

## 浙闽沿海缢蛭群体遗传结构的微卫星和 线粒体 *CO I* 序列分析

牛东红<sup>1</sup>, 冯冰冰<sup>1</sup>, 刘达博<sup>1</sup>, 沈和定<sup>1</sup>, 李家乐<sup>1,2\*</sup>

(1. 上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;

2. 上海市高校水产养殖学 E-研究院, 上海 201306)

**摘要:** 我国缢蛭养殖规模不断扩大, 而缢蛭主产区苗种的遗传结构却缺乏系统的分析研究。利用微卫星标记和线粒体 *CO I* 序列分析了我国浙闽沿海 8 个缢蛭群体的遗传多样性和遗传分化水平。基于微卫星标记的遗传多样性分析结果显示, 群体的平均有效等位基因数 ( $N_e$ ) 为 6.2 ~ 9.0, 期望杂合度 ( $H_e$ ) 为 0.806 ~ 0.875; 基于线粒体 *CO I* 标记的遗传多样性结果显示, 单倍型多态性 ( $H_d$ ) 为 0.942 ~ 1.000, 核苷酸多样性指数 ( $P$ ) 为 0.005 6 ~ 0.011 5。基于微卫星标记的群体间遗传分化值 ( $F_{ST}$ ) 为 0.001 4 ~ 0.063 8, 除 NH 和 SM 群体外, 其他群体间均具有显著性差异; 基于线粒体 *CO I* 标记的群体间遗传分化值 ( $F_{ST}$ ) 为 0.000 9 ~ 0.368 0, 部分群体间具有显著性差异。基于微卫星标记和线粒体 *CO I* 标记的聚类结果表明, 位于同一海湾内的群体首先聚类在一起, 但是浙江和福建沿海 8 群体并不符合地理距离隔离模式的聚类方式, 而呈现出浙江群体和福建群体的交叉聚类。由此可见, 我国缢蛭主产区浙闽沿海群体仍具有较高的遗传多样性水平, 但是异地群体间产生了基因交流, 并形成了新的地方性种群。

**关键词:** 缢蛭; 微卫星; 线粒体 DNA; 遗传结构

**中图分类号:** S 917

**文献标志码:** A

缢蛭 (*Sinonovacula constricta*) 俗称蛭子、泥蛭、蜻, 广泛分布于我国、日本和朝鲜等国的河口或有少量淡水注入的内湾潮间带中、下区软泥滩。缢蛭生长快, 养殖周期短, 是我国四大养殖贝类之一。缢蛭的养殖历史悠久, 福建缢蛭养殖始于宋代, 距今有 800 年, 之后缢蛭养殖逐步推广到浙江一带。由于缢蛭适合生活在具有很多淡水注入的海湾, 因此, 浙江的宁海、三门以及玉环、乐清一带, 福建的连江、长乐、涵江、石狮、惠安一带为缢蛭的苗种主产区, 其产量占全国产量的 90%。目前, 随着缢蛭养殖规模的不断扩大, 我国其他沿海地区缢蛭的养殖, 主要依靠采集浙闽沿海一带的野生蛭苗。由于缢蛭属于体外产卵受精, 而且具有短暂的浮游幼虫

期, 这种繁殖特性有可能导致异地苗种和当地苗种之间产生基因交流, 从而导致种质资源的混杂和稀有基因的丢失。

近几年, 关于缢蛭群体遗传结构的研究主要从整个沿海或者某个沿海区域的角度进行了阐述。利用 RAPD 技术检测了辽宁大连、浙江象山和福建的缢蛭养殖群体以及浙江临海滩涂野生群体的遗传多样性水平, 结果表明遗传平均杂合度均大于 0.19, 高于海洋贝类种群的平均遗传变异水平<sup>[1]</sup>。利用线粒体 *CO I* 序列分析了我国沿海 9 个缢蛭群体的遗传结构, 研究结果表明, 我国缢蛭群体的遗传多样性仍处于较高水平, 但是由于早期缢蛭的迁移养殖模式已经导致南北部群体间形成了一定的基因混杂<sup>[2]</sup>。

收稿日期: 2011-07-11 修回日期: 2011-10-10

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA10A410); 国家自然科学基金项目(31101897); 上海市教育委员会重点学科建设  
项目(海洋生物学 J50701); 上海市高校优青科研专项基金(SSC-09016); 上海市高校博士启动基金(A-2400-09-0144)

通讯作者: 李家乐, E-mail: jlli@shou.edu.cn

同时,缙蛭养殖群体和野生群体的遗传多样性结果揭示,养殖群体的遗传多样性要略低于野生群体,而且养殖群体与浙闽野生群体的关系较近,揭示养殖群体有可能来自于浙闽沿海一带<sup>[3-4]</sup>。但是对缙蛭主产区苗种的遗传结构却缺乏系统的分析研究。

微卫星是具有高度多态性的共显性标记,线粒体基因是进化速度较快的母系遗传标记,二者在水产动物的群体遗传学研究中已经得到了广泛应用<sup>[5-9]</sup>。因此本研究则利用微卫星标记和线粒体 *CO I* 序列分析了我国浙江和福建沿海地区缙蛭群体的遗传多样性和遗传关系,揭示缙蛭主产区种质资源现状,为缙蛭养殖的苗种选择及其良种选育工作提供重要的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

于2008年3月和5月,在浙江和福建沿海滩涂共采集8个缙蛭自然群体,分别是位于三门湾的宁海群体(NH)和三门群体(SM),乐清湾的玉环群体(YH)和乐清群体(YQ),位于闽江口的长乐群体(CL),兴化湾的涵江群体(HJ),湄洲湾的惠安群体(HA)以及泉州湾的石狮群体(SS)(表1)。样本在当地采集后,取其外套膜组织,在无水乙醇中固定备用。基于微卫星分析的样本量为每个群体40个个体,基于线粒体 *CO I* 标记的样本量为每个群体平均20个体。

表1 缙蛭群体采集地点  
Tab.1 Sampling sites of *S. constricta* populations

群体 population	采集地点 location	采集时间 date
宁海群体 NH	浙江省宁波市宁海县城关镇汶溪周村(N29.29°/E121.48°) Wenxi Village, Chengguan Town, Ninghai County, Ningbo City, Zhejiang Province	2008-05
三门群体 SM	浙江省台州市三门县海游镇园里村(N 29.11°/E 121.41°) Yuanli Village, Haiyou Town, Sanmen County, Taizhou City, Zhejiang Province	2008-05
玉环群体 YH	浙江省台州市玉环县珠港镇沙岙村(N 28.09°/E 121.16°) Shaao Village, Zhugang Town, Yuhuan County, Taizhou City, Zhejiang Province	2008-05
乐清群体 YQ	浙江省温州市乐清市翁垟镇沙头村(N 28.02°/E 120.59°) Shatou Village, Wengxiang Town, Yueqing County, Wenzhou City, Zhejiang Province	2008-05
长乐群体 CL	福建省福州市长乐市梅花镇梅新村(N 26.01°/E 119.40°) Meixin Village, Meihua Town, Changle County, Fuzhou City, Fujian Province	2008-03
涵江群体 HJ	福建省莆田市涵江区三江口镇哆头村(N 25.25°/E 119.08°) Duotou Village, Sanjiangkou Town, Hanjiang District, Putian City, Fujian Province	2008-03
惠安群体 HA	福建省泉州市惠安县辋川镇后任村(N 25.05°/E 118.52°) Houren Village, Wangchuan Town, Hui'an County, Quanzhou City, Fujian Province	2008-03
石狮群体 SS	福建省泉州市石狮市蚶江镇水头村(N 24.4°/E 118.39°) Shuitou Village, Hanjiang Town, Shishi County, Quanzhou City, Fujian Province	2008-03

### 1.2 基因组 DNA 提取

每个样本取0.5 g外套膜组织剪碎后,加入500  $\mu$ L组织匀浆缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 50 mmol/L EDTA, pH 8.0),混匀后加入终浓度为1%的SDS和200  $\mu$ g/mL的蛋白酶K,55  $^{\circ}$ C消化澄清。用等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)提取2次,然后加入2倍体积预冷的无水乙醇沉淀,70%乙醇洗涤两遍后干燥,TE溶解。紫外分光光度计测定样品DNA的OD<sub>260</sub>、OD<sub>280</sub>值,确定其浓度和纯度,母液置于

-20  $^{\circ}$ C保存。

### 1.3 微卫星数据分析

微卫星引物来自于磁珠富集法构建和筛选的缙蛭微卫星引物(*Sco*-117: EU272060, *Sco*-146: EU272063, *Sco*-221: EU272065, *Sco*-222: EU272066, *Sco*-400: EU285666, *Sco*-431: EU272072, *Sco*-448: EU272073, *Sco*-470: EU272076)<sup>[10]</sup>。

基于微卫星的群体遗传结构检测 PCR反应条件:94  $^{\circ}$ C预变性3 min;进行35个循环:94  $^{\circ}$ C变性30 s,48~55  $^{\circ}$ C退火30 s,72  $^{\circ}$ C延伸30 s,

最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 反应体系为 25  $\mu\text{L}$ , 含 10  $\times$  Buffer 2.5  $\mu\text{L}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  1.5 ~ 2.5 mmol/L, dNTP 0.2 mmol/L, *Taq* DNA 聚合酶 1 U, 上、下游引物各 0.2  $\mu\text{mol/L}$ , 模板 DNA 50 ~ 100 ng。PCR 扩增反应产物采用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 标准分子量标记 PUC18, 快速银染, Gelpro 4.5 分析每个扩增条带的标准分子量与产物量的差异性。

**数据统计和分析** 利用 GenAlEx 6.4<sup>[11]</sup> 计算各位点的观测等位基因数 ( $N_a$ , number of alleles per locus)、有效等位基因数 (effective number of alleles per locus,  $N_e$ ), 表观杂合度 (observed heterozygosity,  $H_o$ ) 和期望杂合度 (expected heterozygosity,  $H_e$ )。利用 DISPAN<sup>[12]</sup> 软件计算  $D_A$  遗传距离, 利用 MEGA 4.0 软件<sup>[13]</sup> 构建 NJ 系统发生树。

ARLEQUIN 3.0<sup>[14]</sup> 软件进行基因座间连锁不平衡分析,  $\chi^2$  检验估计群体 Hardy-Weinberg 平衡偏离, 根据 Bonferroni 方法<sup>[15]</sup> 校正显著性检验值。根据 Pairwise differences 计算遗传分化系数 ( $F$ -statistics,  $F_{ST}$ ), 并用排列测验法 (Permutation test) 检验  $F_{ST}$  的显著性 (重复次数为 1 000)。

#### 1.4 线粒体 CO I 序列分析

基于线粒体 CO I 的群体遗传结构检测 CO I 序列的扩增引物: LCO1490: 5' GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G 3', HCO2198: TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AATCA 3'<sup>[16]</sup>, 由上海生工生物工程技术有限公司合成。

PCR 反应条件为 94 °C 预变性 3 min, 进行 35 个循环: 94 °C 变性 40 s, 50 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 50 s, 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 反应体系为 25  $\mu\text{L}$ , 含 10  $\times$  Buffer 2.5  $\mu\text{L}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  2.0 mmol/L, dNTP 0.2 mmol/L, *Taq* DNA 聚合酶 1 U, 上、下游引物各 0.2  $\mu\text{mol/L}$ , 模板 DNA 50 ~ 100 ng。PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶检测, EB 染色, 于凝胶成像系统下观察并拍照记录。PCR 产物的纯化和测序工作由上海生工生物工程技术有限公司完成。

**数据统计和分析** DNA 序列利用 Bioedit 7.0<sup>[17]</sup> 进行编辑、校对和排序, Clustal X 进行同源比对。利用 DNASP 4.0<sup>[18]</sup> 计算群体单倍型, 单倍型多样性 (haplotype diversity,  $H_d$ ), 平均核苷酸差

异数 (average number of nucleotide differences,  $K$ ) 和核苷酸多样性 (nucleotide diversity,  $P$ ) 和变异位点 (mutation site,  $S$ )。

利用 ARLEQUIN 3.0<sup>[14]</sup> 估算群体间遗传分化系数 ( $F$ -statistics,  $F_{ST}$ ), 并用排列测验法 (Permutation test) 检验  $F_{ST}$  的显著性 (重复次数为 1 000)。利用 MEGA 4.0<sup>[13]</sup> 计算每个群体 DNA 序列的平均碱基组成和群体间的 Kimura 2-parameter 遗传距离, 采用邻接法 (Neighbour-Joining, NJ) 构建群体系统树。

## 2 结果

### 2.1 缙蛭群体遗传多样性分析

利用微卫星标记分析了 8 个群体的遗传多样性水平, 结果显示群体的平均观测等位基因数 ( $N_a$ ) 为 9.9 ~ 12.8, 有效等位基因数 ( $N_e$ ) 为 6.2 ~ 9.0, 表观杂合度 ( $H_o$ ) 为 0.744 ~ 0.828, 期望杂合度 ( $H_e$ ) 为 0.806 ~ 0.875, 其中 YH ( $H_e$ : 0.863) 和 SS ( $H_e$ : 0.875) 群体的遗传多样性相对较高 (表 2)。

利用通用引物扩增缙蛭线粒体 CO I 序列, 序列经排序、剪辑和比对后, 得到 556 bp 的同源基因序列, 其 GenBank 登记号为 EU239928。在 8 个群体共计 166 个个体中, 发现了 112 个单倍型, 80 个变异位点。群体遗传多样性的线粒体标记分析结果显示, 单倍型多态性为 0.942 ~ 1.000, 平均核苷酸差异数为 3.099 ~ 6.362, 核苷酸多样性指数为 0.005 6 ~ 0.011 5。群体的平均核苷酸多样性指数为 0.008 7, 其中 YH 和 YQ 群体核苷酸多样性指数相对较高 (0.011 5; 0.009 8) (表 3)。

### 2.2 缙蛭群体间遗传分化

基于微卫星标记的群体间遗传分化值为 0.001 4 ~ 0.063 8, 除 NH 和 SM 群体外 (0.001 4), 其他群体间均具有显著性差异; 基于线粒体 COI 标记的群体间遗传分化值为 0.000 9 ~ 0.368 0, 部分群体间具有显著性差异, 其中 HJ 群体与其他群体的遗传分化较大 ( $F_{ST}$ : 0.136 2 ~ 0.368 0) (表 4)。

### 2.3 缙蛭群体遗传距离和聚类分析

基于微卫星标记的群体间遗传距离为 0.078 5 ~ 0.275 7, 基于线粒体 CO I 标记的群体间遗传距离为 0.005 9 ~ 0.011 1 (表 5)。

表 2 缙蛭群体在 8 个微卫星位点的遗传多样性指数  
 Tab. 2 The genetic diversity indices of 8 microsatellite loci for *S. constricta* populations

群体 population	位点 locus								平均值 mean	
	<i>Sco</i> -117	<i>Sco</i> -146	<i>Sco</i> -221	<i>Sco</i> -222	<i>Sco</i> -400	<i>Sco</i> -431	<i>Sco</i> -448	<i>Sco</i> -470		
NH	$N_a$	16.0	18.0	8.0	10.0	7.0	11.0	9.0	11.0	11.3
	$N_e$	10.0	13.2	4.6	7.9	3.9	3.9	5.8	5.7	6.9
	$H_o$	1.000	0.975	0.475	1.000	0.525	0.875	0.950	0.675	0.809
	$H_e$	0.900	0.924	0.782	0.873	0.744	0.746	0.829	0.823	0.828
SM	$N_a$	14.0	18.0	7.0	12.0	7.0	13.0	8.0	17.0	12.0
	$N_e$	10.9	11.7	4.4	10.1	4.2	4.9	5.0	10.0	7.7
	$H_o$	0.789	0.943	0.475	0.950	0.550	0.900	0.800	0.625	0.754
	$H_e$	0.909	0.914	0.774	0.901	0.764	0.797	0.799	0.900	0.845
YH	$N_a$	17.0	16.0	7.0	21.0	12.0	11.0	7.0	11.0	12.8
	$N_e$	11.3	10.7	5.1	13.0	9.0	6.9	4.0	7.5	8.4
	$H_o$	0.771	0.806	0.175	0.750	0.828	0.950	0.875	0.794	0.744
	$H_e$	0.912	0.906	0.803	0.923	0.889	0.855	0.752	0.867	0.863
YQ	$N_a$	15.0	15.0	4.0	10.0	8.0	15.0	5.0	7.0	9.9
	$N_e$	10.6	8.7	2.8	6.9	5.7	6.9	3.5	4.1	6.2
	$H_o$	0.921	0.925	0.450	0.800	0.727	1.000	0.950	0.850	0.828
	$H_e$	0.905	0.885	0.647	0.856	0.826	0.856	0.716	0.758	0.806
CL	$N_a$	17.0	16.0	7.0	12.0	7.0	19.0	11.0	11.0	12.5
	$N_e$	12.3	11.3	4.1	9.7	3.8	10.9	5.7	4.7	7.8
	$H_o$	1.000	1.000	0.525	0.975	0.475	1.000	0.875	0.775	0.828
	$H_e$	0.918	0.912	0.754	0.897	0.740	0.908	0.824	0.785	0.842
HJ	$N_a$	14.0	17.0	8.0	15.0	6.0	16.0	12.0	9.0	12.1
	$N_e$	10.6	12.6	3.1	9.0	3.6	10.3	5.0	3.8	7.3
	$H_o$	0.897	1.000	0.325	1.000	0.475	1.000	0.875	0.650	0.778
	$H_e$	0.906	0.921	0.678	0.889	0.721	0.903	0.801	0.738	0.820
HA	$N_a$	17.0	12.0	6.0	11.0	9.0	14.0	11.0	14.0	11.8
	$N_e$	13.2	8.6	3.3	8.3	5.9	9.7	5.7	10.4	8.1
	$H_o$	0.850	0.844	0.250	0.875	0.806	0.925	0.975	0.811	0.792
	$H_e$	0.924	0.883	0.699	0.88	0.830	0.897	0.823	0.904	0.855
SS	$N_a$	16.0	17.0	7.0	15.0	11.0	12.0	11.0	12.0	12.7
	$N_e$	12.6	13.0	4.0	9.9	7.4	8.5	8.2	8.7	9.0
	$H_o$	0.889	0.920	0.237	1.000	0.811	0.975	0.900	0.806	0.817
	$H_e$	0.921	0.923	0.750	0.899	0.865	0.882	0.878	0.885	0.875
平均值 mean	$N_a$	15.8	16.1	6.8	13.3	8.4	13.9	9.3	11.5	11.9
	$N_e$	11.4	11.2	3.9	9.3	5.5	7.8	5.4	6.9	7.7
	$H_o$	0.890	0.927	0.364	0.919	0.650	0.953	0.900	0.748	0.794
	$H_e$	0.912	0.909	0.736	0.890	0.797	0.856	0.803	0.833	0.842

注: \* 表示显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡 ( $P < 0.006$ , Bonferroni 方法校正值)。

Notes: \* indicated significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium ( $P < 0.006$ , Bonferroni-corrected value).

表 3 基于线粒体 *CO I* 序列的缙蛭群体遗传多样性指数  
 Tab. 3 Genetic diversity of *S. constricta* populations based on mitochondria *CO I* sequences

群体 population	个体 <i>N</i>	多态位点数 <i>S</i>	单倍型 haplotype	单倍型多态性 $H_d$	平均核苷酸差异数 <i>K</i>	核苷酸多样性指数 <i>P</i>
NH	20	19	16	0.979	3.626	0.006 5
SM	23	28	20	0.984	4.723	0.008 5
YH	24	35	23	0.996	6.362	0.011 5
YQ	19	28	19	1.000	5.450	0.009 8
CL	20	22	16	0.979	4.516	0.008 1
HJ	21	26	19	0.990	4.171	0.007 5
SS	19	19	15	0.959	3.099	0.005 6
HA	20	20	15	0.942	3.484	0.006 3
总计 total	166	80	112	0.986	4.885	0.008 7

表 4 缙蛭群体间的遗传分化(对角线下:基于微卫星数据;对角线上:基于线粒体 *CO I* 序列)  
 Tab. 4 Genetic differentiation ( $F_{ST}$ ) based on microsatellite loci (below diagonal) and mitochondria *CO I* sequences (above diagonal) of *S. constricta* populations

	NH	SM	YH	YQ	CL	HJ	HA	SS
NH		0.009 7	0.018 0	0.006 6	0.051 0*	0.262 2*	0.004 3	0.020 5
SM	0.001 4		0.019 7	0.007 5	0.074 6*	0.244 2*	0.026 2	0.019 3
YH	0.037 1*	0.034 3*		0.010 3	0.013 2	0.138 2*	0.056 3*	0.079 5*
YQ	0.045 8*	0.037 6*	0.028 5*		0.032 7	0.136 2*	0.053 5*	0.066 9*
CL	0.031 3*	0.023 6*	0.026 9*	0.026 3*		0.137 2*	0.098 1*	0.156 3*
HJ	0.038 7*	0.025 2*	0.032 4*	0.022 3*	0.016 7*		0.328 9*	0.368 0*
HA	0.045 3*	0.040 2*	0.063 8*	0.054 1*	0.041 7*	0.035 6*		0.000 9
SS	0.048 1*	0.038 2*	0.045 1*	0.041 5*	0.033 5*	0.032 8*	0.011 8*	

注: \* 表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Notes: \* indicates the difference is significant ( $P < 0.05$ ).

表 5 缙蛭群体间的遗传距离(对角线下:基于微卫星;对角线上:基于线粒体 *CO I* 序列)  
 Tab. 5 Genetic distance of *S. constricta* populations based on microsatellite loci (below diagonal) and mitochondria *CO I* sequences (above diagonal)

	NH	SM	YH	YQ	CL	HJ	HA	SS
NH		0.007 6	0.009 2	0.008 2	0.007 7	0.009 6	0.006 4	0.006 2
SM	0.144 8		0.010 2	0.009 1	0.009 0	0.010 7	0.007 6	0.007 2
YH	0.213 7	0.275 7		0.010 6	0.010 0	0.011 1	0.009 5	0.009 4
YQ	0.156 4	0.203 5	0.187 6		0.009 3	0.010 1	0.008 3	0.008 2
CL	0.106 3	0.176 6	0.181 8	0.120 0		0.009 1	0.008 0	0.008 2
HJ	0.143 4	0.186 4	0.213 0	0.122 9	0.078 5		0.010 3	0.010 4
HA	0.177 2	0.197 1	0.263 6	0.188 9	0.148 8	0.162 8		0.005 9
SS	0.192 5	0.214 7	0.236 5	0.159 6	0.151 1	0.153 5	0.0926	

基于微卫星标记的群体聚类树表明, NH、SM 群体首先与 SS、HA 群体聚类, 之后与 CL、HJ 群体聚类, 最后与 YH、YQ 群体聚在一起(图 1); 基

于线粒体 *CO I* 标记的群体聚类树显示, SS 和 HA 首先聚类, 之后依次与 NH, SM, YQ, YH 聚类, 最后与 CL、HJ 聚在一起(图 2)。

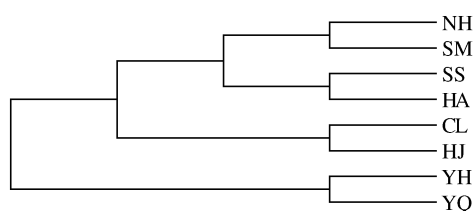


图1 基于微卫星位点的缢蛏群体 NJ 系统树

Fig.1 NJ phylogenetic tree of *S. constricta* populations based on microsatellite loci

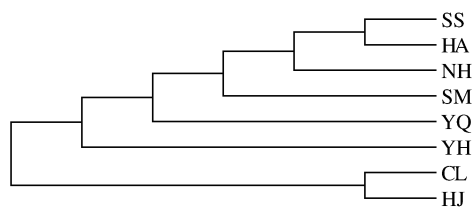


图2 基于线粒体 CO I 序列的缢蛏群体 NJ 系统树

Fig.2 NJ phylogenetic tree of *S. constricta* populations based on mitochondria CO I sequences

### 3 讨论

#### 3.1 群体遗传多样性

遗传变异既是生物生存和适应的基础,也是物种发生、选择、进化的基础。一个物种或群体的进化潜力和抵御不良环境的能力既取决于种内遗传变异的大小,也有赖于遗传变异的群体结构。一个物种或群体遗传多样性越大或遗传变异越丰富,对环境变化的适应能力就越强,越容易扩展其分布范围和开拓新的生存环境。一般而言,由于养殖群体在人工繁殖时亲本数量有限,近交机会增加,以及群体规模较小,特定的环境等因素往往在不同程度上导致养殖群体遗传多样性水平低于野生群体<sup>[19]</sup>,在皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*)<sup>[20-21]</sup>,文蛤 (*Meretrix meretrix*)<sup>[22]</sup>,西施马珂蛤 (*Coelomacra antiquata*)<sup>[23]</sup>,合浦珠母贝 (*Pinctada fucata*)<sup>[24]</sup>,四角蛤蜊 (*Macra veneriformis*)<sup>[25]</sup>等均有所探讨。

缢蛏养殖主要依靠采集野生蛏苗进行当地或者异地播种,长期以来这种半人工养殖模式有可能影响缢蛏的种群遗传结构。我国福建地区最早开展缢蛏养殖,之后传播到浙江地区,目前为止,福建和浙江的主要海湾如浙江省三门湾和乐清湾以及福建省闽江口、东港、兴化湾、湄洲湾和泉州湾仍然是缢蛏主要的苗种产区,不断输入到其他

沿海地区进行养殖,养殖规模也在不断扩大,因此关于该地区缢蛏种质资源状况的系统研究就显得尤为重要。本研究利用微卫星标记分析了我国浙闽地区缢蛏 8 个群体的遗传多样性水平分析,结果表明平均表观杂合度为 0.794,平均期望杂合度为 0.842;基于线粒体 CO I 标记的分析结果显示,总的核苷酸遗传多样性指数为 0.0087,单倍型多态性达到了 0.986,种水平上的遗传多样性较高。大多数贝类的种群遗传多样性较高,这可能与贝类的繁殖方式和生活方式有关系<sup>[26-27]</sup>。缢蛏的平均产卵量可以达到 193 000 粒,而且后期具有 6~9 d 的浮游幼虫阶段,这些生物学特性使得缢蛏可以抵御早期阶段不可预期的死亡,从而保障物种的繁衍和生存能力。

虽然浙闽地区缢蛏养殖历史悠久,但是从目前看来,其种质资源现状并不悲观,正是由于缢蛏这种采集野生苗种的养殖方式以及特殊的生物学特性,在一定程度上增加了繁殖的有效群体,降低了近亲交配的几率,因此种群得以保持相对较高的遗传多样性水平。

#### 3.2 群体遗传分化和聚类分析

一般认为具有浮游幼虫期的海洋贝类,可以在比较广泛的区域内进行扩散,从而呈现较低的遗传分化水平<sup>[28]</sup>。本研究发现,基于线粒体 CO I 标记,群体间遗传分化水平位于 0.0009~0.3680,其中 HJ 群体与其他群体间的遗传分化达到了 0.1362~0.3680。基于微卫星标记,群体间遗传分化水平位于 0.0014~0.0638, NH 和 SM 群体(0.0014), SS 和 HA 群体(0.0118)之间具有较低的遗传分化。由于缢蛏生活在海湾潮间带,其水体交流相对局限,形成了天然屏障,导致位于同一海湾内的群体遗传分化较低。

基于微卫星标记的群体间聚类结果显示, NH 和 SM 群体, SS 和 HA 群体, CL 和 HJ 群体, YQ 和 YH 群体分别首先聚类,而之后的聚类关系表明, SS、HA 群体与 NH、SM 群体首先聚类,接着与 CL、HJ 群体,最后与 YH、YQ 群体聚类。基于线粒体标记的聚类结果与微卫星结果相似。因此根据遗传分化和聚类结果,表明位于三门湾的 NH 和 SM 群体以及位于乐清湾的 YQ 和 YH 群体均具有较近的遗传关系,说明一个湾内的群体具有较高的遗传相似性。通常,海水贝类的群体分化和聚类关系符合地理隔离模式(isolation by

distance, IBD)<sup>[28-29]</sup>。但是,缢蛭 8 个群体的遗传关系并没有完全按照地理位置聚类,而是呈现出浙江群体位于福建群体之间(基于线粒体标记),或者福建群体位于浙江群体之间(基于微卫星标记)。这种聚类结果揭示出浙江和福建缢蛭群体间可能出现了种苗混杂。由于缢蛭属于底栖贝类,具有短暂的浮游幼虫期,从而允许其在一定区域内进行群体间的基因交流,但是浙江和福建沿海缢蛭的繁殖季节不同,很难进行自然交流。据历史记载,缢蛭养殖最早在福建开展,而后发展到浙江沿海,而福建石狮市和惠安一代是缢蛭最早的产苗区,是缢蛭养殖的重要苗种来源,由此可见,浙江北部沿海的蛭苗最早可能来源于福建南部沿海。而长期的养殖过程,异地苗种的引进和繁殖,对当地缢蛭群体的遗传结构可能造成影响,从而打破了原有的遗传结构,逐渐形成了适应当地的新种群,这正是人类选择和自然选择的双重结果。

#### 参考文献:

- [1] 李成华,李太武,宋林生,等. 4 个缢蛭群体遗传结构的 RAPD 分析[J]. 水产科学, 2004, 23(12): 26-28.
- [2] 牛东红,陈慧,王树亮,等. 我国沿海缢蛭群体遗传结构的 mtDNA-CO I 分析[J]. 动物学杂志, 2010, 45(2): 11-18.
- [3] 牛东红,李家乐,汪桂玲,等. 缢蛭六群体 16S rRNA 基因片段序列的差异分析[J]. 上海水产大学学报, 2007, 16(1): 1-6.
- [4] 牛东红,李家乐,沈和定,等. 缢蛭六群体线粒体 DNA CO I 基因序列变异及群体遗传结构分析[J]. 海洋学报, 2008, 30(30): 109-116.
- [5] 孙鹏,尹飞,彭士明,等. 条石鲷线粒体 CO I 和 Cyt b 序列的遗传变异分析[J]. 水产学报, 2011, 35(3): 327-333.
- [6] 叶小军,王志勇,刘贤德,等. 大黄鱼连续 4 代选育群体遗传多样性与遗传结构的微卫星分析[J]. 水产学报, 2010, 34(4): 500-508.
- [7] YUE G H, ZHU Z Y, LO L C, *et al.* Genetic variation and population structure of Asian seabass (*Lates calcarifer*) in the Asia-Pacific region [J]. Aquaculture, 2009, 293(1-2): 22-28.
- [8] LIU F, XIA J H, BAI Z Y, *et al.* High genetic diversity and substantial population differentiation in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) revealed by microsatellite analysis [J]. Aquaculture, 2009, 297(1-4): 51-56.
- [9] LI J, WANG G, BAI Z. Genetic variability in four wild and two farmed stocks of the Chinese freshwater pearl mussel (*Hyriopsis cumingii*) estimated by microsatellite DNA markers [J]. Aquaculture, 2009, 287(3-4): 286-291.
- [10] 牛东红,李家乐,郑润玲. 缢蛭微卫星序列分离及特性分析[J]. 中国海洋大学学报, 2008, 38(5): 733-738.
- [11] PEAKALL R, SMOUSE P E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research [J]. Molecular Ecology Notes, 2006, 6(1): 288-295.
- [12] Dispan: Genetic distance and phylogenetic analysis [OL]. <http://www.bio.psu.edu/People/Faculty/Nei/Lab/Programs.html>.
- [13] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, *et al.* MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [14] EXCOFFIER L, LAVAL G, SCHNEIDER S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis [J]. Evolutionary Bioinformatics, 2005, 1: 47-50.
- [15] RICE W R. Analyzing tables of statistical tests [J]. Evolution, 1989, 43(1): 223-225.
- [16] FOLMER O, BLACK M, HOEH W, *et al.* DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrate [J]. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 1994, 3: 294-299.
- [17] HALL T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. Nucleic Acids Symposium Series, 1999, 41: 95-98.
- [18] HROZAS J, SÁNCHEZ-DELBARRIO J C, MESSEGUER X, *et al.* DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods [J]. Bioinformatics, 2003, 19(18): 2496-2497.
- [19] EVANS B, BARTLETT J, SWEIJND N, *et al.* Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery produced abalone in Australia (*Haliotis rubra*) and South Africa (*Haliotis midae*) [J]. Aquaculture, 2004, 233(1-4): 109-127.
- [20] 束靖,李琪,于瑞海,等. 皱纹盘鲍野生与养殖群体微卫星标记遗传变异研究[J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2008, 38(1): 52-58.
- [21] 李莉,孙振兴,杨树德,等. 用微卫星标记分析皱纹

- 盘鲍群体的遗传变异[J]. 遗传, 2006, 28(12): 1549-1554.
- [22] 赫崇波, 丛林林, 葛隍利, 等. 文蛤养殖群体和野生群体遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 中国水产科学, 2008, 15(2): 215-221.
- [23] KONG L, LI Q, QIU Z. Genetic and morphological differentiation in the clam *Coelomacra antiquata* (Bivalvia: Veneroida) along the coast of China[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2007, 343(1): 110-117.
- [24] YU D H, CHU K H. Genetic variation in wild and cultured populations of the pearl oyster *Pinctada fucata* from southern China[J]. Aquaculture, 2006, 258: 220-227.
- [25] HOU L, LÜ H L, ZOU X Y, et al. Genetic characterizations of *Macra veneriformis* (Bivalve) along the Chinese coast using ISSR-PCR markers[J]. Aquaculture, 2006, 261: 865-871.
- [26] BOHONAK A J. Dispersal, gene flow, and population structure[J]. The Quarterly Review of Biology, 1999, 74(1): 21-45.
- [27] TARIS N, ERNANDE B, MCCOMBIE H, et al. Phenotypic and genetic consequences of size selection at the larval stage in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2006, 333(1): 147-158.
- [28] ARNAUD S, MONTEFORTE M, GALTIER N, et al. Population structure and genetic variability of pearl oyster *Pinctada mazatlanica* along Pacific coasts from Mexico to Panama[J]. Conservation Genetics, 2000, 1(4): 299-307.
- [29] LAUNEY S, LEDU C, BOUDRY P, et al. Geographic structure in the European flat oyster (*Ostrea edulis* L.) as revealed by microsatellite polymorphism[J]. Journal of Heredity, 2002, 93(5): 331-351.



## Microsatellites and mitochondrial *CO I* analysis of population genetic structure of *Sinonovacula constricta* along the coast of Zhejiang and Fujian Provinces

NIU Dong-hong<sup>1</sup>, FENG Bing-bing<sup>1</sup>, LIU Da-bo<sup>1</sup>, SHEN He-ding<sup>1</sup>, LI Jia-le<sup>1,2\*</sup>

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Aquaculture Division, E-Institute of Shanghai Universities, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** The razor clam, *Sinonovacula constricta*, which belongs to Mollusca, Bivalvia, Veneroida, Solecurtidae, is a common shellfish as human seafood, living in the lower-to-mid intertidal zones along the coast of the West Pacific Ocean. The genetic structure of the razor clam has not been reported along the coast of Zhejiang and Fujian Provinces, the major aquaculture regions in China following the widespread culture. In this study, genetic structure of eight populations of *S. constricta* from Zhejiang and Fujian Provinces (NH, SM, YH, YQ, CL, HJ, HA and SS) was estimated by using microsatellite loci and mitochondria *CO I* sequences. Based on microsatellite loci, the effective allele gene ( $N_e$ ) number ranged from 6.2 to 9.0, and the expected heterozygosity ( $H_e$ ) was high, ranging from 0.806 to 0.875. Based on mitochondria *CO I*, haplotype diversity ( $H_d$ ) ranged from 0.942 to 1.000 and nucleotide diversity ( $P$ ) varied from 0.0056 to 0.0115. The analysis of genetic differentiation revealed that the  $F_{ST}$  values ranged from 0.0014 to 0.0638 based on microsatellite loci and from 0.0009 to 0.3680 based on mitochondria *CO I*. The phylogenetic tree analyses showed that the genetic relationships of eight populations were not consistent with a model of isolation by distance (IBD), but the populations within one bay could be clustered first. It is suggested that the razor clam contains high genetic diversity, but gene flow exists between Zhejiang populations and Fujian populations based on the genetic relationship.

**Key words:** *Sinonovacula constricta*; microsatellite; mtDNA; genetic structure

**Corresponding author:** LI Jia-le. E-mail: jlli@shou.edu.cn