

# 基于 CO1 基因的渔山列岛厚壳贻贝遗传资源评估

袁文斌<sup>1</sup>, 李长保<sup>1</sup>, 焦海峰<sup>2</sup>, 林志华<sup>1</sup>, 包永波<sup>1</sup>

(1. 浙江万里学院, 浙江 宁波 315100; 2. 宁波市海洋与渔业研究院, 浙江 宁波 315012)

**摘要:** 基于线粒体 CO1 基因的序列, 对渔山列岛, 大连獐子岛, 南麂列岛, 山东南隍城乡, 舟山嵊泗 5 个野生群体的厚壳贻贝进行遗传多样性和遗传结构的分析。结果表明: 在 mtDNACO1 基因同源片段上共检测到了 39 个多态位点, 其中 39 个简约信息位点, 无单突变位点, 构成 40 个单倍型, 群体遗传多样性水平为: 渔山>山东>大连>舟山>南麂; 然而单倍型多样性却是山东>渔山>南麂>大连>舟山。分子进化树和单倍型网络关系图构建结果显示: 5 个群体之间分为 3 个单倍型类群(A、B、C), 其中 A 类群含 15 个单倍型, B 类群含 23 个单倍型, C 类群含 2 个单倍型(均为渔山列岛的单倍型), 其中渔山列岛的单倍型在上述三个类群中都有分布。3 个单倍型类群间的遗传距离为 0.0099~0.0268。渔山列岛群体内遗传分化较为显著, 其他 4 个群体间未检测到显著的遗传分化。

**关键词:** CO1 基因; 遗传资源; 渔山列岛; 厚壳贻贝(*Mytiluscoruscus*); 单倍型

中图分类号: Q523 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2017)11-0107-06

DOI: 10.11759/hyxx20170727001

厚壳贻贝(*Mytiluscoruscus*)属于双壳纲(Bivalvia), 翼形亚纲(Pteriomorphia), 贻贝目(Mytioida)。也称淡菜, 海红, 中国古书上还称之为“东海夫人”<sup>[1]</sup>, 主要分布于黄、渤海和东海沿岸<sup>[2]</sup>, 野生厚壳贻贝多分布在外侧海岛低潮线至 20 m 之间的海底礁岩上<sup>[3]</sup>, 厚壳贻贝(*Mytiluscoruscus*)是渔山列岛重点保护的贝类资源之一, 也是当地重点采捕的种类之一, 由于其世代更替速度较慢, 大规模、高强度的采捕势必造成贻贝资源的减少。本文运用 CO1 基因分析对渔山列岛代表性潮间带生物厚壳贻贝进行遗传学研究, 对五个地理群体(渔山、山东、大连、舟山、南麂)进行遗传多样性和单倍性分析等, 构建反映群间关系的系统进化树, 观察不同群体的遗传多样性, 探讨野生群体遗传多样性之间的差异, 从分子水平了解渔山列岛厚壳贻贝遗传背景。通过本课题的研究, 为渔山列岛其他海洋生物的恢复和保护提供了借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料来源

贻贝: 5 个地点的野生厚壳贻贝: 渔山列岛、大连獐子岛、南麂列岛、山东南隍城乡、舟山嵊泗。以上厚壳贻贝采集后活体运送至实验室, 取闭壳肌放于无水乙醇中, -20℃保存备用。

### 1.2 实验步骤

#### 1.2.1 基因组 DNA 的提取

用酚-氯仿法抽提各样品 DNA。检测 DNA 完整性后, 放入-20℃保存备用。

#### 1.2.2 PCR 扩增

采用常规 PCR, 反应体系为 25 μL, 其中 12.5 μL taq master mix, 9 μL 双蒸水, 1.5 μL 模板, 上下引物各 1 μL。PCR 程序为: 94℃ 预变性 10 min; 循环过程为: 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 90 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min, 引物序列为: CO1-F(5'-GGTCAACAAA TCATAAAGATATTGG-3'), CO1-R(5'-TAAACTTCA GGGTGACCAAAAAATCA-3')。

#### 1.2.3 PCR 产物鉴定

PCR 产物在 1%琼脂糖中电泳检测, 700 bp 处出现单一亮条带则证明扩增成功。

收稿日期: 2017-07-27; 修回日期: 2017-09-25

基金项目: 浙江省公益性项目(2016C33090); 宁波市农业科技攻关项目(2014C10018)

[Foundation: Zhejiang Province Public Technology Applied Research Projects, No.2016C33090; Ningbo Agricultural Science and Technology Research Project, NO.2014C10018]

作者简介: 袁文斌(1996-), 男, 浙江宁波人, 学士, 主要从事海洋生物学研究, 电话: Email: 821612148@qq.com; 包永波(1980-), 通信作者, 男, 研究员, 硕士生导师, 主要从事贝类分子遗传育种方向的研究, Email: bobbao2001@gmail.com

表 1 5 个厚壳贻贝群体样品信息  
Tab. 1 Messages for sample collection

地点	贻贝 (缩写)	经度	纬度	采集时间 (年-月)
渔山列岛	YS	122°15'	28°53'	2015-07
大连獐子岛	DL	122°43'	39°01'	2016-04
南麂列岛	NJ	121°05'	27°29'	2016-05
山东南隍城乡	SD	120°43'	37°55'	2016-07
舟山嵎泗	ZS	122°26'	30°43'	2016-11

### 1.2.4 扩增产物纯化及序列测定

本部分工作由上海桑尼公司完成。

### 1.2.5 数据分析

使用 Bioedit, Cexpress 等软件进行序列比对, 并辅以人工校对, 并抹平单碱基差异。使用 DnaSP 软件分析碱基组成、单倍型状况和遗传多样性指数, 使用 MEGA7.0 软件分析遗传距离, 使用 MEGA7.0 软件的 NJ 方法构建分子系统树, 计算系统分支遗传差异程度。使用 DnaSP 转换格式后使用 Network 软件辅助以人工绘制单倍型网络关系图, 绘出碱基差异数图。

## 2 结果与分析

测序结果通过 Cexpress 与 MEGA 软件处理后, 获得用于分析的序列, 渔山列岛群体 30 条, 大连獐子岛群体 26 条, 南麂列岛群体 39 条, 山东南隍城乡群体 16 条, 舟山嵎泗群体 45 条, 共 156 条序列, 统一截取 576 bp 的 CO1 序列。

在 mtDNACO1 基因同源片段上共检测到了 39 个多态位点, 其中 39 个简约信息位点, 无单突变位点, 构成 40 个单倍型, 其中 16 个共享单倍型, 24 个特有单倍型(表 2), Network 绘制的碱基不配对分析图中可以看到每个单倍型间的核苷酸差异数(图 1), 5 个群体总的单倍型多样性为  $0.888 \pm 0.014$ , 核苷酸多样性为  $0.00558 \pm 0.00049$ , 两两对比的碱基差异度为  $3.216 \pm 1.669$ 。基因片段中的 A+T 含量(60.5%)明显大于 C+G 的含量(39.5%)。

基于 mtDNACO1 基因同源性片段获得的遗传多样性结果显示, 40 个单倍型中, 有 4 个单倍型为 5 个群体的共享单倍型, 特有单倍型居多, 单倍型共享率为 40.0%。就核苷酸多样性指数和两两对比的碱基差异度而言, 渔山群体 ( $\pi=0.00890 \pm 0.00193$ ,  $k=5.126 \pm 2.556$ ) > 山东群体 ( $\pi=0.00535 \pm 0.00062$ ,  $k=3.083 \pm 1.691$ ) > 大连群体 ( $\pi=0.00503 \pm 0.00051$ ,  $k=2.895 \pm 1.571$ ) > 舟山群体 ( $\pi=0.00442 \pm 0.00038$ ,  $k=2.547 \pm 1.395$ ) > 南麂

群体 ( $\pi=0.00427 \pm 0.00028$ ,  $k=2.459 \pm 1.359$ ); 但是单倍型多样性却是山东群体 ( $h=0.942 \pm 0.048$ ) > 渔山群体 ( $h=0.929 \pm 0.023$ ) > 南麂群体 ( $h=0.883 \pm 0.031$ ) > 大连群体 ( $h=0.868 \pm 0.042$ ) > 舟山群体 ( $h=0.855 \pm 0.033$ )。

表 2 厚壳贻贝 5 个群体的单倍型频率分布  
Tab. 2 Distribution of haplotypes in five *Mytiluscoruscus* populations

单倍型	DL	NJ	SD	YS	ZS
Hap_1	4	8	2	2	12
Hap_2	1				
Hap_3	2	2	1	4	2
Hap_4	1				
Hap_5	7	10	4	4	11
Hap_6	1				
Hap_7	6	4	1	5	7
Hap_8	1				
Hap_9	1				
Hap_10	1				
Hap_11	1				
Hap_12		2			
Hap_13		2		1	2
Hap_14		1			
Hap_15		3	1		1
Hap_16		2	1	1	
Hap_17		1			
Hap_18		2			
Hap_19		1			
Hap_20		1			
Hap_21			1		1
Hap_22			1		
Hap_23			1		
Hap_24			1		
Hap_25			1		
Hap_26			1		1
Hap_27				4	
Hap_28				2	
Hap_29				1	1
Hap_30				1	
Hap_31				2	
Hap_32				1	1
Hap_33				1	
Hap_34				1	
Hap_35					1
Hap_36					1
Hap_37					1
Hap_38					1
Hap_39					1
Hap_40					1

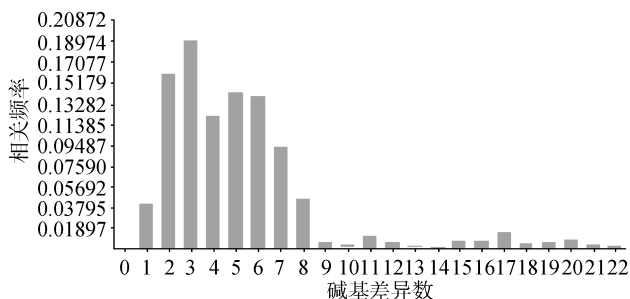


图 1 厚壳贻贝单倍型间碱基不配对分析图

Fig. 1 Mismatch distributions analyses of the nucleotide of CO1 gene for *Mytiluscoruscus* haplotypes

基于 mtDNACO1 基因片段的群体间遗传距离构建了 5 个群体之间的 NJ 系统树(图 2), 看到渔山列岛群体与其他 4 个群体的遗传差异较大, 山东群体与

大连群体间的关系较近, 渔山群体与南麂群体, 舟山群体的关系较近。表 4 中可以看出群体内遗传距离为: 渔山(0.0089)>山东(0.0054)>大连(0.0050)>舟山(0.0044)>南麂(0.0043)(表 4)结果显示渔山与其他四个群体间的遗传距离较大。

基于 mtDNACO1 基因同源性片段用 MEGA7.0 软件构建了单倍型 NJ 系统树, 系统发育结果显示, 5 个群体内存在三个显著分化的单倍型类群 A、B、C, 其中 A 类群含 15 个单倍型, B 类群含 23 个单倍型, C 类群含 2 个单倍型(均为渔山列岛的样品), 其中渔山列岛在上述三个类群中都有分布。使用 Network 软件绘制的单倍型中介连接网络关系图与 MEGA7.0 构建的 NJ 树结果一致(图 3-4)。类群间的遗传距离为 0.0099~0.0268(A/B=0.0099, A/C=0.0268, B/C=0.0208)(图 3)。

表 3 厚壳贻贝 5 个群体的遗传多样性指数

Tab. 3 Molecular diversity indices of five *Mytiluscoruscus* populations

样品	样本量	单倍型数目	单倍型多样性( $h$ )	多态位点	核苷酸多样性指数( $\pi$ )	两两比对的碱基差异数( $k$ )
大连	26	11	0.868±0.042	12	0.00503±0.00051	2.895±1.571
南麂	39	13	0.883±0.031	12	0.00427±0.00028	2.459±1.359
山东	16	12	0.942±0.048	11	0.00535±0.00062	3.083±1.691
渔山	30	14	0.929±0.023	29	0.00890±0.00193	5.126±2.556
舟山	45	16	0.855±0.033	17	0.00442±0.00038	2.547±1.395

表 4 基于 CO1 基因片段序列的 5 个厚壳贻贝群体间遗传距离(对角线下)、群体内遗传距离(粗体显示)和群体间平均净遗传距离(对角线上)

Tab. 4 Genetic distances between populations (below diagonal), genetic distances within populations (in bold values), and genetic net distance between populations (above the diagonal) of the five *Mytiluscoruscus* populations based on CO1 gene

贻贝	DL	NJ	SD	YS	ZS
DL	<b>0.0050</b>	0.0000	0.0000	0.0005	-0.0001
NJ	0.0046	<b>0.0043</b>	0.0001	0.0004	-0.0001
SD	0.0052	0.0049	<b>0.0054</b>	0.0010	0.0001
YS	0.0074	0.0070	0.0081	<b>0.0089</b>	0.0003
ZS	0.0047	0.0043	0.0050	0.0070	<b>0.0044</b>

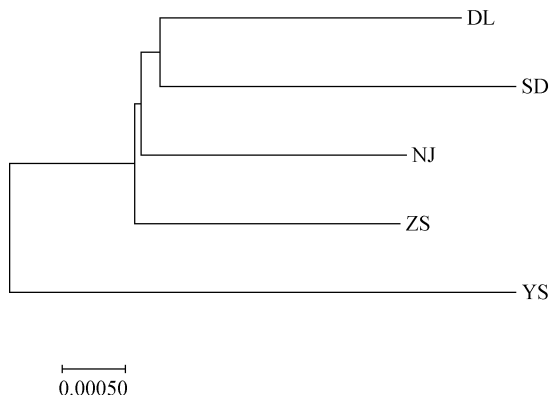


图 2 基于 5 个群体间遗传距离的 NJ 系统树

Fig. 2 Neighbor-joining tree of five *Mytiluscoruscus* populations based on genetic distance

基于厚壳贻贝 CO1 基因的分歧速率为(0.7%~2.4%/MY)<sup>[4]</sup>。计算所有单倍型类群的分化时间: A/B 的净遗传距离为 0.0052, A/C 的净遗传距离为 0.0149, B/C 的净遗传距离为 0.0088; 类群 A/B 的分化事件发生于 21~74 万年前, 类群 A/C 的分化事件发生于 62~212 万年前, 类群 B/C 的分化事件发生于 36.67~125.7 万年前。上述分化事件的发生主要集中在更新世晚中期。

### 3 讨论

线粒体 DNA 是一种共价闭合的, 环状的双链分子由于具有高拷贝数, 高置换率和母系遗传等特点, 在近十年间已经成为研究动物遗传多样性的重要工

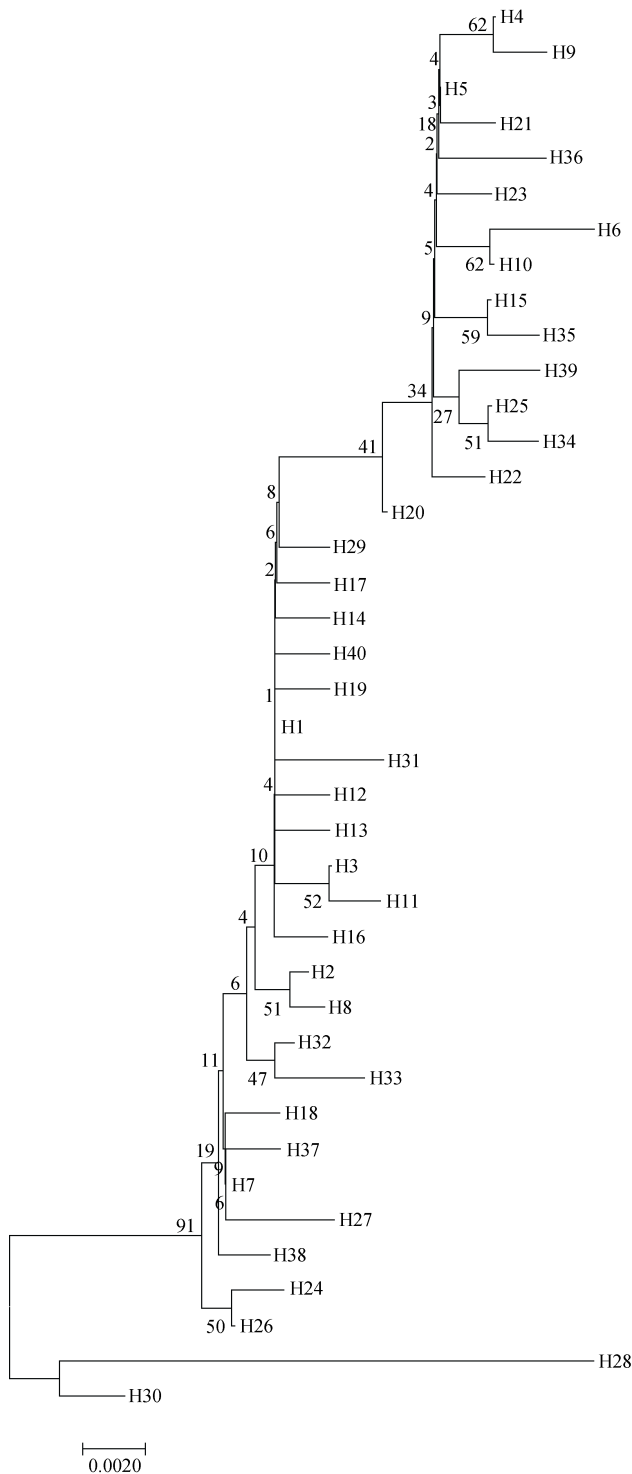


图3 基于 CO1 基因的各个单倍型 NJ 系统树

Fig. 3 Neighbor-joining tree of haplotypes for *Mytiluscoruscus* from CO1 gene

具<sup>[5-9]</sup>。最近有关人类线粒体 DNA 的研究文献也屡见不鲜<sup>[10]</sup>。目前对贻贝的研究方向主要在人工养殖或者遗传学分析<sup>[11]</sup>上,也有少许分析形态<sup>[12]</sup>,研究药理病理<sup>[13-14]</sup>的方向。研究表明,海洋贝类的遗传多

样性水平的高低受多种因素的影响,比如洋流,温度等等。此外,海洋贝类的自身生活史特征也会印象其遗传多样性。因此,加大对海洋贝类种群遗传多样性的监测及遗传多样性分布格局的分析,对于海洋贝类遗传多样性的保护和合理的资源利用有意义。

在多态位点的研究中,渔山群体拥有较多的多态位点,有较为丰富的遗传变异。单倍型多样性( $h$ ),核苷酸多样性( $\pi$ ),两两比较的碱基差异度( $k$ )是衡量种群遗传多样性水平的重要参数<sup>[15]</sup>。本研究中,渔山群体的核苷酸多样性与两两比较的碱基差异度值要显著大于大连、山东、舟山和南麂群体。而单倍型多样性却是山东群体更高,可能因为山东群体的个体数较少导致。大连獐子岛与山东南隍城乡地同处渤海黄海交界处附近,地理位置相隔不远,南麂列岛、渔山列岛、舟山嵊泗同处浙江沿海,渔山列岛距大陆最远,群体 NJ 系统树的结果也发现:渔山列岛群体与其他四个群体之间的遗传距离较远,相对来说渔山列岛群体与舟山群体以及南麂群体的遗传距离较近;山东群体与大连群体之间遗传距离较近。推测群体间遗传距离的远近可能与各群体间的相对地理位置的远近有关。综上所述,虽然渔山列岛不仅与大陆的距离较远,而且与其他群体之间的遗传距离也较远,但是却具有较为丰富的遗传多样性水平,可能与渔山列岛厚壳资源丰厚,群体数量较大,种子资源状况较好有关。

Zuckerlandl 和 Pauling<sup>[16]</sup>提出分子钟假说认为对于任意给定的大分子(蛋白质或 DNA 分子)在其所有的进化谱系中核苷酸替代速率是近似恒定的。对于 5 个群体的各个单倍型做系统发育分析后显示,厚壳贻贝被分为 3 个较为明显的类群 A、B、C。4 个类群间的净遗传距离为 0.0052~0.0149。采用 0.7%~2.4%的分歧速率计算获得 4 个类群的分化时间在大概一百万年之前。而那时候的海平面下降的非常剧烈,海平面下降了 120~140 m<sup>[17]</sup>,边缘海的面积和结构发生了巨大的变化,从而导致了许许多海洋生物的分布范围经历了收缩和扩张,并在遗传信息上留下明显的印迹<sup>[18]</sup>。厚壳贻贝是群体附着生长的双壳类,而且生长于近海,受此次海洋的大变动的的影响应该很大。从而导致了 A、B 群体和 C 群体的分化。C 群体的两个单倍型是渔山群体的样本,而其他渔山的单倍型在 A、B 两个类群里都有渗透,推测可能是渔山列岛群体在一百万年前隔离后又与其他群体重新扩张混合。

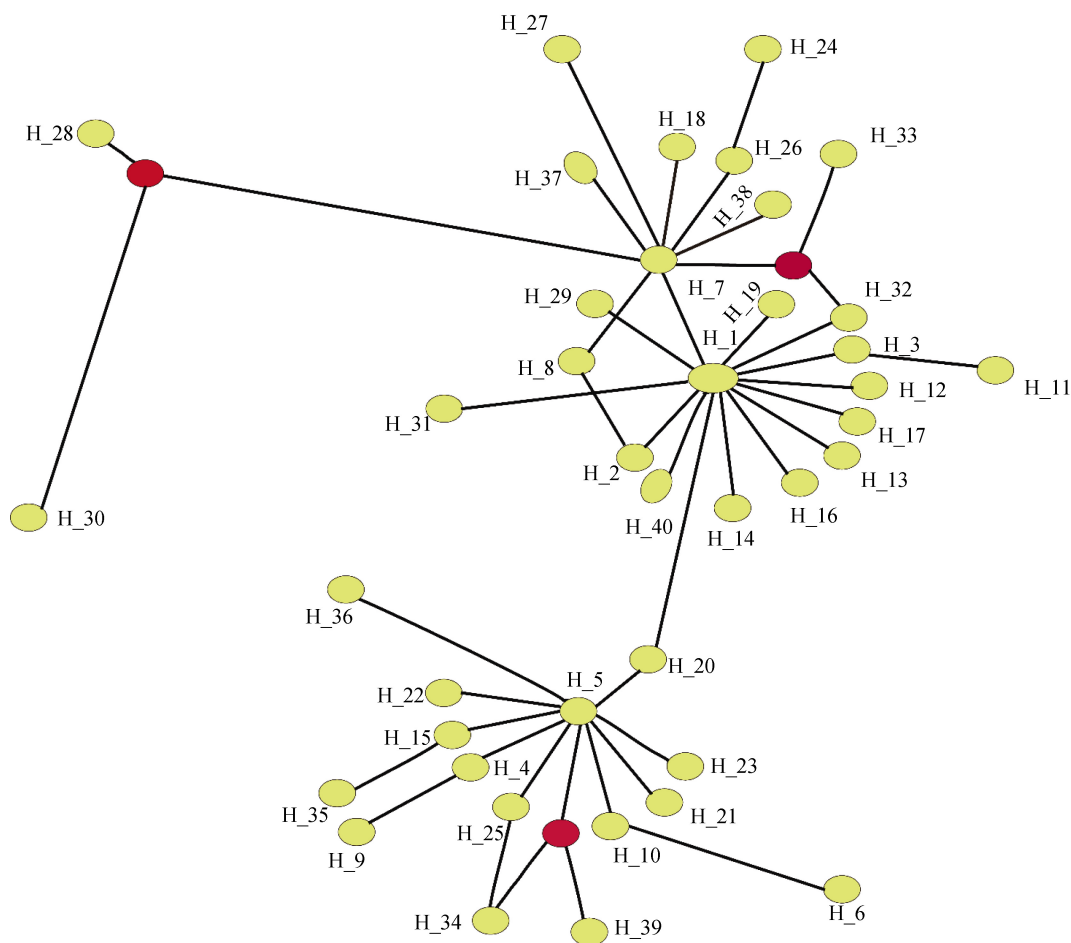


图 4 厚壳贻贝单倍型中介连接网络关系图

Fig. 4 The median joining network of *Mytiluscoruscus* haplotypes

参考文献:

- [1] 常抗美, 吴剑锋. 厚壳贻贝人工繁殖技术的研究[J]. 南方水产, 2007, 3: 26-30.  
Chang Kangmei, Wu Jianfeng. Study on artificial propagation of mussel *Mytiluscoruscus*[J]. South China Fisheries Science, 2007, 3: 26-30.
- [2] 叶莹莹, 徐梅英, 郭宝英, 等. 厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)4 个群体遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 海洋与湖沼, 2012, 1: 113-119.  
Ye Yingying, Xu Meiyong, Guo Baoying, et al. Thick shell mussel (*Mytilus coruscus*) analysis of 4 population genetic diversity in ISSR[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2012, 1: 113-119.
- [3] 杨顺良, 杨璐, 赵东波, 等. 福建台山列岛厚壳贻贝资源调查与评估[J]. 海洋科学, 2015, 39(11): 32-38.  
Yang Shunliang, Yang Lu, Zhao Dongbo, et al. The investigation and evaluation of Fujian Taishan islands' *Mytilus coruscus* resources[J]. Marine Sciences, 2015, 39(11): 32-38.
- [4] 毛阳丽. 贻贝属的系统发育及群体的形态学和遗传学研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011, 63-64.  
Mao Yangli. Phylogenetic groups, Morphological and genetic studies of the genus of *Mytilus*[D]. Qingdao: The master degree thesis of Ocean University of China, 2011: 63-64.
- [5] Moritz C, Dowling T E, Borwn W M. Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematics[J]. Annual Review of Ecology & Systematics, 1987, 18: 269-292.
- [6] Englbrecht C C, Freyhof J, Nolte A, et al. Phylogeography of the bullhead *Cottusgobio* (*Pisces: Teleostei: Cottidae*) suggests a pre-Pleistocene origin of the major central European populations[J]. Molecular Ecology, 2000, 9(6): 709-722.
- [7] Whitehead A, Anderson S L, Kuivila K M, et al. Genetic variation among interconnected populations of *Catostomus occidentalis*: implications for distinguishing impacts of contaminants from biogeographical structuring[J]. Molecular Ecology, 2003, 12(10): 2817-2833.
- [8] Zhou Benjiang, Yang Bingbing, Pham Ngoc Doanh, et al. Sequence analyses of ITS2 and CO1 genes of

- Paragonimus proliferus* obtained in Yunnan province, China and their similarities with those of *P. hokouensis*[J]. Parasitology Research, 2008, 102(6): 1379-1383.
- [9] 杨振雄, 毛阳丽, 宋娜. 浙江和福建沿海厚壳贻贝 *Mytilus coruscus* 群体的 CO1 序列比较分析[J]. 海洋湖沼通报, 2014, 2: 82-88.  
Yang Zhenxiong, Mao Yangli, Song Na. Comparative analysis of CO1 sequence in Zhejiang and the Fujian coast *Mytilus coruscus* group. Transactions of Oceanology and Limnology, 2014, 2: 82-88.
- [10] Zhen Xiumei, Wu Bailin, Wang Jian. Increased Incidence of Mitochondrial Cytochrome C Oxidase 1 Gene Mutations in Patients with Primary Ovarian Insufficiency[J]. PLoS ONE, 2015, 10(7): 1-8.
- [11] Shen Yubang, Li Jiale, Feng Bingbing. Genetic Analysis of cultured and wild populations of *Mytilus coruscus* based on mitochondrial DNA[J]. Zoological research, 2009, 30(3): 240-246.
- [12] Vekhova E E. Growth and Shell Morphology of Three *Mytilidae* (*Bivalvia*) Species from the Sea of Japan[J]. Zoologicheskii Zhurnal, 2013, 92(4): 399-408.
- [13] Xu Hongli, Guo Tingting, Guo Yifeng, et al. Characterization and protection on acute liver injury of a polysaccharide MP-I from *Mytilus coruscus*[J]. Glycobiology, 2008, 18(1): 97-103.
- [14] Wu Jinchao, Cheng Jie, Shi Xiaolai. Preparation of ACE inhibitory peptides from *Mytilus coruscus* hydrolysate using uniform design[J]. Biomed Research International, 2013: 1-6.
- [15] 肖永双, 程启群, 任桂静, 等. 中国近海条石鲷 (*Oplegnathus fasciatus*) 群体遗传多样性线粒体 DNA 序列分析[J]. 海洋与湖沼, 2013, 44(2): 427-432.  
Xiao Yongshuang, Chen Qiqun, Ren Guijing, et al. China rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) analysis of genetic diversity of mitochondrial DNA sequences[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2013, 44(2): 427-432.
- [16] Zuckerkandl E, Pauling L. Evolving Genes and Proteins[M]. New York: Academic press, 1965, 1965.
- [17] Kurt Lambeck, Tezer M Esat, Emma-kate Potter. Links between climate and sea levels for the past three million years[J]. Nature, 2002, 419(6903): 199-206.
- [18] Hewitt Godfrey. The genetic legacy of the Quaternary ice ages[J]. Nature, 2000, 405(6789): 907-913.

## Genetic resources assessment of mussel *Mytilus coruscus* based on CO1 gene in Yushan Island

YUAN Wen-bin<sup>1</sup>, LI Chang-bao<sup>1</sup>, JIAO Hai-feng<sup>2</sup>, LIN Zhi-hua<sup>1</sup>, BAO Yong-bo<sup>1</sup>

(1. Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China; 2. Ningbo Institute of Marine and Fishery, Ningbo 315012, China)

**Received:** Jul. 27, 2017

**Key words:** CO1 gene; Genetic resources; Yushan Island; *Mytiluscoruscus*; haplotype

**Abstract:** Partial nucleotide sequences of mitochondrial DNA CO1 gene were sequenced and analyzed to estimate the genetic diversity and genetic structure of *Mytiluscoruscus* populations in Yushan island, Zhangzi island of Dalian, Nanji island, Nanhuangcheng islands of Shandong, and Shengsi island of Zhoushan populations. In the mtDNA, homologous fragments of CO1 gene were detected in 39 polymorphic sites, including 39 parsimony informative sites, no single mutation, 40 haplotypes were identified. The results of the genetic diversity level ranging from high to low were as follows: Yushan, Shandong, Dalian, Zhoushan, and Nanji populations. The haplotype diversity ranging from high to low was as follows: Shandong, Yushan, Nanji, Dalian, and Zhoushan populations. Three genealogical clades (A, B, C) were checked in the *Mytiluscoruscus* populations in NJ and MST analyses. Genealogical clade-A was found to have 15 haplotypes, 13 in genealogical clade-B, and 2 in genealogical-C (all of them are haplotypes of the Yushan Island). The Yushan island's haplotypes were disturbed in three genealogical clades, the genetic distances among the clades ranged from 0.0099 to 0.0268. The genetic differentiation of Yushan population was higher than that of the other four populations.

(本文编辑: 康亦兼)