

菲律宾蛤仔不同地理群体生化遗传结构与变异的研究

李旭光^{1,3}, 许广平², 阎斌伦³, 杨家新⁴, 赵艳景³, 徐建荣¹, 许 璞¹

(1. 常熟理工学院 生物与食品工程系, 江苏 常熟 215000; 2. 江苏省海洋水产研究所, 江苏 南通 226007; 3. 淮海工学院 江苏省海洋生物技术重点建设实验室, 江苏 连云港 222005; 4. 南京师范大学 生命科学学院, 江苏 南京 210097)

摘要:采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术对福建平潭岛、浙江象山港、江苏海州湾和辽宁辽东湾 4 个海区菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)野生群体的生化遗传特征进行了分析。结果表明, 菲律宾蛤仔 4 个群体的多态位点比例为 62.5%~75.0%, 平均杂合度观测值在 0.274 3~0.338 7 之间, 与平均杂合度期望值相近; 平均有效等位基因数在 1.489 1~1.632 5 之间, 遗传变异水平较高; 杂合子缺失不显著。比较群体间的遗传分化指数和群体每代迁移数发现, 平潭岛、象山港和海州湾 3 个群体间的遗传分化不显著, 而辽东湾群体与 3 个群体间出现遗传差异。聚类分析同样表明, 平潭岛群体首先与象山港群体聚类, 再与海州湾群体相聚, 最后与辽东湾群体相汇。讨论了杂合子缺失不显著原因和群体间遗传分化机制。

关键词: 菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*); 同工酶; 遗传分化

中图分类号: Q789

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2009)04-0061-05

同工酶作为一种生化遗传标记, 自 20 世纪 70 年代初即被应用于海洋贝类的遗传变异研究。至今, 采用同工酶分析方法研究过的海洋贝类已达百余种, 其中主要集中在牡蛎、扇贝和贻贝等一些重要的海洋经济贝类中^[1~3], 涉及的同工酶类及可溶性蛋白近 40 种。随着生化遗传研究的发展, 同工酶标记被广泛应用于组织特异性、个体发育、倍性检测、生理病理诊断、种群遗传结构分析以及亲缘关系比较等研究。同时还被应用于杂合度与生长率等数量性状的相关性研究、性状基因与同工酶位点连锁分析、种群的遗传分化机制探讨、幼体的散布范围估算等方面^[4,5]。

菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)俗称花蛤、蛤蜊、蛤仔和蚬子等。隶属于软体动物门(Mollusca), 双壳纲(Lamellibranchia), 异齿亚纲(Heterodonta), 帘蛤目(Veneroida), 帘蛤科(Veneridae), 蛤仔属(*Ruditapes*), 是广温广盐的世界性分布贝类。20 世纪 90 年代以来由于国内外市场对菲律宾蛤仔的需求日益增加, 人为采捕强度显著增大, 区域性自然种群起伏变化很大。同时人工育苗、养殖等技术被广泛应用于生产, 而人为的移苗增养殖现象也逐年增加, 具有不同遗传背景的异地群体移入对

当地海域的野生群体遗传结构也可能产生影响。刘仁沿等^[6]研究认为中国北方不同地理群体菲律宾蛤仔的酶谱表达存在差异, 并报道杂合度与形态数量性状存在一定的相关性。Ren 等^[7]报道了中国沿海菲律宾蛤仔分化成南北两大类群。作者采用聚丙烯酰胺同工酶技术, 对产于福建平潭岛、浙江象山港、江苏海州湾和辽宁辽东湾的菲律宾蛤仔野生群体生化遗传特征进行研究分析, 以期探讨这些不同地理群体的遗传结构以及分化状况。

1 材料与方法

1.1 材料与样品制备

实验所需样品分别从福建平潭岛、浙江宁波象山港、江苏连云港海州湾和辽宁锦州辽东湾当地野生群体原聚集地采集。每群体个体数量为 50~60 个,

收稿日期: 2007-02-20; 修回日期: 2007-06-22

基金项目: 江苏省海洋生物技术重点建设实验室开放课题资助项目 (2005HS007)

作者简介: 李旭光(1981-), 男, 江苏徐州人, 硕士研究生, 主要从事海洋贝类群体遗传与进化研究, E-mail: xuguangli1981@163.com; 许璞, 通信作者, 电话: 0512-51837170, E-mail: xupu66@sina.com

样品采集后活体运回实验室,暂养数日。实验分析取外套膜和消化腺组织按 1:3 比例加入 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0),冰浴研磨,4℃下 12 000 r/min 离心 30 min,消化腺组织二次离心 30 min,取上清液电泳。

1.2 实验方法

1.2.1 电泳

采用不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳法,参照何忠效^[8]方法略作改动。电极缓冲液为 Tris~Gly 溶液(pH 8.3),指示剂为溴酚兰,浓缩胶电压为 120 V,进入分离胶电压升至 150 V,4℃条件下电泳 4~5 h。

1.2.2 染色

染色方法参照王中仁^[9]略作改动。

1.2.3 保存

染色完毕后用 7%冰醋酸+20%乙醇溶液终止酶促反应,数码相机记录拍照后固定保存。

1.2.4 同工酶命名

同工酶的命名根据各酶谱的相对迁移率($R_f = d/l$, d 为酶带迁移距离, l 为指示剂迁移距离)从小到大依次命名;各位点从阴极到阳极的迁移顺序命名(1,2,3,...),该位点如有一个以上等位基因,各等位基因按英文字母顺序命名(a,b,c,...)。

1.2.5 数据处理

利用 PopGene(ver. 3.12)软件统计分析结果。

多态位点比率 $P = \text{多态位点数} / \text{总位点数} \times 100\%$

平均预期杂合度 $H_e = \sum (1 - \sum q_{ij}^2) / n$

平均观测杂合度 $H_o = \text{观察到的杂合个体数} / \text{观察的个体总数}$, n 为所测位点总数, q_i 为第 i 个等位基因的频率, q_{ij} 为第 i 位点上 j 等位基因纯合基因型的频率。

平均有效等位基因数 $A_e = \sum (1 / \sum q_i^2) / n$

近交系数 $F_{is} = 1 - H_o / H_e$;

遗传分化指数 $F_{st} = 1 - H_e / H_T$;

$H_T = 1 - \sum X_i^2$;

群体每代迁移数 $N_m = (1 - F_{st}) / 4F_{st}$;

X_i 为等位基因 A_i 的频率, H_o 为平均观测杂合度, H_e 为平均预期杂合度, H_T 为总群体的平均杂合度。

遗传一致性 $I = \sum \sum X_{ij} \times Y_{ij} / (\sum \sum X_{ij}^2 \times \sum \sum Y_{ij}^2)$;

遗传距离 $D = -\ln I$;

X_{ij} , Y_{ij} 分别为 X , Y 两个种群中第 j 个基因位点上第 i 个等位基因的频率。

2 结果

2.1 同工酶酶谱特征

实验选取 4 种酶类酯酶 EST、超氧化物歧化酶 SOD、苹果酸脱氢酶 MDH 和苹果酸酶 ME,在菲律宾蛤仔 4 个群体中检测到 8 个可以判读的位点,分别为 EST-2、EST-3、EST-4、SOD-2、MDH-1、MDH-2、ME-1 和 ME-2,其中位点 MDH-1 和 ME-1 在 4 个群体中均为单态,其他位点具有多态性。

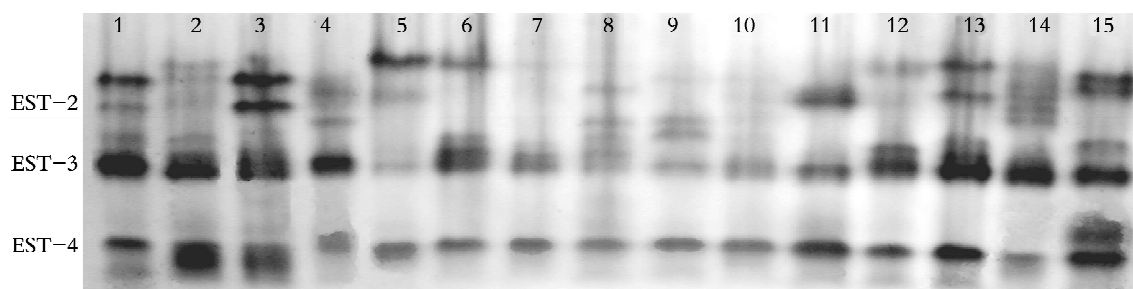


图 1 福建平潭岛菲律宾蛤仔野生群体的 EST 图谱

Fig. 1 Electrophoretogram of EST expressed in Pingtan Island's wild population of *Ruditapes philippinarum*

2.2 群体内的遗传变异水平

根据各群体的酶谱表型的统计结果,计算出各

群体的多态位点比率 $P_{.95}$ 、平均杂合度期望值 H_e 、观测值 H_o 、平均位点有效等位基因数 N_e 和遗传偏离指数 D (表 1)。4 个群体的多态性位点比率分别

为 75.0%、62.5%、75.0% 和 62.5%；群体的平均杂合度观测值为 0.274 3~0.378 7,其中海州湾群体较高,象山港群体较低,但与平均杂合度期望值差异较

小;4 个群体的平均有效等位基因数分别为 1.531 4、1.489 1、1.632 5 和 1.578 3,遗传偏离指数为 -0.066 7~0.026 0。

表 1 菲律宾蛤仔 4 个野生群体的遗传变异水平

Tab.1 The genetic diversity among the four wild populations of *Ruditapes philippinarum*

群体	多态位点比率 $P_{.95}(\%)$	平均杂合度观测值 H_o	平均杂合度期望值 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
平潭岛	75.0	0.296 8	0.299 2	1.531 4	-0.029 1
海州湾	62.5	0.274 3	0.276 4	1.489 1	0.026 0
象山港	75.0	0.338 7	0.345 8	1.632 5	-0.000 6
辽东湾	62.5	0.282 8	0.303 2	1.578 3	-0.066 7

2.3 群体间的遗传分化水平

菲律宾蛤仔 4 个群体间的遗传分化指数为 0.019 1~0.061 1,群体每代迁移数 N_m 为 3.841 3~

12.863 0,其中平潭岛、象山港和海州湾 3 个群体间的遗传分化指数较小,群体每代迁移数较高,而辽东湾群体与其他 3 个群体间的遗传分化指数较大,群体每代迁移数较低(表 2)。

表 2 菲律宾蛤仔 4 个野生群体的遗传分化指数 F_{st} (左下)及群体每代迁移数 N_m (右上)

Tab.2 The coefficient of gene differentiation (the lower left) and the number of migrants per generation (the upper right) among the four wild populations of *Ruditapes philippinarum*

群体	平潭岛	海州湾	象山港	辽东湾
平潭岛	* * * *	12.863 0	8.425 6	4.217 4
海州湾	0.019 1	* * * *	4.940 3	4.658 5
象山港	0.028 8	0.048 2	* * * *	3.841 3
辽东湾	0.056 0	0.050 9	0.061 1	* * * *

2.4 遗传距离与聚类分支图

由 $Nei^{[10]}$ 遗传距离公式计算得到菲律宾蛤仔各群体间的遗传距离和遗传相似度,并依此制表

(表 3)。根据遗传距离公式构建了 4 个群体的聚类分支图(图 1),显示平潭岛群体首先与象山港群体聚类,再与海州湾群体相聚,最后 3 个群体与辽东湾群体相汇。

表 3 菲律宾蛤仔 4 个野生群体的遗传相似度(右上)及遗传距离(左下)矩阵

Tab.3 The genetic similarity index (the upper right) and the genetic distance (the lower left) among four wild populations of *Ruditapes philippinarum*

群体	平潭岛	海州湾	象山港	辽东湾
平潭岛	* * * *	0.986 8	0.975 2	0.951 7
海州湾	0.013 3	* * * *	0.958 5	0.959 1
象山港	0.025 1	0.042 3	* * * *	0.942 3
辽东湾	0.049 5	0.041 7	0.059 4	* * * *

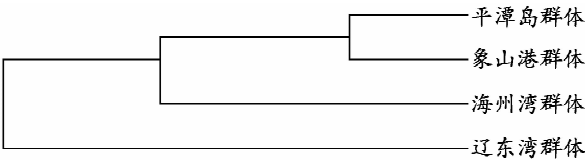


图 2 菲律宾蛤仔 4 个野生群体的 UPGMA 聚类分析
Fig.2 The cluster analysis based on Nei' genetic identity in the four wild populations of *Ruditapes philippinarum*

3 讨论

3.1 群体内的遗传变异

平均杂合度和多态位点比率是反映群体生化遗传变异的重要参数,在海洋贝类中,双壳类普遍具有较高的遗传变异水平。本项研究的菲律宾蛤仔 4 个野生群体多态性位点比率为 62.5%~75.0%,

平均杂合度观测值为 0.274 3~0.338 7, 高于一般海洋贝类的杂合度平均值 ($H_o = 0.147$), 与 Borsa 和 Yokogawa 对 *R. philippinarum*^[11,12] 以及

Jordaens 对 *Tapes decussatus*^[13] 的报道结果相近 (表 4)。在 4 个群体中, 海州湾群体的遗传变异水平较高, 表明海州湾群体的遗传多样性较为丰富。

表 4 菲律宾蛤仔同工酶研究结果比较

Tab. 4 Allozyme variation reported in other studies of *R. philippinarum*

<i>P</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>A_e</i>	文献
0.89	0.331	0.343	2.89	[11]
0.80~0.93	0.34~0.37	* * *	2.89~3.10	[14]
0.54~0.75	0.19~0.22	0.20~0.27	1.57~1.63	[15]
0.75~0.85	0.27	0.27	3.15~3.35	[12]
0.45~0.64	0.04~0.15	0.11~0.24	1.31~1.48	[7]
0.63~0.75	0.27~0.34	0.27~0.35	1.49~1.63	本文

许多海洋贝类的自然群体中普遍存在杂合子缺失现象, 造成这种现象的原因主要包括自然选择、Wahlund 效应、沉默基因及近交等。而本实验菲律宾蛤仔群体的遗传偏离指数为 -0.0667~0.026, 显著高于其他一些双壳类^[2], 杂合子缺失不显著。Borsa^[11]曾报道菲律宾蛤仔养殖群体的遗传偏离指数显著高于自然群体, 群体杂合度与生长率、存活率等数量性状存在正相关性^[6,16]。人工养殖的定向选择作用对杂合度较高的个体有利, 导致杂合度较低的个体被淘汰, 群体的遗传偏离指数增大, 杂合子缺失现象不显著。Wada 等^[17]根据 Sigh 的平衡选择理论认为, 在贝类幼体时期自然选择作用对纯合体有利而对杂合体不利, 随着贝龄的增长自然选择作用逐渐对杂合体有利, 从而导致遗传偏离指数随着贝龄的延长而增大, 即自然选择作用导致群体的杂合子缺失不显著。本实验显示的遗传偏离指数偏高, 可能存在自然选择的作用, 也可能有人工选择作用的影响, 或是两者共同的影响。

3.2 群体间的遗传分化

遗传分化指数和每代迁移数是间接评价群体间遗传分化状况和基因交流水平的重要参数^[18]。Wright^[19]认为 $0 < F_{st} < 0.05$ 群体间无显著分化, $0.05 < F_{st} < 0.15$ 群体间的分化程度中等。本实验结果表明: 平潭岛、象山港和海州湾 3 个野生群体间的遗传分化指数均小于 0.05, 群体间遗传分化不显著; 辽东湾群体与前 3 个群体的比较, 遗传分化指数为 0.050 9~0.061 1, 期间差异均大于 0.05, 显示较高的分化程度。根据遗传距离构建的聚类分析同样表明, 平潭岛、象山港和海州湾 3 个群体间的遗传距离较小, 而辽东湾群体与它们的遗传距离较大, 各群体间生化遗传分化状况并未显示人工增养殖对野生群体遗传结构的影响。具有浮游幼体期的海洋贝类, 幼体的散布能力是决定群体遗传结构的重要因素, 幼体的散布范围越广, 群体间遗传分化越不显著^[20]。Saavedra 等^[1]报道欧洲牡蛎 (*Ostrea edulis*) 地中海群体与大西洋群

体间幼体散布交流显著受限, 造成两群体间的遗传差异显著。菲律宾蛤仔属于广温广盐型的海洋双壳类, 其生长有典型的浮游期, 具备较大尺度的空间与时间交流条件。实验结果显示: 平潭岛、象山港和海州湾 3 个群体间的基因流较高 ($4.940 < N_m < 12.863$), 分化不显著, 表明这些地理群体处在相近的分化进程。而辽东湾群体所处半封闭内海海湾, 与外海其他群体间的基因交流受到限制, 这可能是辽东湾群体与地理距离较远的其他 3 个群体间有明显分化的重要原因。这些结果与 Ren 等^[7]报道中国菲律宾蛤仔群体分为南北两大类群的结论相似。

参考文献:

[1] Saavedra C, Zapata C, Guerra A, *et al.* Allozyme variation in European populations of the oyster *Ostrea edulis* [J]. **Mar Biol**, 1993, 115: 85-95.

[2] Beaumont A R, Beveridge C M. Electrophoretic survey of genetic variation in *Pecten maximus*, *Chlamys opercularis*, *C. varia* and *C. distorta* from the Irish Sea [J]. **Mar Biol**, 1984, 81: 299-306.

[3] Levinton J S, Suchanek T H. Geographic variation, niche breadth and genetic differentiation at different geographic scales in the mussels *Mytilus californianus* and *M. edulis* [J]. **Mar Biol**, 1978, 49: 363-375.

[4] Hedgecock D, McGoldrick D J, Manahan D T, *et al.* Quantitative and molecular genetic analyses of heterosis in bivalve mollusks [J]. **J Exp Mar Biol Ecol**, 1996, 203: 49-59.

[5] Hellberg M E, Burton R S, Neigel J E, *et al.* Genetic assessment of connectivity among marine populations [J]. **Bull Mar Sci**, 2002, 70(sup.): 273-290.

[6] 刘仁沿, 梁玉波, 张喜昌. 中国北方菲律宾蛤仔同工酶电泳的初步分析比较 [J]. **海洋环境科学**, 1999, 18 (1): 24-28.

[7] Ren Yiping, Gao Tianxiang, Yang Tianyan. Isozyme analysis on the populations of *Ruditapes philippinarum* [J]. **Journal of Ocean University of China**, 2006, 15(1): 58-62.

[8] 何忠效, 张树政. 电泳 (第 2 版) [M]. 北京: 科学出版社, 1999.

- [9] 王中仁. 植物等位酶分析 [M]. 北京: 科学出版社, 1996. 95-112.
- [10] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. **Genetics** 1978, 89: 583-590.
- [11] Borsa P, Thiriot-Quicvreux C. Karyological and allozymic characterization of *Ruditapes philippinarum*, *R. aureus* and *R. decussates* (Bivalvia, Veneridae) [J]. **Aquaculture**, 1990, 90: 209-227.
- [12] Yokogawa K. Morphological variabilities and genetic features in Japanese common clam *Ruditapes philippinarum* [J]. **Venus**, 1998, 57: 121-132.
- [13] Jordaens K, Wolf H D, Willems T, *et al.* Loss of genetic variation in a strongly isolated Azorean population of the edible clam, *Tapes decussates* [J]. **Journal of Shellfish Research**, 2000, 19(1): 29-34.
- [14] Fava G, Fonsatti E, Meggiato L. Genetic study on two Adriatic lagoon populations of the clam *R. philippinarum* [J]. **Mar Life**, 1994, 4: 23-32.
- [15] Passamonti M, Mantovani B, Scali V. Allozymic characterization and genetic relationships among four species of Tapetinae (Bivalvia, Veneridae) [J]. **Ital J Zool**, 1997, 64: 117-124.
- [16] Koehn R K, Gaffney P M. Genetic heterozygosity and growth rate in *Mytilus edulis* [J]. **Mar Biol**, 1984, 82: 1-7.
- [17] Wada K T. Genetic variability at four polymorphic loci in Japanese pearl oysters, *Pinctada fucata marten-sii*, selected for six generations [J]. **Aquaculture**, 1986, 59: 139-146.
- [18] Slatkin M. Gene flow and the geographic structure of natural populations [J]. **Science**, 1987, 236: 787-792.
- [19] Wright S. Evolution and the genetics of populations [M]. Chicago: Univ Chicago Press, 1978.
- [20] Palumbi S R. Reproductive isolation, genetic divergence, and speciation in the sea [J]. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 1994, 25: 547-572.

Biochemical genetic structure and variation in different populations of *Ruditapes philippinarum*

LI Xu-guang^{1,3}, XU Guang-ping², YAN Bin-lun³, YANG Jia-xin⁴, ZHAO Yan-jing³, XU Jian-rong¹, XU Pu¹

(1. Department of Biology and Food Engineering, Changshu Institute of Technology, Changshu 215000, China; 2. Marine Fisheries Institute of Jiangsu Province, Nantong 226007, China; 3. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology of Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China; 4. School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Received: Feb. ,20,2007

Key words: *Ruditapes philippinarum*; Allozyme; genetic divergence

Abstract: The biochemical genetics in four populations of *Ruditapes philippinarum*, which were collected from Pingtan Island, Haizhou Bay, Xiangshan Harbor, and Liaodong Bay, were analyzed by polyacrylamide gradient gel vertical electrophoresis. The results showed that the percentages of polymorphic loci ($P_{.95}$) of the four populations varied from 62.5% to 75.0%, the average heterozygosities ranged from 0.274 3 to 0.338 7. The mean effective numbers of alleles in loci varied from—0.066 7 to 0.026 0, and the populations of *R. philippinarum* demonstrated a high genetic variability. Based on the coefficient of genetic differentiation and the number of migrants per generation, the genetic divergence between the populations of Pingtan Island, Haizhou Bay and Xiangshan Harbor was infinitesimal, while the genetic divergence between the three populations and the population of Liaodong Bay was slightly evident. Clustering analysis also showed that the populations of Pingtan Island and the population of Xiangshan Bay were clustered with priority, then the population of Haizhou Bay joined, finally the population of Liaodong Bay joined the group. The genetic differentiation mechanism of populations and the cause of indistinctively heterozygosity deficiency were also discussed in the paper.

(本文编辑:张培新)