

# 两种蛤仔群体遗传多样性的形态参数 及 AFLP 分析\*

刘相全<sup>1</sup> 包振民<sup>2</sup> 胡景杰<sup>2</sup> 何金霞<sup>1</sup> 方建光<sup>3</sup> 王如才<sup>2</sup>

(1. 山东省海洋水产研究所 烟台 264006; 2. 中国海洋大学 青岛 266003;  
3. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

**摘要** 采用多变量形态度量学方法,对大连(DL)、青岛(QD)、厦门(XM)、珠海(ZH)4个菲律宾蛤仔群体和湛江(RV)1个杂色蛤仔群体的形态变异进行了比较研究,建立了群体形态聚类图和形态判别函数,结果较客观地显示了4个菲律宾蛤仔群体之间以及与杂色蛤仔群体之间的差异。利用4对引物组合对菲律宾蛤仔青岛群体与杂色蛤仔湛江群体共48个个体进行了AFLP分析,共得到216个位点,其中特有位点29个,可作为2个物种鉴别的分子标记。两种蛤仔都显示了较高的群体遗传多样性,菲律宾蛤仔群体内遗传相似度为0.6051,杂色蛤仔为0.6882,群体间的平均遗传相似度只有0.2968。群体内香农多样性指数菲律宾蛤仔为0.2526,略高于杂色蛤仔的0.2154。对所有个体聚类分析,同种个体可以很好地聚在一起,没有出现种间的交叉,表明两种蛤仔具有明显的遗传差异。

**关键词** 菲律宾蛤仔,杂色蛤仔,形态变异,遗传多样性,AFLP

**中图分类号** S968.3

蛤仔属(*Ruditapes* Chiamenti, 1900)是双壳纲(Bivalvia)、异齿亚纲(Heterodonta)、帘蛤目(Veneroida)、帘蛤科(Veneridae)贝类(蔡英亚等, 1995)。蛤仔属在中国只有两个种,即菲律宾蛤仔 *Ruditapes philippinarum* (Adama et Reeve, 1850)和杂色蛤仔 *Ruditapes variegata* (Sowerby, 1852)。菲律宾蛤仔是我国传统的养殖贝类,我国南北沿海都有分布;而杂色蛤仔是一种野生种类,在我国只分布在福建平潭及其以南地区(庄启谦, 2001)。两种蛤仔在地理分布上有重叠而外表又非常相似,因此有必要从形态以及分子标记方面对其群体遗传结构进行分析,从而为蛤仔属的分类、种质保护以及遗传育种等奠定基础。

形态数量性状在分类方面作为最初的一个重要的指标,但用于区分地理种群间的差异报道较少。目前,已有在脉红螺(杨建敏等, 2006)、文蛤(林志华等, 2008)、大菱鲆(马爱军等, 2008)等种类的研究。本文对我国蛤仔属的两个种类的群体形态数量性状差异进行了研究,以期对蛤仔属分类提供参考依据。

种群遗传多样性是物种赖以生存的基础。长期的养殖对菲律宾蛤仔的群体遗传多样性产生了怎样的影响,两种蛤仔的群体遗传多样性是否有明显差异,本文采用 AFLP 技术对此进行了分析。在贝类方面,应用 AFLP 技术研究不同种间(王志勇等, 2004; 陈省平等, 2005)及不同地理群体间(潘洁等, 2002; 张雯等, 2005; Liu *et al.*, 2007; 林志华等, 2008)的遗传多样性已有报道,但目前尚未见蛤仔属种间的研究报道。本文对两种蛤仔的基因组 DNA 进行 AFLP 分析,以弄清这两个种的差异和群体遗传结构的特点。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

四个菲律宾蛤仔地理种群,取材地点为:大连(DL)、青岛(QD)、厦门(XM)、珠海(ZH)。杂色蛤仔(RV)取自湛江硇洲岛。种群名称及样品采集地等基本信息见表1。外地样品空运到青岛,暂养于中国海洋大学贝类实验室。

\* 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目,2002AA603015 号。刘相全,博士,E-mail:lxq6808@163.com

收稿日期:2009-05-17,收修改稿日期:2009-07-22

表 1 种群名称及样品采集地  
Tab.1 The population's name of *Ruditapes* and their origin

种类	种群缩写	样本数	采集地	采集时间 (年.月)	所属海区	平均壳长(cm)
菲律宾蛤仔	DL	50	辽宁大连 38°78'N, 121°14'E	2003.05	渤海	3.34 ± 0.43
	QD	50	山东青岛 36°18'N, 120°30'E	2003.05	黄海	3.18 ± 0.32
	XM	50	福建厦门 24°51'N, 118°21'E	2003.05	东海	3.87 ± 0.27
	ZH	50	广东珠海 22°13'N, 113°83'E	2003.06	南海	3.11 ± 0.21
杂色蛤仔	RV	50	广东湛江 20°94'N, 110°63'E	2003.10	南海	3.10 ± 0.19

## 1.2 形态数据测量

每群体随机取样 50 个个体, 逐一测定长、宽、高和体重。用游标卡尺测定长宽高: 壳长是贝壳前端至后端的距离; 壳宽是左右壳间最大的距离; 壳高是由壳顶至腹缘的距离。

## 1.3 DNA 提取和 AFLP 分析

青岛群体和湛江群体各随机取样 30 个个体, 活体解剖取闭壳肌, 用于 AFLP 分析。基因组 DNA 的提取参照《分子克隆实验指南 第三版(上、下册)》(Sambrook *et al.*, 2001)。

采用 E33M58、E35M55、E39M55、E45M58 四组引物组合(引物序列见表 2), 对两种蛤仔进行了 AFLP 分析, 方法参照 Vos 等(1995)。

## 1.4 数据分析

**1.4.1 形态数据分析** 使用 SPSS 建立各个群体长、宽、高的多元回归方程, 并做差异显著性检验。

对形态参数进行两两组合以消除个体大小的影响, 以此作为标准化数值, 使用 STATISTICA6.0 软件

中的 Joining 法和 Euclidean 距离对样本个体、群体平均值及参数变量进行聚类分析。

**1.4.2 AFLP 数据分析** 银染之后得到的带谱利用 AFLP 分析软件 Cross Checker version 2.9 进行分析, 有带记为 1, 无带记为 0, 获得 0、1 矩阵。

按 Nei 等(1979)的公式计算个体间遗传相似性指数和遗传距离, 并计算群体内平均遗传相似度。根据个体间遗传距离矩阵, 用 PHYLIP 3.6 的 NEIGHBOR 程序以 UPGMA 方法对所有个体聚类。

参考 Wachira 等(1995)公式计算香农多样性指数; 对群体中的遗传变异来源进行 AMOVA 分析(Arlequin, 2001, Schneider)。

## 2 结果

### 2.1 群体间形态变异分析

**2.1.1 回归方程的建立** 经显著性检验, 壳高对壳长和壳宽回归关系以及壳高对壳长和壳宽回归系数差异性显著, 可用来建立回归方程。各群体壳高( $H$ )对壳长( $L$ )和壳宽( $W$ )的多元回归方程分别为:

$$H_{DL} = 2.529 + 0.239L + 0.841W$$

$$H_{QD} = 2.255 + 0.177L + 0.961W$$

$$H_{XM} = 2.362 + 0.423L + 0.465W$$

$$H_{ZH} = 3.162 + 0.406L + 0.409W$$

$$H_{RV} = 2.258 + 0.488L + 0.399W$$

壳高对壳长和壳宽的回归方程显示, 不同群体壳高对壳长和壳宽的依赖程度不同。其中, 青岛群体壳宽变化对壳高的影响最大, 而珠海群体的影响最小。

杂色蛤仔壳长变化比壳宽变化对壳高的影响大, 这是与菲律宾蛤仔的不同。

**2.1.2 聚类结果分析** 对所有蛤仔的个体进行聚类分析, 结果表明, 各群体有一定的相似性, 大致可以把各个群体区分开来, 但其中有较多的个体混杂。两种蛤仔从个体数量性状进行区分时, 也有许多个体交叉, 说明两种蛤仔在外形上是比较相似的。

运用每个变量的平均值对群体进行聚类分析,

表 2 AFLP 分析所用接头和引物序列

Tab.2 Adaptor and primer sequences used for AFLP analysis

引物/接头	序列(5' 3')
<i>Mse</i> I adapter	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' 3'-TACTCAGGACTCAT-5'
M00(通用引物)	GATGAGTCCTGAGTAA
<i>Mse</i> I +1 引物: M02	M00 + C
<i>Mse</i> I +3 引物: M55	M00 + CGA
	M00 + CGT
<i>Eco</i> RI adapter	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 3'-CTGACGCATGGTTAA-5'
E00(通用引物)	GACTGCGTACCAATTC
<i>Eco</i> RI +1 引物: E01	E00 + A
<i>Eco</i> RI +3 引物: E33	E00 + AAG
	E00 + ACA
	E00 + AGA
	E00 + ATG

如图 1 所示。菲律宾蛤仔的聚类结果与各群体的地理位置有直接关系, 距离较近的厦门群体与珠海群体首先聚在一起, 其次是青岛群体, 最后是大连群体。两种蛤仔的距离明显高于菲律宾蛤仔种内群体间的距离。聚类图较客观地反应了各群体之间的关系。

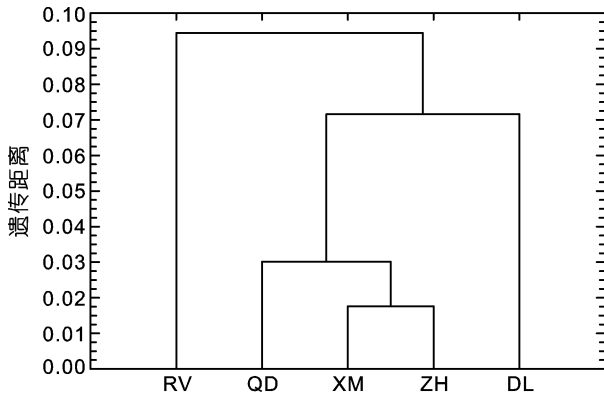


图 1 菲律宾蛤仔各群体与杂色蛤仔群体形态特征均值聚类图

Fig.1 The dendrogram of hierarchical cluster analysis on four different populations of *R. philippinarum* and one of *R. variegata*

## 2.2 两种蛤仔的 AFLP 扩增带谱

4 对选择性扩增引物, 从两种蛤仔共 48 个个体的基因组 DNA 中, 检出总计 216 个大小介于 80—500bp 之间的不同条带。菲律宾蛤仔和杂色蛤仔多态性条带比例分别是 87.9% 和 90.9%, 如表 3 所示。从 AFLP 指纹图谱上检出的 216 个条带中, 12 个条带为菲律宾蛤仔所特有, 17 个条带为杂色蛤仔所特有。这些存在于一种蛤仔而另一种没有的条带, 可以用作 2 个物种鉴别的分子标记。图 2 为引物组合 E45M58 对两种蛤仔扩增的结果。可见菲律宾蛤仔与杂色蛤仔的 AFLP 指纹差异明显, 通过 AFLP 指纹很容易将 2 种蛤仔加以鉴别。在同一物种的个体之间, 则有着较多共享条带, AFLP 指纹较相似。

## 2.3 群体的遗传结构及遗传多样性分析

菲律宾蛤仔群体内遗传相似度为 0.6051, 杂色蛤

表 3 两种蛤仔群体的遗传结构

Tab.3 Average similarity, Shannon's index and percentage of polymorphic loci of *R. philippinarum* and one of *R. variegata*

群体结构	菲律宾蛤仔	杂色蛤仔
多态位点比例(%)	87.9	90.9
香农多样性指数	0.2526±0.1165	0.2154±0.1281
遗传相似度	0.6051±0.0967	0.6882±0.1647

仔为 0.6882, 群体间的平均遗传相似度只有 0.2968。群体内香农多样性指数菲律宾蛤仔略高于杂色蛤仔, 为 0.2526(表 3)。

应用分子方差分析(AMOVA)对两种蛤仔群体的遗传多样性来源进行分析, 结果表明: 群体内的变异只有 45.64%, 而群体间的变异占 54.36%, 说明两种蛤仔具有明显的遗传差异(表 4)。

表 4 两种蛤仔群体的 AMOVA 分析

Tab.4 Analysis of molecular variance (AMOVA) for two populations of *R. philippinarum* and one of *R. variegata*

变异来源	自由度	方差和	变异组分	百分比(%)
群体间	1	125.75	5.39	54.36
群体内	46	208.04	4.52	45.64

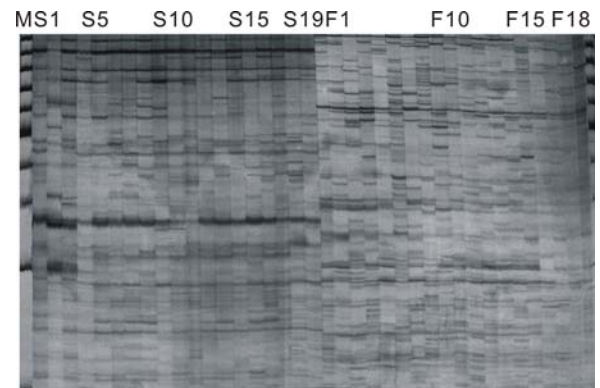


图 2 E45M58 对两种蛤仔的扩增图谱

Fig.2 A portion of an AFLP gel with prime E45M58 of *R. philippinarum* and one of *R. variegata*

注: S<sub>1</sub>—S<sub>19</sub> 为杂色蛤仔, F<sub>1</sub>—F<sub>18</sub> 为菲律宾蛤仔

## 2.4 聚类分析

根据个体间的遗传距离矩阵, 对所分析的 18 个菲律宾蛤仔和 30 个杂色蛤仔的进行聚类。结果表明, 同一种内的个体可以很好地聚在一起, 两种蛤仔之间没有任何交叉, 说明两个种差异明显(图 3)。

## 3 讨论

根据形态数量性状研究水产动物的特征, 可以为分类或选种提供依据。已有的报道多集中在与生产性状相关体重脂肪含量等的相关研究。如刘小林等(2002)研究了栉孔扇贝壳尺寸性状对活体重的影响; Harue 等(2000)利用多元相关分析进行了红海鲤科养殖鱼类标准体长、体重对体脂肪含量的估计; Debowski 等(1999)用多元回归方法对大西洋鲑鱼形态学特征(体长、体重、体高)估计体脂肪含量的研究; Robert 等(1999)根据大扇贝(*Pecten maximus*)双轮幼

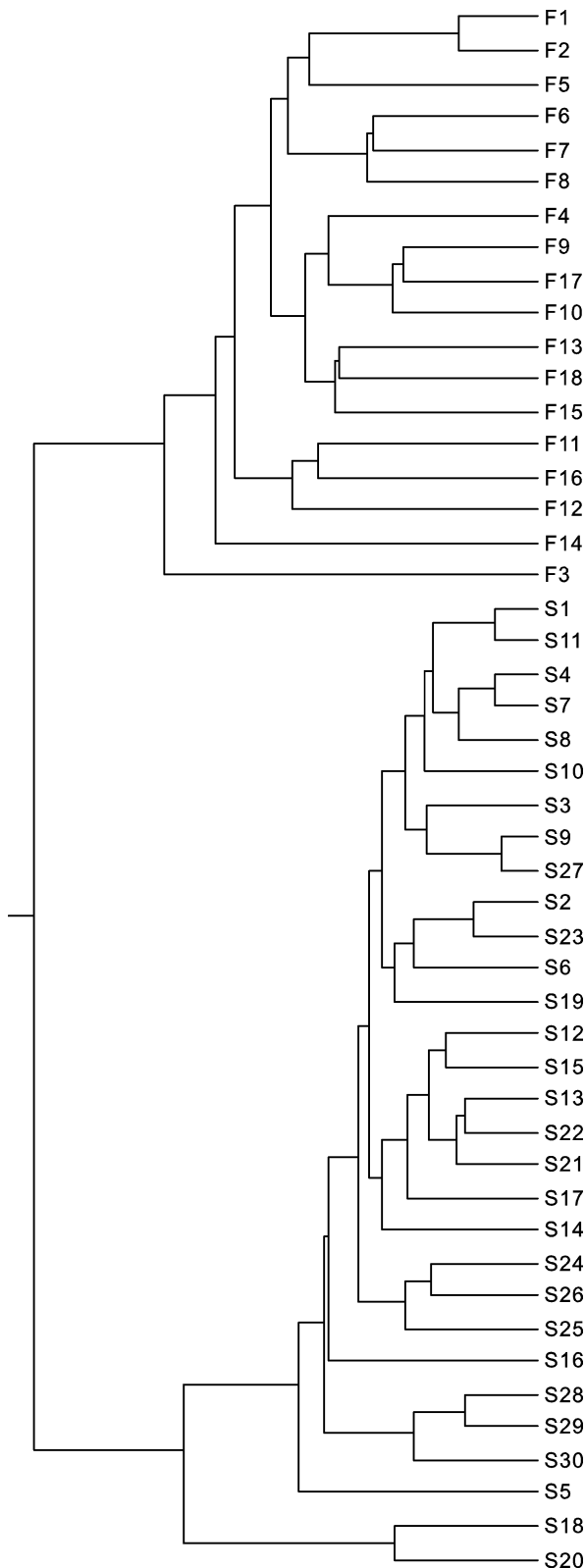


图3 对两种蛤仔所有个体的聚类图

Fig.3 A dendrogram constructed for 48 specimens of *R. philippinarum* and one of *R. variegata*  
注：S为杂色蛤仔，F为菲律宾蛤仔

体形态学特征和幼体脂肪含量与最大形变的多元回归分析; Rhoders 等(1984)分析了淡水龙虾体长、体重的关系, 全体长与甲壳长的相关关系, 肌肉生产量与甲壳长度相关以及体脂肪、碳水化合物、蛋白质的关系。

根据形态数量性状进行分类, 也有报道。Palmer 等(2004)根据形态特征对不同地理种群的一种地中海经济蛤进行了分析, 成功地对不同来源的贝进行了区分, 误差低于 1%。由此可见, 选择合适的分析手段, 根据形态特征区分蛤类的不同种群是可行的。

本文以长、宽、高三个参数对不同种群的菲律宾蛤仔及杂色蛤仔进行区分, 结果表明, 根据形态特征基本可以将两种蛤仔及菲律宾蛤仔的不同种群区分开来, 但有一定的误差。这说明, 不同地理种群的菲律宾蛤仔以及两种蛤仔在形态数量性状方面的差异相对较小。

本文选用形态性状中的长、宽、高进行分析, 可以较客观地反应群体的特征。体重、色泽等性状由于受生长温度、环境中的饵料密度以及底质的不同而有较大的变化, 无法作为稳定的特征性状, 因此不宜作为种群区分的参数。

由于仅凭形态数量性状不能完全地区分两种蛤仔, 因此有必要采用 DNA 分子手段做进一步的研究。

AFLP 技术对于生物的遗传差异有着极高的检出效率, 可以用于对遗传趋异不超过属(genus)的水平不同物种或亚种生物进行有效的鉴别和亲缘及进化关系分析。与现有的线粒体或核 DNA 的其它标记相比, AFLP 的优点是不需知道待分析物种基因组 DNA 的有关信息。AFLP 已被证明是一种快速、有效的进行物种区分的方法。区分的准确度随引物数量的增加而提高, 而引物组合的选择并不是很关键(Ogden *et al*, 2002)。AFLP 最早用于微生物和植物的物种鉴定, 最近在动物也有许多应用, 如蜥蜴(Ogden *et al*, 2002)、蛇(Giannasi *et al*, 2001)、海鸥(De Knijff *et al*, 2001)、牛(Nijman *et al*, 1999)等。在水产动物的应用有丽鱼(Albertson *et al*, 1999)和鲶鱼(Liu *et al*, 1998, 1999)等。本文结果表明, 两种蛤仔具有许多特异性条带, 反映了 AFLP 在贝类物种鉴定方面同样具有较高的分辨力。

杂色蛤仔分布在我国平潭以南, 由于分布面窄, 资源量少, 所以没有进行养殖, 是一个野生种。而菲律宾蛤仔已进行了多年养殖。AFLP 结果显示, 两种蛤仔都具有较高的群体多样性, 多态位点均在

90%以上。群体内的遗传相似度杂色蛤仔为 0.6882, 菲律宾蛤仔为 0.6051。菲律宾蛤仔的遗传多样性略高于杂色蛤仔, 这说明菲律宾蛤仔虽然经过多年养殖, 但群体结构仍应是一种天然状态。这是由于菲律宾蛤仔的苗种来源基本是天然或接近天然(土池育苗), 因此保持了较高的遗传多样性。

AMOVA 分析的结果表明, 两种蛤仔具有较大的遗传差异, 两种蛤仔之间的差异是明显两个种之间的差异。从距离图也可以看出, 两种蛤仔之间的距离非常明显, 种间距离明显大于种内距离。同时也说明, 虽然菲律宾蛤仔的苗种非常混杂, 但在胶州湾养殖的蛤仔里面还没有发现杂色蛤仔被引种进来。

### 参 考 文 献

- 马爱军, 王新安, 雷霖霖等, 2008. 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)四个不同地理群体数量形态特征比较. 海洋与湖沼, 39(1): 24—29
- 王志勇, 柯才焕, 王艺磊等, 2004. 从 AFLP 指纹和标记基因序列看我国养殖的四种鲍的亲缘关系. 高技术通讯, 12: 93—98
- 庄启谦, 2001. 中国动物志. 软体动物门、双壳纲、帘蛤科. 北京: 科学出版社, 41—52
- 杨建敏, 郑小东, 李 琪等, 2006. 中国沿海脉红螺(*Rapana venosa*)居群数量性状遗传多样性研究. 海洋与湖沼, 37(5): 385—392
- 张 雯, 刘 晓, 张国范, 2005. 利用 AFLP 技术研究海湾扇贝不同养殖群体的遗传结构及其分化. 高技术通讯, 15(4): 84—88
- 陈省平, 包振民, 潘 洁等, 2005. 4 种养殖扇贝的群体遗传多样性及特异性 AFLP 标记研究. 海洋学报, 27(2): 160—164
- 林志华, 董迎辉, 李 宁等, 2008. 基于形态参数和 AFLP 标记的文蛤(*Meretrix meretrix*)不同地理群体遗传变异分析. 海洋与湖沼, 39(3): 245—251
- 蔡英亚, 张 英, 魏若飞, 1995. 贝类学概论. 上海: 上海科学技术出版社, 216
- 潘 洁, 包振民, 赵 洋等, 2002. 栉孔扇贝不同地理群体的遗传多样性分析. 高技术通讯, 12: 78—82
- Sambrook J, Russell D W 著, 2001. 黄培堂译, 2002. 分子克隆实验指南(第三版)(上、下册). 北京: 科学出版社, 463—471
- Albertson R C, Markert J A, Danley P D *et al*, 1999. Phylogeny of a rapidly evolving clade: the cichlid fishes of Lake Malawi, East Africa. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 96, 5107—5110
- De Knijff P, Denkers F, van Swelm N D *et al*, 2001. Genetic affinities within the herring gull *Larus argentatus* assemblage revealed by AFLP genotyping. Journal of Molecular Evolution, 52: 85—93
- Debowski P, Dobosz S, Robak S *et al*, 1999. Fat level in body of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), and sea trout (*Salmo trutta* M. *trutta* L.), and method of estimation from morphometric data. Archives of Polish Fisheries, 7(2): 237—243
- Giannasi N, Thorpe R S, Malhotra A, 2001. The use of amplified fragment length polymorphism in determining species trees at fine taxonomic levels: analysis of a medically important snake, *Trimeresurus albolabris*. Mol Ecol, 10: 419—426
- Harue K, Mutsuyshi T, Katsuya M *et al*, 2000. Estimation of body fat content from standard body length and body weight on cultured Red Sea bream. Fisheries Science, 66(2): 365—371
- Liu X Q, Bao Z M, Hu J J *et al*, 2007. AFLP analysis revealed differences in genetic diversity of four natural populations of Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in China. Acta Oceanologica Sinica, 26(1): 150—158
- Liu Z J, Li P, Kucuktas H *et al*, 1999. Development of AFLP markers for genetic linkage mapping analysis using channel catfish and blue catfish interspecific hybrids. Transactions of the American Fisheries Society, 128, 317—327
- Liu Z, Nichols A, Li P *et al*, 1998. Inheritance and usefulness of AFLP markers in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), blue catfish (*I. furcatus*), and their F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> and backcross hybrid. Mol Gen Genet, 258: 260—268
- Nei M, Li W H, 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 76: 5273—5296
- Nijman J, Bradley D G, Hanotte O *et al*, 1999. Satellite DNA polymorphisms and AFLP correlate with *Bos indicus-taurus* hybridization. Animal Genetics, 30: 265—273
- Ogden R, Thorpe R S, 2002. The usefulness of amplified fragment length polymorphism markers for taxon discrimination across graduated fine evolutionary levels in Caribbean *Anolis* lizards. Mol Ecol, 11: 437—445
- Palmer M, Pons G X, Linde M, 2004. Discriminating between geographical groups of a Mediterranean commercial clam (*Chamelea gallina* L.: Veneridae) by shape analysis. Fisheries Research, 67: 93—98
- Rhodors C P, Holdich D M, 1984. Length weight relationship, muscle production and proximate composition of the freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet). Aquaculture, 37(1): 107—123
- Robert R, Nicolas L, Moisan C *et al*, 1999. Morphological and biochemical characterizations of the great scallop *Pecten maximus* metamorphosis. C R Acad Sci (Ser.3) (Sci Vie / Life Sci), 322(10): 847—853
- Vos P, Hogers R, Bleeker M *et al*, 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research, 23: 4407—4114
- Wachira F H, Waugh R, Hackett C A *et al*, 1995. Detection of genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) using RAPD markers. Genome, 38: 201—210

## COMPARISON OF GENETIC DIVERSITY IN THE POPULATIONS OF *RUDITAPES PHILIPPINARUM* AND *R. VARIEGATE*

LIU Xiang-Quan<sup>1</sup>, BAO Zhen-Min<sup>2</sup>, HU Jing-Jie<sup>2</sup>, HE Jin-Xia<sup>1</sup>, FANG Jian-Guang<sup>3</sup>, WANG Ru-Cai<sup>2</sup>  
(1. Marine Fisheries Research Institute of Shandong Province, Yantai, 264006; 2. Ocean University of China, Qingdao, 266003;  
3. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Qingdao, 266071)

**Abstract** Morphological variance of four natural populations of *Ruditapes philippinarum*, i.e. Dalian (DL), Qingdao (QD), Xiamen (XM) and Zhuhai (ZH) and a natural population of *R. variegata*, i.e. Zhanjiang (RV) were analyzed using multi-variant morphological parameters. Clustering dendrogram and discriminant functions were constructed, showing objectively the differences among the five populations. Four AFLP primer combinations were applied to analyze genetic diversities and relationships between populations of QD and RV for the two species. Twenty-nine population-specific bands were found in 216 detected bands, which may be used to distinguish the two clams. It revealed high levels of genetic diversity in two clam species. The average similarity were 0.6051 in *R. philippinarum* and 0.6882 in *R. variegata*, and only 0.2968 between two populations. The Shannon's information index was 0.2526 for *R. philippinarum*, a little higher than 0.2154 for *R. variegata*. Cluster analysis with Nei's pairwise distance grouped specimens in geographical origin with no exception, showing distinct difference between the two populations of two clam species.

**Key words** *Ruditapes philippinarum*, *Ruditapes variegata*, Morphological variance, Genetic diversity, AFLP