 水平的研究还刚刚起步。

由此可见,贝类遗传多样性是指种间或种内在个体、细胞和分子水平上的遗传变异度。建立遗传多样性评价标准是必要的。现行用于评价遗传多样性的有关参数是借用群体遗传学中有关遗传变异的参数^[7],即多态位点比例(P)和平均杂合度(H)。某一位点是否是多态的,判定常带有人们主观武断的色彩。在不同的判据水平可得出不同的结论。而杂合度相对较客观^[8,11],故可

作为评价遗传多样性的主要指标。

海洋贝类在海洋产业中占有重要地位,特别是近 20 a 经济贝类的增养殖已成为海洋可再生资源产业中的支柱性产业。海洋生物多样性与陆地等生物多样性一样,也都存在保护和永续利用的问题。海洋是个开放连续的系统,环境相对较稳定,其间蕴藏着丰富的生物多样性,而尤以物种和遗传多样性为甚。但由于人类的无节制活动,使海洋生物多样性受到威胁。某些海洋哺乳类数量锐减已近濒危边缘;海洋经济鱼类小型化;某些经济贝类生物量骤降,历史上的贝类渔场,现已无贝可采。养殖群体性状单一化,也必然会反过来影响自然群体遗传多样化。虽然海洋生物的生活空间与人类相分离,且海洋环境波动性小,使其多样性破坏程度稍差于陆地生物多样性。但谁也不能否认现在海洋生物多样性已经受到很大的侵害,谁也不能保证其不会受到进一步破坏,也不能把握其受害程度及长期影响。因此,研究海洋生物多样性即可为自然生命资源的保护提供依据,也可为其进一步开发和永续利用奠定基础。

结合作者的研究工作,本文仅就海洋贝类分子遗传多样性研究的现状,永续利用的途径和全息保存的方法进行初步的探讨。

1 自然群体分子遗传多样性

在本世纪上半叶,遗传多样性的普遍性就已渐为人们所认识。其根据主要来自外部形态,人工选择和近交实验。但由于既无法获得非变异位点比例,也不能测定可变异基因的变异水平。因此,也就不能对生物遗传多样性进行定量研究。

到 60 年代,由于电泳技术的发展,使定量研究基因变异成为可能,而不管这些基因是否是可变异的。电泳分析表明,生物体内具有相同生理功能的酶,其分子形式也有不同。结合遗传分析证明这些酶是由等位基因编码的,故称等位基因酶,它是等位基因的标记。等位基因酶大多是由单位点编码的,故电泳表型就可用于判读基因型。由此,我们就可获得基因型频率及其它有关遗传

变异参数,如多态位点比例和平均杂合度等,即可对遗传多样性进行定量分析。尽管这是个偏低估计值^[9]。

表 1 贝类自然群体遗传多样性及 Hardy-Weinberg 平衡偏离指数

种类	NL	P	Ho	D	作者
<i>Anadara broughtonii</i>	30	0.500(0.95)	0.164	-0.041	Fujio et al., 1983
<i>Argopecten irradians</i>	15	0.333(0.95)	0.116	/	Wall et al., 1976
<i>Cheamys distorta</i>	8	0.727(0.99)	0.321	-0.171	Beaumont et al., 1984
<i>C. nipponensis akazara</i>	23	0.217(0.95)	0.061	-0.062	Fujio et al., 1983
<i>C. opercularis</i>	10	0.591(0.95)	0.155	-0.084	Beaumont et al., 1984
<i>C. varia</i>	11	0.723(0.95)	0.284	-0.052	Beaumont et al., 1984
<i>Clinocardium buellowi</i>	33	0.515(0.95)	0.170	-0.061	Fujio et al., 1983
<i>Corbicula japonica</i>	31	0.484(0.95)	0.146	-0.161	Fujio et al., 1983
<i>Crassostrea angulata</i>	25	0.600(0.99)	0.234	-0.017	Buroker et al., 1979
<i>C. belcheri</i>	25	0.200(0.99)	0.062	-0.088	Buroker et al., 1979
<i>C. commercialis</i>	20	0.250(0.95)	0.100	+0.087	Buroker et al., 1979
<i>C. corteziensis</i>	17	0.628(0.95)	0.137	-0.315	Hedgecock et al., 1979
<i>C. gigas</i>	27	0.602(0.99)	0.205	-0.055	Buroker et al., 1979
<i>C. gigas</i>	30	0.500(0.95)	0.186	-0.093	Fujio et al., 1983
<i>C. gigas</i>	14	0.643(0.95)	0.262	-0.007	Hedgecock et al., 1990
<i>C. iredalei</i>	28	0.393(0.99)	0.100	-0.048	Buroker et al., 1979
<i>C. nippona</i>	40	0.425(0.95)	0.098	-0.101	Fujio et al., 1983
<i>C. rhizophorae</i>	30	0.300(0.99)	0.100	-0.091	Buroker et al., 1979
<i>C. rhizophorae</i>	18	0.571(0.95)	0.162	-0.134	Hedgecock et al., 1984
<i>C. rivularis</i>	32	0.375(0.99)	0.098	-0.117	Buroker et al., 1979
<i>C. rivularis</i>	21	0.238(0.95)	0.089	-0.299	Fujio et al., 1983
<i>C. sp.</i>	20	0.569(0.99)	0.116	-0.036	LiGang et al., 1988
<i>C. virginica</i>	34	0.471(0.99)	0.166	-0.184	Buroker et al., 1979
<i>C. virginica</i>	19	0.501(0.95)	0.207	-0.096	Hedgecock et al., 1984
<i>Mytilus coruscus</i>	28	0.536(0.95)	0.122	-0.153	Fujio et al., 1983
<i>M. edulis</i>	23	0.478(0.95)	0.139	-0.265	Fujio et al., 1983
<i>Ostrea circumpecta</i>	21	0.143(0.95)	0.059	-0.092	Fujio et al., 1983
<i>O. denselamellosa</i>	24	0.333(0.95)	0.078	-0.082	Fujio et al., 1983
<i>O. edulis</i>	31	0.226(0.95)	0.084	+0.037	Fujio et al., 1983
<i>O. lurida</i>	21	0.190(0.95)	0.063	+0.050	Fujio et al., 1983
<i>Patiopecten yessoensis</i>	22	0.455(0.95)	0.160	-0.121	Fujio et al., 1983
<i>Pecten maximus</i>	9	0.722(0.99)	0.215	-0.073	Beaumont et al., 1984
<i>P. nonaenzelandiae</i>	27	0.296(0.95)	0.077	-0.135	Fujio et al., 1983
<i>Perna canaliculus</i>	31	0.613(0.95)	0.172	-0.173	Fujio et al., 1983
<i>Peronidia venulosa</i>	32	0.625(0.95)	0.173	-0.210	Fujio et al., 1983
<i>Pinctada chemnitzii</i>	13	0.692(0.99)	0.157	-0.196	李刚等, 1985
<i>P. fucata</i>	8	0.750(0.99)	0.113	-0.446	李刚等, 1985
<i>P. mazatlanica</i>	28	0.607(0.99)	0.153	+0.021	李刚等, 1991
<i>P. mazatlanica</i>	23	0.435(0.99)	0.124	-0.006	李刚等, 1991
<i>Placopecten magellanicus</i>	6	0.464(0.99)	0.139	-0.115	Foltz et al., 1984
<i>Saccostrea commercialis</i>	28	0.464(0.99)	0.180	-0.053	Buroker et al., 1979
<i>S. glomerata</i>	27	0.519(0.99)	0.182	-0.057	Buroker et al., 1979
<i>Septifer virgatus</i>	21	0.524(0.95)	0.162	-0.120	Fujio et al., 1983
<i>Spisula sachalinensis</i>	29	0.414(0.95)	0.160	-0.101	Fujio et al., 1983
<i>S. voyi</i>	37	0.486(0.95)	0.143	-0.106	Fujio et al., 1983
<i>Tapes japonica</i>	31	0.548(0.95)	0.152	-0.151	Fujio et al., 1983
<i>Tiostrea lutaria</i>	24	0.667(0.95)	0.216	-0.136	Fujio et al., 1983

表(1)续

种类	NL	P	Ho	D	作者
<i>Tridacna mazima</i>	31	0.633(0.95)	0.202	-0.082	Ayala et al., 1973
<i>T. mazima</i>	28	0.638(0.95)	0.232	+0.045	Campbell et al., 1975
<i>Buccinum sp.</i>	29	0.360(0.98)	0.092	-0.012	Costa et al., 1978
<i>Haliotis discus hannai</i>	30	0.333(0.95)	0.123	-0.121	Fujio et al., 1983
<i>H. rubra</i>	15	0.613(0.99)	0.136	-0.049	Brown, 1991
<i>Littorina arcana</i>	21	0.370(0.98)	0.130	/	Ward et al., 1980
<i>L. rudis</i>	21	0.380(0.98)	0.150	/	Wsrud et al., 1980
<i>Neptunea arthritica</i>	20	0.300(0.95)	0.119	-0.153	Fujio et al., 1983
<i>Thais haemostoma</i>	15	0.203(0.95)	0.076	-0.116	Liu et al., 1991
总计	1315				
平均		0.471	0.147	-0.099	
		±0.159	±0.059		

注: NL:位点数; P:多态位点比例; Ho:杂合度; D:Hardy-Weinberg 平衡偏离指数。

许多贝类,特别是海洋贝类遗传多样性,即遗传变异都已进行过研究。在这些研究中有有的仅就单一群体进行了分析,而有的进行了各地理群体间的比较研究。与此相似,有些研究仅取几种酶或几个位点,而有的则研究了数种酶及多态位点。有些研究还把遗传变异同生长、能量代谢及苗种繁育相结合,使研究向更深层次,更广阔的应用领域发展。这些研究大多取向多态位点。到目前为止,已进行遗传变异研究的种类已近百种^[19,29,34,43],等位基因酶逾 20 种,位点数逾 2 000 多。本文仅列出其中的一部分(表 1),而且其中主要为海洋贝类的研究结果。

我国这方面的研究开展得较迟。1985 年发表了广西沿海珠母贝两个种自然群体和养殖群体的遗传变异^[5],使对中国贝类遗传多样性有个起码的认识。尔后又开展了中国南方海区牡蛎的遗传变异及有关的群体遗传学研究,并为澄清广东福建沿海牡蛎的分类问题提供了重要的依据。我国学者还与国外学者合作研究巴拿马珠母贝两个群体的遗传变异。目前,中国科学院海洋研究所贝类生态实验室正在进行栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)原种遗传多样性及引种后海湾扇贝养殖群体的遗传多样性研究,并已取得重要进展。

从表 1 可以看出,大多数所研究的种类在自然界基因位点的 1/3~1/2 都存在两个或更多的等位基因,杂合度水平大多在 0.1~0.2 之间,平均杂合度为无脊椎动物偏高估计值^[12]。

较高水平的遗传变异度是群体适应调节能力和稳定的遗传学基础。然而,如何评价一个群体或一个种的遗传变异水平呢?Hardy-Weinberg 平衡定律可为此提供一个如同力学中牛顿第一定律一样科学认识问题的遗传学起点。该定律认为在随机交配的群体中,遗传过程本身并不改变某一位点上等位基因频率或基因型频率。

海洋科学,1993 年 9 月,第 5 期

此外,只要等位基因频率在两性中相等,随机交配的一个世代就能在任何一位点达到平衡的基因型频率。然而,用该平衡定律检验电泳分析的结果发现,大多数贝类的自然群体在许多位点都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于 Hardy-Weinberg 期望值($D < 0$)。平均偏离 -0.099。这是因为 Hardy-Weinberg 平衡的基础是在无扰动过程的情况下,基因频率保持不变。而事实证明,遗传过程既受到参与遗传过程亲代的基因型及其频率、遗传学机制的制约,也受到外部环境的影响。因而偏离 Hardy-Weinberg 平衡期望值就不足为奇了。然而,为什么大多数所检测的种类或群体都出现杂合子缺失呢?其主要原因有以下 4 点。(1)群体存在自体受精或近交。当交配不是随机的時候,选型交配就占优势。如果相似基因型间交配的几率大于随机性得到的预期值,就可能出现纯合子过剩。(2)自然选择。对基因型的选择是通过依赖基因型的生活力和生殖力的适度来实现的。在有些情况下选择也不利于杂合子。(3)Wahlund 效应。如果群体内有相当比例的个体是相邻群体的入侵者。在这些相邻群体又分别带有一组频率不同的等位基因,这就会使在群体或某一位点造成杂合子缺失。(4)电泳图谱的判别对杂合子不利,把杂合子误判为纯合子。但沉寂基因可能不是个重要原因,因为沉寂基因对杂合和纯合子没有偏好选择。

在影响平衡偏离的各种因素中,选择可能是最主要的。Singh^[52]用平衡选择理论解释贝类早期浮游幼体的杂合子缺失现象。浮游期幼体杂合子适度反转,是因为生长快的杂合子饵料压力较大,造成杂合子的差异死亡,使附着变态后稚贝群体出现杂合子缺失。而杂合子适度的相对优势只是在附着以后才能表现出来。一项杂交试验也证实了这一假说。在同龄个体中生长快的组成一个杂交组合,生长慢的构成另一个杂交组合。两组幼

体同时饲养在同一容器内,不投饵或少投饵。结果发现只有生长慢的组合幼体可以附着变态并长成稚贝。

根据美洲牡蛎杂合子个体较大,比纯合子产生更多的配子及附着变态后的低死亡率,Zouros 等^[60]提出了解释杂合子缺失的几个选择模型。(1)生活力从浮游阶段到附着后逐渐降低模型。在此模型下,杂合子缺失可在附着后到成熟选择之前检测到,如果在幼体阶段选择所淘汰的等位基因在选择效应上对选择有利的等位基因呈显性,这种缺失就会发生。(2)差异幼体生活力和成体繁殖力模型。该模型与前一个模型的重要差别就是,由于新附着的个体与成体的基因型频率相同,故幼体生活力导致的杂合子缺失,在成体依然存在。(3)依赖于遗传类型的产卵时间模型。当纯合子的产卵时间离散性比杂合子大时,由于平衡值依赖于等位基因的频率及杂合子和纯合子产卵时间的重叠系数,故在群体中就会出现杂合子缺失。杂合子缺失的数量关系与两种基因型间产卵的时间重叠量成反比。早期幼体生活力选择模型已得到实验证实,但其余几个模型还没有充分的实验证据,故现尚难定论。

Beaumont 等^[16]为选择是影响 Hardy-Weinberg 平衡的主要原因提供了一个非常有利的证据。在不存在选型交配的混配(Mass mating)繁殖结构中,Lap Pgm Odh Hex P_{gk} 和 Gpi 位点都出现明显偏离,但唯 Lap 的偏离与盐度有关。一直生活在低盐条件下(25)的稚贝,带有 Lap⁹⁴ 等位基因的三个基因型 Lap^{94/94}, Lap^{96/94}, Lap^{98/94} 都出现显著的杂合子过剩。在单配(Single mating)繁殖结构中也有过这种有利于 Lap⁹⁴ 等位基因的倾向。然而,如果开始饲养在高盐度(32)条件下,后来转到低盐海水中,在两种繁殖结构中 Lap⁹⁴ 频率从稚贝到幼贝都有降低。在单配结构中降低 0.087(从 0.312 到 0.225)。在混配结构中降低 0.017 个(从 0.125 到 0.108)。由此可以看出,低盐环境对后期幼体和幼贝 Lap⁹⁴ 等位基因有选择作用,即淘汰 Lap⁹⁴ 等位基因。虽然这种降低并没有达以显著性水平,但也足以证明盐度对基因型的选择效应及对遗传平衡的影响。这一结果与 Hilbish 等^[41]的研究结果是吻合的。然而这种选择与温度无关^[16]。

虽然实验室的选择对 Hardy-Weinberg 平衡具有显然的影响,但实验室的选择与野外选择可能不一样。在野外,Lap 位点一般杂合子都缺失,但在实验室内的结果则相反,为杂合子过剩。室内的选择常与饵料有关,而野外是否与饵料有关尚未知。但总还是与生活力和生殖力的适度有关^[12]。

除选择外,从海洋贝类的幼体生物学来看,Wahland 效应也是一个不容忽视的原因。双壳类幼体池游期可达

4~5 个星期,如无合适附着基质,还可延迟数天附着变态^[4,18],而且某些贝类,如贻贝(*Mytilus edulis*)还有二次性附着的习性^[2]。随海流幼体可能被送至数百公里之外^[5]。在此过程中如遇合适附着基可随时完成附着变态过程^[13],这样就会间或给某一群体带来一组不同的等位基因,使该群体或其某位点杂合子缺失。

近交在海洋贝类,特别是腹足类是个比较普遍的现象^[21,31,34],这也是造成自然群体杂合子缺失的重要原因。皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)和盘鲍(*H. discus*)在自然群体都存在广泛的近交。造成皱纹盘鲍 87%,EstF 位点为纯合子的主要原因就是近交^[31]。由此,是否可以认为鲍生长慢可能直接或间接与近交有关。此外,鲍生活的海区条件要求严格、人工养殖难度大也间接说明近交的可能影响。

从以上讨论可以看出,不同种及群体在生活史的不同阶段、不同时间及不同环境背景,其平衡偏离的原因不同,没有一个通用的解释模型。有时是一种机制在起作用,有时是几种机制共同起作用,有的是直接的,有的是间接的作用。因此,对自然条件下平衡偏离的任何遗传学解释都必须有可靠的实验证据。

杂合子缺失会使某些等位基因从基因库中消失^[9],即遗传多样性降低。这可能是海洋贝类对第四纪以来比较稳定环境的一种适应。但是由于遗传同质性的增加,使种类对环境适应能力降低,一旦环境发生变化,哪怕是轻微的变化,也可能给某些贝类带来灾难性的后果。此外,从贝类人工养殖来说,也会增加工艺难度。

蛋白质(酶)是基因的最终稳定产物。然而近 20 a 来的研究表明,大约只有 10%的真核生物核 DNA 编码蛋白质。由于大约有 24%同义密码子^[8]的存在及在转录和转译水平调节基因的作用,电泳所能揭示的遗传变异只是全部基因变异的一小部分。近年来,随着分子生物学,特别是 DAN 重组技术的发展,人们更加重视基因本身,即 DNA 分子水平上的多态性研究。然而,对 DNA 的序列分析是十分费时的工作,故现只进行了少数几个基因和基因簇的克隆和序列分析。现在通常研究限制性内切酶酶切 DNA 片段多态性(RFLP)。由于线粒体 DNA(mtDNA)分子量较小(16kb),而且大多数 mtDNA 的变化呈中性^[27],分离和纯化较易,以及母系遗传等,故贝类 mtDNA 的 RFLP 分析在遗传多样性研究方面的应用越来越受到人们的重视。Edwards 等^[27]分析了两种贻贝(*M. edulis* 和 *M. galloprovincialis*)mtDNA 的 RFLP,结果发现,这两个种间存在许多很不相同的 mtDNA 基因型。在各群体中都有两到三个较高频率的基因型及出现 1~2 次的稀有基因型。*M. galloprovincialis* 两群体的基因型频率

相近,但与 *M. edulis* 明显不同。另一项对美洲牡蛎 mtDNA RFLP 的研究发现^[21],在自然群体单型体间平均核苷酸差异为 0.018。近交牡蛎的 mtDNA 单型体与野祖型有明显的差异,平均 mtDNA 核苷酸序列差异 $\delta = 0.218$ 。

mtDNA 的 RFLP 作为遗传多样性的指标及遗传育

种的遗传标记,即快速,可选择性大,且不受环境变化及基因表达调控的影响。虽然这方面的研究还刚刚起步,但其所揭示的基因多样性的潜力是不容低估的。

(未完待续)