

西施舌 5 个地理群体 ITS1 序列变异及系统发生分析

孟学平^{1,*}, 高如承², 申 欣¹, 王 帅², 程汉良¹, 董志国¹, 阎斌伦¹

(1. 淮海工学院海洋学院, 江苏省海洋生物技术重点实验室, 连云港 222005; 2. 福建师范大学生命科学学院, 福州 350108)

摘要: 利用核糖体 rRNA 基因第一内转录间隔区 (ITS1) 序列, 对我国山东日照 (RZ)、江苏连云港 (LYG) 和启东 (QD)、福建长乐 (CL)、广西北海 (BH) 沿海西施舌 5 个野生群体的遗传结构进行了分析。经 PCR 扩增、克隆、非克隆测序, 获得长度为 816—843bp 的 ITS1 核苷酸序列, 其平均 G+C 含量 (60.8%) 显著高于 A+T 含量。在西施舌 5 个群体 93 个个体 118 个序列中共检测到 153 个变异位点, 多态位点比例为 18.3%, 其中, 简约信息位点为 63 个, 共有 63 种基因型。群体间遗传距离在 0.74%—3.38% 之间, 群体内遗传距离为 0.72%—1.06% 之间。CL 群体与其他 4 个群体间的遗传距离明显高 (3.17%—3.38%)。AMOVA 分析结果显示长乐群体有明显的遗传分化 ($F_{ST} = 0.670—0.702, P < 0.001$)。以中国蛤蜊为外群构建的 NJ 树和 ML 树显示 CL 群体聚为一支, 非长乐群体互相重叠聚为另一支, 研究结果显示, 长乐群体已经形成了具有明显遗传结构的地理种群。

关键词: 西施舌; ITS1; 序列分析

ITS1 sequences variation and phylogenetic analysis on five geographical stocks of *Coelomactra antiquata*

MENG Xueping^{1,*}, GAO Rucheng², SHEN Xin¹, WANG Shuai², CHENG Hanliang¹, DONG Zhiguo¹, YAN Binlun¹

1 Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, College of Marine Science of Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China

2 College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China

Abstract: *Coelomactra antiquata* Spengler, 1802, called Xishishe in Chinese, is a bivalve, which belongs to the phylum Mollusca, the class Bivalvia, the order Veneroida, the family Mactridae and the genus *Coelomactra*. The species is distributed widely in the western Pacific Ocean, along the coast of Indochina, Japan, Korea and China. *C. antiquata* has a wide but erratic distribution in China from Taiwan, Guangdong and Hainan Provinces in the south northward to the Shandong Peninsula. *C. antiquata*, a commercially important clam in aquaculture, is one of the most critically endangered species in China. It has experienced severe population declines due to habitat destruction and overfishing during the last two decades. The depletion of natural resources encouraged development of culture techniques for this species, in order to satisfy the demand of the market and maintain the wild population. However, cultivation may result in reduction of genetic diversity unless we know the genetic background of the species. Therefore it is necessary to investigate the genetic structure of this species. Molecular markers have been very useful for analysis of genetic structure. Among many types of molecular markers, we selected the ribosomal rRNA gene first internal transcribed spacer (ITS1). It is widely used in genetic variation and phylogenetic studies of animals and plants because of its high rate of molecular evolution. In recent years, the usage of ITS1 to assess genetic variations in bivalves has increased. To study the genetic variability, five wild stocks of *C.*

基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (BK2007066); 国家 863 计划 (2004AA603140); 江苏省教育厅自然科学基金项目 (05SJD240028)

收稿日期: 2010-02-05; 修订日期: 2010-08-09

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: mpx2002@hotmail.com

antiquata were collected from Shandong Rizhao (RZ), Jiangsu Lianyungang (LYG) and Qidong (QD), Fujian Changde (CL), Guangxi Beihai (BH) in China, and the genetic variation was analyzed based on ITS1 nucleotide sequences of rDNA. PCR amplification with the primers ITS1-F and ITS1-R was performed and the PCR products were cloned and sequenced. DNA sequences were analyzed using DNASTar, and were aligned in ClustalX. The phylogenetic trees were constructed using Neighbor-Joining method (on MEGA 4.1) and Maximum likelihood method (online: <http://www.atgc-montpellier.fr/phylm/>). Analysis of molecular variance (AMOVA) was performed by Arlequin3.11. The results showed that the ITS1 region ranged in size from 816 to 843 bp. 118 sequences were obtained from 93 samples of five stocks of *C. antiquata*, and 153 polymorphic sites were detected. The proportion of polymorphic sites was 18.3%, in which parsimony informative sites were up to 63. Intrastock genetic distance was 0.72%—1.06% whereas interstock genetic distance was 0.74%—3.38%. Significantly, higher genetic variation was observed between the CL stock and the other four stocks (3.09%—3.34%). Further, AMOVA analysis revealed a substantial genetic differentiation in the CL stock ($F_{ST} = 0.670 - 0.702$, $P < 0.001$). Phylogenetic relationships of these individuals were analyzed using NJ and ML methods with *Mactra chinensis* Philippi as an out-group. Phylogenetic analysis showed that CL species formed a monophyletic clade whereas the other non-CL species formed a separate clade. Combined with previous findings, this evidence strongly supports CL *C. antiquata* as a distinct geographical population. In this study, the analysis of ITS1 nucleotide sequences of *C. antiquata* geographical stocks revealed the genetic structure and phylogenetic relationship of five wild stocks of *C. antiquata* in typical coastal regions, which provides the molecular basis for genetic breeding and resource protection of the species.

Key Words: *Coelomactra antiquata*; ITS1; sequence analysis

西施舌(*Coelomactra antiquata* Spengler, 1802)隶属双壳纲,帘蛤目,蛤蜊科,腔蛤蜊属,自然分布于太平洋西部的日本、朝鲜、韩国及中国沿海和印度半岛。在我国四大海及北部湾沿海均有分布。西施舌个体大,肉质细嫩,营养丰富^[1],可与海参、鲍鱼媲美,具有极高的经济价值。近年来,由于酷渔滥捕和海水污染,其种质资源遭到了严重的破坏,自然资源量锐减,资源保护迫在眉睫^[2]。西施舌种质资源的管理急需其遗传学资料。国内有关西施舌遗传多样性研究已有一些报道^[3-8],但还不能反映中国西施舌群体遗传状况全貌,需要更多的分子生物学标记研究结果给以补充。

真核生物核糖体 rRNA 基因第一内转录间隔区(ITS1)被广泛地用于动植物遗传变异和系统发生研究,近年来,在双壳贝类的遗传差异分析中应用逐年增多^[9-15]。本研究通过分析山东、江苏、福建和广西沿海 5 个地理群体西施舌 ITS1 的核苷酸序列,揭示我国沿海具代表性地区西施舌遗传结构和亲缘关系,为西施舌种质资源保护与可持续利用提供理论依据,为其遗传育种奠定分子生物学基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

本研究所用的实验样本西施舌分别采自山东日照涛雒,江苏连云港的墟沟、启东的吕四,福建长乐的漳港和广西北海(表 1),取斧足肌肉乙醇固定,4℃保存备用。此外,从 GenBank 下载 4 个序列:代号和登录号分别为 SD0, EU183532(采集地未知); JS0, EU195802(江苏,具体采集地未知); CL0, EU195801(长乐); SH0, EU195803(神沪湾)^[8]。

1.2 DNA 提取及 PCR 扩增

西施舌基因组 DNA 提取用 CTAB/蛋白酶 K 消化、酚-氯仿抽提、乙醇沉淀法^[14],电泳检测、稀释后作为 PCR 模板。ITS1 序列扩增引物为 ITS1-F: 5' GGTGAAACCTGGCGATGGA3', ITS1-R: 5' GCTGGCTGCGCTCT-TCAT3'。PCR 反应条件:94℃预变性 4min 后进入 PCR 循环,即:94℃变性 45s, 55℃退火 45s, 72℃延伸 1min, 共进行 35 个循环。循环结束后 72℃延伸 8min。扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离,GoldView 染色,凝胶成像系统(ChemidocXRS, Bio-Rad 公司)观察结果并拍照。

表 1 西施舌样本采集信息及 ITS1 序列的 GenBank 登录号

Table 1 Collection data and GenBank accession numbers of ITS1 sequences of *Coelomactra antiquata*

群体 Stock	样本数 Sample. No.	序列数 Sequence No.	样本来源 Sample location	GenBank 登录号 GenBank assesion No.
日照 RZ	17	21	日照, 泰州	HM159073-HM159083
连云港 LYG	17	20	连云港, 墓沟	HM159084-HM159094
启东 QD	16	21	启东, 吕四	HM159095-HM159105
北海 BH	20	23	北海	HM159106-HM159117
长乐 CL	23	33	长乐, 漳港	GU644449-GU6444464
合计 Total	93	118		

1.3 测序及序列分析

PCR 产物经电泳检测后, 用 EZ-10 Spin Column PCR Products Purification Kit(BBI)试剂盒按说明书操作纯化, 将纯化后的 PCR 产物连接到载体 pUCm-T(BS433 pUCm-TVector, BBI)上, 转化到大肠杆菌感受态细胞 DH5 α , 送上海生工生物工程技术有限公司双向测序。另一部分扩增效果好的 PCR 产物直接双向测序。利用 DNAStar 软件包中的 SeqMan 软件和峰图软件 Chromas 对正反向 ITS1 序列进行组装和人工校对, 用 ClustalX 进行序列比对, 用 MEGA4.1 软件进行核苷酸组成分析, 采用 Kimura-2-Parameter distance 双参数模型((Kimura, 1980)计算遗传距离, 并用邻接(Neighbour-Joining, NJ)法和最大似然(Maximum likelihood method, ML)法构建系统树, 通过 1000 次重复获得的自展检验(bootstrap)数值标记在分支上。用 Arlequin 3.11 软件进行分子方差分析(AMOVA)。

2 结果与分析

2.1 ITS1 序列核苷酸多态性分析

PCR 产物经克隆或直接双向测序获得西施舌 ITS1 全序列, 长度为 816—843 bp, 序列长度存在多态性。CL 群体 ITS1 分为 S 型(short sequences, S) 和 L 型(long sequences, L)两种类型, S 型 ITS1 长度为 816—817 bp, L 型长度为 834—839 bp。RZ、QD、LYG 和 BH 群体 ITS1 长度分布在 833—843 之间, 全部为 L 型。S 型序列的 ITS1 在 5'端有一段 19 个碱基(GAAGTCCGCTTC-TACTGTC)的缺失序列。ITS1 序列平均 G+C 含量(60.80%)明显高于 A+T 含量。CL 群体 G+C 含量(61.33%)略高于其他 4 个群体(60.63%—60.75%)。序列经比对后显示, 变异位点占比对位点的 18.3%(153/837)。其中, 约简信息位点占 7.5%(63/837), 变异率较高。西施舌 CL 群体的 23 个个体的 17 种基因型(图 1 大方框)具有 22 个共享变异位点, 可作为群体鉴别的分子标记。其中 4 种基因型有明显的缺失(图 1 小方框)。其余 4 个群体无群体内共享变异位点。在 93 个个体的 118 个序列中共检出 63 种基因型。群体间

RZ2fGGTCCTTGG AGTTTACTCC AAC-GACGGT TCCTACGAGT TTAATAGTTG ATGTTTCTC GCC
RZ3aC..T.....T.....C.....
RZ3cT.....G.....T.....
RZ3dT.....G.....TT..C
RZ6aT.....G.....T.....
RZ9aC..T.....A.....T.....
RZ10aA.AC..TA.C..T.....TT..C.....C.....
RZ10bT.....T.....
RZ11aT.....G.....TT..C.....
RZ13aA.AC..TA.C..T.....A.....TT..C.....C.....
RZ14aT.....G.....T.....
SD0G..T.....G.....T.....
LYG1bA.....T.....T.....T.....
LYG1xA.AC..TA.C..T.....T.....AC.....
LYG2aA.AC..TA.C..T.....T.....C.....A.....
LYG2bT.....G.....T.....
LYG2GT.....T.....C.....T.....
LYG5aA.....T.....G.....T.....
LYG7aT.....T.....T.....G.....
LYG8aA.AC..TA.C..T.....TT..AC.....
LYG13aT.....G.....T.....
LYG17bA.AC..TA.C..T.....TT..AC.....
QD1aT.....G.....T.....C.....T.....
QD3aA.AC..TA.C..T.....A.....TT..C.....C.....
QD3cT.....G.....T.....A.....T.....
QD3fA.AC..TA.C..T.....A.....TT..C.....A.....
QD5aT.....G.....T.....C.....
QD5bT.....G.....TT..AC.....
QD10aCG..T.....A.....T.....C.....
QD11aT.....G.....T.....GC.....
QD12cT.....G.....TT.....
QD12eT.....T.....
J50T.....
CL4a	...TG..T..CTA CTG..CG..T..T..TG..-..A..G..T..TT..C..C..A..GT..-..AA..GC..-..AC..GC..
CL6a	...TG..T..CTA CTG..CG..T..T..TG..-..A..G..T..TT..C..C..ACGT..-..AA..GC..-..GC..
CL9a	...G..-..T..T..TG..-..A..G..TC..TT..C..C..ACGT..-..AA..GC..-..GCC..
CL13c	...G..-..T..TG..-..A..G..TC..TT..C..C..A..GT..G..-..AA..GC..-..GC..
CL11d	...A.....G..-..T..T..TG..-..A..G..T..CT..-..C..C..A..GT..-..AA..GC..-..GC..
CL11h	...A.....G..-..T..T..TG..-..A..G..T..CT..-..C..A..GT..-..AA..GC..-..GC..
CL13a	...TG..T..CTA CTG..CG..-..T..T..TG..-..A..G..T..TT..C..C..ACGT..-..AA..GC..-..GC..A..
CL11c	...TG..T..CTA CTG..CG..-..T..T..TG..-..A..G..T..CT..-..C..A..GT..-..AA..GC..-..GC..
CL13d	...TG..T..CTA CTG..CG..-..T..T..TG..-..A..G..T..TT..C..C..ACGT..-..AA..GC..-..GC..
CL13h	...TG..T..CTA CTG..CG..-..T..T..TG..-..A..G..T..TT..C..C..ACGT..-..AA..GC..-..GC..
CL14b	...TG..T..CTA CTG..CG..C..T..T..TA..-..A..G..T..TT..C..C..A..GT..-..AA..GC..-..GC..
CL15a	...TG..T..CTA CTG..CG..C..T..T..TG..-..A..G..T..TT..C..C..ACGT..-..AA..GC..-..GC..
CL15c	...TG..T..CTA CTG..CG..C..T..T..TG..-..A..G..T..TT..C..C..ACGT..-..AA..GC..-..GC..
CL17a	...TG..T..CTA CTG..CG..C..T..T..TG..-..A..G..T..TT..C..C..ACGT..-..AA..GC..-..GC..
CL0	...TG..T..CTA CTG..CG..-..T..T..TG..-..A..G..T..TT..C..C..ACGT..-..AA..GC..-..GC..
SH0	...TG..T..CTA CTG..CG..-..T..T..TG..-..A..G..T..TT..C..C..A..GT..G..-..AA..GC..-..GC..
BH1aG.....T.....
BH1eG.....T.....C.....GC.....
BH2hT.....
BH4aG.....T.....
BH5aT.....
BH5eT.....I.....G.....T.....
BH6aA.AC..TA.C..T.....TT..AC.....
BH6bT.....G.....T.....
BH6dT.....G.....TT.....
BH10aA.AC..TA.C..T.....TT..AC..G.....
BH12aA.AC..TA.C..T.....T.....
BH13aT.....G.....T.....G.....
BH14aT.....T.....T.....T.....

图 1 5 个群体西施舌 ITS1 核苷酸简约信息位点比对

Fig. 1 The parsim-informative sites alignment of the ITS1 nucleotide obtained from five stocks of *Coelomactra antiquata*
RZ: 日照群体, LYG: 连云港群体, QD: 启东群体, CL: 长乐群体,
BH: 北海群体

共享基因型很少(只有2个),基因型LYG5a由连云港和日照2个群体共享,QD10a由启东群体和日照群体共享,其余基因型为群体特有。

2.2 遗传变异分析

根据西施舌个体所处的地理位置,将5个群体划分为黄海组(包括RZ、LYG和QD群体),东海、北部湾组(包括CL、BH群体)2个组。运用分子方差分析法(AMOVA)估算2个组间、5个群体间和群体内部的遗传变异成分、群体结构和变异来源,具体结果见表2。AMOVA分析结果显示,西施舌群体内及组内群体间均有很高的遗传变异,总变异的贡献主要来源于群体内和组内群体间,前者占总变异的41.80%,后者占40.69%。并且CL群体与其他4个群体间发生了极大的遗传分化($F_{ST} = 0.670 - 0.702, P < 0.001$) (表3)。但是,RZ、LYG、QD和BH4个群体间的遗传分化较弱($F_{ST} = 0.020 - 0.064$) (表3)。为进一步分析种群间的遗传差别,使用NJ法构建种群间的相对遗传距离矩阵(表3)。从表3可以看出,群体间遗传距离在0.74%—3.38%之间,CL群体与LYG、QD、RZ和BH群体间的遗传距离为3.17%—3.38%,而LYG、QD、RZ和BH群体之间的遗传距离只有0.74%—1.03%。群体内遗传距离为0.72%—1.06。西施舌BH群体在地理位置上与长乐群体近,而与黄海海域西施舌距离远,但是,ITS1资料显示BH群体与黄海海域的LYG、QD、RZ群体亲缘关系近,未表现出遗传分化。

表2 西施舌群体遗传变异的分子方差分析(AMOVA)

Table 2 AMOVA analysis of genetic variation in stocks of *Coelamactra antiquata*

遗传变异来源 Source of variation	方差和 Sum. of squares	遗传变异元素 Variance components	占总变异的百分比/% Percentage of variation	显著性检验 P
组间 Among groups	184.380	1.52916 Va	17.51	=0.3900
组内种群间 Among stocks within group	255.241	3.55275 Vb	40.69	<0.001
种群内 Within stocks	416.068	3.64972 Vc	41.80	<0.001
合计 Total	855.689	8.73163	100	

表3 西施舌5个群体间的相对遗传距离和 F_{ST} 显著性检验

Table 3 Pairwise distance matrix of ITS1 sequences among 5 *C. antiquata* stocks and F_{ST} significance check

群体 Stock	RZ	LYG	QD	CL	BH
日照 RZ	—	0.00845	0.00874	0.03171	0.00739
连云港 LYG	0.05828	—	0.01030	0.03380	0.00874
启东 QD	0.02024	0.06381	—	0.03361	0.00922
长乐 CL	0.67032 ***	0.67633 ***	0.70151 ***	—	0.03248
北海 BH	0.04151	0.06345	0.06000	0.69192 ***	—

注:对角线下的数字为 F_{ST} 值;***表示差异极显著($P < 0.001$);对角线上为相对遗传距离

2.3 系统发育分析

根据不同基因型之间的遗传距离,以蛤蜊科的中国蛤蜊(*Mactra chinensis* Philippi, Mch)(登录号:DQ132790)为外群,构建西施舌5个不同地理群体的NJ分子系统树(图2)和ML树,NJ树上各分支上的数字代表1000次Bootstrap统计分析后对该支的支持百分比(即置信度)。NJ树和ML树均聚为三大分支,CL群体的23个个体(17种基因型)以较高置信度(85%)聚成一支,另外的RZ、LYG、QD和BH4个群体的46种基因型聚成另一大支,外群的中国蛤蜊为第三支。由图2可见,CL群体以外的4个群体中同一个地理区域的群体并未聚成一支,4个群体的基因型在聚类时交叉重叠。ITS1序列的相似性与群体间的地理分布相关性不完全一致,西施舌BH群体与黄海群体相距甚远,但ITS1资料显示没有明显遗传分化。

3 讨论

3.1 西施舌ITS1序列特点

西施舌ITS1序列存在种内个体间长度多态性。本研究发现5个群体西施舌ITS1序列存在两种类型,分

别命名为 S 型和 L 型。S 型 ITS1 序列长度为 814—817bp, L 型的长度为 833—843bp。L 型序列在 5 个群体中均有分布。S 型序列只分布于长乐群体的部分个体中, 属长乐群体特征性序列。在西施舌的 ITS1 序列中, 缺失/插入位点丰富(1—19 个不等), 这是导致序列长度多态性的主要原因。最长的连续缺失/插入序列达 19bp; 西施舌 ITS1 核苷酸变异频率高。核苷酸变异位点占比对位点的 18.3%, 可为种内群体间遗传分析提供丰富的信息; 西施舌 ITS1 序列在个体内存有变异性。在西施舌 5 个群体的 93 个个体中, 共有 63 种基因型。其中, 有 13 个个体作了多克隆测序, 共测序 32 个, 同一个体测序 2—4 个不等。同一个体最多有 4 种基因型, 包括 S 型和 L 型两种类型序列。本研究发现西施舌 ITS1 序列存在协同进化不完全现象。

核糖体 rRNA 基因内转录间隔区(包括 ITS1 和 ITS2)由于在真核生物体内具有多拷贝性以及协同进化, 因而序列高度一致, 一般情况下分析时无需考虑不同拷贝之间的差异^[16]。但随着研究的广泛和深入, 基因组内多态性(intragenomic polymorphisms IGPs)在很多生物中陆续报道, 如在罗非鱼^[16]、淡水螯虾^[17]、石鲽鱼^[18]、虎甲虫^[19]、海绵动物^[20]、涡虫^[21]等生物中都存在。本文发现在西施舌 5 个群体内明显存在长度不同的两类 ITS1, 这种差异是等位基因间的差异还是不同拷贝间的差异, 或是二者兼而有之, 有待进一步研究。罗非鱼 ITS1 的 PCR 扩增产物电泳图谱提示这种现象很可能来自不同拷贝间^[16]。这提醒我们今后作 ITS1 分析时应该考虑测定多个克隆。虽然西施舌 ITS1 存在 IGPs 现象, 本研究发现, 在聚类分析中, 长乐西施舌仍然聚在一起, 这与孔令锋的形态学和同功酶^[3]、AFLP^[4]、AFLP 与 16S rRNA 基因^[5]研究结果一致, 从这个角度看, ITS1 的 IGPs 现象对西施舌群体系统发生分析结果影响不大。

3.2 群体遗传关系分析

群体遗传学认为, F_{ST} 值可以表示群体间的遗传分化程度, 一般 F_{ST} 值在 0.00—0.05 之间表示分化较弱, 在 0.25 以上表示遗传分化极大^[15]。西施舌 CL 群体与 RZ、LYG、QD 和 BH 群体间的 F_{ST} 值为 0.670—0.702(表 3), 说明长乐群体发生了极大的遗传分化。除长乐群体以外的 4 个群体间的 F_{ST} 值为 0.020—0.064, 可见这 4 个群体间的遗传分化较弱或只有中度分化。西施舌 4 个群体(山东日照、即墨, 江苏启东, 福建长乐)贝壳形态结构的主成分分析结果显示, 在第一区别函数和

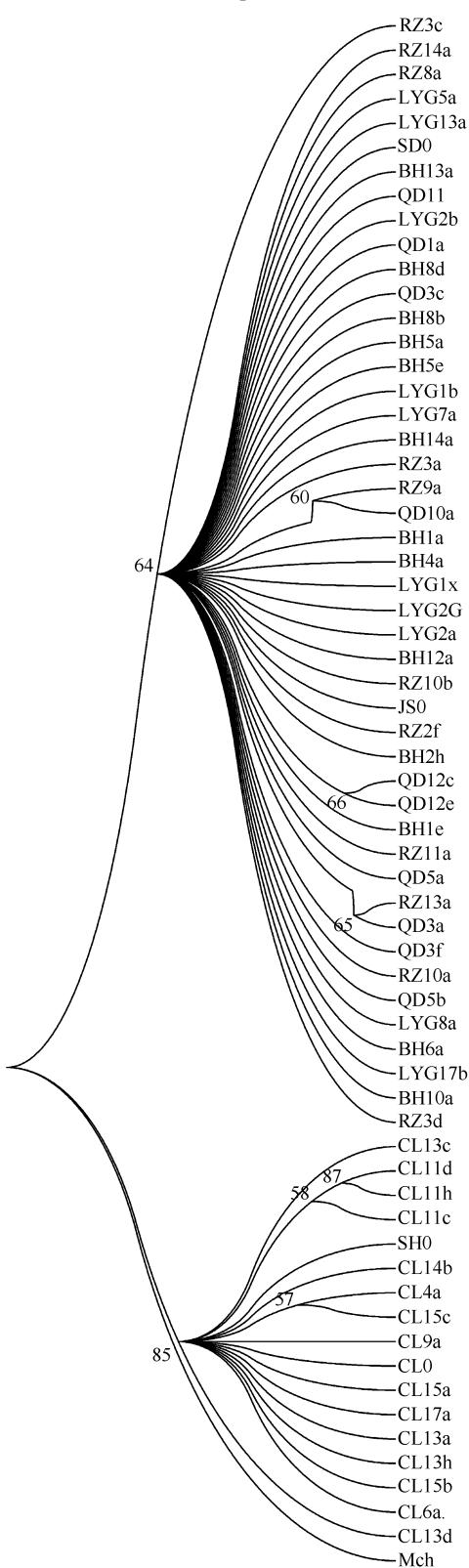


图 2 西施舌 ITS1 序列基因型 NJ 树

Fig. 2 NJ tree of based on ITS1 Genotype of *C. antiquata*
RZ: 日照群体, LYG: 连云港群体, QD: 启东群体, CL: 长乐群体,
BH: 北海群体, SD0、JS、SH0、CL0: GenBank 下载序列, Mch: 外群

第二区别函数可完全把 CL 群体与其它 3 个北方群体分开^[3]; AFLP 分析结果显示, 西施舌北方群体(山东胶南)和南方群体(福建长乐、漳州)存在明显遗传差异($F_{ST} = 0.696\text{--}0.746$)^[4]; 16S rRNA 基因片段分析显示, 南(长乐、漳州)、北(即默、胶南、日照、启东)方西施舌遗传分化大($F_{CT} = 0.959$, $P < 0.046$)。本研究结果显示长乐群体与 3 个北方群体(山东日照、江苏连云港和启东)和 1 个南方群体(广西北海)有明显的遗传差异(遗传距离为 0.032—0.034), 长乐群体显示极显著的遗传分化($F_{ST} = 0.670\text{--}0.702$, $P < 0.001$)。鉴于本研究的研究结果, 加之已有的研究证据, 长乐群体已经形成具有明显遗传结构的地理种群。

有趣的是广西北海地理位置相对封闭, 北部湾与黄海间有南海、东海相隔, 但西施舌 BH 群体与黄海的 3 个群体(RZ、LYG 和 QD 群体)遗传分化很弱。这说明北部湾西施舌在进化过程中与黄海西施舌存在正常的基因交流现象, 或通过人工运输等方式发生了基因交流, 其基因交流的方式有待进一步研究。黎中宝^[6]同功酶研究结果认为广西群体与福建群体的遗传关系近, 与启东群体的遗传关系远, 尤仲杰的 RAPD 分析结果显示广西群体形成了独立的种群, 或与福建群体的遗传关系近^[7], 这与本研究结果不一致, 林昕的 ITS1 分析结果认为长乐西施舌未形成一个独立的种^[8], 孔令锋的研究结果^[3-5]显示长乐群体形成了独立的种群, 或许是一个同形种。遗憾的是孔令锋和林昕的研究中无广西北海的样本。因此, 我国西施舌广西群体的系统发育关系到目前为止还没有完全明朗, 需要更多的分子标记研究结果校正。但本研究结果显示广西群体与北方群体亲缘关系近, 与长乐群体亲缘关系远。

3.3 长乐群体遗传分化原因分析

本研究结果显示西施舌长乐群体发生了明显的遗传分化, 说明长乐群体与其他群体间存在基因交流的屏障。孔令锋认为黄海与东海间的长江入海口注入的淡水可能是西施舌幼虫扩散的主要屏障。因为在每年的 5—10 月份(此时正是西施舌繁殖季节)从此入海口注入大海的长江水占全年的 71.7%, 形成很宽的低盐带, 造成北方和南方(长乐)西施舌幼虫相互扩散的障碍。此外, 每年 5—10 月份浙江沿岸的强上升流也限制了西施舌幼虫北方群体和长乐群体的扩散, 阻断了南北方西施舌基因交流^[3]。在每年的 6—8 月份, 台湾海峡中、北部西侧近岸海区存在上升流现象, 与上升流现象有关的近表层低温、高盐现象出现在海坛岛附近海区^[22], 此时正是西施舌繁殖季节, 低温、高盐可能不利于西施舌幼虫的扩散。福建位于台湾海峡的北部, 末次冰期以来的海陆变迁影响海峡两岸生物的分布格局^[23]。台湾岛自出露海平面起曾出现多次与大陆陆地相接或间断的过程。此地理演变过程营造了福建沿海特殊的海洋地理环境, 这也为西施舌长乐种群的形成提供了特殊的环境。使长乐西施舌形成了一个遗传特性明显区别于其它群体的特殊种群。

References:

- [1] Meng X P, Gao R C, Dong Z G, Cheng H L, Yan B L. Analysis and evaluation of nutritive composition in edible part of *Coelomactra antiquata*. Marine Sciences, 2007, 31(1): 17-22.
- [2] Chen J G, Chen L X, Wu J F, Zhang H H, Cheng S W. The artificial cultivation status and prospect for culture development foreground of *Coelomactra antiquata*. Fisheries Science and Technology, 2006, (3): 4-8.
- [3] Kong L F, Li Q, Qiu Z X. Genetic and morphological differentiation in the clam *Coelomactra antiquata* (Bivalvia: Veneroida) along the coast of China. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2007, 343(1): 110-117.
- [4] Kong L F, Li Q. Genetic comparison of cultured and wild populations of the clam *Coelomactra antiquata* (Spengler) in China using AFLP markers. Aquaculture, 2007, 271(1/4): 152-161.
- [5] Kong L F, Li Q. Genetic evidence for the existence of cryptic species in an endangered clam *Coelomactra antiquata*. Marine Biology, 2009, 157(7): 1507-1515.
- [6] Li Z B, Wang Z L, Zhang G L, Chen J, Zhao B L, Wu N, Lin X Y. Genetic diversity and differentiation of *Coelomactra antiquata* (spengler) population. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2009, 40(3): 302-306.
- [7] You Z J, Bao Y B, Zhang A J. Morphological and RAPD variation among five populations of *Coelomactra antiquata*. Acta Oceanologica Sinica, 2007, 29(3): 98-104.
- [8] Lin X, Liang J R, Gao Y H, Wang P, Du Q, Li Z H. The analysis of ITS-1 sequence of *Coelomactra antiquata* the three Locations in China. Life Science Research, 2008, 12(1): 14-19.
- [9] Wang J J, Li J L, Wang G L, Bai Z Y. Sequence variation of ribosomal DNA internal transcribed spacer 1 of *Hyriopsis cumingii* from the five

- freshwater lakes of China. *Journal of Lake Science*, 2008, 20(2): 208-214.
- [10] Ding X L, He M X, Deng F J, Zhang X Y. 18S-ITS1 Sequence of rRNA in bivalves and its application in phylogenetic analysis. *Hereditas*, 2004, 26(3): 319-324.
- [11] Wu Q, Pan H T, Pan B P. Analysis of genetic diversity in populations of two commercial species of *Mercenaria mercenaria* and *Cyclina sinensis* (Bivalvia Veneridae) Based on ITS-1 Sequence. *Journal of Tianjin Normal University: Natural Science*, 2007, 27(1): 20-23.
- [12] Lin Z H, Huang X T, Dong Y H, Bao Z M, Hu J J. Analysis of *Meretrix* clams from guangxi based on fAFLP markers and its sequences. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2009, 40(1): 33-41.
- [13] Cheng H L, Xia D Q, Wu T T, Meng X P, Ji H J, Dong Z G. Study on Sequences of ribosomal DNA internal transcribed spacers of Clams Belonging to the Veneridae Family (Mollusca:Bivalvia). *Acta Genetica Sinica*, 2006, 33(8): 702-710.
- [14] Wood A R, Apté S, MacAvoy E S, Gardner J P A. A molecular phylogeny of the marine mussel genus *Perna* (Bivalvia: Mytilidae) based on nuclear (ITS1&2) and mitochondrial (COI) DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2007, 44(2): 685-698.
- [15] Yuan Y, Gao W W, Wu Q, Pan B P. Genetic variation and structure of *Cyclina sinensis* populations in the yellow and bohai sea of China, *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2008, 39(6): 665-670.
- [16] Chen X F, Li H X, Yu J H, Tang Y K, Li J L. Analysis on sequences of ribosomal DNA internaltranscribed spacers of *Oreochromis aureus* and *O. niloticus*. *Chinese Journal of Zoology*, 2009, 44(2): 92-96.
- [17] Harris D J, Crandall K A. Intrageneric variation within ITS1 and ITS2 of freshwater crayfishes (Decapoda: Cambaridae): implications for phylogenetic and Microsatellite studies. *Molecular Biology and Evolution*, 2000, 17(2): 284-291.
- [18] Xu J P, Zhang Q Q, Xu X F, Wang Z G, Xu X F. Intrageneric variability and pseudogenes of ribosomal DNA in Stone flounder *Kareius bicoloratus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2009, 52(1): 157-166.
- [19] Vogler A P, De Salle R. Evolution and phylogenetic information content of the ITS1 region in the tiger beetle, *Cicindela dorsalis*. *Molecular Biology and Evolution*, 1994, 11(3): 393-4051.
- [20] Wörheide G, Nichols S A, Goldberg J. Intrageneric variation of the rDNA internal transcribed spacers in sponges (Phylum Porifera): implications for phylogenetic studies. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2004, 33(3): 816-830.
- [21] Carranza S, Giribet G, Ribera C, Baguñà J, Riutort M. Evidence that two types of 18S rDNA coexist in the genome of *Dugesia* (Schmidtea) mediterranea (Platyhelminthes, Turbellaria, Tricladida). *Molecular Biology and Evolution*, 1996, 13(6): 824-832.
- [22] Huang R X. Upwelling in middle and north Taiwan strait. *Transaction of Oceanology And Limnology*, 1989, (4): 8-12.
- [23] Chen Y F, Chen Y Y, He D K, Sui X Y. Current status and perspective of biogeography study in Taiwan strait, China. *Chinese Journal of Zoology*, 2006, 41(1): 118-122.

参考文献:

- [1] 孟学平,高如承,董志国,程汉良,阎斌伦.西施舌营养成分分析与评价. *海洋科学*, 2007, 31(1): 17-22.
- [2] 陈健光,陈利雄,吴进锋,张汉华,陈素文. 西施舌的人工育苗现状及养殖发展前景展望. *水产科技*, 2006, (3): 4-8.
- [6] 黎中宝,王展林,张桂玲,陈锦,赵斌丽,吴宁,林小云. 西施舌(*Coelomactra antiquata*)群体遗传多样性与分化的研究. *海洋与湖沼*, 2009, 40(3): 302-306.
- [7] 尤仲杰,包永波,张爱菊. 中国沿海西施舌5个自然群体形态差异和RAPD分析. *海洋学报*, 2007, 29(3): 98-104.
- [8] 林昕,梁君荣,高亚辉,王鹏,杜琦,李振华. 3个地区西施舌的ITS-1基因片段序列分析. *生命科学研究*, 2008, 12(1): 14-19.
- [9] 王建军,李家乐,汪桂玲,白志毅. 我国五大湖三角帆蚌群体ITS-1序列变异分析. *湖泊科学*, 2008, 20(2): 208-214.
- [10] 丁小雷,何毛贤,邓凤姣,张锡元. 双壳纲动物核糖体RNA 18S-ITS1序列及其在分子系统发育研究中的应用. *遗传*, 2004, 26(3): 319-324.
- [11] 吴琪,潘鹤婷,潘宝平. 帘蛤科两种经济贝类种群的ITS-1序列遗传多样性分析. *天津师范大学学报(自然科学版)*, 2007, 27(1): 20-23.
- [12] 林志华,黄晓婷,董迎辉,包振民,胡景杰. 广西文蛤(*Meretrix*)的fAFLP及ITS分析. *海洋与湖沼*, 2009, 40(1): 33-41.
- [15] 袁媛,高玮玮,吴琪,潘宝平. 黄、渤海地区青蛤(*Cyclina sinensis*)种群的ITS序列遗传变异与遗传结构分析. *海洋与湖沼*, 2008, 39(6): 665-670.
- [16] 陈雪峰,李红霞,俞菊华,唐永凯,李建林. 奥利亚罗非鱼与尼罗罗非鱼rDNA内转录间隔区序列特征. *动物学杂志*, 2009, 44(2): 92-96.
- [22] 黄荣祥. 台湾海峡中、北部海域的上升流现象. *海洋湖沼通报*, 1989, (4): 8-12.
- [23] 陈毅峰,陈宜瑜,何德奎,隋晓云. 台湾海峡两岸生物地理学现状与展望. *动物学杂志*, 2006, 41(1): 118-122.