



## 西施舌 3 个自然群体杂合性的研究

王展林, 黎中宝, 张桂玲, 陈 锦, 赵斌丽, 吴 宁, 林小云

(集美大学 水产学院, 集美大学水产生物技术研究所, 福建省高校水产科学技术与食品安全重点实验室, 福建 厦门 361021)

**摘要**:采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,对广西北海、福建漳港和江苏启东 3 个西施舌(*Coelomaetra antiquata* (Spengler)) 自然群体杂合性进行了研究。共检测分析了 7 个酶,获得 12 个位点、25 个等位基因。其中 4 个位点是多态的,分别是 *Sod-1*、*Mdh-1*、*Est-1*、*Est-3*, 这些位点分别有 1~7 个等位基因。结果表明,福建漳港群体的 *Sod-1* 和 *Est-1* 位点、广西北海群体的 *Sod-1* 位点符合 Hardy-Weinberg 平衡 ( $P>0.05$ ); 江苏启东群体的多态位点中所有位点、福建漳港群体的 *Mdh-1*、*Est-3* 位点、广西北海群体的 *Mdh-1*、*Est-1*、*Est-3* 位点均非常显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡 ( $P<0.01$ )。另外,除了江苏启东和福建漳港群体的 *Est-1* 位点表现出杂合子缺失 ( $F>0$ ) 外,各群体中每个位点均表现出杂合子过量 ( $F<0$ )。结合各群体中每个多态位点的观察杂合度和期望杂合度,认为中国东南沿海西施舌的种质资源状况良好。

**关键词**:西施舌 (*Coelomaetra antiquata* (Spengler)); 等位酶; 群体; 杂合性

中图分类号: S968.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096 (2009) 07-0070-05

西施舌 (*Coelomaetra antiquata* (Spengler)) 隶属于软体动物门 (Mollusca), 瓣鳃纲 (Lamellibranchia), 异齿亚纲 (Heterodonta), 帘蛤目 (Veneroida), 蛤蜊科 (Mactridae), 腔蛤蜊属 (*Coelomaetra*)。中国沿海均有分布, 印度半岛、日本也有分布。西施舌俗称海蚌, 个体较大, 肉质细嫩, 滋味鲜美, 营养丰富, 可与海参、鲍鱼媲美, 是一种经济价值较高的名贵海产贝类。西施舌除了是久负盛名的筵席珍品佳肴外, 还具有极高的医疗保健价值<sup>[1]</sup>。但由于滥捕和长期只捕不养, 近年来, 产量急剧下降, 全国年产量不足 50 t, 一些海区已很少见到西施舌的踪迹。目前, 关于西施舌的研究主要集中在西施舌的繁殖生物学<sup>[2]</sup>、生物学观察<sup>[3]</sup>及其人工养殖<sup>[4]</sup>等方面, 在遗传学方面, 程汉良等<sup>[5]</sup>对西施舌肝脏、鳃、后闭壳肌、外套膜和足 5 种组织的 3 种同工酶进行了组织特异性分析; 孔令锋等<sup>[6]</sup>对西施舌闭壳肌、鳃、外套膜、消化腺和足肌 5 种组织的 18 种同工酶进行了组织特异性分析, 并对其中 11 种同工酶进行了多态性的筛选; 姚丽娅等<sup>[7]</sup>对西施舌 16S rRNA 基因片段进行 PCR 扩增并对分析其核苷酸序列; 林昕等<sup>[8]</sup>检测了西施舌的 ITS-1 基因序列片段, 并利用 ITS-1 序列作为遗传标记分析了来自 3 个不同地区的西施舌的遗传变异情

况; 尤仲杰等<sup>[9]</sup>采用 RAPD 技术对 5 个西施舌自然群体的遗传多样性进行了研究。但在中国西施舌分布区范围内进行西施舌不同群体的等位酶杂合性研究尚未见报道。根据中国西施舌的分布, 作者在中国东南沿海从低纬度到高纬度依次采集了广西北海、福建漳港、江苏启东 3 个西施舌群体。

等位酶位点的不同等位基因都是等显表达的, 因此等位酶电泳技术能够判别某位点的基因型是杂合的还是纯合的, 为物种种质资源的研究提供技术支持。该技术已成功应用于牡蛎<sup>[10]</sup>、扇贝<sup>[11]</sup>、贻贝<sup>[12]</sup>、蛤<sup>[13]</sup>等海洋贝类中。本研究运用等位酶技术对西施舌不同群体的杂合子缺乏及过量的状况进行了研究, 并探讨其发生的原因, 以期对种质资源的保护和利用、遗传育种等研究提供基础资料。

收稿日期: 2008-10-20; 修回日期: 2009-01-05

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (B0640010); 福建省高等教育新世纪优秀人才支持计划项目 (闽教科 [2006] 35 号); 福建省高校水产科学技术与食品安全重点实验室基金项目 (2007J202); 集美大学创新团队基金项目 (2007A001)

作者简介: 王展林(1984-), 男, 福建莆田人, 硕士, 研究方向为水产增殖与水产生物技术, E-mail: zhanlinwang@163.com; 黎中宝, 通信作者, E-mail: lizhongbao@jmu.edu.cn



## 1 材料与方法

西施舌样品于 2008 年 5 月分别取自江苏启东自然海区、福建漳港自然海区、广西北海自然海区，每群体随机采样 30~33 个样本，所有样本皆为成贝。样品采集后活体带回实验室，冰上解剖剪取闭壳肌、斧足、肝脏和外套膜 4 种组织，-80 保存。实验过程中每个样品分别取 0.5 g 的肝脏等 4 种组织，加 2~3 倍体积的磷酸缓冲液 (pH7.4)，在冰浴中研磨。4 离心 10 min (12 000 r/min)，取上清液，加质量分数为 40% 的蔗糖溶液，上清液与蔗糖溶液的比为 2:1，然后滴加 20  $\mu$ l 的溴酚蓝，在 4 下保存备用。

等位酶电泳采用垂直板型不连续聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE)，点样后于 4 冰箱中进行电泳。浓缩胶和分离胶质量分数分别为 2.5% 和 7.5%，pH 值分别为 8.9 和 6.7。浓缩胶保持 100V 的电压，分离胶的电压为 150V。染色方法、酶谱判译、等位酶的缩写参照黎中宝等<sup>[14]</sup>的方法。数据处理采用 PopGen32 软件。作者采用的遗传学参数分别为各位点的观察杂合度 ( $H_o$ )、各位点的期望杂合度 ( $H_e$ )、杂合子缺乏或过量系数 ( $F$ ) 对 Hardy-Weinberg 平衡符合度检测的概率值 ( $P$ ) 等。

## 2 结果

通过利用 4 种组织筛选 13 个酶系统，结果显示肝脏组织的等位酶数量和多态性最为丰富，以肝

脏组织作为最终材料，得到 7 个可供分析的等位酶，分别为：超氧化物歧化酶 (SOD, E.C. 1.15.1.1)、天冬氨酸转氨酶 (AAT, E.C. 2.6.1.1)、苹果酸酶 (ME, E.C. 1.1.1.40)、苹果酸脱氢酶 (MDH, E.C. 1.1.1.37)、酯酶 (EST, E.C. 3.1.1.1)、酸性磷酸酶 (ACP, E.C. 3.1.3.2)、淀粉酶 (AMY, E.C. 3.2.1.1)，共获得 12 个位点，25 个等位基因。其中 4 个位点为多态，即 *Sod-1*、*Mdh-1*、*Est-1*、*Est-3* (表 1)。

根据 Hardy-Weinberg 平衡标准进行  $\chi^2$  检验和杂合子缺乏或过量系数研究结果显示：江苏启东西施舌群体的多态位点中所有位点均非常显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡 ( $P < 0.01$ )；*Sod-1*、*Est-3* 两个位点表现出杂合子过量 ( $-1 < F < 0$ )，*Mdh-1* 位点表现为全部杂合 ( $F = -1.000$ )，*Est-1* 位点表现出杂合子缺失 ( $F > 0$ )。并总结了各位点的观察杂合度和期望杂合度 (表 1)。

福建漳港西施舌群体的多态位点中 *Sod-1*、*Est-1* 两个位点符合 Hardy-Weinberg 平衡标准 ( $P > 0.05$ )，*Mdh-1*、*Est-3* 两个位点非常显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡 ( $P < 0.01$ )；*Sod-1*、*Est-3* 两个位点表现出杂合子过量 ( $-1 < F < 0$ )，*Mdh-1* 位点表现为全部杂合 ( $F = -1.000$ )，*Est-1* 位点表现出杂合子缺失 ( $F > 0$ )。并总结了各位点的观察杂合度和期望杂合度 (表 1)。

广西北海西施舌群体的多态位点中 *Sod-1* 位点符合 Hardy-Weinberg 平衡标准 ( $P > 0.05$ )，*Mdh-1*、

表 1 3 个西施舌群体  $H_o$ 、 $H_e$ 、 $F$  和  $P$

Tab. 1  $H_o$ ,  $H_e$ ,  $F$  and  $P$  of the 3 populations of *Coelomactra antiquate* (Spengler)

群体	位点	$H_o$	$H_e$	$F$	$P$
江苏启东	<i>Sod-1</i>	0.933 3	0.584 7	-0.623 2	0.000 011
	<i>Mdh-1</i>	1.000 0	0.508 5	-1.000 0	0.000 000
	<i>Est-1</i>	0.466 7	0.720 3	0.341 2	0.000 000
	<i>Est-3</i>	0.933 3	0.635 6	-0.493 3	0.000 014
福建漳港	<i>Sod-1</i>	0.666 7	0.518 1	-0.308 6	0.240 415
	<i>Mdh-1</i>	1.000 0	0.508 5	-1.000 0	0.000 000
	<i>Est-1</i>	0.200 0	0.243 5	0.164 7	0.180 502
	<i>Est-3</i>	1.000 0	0.524 9	-0.937 6	0.000 002
广西北海	<i>Sod-1</i>	0.700 0	0.536 2	-0.327 7	0.466 023
	<i>Mdh-1</i>	1.000 0	0.508 5	-1.000 0	0.000 000
	<i>Est-1</i>	1.000 0	0.524 9	-0.937 6	0.000 002
	<i>Est-3</i>	1.000 0	0.540 1	-0.882 8	0.000 002

注： $P < 0.01$  为差异极显著， $P < 0.05$  为差异显著



*Est-1*、*Est-3* 3 个位点均非常显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡 ( $P < 0.01$ ); *Sod-1*、*Est-1*、*Est-3* 三个位点均表现出杂合子过量 ( $-1 < F < 0$ ), *Mdh-1* 位点表现为全部杂合 ( $F = -1.000$ )。并总结了各位点的观察杂合度和期望杂合度 (表 1)。

### 3 讨论

$\chi^2$  检验是一种经典的拟合度检验方法,  $\chi^2$  检验的概率 ( $P$ ) 定量地给出了差异水平, 一般认为  $P < 0.05$  差异显著,  $P < 0.01$  差异极显著。影响偏离 Hardy-Weinberg 平衡的因素是多方面的, 不仅受遗传学规律的控制, 而且受外界环境的影响<sup>[15]</sup>。对根据 Hardy-Weinberg 平衡标准进行  $\chi^2$  检验的概率值 ( $P$ ) 和杂合子缺乏或过量系数的分析结果表明, 福建漳港群体的 *Sod-1* 和 *Est-1* 位点、广西北海群体的 *Sod-1* 位点符合 Hardy-Weinberg 平衡 ( $P > 0.05$ )。但在一个非随机交配的群体里, 观察杂合度 ( $H_o$ ) 不等于期望杂合度 ( $H_e$ ), 实际的等位基因频率就会偏离 Hardy-Weinberg 平衡<sup>[15]</sup>。江苏启东西施舌群体的多态位点中所有位点, 福建漳港西施舌群体的多态位点中 *Mdh-1*、*Est-3* 位点, 广西北海西施舌群体的多态位点中 *Mdh-1*、*Est-1*、*Est-3* 位点均非常显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡 ( $P < 0.01$ ), 这是由于杂合体缺失或纯合体过量、或稀有纯合体和其他杂合体、常见/稀有杂合体、最常见基因纯合体的比例失调所致, 进一步说明了该群体的繁殖方式不完全是随机交配的, 或者是自然选择的作用导致基因频率的变化及基因漂变等, 或者是相邻群体的基因经杂交正在进入所研究的区域, 或者是基因成分发生了变化<sup>[16]</sup>。孔令锋等<sup>[6]</sup>对山东即墨的西施舌同工酶研究中, *Sod-1* 和 *Xdh-1* 位点显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡 ( $P < 0.05$ ), 在其他贝类中, 翡翠贻贝 (*Perna viridis* L.)<sup>[12]</sup>的 *Est-2*、*Est-5*、*Me-2*、*G6pdh-1* 位点, 文蛤 (*Meretrix meretrix*)<sup>[13]</sup>的 *Idh-1*、*Alp-2*、*Ldh-3*、*Gdh-2*、*Sod-2*、*Me-3* 位点, 企鹅珍珠贝 (*Pteria penguin*)<sup>[17]</sup>的 *Ldh-1*、*Ldh-2*、*Sod-2* 位点, 欧洲牡蛎 (*Ostrea edulis*)<sup>[10]</sup>的 *Aat-2*、*Aldh-2*、*Est-1*、*Est-2*、*Gpi*、*Me-1*、*Pgdh* 位点均非常显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡 ( $P < 0.01$ )。

多态位点的固定指数  $F$  不仅是测量遗传动态的重要指标, 也是测量近交衰退和远交衰退的重要参数<sup>[15]</sup>。若杂合体缺乏, 纯合体过多,  $F > 0$ , 杂合

体完全缺失 (全部为纯合体) 时  $F = 1$ ; 反之,  $F < 0$  或  $F$  等于  $-1$ ; 若  $F$  等于  $0$  说明符合 Hardy-Weinberg 平衡, 该群体是随机交配的; 所以,  $F$  值的变动可在  $+1 \sim -1$  之间。杂合体缺失, 尤其是杂合体完全缺失将导致有些基因从基因库中消失, 造成群体遗传多样性的降低, 从而降低其适应环境的能力<sup>[18]</sup>。杂合子缺失是海洋软体动物中常见的现象<sup>[19]</sup>, 本研究的 3 个西施舌群体中, 江苏启东和福建漳港群体的 *Est-1* 位点表现出杂合子缺失 ( $F > 0$ ), 而山东即墨西施舌<sup>[6]</sup> 6 个多态位点 (*Adh*、*Est-1*、*Mdh-1*、*Pgm*、*Sod-1* 和 *Xdh*) 均表现出杂合子缺失 ( $F > 0$ )。其他贝类中, 文蛤<sup>[13]</sup>的 *Adh-1*、*Est-5*、*Sod-2*、*Me-2*、*Me-3* 位点, 企鹅珍珠贝<sup>[17]</sup>的 *Ldh-1*、*Ldh-2* 位点, 翡翠贻贝<sup>[12]</sup>的 *Est-5*、*G6pdh-1* 位点, 欧洲牡蛎<sup>[10]</sup>的 *Aldh-1*、*Est-1*、*Est-2*、*Me-1* 位点, 泥蚶 (*Tegillarca granosa* Linnaeus)<sup>[20]</sup>的 *Est-4*、*Est-6*、*Pgm-1* 位点均表现出杂合子缺失 ( $F > 0$ )。关于杂合体缺失的原因争论很大<sup>[21]</sup>, 可能与自然选择、群体内交、Wahlund 效应、亚等位基因和性连锁座位等原因有关, 但至于与哪种或哪几种更相关, 还有待于进一步研究。一般认为某种或某种方式的自然选择是造成杂合体缺失可能原因之一, Zouros 等<sup>[21]</sup>认为由于不同基因型产卵时间的差异导致选型交配, 从而产生较多的纯合性; 黎中宝等<sup>[18]</sup>认为群体内交使某些位点上等位基因纯合加快, 并且认为样本来自两个以上等位基因频率不同的种群 (亚种群) 能产生杂合体缺失, 产生 Wahlund 效应; Kijima 等<sup>[22]</sup>通过交配实验发现皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*) 的等位酶位点 *Pgm-1* 和 *Pgm-2* 具有哑等位基因, 在进行遗传学计算时, 没有考虑哑等位基因也是导致杂合体缺失的原因之一。另据报道<sup>[23]</sup>, 环境因子如盐度与温度也是影响群体杂合度的因素。杂合子在生长、繁殖能力及抗逆性等方面均比纯合子强, 长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 的杂合度与其存活率和生长速度之间存在明显的相关性<sup>[24]</sup>。本研究的 3 个西施舌群体当中, 除了江苏启东和福建漳港群体的 *Est-1* 位点表现出杂合子缺失 ( $F > 0$ ) 外, 各群体中每个位点均表现出杂合子过量 ( $F < 0$ ), 3 个群体的  $F$  值 ( $-0.4438$ ,  $-0.5204$ ,  $-0.7870$ ) 明显低于 48 种海洋贝类的平均值 ( $-0.099$ )<sup>[25]</sup>, 结合各群体中每个多态位点的观察杂合度和期望杂合度状况, 尤其是



*Mdh-1* 位点的  $H_0$  在 3 个群体中均为 1, 说明中国东南沿海西施舌的种质资源状况良好。尤仲杰等<sup>[9]</sup>用 RAPD 技术从遗传多样性水平上也认为中国西施舌种质资源良好, 这可能与目前西施舌未能开展大规模的人工育苗及养殖有关。根据西施舌绝大多数多态位点表现为杂合子过量的事实, 可以通过人工育种的方法来提高具有杂合度个体在群体中的比例<sup>[11]</sup>。虽然目前提高西施舌资源量的方法是将人工育苗投放到海区, 完全的人工养殖尚未开展, 对西施舌的群体遗传结构的影响并不明显, 但也要及时采取相应的保护措施, 防止过度的捕捞使其资源量严重衰减以及对种质资源和遗传多样性产生不可低估的影响。

#### 参考文献:

- [1] 邢湘成. 西施舌的药用[J]. 药膳食疗, 2004, 4: 32.
- [2] 刘德经, 谢开恩. 西施舌的繁殖生物学[J]. 动物学杂志, 2003, 38(4): 10-15.
- [3] 齐秋贞, 邱文仁. 西施舌器官的发生和形成[J]. 台湾海峡, 1996, 15(1): 6-15.
- [4] 刘德经, 黄进升, 蔡起彬, 等. 西施舌人工育苗高产稳产技术初步研究[J]. 齐鲁渔业, 2004, 21(5): 31-33.
- [5] 程汉良, 孟学平, 董志国. 西施舌同工酶组织特异性研究[J]. 海洋湖沼通报, 2006, 2: 44-49.
- [6] 孔令锋, 李琪. 西施舌同工酶的组织特异性与多态性初步研究[J]. 中国水产科学, 2008, 15(1): 178-181.
- [7] 姚丽娅, 肖宁, 陈建安, 等. 西施舌 16S rRNA 基因片段 PCR 扩增及其核苷酸序列分析[J]. 淮海工学院学报(自然科学版), 2006, 15(4): 59-62.
- [8] 林昕, 梁君荣, 高亚辉. 3 个地区西施舌的 ITS-1 基因片段序列分析[J]. 生命科学研究, 2008, 12(1): 14-19.
- [9] 尤仲杰, 包永波, 张爱菊. 中国沿海西施舌 5 个自然群体形态差异和 RAPD 分析[J]. 海洋学报, 2007, 29(3): 99-103.
- [10] 沈琪, Beaumont A R. 欧洲牡蛎两个种群的遗传变异[J]. 热带海洋, 1999, 18(3): 45-49.
- [11] Beaumont A R. 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.
- [12] 黄荣莲, 李康, 杜晓东. 翡翠贻贝三个野生群体的生化遗传分析[J]. 海洋通报, 2008, 27(1): 42-46.
- [13] 薛明, 杜晓东, 黄荣莲, 等. 文蛤三个野生种群的生化遗传变异[J]. 海洋通报, 2006, 25(1): 39-42.
- [14] Li Zhong-bao, Chen Changsheng. Genetic structure of cultured *H. diversicolor supertexta* (Reeve) populations [J]. *Journal of Shellfish Research*, 2004, 23(4): 1135-1137.
- [15] 黎中宝, 李少菁, 王桂忠. 锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) 不同种群的杂合性研究[J]. 海洋与湖沼, 2004, 35(4): 358-361.
- [16] 王中仁. 植物等位酶分析[M]. 北京: 科学出版社, 1996. 77-119.
- [17] 余祥勇, 王梅芳, 刘永, 等. 企鹅珍珠贝同工酶酶谱特征及其遗传分析[J]. 水产学报, 2004, 28(4): 376-382.
- [18] 黎中宝, 吴仲庆. 几种优良养殖对虾杂合性的比较研究[J]. 海洋科学, 2002, 26(12): 45-48.
- [19] Singh S M, Zouros E. Genetic variation associated with growth rate in the American oyster (*Crassostrea virginica*) [J]. *Evolution*, 1978, 32: 342-353.
- [20] 吕振明, 李太武, 苏秀榕. 泥蚶遗传多样性的研究[J]. 高技术通讯, 2005, 15(12): 104-110.
- [21] Zouros E, Foltz D W. Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve mollusks [J]. *Malacologia*, 1984, 25(2): 583-589.
- [22] Kijima A, Furutono T, Kawahara I, et al. A mode of inheritance for isozymic variation and detection of a null at *Pgm-1* and *Pgm-2* in the Pacific abalone by mating experiment [J]. *Fish Genet Breed Sci*, 1997, 25: 73-80.
- [23] 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]. *Marine Biology*, 1978, 49: 363-375.
- [24] Bierne N, Launey S, Naciri-Graven Y, et al. Early effect of inbreeding as revealed by microsatellite analyses on *Ostrea edulis* Larvae [J]. *Genetics*, 1998, 148(4): 1893-1906.
- [25] 张国范, 张福绥. 海洋贝类遗传多样性及其永续性利用[J]. 海洋科学, 1993, 5: 17-21.

# Heterozygosity in 3 natural stocks of *Coelmomacra antiquata* (Spengler)

WANG Zhan-lin , LI Zhong-bao , ZHANG Gui-ling , CHEN Jin , ZHAO Bin-li , WU Ning , LIN Xiao-yun

(Fisheries College, Jimei University, Institute of Aquaculture Biotechnology, Jimei University, Key Laboratory of Aquaculture Technology and Food Safe of Fujian College, Xiamen 361021,China)

**Received:**Oct.,20,2008

**Key words:** *Coelmomacra antiquata* (Spengler); allozyme; natural stock; heterozygosity

**Abstract:** Heterozygosity was investigated using an assay of vertical slab polyacrylamide gel electrophoresis in three *Coelmomacra antiquate* stocks from three sites: Beihai (Guangxi Province), Zhanggang (Fujian Province), Qidong (Jiangsu Province). 7 allozymes were detected, and got 12 allozyme loci, 25 alleles, 4 loci (*Sod-1, Mdh-1, Est-1, Est-3*) with 1-7 alleles which are polymorphic. The results showed that the genotypic distribution observed at *Sod-1, Est-1* in Zhanggang stock and *Sod-1* in Beihai stock were corresponded with the Hardy-Weinberg equilibrium ( $P>0.05$ ). But other loci in the three stocks were significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium ( $P<0.01$ ). There was heterozygote deficiency existed in *Est-1* in Qidong and Zhanggang stock ( $F>0$ ), and heterozygote excess existed in other loci in the three stocks ( $F<0$ ). The observed heterozygosity and expected heterozygosity per polymorphic locus per stock indicated that the germplasm resources of three *C. antiquate* stocks were good.

(本文编辑:张培新)