

文章编号: 1004 - 7271(2008)04 - 0406 - 05

## 吕泗渔场三疣梭子蟹自然群体同工酶与 ISSR 遗传多样性分析

陈淑吟<sup>1,2</sup>, 吉红九<sup>1</sup>, 丁亚平<sup>1</sup>, 李旭光<sup>1,2</sup>, 刘培廷<sup>1</sup>

(1. 江苏省海洋水产研究所, 江苏 南通 226007;

2. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210097)

**摘要:** 采用不连续垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳方法和 ISSR 分子标记技术, 检测分析了南黄海吕泗渔场海域三疣梭子蟹自然群体遗传多样性状况。结果表明: (1) 三疣梭子蟹 EST 同工酶在肌肉和肝脏的表达具有明显的组织特异性。5 种同工酶 (LDH、GDH、EST、MDH、ME) 在肌肉及肝脏两种组织中共检测到 12 个基因座位, 其中 5 个基因座位 *Est-1*、*Est-2*、*Mdh-2*、*Gdh-2*、*Me-3* 为多态。(2) 用 6 个 ISSR 随机引物的 PCR 扩增分析得出: 平均每个位点的有效等位基因数  $N_e = 1.548$ , Nei's 基因多样性指数  $H = 0.316$ , Shannon 多样性信息指数  $H_{sp} = 0.468$ 。两种分析结果一致表明该三疣梭子蟹自然群体杂合度较高, 遗传多样性较为丰富。

**关键词:** 三疣梭子蟹; 同工酶; ISSR; 遗传多样性

中图分类号: S 917

文献标识码: A

## Analysis on genetic diversity of *Portunus triuberbuculatus* population from Lvsì fishing region

CHEN Shu-yin<sup>1,2</sup>, JI Hong-jiu<sup>1</sup>, DING Ya-ping<sup>1</sup>, LI Xu-guang<sup>1,2</sup>, LIU Pei-ting<sup>1</sup>

(1. Jiangsu Institute of Marine Fisheries, Nantong 226007, China;

2. School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

**Abstract:** Vertical polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and inter-simple sequence repeat (ISSR) were used to investigate the genetic diversity of *Portunus triuberbuculatus* collected from Lvsì fishing region in the southern Yellow Sea. Results indicated that (1) Significant tissue specificity was observed in EST isozyme expression in muscle and liver; among 5 isozymes (LDH, GDH, EST, MDH, ME) of muscle and liver, twelve loci were detected, of which five (*Est-1*, *Est-2*, *Mdh-2*, *Gdh-2*, *Me-3*) were found polymorphic. (2) 45 bands were amplified by 6 informative and reliable primers, 37 of which were polymorphic, the mean effective allele number ( $N_e$ ) was 1.548, Nei's gene diversity ( $H$ ) was 0.316, Shannon's diversity index ( $H_{sp}$ ) was 0.468. Results of both methods demonstrated a rich genetic diversity in this wild stock.

**Key words:** *Portunus triuberbuculatus*; isozyme; ISSR; genetic diversity

三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 属甲壳纲 (Crustacea)、十足目 (Decapoda)、梭子蟹科

收稿日期: 2007-12-17

基金项目: 2004 年江苏省重要海洋渔业资源保护监测研究 (BM2004704)

作者简介: 陈淑吟 (1966-), 女, 江苏南通人, 高级工程师, 主要从事海洋生物遗传资源与增养殖方面的研究。E-mail: shuyinchen89@163.com

(Portunidae)、梭子蟹属(*Portunus*),广泛分布于我国南北沿海,东海、黄渤海产量较大,其生长快、适应性强且营养丰富,是我国海水养殖的主要经济种类。目前,其人工繁育和养殖规模不断扩大,因此,有关该物种的遗传多样性研究将在科学利用和保护好该优良自然资源方面发挥越来越大的作用。朱冬发等<sup>[1]</sup>、宋微微等<sup>[2]</sup>、余红卫<sup>[3]</sup>等研究了三疣梭子蟹个体发育早期至幼蟹阶段的同工酶表达情况;王国良等<sup>[4]</sup>、高保全等<sup>[5]</sup>及李鹏飞等<sup>[6]</sup>也用生化分析方法分别对舟山的养殖群体、野生群体及莱州湾的野生群体的遗传多样性展开研究。位于南部黄海的吕泗渔场目前仍具有较丰富的三疣梭子蟹资源,本文应用同工酶与 ISSR 方法,检测分析来自该海域的三疣梭子蟹自然群体的遗传多样性状况。

## 1 材料与方 法

### 1.1 样本采集及处理

样本于 2007 年 3 月 22 日采自江苏吕泗渔场的三疣梭子蟹自然群体,共 30 个,甲壳长为 4~6cm,样本保持鲜活送至实验室,立即按要求分别处理。

取一定量体组织置于预冷的研钵中,按 1/3(w/v)加 0.1M 的磷酸缓冲液(pH 7.0)和 0.05%β-巯基乙醇冰浴研磨,15 000 r/min 高速冷冻离心 30 min,肝脏需二次离心 30 min;取部分上清液装入 0.5 mL 的 eppendorf 管中 4℃ 保存备用。DNA 提取采用试剂盒(TIANamp Genomic DNA Kit DP304-2),按产品说明书方法操作。

### 1.2 电泳及染色方法

采用不连续垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳法。聚丙烯酰胺凝胶的制备参照卢龙斗等<sup>[7]</sup>的方法,电泳及染色参照何忠效等<sup>[8]</sup>的方法进行。浓缩胶浓度 3.5%~4%,分离胶浓度 7.5%~10%,电极缓冲液为 pH 8.3 的 Tris-Gly 缓冲液,在 4℃ 条件下电泳 3~5 h。染色后的胶片保存于固定液(5%的冰醋酸+20%的乙醇+单蒸水)中,染色后胶片立即拍照。

### 1.3 引物来源及 PCR 反应

100 个 ISSR 随机引物购自加拿大哥伦比亚大学(University of British Columbia)。PCR 实验所用的 MgCl<sub>2</sub>、dNTP、Taq 酶及琼胶等试剂购自上海生工。PCR 扩增体系为 25 μL,内含:模板 DNA 约 90 ng, Mg<sup>2+</sup> 2.5 mmol/L, dNTP 0.25 mmol/L,引物 0.25 μmol/L, Taq 酶 1.5 U;反应条件为 94℃ 预变性 5 min,进入循环:94℃ 变性 45 s, 52℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 120 s,共 45 个循环;72℃ 延伸 10 min。

### 1.4 群体遗传数据处理

电泳酶谱谱带的命名及其酶谱分析参照王中仁<sup>[9]</sup>的方法。若酶有一个以上座位编码时,各基因位点按编码酶从阳极到阴极的迁移顺序命名 1、2、3….,同一基因位点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….,统计各座位不同个体的基因型。

对获得的 ISSR 扩增图谱进行统计,在相同迁移位置,有带记为 1,无带记为 0,依此构成遗传相似矩阵,用 POPgene 32 进行数据处理。

多态位点比例( $p$ ) = 多态位点数/所测位点总数 × 100%

有效等位基因数(Crow & Kimura, 1965):  $A_e = 1 / \sum p_i^2$ , 其中  $p_i$  为第  $i$  个等位基因的频率。

观测杂合度:  $H_o$  = 观察到的杂合子数/观察个体总数

期望杂合度(Nei, 1972):  $H_e = 1 - \sum p_i^2$

## 2 结果与分析

### 2.1 同工酶的表达

乳酸脱氢酶(LDH)四聚体酶。在三疣梭子蟹肌肉和肝脏中均观察到 2 个基因座位, Ldh-1、Ldh-2

均为单态座位,由一种等位基因 a 编码。电泳图谱见图 1-A、1-B。Ldh-1 在肌肉和肝脏中超显性,活性很强,显著高于 Ldh-2。

酯酶(EST)二聚体酶。三疣梭子蟹中均观察到 2 个基因座位,Est-1、Est-2 均为多态性座位,Est-1 在肌肉组织中有 a、b、c、d 四个等位基因和 AB、BC、CD、DD 四种基因型,Est-1 在肝脏组织中有 a、b、c、d 四个等位基因和 AB、AC、BB、BD、CD、DD 六种基因型,Est-2 在肌肉和肝脏组织中均有 a、b 两个等位基因和 AA、AB 两种基因型,见图 1-C、1-D。

苹果酸脱氢酶(MDH)二聚体酶。在两种组织中观察到 Mdh-1、Mdh-2、Mdh-3 三个基因座位,见图 1-E、1-F。其中 Mdh-1、Mdh-3 均有一个基因座位编码,而且每个座位都观察到一个等位基因 a 和一种基因型 AA, Mdh-2 位点呈多态性,有 a、b 两个等位基因和 AB、BB 两种基因型。

谷氨酸脱氢酶(GDH)二聚体酶。三疣梭子蟹肌肉组织中观察到 2 个基因座位,Gdh-1 为单态座位,在肌肉和肝脏中观察到一个等位基因 a 和一种基因型 AA, Gdh-2 为多态座位,由 a、b、c 三个等位基因编码和 AC、BB、BC 三种基因型(见图 1-G)。

苹果酸酶(ME)四聚体酶。在三疣梭子蟹肌肉组织中观察到 3 个基因座位(见图 1-H)。Me-1、Me-2 都观察到一种等位基因 a 和一种基因型 aa。

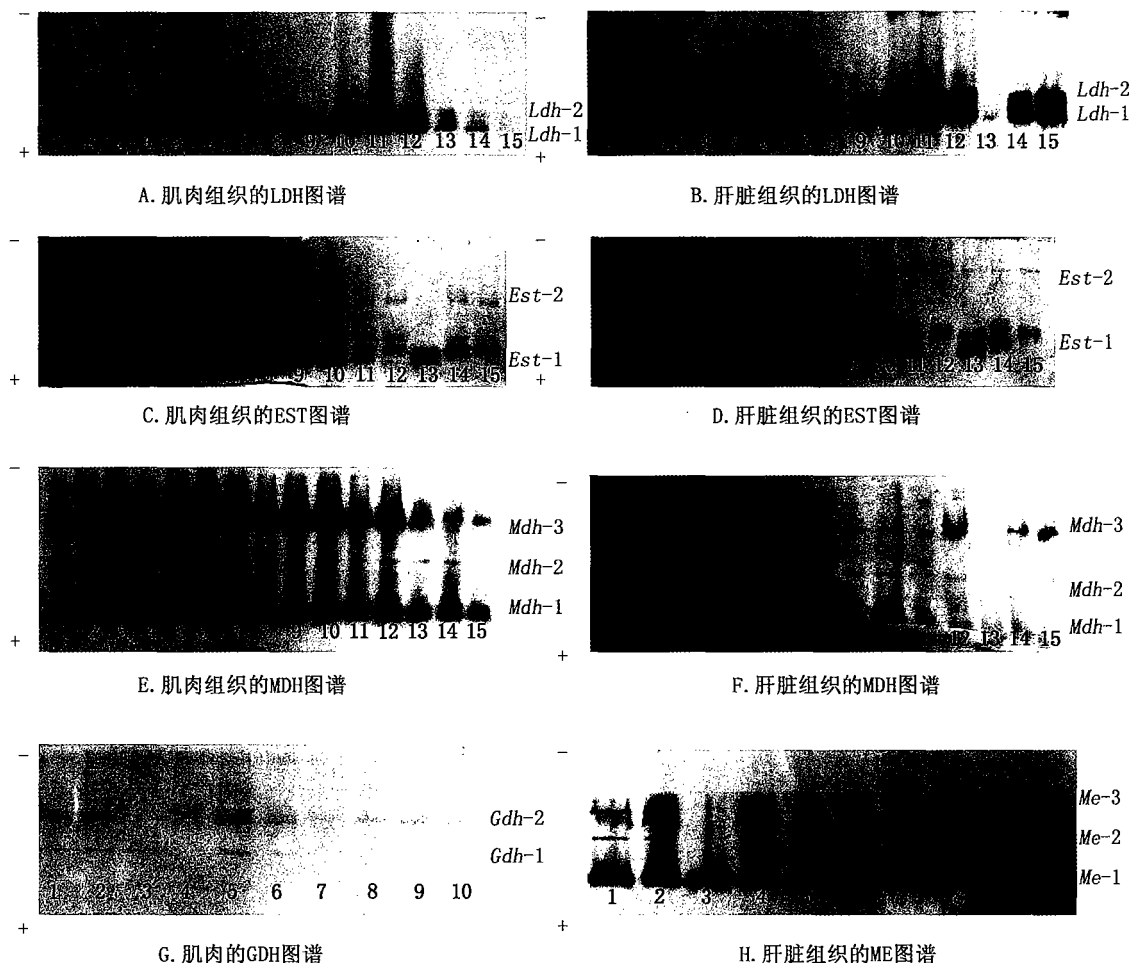


图1 三疣梭子蟹同工酶酶谱

Fig. 1 Kinds of isozyme electrophoregrams of *Portunus triuberbuculatus*

5 种同工酶(LDH、GDH、EST、MDH、ME)所测的基因座位及其等位基因频率见表 1。在肌肉及肝脏两种组织检测到的 12 个基因座位中,有 5 个基因座位 Est-1、Est-2、Mdh-2、Gdh-2、Me-3 呈现多态性,多态

比例为 41.67%, 平均每个座位的有效等位基因数目  $A_e$  为 1.185, 预期杂合度  $H_e$  为 0.156, 实际杂合度  $H_o$  为 0.199。

表 1 三疣梭子蟹 12 个同工酶基因位点的等位基因频率  
Tab. 1 Allelic frequency of 12 enzymes loci in *Portunus triuberbuculatus*

基因位点	等位基因	肌肉组织基因频率	肝脏组织基因频率
<i>Est-1</i>	a	0.066 7	0.0667
	b	0.533 3	0.400 0
	c	0.266 7	0.333 3
	d	0.133 3	0.200 0
<i>Est-2</i>	a	0.933 3	0.966 7
	b	0.066 7	0.033 3
<i>Ldh-1</i>	a	1.000 0	1.000 0
<i>Ldh-2</i>	a	1.000 0	1.000 0
<i>Mdh-1</i>	a	1.000 0	1.000 0
<i>Mdh-2</i>	a	0.833 3	0.866 7
	b	0.1667	0.133 3
<i>Mdh-3</i>	a	1.000 0	1.000 0
<i>Gdh-1</i>	a	1.000 0	
<i>Gdh-2</i>	a	0.666 7	
	b	0.333 3	
	c	0.166 7	
<i>Me-1</i>	a	1.000 0	
<i>Me-2</i>	a	1.000 0	
<i>Me-3</i>	a	0.388 9	
	b	0.611 1	

## 2.2 ISSR 引物筛选与 PCR 结果

实验筛选了 100 个随机引物,应用其中扩增条带清晰、稳定的 6 个引物进行分析(见表 2)。共扩增出 45 条带,其分子量范围在 300~2 500 bp 之间,多态性条带比率为 82.2%。

表 2 ISSR 引物序列及扩增的多态性分析  
Tab. 2 Amplification information of ISSR primers for *Portunus triuberbuculatus*

引物	引物序列	扩增总条带	多态性条带数	多态性比率(%)
834	(AG) <sub>8</sub> YT	11	9	81.8
835	(AG) <sub>8</sub> YC	7	4	57.1
841	(GA) <sub>8</sub> YC	4	4	100
844	(CT) <sub>8</sub> RC	6	4	66.6
878	(GGAT) <sub>4</sub>	8	8	100
899	CATGGTGTGGTCATTGTCCA	9	8	88.8
合计		45	37	
平均多态位点比				82.2

## 3 讨论

### 3.1 群体的同工酶表达状况

本文通过对三疣梭子蟹的 LDH、EST、MDH、ME 及 GDH 等几种同工酶的检测分析,表明吕泗渔场的三疣梭子蟹自然群体具有相当丰富的酶系统,有较高表达多态性。实验结果得出的群体多态位点比例( $P$ )为:41.67%,预期杂合度( $H_e$ )为 0.156,实际杂合度( $H_o$ )为 0.199,平均每个座位的有效等位基因数目( $A_e$ )为 1.185;在相邻的南北两海域三疣梭子蟹自然群体中,莱州湾群体的  $P$  为 27.3%, $A_e$  为

1.227,  $H_e$  为 0.177,  $H_o$  为 0.216<sup>[6]</sup>; 舟山海域群体的  $P$  为 20%,  $A_e$  为 1.230,  $H_e$  为 0.094,  $H_o$  为 0.175<sup>[5]</sup>, 吕泗渔场的自然群体多态位点比例最高。多态性高的群体意味着有更多的基因位点存在着变异, 这些数据反映出三个地理群体三疣梭子蟹野生种质皆表现出较高的遗传变异水平。

### 3.2 ISSR 标记的适用性分析

同工酶研究在方法上简单易行, 可区分显性纯合子或杂合子, 但其结果受环境影响大, 且可供选择基因座不够多。应用 ISSR 技术检测物种的遗传多样性, 避免了这两方面的影响, 可以更直接、更准确地说明物种的基础遗传状况。简单序列重复区间扩增 (inter-simple sequence repeat, 简称 ISSR) 是在微卫星技术上发展起来的一种新型标记, 其不仅具有多态性高、重复性和稳定性好等优点, 又无需测序, 是非常理想的分子标记, 已被广泛地应用于遗传多样性分析、绘制 DNA 指纹图谱、种质鉴定及分子生态学研究

中。目前, ISSR 标记方法应用于植物遗传学研究较多<sup>[10-12]</sup>, 在评价水产动物自然种群遗传多样性及种质鉴定等方面也逐渐得到认可<sup>[13-14]</sup>, 运用于甲壳类遗传多样性研究的报道仍不多见, 郑芳等<sup>[15]</sup>通过实验得出 ISSR 标记可以为河蟹种质资源的遗传研究提供有用信息, 本文运用该法分析也显示出较好的实验效果。

本实验结果揭示南黄海海域的三疣梭子蟹自然群体保持有丰富的遗传多样性, 具有较大的遗传改良潜力, 且不同地理区域的三疣梭子蟹自然资源已有一定的遗传分化; 本研究得出的同工酶位点多态性比例明显低于 ISSR 的检测结果, 这表明在检测种群遗传多态性方面, ISSR 方法具有更高的多态性灵敏度。

### 参考文献:

- [1] 朱冬发, 余红卫, 王春琳. 三疣梭子蟹个体发育早期的同工酶谱变化[J]. 水产学报, 2005, 29(6): 751-756.
- [2] 宋微微, 王春琳, 母昌考. 三疣梭子蟹个体发育早期的同工酶初步研究[J]. 湛江海洋大学学报, 2006, 26(1): 74-76.
- [3] 余红卫, 朱冬发, 韩宝芹. 三疣梭子蟹不同组织同工酶的分析[J]. 动物学杂志, 2005, 40(1): 84-87.
- [4] 王国良, 金珊, 李政, 等. 三疣梭子蟹养殖群体同工酶的组织特异性及生化遗传分析[J]. 台湾海峡, 2005, 24(2): 474-480.
- [5] 高保全, 刘萍, 李健, 等. 三疣梭子蟹野生群体同工酶的遗传多样性分析[J]. 水产学报, 2007, 31(1): 1-6.
- [6] 李鹏飞, 刘萍, 李健, 等. 莱州湾三疣梭子蟹的生化遗传分析[J]. 海洋水产研究, 2007, 28(2): 91-96.
- [7] 卢龙斗, 常重杰. 遗传学实验技术[M]. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 1996, 162-167.
- [8] 何忠效, 张树政. 电泳(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [9] 王中仁. 植物等位酶分析[M]. 北京: 科技出版社, 1996.
- [10] Crow A J, Kimura M. Evolution in sexual and asexual population[J]. American Naturalist, 1965, 99: 439-450.
- [11] Nei M. Genetic distance between populations[J]. American Naturalist, 1972, 106: 283-292.
- [12] 王建波. ISSR 分子标记及其在植物遗传学研究中的应用[J]. 遗传, 2002, 25(5): 613-616.
- [13] 陈大鹏, 沈怀舜, 丁亚军, 等. 文蛤地理种群 ISSR 分子标记的初步研究[J]. 南京师范大学学报, 2003, 27(3): 74-77.
- [14] 沈玉帮, 李家乐, 牟月军. 厚壳贻贝与贻贝遗传渐渗的分子生物学鉴定[J]. 海洋渔业, 2006, 28(3): 195-200.
- [15] 郑芬, 吕秀珍, 孙红英, 等. ISSR 标记在河蟹种质检测中应用[J]. 中国水产科学, 2007, 14(1): 46-51.