

基于线粒体 CO₁ 基因分析厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)养殖群体遗传多样性*

周 超¹ 郭宝英¹ 吴常文¹ 叶莹莹¹ 李继姬¹ 冯广朋²

(1. 浙江海洋学院海洋科学学院 国家海洋设施养殖工程技术研究中心 舟山 316004; 2. 中国水产科学研究院东海水产研究所 农业部海洋与河口渔业资源及生态重点开放实验室 上海 200090)

提要 基于线粒体 DNA 的 CO₁ 基因序列对我国沿海重要经济贝类厚壳贻贝 3 个养殖群体(温州、宁德、福州)的遗传多样性和遗传结构进行了分析。由 PCR 扩增获得 23 个个体的 CO₁ 基因 787bp 的部分序列, 其多态性遗传参数统计显示, 23 个个体共检出 21 个单倍型, 总群体单倍型多样性指数(H_d)为 0.978, 核苷酸多样性指数(P_i)为 0.01045, 平均核苷酸差异数(K)为 8.534, 三个群体均显示出较丰富的遗传多样性。遗传分化系数(F_{st})表明, 福州群体与宁德群体和温州群体间有一定程度的遗传分化, 而宁德群体和温州群体间无遗传分化。

关键词 厚壳贻贝, CO₁, 遗传多样性, 遗传结构
中图分类号 Q955

厚壳贻贝(*Mytilus coruscus* Gould)隶属于软体动物门、瓣鳃纲、异柱目、贻贝科、贻贝属, 又称壳菜, 是贻贝属中个体较大的种类。以发达的足丝营附着生活, 多附着在浪击带的外海岩石上, 主要分布在黄海、渤海和东海沿岸。厚壳贻贝为被动摄食, 靠海水流动送来食物, 以鳃滤食之, 食物以浮游性硅藻为主。它不仅个大产量高, 而且肉味鲜美、营养丰富, 也是一种为人类提供高级蛋白的重要来源。在我国, 自古以来就被人们广泛用做美味食品和滋补品。厚壳贻贝在我国沿海又是自然生长产量较高和收益最大的贝类, 如早在 1956 年, 仅在浙江象山县年产约 5 万 kg 淡菜干; 1958 年, 在浙江嵊泗县曾以投石法进行半人工养殖, 每公顷可产 667kg。其后, 随着我国经济建设的发展, 它不仅是我国沿海重要的海产资源, 而且也是重要的海水养殖对象(王祯瑞, 1997)。

随着厚壳贻贝养殖生产的长期发展, 海洋水质恶化以及单一营养繁殖方式等不利因素日渐突出, 使中国厚壳贻贝养殖产业面临产量逐年降低、病虫害

越来越严重及种质资源退化等问题, 选育高产、抗病等优良品种已迫在眉睫, 首先对其遗传多样性检测显得尤为重要。而目前对厚壳贻贝的有关研究主要集中在苗种繁育(常抗美等, 2007)、生理生态(叶莹莹等, 2011)及基因克隆(廖智等, 2010a, b; 刘慧慧等, 2011), 而有关厚壳贻贝种质资源遗传多样性的研究仅有零星报道(Shen *et al.*, 2009)。

由于线粒体基因组(mtDNA)具有结构简单、母系遗传、进化速率快、几乎不发生重组等特点, 已成为目前研究种内群体遗传结构、近缘种间亲缘关系的有效工具之一(徐梅英等, 2011)。其中 CO₁、CO₂ 和 CO₃ 最保守, 并被认为是研究物种分子系统演化和分类的有效基因(肖武汉等, 2000; 郭新红等, 2004; Meyer, 1993), 利用其进行系统分化及群体遗传学研究已有不少报道。因此, 本文利用线粒体 CO₁ 序列分析中国沿海厚壳贻贝 3 个养殖群体的遗传多样性及遗传结构, 旨在研究其遗传背景为今后的厚壳贻贝养殖良种选育提供参考依据。

* 国家海洋公益性行业科研专项, 201005013 号; 国家国际科技合作项目, 2010DFA22770 号; 农业部海洋与河口资源及生态重点实验室开放课题, 10-01 号。周 超, E-mail: zc43115@163.com

通讯作者: 吴常文, 教授, E-mail: wucw08@126.com; 郭宝英, 博士, 讲师, E-mail: guobaobao1981@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-01-15, 收修改稿日期: 2011-03-29

1 材料与方法

1.1 样品的采集

养殖厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)样品于 2010 年 1—6 月期间分别采自福建福州(FZ)、福建宁德(ND)、浙江温州(WZ), 样品取新鲜闭壳肌保存于 95%酒精, 带回实验室备用。

1.2 DNA 的提取、扩增及测序

取肌肉 100mg 充分剪碎, 加入 700 μ l 组织细胞裂解液(10mmol/L Tris · HCl, pH 8.0; 50mmol/L EDTA; 200mmol/L NaCl 和 0.5% SDS)及蛋白酶 K 至终浓度 100 μ g/ml, 温和混匀, 55 $^{\circ}$ C 消化过夜, 再用标准的酚-氯仿法(Sambrook *et al*, 2002)提取基因组 DNA, DNA 质量用 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

线粒体 DNA CO (细胞色素氧化酶亚基)的扩增引物源自(Groenenberg *et al*, 2011), CO 基因片段的两条引物分别为: F (5' TATGTACCAGGTCCAAGTCCGTG 3'), R (5' ATGCTCTTCTTGAATATAAGCGTACC 3'); 引物由上海英骏生物技术公司合成。PCR 反应体系为: 总体积 25 μ l, 其中 2.5 μ l 10 \times buffer, 2 μ l Mg²⁺ (20mmol/L), 2.5 μ l dNTPs (2.5mmol/L), 0.25 μ l Taq DNA polymerase (5U/ μ l), 正反引物(10mol/L)各 1 μ l, 1 μ l 模板 DNA 溶液(10—100ng/ μ l), 14.75 μ l ddH₂O; PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 94 $^{\circ}$ C 40s, 54 $^{\circ}$ C 50s, 72 $^{\circ}$ C 90s, 38 个循环, 然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。PCR 扩增产物送上海英骏生物技术公司测序。

1.3 数据分析

将双向测序获得的序列进行拼接, 之后在 GenBank 数据库中进行 BLAST 同源性搜索, 经验证确定为 CO 基因。序列结果利用 MEGA 3.1 软件进行 DNA 序列排列, 同时辅以人工校对, 并进行序列比较和变异检测, 确定变异位点和单倍型。采用 DnaSP 4.1 软件计算单倍型多样性指数(Haplotype diversity, H_d)、核苷酸多样性(Nucleotide diversity, P_i)和核苷酸歧异度(Pairwise divergence, π)。用 Arlequin 3.01 软件中的分子变异分析(AMOVA)方法估算遗传变异在群体间和群体内的分布, 并计算群体间遗传分化系数(F -statistics, F_{st})及其显著性(重复次数 1000)。

2 结果

2.1 序列变异特征分析

所分析的 23 个厚壳贻贝的 CO 基因序列长度为 787bp, 其突变位点为 52 个, 变异比例为 6.60%, 其中单突变位点 22 个, 简约信息位点 134 个, 同时还检测到 17 个插入或缺失位点。四个碱基 A、T、C、

G 平均含量分别为 37.16%、22.90%、14.44%和 25.50%, A+T 含量(60.60%)高于 G+C 含量(39.94%)(表 1)。

表 1 厚壳贻贝线粒体 CO 基因片段的序列组成(%)
Tab.1 Nucleotide composition (%) of the fragments of mitochondrial CO gene in *M. coruscus*

群体	A	T	C	G
福州	22.90	37.33	14.31	25.46
宁德	22.88	36.90	14.63	25.58
温州	22.92	37.24	14.39	25.45
平均	22.90	37.16	14.44	25.50

2.2 遗传多样性和遗传结构

多态性遗传参数统计显示, 23 个个体共检出 21 个单倍型(表 2), 群体间共享单倍型 2 个, 占单倍型总数的 9.52%, 该两个单倍型发生在福州群体和宁德群体, 其余 19 个单倍型均为某个群体所特有。遗传参数统计表明, 各群体多态位点比例在 2.41—3.93 之间, 平均值为 3.05%; 单倍型多样性指数(H_d)在 0.9333—1.0000 之间, 平均值为 0.978; 核苷酸多样性指数(P_i)在 0.00768—0.01113 之间, 平均值为 0.01045; 平均核苷酸差异数(K)在 6.036—10.500 之间, 平均值为 8.534, 三个群体均显示出较丰富的遗传多样性。无论是单倍型多样性参数还是核苷酸多样性参数来看, 遗传多样性都以温州群体最高, 宁德群体其次, 福州群体最低(表 2)。

表 2 基于 CO 序列的厚壳贻贝群体的遗传多样性参数
Tab.2 The genetic diversity parameters of CO gene in the three populations of *M. coruscus*

群体变异参数	群体		
	福州	宁德	温州
个体数	8	6	9
单倍型数	8	5	9
单倍型多样性(H_d)	1.000	0.9333	1.000
多态位点比例(%)	2.41	2.80	3.93
核苷酸多样性(P_i)	0.00768	0.01113	0.01254
平均核苷酸差异数(K)	6.036	9.0667	10.5000

厚壳贻贝三个群体间的遗传距离(表 3), 福州和宁德群体之间为 0.015, 福州和温州群体之间为 0.011, 宁德和温州群体之间为 0.013。群体间分化系数 F_{st} (表 3)显示, 福州和宁德群体之间 F_{st} 为 0.33616, 福州群体和温州群体之间为 0.06254, 宁德群体和温州群体之间为 0.09071。AMOVA 分析表明(表 4), 在整个遗传变异中有 84.47%存在于群体内部, 15.53%存在于群体之间, 进一步证实了厚壳贻贝群体内分化为遗传变异的主要部分。

表 3 基于 CO 序列的厚壳贻贝群体间遗传距离(对角线
下)和群体间分化系数(对角线上)

Tab.3 Genetic distance (below the diagonal) and pair-wise F_{st} (above the diagonal) comparisons of the three populations of *M. coruscus* based on CO gene

群体	福州	宁德	温州
福州	—	0.33616	0.06254
宁德	0.015	—	0.09071
温州	0.011	0.013	—

表 4 厚壳贻贝群体遗传变异的 AMOVA 分析

Tab.4 Hierarchical AMOVA results of the three populations of *M. coruscus*

变异来源	自由度 df	方差总和	变异组分	变异贡献率 (%)
群体间	2	20.513	0.78871Va	15.53
群体内	20	85.792	4.28958Vb	84.47
总计	22	106.304	5.07829	100

UPGMA 聚类图(图 1)揭示, 厚壳贻贝三个养殖群体之间没有明显分化, 在遗传上属同一群体。

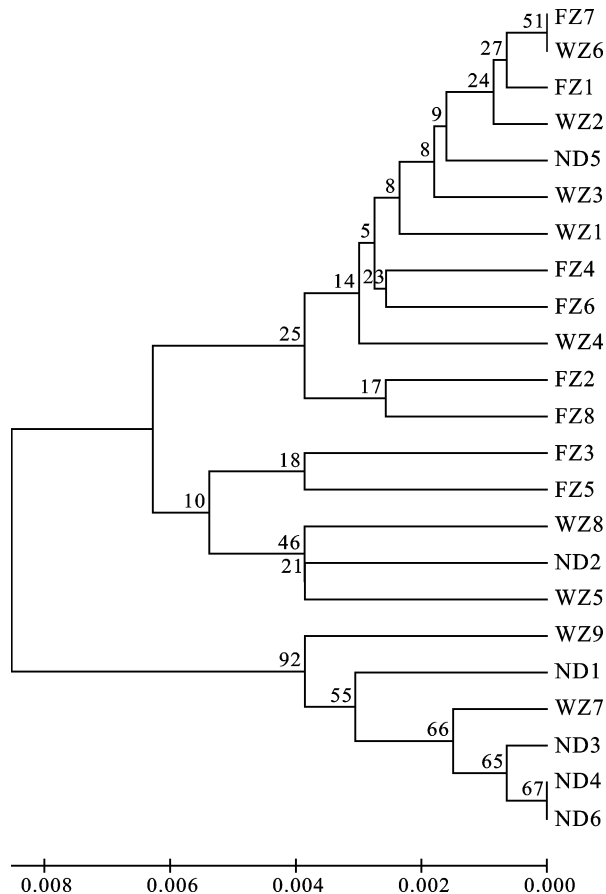


图 1 基于 CO 序列的 UPGMA 聚类分析图

Fig.1 UPGMA tree of CO gene constructed from genetic distance among the *M. coruscus* individuals

3 讨论

遗传多样性是生物多样性的基础和核心, 同时也是物种进化潜能的保证。遗传多样性下降, 会直接导致物种对环境适应能力的下降。目前, 中国养殖业的苗种大部分来自人工育苗, 一些种类经过累代养殖, 出现生活力下降, 个体变小和抗逆性差等问题, 大面积死亡现象时有发生, 严重困扰养殖业的健康发展, 要解决这一问题, 必须加快优良品种的选育工作, 而对养殖群体的遗传多样性检测则是首要任务。厚壳贻贝是我国目前贝类主要的养殖品种之一, 在浙江、福建等沿海省份都有大面积的养殖, 本文对其养殖群体的遗传多样性进行了检测, 揭示了其资源现状, 可以为良种筛选提供参考依据。DNA 序列分析相对于其它分子标记如同工酶、RAPD 等, 在用于群体遗传多样性分析时, 其结果更直接、准确和可靠 (Buonnacorsi *et al.*, 2001)。

3.1 CO 基因片段核苷酸组成

A、T、C 和 G 4 种核苷酸在线粒体基因组中的分布呈不均一性, 是动物线粒体基因组的一个共性 (Thompson *et al.*, 1997)。本研究所得到的厚壳贻贝 CO 区中, A+T 的含量(60.60%)高于 G+C 的含量(39.94%), 这一结果与其它贝类线粒体基因序列结果类似(陈爱辉等, 2009; 李咏梅等, 2009)。

3.2 群体遗传多样性

衡量一个种群 mtDNA 的遗传变异有两个重要指标: 核苷酸多态性(P_i)和单倍型间的平均遗传距离(P), 由于 P_i 值考虑了各种 mtDNA 单倍型在群体中所占的比例, 因此在反映一个群体的 mtDNA 的多态程度时往往比单纯的遗传距离平均值更要精确(Zhou *et al.*, 2006)。本研究结果显示, 基于线粒体 CO 基因片段, 厚壳贻贝群体均具有较高的核苷酸多样性($P_i > 0.01$)和较高的单倍型多样性($Hd > 0.8$)。有学者通过对线粒体 DNA 序列的遗传变异分析, 将不同核苷酸多样性和单倍型多样性间的组合分成了四种类型: 第一种类型是较低的核苷酸多样性($P_i < 0.005$)与较低的单倍型多样性($Hd < 0.5$), 第二种类型是高的单倍型多样性与低的核苷酸多样性, 第三种类型是低的单倍型多样性与高的核苷酸多样性, 第四种类型是高的单倍型多样性与高的核苷酸多样性(Grant *et al.*, 1998)。

本研究中厚壳贻贝群体的结果属于第四种类型, 即厚壳贻贝三个养殖群体具有较高的遗传多样性, 这与其它物种群体较低的遗传多样性结果不一致,

说明温州群体、宁德群体及福州群体三个养殖群体的养殖环境良好,其种苗来自遗传多样性丰富的亲贝,养殖过程中尚未出现明显的近交衰退。同时,也意味着厚壳贻贝在这三个养殖群体目前有着较强的环境适应能力、生长能力及进化潜力。在今后希望长期对养殖群体以及繁殖亲贝进行遗传多样性检测,并且对繁殖群体要及时补充野生个体,以免发生种质资源退化的现象,造成个体变小、抗逆性差等不良特征,严重困扰养殖业的健康发展。

3.3 遗传结构

地理隔离、人工选择、基因交流、遗传瓶颈、环境变化等都是影响群体遗传结构的因素,对群体的遗传结构进行分析能反映出群体的亲缘关系。本研究中, F_{st} 值表明厚壳贻贝福州群体与温州群体和宁德群体之间有一定的遗传差异,而温州群体和宁德群体间遗传差异不明显,说明福州群体已与其它两个群体有一定程度的遗传分化,而温州群体和宁德群体间无遗传分化,该现象可能因为浙江东南向福建沿岸的浙闽沿岸流经过温州,与相反流向的台湾海峡流以及黑潮自台湾的西北流分支在闽东相遇,阻碍了浙闽沿岸流继续向南推进(Lü *et al.*, 2007),从而使福州群体与其它群体产生一定程度的遗传分化。此外,生活水域的盐度、温度的差异也会引起厚壳贻贝的遗传分化,Sarver 等(1993)研究发现,贻贝种群的分布与温度和盐度有密切关系。温州群体和宁德群体间无遗传分化可能因船只来往而无意带入厚壳贻贝进行繁殖,导致子代遗传同质。另外,目前有些鱼贩在各海区收购渔民捕捞的野生幼苗而进行苗种交易,也较容易发生苗种异地交易因而造成较大的基因交流。

本研究中的厚壳贻贝养殖群体(温州、宁德和福州)均具有较高的遗传多样性,其中以温州群体为最高。三个群体间主要的遗传变异来自群体内部,福州群体和其它两个群体间有一定程度的遗传分化,温州群体和福州群体间无明显的遗传分化,在遗传上属同一群体。基于此,建议种苗繁育场在进行人工繁殖时,尽量采用不同来源及亲缘关系较远的亲贝个体进行繁殖,这样可以避免近交衰退带来的风险并有利于保持厚壳贻贝苗种的遗传多样性,从而促进贻贝养殖业的健康发展。

参 考 文 献

王祯瑞, 1997. 中国动物志: 软体动物门 双壳纲 贻贝目. 北京: 科学出版社, 50—51

- 叶莹莹, 徐梅英, 吴常文, 2011. 几种环境因子对厚壳贻贝浮游幼虫生长与存活的影响. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 30(4): 292—296
- 刘慧慧, 薛超波, 常抗美等, 2011. 厚壳贻贝 M7 lysin 分子的克隆与表达. 水产学报, 35(9): 1337—1342
- 李咏梅, 陈秀荔, 彭敏等, 2009. 基于线粒体 COI 基因序列探讨广州钦州湾牡蛎的遗传分化. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 37(3): 60—65
- 肖武汉, 张亚平, 2000. 鱼类线粒体 DNA 的遗传与进化. 水生生物学报, 24(4): 384—391
- 陈爱辉, 李朝霞, 封功能, 2009. 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, 30(3): 233—239
- 徐梅英, 李继姬, 郭宝英等, 2011. 基于线粒体 DNA 12S rRNA 和 CO 基因序列研究中国沿海 7 个长蛸(*Octopus variabilis*)野生群体的遗传多样性. 海洋与湖沼, 42(3): 387—396
- 郭新红, 刘少军, 刘巧等, 2004. 鱼类线粒体研究新进展. 遗传学报, 9(31): 983—1000
- 常抗美, 吴剑锋, 2007. 厚壳贻贝人工繁殖技术的研究. 南方水产, 3(3): 26—30
- 廖智, 刘梅, 王日昕等, 2010a. 厚壳贻贝抗菌肽 mytilin 和 myticin 的 cDNA 基因的克隆与序列分析. 水产学报, 34(7): 1025—1033
- 廖智, 鲁涛, 李楠楠等, 2010b. 厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)足丝蛋白 mcofp3 和 mcofp6 的 cDNA 克隆及序列分析. 海洋与湖沼, 41(5): 739—747
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, 2002. 黄培堂译, 2002. 分子克隆实验指南(第 3 版). 北京: 科学出版社, 463—471
- Buonnacorsi V P, McDowell J R, Graves J E, 2001. Reconciling patterns of inter-ocean molecular variance from four classes of molecular markers in blue marlin (*Makaira nigricans*). Mol Ecol, 10(10): 1179—1196
- Grant W S, Bowen B W, 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. Journal of Heredity, 89: 415—426
- Groenenberg D S J, Wesselinhg F P, Rajagopal S *et al.*, 2011. On the identity of broad-shelled mussels (Mollusca, Bivalvia, *Mytilus*) from the Dutch delta region. Contributions to Zoology, 80(2): 95—106
- Lü H Q, Song H T, Chris B, 2007. Temporal and spatial distributions of dominant shrimp stocks and their relationship with the hydrological environment in the East China Sea. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 25(4): 386—397
- Meyer A, 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, 2(2): 1—38
- Sarver S K, Foltz D W, 1993. Genetic population structure of a species complex of blue mussels (*Mytilus* spp.). Mar Biol, 117: 105—112
- Shen Y, Li J, Feng B, 2009. Genetic Analysis of Cultured and Wild Populations of *Mytilus coruscus* on Mitochondrial

- DNA. Zoological Research, 30(3): 240—246
- Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F *et al*, 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, 25: 4876—4882
- Zhou H, Li D Q, Zhang Y G *et al*, 2006. Study on mitochondrial DNA genetic diversity of Tibetan Antelope. Hereditas, 28(3): 299—305

THE GENETIC DIVERSITY OF CULTURED *MYTILUS CORUSCUS* POPULATIONS BASED ON SEQUENCE ANALYSIS OF MITOCHONDRIAL CO₁ GENE

ZHOU Chao¹, GUO Bao-Ying¹, WU Chang-Wen¹, YE Ying-Ying¹,
LI Ji-Ji¹, FENG Guang-Peng²

(1. Marine Science College of Zhejiang Ocean University, National Engineering Research Center of Marine Facilities Aquaculture, Zhoushan, 316004; 2. Key and Open Laboratory of Marine and Estuarine Fisheries Resources and Ecology, Ministry of Agriculture, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai, 200090)

Abstract The genetic diversity and genetic structure of three cultured populations (Wenzhou of Zhejiang province, Ningde of Fujian province and Fuzhou of Fujian province) of *Mytilus coruscus* were determined using the mitochondrial gene sequencing technology (CO₁). The result revealed 21 haplotypes for total 23 individuals obtained using PCR method. The haplotype diversities (H_d), nucleotide diversities (P_i) and the average nucleotide differences (K) were 0.978, 0.01045 and 8.534, respectively, which showed high genetic diversity among populations. The fixation indices (F_{st}) of three populations showed that there was no genetic differentiation between Wenzhou and Ningde populations and some genetic differentiation between Fuzhou population and the other two populations.

Key words *Mytilus coruscus*, CO₁, Genetic diversity, Genetic structure

中国海洋湖沼学会 2011 年理事会圆满召开

中国海洋湖沼学会 2011 年理事会,于 2011 年 12 月 28 日在青岛中国科学院海洋研究所召开,刘瑞玉院士、秦蕴珊院士、管华诗院士以及来自全国各地涉海单位的理事、常务理事、学会所属学术期刊编辑部主任、分支机构负责人等 60 余人参加了会议,会议由学会副理事长兼秘书长孙松主持。

会议首先由相建海理事长作学会 2011 年工作总结报告,随后李毅萍副秘书长作了学会 2011 年财务报告;《湖泊科学》编辑部主任李万春、《水生生物学报》编辑部主任杜新征、《海洋与湖沼》编辑部主任陈溥远、《中国海洋湖沼学报》编辑部主任虞子冶,分别就各自期刊的运行情况向理事们做了大会总结汇报。

会议就中国海洋湖沼学会换届选举及召开第十次会员代表大会等事宜进行了讨论,并决定中国海洋湖沼学会第十次会员代表大会将于 2012 年 10 月中旬在青岛召开。

最后常务理事李乃胜就“曾呈奎海洋科技奖”评奖事宜做了通报,2012 年“曾呈奎海洋科技奖”颁奖仪式将在中国海洋湖沼学会第十次会员代表大会上举行。