

文章编号: 1674 - 5566(2011)03 - 0350 - 08

乐清湾和三沙湾缢蛭群体遗传多样性的微卫星分析

刘达博¹, 牛东红¹, 冯冰冰¹, 钟玉民¹, 李家乐^{1,2}

(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: 利用微卫星标记分析了我国浙江乐清湾翁垟(ZWY)、乐成(ZYC)、南岳(ZNY)、南塘(ZNT)、清江(ZQJ)、湖雾(ZHW)、坞根(ZWG)、海山(ZHS)和芦浦(ZLP) 9 个群体和福建三沙湾漳湾(FZW)、梅田(FMT)、三都(FSD)、渔江(FYJ)、白招(FBZ)、霞塘(FXT)、长春(FCC)、沙江(FSJ)和溪尾(FXW) 9 个缢蛭群体的遗传多样性和遗传分化, 以期评价乐清湾和三沙湾内缢蛭群体的遗传结构差异, 为我国缢蛭主要原产地种质资源保护和遗传育种提供基础资料。遗传多样性结果表明, 浙江乐清湾和福建三沙湾内的缢蛭群体中各位点平均有效等位基因数 N_e 变化范围分别为 8.146 ~ 10.457 和 7.457 ~ 9.947, 平均期望杂合度 H_e 分别为 0.872 ~ 0.909 和 0.846 ~ 0.894, Nei's 基因多样性指数分别为 0.863 ~ 0.899 和 0.836 ~ 0.886, 显示乐清湾和三沙湾缢蛭群体的遗传多样性仍处于较高水平。群体间遗传分化指数 (F_{ST}) 结果表明, 缢蛭各群体间 F_{ST} 为 0.000 1 ~ 0.052 3。基于 Nei's 遗传距离 (D_A) 构建非加权组平均法 (UPGMA) 系统树结果显示, 18 个群体聚类为 2 支, 除 ZWY 和 ZWG 群体外, ZYC、ZNY、ZNT、ZQJ、ZHW、ZHS 和 ZLP 浙江群体单独聚为一支; 而 ZWY、ZWG 群体与 FZW、FMT、FSD、FSJ、FBZ、FXT、FCC、FSJ 和 FXW 9 个福建群体聚类在一起, 因此推测浙江的 ZWY、ZWG 群体可能来自福建, 揭示在缢蛭的养殖过程中可能存在引苗现象。

研究亮点: 应用微卫星分子标记技术研究缢蛭的种质资源, 其研究结果较科学、稳定。浙江和福建是缢蛭的主产区, 而乐清湾和三沙湾则是这两个主产区的“产苗和育苗基地”, 通过微卫星技术评价湾内的遗传结构差异, 以探讨这两个主产区之间是否存在引苗现象。

关键词: 缢蛭; 乐清湾; 三沙湾; 微卫星标记; 遗传多样性

中图分类号: S 917

文献标志码: A

缢蛭 (*Sinonovacula constricta* Lamarck) 俗名蛭子、蜻子, 属于双壳纲 (Bivalvia)、帘蛤目 (Veneroida)、截蛭科 (Solecurtidae)、缢蛭属 (*Sinonovacula*)^[1], 是中国、日本、韩国特有种类。缢蛭作为我国四大传统养殖贝类之一, 广泛分布于河口或有少量淡水注入的内湾潮间带中、下区软泥滩上, 在浙江和福建一带已有数百年的养殖历史。而乐清湾和三沙湾一带地理环境优美, 成为缢蛭的主要苗种基地和养殖基地。随着养殖业的发展, 异地引苗现象频繁出现, 这可能会对原产地缢蛭的种质资源产生影响。因此, 从 DNA

水平对其遗传多样性进行研究具有重要意义。

对缢蛭的群体遗传学研究仅限于我国, 且主要集中在不同地理区域上, 如浙江象山港、浙江象山外海、福建宁德等 6 个缢蛭群体的同工酶分析^[2], 江浙沪地区 3 个野生群体和 3 个养殖群体的 16S rRNA 基因片段序列分析^[3], 但对原产地湾内缢蛭群体遗传多样性的研究未见详细报道。随着分子标记技术的发展, 微卫星标记由于多态性丰富、杂合度高、通用性好等优点, 能更好地揭示群体遗传组分的变化, 在皱纹盘鲍^[4-5]、马氏珠母贝^[6]、虾夷扇贝^[7]、海湾扇贝^[8]等海水贝

收稿日期: 2010-11-19 修回日期: 2011-03-04

基金项目: 国家“八六三”计划项目 (2006AA10A410); 上海市高校优青科研专项基金 (SSC09016); 上海市高校博士启动基金 (A2400090144)

作者简介: 刘达博 (1984—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产动物种质资源与种苗工程。E-mail: kevindabo@163.com

通讯作者: 李家乐, E-mail: jlli2009@126.com

类群体遗传多样性研究中得到了广泛应用。本研究以乐清湾和三沙湾内 18 个缢蛏群体为研究对象,通过微卫星标记分析其群体遗传多样性和遗传分化情况,以期评价乐清湾和三沙湾内缢蛏群体的遗传结构差异,为我国缢蛏主要原产地种质资源保护和遗传育种提供基础资料。

1 材料与方 法

1.1 材 料

2009 年 6 月 - 2009 年 10 月,在浙江省乐清湾和福建省三沙湾的自然滩涂上共采集了 18 个缢蛏群体,具体采集地点、数量等详见表 1。采集后的缢蛏样本,取其外套膜组织固定在无水乙醇中,带回实验室备用。

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 μL 组织匀浆缓冲液(10 mmol/dm³ Tris-HCl, pH 为 8.0; 50 mmol/dm³ EDTA, pH 为 8.0),混匀后加入终浓度为 1% 的 SDS 和 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 的蛋白酶 K,55 $^{\circ}\text{C}$ 消化。首先用等体积的饱和酚提取 2 次,再用等体积的 V(酚):V(氯):V(仿异戊醇) = 25:24:1 提取 1 次,用等体积的 V(氯仿):V(异戊醇) = 24:1 提取 1 次,最后加入 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 OD₂₆₀、OD₂₈₀ 值,确定其浓度和纯度,母液置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

表 1 缢蛏群体采集位置及数目

Tab. 1 Sample sites and number of *S. constricta* stocks

群体	采集地	地理位置	样本数	采集时间
翁垟 ZWY	浙江省乐清市翁垟镇山环村	28°02.655'N 120°59.914'E	58	2009.6
乐成 ZYC	浙江省乐清市乐成镇坝头村	28°07.395'N 121°01.273'E	60	2009.6
南岳 ZNY	浙江省乐清市南岳镇里岙村	28°11.946'N 121°06.252'E	55	2009.6
南塘 ZNT	浙江省乐清市南塘镇山马村	28°13.762'N 121°07.557'E	60	2009.6
清江 ZQJ	浙江省乐清市清江镇清江村	28°16.676'N 121°06.952'E	59	2009.6
湖雾 ZHW	浙江省乐清市湖雾镇定头村	28°22.302'N 121°12.335'E	60	2009.6
坞根 ZWG	浙江省温州市坞根镇白壁村	28°18.554'N 121°13.843'E	59	2009.6
海山 ZHS	浙江省台州市海山乡南滩村	28°12.896'N 121°09.597'E	59	2009.6
芦浦 ZLP	浙江省台州市芦浦镇分水山	28°11.822'N 121°12.583'E	60	2009.6
漳湾 FZW	福建省宁德市漳湾镇二屿村	26°43.254'N 119°37.128'E	61	2009.10
梅田 FMT	福建省宁德市飞鸾镇梅田村	26°34.752'N 119°36.954'E	66	2009.10
三都 FSD	福建省宁德市三都镇玳溪村	26°40.007'N 119°40.959'E	57	2009.10
渔江 FYJ	福建省福安市下白石镇渔江村	26°45.693'N 119°37.210'E	66	2009.10
白招 FBZ	福建省福安市下白石镇白招村	26°47.109'N 119°41.227'E	63	2009.10
溪尾 FXW	福建省福安市溪尾镇宝玲村	26°48.985'N 119°46.480'E	64	2009.10
长春 FCC	福建省霞浦县长春镇文岐村	26°34.752'N 119°36.972'E	59	2009.10
沙江 FSJ	福建省霞浦县沙江镇南屏村	26°46.833'N 119°58.434'E	64	2009.10
霞塘 FXT	福建省霞浦县溪南镇霞塘村	26°44.102'N 119°48.529'E	42	2009.10

1.3 SSR 引物筛选及反应

实验所用微卫星引物序列均由本实验室开发,部分由磁珠富集法在本次实验构建和筛选,部分来自于已提交的缢蛏微卫星文库^[9],各引物的退火温度及镁离子浓度详见表 2。

PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min,进行 30 个循环:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, T_m 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 反应体系为 25 μL , 含 10 \times Buffer 2.5 μL , Mg²⁺ 1.5 ~ 2.5 mmol/dm³, dNTP 0.2 mmol/dm³, Taq DNA 聚合酶 1 U, 上、下游引物各 0.2 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$, 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。

1.4 数据处理

利用 Popgene 3.2^[10] 计算各位点的有效等位基因数 (Effective number of alleles per locus, N_e), 观测杂合度 (Observed heterozygosity, H_o), 期望杂合度 (Expected Heterozygosity, H_e), 内氏基因多样性 (Nei's genetic diversity, H)。利用 Arlequin 3.0 软件^[11], 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)。

表 2 微卫星引物
Tab. 2 Microsatellite primers

引物编号	位点	引物序列(5'-3')	退火温度/°C	镁离子浓度/(mmol/L)
GU570943	Sco-7	F CACACACTCACTCAAAC R GACACATACCTTACGCT	53	1.5
GU570945	Sco-17	F AGTGATACGAGTGCCATA R GGGAGGGAGAGATAGACT	51	1.5
GU570944	Sco-20	F AGTTGGACTGGACTGTTG R TGCTGGAAGGTCTTGCTT	53	1.5
EU272065	Sco-221	F TCAAGCTCTGGGACAAG R GTCGGTAAAGGATGTGAAG	51	2.0
EU272066	Sco-222	F ATCCGGCTAATCCACTCT R GATGGTATGCCGTGGTAG	55	1.5
EU285666	Sco-400	F CCACTGAACGTGTCATAC R CCAATAACTACTTCGCCTC	48	2.5
EU272072	Sco-431	F TTCAATCTCCAAAATCATG R AATAAAGGTGGATTAACCT	51	1.5
EU272073	Sco-448	F GATCACTGCAAACCTAGAACC R AATACCTATGCTCTGCTCCT	55	1.5

根据各群体间的等位基因频率利用 Dispan 软件计算出群体间 Nei's 遗传距离 (D_A), 并进行 Bootstrap 检验^[12], 构建 UPGMA 系统树。

2 结果

2.1 群体遗传多样性

等位基因数和杂合度反映各群体在多个位点上的遗传变异, 是度量群体遗传多样性的重要参数。各群体的遗传多样性指数见表 3。浙江乐清湾和福建三沙湾内的缢蛏群体中各位点平均

有效等位基因数变化范围分别为 8.146 ~ 10.457 和 7.457 ~ 9.947, 平均观测杂合度分别为 0.381 ~ 0.489 和 0.353 ~ 0.501, 平均期望杂合度分别为 0.872 ~ 0.909 和 0.846 ~ 0.894, Nei's 基因多样性指数分别为 0.863 ~ 0.899 和 0.836 ~ 0.886。等位基因数和杂合度结果显示, 乐清湾内的 9 个缢蛏群体间的遗传多样性变化不大, 但整体遗传多样性水平略高于福建三沙湾内的 9 个缢蛏群体。

表 3 缢蛏 18 个群体在 8 个微卫星位点的遗传多样性指数
Tab. 3 The genetic diversity indices of 8 microsatellite loci for 18 stocks of *S. constricta*

遗传多样性指数		Sco-7	Sco-17	Sco-20	Sco-221	Sco-222	Sco-400	Sco-431	Sco-448	均值
ZWY	N_e	8.167	14.429	6.728	5.202	16.370	9.518	6.428	6.694	9.192
	H_o	0.339	1.000	0.638	0.055	0.552	0.571	0.434	0.321	0.489
	H_e	0.886	0.942	0.859	0.815	0.947	0.903	0.853	0.858	0.883
	H	0.878	0.931	0.851	0.808	0.939	0.895	0.844	0.851	0.875
ZYC	N_e	6.464	13.055	10.272	3.284	18.340	9.719	6.851	6.579	9.320
	H_o	0.386	0.960	0.517	0.093	0.444	0.381	0.286	0.146	0.402
	H_e	0.855	0.933	0.911	0.702	0.954	0.908	0.864	0.859	0.873
	H	0.845	0.923	0.903	0.696	0.946	0.897	0.854	0.848	0.864
ZNY	N_e	6.348	11.880	6.821	5.967	13.964	6.375	7.399	6.419	8.146
	H_o	0.234	1.000	0.482	0.060	0.375	0.447	0.326	0.120	0.381
	H_e	0.852	0.927	0.861	0.841	0.938	0.854	0.874	0.853	0.875
	H	0.843	0.916	0.853	0.832	0.928	0.843	0.865	0.844	0.866
ZNT	N_e	7.594	12.272	12.000	8.257	16.057	9.618	8.577	9.278	10.457
	H_o	0.293	0.915	0.467	0.000	0.466	0.522	0.340	0.333	0.417
	H_e	0.876	0.928	0.924	0.888	0.946	0.916	0.892	0.900	0.909
	H	0.868	0.919	0.917	0.879	0.938	0.896	0.883	0.892	0.899

续表 3

遗传多样性指数		Sco-7	Sco-17	Sco-20	Sco-221	Sco-222	Sco-400	Sco-431	Sco-448	均值
ZQJ	N_e	5.217	14.826	7.443	4.923	11.121	10.648	7.710	5.451	8.417
	H_o	0.259	1.000	0.561	0.063	0.400	0.388	0.383	0.436	0.436
	H_e	0.816	0.943	0.873	0.805	0.918	0.915	0.880	0.824	0.872
	H	0.808	0.933	0.866	0.797	0.910	0.906	0.870	0.817	0.863
ZHW	N_e	6.867	13.192	11.921	6.083	16.153	9.852	6.636	5.576	9.535
	H_o	0.364	0.978	0.467	0.040	0.500	0.549	0.450	0.275	0.453
	H_e	0.862	0.935	0.924	0.844	0.948	0.907	0.856	0.829	0.888
	H	0.854	0.924	0.916	0.836	0.938	0.899	0.849	0.821	0.880
ZWC	N_e	8.035	14.817	9.345	5.440	16.307	7.959	9.969	7.104	9.872
	H_o	0.327	0.917	0.458	0.049	0.582	0.521	0.463	0.271	0.448
	H_e	0.884	0.942	0.901	0.826	0.947	0.884	0.908	0.867	0.895
	H	0.876	0.933	0.893	0.816	0.939	0.874	0.900	0.859	0.886
ZHS	N_e	6.508	12.293	13.312	6.914	15.527	14.384	8.093	5.157	10.274
	H_o	0.296	0.962	0.593	0.073	0.447	0.525	0.357	0.119	0.422
	H_e	0.856	0.927	0.933	0.863	0.948	0.938	0.884	0.813	0.895
	H	0.846	0.919	0.925	0.855	0.936	0.931	0.876	0.806	0.887
ZLP	N_e	4.665	14.954	7.038	7.234	14.839	9.225	6.752	9.223	9.241
	H_o	0.456	0.982	0.483	0.121	0.333	0.344	0.472	0.177	0.421
	H_e	0.793	0.942	0.865	0.869	0.945	0.906	0.860	0.900	0.885
	H	0.786	0.933	0.858	0.862	0.933	0.892	0.852	0.892	0.876
FBZ	N_e	7.756	12.950	11.578	5.537	16.409	10.580	9.156	5.610	9.947
	H_o	0.400	1.000	0.500	0.069	0.597	0.528	0.625	0.286	0.501
	H_e	0.879	0.933	0.921	0.827	0.947	0.914	0.899	0.829	0.894
	H	0.871	0.923	0.914	0.819	0.939	0.906	0.891	0.822	0.886
FSD	N_e	6.135	8.598	6.694	4.353	16.243	9.797	5.636	3.838	7.662
	H_o	0.280	0.922	0.213	0.118	0.532	0.373	0.439	0.214	0.386
	H_e	0.846	0.892	0.860	0.778	0.949	0.907	0.830	0.746	0.851
	H	0.837	0.884	0.851	0.770	0.938	0.898	0.823	0.740	0.843
FCC	N_e	5.499	10.022	7.567	5.809	18.619	8.705	9.778	5.583	8.948
	H_o	0.292	1.000	0.458	0.096	0.597	0.346	0.458	0.305	0.444
	H_e	0.827	0.911	0.877	0.836	0.955	0.893	0.905	0.828	0.879
	H	0.818	0.900	0.868	0.828	0.946	0.885	0.898	0.821	0.871
FSJ	N_e	4.374	11.014	8.780	5.365	13.926	10.209	7.557	6.731	8.495
	H_o	0.233	0.930	0.484	0.109	0.603	0.393	0.516	0.219	0.436
	H_e	0.778	0.917	0.893	0.820	0.936	0.910	0.875	0.858	0.873
	H	0.771	0.909	0.886	0.814	0.928	0.902	0.868	0.851	0.866
FXW	N_e	4.092	12.454	8.209	5.002	18.285	9.590	7.301	4.935	8.734
	H_o	0.245	0.979	0.268	0.065	0.508	0.131	0.469	0.156	0.353
	H_e	0.763	0.929	0.886	0.807	0.953	0.903	0.870	0.804	0.864
	H	0.756	0.920	0.878	0.800	0.945	0.896	0.863	0.797	0.857
FXT	N_e	4.683	10.452	8.469	5.850	15.611	8.177	3.493	5.539	7.784
	H_o	0.317	1.000	0.610	0.125	0.524	0.385	0.286	0.286	0.442
	H_e	0.796	0.917	0.893	0.840	0.947	0.889	0.722	0.829	0.854
	H	0.786	0.904	0.882	0.829	0.936	0.878	0.714	0.819	0.844
FMT	N_e	5.956	12.278	10.181	7.242	13.676	8.072	6.846	5.816	8.758
	H_o	0.161	0.963	0.231	0.197	0.484	0.328	0.387	0.212	0.370
	H_e	0.840	0.927	0.909	0.869	0.934	0.883	0.861	0.834	0.882
	H	0.832	0.919	0.902	0.862	0.927	0.876	0.854	0.828	0.875
FYJ	N_e	5.341	12.659	8.074	3.840	12.718	10.279	7.545	5.134	8.199
	H_o	0.277	0.957	0.349	0.152	0.530	0.391	0.508	0.231	0.424
	H_e	0.819	0.931	0.883	0.745	0.928	0.910	0.874	0.811	0.863
	H	0.813	0.921	0.876	0.740	0.921	0.903	0.868	0.805	0.856
FZW	N_e	4.798	9.975	4.587	3.452	15.674	7.431	5.960	7.779	7.457
	H_o	0.130	1.000	0.220	0.109	0.674	0.289	0.357	0.326	0.388
	H_e	0.800	0.910	0.792	0.718	0.947	0.875	0.842	0.881	0.846
	H	0.792	0.900	0.782	0.710	0.936	0.865	0.832	0.872	0.836

2.2 群体遗传分化

乐清湾和三沙湾缢蛏 18 个群体间的遗传分化指数 F_{ST} 值见表 4。结果表明,18 个群体间的遗传分化值范围为 0.000 1~0.052 3,各群体间具有一定的遗传分化,其中 FXW 与 FZW 群体间分化程度最高。乐清湾内的 9 个群体间的遗传分化值为 0.000 4~0.025 4,均显著小于 0.05。三沙湾内的 9 个群体间的遗传分化值为 0.000 1~0.052 3,除 FXW 和 FZW 群体外,其他各群体间的分化值均小于 0.05。

2.3 遗传距离和聚类分析

基于等位基因频率计算出缢蛏各群体间的 Nei's 遗传距离(D_A)如表 5 所示,群体间遗传距

离位于 0.085 2~0.295 4 之间,其中 FCC 和 ZWY 群体间遗传距离最近,而 FBZ 与 ZYC 群体间遗传距离最远。

基于 D_A 距离分别构建 UPGMA 系统树(图 1)。UPGMA 系统树结果显示,18 个缢蛏群体大致分为 2 个分支,其中一个分支,ZNY 群体与 ZLP 群体首先聚类,之后依次与 ZQJ、ZHW、ZYC、ZHS、ZNT 聚在一起;另外一个分支,FCC 与 ZWY 先聚类,之后与 FMT、FYJ、FXT、FXD、FSJ、ZWG、FXW、FZW、FBZ 群体聚类(图 1),即除了 ZWY 和 ZWG 群体外,其他浙江群体聚为一支,而 ZWY、ZWG 群体与福建群体聚类在一起。

表 4 缢蛏群体间 F_{ST} - 统计量(F_{ST} , 对角线下)

Tab. 4 F_{ST} estimates (F_{ST} , below diagonal) among *S. constricta* stocks

群体	ZWY	ZYC	ZNY	ZNT	ZQJ	ZHW	ZWG	ZHS	ZLP	FBZ	FSD	FCC	FSJ	FXW	FXT	FMT	FYJ	FZW	
ZWY																			
ZYC	0.005 4																		
ZNY	0.005 3	0.011 0																	
ZNT	0.017 0*	0.002 2	0.025 4*																
ZQJ	0.000 7	0.005 9	0.000 4	0.020 1*															
ZHW	0.023 6*	0.003 8	0.025 2*	0.003 9	0.020 0*														
ZWG	0.012 8	0.006 2	0.014 3	0.007 8	0.010 8	0.006 1													
ZHS	0.012 8*	0.001 2	0.010 6	0.002 6	0.008 8	0.002 5	0.002 7												
ZLP	0.006 8	0.006 0	0.009 2	0.021 3*	0.006 1	0.016 4*	0.009 7	0.012 6											
FBZ	0.023 5*	0.004 9	0.023 5*	0.002 2	0.015 2*	0.001 7	0.006 6	0.003 0	0.012 2										
FSD	0.007 5	0.010 3	0.009 8	0.005 7	0.000 6	0.001 8	0.005 2	0.013 2	0.007 3	0.000 9									
FCC	0.020 8	0.009 7	0.006 8	0.003 9	0.013 5	0.004 8	0.015 0	0.017 3	0.014 4	0.001 6	0.023 0*								
FSJ	0.042 0*	0.011 6	0.038 4*	0.013 2*	0.036 3*	0.008 6	0.022 9*	0.018 5*	0.020 9*	0.007 8	0.001 6	0.024 1*							
FXW	0.026 2*	0.004 6	0.017 6	0.009 2	0.015 5*	0.003 3	0.006 6	0.000 4	0.006 0	0.004 5	0.008 1	0.030 9*	0.005 8						
FXT	0.020 0*	0.003 8	0.029 3*	0.008 9	0.022 6*	0.013 9	0.013 7	0.011 3	0.002 9	0.008 2	0.003 6	0.000 1	0.0091	0.011 2					
FMT	0.029 5*	0.004 0	0.018 5*	0.014 8*	0.013 8	0.009 7	0.016 2*	0.010 9	0.012 9	0.003 1	0.000 7	0.005 8	0.007 5	0.005 5	0.010 4				
FYJ	0.009 8	0.003 3	0.001 8	0.015 1	0.007 0	0.008 3	0.003 3	0.004 8	0.001 1	0.008 4	0.016 7	0.012 1	0.016 3	0.002 8	0.009 3	0.007 4			
FZW	0.002 6	0.010 7	0.018 7	0.021 9*	0.017 6	0.036 1*	0.028 7*	0.017 6*	0.011 6	0.036 9*	0.014 8	0.005 9	0.047 9*	0.052 3*	0.015 4	0.040 5*	0.018 8		

注: * 表示 $P < 0.05$ 。

表 5 缢蛏群体间遗传距离(D_A , 对角线下)

Tab. 5 Genetic distance (D_A , below diagonal) among *S. constricta* stocks

群体	ZWY	ZYC	ZNY	ZNT	ZQJ	ZHW	ZWG	ZHS	ZLP	FBZ	FSD	FCC	FSJ	FXW	FXT	FMT	FYJ	FZW	
ZWY																			
ZYC	0.256 4																		
ZNY	0.225 9	0.179 9																	
ZNT	0.231 9	0.160 1	0.171 3																
ZQJ	0.210 1	0.151 3	0.122 6	0.174 3															
ZHW	0.220 4	0.206 4	0.119 9	0.149 2	0.162 8														
ZWG	0.117 9	0.206 2	0.153 0	0.185 6	0.163 1	0.144 1													
ZHS	0.209 3	0.160 3	0.185 4	0.139 3	0.152 5	0.155 3	0.150 3												
ZLP	0.202 4	0.168 7	0.105 2	0.162 2	0.113 1	0.141 1	0.150 9	0.165 9											
FBZ	0.121 4	0.295 4	0.225 1	0.216 6	0.239 5	0.208 8	0.157 7	0.218 5	0.237 1										
FSD	0.118 9	0.262 6	0.199 7	0.246 5	0.221 6	0.228 3	0.152 5	0.208 0	0.201 2	0.145 3									
FCC	0.085 2	0.234 4	0.193 7	0.217 3	0.202 5	0.200 8	0.125 2	0.207 1	0.189 4	0.132 5	0.110 1								
FSJ	0.117 0	0.253 0	0.200 9	0.223 6	0.196 1	0.195 6	0.141 6	0.212 0	0.182 7	0.124 9	0.081 9	0.105 2							
FXW	0.142 1	0.179 0	0.163 5	0.190 3	0.125 1	0.175 2	0.119 3	0.129 7	0.145 7	0.173 7	0.115 9	0.145 7	0.121 4						
FXT	0.135 2	0.254 5	0.199 8	0.232 1	0.210 0	0.213 2	0.139 8	0.205 1	0.193 3	0.153 0	0.092 6	0.117 5	0.103 2	0.119 4					
FMT	0.112 3	0.231 8	0.192 2	0.232 7	0.179 6	0.180 3	0.131 3	0.202 0	0.162 7	0.166 4	0.131 0	0.109 2	0.126 1	0.116 6	0.125 0				
FYJ	0.094 3	0.252 8	0.214 5	0.248 4	0.202 9	0.228 8	0.119 4	0.221 3	0.185 3	0.136 7	0.109 6	0.116 3	0.114 9	0.121 9	0.116 1	0.092 8			
FZW	0.110 6	0.236 4	0.151 0	0.202 8	0.182 3	0.165 3	0.132 2	0.205 2	0.176 9	0.171 7	0.128 7	0.131 4	0.130 3	0.151 5	0.139 0	0.141 1	0.143 4		

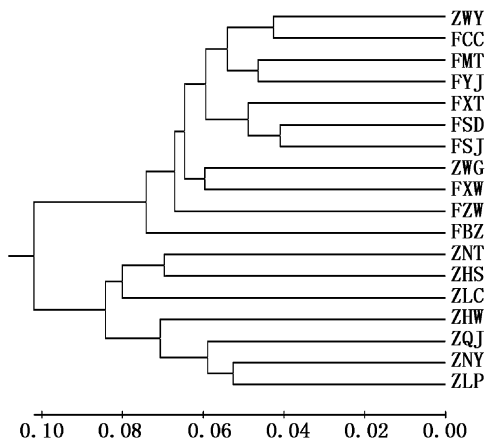


图 1 基于 D_A 遗传距离的 UPGMA 聚类树

Fig. 1 UPGMA clustering tree based on D_A genetic distance

3 讨论

最大限度地维持种内遗传多样性水平,是持续利用种质资源的前提和基础。 N_e 、 H_e 和 H_s 等都是反映群体遗传多样性的度量,其数值越大,说明基因丰富度越高^[13]。本研究结果表明,采自乐清湾和三沙湾自然滩涂的 18 个缢蛏群体,在它们的 8 个微卫星位点上共检测到平均有效等位基因数 N_e 为 7.457 ~ 10.457,而平均期望杂合度 H_e 则为 0.846 ~ 0.909,显著高于虾夷扇贝野生群体 (H_e 为 0.666 ~ 0.676)^[14] 和皱纹盘鲍野生群体 (H_e 为 0.793)^[15],而与大珠母贝野生群体 (H_e 为 0.828 ~ 0.859)^[16] 接近。因此可以判断,乐清湾和三沙湾天然滩涂的 18 个缢蛏群体的遗传多样性仍处于较高水平,具有较高的遗传变异潜力,可作为育种的基础群体。此外,从浙江乐清湾和福建三沙湾内各自的 9 个缢蛏群体的各位点平均有效等位基因数、平均期望杂合度、Nei's 平均基因多样性指数来看,无论是乐清湾还是三沙湾群体,其遗传多样性水平差异都甚小,由此可见一个湾内缢蛏群体的遗传多样性基本处于同一个水平。

基因固定指数 (F_{ST}) 常用于评价群体的遗传分化程度,一般评判标准是 $F_{ST} < 0.05$ 代表轻度分化, $0.05 < F_{ST} < 0.15$ 代表中等分化, $0.15 < F_{ST} < 0.25$ 代表高度分化, $0.25 < F_{ST} < 1.00$ 代表极高度分化^[17]。通过本研究发现,乐清湾内的 9 个群体间的遗传分化值为 0.000 4 ~ 0.025 4,三

沙湾内的 9 个群体间的遗传分化值为 0.000 1 ~ 0.052 3,基本属于轻度分化。而基因流作为遗传分化的一个反向衡量指标,可间接反映群体的遗传分化程度。曲若竹等认为有限的基因流是促使群体发生遗传分化的主要原因^[18]。潘洁等^[19] 对栉孔扇贝 4 个群体的遗传多样性进行了分析,发现位于韩国东西部的两个群体遗传相似性很高,可以看成是一个群体,说明两个群体间基因流动比较频繁,认为栉孔扇贝 15 d 左右的浮游期可能是造成韩国东西部两群体间遗传相似性较高的原因之一。HARE 和 AVISE^[20] 对美洲牡蛎 (*Crassostrea virginica*) 的研究中发现,幼虫浮游时间较长的种类可以造成中、小尺度内的地理群体间的基因流动。缢蛏虽然属于埋栖型贝类,但其生活史具有 1 ~ 2 周的浮游幼虫期,在这浮游期间,随着潮水的涨落,幼虫可以在一定范围内活动和附着,从而在一定区域内使缢蛏群体具备了相似的遗传结构。淡水贝类也有类似情况,在对鄱阳湖三角帆蚌 6 个群体^[21]、洪泽湖 3 个皱纹冠蚌群体^[22] 的研究中,由于三角帆蚌和皱纹冠蚌的受精卵会寄生在鱼类的鳃中,虽然贝类本身不能迁移,但是其附着之前可随着鱼类的运动而发生了相应的迁移,从而加强了个体间的基因交流。

聚类分析的先后顺序可反映出种群间亲缘关系的远近,通过估算遗传距离并构建系统树,可以评价种群间的遗传结构和分化程度^[23]。本研究中,构建的 UPGMA 系统树结果显示,除了 ZWY 和 ZWG 群体外,其他浙江群体聚为一支;而 ZWY、ZWG 群体与福建 9 个群体则聚类在一起。从地理位置上看,浙江乐清湾和福建三沙湾距离 217.9 km,自然水流的作用导致基因交流的机会甚微。另外由于乐清湾和三沙湾都属于内湾,与外海的海水交流受到一定的限制,在客观上形成了地理隔离,而这种特殊的地理隔离导致了群体间的基因流受阻,因此形成了浙江和福建 2 个分支。而 ZWY 群体和福建其他群体聚类在一起,笔者推测这个群体可能是引自福建三沙湾,究其原因可能有两方面:(1) 乐清湾缢蛏养殖历史悠久,本地渔民培育蛏苗分为两类,一类是天然附着苗,另一类是中间暂养苗。天然的贝类附着苗来自本土土长的乐清湾,中间暂养的贝类种苗,则一般是渔民从福建宁德等地采购而来,而 ZWY

群体可能是这些暂养苗的后代;(2)翁垟镇是温州市渔业养殖强镇之一,自 2000 年以来,当地农民纷纷创办育苗场,由于缢蛭性成熟受温度的影响,福建缢蛭较浙江缢蛭早熟,因此 ZWY 群体很有可能是福建缢蛭亲本经人工育苗产出的后代。至于 ZWG 群体也极有可能引自福建三沙湾。

群体遗传多样性可以用于评估物种的种质资源。本实验的结果表明乐清湾和三沙湾内自然滩涂缢蛭群体的遗传多样性仍处于较高水平,可以推断目前这 2 个湾内的种质情况基本良好,但是乐清湾存在异地引苗的现象,因此要加强缢蛭种质资源保护和管理,在苗种引进后,要防止与当地群体混杂。同时,缢蛭的繁育受到温度的影响,福建缢蛭较浙江缢蛭早熟,因此对于缢蛭的遗传育种,应尽量选择福建群体作为亲本群体。

参考文献:

- [1] 徐凤山,张素萍. 中国海产双壳贝图志[M]. 北京:科学出版社,2008:211-213.
- [2] 王冬群,李太武,苏秀榕. 缢蛭六个种群的生化遗传标记[J]. 水产科学,2004,23(4):8-11.
- [3] 牛东红,李家乐,汪桂玲,等. 缢蛭六群体 16SrRNA 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] SEKINO M, SAIDO T, FUJITA T, et al. Microsatellite DNA markers of Ezo abalone (*Haliotis discus hannai*): a preliminary assessment of natural populations sampled from heavily stocked areas [J]. Aquaculture, 2005, 243:33-47.
- [5] 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.
- [6] 闫学春,佟广香,匡友谊,等. 两个马氏珠母贝养殖群体遗传多样性微卫星分析[J]. 水产学杂志,2009,22(1):5-9.
- [7] 常亚青,陈晓霞,丁君,等. 虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) 5 个群体的遗传多样性[J]. 生态学报,2007,27(3):1143-1152.
- [8] QIN Y J, LIU X, ZHANG H B, et al. Genetic mapping of size-related quantitative trait loci (QTL) in the bay scallop (*Argopecten irradians*) using AFLP and microsatellite markers [J]. Aquaculture, 2007, 272: 281-290.
- [9] 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.
- [10] 侯宁,张研,鲁翠云,等. 微卫星 DNA 标记分析德国镜鲤的遗传潜力[J]. 遗传,2007,29(2):1509-1518.
- [11] EXCOFFIER L, LAVAL G, SCHNEIDER S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis [J]. Evolutionary Bioinform Online, 2005, 1:47-50.
- [12] NEI M, JAJIMA F, TATENO Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data [J]. Molecular Evolution, 1983, 19(3):153-170.
- [13] 李春艳,丁君,常亚青. 虾夷扇贝微卫星标记的分离及其养殖群体的遗传结构分析[J]. 中国水产科学,2009,16(1):39-46.
- [14] LI Q, XU K F, YU R H. Genetic variation in Chinese hatchery populations of the Japanese scallop (*Patinopecten yessoensis*) inferred from microsatellite data [J]. Aquaculture, 2007, 269: 211-219.
- [15] LI Q, PARK C, ENDO T, KIJIMA A. Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery strains of the Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*) [J]. Aquaculture, 2004, 235: 207-222.
- [16] 谷龙春,黄桂菊,何毛贤,等. 大珠母贝两个野生群体遗传多样性的微卫星分析[J]. 渔业科学进展,2009,30(4):96-101.
- [17] WRIGHT S. Evolution and the genetics of population, variability within and among natural populations [D]. Chicago: The University of Chicago Press, 1978.
- [18] 曲若竹,侯林,吕红丽,等. 群体遗传结构中的基因流[J]. 遗传,2004,26(3):377-382.
- [19] 潘洁,包振民,赵洋,等. 栉孔扇贝不同地理群体的遗传多样性分析[J]. 高技术通讯,2002(12):78-82.
- [20] HARE M P, AVISE J C. Molecular genetic analysis of a stepped multilocus cline in the American oyster (*Crassostrea virginica*) [J]. Evolution, 1996, 50(6): 2305-2315.
- [21] 王建军,李家乐,汪桂玲,等. 我国五大湖三角帆蚌群体 ITS-1 序列变异分析[J]. 湖泊科学,2008,20(2):208-214.
- [22] 贾名静,李家乐,牛东红,等. 长江中下游褶纹冠蚌 10 个群体 CO I 基因序列变异分析[J]. 动物学杂志,2009,44(1):1-8.
- [23] 陈燕妮,孙振兴,常林瑞. 长竹蛭不同地理居群的遗传多样性[J]. 水生生物学报,2010,34(2):270-277.

Microsatellite analysis on genetic diversity of *Sinonovacula constricta* stocks in Yueqing Bay and Sansha Bay

LIU Da-bo¹, NIU Dong-hong¹, FENG Bing-bing¹, ZHONG Yu-min¹, LI Jia-le^{1,2}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai 201306, China; 2. Aquaculture Division, E-Institute of Shanghai Universities, Shanghai 201306, China)

Abstract: Genetic diversity and genetic differentiation of 18 stocks of *Sinonovacula constricta* in Yueqing Bay and Sansha Bay, were investigated by using eight microsatellite loci, in order to evaluate the genetic divergence between Yueqing Bay and Sansha Bay, protecting aquatic genetic resources and providing the basic information of genetic breeding in sourceland of *Sinonovacula constricta* in China. The results of genetic diversity showed that: the average effective allele numbers (N_e) of Yueqing Bay and Sansha Bay ranged from 8.146 to 10.457 and from 7.457 to 9.947; the average expected heterozygosities (H_e) varied from 0.872 to 0.909 and from 0.846 to 0.894; the average genetic diversity index of Nei's ranged from 0.863 to 0.899 and from 0.836 to 0.886, respectively. Those data indicated higher genetic diversity in all of the 18 stocks in Yueqing Bay and Sansha Bay. Pair-wise F_{ST} values between stocks of Yueqing Bay and Sansha Bay ranged from 0.000 1 to 0.052 3, which indicated that there was some degree of differentiation among 18 stocks based on F_{ST} . The UPGMA phylogenetic trees based on D_A genetic distance suggested that the 18 stocks were divided into two groups, one of which included the stocks of ZYC, ZNY, ZNT, ZQJ, ZHW, ZHS and ZLP in Yueqing Bay whereas the other one consisted of ZWY and ZWG in Yueqing Bay and FZW, FMT, FSD, FSJ, FBZ, FXT, FCC, FSJ and FXW in Sansha Bay. As a result, we can infer that the stocks of ZWY and ZWG in Zhejiang province may come from Fujian Province, revealing the introduction phenomenon in the culture of *Sinonovacula constricta*.

Key words: *Sinonovacula constricta*; Yueqing Bay; Sansha Bay; microsatellite DNA; genetic diversity