

DOI: 10.5846/stxb201306091547

孟学平, 申欣, 屠海森, 朱笑琳, 赵娜娜, 程汉良, 阎斌论. 基于 *nad5* 的西施舌漳州群体遗传分化水平分析——以蛤蜊属 2 个物种差异水平为参照. 生态学报, 2015, 35(8): 2635-2642.

Meng X P, Shen X, Tu H M, Zhu X L, Zhao N N, Cheng H L, Yan B L. The genetic differentiation analysis on *Coelomactra antiquata* Zhangzhou populations based on *nad5*: taking that of two *Macra* species as a reference. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(8): 2635-2642.

基于 *nad5* 的西施舌漳州群体遗传分化水平分析 ——以蛤蜊属 2 个物种差异水平为参照

孟学平^{1,*}, 申 欣¹, 屠海森¹, 朱笑琳¹, 赵娜娜^{1,2}, 程汉良¹, 阎斌论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 南京农业大学资源与环境科学学院, 江苏省海洋生物重点实验室, 南京 210095

摘要: 扩增了西施舌日照、连云港、北海、漳州 4 个野生群体、四角蛤蜊和中国蛤蜊各 1 个群体共 73 个样本的 *NAD5* 基因片段, 测序获得了 480bp 核苷酸序列, 分析核苷酸的多态性, 旨在评估福建漳州西施舌与日照、连云港、北海西施舌之间的分化水平。结果: 从 73 个序列中共检测到 44 种单倍型 (Hap), 其中西施舌 4 个群体有 29 种 Haps, 四角蛤蜊和中国蛤蜊分别有 10 种和 5 种 Haps, 漳州群体与北海、日照、连云港群体单倍型有明显差异; 将西施舌分为北海、日照、连云港组 (GP1) 和漳州组 (GP2) 2 个组, 分析核苷酸差异, GP1 与 GP2 间的 T、A、G 含量差异极显著 ($P < 0.01$)。GP1 与 GP2 间的遗传距离与组内 (GP1、GP2) 遗传距离之比为 25.1—41.8, 四角蛤蜊与中国蛤蜊之间的遗传距离与种内个体间遗传距离之比为 24.4—36.7, GP1、GP2 间的差异达到了四角蛤蜊和中国蛤蜊种间差异水平, 而日照、北海群体间的遗传距离只有 0.009, 北海与日照群体地理位置虽远, 但遗传差异则很小; AMOVA 分析显示漳州西施舌发生了极显著遗传分化 ($F_{ST} = 0.966—0.978$, $P < 0.01$)。

关键词: 西施舌; 四角蛤蜊; 中国蛤蜊; *nad5*; 差异

The genetic differentiation analysis on *Coelomactra antiquata* Zhangzhou populations based on *nad5*: taking that of two *Macra* species as a reference

MENG Xueping^{1,*}, SHEN Xin¹, TU Haimiao¹, ZHU Xiaolin¹, ZHAO Nana^{1,2}, CHENG Hanliang¹, YAN Binlun¹

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

² Key Laboratory of Marine Biology of Jiangsu Province, College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: Class Bivalvia is a group of marine and freshwater molluscs with laterally compressed bodies enclosed by a shell in two hinged parts. Bivalves have been an important source of food for humans. Clams, oysters, ark clams, scallops, cockles and mussels are the most commonly consumed kinds of bivalve, and are eaten raw or cooked. Mactridae, also known as trough shells or duck clams, is an important family of marine bivalve clams of the order Veneroida. Mactridae currently includes about 350 recognized species distributed in the world. *Coelomactra antiquata* (Bivalvia: Veneroida: Mactridae) was widely distributed along the Chinese coast, north to Dalian city (Liaoning province) and south to Beihai city (Guangxi province), which was most abundant in Fujian province 20 years ago. *C. antiquata* is one of the valuable and a promising

基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (BK20131210); 江苏高校优势学科建设工程资助项目; 江苏省海洋生物技术重点实验室开放课题 (2011HS009, 2009HS13); 国家自然科学基金 (40906067); 江苏省“青蓝工程”人才基金 (苏教师[2010]27 号); 中央财政支持地方高校发展专项资金资助 (CXTD01, CXTD04); 江苏省海洋资源开发研究院科技开放基金 (JSIMR11B19); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD)

收稿日期: 2013-06-09; **网络出版日期:** 2014-05-16

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: mxp2002@hotmail.com

new candidate for aquaculture, and it had been ranked as critically endangered species in China. The research results from morphology and molecular (nuclear DNA and mitochondrial DNA sequences) showed that Fujian (Zhangzhou and Changle) *C. antiquata* undergone significant differentiation, and it may be a subspecies of *C. antiquata* or a cryptic species. Comparative mitochondrial genomic analyses also showed that the differentiation between the Zhangzhou (zz-) and Rizhao (rz-) mtDNA reached the species level. The data above mentioned provide an important background to determine the taxonomic status of Zhangzhou *C. antiquata*. However, the evidences to determine the taxonomic status based on the current data are insufficient. The variation of NADH dehydrogenase subunit 5 gene (*nad5*) is larger than 16S rRNA gene and cytochrome oxidase subunit 1 gene, the *nad5* differences among different populations can provide more convincing evidence for identifying the differentiation level of Fujian *C. antiquata*. In this study, NAD5 gene fragments of 73 samples were amplified, including four wild populations of *C. antiquata* (Rizhao, Lianyungang, Beihai and Zhangzhou) and each population of two *Macra* species (*M. veneriformis* and *M. chinensis*). Then sequenced and 480bp nucleotide sequences of each sample were obtained. Single Nucleotide Polymorphism (SNP) analyses were done to assess the difference level between Zhangzhou and non-Zhangzhou (Rizhao, Lianyungang and Beihai) *C. antiquata*. Results: A total of 44 haplotypes (Haps) were detected from 73 sequences, including 29 Haps from *C. antiquata* four populations, 10 Haps from *M. veneriformis* and five ones from *M. chinensis*. There are significant different haplotypes between Zhangzhou and non-Zhangzhou groups. Four *C. antiquata* populations were divided into two groups: non-Zhangzhou group (GP1) and Zhangzhou group (GP2). There are significantly different ($P < 0.01$) on the content of T, A, G between GP1 and GP2. The ratio of intergroup (between GP1 and GP2) and intragroup (GP1 or GP2) nucleotide differences is 25.1—41.8. The ratio of interspecies and intraspecies (*M. chinensis* and *M. veneriformis*) differences is 24.4—36.7. Difference between GP1 and GP2 reaching the interspecies differences level of *M. veneriformis* and *M. chinensis*. The genetic distance among Rizhao, Lianyungang and Beihai populations is ranging between 0.009 and 0.012. AMOVA analysis shown that Zhangzhou *C. antiquata* undergone significantly high genetic differentiation ($F_{ST} = 0.966—0.978$, $P < 0.01$). This study suggests that Fujian Zhangzhou *C. antiquata* have already differentiated into a new species.

Key Words: *Coelomactra antiquata*; *Macra veneriformis*; *Macra chinensis*; *nad5*; difference

西施舌广泛地分布于中国沿海,北至辽宁大连,南到广西北海,20年前,福建西施舌产量最多。西施舌是一种珍奇的重要渔业资源,在我国已属于濒危物种^[1]。来自形态学^[1-2]、核DNA^[3]和线粒体基因组部分序列^[4-6]等分子生物学的资料均显示中国福建(漳州、长乐)西施舌发生了明显的分化,是西施舌的亚种或隐种;来自线粒体全基因组的比较基因组学资料也显示漳州西施舌与日照西施舌发生了明显的分化,使其与其它群体的差异达到了亚种或种间差异水平^[7-9]。目前的资料为福建西施舌分类地位的重新确定提供了重要的依据,但是,就现有的研究结果,要确定福建西施舌是西施舌的亚种或腔蛤属(*Coelomactra*)的新种,资料尚显不足。线粒体DNA编码的基因保守性不同,在群体遗传差异分析中的解析力也不同。NADH脱氢酶亚基5基因(*nad5*)在双壳类中相对保守,但较核糖体16S rRNA基因(16S rRNA)、细胞色素c氧化酶亚基1基因(*cox1*)变异稍大,更能显示群体变异水平。本研究基于*nad5*核苷酸序列分析中国西施舌4个代表性自然群体遗传差异,同时以蛤蜊科(Mactridae)蛤蜊属(*Macra*)的中国蛤蜊(*Macra chinensis*)和四角蛤蜊(*Macra veneriformis*)间、双壳类部分属内不同物种间*nad5*差异水平为参照,对福建西施舌分化水平的界定可提供更有说服力的证据,研究结果对西施舌种质资源的保护和可持续利用及良种选育具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验用样本73个,其中西施舌55个,分别采自福建漳州(14个)、连云港(9个)、山东日照(20个)和广

西北海(12 个)沿海;中国蛤蜊(8 个)采自山东日照;四角蛤蜊(10 个)采自江苏连云港海域。样本经鉴定后,取闭壳肌 75%乙醇固定备用,或用新鲜组织直接提取 DNA。

1.2 DNA 提取及 PCR 扩增

取乙醇保存的或新鲜组织,用 SDS、蛋白酶 K 裂解组织,用酚-氯仿法抽提蛋白质,乙醇沉淀获得总 DNA。将日照^[9]、漳州西施舌、中国蛤蜊和四角蛤蜊 *nad5* 核苷酸序列用 Clustalx 软件进行比对,根据相对保守区,设计兼并引物,Thm-4S-ND5F: GRG AGT CNT AYT CYG CTG G;Thm-4S-ND5R:TGA ACR CCV CCW CTR CAM GC。PCR 体系 25 μ L,模板 20—50 ng,dNTP(10 mmol/dm³ each)0.5 μ L,Taq DNA 聚合酶 [D0090,生工生物工程(上海)股份有限公司(上海生工)] 0.3 μ L(5U/ μ L),95℃预变性 5 min 后,进行 35 个循环扩增:94℃变性 45 s,52—55℃退火 30 s,72℃延伸 1 min。循环结束后,72℃延伸 10 min。

1.3 PCR 产物测序及序列比对分析

PCR 产物经 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测后,送上海生工进行双向测序。PCR 产物经切胶回收,在 ABI 公司的 3730xl DNA Analyzer 测序仪上测序,试剂为 BigDye terminator v3.1。

利用 DNASTar 软件包中的 SeqMan 软件对序列进行组装拼接,用看图软件 Chromas 分析测序峰图,用人工的方法对序列进行校对;查找、切除引物序列,获得用于比对分析的 *nad5* 片段核苷酸序列;用 SPSS 17.0 进行碱基含量差异显著性分析;用 DnaSP v5.1 软件进行单倍型确定;用 Clustalx 进行序列对位排列,MEGA4.0 进行核苷酸序列差异分析;统计变异位点、简约信息位点,根据 K2-P (Kimura 2-parameter)计算遗传距离,用邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统进化树,系统树节点处自举置信水平用 bootstrap 估计,验证次数设置为 1000;用 Arlequin ver 3.1 进行分子方差分析(AMOVA),群体间遗传分化指数(F_{ST})计算采用 pairwise difference 模型。

1.4 双壳类 4 个属属内种间遗传距离分析

从 GenBank 下载双壳类(Bivalve)巨蜆属(*Crassostrea*)8 个种、贻贝属(*Mytilus*)4 个种、竹蛏属(*Solen*)2 个种、文蛤属(*Meretrix*)2 个种线粒体全基因组,从中析出 *nad5* 全序列,截取与本研究扩增序列的同源部分,计算属内种间的遗传距离(K2-P),作为漳州西施舌与非漳州西施舌差异水平判断的参照。物种拉丁文、GenBank 序列号见表 5 及本文讨论部分。

2 结果

2.1 *nad5* 序列核苷酸含量差异分析

本研究共获得西施舌日照、连云港、北海、漳州群体,中国蛤蜊日照群体、四角蛤蜊连云港群体 *nad5* 序列 73 条,拼接后去除引物序列、两端取齐后得到 480 bp 的 DNA 片段,用于序列比对与分析。

西施舌 4 个群体共 55 条 *nad5* 片段,各群体 *nad5* 碱基 T、C、A、G 平均含量(%)如表 1,由表 1 可见漳州西施舌碱基 T 和 A 的含量极显著低于其它 3 个群体($P<0.01$),G 含量显著高于其它 3 个群体,C 含量 4 个群体差异不显著。而北海、日照和连云港群体间 4 种碱基含量差异均不显著($P>0.05$)。四角蛤蜊/中国蛤蜊共 18 条序列,其 T、C、A、G 平均含量(%)分别为 46.27/42.24、13.94/15.68、20.65/20.86、19.15/21.22,AT 含量为 66.92/63.10,其中 T、A 和 G 含量(%)差异极显著($P<0.01$),A 含量差异不显著($P>0.05$)。

表 1 西施舌 4 个群体 *nad5* 核苷酸差异分析

Table 1 Nucleotide differentiation analysis on *nad5* of *Coelomactra antiquata* four populations

群体 Population	碱基含量 Base percentage/%			
	T	C	A	G
北海	42.3 aA	14.0 aA	22.8 aA	20.9 bB
日照	42.3 aA	14.0 aA	22.7 aA	21.1 bB
连云港	42.2 aA	14.1 aA	22.7 aA	21.0 bB
漳州	40.8 bB	14.0 aA	20.1 bB	25.1 aA

小写字母表示在 0.05 水平上差异显著;大写字母表示在 0.01 水平上差异显著

2.2 序列比较分析

序列经 DnaSP 分析,从 73 个序列中共检测到 44 种单倍型(Hap) (表 2),其中西施舌有 29 种 Haps,四角蛤蜊 10 种,中国蛤蜊 5 种;西施舌中,漳州群体有 5 种 Haps,日照群体 15 种,连云港群体 8 种,北海群体 3 种。其中 Hap2 由连云港群体和北海群体共享,Hap21 由连云港群体和日照群体共享,漳州群体与其它 3 个群体无共享单倍型。44 种 Haps 序列比对共获得 480 个比对位点,无插入/缺失碱基,西施舌 4 个群体 29 个 Haps 变异位点(V)122 个,占 25.4%,简约信息位点(Pi)108 个(图 1),占 22.5%,北海、日照、连云港群体合并计算,V 位点 39 个,占 8.1%,Pi 位点 14 个,占 2.9%;中国蛤蜊和四角蛤蜊共有 V 位点 99 个,占 20.6%,Pi 位点 91 个(图 1),占 19.0%;3 种贝类合并计算,V 位点 197 个,Pi 位点 191 个,分别占 41.0%和 39.8%。

西施舌	
	11111111 1111111111 1111111111 1222222222 2222222222 3333333333 3333333333 3333444444 44444444
	2233333455 6788889999 9900000011 1222333335 5567777899 9000112333 4555567790 0000011223 3334566788 9999001112 3334444777
	6474679549 3815703456 7823467814 7367023580 3921478025 8147035157 8256844580 1237925240 4692703547 3469581489 02803447
Hap_27	TATGGTTGCG ACTAAACATA AATACATAAT TTGTACAGCA TGCTTACTAG GGGGATTCCA GGCATTTAAT TTACTTAGCC TGCCCAAGTA GCTGAAACAT TATGTTTC
Hap_1	G.....T.....A.....A.....G.....T.....C.....
Hap_3	G.....T.....A.....A.....G.....T.....C.....
Hap_14	G.....T.....A.....A.....G.....T.....C.....
Hap_23	G.....T.....A.....A.....G.....T.....C.....
Hap_20	G.....T.....A.....A.....G.....T.....C.....
Hap_21	G.....T.....A.....A.....G.....T.....C.....
Hap_24	G.....T.....A.....A.....G.....T.....C.....
Hap_28	G.....T.....A.....A.....G.....T.....C.....
Hap_19	G.....T.....A.....A.....G.....T.....C.....
Hap_2	G.....T.....A.....A.....G.....T.....C.....
Hap_15	G.....T.....A.....A.....G.....T.....C.....
Hap_13	G.....T.....A.....A.....G.....T.....C.....
Hap_12	G.....T.....A.....A.....G.....T.....C.....
Hap_16	G.....T.....A.....A.....G.....T.....C.....
Hap_26	G.....T.....A.....A.....G.....T.....C.....
Hap_10	G.....T.....A.....A.....G.....T.....C.....
Hap_22	G.....T.....A.....A.....G.....T.....C.....
Hap_9	G.....T.....A.....A.....G.....T.....C.....
Hap_17	G.....T.....A.....A.....G.....T.....C.....
Hap_11	G.....T.....A.....A.....G.....T.....C.....
Hap_25	G.....T.....A.....A.....G.....T.....C.....
Hap_18	G.....T.....A.....A.....G.....T.....C.....
Hap_29	G.....T.....A.....A.....G.....T.....C.....
Hap_6	CGCACCAATT GTG..TTGCG GGA.TGCGGG AGC.TGTGAG GA.CCGTGA TCCTTCCTTG T.TGACGG.C GGTIGA.ATT CATTGGAGG ATATGGGGTG CTCAGCGT
Hap_8	CGCACCAATT GTG..TTGCG GGA.TGCGGG AGC.TGTGAG GA.CCGTGA TCCTTCCTTG T.TGACGG.C GGTIGA.ATT CATTGGAGG ATATGGGGTG CTCAGCGT
Hap_4	CGCACCAATT G.G..TTGCG GGA.TGCGGG AGC.TGTGAG GA.CGTGGA TCCTTCCTTG T.TGACGG.C GGTIGA.ATT CATTGGAGG ATATGGGGTG CTCAGCGT
Hap_7	CGCATCAATT G.G..TTGCG GGA.TGCGGG AGC.TGTGAG GA.CGTGGA TCCTTCCTTG T.TGACGG.C GGTIGA.ATT CATTGGAGG ATAT.GGGTG CTCAGCGT
Hap_5	CGCACCAATT G.G..TTGCG GGA.TGCGGG AGC.TGTGAG GA.CGTGGA TCCTTCCTTG T.TGACGG.C GGTIGA.ATT CATTGGAGG ATAT.GGGTG CTCAGCGT
中国蛤蜊和四角蛤蜊	
	11111111 1111111111 1222222222 2222222222 2222333333 3333333333 3334444444 4
	22345557 7778888889 9900011122 3345566688 9011112233 3455566677 8899001112 3344455688 9990123566 6
	6917780140 2781257894 6925614509 5810392506 2708795814 5025891437 5801010584 3623524014 4692199902 3
Hap_35	TTTCCCTTGG TATAGTACT GAAAAAAGT GAAAGATCTT AGTTCTCTTT CAGCTATTTT AGTATACTTG TGTCTGAGCT TGAGATTCTT T
Hap_32	C.....C.....T.....
Hap_38	C.....C.....T.....
Hap_30	A.....T.....
Hap_31	T.....T.....
Hap_37	T.....T.....
Hap_34	G.....T.....
Hap_33	T.....T.....
Hap_39	T.....T.....
Hap_36	T.....T.....
Hap_40	CCCTTTGCCA GTCGAAGTGC AGGGCGGGTA AGTGAGAGCC GTCATGTGCC TTTTAGACGA GTATGTACCT CAATGACAAA CAGAGCACTA C
Hap_41	CCCTTTGCCA GTCGAAGTGC AGGGCGGGTA AGTGAGAGCC GTCATGTGCC TTTTAGACGA GTATGTA. CT CAATGACAAA CAGAGCACTA C
Hap_42	CCCTTTGCCA GTCGAAGTGC AGGGCGGGTA AGTGAGAGCC GT.ATGTGCC TTTTAGACGA GTATGTACCT CAATGACAAA CAGAGCACTA C
Hap_44	CCCTTTGCCA GTCGAAGTGC AGGGCGGGTA AGTGAGAGCC GTCATATGCC TTTTAGACGA GTATGTAC. T CAATGACAAA CAGAGCACTA C
Hap_43	.CCTTTGCCA GTCGAAGTGC AGGGCGGGTA AGTGAGAGCC GTCATGTGCC TTTTAGACGA GTATGTACCT CAATGACAAA CAGAGCA. TA C

图 1 蛤蜊科 3 种贝类 NAD5 基因片段核苷酸序列简约信息位点对

Fig.1 NAD5 gene fragments comparison of three species in family Mactridae

Hap: 单倍型; Hap4—8: 漳州群体; Hap9—23: 日照群体; Hap1—3: 北海群体; Hap2, 21, 24—29: 连云港群体; Hap30—39: 四角蛤蜊群体; Hap40—44: 中国蛤蜊群体

2.3 基于 *nad5* 片段的遗传距离

将 44 种 Haps 分为 4 组,日照、连云港、北海群体分为一组(Gp1),漳州群体分为另一组(Gp2),四角蛤蜊群体(Gp3)、中国蛤蜊群体(Gp4)各分为一组,计算组内和组间遗传距离(K2-P)。Gp2 组内遗传距离(D)平均为 0.006;Gp1 组内 D 值平均为 0.010;Gp3 组内 D 值平均为 0.009,Gp4 组内 D 值平均为 0.006。Gp1 和 Gp2 间的 D 值为 0.250—0.251,Gp3 和 Gp4 间的 D 值为 0.220,Gp1、Gp2 与 Gp3、Gp4 之间的 D 值在 0.304—0.365 之间。计算 Gp1、Gp2 间的遗传距离(BG)与 Gp1、Gp2 组内遗传距离(WG)的比值(BG/WG),结果显示 BG/WG 值为 25.1—41.8,Gp3、Gp4 间的 BG/BW 比值为 24.4—36.7(表 3)。日照与北海群体间的遗传距离只有

0.009, 远远小于漳州与其它群体的遗传距离。西施舌漳州群体和非漳州群体的 *BG/BW* 值在四角蛤蜊和中国蛤蜊的 *BG/BW* 比值范围内, 说明西施舌漳州群体与日照、连云港、北海群体间的差异达到种间差异的水平。

表 2 蛤蜊科 3 种贝类 *nad5* 片段单倍型Table 2 The haplotypes on *nad5* fragments of Mactridae three species

单倍型	群体 Population				单倍型	群体 Population				单倍型	群体 Population				单倍型	群体 Population	单倍型	群体 Population
Hap	ZZ	RZ	LYG	BH	Hap	ZZ	RZ	LYG	BH	Hap	ZZ	RZ	LYG	BH	Hap	Mve	Hap	Mch
Hap1				6	Hap11		1			Hap21		2	1		Hap30	1	Hap40	4
Hap2			2	2	Hap12		2			Hap22		1			Hap31	1	Hap41	1
Hap3				4	Hap13		2			Hap23		1			Hap32	1	Hap42	1
Hap4	2				Hap14		1			Hap24			1		Hap33	1	Hap43	1
Hap5	6				Hap15		1			Hap25			1		Hap34	1	Hap44	1
Hap6	4				Hap16		1			Hap26			1		Hap35	1		
Hap7	1				Hap17		2			Hap27			1		Hap36	1		
Hap8	1				Hap18		1			Hap28			1		Hap37	1		
Hap9		1			Hap19		1			Hap29			1		Hap38	1		
Hap10		1			Hap20		2								Hap39	1		
73	14	2	2	12		14						4	7		10			8

pop.: population, Hap: haplotype; ZZ: 漳州, RZ: 日照, LYG: 连云港, BH: 北海; Mve: 四角蛤蜊, Mch: 中国蛤蜊

表 3 基于 *nad5* 片段核苷到的遗传距离Table 3 Genetic distances based on *nad5* nucleotide

组 Group	群体 Population	Gp1			Gp2	Gp3	WP	BG / WG
		连云港	北海	日照				
Gp1	西施舌	连云港					0.010	
		北海	0.011					25.1—41.8A
		日照	0.012	0.009				
Gp2	漳州	0.250	0.250	0.251			0.006	
Gp3	四角蛤蜊	0.304	0.311	0.305	0.328		0.009	24.4—36.7B
Gp4	中国蛤蜊	0.363	0.365	0.361	0.364	0.220	0.006	

BG、WP: 组间、组内遗传距离 (between groups, within group genetic distances), BG / WG: 组间与组内遗传距离比值 (the ratio of BG/WG); Gp (group): 组, A: Gp1 与 Gp2 间, B: Gp3 与 Gp4 间

2.4 群体遗传差异的分子方差分析 (AMOVA)

用 AMOVA 方法分析西施舌组间、群体间和群体内遗传变异来源, 结果显示 (表 4), 95.55% 的变异来源于组间, 即漳州组与混合组 (连云港、日照、北海) 间, 说明组间群体遗传分化很大, 3.56% 的变异来源于群体内, 只有 0.89% 的变异来源于组内群体间, 提示西施舌漳州群体发生了极大的遗传分化。漳州群体与日照、连云港和北海群体间的 F_{ST} 分别为 0.967 ($P < 0.01$)、0.963 ($P < 0.001$) 和 0.976 ($P < 0.01$), 说明漳州西施舌与日照、连云港和北海群体遗传分化很大, 而北海与日照、北海与连云港间的 F_{ST} 分别为 0.258 ($P < 0.01$) 和 0.191 ($P < 0.01$), 日照与连云港群体间的 F_{ST} 为 0.013 ($P > 0.05$), 这两个群体间的遗传分化很小, 两组间的 F_{ST} 为 0.964 ($P < 0.01$), 四角蛤蜊与中国蛤蜊间的 F_{ST} 为 0.965 ($P < 0.01$)。

表 4 西施舌种群差异分子方差分析 (AMOVA)

Table 4 The AMOVA analysis of *Coelomactra antiquata* genetic difference

变异来源 Source of variation	遗传变异元素 Variance components	占总变异的百分数/% Percentage of variation	P
组间 Among groups	47.59063 Va	95.55	<0.001
组内群体间 Among populations Within groups	0.44483 Vb	0.89	<0.001
群体内 Within populations	1.77211 Vc	3.56	<0.001

2.5 基于 *nad5* 的系统发育分析

基于 *nad5* 的 44 种单倍型构建了西施舌不同群体与四角蛤蜊、中国蛤蜊的系统发生 NJ 树(图 2),由图 2 可见,进化树拓扑结构形成 2 大支(A 支,B 支),A 支又分为 2 小支(A-1,A-2),B 也分为 2 小支(B-1,B-2)。日照、连云港、北海群体不同的单倍型交叉聚为支持率(100%)较高的一小支(A-2),漳州群体不同单倍型聚为另一小支(A-1)(100%)。中国蛤蜊、四角蛤蜊不同单倍型分别聚为两小支(B-1 和 B-2)(100%)。图 2 可见,漳州西施舌与日照、连云港、北海西施舌相聚,形成清晰的两支,说明漳州西施舌与日照、连云港、北海西施舌发生了明显的分化。

3 讨论

本人对日照、漳州西施舌线粒体全基因组组成及结构进行了比较^[7],发现两地西施舌 tRNAs 组成、非编码区组成有明显差异,但是线粒体基因组结构只反映了 2 个个体间的差异,是否一个群体中其它不同的个体间的差异也达到如此高的水平,需要对更多的线粒体全基因组进行比对,但全基因组测序耗资颇大,为了能达到既经济、又能获得大量有效信息资料,因此,决定扩大取样量,将线粒体基因组个别基因或非编码区序列进行比较。本人前期工作中及国内其它学者对线粒体 DNA 的 16S *rRNA* 和 *cox1*、细胞色素 b 基因(*cob*)进行了群体间的比对。线粒体 DNA 编码的基因中,16S *rRNA* 和 *cox1* 常被用来进行高^[10]、低^[11]阶元种类群体差异分析。*nad5* 核苷酸较 16S 和 *cox1* 变异稍大,用于遗传差异分析相对灵敏,此外,*nad5* 分子量相对大,便于设计引物,因此,本研究选择了 *nad5* 作为标记,可放大差异,便于观察。目前,关于群体基因核苷酸差异值的种间、种内差异界限尚无标准,且不同的动物的相同基因保守性不同,因此,也不便定标准。但对于同一个基因的种间差异与种内个体间差异之比值相对稳定,可作为重要的参考指标。Hebert^[12-13]提出了 10×规则:认为 *cox1* 在群体间的差异若是群体内差异的 10 倍以上,则认为两群体可能是 2 个种。前期工作中基于 *cox1* 的福建群体与非福建群体间的差异与福建群体内或非福建群体内的差异之比为 17.8—23.5,远远大于 10。基于 *nad5* 基因种间差异界限目前尚不明确,本研究基于 *nad5* 的漳州群体与非漳州群体间的差异与群体内个体间的差异之比为 25.1—41.8,远远大于 10。若参考基于 *cox1* 的 10×规则,此差异也达到种间差异水平。为了有一个可参考的值,本研究计算了与西施舌同一个科(Mactridae)的蛤蜊属(*Mactra*)中国蛤蜊和四角蛤蜊间的差异与群体内差异比值(24.4—36.7),此比值与漳州群体、非漳州群体间与群体内之比相似,*nad5* 资料证明漳州西施舌已经分化为一个新种。

本研究基于 *nad5* 片段(与本研究采用的西施舌 *nad5* 片段同源)分析了双壳类巨蜆属、贻贝属、文蛤属、

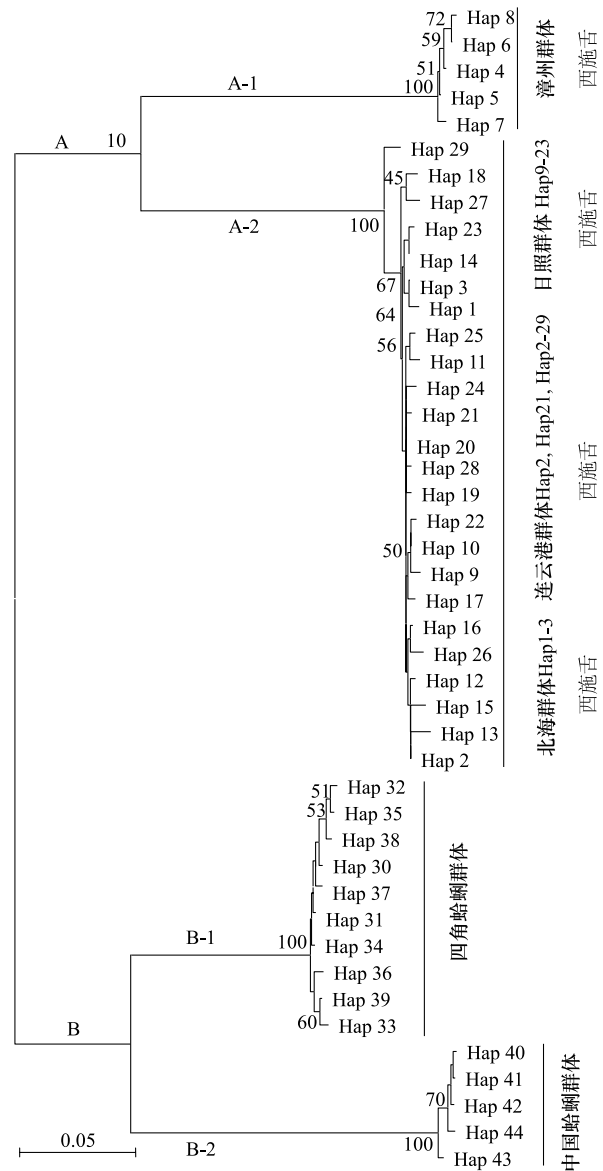


图 2 基于 *nad5* 的蛤蜊科 3 种贝类的 NJ 树

Fig. 2 The NJ tree based on *nad5* of three species in family Mactridae

A 支:西施舌 4 个群体,B 支:四角蛤蜊、中国蛤蜊各 1 个群体,
Hap: 单倍型

竹蛏属 4 个属属内种间遗传距离 (D) ($K2-P$), 结果显示巨蛏属 8 个物种间的 D 值为 0.053—0.379, 多数在 0.150—0.269 之间(表 5)。贻贝属 4 个物种间的 D 值为 0.011—0.317, 多数在 0.218—0.291 之间(表 5)。竹蛏属的大竹蛏(*Solen grandis*, NC_016665)和长竹蛏(*Solen strictus*, NC_017616)之间的 D 值为 0.210。文蛤属的中华文蛤(*Meretrix petechialis*, NC_012767)和丽文蛤(*Meretrix lusoria* NC_014809)间的遗传距离为 0.090。而西施舌混合群体(北海、日照和连云港)与漳州群体间的遗传距离为 0.250—0.251(表 3), 此值在巨蛏属 8 种贝类、贻贝属 4 种贝类种间遗传距离范围内; 大于文蛤属 2 种贝类、竹蛏属 2 种贝类间的遗传距离, 这从侧面证明西施舌漳州群体与其它 3 个群体的差异达到了种间差异水平。

西施舌连云港与北海群体、连云港与日照群体间均有共享 *nad5* 单倍型, 说明 3 个群体间有基因交流现象, 但漳州群体与上述 3 个群体间无共享单倍型, 说明无基因交流现象, 存在生殖隔离, 其原因有待进一步研究; 本研究分析了群体间 *nad5* 核苷酸组成差异显著性, 发现西施舌漳州与非漳州群体的 T、A、G 3 种核苷酸含量差异极显著 ($P < 0.01$), 而中国蛤蜊与四角蛤蜊的也有 3 种核苷酸(T、C、G)含量差异极显著 ($P < 0.01$); AMOVA 分析结果显示西施舌漳州群体与非漳州群体的 $F_{ST} = 0.964$, 而中国蛤蜊与四角蛤蜊间的 $F_{ST} = 0.965$, 两 F_{ST} 值接近。碱基组成显著差异及分化程度之高均证实漳州西施舌发生了极大的遗传分化。

表 5 基于 *nad5* 片段的巨蛏属和贻贝属贝类的遗传距离Table 5 Genetic distance of genus *Crassostrea* and *Mytilus* based on *nad5* fragments

样本序号 Sample No.	物种名及其注册号 Species and submission No.	样本序号 Sample No.									
		1	2	3	4	5	6	7	9	10	11
1	<i>C. nippona</i> NC_015248										
2	<i>C. hongkongensis</i> NC_011518	0.158									
3	<i>C. ariakensis</i> NC_012650	0.157	0.150								
4	<i>C. gigas</i> NC_001276	0.245	0.212	0.219							
5	<i>C. angulata</i> NC_012648	0.221	0.203	0.213	0.053						
6	<i>C. sikamea</i> NC_012649	0.216	0.206	0.206	0.154	0.156					
7	<i>C. iredalei</i> NC_013997	0.242	0.253	0.257	0.269	0.259	0.250				
8	<i>C. virginica</i> NC_007175	0.368	0.371	0.378	0.378	0.378	0.342	0.379			
9	<i>M. galloprovincialis</i> NC_006886										
10	<i>M. edulis</i> NC_006161								0.011		
11	<i>M. trossulus</i> NC_007687								0.218	0.227	
12	<i>M. californianus</i> NC_015993								0.284	0.291	0.317

我国学者孔令峰^[1]对福建长乐、山东即墨、日照和江苏启东西施舌 4 个群体贝壳的 12 个变量数据分析结果显示, 长乐群体与北方的 3 个群体发生了高度遗传分化; 刘德经^[2]对长乐和江苏如东野生西施舌群体贝壳的 5 个数量性状分析结果认为, 2 个群体西施舌的差异达到亚种水平。此资料为漳州西施舌分类地位的确定提供了形态学的证据; 综合本研究结果、前期工作的核基因组 DNA 标记(ITS1^[3]和 RAPD^[14])和线粒体基因组标记(*cox1*^[5]和 *cob*^[6])及全基因组资料^[7, 8]、结合上述形态学资料, 提示中国福建西施舌与其它群体间的差异达到了种间差异水平, 应该是腔蛤蜊属的新种。目前腔蛤蜊属只有两个种, 即西施舌和古氏腔蛤蜊(*Coelomactra cumingii*), 这 2 个种均为濒危物种^[15], *cox1* 分析结果^[15]也认为福建西施舌与日照西施舌可能是姊妹种, 因此, 作者建议对福建西施舌进行重命名, 并对其种质资源加强管理和保护, 以确保此优良资源的可持续利用。

参考文献 (References):

- [1] 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.
- [2] 刘德经, 朱善央. 福建与江苏西施舌群体形态差异研究. *南方水产*, 2010, 6(2): 29-34.

- [3] 孟学平, 高如承, 申欣, 王帅, 程汉良, 董志国, 阎斌伦. 西施舌 5 个地理群体 ITS1 序列变异及系统发生分析. 生态学报, 2010, 30(20): 5555-5561.
- [4] Kong L F, Li Q. Genetic evidence for the existence of cryptic species in an endangered clam *Coelomactra antiquata*. Marine Biology, 2009, 156(7): 1507-1515.
- [5] 孟学平, 申欣, 张波, 程汉良, 田美, 郑雯雯. 西施舌 Cyt b 基因核苷酸差异分析. 水产科学, 2010, 29(9): 537-542.
- [6] 孟学平, 高如承, 申欣, 郑雯雯, 赵娜娜, 程汉良, 田美. 基于 COI 的中国西施舌 DNA 条形码. 水产科学, 2011, 30(10): 626-630.
- [7] Meng X P, Shen X, Zhao N N, Tian M, Liang M, Hao J, Cheng H L, Yan B L, Dong Z G, Zhu X L. Mitogenomics reveals two subspecies in *Coelomactra antiquata* (Mollusca: Bivalvia). Mitochondrial DNA, 2013, 24(2): 102-104.
- [8] 孟学平, 申欣, 赵娜娜, 田美, 梁猛, 郝珏, 程汉良, 阎斌伦, 董志国. 漳州西施舌线粒体基因组全序列: 腔蛤属(*Coelomactra*) 存在新种的证据. 海洋学报, 2013, 35(3): 213-222.
- [9] Meng X P, Zhao N N, Shen X, Hao J, Liang M, Zhu X L, Chen H L, Yan B L, Liu Z P. Complete mitochondrial genome of *Coelomactra antiquata* (Mollusca: Bivalvia): The first representative from the family Mactridae with novel gene order and unusual tandem repeats. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 2012, 7(2): 175-179.
- [10] Puslednik L, Serb J M. Molecular phylogenetics of the Pectinidae (Mollusca: Bivalvia) and effect of increased taxon sampling and outgroup selection on tree topology. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2008, 48(3): 1178-1188.
- [11] Mao Y L, Gao T X, Yanagimoto T, Xiao Y S. Molecular phylogeography of *Ruditapes philippinarum* in the Northwestern Pacific Ocean based on COI gene. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2011, 407(2): 171-181.
- [12] Hebert P D, Penton E H, Burns J M, Janzen D H, Hallwachs W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(41): 14812-14817.
- [13] Hebert P D, Stoeckle M Y, Zemlak T S, Francis C M. Identification of birds through DNA barcodes. PLoS Biology, 2004, 2(10): e312.
- [14] 孟学平, 王帅, 高如承, 申欣, 程汉良, 田美. 西施舌群体遗传结构及分化的 RAPD 分析. 海洋科学, 2011, 35(2): 6-9.
- [15] Ni L, Li Q, Kong L F, Huang S Q, Li L J. DNA barcoding and phylogeny in the family Mactridae (Bivalvia: Heterodonta): Evidence for cryptic species. Biochemical Systematics and Ecology, 2012, 44: 164-172.