

厦门文昌鱼(*Branchiostoma belcheri* Gray) 种群杂合性研究*

陈锦 黎中宝 赵斌丽 雷光高 张桂玲 王展林

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

提要 应用聚丙烯凝胶电泳技术,研究了厦门海域四个野生文昌鱼种群的杂合度缺乏和过量情况。在测定的7个酶系统中,共有14个等位酶基因位点,分别为 *Aat-1*、*Amy-1*、*Amy-2*、*Amy-3*、*Amy-4*、*Me-1*、*Me-2*、*Mdh-1*、*Mdh-2*、*Sod-1*、*Sod-2*、*Est-1*、*Est-2*、*Per-1*。多态位点有8个,分别为 *Sod-1*、*Aat-1*、*Me-1*、*Me-2*、*Mdh-1*、*Mdh-2*、*Est-2*、*Amy-2*。结果表明,在大嶝岛种群、南线至十八线东端种群、南线至十八线西端种群及黄厝种群中,多态位点 *Sod-1*、*Mdh-2*、*Me-2*、*Aat-1* 显著偏离 H-W 平衡标准($P < 0.05$),而位点 *Me-1*、*Mdh-1*、*Est-2* 符合 H-W 平衡标准($P > 0.05$)。多态位点 *Amy-2* 除南线至十八线东端种群显著偏离 H-W 平衡标准($P < 0.05$)外,其它三个种群的多态位点 *Amy-2* 均符合 H-W 平衡标准($P > 0.05$)。在所有的8个多态位点中,只有大嶝岛和黄厝两个种群的 *Amy-2* 位点表现为杂合子缺失($F > 0$),其它种群的多态位点均表现为杂合子过量($F < 0$)。造成杂合体缺失的主要原因可能是自然选择、近交、哑等位基因等。杂合体的缺失会导致某些基因从该物种的基因库中消失,从而降低了物种的遗传多样性,同时也使物种对环境的适应能力降低。

关键词 文昌鱼, 等位酶, 杂合子缺乏, 杂合子过量

中图分类号 Q346

文昌鱼,又名双尖鱼,是一类低等的脊索动物,隶属脊椎动物门的头索动物亚门(Subphylum Cephalochordata)、文昌鱼纲(Amphioxii),为国家二级保护动物。高等动物的脊椎骨是生物在漫长进化过程中由脊索演化而来的,脊索动物的三大重要特征就是具有脊索、背神经管、咽鳃裂,脊索动物中的典型代表是头索动物,而文昌鱼则是头索动物中的代表物种(刘凌云,1997)。文昌鱼产生于五亿年前,是无脊椎动物演化至脊椎动物的过渡物种的典型活标本。文昌鱼在我国的沿海地区均有分布,广为人知的就是厦门和青岛两地的文昌鱼。曹玉萍等(2001)在昌黎海区文昌鱼初步调查中提到我国文昌鱼(*Branchiostoma belcheri*),又名白氏文昌鱼,有两个亚种,包括厦门

亚种和青岛文昌鱼亚种。文昌鱼在形态学(张士璠等,1995; Lacalli, 2002; Lacalli *et al.*, 1994, 1999, 2002, 2003)、生理生化(方永强等,1999; Gorbman, 1999; Pang *et al.*, 2006)、遗传学研究(陈忠科等,2001; Dong *et al.*, 2005; Holland *et al.*, 1999)等方面已经取得了很多成果,并且在遗传多样性(周涵韬等,2003; 王奕华等,2004)研究上做了部分工作,但是文昌鱼杂合性研究尚未见报道。根据厦门文昌鱼保护区文昌鱼的分布,作者从两个保护区地点南线至十八线、黄厝和与保护区相近的区域翔安大嶝岛分别采集了四个文昌鱼种群。

等位酶技术的优点是等显表达,因此等位酶电泳技术能够将某位点的杂合和纯合基因型区分开来,

* 福建省自然科学基金资助项目, B0640010 号; 集美大学创新团队基金资助, 2007A001 号; 福建省高等教育新世纪优秀人才支持计划项目资助, 闽教科[2006]35 号, 2007.01—2009.12。陈锦, 硕士, E-mail: cj198166@163.com

通讯作者: 黎中宝, 博士, 教授, E-mail: lizhongbao@jmu.edu.cn

收稿日期: 2007-12-25, 收修改稿日期: 2008-02-09

可作为物种种质资源的研究技术手段。该技术已成功应用于几种优良养殖对虾、锯缘青蟹(*Scylla serrata*)、澳大利亚虹鲟(*Oncorhynchus mykiss*)等的研究中(黎中宝等, 2002, 2004; Farrington *et al.*, 2004)。作者利用等位酶技术研究了不同文昌鱼种群的杂合体缺乏及过量的状况, 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。

1 材料与方法

文昌鱼(*Branchiostoma belcheri*)样品分别取自厦门翔安大嶝岛(2007年5月30日), 文昌鱼自然保护区南线至十八线东端(2007年5月29日)、南线至十八线西端(2007年5月15日)和黄厝(2007年5月19日)。每个种群随机采样30—60个样本。采集回来的样品在-80℃低温冰箱下保存。实验过程中文昌鱼样品先用蒸馏水洗涤三次, 去内脏, 加 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0), 在冰浴中研磨。4℃离心 10min (12000r/min), 取上清液, 加浓度 40%的蔗糖溶液, 上清液与蔗糖溶液的比为 2:1, 然后滴加 20 μl 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)电泳。电泳浓缩胶和分离胶的浓度分别为 2.5%和 7.0%, pH 分别为 6.7 和 8.9(曾呈奎等, 1998)。浓缩胶保持 100V 的电压, 分离胶的电压为 150V。共检测了 14 个酶系统, 其中图片清晰可供分析的 7 个酶, 分别为: 超氧化物歧化酶(SOD, E.C.1.15.1.1)、淀粉酶(AMY, E.C.3.2.1.1)、天冬氨酸转氨酶(AAT, E.C.2.6.1.1)、酯酶(EST, E.C.3.1.1.1)、苹果酸酶(ME, E.C.1.1.1.40)、苹果酸脱氢酶(MDH, E.C.1.1.1.-37)、过氧化物酶(PER, E.C.1.11.1.7)。酶的染色、酶谱分析、缩写、国际代码参考王中仁(1996)的方法。

实验结果的数据分析采用 POPGEN32 软件进行分析。本文中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)、杂合体缺乏或过量系数(F)、对 Hardy-Weinberg(H-W)平衡符合度检测的概率值(P)等。

2 结果

根据 H-W 平衡标准进行 χ^2 检验和杂合体缺乏或过量系数(F , 也称多态位点的固定指数)研究。结果表明, 在大嶝岛种群中多态位点 *Sod-1*、*Mdh-2*、*Me-2*、*Aat-1* 不符合 H-W 平衡标准($P<0.01$), 而位点 *Me-1*、

Mdh-1、*Amy-2*、*Est-2* 符合 H-W 平衡标准($P>0.05$)。另外, *Amy-2* 位点有出现杂合子缺乏($F>0$)的情况, 其它位点的均为杂合子过量($F<0$)。各位点的观察杂合度和期望杂合度见表 1。

在南线至十八线东端种群中, 多态位点 *Sod-1*、*Mdh-2*、*Me-2*、*Aat-1*、*Amy-2* 不符合 H-W 平衡标准($P<0.01$), 而位点 *Me-1*、*Mdh-1*、*Est-2* 符合 H-W 平衡标准($P>0.05$)。另外, 所有位点均为杂合子过量($F<0$)。各位点的观察杂合度和期望杂合度见表 1。

表 1 文昌鱼四个种群的 H_o 、 H_e 、 F 和 P

Tab.1 H_o , H_e , F and P of the four populations of *B. belcheri*

种群	位点	H_o	H_e	F	P
大嶝岛	<i>Sod-1</i>	1.0000	0.5085	-1.0000	0.000**
	<i>Aat-1</i>	1.0000	0.7299	-0.3932	0.000**
	<i>Me-1</i>	0.0333	0.0333	-0.0169	1.000
	<i>Me-2</i>	1.0000	0.5085	-1.0000	0.000**
	<i>Mdh-1</i>	0.0333	0.0333	-0.0169	1.000
	<i>Mdh-2</i>	1.0000	0.5085	-1.0000	0.000**
	<i>Est-2</i>	0.6667	0.5492	-0.2346	0.266
	<i>Amy-2</i>	0.5333	0.6424	0.1557	0.101
	南线至十八线东端	<i>Sod-1</i>	1.0000	0.5085	-1.0000
<i>Aat-1</i>		1.0000	0.7345	-0.3846	0.000**
<i>Me-1</i>		0.0333	0.0333	-0.0169	1.000
<i>Me-2</i>		1.0000	0.5085	-1.0000	0.000**
<i>Mdh-1</i>		0.1333	0.1266	-0.0714	0.737
<i>Mdh-2</i>		1.0000	0.5085	-1.0000	0.000**
<i>Est-2</i>		0.6667	0.5429	-0.2487	0.723
<i>Amy-2</i>		0.7333	0.6695	-0.1139	0.000**
南线至十八线西端		<i>Sod-1</i>	1.0000	0.5085	-1.0000
	<i>Aat-1</i>	1.0000	0.7486	-0.3585	0.000**
	<i>Me-1</i>	0.0333	0.0333	-0.0169	1.000
	<i>Me-2</i>	1.0000	0.5085	-1.0000	0.000**
	<i>Mdh-1</i>	0.0333	0.0333	-0.0714	0.737
	<i>Mdh-2</i>	1.0000	0.5085	-1.0000	0.000**
	<i>Est-2</i>	0.2667	0.2458	-0.1034	0.996
	<i>Amy-2</i>	0.7667	0.5328	-0.4634	0.051
	黄厝	<i>Sod-1</i>	1.0000	0.5085	-1.0000
<i>Aat-1</i>		1.0000	0.5836	-0.7425	0.000**
<i>Me-1</i>		0.0333	0.0333	-0.0169	1.000
<i>Me-2</i>		1.0000	0.5085	-1.0000	0.000**
<i>Mdh-1</i>		0.1333	0.1266	-0.0714	0.737
<i>Mdh-2</i>		1.0000	0.5085	-1.0000	0.000**
<i>Est-2</i>		0.3667	0.3249	-0.1478	0.968
<i>Amy-2</i>		0.5333	0.6068	0.1061	0.067

*表示差异显著($P<0.05$), **表示差异极显著($P<0.01$)

南线至十八线西端种群多态位点 *Sod-1*、*Mdh-2*、*Me-2*、*Aat-1* 不符合 H-W 平衡标准($P < 0.01$), 而位点 *Mdh-1*、*Me-1*、*Amy-2*、*Est-2* 符合 H-W 平衡标准($P > 0.05$)。另外, 所有位点均为杂合子过量($F < 0$)。各位点的观察杂合度和期望杂合度见表 1。

黄厝种群多态位点 *Sod-1*、*Mdh-2*、*Me-2*、*Aat-1* 不符合 H-W 平衡标准($P < 0.01$), 而位点 *Me-1*、*Mdh-1*、*Amy-2*、*Est-2* 符合 H-W 平衡标准($P > 0.05$)。另外, 黄厝种群 *Amy-2* 位点有出现杂合子缺乏($F > 0$)的情况, 其它位点的均为杂合子过量($F < 0$)。各位点的观察杂合度和期望杂合度见表 1。

3 讨论与结语

H-W 平衡受自然选择、近交、人工选择等诸多因素的影响。检验多态位点的各等位基因频率是否符合 H-W 平衡, 它是研究种群遗传结构的起点(王中仁, 1996), 而 χ^2 检验恰好提供了检验多态位点的方法。大量的研究也正是采用了这种经典的检验方法来检验各遗传指标是否符合 H-W 平衡, 如 Giaever 等(1998)利用 χ^2 检验和自由度对蓝鳉鱼(*Micromesistius poutassou*)的遗传一致性进行检验, 而黎中宝等(2004)则将其应用在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)杂合体缺乏或过量系数的检验上。 χ^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。在对 H-W 平衡标准进行 χ^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, 在大嶝岛种群、南线至十八线东端种群、南线至十八线西端种群及黄厝种群中, 多态位点 *Me-1*、*Mdh-1*、*Est-2* 符合 H-W 平衡标准($P > 0.05$); 而多态位点 *Amy-2* 在大嶝岛种群、南线至十八线西端种群及黄厝种群中符合 H-W 平衡标准($P > 0.05$)。然而在一个非随机交配的种群里, 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 H-W 平衡。四个种群多态位点 *Sod-1*、*Mdh-2*、*Me-2*、*Aat-1* 极显著偏离 H-W 平衡标准($P < 0.01$), 不符合 H-W 平衡标准, 多态位点 *Amy-2* 在南线至十八线东端种群中极显著偏离 H-W 平衡标准($P < 0.01$)。这也说明四个种群的繁殖方式不完全是随机交配的, 自然选择的作用导致的基因频率的变化及基因漂变以及种群内部基因成分发生变化等(王中仁, 1996), 这些因素都有可能造成文昌鱼四个种群多态位点 *Sod-1*、*Mdh-2*、*Me-2*、*Aat-1* 及 *Amy-2*(南线至十八线东端种群)偏离 H-W 平衡。

杂合体缺乏或过量系数的判定: 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 $F = 0$ 说明符合 H-W 平衡, 该种群是随机交配的; 所以, F 值的变动可在 $+1$ 到 -1 之间。在研究的四个种群中, 大嶝岛和黄厝两个种群 *Amy-2* 位点的 F 值分别为 0.1557、0.1061, 出现杂合子缺乏($F > 0$)的情况, 其它的位点均表现为杂合子过量($F < 0$)。杂合体的缺失, 特别是杂合体完全缺失会造成某些基因从种群的基因库中消失, 造成种群的遗传多样性降低, 从而降低其适应环境的能力(黎中宝等, 2004)。造成杂合体缺失的原因很多, 比如自然选择、种内杂交、哑等位基因等(Zouros *et al.*, 1984)。基于文昌鱼自然种群规模的降低以及环境的不断恶化现状, 作者认为文昌鱼杂合子不足有可能是由于自然选择和种内杂交等多种因素造成的, 具体的原因还有待进一步的研究。厦门文昌鱼四个种群中仅大嶝岛和黄厝两个种群的 *Amy-2* 位点有出现杂合子缺乏($F > 0$)的情况, 并且四个种群都具有较高的杂合度, 说明厦门文昌鱼保护区的种质资源状况还十分良好, 这当然和文昌鱼还未进行大规模的人工育苗和养殖有关。虽然文昌鱼已经成功进行了人工繁殖的批量生产(周仁杰等, 2007), 但是还没有进行大规模的养殖。文昌鱼作为国家二级保护动物, 其种质资源的保护是非常重要的。要保护其种质资源就必须保持文昌鱼种群的遗传多样性。要制止过渡捕捞和维护保护区周边环境, 使文昌鱼的种群保持在一定的规模, 从而避免杂合度的降低, 保持其丰富的遗传多样性。

生物体的杂合子相对纯合子在其生长、繁殖能力及抗逆性等方面均占有很大的优势(黎中宝等, 2004)。文昌鱼各群体中每个多态位点表现为杂合子过量(除大嶝岛和黄厝的 *Amy-2* 外), 可以通过人工育种的方法来提高具有杂合度个体在种群中的比例, 这也使通过人工繁殖放流方法加强文昌鱼种质资源的保护成为可能。根据 H-W 平衡标准进行 χ^2 检验的概率值(P)和杂合子缺乏或过量系数(F), 两者相结合更能客观、全面地反映种群多态位点的遗传平衡状况, 并已应用于锯缘青蟹、牙鲆等海洋动物研究之中(黎中宝, 2004; 黎中宝等, 2004)。

参 考 文 献

王中仁, 1996. 植物等位酶分析. 北京: 科学出版社, 77—119

- 王奕华, 张士瑾, 刘振辉, 2004. 青岛文昌鱼遗传多样性的 RAPD 分析. 海洋水产研究, 25(3): 21—27
- 方永强, 黄威权, 陈 蕾等, 1999. GnRH 在文昌鱼脑和哈氏窝的分布. 动物学报, 45(1): 106—111
- 刘凌云, 1997. 普通动物学(第三版). 高等教育出版社, 338—339
- 张士瑾, 吴贤汉, 1995. 从文昌鱼个体发生谈脊椎动物起源. 海洋科学, 19(4): 15—21
- 陈忠科, 李 琳, 张燕君等, 2001. 青岛文昌鱼核糖体蛋白 Amphil37a 基因的克隆和同源性分析. 山东大学学报(自然科学版), 36(4): 445—449
- 周仁杰, 方 琦, 2007. 厦门文昌鱼人工繁育批量生产技术研究. 台湾海峡, 26(1): 121—128
- 周涵韬, 连玉武, 邱检萍等, 2003. 厦门文昌鱼遗传多样性研究. 海洋科学, 27(11): 68—74
- 曹玉萍, 闫路娜, 谢 松, 2001. 昌黎海区文昌鱼初步调查. 动物学杂志, 36(3): 10—13
- 曾呈奎, 相建海, 1998. 海洋生物技术. 济南: 山东科学技术出版社, 283—310
- 黎中宝, 2004. 牙鲆养殖群体遗传结构的研究. 海洋学报, 26(3): 102—108
- 黎中宝, 李少菁, 王桂忠, 2004. 锯缘青蟹(*Scylla serrata*)不同种群的杂合性研究. 海洋与湖沼, 35(4): 358—363
- 黎中宝, 吴仲庆, 2002. 几种优良养殖对虾杂合性的比较研究. 海洋科学, 26(12): 45—48
- Dong M L, Fu Y G, Yu C L *et al*, 2005. Identification and characterisation of a homolog of an activation gene for the recombination activating . Fish and Shellfish Immunology, 19: 165—174
- Farrington L W, Austin C M, Burrige C P, 2004. Allozyme diversity in Australian rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Fisheries Management and Ecology, 11: 97—106
- Giaever M, Stien J, 1998. Population genetic substructure in blue whiting based on allozyme data. Journal of Fish Biology, 52: 782—795
- Gorbman A, 1999. Brain-Hatschek's pit relationships in amphioxus species. Acta Zoologica (Stockholm), 80: 301—305
- Holland L Z, Schubert M, Kozmik Z *et al*, 1999. Amphipax3/7 an amphioxus paired box gene: insights into chordate myogenesis neurogenesis and the possible evolutionary precursor of definitive vertebrate neural crest. Evolution and Development, 1(3): 53—165
- Lacalli T C, 2002. Sensory pathways in amphioxus larvae I. Constituent fibres of the rostral and anterodorsal nerves, their targets and evolutionary significance. Acta Zoologica (Stockholm), 83: 149—166
- Lacalli T C, Hou S F, 1999. A reexamination of epithelial sensory cell of amphioxus. Acta Zoologica (Stockholm), 80: 125—134
- Lacalli T C, Kelly S J, 1994. Somatie motoneurons in amphioxus larvae: cell types cell position and innervation patterns. Acta Zoologica (Stockholm), 4: 113—124
- Lacalli T C, Kelly S J, 2002. Floor plate, glia and other support cells in the anterior nerve cord of amphioxus larvae. Acta Zoologica (Stockholm), 83: 87—98
- Lacalli T C, Kelly S J, 2003. Sensory pathways in amphioxus larvae II. Dorsal tracts and transluminal cells. Acta Zoologica (Stockholm), 84: 1—13
- Pang Q X, Zhang S C, Liu X M *et al*, 2006. Humoral immune responses of amphioxus *Branchiostoma belcheri* to challenge with *Escherichia coli*. Fish and Shellfish Immunology, 21: 139—145
- Zouros E, Foltz D W, 1984. Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve mollusks. Malacologia, 25(2): 583—591

HETEROZYGOSITY OF FOUR POPULATIONS OF *BRANCHIOSTOMA BELCHERI* GRAY IN XIAMEN

CHEN Jin, LI Zhong-Bao, ZHAO Bin-Li, LEI Guang-Gao, ZHANG Gui-Ling, WANG Zhan-Lin

(Fishery College, Jimei University, Xiamen, 361021; Institute of Aquaculture Biotechnology, Jimei University, Xiamen, 361021; Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety, Fujian Province University, Xiamen, 361021)

Abstract Heterozygosity of *Branchiostoma belcheri* Gray in Xiamen was investigated using vertical slab polyacrylamide gel electrophoresis. Seven enzymes presumably encoded by 14 allozyme loci in *B. belcheri*. They are *Aat-1*, *Amy-1*, *Amy-2*, *Amy-3*, *Amy-4*, *Me-1*, *Me-2*, *Mdh-1*, *Mdh-2*, *Sod-1*, *Sod-2*, *Est-1*, *Est-2*, and *Per-1*, of which 8 loci are polymorphic, they are *Sod-1*, *Aat-1*, *Me-1*, *Me-2*, *Mdh-1*, *Mdh-2*, *Est-2*, *Amy-2*. The genotypic distribution observed at *Me-1*, *Mdh-1* and *Est-2* in all populations and *Amy-2* in East of Southern line to 18 population was in agreement with those expected by the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) ($P>0.05$); but *Sod-1*, *Mdh-2*, *Me-2* and *Aat-1* loci in all populations and *Amy-2* in other three populations were significant departed from those expected from HWE ($P<0.05$). Heterozygote deficiency in *Amy-2* locus in East of Southern line to 18 and Huangcuo populations ($F>0$) and heterozygote excess in other polymorphic loci ($F<0$) were also revealed among populations. The heterozygote deficiency resulting from natural selection, inbreeding effects, presence of null allele and so on would cause disappearance of allele, lower genetic diversity and lower environmental adaptation ability.

Key words *Branchiostoma belcheri*, Allozyme, Heterozygote deficiency, Heterozygote excess