

文章编号:1000-0615(2004)04-0375-09

企鹅珍珠贝同工酶酶谱特征及其遗传分析

余祥勇^{1,2}, 王梅芳², 刘永², 梁飞龙², 毛勇², 桂建芳¹

(1. 中国科学院水生生物研究所淡水生态与生物技术国家重点实验室, 湖北 武汉 430072)

(2. 湛江海洋大学水产学院, 广东 湛江 524025)

摘要:采用垂直板状聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳分离技术,对企鹅珍珠贝闭壳肌、外套膜、鳃、消化盲囊、足组织的 SOD、EST、LDH、G6PDH、MDH、ME 6 种同工酶酶谱特征及其遗传控制进行了研究。6 种同工酶在不同组织中的表达有明显的差异,同工酶分析共检测到 18 个位点,其中有 16 个位点具多态性,群体中,多态位点比例为 88.8%,平均杂合度为 0.396 ± 0.029 。有 13 个多态位点上的基因型频率与 Hardy-Weinberg 定律相符($P > 0.05$),位点 *Ldh-1*、*Ldh-2*、*Sod-2* 极显著偏离该平衡($P < 0.01$)。在 *G6pdh-1* 位点发现较高频率的无效等位基因。

关键词: 企鹅珍珠贝; 酶谱特征; 位点; 多态性

中图分类号: S917 文献标识码: A

The peculiarities of zymogram and their genetic analysis in *Pteria penguin*

YU Xiang-yong^{1,2}, WANG Mei-fang², LIU Yong², LIANG Fei-long², MAO Yong², GUI Jian-fang¹

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. Fisheries College, Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Abstract: The wing pearl oyster *Pteria (Magnavacula) penguin* Röding is a kind of fast growing and large-sized bivalve species, which is distributed along the coastline of Hainan Island, Leizhou Peninsula and other waters in South China Sea. It has been identified as a candidate for bigger pearl cultivating but is not sufficiently prolific in the wild due to the depletion of its natural resources. Its hatchery techniques and the technology of producing mabe, imaging and round pearls from this oyster have been developed successfully recently. In order to discern the hereditary background for future genetic breeding of this species, vertical polyacrylamide gradient gel electrophoresis was used to analyze the peculiarity and genetic control of isozymes in *P. penguin*. SOD, EST, MDH, ME, LDH and G6PDH from five kinds of tissues (adductor muscle, mantle, gill, digestive gland and foot) were studied. The expression peculiarities of the above 6 isozymes were distinctly varied in different tissues. 18 loci were recorded, of which, 16 loci were polymorphous. In the examined population, the rate of polymorphic loci was 88.8%, and the average heterogeneity index was 0.396 ± 0.029 . The allelic frequencies of 13 loci were accordant with the Law of Hardy-Weinberg ($P > 0.05$), frequencies of other 3 loci, *Ldh-1*, *Ldh-2* and *Sod-2* were obviously deviated from the genetic equilibrium ($P < 0.01$), the reason of which for

收稿日期: 2003-07-07

资助项目: 广东省重点科技攻关项目(珍珠贝育贝与育珠全程技术研究 2KB05504N)

作者简介: 余祥勇(1966-), 男, 湖北武汉人, 副教授, 博士, 主要从事海产经济动物遗传育种研究。Tel: 0759-2382184, E-mail: yuxyong@Tom.com

Ldh - 1, *Ldh* - 2 was the deficiency of the heterozygosity, for *Sod* - 2 was that only hybrid present at this locus. At locus of *G6pdh* - 1, high frequency of null gene was discovered.

Key words: *Pteria penguin*; peculiarity of zymogram; loci; polymorphism

企鹅珍珠贝 (*Pteria (Magnavacula) penguin* Röding) 是一种重要的海产经济软体动物, 生长在热带、亚热带海区, 主要分布在我国的广东、海南和广西、台湾沿海, 以及日本、菲律宾、印度尼西亚等地。其个体较大, 壳长可达 25 cm, 贝壳内表面珍珠层具虹彩光泽, 可培育品质较佳的大型附壳珍珠^[1], 并已培育出正圆珠, 成为我国南方养殖海水珍珠的贝类新品种。它硕大闭壳肌柱也是一种美味的海珍品。由于该贝生长速度快, 个体大, 生命力强, 珍珠质分泌旺盛, 养殖成本低, 是培育大型高品质珍珠的理想母贝^[2]。目前由于生产性全人工繁殖、养成和育珠已获成功^[3,4], 在海南及粤西南部海区, 这种新开发的珍稀品种的养殖已逐渐兴起, 使企鹅珍珠贝珍珠大规模生产成为可能。关于企鹅珍珠贝的研究报道相对较少, 主要集中在育苗和养成方面, 而其同工酶等生化遗传方面的研究则为空白。目前, 在其规模养殖刚刚兴起, 对它的种质资源状况不甚了解之时, 开展相关工作, 对了解其群体遗传结构和遗传多样性、制定种质标准, 开展优良品系的筛选、育种和资源保护, 以及保证企鹅贝珍珠养殖的持续发展具有重要的理论和实践意义。本文首次报道了企鹅珍珠贝 SOD、EST、LDH、G6PDH、MDH 和 ME 酶谱特征和生化遗传分析结果。

1 材料与与方法

1.1 材料来源与样品制备

实验贝均来自湛江海洋大学珍珠研究基地湛

江流沙港海上浮排, 实验取样 34 个体, 为海南陵水野生母贝的子一代, 贝龄 1.5 ~ 2.0; 体重 120 ~ 200g, 壳长 9.0 ~ 11.9cm。

实验贝活体剖开, 取鳃、消化盲囊、闭壳肌、外套膜、足组织, 将组织按体积 1:3 (组织: 双蒸水) 比例冰浴匀浆, 置 4℃ 下过夜后, 4℃, 10 000 r·min⁻¹ 离心 15min, 上清液置 -20℃ 保存备用。

1.2 电泳、染色及酶谱分析

采用垂直板聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳, 胶的制备及 SOD、EST、MDH 和 LDH 同工酶显色法均参考文献[5], ME、G6PDH 的染色方法参考文献[6], 略作修改, 4℃、恒压 200V 条件下进行电泳。缓冲系统为 TVB (三羟甲基氨基甲烷 0.178mol·L⁻¹, 乙二胺四乙酸二钠 4.968mmol·L⁻¹, 硼酸 0.178mol·L⁻¹, pH 为 8.4)。其凝胶梯度见表 1, 酶谱分析参考文献[6,7]。

编码酶的基因位点以该酶缩写的斜体表示, 对于 2 个以上位点编码的酶, 则各位点按其从阴极向阳极迁移的顺序命名为 1, 2, ..., 各位点等位基因命名以 a, b, c, ... 表示。电泳原始数据用来计算基因型频率、等位基因频率、多态位点比例、多态位点杂合度、Hardy-Weinberg 平衡下的不同基因型个体的预期值、杂合度预期值, 并作显著性检测。其中“多态位点”的标准为 0.99。

表 1 所分析酶与电泳条件及分析结果

Tab.1 Analyzed enzyme, gel concentration and encoded gene loci

同工酶 enzyme	酶编码 code of enzyme	凝胶梯度 gel concentration	亚基数 subunit number	位点数 loci number	位点状态 loci status
超氧化物歧化酶(SOD)	EC 1.15.1.1	4% ~ 30%	2	3	1M 2P
酯酶(EST)	EC 3.1.1.1	4% ~ 30%	1 或 2	7	1M 6P
苹果酸脱氢酶(MDH)	EC 1.1.1.37	4% ~ 30%	2	2	2P
苹果酸酶(ME)	EC 1.1.1.40	4% ~ 15%	4	2	2P
乳酸脱氢酶(LDH)	EC 1.1.1.27	4% ~ 15%	2	2	2P
葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)	EC 1.1.1.49	4% ~ 15%	2	2	2P
总计(amount)				18	2M 16P

注: M 为单态位点, P 为多态位点

Notes: M - monomorphic, P - polymorphic

2 结果与分析

2.1 酶谱分析

2.1.1 超氧化物歧化酶(SOD) SOD同工酶由3个位点编码,均为二聚体酶,不同位点的亚基间互不缔合(图版 I-1,2,3)。

Sod-1 位点编码的酶活性较弱,由相同的一对等位基因控制,群体中呈单态性,表现为1条酶带(纯合型)。

Sod-2 位点编码的酶,活性较强,由2个等位基因控制,酶谱呈现1:2:1的3条酶带(杂合型),为多态位点。

Sod-3 位点在企鹅珍珠贝外套膜组织中表现为1条酶带或无,推测是由一对等位基因编码的二聚体酶,其中有1个基因为哑等位基因,不表达或表达极弱,因哑等位基因的纯合子不能产生电泳带,而活性基因的纯合子及两基因的杂合子均产生1条酶带,后者电泳带较弱。

SOD酶的表达在不同组织中有明显差异,消化盲囊中检测到2个表达位点,其中*Sod-3*表达微弱,而*Sod-2*的表达很强;在鳃组织中无*Sod-3*的表达;外套膜组织中检测到3个位点,其中*Sod-2*、*Sod-3*的表达明显;后闭壳肌中检测到*Sod-1*的微弱表达和*Sod-2*的明显表达。*Sod-2*活性在所检测组织中均较其它2位点表达要强,但在不同组织中有差异:消化盲囊中活性最高,鳃组织中次之,外套膜、足、闭壳肌中较低。而*Sod-1*、*Sod-3*的表达与否存在组织差异。

2.1.2 酯酶(EST) EST同工酶的编码位点至少有7个,其中1个为单态位点,6个为多态位点,其编码的酶为6个单体酶和1个二聚体酶(图版 I-4,5,6)。

Est-1 位点编码的酶为单体酶,群体为单态位点,由1对相同的等位基因控制,表现为1条酶带(纯合型)。

Est-2 位点编码单体酶,活性较强,有2个等位基因,呈多态,由1或2条酶带组成(纯合型或杂合型)。

Est-3 位点编码的酶也为单体酶,多呈现1条酶带(纯合型),但不同个体其迁移率有差异,呈多态性,至少有2个等位基因控制(图版 I-4)。

Est-4 位点编码单体酶,活性很强,由2个等位基因控制,呈多态性,由1或2条酶带组成(纯合型或杂合型)。

Est-5 位点编码二聚体酶,活性强,由2个等位基因(a,b)控制,呈多态性。由1~3条酶带组成(纯合型或杂合型)。其表达形式是多样的,外套膜中检测到3条酶带(图版 I-5),表现为杂合子二聚体酶的酶谱特征;闭壳肌组织中1~2条酶带(图版 I-6),为二聚体酶的1条同聚体酶带(AA)和1条异聚体酶带(AB),可能b基因表达活性较低而缺BB型同聚体酶带;而消化盲囊、鳃组织的1或2条均为同聚体酶带(AA、BB)(图版 I-4),缺失异聚体酶带AB,这可能因基因表达时间上的差异而失去不同亚基间缔合的机会或在该组织中异聚体不稳定、活性低而未检测到。

Est-6 位点编码单体酶,由1或2条酶带组成(纯合型或杂合型),多态性位点,由3个复等位基因控制(图版 I-6)。

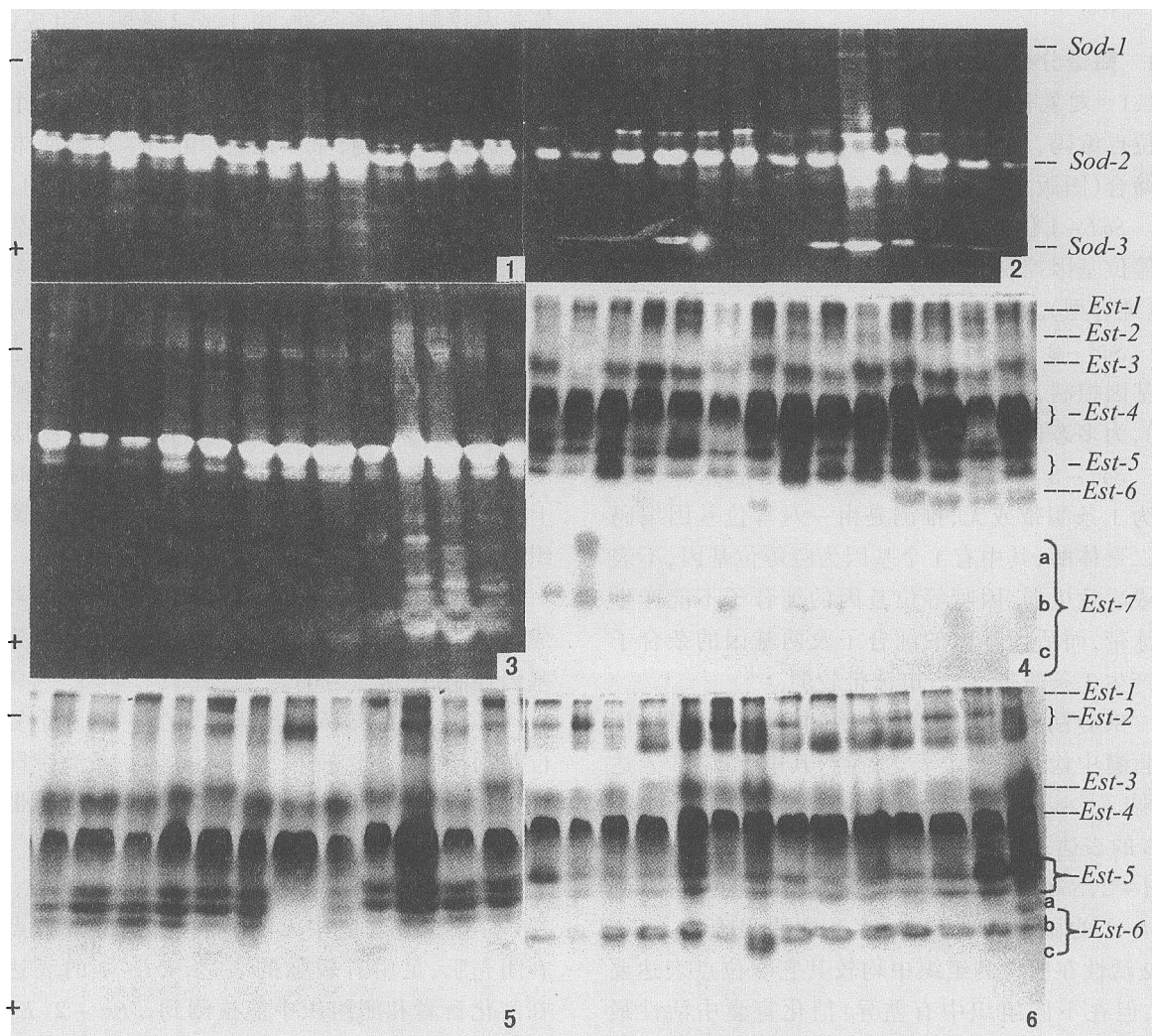
Est-7 位点编码单体酶,活性弱,由3个复等位基因控制,呈多态性,多数个体为1条酶带即纯合型,少量为2条酶带的杂合型。个体间酶带迁移率明显不同(图版 I-4)。

EST在不同组织中的表达有明显的不同,*Est-1*位点在外套膜中无明显表达,*Est-6*位点只在闭壳肌、足中有较强的表达,*Est-7*的表达仅在消化盲囊和鳃组织中能检测到,*Est-2*、*Est-3*、*Est-4*、*Est-5*,4个位点在所测组织中均有表达。*Est-4*、*Est-5*有很强的表达活性,在消化盲囊中的活性最强,鳃、足组织次之,闭壳肌和外套膜中的活性较弱。即EST同工酶在组织中的表达差异主要表现在位点*Est-1*、6、7的表达与否及*Est-4*、*Est-5*表达的活性强弱上。

2.1.3 乳酸脱氢酶(LDH) 企鹅珍珠贝LDH同工酶由2个位点控制,二聚体酶,不同位点编码的亚基间互相不能缔合(图版 II-1,2)。

Ldh-1、*Ldh-2*两位点基本上都表现为1条纯合型酶带,但不同个体其迁移率不同,推断各由2个等位基因决定,为多态位点,杂合子严重缺失。

不同组织LDH的表达有很大差异:*Ldh-1*、*Ldh-2*在闭壳肌、消化盲囊中均有表达,且在闭



图版 I 企鹅珍珠贝同工酶电泳图谱

Plate I Zymogram of *Pteria penguin*

1~3: SOD 同工酶电泳图谱; 4~6: EST 同工酶电泳图谱

1. 消化盲囊, 2. 外套膜, 3. 闭壳肌, 4. 鳃组织, 5. 外套膜, 6. 闭壳肌

1-3. zymogram of SOD; 4-6. zymogram of EST

1. digestive gland, 2. mantle, 3. adductor muscle, 4. gill, 5. mantle, 6. adductor muscle

壳肌组织中活性较强, 而外套膜组织中两位点的表达活性极低, 鳃组织中只检测到 *Ldh-1* 的表达。

2.1.4 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G6PDH)

G6PDH 同工酶检测到 2 个位点, *G6pdh-1* 的表达活性较 *G6pdh-2* 强 (图版 II-3, 4)。

G6pdh-1 编码的二聚体酶, 在消化盲囊组织中表现为 1 条酶带或无, 且这条被检测到的酶带在不同个体呈现出不同的迁移率, 推测该位点为

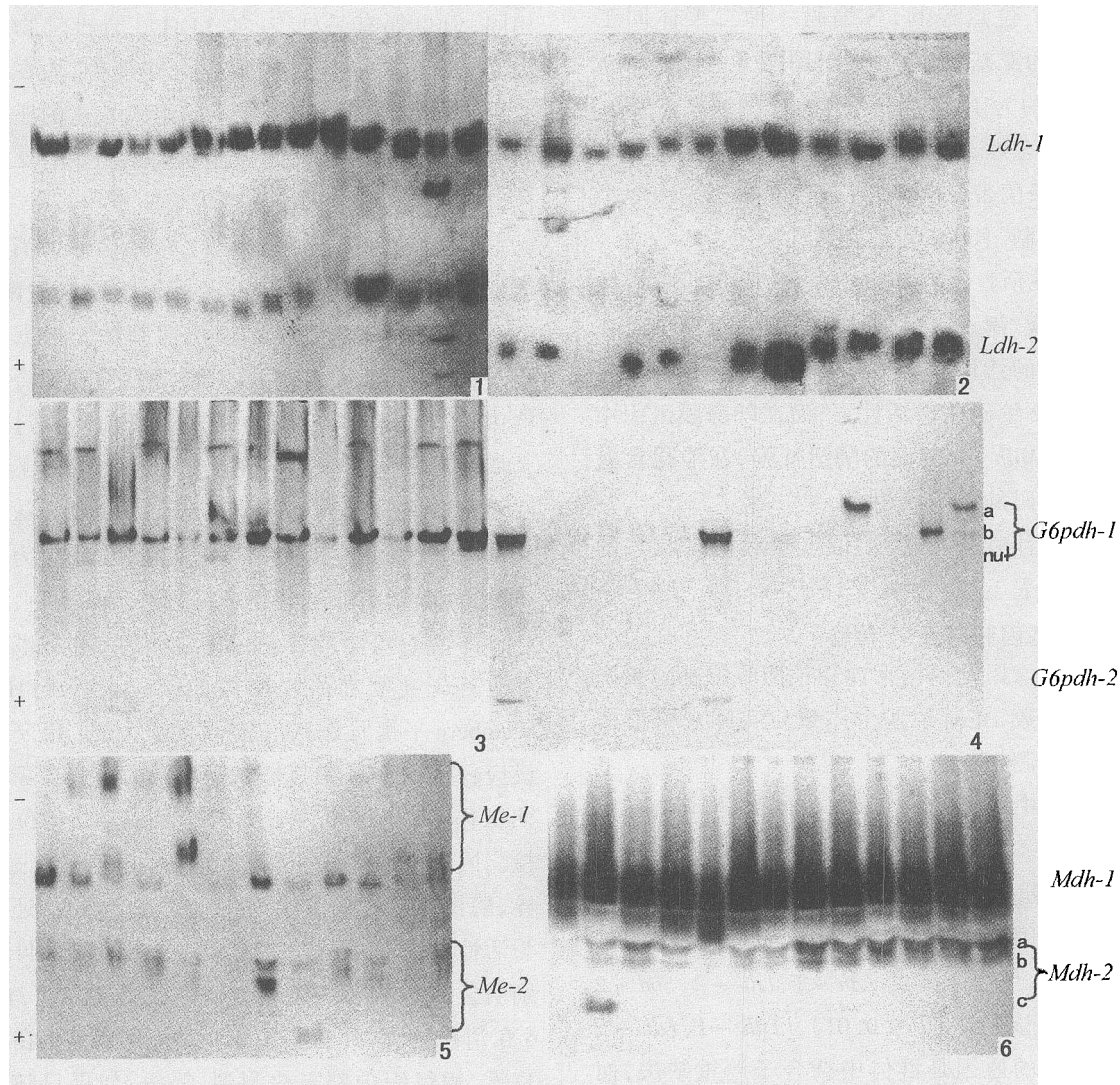
多态位点, 在群体中至少存在 3 个复等位基因, 且其中之一为哑等位基因, 即该位点具有 2 个等显性基因和 1 个哑等位基因。酶带为显性同型合子或含哑等位基因的杂型合子的电泳表型, 当为哑等位基因的纯合子时, 不产生电泳带。 *G6pdh-2* 编码的酶在所测个体中表现为迁移率相同的 1 条酶带或无, 推测由两个基因决定, 其中之一为哑等位基因, 群体也为多态位点。但表达不稳定。

不同组织的 G6PDH 同工酶的表达有差异: 虽

在消化盲囊、鳃、闭壳肌组织中均有 G6pdh - 1、G6pdh - 2 编码的酶,且 G6pdh - 1 的表达活性强,但同工酶活性在消化盲囊、闭壳肌组织中较强;鳃组织中较弱而在外套膜组织中未检测到明显的酶

带。

2.1.5 苹果酸酶(ME) ME为四聚体酶,由2个位点编码,位点间的亚基互相不缔合(图版 II - 5)。



图版 II 企鹅珍珠贝同工酶电泳图谱

Plate II Zymogram of *Pteria penguin*

1-2:LDH 同工酶电泳图谱;3-4:G6PDH 同工酶电泳图谱;5:ME 同工酶电泳图谱;6:MDH 同工酶电泳图谱

1.消化盲囊,2.闭壳肌,3.闭壳肌,4.消化盲囊,5.闭壳肌,6.闭壳肌

1-2. zymogram of LDH;3-4. zymogram of G6PDH;5. zymogram of ME;6. zymogram of MDH

1. digestive gland, 2. adductor muscle, 3. adductor muscle, 4. digestive gland, 5. adductor muscle, 6. adductor muscle

Me - 1、Me - 2 编码的酶都呈现出迁移率不同的 1 条或几条酶带,这 1 条或几条酶带分别代表基因型为纯合或杂合型个体的酶谱,推断群体

中 2 个位点都分别由 3 个等位基因控制,呈多态性。

只在闭壳肌肌肉组织中检测到明显的 ME 同

工酶酶带,外套膜组织中只检测到 *Me-1* 的微弱表达,而在消化盲囊、鳃组织中未检测到酶带,说明在这种检测条件下,这 2 种组织中的 *ME* 活性极低。

2.1.6 苹果酸脱氢酶(MDH) 企鹅珍珠贝的 MDH 由 2 个位点控制,各编码一种二聚体同工酶,位点间的亚基互相不缔合(图版 II-6)。*Mdh-1* 编码的酶为 1~3 条酶带(纯合型或杂合型),群体中呈多态性,存在 2 个等位基因;*Mdh-2* 表达为 1~3 条酶带(纯合型或杂合型),至少由 3 个等位基因控制,其 MDH 呈多态性。

MDH 在活性上存在组织差异:闭壳肌中活性最强,外套膜、鳃、消化盲囊组织次之;且两位点在不同组织中的活性强弱有差异:闭壳肌中 *Mdh-1* 较 *Mdh-2* 编码的酶活性强,而在外套膜组织中 *Mdh-2* 较 *Mdh-1* 编码的酶活性强,在消化盲囊中两位点编码的酶活性相当。

上述 6 种酶的亚基数,位点数和位点状态的分析结果见表 1。

2.2 等位基因频率及 χ^2 检验

利用电泳原始数据来计算预期等位基因频率和预期个体数,并对预期个体数与实际观察值作 χ^2 显著性检测(表 2)。

从表 2 中可见,企鹅珍珠贝同工酶座位有丰富的多态性。此次分析的 6 种同工酶中,共检测到 18 个座位,其中多态位点 16 个,有 13 个多态位点上的基因型频率与 Hardy-Weinberg 定律相符 ($P > 0.05$),另 3 个位点 *Ldh-1*、*Ldh-2*、*Sod-2* 极显著偏离该平衡 ($P < 0.01$)。*Ldh-1*、*Ldh-2* 极显著偏离的原因是群体中杂合子严重缺失,而 *Sod-2* 位点则全为杂合子。群体中,多态位点比例为 88.8%,平均杂合度为 0.396 ± 0.029 。

3 讨论

3.1 影响同工酶分析结果的主要因素

同工酶分析结果受多方面因素的影响,其中主要的有:酶谱分析所参考的已有的相关信息,样本取材的完备程度,研究材料处理、电泳和显色方法等实验条件。

确定研究对象酶蛋白的亚基数、编码这些酶的基因位点数是酶谱分析的重要内容,但这些信息并不是很容易获得的,而从相近分类单元已有的相关信息中来推测是很有效的途径之一。一般而言,编码一种酶系的座位数在纲以下阶元中都相同,但也偶有另外^[7],如 LDH 在脊椎动物中多为 2 个座位,其它动物中多为 1 个座位,而在本研究中,企鹅珍珠贝 LDH 在不同组织表达的座位数就有差异:消化盲囊、闭壳肌肌肉组织中有 2 个座位,而在鳃组织中只检测到 1 个座位。

对 LDH 亚基数的确定上,企鹅珍珠贝消化盲囊、鳃、闭壳肌组织中均表现出 1 条纯合型酶带,杂合子缺失,无法直接判读出亚基数。根据现有资料,该同工酶大多数为四聚体酶,但在无脊椎动物中也有二聚体或单体^[7],对照我们研究过的与企鹅珍珠贝同属于异形亚纲(Pteriamorphia)的栉江珧^[8]和同为珍珠贝科(Pteriidae)的马氏珠母贝酶谱(待发表),推断企鹅珍珠贝的 LDH 应为二聚体酶,但确切的亚基数还有待进一步证实。

酶谱的判读带有一定的主观性,对酶谱的解释应首先建立在研究群体的该位点处于 Hardy-Weinberg 平衡状态这一零假设上,与此相反假设应仔细检验。尤其是在一个新的研究对象的初期工作中,应尽量多分析几个组织,以免位点漏检。因不同组织中,位点的表达可能存在很大差异,酶谱差异不仅表现为位点的表达与否,还表现为活性的强弱不同,这种现象在企鹅珍珠贝中特别明显,如 *Sod-3* 在外套膜中有明显表达,*Est-6* 在消化盲囊、外套膜中未见表达,*Me-1* 在消化盲囊、鳃组织中均未检测到,等等,如果只随机在一或两个组织中进行检测并作分析,结果可能是不全面的。另外,样本数量的多少,也影响着对酶谱判读的准确性,因个体间表达有差异,仅根据少量几个样本的酶谱来做判断,可能会失去某些信息,尤其是一些稀有基因会漏检掉,如外套膜中的 *Sod-3*、闭壳肌组织的 *Est-5* 等位点“沉默”或“无效”基因和闭壳肌 *Est-6*、*Mdh-2* 等位点个别样本中 c 基因等的检出,都需一定数量的样本为基础。

表 2 企鹅珍珠贝基因座位的分布,等位基因频率及 χ^2 检验Tab.2 Genotypic distribution, allelic frequencies and chi-square test of loci in *Pteria penguin*

基因座位 loci	组织 tissue	基因型 genotype	观察值 observed data	预期值 expected data	等位基因频率 allelic frequencies	χ^2	P
<i>Sod</i> - 2	M	aa	0	8.5	0.500	34	< 0.01
		ab	34	17			
		bb	0	8.5	0.500		
<i>Sod</i> - 3	M	aa	4	5.602	0.406	0.615	> 0.05
		ab	18	16.398			
		bb = nul	12	12	0.594		
<i>Est</i> - 2	Am	aa	11	12.971	0.618	2.048	> 0.05
		ab	20	16.059			
		bb	3	4.9701	0.382		
<i>Est</i> - 3	M	aa	3	2.382	0.265	0.296	> 0.05
		ab	12	13.235			
		bb	19	18.382	0.735		
<i>Est</i> - 4	G	aa	17	18.382	0.735	1.483	> 0.05
		ab	16	13.235			
		bb	1	2.382	0.265		
<i>Est</i> - 5	G	aa	14	15.559	0.676	1.492	> 0.05
		ab	18	14.882			
		bb	2	3.559	0.324		
<i>Est</i> - 6	Am	aa	0	0.029	0.029	2.607	> 0.05
		ab	2	1.765			
		bb	27	26.471	0.882		
		bc	4	5.294			
		cc	1	0.265	0.088		
<i>Est</i> - 7	G	aa	0	0.029	0.029	0.604	> 0.05
		ab	2	1.765			
		bb	26	26.471	0.882		
		bc	6	5.294			
		cc	0	0.265	0.088		
<i>Mdh</i> - 1	M	aa	0	0.471	0.118	0.604	> 0.05
		ab	8	7.059			
		bb	26	26.471	0.882		
		bc	6	5.294			
		cc	0	0.265	0.088		
<i>Mdh</i> - 2	Am	aa	3	4.971	0.382	2.073	> 0.05
		ab	19	15.204			
		bb	10	11.765	0.588		
		bc	1	1.176			
		cc	0	0.029	0.029		
<i>Me</i> - 1	Am	aa	0	1.446	0.206	4.577	> 0.05
		ab	2	2.265			
		bb	0	0.890	0.162		
		bc	9	6.956			
		cc	11	13.596	0.632		
<i>Me</i> - 2	Am	aa	13	14.890	0.662	2.586	> 0.05
		ab	16	13.235			
		bb	2	2.941	0.294		
		bc	0	0.882			
		cc	0	0.066	0.044		
<i>Ldh</i> - 1	Am	aa	12	4.235	0.353	34	< 0.01
		ab	0	15.529			
		bb	22	14.235	0.647		
<i>Ldh</i> - 2	D	aa	8	2.382	0.265	24.501	< 0.01
		ab	2	13.235			
		bb	24	18.382	0.735		
<i>G6pdh</i> - 1	D	A(aa, ac)	4	3.629	0.061	0.450	> 0.05
		ab	0	0.384	0.093		
		B(bb, bc)	6	5.635			
		cc = nul	24	24.352	0.846		

注: Am - 闭壳肌, D - 消化盲囊, G - 鳃, M - 外套膜, P 为显著性水平

Notes: Am - adductor muscle, D - digestive gland, G - gill, M - mantle, P - grade of divergence

为正确进行生化遗传分析,需优化实验条件,使酶谱表型有良好的重复性。在研究中,实际电泳图谱和理论上可能出现的同工酶带数往往不符,如 *Est-5*、*Ldh*、*Sod-3*、*G6pdh* 等编码的同工酶,其原因是多方面的:可能因某些低等动物,不同亚基的亲合力较低,杂合子数目较少;或酶电荷和分子量差异较小,在电泳上分离不开。另外,无效基因或零基因的存在也会导致上述情况发生。

3.2 企鹅珍珠贝中的无效等位基因

在企鹅珍珠贝中,*Sod-3* 和 *G6pdh-1* 两个位点明显存在不能通过电泳检测其产物的哑等位基因,其基因频率相对较高,在样本中出现了一定数量的“无效”同型合子的电泳表型(即无酶带),它的出现是无效等位基因(哑等位基因或 0 等位基因)存在的证据。如 *Sod-3* 位点在外套膜中推测编码的 1 个二聚体酶,通常应出现 3 条酶带,但多数个体表现为 1 条酶带,个别个体未检测到酶带,合理的解释是其中有一个的哑等位基因,在纯合状态下不能显示电泳带。该现象在 *G6PDH* 同工酶中也较明显。位点 *G6pdh-1* 至少由 3 个等位基因控制,推测有 2 个等显性基因和 1 个亚基因,它们产生的酶带较特别,尤其在消化盲囊中,哑等位基因的频率很高,然而适合度检测却又很符合基因平衡定律,这似乎表明存在哑等位基因假设有一定合理性。

对于无效等位基因或对应电泳表型产生的原因,直至目前还没有权威的解释。某一特定的酶带未显现,归结起来应该有 3 个方面可能:一是相关的酶蛋白未产生,二是蛋白虽产生但缺乏相应的酶活性,第三种可能则是所用的同工酶检测的实验条件不适合该酶的检出。有研究报道其它物种也存在哑等位基因^[9, 10],但对其出现的原因多未作深入分析。相对而言,这种现象在贝类中报道的较多^[11],是否是一种正常的生理与生化调节方式,或与贝类生活环境多变存在某些关联还需更深入的研究,但目前我们至少可以说,哑等位基因的存在也是遗传多样性的一种表现,贝类中哑等位基因的频率较高也与现在通常认为的贝类遗传多样性较丰富可能存在某种内在的联系。

3.3 企鹅珍珠贝位点多态性

此次分析的 18 个位点中,多态位点有 16 个,

其中 13 个多态位点的基因频率与 Hardy - Weinberg 定律相符,而 *Ldh-1*、*Ldh-2*、*Sod-2*、*3* 个位点极显著偏离该平衡,其中 *Ldh-1*、*Ldh-2* 是由于群体中杂合子缺失,这与已报道的双壳类天然群体中杂合子缺失比较普遍存在的现象相符,对这一现象的解释目前还未取得一致的看法^[12, 13]。而 *Sod-2* 位点全为杂合子,此现象是因纯合子的存活力低或因其他原因造成,尚需进一步探讨。

通常用多态位点比例、平均每个位点杂合度等参数来衡量居群的遗传多样性。此次分析结果显示,群体多态位点比例为 88.8%,平均杂合度为 0.396 ± 0.029 ,远高于 48 种海洋贝类的平均杂合度 0.147 ± 0.059 ^[14],表现出丰富的遗传多样性。初步分析是由于该贝人工养殖的历史较短,其原始种质资源较其他养殖时间长的贝类保存要好。虽检测 20 个左右基因位点的样本已基本可以作统计分析,但为避免因所涉及的酶系统较少而影响结果的准确性、全面性,我们计划待检测分析更多的同工酶系统的基因位点后,再根据群体平均杂合度、多态位点比例等数值,评价企鹅珍珠贝的遗传变异性。在分析讨论种群遗传结构变异时,同工酶资料应结合其它方法的研究资料进行综合分析,因而,进一步开展核酸分子标记的研究,并结合各种标记进行综合分析,将有助于对企鹅珍珠贝遗传多样性的全面了解,并对这种珍稀物种资源进行合理的开发。

参考文献:

- [1] Meng Z M, Li Y N, Xing K W. Theory and technique of pearl cultivation[M]. Beijing: Science Press, 1996. 39 - 40, 86 - 149. [蒙钊美,李有宁,邢孔武.珍珠养殖理论与技术[M].北京:科学出版社,1996.39-40,86-149.]
- [2] Fu S, Liang F L. Experimental cultivation of blister pearl with pearl oyster, *Pteria penguin* Röding[J]. Marine Sci, 2000, 24(2): 12 - 14. [符韶,梁飞龙.企鹅珍珠贝附壳珍珠培育的中间试验[J].海洋科学,2000,24(2):12-14.]
- [3] Yu X Y, Wang M F, Ye F L. Development and artificial propagation of *Pteria penguin*[J]. J Hainan Univ, 2000, 18(3): 266 - 269. [余祥勇,王梅芳,叶富良.企鹅珍珠贝个体发育及人工育苗的研究[J].海南大学学报,2000,18(3):266-269.]

- [4] Liang F L, Mao Y, Yu X Y. A preliminary observation on the growth of the artificial spats of *Pteria penguin* [J]. J Zhanjiang Ocean Univ, 2001, 21(1): 6-9. [梁飞龙, 毛 勇, 余祥勇. 企鵝珍珠贝人工苗生长的初步观察[J]. 湛江海洋大学学报, 2001, 21(1): 6-9.]
- [5] Zhu L F. Gradient gel electrophoresis on polyacrylamide of isozymes and proteins of fishes [J]. Acta Hydrobiol Sini, 1992, 16(2): 183-185. [朱蓝非. 鱼类同工酶和蛋白质聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳法[J]. 水生生物学报, 1992, 16(2): 183-185.]
- [6] Wang Z R. Plant allozyme analysis [M]. Beijing: Science Press, 1996. 14-36, 98-100, 140-144. [王中仁. 植物等位酶分析[M]. 北京: 科学出版社, 1996. 14-36, 98-100, 140-144.]
- [7] Huang Y. Molecular systematics-principle, method and its application [M]. Beijing: Agriculture Press, 1998. 258-271. [黄原. 分子系统学-原理、方法及应用[M]. 北京: 农业出版社, 1998. 258-271.]
- [8] Wang M F, Yu X Y, Yang S T, et al. A comparative study on isozyme phenotypic divergence among four types of pen shell, *Atrina pectinata* (L.) [J]. Tropic Oceanography, 2000, 19(4): 45-50. [王梅芳, 余祥勇, 杨书婷, 等. 无裂栉江珧种内同工酶表型差异的比较研究[J]. 热带海洋, 2000, 19(4): 45-50.]
- [9] Stoneking M, May B, Wright J E. Loss of duplicate expression in salmonids: Evidence for a null allele polymorphism at the duplicate aspartate aminotransferase loci in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) [J]. Biochem Genet, 1981, 19(12): 1063-1067.
- [10] Wang Y, Dai J X. The features of isozyme zymograms and genetic diversity in *Undara pinnatifida* [J]. Acta Genetica Sinica 1999, (26): 269-273 [王 莹, 戴继勋. 裙带菜同工酶酶谱特征及其遗传多样性研究[J]. 遗传学报, 1999(26): 269-273.]
- [11] Li G L, Du X D, Ye F L. The biochemical genetic variations of two wild populations of pearl oyster *Pinctada martensii* [J]. J Tropic Oceanography 2002 21(4): 63-68. [李广丽, 杜晓东, 叶富良. 合浦珠母贝两个野生种群的生化遗传变异[J]. 热带海洋学报, 2002, 21(4): 63-68.]
- [12] English L J, Maguire G B, Ward R D. Genetic variation of wild and hatchery populations of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Australia [J]. Aquac. 2000, 187: 283-298.
- [13] Yang R, Yu Z N, Cheng Z Z, et al. Allozyme variation within *Crassostrea plicatula* and *Crassostrea gigas* from Shandong coastal waters [J]. J Fish China, 2000, 24(2): 130-133. [杨 锐, 喻子牛, 陈再中, 等. 山东沿海褶牡蛎与太平洋牡蛎等位基因酶的遗传变异[J]. 水产学报, 2000, 24(2): 130-133.]
- [14] Zhang G F, Zhang F S. Genetic diversity and sustainable utilization of marine mollusca [J]. Marine Sci, 1993, (5): 17-21. [张国范, 张福绥. 海洋贝类遗传多样性及其持续性利用[J]. 海洋科学, 1993, (5): 17-21.]