

不同地区库蚊复组群体的同工酶遗传多样性研究

张柯,叶镇清,乔传令

(中国科学院动物研究所农业虫鼠害综合治理研究国家重点实验室,北京 100080)

摘要:采用水平切片淀粉凝胶电泳的方法,对分布于我国 5 省的 8 个库蚊复组(*Culex pipiens* complex)野生群体的遗传多样性进行研究,分析了 4 个酶系统 7 个基因座(*ME*、*MDH-1*、*MDH-2*、*MDH-3*、*GPD*、*EST-2*、*EST-3*)的酶谱资料。结果显示:(1)群体内存在不同程度的遗传变异(H_e 为 0.098~0.41);(2)较低的基因流水平($N_m=0.64$)使遗传漂变起主要作用,造成群体之间的遗传分化($G_{st}=0.303$),而总群体的遗传多样性相对富集于群体之内($H_s/D_{st}=2$)。(3)库蚊群体的遗传结构属于距离隔离模式。(4)群体间的遗传一致性(或遗传距离)反映出群体间的遗传分化程度,也表明与地理位置存在对应关系。

关键词:库蚊复组;遗传多样性;同工酶

中图分类号:Q965.91

文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2004)02-0172-05

Genetic Diversity of Isoenzyme in *Culex pipiens* complex Field Populations Sampling from Distinct Area of China

ZHANG Ke, YE Zhen-Qing, QIAO Chuan-Ling

(State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects & Rodents, Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: Eight field populations of *Culex pipiens* complex collected from five provinces (Guangdong, Henan, Shandong, Beijing and Yunnan) in 2001 were used to study genetic diversity by starch gel electrophoresis. Data from seven loci (*ME*、*MDH-1*、*MDH-2*、*MDH-3*、*GPD*、*EST-2*、*EST-3*) of four isozymes were analyzed by software Biosys2.0 and FSTAT (Version 2.9.3). The results were as follows: (1) The values of H_e (from 0.098 to 0.41) indicated genetic variabilities of different degree in populations. (2) The low level of gene flow ($N_m=0.64$) could not prevent genetic drift to cause the gene differentiation between populations. The genetic diversity between populations attributed to the genetic diversity of total populations is small ($G_{st}=0.303$), and the great part is accumulated within populations ($H_s/D_{st}=2$). (3) The genetic structure of *Culex pipiens* complex population was the isolation-by-distance model. (4) The genetic identity (or genetic distance) revealed the scale of genetic differentiation between populations which related to the collection sites.

Key words: *Culex pipiens* complex; genetic diversity; isoenzyme

库蚊复组(*Culex pipiens* complex)是分布较广的入室骚扰害虫,是疟疾、班氏丝虫病和黄热病等的传播媒介,对该蚊虫的治理已引起世界卫生组织及

各个国家的重视^[1]。进行库蚊自然群体遗传多样性的研究,有助于了解群体结构的特征及动态发展状况,从而指导媒介控制。应用同工酶淀粉凝胶电泳

收稿日期:2003-01-03;修回日期:2003-10-16

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39980034,30140014)资助[Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 39980034 and 30140014)]

作者简介:张柯(1978-),女,河南永城人,硕士研究生,专业方向:抗性分子遗传学

通讯作者:乔传令(1953-),女,博士,研究员,博士生导师,专业方向:抗性分子遗传学。E-mail:Qiaocl@panda.ioz.ac.cn

手段揭示基因座变异有其突出的优点^[2],在植物、动物群体遗传学分析方面得到广泛应用^[3,4]。本文旨在从库蚊群体的遗传多样性方面进行分析,通过探讨群体的遗传变异、分化现象和遗传结构,为蚊虫综合治理及杀虫药剂抗性遗传机制的研究提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 采样

库蚊群体标本采自五省 8 个代表点现场,见表 1。所有群体采样的卵筏、幼虫带回实验室,饲养至 4 日龄成虫后于 -70°C 冰箱保存备用。

表 1 库蚊群体采样地点
Table 1 Collection locations of all
Culex pipiens complex populations

群体代号 Population code	采样地点 Location	采样时间 Time
GZ	广东省广州市郊区 (N23°7'48", E113°17'24")	2001-05
FS	广东省佛山市郊区 (N23°12', E113°9')	2001-05
ZS	广东省中山市郊区 (N22°30', E113°24'36")	2001-05
ZZ	河南省郑州市郊区 (N34°44'24", E113°39')	2001-08
SQ	河南省商丘市郊区 (N34°28'48", E115°34'48")	2001-08
GM	山东省高密市郊区 (N36°22'48", E119°44'24")	2001-06
BJ	北京市中关村生活区 (N39°55'12", E116°25'48")	2001-06
KM	云南省昆明市郊区 (N25°, E102°43'12")	2001-08

1.2 水平切片淀粉凝胶电泳

在有机玻璃盘上加 10 μl 灭菌重蒸水,将蚊虫置于有机玻璃盘上,用试管研磨,尽量保持冷却,同时记录蚊虫品系,研磨后依次用事先制好的纸沁子吸取研磨好的提取液,所用水解淀粉为法国科学与进化研究所提供。参照王中仁的方法^[2],在 4°C 冰箱中,采用 Tris-Malate-EDTA 缓冲液(0.1mol/L Tris, 0.1mol/L Malic anhydride, 0.01mol/L EDTA和 0.01mol/L MgCl_2),使用“SG-ZW”型水平切片电泳槽进行电泳,设定电流 100mA,电压 90V。共测定了 4 个同工酶系统:苹果酸酶 ME、苹果酸脱氢酶 MDH、甘油-3-磷酸脱氢酶 GPD 和酯酶 EST。凝胶缓冲液及染色方案均参照 Pasteur^[4]的配方。

1.3 数据处理

通过对电泳结果的酶谱分析与记录,根据熊全沫等的方法^[5],对每个基因座的不同等位基因,按从阴极到阳极的次序用 1、2……表示,记录原始数据,按 Biosys2.0^[6]和 FSTAT(Version 2.9.3)^[7]要求的格式编制输入文件,运行程序并获得了二倍体基因型频率,进而计算得到多个群体遗传学参数,对库蚊群体进行遗传多样性的分析。

2 结果与讨论

2.1 群体内的遗传变异

根据 4 个酶系统 7 个基因座的原始资料,参照 Nei 关于等位基因频率的计算方法^[8]: $q_i = (2n_{ii} + \sum n_{ij}) / (2N)$ ($i \neq j$),其中 i 和 j 表示同一基因座上的不同等位基因, n_{ii} 表示纯合基因型的个体数, n_{ij} 表示杂合基因型的个体数, N 为个体总数;得到 7 个基因座的等位基因频率(表 2)。

运行 Biosys 2.0,得到反映群体内遗传变异的 4 个指标(表 3)。通常将等位基因频率小于 95% 的基因座称为多态基因座。多态基因座百分数 P 可以反映自然群体内的遗传多态性,从表 3 可看出,每个群体都呈现出一定的遗传多态性, P 的平均值为 62.5%,其中广州和中山群体具有高度的遗传多态性(85.7%),而高密和北京群体的遗传多态性相对较低(42.9%)。每个基因座的平均等位基因数 A ,可说明基因座上等位基因的多样性水平,表 3 中显示 7 个基因座的等位基因都呈现出多样性, A 的平均值为 2.7,其中广州群体最高($A=4$),而高密群体最低($A=1.7$)。平均期望杂合度 H_e 被称作“遗传多样性指标”^[8],可以反映出群体内的遗传变异程度,8 个群体中,高密群体的遗传变异程度最低, $H_e=0.098$,中山的遗传变异程度最高, $H_e=0.410$ 。

2.2 群体间的遗传分化

对于每个多态基因座而言,Nei 认为所有群体的总遗传多样性(H_t)包括群体内的遗传多样性(H_s)和群体间的遗传多样性(D_{st})^[9],即对任何一个基因座,它们间的关系为: $H_t = H_s + D_{st}$,存在于群体间的遗传多样性比率 $G_{st} = D_{st} / H_t = (H_t - H_s) / H_t$,Nei 称 G_{st} 为“基因分化系数”,用于衡量群体间遗传分化的程度^[10]。

运行 FSTAT 软件,给出与 G_{st} 相关的参数 H_o 、 H_t 、 H_s 和 D_{st} (表 4)。

表 2 8 个库蚊复组群体中 7 个基因座的等位基因频率
Table 2 Allele frequencies at 7 loci in 8 population of *Culex pipiens* complex

基因座 Locus	等位基因数 N	群体代号 Population code							
		GZ	FS	ZS	ZZ	SQ	GM	BJ	KM
GPD	(N)	65	72	65	64	33	81	82	78
	1	0.923	0.944	0.831	1.00	1.00	0.765	0.902	1.00
	2	0.015	0.00	0.077	0.00	0.00	0.00	0.024	0.00
	3	0.046	0.028	0.077	0.00	0.00	0.00	0.024	0.00
	4	0.015	0.028	0.015	0.00	0.00	0.235	0.049	0.00
ME	(N)	64	71	68	65	32	81	82	78
	1	0.617	0.585	0.669	0.715	0.672	0.926	0.976	0.526
	2	0.352	0.415	0.316	0.285	0.313	0.074	0.012	0.263
	3	0.031	0.00	0.015	0.00	0.016	0.00	0.012	0.212
MDH-1	(N)	66	72	68	63	29	81	82	78
	1	0.735	0.625	0.831	0.952	1.00	0.907	0.726	0.782
	2	0.197	0.264	0.103	0.008	0.00	0.068	0.201	0.173
	3	0.015	0.097	0.015	0.00	0.00	0.00	0.043	0.00
	4	0.053	0.00	0.00	0.04	0.00	0.025	0.018	0.045
MDH-2	(N)	62	73	69	64	31	81	82	75
	1	0.952	0.959	0.536	0.853	0.71	0.994	0.927	1.00
	2	0.032	0.041	0.13	0.016	0.032	0.006	0.061	0.00
	3	0.016	0.00	0.188	0.094	0.258	0.00	0.00	0.00
	4	0.00	0.00	0.014	0.039	0.00	0.00	0.00	0.00
MDH-3	(N)	60	65	59	56	30	81	82	78
	1	0.933	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.892	0.923
	2	0.033	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.079	0.058
	3	0.017	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.006
	4	0.017	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
EST-2	(N)	68	74	71	64	33	81	82	78
	1	0.074	0.243	0.049	0.359	0.00	0.00	0.00	1.00
	2	0.382	0.345	0.465	0.367	0.712	0.00	0.00	0.00
	3	0.478	0.331	0.444	0.102	0.106	0.00	0.00	0.00
	4	0.037	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
EST-3	(N)	64	74	61	64	33	81	82	78
	1	0.039	0.108	0.049	0.414	0.242	1.00	1.00	0.00
	2	0.078	0.236	0.066	0.219	0.00	0.00	0.00	1.00
	3	0.273	0.324	0.557	0.352	0.727	0.00	0.00	0.00
	4	0.531	0.331	0.328	0.016	0.030	0.00	0.00	0.00
	5	0.078	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

表 3 8 个群体的遗传变异度量指标(标准误差)

Table 3 Genetic variability at 7 loci in eight populations(standard errors)

群体代号 Population code	N	A	P(%)	He
GZ	64.1(1.0)	4.0(0.3)	85.7	0.364(0.090)
FS	71.6(1.2)	2.9(0.5)	71.4	0.378(0.117)
ZS	65.9(1.7)	3.6(0.5)	85.7	0.410(0.086)
ZZ	62.9(1.2)	2.7(0.5)	57.1	0.305(0.112)
SQ	31.6(0.6)	2.1(0.4)	57.1	0.252(0.089)
GM	81.0(0.0)	1.7(0.3)	42.9	0.098(0.052)
BJ	82.0(0.0)	2.9(0.6)	57.1	0.142(0.057)
KM	77.6(0.4)	2.0(0.5)	42.9	0.160(0.091)
平均(Mean)	67.1(0.8)	2.7(0.5)	62.5	0.264(0.088)

* : N, 每个基因座的平均样品大小 Mean sample size per locus; A, 每个基因座的平均等位基因数 Mean number of alleles per locus; P, 多态基因座百分数 Percentage of loci polymorphic; He, 平均期望杂合度 Mean expected heterozygosity.

表 4 根并正利的遗传多样性统计量

Table 4 Nei's statistics of genetic diversity

基因座 Locus	平均观测杂合度 H_o	群体内的遗传多样性 H_s	总群体的遗传多样性 H_t	群体间的遗传多样性 D_{st}	基因分化系数 G_{st}
<i>GPD</i>	0.087	0.139	0.151	0.012	0.082
<i>ME</i>	0.465	0.392	0.432	0.040	0.093
<i>MDH-1</i>	0.179	0.298	0.318	0.020	0.062
<i>MDH-2</i>	0.010	0.215	0.247	0.032	0.130
<i>MDH-3</i>	0.006	0.056	0.058	0.002	0.028
<i>EST-3</i>	0.142	0.388	0.742	0.405	0.477
<i>EST-2</i>	0.077	0.381	0.732	0.401	0.480
Mean	0.138	0.267	0.383	0.133	0.303

表 4 中,7 个基因座的 G_{st} 平均值为 0.303,说明各群体间存在一定程度的遗传分化,其中 EST-2 和 EST-3 对该分化程度的贡献最大。 H_s/D_{st} 的值为 2,说明库蚊群体的总基因多样性相对富集在群体之内。

Wright 提出了一种基于岛屿遗传结构模式的通过测量群体间遗传分化间接估计基因流的方法^[11],该方法假设相同大小的有限群体间无选择作用,且每一代中群体间相互迁移的个体相同,在此条件下建立遗传漂变的趋异效应和基因流同化效应的平衡关系。该方法用 F 统计值中的 F_{st} 测量遗传分化程度,衡量基因流的参数 Nm (N 为有效群体大小, m 为群体间有效迁移率)与 F_{st} 有近似式: $Nm \approx (1/F_{st} - 1)/4$ 。运行 FSTAT 得到 Weir 和 Cockerham 的 F_{st} 值为 0.28,进而得到 Nm 值为 0.64^[12],说明群体间的基因流不足以防止遗传漂变造成的群体遗传分化。

2.3 群体遗传结构的分析

运行 FSTAT,可以获得不同群体两两间的 F_{st} ;忽略各群体间的迁移障碍,从地图上测得各群体间最短的地理距离 D 。根据 Rousset 提出的研究群体遗传结构的方法^[13], $F_{st}/(1-F_{st})$ 对 $\ln(D)$ 作图(图 1)。

对相关系数 R 进行显著性检测, $|t| = 2.39 > t_{0.05}$,说明 $F_{st}/(1-F_{st})$ 与 $\ln(D)$ 之间存在显著的直线相关关系,即所研究的库蚊群体符合距离隔离的群体结构模型。

2.4 相似性系数和遗传距离

衡量不同地区的库蚊群体间的遗传分化程度,可依据遗传距离(D)和遗传一致性(I)^[8](表 5),分

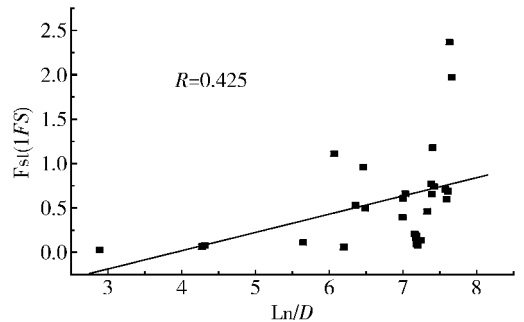


图 1 Rousset 方法检测距离隔离模型

Fig. 1 Isolation by distance using the Rousset method

析可知广东省内 3 群体间的遗传一致性较高,河南省内两群体间有高的遗传一致性,高密和北京群体间相似性较高,昆明群体和其他群体间遗传一致性相对较低,总体来讲,各群体间的遗传一致性与地理位置存在一定关系。根据遗传距离作聚类分析(UPGMA)图 2,可以清楚地看到各群体间的遗传分化情况。

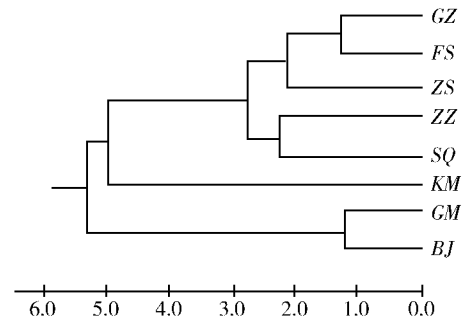


图 2 平均遗传距离聚类图

Fig. 2 Dendrogram generated by cluster analysis of genetic distance

表 5 8 个群体的遗传相似性和遗传距离系数矩阵
 Table 5 Matrix of Nei unbiased genetic identity (below diagonal) and genetic distance
 (above diagonal) coefficients among 8 populations

种 群 Populations	GZ	FS	ZS	ZZ	SQ	GM	BJ	KM
GZ	—	0.016	0.044	0.086	0.104	0.298	0.306	0.266
FS	0.985	—	0.056	0.052	0.095	0.264	0.267	0.173
ZS	0.957	0.945	—	0.079	0.042	0.331	0.344	0.340
ZZ	0.917	0.949	0.924	—	0.048	0.155	0.168	0.162
SQ	0.901	0.909	0.958	0.953	—	0.257	0.273	0.365
GM	0.742	0.768	0.718	0.856	0.774	—	0.010	0.444
BJ	0.736	0.766	0.709	0.845	0.761	0.990	—	0.452
KM	0.767	0.841	0.712	0.851	0.695	0.642	0.636	—

同工酶电泳是进行群体遗传结构分析的一种有效手段,它在研究生物进化中沿用的描述表型的传统方法实现了定量特征。Chevillon 等采用同工酶电泳的方法研究法国南部地区库蚊群体间基因流与遗传分化的相对强度,揭示抗性基因的区域化特异分布^[14]。

Rousset 提出的研究群体遗传结构的方法在库蚊群体结构中得到有效的使用,在对法国南部和意大利的库蚊群体研究表明两地的库蚊群体的遗传结构都是距离隔离模式^[15,16],这与本文的研究结果一致。当遗传结构属于距离隔离模式时,通过 F_{st} 估算 Nm 的结果较为准确,理论上, $Nm < 1$ 时,遗传漂变是群体间遗传分化的主要因素; $Nm > 1$, 基因流为主要作用^[17]。本文对 8 个库蚊复组群体的遗传多样性分析表明库蚊群体具有较高的遗传多态性,由于地理隔离等因素的作用,使群体间较低的基因流水平无法阻止遗传漂变造成遗传分化。

参 考 文 献 (References):

- [1] TANG Zhen-Hua, Insect Resistant and Its Managements. Beijing: Agricultural publishing company, 1993.
唐振华. 昆虫抗药性及其治理. 北京: 农业出版社, 1993.
- [2] WANG Zhong-Ren, Plant Isoenzyme Analysis, Beijing: Scientific publishing company, 1996.
王中仁. 植物等位酶分析. 北京: 科学出版社, 1996.
- [3] HUANG Yuan, Molecular System logy-Principle, Method and Application, Agricultural publishing company of China. 1998.
黄原. 分子系统学——原理、方法及应用. 中国农业出版社, 1998.
- [4] Pasteur N, Pasteur G, Bonhomme F, Catalan J, Britton-Davidian J. Practical isoenzyme genetics. England: Ellis Horwood Lond. Chister., 1988. 83~155.
- [5] XIONG Quan-Mo, Analysis of Isoenzyme Electrophoresis Data and Its Application of Populations Genetics. *Hereditas (Beijing)*, 1986, 8 (1): 1~5.
熊全沫. 同工酶电泳数据的分析及其在群体遗传上的应用. 遗传, 1986, 8(1): 1~5.
- [6] David L, Swofford G, Richard B. BIOSYS-2.0- A Computer Program for the Analysis of Allelic Variation in Genetics. Release: Swofford D. L, Illinois Natural History Survey, IL, June 1997, USA.
- [7] Goudet, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- [8] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 1978, 83: 583~590.
- [9] Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1973, 70(12): 3321~3323.
- [10] Nei M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann Human Genet*, 1977, 41: 225~233.
- [11] Wright S. Evolution in Mendelian population. *Genetics*, 1931, 16: 97~159.
- [12] Weir B S, Cockerham C C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 1984, 38:1358~1370.
- [13] Rousset F. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics*, 1997, 145(4): 1219~1228.
- [14] Chevillon C, Pasteur N, Marquine M, Heyse D, Raymond M. Population structure and dynamics of selected genes in the mosquito *Culex pipiens*. *Evolution*, 1995, 49: 997~1007.
- [15] Lenormand T, Guillemaud T, Bourguet D, Raymond, M. Evaluating Gene Flow Using Selected Markers: A Case Study. *Genetics*, 1998, 149: 1383~1392.
- [16] Silvestrini F, Severini C, Pardo V D, Romi R, Matthaes E D, Raymond M. Population structure and dynamics of insecticide resistance genes in *Culex pipiens* populations from Italy. *Heredity*, 1998, 81, 342~348.
- [17] Slatkin M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, 1987, 236:787~792.