

栉孔扇贝不同种群的遗传结构及其杂种优势*

李红蕾 宋林生¹⁾ 刘保忠 崔朝霞 相建海

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

刘升平 曲善村 姜广亮

(山东省烟台市水产技术推广中心 烟台 264003)

提要 采用来自韩国野生的栉孔扇贝和中国养殖的栉孔扇贝以及发病区存活个体作为亲本,构建韩国野生×韩国野生、韩国野生×中国养殖、韩国野生×中国养殖发病区存活个体以及中国养殖×中国养殖共 4 个交配组合,通过对 F₁ 代个体壳宽、壳高和体重的测量,比较不同群体的生长情况。同时采用 RAPD 技术对 F₁ 代不同群体的遗传结构进行比较,研究群体内的遗传变异与杂种优势的关系。结果表明,杂交后代具有明显的生长优势,说明栉孔扇贝种内不同种群之间存在杂种优势。韩国野生种群和中国养殖群体以及发病区存活群体的遗传距离分别为 0.036 6 和 0.005 7,以上 4 个 F₁ 代群体的平均杂合度的理论值分别为 0.283、0.267、0.268 和 0.266;多态位点比例分别为 0.765、0.760、0.760、0.735。表明栉孔扇贝不同地理种群之间存在遗传分化,其杂种优势与群体的遗传多样性相关。

关键词 栉孔扇贝,种群,遗传多样性,杂种优势, RAPD

中图分类号 Q789

栉孔扇贝是重要的经济养殖贝类,在我国海水养殖业中占有重要地位。以栉孔扇贝养殖为代表的贝类养殖业是我国海水养殖的支柱性产业。近年来,随着栉孔扇贝养殖的高密度、规模化生产的发展,病害不断爆发流行,造成大规模死亡,经济损失十分惨重。引起栉孔扇贝大规模死亡的原因是多方面的,其根本原因则是养殖环境的恶化以及栉孔扇贝种质衰退,抗病力下降(王运涛等, 1999; 张福绥等, 1999)。所以在积极调整产业结构、加强环境治理、开展栉孔扇贝病原及流行病学研究的同时,改良种质增强栉孔扇贝的抗病抗逆能力则是解决困扰扇贝养殖业健康可持续发展的根本保证。

采用人工杂交的方法进行优良品种的选育一直是农业生产中动植物优良品种选育的重要方法,对农业生产产生了巨大的推动作用。现代杂种优势理论认为,杂种优势的大小在一定程度上取决于亲本间遗传差异的大小,差异愈大的群体之间杂交,所产生的杂种优势愈大。目前,关于贝类人工杂交的研究已有不少报道(周茂德等, 1982; Bierne *et al*, 1998; Pogson *et al*, 1994; 陈倅等, 1991²⁾)。陈倅等人自 1986 年就开始对栉孔扇贝、虾夷扇

* 国家重点基础研究发展规划项目, G1999012008 号; 国家自然科学基金资助项目, 39700017 号。李红蕾, 女, 出生于 1979 年 10 月, 硕士生, E-mail: lshsong@ms. qdio. ac. cn

1) 通讯作者, 宋林生, 男, 出生于 1966 年 1 月, 博士, 研究员, E-mail: lshsong@ms. qdio. ac. cn

2) 陈倅, 相建海, 秦预江等, 1991. 海湾扇贝、栉孔扇贝和虾夷扇贝杂交育种可行性研究 I. 异种配子亲和性和杂种的早期发育. 中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放研究实验室年报, 122—128

收稿日期: 2001-04-03, 收修改稿日期: 2001-06-05

贝杂交育种的可行性进行研究并取得了初步结果。栉孔扇贝是产于我国北方近海的经济贝类,在日本和韩国沿海均有分布。不同地理区域分布的栉孔扇贝之间存在一定的遗传变异,用具有一定遗传分化、来自不同地理种群的栉孔扇贝作为亲本进行杂交,可望产生具有杂种优势的后代,但至今尚未见栉孔扇贝种内不同种群之间进行杂交育种的报道。本文用来自韩国的野生栉孔扇贝与我国养殖的栉孔扇贝以及发病区存活的个体进行杂交,通过对 F_1 代部分生长性状的测量,确认 F_1 代的杂交优势,同时采用 RAPD 技术对 F_1 代群体的遗传结构和遗传多样性进行检测,从分子水平探讨栉孔扇贝种内不同群体之间的杂种优势与群体遗传多样性的关系,以期为栉孔扇贝的杂交育种以及遗传改良提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 亲贝采集

实验用栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)韩国野生种群样品于 1999 年春季采自韩国沿岸。中国养殖群体样品来自烟台市水产良种推广中心,发病区存活个体采集于烟台市水产良种推广中心养殖区。

1.2 苗种培育

杂交实验于 1999 年春季在烟台市水产良种推广中心完成,交配组合分别为韩国野生贝×韩国野生贝、韩国野生贝×中国养殖贝、韩国野生贝×中国养殖发病区存活个体以及中国养殖贝×中国养殖贝。每一杂交组合的母本个体数都在 1000 个以上,父本个体数在 50 个以上。

每个杂交组合所用亲贝在不同的池内分别蓄养,亲贝以及其后的幼虫培养都采用经沉淀过滤的自然水温海水。亲贝主要投喂三角褐指藻,不采用人工刺激而是待其自然排放卵子和精子。受精卵发育至 D 形幼虫后开始投饵,饵料以等鞭金藻 3011 为主,后期附以扁藻混合投喂。幼虫培养密度为 10—15 ind/ml 水体,每日换水 2 次。幼虫出现眼点后投放附着基,变态后生长至壳长 1mm 左右放到海区培养。

1.3 F_1 代生长性状的测量

来自 4 个交配组合的 F_1 代挂养于烟台市水产良种推广中心养殖区。2000 年 2 月对这 4 个群体的生长性状进行测量,从中随机抽取 60 个个体,测量其壳高、壳宽和体重,比较其生长情况。

1.4 DNA 提取

随机从以上 4 个群体中抽取 20 个个体,从闭壳肌取 100mg 肌肉组织,加入 500 μ l 匀浆缓冲液(10mmol/L Tris-HCl, pH= 8.0; 100mmol/L EDTA, pH= 8.0),混匀后加入终浓度为 1% 的 SDS 和 100 μ g/ml 的蛋白酶 K, 50 $^{\circ}$ C 消化 3h, 然后分别用等体积的酚、酚: 氯仿(1:1)、氯仿: 异戊醇(24:1) 抽提,二倍体积乙醇沉淀,TE 溶解,置 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.5 PCR 扩增

所有随机引物购自上海 Sagon 公司。RAPD 反应参照 Williams(1990) 的报道并稍加修改(宋林生等,1999)。基因组 DNA 在 PE9600 PCR 扩增仪上经 94 $^{\circ}$ C 变性 5min 后进行 45 个扩增循环,每一循环包括 94 $^{\circ}$ C 1min、36 $^{\circ}$ C 1min、72 $^{\circ}$ C 2min,最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离,E. B 染色,紫外灯光下观察、拍照。

1.6 数据分析

记录下电泳后清晰的扩增条带, 每一个体的扩增条带按有或无记录, 出现扩增带记录为1, 无扩增带记录为0。多态位点比例 $P = \text{多态扩增片段数} / \text{扩增片段总数}$ 。群体的平均杂合度: $H = \sum_{i=1}^n (1 - \sum p_i^2) / n$, 其中 p_i 是第 i 个等位基因的频率 (Nei *et al.*, 1974; Nei, 1978)。同时, 根据群体中纯合隐性个体 (即对应某一扩增条带, 不出现该扩增带的个体) 频率的平方根来计算隐性等位基因 a 的基因频率 q , 显性等位基因 A 的基因频率 $p = 1 - q$ 。根据群体中各等位基因的频率用 PHYLIP 软件中的 Gendist 程序计算种群间的遗传距离, 再用 Drawgram 程序画出四个群体的系统树。

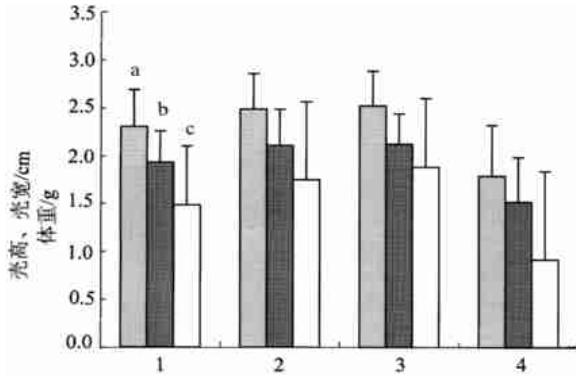


图 1 4 个交配组合 F₁ 代的生长性状

Fig. 1 The growth performance of four F₁ Progeny populations

a. 壳高; b. 壳宽; c. 体重

1. 韩国野生种群; 2. 韩国野生种群与中国养殖群体的杂交后代; 3. 韩国野生种群与中国养殖发病区存活个体的杂交后代; 4. 中国养殖群体

是使用引物 S-103 扩增后得到的电泳图谱。21 个引物在 4 个群体中共扩增出 162 条扩增片段, 未发现种群特异性扩增片段。

2.3 F₁ 代群体的遗传结构和遗传多样性

分别对 4 个交配组合 F₁ 代群体 RAPD 扩增结果进行统计, 根据扩增片段总数和多态性片段的数目计算出四个 F₁ 代群体的多态位点比例。韩国野生种群的多态位点比例最高, 中国养殖群体最低, 两个韩国野生种群与中国养殖群体杂交后代群体的多态位点比例接近韩国野生种群。通过每个位点上等位基因的频率分别计算出各群体杂合度的平均值, 如表 1 所示。与多态位点比例一样, 韩国野生种群的杂合度显著高于中国养殖群体, 而两个杂交后代群体的杂合度则与中国养殖群体接近。

2 结果

2.1 4 个群体 F₁ 代生长性状的比较

从 4 个交配组合随机抽取 60 个个体, 测量其壳高、壳宽和体重, 结果见图 1。从图 1 可以看出, 中国养殖群体在生长性状上明显处于劣势 ($P < 0.01$), 而韩国野生种群与中国养殖群体的杂交后代则呈现明显的生长优势 ($P < 0.05$), 在壳高、壳宽和体重上都超过了韩国野生种群, 显示出明显的杂种优势。

2.2 RAPD 扩增结果

本实验共使用 21 个随机引物进行扩增, 所有引物均能扩增出清晰、可重复的扩增产物, 但每个引物所能扩增出的带数以及揭示的多态性各不相同, 图 2

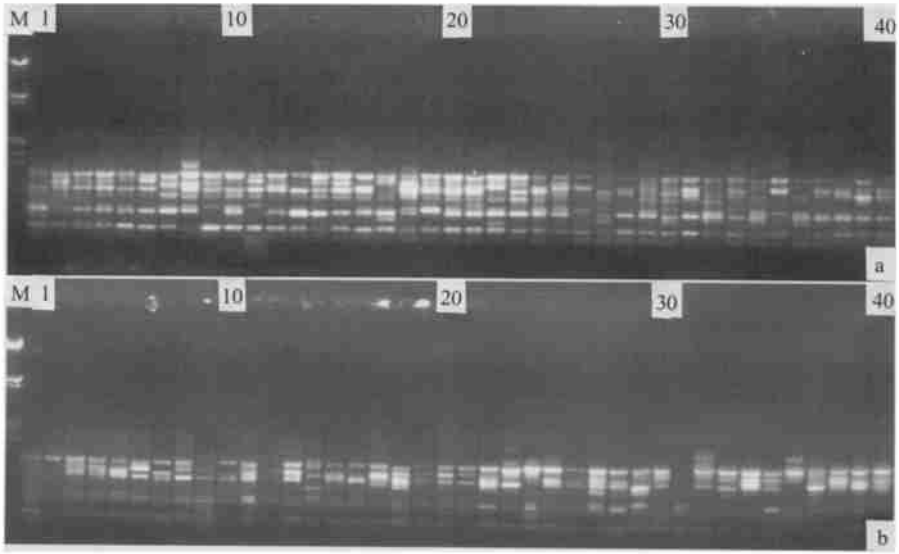


图 2 随机引物 S-103 RAPD 扩增的电泳图谱

Fig.2 RAPD electrophoregrams amplified with primer S-103

M: DNA EcorR I/Hind III a. 1—20: 中国养殖群体; a. 21—40: 韩国野生种群与中国养殖发病区存活个体的杂交后代; b. 1—20: 韩国野生种群; b. 21—40: 韩国野生种群与中国养殖群体杂交后代

表 1 4 个种群 RAPD 图谱的遗传分析

Tab. 1 RAPD electrophoregrams analysis of the four populations

杂交组合	韩国野生种群	韩国野生种群 × 中国 养殖群体	韩国野生种群 × 中国 养殖发病区存活个体	中国养殖群体
扩增片段总数	162	162	162	162
多态性片段数	124	123	123	119
多态位点比例	0.765	0.760	0.760	0.735
杂合度理论值	0.283	0.267	0.268	0.266

2.4 4 个交配组合 F₁ 代群体之间的遗传距离

根据群体中各位点等位基因频率计算出的遗传距离如表 2 所示, 图 3 是根据群体间的遗传距离得到的系统树。韩国野生种群和中国养殖群体之间的遗传距离为 0.036 6, 说明存在一定的遗传分化。韩国野生种群与中国养殖群体的杂交后代群体与韩国野生种群、中国养殖群体的遗传距离分别为 0.030 3 和 0.024 0, 介于韩国野生种群和中国养殖群体之间。从图 3 也可以看到韩国野生种群与中国养殖群体的杂交后代介于韩国野生种群和中国养殖群体之间。韩国野生种群 × 中国养殖发病区存活个体的后代群体与其他三个交配组合后代的遗传距离较大。在系统树上, 中国养殖群体首先与韩国野生种群 × 中国养殖发病区存活个体的后代聚在一起, 然后再与韩国野生种群聚在一起, 最后是韩国野生

种群 × 中国养殖群体的杂交后代。

表 2 4 个交配组合 F₁ 代群体之间的遗传距离

Tab. 2 The genetic distances among the four F₁ progeny populations

杂交组合	韩国野生种群	韩国野生种群 × 中国养殖群体	韩国野生种群 × 中国养殖发病区存活个体	中国养殖群体
韩国野生种群	0.0000	0.0303	0.0507	0.0366
韩国野生种群 × 中国养殖群体	0.0303	0.0000	0.0417	0.0240
韩国野生种群 × 中国养殖发病区存活个体	0.0507	0.0417	0.0000	0.0332
中国养殖群体	0.0366	0.0240	0.0332	0.0000

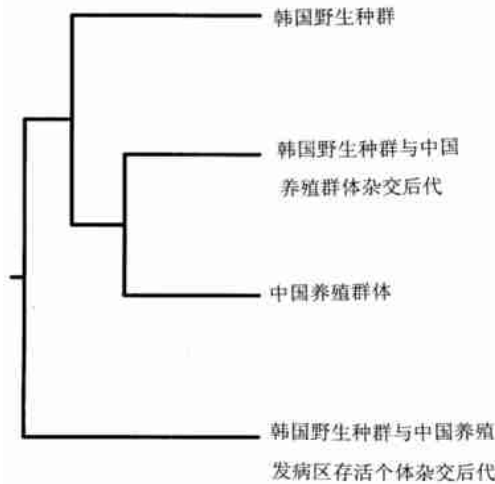


图 3 四个交配组合 F₁ 代群体遗传距离的系统树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on the genetic distance of the four F₁ progeny population

- 1: 韩国野生种群; 2: 韩国野生种群与中国养殖群体的杂交后代; 3: 韩国野生种群与中国养殖发病区存活个体的杂交后代; 4: 中国养殖群体

3 讨论

杂种优势是生物界普遍存在的一种现象, 在农业生产上已经得到了广泛的应用, 成功的报道很多(董在杰等, 1999; 孙少华等, 2000; 吴敏生等, 1999; 吴雪梅等, 1999)。在水生生物中, 尤其是在双壳类, 用同工酶揭示的杂合度和一些生产性状存在明显的相关性。在太平洋牡蛎中, 人们已经发现杂合度与其存活率和生长速率之间存在显著的相关性(Fujio, 1982; Bierne *et al*, 1998)。相同的研究结果在其他物种, 例如牡蛎、贻贝、扇贝和蛤类中也有报道(Alvarez *et al*, 1989; Singh *et al*, 1978; Mallet *et al*, 1986; Koehn *et al*, 1982, 1984, 1988; Rodhouse *et al*, 1984; Gaffney *et al*, 1984, 1990; Pogson *et al*, 1994; Mitton *et al*, 1984; Shikano *et al*, 2000; Saavedra *et al*, 1996), 表明不同种生物以及同种生物不同种群之间都有可能存在杂种优势。但在其他一些物种中也有不存在这种相关性的报道。这种差异可能是由于物种、种群、同工酶位

点或性状本身造成的。按照现代杂种优势理论, 杂种优势的强弱与两亲本遗传差异的大小成比例。栉孔扇贝在我国主要分布在北部沿海, 在韩国和日本沿海也有分布。但栉孔扇贝的养殖业主要集中在我国, 日本和韩国尚未形成具有规模的扇贝养殖业。目前, 关于我国和日本、韩国栉孔扇贝是否存在种群差异尚未见报道, 尽管在一些养殖地区有人尝试用不同地理种群的栉孔扇贝杂交, 进行苗种培育, 取得了一定的结果, 但至今尚未见到关于栉孔扇贝不同种群是否存在遗传分化和杂种优势的报道。从表 3 可知, 韩国野生种群的遗传多样性较高, 多态位点比例和平均杂合度均高出我国的养殖群体, 说明韩国栉孔扇贝的野生资源状况良好, 这与目前韩国尚未开展栉孔扇贝养殖是相关的。中国养殖群体

在遗传多样性上的下降也说明我国近年来栉孔扇贝养殖规模不断扩大, 长期近亲交配而造成的种质衰退, 在生产性状上表现为个体变小(图 1)。

用韩国野生种群和中国养殖群体以及中国养殖发病区存活个体进行杂交, 其杂交后代表现出一定的生长优势, 其生长性状明显优于养殖群体的后代, 也比韩国野生种群的后代有所提高, 显示出栉孔扇贝不同种群之间的杂种优势(图 1)。通过对 4 个交配组合 F_1 代遗传结构及遗传多样性的分析发现, 韩国野生种群的遗传多样性最高, 中国养殖群体的遗传多样性最低, 两个杂交组合 F_1 代的遗传多样性与韩国野生种群接近, 而显著高于中国养殖群体, 这一现象可能是由于中国养殖栉孔扇贝经过多代人工选育, 遗传多样性降低, 某些位点已经纯合, 所以在与韩国野生种群杂交后, 其后代的遗传多样性虽较中国养殖群体有所提高, 但仍低于韩国野生种群。通过比较各种群之间的遗传距离发现韩国野生种群和中国养殖群体之间的遗传距离为 0.036 6, 韩国野生种群与两个杂交后代群体的遗传距离分别为 0.030 3 和 0.050 7。在聚类图(图 3)上这两个群体的杂交后代正好位于它们中间, 而距中国养殖群体较近, 说明栉孔扇贝在中国和韩国沿海具有种群分化的可能, 也正是由于发生了遗传分化才在它们的杂交后代中显示出杂种优势。

值得指出的是, 用韩国野生种群与中国养殖发病区存活个体杂交, 其后代的杂种优势较韩国野生种群与中国养殖群体杂交后代更为明显。遗传结构及遗传多样性分析表明, 该杂交群体与韩国野生种群的遗传距离达到 0.050 7, 与中国养殖群体的遗传距离为 0.0332。说明养殖发病区存活群体在经过自然选择后存活下来的个体在遗传组成上与养殖群体和野生种群存在差异。深入研究这些在养殖发病区存活个体的抗病特性与其遗传变异的相关性, 将有助于定位和克隆扇贝的抗病基因以及抗病的品系选育。

本研究用韩国野生的栉孔扇贝与中国养殖群体以及养殖发病区存活个体进行杂交, 并对各群体的遗传结构和遗传多样性在 DNA 水平上进行了研究, 揭示了栉孔扇贝韩国种群和中国养殖群体之间的遗传分化, 证实栉孔扇贝不同地理种群之间的杂交后代存在杂种优势, 该结果对于我国扇贝养殖业中苗种培育以及优良品种的选育都具有重要的指导意义。

参 考 文 献

- 王运涛, 相建海, 1999. 栉孔扇贝大规模死亡的原因探讨. 海洋与湖沼, 30(6): 770—774
- 孙少华, 桑润兹, 师守 等, 2000. 肉牛杂交优势预测、评估及其应用研究. 遗传学报, 27(7): 580—589
- 吴敏生, 王守才, 戴景瑞, 1999. RAPD 分子标记与玉米杂种产量优势预测的研究. 遗传学报, 26(5): 578—584
- 吴雪梅, 杨关福, 张细权等, 1999. 蛋鸡品系 RAPD 变异及其与杂种优势关系的分析. 遗传, 21(2): 24—28
- 张福绥, 杨红生, 1999. 栉孔扇贝大规模死亡问题的对策及应急措施. 海洋科学, 2: 1—5
- 宋林生, 相建海, 李晨曦等, 1999. 日本对虾野生种群和养殖群体遗传结构的 RAPD 标记研究. 海洋与湖沼, 30(3): 261—266
- 周茂德, 高允田, 吴 融, 1982. 太平洋牡蛎与近江牡蛎、褶牡蛎人工杂交的研究. 水产学报, 6(3): 235—241
- 董在杰, 夏德全, 吴婷婷等, 1999. RAPD 技术在鱼类杂种优势研究中的应用. 中国水产科学, 1(1): 1—4
- Alvarez G, Zapata C, Amaro R *et al* , 1989. Multipocus heterozygosity at protein loci and fitness in the European oyster, *Ostrea edulis* L. Heredity, 63: 359—372
- Bieme N, Launey S, Naciri-Graven Y *et al* , 1998. Early effect of inbreeding as revealed by microsatellite analyses on *Ostrea edulis* larvae. Genetics, 148(4): 1893—1906

- Fujio Y, 1982. A correlation of heterozygosity with growth rate in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Tahoku J Agric Res*, 33: 66—75
- Gaffney P M, Scott T M, 1984. Genetic heterozygosity and production traits in natural and hatchery populations of bivalves. *Aquaculture*, 42: 289—302
- Gaffney P M, Scott T M, Koehn R K *et al*, 1990. Interrelationships of heterozygosity, growth rate, and heterozygote deficiencies in the coot clam, *Mulinia lateralis*. *Genetics*, 124: 686—699
- Koehn R K, Dichl W J, Scott T M, 1988. The different contribution by individual enzymes of glycolysis and protein catabolism to the relationship between heterozygosity and growth rate in coot clam, *Mulinia lateralis*. *Genetics*, 118: 121—130
- Koehn R K, Gaffney P M, 1984. Genetic heterozygosity and growth rate in *Mytilus edulis*. *Mar Biol*, 82: 1—7
- Koehn R K, Shumway S E, 1982. A genetic/physiological explanation for differential growth rate among individuals of the American oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Mar Biol*, 3: 35—42
- Mallet A L, Zouros E, Gartner-Keplay K E *et al*, 1986. Genetics of growth in blue mussels: family and enzyme-heterozygosity effects. *Mar Biol*, 92: 475—482
- Mitton J B, Grant M C, 1984. Associations among protein heterozygosity, growth rate and developmental homeostasis. *Annu Rev Ecol Syst*, 15: 479—499
- Nei M, Roychoudhury A K, 1974. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics*, 76(2): 379—390
- Nei M, 1978. The theory of genetic distance and evolution of human races. *J Human Genetics*, 23(4): 341—369
- Pogson G H, Zouros E, 1994. Allozyme and PELP heterozygosities as correlates of growth rate in the scallop *Placopecten agellanicus*: a test of the associative overdominance hypothesis. *Genetics*, 137(1): 221—231
- Rodhouse P G, Gaffney P M, 1984. Effect of heterozygosity on metabolism during starvation in the American oyster *Crassostrea virginica*. *Mar Biol*, 80: 179—187
- Saavedra C, Guerra A, 1996. Allozyme heterozygosity, founder effect and fitness traits in a cultured population of the European oyster, *Ostrea edulis*. *Aquaculture*, 139: 203—224
- Shikano T, Chiyokubo T, Nakadate M *et al*, 2000. The relationship between allozyme heterozygosity and salinity tolerance in wild and domestic populations of guppy (*Poecilia reticulata*). *Aquaculture*, 184: 233—245
- Singh S M, Zouros E, 1978. Genetic variation associated with growth rate in the American oyster (*Crassostrea virginica*). *Evolution*, 32: 342—353
- Williams J G K, Kubelik A R, Livark K J *et al*, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res*, 18(22): 6531—6535

STUDIES ON THE GENETIC STRUCTURE OF DIFFERENT POPULATION OF *CHLAMYS FARRERI* AND THEIR HYBRIDS' HETEROSIS

LI Hong-Lei, SONG Lin-Sheng, LIU Bao-Zhong, CUI Zhao-Xia, XIANG Jian-Hai

(Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

LIU Sheng-Ping, QU Shan-Cun, JIANG Guang-Liang

(Aquaculture Technique Exploitation Center of Yantai, Yantai, 264003)

Abstract Crossbreeding of *Chlamys farreri* was performed using the parent scallops from the Korea wild population, China cultured stock and the survived individuals in epidemic waters in culture areas of China. Four crosses, Korea wild population × Korea wild population, Korea wild population × China cultured stock, Korea wild population × survived individuals in epidemic waters in culture area of China and China cultured stock × China cultured stock, were constructed. The index of growth performance of their progenies such as the length and width of the shell and the individual weight

were measured for heterosis study. Population genetic structure was studied using RAPD analysis to reveal the relationship between the genetic variations and heterosis. The index of growth performance of hybrids between Korea wild population and China cultured stock was better than their parents, which indicated that heterosis existed between different populations of *C. farreri*. RAPD analysis revealed that the genetic distances between Korea wild population and China cultured stock, and the stock of survived individuals in China epidemic waters were 0.036 6 to 0.050 7, respectively. The mean expected heterozygosities of the above populations were 0.283, 0.267, 0.268, and 0.266, respectively, and the proportions of polymorphic loci were 0.765, 0.760, 0.760 and 0.735, respectively. The results indicated that the genetic differentiation occurred between the different geographic populations of *C. farreri*.

Key words *Chlamys farreri*, Population, Genetic diversity, Heterosis, RAPD