



基于线粒体 *CO I* 和 *Cytb* 基因探讨北鲍南养对 皱纹盘鲍群体遗传结构的影响

吴 宙^{1,2}, 周丽青^{2*}, 迟长风¹, 吴 彪², 孙秀俊²,
刘志鸿², 赵 丹², 于 涛³, 郑言鑫³

(1. 浙江海洋大学, 国家海洋设施养殖工程技术研究中心,

海洋生物物质发掘与利用国家地方联合实验室, 浙江 舟山 316022;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071;

3. 中国水产科学研究院长岛增殖实验站, 山东 烟台 265800)

摘要: 为探讨近三十年来我国皱纹盘鲍养殖模式对群体遗传结构产生的影响, 利用线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 (*CO I*) 基因和细胞色素 b (*Cytb*) 基因分析了定殖漳州的群体、大连培育蓬莱越冬群体、荣成培育福建越冬群体及长山列岛 (砣矶岛、大钦岛、南隍城岛) 皱纹盘鲍群体的遗传多样性与群体遗传结构。结果显示, 在 259 个个体 730 bp 的 *CO I* 序列片段中检测到 48 个变异位点和 30 个单倍型, 6 个群体的单倍型多样性为 0.586~0.897, 核苷酸多样性为 0.0056~0.0081。259 个个体 730 bp 的 *Cytb* 序列片段中检测到 59 个变异位点和 32 个单倍型, 6 个群体的单倍型多样性为 0.605~0.909, 核苷酸多样性为 0.0077~0.0120。基于 *CO I* 和 *Cytb* 基因的群体间 F_{st} 值以及 AMOVA 结果表明, 绝大部分群体之间存在显著的遗传分化, 并且遗传变异主要来源于群体内。现行的皱纹盘鲍北鲍南养模式加强了不同群体之间的基因交流, 使不同遗传背景的种群二次接触, 导致皱纹盘鲍 6 个群体均具有较高的单倍型多样性和核苷酸多样性; 而各养殖群体中的不同选育条件则可能是造成显著遗传分化的重要原因。本研究对分属南北沿海的 6 个皱纹盘鲍群体的遗传评估将为我国皱纹盘鲍资源的合理利用以及养殖模式对遗传结构的影响提供科学依据。

关键词: 皱纹盘鲍; 细胞色素 C 氧化酶亚基基因; 细胞色素 b 基因; 遗传多样性; 遗传结构
中图分类号: Q 347; S 931.5 **文献标志码:** A

皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*) 属腹足纲 (Gastropoda) 前鳃亚纲 (Prosobranchia) 原始腹足目 (Archaeogastropoda) 鲍科 (Haliotidae) 鲍属 (*Haliotis*), 自然分布于朝鲜半岛、日本北部以及我国山东半岛、辽东半岛沿海^[1-2], 属于北方冷水物种。皱纹盘鲍具有很高的经济价值与营养价值, 有“海洋软黄金”之称, 是我国一种重要的水产养殖贝类。

在 20 世纪 50 年代, 我国皱纹盘鲍的捕捞量超 100 t, 捕捞量过大使得自然资源遭受严重破坏, 至 70 年代捕捞量仅有 20~30 t。为恢复皱纹盘鲍资源, 其人工繁殖、育苗、增殖放流试验也随之展开^[3-4], 并取得突破性进展, 至 20 世纪 90 年代, 我国开展了皱纹盘鲍“南北接力”的养殖试验, 将北方培育的皱纹盘鲍苗种于 11 月运输至福建海区

收稿日期: 2021-08-05 修回日期: 2021-10-26

资助项目: 国家重点研发计划蓝色粮仓项目 (2018YFD0900803)

第一作者: 吴宙 (照片), 从事贝类遗传育种研究, E-mail: wxzmmeda@163.com

通信作者: 周丽青, 从事贝类遗传育种研究, E-mail: zhoulq@ysfri.ac.cn



养殖, 到次年 5 月再运回北方养殖, 成功避免了皱纹盘鲍稚鲍在北方寒冷的冬季因水温过低生长缓慢、死亡率高和在南方水域夏季温度过高导致大量死亡的风险。20 世纪 90 年代后期到 2010 年, 皱纹盘鲍种群杂交技术的突破及应用推动了我国皱纹盘鲍养殖产业重心南移至福建省, “北鲍南养”使得皱纹盘鲍人工养殖产业得到迅速发展^[3], 也成为我国鲍鱼养殖的主要品种。

人工养殖与选育的进程会在一定程度上影响物种遗传多样性水平, 或改变其原有的遗传结构, 甚至使群体发生显著的遗传分化。张国范等^[5]利用皱纹盘鲍中国群体和日本野生群体进行单自交与单正反杂交获得了 4 个 F₁ 家系, 通过 RAPD 分析发现两个杂交组合家系的杂合度均高于自交组合, 推测杂交产生杂种优势, 使其遗传多样性水平有所提高。高祥刚等^[6]采用 AFLP 标记技术对国内雌性皱纹盘鲍与日本野生雄性皱纹盘鲍杂交的 F₁ 群体遗传结构进行了研究, 发现其遗传多样性水平显著高于日本野生群体, 认为群体间的杂交可以有效提高遗传多样性。李莉等^[7]通过微卫星标记分析发现, 皱纹盘鲍养殖群体遗传多样性低于野生群体, 但仍处于较高水平, 认为选用野生皱纹盘鲍个体与遗传距离较大的个体作为亲本, 可避免因近亲交配而导致的遗传多样性下降。Li 等^[8]利用 7 个微卫星标记, 同样发现养殖群体的遗传多样性显著低于野生群体, 且各群体之间发生显著的遗传分化, 认为亲鲍数量少且雄雌性比例低是造成养殖群体遗传变异显著减少的原因。

微卫星标记技术具有特异性 PCR 扩增、多态性丰富、突变量高、遵循孟德尔共显性遗传等特点^[9], 因此近年来我国研究人员主要采用微卫星

标记的方法来研究皱纹盘鲍群体遗传多样性^[10-12], 但开发新的微卫星标记存在工作繁琐、费时、成本高等缺点^[9]。而目前国内尚未见有基于线粒体 DNA 标记手段研究皱纹盘鲍群体遗传结构和遗传多样性比较详尽的相关报道。线粒体 DNA (mtDNA) 具有母系遗传、进化速率快、分子简单、几乎不发生重组等特点, 已被广泛应用于群体遗传学、生物系统发育研究^[9, 13-14]。其中 mtDNA 细胞色素 C 氧化酶亚基 (CO I) 基因和细胞色素 b (Cytb) 基因进化速率适中, 适合种群水平基因差异检测, 是研究群体遗传结构、遗传多样性的理想标记^[15-18]。本研究采集了我国南北沿海 6 个皱纹盘鲍群体样本, 基于 CO I、Cytb 基因序列分析了各群体皱纹盘鲍的遗传结构与遗传多样性, 为评估我国皱纹盘鲍遗传资源以及研究养殖模式对遗传结构的影响提供了科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

6 个群体的皱纹盘鲍分别于 2020 年 8 月—2021 年 3 月取自福建漳州 (ZZ)、辽宁大连 (DL)、山东荣成 (RC) 及长山列岛的南隍城岛 (NH)、砣矶岛 (TJ)、大钦岛 (DQ)。其中 ZZ 群体为洋下群体, 长期定殖于漳州, 属累代养殖群体; DL 群体为大连繁育至蓬莱越冬群体, 属非累代养殖群体; RC 群体为养殖公司繁育群体, 属累代养殖群体; NH 群体为累代养殖群体; TJ 群体养殖方式为吊笼养殖, 成长到一定规格后即全部售出, 属非累代养殖群体; DQ 群体为野生群体, 6 个皱纹盘鲍群体采样信息见表 1。活体鲍采集至实验室解剖, 取肌肉组织液氮速冻后置于 -80 °C 超低温冰箱保

表 1 皱纹盘鲍采样信息

Tab. 1 Sampling information of *H. discus hannai*

群体 population	经度(E) longitude	纬度(N) latitude	采样日期 sampling date	样本数/只 number of samples
ZZ	117°51'57.72"	24°7'58.81"	2020-11-06	45
DL	121°31'19.00"	38°52'26.43"	2020-08-23	50
RC	122°33'37.27"	37°8'40.55"	2020-11-04	39
TJ	120°45'42.87"	38°9'29.19"	2020-08-23	50
DQ	120°50'5.05"	38°17'54.60"	2021-03-13	39
NH	120°54'51.41"	38°20'59.71"	2020-08-23	36

注: ZZ.漳州, DL.大连, RC.荣成, TJ.砣矶岛, DQ.大钦岛, NH.南隍城岛, 下同。

Notes: ZZ. Zhangzhou, DL. Dalian, RC. Rongcheng, TJ. Tuoji Island, DQ. Daqin Island, NH. Nanhuangcheng Island, the same below.

存备用。本实验严格按照中国水产科学研究院实验动物的护理和使用指南开展。

1.2 DNA 提取、PCR 扩增与测序

取皱纹盘鲍肌肉组织, 采用酚-氯仿抽提法进行 DNA 提取。提取完毕后以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测、Gene finder 染色, 成像系统观察与拍照, 并利用 NanoDrop Lite 超微量分光光度计测量 DNA 的浓度与纯度。取质量较好的 DNA 部分稀释至 50 ng/ μ L, 置于 -80°C 超低温冰箱保存备用。

根据皱纹盘鲍线粒体基因序列 (登录号: EU595789.1), 利用 Primer 3 软件进行 *CO I*、*Cytb* 基因引物设计并交由北京擎科生物科技股份有限公司青岛分公司进行测序分析。引物序列分别为 *CO I*-F: (5'-TTCTGACTCCTCCCACCATC-3'); *CO I*-R: (5'-GCGAATACGGCTCCTATTGA-3'); *Cytb*-F: (5'-CGTGAATTATGGGTGGCTCT-3'); *Cytb*-R: (5'-AGTAAACACACGCCCAATCC-3')。PCR 反应体系: 2 \times Taq Plus Master Mix II 25 μ L, 正反引物各 2 μ L, DNA 模板浓度 50 ng/ μ L, 取 1 μ L, 补充 ddH₂O 至总体积为 50 μ L。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 30 个循环, 每个循环包括 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s、58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 最后彻底延伸 5 min。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 成像系统观察、拍照, 选择具有单一明亮条带的 PCR 产物原液, 交由北京擎科生物科技股份有限公司青岛分公司纯化、测通。

1.3 数据分析

所有序列均用 Chromas 2.33 软件观察峰图、校对数据, 将有杂峰、双峰的样品重新测序。利用 Bioedit 7.0.5 软件对所有序列进行序列比对、剪切。利用 DNAsp 5.10 软件^[19] 计算核苷酸变异位点、单倍型数、各群体单倍型多样性 (haplotype diversity, H_d)、核苷酸多样性 (nucleotide diversity, π)、平均核苷酸差异指数 k (mean pairwise difference) 等遗传多样性参数。利用 MEGA 6.06^[20] 以红鲍 (*H. rufescens*)、新西兰鲍 (*H. iris*) 为外类群, 通过邻接法 (Neighbor-joining, NJ) 构建皱纹盘鲍各单倍型的系统发育树。利用 Arlequin 3.5 软件^[21] 进行 AMOVA^[22] 方差分析, 分析皱纹盘鲍群体间遗传变异情况, 采用分化固定指数 (F_{st}) 以 1000 次重抽样检验方法来评估两两群体间的遗传分化程度。利用 Popart 1.7 软件^[23] 构建单倍型网络图。

2 结果

2.1 *CO I* 基因序列结果分析与遗传多样性

PCR 产物经纯化、测序、序列比对、剪切后得到 730 bp *CO I* 基因部分序列。基于研究的 6 个群体 259 个个体的 *CO I* 基因序列中, 发现碱基 A、T、C、G 比例为 28.56%、31.05%、23.60%、16.79%。A+T 碱基含量为 59.61%, C+G 碱基含量 40.39%, 具有明显的 A+T 碱基偏倚性。此外, 共发现 48 个变异位点, 碱基变异比例为 6.6%。其中单一信息位点 13 个, 简约信息位点 35 个。变异类型均为转换, 无碱基的颠换、插入与缺失。

在 259 个个体中, 共定义了 30 种单倍型, 其中优势单倍型为 Hap2、Hap3, 分别占个体总数的 17.4%、33.2%。Hap2、Hap3、Hap6 为 6 个群体共有单倍型, Hap8、Hap11 为 DL 群体特有单倍型, Hap15 为 ZZ 群体特有单倍型, Hap17~19 为 NH 特有单倍型, Hap20、Hap21 为 DQ 特有单倍型, Hap25~30 为 TJ 群体特有单倍型。TJ 群体的单倍型种类最多 (18 个), RC 群体的单倍型种类最少 (6 个)。以红鲍、新西兰鲍为外类群和所有检测的单倍型构建的 NJ 系统发育树见图 1, 结果显示, 两外群的基因分布在 NJ 树的最末端, 30 个单倍型广泛分散在 NJ 树的各个分支, 仅砵矶岛群体的单倍型 Hap25 独立为一支, 可以明显看出单倍型与地理群体间不存在明确的对应关系。构建的单倍型网络图见图 2, 其与 NJ 发育树呈现了相同的结果, 但在图中可以明显看出, 不同单倍型之间具有显著的碱基差异。

皱纹盘鲍 6 个群体 *CO I* 基因的遗传多样性参数见表 2, 6 个群体总体的 H_d (0.586~0.897)、 π (0.0056~0.0081) 处于较高水平, 其中 TJ 群体的 H_d (0.897 \pm 0.028) 与 π (0.0081 \pm 0.0008) 均为最高, NH 群体的 H_d (0.586 \pm 0.093) 最低, DL 群体 π (0.0056 \pm 0.0006) 最低, 总体呈现高单倍型多样性与高核苷酸多样性的特征。

群体间分化指数 F_{st} 值见表 3, 大部分群体间的分化指数达到了显著性水平 ($P < 0.05$), 仅 DL 与 TJ 群体、DQ 与 NH 群体之间的 F_{st} 未达到显著性水平 ($P > 0.05$), 表明绝大多数群体间均存在遗传分化。RC 群体与其余 5 个群体的分化指数范围为 0.1665~0.3167; 均达到高程度遗传分化, ZZ 与 TJ 之外的 4 群体为中等程度及以上遗传分化 (F_{st} : 0.0556~0.2039), 其余群体两两间的遗传分

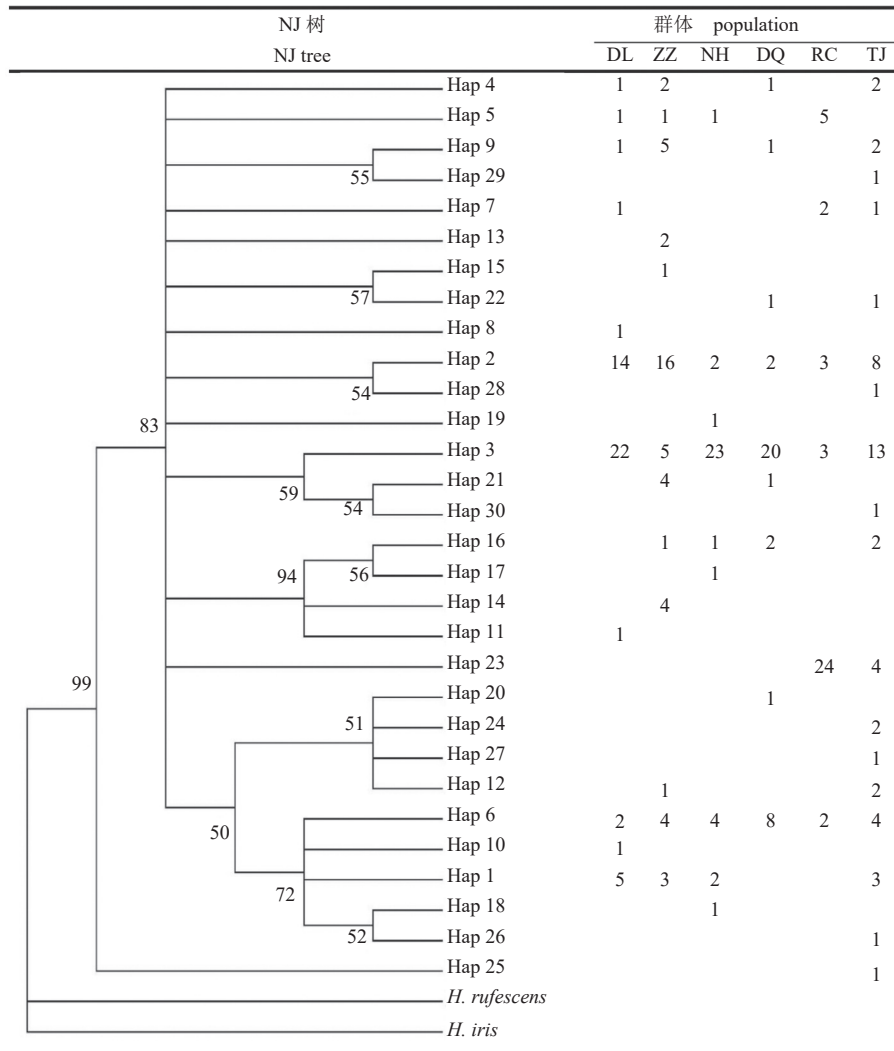


图 1 皱纹盘鲍 CO I 基因序列构建的 NJ 进化树及在 6 个群体中的分布

Fig. 1 Neighbor-joining phylogenetic tree of CO I haplotypes and their distribution in 6 populations of *H. discus hannai*

化均为低度分化 ($F_{st} < 0.05$)。

由 AMOVA 分析可知, 将 6 个群体均归为一个组群进行分析时, 群体间的遗传变异占总变异的 12.05%, 群体内的遗传变异占总变异的 87.95%, 表明遗传变异主要来源于群体内, 并且群体间遗传分化达到极显著水平 ($F_{st} = 0.1205, P < 0.01$) (表 4)。

2.2 Cytb 基因序列结果分析与遗传多样性

经序列比对、剪切后同样得到 730 bp 的 *Cytb* 基因部分序列。6 个群体皱纹盘鲍的 A、T、C、G 组成比例分别为 20.27%、40.2%、16.95%、22.58%。A+T 出现频率为 60.47%, C+G 的出现频率为 39.53%。同 CO I 基因类似, 表现出明显的 A+T 碱基偏向性。共发现 59 个变异位点, 其中单一信息位点 21 个, 简约信息化位点 38 个。变异

类型均为转换, 无碱基的颠换、插入与缺失。

皱纹盘鲍 259 个个体中, 共检测到了 32 个单倍型。其中优势单倍型为 Hap2、Hap3, 并为 6 个群体共有, 出现频率分别为 16.21%、33.20%, 单倍型 Hap9、Hap12 仅在 DL 群体出现过 1 次, Hap17~22 仅在 NH 群体出现过 1 次, Hap23 仅在 DQ 群体出现过 1 次, Hap27~32 仅在 TJ 群体出现了 1 次。其中 TJ 群体拥有最多的单倍型 (19 个), RC 群体拥有最少的单倍型 (7 个)。基于 *Cytb* 基因以红鲍、新西兰鲍为外类群和所有检测的单倍型构建的 NJ 系统发育树见图 3, 构建的单倍型网络图见图 4, 结果与基于 CO I 基因构建的 NJ 树、单倍型网络图基本一致。

基于 6 个皱纹盘鲍 *Cytb* 基因序列分析得到的遗传多样性参数见表 5, 6 个群体总体的 H_d

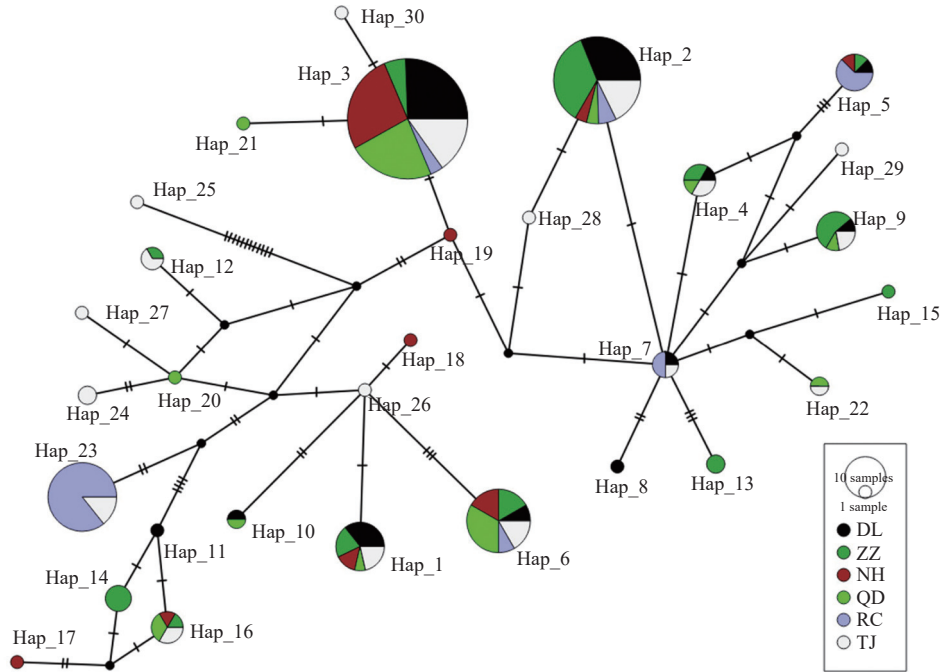


图 2 皱纹盘鲍线粒体 CO I 基因单倍型网络图

Fig. 2 Network diagram of CO I haplotypes in *H. discus hannai*

表 2 基于 CO I 基因序列皱纹盘鲍 6 个群体的遗传多样性指数

Tab. 2 Genetic diversity indices of six populations in *H. discus hannai* based on CO I gene sequence

群体 population	样品数/只 number of samples	单倍型数 number of haplotypes	单倍型多样性(H_d) haplotype diversity	核苷酸多样性(π) nucleotide diversity	平均核苷酸差异指数(k) mean pairwise difference
DL	50	11	0.728±0.047	0.005 6±0.000 6	4.049
ZZ	45	12	0.841±0.042	0.007 8±0.000 8	5.669
NH	36	9	0.586±0.093	0.005 7±0.001 1	4.130
DQ	39	11	0.703±0.069	0.006 6±0.000 8	4.850
RC	39	6	0.603±0.084	0.006 1±0.000 9	4.416
TJ	50	18	0.897±0.028	0.008 1±0.000 8	5.887

表 3 基于 CO I 基因皱纹盘鲍 6 个群体间的分化指数 F_{st}

Tab. 3 The F_{st} value in six populations of *H. discus hannai* based on CO I gene sequence

群体 population	DL	ZZ	NH	DQ	RC	TJ
DL						
ZZ	0.0556*					
NH	0.0434*	0.1522**				
DQ	0.0511*	0.1245**	-0.0111			
RC	0.2817**	0.2039**	0.3167**	0.2794**		
TJ	0.0171	0.0346**	0.0451**	0.0264*	0.1665**	

注：“*”表示 F_{st} 达到显著水平 ($P < 0.05$), “**”表示 F_{st} 达到极显著水平 ($P < 0.01$), 下同。
Notes: “*” indicates the F_{st} reaches significant level at $P < 0.05$; “**” indicates the F_{st} reaches significant level at $P < 0.01$, the same below.

(0.605~0.909) 和 π (0.0077~0.0120) 均处于较高水平。其中 TJ 群体 H_d 、 π 参数为 6 个群体中最高, 分别为 0.909±0.028、0.0120±0.0010, RC 群体的

H_d 最低 (0.605±0.084), DL 群体的 π 最低 (0.0077±0.0009)。与 CO I 基因序列分析结果一致, 总体呈现出高单倍型多样性与高核苷酸多样性的特征。

表 4 基于 CO I 基因序列皱纹盘鲍 6 个群体分子变异分析 (AMOVA)

Tab. 4 Analysis of molecular variance (AMOVA) of all 6 populations of *H. discus hannai* based on CO I gene sequence

变异来源 source of variation	自由度 df	平方和 sum of squares	变异组分 variance component	变异百分比/% percentage of variation	固定指数 fixation index
群体间 among populations	5	84.03	0.334	12.05	
群体内 within populations	253	616.46	2.437	87.95	
总计 total	258	700.49	2.771		0.1205

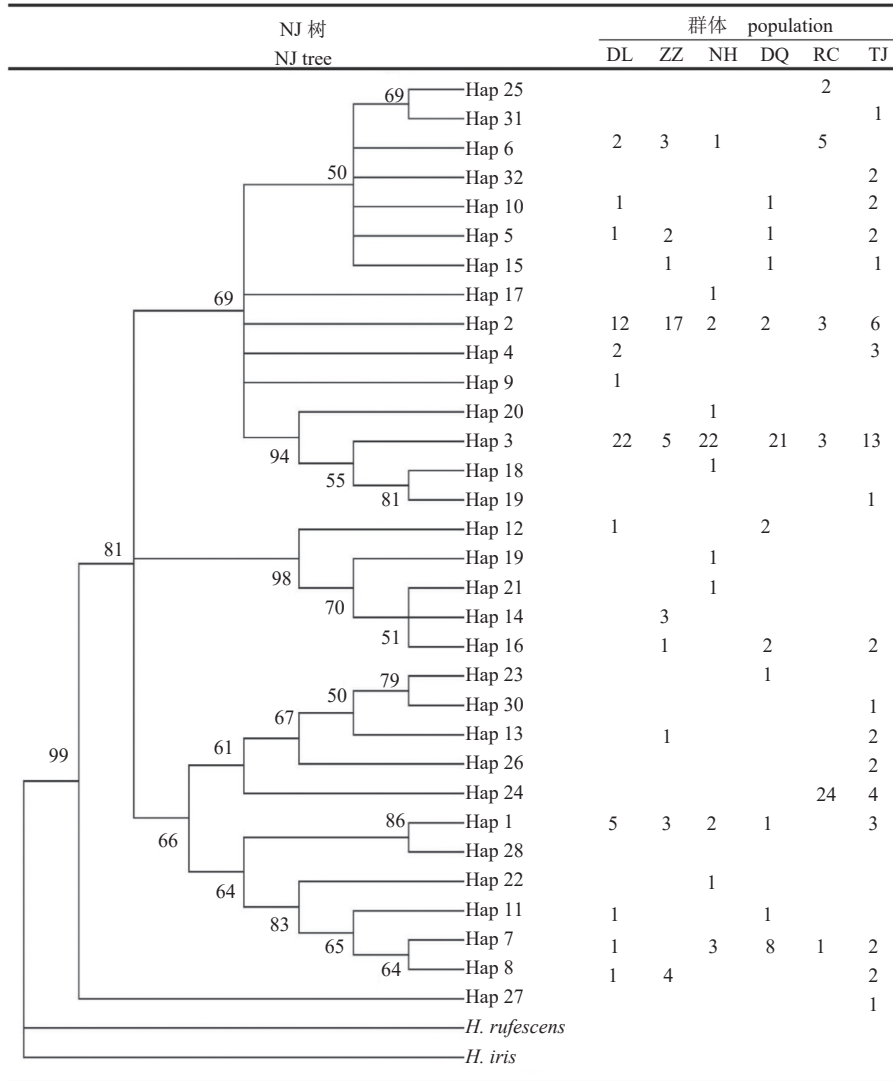


图 3 皱纹盘鲍 *Cytb* 基因序列构建的 NJ 系统树及在 6 个群体中的分布

Fig. 3 Neighbor-joining phylogenetic tree of *Cytb* haplotypes and their distribution in 6 populations of *H. discus hannai*

由群体间的分化指数 F_{st} 值可知, 除了 DL 与 NH、DQ, DQ 与 NH、TJ 群体间的遗传分化未达到显著水平之外 ($P>0.05$), 其余群体间的遗传分化均达到了显著水平 ($P<0.05$) (表 6)。RC 与其他群体 (除 TJ 群体外) 间的分化指数范围为 0.3030~0.3825, 均达到了极高程度遗传分化。ZZ 与 NH 群体、RC 与 TJ 群体的分化指数分别为 0.1784、0.1716, 达到了高程度遗传分化。ZZ 与 DL、NH,

TJ 与 NH 群体的分化指数范围为 0.0631~0.1323, 达到中等的遗传分化程度, 其余各群体间均为低程度遗传分化。

AMOVA 分析结果见表 7, 同 CO I 基因分析, 将 6 个群体的皱纹盘鲍列为同一组群进行分析时, 群体间遗传变异占总变异的 14.89%, 群体内的遗传变异占总变异的 85.11%。结果表明主要的遗传变异来自于群体内, 群体间的遗传分化达到极显

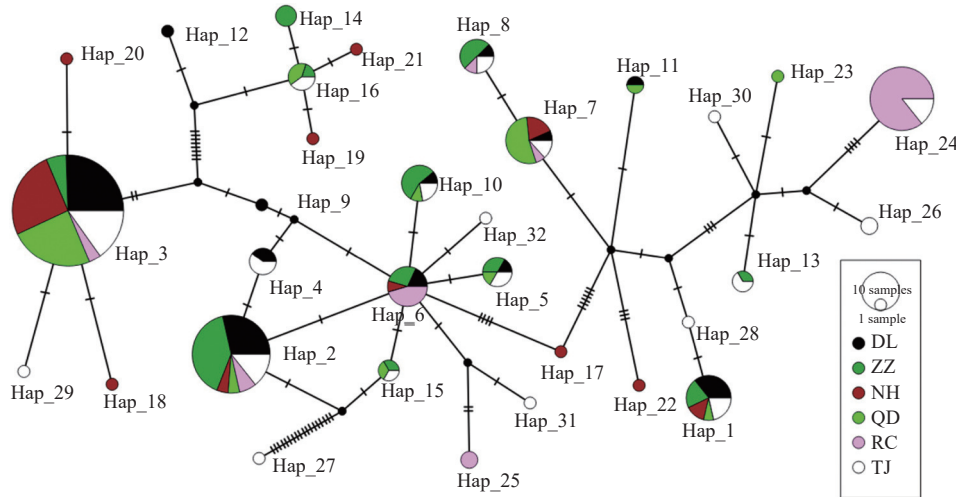


图 4 皱纹盘鲍线粒体 *Cytb* 基因单倍型网络图

Fig. 4 Network diagram of *Cytb* haplotypes in *H. discus hannai*

表 5 基于 *Cytb* 基因序列皱纹盘鲍 6 个群体的遗传多样性指数

Tab. 5 Genetic diversity indices in six populations of *H. discus hannai* based on *Cytb* gene sequence

群体 population	样品数/只 number of samples	单倍型数 number of haplotypes	单倍型多样性(H_d) haplotype diversity	核苷酸多样性(π) nucleotide diversity	平均核苷酸差异指数(k) mean pairwise difference
DL	50	12	0.748±0.049	0.0077±0.0009	5.612
ZZ	45	11	0.826±0.045	0.0094±0.0012	6.889
NH	36	11	0.625±0.092	0.0078±0.0014	5.663
DQ	39	10	0.676±0.072	0.0094±0.001	6.839
RC	39	7	0.605±0.084	0.0087±0.001	6.340
TJ	50	19	0.909±0.028	0.0120±0.001	8.729

表 6 基于 *Cytb* 基因序列皱纹盘鲍 6 个群体间的分化指数 F_{st}

Tab. 6 The F_{st} value of six populations in *H. discus hannai* based on *Cytb* gene sequence

群体 population	DL	ZZ	NH	DQ	RC	TJ
DL						
ZZ	0.0631*					
NH	0.0332	0.1784**				
DQ	0.0332	0.1323**	-0.0015			
RC	0.3524**	0.3030**	0.3825**	0.3066**		
TJ	0.0335*	0.0446*	0.0734**	0.0282	0.1716**	

著水平 ($F_{st}=0.1489, P<0.01$)。

3 讨论

3.1 6 个皱纹盘鲍群体遗传多样性

物种的遗传多样性是生物多样性的的重要组成部分, 是物种生存和发展的前提, 丰富的遗传多样性有助于提升其适应环境变化的能力与进化潜力^[24]。单倍型多样性指数与核苷酸多样性指数越高, 代表物种的遗传多样性越丰富。本研究基于

Cytb 基因序列分析得到的遗传多样性参数较 *CO I* 基因高, 认为这是由于 *Cytb* 进化速率较快所导致, 这与柔鱼 (*Ommastrephes bartramii*)^[15]、波纹唇鱼 (*Cheilinus undulatus*)^[25]、北方磷虾 (*Meganyctiphanes norvegica*)^[26] 等研究的结果一致。6 个群体皱纹盘鲍具有高单倍型多样性与高核苷酸多样性的特征, Grant 等^[27] 认为这是因为群体由大而稳定的种群构成, 并拥有较长进化历史或者是不同遗传背景的种群二次接触造成的, 本研究认为主要由以下 2 个原因导致: ①皱纹盘鲍喜生活在

表 7 基于 *Cytb* 基因序列皱纹盘鲍 6 个群体分子变异分析 (AMOVA)Tab. 7 Analysis of molecular variance (AMOVA) of all the 6 populations of *H. discus hannai* based on *Cytb* gene sequence

变异来源 source of variation	自由度 df	平方和 sum of squares	变异组分 variance component	变异百分比/% percentage of variation	固定指数 fixation index
群体间 among populations	5	143.63	0.589	14.89	
群体内 within populations	253	852.44	3.369	85.11	
总计 total	258	996.07	3.958		0.1489

水质清澈、水流畅通、富含海藻的几米至几十米深的岩礁上, 其活动能力较弱, 难以凭自身的移动能力与其他地域较远的种群进行基因交流。而近三十年来的皱纹盘鲍养殖模式已经发生巨大改变, 从早期的“南北接力养殖”到现在的“北鲍南养”, 皱纹盘鲍人工养殖的重心已经移至南方, 这些养殖模式都加强了皱纹盘鲍不同群体间的基因交流, 使各群体的遗传多样性指数都处于较高水平。②皱纹盘鲍北鲍南移养殖的成功, 进一步提升了其环境适应能力, 另外皱纹盘鲍性成熟年龄相对较短(3年), 这些特性可能对群体的快速生长、新变异的保存、维持自身的高单倍型多样性具有一定作用^[28]。因此, 大规模的北鲍南养对我国皱纹盘鲍的遗传结构起到优化调整的作用, 使该物种遗传多样性指数提高, 相应的适应能力也得到充分锻炼, 这对种质资源的开发利用具有积极的意义。

通常情况下, 野生群体的群体遗传多样性指数会高于养殖群体, 而 DQ 作为野生群体, 其遗传多样性指数比个别养殖群体低。前人在利用 RAPD、AFLP 标记技术进行相关研究时, 也出现了养殖群体遗传多样性高于野生群体的情况, 推测是由于两个在遗传上有一定隔离的群体经过杂交之后获得了杂种优势, 使其后代群体的遗传多样性升高^[5-6]。在同属于累代养殖的群体中, NH、RC 群体的单倍型多样性与核苷酸多样性都相对较低, 推测这两个累代养殖群体均发生了近交衰退, 使遗传多样性呈下降趋势, 但是 ZZ 群体却仍保持着相对较高的遗传多样性, 对于这种现象, 后续还需以现有的群体样本通过其他标记方法获得更多的遗传数据, 以作进一步的遗传分析。

3.2 群体遗传结构与遗传分化

由 *CO I*、*Cytb* 基因的群体间 F_{st} 值、AMOVA 分析结果, 发现大部分群体间存在显著遗传分化现象。由单倍型网络图可知, 单倍型之间存在较大的碱基差异, 是使得 F_{st} 和 AMOVA 计算出较高遗传分化的原因。存在较大差异的单倍型可能

代表皱纹盘鲍养殖重心南移前的各个野生群体。由于鲍的幼体和成体随海流迁移的能力有限, 群体间基因交流少, 经过长时间的种群繁衍, 群体中的优势单倍型与其他群体间的碱基差异逐渐增大, 最终形成了群体间差异显著的单倍型。而皱纹盘鲍的大规模北鲍南移养殖人为地将差异较大的单倍型带入不同群体中, 进而形成了本研究中的实验结果。

RC 与其他所有群体间存在较高度度的遗传分化, 除 TJ 之外, ZZ 与其他所有群体均存在中高度以上遗传分化。由于 RC 群体每年都会选育性状优良的皱纹盘鲍作为亲本继续繁育后代, 而 ZZ 群体为洋下群体, 长期定殖于漳州, 其遗传背景较为复杂且也经过长期的选育, 可能 RC、ZZ 群体与其他养殖群体的选育条件不同, 导致群体发生了显著的遗传分化, 也从侧面说明了人工选育对皱纹盘鲍不同群体的遗传分化有重要影响, 这与张仪方^[29]的研究结果一致。Li 等^[8]也证实了除人工选育外, 养殖环境中的人工选择和自然选择也可能改变了养殖群体的总体等位基因组成; 另外在育苗过程中采用的亲本数量过少, 群体容易产生遗传漂变, 使群体发生不同程度遗传分化^[30-32]。DL、NH 与 DQ 群体两两间为低度分化或者无分化, 推测这 3 个群体的皱纹盘鲍均位于渤海湾内, 地理位置接近, 不同群体间的基因交流相对比较密切, 从而降低了群体间的遗传分化。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 陈木, 卢豪魁, 陈世杰, 等. 皱纹盘鲍人工育苗的初步研究[J]. 动物学报, 1977, 23(1): 35-46.
Chen M, Lu H K, Chen S J, et al. A preliminary study on the artificial rearing of the larvae and juveniles of *Haliotis discus hannai* ino[J]. Acta Zoologica Sinica, 1977, 23(1): 35-46 (in Chinese).
- [2] 刘力源, 卢龙飞, 常丽荣, 等. 低温对南北越冬后皱纹盘鲍的影响[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(20): 195-199.

- Liu L Y, Lu L F, Chang L R, *et al.* Effect of low-temperature on *Haliotis discus hannai* overwintering in southern and northern coast[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2020, 48(20): 195-199 (in Chinese).
- [3] 吴富村, 阙华勇, 张国范. 我国皱纹盘鲍底播增殖养殖历史、现状及未来发展趋势[J]. *海洋科学*, 2020, 44(8): 56-68.
- Wu F C, Que H Y, Zhang G F. History, current status, and future development of the Pacific abalone seed release and sea ranching in China[J]. *Marine Sciences*, 2020, 44(8): 56-68 (in Chinese).
- [4] 李元山, 牟绍敦, 冯月群, 等. 皱纹盘鲍的分布水域与种苗放流效果[J]. *海洋湖沼通报*, 1997(4): 48-54.
- Li Y S, Mu S D, Feng Y Q, *et al.* Living environment and stocking seeds of *Haliotis discus hannai*[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 1997(4): 48-54 (in Chinese).
- [5] 张国范, 王继红, 赵洪恩, 等. 皱纹盘鲍中国群体和日本群体的自交与杂交F₁的RAPD标记[J]. *海洋与湖沼*, 2002, 33(5): 484-491.
- Zhang G F, Wang J H, Zhao H E, *et al.* The RAPD marker of self-bred and hybrid progeny between Chinese and Japanese populations of *Haliotis discus hannai* ino[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2002, 33(5): 484-491 (in Chinese).
- [6] 高祥刚, 葛隄利, 刘卫东, 等. 皱纹盘鲍野生与养殖群体遗传多样性的AFLP分析[J]. *生物技术通报*, 2008(S1): 324-330.
- Gao X G, Ge L L, Liu W D, *et al.* AFLP analysis of cultured and wild populations of abalone[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2008(S1): 324-330 (in Chinese).
- [7] 李莉, 常林瑞, 孙振兴, 等. 皱纹盘鲍遗传多样性的RAPD分析[J]. *海洋水产研究*, 2006, 27(1): 59-63.
- Li L, Chang L R, Sun Z X, *et al.* Genetic diversity of *Haliotis discus hannai* as revealed by RAPD[J]. *Marine Fisheries Research*, 2006, 27(1): 59-63 (in Chinese).
- [8] Li Q, Shu J, Yu R H, *et al.* Genetic variability of cultured populations of the Pacific abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) in China based on microsatellites[J]. *Aquaculture Research*, 2007, 38(9): 981-990.
- [9] 林志华, 包振民, 王如才. 海洋经济贝类分子遗传标记及其应用的研究进展[J]. *中国海洋大学学报*, 2007, 37(4): 533-540.
- Lin Z H, Bao Z M, Wang R C. Advances in the studies on molecular genetics of marine economic shellfish[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2007, 37(4): 533-540 (in Chinese).
- [10] Li Q, Shu J, Zhao C, *et al.* Characterization of genic microsatellite markers derived from expressed sequence tags in Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*)[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2010, 28(1): 46-54.
- [11] An H S, Lee J W, Kim H C, *et al.* Genetic characterization of five hatchery populations of the Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*) using microsatellite markers[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2011, 12(8): 4836-4849.
- [12] Chen N, Luo X, Wu F C, *et al.* Genetic structure of different cultured populations of the Pacific abalone *Haliotis discus hannai* Ino inferred from microsatellite markers[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2016, 35(3): 661-667.
- [13] Brown W M, George Jr M, Wilson A C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1979, 76(4): 1967-1971.
- [14] Brown W M, Prager E M, Wang A, *et al.* Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1982, 18(4): 225-239.
- [15] 刘连为, 许强华, 陈新军. 基于线粒体COI和Cytb基因序列的北太平洋柔鱼种群遗传结构研究[J]. *水产学报*, 2012, 36(11): 1675-1684.
- Liu L W, Xu Q H, Chen X J. Population genetic structure of *Ommastrephes bartramii* in the North Pacific Ocean based on the COI and Cytb gene sequences analysis[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(11): 1675-1684 (in Chinese).
- [16] 边力, 王鹏飞, 陈四清, 等. 基于线粒体Cytb基因序列的绿鳍马面鲷6个野生群体的遗传结构分析[J]. *中国水产科学*, 2018, 25(4): 827-836.
- Bian L, Wang P F, Chen S Q, *et al.* Population genetic structure of *Thamnaconus septentrionalis* in China's coastal waters based on mitochondrial Cytb sequences[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(4): 827-836 (in Chinese).
- [17] 高天翔, 毕潇潇, 赵林林, 等. 基于线粒体Cytb基因全序列的松江鲈群体遗传结构分析[J]. *水生生物学报*, 2013, 37(2): 199-207.
- Gao T X, Bi X X, Zhao L L, *et al.* Population genetic structure of roughskin sculpin *Trachidermus fasciatus* based on the mitochondrial Cytb sequence[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(2): 199-207 (in Chinese).
- [18] Li Q, Park C, Endo T, *et al.* Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery strains of the Pacific abalone

- lone (*Haliotis discus hannai*)[J]. *Aquaculture*, 2004, 235(1-4): 207-222.
- [19] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1451-1452.
- [20] Tamura K, Stecher G, Peterson D, *et al.* MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [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[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2010, 10(3): 564-567.
- [22] Excoffier L, Smouse P E, Quattro J M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction Data[J]. *Genetics*, 1992, 131(2): 479-491.
- [23] Leigh J W, Bryant D. POPART: full-feature software for haplotype network construction[J]. *Methods in Ecology and Evolution*, 2015, 6(9): 1110-1116.
- [24] 沈浩, 刘登义. 遗传多样性概述[J]. *生物学杂志*, 2001, 18(3): 4-7.
Shen H, Liu D Y. Summary of genetic diversity[J]. *Journal of Biology*, 2001, 18(3): 4-7 (in Chinese).
- [25] 胡静, 侯新远, 尹绍武, 等. 基于mtDNA *CO I*和*Cytb*基因序列对南中国海不同海域波纹唇鱼群体遗传多样性的研究[J]. *水生生物学报*, 2014, 38(6): 1008-1016.
Hu J, Hou X Y, Yin S W, *et al.* Genetic diversity and divergence of *Cheilinus undulatus* of different geographic populations of the South China Sea revealed by *CO I* and *Cytb* gene analyses[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(6): 1008-1016 (in Chinese).
- [26] Bucklin A, Smolenack S B, Bentley A M, *et al.* Gene flow patterns of the euphausiid, *Meganyctiphanes norvegica*, in the NW Atlantic based on mtDNA sequences for cytochrome b and cytochrome oxidase I[J]. *Journal of Plankton Research*, 1997, 19(11): 1763-1781.
- [27] Grant W A S, Bowen B W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation[J]. *Journal of Heredity*, 1998, 89(5): 415-426.
- [28] 刘红艳, 熊飞, 杨东, 等. 基于细胞色素b基因的鳓浪白鱼野生群体和养殖群体遗传多样性分析[J]. *华中农业大学学报*, 2011, 30(1): 94-98.
Liu H Y, Xiong F, Yang D, *et al.* Mitochondrial cytochrome b gene sequence diversity in wild and cultured populations of *Anabarilius grahami*[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2011, 30(1): 94-98 (in Chinese).
- [29] 张仪方. 鲍的种间及群体间形态差异和遗传多样性研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2019.
Zhang Y F. Morphological and genetic diversity among different species and populations of abalone[D]. Xiamen: Xiamen University, 2019 (in Chinese).
- [30] Allendorf F W, Phelps S R. Loss of Genetic variation in a hatchery stock of cutthroat trout[J]. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1980, 109(5): 537-543.
- [31] Hedgecock D, Sly F. Genetic drift and effective population sizes of hatchery-propagated stocks of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. *Aquaculture*, 1990, 88(1): 21-38.
- [32] 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*, 2008, 38(1): 52-58.
Shu J, Li Q, Yu R H, *et al.* Microsatellites analysis on genetic variation between wild and cultured populations of Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*)[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2008, 38(1): 52-58 (in Chinese).

Effects of southern culture pattern on population genetic structure of *Haliotis discus hannai* based on mitochondrial *CO I* and *Cytb* gene sequences

WU Zhou^{1,2}, ZHOU Liqing^{2*}, CHI Changfeng¹, WU Biao², SUN Xiujun²,
LIU Zhihong², ZHAO Dan², YU Tao³, ZHENG Yanxin³

(1. National and Provincial Joint Laboratory of Exploration and Utilization of Marine Aquatic Genetic Resources, National Engineering Research Center of Marine Facilities Aquaculture, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China;

2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

3. Changdao Enhancement and Experiment Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, Yantai 265800, China)

Abstract: Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*) is an important marine shellfish in China, which is naturally distributed in the coastal areas of Shandong Peninsula and Liaodong Peninsula, and has high economic and nutritional value. Since the 1990s, with the extensive application of hybridization technology, the cultivation industry of *H. discus hannai* has gradually moved from northern to southern China and developed rapidly. In 2019, the production of *H. discus hannai* and its hybrid offsprings in China has reached 180 000 tons. However, the process of artificial breeding and selection may reduce the genetic diversity index of species, change the genetic structure, or even cause genetic differentiation of populations. In order to explore the possible effects of cultivation patterns on the genetic structure of Pacific abalone in China in the last 30 years, 259 individuals were collected from Dalian (DL), Rongcheng (RC), Zhangzhou (ZZ), Tuoji Island (TJ), Daqin Island (DQ), and Nanhuangcheng Island (NH), the last three island belonging to the Changshan Archipelago of China. The mitochondrial cytochrome C oxidase subunit (*CO I*) gene and cytochrome B (*Cytb*) gene sequences were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and sequenced on an automatic sequencer by using forward and reverse primers. Bioedit 7.0.5, DNAsp 5.10, MEGA 6.06 and Arlequin 3.5 software were used for sequence analysis. After sequence matching and shearing, 730 bp fragment length of *CO I* and *Cytb* genes were obtained. The results showed that 48 mutation sites and 30 haplotypes were detected in the 730 bp *CO I* sequence of 259 individuals; the haplotype diversity of the 6 populations ranged from 0.586 to 0.897, and the nucleotide diversity was 0.0056-0.0081; 59 mutation sites and 32 haplotypes were detected in the 730 bp *Cytb* sequence of 259 individuals. The haplotype diversity ranged from 0.605 to 0.909 and the nucleotide diversity was 0.0077-0.0120 in the 6 populations. The results of F_{st} and AMOVA among populations based on *CO I* and *Cytb* genes showed that there was significant genetic differentiation between most populations, and the genetic variation mainly existed between individuals but within populations. The current cultivation mode of *H. discus hannai* enhanced the gene exchange between different populations, and the secondary contact of populations with different genetic backgrounds resulted in high haplotype diversity and nucleotide diversity in all 6 populations. Different breeding standards in different breeding populations may be an important reason for the significant genetic differentiation. The evaluation of genetic resources of six *Haliotis discus hannai* populations in the northern and southern China coasts conducted in this paper provides a scientific basis for the rational utilization of the resources in China and the influence of breeding modes on genetic structure.

Key words: *Haliotis discus hannai*; *CO I*; *Cytb*; genetic diversity; genetic structure

Corresponding author: ZHOU Liqing. E-mail: zhouliq@ysfri.ac.cn

Funding projects: National Key R & D Program of China (2018YFD0900803)