

DOI: 10.5846/stxb201409151822

李宏俊, 张晶晶, 袁秀堂, 张安国, 柳圭泽, 邵魁双. 利用线粒体 COI 和微卫星标记分析文蛤 7 个地理群体的遗传变异. 生态学报, 2016, 36(2):

Li H J, Zhang J J, Yuan X T, Zhang G A, Liu G Z, Shao K S. Genetic diversity and differentiation of seven geographical populations of hard clam (*Meretrix meretrix*) assessed by COI and microsatellite markers. Acta Ecologica Sinica, 2016, 36(2):

利用线粒体 COI 和微卫星标记分析文蛤 7 个地理群体的遗传变异

李宏俊¹, 张晶晶^{1,2}, 袁秀堂^{1,*}, 张安国³, 柳圭泽¹, 邵魁双¹

1 国家海洋环境监测中心, 大连 116023

2 大连海洋大学, 大连 116023

3 辽宁医学院, 锦州 121001

摘要: 利用线粒体细胞色素氧化酶亚基 I (COI) 和微卫星标记分析了文蛤 7 个地理群体 (朝鲜新义州, 辽宁丹东、蛤蜊岗和盘山, 山东东营, 江苏如东和启东) 的遗传多样性和群体分化。PCR 扩增获得 142 条 602 bp 的 COI 核苷酸片段, 比对到 13 个变异位点, 包括 11 个转换和 2 个颠换, 定义了 22 个单倍型, 共享单倍型 12 个, 新义州、丹东和启东群体分别拥有特有单倍型。单倍型多样性最高的是如东群体 ($h=0.900$), 最低的是东营群体 ($h=0.600$); 核苷酸多样性最高的是丹东群体 ($\pi=0.00350$), 最低的是蛤蜊岗群体 ($\pi=0.00115$)。基于 COI 数据的 Fu's F_s 中性检验和核苷酸不配对分析揭示文蛤种群历史上曾经历过群体扩张事件。分子变异分析 (AMOVA) 表明, 群体内遗传变异占 71.64%, 群体间遗传变异占 28.36%, 群体间发生显著的遗传分化 ($P<0.05$)。7 个微卫星标记扩增 280 个个体共获得 54 个等位基因, 平均等位基因数为 7.7 个, 平均观测杂合度和期望杂合度分别为 0.3878 和 0.7996。江苏群体具有较高的遗传多样性, 但 7 个群体间遗传多样性不存在显著差异 (Kruskal-Wallis 检验, $P>0.05$)。Hardy-Weinberg 平衡检验结果显示 49 个群体-位点组合中有 18 个偏离平衡 ($P<0.05$), 表现为杂合子缺失。单倍型邻接 (NJ) 树显示聚类未展示地域性特色, 但某几个同一或者相近地理群体的单倍型具有聚类现象 (如东和启东部分单倍型出现地理聚类)。依据群体间遗传距离以 Kimura 2-parameter 为模型建立 UPGMA 系统发育树, 显示丹东群体和江苏的如东和启东群体聚为一支, 暗示江苏苗种的异地养殖已经污染丹东文蛤的遗传背景。

关键词: 文蛤; 群体遗传变异; 细胞色素氧化酶亚基 I; 微卫星; 增殖放流

Genetic diversity and differentiation of seven geographical populations of hard clam (*Meretrix meretrix*) assessed by COI and microsatellite markers

LI Hongjun¹, ZHANG Jingjing^{1,2}, YUAN Xiutang¹, ZHANG Guo'an³, LIU Guize¹, SHAO Kuishuang¹

1 National Marine Environmental Monitoring Center, Dalian 116023, China

2 Dalian Ocean University, Dalian 116023, China

3 Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, China

Abstract: The hard clam (*Meretrix meretrix*) is a commercially important shellfish in China. With the rapid development of the aquaculture industry of *M. meretrix*, the demand for seed cultures has led to the over-exploitation of natural populations, which makes stock enhancement a high priority. Stock enhancement programs that use a small number of breeders for the production of hatchery-reared juveniles to be released to the environment may have negative effects on the genetic diversity of wild populations due to a reduction in the genetic variability of the released stock. In this study, the genetic diversity of

基金项目: 国家海洋公益项目 (201305043); 国家自然科学基金项目 (31101899)

收稿日期: 2014-09-15; 修订日期: 2015-07-27

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: xtyuan@nmemc.org.cn

seven geographical populations (Sinuiju in North Korea; Dandong, Geligang, and Panshan in Liaoning Province; Dongying in Shandong Province; and Rudong and Qidong in Jiangsu Province) of *M. meretrix* was assessed using the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene and microsatellite markers. We obtained a total of 142 COI sequences. Each COI sequence was 602 bp in length. These sequences contained 14 variant sites, including 12 transitions and 2 transversions. Twenty-two haplotypes were identified, with 12 haplotypes shared among populations. Population-specific haplotypes were identified in the Sinuiju, Dandong, and Qidong population, respectively. The haplotype diversity was highest in Rudong ($h = 0.900$) and lowest in Dongying ($h = 0.600$). The nucleotide diversity was highest in Dandong ($\pi = 0.00350$) and lowest in Geligang ($\pi = 0.00115$). Neutral test (Fu's F_s) and mismatch distribution analysis revealed that the hard clam experienced a population expansion event. Analysis of molecular variance (AMOVA) indicated that 71.64% of the genetic variance was within populations and 28.36% of the variance was among populations, demonstrating significant genetic differentiation among populations ($P < 0.05$). A total of 54 alleles were amplified from 280 individuals by using 7 microsatellite markers, with an average of 7.7 alleles per locus. The mean observed heterozygosity (H_o) and expected heterozygosity (H_e) was 0.387 and 0.7996, respectively. Compared with other populations, genetic diversity in the Jiangsu population was highest, but the difference was not significant (Kruskal-Wallis test, $P > 0.05$). Among the 49 population-locus combinations (7 populations $\times$ 7 loci), 18 cases deviated from the Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.05$), indicating heterozygote deficiencies. The neighbor-joining tree showed that the haplotypes were not clustered according to geographical location, but some haplotypes from the same or neighboring locations grouped together (e.g. Rudong and Qidong showing geographical clustering). The unweighted pair group with arithmetic mean (UPGMA) phylogenetic tree showed that the Dandong population was grouped with the Jiangsu population, suggesting that the introduced Jiangsu clam seed has contaminated the genetic background of the Dandong population. These results highlight the need to monitor the genetic effects of releasing large numbers of juveniles.

Key Words: *Meretrix meretrix*; population genetic variation; COI; microsatellite; stock enhancement

文蛤 (*Meretrix meretrix*) 是我国重要的滩涂经济贝类,在我国辽宁辽河口、山东蓬莱湾、江苏南部和广西北部湾等地广泛分布^[1]。近年来,我国文蛤养殖业发展迅速,但苗种供应制约产业发展^[2],大规模苗种异地养殖造成我国文蛤种质遗传背景混杂^[3]。产业发展初期,文蛤养殖苗种依赖于采捕天然苗种,而近年来受围填海工程 and 环境污染等因素影响,我国野生文蛤资源严重衰退^[2]。为遏制我国野生文蛤资源衰退趋势,基于文蛤增殖放流方式的资源恢复势在必行,但由于我国文蛤地理群体的遗传背景模糊,放流群体对当地野生资源的负面影响无法评估,因此开展文蛤不同地理种群的分子遗传学研究,对我国文蛤种质资源的修复和保护具有重要意义。

细胞色素 C 氧化酶亚基 I (cytochrome c oxidase subunit I, COI) 来源于线粒体 DNA,基因变异大、进化速率快,在贝类分子系统发生^[4-6]和种群遗传结构分析^[7-9]等领域应用广泛。微卫星 (Microsatellite) 来源于核基因组,是由 1—6 个碱基重复单位首尾相连组成的串联重复序列,微卫星标记具有数量多、分布广、共显性遗传和多态信息含量高等特点,被广泛应用于群体遗传分析^[10-11]、亲缘关系鉴定^[12]和遗传连锁图谱构建^[13-15]等研究中。考虑到增殖放流文蛤苗种的可操作性,应尽可能选择地理距离近的群体放流,本研究聚焦于我国北方文蛤群体,以朝鲜群体作为参照,利用线粒体 COI 和微卫星 2 种标记分析了我国北方 6 个文蛤地理群体和 1 个朝鲜群体的遗传多样性和群体分化,以期为我国文蛤种质资源保护和修复提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 样品采集和 DNA 提取

本研究所用文蛤来源于 7 个地理群体,分别采自朝鲜新义州,辽宁丹东、蛤蜊岗和盘山,山东东营,江苏如

东和启东(图 1),每个地点随机采集 40 个样本,活体解剖取闭壳肌,保存于 80%酒精中,用于 DNA 提取。采用常规酚/氯仿/异戊醇法提取基因组 DNA,利用 1%的琼脂糖电泳和紫外分光光度计进行定量,无菌超纯水稀释至 50 ng/ μ L 备用。

1.2 线粒体 COI 序列扩增

文蛤线粒体 COI 引物来源于通用引物 LCO1490 和 HCO2198^[16],为了提高扩增效率,稍加改动,上游序列为 MmCOIF: TTTAGTACTAATCATAAAGATATTG,下游序列为 MmCOIR: TACACTTCAGGATGACCAAAAAATCA。PCR 反应体系为 25.0 μ L,内含 10 $\times$ PCR buffer 2.5 μ L (含 Mg^{2+} 25 mmol/L),正、反向引物各 1.0 μ L (10 μ mol/L),dNTP 1.5 μ L (各含 2.5 mmol/L),Taq 酶 1 U,模板 1.0 μ L。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1min,反应 35 个循环后,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后,切胶,送上海生工进行 PCR 产物测序。

1.3 微卫星标记

查阅已发表文蛤微卫星引物文献^[17-18],筛选多态性高、扩增效果好的 7 个微卫星标记用于群体遗传分析,其引物序列、等位基因数、等位基因大小、重复单元和 GenBank 登录号等信息见表 1。PCR 反应体系为 15 μ L,内含 10 $\times$ buffer 1.5 μ L (含 Mg^{2+} 25 mmol/L),正、反向引物各 0.5 μ L (10 μ mol/L),dNTP 1.0 μ L (各含 2.5 mol/L),Taq 酶 0.5 U,模板 1.0 μ L。PCR 程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,最适退火温度复性 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,反应 35 个循环后,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。微卫星标记 PCR 产物经 10%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,300 V 恒电压 1.5 h,紫外灯拍照。

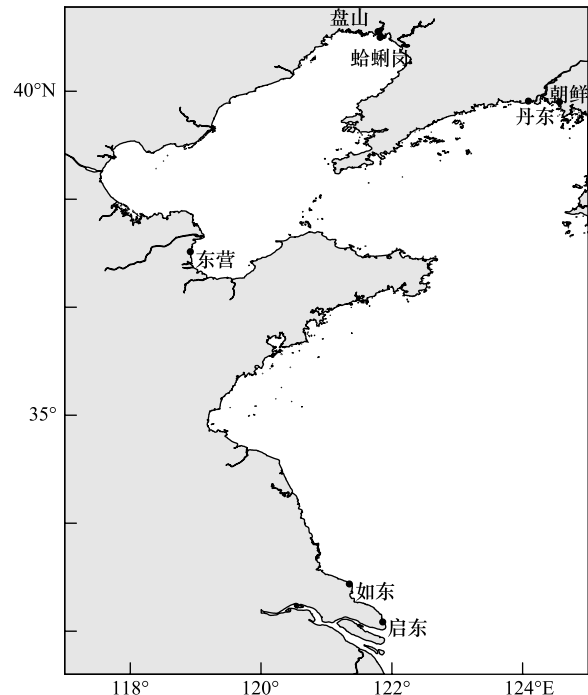


图 1 本研究文蛤地理群体采集点矢量图

Fig. 1 Collection locations of hard clam geographical populations in this study

表 1 本研究中所用 7 个微卫星标记引物序列、等位基因数、有效等位基因数、等位基因大小、近交系数、重复单元和 GenBank 登录号

Table 1 Primer sequence, allele number, effective allele number, allele size, F_{IS} , repeat motif and GenBank accession number of seven microsatellite markers used in this study

位点 Locus	引物序列 Primer sequence	等位基因数 No. of alleles	有效等位基因数 No. of effective alleles	等位基因大小(bp) Allele size (bp)	近交系数 F_{IS}	重复单元 Repeat motif	GenBank 登录号 GenBank number
Mm38	F:CTTCATCTATGCTTTCGTATTTCG R:CTGCTGGCTATGAATCAAGTG	5	4.5289	155—168	0.3552	(TCA) _n	J1266036
Mm14	F:AGCCATTAGTTTTTCTTGCC R:CTTGGTAGAGGTCCAGTAGGT	6	5.3294	200—230	0.6719	(GTCC) _n	J1266266
MM8105	F:AGTTGCCTTGAAGTAAAGTCC R:CATGATCAATCATTTGTTACA	8	6.1 364	135—164	0.5998	(TGAT) _n	J1265669
MM5358	F:TTCTACTGACCTAAGCTGCTG R:CCATATGTGTCATTGGAAGTT	9	6.9176	91—170	0.7157	(AATC) _n	J1262933
MM12736	F:GTCAGCGAAGATTTTAACAAA R:TCATCATCTTCAACTCACCAT	10	7.3618	114—172	0.4373	(TGA) _n	J1270267
MM3923	F:TTTTCGTCTTAATGAGGGTTA R:GTTTGTGAAATAGTCTCTGCT	7	6.4598	78—157	0.2995	(AATC) _n	J1261510
MM26715	F:ACATCATCATCTCAACTCACC R:GTCAGCGAAGATTTTAACAAA	9	6.4700	118—188	0.3386	(ATC) _n	J1284180

1.4 数据统计与分析

利用 Mega 4.0^[19] 对 COI 序列进行对位排列,结合人工核查,利用 DNASP^[20] 统计单倍型,计算每个群体的单倍型多样性(h)和核苷酸多样性(π)。利用 Arlequin 3.5^[21] 计算群体分化指数(F_{st}),分析群体内和群体间的分子方差(Analysis of Molecular Variance, AMOVA),并进行 Fu's F_s 检验和核苷酸不配对分布分析。利用 TCS 1.21^[22] 构建单倍型网络图,以 Kimura 2-parameter 模型分别建立单倍型 Neighbor-Joining(NJ)进化树以及 7 个群体的 Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean(UPGMA)系统进化树,利用 Geodis 2.6^[23] 检测单倍型与地理学特征的相关性。

借助 Gel-Pro(Media Cybernetics, USA)统计微卫星标记基因型,利用 FSTAT^[24] 统计微卫星位点的等位基因数、有效等位基因数、近交系数(F_{IS})、观测杂合度(H_o)和期望杂合度(H_e),利用非参数分析(Kruskal-Wallis test)检验群体间差异显著性。利用 Arlequin 计算群体分化指数(F_{ST}),用 Bonferroni^[25] 法对多重比较的显著水平进行校正。利用 MICRO-CHECKER^[26] 检测无效等位基因概率。采用马尔科夫链(Markov Chain)方法进行 Hardy-Weinberg 平衡检验。

2 结果

2.1 群体内遗传变异

对 7 个文蛤地理群体的总 DNA 进行 PCR 扩增,获得特异性的 COI 基因片段,经 Mega 同源排序,去除部分端部序列,获得 142 条 602bp 的 COI 基因片段,经 BLAST 比对分析,确认所得片段为 COI 序列。序列组成显示平均 A、T、G、C 碱基含量分别为 21.2%、45.3%、19.4%、14.1%,A+T 含量大于 G+C 的含量,具有明显的碱基组成偏倚性。602bp 的片段共鉴定出 13 个变异位点(占位点总数的 2.16%),包括 11 个转换和 2 个颠换,没有插入和缺失突变,共检测出 22 个单倍型(GenBank 登录号:KJ657746-KJ657749, KJ657752-KJ657769),共享单倍型 12 个,占总数的 54.5%,Hap01 被 3 个群体共享(朝鲜蛤蜊岗、和盘山),Hap02 被 6 个群体共享(朝鲜、丹东、蛤蜊岗、盘山、如东和启东),Hap03 被 5 个群体共享(蛤蜊岗、盘山、东营、如东和启东),Hap04 被 5 个群体共享(朝鲜、东营、盘山、蛤蜊岗和如东),Hap05 被 2 个群体共享(朝鲜和盘山),Hap06 被 3 个群体共享(丹东、如东和启东),Hap08 被 4 个群体共享(朝鲜、丹东、如东和启东),Hap13 被 3 个群体共享(朝鲜、盘山和东营),Hap14、Hap15、Hap16 和 Hap17 分别都被 2 个群体共享(启东和如东)。Hap07 和 Hap12 是新义州特有单倍型,Hap09、Hap10 和 Hap11 是丹东特有单倍型,Hap18、Hap19、Hap20、Hap21 和 Hap22 是启东特有单倍

表 2 基于 COI 和微卫星标记的文蛤 7 个群体的遗传学参数

Table 2 Genetic diversity indices for cytochrome c oxidase subunit (COI) gene and microsatellite markers for seven populations of the hard clam, *Meretrix meretrix*

种群 Population	细胞色素氧化酶亚基 I COI				微卫星 Microsatellite		
	n_p	n_h	h	π	N_a	H_o	H_e
新义州	7	7	0.810±0.070	0.00249±0.00060	7.7	0.4429	0.8108
丹东	8	6	0.803±0.096	0.00350±0.00095	7.6	0.475	0.8228
蛤蜊岗	3	4	0.603±0.131	0.00115±0.00032	7.3	0.3036	0.7936
盘山	4	8	0.748±0.053	0.00180±0.00023	7.1	0.2964	0.7413
东营	3	4	0.600±0.154	0.00169±0.00055	7.3	0.3857	0.7989
如东	7	9	0.900±0.039	0.00308±0.00042	7.7	0.375	0.8107
启东	9	13	0.875±0.046	0.00299±0.00039	7.7	0.4357	0.8188
总体/平均 Total/Average	14	24	0.763	0.00239	7.4	0.3878	0.7996

n_p :多态位点数 number of polymorphic sites; n_h :单倍型数 number of haplotypes; h :单倍型多样性 haplotype diversity; π :核苷酸多样性 nucleotide diversity; N_a :等位基因数 number of alleles; H_o :观测杂合度 observed heterozygosity; H_e :期望杂合度 expected heterozygosity

型。文蛤 7 个地理群体的遗传学参数见表 2, 平均单倍型及核苷酸多样性处于中等水平 ($h=0.886$, $\pi=0.00314$)。单倍型多样性最高的是如东群体 ($h=0.900$), 最低的是东营群体 ($h=0.600$); 核苷酸多样性最高的是丹东群体 ($\pi=0.00350$), 最低的是蛤蜊岗群体 ($\pi=0.00115$)。总体来说, 来自江苏的两个群体显示出较高的遗传多样性。

中性检验结果显示, 平均 F_u 的 F_s 值为 -11.97063 ($P<0.05$) (表 3), F_u 的 F_s 值达到显著水平, 表明文蛤偏离中性选择, 曾经历群体扩张事件。核苷酸不配对分布分析的结果表明, 文蛤观测到的核苷酸不配对分布呈单峰类型, 符合群体扩张模型下的预期分布 (图 2)。基于观测值和模拟值间的拟合优度检验结果显示, 平方离差之和 (Sum of squared deviations, SSD) 较小, 且统计检验不显著 ($P>0.05$), 表明观测值与模拟值拟合程度较好, 符合群体扩张模型, 与中性检验结果一致。

文蛤线粒体 COI 单倍型网络图 (图 3A) 显示绝大部分单倍型之间只保留 1 步变异, 仅少数单倍型之间 (Hap06 → Hap12、Hap06 → Hap16、Hap12 → Hap10 和 Hap21 → Hap11) 保留 2 步变异。启东拥有 13 种单倍型, 如东拥有 9 种单倍型, 新义州拥有 8 种单倍型, 盘山拥有 6 种单倍型, 丹东拥有 6 种单倍型, 蛤蜊岗拥有 4 种单倍型, 东营拥有 3 种单倍型。如东群体的单倍型大部分和启东相同, 仅 Hap04 是如东特有单倍型, 推测如东和启东的遗传背景相似。基于 Kimura 双参数模型建立的 NJ (图 3B) 聚类图显示单倍型聚类并未完全展示地域性特色, 但是对于某几个同一或者相近地理群体的单倍型具有聚类现象 (如 Hap09、Hap10、Hap14)。

7 个微卫星标记共检测到 54 个等位基因, 每个位点的等位基因数从 5—10 个不等, 平均等位基因数为 7.7 个。在所有微卫星位点中, MM12736 的等位基因数最多 (10 个), Mm38 的等位基因数最少 (5 个) (表 1); 朝鲜新义州和江苏如东、启东群体的平均等位基因数最多 ($N_e=7.7$), 盘山群体的平均等位基因数最少 ($N_e=7.1$); 丹东群体的平均观测杂合度最高 ($H_o=0.4750$), 盘山群体的平均观测杂合度最低 ($H_o=0.2964$)。总体上, 7 个群体均具有较高的微卫星遗传多样性, 7 个群体平均等位基因数 (Kruskal-Wallis test, $P=0.951$) 和观测杂合度 ($P=0.592$) 不存在显著差异。在 49 组群体位点组合中 (7 群体 × 7 位点), 有 18 个组合由于杂合子缺失偏离 HWE 平衡 ($P<0.05$)。利用 MICRO-CHECKER 检验微卫星位点的无效等位基因概率, 结果表明偏离 HWE 平衡的位点在不同群体中均存在无效等位基因, 表现为杂合子缺失, 但未检测到微卫星 PCR 扩增过程中易出现的“影子带”和大片段等位基因丢失现象。

2.2 群体间遗传变异

文蛤 7 个群体 COI 序列的分子变异分析 (AMOVA) 结果见表 4, 群体间的遗传分化系数 F_{ST} 为 0.28360 ($P<0.05$), 表明在整个遗传变异中群体间遗传变异占 28.36%, 群体内遗传变异占 71.64%, 群体内的遗传变异大于群体间, 群体间发生显著的遗传分化 ($P<0.05$)。文蛤 COI 群体间 F_{ST} 的显著性检验结果见表 5, 两两群体间 F_{ST} 介于 0.00714—0.45390 之间, 只有丹东和如东 ($F_{ST}=-0.00714$)、新义州和盘山 ($F_{ST}=0.01018$)、启东和如

表 3 基于 COI 序列的文蛤 7 个群体的选择中性检验和核苷酸不配对分析

Table 3 Selective neutrality test and mismatch distribution analysis of 7 populations of hard clam (*Meretrix meretrix*) based on COI sequences

群体 Population	F_u 的 F_s 检验 (P) F_u 的 F_s test (P)	平方离差之和 (P) Sum of squared deviations (P)
新义州	-2.35649 (0.041 *)	1.39258 (0.014 *)
丹东	-1.19527 (0.195)	0.24997 (0.020 *)
蛤蜊岗	-1.30733 (0.067)	0.02717 (0.100)
盘山	-1.45355 (0.162)	0.01578 (0.100)
东营	-0.70056 (0.188)	0.00222 (0.950)
如东	-3.64483 (0.011 *)	0.00796 (0.440)
启东	-7.48745 (0.000 *)	0.00417 (0.360)
平均 Average	-11.97063 (0.000 *)	0.00314 (0.0829)

* 表示差异显著 $P<0.05$

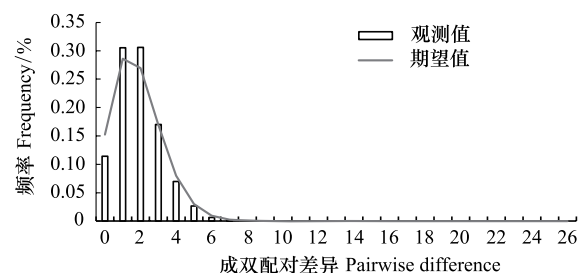


图 2 文蛤线粒体细胞色素氧化酶亚基 I (COI) 单倍型的核苷酸不配对分布

Fig. 2 Mismatch distributions of *Meretrix meretrix* COI haplotypes

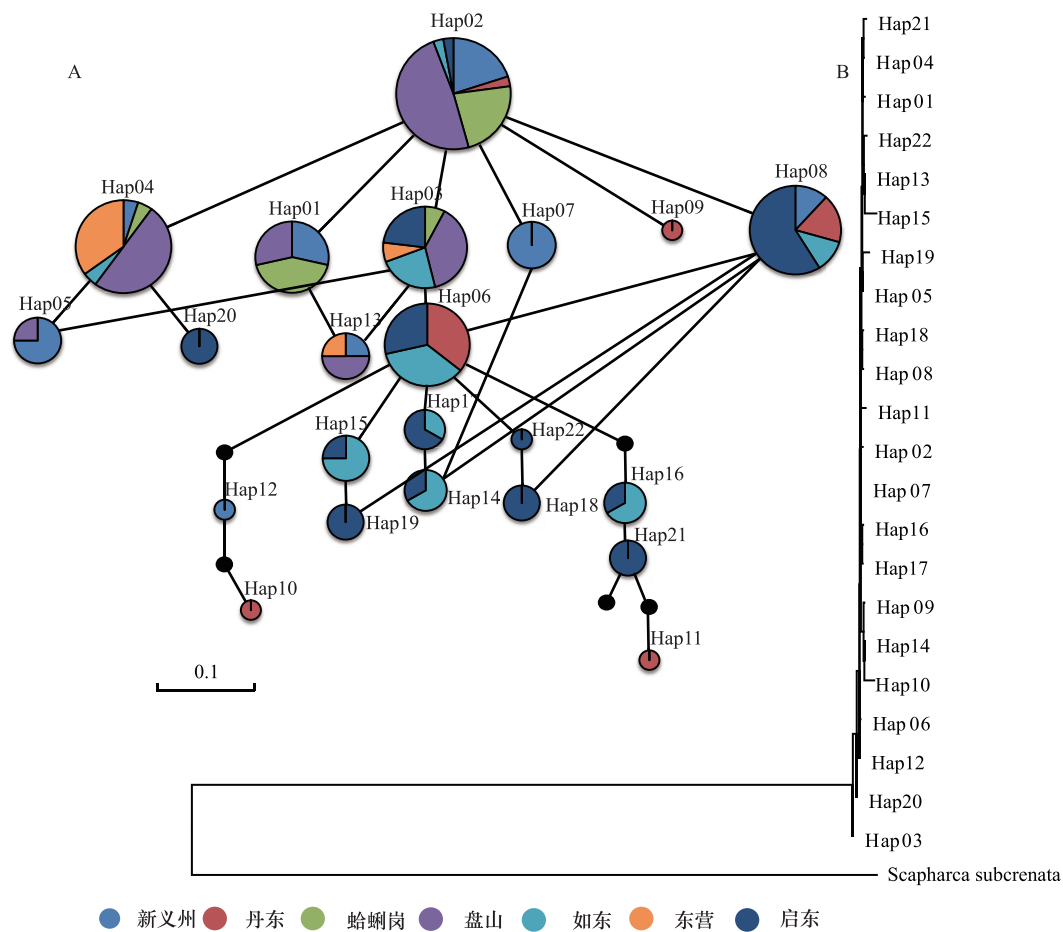


图3 文蛤 COI 基因单倍型网络图(A)和 NJ 系统树(B),外群毛蚶 (*Scapharca subcrenata*) Genbank 登录号 AB729113

Fig. 3 The COI haplotype network and NJ tree for *Meretrix meretrix*, the GenBank accession number of outgroup *Scapharca subcrenata* is AB729113

单倍型网络图反映的是单倍型之间的关系,每个圆圈代表一个单倍型,中间缺失的单倍型用黑圈表示,圆圈大小代表单倍型的出现频率,圆圈里的不同颜色代表不同的地理群体。

东 ($F_{ST}=0.02529$)、如东和丹东 ($F_{ST}=0.03713$) 的 P 值大于 0.05,说明启东、丹东和如东之间,新义州、蛤蜊岗和盘山之间,东营和盘山之间未发生显著遗传分化。微卫星标记各群体间 F_{ST} 范围为 0.01139—0.03935(表 5),经 Bonferroni 校正,各群体间均处于显著分化 ($P<0.0083$)。

表4 文蛤 7 个群体的 COI 序列遗传差异的分子方差分析 (AMOVA)

Table 4 Analysis of molecular variance (AMOVA) of mitochondrial cytochrome oxidase c subunit (COI) gene among seven populations of hard clam (*Meretrix meretrix*)

变异起源 Source of variation	自由度 <i>df</i>	平方和 Sum of squares	方差组分 Variance components	方差比例/% Percentage of variance
群体间 Among populations	6	37.229	0.28077	28.36
群体内 Within populations	135	95.75	0.70926	71.64
总变异 Total variation	141	132.979	0.99003	—

利用 Mega 构建 7 个群体遗传距离 UPGMA 树(图 4),7 个群体聚类为两大分支,其中蛤蜊岗、盘山、新义州和东营聚为一大支,启东和如东相聚再与丹东群体聚为另一支。利用 Geodis 检测,未发现 7 个群体遗传距离与地理距离间的显著相关($r=0.4035$, $P=0.0600$),但去掉丹东群体后,检测到遗传距离与地理群体间的显

著相关($r=0.7129, P=0.0280$)。

表 5 基于线粒体 COI 序列(成对 F_{ST} , 对角线下)和微卫星标记(成对 F_{ST} , 对角线上)的文蛤群体遗传分化

Table 5 E estimates of population genetic differentiation based on microsatellite markers (pairwise F_{ST} , above diagonal) and mitochondrial cytochrome oxidase c subunit (COI) gene (pairwise F_{ST} , below diagonal) for the hard clam (*Meretrix meretrix*)

种群 Population	新义州	丹东	蛤蜊岗	盘山	如东	东营	启东
新义州	—	0.01139 *	0.02678 *	0.02835 *	0.01271 *	0.01868 *	0.02490 *
丹东	0.24667 *	—	0.03006 *	0.02557 *	0.01839 *	0.01937 *	0.02660 *
蛤蜊岗	0.01018	0.38112 *	—	0.03476 *	0.02972 *	0.03024 *	0.03907 *
盘山	0.08710	0.40649 *	0.03823	—	0.02677 *	0.02818 *	0.03935 *
如东	0.28754 *	0.03713	0.41132 *	0.40904 *	—	0.01874 *	0.02780 *
东营	0.32586 *	0.45390 *	0.40862 *	0.19277	0.43984 *	—	0.02657 *
启东	0.24152 *	-0.00714	0.35621 *	0.37830 *	0.02529	0.44328 *	—

* 经 Bonferroni 校正差异显著

3 讨论

近年来,过度捕捞和环境恶化使我国近岸海域渔业资源量锐减,单纯依靠渔业资源自身补给已经不能修复受损的资源,增殖放流作为一种有效的资源修复手段,已经在世界各地得到推广和应用。放流苗种往往来源于养殖群体,随着放流数量的增加,人们越来越关注放流苗种的遗传多样性,以降低养殖群体污染野生种质资源的风险,对亲本和放流群体的遗传监测与管理已经成为评价增殖放流效果的指标之一^[27]。已有研究表明,

群体内遗传多样性降低会导致适应能力和生存能力降低^[28],对于经济物种,遗传多样性的降低会导致隐性有害基因表达增加和经济性状衰退,导致品种退化^[29]。因此,利用 DNA 分子标记对放流群体进行遗传监测,研究放流群体与野生群体的遗传差异,对评估增殖放流效果具有重要意义。本研究利用线粒体 COI 和微卫星标记检测了文蛤 7 个地理群体的遗传多样性,两种分子标记的结果均显示江苏的如东和启东群体存在高的遗传多样性,这与文蛤地理种群的 ISSR 研究结果吻合,江苏文蛤 ISSR 的位点多态性(80.7%)高于辽宁文蛤的位点多态性(68.4%)^[30],说明江苏文蛤具有较强的遗传适应能力和选择育种潜力。

线粒体 COI 来源于通用引物扩增,可以用于物种间遗传多样性的横向比较。本研究检测到文蛤线粒体 COI 序列的单倍型多样性为 0.763,核苷酸多样性为 0.00239,与我国其他海水贝类同源序列^[7,31-32]相比,具有较低的遗传多样性。本研究样品来源于我国主要的文蛤养殖海域,各群体的养殖规模大,但大群体不代表高遗传多样性,可能是由于贝类 COI 序列多样性具有种属特异性决定的。此外,对各群体 Hardy-Weinberg 检验结果表明,各群体均表现一定的杂合子缺失,可能是有效群体小、近交和群体亲本性比例失衡等因素^[33]造成,从而导致文蛤群体 COI 遗传多样性偏低。由于早期的文蛤养殖缺乏科学性指导,采取“野捕家养”供苗系统,没有充分考虑有效群体数量和利用杂种优势进行人工育种,稀有等位基因很可能在大规模人工育苗情况下丢失而导致 Hardy-Weinberg 失衡。

微卫星的杂合度和等位基因数是反映群体遗传多样性的重要参数。本研究中文蛤群体平均观测和期望杂合度分别为 0.2964—0.4750 和 0.7413—0.8228,但 7 个群体之间的差异不显著。各群体不同位点的杂合度也没有明显差异,说明各群体遗传多样性的差别不大。从等位基因数来看,每个位点的等位基因数为 5—10 个,而各群体平均等位基因数从 7.1 到 7.7 个不等,差异亦不显著,这与杂合度的检测结果基本一致。而从

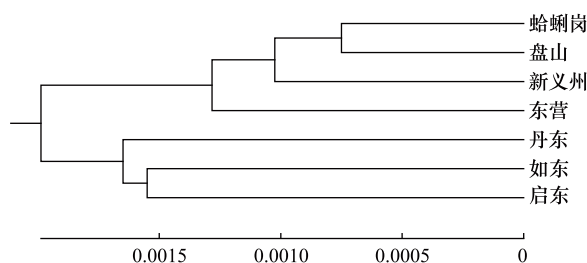


图 4 文蛤 7 个地理群体的 UMPGA 系统树

Fig. 4 UMPGA tree constructed from genetic distance among 7 populations of hard clam, *Meretrix meretrix*

COI 单倍型网络图来看,各群体单倍型数量从 3 到 13 个不等,群体间差异明显,与等位基因数和杂合度结果不一致,这可能是因为线粒体 DNA 属于母系遗传和单倍体的特性,与核遗传 DNA 相比拥有更小的有效群体,更容易受瓶颈效应影响^[9]。

群体遗传分化指数 F_{ST} 是反映群体间遗传分化程度的重要指数。赫崇波等^[3] 研究辽宁和山东沿海 5 个文蛤群体遗传多样性, AFLP 的分析得到的 F_{ST} 值为 0.0596, 结果表明群体间相似性较大, 本研究中 7 个文蛤群体的 F_{ST} 值为 0.28360, 群体间发生显著的遗传分化, 与本研究中文蛤取样地理范围广有关, 这正好和 Geodis 的结果遗传距离和地理距离显著相关(丹东群体除外)相符。从系统进化树来看, 丹东群体与江苏的 2 个群体聚为一类, 暗示江苏苗种的异地养殖已经污染丹东文蛤的遗传背景。从分子遗传学角度来看, 文蛤远距离异地养殖或者增殖放流可能对当地野生群体的遗传结构造成影响, 因此, 文蛤增殖放流应尽量“就地取材”, 避免异地文蛤种质资源污染当地文蛤。在选用优良苗种的同时, 应适当提高放流亲本数量, 提高有效群体数量, 避免放流群体遗传多样性降低和遗传结构改变, 并制定科学合理的遗传多样性监测方案, 以确保增殖放流科学合理开展。

参考文献 (References):

- [1] 庄启谦. 中国动物志: 软体动物门 双壳纲 帘蛤科. 北京: 科学出版社, 2001: 1-278.
- [2] 张安国, 李太武, 苏秀榕, 刘保忠. 文蛤养殖现状及展望. 水产科学, 2005, 24(2): 31-33.
- [3] 赫崇波, 丛林林, 葛陇利, 刘卫东, 周遵春, 高祥刚. 文蛤养殖群体和野生群体遗传多样性的 AFLP 分析. 中国水产科学, 2008, 15(2): 215-221.
- [4] 程汉良, 夏德全, 吴婷婷, 孟学平, 吉红九, 董志国, 陈淑吟. 6 种帘蛤科贝类及 4 个地理种群文蛤线粒体 COI 基因片段序列分析. 海洋学报, 2007, 29(5): 109-116.
- [5] 陈爱辉, 李朝霞, 封功能. 基于线粒体 COI 基因序列的文蛤属(软体动物门: 帘蛤科)系统发育关系. 动物学研究, 2009, 30(3): 233-239.
- [6] 程汉良, 彭永兴, 董志国, 易乐飞, 孟学平, 申欣, 周旻纯, 陈冬勤. 基于线粒体细胞色素 c 氧化酶亚基 I 基因序列的帘蛤科贝类分子系统发育研究. 生态学报, 2013, 33(9): 2744-2753.
- [7] 牛东红, 李家乐, 沈和定, 姜志勇. 缢蛏六群体线粒体 DNA-COI 基因序列变异及群体遗传结构分析. 海洋学报, 2008, 30(3): 109-116.
- [8] 沈玉帮, 张俊彬, 冯冰冰, 李家乐. 基于线粒体 COI 序列分析对紫贻贝群体遗传多样性的研究分析. 海洋通报, 2011, 30(4): 435-440.
- [9] Zhan A B, Perepelizin P V, Ghabooli S, Paolucci E, Sylvester F, Sardina P, Cristescu M E, MacIsaac H J. Scale-dependent post-establishment spread and genetic diversity in an invading mollusc in South America. Diversity and Distributions, 2012, 18(10): 1042-1055.
- [10] Zhan A B, Hu J J, Hu X L, Zhou Z C, Hui M, Wang S, Peng W, Wang M L, Bao Z M. Fine-scale population genetic structure of Zhikong scallop (*Chlamys farreri*): do local marine currents drive geographical differentiation?. Marine Biotechnology, 2009, 11(2): 223-235.
- [11] Xing K, Gao M L, Li H J. Genetic differentiation between natural and hatchery populations of Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) based on microsatellite markers. Genetics and Molecular Research, 2014, 13(1): 237-245.
- [12] Lu X, Wang H X, Liu B Z, Xiang J H. An effective method for parentage determination of the clam (*Meretrix meretrix*) based on SSR and COI markers. Aquaculture, 2011, 318(1/2): 223-228.
- [13] Li H J, Liu X, Zhang G F. Development and linkage analysis of 104 new microsatellite markers for bay scallop (*Argopecten irradians*). Marine Biotechnology, 2012, 14(1): 1-9.
- [14] Li H J, Liu X, Zhang G F. A consensus microsatellite-based linkage map for the hermaphroditic bay scallop (*Argopecten irradians*) and its application in size-related QTL analysis. PLoS One, 2012, 7(10): e46926.
- [15] Zhan A B, Hu J J, Hu X L, Hui M, Wang M L, Peng W, Huang X T, Wang S, Lu W, Sun C, Bao Z M. Construction of microsatellite-based linkage maps and identification of size-related quantitative trait loci for Zhikong scallop (*Chlamys farreri*). Animal Genetics, 2009, 40(6): 821-831.
- [16] Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology Biotechnology, 1994, 3(5): 294-299.
- [17] Lu X, Wang H X, Dai P, Liu B Z. Characterization of EST-SSR and genomic-SSR markers in the clam, *Meretrix meretrix*. Conservation Genetics Resources, 2011, 3(4): 655-658.
- [18] Dong Y H, Yao H H, Lin Z H, Sun C S, You Z J. Development of 53 novel polymorphic EST-SSR markers for the hard clam *Meretrix meretrix* and

- cross-species amplification. Conservation Genetics Resources, 2013, 5(3): 811-816.
- [19] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4. 0. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [20] Rozas J, Sánchez-DelBarrio J C, Messeguer X, Rozas R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics, 2003, 19(18): 2496-2497.
- [21] Excoffier L, Lischer H E L. Arlequin suite ver 3. 5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular Ecology Resources, 2010, 10(3): 564-567.
- [22] Clement M, Posada D, Crandall K A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. Molecular Ecology, 2000, 9(10): 1657-1659.
- [23] Posada D, Crandall K A, Templeton A R. GeoDis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. Molecular Ecology, 2000, 9(4): 487-488.
- [24] Goudet J. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2. 9. 3), 2001[2005-08-23]. <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
- [25] Rice W R. Analyzing tables of statistical tests. Evolution, 1989, 43(1): 223-225.
- [26] Van Oosterhout C, Hutchinson W F, Wills D P, Shipley P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Molecular Ecology Notes, 2004, 4(3): 535-538.
- [27] Blankenship H L, Leber K M. A responsible approach to marine stock enhancement. American Fisheries Society Symposium, 1995, 15: 167-175.
- [28] Barrett R D H, Schluter D. Adaptation from standing genetic variation. Trends in Ecology & Evolution, 2008, 23(1): 38-44.
- [29] Beaumont A, Boudry P, Hoare K. Biotechnology and Genetics in Fisheries and Aquaculture. Singapore: Wiley-Blackwell, 2010.
- [30] 陈大鹏, 沈怀舜, 丁亚平, 杨家新, 沈颂东, 许璞. 文蛤 (*Meretrix meretrix*) 地理种群 ISSR 分子标记的初步研究. 南京师大学报: 自然科学版, 2004, 27(3): 74-77.
- [31] 郑文娟, 朱世华, 沈锡权, 刘必谦, 潘志崇, 叶央芳. 基于线粒体 COI 基因序列探讨泥蚶的遗传分化. 动物学研究, 2009, 30(1): 17-23.
- [32] 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.
- [33] Avise J C, Arnold J, Ball R M, Bermingham E, Lamb T, Neigel J E, Reeb C A, Saunders N C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. Annual Review of Ecology and Systematics, 1987, 18: 489-522.