

文蛤养殖群体和野生群体遗传多样性的 AFLP 分析

赫崇波¹, 丛林林^{1,2}, 葛陇利^{1,3}, 刘卫东¹, 周遵春¹, 高祥刚¹

(1. 辽宁省海洋水产科学研究院, 辽宁省应用海洋生物技术开放实验室, 辽宁省海洋水产分子生物学重点实验室, 辽宁 大连 116023; 2. 辽宁师范大学 生命科学学院, 辽宁 大连 116029; 3. 大连水产学院 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023)

摘要: 应用 AFLP 标记技术对辽宁和山东沿海文蛤 (*Meretrix meretrix*) 养殖群体和野生群体的遗传多样性进行分析。采用 7 对 AFLP 引物组合对 5 个群体 (3 个野生群体, 2 个养殖群体) 150 个个体进行扩增, 共得到 364 个的位点。5 个群体内的多态位点比例为 84.394 5%~87.646 5%, 总多态位点比例为 99.630 0%。群体的 Nei's 基因多样性指数 (H) 为 0.230 1~0.263 4; 群体的 Shannon 多样性指数为 0.361 7~0.424 8, 群体间的遗传距离为 0.039 4~0.160 9, 群体内个体间的遗传距离为 0.259 2~0.536 0。辽宁大洼野生群体和山东河口野生群体的多态位点比例、Shannon 多样性指数和群体内遗传距离均高于辽宁盘山和辽宁庄河养殖群体, 辽宁庄河野生群体的遗传多样性处于中等水平。用 UPGMA 方法构建的群体系统进化树显示, 辽宁庄河野生群体单独成为一支, 辽宁大洼野生群体与庄河养殖群体聚到一起, 辽宁盘山养殖群体与山东野生群体聚到一起, 但是用这 5 个群体的 150 个个体进行的聚类结果显示, 所有个体基本是随机交叉聚类, 不能形成明显的类群分支。分子变异分析 (AMOVA) 表明, 文蛤群体 94.04% 的变异来源于群体内, 群体间的变异仅占 5.96%。以上结果表明, 文蛤群体内遗传多样性非常丰富, 群体间相似性较大, 且存在较强的基因交流。[中国水产科学, 2008, 15 (2): 215~221]

关键词: 文蛤; AFLP; 遗传多样性

中图分类号: Q959.215

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)02-0215-07

文蛤 (*Meretrix meretrix* Linnaeus) 又名花蛤、黄蛤, 是隶属于软体动物门 (Mollusca)、双壳纲 (Bivalvia)、真瓣鳃目 (Eulamelli-branchia)、帘蛤科 (Veneridae) 文蛤属 (*Meretrix*) 的海产经济贝类, 素有“天下第一鲜”的盛誉。辽宁是文蛤的重要产地之一。历史上, 辽东湾的蛤蜊岗和黄海北部的庄河市沿海是文蛤两大地理种群的栖息地。近年来, 随着市场需求增加, 文蛤增养殖业迅猛发展, 但是由于规模化全人工育苗技术尚未成熟, 文蛤养殖苗种主要依赖于采捕天然苗, 从而造成野生文蛤资源量急剧减少。同时由于各地区间文蛤养殖苗种交流频繁^[1-3], 势必造成文蛤天然种质资源混杂, 各地理群体的遗传多样性水平发生变化。利用现代分子标记技术研究文蛤的遗传多样性, 对于了解文蛤地理群体种质状况具有重要的意义。沈怀舜等^[4]对中国沿海 3 个文蛤地理群进行了 RAPD 分析, 得出 3 个文蛤地理群体之间的遗传距离较大。阎冰等^[5]通过对广西地区文蛤的遗传多样性进行研究,

认为相邻两地理种群的遗传距离偏小, 而地理位置相隔越远, 遗传距离越大。陈大鹏等^[6]利用 ISSR 分子标记对中国文蛤地理种群进行初步研究后认为, 江苏文蛤种群的遗传多样性比辽宁文蛤种群要高。李太武等^[7]对广西和江苏不同花纹文蛤进行了 ITS2 分析, 结果显示广西文蛤群体和江苏文蛤群体间发生了遗传变异, 江苏文蛤群体内部也发生了遗传分化。薛明等^[8]对文蛤 3 个野生种群的生化遗传变异进行了分析, 显示三地区群体间有着较强的基因流。

研究辽东湾和黄海北部沿海文蛤的野生和养殖群体的遗传多样性对分析群体亲缘关系、有效繁殖亲本数量、群体内和群体间的变异来源以及选择育种等都具有重要意义。本研究利用 AFLP 分子标记技术对辽宁黄海北部沿海和辽东湾文蛤群体的遗传多样性进行了分析, 旨在了解该文蛤地理种群的种质资源状况。

收稿日期: 2006-12-10; 修订日期: 2007-04-04.

基金项目: 国家 908 项目辽宁专项 (LN-908-01-01-06); 国家留学人员科技活动择优资助项目 (LXZZ2005001).

作者简介: 赫崇波 (1961-), 男, 硕士生导师, 研究员, 从事分子遗传学研究. Tel: 0411-81787087; E-mail: hechongbo@hotmail.com

1 材料与方法

1.1 实验材料

文蛤的性成熟年龄一般为 2 龄以上,为了使实验分析更有代表性,分析所用文蛤样品均为 3 龄以上性成熟个体,壳长 4~7 cm。同时为了更好地比较养殖活动对野生文蛤资源的影响,在辽宁的两大文蛤主产区即辽东湾附近和黄海北部沿海各采集 2 个群体,并采集山东省东营市黄河口的 1 个野生群

体作为对照群体(表 1)。所谓野生群体是指在自然滩涂生长的文蛤,养殖群体是指在有一定防逃设施的滩涂上或池塘中人工投放的文蛤苗种(其中包括通过利用野生文蛤亲本工厂孵化培育出的 F₁ 代苗种和直接从自然附苗场采集的天然文蛤苗),一般经过 1~3 年人工养殖的文蛤群体。
从以上 5 个群体中各随机选取 30 个个体。取其腹足肌肉组织,75% 乙醇保存用于 DNA 提取。

表 1 用于实验分析的 5 个不同文蛤群体
Tab. 1 Five populations of *Meretrix meretrix* used in the study

群 体 Population	缩写 Abbreviation	性质 Nature	标本数 Number sampled	地理位置 Location	采样时间 Sampling time
辽宁大洼野生 Wild population from Liaoning Dawa	LDYS	野生 Wild	30	辽东湾 Liaodong Gulf	2006-07
辽宁盘山养殖 Cultured population from Liaoning Panshan	LPYZ	养殖 Cultured	30	辽东湾 North Yellow Sea	2006-07
辽宁庄河野生 Wild population from Liaoning Zhuanghe	LZYS	野生 Wild	30	黄海北部 North Yellow Sea	2005-11
辽宁庄河养殖 Cultured population from Liaoning Zhuanghe	LZYZ	养殖 Cultured	30	黄海北部 North Yellow Sea	2005-07
山东东营野生 Wild population from Shandong Dongying	SDYS	野生 Wild	30	山东黄河口 Estuary of Yellow River	2005-10

1.2 基因组DNA提取

基因组 DNA 的提取参照《分子克隆实验指南》(第 3 版)^[9]。用常规酚/氯仿抽提法提取经乙醇固定的文蛤肌肉组织的 DNA。1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA,并稀释到 100 ng/μL 备用。

1.3 AFLP分析

AFLP 操作流程参照 Vos 等^[10]的方法并略加改动。所用限制酶、接头和引物等购自上海生工。PCR 扩增使用 Eppendorf 梯度 PCR 仪。内切酶为 *EcoR* I 和 *Mse* I,每对预扩增引物含 1 个选择碱基,即 E00-A, M00-C。选择性扩增引物(表 2)含 3 个选择碱基。AFLP 主要步骤如下:

1.3.1 基因组 DNA 的双酶切 采用 *EcoR* I/*Mse* I 双酶切组合反应体系 10 μL,其中 DNA 模板 1 μL (100 ng), *Mse* I 0.5 μL (1 500 U), *EcoR* I 0.25 μL (5 000 U), 10× Buffer Tango 2 μL,用 ddH₂O 补齐体积。反应体系 37 °C 酶切 3 h,然后 65 °C 3 h 使内切酶失活。将离心管置于冰上,降温后稍离心,收集酶切产物。

1.3.2 接头连接 将酶切产物分别与 *EcoR* I/*Mse*

I 接头(表 2)相连接,连接反应体系为 10 μL(冰上操作),其中 *EcoR* I 接头 5 pmol, *Mse* I 接头 50 pmol, T4 DNA 连接酶 0.2 μL 和 10×buffer 2 μL。22 °C 保温连接 6 h。

1.3.3 连接产物的预扩增 预扩增引物序列各含 1 个选择碱基(表 2),反应体系为 20 μL,其中连接样品 2 μL, E00 和 M00 各 6 pmol, Ex *Taq* 0.08 μL, 10× PCR buffer 2 μL, dNTP 1.6 μL,用 ddH₂O 补足体积。反应条件为 94 °C 2 min(预变性),然后 94 °C 30 s, 56 °C(退火)30 s, 72 °C(延伸)1 min, 30 个循环。

1.3.4 预扩增 PCR 产物的选择扩增 选择扩增引物序列各含 3 个选择碱基。预扩增产物稀释 10 倍后,选扩增反应体系为 10 μL,包括稀释后的预扩增产物 2.5 μL, *EcoR* I 选择扩增引物 1 pmol, *Mse* I 选择扩增引物 3 pmol, dNTP 0.8 μL, 10×PCR buffer 1 μL, Ex *Taq* 0.05 μL, ddH₂O 补足体积。PCR 反应程序为 94 °C 预变性 2 min,然后降落 PCR 13 循环,即 94 °C(变性)30 s, 65 °C(退火)30 s(每个循环降低退火温度 0.7 °C), 72 °C 延伸 1 min; 然后 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 24 个循环。

1.3.5 选择扩增 PCR 产物的银染和图谱采集

将丙烯酰胺和甲叉丙烯酰胺按 19:1 ($V:V$) 配成 40% 丙烯酰胺, 然后用 1×TBE 稀释至 4.5%, 每 60 mL 加 420 μ L 10% 的过硫酸铵和 60 μ L TEMED。选扩增产物用 4.5% 变性聚丙烯酰胺凝胶, 在 Hoefer SQ3 Sequencer 上恒功率 60 W 电泳 1.5 h 后, 将玻璃板放入 10% 冰醋酸溶液轻轻摇动 30 min, 至胶板全部脱色, 重蒸水冲洗 3 次, 每次 2 min。加入染色液轻轻摇动 30 min (2 L ddH₂O+2 g 硝酸银+3 mL 35% 甲醛)。用水冲洗, 不超过 5 s。把胶板快速转移到 2 L 冷却的显影液中, 并轻轻摇动直至带纹出现, 本实验使用的碳酸钠溶液约预冷 2 h, 使用前 5 min 加入 3 mL 的 37% 甲醛和 0.4 mL 的 10 mg/mL 硫代硫酸钠。将胶板放入到

10% 的醋酸中, 轻轻摇晃 3~5 min。用自来水冲洗胶板, 直至醋酸味去除为止, 晾干后用扫描仪扫描并保存图像, 用 UVP BioImaging Systems 进行图像分析和数据处理, 统计带型。标记由引物组合及阿拉伯数字按分子量大小逆序命名。

经 96 对引物组合筛选, 从扩增条带数目适中清晰、多态性高的引物组合中随机选取 7 对引物组合 [E39M48 (E00-AAC, M00-CAC)、E33M55 (E00-AAG, M00-CGA)、E38M55 (E00-ACT, M00-CGA)、E35M60 (E00-ACA, M00-CTC)、E38M58 (E00-ACT, M00-CGT), E42M61 (E00-AGT, M00-CTG), E35M61 (E00-ACA, M00-CTG)] 用于对以上 5 个文蛤群体进行 AFLP 分析。

表 2 用于 AFLP 分析的接头和引物序列
Tab. 2 Adaptor and primer sequences used for AFLP analysis

内切酶 Endonucleases	接头序列 Adaptor sequence	引物序列 (E00-NNN 和 M00-NNN) Primer sequence (E00-NNN and M00-NNN)
<i>EcoR</i> I	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 3'-CTGACGCATGTTAA-5'	5'-GACTGCGTACCAATTC NNN-3'
<i>Mse</i> I	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' 3'-TACTCAGGACTCAT-5'	5'-GATGAGTCCTGAGTAA NNN-3'

注: E00: 5'-GACTGCGTACCAATTC-3'; M00: 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3', N: 选择碱基

Note: E00: 5'-GACTGCGTACCAATTC-3'; M00: 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3', N: Selective bases.

1.4 数据整理与分析

利用分析软件 Cross Checker version 2.9^[11] 进行谱带识别和分析, 电泳图谱中有条带记为“1”, 无条带记为“0”, 缺失记为“.”, 获得 0、1 矩阵。用 POPGENE1.32 软件计算出等位基因数、Shannon 多样性指数 (I)、Nei's 基因多样性指数 (H)、群体间基因分化系数 (G_{ST})、Nei's 遗传距离^[12] (D), 用 Arlequin 2.000 进行 AMOVA 分析并估算群体间遗传分化系数 (F_{ST})^[13]。根据个体间遗传距离矩阵, 用 PHYLIP 3.62^[14] 的 Neighbor 模型以 UPGMA 方法对群体进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 文蛤群体 AFLP 扩增谱带统计

应用 7 对引物组合 (E39M48、E33M55、E38M55、E35M60、E38M58、E42M61、E35M61) 从 5 个群体中扩增得到 364 个位点, 其中 E39M48 得到 56 个, E33M55 得到 54 个, E35M60 得到 48 个,

E38M58 得到 46 个, E42M61 得到 44 个, E35M61 得到 62 个, 总的多态位点 359 个, 5 个群体的多态位点比例达到 99.63%。5 个群体内的多态位点比例也非常高, 为 84.39%~87.64%。图 1 为引物组合 E39M48 的扩增电泳图。

2.2 群体的遗传结构及遗传多样性分析

5 个群体内的 Shannon 多样性指数与遗传距离等参数如表 3 所示, 在这 5 个群体中, 辽宁大洼野生群体 (LDYS) 和山东野生群体 (SDYS) 的多态位点比例最大, 分别为 87.64% 和 87.01%, 辽宁盘山养殖群体 (LPYZ) 多态位点比例最小, 为 84.39%; 从基因多样性水平来看, 辽宁大洼野生群体 (0.276 8) 和山东野生群体 (0.263 4) 均大于其他 3 个群体 (0.230 1~0.254 8); 群体内的 Shannon 多样性指数和遗传距离, 辽宁大洼野生群体 (LZYS) (0.424 8、0.536 0) 和山东野生群体 (0.404 2、0.480 0) 均大于辽宁盘山养殖群体 (0.361 7、0.449 3)、辽宁庄河野生群体 (0.382 3、0.384 9) 和辽宁庄河养殖群体

(0.378 4, 0.259 2), 辽宁庄河野生群体不论在多态位点比例、Shannon 多样性指数还是群体内遗传距离等参数上与其他群体相比都处于中等水平。通常群体的遗传距离越大, Shannon 多样性指数越高,

但是本研究中的 5 个群体间的多样性指数与群体内的遗传距离并不一致, 如辽宁盘山养殖群体和辽宁庄河养殖群体。

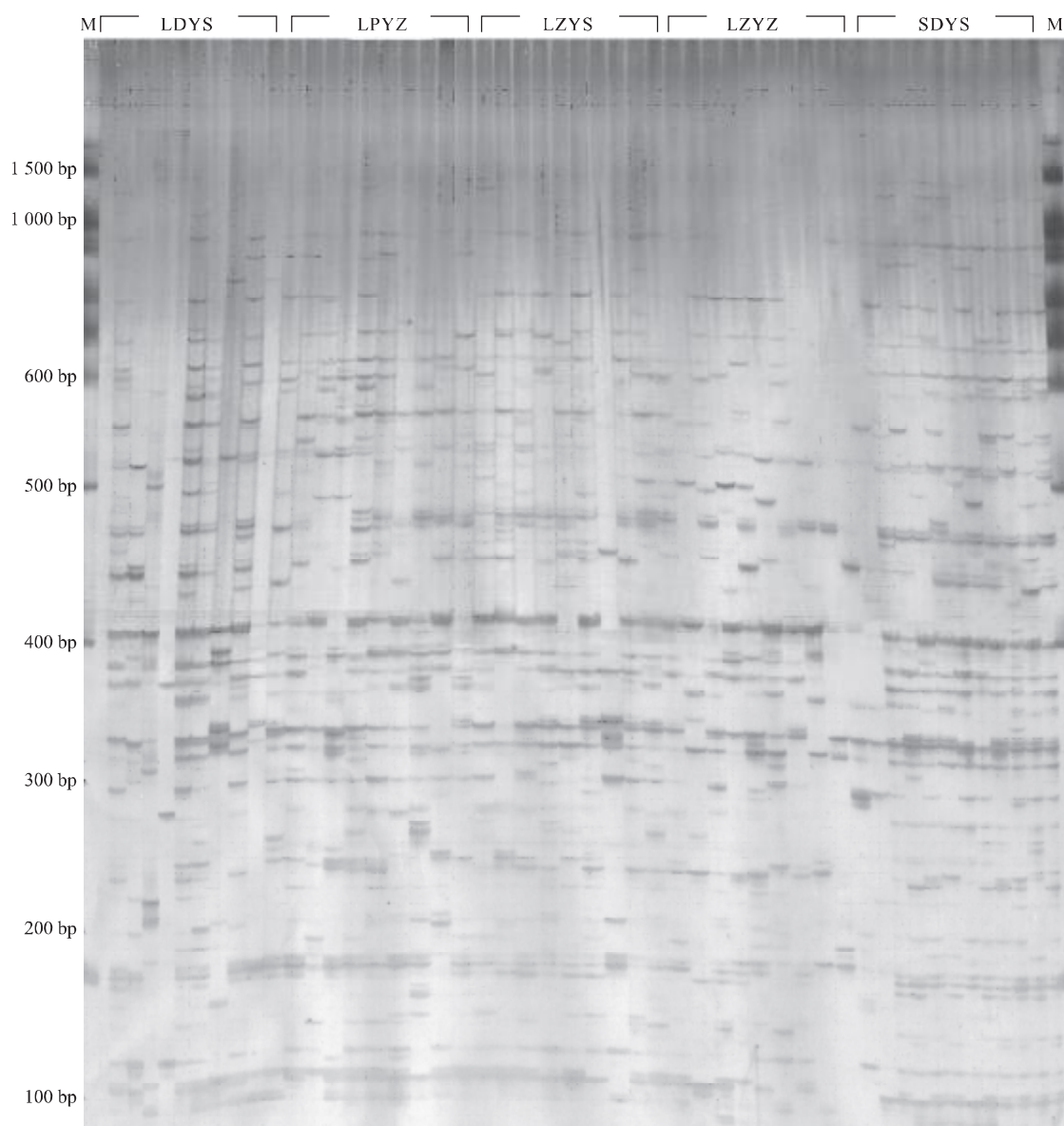


图 1 引物组合 E39M48 的 AFLP 扩增电泳图

LDYS: 辽宁大洼野生; LPYZ: 辽宁盘山养殖; LZYS: 辽宁庄河野生; LZYZ: 辽宁庄河养殖; SDYS: 山东东营野生。

Fig.1 AFLP results of primer pair E39M48

LDYS: wild population from Liaoning Dawa; LPYZ: cultured population from Liaoning Panshan; LZYS: wild population from Liaoning Zhuanghe; LZYZ: cultured population from Liaoning Zhuanghe; SDYS: wild population from Shandong Dongying.

5 个群体内的遗传距离均远远高于群体间的遗传距离 (表 3、表 4), 说明这 5 个文蛤群

体间相似性较大, 或者说群体间存在较大的基因交流。但是, 从群体间的遗传距离还可以看

出(表3), 辽宁庄河野生群体与其他任何群体的遗传距离 D (0.131 5~0.160 9) 和基因分化系数 G_{ST} (0.075 5~0.082 9) 均大于其他群体之间的遗传距离 (0.039 4~0.060 4) 和基因分化系数 (0.040 2~0.055 9), 表明辽宁庄河野生文蛤群体与其他群体之间的遗传差异较大, 这与辽宁庄河野

生文蛤在壳色以及花纹方面与其他文蛤存在差异这一特点相吻合, 从总体上看庄河沿海野生文蛤壳色与其他群体相比略显紫褐色, 但是这是否表明庄河野生群体是一个独立的群体还有待进一步的研究和探讨。

表 3 文蛤 5 个群体的遗传结构
Tab. 3 Genetic construction of 5 populations of *Meretrix meretrix*

群体 Population	多态位点比例 / % P	基因多样性 H	Shannon 多样性指数 I	遗传距离 D
辽宁大洼野生 LDYS	87.646 5	0.276 8	0.424 8	0.536 0
辽宁盘山养殖 LPYZ	84.394 5	0.230 1	0.361 7	0.449 3
辽宁庄河野生 LZYS	85.536 1	0.254 8	0.382 3	0.384 9
辽宁庄河养殖 LZYZ	85.240 1	0.240 7	0.378 4	0.259 2
山东东营野生 SDYS	87.011 2	0.263 4	0.404 2	0.480 0

表 4 文蛤 5 个群体间基因分化系数 G_{ST} 和遗传距离 D
Tab. 4 Gene differentiation (G_{ST}) and genetic distance (D) among five populations

群体 Population	辽宁大洼野生 LDYS	辽宁盘山养殖 LPYZ	辽宁庄河野生 LZYS	辽宁庄河养殖 LZYZ	山东东营野生 SDYS
辽宁大洼野生 LDYS	****	0.042 0	0.082 9	0.040 7	0.054 1
辽宁盘山养殖 LPYZ	0.057 3	****	0.079 0	0.050 7	0.040 2
辽宁庄河野生 LZYS	0.160 9	0.131 5	****	0.075 6	0.075 5
辽宁庄河养殖 LZYZ	0.039 4	0.054 0	0.140 2	****	0.055 9
山东东营野生 SDYS	0.060 4	0.047 8	0.058 0	0.135 3	****

注: 对角线以上为基因分化系数 (G_{ST}); 对角线以下为遗传距离 (D).
Note: Values above diagonal are gene differentiation (G_{ST}); below diagonal are genetic distance (D).

应用分子变异分析 (AMOVA) 对 5 个群体的遗传变异来源进行分析, 结果表明, 文蛤 5 个群体在 7 对 AFLP 引物位点的检测下, 其群体间的遗传分化系数 F_{ST} 仅为 0.596, 即群体间的遗传变异很小 (5.96%), 而 94.04% 的变异来源于群体内, 说明文蛤群体间的基因流较大。

2.3 聚类分析

由 5 个群体的 UPGMA 聚类结果 (图 2) 可以看出, 辽宁庄河野生文蛤群体单独成为一支, 辽宁大洼野生群体与庄河养殖群体聚到一起, 辽宁盘山养殖群体与山东野生群体聚到一起。但是, 对 5 个群体的 150 个个体的聚类分析表明, 不论在 UPGMA 聚类图上还是在 NJ 图上, 没有任何一个群体的全部个体聚在一起形成独立的分支, 而是群体之间出现明显的交叉分布 (图略)。

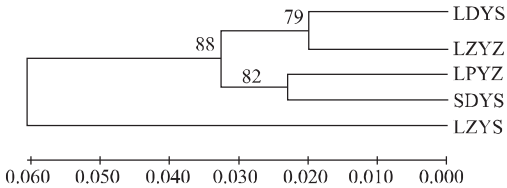


图 2 文蛤 5 个群体的 UPGMA 聚类图

注: 图中刻度线表示遗传距离, 节点处数值为置信度. LDYS: 辽宁大洼野生; LPYZ: 辽宁盘山养殖; LZYS: 辽宁庄河野生; LZYZ: 辽宁庄河养殖; SDYS: 山东东营野生。

Fig. 2 Dendrogram of five *Meretrix meretrix* populations by UPGMA method based Nei's genetic distance

Note: Numbers on the nodes are bootstrap values. Scale line is genetic distance. LDYS: wild population from Liaoning Dawa; LPYZ: cultured population from Liaoning Panshan; LZYS: wild population from Liaoning Zhuanghe; LZYZ: cultured population from Liaoning Zhuanghe; SDYS: wild population from Shandong Dongying.

3 讨论

3.1 本研究结果与其他相关研究的比较

在文蛤的遗传多样性研究方面,一些研究者利用 RAPD 标记技术分别对中国不同地区的文蛤野生群体进行了分析,如沈怀舜等^[4]对辽宁、江苏、广西沿海 3 个文蛤地理群进行了 RAPD 分析,结果得出 3 个地区文蛤的群体内遗传距离分别为 0.169、0.117、0.108,群体间的遗传距离分别为 0.222、0.209、0.316。阎冰等^[5]利用 RAPD 标记分析广西沿海 4 个地区的文蛤遗传多样性为 0.177 3~0.203 9,多态位点比例为 81.35%~90.63%,认为文蛤野生群体的遗传多样性比较丰富。陈大鹏等^[6]利用 ISSR 技术对江苏和辽宁两个文蛤地理种群进行分析表明,江苏文蛤的多态位点比例 (80.7%) 高于辽宁文蛤 (68.4%),两种群的遗传距离分别为 $(0.310\ 5 \pm 0.090\ 0)$ 和 $(0.265\ 8 \pm 0.044\ 0)$,江苏文蛤也高于辽宁文蛤。本研究利用 AFLP 对辽宁和山东沿海文蛤养殖群体和野生群体进行分析,得到了基本一致的结果,但 AFLP 分析的多样性指数 (0.361 7~0.424 8) 远远高于 RAPD 的分析结果 (0.177 3~0.203 9)^[5],这可能是因为 AFLP 标记比 RAPD 标记检测位点更加丰富所致。史兼华等^[15]应用 AFLP 技术通过 5 对选择性扩增引物对两个马氏珠母贝 (*Pinctada martensii*) 选育系和 1 个当地养殖群体的遗传多样性进行了分析,共扩增出 265 条谱带,多态位点比例为 73.58%~79.25%,选育系和养殖群体的 Nei's 基因多样性指数 (0.252 2~0.281 7) 和 Shannon 遗传多样性指数 (0.381 4~0.420 4) 与本研所得出的文蛤的 Nei's 基因多样性指数 (0.230 1~0.276 8) 和 Shannon 遗传多样性指数 (0.361 7~0.424 8) 基本相当,通过横向比较可以看出,这两种贝类的遗传多样性水平都比较高。

从本研究的结果还可以看出,文蛤野生群体的遗传多样性水平高于养殖群体,但是值得注意的是庄河野生群体的多样性水平与养殖群体接近,这可能与近年来庄河沿海文蛤野生资源日趋枯竭所造成的遗传瓶颈作用有关,近年来的文蛤资源调查显示庄河沿海文蛤资源量已下降到极低水平,已不能形成优势种群。

3.2 文蛤群体的遗传多样性水平及保护

通过 AFLP 分析结果看出,不论是养殖群体还

是野生群体,群体间遗传差异普遍偏小,所使用的 7 对 AFLP 引物组合在这 5 个群体中扩增出的位点并没有出现群体特有的 AFLP 特征谱带,这似乎说明不同的群体间存在着明显的基因交流。150 个个体的聚类分析表明,不论在 UPGMA 聚类图上还是在 NJ 图上,没有任何一个群体单独聚合在一起形成自己的分支,而是 150 个文蛤出现交叉分布,说明黄海北部沿海和渤海辽东湾的文蛤以及山东黄河口文蛤群体之间存在着较大的基因流。但从地理分布上来看,这 3 个区域相距较远,地理隔离明显 (辽东湾辽河口与黄河口相距数百千米,辽东湾辽河口与黄海北部庄河沿海有半岛相隔),相互之间的自然基因交流比较困难,所以这种基因交流可能主要来源于文蛤增养殖过程中苗种交流,因为目前辽宁文蛤养殖所用的苗种绝大部分来自山东黄河口、辽宁蛤蜊岗和江苏沿海等地^[3,16],大量的异地苗种的引入可能是导致辽宁及山东等文蛤地理种群种质混杂、群体之间遗传差异减小、群体遗传特征下降的主要原因。文蛤的人工养殖已经对辽宁沿海的野生文蛤自然资源的遗传结构产生了影响。因此,从文蛤自然种群保护的角度考虑,应尽量避免不同地理群体间文蛤种质混杂以及养殖群体流入到天然群体中,特别是保护好原种场,以避免地理群体的种质资源的丧失,也为通过地理种群组合杂交育种,提高文蛤养殖水平^[17]奠定基础。

致谢: 本项目得到国家 908 项目辽宁省近岸海域化学和生物生态调查项目的资助。辽宁省盘山县、大洼县和东港市海洋与渔业局张万春、李作生和谭学群先生在文蛤样品采集工作中给予大力支持,在此一并表示感谢。

参考文献:

- [1] 徐胜基,张赤,赫崇波,等. 葫芦岛海区文蛤滩涂养殖实验报告 [J]. 水产科学,1998 (05): 34-36.
- [2] 赫崇波,徐胜基,党中印. 文蛤滩涂养殖技术 [J]. 中国水产,1999 (05): 40-42.
- [3] 赫崇波,徐盛基,张赤,等. 辽宁文蛤滩涂养殖业现状及前景分析 [J]. 水产科学,2001,20 (4): 42-43.
- [4] 沈怀舜,朱建一,丁亚平,等. 我国沿海三个文蛤地理群的 RAPD 分析 [J]. 海洋学报,2003,25 (5): 97-102.
- [5] 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.
- [6] 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]. 南京师大学报, 2004, 27(3): 74-77.
- [7] 李太武, 张国安, 苏秀榕, 等. 不同花纹文蛤 (*Meretrix meretrix*) 的 ITS2 分析 [J]. 海洋与湖沼, 2006, 37(2): 132-136.
- [8] 薛明, 杜晓东, 黄荣莲, 等. 文蛤三个野生种群的生化遗传变异 [J]. 海洋通报, 2006, 25(1): 38-42.
- [9] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [10] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA finger printing [J]. Nucl Acids Res, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [11] Buntjier J B. Cross Checker version 2.91 [EB/OL]. 1999. <http://www.spg.wau.nl/pv/pub/Cross>.
- [12] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. Proc Natl Acad Sci, 1979, 76(10): 5269-5273.
- [13] Schneider S, Roessli D, Excofier L. Arlequin: A software for population genetics data analysis. Ver 2.000 [EB/OL]. 2000. <http://anthro.unige.ch/software/arlequin/>
- [14] Felsenstein J. PHYLIP Version 3.62 [EB/OL]. 2002. <http://evolution.genetics.washington.edu/phyliip.html>
- [15] 史兼华, 何毛贤, 黄良, 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.
- [16] 于志华, 董剑波, 龚海静, 等. 文蛤天然附苗场抢救性保护刻不容缓 [J]. 海洋渔业, 2003, 25(1): 39-41.
- [17] 冯建彬, 李家乐, 王美珍, 等. 我国沿海不同群体文蛤遗传差异 RAPD 分析 [J]. 海洋渔业, 2005, 27(4): 281-285.

AFLP analysis of cultured and wild hard clam (*Meretrix meretrix*) populations

HE Chong-bo¹, CONG Lin-lin², GE Long-li³, LIU Wei-dong¹, ZHOU Zun-chun¹, GAO Xiang-gang¹

(1. Liaoning Ocean and Fisheries Science Research Institute, Liaoning Key Laboratory of Marine Fishery Molecular Biology, Dalian 116023, China; 2. College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China; 3. College of Life Science and Technology, Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China)

Abstract: Genetic diversity of five hard clam (*Meretrix meretrix*) populations was conducted using amplified fragment length polymorphism (AFLP) in this study. The five populations included 3 wild ones from Liaoning Dawa (LDYS), Liaoning Zhuanghe (LZYS) and Shandong Dongying (SDYS) and 2 cultured ones from Liaoning Zhuanghe (LZYZ) and Liangning Panshan (LPYZ). Total of 364 reproducible bands amplified with 7 AFLP primer combinations were obtained from 150 individuals. The percentage of polymorphic loci ranged from 84.394 5% to 87.646 5% within the five populations and the overall polymorphic loci percentage of the five populations was 98.630 0%. The Nei's gene diversity (H) of the five populations were 0.230 1~0.263 4. The Shannon diversity indices (I) were 0.361 7~0.424 8, the genetic distances (D) were 0.259 2~0.536 0 among populations, and 0.259 2~0.536 0 within populations. The percentage of polymorphic loci (P), Shannon diversity indice, genetic distance for the population LDYS and SDYS were higher than those of the population LPYZ and LZYZ, while the genetic diversity of population LZYS was at middle level. AMOVA analysis indicated that 5.96% of variance was among populations and 94.04% of variance was within populations. Average F_{ST} value overall loci was 0.117 0. The five populations were clustered into three major clades through UPGMA method based on genetic distance. Populations of LDYS and LZYZ were clustered into one clade. LPYZ and SDYS were clustered into the second clade, Population LZYS was not clustered into any clade. Although the five populations were grouped into three clusters by whole population, all the 150 individuals from five populations were clustered with each other through UPGMA method based on their genetic distances. The analysis result of population pairwise gene differentiation (G_{ST}) showed that great gene flow existed among populations and the genetic diversity between populations was at quite lower levels. The information may be beneficial to future broodstock selection and defining conservation management for the different populations of *Meretrix meretrix*. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(2): 215-221]

Key words: *Meretrix meretrix*; AFLP; genetic diversity