

10 个菲律宾蛤仔野生群体的遗传多样性研究*

胡利莎^{1,2} 张 振¹ 马培振^{1,3} 王海艳¹

(1. 中国科学院海洋研究所 青岛 266071; 2. 中国科学院大学 北京 100049; 3. 中国海洋大学 青岛 266003)

摘要 对我国沿海地区 10 个菲律宾蛤仔野生群体线粒体 16S rRNA 和 COI 基因部分序列进行测序, 分别得到了长度为 473bp 和 632bp 的片段。结果表明, 16S rRNA 193 条序列 A+T 平均含量为 66.6%, 共检测到 21 个变异位点, 193 个个体具有 22 种单倍型; COI 基因 183 条序列 A+T 平均含量为 64.8%, 共检测到 126 个变异位点, 183 个个体具有 67 种单倍型。基于群体间遗传距离利用 Mega5.1 软件构建 10 个群体的 NJ 树, 聚类结果表明, 大连群体和荣成群体聚为一支, 其余 8 个群体聚为一支。AMOVA 分析表明, 大连群体和荣成群体间分化不显著, 而荣成、大连群体与其余 8 个群体间的分化达到极显著水平($P < 0.01$), 说明我国沿海的菲律宾蛤仔野生群体存在一定的遗传分化。

关键词 菲律宾蛤仔; COI 基因; 16SrRNA 基因; 遗传多样性

中图分类号 S917.4 doi: 10.11693/hyh20150500142

菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)属于软体动物门(Mollusca), 双壳纲(Bivalvia), 帘蛤目(Venerioida), 帘蛤科(Veneridae), 蛤仔属(*Ruditapes*)。菲律宾蛤仔分布于俄罗斯、日本、菲律宾和中国沿海, 在我国河北、山东、浙江、福建、广东等省区沿海分布较广。菲律宾蛤仔生长迅速, 适应性强, 肉味鲜, 是我国 4 大养殖贝类之一, 具有较高的经济价值。近些年来, 我国菲律宾蛤仔的人工养殖规模快速发展, 异地引种养殖现象频繁出现, 这一人类活动使菲律宾蛤仔野生群体间的遗传多样性结构受到了一定的影响, 因此, 研究我国菲律宾蛤仔的种群遗传学, 不仅能够保护菲律宾蛤仔的种质资源, 还能为菲律宾蛤仔养殖业的发展提供良好的生物学依据。

目前对菲律宾蛤仔种群遗传学已有较多研究。裴赢等(2006)采用 RAPD 分子标记技术分析了大连沿海 6 个菲律宾蛤仔种群的遗传多样性及其分布, 结果表明该地区的菲律宾蛤仔种群具有较高的遗传多样性, 且种群之间存在一定数量的遗传变异。葛京盈等

(2008)研究表明大连、丹东、青岛和锦州 4 群体生化遗传特征上未见明显差异, 且 4 个野生群体的遗传多样性属偏低水平。Bi 等(2012)研究结果显示烟台和威海的菲律宾蛤仔无明显的种群结构, 且具有较高的单倍型多样性。Ren 等(2006)利用同工酶的方法、李旭光等(2009)采用聚丙烯酰胺同工酶技术对菲律宾蛤仔不同群体遗传特征进行了研究, 认为中国沿海菲律宾蛤仔分化成南、北两大类群。Sekine 等(2006)和 Mao 等(2011)利用 COI 基因的研究也得出类似的结果。

结合前人的研究结果可以看出, 关于北方菲律宾蛤仔的遗传多样性的研究结果各不相同。Ren 等(2006)未对中国沿海南北两大类群的遗传多样性进行详细的分析。在此基础上本研究将结合 COI 和 16S rRNA 两种基因分析中国沿海菲律宾蛤仔的遗传多样性和系统进化关系, 为菲律宾蛤仔种群的遗传结构特征以及生物资源保护提供更加准确的分子生物学信息。

* 国家自然科学基金项目, 40406032 号, 40876084 号, 31101898 号, 31000948 号; 中国科学院战略性先导科技专项, XDA1102030304 号; 中国科学院海洋研究所“一三五”生物多样性项目, 20121O060101 号; 海洋公益性行业科研专项经费项目, 200805069 号; 国家环境保护部项目, 物种 10-二-14 号; 国家科技基础性工作专项项目, 2014FY110500 号。胡利莎, 硕士研究生, E-mail: hulisha13@mailsucas.ac.cn

通讯作者: 王海艳, 博士, 研究员, E-mail: haiyanwang@qdio.ac.cn

收稿日期: 2015-05-13, 收修改稿日期: 2015-08-26

1 材料与方方法

1.1 材料与样品制备

实验所需样品分别从大连、荣成、连云港、霞浦、莆田、广州、阳江、湛江、钦州、儋州当地采集, 每群体个体数量为 12—23 个, 样品采集后立即用 95% 酒精固定, 保存备用。图 1 为样品采集地的分布。

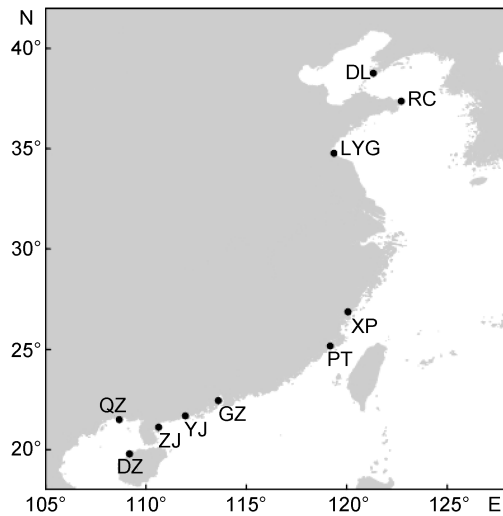


图 1 菲律宾蛤仔样品分布图

Fig.1 Map of sampling sites for *R. philippinarum*

DL: 大连; RC: 荣成; LYG: 连云港; XP: 霞浦; PT: 莆田; GZ: 广州; YJ: 阳江; ZJ: 湛江; QZ: 钦州; DZ: 儋州

1.2 DNA 的提取、扩增及测序

取菲律宾蛤仔闭壳肌肌肉约 100mg 充分剪碎, 用 TIANamp 海洋动物 DNA 提取试剂盒(北京天根生物有限公司)提取全基因组。

线粒体 COI 基因扩增引物 LCO1490 (5'-GGTCA ACAAATCATAAAGATATTGG-3')和 HCO2198 (5'-AACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3') (Folmer *et al.*, 1994); 16S rRNA 基因扩增引物 16S rRNAar (5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3') 和 16S rRNAbr (5'-CCGGTCTGAACTCAGMTCAYG-3') (Anderson, 2000), 由上海桑尼生物科技有限公司合成。实验中 PCR 反应体系: 2 μ L 10 \times PCR buffer, 1.5mM Mg²⁺, 200 μ M dNTPs, 1U Taq DNA polymerase, 正、反向引物各 0.4 μ M, 2 μ L 模板 DNA 溶液(10–100ng/ μ L), 用超纯水补充至 25 μ L。PCR 扩增反应程序为: 预变性 94 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 30s, 48–52 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min, 循环 30–35 次; 总延伸 72 $^{\circ}$ C 10min。

PCR 产物经 1.5%–2.0% 琼脂糖电泳凝胶纯化后送上海桑尼生物科技有限公司测序, COI 基因测序引物用 LCO1490, 16S rRNA 基因测序引物用 16S rRNar。

1.3 数据分析

单倍型: Haplotype, 指若干个决定同一性状的紧密连锁的基因构成的基因型, 及一条染色体上 SNP 基因型的组合。

DNA 序列结果由 CLUSTAL X 软件(Thompson *et al.*, 1997)采用默认参数对位, 并进一步经人工校对。对位后将碱基序列输入 DnaSP 5 软件(Rozas *et al.*, 2003)统计单倍型, 并统计单倍型在各采样点的分布情况, 并对多态位点数、单倍型数、核苷酸多样性指数(P_i)、单倍型多样性指数(Hd)、平均核苷酸差异数(K)等遗传多样性参数进行计算; 采用 Mega5.1 (Tamura *et al.*, 2004)软件进行遗传距离计算和聚类分析, 并构建 NJ 进化树。采用 IBDWS(Jensen *et al.*, 2005)软件中的 Mantel 检测评估菲律宾蛤仔群体的遗传距离和地理距离的相关性。运用 ARLEQUIN v3.5 (Excoffier *et al.*, 2005)软件中的分子变异分析(AMOVA)方法估算遗传变异在群体内和群体间的分布, 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 菲律宾蛤仔群体基因序列碱基组成

COI 和 16S rRNA 基因序列通过 BLAST 分析、比较确认, 经 CLUSTAL X 同源排序, 除去引物和部分端序列, 分别得到长度为 632bp 和 473bp 的基因片段。利用 Mega5.1 软件计算菲律宾蛤仔群体 COI 和 16S rRNA 基因序列碱基组成, 不同群体的各碱基组成基本一致, COI 基因 T、C、A、G、A+T 和 G+C 的平均含量分别为 41.4%, 12.8%, 23.4%, 22.3%, 64.8%, 35.2%, AT 含量明显高于 GC 含量。16S rRNA 基因 T、C、A、G、A+T 和 G+C 的平均含量分别为 33.0%, 10.6%, 33.6%, 22.8%, 66.6%, 33.4%, AT 含量亦明显高于 GC 含量。

2.2 菲律宾蛤仔群体遗传多样性分析

利用 DnaSP 5 软件计算群体遗传多样性参数, 结果见表 1 和表 2。根据 COI 基因序列计算遗传多样性参数, 在 183 个菲律宾蛤仔个体中, 共检测到 67 个单倍型, 且每个群体都具有各自的单倍型。群体特有单倍型 50 个, 占单倍型总数的 74.63%; 共享单倍型 17 个, 占单倍型总数的 25.37%, 其中共享单倍型 Hap_4 的个体数最多 31 个, 占总个体数的 16.94%, 共享单倍型 Hap_4 在除大连群体和荣成群体外的 8 个群体中均有分布, 而 Hap_16 分布在大连群体和荣成群体中。COI 基因共检测到 126 个核苷酸多态位点, 包括 83

个单突变位点, 43 个简约信息位点, 总群体的平均核苷酸差异数为 6.35447, 核苷酸多样性指数为 0.01005。其中荣成群体遗传多样性参数较高, 莆田群体遗传多样性参数较低。

表 1 基于 COI 基因序列片段的 10 个菲律宾蛤仔群体的遗传多样性参数
Tab.1 Genetic diversity parameters of partial COI gene in 10 populations of *R. philippinarum*

群体	样本数目	单倍型类型(数目)	单倍型数 h	多态位点 S	单倍型多样性 H_d	平均核苷酸差异数 K	核苷酸多样性指数 P_i
钦州	12	Hap_1(1), Hap_2(1), Hap_3(2), Hap_4(4), Hap_9(1), Hap_21(1), Hap_22(1), Hap_23(1)	8	36	0.89394	7.28788	0.01153
儋州	15	Hap_3(1), Hap_4(2), Hap_5(1), Hap_6(1), Hap_7(2), Hap_8(1), Hap_9(2), Hap_10(1), Hap_11(1), Hap_26(1), Hap_27(1), Hap_28(1)	12	21	0.97143	4.95238	0.00784
连云港	20	Hap_3(2), Hap_4(2), Hap_7(2), Hap_9(2), Hap_12(1), Hap_13(1), Hap_14(1), Hap_15(1), Hap_29(6), Hap_30(1), Hap_31(1)	11	39	0.90000	6.69474	0.01059
荣成	13	Hap_3(1), Hap_7(3), Hap_16(1), Hap_17(1), Hap_18(1), Hap_19(2), Hap_20(2), Hap_24(1), Hap_25(1)	9	36	0.93590	8.70513	0.01377
霞浦	20	Hap_4(7), Hap_9(2), Hap_22(1), Hap_32(1), Hap_33(2), Hap_34(1), Hap_35(1), Hap_36(1), Hap_37(1), Hap_38(1), Hap_39(1), Hap_40(1)	12	14	0.87895	3.62632	0.00574
大连	22	Hap_7(2), Hap_9(2), Hap_16(4), Hap_19(2), Hap_20(4), Hap_41(1), Hap_42(2), Hap_43(1), Hap_44(1), Hap_45(1), Hap_46(1), Hap_47(1)	12	23	0.93074	5.35065	0.00847
莆田	18	Hap_3(4), Hap_4(4), Hap_7(1), Hap_9(2), Hap_34(1), Hap_48(2), Hap_49(1), Hap_50(1), Hap_51(1), Hap_52(1)	10	16	0.90850	3.19608	0.00506
湛江	19	Hap_4(5), Hap_5(1), Hap_9(3), Hap_32(3), Hap_53(1), Hap_54(1), Hap_55(2), Hap_56(1), Hap_57(1), Hap_58(1)	10	15	0.90058	3.85380	0.00610
广州	22	Hap_3(3), Hap_4(3), Hap_7(2), Hap_9(4), Hap_14(1), Hap_19(1), Hap_20(1), Hap_47(1), Hap_54(1), Hap_55(1), Hap_59(1), Hap_60(1), Hap_61(1), Hap_62(1)	14	26	0.94372	5.41558	0.00857
阳江	22	Hap_3(4), Hap_4(4), Hap_9(4), Hap_22(1), Hap_34(1), Hap_48(1), Hap_55(1), Hap_61(1), Hap_63(1), Hap_64(1), Hap_65(1), Hap_66(1), Hap_67(1)	13	18	0.92208	3.73593	0.00591
总数	183	67(183)	67	126	0.941	6.35447	0.01005

表 2 基于 16S rRNA 基因序列片段的 10 个菲律宾蛤仔群体的遗传多样性参数
Tab.2 Genetic diversity parameters of partial 16S rRNA gene in 10 populations of *R. philippinarum*

群体	样本数目	单倍型类型(数目)	单倍型数 h	多态位点 S	单倍型多样性 H_d	平均核苷酸差异数 K	核苷酸多样性指数 P_i
钦州	14	Hap_1(13), Hap_8(1)	2	1	0.14286	0.14286	0.00030
儋州	16	Hap_1(13), Hap_2(1), Hap_3(1), Hap_9(1)	4	3	0.35000	0.37500	0.00079
连云港	20	Hap_1(11), Hap_4(1), Hap_10(6), Hap_11(1), Hap_12(1)	5	4	0.63158	0.74211	0.00157
荣成	13	Hap_1(4), Hap_5(1), Hap_6(1), Hap_7(7)	4	5	0.65385	1.38462	0.00293
霞浦	20	Hap_1(20)	1	0	0.00000	0.00000	0.00000
大连	23	Hap_1(8), Hap_7(12), Hap_13(1), Hap_14(1), Hap_15(1)	5	6	0.62846	1.29644	0.00274
莆田	22	Hap_1(18), Hap_11(1), Hap_16(1), Hap_17(1), Hap_18(1)	5	4	0.33766	0.36364	0.00077
湛江	21	Hap_1(17), Hap_8(1), Hap_11(1), Hap_19(1), Hap_20(1)	5	4	0.35238	0.38095	0.00081
广州	22	Hap_1(17), Hap_7(2), Hap_8(1), Hap_18(1), Hap_21(1)	5	5	0.40693	0.76623	0.00162
阳江	22	Hap_1(17), Hap_16(1), Hap_18(3), Hap_22(1)	4	4	0.39827	0.51948	0.00110
总数	193	22(193)	22	21	0.47674	0.86161	0.00182

根据 16S rRNA 基因序列计算遗传多样性参数, 在 193 个菲律宾蛤仔个体中, 共检测到了 22 个单倍型, 群体特有单倍型 15 个, 占单倍型总数的 68.18%, 共享单倍型 7 个, 占单倍型总数的 31.82%, 其中共享单倍型 Hap_1 个体数最多 138, 占总个体数的 71.50%, 在 10 个群体中均有分布。共检测到 21 个核苷酸多态位点, 包括 14 个单突变位点, 7 个简约信息位点, 总群体的平均核苷酸差异数为 0.86161, 核苷酸多样性指数为 0.00182。其中荣成和大连群体遗传多样性参数普遍高于其余群体, 而霞浦群体因只有一种单倍型其遗传多样性参数为零。

2.3 菲律宾蛤仔群体的遗传距离和聚类分析

利用 Mega5.1 所计算的群体内、群体间遗传距离如表 3 和 4 所示。基于 COI 基因的计算结果: 荣成群体内遗传距离最高为 0.014052, 而莆田群体内遗传距离最低为 0.005089, 说明荣成群体遗传多样性最高, 莆田群体遗传多样性较低; 群体间遗传距离在 0.005—0.021, 其中荣成群体和大连群体与其他群体的遗传距离均较高; 荣成与其他群体间遗传距离中与钦州群体的最高, 与大连群体的最低; 钦州和广州、儋州、连云港、霞浦、莆田、湛江、阳江 8 个群体两两间的遗传距离均低于与荣成和大连之间的遗传距离。基于 16S rRNA 基因计算的结果: 荣成群体内遗传距离最高为 0.002938, 而霞浦群体内遗传距离最低为 0, 说明荣成群体遗传多样性最高, 霞浦群体遗传多样性较低; 群体间遗传距离在 0.000151—0.004378, 其中荣成群体和大连群体与其他群体的遗传距离均较高; 荣成与其他群体间遗传距离中与连云港群体的

最高, 与大连群体的最低; 钦州和广州、儋州、连云港、霞浦、莆田、湛江、阳江 8 个群体两两间的遗传距离均低于与荣成和大连之间的遗传距离。

利用 Mega5.1 软件中的 NJ 法对菲律宾蛤仔 10 个群体进行系统树的构建, 群体之间的系统聚类图如图 2 和 3 所示, 从图中可以看出, 基于 COI 基因和 16S rRNA 基因构建的 NJ 树均分为两大支, 大连、荣成群体聚为一支, 其余 8 个群体聚为一支。

对菲律宾蛤仔 10 个群体进行地理距离和遗传距离的 Mantel 测试, 发现菲律宾蛤仔群体的遗传距离与地理距离之间不存在明显的线性关系(COI 基因: $R=0.5430$, $P=0.9874$; 16S rRNA 基因: $R=0.6395$, $P=0.9956$)(图 4、图 5)。

2.4 菲律宾蛤仔群体的遗传分化

运用 ARLEQUIN v3.5 计算的群体间遗传分化系数(F_{st})及其显著性如表 3 和表 4 所示。由表 3 可看出, 基于 COI 基因所得出的 10 个群体间的遗传分化指数在-0.03146—0.49684 之间, 其中湛江与莆田之间的遗传分化系数最小, 大连与莆田之间的遗传分化系数最大。群体间两两比对的组中, 18 个组间的遗传分化表现为差异不显著($P>0.05$), 10 个组表现为显著差异($P<0.05$), 17 个组表现为极显著差异($P<0.01$), 除大连和荣成群体外的其他群体相互之间均未达到分化极显著(除霞浦与广州群体间的遗传分化极显著外)。由表 4 可看出, 基于 16S rRNA 基因所得出的 10 个群体间的遗传分化指数在-0.04027—0.63743 之间, 其中荣成与霞浦之间的遗传分化指数最大, 荣成与大连之间的遗传分化指数最小。群体间两两比对的组中,

表 3 基于 COI 基因序列片段的菲律宾蛤仔群体间遗传距离(对角线下), 群体内遗传距离(粗线显示)和群体间分化系数(对角线上)

Tab.3 Genetic distances between populations (below the diagonal), genetic distances within populations (in bold values) and pairwise F_{st} (above the diagonal) of 10 populations of *R. philippinarum* based on partial COI gene

	钦州	儋州	连云港	荣成	霞浦	大连	莆田	湛江	广州	阳江
钦州	0.011749	0.10481*	0.02843	0.37420**	0.00203	0.43071**	-0.01324	-0.00747	0.10856*	0.01666
儋州	0.011	0.007899	0.05122*	0.31532**	0.13943*	0.34254**	0.13886*	0.09613*	-0.01732	0.03585
连云港	0.012	0.010	0.010818	0.33851**	0.05311*	0.37474**	0.02474	0.02901	0.05459*	0.00976*
荣成	0.021	0.016	0.019	0.014052	0.45323**	-0.01646	0.46098**	0.44077**	0.23965**	0.41443**
霞浦	0.009	0.008	0.009	0.017	0.005778	0.48772**	-0.01522	-0.00931	0.12840**	0.03466
大连	0.017	0.013	0.015	0.011	0.014	0.008556	0.49684**	0.47354**	0.24916**	0.43617**
莆田	0.008	0.008	0.008	0.017	0.005	0.014	0.005089	-0.03146	0.12155*	-0.00119
湛江	0.009	0.008	0.009	0.017	0.006	0.014	0.005	0.006139	0.09637*	-0.00704
广州	0.011	0.008	0.010	0.015	0.008	0.011	0.008	0.008	0.008656	0.03710
阳江	0.009	0.007	0.008	0.016	0.006	0.013	0.006	0.006	0.008	0.005951

*表示差异显著($P<0.05$), **表示差异极显著($P<0.01$)

表 4 基于 16S rRNA 基因序列片段的菲律宾蛤仔群体间遗传距离(对角线下), 群体内遗传距离(粗线显示)和群体间分化系数(对角线上)

Tab.4 Genetic distances between populations (below the diagonal), genetic distances within populations (in bold values) and pairwise F_{st} (above the diagonal) of 10 populations of *R. philippinarum* based on partial 16S rRNA gene

	钦州	儋州	连云港	荣成	霞浦	大连	莆田	湛江	广州	阳江
钦州	0.000303	-0.00403	0.12667*	0.55636**	0.02648	0.48188**	-0.01068	-0.03505	0.02068	0.02074
儋州	0.000549	0.000795	0.11662*	0.51860**	0.01437	0.45813**	0.00027	-0.00012	0.02272	0.02489
连云港	0.001105	0.001351	0.001573	0.50408**	0.17544*	0.46599**	0.12168**	0.11817*	0.12199**	0.12327**
荣成	0.003580	0.003735	0.004378	0.002938	0.63743**	-0.04027	0.56113**	0.55335**	0.36975**	0.53251**
霞浦	0.000151	0.000397	0.000953	0.003428	0.000000	0.54274**	-0.00446	-0.00239	0.05672	0.04139
大连	0.003275	0.003449	0.004094	0.002732	0.003137	0.002750	0.49647**	0.48915**	0.32335**	0.47875**
莆田	0.000537	0.000783	0.001330	0.003816	0.000385	0.003524	0.000771	-0.01172	0.03722	-0.01769
湛江	0.000541	0.000801	0.001348	0.003834	0.000404	0.003533	0.000780	0.000807	0.03539	0.01847
广州	0.001006	0.001247	0.001822	0.003496	0.000868	0.003242	0.001245	0.001263	0.001626	0.03968
阳江	0.000730	0.000976	0.001523	0.004010	0.000578	0.003718	0.000920	0.000973	0.001421	0.001102

*表示差异显著($P < 0.05$), **表示差异极显著($P < 0.01$)

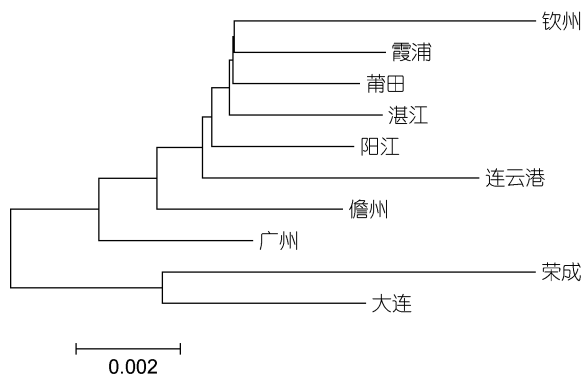


图 2 基于 COI 基因菲律宾蛤仔 10 个群体的 NJ 树
Fig.2 NJ tree based on the COI gene of 10 populations of *R. philippinarum*

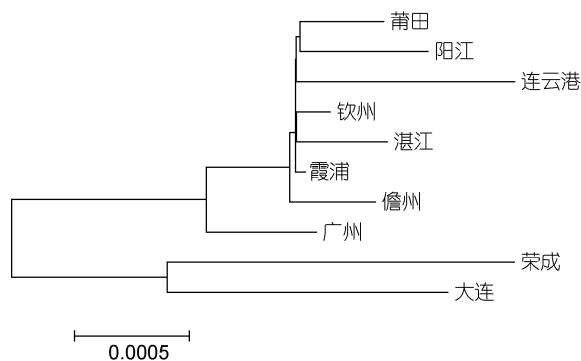


图 3 基于 16S rRNA 基因菲律宾蛤仔 10 个群体的 NJ 树
Fig.3 NJ tree based on the 16S rRNA of 10 populations of *R. philippinarum*

22 个组间的 F_{st} 值统计检验结果为差异不显著 ($P > 0.05$), 4 个组为差异显著 ($P < 0.05$), 19 个组表现为差异极显著 ($P < 0.01$), 连云港群体与钦州、儋州、霞

浦、湛江群体间的遗传分化显著, 与其余群体极显著; 结合 COI 基因和 16S rRNA 基因总体来看, 荣成群体除与大连群体间的遗传分化差异不显著外, 与其他群体间的遗传分化均为极显著, 并且大连群体也是除与荣成群体间的遗传分化不显著外, 与其他群体间的遗传分化均为极显著; 群体间遗传分化显著或者是极显著的均出现在荣成群体、大连群体、连云港群体与其他群体之间。按照 NJ 树的分组, 将荣成群体和大连群体分为一组, 其余 8 个群体分为一组进行 F_{st} 分析, 结果显示基于 COI 基因和 16S rRNA 基因组群间的遗传分化指数分别为 0.05615, 差异极显著 ($P < 0.01$) 和 0.37253, 差异极显著 ($P < 0.01$)。

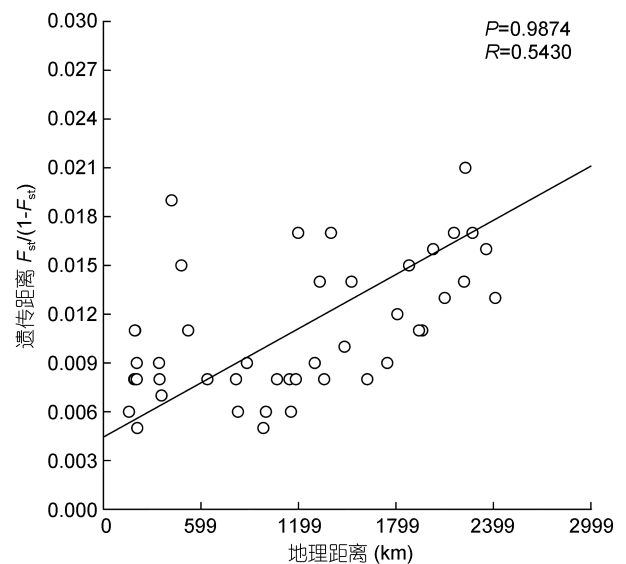


图 4 菲律宾蛤仔 COI 基因的遗传距离模式(IBD)分析
Fig.4 IBD analysis based on COI gene of *R. philippinarum*

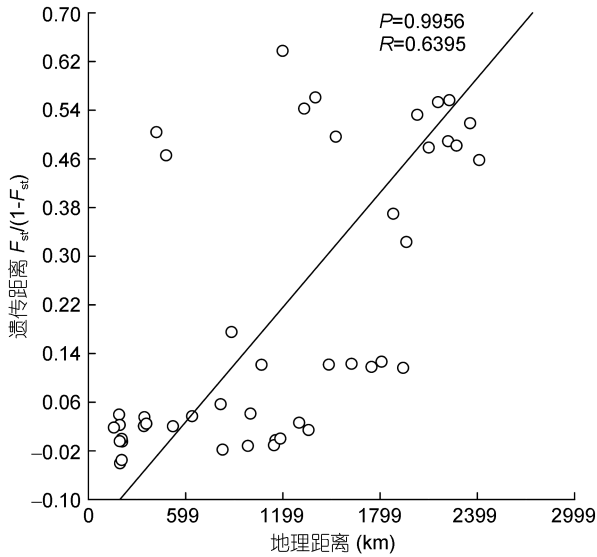


图5 菲律宾蛤仔 16S rRNA 基因的遗传距离模式(IBD)分析

Fig.5 IBD analysis based on the 16S rRNA of *R. philippinarum*

对菲律宾蛤仔 10 个群体进行 AMOVA 分析(如表 5 和 6)表明, 基于 COI 基因群体内遗传变异为 78.17%, 群体间的遗传变异为 21.83%, 基于 16S rRNA 基因群体内遗传变异为 66.86%, 群体间的遗传变异为 33.14%, 说明菲律宾蛤仔群体遗传分化主要表现为群体内分化, 群体内部遗传多态性较高, 而在 F_{st} 分析中, 一般认为 $0 < F_{st} < 0.05$ 表示群体间无显著分化, $0.05 < F_{st} < 0.15$ 表示群体间的分化程度中等, $0.15 < F_{st} < 0.25$ 表示群体间的分化程度较大, $F_{st} > 0.25$

表 5 基于 COI 基因序列片段的菲律宾蛤仔群体遗传变异的 AMOVA 分析

Tab.5 Results of hierarchical AMOVA based on the partial COI sequences of 10 populations of *R. philippinarum*

变异来源	自由度	方差总和	变异组分	变异贡献率(%)
群体间	9	139.102	0.70883 Va	21.83
群体内	173	439.154	2.53846 Vb	78.17
总计	182	578.257	3.24730	100

总的遗传分化指数(F_{st}): 0.21828

表 6 基于 16S rRNA 基因序列片段的菲律宾蛤仔群体遗传变异的 AMOVA 分析

Tab.6 Results of hierarchical AMOVA analysis based on the partial 16S rRNA sequences of the ten populations of *R. philippinarum*

变异来源	自由度	方差总和	变异组分	变异贡献率(%)
群体间	9	28.228	0.14760 Va	33.14
群体内	183	54.487	0.29775 Vb	66.86
总计	192	82.715	0.44535	100

总的遗传分化指数(F_{st}): 0.33143

表示群体间的分化程度极大, 基于 COI 基因和 16S rRNA 基因菲律宾蛤仔群体总的遗传分化指数分别为 0.21828 和 0.33143, 说明菲律宾蛤仔群体间存在较大的遗传分化。

3 讨论

线粒体基因是群体遗传学和进化生物学研究中的重要分子标记。线粒体基因上的不同片段具有不同的解析能力, 即使是同一基因在不同的物种间的解析能力也是不同的。一般而言, 16S rRNA 和 COI 基因在同一种群中变异程度较低, 但在不同的种群之间 16S rRNA 基因较 COI 基因具有明显的保守性。本研究中菲律宾蛤仔 10 个群体 16S rRNA 和 COI 基因片段检测到的多态位点数分别为 126 和 21, 核苷酸多样性指数(P_i)分别为 0.01005 和 0.00182, 此结果说明菲律宾蛤仔的不同的群体之间 16S rRNA 基因较 COI 基因具有明显的保守性。

3.1 菲律宾蛤仔 16S rRNA 和 COI 基因的碱基组成和遗传多样性

本研究得到的 10 个菲律宾蛤仔群体的 COI 和 16S rRNA 两个基因片段各碱基组成基本一致, A+T 平均含量分别为 64.8%、66.6%, G+C 平均含量 35.2%、33.4%, 所有群体的 A+T 含量均显著高于 G+C 含量, 这与其他贝类如文蛤属(文蛤、丽文蛤等)、泥蚶、太平洋牡蛎等线粒体基因的碱基组成相一致(Kong *et al.*, 2001; 潘宝平等, 2006; 郑文娟等, 2009)。

菲律宾蛤仔 10 个群体 16S rRNA 和 COI 基因片段单倍型多样性(H_d)分别为 0.47674 和 0.941, 核苷酸多样性指数(P_i)分别为 0.00182 和 0.01005, 与相近物种相比: 例如栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)(刘亚军等, 2002)、泥蚶(*Tegillarca granosa*)(郑文娟等, 2009)、光滑河篮(*Potamocorbula laevis*)(孙超等, 2013)、黑龙江河篮蛤(*Potamocorbula amurensis*)(孙超, 2013)、栉江珧(*Atrina pectinata*)(严加坤等, 2013)、厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)(杨振雄等, 2014), 表明我国沿海菲律宾蛤仔遗传多样性相对比较丰富, 大连群体遗传多样性较高, 裴赢等(2006)的研究结果也表明大连群体具有较高的遗传多样性。

3.2 菲律宾蛤仔的遗传距离和遗传分化

菲律宾蛤仔遗传参数 F_{st} 的 AMOVA 分析表明: 菲律宾蛤仔的遗传分化主要来自群体内(COI 基因群体内变异贡献率为 78.17%, 16S rRNA 群体内变异贡献率为 66.86%), 说明群体内的遗传多态性较高; 另

外, 依据各个群体间的 F_{st} 分析, 荣成和大连群体间分化不显著, 而荣成、大连群体与其余 8 个群体间分化达到极显著水平 ($P < 0.01$)。根据遗传距离和遗传树的构建将菲律宾蛤仔 10 个群体分为两组: 荣成群体和大连群体为一组, 其余 8 群体为一组, 基于两组进行的分析表明: 两组群间的遗传分化极显著, 因此可将我国沿海的菲律宾蛤仔分为南北两个类群, Ren 等 (2006)、李旭光等 (2009) 的研究结果也将我国沿海菲律宾蛤仔群体分为南北两个类群。

群体之间的遗传距离能反映群体间的亲缘关系。本研究结果表明荣成群体和大连群体与其他群体的遗传距离较远, 而其他群体间遗传距离较近, 所以荣成群体和大连群体亲缘关系较近, 其他 8 群体亲缘关系较近。亲缘关系的远近一般与地理位置远近一致, 本研究中遗传距离与地理距离没有明显的相关性。如连云港群体没有与地理位置较近的荣成群体聚在一起, 反而与地理位置较远的南方群体聚在一起, 可能是越来越多的南方菲律宾蛤仔苗种被引入北方养殖, 使得连云港本地的野生群体的遗传组成受到了影响, 从而与南方种群结构越来越接近, 亲缘关系也越来越近; 也可能受沿岸流和暖流的影响, 使连云港以北和以南的基因交流受到了限制, 从而使南北群体产生了遗传分化。

Liu 等 (2007) 研究结果表明异地购苗增养殖对菲律宾蛤仔野生群体的遗传结构产生了一定的影响, 所以青岛群体与厦门群体的遗传相似度较高。但是本研究中大连群体和荣成群体具有较高的遗传相似度, 而其余 8 群体具有较高的遗传相似度, 明显形成两大类群。虽然北方在养殖过程中很大一部分苗种引自南方, 但大连群体和荣成群体与南方种群未显示出高的遗传相似度, 说明大连和荣成的野生群体结构未被影响, 而其余 8 群体的遗传结构在一定程度上受到了苗种异地放养的影响。Kim 等 (2015) 应用 5 个 PNA 探针很好地区别出了韩国当地菲律宾蛤仔和引自大连的菲律宾蛤仔。因此在本研究基础上, 如果能够应用 Kim 等 (2015) 的方法进一步对遗传结构受到苗种异地放养影响的群体进行研究, 确定这些群体受苗种异地放养影响的程度, 将为菲律宾蛤仔的种群结构研究提供更为有力的数据支撑。

4 结论

我国沿海菲律宾蛤仔种群具有相对较高的遗传多样性, 并且以连云港为界分为南北两大类群, 其中

北方种群生物多样性高于南方种群, 本研究为菲律宾蛤仔的养殖和生物资源保护提供了生物学参考依据。至 2014 年, 10m 等深线以内的浅海基本都被开发用于贝类的养殖, 而菲律宾蛤仔已成为浅海养殖第一大品种 (车向庆等, 2015), 作为具有经济价值的物种, 为保证其生物多样性, 防止种质退化, 在养殖过程中要针对南北两大类群特点进行合理有效的保护。

参 考 文 献

- 车向庆, 冷忠业, 吴庆东等, 2015. 菲律宾蛤仔浅海养殖技术. 科学养鱼, (11): 44
- 刘亚军, 喻子牛, 姜艳艳等, 2002. 栉孔扇贝 16S rRNA 基因片段序列的多态性研究. 海洋与湖沼, 33(5): 477—483
- 孙超, 2013. 河蓝蛤属贝类生物学性状及基于线粒体 DNA 的分子遗传学研究. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 23—28
- 孙超, 刘志鸿, 杨爱国等, 2013. 光滑河蓝蛤 3 个野生群体线粒体 COI 基因遗传多样性研究. 湖南农业科学, (7): 4—7
- 严加坤, 杨爱国, 周丽青等, 2013. 基于线粒体 16S rRNA 基因研究 5 个栉江珧野生群体的遗传多样性. 海洋科学, 37(2): 36—42
- 李旭光, 许广平, 阎斌伦等, 2009. 菲律宾蛤仔不同地理群体生化遗传结构与变异的研究. 海洋科学, 33(4): 61—65
- 杨振雄, 毛阳丽, 宋娜等, 2014. 浙江和福建沿海厚壳贻贝 *Mytilus coruscus* 群体的 COI 序列比较分析. 海洋湖沼通报, (2): 82—88
- 郑文娟, 朱世华, 沈锡权等, 2009. 基于线粒体 COI 基因序列探讨泥蚶的遗传分化. 动物学研究, 30(1): 17—23
- 葛京盈, 刘萍, 高天翔, 2008. 菲律宾蛤仔 4 个野生群体的同工酶分析. 海洋水产研究, 29(6): 63—70
- 裴赢, 王晓红, 张恒庆, 2006. 大连渤海沿海菲律宾蛤仔种群的 RAPD 分析. 水产科学, 25(5): 250—252
- 潘宝平, 吴琪, 张素萍等, 2006. 文蛤属 (*Meretrix*) 16S rRNA 基因及 ITS1 序列的系统学分析. 海洋与湖沼, 37(4): 342—347
- Anderson F E, 2000. Phylogeny and historical biogeography of the loliginid squids (Mollusca: Cephalopoda) based on mitochondrial DNA sequence data. Molecular Phylogenetics and Evolution, 15(2): 191—214
- Bi X X, Huang L, Jing M D *et al*, 2012. Analysis on genetic diversity of mitochondria from *Venerupis philippinarum* in the coasts of Yantai and Weihai. Agricultural Science & Technology-Hunan, 13(1): 32—35
- Excoffier L, Laval G, Schneider S, 2005. Arlequin version 3.01: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online, 1: 47—50
- Folmer O, Black M, Hoeh W *et al*, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 3(5): 294—299
- Jensen J L, Bohonak A J, Kelley S T, 2005. Isolation by distance, web service. BMC Genetics, 6: 13

- Kim E-M, Song M S, Hur D H *et al*, 2015. Easy method for discriminating the origins of manila clam *Ruditapes philippinarum* with a dual-labelled PNA-probe-based melting curve analysis. *BioChip Journal*, 9(3): 247—258
- Kong X Y, Zhang L S, Yu Z N *et al*, 2002. Sequencing of ribosomal internal transcribed spacer regions and mitochondrial gene fragments in *Crassostrea gigas*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 9(4): 304—308
- Liu X Q, Bao Z M, Hu J J, *et al*, 2007. AFLP analysis revealed differences in genetic diversity of four natural populations of Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in China. *Acta Oceanologica Sinica*, 26(1): 150—158
- Mao Y L, Gao T X, Yanagimoto T *et al*, 2011. Molecular phylogeography of *Ruditapes philippinarum* in the Northwestern Pacific Ocean based on COI gene. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 407(2): 171—181
- Ren Y P, Gao T X, Yang T Y, 2006. Isozyme analysis on the populations of *Ruditapes philippinarum*. *Journal of Ocean University of China*, 5(1): 58—62
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio J C, Messeguer X *et al*, 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19(18): 2496—2497
- Sekine Y, Yamakawa H, Takazawa S *et al*, 2006. Geographic variation of the COX1 gene of the short-neck clam *Ruditapes philippinarum* in coastal regions of Japan and China. *Venus*, 65: 229—240
- Tamura K, Nei M, Kumar S, 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(30): 11030—11035
- 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(24): 4876—4882

THE GENETIC DIVERSITY OF TEN WILD POPULATIONS OF *RUDITAPES PHILIPPINARUM*

HU Li-Sha^{1,2}, ZHANG Zhen¹, MA Pei-Zhen^{1,3}, WANG Hai-Yan¹

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract Partial sequences of the mitochondrial 16S rRNA gene and COI gene of 10 *Ruditapes philippinarum* populations in China were sequenced, from which 473bp from 16S rRNA gene and 632bp from COI gene were obtained. The average contents of A+T (16S rRNA gene 66.6% and COI gene 64.8%) were significantly higher than those of G+C. In 16S rRNA gene fragment, 21 variation sites were detected and 22 haplotypes were defined. In COI gene fragment, 126 variation sites were detected and 67 haplotypes were defined. Based on the genetic distance among populations, the NJ phylogenetic trees were obtained. The trees display that Dalian and Rongcheng Populations are clustered in one clade, the rest 8 populations to another. AMOVA analysis showed that genetic differentiation between Dalian and Rongcheng Populations was not significant, while it is extremely significant among Dalian-Rongcheng Populations and the rest of eight populations ($P < 0.01$), indicating certain genetic differentiation among different wild populations of *R. philippinarum* in China.

Key words *Ruditapes philippinarum*; COI gene; 16S rRNA gene; genetic diversity