

文章编号: 1000- 0615(2004)02- 0127- 06

## 亲本数目对鲍养殖群体 AFLP 标记位点及其遗传结构的影响

万俊芬<sup>1,2</sup>, 包振民<sup>1</sup>, 汪小龙<sup>1</sup>, 张全启<sup>1</sup>, 王如才<sup>1</sup>

(1. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003; 2. 华东理工大学海洋生化工程研究所, 上海 200237)

**摘要:** 为了探讨不同的交配亲本数对鲍养殖群体遗传结构的影响, 实验中对两个皱纹盘鲍自交群体 SS(亲本数少)和 LS(亲本数多)及两个皱纹盘鲍(♀) × 日本盘鲍(♂)的杂交群体 SH(亲本数少)和 LH(亲本数多)进行了位点频率和遗传结构的 AFLP 标记分析。研究表明, 自交组中亲本数少的 SS 群体的总位点数少于 LS 群体, 后者的一些低频位点在前者中丢失, 同时群体的位点频率发生漂移, SS 的低频位点数目减少而高频位点略有增加。另外统计了各群体的相似指数和杂合度, 发现 SS 群体的相似指数低于 LS, 而杂合度高于 LS 群体。在杂交组两群体(SH, LH)中位点数目频率、相似指数和杂合度变化趋势与两自交群体相似。两组结果均表明群体的亲本数减少会引起一些低频位点丢失及位点频率发生漂移, 同时亲本数过少会导致群体的杂合度暂时升高。

**关键词:** 鲍; 扩增片段长度多态性; 亲本数目; 位点频率; 杂合度

中图分类号: S944.4<sup>+</sup>5 文章标识码: A

## The influence of parental stock size on the genetic structure of *Haliotis discus*

WAN Jun-fen<sup>1,2</sup>, BAO Zhen-min<sup>1</sup>, WANG Xiao-long<sup>1</sup>, ZHANG Quan-qi<sup>1</sup>, WANG Ru-cai<sup>1</sup>

(1. College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Marine Bioengineering Institute, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

**Abstract:** In order to reveal the influence of stock size on the genetic structure of filial populations, two groups of *Haliotis discus hannai* (SS with small number of parents, LS with large number of parents) were analyzed using AFLP (amplified fragment length polymorphism) markers. It was found the total number of loci in SS was less than that in LS and some rare loci of LS were lost in SS. Furthermore, the number of low-frequency loci increased, and high-frequency loci slightly decreased in SS compared with LS. The similarity was lower and heterozygosity was higher in SS than in LS. In order to prove above results, another two groups (SH, LH) were also analyzed, which were hybrids of *H. discus hannai* × *H. discus discus*. The trends of loci number, loci frequency, similarity and heterozygote in SH and LH were similar to SS and LS. Both results revealed small parental stock size could result in the loss of low-frequency loci and cause low-frequency loci to drift to high-frequency loci, and extremely small stock size could result in temporal increase of heterozygosity.

**Key words:** abalone; AFLP; parent number; loci frequency; heterozygosity

收稿日期: 2003-04-28

资助项目: 国家 973 项目(G 1999012009), 863 项目资助(2001A A628050)

作者简介: 万俊芬(1972-), 女, 山东莱阳人, 博士研究生, 从事海洋生物遗传育种研究

通讯作者: 包振民(1962-), 男, 山东烟台人, 教授, 博士生导师, 从事海洋生物遗传育种研究, E-mail: zmbao@ouc.edu.cn

皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)以营养丰富,肉质细嫩,深受人民喜爱,成为中国北部、朝鲜半岛南部和日本中北部鲍的主要养殖品种。由于皱纹盘鲍的繁殖力很高,如生产上选用的8cm雌贝的产卵量可达每只120多万,雄贝的排精量还要多好几倍,同时种鲍培养周期长(3年以上),价格较贵,因此育苗场往往选用较少数量的种鲍进行育苗生产,尤其是雄鲍数通常只有几只。同时近几年因皱纹盘鲍和日本盘鲍(*H. discus discus*)杂交所得的杂交鲍生长快、成活率高而迅速应用于生产,但从国外引进日本盘鲍需要大量的费用,因此杂交种在生产中所用的亲本数往往更少。这种养殖群体只来源于有限的亲本数的现象不可避免地会带来两个问题:一是少数个体的大量繁殖和多年的累代养殖,会造成一定程度的近交繁殖,导致养殖群体生活力下降及生产性状退化等<sup>[1]</sup>。二是从自然群体中选用有限数目的亲鲍进行繁殖必然引起养殖群体的遗传结构发生改变,导致群体的随机漂变或瓶颈效应<sup>[2]</sup>。

目前针对这方面的研究较少,仅有应用同工酶和微卫星的报道<sup>[3,4]</sup>,因同工酶和微卫星技术标记的位点数相对较少,限制了其在全面评价种鲍数量对后代基因频率和遗传结构影响中的应用。近几年发展起来的DNA扩增片段长度多态性(AFLP)技术是一种高精度、大容量标记技术,很适合亲缘关系很近群体间的遗传分析<sup>[5]</sup>。本文首次应用该技术对具有不同亲本数的鲍养殖群体进行了分析,通过对具有不同种鲍数的两自交群体和两杂交群体的标记,研究了不同群体的位点数目及其频率分布特点,以及各群体的遗传相似性和杂合度的变化,以期揭示不同种鲍数对养殖群体遗传结构的影响,为鲍的育苗生产和育种研究提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

皱纹盘鲍亲鲍取自山东长岛海域的野生种群,日本盘鲍亲鲍取自于日本岩手县,运回育苗场作为种鲍暂养。两种亲鲍于2月底在室内升温促熟。交配实验于2000年和2001年的5~6月在蓬莱大季家镇鲍育苗场进行,本实验共设计了4个组:少量亲本自交群体(SS)为4个皱纹盘鲍(♀)与4个皱纹盘鲍(♂)自交;多数量亲本自交

群体(LS),亲本数雌鲍约100个,雄鲍约30个,SS和LS为自交组。少量亲本杂交群体(SH)为4个皱纹盘鲍(♀)与4个日本盘鲍(♂)杂交;多数量亲本杂交群体(LH)由约100个皱纹盘鲍(♀)与约20个日本盘鲍(♂)杂交所得,SH和LH为杂交组。

### 1.2 AFLP分析

取以上各组鲍个体30个,剪取腹足肌0.1g,常规酚-氯仿抽提法提取基因组DNA后,按Pieter等方法<sup>[6]</sup>进行AFLP分析:基因组DNA用EcoR I和Mse I双酶切并连上接头后,用带有1个选择碱基的引物(E-A, M-C)进行预扩增,最后用带有3个选择碱基的引物进行选择扩增。扩增产物在4.5%变性聚丙烯酰胺凝胶分离后,进行银染显带。AFLP操作流程中所用药品均购自Sangon公司,PCR(聚合酶链反应)仪为TECHNE-Genius型。

### 1.3 数据分析

应用Cross Checker Version 2.8<sup>[7]</sup>软件将所有AFLP扩增图谱转换成1,0数据矩阵(有带赋值为1,无带为0)。因AFLP为显性标记,每处扩增带看成是一个具有2个等位基因的位点,1代表该位点的显性基因型,0为隐性基因型。

统计各位点的扩增频率和各群体的位点分布情况,应用百分数检验群体间差异显著性位点,并绘制各群体的位点频率分布图。

根据Lynch公式 $S_{xy} = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ <sup>[8]</sup>,计算各群体内的相似性指数,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和个体y的总位点数。同时用TFPGA 1.3软件中的显性标记法计算各群体的杂合度<sup>[9]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 各群体的扩增位点差异

从42对引物组合中筛选出的6对多态性高扩增带清晰的引物组合对四群体进行了扩增,这6对引物组合分别为:E-aac/M-cct, E-aac/M-cga, E-aag/M-cgt, E-aca/M-cga, E-aga/M-cct和E-atg/M-cga,其中两对引物组合分别对自交组和杂交组的扩增图谱见图1。

由图可见自交组中大多扩增位点在两群体中同时出现,但位点a1-a4仅在多数量亲本LS群体中出现;杂交组中的扩增位点亦多在两群体中同

时出现,但位点 b1-b4 仅在多数量亲本 LH 群体中出现,同时在 SH 群体中有一个位点 c 在 LH 群体中不存在。对各群体的总扩增位点及群体间差异位点数进行了统计,自交组 SS 群体共扩增出 434 个位点,LS 群体扩增出 481 个位点,两个群体共享位点为 425 个,占总位点的 86.7%,除共享位点外,LS 群体出现 56 个位点在 SS 群体中没有被扩增,SS 群体中也有 9 个位点在 LS 群体中不存在;杂交组 SH 群体共扩增出 481 个位点,LH 群体扩增出 527 个位点,两群体共享位点为 475 个,占总

位点的 89.1%,此两群体中亦出现了一些对方没有的位点,LH 有 52 个,SH 有 6 个位点在对方中不存在。结果说明,无论是自交组还是杂交组中,亲本数较少的后代群体含有绝大多数(近 90%)亲本数多的群体的扩增带。但群体的亲本数减少导致一些位点丢失,自交和杂交组中少数亲本群体的位点数皆比多数量亲本少近约 10%,这些位点的出现频率是较低的,其范围为 3.3%~56.7%,在自交组中平均为 18.8%,杂交组中为 13.8%(表 1)。



图 1 引物组合 E-AAG/M-CGT 对自交组以及引物组合 E-ACA/M-CGA 对杂交组的 AFLP 扩增图谱

Fig. 1 The AFLP profile of *H. discus hannai* and hybrid groups by primer combination a1-a4 of LS group; b1-b4, special loci of LH groups; c, special loci of SH group

a1-a4 为 LS 群体的特有位点; b1-b4 为 LH 群体的特有位点; c 为 SH 群体的特有位点  
a1-a4, special loci of LS group; b1-b4, special loci of LH groups; c, special loci of SH group

从表 1 中还可以看出杂交群体的总位点数 (533 个) 与共享位点数 (475 个) 均多于自交群体 (490 个, 425 个), 其多态率也高于自交群体, 说明杂交增加了后代群体的遗传变异。同时也可以看到, 不论是杂交群体还是自交群体, 亲本数目的多少对后代群体的特有位点数目的影响十分明显,

表 1 不同群体的扩增位点数目及多态分布情况

Tab. 1 The number of loci and polymorphism rate of different groups

实验分组 groups	个体数 individual number	总位点 total loci	两群体 共有位点 shared loci	各群体位点 each group loci	群体间 特有位点 special loci	特有位点比例 % special loci Proportion	多态率 % polymorphism rate
自交组 SS	30	490	425	434	9	1.8	71.2
self LS	930	490	425	481	56	11.2	68.7
杂交组 SH	30	533	475	481	6	1.1	81.6
Hybrid LH	30	533	475	527	52	9.76	82.3

另外各组内两群体间除了以上所述在一方中不存在, 而在另一方以较低频率出现的差异位点外, 还有一些位点在双方中皆出现但频率差异较大, 经百分数检验, 这样的位点自交组内两群体间有 14.1%, 杂交组内有 12.3% 的位点频率差异显著 ( $P < 0.01$ )。

2.2 各群体的位点分布特征

为了从总体上进一步研究不同亲本数对子代群体位点分布的影响, 将显性位点频率从 0~ 1 平均分成 5 个区间:  $> 0 \sim \leq 0.2$ ,  $> 0.2 \sim \leq 0.4$ ,  $> 0.4 \sim \leq 0.6$ ,  $> 0.6 \sim \leq 0.8$ ,  $> 0.8 \sim < 1$  和位点频率为 0 和 1 两个关键点, 统计所有显性位点在各频率区间内的数目, 并分析各组内具有不同亲本

如 SS 群体的特有位点占总位点的比例为 1.8%, 而 LS 群体为 11.2%。但对群体的多态率的变化影响不大, SS 群体的多态率为 71.2%, 而 LS 群体的多态率为 68.7%, 两者相差无几, 杂交组两群体也是如此。

数的群体位点频率的变化规律。由图 2 可见, 自交组中 LS 群体显性基因频率为 0 的位点数明显少于 SS 群体 ( $P < 0.01$ ); 在显性频率区间  $> 0 \sim 0.4$  内, LS 群体的位点数明显多于 SS 群体 ( $P < 0.01$ ), 而在  $0.4 \sim 0.8$  区间内 SS 群体的位点数略多于 LS 群体, 但差异不明显 ( $P < 0.05$ )。由图 3 可见, 杂交组两群体的显性位点频率的分布趋势与自交群体类似, 只是在低频率区间两群体间的差异不象自交群体那么明显而已。说明不论是在自交群体还是杂交群体中, 受交配亲本数影响显性位点频率发生漂移, 即随亲本数减少低频位点减少, 高频位点数略有增加, 即就是一些稀有位点丢失, 进而影响到其它位点的频率。

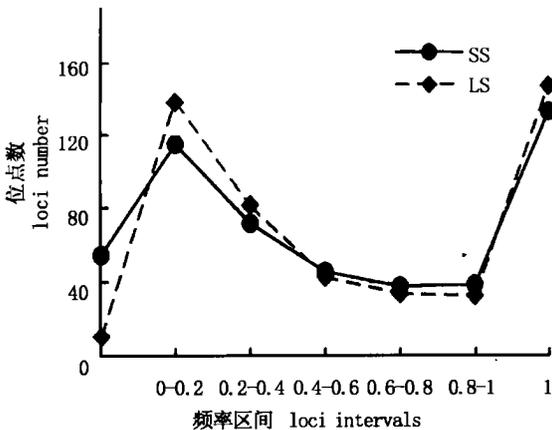


图 2 两自交群体显性位点频率分布特征

Fig. 2 The characteristics of loci frequency in two selfing groups

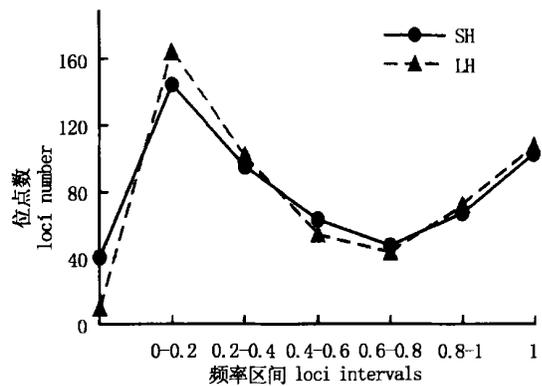


图 3 两杂交群体显性位点频率分布特征

Fig. 3 The characteristics of loci frequency in two hybrid groups

### 2.3 种鲍数对群体遗传结构的影响

根据 AFLP 标记的群体内各个体的扩增位点, 统计各群体的相似性指数。自交组中 SS 群体的相似性指数 (0.788) 低于 LS 群体 (0.809); 杂交组中的 SH 群体的相似性指数 (0.750) 低于 LH 群体 (0.785), 这两组群体皆表明来源于少量亲本的群体的相似性低于亲本数多的群体的相似性。为了进一步验证亲本数量对群体结构的影响, 计算了各群体的平均杂合度, 由表 2 可见, 自交组中 SS 群体的杂合度 (0.211) 大于 LS 群体的 (0.171), 而杂交组中 SH 的杂合度 (0.229) 大于 LH (0.203), 表明亲本少的群体的杂合度高于亲本数多的群体。且经 t 检验表明, 各组内两群体的相似性指数和杂合度均差异显著 ( $P < 0.01$ )。从以上结果我们可以总结出当某群体具有的繁殖亲本数很少时, 其相似性低于亲本数多的群体, 而杂合度高于亲本数多的群体。另外发现杂交组的遗传相似性指数均低于自交组, 而杂合度高于自交组, 表明杂交丰富了生物群体的遗传基础, 增加了变异 (表 2)。

表 2 不同群体的相似性及杂合度指数的比较

Tab. 2 The heterozygosity and similarity indexes of different groups

指数 indexes	自交组 self-groups		杂交组 hybrid groups	
	SS	LS	SH	LH
相似性指数 similarity index	0.788	0.809	0.750	0.785
杂合度 heterozygosity	0.211	0.171	0.229	0.203

### 3 讨论

当某群体的繁殖亲本数过少时, 由于瓶颈效应往往会引起该群体的基因频率发生漂移和稀有位点丢失<sup>[10]</sup>, 在高繁殖力种类如牡蛎<sup>[2]</sup>, 扇贝<sup>[11]</sup>, 蛤仔<sup>[10]</sup>和鲍<sup>[3]</sup>等贝类的某些群体中通过同工酶或 RFLP 等标记已得到证实。本实验中利用 AFLP 技术对鲍 4 个群体的全基因组进行标记, 也发现只有很少种鲍数的 SS、SH 两群体的显性位点相对于种鲍数多的群体向高频发生漂移, 且 LS、LH 群体中各有几十个低频位点在 SS、SH 群体中丢失, 说明在种贝数目有限的情况下, 进行繁育不可避免地要造成或多或少的基因丢失。

本实验发现虽然少数亲本的后代群体丢失了

一些稀有位点, 但其杂合度反而高于亲本数较多的群体的矛盾现象。Gaffney 等<sup>[12]</sup>通过同功酶标记也发现在牡蛎中有效亲本数少的群体 (8.7 个) 的杂合度亦高于其它群体, 且相对于哈得-温伯格平衡 (HWE) 表现出杂合子过剩<sup>[12]</sup>。Launey 等<sup>[13]</sup>对牡蛎 (*Ostrea edulis*) 的 3 个选择群体进行微卫星标记, 也发现随亲本减少, 群体的位点数明显下降, 但杂合度上升, 杂合子过剩。这种因亲本数过少而引起的暂时的杂合度升高和杂合子过剩现象, Watterson 认为由于某些稀有位点丢失引起的杂合度降低可以由剩下位点频率的均衡而补偿, 也就是由于位点频率的均衡性提高引起的杂合度的增加<sup>[14]</sup>。这种因亲本数过少而引起的暂时的杂合度升高, 也可能因为亲本数过少时子代中一些隐性致死基因容易纯合, 纯合个体死亡率增加, 从而使群体的杂合度升高<sup>[12, 15]</sup>。Robertson<sup>[16]</sup>和 Pudovkin 等<sup>[17]</sup>通过数学推理证明这种因亲本数过少而引起的群体杂合度升高的现象只是暂时的, 若该群体内自由交配, 产生的下一代的杂合度便会降低。因杂合度常与群体的一些经济性状呈正相关, 但在某些养殖群体中 (特别是象鲍这样高繁殖力的种类) 不能仅靠杂合度的大小来判断该群体的优劣, 如上所述过少的亲本数往往会造成群体暂时的杂合度升高的假象。

种贝的保种规模一直是各苗种场关心的问题。Smith 等<sup>[3]</sup>建议鲍的育苗中所用最少的有效亲本数雌鲍和雄鲍各为 5 个。从本研究看雌雄亲鲍数量越少, 丢失的基因越多, 所以建议有效亲本数应更多一些。Smith 等<sup>[3]</sup>建议鲍的育苗生产中实际所用最少的亲本数雌鲍为 25~50 个, 雄鲍为 10~13 个。我们认为, 参与繁殖的亲鲍以雌鲍 60 个以上, 雄鲍 30 个以上为宜, 繁育杂交种时因存在一定程度的异源受精, 精卵的结合相对困难些, 因而雌雄亲鲍的数量应适当增加。

### 参考文献:

- [1] Patrick M, Rubin V P, Hedgecock D, et al. Genetic effects of artificial propagation: signal from wild and hatchery populations of red abalone in California [J]. Aquac, 1996, 143: 257-266.
- [2] Hedgecock D, Sly F. Genetic drift and effective population sizes of hatchery-propagated stocks of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* [J]. Aquac, 1990, 88: 21-38.
- [3] Smith P J, Conroy A M. Loss of genetic variation in hatchery-produced abalone, *Haliotis iris*, New Zealand [J]. J Mar

- Freshwater Res, 1992, 26: 81- 85.
- [ 4 ] Selvamani M J P, Degnan S M, Degnan B M. Microsatellite genotyping of individual abalone larvae: parentage assignment in aquaculture[J]. Mar Biotech, 2001, 3: 478- 485.
- [ 5 ] Ulrich G M, Lareesa L V. AFLP genotyping and fingerprinting [J]. Tree, 1999, 14( 10 ):389- 394.
- [ 6 ] Pieter V, Rene H, Marjo B, *et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23: 4407 - 4414.
- [ 7 ] Buntjer B J. Software Crosscheck 2. 8 [ Z ]. developed in Wageningen University and Research Center, 1999.
- [ 8 ] Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting [J]. Mol Biol Evol, 1990, 7: 478- 484.
- [ 9 ] Miller M P. Tools for population genetic analyses (TFPGA1. 3): computer software distributed by author[Z]. 1997.
- [ 10 ] Robert T D, John J M. Hard clam, *Mercenaria mercenaria*, broodstocks genetic drift and loss of rare alleles without reduction in heterozygosity[J]. Aquac, 1987, 60: 99- 105.
- [ 11 ] Blake S G. Mitochondrial DNA variation in the cultured bay scallop, *Argoecten irradians*[J]. J Shellfish Res, 1994, 13: 301 - 302
- [ 12 ] Gaffney P M, Davis C V, Hawes R O. Assessment of drift and selection in hatchery populations of oysters (*Crassostrea virginica*) [J]. Aquac, 1992, 105: 1- 20.
- [ 13 ] Launey S, Barre M, Gerard A, *et al.* Population bottleneck and effective size in *Bonnamia ostreae*-resistant populations of *Ostrea edulis* as inferred by microsatellite markers[J]. Genet Res Camb, 2001, 78: 259- 270.
- [ 14 ] Watterson G A. Allelic frequencies after a bottleneck [ J ]. Theoretical Popul Bio, 1984, 26: 387- 407.
- [ 15 ] Lewontin R C, Cockerham C C. The goodness-of-fit test for detecting natural selection in random mating populations [ J ]. Evolution, 1959, 13: 561- 564.
- [ 16 ] Robertson A. The interpretation of genotypic ratios in domestic animal population [ J ]. Animal Production, 1965, 7: 319- 324.
- [ 17 ] Pudovkin A I, Zaykin D V, Hedgecock D. On the potential for estimating the effective number of breeders from heterozygote-excess in progeny [ J ]. Genetics, 1997, 144: 383- 387.