

# 帘蛤科 4 种养殖蛤群体遗传多样性和种间关系的 fAFLP 分析

彭永兴<sup>1</sup>, 程汉良<sup>1</sup>, 夏德全<sup>2</sup>, 吴婷婷<sup>2</sup>, 孟学平<sup>1</sup>, 吉红九<sup>3</sup>, 董志国<sup>1</sup>

(1. 淮海工学院 江苏省海洋生物重点建设实验室, 江苏 连云港 222005; 2. 中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081; 3. 江苏省海洋水产研究所, 江苏 南通 226007)

**摘要:**利用荧光标记扩增片段长度多态性(fAFLP)技术对文蛤(*Meretrix meretrix*)、青蛤(*Cyclina sinensis*)、菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)和硬壳蛤(*Mercenaria mercenaria*)4种帘蛤科贝类的群体遗传多样性和种间关系进行了研究。选择 EcoR / Mse 进行酶切,使用 6 个 E+3/M+3 引物组合进行扩增,共获得 1 096 个位点,多态位点比率 95.1%,片段长度 50~456 bp。其中,文蛤、青蛤、菲律宾蛤仔和硬壳蛤分别得到 681,715,702 和 694 个位点,相应的多态位点比率为 76.8%,81.7%,83.0%和 75.1%,得到 17 个种特异性位点,可作为 4 物种特征标记。分析了群体遗传相似系数和遗传多样性指数以及种间遗传相似系数。结果表明,硬壳蛤群体遗传相似系数最高(0.670 9),遗传多样性指数最低(0.236 0);菲律宾蛤仔群体遗传相似系数最低(0.592 5),遗传多样性指数最高(0.261 8);根据遗传相似系数采用 UPGMA 法构建了 4 物种 32 个体的聚类图,表明文蛤与菲律宾蛤仔遗传关系最近,青蛤与其他 3 物种遗传关系较远。

**关键词:**荧光标记扩增片段长度多态性(fAFLP);遗传多样性;蛤;帘蛤科(Veneridae);分子标记;系统发育分析;物种鉴定

中图分类号:S917.4

文献标识码:A

文章编号:1000-3096(2008)01-0045-07

帘蛤科(Veneridae)贝类广泛分布于世界各海域,共有 12 个亚科,500 多种,很多种类具有重要的商业价值<sup>[1]</sup>。文蛤(*Meretrix meretrix*)、青蛤(*Cyclina sinensis*)和菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)是中国主要养殖种类,硬壳蛤(*Mercenaria mercenaria*)是 1999 年从美国引进的种类。近十几年来,中国蛤类养殖业发展迅速,2004 年养殖产量已达 279.9 万 t。目前,中国养殖用蛤的苗种大部分来源于人工育苗,一些种类经过累代养殖,出现生活力下降,个体变小和抗逆性差等问题,大面积死亡现象时有发生,严重困扰养殖业的健康发展,要解决这一问题,必须加快优良品种的选育工作。但目前帘蛤科贝类遗传基础研究还不多,只采用 RAPD 和 ISSR 技术对不同地理种群文蛤的遗传多样性进行过研究<sup>[2~5]</sup>;采用 RAPD 技术对不同地理种群青蛤的遗传变异进行过研究<sup>[6]</sup>;采用同工酶技术对帘蛤科 4 物种的种质鉴定进行过研究<sup>[7]</sup>。近年来在海洋贝类育种中,世界各国纷纷加大了对分子标记的研究,应用现代分子生物学技术,快速确定优良性状的分子标记,结合传统育种方法,可缩短育种周期。AFLP 是 20 世纪 90 年代中期发展起来的一种高效分子标记技术<sup>[8]</sup>,广泛应用于动植物及微生物的种质鉴定、种群遗传结构研究和遗传图谱构建等领域<sup>[9~14]</sup>,这一技术应用于海洋贝类相对较晚。王玲玲等<sup>[15,16]</sup>采用 AFLP 对 4 种扇贝(*Chlamys farreri*, *Chlamys*

*nobilis*, *Patinopecten yessoensis*, *Argopecter irradians*)群体遗传多样性进行了研究。王志勇等<sup>[17]</sup>用 AFLP 技术对 4 种鲍(*Haliotis diversicolor super-texta*, *H. diversicolor diversicolor*, *Haliotis discus hannai*, *H. discus discus*)的物种鉴定和种间关系进行了研究。

作者采用荧光标记扩增片段长度多态性(fAFLP)分子标记技术,研究帘蛤科 4 种蛤的遗传多样性和种间关系,目的是探讨目前养殖文蛤、青蛤和菲律宾蛤仔大规模死亡现象是否是由于种质退化引起的,同时,为帘蛤科贝类种质鉴定和系统分类提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品收集和基因组 DNA 提取

试验用文蛤、青蛤、菲律宾蛤仔和硬壳蛤采集于江苏省赣榆县海头镇农业技术服务中心育苗场,均为人工养殖群体,其中硬壳蛤是 2000 年由科学

收稿日期:2006-01-22;修回日期:2007-03-26

基金项目:“十五”国家科技攻关计划专题项目(2004BA526B0403);江苏省海洋生物技术重点建设实验室开放基金项目(2006HS001)

作者简介:彭永兴(1965-),男,江苏南通人,讲师,研究方向:水产生物技术;程汉良,通讯作者,教授,E-mail:CHL3139@163.com

院海洋研究所引入当地的,文蛤、青蛤和菲律宾蛤仔的亲本均采自于沿海滩涂。每种随机取蛤 32 个,剪取后闭壳肌 50 mg 左右,采用 CTAB 法提取总 DNA<sup>[18]</sup>,DNA 溶于 TE 中,-20 保存备用。

## 1.2 酶切连接一步进行

用 EcoR 和 MseI 双酶切基因组 DNA,用 T<sub>4</sub> DNA 连接酶将酶切片段与双链人工接头(表 1)相连。在 20 μL 的反应体系含有:10 ×T<sub>4</sub> DNA 连接酶缓冲液 2.5 μL,MseI/EcoRI 内切酶 2 μL(含 1U MseI 和 5U EcoRI),50 pmol MseI 人工接头和 5 pmol EcoRI 人工接头 1 μL,基因组 DNA 4 μL(50 mg/L),10 mmol/L ATP 2.5 μL,T<sub>4</sub>Ligase 1 μL,AFLP-Water 7 μL。混匀离心数秒,37 保温 5 h,8 保温 4 h,4 过夜。

表 1 人工接头和 PCR 引物

Tab. 1 Adapters and primers sequences for PCR

引物/接头	编号	序列(5' - 3')
EcoR 接头		5'-CTCGTA GACTGCGTACC-3' 3'-CTGACGCATGGTTAA-5'
EcoR (通用引物)	E	GACTGCGTACCAATTC
EcoR +1 预扩增引物	E 01	E + A
EcoR +3 引物(5 mg/L)	E 33	E + AAC
	E 34	E + AAG
	E 35	E + ACA
	E 36	E + ACT
	E 37	E + ACC
	E 38	E + ACG
	E 39	E + AGC
	E 40	E + AGG
MseI 接头		5'-GACGATGA GTCCTGAG-3' 3'-TACTCAGGACTCAT-5'
MseI (通用引物)	M	GATGAGTCCTGAGTAA
MseI +1 预扩增引物	M 01	M + C
MseI +3 引物(30 mg/L)	M 31	FAM 标记 M + CAA
	M 32	FAM 标记 M + CAC
	M 33	FAM 标记 M + CAG
	M 34	FAM 标记 M + CAT
	M 35	FAM 标记 M + CTA
	M 36	FAM 标记 M + CTC
	M 37	FAM 标记 M + CTG
	M 38	FAM 标记 M + CTT

## 1.3 预扩增

预扩增使用带有 1 个选择性碱基的引物(表 1),

25 μL 总体系中含有:10 ×Tag 酶缓冲液 2.5 μL、dNTPs 1 μL,1 U/μL Tag 酶 0.5 μL,EcoR / MseI 引物 1 μL,2 μL 酶切连接产物,AFLP-Water 18 μL,离心数秒,按下列参数进行 PCR 扩增,首先 72 °C,2 min,随后是 30 个循环,每个循环包括 94 °C 变性 30 s;56 °C 退火 30 s;72 °C 延伸 80 s,30 个循环之后 72 °C 延伸 5 min。然后用 20 倍的 TE<sub>0.1</sub>(20 mmol/L Tris-HCl,0.1 mmol/L EDTA,pH = 8.0)稀释,作为选扩模板。

## 1.4 选择性扩增

选择性扩增使用 3 个选择性碱基的引物(表 1),25 μL 体系中含有:2 μL 稀释的上述预扩增产物,EcoR 引物 1 μL,FAM 标记的 MseI 引物 1 μL,dNTPs 0.5 μL,10 ×PCR buffer 2.5 μL,Taq 酶 0.5 μL,AFLP-Water 17.5 μL 混匀离心数秒,按下列参数进行 PCR 扩增:第一轮 94 °C 变性 30 s;65 °C 退火 30 s;72 °C 延伸 80 s。以后每轮退火温度递减 0.7 °C,扩增 12 轮。接着按下列参数扩增 23 轮:94 °C 变性 30 s;55 °C 退火 30 s;72 °C 延伸 80 s。

## 1.5 扩增产物的检测及数据处理

选择性扩增产物加入内标(标准分子质量标记,50~700 bp)后在 ABI prism 377 自动测序仪上电泳分离和记录,由自动测序仪收集的 AFLP 电泳数字图像经 GeneScan 3.1 分析,计算出 DNA 片段的长度并生成样品文件,样品文件经 Binthere 汇集后输出 DNA 片段分子量矩阵以 Excell 文件保存,根据分子量矩阵统计总位点数,各物种位点数,多态位点数,计算多态位点比率  $P [P = (\text{总位点数} - \text{共享位点数}) / \text{总位点数} \times 100\%]$ 。根据引物组合和片段长度由小到大对各位点进行编号。根据分子量矩阵位点的有无构建 0/1 数据矩阵,参照 Nei 等<sup>[19]</sup>的公式  $S_{xy} = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$  计算个体间遗传相似系数,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  $y$  总位点数,遗传距离  $D_{xy} = 1 - S_{xy}$ 。

参考 Wachiara 等<sup>[20]</sup>公式  $H = -\frac{1}{N} \sum X_i \ln X_i$  计算群体遗传多样性指数,其中, $X_i$  为位点  $i$  在某一群体内的显性频率, $N$  为此群体检测到的位点总数。根据个体间的遗传相似系数,采用 NTSYS-PC 2.10 软件用 UPGMA 方法构建聚类图。

## 2 结果与分析

### 2.1 扩增位点数、多态位点比率及种特异性位点

通过对 8 对引物 64 个组合的筛选,从扩增位点数目适中、多态性高的引物组合中选取了 E33/M31、E33/M33、E33/M34、E33/M35、E33/M37 和 E33/M38 等 6 个引物组合。4 物种共扩增出 1 096 个位点,多态位点比率高达 95.1%。其中,E33/M31 有 191 个位点、E33/M33 有 179 个位点、E33/M34 有 180 个位点、E33/M35 有 177 个位点、E33/M37 有 191 个位点和 E33/M38 有 178 个位点(表 2),扩增片段长

度为 50 ~ 456 bp。由于存在大量的缺失位点,各物种扩增位点数不同,文蛤、青蛤、菲律宾蛤仔和硬壳蛤 6 组引物分别扩增出了 681,715,702 和 694 个位点,各引物组合扩增位点数和多态位点比率见表 3。菲律宾蛤仔多态位点比率最高,达 83.0%,青蛤(81.7%)、文蛤(76.8%)依次降低,硬壳蛤最低,为 75.1%。

在 1 096 个位点中,有 17 个位点是物种特异性位点(表 4),表现为显性基因型频率在某一物种中为 100%,而在其他物种中为 0%,根据特异性位点(特异性缺失)在 6 组引物中的分布,可以很容易地将 4 物种区别开。因此,这些位点可用于物种鉴定。

表 2 种间扩增位点数及多态位点比率

Tab. 2 The number of loci and percentage of polymorphic loci among species

引物组合	总位点数	共享位点数	多态位点 比率(%)	缺失位点数			
				文蛤	青蛤	菲律宾蛤仔	硬壳蛤
E33/M31	191	3	98.4	85	44	73	54
E33/M33	179	8	95.5	76	56	50	55
E33/M34	180	14	92.2	58	52	58	55
E33/M35	177	13	92.7	60	69	74	82
E33/M37	191	10	94.8	69	87	48	82
E33/M38	178	6	96.6	67	73	91	74
合计	1 096	54	95.1	415	381	394	402

表 3 种内扩增位点数及多态位点比率

Tab. 3 The number of loci and percentage of polymorphic loci within species

引物组合	种内位点数(共享位点数)				种内多态位点比率(%)			
	文蛤	青蛤	菲律宾蛤仔	硬壳蛤	文蛤	青蛤	菲律宾蛤仔	硬壳蛤
E33/M31	106(21)	147(25)	118(11)	137(24)	80.2	83.0	83.0	82.5
E33/M33	103(24)	123(11)	129(18)	124(40)	76.6	91.1	90.7	67.7
E33/M34	122(23)	128(29)	122(26)	125(36)	81.1	77.3	86.0	71.2
E33/M35	117(31)	108(34)	103(26)	95(22)	73.5	68.5	78.7	76.8
E33/M37	122(36)	104(16)	143(23)	109(29)	70.5	84.6	74.8	73.4
E33/M38	111(23)	105(16)	87(15)	104(22)	79.3	84.8	83.9	78.8
合计	681(158)	715(131)	702(119)	694(173)	76.8	81.7	83.0	75.1

注:括号内数字为种内共享位点数

表 4 种间特异性位点及其在各引物组合中的分布

Tab. 4 Specific loci and their distribution in six primer combinations

位点编号	所在引物组合	片段大小(bp)	基因型频率(%)			
			文蛤	青蛤	菲律宾蛤仔	硬壳蛤
R1-56	E33/ M31	160 ~ 161	100	0	0	0
R1-67	E33/ M31	182	0	100	0	0
R1-122	E33/ M31	294 ~ 295	0	100	0	0
R1-131	E33/ M31	315	0	0	0	100
R1-158	E33/ M31	372 ~ 373	0	100	0	0
R1-176	E33/ M31	416 ~ 417	0	100	0	0
R2-136	E33/ M33	330	100	0	0	0
R2-160	E33/ M33	401	0	0	0	100
R3-167	E33/ M34	408	0	100	0	0
R4-90	E33/ M35	228 ~ 229	0	100	0	0
R4-130	E33/ M35	311	100	0	0	0
R4-135	E33/ M35	326 ~ 327	0	100	0	0
R4-144	E33/ M35	352 ~ 353	0	100	0	0
R4-172	E33/ M35	434 ~ 435	0	0	100	0
R5-149	E33/ M37	352 ~ 353	100	0	0	0
R5-183	E33/ M35	434 ~ 435	100	0	0	0
R6-35	E33/ M38	118 ~ 119	100	0	0	100

## 2.2 种内遗传多样性分析

根据 fAFLP 数据计算 4 种蛤 32 个体间的遗传相似系数和遗传多样性指数,进而求出种内遗传相似系数和遗传多样性指数(表 5)。硬壳蛤遗传相似系数最高(0.670 9),遗传多样性指数最低(0.236 0),说明其遗传多样性水平较低,菲律宾蛤仔种群遗传相似系数最低(0.592 5),而遗传多样性指数最高(0.261 8),说明其遗传多样性水平较高。青蛤和文蛤遗传多样性水平居于二者之间。

表 5 种内遗传相似系数及遗传多样性指数

Tab. 5 The genetic similarity coefficient and genetic diversity index within species

遗传相似系数	文蛤	青蛤	菲律宾蛤仔	硬壳蛤
平均	0.652 1	0.609 9	0.592 5	0.670 9
最大值	0.730 6	0.695 9	0.652 5	0.735 6
最小值	0.564 9	0.535 3	0.543 0	0.617 0
标准差	0.035 8	0.042 9	0.025 4	0.028 9
遗传多样性指数	0.245 4	0.260 3	0.261 8	0.236 0

## 2.3 种间遗传关系及聚类分析

根据 32 个体间遗传相似系数,求出种间遗传相似系数(表 6)。文蛤与菲律宾蛤仔的遗传相似系数最高(0.425 2),而文蛤与青蛤的遗传相似系数最低(0.398 2)。根据 32 个体间的遗传相似系数用 UP-GMA 方法(Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Average)构建了聚类图(图 1)。

由图 1 可见,每个物种 8 个体首先聚在一起,种间文蛤与菲律宾蛤仔先聚为一类,然后是硬壳蛤,最后与青蛤聚在一起。物种间的遗传相似系数和聚类图都表明,文蛤与菲律宾蛤仔遗传关系最近,青蛤与其他 3 物种的遗传关系较远。图 1 也清楚地显示,菲律宾蛤仔遗传多样性水平最高,青蛤、文蛤和硬壳蛤遗传多样性水平依次降低。4 种蛤种间遗传相似系数明显低于各自群体内个体间的相似系数,表明 4 物种遗传趋异比较明显。

表 6 种间遗传相似系数

Tab. 6 The genetic similarity coefficient among species

物种	文蛤	青蛤	菲律宾蛤仔	硬壳蛤
文蛤				
青蛤	0.398 2 ±0.020 6			
菲律宾蛤仔	0.425 2 ±0.028 4	0.402 5 ±0.030 8		
硬壳蛤	0.418 4 ±0.027 7	0.401 9 ±0.029 1	0.415 9 ±0.028 6	

注:表内数字表示平均值 ±标准差

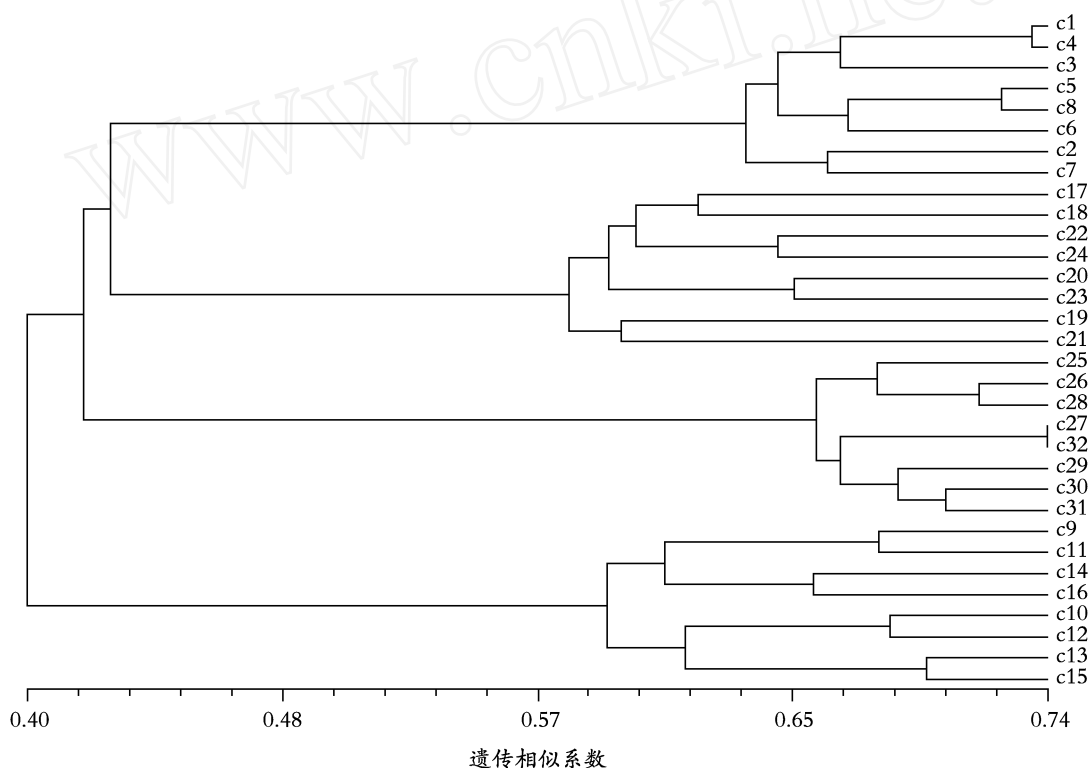


图 1 基于 6 对引物 fAFLP 数据计算遗传相似系数,用 UPGMA 法构建的帘蛤科 4 种蛤 32 个体聚类图

Fig. 1 Dendrogram of UPGMA based on genetic similarity coefficient of 32 individuals from four kinds of clams in Veneridae

c1 ~ c8. 文蛤 (*Meretrix meretrix*); c9 ~ c16. 青蛤 (*Cyclina sinensis*);

c17 ~ c24. 菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*); c25 ~ c32. 硬壳蛤 (*Mercenaria mercenaria*)

### 3 讨论

AFLP 分子标记技术利用 RFLP 的可靠性和 PCR 的高效性,对基因组 DNA 双酶切片段进行选择性扩增,生物在进化过程中,如果 DNA 遗传特性发生了改变,酶切片段数目、长短亦会发生变化,则谱带显示多态性,典型的 AFLP 分析,每次检测到的谱带数在 50 ~ 100 条之间。对 4 种主要 DNA 标记技术比较研究表明,综合效应大小依次为 AFLP > SSR > RAPD > RFLP,其中 RFLP 操作复杂但可靠性高,RAPD 重复性差但具有高效性,而 AFLP 兼具

RFLP 和 RAPD 的优点<sup>[9, 11, 12]</sup>。因此,AFLP 被认为是迄今为止最有效的分子标记。fAFLP 基本原理与常规 AFLP 相同但在选择性扩增引物的 5 端标记上了荧光物质,在测序仪上电泳时由于激光的激发产生不同波长的荧光能被测序仪自动收集生成图像,具有数据收集自动化、定量化,灵敏性更好、速度更快、效率更高等特点,能节省大量的时间和物资。AFLP 指纹已广泛应用于动植物分子遗传图谱的构建、遗传多样性分析、分子标记辅助选择育种与种质鉴定等方面,并取得了巨大的成绩,具有广阔的应用前景。

AFLP 标记应用于海洋贝类遗传变异分析,已有一些成功的报道<sup>[16,17,21]</sup>。本研究首次把 fAFLP 技术应用于帘蛤科贝类群体遗传多样性分析和种间关系研究,并证明这一技术十分可靠。4 种贝类多态位点比率(表 3)、遗传相似系数和遗传多样性指数(表 5)等几项指标都一致表明菲律宾蛤仔遗传多样性水平最高,青蛤、文蛤和硬壳蛤依次降低。究其原因,可能是硬壳蛤引进种群数量较小,文蛤养殖历史较长,长期有意识或无意识地人工选择或近亲繁殖,造成遗传多样性水平降低。尽管 4 种帘蛤遗传多样性水平有一定的差异,总体上仍居较高水平,这与采用 RAPD 和 ISSR 技术对中国文蛤<sup>[2~5]</sup>和青蛤<sup>[6]</sup>遗传多样性水平研究的结论相一致。从保护的角度看,文蛤、青蛤和菲律宾蛤仔具有较高的遗传多样性,应保护这种多样性不丢失;从育种角度看,4 种蛤具有较大的遗传改良潜力。同时也说明中国目前养殖文蛤、青蛤和菲律宾蛤仔大规模死亡现象可能不是由于种质退化引起的,而是另有其他原因。

AFLP 标记也是进行种质鉴定和种间遗传关系分析的有效工具。陈省平等<sup>[16]</sup>对 4 种养殖扇贝 AFLP 分析表明,种间遗传相似系数 0.262 1~0.769 5;王志勇<sup>[17]</sup>应用 AFLP 技术研究了中国养殖的 4 种鲍的亲缘关系,种间遗传相似系数 0.240 4~0.834 8,表明 AFLP 是进行扇贝和鲍物种鉴定和种间关系研究的有效手段。上述研究中种间遗传相似系数高于本研究 0.398 2~0.425 2 的水平,说明 4 种蛤种间遗传趋异比较明显,亲缘关系较远。

对帘蛤科 4 种贝类 fAFLP 分析表明,这一技术所揭示的群体遗传多样性水平与 RAPD 结果相一致,所揭示的种间关系与 ITS 序列所揭示的 4 种蛤的遗传关系完全相同<sup>[22]</sup>。表明 AFLP 技术适用于帘蛤科贝类遗传多样性分析和种间关系探讨。

#### 参考文献:

- [1] 庄启谦. 中国动物志:双壳纲-帘蛤科[M]. 北京:科学出版社, 2001. 1-10.
- [2] 阎冰,邓岳文,杜晓东,等. 广西地区文蛤的遗传多样性研究[J]. 海洋科学, 2002, 26(5):5-8.
- [3] 沈怀舜,朱建一,丁亚平,等. 中国沿海三个文蛤地理种群的 RAPD 分析[J]. 海洋学报, 2003, 25(5):97-102.
- [4] 杜晓东,邓岳文,叶富良,等. 广东和广西地区野生文蛤的遗传多样性[J]. 中国水产科学, 2004, 11(1)41-47.
- [5] 陈大鹏,沈怀舜,丁亚平,等. 文蛤 (*Meretrix meretrix*) 地理种群 ISSR 分子标记的初步研究[J]. 南京师范大学报(自然科学版), 2004, 27(3):74-77.
- [6] 么宗利,周凯,来琦芳,等. 中国五个青蛤地理种群遗传变异的 RAPD 分析[J]. 海洋渔业, 2005, 27(2):102-108.
- [7] 程汉良,夏德全,吴婷婷,等. 四种帘蛤科贝类同工酶研究[J]. 中国水产, 2005, 10:75-77.
- [8] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. **Nucleic Acids Res**, 1995, 23: 4407-4414.
- [9] Pejic I, Ajmone-Marsan P, Morgante M, et al. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs [J]. **Theor Appl Genet**, 1998, 97:1 248-1 255.
- [10] Castiglioni P, Ajmone-Marsan P, van Wijk R, et al. AFLP markers in a molecular linkage map of maize: codominant scoring and linkage group distribution [J]. **Theor Appl Genet**, 1999, 99:425-431.
- [11] 袁力行,傅骏骅,Warburton M,等. 利用 RFLP, SSR, AFLP 和 RAPD 标记分析玉米自交系遗传多样性的比较研究[J]. 遗传学报, 2000, 27(8):725-733.
- [12] Garcia-Mas J, Oliver M, G6mez-Paniagua H, et al. Comparing AFLP, RAPD and RFLP markers for measuring genetic diversity in melon [J]. **Theory Appl Genet**, 2000, 101:860-864.
- [13] Tan Y D, Wan C L, Zhu Y F, et al. An amplified fragment length polymorphism map of the silkworm [J]. **Genetics**, 2001, 157: 1 277-1 284.
- [14] Waycott M, Barnes P A G. AFLP diversity within and between populations of the Caribbean seagrass *Thalassia testudinum* (Hydrocharitaceae) [J]. **Marine Biology**, 2001, 139:1 021-1 028.
- [15] 王玲玲,宋林生,李红蕾,等. AFLP 和 RAPD 标记技术在栉孔扇贝遗传多样性研究中的应用比较[J]. 动物学杂志, 2003, 38(4):35-39.
- [16] 陈省平,包振民,潘洁,等. 4 种养殖扇贝的群体遗传多样性及特异性 AFLP 标记研究[J]. 海洋学报, 2005, 27(2): 160-164.
- [17] 王志勇,柯才焕,王艺磊,等. 从 AFLP 指纹和标记基因序列看我国养殖的四种鲍的遗传关系[J]. 高技术通讯, 2004, 12:93-98.
- [18] Winnepenninckx B, Backeljau T, de Wachter R. Extraction of high molecular weight DNA from mollusks [J]. **Trends Genet**, 1993, 9: 407.
- [19] Nei M, 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: 5 269-5 273.

- [20] Wachira F N, Waugh R, Hackett C A, *et al.* Detection of genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) using RAPD markers [J]. *Genome*, 1995, 38: 201-210.
- [21] 史兼华,何毛贤,黄良民,等. 马氏珠母贝选育系遗传变异的 AFLP 分析[J]. 高技术通讯, 2006, 16(5): 534-538.
- [22] Cheng H L, Xia D Q, Wu T T, *et al.* Study on sequences of ribosomal DNA internal transcribed spacers of clams belonging to the Veneridae family (Mollusca: Bivalvia) [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2006, 33(8): 702-710.

## Fluorescent amplified fragment length polymorphism (fAFLP) analysis of population genetic diversity and species relationships of four species of cultured clams in family Veneridae (Mollusca : Bivalvia)

PENG Yong-xing<sup>1</sup>, CHENG Han-liang<sup>1</sup>, XIA De-quan<sup>2</sup>, WU Ting-ting<sup>2</sup>, MENG Xue-ping<sup>1</sup>, JI Hong-ju<sup>3</sup>, DONG Zhi-guo<sup>1</sup>

(1. Huaihai Institute of Technology, Jiangsu Province Key Lab of Marine Biotechnology, Lianyungang 222005, China; 2. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China; 3. Jiangsu Province Institute of Marine Fisheries, Nantong 226007, China)

**Received** : Jan. , 22 , 2006

**Key words** : fAFLP; genetic diversity; clams; Veneridae; molecular markers; phylogenetic analysis; species identification

**Abstract** : Fluorescent amplified fragment length polymorphism (fAFLP) method was used to study the population genetic diversity and species relationships of four species of cultured clams in family Veneridae. Digestion with enzymes EcoR / Mse and amplification with six E + 3 / M + 3 primer combinations are made. A total of 1096 AFLP loci ranging from 50 to 456 bp were detected, 95.1 % of them was polymorphic loci. For each clam, *Meretrix meretrix*, *Cyclina sinensis*, *Ruditapes philippinarum*, *Mercenaria mercenaria*, the numbers of loci were 681, 715, 702 and 694, and the percentages of polymorphic loci were 76.8 %, 81.7 %, 83.0 % and 75.1 %, respectively, 17 specific loci were found, which can be used to distinguish four species of clams. Base on the fAFLP data, the genetic similarity coefficient and genetic diversity index among these species were computed. As a result, the largest genetic similarity coefficient (0.6709) and lowest genetic diversity index (0.2360) occurred in *M. mercenaria*, while the smallest genetic similarity coefficient (0.5925) and highest genetic diversity index (0.2618) occurred in *R. philippinarum*. The cluster analysis of 32 individuals from four species was performed with UPGMA method based on genetic similarity coefficient, and the dendrogram of these species was constructed. It was indicated that *M. meretrix* has a close relationship with *R. philippinarum*, and *C. sinensis* has a distant relationship with other species.

(本文编辑:张培新)