

# 4 种养殖扇贝的群体遗传多样性及 特异性 AFLP 标记研究

陈省平<sup>1,2</sup>, 包振民<sup>1\*</sup>, 潘 洁<sup>1</sup>, 胡景杰<sup>1</sup>

(1. 中国海洋大学 生命科学与技术学部, 山东 青岛 266003; 2. 中山大学, 广东 广州 510275)

**摘要:**应用 AFLP 技术对我国 4 种主要养殖扇贝进行了遗传分析. 虾夷扇贝、海湾扇贝、华贵栉孔扇贝、栉孔扇贝 4 种养殖扇贝群体中, 种内遗传相似度依次分别为 0.841 5, 0.786 3, 0.719 0 和 0.673 1, 香侬氏指数分别为 43.52, 58.87, 80.16 和 92.83, 栉孔扇贝和华贵栉孔扇贝的遗传多样性水平明显高于海湾扇贝和虾夷扇贝; AFLP 标记共享位点分布表明, 在 4 种扇贝中栉孔扇贝与华贵栉孔扇贝之间的共享位点最多, 同时 4 种扇贝的种间遗传相似度也以栉孔扇贝和华贵栉孔扇贝之间为最高(0.769 5), 海湾扇贝和虾夷扇贝之间为最低(0.662 6), 揭示所研究的几种扇贝中栉孔扇贝和华贵栉孔扇贝的遗传关系最近(遗传距离为 0.262 1); 找到了 21 个种内特异性 AFLP 标记和种间共享标记, 可用于种质鉴定和分子辅助分类.

**关键词:**扇贝; AFLP; 分子标记; 遗传多样性

中图分类号: Q346+.5; S944.4+3

文献标识码: A

文章编号: 0253-4193(2005)02-0160-05

## 1 引言

栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)、华贵栉孔扇贝(*Chlamys nobilis*)、虾夷扇贝(*Patinopecten yesoensis*)和海湾扇贝(*Argopecten irradians*)是我国 4 种主要养殖扇贝种类, 它们分属于扇贝科的 3 个属. 栉孔扇贝主要分布于我国北部沿海、朝鲜和日本沿海; 华贵栉孔扇贝分布于日本的本州、四国、九州, 我国的东部和南部沿海以及印尼; 海湾扇贝和虾夷扇贝是分别从美国和日本引进的<sup>[1,2]</sup>. 近年来随着扇贝养殖规模不断扩大, 其遗传育种工作日益受到重视, 尤其是扇贝种间杂交技术已成为养殖扇贝遗传改良的主要手段之一, 如何进行扇贝种质鉴定也成为有关研究的热点.

扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)技术具有多态性丰

富、共显性表达、无复等位效应、灵敏度高、快速高效等优点, 可在较短的时间内掌握大量遗传信息, 已被广泛地应用于动植物及微生物的分类、鉴定及种群区分等工作中<sup>[3-10]</sup>. AFLP 技术应用于水生生物遗传学研究相对落后于陆生生物, 但随着其广泛渗透, 目前也已经有了相当发展<sup>[11]</sup>. 邱涛等<sup>[12]</sup>分别就沼虾属罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)、海南沼虾(*M. hainanense*)、日本沼虾(*M. nipponense*)和粗糙沼虾(*M. asperulum*)的谱系关系进行了鉴定和分析. 王志勇等<sup>[13,14]</sup>研究了福建官井大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*) AFLP 指纹多态性, 并利用 AFLP 技术研究我国沿海真鲷(*Pagrus major*)群体的遗传变异和趋异. 本文利用 AFLP 技术筛选了我国 4 种养殖扇贝的特异性标记, 并且进行遗传多样性分析, 以期为促进扇贝养殖业健康发展提供参考.

收稿日期: 2004-04-20; 修订日期: 2004-09-20.

基金项目: 国家“十五”“863”计划资助项目(2003AA603022, 2002AA62110); 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金资助项目(01BS10).

作者简介: 陈省平(1975—), 男, 广东省广州市人, 助理研究员, 在职研究生, 从事海洋生物学方面的研究与科研管理工作.

\* 通讯作者: 包振民. E-mail: zm\_bao@ouc.edu.cn

## 2 材料和方法

### 2.1 实验材料

实验用栉孔扇贝于 2000 和 2001 年两次采自山东长岛县海域栉孔扇贝自然原产地深水区; 虾夷扇贝和海湾扇贝采自长岛养殖场, 华贵栉孔扇贝 2001 年采自福建东山, 暂养于养殖场。对每种群体随机取样 32 个个体, 活体解剖取闭壳肌, 液氮保存, 用于 AFLP 分析。

### 2.2 基因组 DNA 的提取和 AFLP 指纹图谱的构建

基因组 DNA 的提取参照 Sambrook 等<sup>[15]</sup>《分子克隆试验指南》。获得的 DNA 样品以 Hind III 酶切的  $\lambda$ DNA 为标准, 进行琼脂糖电泳, 估测样品 DNA 浓度, 将每个样品 DNA 浓度调整为 200 ng/mm<sup>3</sup>。每种或每种群体扇贝取 10 个个体 DNA, 等量混合成一个待测样品。

AFLP 实验方法参照 Vos 等<sup>[16]</sup>的方法, 引物人工接头由上海生物工程合成。引物及接头序列参照 Qi 等<sup>[17]</sup>, 选择性扩增使用了 8 种 EcoR I 引物和 12 种 Mse I 引物共 96 个引物组合<sup>1)</sup>。根据预实验结果, 从扩增带数目适中、多态性高的引物组合中随机选取了 E32M49, E32M54, E35M61, E44M61 四组引物组合。

扩增产物在 4.5% 聚丙烯酰胺凝胶上进行 60 W 恒功率高压电泳。电泳结果参照 Sambrook 等的《分子克隆试验指南》<sup>[15]</sup>进行银染检测。

### 2.3 数据处理和分析

银染之后得到的谱带利用 AFLP 分析软件 Cross Checker version 2.8 进行分析, 有带记为 1, 无带记为 0, 获得 0, 1 矩阵。各扩增位点以所使用的引物组合名称及其在该引物组合所有扩增位点中的序号命名。引物组合名称与序号间用“-”连接。每一引物组合的扩增位点按照片段从大至小依次编号。

多态位点比率等于  $(r-s)/r$ , 其中  $s$  是群体内共享位点数,  $r$  为群体扩增出的总位点数。

显性基因型频率:  $pd = n_i/n$ , 其中  $n_i$  为位点  $i$  上有带的个体数,  $n$  为总个体数; 隐性纯和基因型频率:  $pr = 1 - pd$ 。

根据 Nei 等<sup>[18]</sup>公式  $S_{xy} = 2N_{xy}/(N_x + N_y)$  计算个体间遗传相似性指数, 其中  $N_{xy}$  是个体  $x$  和个体  $y$  共有位点数,  $N_x$  和  $N_y$  分别是个体  $x$  和个体  $y$  总位点数。遗传距离  $D = 1 - S$ 。并由此分别计算 3 种

群体内及群体间的平均遗传相似度  $S'$ 。

参考 Wachira 等<sup>[19]</sup>公式计算香依氏遗传多样性指数: 在群体内等于  $H_{pop}/H_{sp}$ ; 在群体间等于  $(H_{sp} - H_{pop})/H_{sp}$ ;  $H_o = -\sum x_i \ln x_i$ , 其中  $x_i$  为位点  $i$  在某一群体内的显性频率;  $H_{pop} = (\sum H_o)/N$ , 其中  $N$  为群体数;  $H_{sp} = -\sum x \ln x$ , 其中  $x$  为位点  $i$  在  $N$  个群体内的总显性频率。

## 3 结果

### 3.1 4种扇贝的 AFLP 扩增带谱及特异性标记

在预实验的基础上, 本研究选取了 E32M49, E32M54, E35M61, E44M61 这 4 个引物组合, 共得到 510 个扩增位点。从表 1 可见, 在 105 个位点上 4 种扇贝均有扩增带出现, 有 197 个位点上的扩增带只在 3 种扇贝出现, 其中在华贵栉孔扇贝-栉孔扇贝-海湾扇贝中有扩增带出现的位点数最高, 在华贵栉孔扇贝-栉孔扇贝-虾夷扇贝有扩增带出现的位点次数次之, 而在海湾扇贝-虾夷扇贝-华贵栉孔扇贝和海湾扇贝-虾夷扇贝-栉孔扇贝这两组中出现的位点数远低于前面两组。只在 2 种扇贝出现扩增带的位点数也表现了相同的趋势, 在华贵栉孔扇贝-栉孔扇贝中出现扩增带的位点数为 51 个, 比其他几组高 2 倍以上。揭示在 4 种扇贝中, 栉孔扇贝与华贵栉孔扇贝之间的遗传相似性最高。

从表 1 还可看出, 所选择的 4 个引物组合的共享扩增位点数, 虽然在不同种的扇贝中或不同种扇贝组合中的变化较大, 如 E32M49 组合在华贵栉孔-海湾 3 种贝的共享位点数为 30 个, 而 E44M61 在海湾-虾夷-栉孔 3 种贝的共享位点数仅有 2 个, E32M49 组合在华贵-栉孔可以扩增出 18 个共享位点, 而在海湾-虾夷扩增不出共享位点, 但各引物组合的总位点数差别不大, 差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 这说明研究所选择的 4 组引物组合总体上是均匀和平衡的。

在 510 个扩增位点中有 21 个位点在 4 种扇贝中的每个个体呈现全部扩增或完全无扩增两种情况, 也就是显性基因型出现频率出现 100% 或 0 的情况, 因此这 21 个位点上的扩增带用于种群鉴定和区分 (见表 2), 其中栉孔扇贝有 2 个特异性 AFLP 标记, 海湾扇贝有 2 个, 虾夷扇贝有 5 个, 没有找到

1) 选择性引物序列: EcoR I (8 种): GACTGCGTACCAATTC + AAC+ AAG+ ACA+ ACT+ AGA+ AGT+ ATC 和+ ATG; Mse I (12 种): GATGAGTCTGAGTAA + CAA+ CAC+ CAG+ CAT+ CCA+ CCT+ CGA+ CGT+ CTA+ CTC+ CTG 和+ CTT。

华贵栉孔扇贝特有的 AFLP 标记, 另外还有 12 个 AFLP 标记为 2 种或 3 种扇贝共享。(图 1)。

表 1 不同引物组合及不同种扇贝得到扩增带的位点数

位点数	E32M 49	E32M 54	E44M 61	E35M 61	合计
在 4 种扇贝中均有扩增带	31	18	25	31	105
在 3 种扇贝中出					
华贵-栉孔-海湾	30	19	18	19	86
现扩增带					
华贵-栉孔-虾夷	22	12	15	15	64
海湾-虾夷-华贵	5	7	6	4	22
海湾-虾夷-栉孔	5	11	2	7	25
合计	62	49	41	45	197
只在 2 种扇贝中					
出现扩增带					
华贵-海湾	6	7	10	1	24
华贵-栉孔	18	9	15	9	51
华贵-虾夷	6	4	3	1	14
海湾-栉孔	1	10	3	10	24
海湾-虾夷	0	9	4	5	18
栉孔-虾夷	1	7	5	7	20
合计	32	46	40	33	151
只在 1 种扇贝中					
出现扩增带					
华贵栉孔扇贝	3	2	5	0	10
海湾扇贝	4	1	3	5	13
栉孔扇贝	3	12	3	2	20
虾夷扇贝	3	6	4	1	14
合计	13	21	15	8	57
总位点数	138	134	121	117	510

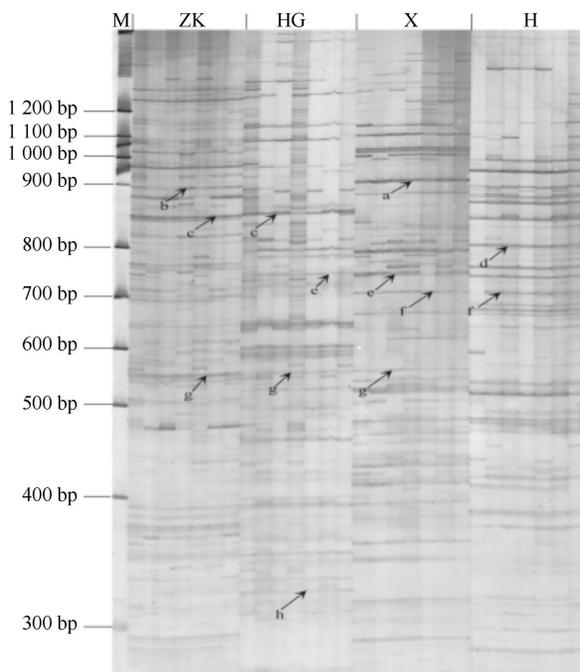


图 1 应用 E32M 49 引物组合在 4 种扇贝中得到的扩增谱带

M: DNA marker; ZK: 栉孔扇贝; HG: 华贵栉孔扇贝; H: 海湾扇贝; X: 虾夷扇贝

a: 虾夷扇贝特异带; b: 栉孔扇贝特异带; c: 栉孔和华贵栉孔扇贝共享带; d: 海湾扇贝特异带; e: 华贵栉孔扇贝和虾夷扇贝共享带; f: 虾夷扇贝和海湾扇贝共享带; g: 栉孔、华贵和虾夷扇贝共享带; h: 华贵栉孔扇贝特异带

### 3.2 4 种扇贝群体遗传相似性、遗传距离和遗传多样性

根据表 3, 4 种扇贝群体遗传相似性为虾夷扇贝

(0.841 5)、海湾扇贝(0.786 3)、华贵栉孔扇贝(0.719 0)、栉孔扇贝(0.673 1), 这说明取样群体中, 虾夷扇贝遗传多样性最低, 栉孔扇贝遗传多样性最高; 由香农氏遗传多样性指数也可以看出这一点: 栉孔扇贝和华贵栉孔扇贝的香农氏指数分别为 92.83 和 80.16, 远高于海湾扇贝和虾夷扇贝的 58.87 和 43.52。

表 2 不同群体的特异性 AFLP 标记

标记种类	标记数	标记位点
栉孔扇贝特异性标记	2	E32M 49-129, E44M 61-74
海湾扇贝特异性标记	2	E32M 49-70, E35M 61-115
虾夷扇贝特异性标记	5	E32M 54-62, E32M 54-111, E32M 54-132, E44M 61-9, E44M 61-73
栉孔- 虾夷- 共享标记	2	E44M 61-90, E44M 61-91
栉孔- 华贵- 虾夷共享标记	1	E35M 61-116
华贵- 海湾共享标记	3	E32M 49-105, E32M 49-127, E44M 61-121
海湾- 虾夷共享标记	6	E32M 54-116, E32M 54-118, E32M 54-134, E35M 61-114, E44M 61-24, E44M 61-117

4 种扇贝的种间遗传相似性以栉孔扇贝和华贵栉孔扇贝之间为最高(0.769 5), 海湾扇贝和虾夷扇贝之间为最低(0.662 6), 也就是栉孔扇贝和华贵栉孔扇贝的遗传距离最近(0.262 1), 海湾扇贝和虾夷扇贝的遗传距离最远(0.4116) (见表 4)。这一结果

也证实了前面从共享扩增位点得出的直观结论。

表3 种内遗传相似性及香农氏指数

遗传相似度	华贵栉孔扇贝	海湾扇贝	栉孔扇贝	虾夷扇贝
平均值	0.719 0	0.786 3	0.673 1	0.841 5
最大值	0.862 5	0.860 5	0.788 3	0.892
最小值	0.509 8	0.666 7	0.558 6	0.792 6
标准差	0.087 7	0.039 2	0.047 5	0.022
香农氏指数	80.16	58.87	92.83	43.52

表4 种间遗传相似性及遗传距离\*

	华贵栉孔扇贝	海湾扇贝	栉孔扇贝	虾夷扇贝
华贵栉孔扇贝	* * * *	0.719 8	0.769 5	0.697 5
海湾扇贝	0.328 7	* * * *	0.749 4	0.662 6
栉孔扇贝	0.262 1	0.288 5	* * * *	0.703 5
虾夷扇贝	0.360 3	0.411 6	0.351 6	

\* 对角线以上是遗传相似度, 对角线以下为遗传距离。

## 4 讨论

栉孔扇贝、华贵栉孔扇贝、虾夷扇贝和海湾扇贝分属于扇贝科的3个属, 4种扇贝间在生态学和生物学方面存在着一定的差异, 在扩增出的510个位点中仅出现了105个位点共有扩增带。找出的栉孔扇贝、虾夷扇贝和海湾扇贝特异性 AFLP 标记可用于种质的分子辅助鉴定。实验中未获得华贵栉孔扇贝特有的 AFLP 标记, 但可以将其他3种扇贝的特异性标记与华贵栉孔扇贝和海湾扇贝共享的3个 AFLP 标记相结合, 进行区分。除了上述4种扇贝的特异性标记和共享标记外, 还有129个位点上的扩增带可以用于显性基因型频率为极端值的种群鉴定

### 参考文献:

- [1] 张福绥. 海湾扇贝引进中国10周年[J]. 齐鲁渔业, 1993, 48(5): 9—12.
- [2] 张福绥, 何义朝, 元铃欣, 等. 海湾扇贝引种复壮研究[J]. 海洋与湖沼, 1997, 28(2): 146—152.
- [3] AJMON-M ARSAN P, VALENTINI A, CASSANDRO M, et al. AFLP<sup>TM</sup> markers for DNA fingerprinting in cattle[J]. Animal Genetics, 1997, 28: 418—426.
- [4] A ARTS H J M, VAN L A J T, KEIJER J. High-resolution genotyping of *Salmonella* strains by AFLP-fingerprinting[J]. Letters in Applied Microbiology, 1998, 26: 131—135.
- [5] 孙 易, 宋文芹, 钟贻诚, 等. 用 RAPD 和 AFLP 的方法对中国卤虫 (*Artemia*) 种及亲缘关系的研究[J]. 遗传学报, 2000, 27(3): 210—218.
- [6] 任 军, 黄路生, 艾华水, 等. 24个中外猪种(群)的 AFLP 多态性及其群体遗传关系[J]. 遗传学报, 2002, 29(9): 774—781.
- [7] 梁智勇, 史景泉, 魏 泓, 等. 10个品系小鼠的 AFLP 分析[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(2): 155—159.
- [8] 王世伟, 齐小辉, 刘 军, 等. AFLP 技术在微生物分类鉴定、基因标定及遗传多样性方面的应用[J]. 生物技术, 2003, 13(5): 42—43.
- [9] CHAI Jia-fang, WU Zh-ming, ZHAO He, et al. Using subtracted AFLP to efficiently mark an alien chromosome fragment in wheat background[J]. Acta Botanica Sinica, 2003, 45(4): 379—383.
- [10] 庞晓明, 邓秀新, 胡春根. 积属36份特异种质的 AFLP 指纹图谱构建与分析[J]. 园艺学报, 2003, 30(4): 394—398.

和区分。另外, 上述获得的 AFLP 标记还可用于杂交子代的遗传组成研究和遗传结构分析。

宋林生等<sup>[20]</sup>报道了栉孔扇贝的野生种群与养殖群体的 RAPD 遗传多态性分析, 两者的多态性位点比例分别为 75.82% 和 73.47%, 遗传多样性水平较高。根据本实验分析结果, 我国原产的华贵栉孔扇贝遗传相似度为 0.719 0, 栉孔扇贝遗传相似度为 0.673 1, 其遗传多样性比较丰富。可能是长期以来较多使用野生苗种进行养殖生产, 种内遗传多样性仍维持在较高水平。

我国养殖的海湾扇贝原产于美国及加拿大的大西洋沿海, 虾夷扇贝产于日本的北海道及本州北部。经过多年养殖, 已形成了较大的养殖群体, 但由于受到引进原种个体数量少而形成的瓶颈效应影响, 其遗传多样性均低于栉孔扇贝和华贵栉孔扇贝2个本地种; 另外, 养殖中的近交繁殖也进一步降低了种群的遗传多样性。Blake<sup>[21]</sup>分析了在我国养殖了10a的海湾扇贝与引种地经过相同时间养殖的群体在 mtDNA 上的差异, 发现我国引种群体的杂合度低于引种地群体。张喜昌等<sup>[22]</sup>研究发现, 海湾扇贝在大连湾沿岸4个不同生态环境条件下的养殖群体的遗传多样性均处于较低水平, 其多态性位点比例为 18.18% ~ 22.73%, 同时在人工养殖中也出现了生长速度减缓、贝柱产率下降以及病害严重等近交衰退现象, 通过几次引种扩大了养殖种群的遗传来源, 起到了引种复壮的作用<sup>[2]</sup>, 但从长期来看, 如何保持种群的遗传多样性、减少遗传瓶颈效应以及防止养殖群体近交衰退仍是保障扇贝养殖业持续发展的根本所在。

- [11] 张留所,孔晓瑜,喻子牛,等. AFLP 技术在水生动物遗传学研究中的应用及前景展望[J]. 高技术通讯, 2003, 4: 95—99.
- [12] 邱涛,陆仁后,项超美,等. 4 种沼虾的 SRFA 指纹研究[J]. 中国水产科学, 1999, 6(1): 1—4.
- [13] 王志勇,王艺磊,林利民,等. 利用 AFLP 指纹技术研究中国沿海真鲷群体的遗传变异和趋势[J]. 水产学报, 2001, 25(4): 289—293.
- [14] 王志勇,王艺磊,林利民,等. 福建官井大黄鱼 AFLP 指纹多态性的研究[J]. 中国水产科学, 2002, 9(3): 198—202.
- [15] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIC T. 分子克隆试验指南(第二版)[M]. 金东雁,黎孟枫,等译. 北京: 科学出版社, 1996.
- [16] VOS P, HOGERS R, BLEEKER M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23(21): 4 490—4 414.
- [17] QI X, LINDHOUT P. Development of AFLP markers in barley[J]. Molecular General Genetics, 1997, 254: 330—336.
- [18] NEIM, LI W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction Endonucleases[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American, 1979, 76: 5 296—5 273.
- [19] WACHIRA F H, WAUGH R, HACKETT C A, et al. Detection of genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) using RAPD markers[J]. Genome, 1995, 38: 201—210.
- [20] 宋林生,李俊强,李红雷,等. 用 RAPD 技术对我国栉孔扇贝野生种群与养殖种群的遗传结构及其遗传分化的研究[J]. 高技术通讯, 2002, 7: 83—86.
- [21] BLAKE S G. Mitochondrial DNA variation in the cultured bay scallop. *Argopecten irradians*[J]. Journal of Shellfish Research, 1994, 13(1): 301—302.
- [22] 张喜昌,梁玉波,刘仁沿,等. 海湾扇贝养殖群体遗传多样性的研究[J]. 海洋学报, 2002, 24(2): 107—113.

## Analyses of the population genetic diversity and species specific markers in four scallop species, *Patinopecten yessoensis*, *Argopecten irradians*, *Chlamys nobilis* and *C. farreri*

CHEN Sheng-ping<sup>1,2</sup>, BAO Zhen-min<sup>1</sup>, PAN Jie<sup>1</sup>, HU Jing-jie<sup>1</sup>

(1. Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** The AFLP technology was used to analyse the genetic diversity of four scallops, *Patinopecten yessoensis*, *Argopecten irradians*, *Chlamys nobilis* and *C. farreri*. The genetic similarity index of the four species is 0.841 5, 0.786 3, 0.719 0 and 0.673 1, while Shannon index is 43.52, 58.87, 80.16 and 92.83, respectively. The results show that the two native species, *C. farreri* and *C. nobilis*, have higher level of the genetic diversity than the two introduced species, *A. irradians* and *P. yessoensis*. The results also show that *C. nobilis* and *C. farreri* shared the most common loci. The genetic distance indicates that *C. nobilis* and *C. farreri* are closely related. Moreover, out of 510 AFLP markers, 21 specific bands are found to distinguish the four species scallop and these markers may be applied for germplasm characterization and molecular assistant classification in scallops.

**Key words:** scallop; AFLP; markers; genetic diversity