

# 山东沿海菲律宾蛤仔不同地理群体遗传多样性的 AFLP 分析

邹 琰<sup>1</sup>, 李 莉<sup>1</sup>, 张 良<sup>2</sup>, 吕 芳<sup>1</sup>, 辛美丽<sup>1</sup>, 张少春<sup>1</sup>, 邱兆星<sup>1</sup>, 刘洪军<sup>1</sup>

(1. 山东省海水养殖研究所 山东省海水健康养殖工程技术研究中心, 山东 青岛 266002; 2. 国家海洋局 第一海洋研究所, 山东 青岛 266061)

**摘要:** 利用 AFLP 技术对山东沿海菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)4 个野生群体(乳山、无棣、牟平、即墨)进行了遗传多样性分析。采用 6 对引物组合对 4 个群体进行扩增, 共得到 356 个位点, 乳山群体、无棣群体、牟平群体和即墨群体的多态位点比例依次为 74.40%、70.50%、72.80%、74.70%, 具有较高的遗传多样性水平。其中, 即墨群体多态性比例最高, 无棣群体多态性比例最低。聚类分析表明, 各群体间的遗传距离为 0.0263~0.0448, 乳山群体和无棣群体间的遗传距离最近(0.0263), 两群体首先聚在一起, 随后与牟平群体和即墨群体聚在一起。

**关键词:** 菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*); 地理群体; 遗传多样性; AFLP

中图分类号: S917.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2014)02-0076-04

doi: 10.11759/hyxx20130703001

菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)隶属于软体动物门(Mollusca), 瓣鳃纲(Lamellibranchia), 帘形目(Veneroidea), 蛤仔属(*Ruditapes*)。是广温、广盐、广分布的亚热带种, 是蛤仔属中我国仅有的两个种类之一<sup>[1]</sup>。我国是世界菲律宾蛤仔的第一养殖大国, 山东省是我国菲律宾蛤仔主产地。近年来, 随着菲律宾蛤仔人工养殖规模的急速发展, 异地移养现象频繁出现, 加速了菲律宾蛤仔自然群体间遗传背景的混杂, 对我国菲律宾蛤仔种质资源的保护产生了不利的影响。因此, 深入研究菲律宾蛤仔群体遗传学, 对保护菲律宾蛤仔种质资源及其增养殖业的健康发展有着重要的意义。

国内已有学者利用形态参数<sup>[2]</sup>、同工酶<sup>[3-5]</sup>、RAPD 标记<sup>[6]</sup>、AFLP 标记<sup>[7]</sup>对不同地理群体的菲律宾蛤仔进行了遗传学研究, 但山东菲律宾蛤仔主要产区的蛤仔遗传基础背景依然模糊。作者对山东菲律宾蛤仔 4 个主要产区的自然群体进行遗传多样性 AFLP 分析, 探讨各群体的主要遗传参数和遗传变异水平, 为了解菲律宾蛤仔的种质状况提供数据支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)样品为 2009 年 10 月采自烟台牟平(Muping, 简称: MP)、威海乳山(Rushan, 简称: RS)、青岛即墨(Jimo, 简称: JM)和滨州无棣(Wudi, 简称: WD)自然海区的

野生个体, 经活体运输至实验室进行形态性状测量与解剖。各样品采样地点、采集时间及样品数量详细信息列于表 1。取样品的闭壳肌放入离心管中, 保存在-76℃的超低温冰箱中, 用于 DNA 提取。

实验用的 EcoR I、Mse I 内切酶和 T4-DNA 连接酶来自 Fermentas 公司, PCR 扩增体系使用的 Taq 酶、Buffer、MgCl<sub>2</sub>、dNTP 购自青岛碧海生物技术有限公司。

表 1 菲律宾蛤仔实验样品来源

Tab. 1 The sources of experimental samples of *Ruditapes philippinarum*

群体	采样地点	采集时间 (年-月)	样本数量 (个)
RS	乳山徐家海区 (36°53'N, 121°47'E)	2009-10	50
WD	无棣沙头堡海区 (38°12'N, 118°04'E)	2009-10	50
MP	养马岛附近海区 (37°26'N, 121°36'E)	2009-10	50
JM	鳌山湾海区 (36°21'N, 120°42'E)	2009-10	50

收稿日期: 2013-09-22; 修回日期: 2013-12-28

基金项目: 山东省良种工程课题“蛤类优质高产抗逆贝类选育”与“水产经济生物种质资源收集、保护与评价”联合资助

作者简介: 邹琰(1986-), 女, 硕士, 研究实习员, 主要从事海水养殖研究, 电话: 0532-82675359, E-mail: qdyzsy@163.com; 刘洪军, 通信作者, 男, 研究员, 研究方向: 海水健康养殖与生态环境调控, 电话: 0532-82681569; 邱兆星, 通信作者, 男, 研究员, 研究方向: 海水增养殖与渔业资源, 电话: 0532-82655582

### 1.2 DNA 提取和 AFLP 分析

采用 Li 等<sup>[8]</sup>的方法进行样品 DNA 提取。DNA 样品采用 0.8%的琼脂糖凝胶电泳进行质量检测,经紫外分光光度仪(VarianCary 50 型)进行定量,调整 DNA 质量浓度为 100 mg/L,置于 4℃备用。

遗传多样性检测使用的六对 AFLP 选扩引物如下: E-ATG/M-CCT, E-ACA/M-CCT, E-AAG/M-CGA, E-ACA/M-CGA, E-ACT/M-CCT, E-ACT/M-CGA, 主要参照 Vos 等<sup>[9]</sup>的方法进行检测。

### 1.3 数据分析

根据菲律宾蛤仔各群体基因组 DNA 电泳条带的有、无分别记录为“1”、“0”,得到数据矩阵,找出 4 个地理群体的特异性扩增位点,并计算出现频率。

采用 AFLPSURV 1.0 软件计算多态位点比率( $P$ )和期望杂合度( $H_e$ )<sup>[10]</sup>。群体间遗传距离参照 Nei<sup>[11]</sup>,用软件 TPGA 软件进行计算<sup>[12]</sup>,并使用 TPGA 软件的非加权平均聚类法对菲律宾蛤仔的 4 个地理群体进行聚类分析,绘制聚类图。群体间  $F_{st}$  值的显著性检验采用 TPGA 软件的 Exact Test 进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 AFLP 扩增结果

在 100~330bp 范围内,用 6 对扩增引物在菲律宾蛤仔 4 个野生地理群体共 200 个个体中统计了 356 个位点,平均每对引物扩增 59.3 条产物。其中 E-ACA/M-CGA 得到 56 个, E-AAG/M-CGA 得到 61 个, E-ATG/M-CCT 得到 82 个, E-ACT/M-CCT 得到 54 个, E-ACT/M-CGA 得到 40 个, E-ACA/M-CCT 得到 63 个。从表 2 可得知,乳山群体的扩增位点最多,无棣群体的扩增位点数最少。4 个菲律宾蛤仔地理群体的多态位点比率为 70.5%~74.7%,期望杂合度为

表 2 菲律宾蛤仔群体 AFLP 标记扩增结果  
Tab. 2 The amplification results of *Ruditapes philippinarum* populations

引物组合	总片段	RS	MP	JM	WD
E-ACA/M-CGA	56	51	49	50	49
E-AAG/M-CGA	61	40	29	34	34
E-ATG/M-CCT	82	52	55	53	50
E-ACT/M-CCT	54	44	46	45	48
E-ACT/M-CGA	40	28	34	33	32
E-ACA/M-CCT	63	57	49	53	48
合计	356	272	262	268	261

0.250~0.259。其中即墨群体的期望杂合度值最大,为 0.259;无棣群体的期望杂合度值最小,为 0.250,见表 3。

表 3 菲律宾蛤仔群体 AFLP 多态性位点比率和期望杂合度  
Tab.3 The expected heterozygosity ( $H_e$ ) and percentage of polymorphism loci ( $P$ ) of four *Ruditapes Philippinarum* populations

群体	蛤仔数(个)	多态性位点比率(%)	期望杂合度
RS	50	74.4	0.257
WD	50	70.5	0.250
MP	50	72.8	0.255
JM	50	74.7	0.259

### 2.2 遗传分化分析

4 个菲律宾蛤仔野生地理群体间的遗传分化系数( $F_{st}$ )为 0.063 5~0.102 9,平均大小为 0.088 8。乳山与无棣两个群体之间的遗传分化系数最小,为 0.063 5,即墨与无棣群体之间的遗传分化系数最高(表 4)。对 4 个群体两两  $P$  值的 Exact Test 结果显示,4 个群体的遗传分化系数两两显著。

表 4 菲律宾蛤仔群体间遗传分化分析  
Tab. 4 Pairwise genetic differentiation between four populations of *Ruditapes philippinarum*

群体	RS	WD	MP	JM
RS		< 0.001	< 0.001	< 0.001
WD	0.0635***		< 0.001	< 0.001
MP	0.0927***	0.0944***		< 0.001
JM	0.0904***	0.1029***	0.0891***	

注:\*\*\*表示  $P < 0.001$

### 2.3 聚类分析

由表 5 可知,乳山群体与无棣群体的遗传距离最近(0.026 3),而即墨群体和无棣群体之间的遗传距离最大(0.044 8),变化趋势与  $F_{st}$  值一致。

对菲律宾蛤仔 4 个地理群体进行聚类分析(图 1)。

表 5 菲律宾蛤仔 4 个群体间遗传距离  
Tab. 5 Nei's unbiased genetic distance between four populations of *Ruditapes philippinarum*

	RS	WD	MP	JM
RS				
WD	0.0263			
MP	0.0398	0.0398		
JM	0.0397	0.0448	0.0385	

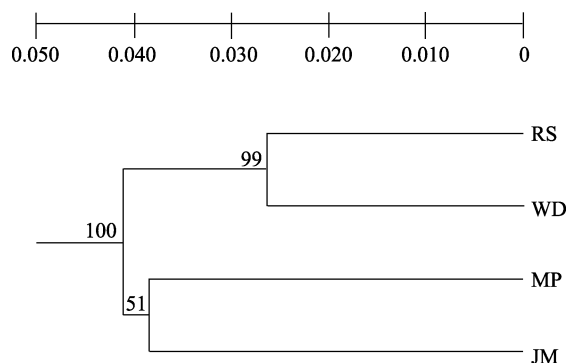


图1 菲律宾蛤仔群体的 UPGMA 聚类图

Fig. 1 The dendrogram of four *Ruditapes philippinarum* populations by UPGMA cluster analysis

结果显示乳山群体与无棣群体亲缘关系最近, 两个群体首先聚在一起, 获得 99% 支持率。牟平群体和即墨群体的遗传距离次之, 两者聚为一类, 置信度获得 51% 支持率。

### 3 讨论

#### 3.1 AFLP 标记技术的检测效果评价

本研究对山东沿海菲律宾蛤仔 4 个野生地理群体进行遗传多样性 AFLP 分析。结果表明, 4 个群体的平均多态位点比率为 73.10%, 对比文蛤野生群体的平均多态位点比率 72.76%<sup>[13]</sup>和虾夷扇贝野生群体的平均多态位点比率 66.29%<sup>[14]</sup>, 可知山东省菲律宾蛤仔的遗传多样性相对较高。

葛京盈等<sup>[4]</sup>对锦州、大连、丹东和青岛 4 个地方的野生菲律宾蛤仔群体的同工酶进行了检测, 结果表明 4 个群体的多态位点百分数为 33.33, 平均杂合度期望值为 0.082 5; 李旭光等<sup>[5]</sup>采用同工酶技术对福建平潭岛、浙江象山港、江苏海州湾和辽宁辽东湾 4 个海区菲律宾蛤仔野生群体的生化遗传特征进行了分析, 结果表明 4 个群体的平均多态位点比率为 68.75%, 平均杂合度期望值为 0.306 1。由此可见与同工酶标记相比, 在菲律宾蛤仔的检测中, AFLP 位点具有更丰富的多态性。

#### 3.2 菲律宾蛤仔群体的遗传多样性分析

菲律宾蛤仔分布较广, 其分布海域间的生态环境的客观差异, 必然在各地理群体之间形成相对的地理隔离, 进而造成某些差异。本研究中两两比较 4 个地理群体间的  $F_{st}$  值均显示差异显著, 说明 4 个群体间存在显著遗传分化。各群体间的  $F_{st}$  值为 0.063 5~0.102 9, 其中无棣群体与乳山群体之间的遗传分化

系数最小, 即墨群体和牟平群体的遗传分化系数最高。Wright<sup>[15]</sup>认为  $F_{st}$  值为 0~0.05, 群体间无显著分化;  $F_{st}$  值为 0.05~0.15, 群体间的分化程度中等。本研究的 4 个地理群体间  $F_{st}$  值均大于 0.05, 显示了较高的分化程度。

### 4 结论

本文的研究结果表明, 4 个菲律宾蛤仔野生群体间已出现一定的遗传分化。其中无棣群体和乳山群体的遗传距离最近, 即墨群体与无棣群体遗传距离最远。UPGMA 树结果也显示无棣群体与乳山群体遗传距离最近, 而即墨群体与牟平群体则另聚在一起。4 个野生群体并没有遵循地理距离越近, 遗传结构越为相似的规律, 这可能与近年来菲律宾蛤仔异地移养所导致的种质混杂、遗传渐渗有关。

随着菲律宾蛤仔人工养殖规模的不断扩大, 累代人工繁育导致的种质问题越来越严重, 菲律宾蛤仔异地移养现象也随之广泛出现。异地异养虽然可以在短时间内提高养殖户的经济效益, 但其底播增殖行为也在一定程度上造成了不同地区菲律宾蛤仔野生品种的交叉污染。山东是菲律宾蛤仔养殖大省, 同样存在这样的问题。近些年, 福建菲律宾蛤仔苗种因为价格便宜, 冲击了山东的菲律宾蛤仔苗种市场, 许多育苗场大量采购福建蛤仔苗种, 进行人工养殖、底播增殖, 必然对当地的菲律宾蛤仔的遗传基础产生影响。Liu 等<sup>[7]</sup>对我国大连、青岛、杭州和厦门 4 个菲律宾蛤仔自然群体遗传多样性进行的 AFLP 分析结果表明, 青岛群体与福建厦门群体遗传相似程度较高, 进而得出异地购苗增殖已经对青岛菲律宾蛤仔野生群体的遗传结构产生了一定影响的结论。本研究中青岛即墨群体与烟台牟平群体遗传距离较近, 表明牟平菲律宾蛤仔野生群体可能也受到了福建菲律宾蛤仔遗传杂交的污染。

参考文献:

- [1] 葛京盈. 菲律宾蛤仔形态学与同工酶分析[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2007.
- [2] 刘仁沿, 张喜昌, 马成东, 等. 菲律宾蛤仔形态性状及与遗传变异的关系研究[J]. 海洋环境科学, 1999, 18(2): 6-10.
- [3] 刘仁沿, 梁玉波, 张喜昌, 等. 中国北方菲律宾蛤仔同工酶电泳的初步分析比较[J]. 海洋环境科学, 1999, 18(1): 24-28.

- [4] 葛京盈, 刘萍, 高天翔. 菲律宾蛤仔 4 个野生群体的同工酶分析[J]. 海洋水产研究, 2008, 29(6): 63-70.
- [5] 李旭光, 许广平, 阎斌伦, 等. 菲律宾蛤仔不同地理群体生化遗传结构与变异的研究[J]. 海洋科学, 2009, 33(4): 61-65.
- [6] 王晓红. 菲律宾蛤仔生态遗传学研究[D]. 沈阳: 辽宁师范大学, 2003.
- [7] Liu X Q, Bao Z M, Hu J J, et al. AFLP analysis revealed differences in genetic diversity of four natural populations of Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in China[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2007, 26(1): 150-158.
- [8] Li Q P, Kijima C A. Isolation and characterization of microsatellite loci in the Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*[J]. Journal of Shellfish Research, 2002, 21: 811-815.
- [9] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA finger printing[J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23(21): 4407-4114.
- [10] Vekemans X, Beauwens T, Lemaire M, et al. Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size[J]. Molecular Ecology, 2002, 11: 139-151.
- [11] Nei M. The theory of genetic distance and evolution of human races[J]. Journal of Human Genetics, 1978, 23: 341-369.
- [12] Miller M P. Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3: a Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data[J]. Planta Daninha, 1997, 2: 55-57.
- [13] 林志华, 贾守菊, 董迎等. 文蛤不同群体的同工酶分析[J]. 大连水产学院学报, 2009, 24(6): 525-530.
- [14] 鲍相渤, 董颖, 赫崇波等. 基于 AFLP 技术对中国虾夷扇贝群体种质资源的研究[J]. 生物技术通报, 2009, 4: 126-129.
- [15] Wright S. Evolution and the genetics of populations[M]. Chicago: University Chicago Press, 1978.

## Analysis of genetic diversity of different geographical populations of *Ruditapes philippinarum* along the coast of Shandong Province by AFLP markers

ZOU Yan<sup>1</sup>, LI Li<sup>1</sup>, ZHANG Liang<sup>2</sup>, LU Fang<sup>1</sup>, XIN Mei-li<sup>1</sup>, ZHANG Shao-chun<sup>1</sup>, QIU Zhao-xing<sup>1</sup>, LIU Hong-jun<sup>1</sup>

(1. Marine Culture Institute of Shandong Province Healthy mariculture engineering research center of Shandong Province, Qingdao 266002, China; 2. First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao 266061, China)

Received: Sep., 22, 2013

**Key words:** *Ruditapes philippinarum*; geographical populations; genetic diversity; AFLP

**Abstract:** The AFLP technique was applied to investigate genetic diversity of 4 geographical populations of *Ruditapes philippinarum* in coastal sea of Shandong. Six primer pairs were used to generate 356 loci among individuals in 4 populations. The proportion of polymorphic loci for the Rushan, Wudi, Muping and Jimo population was 74.40%, 70.50%, 72.80% and 74.70% respectively, suggesting high levels of genetic diversity. The Jimo population exhibited the highest genetic diversity, and the Wudi population exhibited the lowest one. The cluster analysis showed that the genetic distance among the 4 populations was 0.0263~0.0448 and the genetic distance between the Rushan and Wudi population was the smallest one (0.0263). The Rushan and Wudi populations were clustered together and subsequently grouped with Muping-Jimo clade.

(本文编辑: 梁德海)