

三疣梭子蟹4个野生群体遗传差异的同工酶分析

樊祥国¹ 高保全² 刘萍^{2*} 李健²

(¹ 中国海洋大学生命科学与技术学部, 青岛 266003)

(² 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘要 采用聚丙烯酰胺不连续凝胶垂直电泳技术对三疣梭子蟹 *Portunus trituberculatus* 4个野生群体(鸭绿江口、莱州湾、海州湾和舟山)的同工酶进行检测, 分析群体间的生化遗传差异。结果发现(1) 4个群体的多态座位百分数($P_{0.99}$)分别为: 鸭绿江口 13.6%、莱州湾 13.6%、海州湾 13.6%和舟山 13.6%。(2) 4个群体间的生化遗传差异不显著, 4个群体间的遗传距离 $D=0.00054\sim 0.00170$, 属种内群体间差异。(3) 聚类分析表明: 4个群体分为两组, 海州湾和舟山两群体之间的亲缘关系最近, 聚为一组。莱州湾和鸭绿江口群体亲缘关系比较近, 聚为另一组。

关键词 三疣梭子蟹 野生群体 同工酶 遗传差异

中图分类号 Q78 **文献标识码** **文章编号** 1000-7075(2009)04-0084-06

Genetic variation analysis of four wild populations of *Portunus trituberculatus* by isozyme

FAN Xiang-guo¹ GAO Bao-quan² LIU Ping^{2*} Li Jian²

(¹ College of Life Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003)

(² Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

ABSTRACT Vertical polyacrylamide gel electrophoresis was used to investigate the genetic variation of isozyme of *Portunus trituberculatus*. Four wild geographic populations distributed in the Yalujiangkou(YL), Laizhou Bay(LZ), Zhoushan(ZS) and Haizhou Bay(HZ) (48 individuals each) were surveyed. Of 22 loci encoding 11 enzymes, three were polymorphic. The results showed that: (1) the mean proportion of polymorphic loci($P_{0.99}$) of YL, LZ, ZS and HZ were 13.6%, 13.6%, 13.6% and 13.6%, respectively; (2) there were no significant differences in biochemical genetic characteristics of the *P. trituberculatus* among four wild geographic populations. The genetic divergences (D_{nei}) among the four wild geographic populations ranged from 0.00054 to 0.00170, which were lower than that between subspecies; (3) dendrogram constructed based on the genetic distances among the four populations showed that there were two different groups: one being composed of YL and LZ and the other of ZS and HZ.

国家高技术研究发展计划项目“863”(2006AA10A406)、国家自然科学基金项目(30871933)和青岛市科技计划项目(07-2-3-5-jch)共同资助

* 通讯作者。E-mail: liuping@ysfri.ac.cn

收稿日期:2008-01-16;接受日期:2008-03-29

作者简介:樊祥国(1966-),男,博士,主要从事海水养殖生物病害研究。

KEY WORDS *Portunus trituberculatus* Wild populations Isozyme
Genetic diversity

三疣梭子蟹 *Portunus trituberculatus* 俗称海蟹或梭子蟹,属于甲壳纲、十足目、梭子蟹科,分布于中国、朝鲜和日本等海域(戴爱云等 1977,1986),是我国沿海重要的渔业养殖对象。国内外有关三疣梭子蟹的养殖、生理生态和胚胎发育等方面已经作了较多的研究;有关其遗传特性的研究主要有以下工作。郭天慧等(2004)对三疣梭子蟹的 16S rRNA 和 COI 基因片段序列进行分析,发现其种内变异较低,在 3 个样本中 16S rRNA 基因片段序列完全一样,COI 基因片段中也只有 2 个 T/C 位点转换。余红卫等(2005)采用垂直板状聚丙烯酰胺凝胶电泳分析技术,分析了三疣梭子蟹雌性成体 6 种组织中的 10 种同工酶的分化表达模式,并对各种同工酶位点表达及酶谱表型进行了分析,结果显示三疣梭子蟹的同工酶系统具有明显的组织特异性。朱冬发等(2005)研究了三疣梭子蟹个体发育早期(从未受精卵到第一期幼蟹)11 种同工酶酶谱的变化,结果三疣梭子蟹 EST、ME、MDH、SDH、GOT、ACP 和 AMY 等 7 种同工酶酶谱显示了明显的发育阶段差异性,大都随发育渐趋复杂。朱冬发等(2005)以成熟卵、精巢、胚胎及蚤状幼体等为材料进行了三疣梭子蟹染色体数目和核型的研究。结果显示:精巢最适宜进行染色体计数,卵内蚤状幼体最适宜核型分析,染色体数目是 $2n=106$, $n=53$ 。但是不同群体生化遗传方面的差异研究尚未见报道。因此,本文对三疣梭子蟹 4 个野生群体的同工酶进行了比较分析,以期三疣梭子蟹地理种群的识别、亲缘关系、种质资源保护和遗传育种提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 材料

三疣梭子蟹 4 个群体的样品于 2005 年 10 月中旬分别取自:丹东鸭绿江口(YL)、渤海莱州湾(LZ)、连云港海州湾(HZ)和浙江舟山群岛(ZS)。每个群体各 48 只。体质量(平均值±标准差) 176.7 ± 30.2 g,雌、雄比例 1:1。活体解剖,取适量大螯肌肉,编号,快速放入 -70 °C 超低温冰箱中保存。

1.2 电泳方法

1.2.1 电泳材料

取适量肌肉,分别加入约 3 倍体积的 0.05% 巯基乙醇组织提取缓冲液,在冰浴条件下匀浆, 4 °C 离心机中 $12\ 000$ r/min 离心 30 min,取上清液,按需要量分装入小管中置于 -70 °C 超低温冰箱备用。

1.2.2 方法

采用不连续聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳。电泳在 4 °C 冰箱中进行。对凝胶浓度、电压、电极缓冲液、点样量和染色条件进行摸索和优化,最终确立电泳参数。

凝胶浓度(T): $T_{\text{浓缩胶}} = 3.6\%$ (pH 6.7), $T_{\text{分离胶}} = 8.2\%$ (pH 8.9),电压:Tris-甘氨酸(TG, pH 8.3)系统,恒压 280 V,电泳时间 5-7 h,点样量根据酶种类而不同。染色参照王中仁(1998)和胡能书等(1985)的方法。

1.3 结果记录

同工酶的缩写、基因座位和等位基因的命名基本参照 Shaklee 等(1990)和 Whitmore(1990)方法。以同工酶缩写名称的大写代表酶蛋白,小写代表编码基因。控制同一种酶的不同基因座位按照从阳极到阴极的顺序依次标记为 1、2、3...,同一基因座位的不同等位基因按照从阳极到阴极的顺序依次标记为 a、b、c...

1.4 数据处理

采用参考王中仁(1998)和曾呈奎等(1998)介绍的数理统计方法

(1)多态座位比例(P)

$$P = \text{多态座位数} / \text{所测座位总数} \times 100\%$$

多态座位以其主要的等位基因频率低于 0.99 为标准 (Nei 1972)

(2) 平均每个座位的有效等位基因数目 (A_e)

$$A_e = \sum (1 / \sum q_i^2) / n$$

式中, q_i 为第 i 个等位基因的频率, n 为所测座位的总数。

(3) 平均每个座位的观测杂合度 H_o 和预期值 H_e

H_o = 观察到的杂合个体数 / 观察的个体总数

$$H_e = \sum_{i=1}^n (1 - \sum_{j=1}^{m_i} q_{ij}^2) / n$$

q_{ij} 第 i 个座位上第 j 个等位基因的纯合基因型的频率, m_i 第 i 个位点上所测定到的等位基因的总数, n 所测定的位点的总数。

(4) 遗传距离 D

$$D = -\ln I$$

I 为两群体间的遗传一致度。 I 使用 Nei(1972) 的公式计算。

(5) 聚类分析

根据遗传距离用 UPGMA 软件对四个群体进行聚类分析。

2 结果

2.1 三疣梭子蟹 4 个群体同工酶表达

三疣梭子蟹同工酶电泳图谱见图 1。4 个群体同一种酶的表型相同, 所以只给出舟山群体的电泳图谱以节约篇幅。

2.1.1 苹果酸酶 (ME) 四聚体酶。在三疣梭子蟹 4 个群体中均观察到 4 个基因座位。 $Me-1$ 、 $Me-2$ 、 $Me-4$ 为单态。 $Me-3$ 是个多态座位, 由 a、b 2 个等位基因编码。电泳图谱见图 1-A。

2.1.2 山梨醇脱氢酶 (SDH) 单聚体酶。三疣梭子蟹 4 个群体中均观察到 1 个基因座位, 为单态。电泳图谱见图 1-B。

2.1.3 超氧化物歧化酶 (SOD) 二聚体和四聚体酶。三疣梭子蟹的超氧化物歧化酶表现为二聚体酶。三疣梭子蟹 4 个群体中均观察到 3 个基因座位。 $Sod-1$ 、 $Sod-2$ 均为单态。 $Sod-3$ 是个多态座位, 观察到 2 个等位基因 a、b 和 1 种基因型 ab。电泳图谱见图 1-C。

2.1.4 过氧化物酶 (POD) 二聚体酶。三疣梭子蟹 4 个群体中均观察到 1 个基因座位, 为单态。电泳图谱见图 1-D。

2.1.5 乳酸脱氢酶 (LDH) 四聚体酶。三疣梭子蟹 4 个群体中均观察到 2 个基因座位, 其中 $Ldh-2$ 为多态座位, 4 个群体均有 aa、ab 两种基因型。 $Ldh-1$ 4 个群体均为单态。电泳图谱见图 1-E。

2.1.6 乙醇脱氢酶 (ADH) 二聚体酶。在三疣梭子蟹 4 个群体中只观察到 1 个基因座位。均为单态。电泳图谱见图 1-F。

2.1.7 酯酶 (EST) 单聚体酶。三疣梭子蟹 4 个群体中均观察到 2 个基因座位, 均为单态。电泳图谱见图 1-G。

2.1.8 过氧化氢酶 (CAT) 四聚体酶。三疣梭子蟹 4 个群体中均观察到 4 个基因座位, 均为单态。电泳图谱见图 1-H。

2.1.9 异柠檬酸脱氢酶 (IDH) 二聚体酶。三疣梭子蟹 4 个群体中均观察到 1 个基因座位, 为单态。电泳图谱见图 1-I。

2.1.10 天冬氨酸脱氢酶 (AAT) 二聚体酶。三疣梭子蟹 4 个群体中均观察到 1 个基因座位, 为单态。电泳图谱见图 1-J。

2.1.11 苹果酸脱氢酶(MDH)二聚体酶。在三疣梭子蟹 4 个群体中均观察到线粒体型(m-Mdh)和上清液型(s-Mdh)。两种类型各由 1 个基因座位编码,均为单态。电泳图谱见图 1-K。

2.2 4 个三疣梭子蟹群体的遗传参数

2.2.1 三疣梭子蟹 4 个群体同工酶的等位基因频率

三疣梭子蟹 4 个野生群体共检测到 22 个基因座位。所测基因座位及其等位基因频率见表 1。

根据表 1 的统计结果,经计算得到 4 个三疣梭子蟹群体的多态座位比例(P)、平均每个座位的有效等位基因数目(A_e)、平均每个座位的观测杂合度 H_o 和预期值 H_e 4 项遗传参数,如表 2 所示。

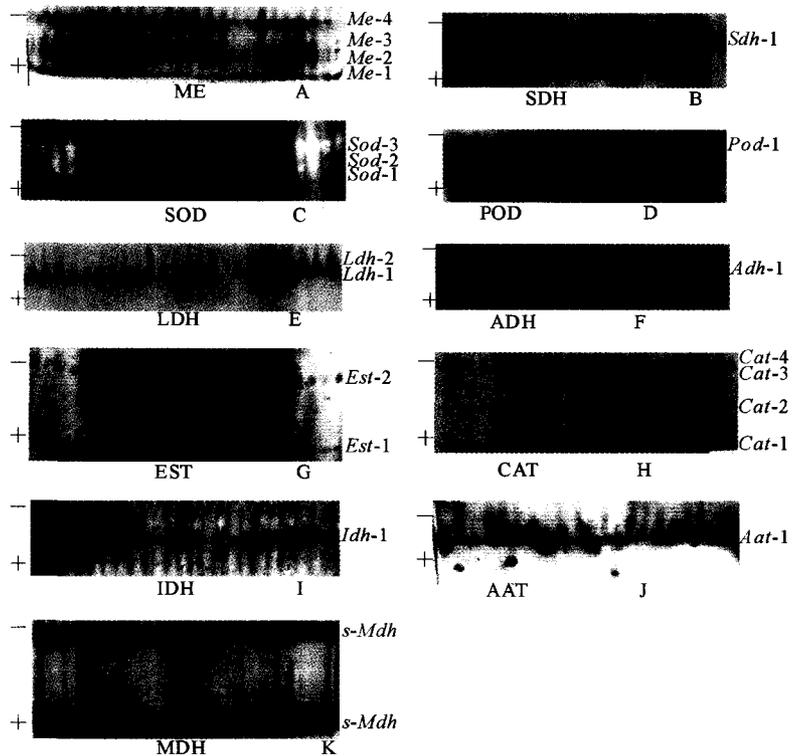


图 1 三疣梭子蟹同工酶的电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretic pattern of 11 *P. trituberculatus* isozymes

表 1 4 个三疣梭子蟹 4 个群体实测基因位点及其等位基因频率

Table 1 Observed loci and allelic frequencies of enzymes of four *P. trituberculatus* populations

基因位点 Locus	等位基因 Allele	群体 Population			
		YL	LZ	ZS	HZ
<i>Pod-1</i>	a	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>s-Mad-1</i>	a	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>m-Mad-1</i>	a	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>Sdh-1</i>	a	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>Ldh-1</i>	a	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>Ldh-2</i>	a	0.906	0.938	0.750	0.885
	b	0.094	0.062	0.250	0.115
<i>Sod-1</i>	a	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>Sod-2</i>	a	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>Sod-3</i>	a	0.500	0.500	0.500	0.500
	b	0.500	0.500	0.500	0.500
<i>Est-1</i>	a	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>Est-2</i>	a	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>Cat-1</i>	a	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>Cat-2</i>	a	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>Cat-3</i>	a	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>Cat-4</i>	a	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>Adh-1</i>	a	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>Idh-1</i>	a	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>Me-1</i>	a	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>Me-2</i>	a	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>Me-3</i>	a	0.591	0.614	0.568	0.573
	b	0.409	0.486	0.432	0.427
<i>Me-4</i>	a	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>Aat-1</i>	a	1.000	1.000	1.000	1.000

表2 4个群体的遗传参数
Table 2 Genetic parameters of four *P. triuberbuculatus* populations

遗传参数 Genetic parameter	Population			
	YL	LZ	ZS	HZ
$P(\%)$	13.6	13.6	13.6	13.6
A_e	1.097	1.080	1.116	1.101
H_o	0.091	0.086	0.107	0.095
H_e	0.052	0.046	0.062	0.054

由上表可知,4个群体的多态位点为13.6%,平均每个座位的等位基因的有效数目为1.080~1.116,平均每个座位的实际杂合度为0.086~0.107,平均每个座位的预期杂合度为0.046~0.062。

2.2.2 三疣梭子蟹4个群体间的遗传距离

表3列出了4个群体间的遗传相似度和遗传距离值。对角线上的部分表示各群体之间的遗传距离,对角线下面的部分表示各群体之间的遗传相似度。其中海州湾和舟山两群体之间遗传距离最小为0.00054,其次为鸭绿江口和莱州湾之间为0.00072。

表3 三疣梭子蟹4个群体的遗传相似度和遗传距离
Table 3 Genetic similarities and genetic distances of four *P. triuberbuculatus* populations

群体 Population	YL	LZ	ZS	HZ
YL		0.00072	0.00162	0.00170
LZ	0.99928		0.00115	0.00089
ZS	0.99838	0.99885		0.00054
HZ	0.99830	0.99911	0.99946	

根据遗传距离值,用UPGMA软件进行聚类分析。如图2。

4个群体分为两组,一组为南方的海州湾和舟山两群体,另一组为北方莱州湾和鸭绿江口两群体。

3 讨论

3.1 三疣梭子蟹4群体的亲缘关系及差异的原因探讨

王家玉(1975)翻译的分子群体遗传学和进化论一书中提到群体间的遗传距离的范围为0~0.05,亚种间遗传距离为0.02~0.2;本研究结果是:三疣梭子蟹鸭绿江口、莱州湾、舟山、海州湾4群体间的遗传相似度高($I=0.99830\sim0.99946$),遗传距离小($D=0.00054\sim0.00170$)。按上述标准,4群体同属三疣梭子蟹的不同地理群体。

另外舟山和海州湾2个群体遗传距离最小,为0.00054。其次为鸭绿江口和莱州湾2群体,遗传距离为0.00072。此结果与4个群体的地理距离基本相符,也与高保全等(2007)对三疣梭子蟹4个野生群体形态差异分析结果一致。

莱州湾三疣梭子蟹群体生活于封闭性强的渤海(薛俊增等 1997),该群体是个地方性种群,越冬后,在4月上中旬开始生殖洄游,繁殖场所为渤海湾和莱州湾近岸浅水区河口附近;12月初开始越冬洄游,越冬场所为渤海深水区,至来年3月(邓景耀等 2001;中国海洋渔业资源编写组 1986)。整个生命活动主要局限于渤海之内。这就同南方两个群体(舟山、海州湾)之间产生了地理隔离。由于不同海域环境所造成的生长温度和栖

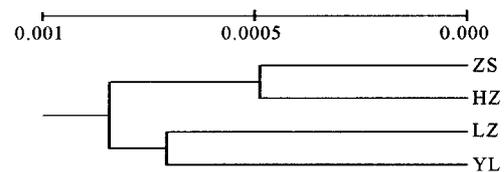


图2 4个三疣梭子蟹群体UPGMA聚类分析
Fig. 2 Unweighted pair group method analysis dendrogram of four *P. triuberbuculatus* populations

息底质等不同,以及盐度和饵料的不同,造成莱州湾和南方群体之间差异比较大。

鸭绿江群体和莱州湾群体遗传距离小,是因为它们生活的海域同属于暖温带,生长环境比较接近。南方两群体遗传距离比较小一方面是因为环境比较相似,另外还因为舟山群体三疣梭子蟹活动范围比较广,北可达黄海南部的吕泗、大沙渔场(宋海棠等 1989),可能与海州湾的三疣梭子蟹存在基因交流。

3.2 三疣梭子蟹的遗传多样性

常用的表示群体内变异水平的指标主要有多样位点的百分数、平均每个座位的等位基因的有效数目、平均每个座位的观测杂合度和预期值。4个群体的多样位点为13.6%,平均每个座位的等位基因的有效数目为1.080~1.116,平均每个座位的观测杂合度为0.086~0.107,平均每个座位的预期杂合度为0.046~0.062。Gao等(1998)研究结果表明,日本绒螯蟹的多样位点比例为13.6%,预期杂合度为0.021;中华绒螯蟹多样位点比例为18.2%,预期杂合度为0.034。对比可知,三疣梭子蟹的多样位点比例低于中华绒螯蟹,与日本绒螯蟹相同;平均每个座位的预期杂合度要高于中华绒螯蟹和日本绒螯蟹。综合这些数据表明三疣梭子蟹还处于种质资源维持较好的状态。

参 考 文 献

- 王中仁. 1998. 植物等位酶分析. 北京: 科学出版社
- 王家玉(译). 1975. 分子群体遗传学和进化论. 北京: 农业出版社
- 中国海洋渔业资源编写组. 1986. 中国海洋渔业资源. 杭州: 浙江科学技术出版社
- 邓景耀, 金显仕. 2001. 渤海越冬场渔业生物资源量和群落结构的动态特征. 自然资源学报, 16(1): 42~46
- 朱冬发, 王春琳, 李志强. 2005. 三疣梭子蟹核型分析. 水产学报, 29(5): 649~653
- 朱冬发, 余红卫, 王春琳. 2005. 三疣梭子蟹个体发育早期的同工酶谱变化. 水产学报, 29(6): 751~756
- 余红卫, 朱冬发, 韩宝芹. 2005. 三疣梭子蟹不同组织同工酶的分析. 动物学杂志, 40(1): 84~87
- 宋海棠, 丁耀平, 许源剑. 1989. 浙江近海三疣梭子蟹洄游分布和群体组成特征. 海洋通报, 8(1): 66~4
- 郭天慧, 孔晓喻, 陈四清, 等. 三疣梭子蟹线粒体 DNA 16S rRNA 和 CO I 基因片段序列的比较研究[J]. 中国海洋大学学报, 2004, 34(1): 22~28
- 胡能书, 万贤国. 1985. 同工酶技术及其应用. 长沙: 湖南科学技术出版社
- 高保全, 刘 萍, 李 健, 戴芳钰, 马 牲. 2007. 三疣梭子蟹4个野生群体形态差异分析. 中国水产科学, 14(2): 223~228
- 曾呈奎, 相建海. 1998. 海洋生物技术. 济南: 山东科技出版社, 238~309
- 薛俊增, 堵南山, 赖 伟. 1997. 中国三疣梭子蟹 *Portunus trituberculatus* Miers 的研究. 东南海洋, 15(1): 60~65
- 戴爱云, 冯钟琪, 宋玉枝. 1977. 三疣梭子蟹渔业生物资源的初步调查. 动物学杂志, (2): 30~33
- 戴爱云, 杨思琼, 宋玉枝. 1986. 中国海洋蟹类. 北京: 海洋出版社
- Gao, T., and Watanabe, S. 1998. Genetic Variation among local populations of the Japanese mitten crab *Eriocheir japonica* De Haan. Fisheries Science, 64(2): 198-205.
- Mitsugu, M., Yamauchi. 2003. Complete mitochondrial DNA sequence of swimming crab *Portunus trituberculatus* (Crustacea: Decapoda: Brachyura). Gene 311: 129-135.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between population. Am Nat, 106: 283-292.
- Shaklee, J. B., Allendorf, F W., and Morizot, D. C. 1990. Genetic Nomenclature for Protein-Coding Loci in Fish. Trans Am Fish Soci, 119: 2-15.
- Whitmore, D. G. 1990. Electrophoretic and isoelectric focusing technique in fisheries management. Boston: CPC Press