

褐藻(*Halidrys dioica*)的遗传多样性和种群遗传结构进行了研究^[5]。而国内海藻生化遗传学的研究基本上仍为空白。本研究评估了海带丝状体中国青岛种群与日本北海道种群的遗传多样性,揭示2个种群的遗传分化程度,为合理保护和利用海带种质资源提供基础资料和科学依据。

2 材料与方法

2.1 材料

中国青岛海带丝状体由青岛海洋大学海洋生命学院遗传实验室分离,日本北海道海带丝状体则是从日本北海道引进。这些材料在1996年采集于海带不同孢子体所产生的配子体,分别培养在8~12℃的低温室中。实验用三角瓶培养于实验室中,不同来源的海带分别取样30个左右,培养液用消毒海水加入 $\text{NO}_3\text{-N}$ 4 $\mu\text{g/g}$, $\text{PO}_4\text{-P}$ 0.4 $\mu\text{g/g}$,每周更换培养液2次,每天摇动培养瓶2~3次,光照15 h以上,以促进其生长。

2.2 等位基因酶的研究方法

2.2.1 酶提取缓冲液的筛选 海带中含有大量的褐藻胶,因而酶的提取相当困难。本研究采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,没有现成的酶提取缓冲液可供使用。笔者从12种酶提取缓冲液中,筛选出下列2种较适合海带的酶提取缓冲液:(1) 0.1 mol/L Tris-HCl pH6.9 (2) 0.2 mol/L Tris-Citrate pH6.9;并提出1种新的酶提取缓冲液配方:蔗糖与甘油各占10%,再加水80%。

2.2.2 样品匀浆上清液的制备 取新鲜材料0.2~0.4 g,清洗后置于已预冷的研钵中,加少许石英砂,在冰浴条件下(0~4℃)研磨10~15 min后,按样品与酶提取缓冲液1:3(W/V)的比例,加入提取液。把匀浆液装入1.5 ml的离心管中,用高速冷冻离心机,以10000 r/min的速度离心20 min后,立即点样。

2.2.3 凝胶的制备与缓冲液系统的选用 采用聚丙烯酰胺凝胶垂直板式电泳技术,分离胶的浓度为7%或10%,浓缩胶浓度为3%或4%。经过筛选,确立了海带乙醇脱氢酶、谷氨酸脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶、乳酸脱氢酶、山梨醇脱氢酶和超氧化物歧化酶6种酶电泳缓冲系统为TBE^[6,7](Tris-硼酸-EDTA pH8.9)。

2.2.4 电泳与染色 电泳:电压为100 V,电流为30 mA,在4℃冰箱中电泳6 h左右(国产电泳仪)。电泳完毕立即染色。染色参阅Sosa^[8]和张维强等^[9]的文献,针对海藻的特点进行修改,具体配方不再一一列出。

2.2.5 等位基因酶的记录 染色后及时将酶图谱拍摄下来,从原点(分离胶上缘)以cm为单位,按酶带相对迁移率记录酶谱并用计算机重新绘制,以便进行等位酶分析。

2.3 酶谱的分析方法

2.3.1 酶带命名法与基因表达 参阅综合有关学者王中仁^[10]等的命名方法。从阳极至阴极,以乙醇脱氢酶为例,基因位点依次为:Adh-1、Adh-2……,以此类推。从阳极至阴极,依次用小写英文字母a、b、c……表示不同的等位基因,小写字母后面的下角标数字代表等位基因的不同成员。

2.3.2 酶谱分析方法 采用张维强等^[9]和王中仁^[10]的分析方法,海带丝状体均为配子体(单倍体),对 a_1 a_2 一对等位基因而言,每个样品的这一位点仅含有单个基因 a_1 或 a_2 。中国青岛海带丝状体与日本北海道海带丝状体均含有不等距双带酶,可能由特殊基因控制,在相应 c_1 或 c_2 的位置上,用 c^1 或 c^2 表示。

本研究用根井正利^[11]、王中仁^[10]、熊全沫^[12]和向井辉美^[13]的计算公式,测算了多态位点比例(*P*)、每个位点平均等位基因数(*N_a*)、每位点有效等位基因数(*N_e*)和预期杂合度(*H_e*)以及中国青岛海带丝状体与日本北海道海带丝状体的遗传相似系数(*I*)和遗传距离(*D*)。

3 结果与分析

对海带丝状体 6 种酶系统的等位酶基因表达及其遗传多样性分析,结果见表 1。

表 1 中国青岛种群与日本北海道种群海带丝状体的遗传多样性
Table 1 Genetic diversity in populations of *Laminaria japonica* gametophytes from Qingdao of China and Hokkaido of Japan

	日本北海道海带丝状体 <i>Laminaria japonica</i> gametophytes from Japan	中国青岛海带丝状体 <i>Laminaria japonica</i> gametophytes from Qingdao
多态位点比例(<i>P</i>) Proportion of polymorphic loci	81. 82%	77. 27%
每位点平均等位基因数(<i>N_a</i>) Average number of alleles per locus	2. 2273	2. 0909
每位点有效等位基因数(<i>N_e</i>) Effective number of alleles per locus	1. 8032	1. 7104
遗传(基因)多样性(预期杂合度)(<i>H_e</i>) Genetic diversity	0. 4077	0. 3785
遗传相似系数(<i>I</i>)Genetic similarity	0. 8157	
遗传距离(<i>D</i>)Genetic distance	0. 2037	

3.1 等位基因频率

任何群体的遗传变异,均取决于基因或基因型频率的改变。海带丝状体为单倍体,其基因频率也就代表了基因型频率,它们的表型差异可直接反应基因型的差异(见表 2)。

对中国青岛海带丝状体与日本北海道海带丝状体的酶谱与基因表达进行分析,其结果为:6 种酶系统中有 22 个基因位点编码的等位基因,中国青岛海带丝状体和日本北海道海带丝状体均有不等距双带酶,可能由特殊基因(*c¹* 和 *c²*)控制。有些相应位置应有酶带但没有,可能是由于哑等位基因造成的^[10]。

3.2 多态位点比例(*P*)

在日本北海道海带丝状体和中国青岛海带丝状体中,检测到乙醇脱氢酶、谷氨酸脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶、乳酸脱氢酶、山梨醇脱氢酶、超氧化物歧化酶各自共有 22 个基因位点,其中日本北海道海带丝状体存在 18 个多态位点和 4 个单态位点(表 2),多态位点比例为 81. 82%(表 1),中国青岛海带丝状体有 17 个多态位点和 5 个单态位点(表 2),多态位点比例为 77. 27%(表 1),多态位点比例大的群体意味着基因位点存在着变异多,可见日本北海道海带丝状体变异程度高于中国青岛海带丝状体。

3.3 基因多样性(预期杂合度 *H_e*)

根据基因分布和频率的统计,分别求出日本北海道海带丝状体的平均预期杂合度为 0. 4077,中国青岛海带丝状体为 0. 3785(见表 1),可见日本北海道海带丝状体的遗传多样性比中国青岛海带丝状体丰富,这与中国青岛海带丝状体来自日本这一事实相吻合,即中国青岛海带丝状体只是原日本北海道海带丝状体的一部分。

3.4 平均每位点等位基因数(*N_a*)与每位点有效等位基因数(*N_e*)

日本北海道海带丝状体的平均每位点等位基因数(*N_a*)为 2. 2273,中国青岛海带丝状体为

表 2 中国青岛种群与日本北海道种群海带丝状体等位基因频率
Table 2 Allele frequency in populations of *Laminaria japonica* gametophytes from Qingdao of China and Hokkaido of Japan

基因位点 Locus	等位基因 Allele	等位基因频率 Allelic frequency	
		中国青岛种群海带丝状体 Qingdao of China	日本北海道种群海带丝状体 Hokkaido of Japan
乙醇脱氢酶			
(Alcohol dehydrogenase)			
<i>Adh-1</i>	<i>a</i> ₁	0. 5000	0. 6667
	<i>a</i> ₂	0. 5000	0. 3333
<i>Adh-2</i>	<i>b</i> ₁	0. 3333	0. 7143
	<i>b</i> ₂	0. 6667	0. 2857
<i>Adh-3</i>	<i>c</i> ₁	0. 3333	0. 2500
	<i>c</i> ₂	0. 0000	0. 0000
	<i>c</i> ₃	0. 6667	0. 5000
	<i>c</i> ²	0. 0000	0. 2500
<i>Adh-4</i>	<i>d</i> ₁	1. 0000	1. 0000
谷氨酸脱氢酶			
(Glutamate dehydrogenase)			
<i>Gdh-1</i>	<i>a</i> ₁	0. 7143	0. 5385
	<i>a</i> ₂	0. 2857	0. 4615
<i>Gdh-2</i>	<i>b</i> ₁	1. 0000	1. 0000
<i>Gdh-3</i>	<i>c</i> ₁	0. 3333	0. 5000
	<i>c</i> ₂	0. 6667	0. 2500
	<i>c</i> ¹	0. 0000	0. 2500
<i>Gdh-4</i>	<i>d</i> ₁	1. 0000	1. 0000
异柠檬酸脱氢酶			
(Isocitrate dehydrogenase)			
<i>Idh-1</i>	<i>a</i> ₁	0. 7143	0. 8000
	<i>a</i> ₂	0. 2857	0. 2000
<i>Idh-2</i>	<i>b</i> ₁	0. 0000	0. 6667
	<i>b</i> ₂	1. 0000	0. 3333
<i>Idh-3</i>	<i>c</i> ₁	0. 1111	0. 2500
	<i>c</i> ₂	0. 4445	0. 1250
	<i>c</i> ₃	0. 3333	0. 5000
	<i>c</i> ²	0. 1111	0. 1250
乳酸脱氢酶			
(Lactate dehydrogenase)			
<i>Ldh-1</i>	<i>a</i> ₁	0. 4445	0. 5556
	<i>a</i> ₂	0. 5555	0. 4444
<i>Ldh-2</i>	<i>b</i> ₁	1. 0000	0. 8333
	<i>b</i> ₂	0. 0000	0. 1667
<i>Ldh-3</i>	<i>c</i> ₁	0. 5556	0. 2000
	<i>c</i> ₂	0. 2222	0. 6000
	<i>c</i> ¹	0. 1111	0. 0000
	<i>c</i> ²	0. 1111	0. 2000
<i>Ldh-4</i>	<i>d</i> ₁	0. 5000	1. 0000
	<i>d</i> ₂	0. 5000	0. 0000
山梨醇脱氢酶			
(Sorbitol dehydrogenase)			
<i>Sdh-1</i>	<i>a</i> ₁	0. 2587	0. 5556
	<i>a</i> ₂	0. 7413	0. 4444
<i>Sdh-2</i>	<i>b</i> ₁	0. 8333	0. 7500
	<i>b</i> ₂	0. 1667	0. 2500
<i>Sdh-3</i>	<i>c</i> ₁	0. 2500	0. 1672
	<i>c</i> ₂	0. 5000	0. 5741
	<i>c</i> ¹	0. 0000	0. 0000
	<i>c</i> ²	0. 2500	0. 2584
<i>Sdh-4</i>	<i>d</i> ₁	0. 5000	0. 6667
	<i>d</i> ₂	0. 5000	0. 3333
超氧化物歧化酶			
(Superoxide dismutase)			
<i>Sod-1</i>	<i>a</i> ₁	0. 3077	0. 7500
	<i>a</i> ₂	0. 5385	0. 2500
	<i>a</i> ₃	0. 1538	0. 0000
<i>Sod-2</i>	<i>b</i> ₁	0. 7500	0. 4445
	<i>b</i> ₂	0. 2500	0. 3333
	<i>b</i> ²	0. 0000	0. 2222
<i>Sod-3</i>	<i>c</i> ₁	0. 5000	0. 1111
	<i>c</i> ₂	0. 2500	0. 3334
	<i>c</i> ₃	0. 2500	0. 2222
	<i>c</i> ²	0. 0000	0. 3333

2.0909。从每位点有效等位基因数(N_e)看 ,日本北海道海带丝状体为 1.8032、中国青岛海带丝状体为 1.7104 ,这 2 个参数表明日本北海道海带丝状体均大于中国青岛海带丝状体。

3.5 两个不同群体丝状体的遗传相似性(I)和遗传距离(D)

用等位酶电泳所获得基因位点及其所属的等位基因频率等参数 ,可对不同种群作遗传相似性和遗传距离的比较 ,从而揭示不同种群的遗传分化程度。群体遗传分析中对两个不同种群间遗传相似性的计算 ,只研究单个基因位点是不够的 ,应对多个基因位点结果的平均值进行比较。本研究对中国青岛海带丝状体和日本北海道海带丝状体的 6 种酶系统 22 个基因位点进行了统计计算与分析 ,得出 2 个群体的遗传相似系数 $I=0.8157$,遗传距离 $D=0.2037$,据此可以推断 ,中国青岛海带丝状体与日本北海道海带丝状体存在着遗传结构的差异和一定程度的遗传分化。

3.6 不等距双带酶

海带丝状体(配子体)等位基因酶谱中 ,存在着不同迁移率的不等距双带酶共 7 种(表 2)。这与杨一平等^[14]和 Lu 等^[5]曾经报道过的现象一致。

4 结论

采用多态位点比例、预期杂合度、每位点平均等位基因数和每位点有效基因数 ,作为度量群体遗传变异水平和遗传多样性的定量指标。根据以上分析结果 ,可知日本北海道海带丝状体的遗传多样性程度均高于中国青岛海带丝状体。

在中国青岛海带丝状体与日本北海道海带丝状体中 ,存在着不同迁移率的不等距双带酶 ,可能由特殊基因(c^1 或 c^2)控制 ,主要集中在第 3 个基因位点上 ,这将有待进一步研究。

中国青岛海带丝状体与日本北海道海带丝状体的遗传相似性和遗传距离 ,揭示了这 2 个种群存在着遗传结构上的差异 ,说明两者之间已发生了较大幅度的遗传分化 ,这可能是由于这 2 个种群长期处于地理和生殖隔离的结果。

参 考 文 献

1 宫明山 ,涂逢俊.当代中国水产业.北京 :当代中国出版社 ,1991. 11 :128
2 唐延林 ,方宗熙.过氧化物酶同工酶在海带和裙带菜各部分分布的初步研究.山东海洋学院学报 ,1982. 2 : 47 ~ 50
3 赵素达 ,高尚德 ,张红.海带、裙带菜过氧化物酶活性及其同工酶酶谱的比较.海洋湖沼通报 ,1993. 3 :53 ~ 58
4 Marsden W J , Evans L V. A preliminary investigation of the electrophoretic characteristics of enzymes from a range of macroscopic brown algae. *Botanica Marina* ,1984. 27 :521 ~ 526
5 Lu T T. Genetic diversity and genetic structure in the Brown algae *Halidrys dioica* (*Fucales* : *Cystoseiraceae*) in Southern California. *Marine Biology* ,1994. 121 :363 ~ 371
6 [美]萨姆布鲁克 J ,弗里奇 E F ,曼尼阿蒂斯 T 编(金冬雁 ,黎孟枫译).分子克隆实验指南(第二版).北京 :科学出版社 ,1995. 308
7 卢圣栋 ,李尹雄 ,胡晓年.现代分子生物学实验技术.高等教育出版社 ,1993. 575
8 Sosa P A , Garcia-Reina G. Genetic variability and differentiation of sporophytes and gametophytes in populations of *Gelidium Arbuscula* (*Gelidiaceae* : *Rhodophyta*) determined by isozyme electrophoresis. *Marine Biology* , 1992. 113 :679 ~ 688
9 张维强 ,唐秀芝.同工酶与植物遗传育种.北京 :北京农业大学出版社 ,1993
10 王中仁.植物等位酶分析.北京 :科学出版社 ,1996
11 根井正利编(王家玉译).分子群体遗传学与进化论.北京 :农业出版社 ,1983
12 熊全沫.同工酶电泳数据的分析及其在种群遗传上的应用.遗传 ,1986. 1 :1 ~ 5
13 向井辉美编(隋文彬译).群体遗传学.长春 :吉林科学技术出版社 ,1984
14 杨一平 ,尹瑞雪 ,张军丽.红皮云杉自然群体遗传多样性及遗传分化的研究.植物学报 ,1993. 35(6) :458 ~ 465