

# 三种杜拉属 (*Drawida*) 蚯蚓的酯酶同工酶的初步研究\*

韩雅莉 巴雅尔

(内蒙古农牧学院草原系 呼和浩特 010018)

**摘要** 应用聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法,对寡毛纲杜拉属 (*Drawida*) 三种蚯蚓进行酯酶同工酶酶谱分析。其结果表明,同属蚯蚓具有几条相似的酶谱区带,而不同种蚯蚓又具有各自独特的酶谱带,种间酶谱区带数目、泳动率及染色强度都有明显区别。雅和杜拉蚓 (*Drawida jeholensis*) 酶谱图和天锡杜拉蚓相似,而与管状杜拉蚓相差较远,表明同属蚯蚓在进化水平上的亲缘关系。

**关键词** 杜拉属,酯酶同工酶,蚯蚓,分类

动物分类学在近年来有了很大发展,人们  
在应用传统的形态特征进行分类的基础上,已  
将生物化学等方法广泛地应用于鉴别物种的特

异性以及它们在进化的血缘关系上<sup>[1,2]</sup>。Avisé<sup>[3]</sup>

---

\* 本文为内蒙古自然科学基金资助项目。

曾经指出:种间的生化差异对描绘和鉴定不同物种很有参考价值,可使同属物种比较容易地分辨出。程立生<sup>[4]</sup>认为:近缘种包括生殖隔离的在形态上几乎难以区分的种群,却很容易通过生化差异来区别。Ayala 和 Powell<sup>[5]</sup>发现在果蝇属中,以传统分类标准为基础所得的相似性和以同工酶电泳为基础所得的相似性始终是一致的。

目前,应用电泳技术研究不同物种的同工酶已成为比较各物种之间遗传变异的一种常用分子生物学技术,并已在许多动物类群的分类上得到了较为广泛的应用<sup>[6,7]</sup>。而对于寡毛类同工酶方面的研究,国内尚少见,国外这方面的研究也不多。为此,我们从遗传学及进化的角度利用同工酶电泳分析方法,对环节动物门寡毛纲杜拉属三种蚯蚓的酯酶同工酶进行了初步研究,旨在通过探讨这三个种酯酶同工酶的差异,为形态分类增加比较客观的鉴别手段。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 雅和杜拉蚓 (*Drawida jeholensis*) 采自内蒙古卓资县郊区菜地(1990年5—7月、1991年5—7月)。

1.1.2 天锡杜拉蚓 (*Drawida gissi*) 采自呼和浩特市近郊哈拉沁乡(1991年5—7月)。

1.1.3 管状杜拉蚓 (*Drawida syringa*) 采自内蒙古伊盟达拉特旗农田(1991年5—7月)。

这三种蚯蚓参照 Shinjiro Kobayashi<sup>[8]</sup> 以及黄慧芳<sup>[9]</sup>的方法进行分类鉴定。

雅和杜拉蚓 主要特征 体长42—74.5毫米,直径3—4毫米,体节138—165,口前叶的,无背孔,体土灰色,前端数节为肉粉色(活体),体形粗短。环带位于X—XIII节,环带稍有些腺肿。刚毛紧密,对生,环带前  $aa > bc$ , 环带后  $aa < bc$ ,  $ab = cd$ ,  $dd$  不及节周一半。雄孔位于X节下1/3处b毛外侧,基部隆起,上有凹陷的沟纹,类似于乳头状。雌性生殖孔一对,位于11/12节间,很不明显。受精囊孔位于7/8节间c毛处,孔处皮肤向内凹陷,孔旁常有

乳突。身体前端常有不规则排列的乳突。6/7—8/9隔膜甚厚。砂囊2个,位于XI—XII节间,精巢囊一对悬在9/10隔膜上,前列腺呈拇指状,直立于体内腹壁上。10/11与11/12隔膜在背面汇合形成卵巢腔,卵巢自11/12节向后延伸到XV转向身体腹面,变得非常细,止于XXIV—XXIX节。受精囊卵圆形,在7/8隔膜后方,由弯曲盘绕的受精囊管进入一圆球状膨部,膨部还连有一细手指状突出物。

天锡杜拉蚓 主要特征 体长58—147毫米,直径3—5毫米,体节数113—200。口前叶的,无背孔。环带位于X—XIII节。刚毛紧密,对生,  $aa = 7ab$ ,  $ab = cd$ ,  $dd$  约为节周一半,环带前,  $aa > bc$ , 环带后,  $aa < bc$ 。雄性生殖孔位于10/11节间bc毛之间,孔周围皮肤腺肿显著,常有阴茎不同程度地伸出,阴茎基部圆形,长约1.5毫米,直径0.4毫米,末端细而前后扁,雌孔在11/12节间,不明显。受精囊孔一对,位于7/8节间c毛处,呈一小三角形裂缝状。体前端腹面常有不规则排列的乳突。砂囊2—3个,位于XII—XIV节。6/7—8/9隔膜厚。精巢囊在9/10隔膜背侧,肾形,输精管卷曲至腹面穿隔膜入X节,又盘绕多转最后扩大成圆柱形的精管膨部,精管膨部长3—7毫米,位于卵巢腔腹面,其外端逐渐变细,从球形阴茎囊顶部或旁侧进入阴茎囊腔,末端由阴茎通出。受精囊圆形,其管在7/8隔膜后盘旋多转,下通膨腔腰部,膨腔呈圆柱形,卵囊自XII至XVIII节。

管状杜拉蚓 主要特征 体长35—60毫米,直径2—3毫米,体节数101—137节,口前叶的,无背孔。生殖环带位于X—XIII节,腺肿,体色除生殖环带处为土黄色,其余部分皆为青灰色。刚毛紧密,对生,环带前  $aa > bc$ , 环带后  $aa < bc$ ,  $ab = cd$ 。雄孔位于X节下1/3近b毛处的一对乳头状突起上。受精囊孔一对,位于7/8节间近c毛处,X—XII节腹面有多个生殖孔头。砂囊2—3个,位于XII—XIV节或XV节。精巢囊一对,肾形,悬在9/10隔膜上,通常位于IX节部分略大,弯曲的精管通

入前列腺,前列腺成不规则的块状,表面粗糙。卵巢从 XII 节向后延伸,长达 XXXII 节,全长外侧被每节隔膜束缩甚深,成大小不一的钝圆形突起。受精囊一对,在 7/8 隔膜后面,体圆形,受精囊管盘曲松散。

**1.2 样品制备** 选择健康生殖环带明显的蚯蚓,活体剪取其身体后部一段,剖开体壁和肠管将内部的泥沙冲洗干净,然后称重并剪成小块,按 1:2 (W/V)的比例在 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.4) 中匀浆,匀浆液经 15000 转/分离心 20 分钟,取上清液备用。根据样品采集的难易,每种蚯蚓测定了 10—20 只个体,每个样品在相同试验条件下,均重复 5 次以上。

**1.3 电泳** 采用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳,凝胶板为 100 毫米×80 毫米×1.5 毫米,凝胶的制备按莽克强<sup>[10]</sup>的方法,采用高 pH 不连续系统。浓缩胶浓度为 2.5%,分离胶浓度为 7%,电极缓冲液为 pH 8.3 的 Tris-甘氨酸溶液,电泳电压 210 伏特,电流恒定在 30 毫安,4℃ 下电泳 2 小时,样品中加入少许 0.025% 溴酚蓝作为指示染料,每槽加样品 50 微升。

染色主要参考吴鹤龄<sup>[11]</sup>的方法,凝胶板置 37℃ 恒温保温孵育 30 分钟,待 EST 区带显色完全后,用 7% 乙酸固定液浸泡 24 小时后进行照相记录。

## 2 实验结果

**2.1** 三种杜拉属蚯蚓酯酶同工酶电泳图谱见图 1,天锡杜拉蚓显示出 9 条区带;雅和杜拉蚓为 8 条区带;管状杜拉蚓为 11 条区带。三者相比较,雅和杜拉蚓的区带数最少,根据所测各区带迁移率(表 1),天锡杜拉蚓在 Rf 0.55—0.83 的中间带区多 1 条区带,管状杜拉蚓在 Rf 0.83—0.98 的快带区多 2 条区带,在中间带区多 1 条区带。

**2.2** 从酶带的数目、染色强度、宽度以及泳动率几方面来看,三个种的蚯蚓除具有某些相似的特点外,又各具特征。天锡杜拉蚓的 2、3、6、7、8、9 与雅和杜拉蚓的 2、3、5、6、7、8 以及管状杜拉蚓的 3、4、6、7、10、11 (区带编号由正极到

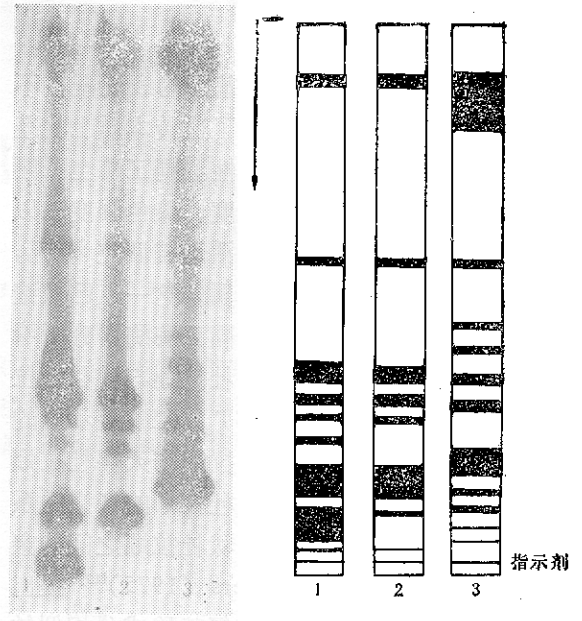


图 1、2 三种杜拉属蚯蚓酯酶同工酶电泳

1.天锡杜拉蚓; 2.雅和杜拉蚓; 3.管状杜拉蚓

表 1 杜拉属不同种酯酶同工酶酶带数目

迁移率 Rf	天锡杜拉蚓	雅和杜拉蚓	管状杜拉蚓
0.83—0.98	3	3	5
0.55—0.83	4	3	4
0.44—0.55	1	1	1
0.11—0.44	1	1	1
合计	9	8	11

负极)这 6 条区带迁移位置相近,视为同源成分,但从同源成分区带所占百分率来看,雅和杜拉蚓对天锡杜拉蚓为 66.7%,前者对管状杜拉蚓为 54.5%。三种杜拉蚓所共有这 6 条酶带宽度也相差很大,天锡杜拉蚓仅第 2 条酶带明显宽于另外两种蚯蚓,其余酶带宽度基本与雅和杜拉蚓相同;而管状杜拉蚓的 4、7、11 三条酶带宽度却明显不同于以上两个种。此外,同源成份区带所占百分率,雅和杜拉蚓对天锡杜拉蚓为 66.7%,对管状杜拉蚓则为 54.5%。比较染色强度,天锡杜拉蚓>雅和杜拉蚓>管状杜拉蚓。雅和杜拉蚓与天锡杜拉蚓在中间带区及慢带区谱形极为相近;而管状杜拉蚓与以上 2 种蚯蚓差别甚远。

### 3 讨论与分析

同工酶受基因控制,是基因的表现型,不同种动物同工酶的差异反映了遗传本质上的差异,因而,具有物种的特异性。同工酶电泳图谱呈现的区带数目、区带宽度、染色强度、以及泳动率等都反映了基因的活动与调控状况,即反映了不同物种的遗传本质,这一点已被诸多实验结果所证实。从酯酶同工酶酶谱分析看出:雅和杜拉蚓是介于天锡杜拉蚓与管状杜拉蚓之间的种类,根据它们 EST 同工酶显示出的明显差异,我们认为雅和杜拉蚓与天锡杜拉蚓的亲缘关系较近,而与管状杜拉蚓的亲缘关系相对较远,天锡杜拉蚓与管状杜拉蚓之间的亲缘关系也较远。这与 Masters (1975)<sup>[11]</sup>提出的:进化上相似的种,具有氨基酸成分相似结构,相反,种间进化上距离越远,其同工酶的趋势性就越明显的观点相吻合。

从酯酶同工酶谱带数来看,三种杜拉属蚯蚓所呈现出的区带数不同,但它们都具有同样的6条谱带,这可能是本属动物所共同的特征。

通过在同样条件下对同种动物的多次重复实验表明,同种动物的不同个体的酯酶同工酶

酶谱基本一致,酶带清晰、稳定、再现性较好,可作为蚯蚓形态分类方法的一种补充手段。

### 参 考 文 献

- 1 钦俊德.生物化学方法在分类上的应用.生物科学参考资料,1974,4: 34—44.
- 2 Ohno, S. Evolution by Gene Duplication, London, George Allen and Unwin Ltd. 1970. 76.
- 3 Avise, J. C. Systematic value of electrophoretic data. *Syst. Zool.* 1974, 23:465—481.
- 4 程立生.同工酶电泳技术在动物分类上的应用.生物学杂志,1987,(4): 20—23.
- 5 Ayala, F. J. and Powell. Allozymes as diagnostic characters of sibling species of *Drosophila*. *Proc Nat. Acad. Sci. USA.* 1972, 69(5): 1094—1096.
- 6 王思义,周厚安.电泳方法在分类学上的应用——以酯酶分析区别萝卜螺属三个种的初步研究.动物分类学报,1984,9(3): 333—334.
- 7 屈红,党蕊叶,宋世良等.鱼眼晶体酯酶同工酶电泳分析.动物学研究,1985,6(2): 154.
- 8 Shinjiro Kobayash. Terrestrial Oligochaeta from Manchoukuo. *Sci. Rep. Tohoku Imp. Univ. Biol.* 1940, (3):261—315.
- 9 黄慧芳.内蒙古部分地区蚯蚓种类调查初报.内蒙古农牧学院学报,1986,7(6): 157—174.
- 10 莽克强.聚丙烯酰胺凝胶电泳.科学出版社. 1975. 34—41.
- 11 吴鹤龄.遗传学实验方法和技术.高等教育出版社. 1984. 273.
- 12 Masters, C. J. and R. S. Holmes. Haemoglobin, Isoenzymes and tissue differentiation. North-Holland. 1975. 66—82 and 153—206.

## PRELIMINARY STUDY ON EST ISOZYMES BETWEEN THREE SPECIES OF THE EARTHWORM GENUS *DRAWIDA*

HAN Yali BA Yar

(Department of Grassland, Nei Monggol Institute of Agriculture and Animal Husbandry Hohhot 010018)

**ABSTRACT** This paper reports the analysis of Esterase isozymes from three species of earthworm genus *Drawida* by discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis method. The number, mobility and dye intensity of the enzyme band have been analysed. The results showed that EST isozymes reflected the specificities of species—genera, each species possessed its specific zymogram. The zymogram of *Drawida jeolensis* was much closer to that of *Drawida gisti* than to that of *Drawida syringa*.

**Key words** *Drawida*, Esterase isozyme, Earthworm, Classification