

紫贻贝(*Mytilus edulis*)养殖群体的遗传多样性 及遗传结构分析*

郭宝英¹ 祁鹏志² 李继姬¹ 叶莹莹¹ 储张杰¹ 吴常文¹

(1. 浙江海洋学院 国家海洋设施养殖工程技术研究中心 舟山 316004; 2. 华中农业大学水产学院 武汉 430070)

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紫贻贝 3 个养殖群体(烟台、乳山、东极)的遗传多样性和遗传结构进行了研究。由 PCR 扩增获得 32 个个体的 CO₁ 基因 750bp 的部分序列, 其多态性遗传参数统计显示, 32 个个体共检出 18 个单倍型, 总群体单倍型多样性指数(H_d)为 0.946, 核苷酸多样性指数(P_i)为 0.0207, 平均核苷酸差异数(K)为 15.316, 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, 东极群体与烟台群体及乳山群体已明显分化, 而烟台群体和乳山群体间无遗传分化, 并且存在着较大的基因流。

关键词 紫贻贝, CO₁, 遗传多样性, 遗传结构
中图分类号 Q955

紫贻贝(*Mytilus edulis* Linnaeus)隶属于软体动物门(Mollusca)、双壳纲(Bivalvia)、翼形亚纲异柱目(Anisomyaria)、贻贝科(Mytilidae)、贻贝属(*Mytilus*), 别名海红、淡菜, 为寒温带种, 盛产于黄、渤海。20 世纪 50 年代仅见于我国北部大连沿海, 现在烟台、青岛、浙江、福建和广东等地均有分布(王祯瑞, 1997)。紫贻贝有“东方夫人”之称, 味道鲜美, 营养丰富, 含有 8 种氨基酸和多种微量元素, 贝因经济价值较高、繁殖力强、生长快, 已被列为主要养殖贝类之一。随着养殖规模的扩大, 随之而来的种质资源退化现象也日趋严重。目前有关紫贻贝的研究主要集中在组织学(崔龙波等, 1996, 1998)、养殖技术(孙显武等, 2001)、苗种培育(李世栋等, 1995; 刘德经等, 1997)及营养学(苏秀榕等, 1997, 1998)等方面, 而有关遗传学的研究较少, 仅见沈玉帮等(2011)的报道。

动物线粒体基因组(mtDNA)中含细胞色素氧化酶三个亚基基因(CO₁, CO₂, CO₃)、Cytb、ATPase6、ATPase8 等 13 个结构蛋白基因, 它们都是线粒体内膜呼吸链的重要组分。其中 CO₁、CO₂ 和 CO₃ 最保守, 并认为它们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。目前, mtDNA 分析技术在国外已被遗传学家用于种群遗传结构及品系鉴定的研究(柳淑芳等, 2010; 董徐辉等, 2011)。基于此, 本文利用线粒体 CO₁ 序列分析中国沿海紫贻贝 3 个养殖群体的遗传多样性及遗传结构, 以期对紫贻贝的群体遗传学积累资料, 同时为其种质资源筛选提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 样品的采集

紫贻贝(*Mytilus edulis*)样品于 2010 年 1—6 月期间取自渤海、黄海、东海海域, 采集地点分别为山东烟台(YT)、山东乳山(RS)、浙江东极(DJ), 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

采用标准酚-氯仿法参考《分子克隆实验指南》(Sambrook *et al.*, 2002)从紫贻贝肌肉中提取基因组总 DNA。DNA 质量用 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定, 浓度用分光光度计(Beckman, DU650)测定。

* 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; 海洋渔业科学与技术浙江省重中之重学科开放课题, 20110218 号。郭宝英, 博士, 讲师, E-mail: guobaobao1981@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-12-15, 收修改稿日期: 2011-02-28

线粒体 DNA CO_{III} (细胞色素氧化酶亚基 III) 的扩增引物源自(Groenenberg *et al.*, 2011), CO_{III} 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_{III} 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(haplotype diversity, H_d)、核苷酸多样性(Nucleotide diversity, P_i)和核苷酸歧异度(Pairwise divergence)。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), 群体间基因流计算公式: $Nm = (1/F_{st}-1)/2$ 。

2 结果

2.1 序列分析结果

经 PCR 扩增, 得到紫贻贝 CO_{III} 基因片段的扩增产物, 经测序, 去除引物及部分端部序列, 得到可清楚判读的碱基数为 750bp。紫贻贝 CO_{III} 基因片段中 T、A、C、G 平均含量分别为 36.02%、22.86%、15.14% 和 25.98%, A+T 含量(58.88%)高于 G+C 含量(41.02%) (表 1)。

表 1 紫贻贝线粒体 CO_{III} 基因片段的序列组成(%)
Tab.1 Nucleotide composition (%) of the fragments of mitochondrial CO_{III} gene in *M. edulis*

群体	A	T	C	G
烟台	23.11	35.44	15.38	26.07
乳山	23.16	35.41	15.43	26.00
东极	22.31	37.21	14.61	25.87
平均	22.86	36.02	15.14	25.98

CO_{III} 基因序列经 DNAsp 4.10 软件分析显示, 32 个个体共检测到 188 个变异位点, 占分析位点总数的 24.9%, 其中单突变位点 31 个, 简约信息位点 157 个, 同时还检测到 17 个插入或缺失位点。多态性遗传参数统计显示, 32 个个体共检出 18 个单倍型(表 2), 群体间共享单倍型 4 个, 占单倍型总数的 22.2%, 其余 14 个单倍型均为某个群体所特有, 并且东极群体和其它两个群体无共享单倍型, 共享单倍型主要发生在烟台群体和乳山群体之间。

2.2 遗传多样性和遗传结构

遗传参数统计表明, 各群体多态位点比例均为 3.87%; 单倍型多样性指数(H_d)在 0.8920—1.0000 之间, 平均值为 0.946; 核苷酸多样性指数(P_i)在 0.0175—0.0267 之间, 平均值为 0.0207; 平均核苷酸差异数(K)在 12.929—19.643 之间, 平均值为 15.316, 三个群体均显示出较丰富的遗传多样性。遗传多样性以东极群体最高, 烟台群体和乳山群体水平相当(表 2)。

表 2 基于 CO_{III} 序列的紫贻贝群体的遗传多样性参数
Tab.2 The genetic diversity parameters of CO_{III} gene in the three populations of *M. edulis*

群体变异参数	烟台	乳山	舟山
个体数	16	8	8
单倍型数	8	6	8
单倍型多样性(H_d)	0.892	0.893	1.0000
核苷酸多样性(P_i)	0.0181	0.0175	0.0267
平均核苷酸差异数(K)	13.375	12.929	19.643

紫贻贝三个群体间的遗传距离(表 3), 东极群体与烟台、乳山群体间的遗传距离均为 0.229, 烟台群体和乳山群体间为 0.017。群体间分化系数 F_{st} (表 3) 显示, 烟台群体和乳山群体间 F_{st} 为 -0.0546, 不显著 ($P>0.05$), 负值说明两群体间无分化, 基因流 Nm 为 9.6468, 说明两个群体间存在着较大的基因交流。东极群体与烟台群体、乳山群体 F_{st} 分别为 0.8848 及 0.8857, 均达到极显著水平 ($P<0.01$), 基因流 Nm 均小于 1。以上均说明烟台群体和乳山群体在遗传上没有分化而属于同一群体, 但这两个群体与东极群体已有一定程度的分化。AMOVA 分析表明(表 4), 在整个遗传变异中有 17.27% 存在于群体内部, 82.73% 存在于群体之间, 进一步证实了紫贻贝群体间分化为遗传变异的主要部分。

UPGMA 聚类图(图 1)揭示, 东极群体所有个体聚为一支, 烟台群体和乳山群体基本没有分开。综上, 可以看出东极群体已与烟台群体和乳山群体两群体明显有分化, 而烟台群体和乳山群体间无分化。

表 3 基于 CO 序列的紫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. edulis*

群体	烟台	乳山	舟山
烟台	—	- 0.0546	0.8848
乳山	0.017	—	0.8857
舟山	0.229	0.229	—

表 4 紫贻贝群体遗传变异的 AMOVA 分析

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

变异来源	自由度	方差总和	变异组分	变异贡献率(%)
群体间	2	767.219	37.57667	82.73
群体内	29	227.438	7.84267	17.27
总计	31	994.656	45.41934	100

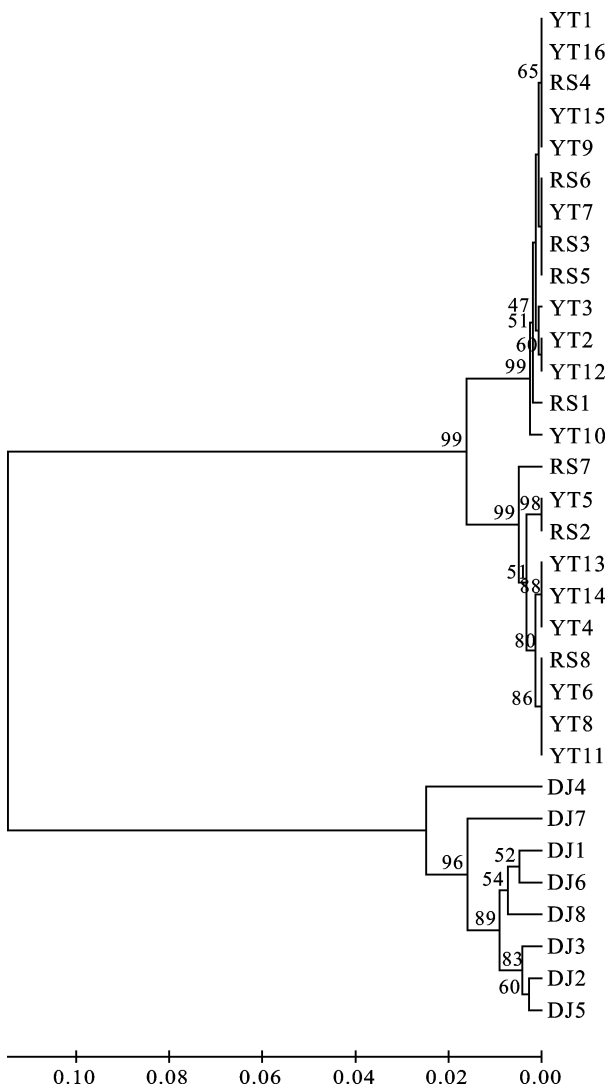


图 1 基于 CO 序列的 UPGMA 聚类分析图

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

3 讨论

遗传多样性(Genetic diversity)是生物多样性的核心, 又称为基因多样性(Gene diversity), 遗传多样性的减少将会使一个物种降低对环境改变的适应能力, 降低群体中变异的丰富度, 便会导致渔业资源的匮乏, 甚至导致物种的灭绝, 通过对遗传多样性的研究可以从根本上揭示物种多样性的起源、进化和遗传变异。紫贻贝是重要的经济养殖贝类之一, 因此, 对紫贻贝遗传多样性的保护对于水产生物多样性的保护是非常重要的, 而保护水产生物多样性是渔业资源持续利用的关键。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 紫贻贝 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)。本研究所得到的紫贻贝 CO 区中, A+T 的含量(58.88%)高于 G+C 的含量(41.02%), 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 紫贻贝群体的遗传多样性水平

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, 紫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)。本研究中紫贻贝群体的结果属于第四种类型。鉴于较丰富的单倍型多样性和核苷酸多样性, 作者分析得出紫贻贝三个养殖群体均具有较高的遗传多样性水平, 这与其它物种养殖群体较低的遗传多样性结果不一致, 说明本研究中的紫贻贝对象其种质资源尚为丰富, 还未受人工养殖环境的影响或人工养殖环境良

好, 或者引进的基础群体数量比较大, 养殖过程中尚未出现明显的近交衰退。同时, 也意味着养殖紫贻贝有着较强的环境适应能力、生成能力及进化潜力。

3.3 紫贻贝群体间的遗传分化

东极群体与烟台群体、乳山群体间的遗传分化系数(F_{st})分别为 0.88489、0.88573, 说明东极群体已与这两个群体有明显的遗传分化, 而烟台群体和乳山群体间的遗传分化系数(F_{st})为-0.05467, 说明这两个群体间无分化, 在遗传上属同一群体。遗传距离及 UPGMA 聚类图均支持这一结果。虽然紫贻贝不能作长距离运动, 但因为烟台处于渤海, 乳山处于黄海, 两个水系有可能因船只来往而无意带入紫贻贝, 从而发生基因交流; 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, 所以也可能因烟台和乳山地理距离较近, 容易发生苗种异地交易因而造成较大的基因交流。而东极处于东海, 相对其它两个群体地理距离较远, 发生基因交流的可能性较小, 因此, 东极群体与这两个群体间有一定程度的遗传分化。

综上所述, 本研究中的紫贻贝养殖群体(烟台、乳山和东极)均具有较高的遗传多样性, 其中以东极群体最高。三个群体间的主要变异来自群体间, 东极群体与烟台、乳山群体间有一定程度的遗传分化, 而烟台群体和乳山群体间无分化, 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, 尽量采用多种来源及遗传距离较远的不同亲贝群体进行繁殖, 这样可以避免近交衰退带来的风险并有利于保持紫贻贝苗种的遗传多样性。

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
- 刘德经, 王聪明, 施孙福等, 1997. 紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis* Lamarck)筏式采苗和度夏的研究. 福建水产, (1): 46—52
- 孙显武, 王洪瑞, 赵永益等, 2001. 贻贝套网兼养刺参技术. 科学养鱼, (1): 28
- 苏秀榕, 李太武, 丁明进, 1998. 紫贻贝和厚壳贻贝营养成分的研究. 中国海洋药物, (2): 30—32
- 苏秀榕, 张 健, 李太武等, 1997. 两种贻贝营养成分的研究. 辽宁师范大学学报(自然科学版), 20(3): 239—243
- 李世栋, 舒云华, 方 圃等, 1995. 贻贝自然海区半人工采苗的技术. 水产养殖, (4): 6—7
- 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
- 沈玉帮, 张俊彬, 冯冰冰等, 2011. 基于线粒体 COI 序列分析对紫贻贝群体遗传多样性的研究分析. 海洋通报, 30(4): 435—437
- 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
- 柳淑芳, 陈亮亮, 戴芳群等, 2010. 基于线粒体 COI 基因的 DNA 条形码在石首鱼科(Sciaenidae)鱼类系统分类中的应用. 海洋与湖沼, 41(2): 223—232
- 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
- 崔龙波, 马圣媛, 刘 萍等, 1999. 紫贻贝消化系统的组织学和组织化学研究. 上海水产大学学报, 8(4): 316—321
- 崔龙波, 刘传林, 陆瑶华等, 1996. 紫贻贝(*Mytilus edulis* L.) 鳃的研究. 齐鲁渔业, 13(5): 11—14
- 董徐辉, 李明云, 陈 炯等, 2011. 日本鬼鲉 (*Inimicus japonicus*) 线粒体 Cyt b 和 CO 基因的克隆及鲉形目系统发育分析. 海洋与湖沼, 42(1): 47—54
- 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. 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, Wesselingh F P, Rajagopal S *et al*, 2011. On the identity of broad-shelled mussels (Mollusca, Bivalvia, *Mytilus*) from the Dutch deltaregion. Contributions to Zoology, 80(2): 95—106
- Meyer A, 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, 2(2): 1—38
- 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 AND GENETIC STRUCTURE OF THREE CULTURED *MYTILUS EDULIS* POPULATIONS

GUO Bao-Ying¹, QI Peng-Zhi², LI Ji-Ji¹, YE Ying-Ying¹, CHU Zhang-Jie¹, WU Chang-Wen¹

(1. Zhejiang Ocean University, National Engineering Research Center of Marine Facilities Aquaculture, Zhoushan, 316004; 2. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan, 430070)

Abstract The genetic diversity and genetic structure of three cultured populations (Yantai of Shandong province, Rushan of Shandong province and Dongji of Zhejiang province) of *Mytilus edulis* were determined using the mitochondrial gene sequencing technology (CO_I). The result revealed 18 haplotypes for total 32 individuals obtained using PCR method. The haplotype diversities (H_d), nucleotide diversities (P_i) and the average nucleotide differences (K) were 0.946, 0.0207 and 15.316, respectively, which showed high genetic diversity among populations. The fixation indices (F_{st}) of three populations showed that there was no genetic differentiation between Yantai and Rushan populations and significant genetic differentiation between Dongji and the other two populations.

Key words *Mytilus edulis*, CO_I, 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。