

DOI: 10.12264/JFSC2020-0232

多元统计方法和 SSR 标记对不同海域文蛤及选育群体亲缘关系分析

曹奕¹, 陈爱华¹, 吴杨平¹, 张雨¹, 陈素华¹, 张志东², 田镇²

1. 江苏省海洋水产研究所, 江苏 南通 226007;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 近年来因文蛤(*Meretrix meretrix*)异地移养频繁造成遗传背景不明, 对种质保护和选择育种工作造成了影响, 进而阻碍了产业的持续发展。为挖掘不同海域文蛤群体的种质资源状况, 评估子代群体的选育潜力, 本实验采用聚类分析、主成分分析、判别分析等多元统计方法以及 SSR 标记手段对 5 个不同海域文蛤群体及江苏子三代文蛤选育群体的亲缘关系进行联合分析。结果显示: (1)日本三重文蛤群体的表观性状与所供试的 5 个我国的文蛤群体都存在着显著性差异($P<0.05$), 主成分分析及判别分析结果亦验证了该结果, 并且日本文蛤与我国文蛤的遗传差异也较大($F_{st}>0.1$); (2)多元统计方法和 SSR 标记聚类分析所得结果一致, 江苏南通文蛤群体与其选育后代江苏子三代文蛤群体先聚为一类, 之后与广西文蛤聚为一类, 采自渤海湾的山东文蛤则与辽宁文蛤聚为一类, 之后我国文蛤聚类后与日本文蛤群体聚在一起。但通过 SSR 标记手段对个体进行鉴定的准确率(91.3%)高于多元统计方法(62.78%); (3)江苏子三代文蛤选育群体与原种相比, 在遗传多样性水平上均无显著性差异($P>0.05$)。本研究表明日本文蛤与我国文蛤的差异在形态特征和遗传水平上均较为明显; 并分析了不同方法分析结果存在差异的原因, 阐述了两种方法进行联合分析的必要性; 表明了异地移养对我国文蛤种质造成的影响, 并提出了相应保护措施; 进行了将远缘种群进行杂交选育的设想; 亦通过微卫星分子标记手段证明了江苏文蛤子代群体具有继续选育的潜力, 验证了通过群体选育途径培育文蛤新品种的可行性。

关键词: 文蛤; 多元统计方法; SSR; 种质资源; 选育群体; 亲缘关系

中图分类号: S961

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2021)03-0265-11

文蛤(*Meretrix meretrix*)是我国重要的海洋经济动物, 素有“天下第一鲜”的美誉, 属真瓣鳃目(Eulamellibranchia)、帘蛤科(Veneridae)、文蛤属(*Meretrix*), 主要栖息于沿岸内湾潮间带中、低潮区或潮下带浅海, 肉质鲜嫩, 味道鲜美, 营养丰富, 具有很高的经济价值。在世界范围内, 文蛤主要分布在中国、朝鲜半岛、日本和东南亚沿海, 以及阿拉伯海的亚丁湾和阿曼湾^[1]。其在中国南北的沿海滩涂均有广泛分布, 其中辽宁辽河口沿海、山东莱州湾沿海、江苏南通沿海和广西合浦

沿海是中国文蛤的四大产区。由于文蛤增养殖效益显著, 带动了沿海各地文蛤养殖规模迅速扩大^[2], 进而导致文蛤产地天然苗种的大量采捕及大范围的异地移养, 使得原先的地理和生态隔离被人为打破, 各主产区养殖文蛤的遗传背景难以明确。该现象一方面造成了文蛤种质混杂, 使得真正的野生原种不易获得, 迫切需要采取措施加以保护; 另一方面导致在开展文蛤选择育种工作时, 缺乏可溯源的良种作为选育亲本, 从而造成了养殖文蛤出现生长速度减慢、抗逆力下降等情况, 对产

收稿日期: 2020-07-22; 修订日期: 2020-09-17.

基金项目: 江苏省自然科学基金面上项目(BK20181201); 江苏省渔业科技类重大项目(D2018-1); 江苏省水产良种保种及更新项目(2020-SJ-006); 江苏省公益类科研院所能力提升项目(BM2018029); 江苏省农业科技自主创新资金项目(CX(20) 3194).

作者简介: 曹奕, 硕士, 助理研究员, 从事贝类遗传育种研究. E-mail: caoyi19881123@126.com

通信作者: 陈爱华, 研究员, 从事贝类遗传育种研究. E-mail: chenah540540@aliyun.com

业的稳定和可持续发展造成了极大的负面影响。因此,有必要对目前常见的文蛤的不同地理群体进行亲缘分析,获取其种质基本信息,为其原种认定和种质保护工作留下一手资料。同时也可以将通过选育群体与原种进行比较,了解其是否有继续选育的潜力。

目前针对水产贝类亲缘分析的方法主要分为两大类,一是通过单因子方差分析、聚类分析和主成分分析等多元统计方法对不同群体在形态数据上的差异进行分析^[3-4],其优点是测量过程操作简单,实验技能要求较低,数据处理方法容易掌握,但其缺点是形态性状差异分析结果易受到遗传因子、环境因子的影响^[5];二是通过分子实验手段,如 ITS、AFLP、SSR、SNP 等分子标记对群体或个体进行分型^[6-9],或对不同群体的 18S rRNA、16S rRNA、COI 基因进行序列比对分析^[10-12]。分子实验手段具有以下优点:检测方法简单高效,能够实现大规模全自动分型,且其不受个体形态和趋同进化因素的影响。但离开形态学层面,分子标记也无从谈起。分子标记是复杂的生化技术的结果,但其难以直观体现出生物特性,仅能提高对生物特性研究结果的推测和判断的可信度,因为形态标记是分子标记具象化的体现^[13]。因此,通过采用传统形态分类和分子标记技术相结合的方法,是解决贝类分类问题的重要手段,能够为

贝类分类提供重要的科学依据,对于贝类良种选育及种质资源保护利用等方面都具有重要的意义^[14]。然而,目前针对不同海域文蛤群体及其选育群体同时运用形态和分子手段进行亲缘分析的研究尚未见有报道。本研究以中国广西北海、江苏南通、山东东营、辽宁丹东以及日本三重等 5 个不同海域文蛤群体及江苏子三代文蛤选育群体为研究对象,采用多元统计方法与微卫星标记手段联合对其进行亲缘分析,希望能够较为全面地了解不同海域文蛤群体及选育群体的种质资源状况,同时为文蛤良种选育工作的开展提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用自然群体文蛤采捕的海域为:中国四大主产区辽宁辽河口沿海、山东莱州湾沿海、江苏南部沿海和广西合浦沿海,以及日本伊势湾海域。同时以江苏南部沿海自然文蛤中的红壳色文蛤 5000 粒为育种基础群体,以“红壳色+生长”为目标性状,通过闭锁群体选育方式,经过 6 年获得子三代选育系(表 1),各选育世代的亲本数均大于 5000 粒,每一代的选择强度约为 10%。所有样品在江苏省文蛤良种场内用砂滤海水暂养(盐度 23.7),除去壳外脏污,吐沙干净后每个文蛤群体随机收取 30 个样品用于进行形态学测量和微卫星检测。

表 1 文蛤样品采集信息
Tab. 1 Sample information of the *Meretrix meretrix* population

群体名称 population	采集地点 sampling site	壳长/mm shell length		总重/g total weight	
		范围 range	均值 mean	范围 range	均值 mean
广西北海(G) Beihai, Guangxi	广西北海合浦港 Hepu Harbor, Beihai, Guangxi	43.75-51.78	47.75±1.87	22.27-32.88	26.72±2.9
江苏南通(S) Nantong, Jiangsu	江苏南通吕四港 Lyusi Harbor, Dongying, Shandong	36.66-53.01	44.14±4.53	21.88-30.2	25.2±5.66
山东东营(D) Dongying, Shandong	山东东营河口区 Hekou District, Nantong, Jiangsu	35.52-51.33	42.44±1.73	20.84-31.48	26.45±3.07
辽宁丹东(L) Dandong, Liaoning	辽宁丹东东港区 Donggang District, Dandong, Liaoning	41.36-55.41	48.21±2.71	21.02-36.63	28.21±4.26
日本三重(J) Mie, Japan	日本三重县志摩市 Shima, Mie, Japan	34.18-53.42	49.65±4.58	21.24-38.41	29.49±5.22
江苏子三代(SF ₃) F ₃ , Jiangsu	江苏省文蛤良种场 Stock breeding farm of <i>Meretrix meretrix</i> , Jiangsu	37.41-54.48	45.45±1.85	23.9-37.66	28.35±2.49

1.2 形态测量

根据文献[12]中所述的测量方法, 采用数显游标卡尺测量壳长(AB)、壳宽(GH)、壳高(CD)、韧带长(DE)、楯面长(DF)、楯面宽(MN)等 6 个可度量性状(图 1), 单位精确到 0.01 mm。

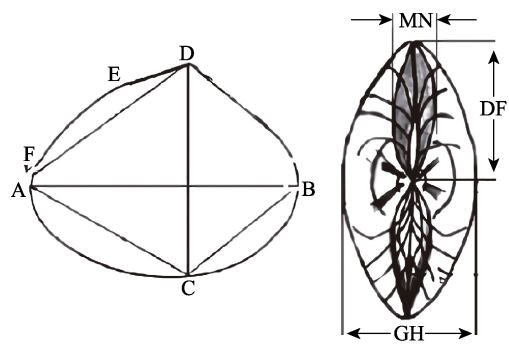


图 1 文蛤形态学指标测量示意图^[15]
Fig. 1 Diagram about morphological indicators measurement^[15]

1.3 DNA 提取

从 G、S、D、L、J 和 SF₃ 6 个文蛤群体中随机取样, 将闭壳肌取出, 用滤纸吸干, 剪碎, 加入 475 μ L STE、10 μ L 蛋白酶 K (20 mg/mL)、25 μ L 的 10% SDS, 混匀, 52 $^{\circ}$ C 消化过夜。采用酚-氯仿法进行 DNA 提取。以 ONE-DROP 微量分光光度计测定 DNA 浓度与质量, 并采用 1.5% 琼脂糖电泳加以验证, DNA 保存于 -20 $^{\circ}$ C 条件下。

1.4 引物序列合成

本次实验利用查阅相关文献[16-17]及 NCBI 查找获得的微卫星位点, 通过 Primer Premier 5.0 软件设计共 25 对微卫星引物, 并送往生工生物工程(上海)有限公司合成。经预实验筛选, 将 12 对多态性佳的微卫星引物用于 6 个不同文蛤群体的亲缘关系分析。12 对 SSR 标记的引物序列见表 2。

表 2 筛选获得引物序列
Tab. 2 The nucleotide sequences of selected primer

引物名称 primer's name	序列 (5'-3') nucleotide sequences (5'-3')	引物名称 primer's name	序列 (5'-3') nucleotide sequences (5'-3')
MM01	F: ACCCACGCACCCACCCTT R: AATGGGTGGATGGATGGGT	MM19	F: GACGCTTTGTCCAGATTTT R: CAGGTTCCAGGTCTTCCAT
MM03	F: ATGGGTATTCTTAATTGTG R: ATCAAATTGCGAACTG	MM20	F: TAAAGCCCGCAACCAAAC R: CAAGAGTGCTTTTGTCTGG
MM04	F: TAGGAGTGGGCGCTCTTAC R: CATTGTCTATGCCTCGCCTCT	MM23	F: TCAGATGGAAACAACCTC R: GTTACCCAGGACCGCTTA
MM06	F: CCGGCTAGGTAGACTGAC R: GGAGCTCCGTCTGTGGAATCA	MM25	F: GCGTAAAATGCGTATCAGA R: CACCCTAGAAACCCAGAG
MM08	F: CGCATATTATTGATAGGGTAG R: AAGTTGCCATATGACCTAAGT	MM27	F: CTGATTGAAATCTTCGGTATG R: GACTAGGGGATTAGGTCTTGA
MM18	F: CAGGTTCCAGGTCTTCCAT R: GACGCTTTGTCCAGATTTT	MM29	F: TGGAAGTTGATAATCTGAAGC R: TTCTACTGACCTAAGCTGCTG

注: B=C/G/T; D=A/G/T; H=A/C/T; Y=C/T; V=A/C/G.
Note: B=C/G/T; D=A/G/T; H=A/C/T; Y=C/T; V=A/C/G.

1.5 SSR-PCR 反应体系及程序

SSR-PCR 反应体系为 25 μ L, 包括 10 $\times$ PCR Buffer 2.5 μ L, 25 mmol/L Mg²⁺ 2.0 μ L, 10 mmol/L dNTPs 2.0 μ L, 正向反向引物各 0.5 μ mol/L, Taq 酶 1.0 U, 模板约 100 ng。程序为: 首先进行 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, T_m 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 反应进行 35 个 cycle, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物用 ABI 3730 进行毛细管电泳, 确定每个个体的等位基因大小。

1.6 数据分析

运用 SPSS 18.0 软件, 以聚类分析、主成分分析和判别分析等 3 种多元分析方法对 6 个不同文蛤群体的形态测量性状的差异进行比较分析, 确定其亲缘关系。为消除样品规格大小对形态特征的影响, 将所有参数分别除以本身壳长值(AB)予以校正, 得到 5 个形态特征比例性状, 再分别求出各组参数校正值的平均值。

聚类分析: 聚类方法为最短欧氏距离系统聚

类法。

主成分分析: 从获得的 5 个形态特征比例性状中运算得出综合性指标, 即互不关联的主成分。主成分贡献率和累计贡献率的计算参照文献[18]进行。

判别分析: 采用逐步判别法进行判别分析。对所有性状比例参数进行校正。对所有样本逐个判别, 判别准确率及综合判别率的计算公式^[19]如下: 判别准确率 $P_1(\%) = \text{判别正确的样品数} / \text{实测样品数} \times 100$; 判别准确率 $P_2(\%) = \text{判别正确的样品数} / \text{判别样品数} \times 100$; 综合判别率 $P = \sum_{i=1}^k A_i / \sum_{i=1}^k B_i$ 式中, A_i 为第 i 个群体判别正确的样品数, B_i 为第 i 个群体实际判别的样品数, k 为群体数。

微卫星数据分析步骤则如下: 获得各微卫星位点上等位基因的条带大小后, 将所得结果进行归类, 采用 Popgene 32 软件进行遗传参数分析, 并根据各群体遗传多样性参数计算了各群体间的

遗传分化系数、遗传距离。基于遗传距离, 用 Mega 5.0 软件构建所有群体样品的系统发育树。

2 结果与分析

2.1 形态特征比例性状的多元统计分析

2.1.1 形态特征比例性状的差异分析 对 5 个不同海域文蛤群体及江苏文蛤子三代选育群体的形态特征比例性状进行了单因子方差分析, LSD 法多重比较结果表明: 日本三重文蛤群体与中国文蛤群体 5 个形态测量性状均存在显著差异($P < 0.05$), 江苏文蛤群体与其子三代仅在韧带长/壳长性状上存在显著差异($P < 0.05$), 二者与广西文蛤群体也仅有 1 个形态测量性状(江苏群体与广西群体的壳宽/壳长)存在显著性差异($P < 0.05$), 山东文蛤群体与辽宁文蛤群体之间性状差异较少, 但这两个群体与其他群体至少存在 3 个形态测量性状(壳宽/壳长、韧带长/壳长、楯面长/壳长)上的显著性差异($P < 0.05$)(表 3)。

表 3 6 个不同文蛤群体的 6 个形态比例性状的校正值比较
Tab. 3 Correction with morphological proportion of six morphometric characteristics among six different *Meretrix meretrix* populations

性状 trait	广西北海 Beihai, Guangxi	江苏南通 Nantong, Jiangsu	山东东营 Dongying, Shandong	辽宁丹东 Dandong, Liaoning	日本三重 Mie, Japan	江苏子三代 F ₃ , Jiangsu
	n=30; $\bar{x} \pm SD$					
壳宽/壳长 GH/AB	0.512±0.025 ^a	0.502±0.018 ^b	0.484±0.013 ^c	0.491±0.017 ^c	0.501±0.019 ^d	0.511±0.018 ^{ab}
壳高/壳长 CD/AB	0.821±0.018 ^a	0.827±0.019 ^a	0.823±0.035 ^a	0.827±0.018 ^a	0.795±0.043 ^b	0.832±0.019 ^a
韧带长/壳长 DE/AB	0.739±0.018 ^a	0.740±0.03 ^a	0.721±0.032 ^b	0.726±0.02 ^b	0.737±0.022 ^c	0.659±0.028 ^d
楯面长/壳长 DF/AB	0.293±0.026 ^a	0.299±0.021 ^a	0.263±0.018 ^b	0.28±0.025 ^b	0.312±0.025 ^c	0.30±0.026 ^a
楯面宽/壳长 MN/AB	0.237±0.016 ^a	0.259±0.019 ^b	0.202±0.018 ^c	0.251±0.021 ^b	0.224±0.024 ^d	0.243±0.021 ^{ab}

注: 同行上标标有不同小写字母者表示组间存在显著性差异($P < 0.05$); 标有相同小写字母者表示组间无显著性差异($P > 0.05$).
Note: The different superscripts mean the differences are significant ($P < 0.05$), while the same superscript means the difference is not significant ($P > 0.05$).

2.1.2 基于形态特征性状的聚类分析 江苏南通文蛤群体与其选育后代江苏子三代文蛤群体距离最近, 之后与广西文蛤聚为一类, 山东文蛤则与辽宁文蛤聚为一类, 三重文蛤群体与其他文蛤群体的距离最远(图 2)。

2.1.3 主成分分析 对 5 个不同海域文蛤群体及江苏文蛤子三代选育群体的形态比例性状进行了主成分分析。特征值>1 的主成分共有 2 个, 其中主成分 1 的贡献率为 36.98%, 主成分 2 的贡献率为 21.17%, 累计贡献率为 58.15%。在主成分 1 中,

椭圆长/壳长(DF/AB)、壳宽/壳长(GH/AB)的影响最大, 其贡献率分别为 82.2%、80%; 主成分 2 中, 韧带长/壳长(DE/AB)影响最大, 贡献率为 77.5% (表 4)。根据 2 个主成分因子的得分绘制散点图, 结果显示 6 个群体中日本三重文蛤群体只分布在三、四象限, 独立为一个区域, 其余群体在 4 个象限均有分布且互相重叠(图 3)。

2.1.4 判别分析 通过 SPSS 18.0 对 6 个不同文蛤群体样品形态数据进行判别分析, 获得 5 个性状特征校正值, 以及 6 个群体的判别函数。以 *a*、*b*、*c*、*d*、*e* 指代壳宽/壳长(GH/AB)、壳高/壳长(CD/AB)、韧带长/壳长(DE/AB)、椭圆长/壳长

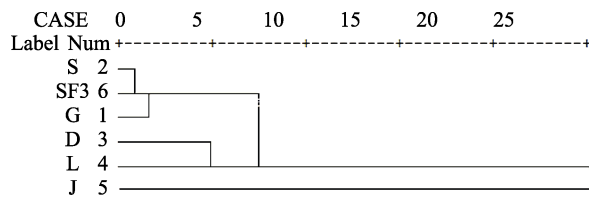


图 2 6 个不同文蛤群体的形态性状聚类分析图
D: 山东东营群体; G: 广西北海群体; J: 日本三重群体;
L: 辽宁丹东群体; S: 江苏南通群体; SF3: 江苏子三代群体。
Fig. 2 Cluster analysis among six different *Meretrix meretrix* populations
D: Population from Dongying, Shandong; G: Population from Beihai, Guangxi; J: Population from Mie, Japan;
L: Population from Dandong, Liaoning;
S: Population from Nantong, Jiangsu;
SF3: F₃ selective breeding population from Jiangsu.

表 4 6 个不同文蛤群体的 5 个形态比例性状主成分分析因子负荷值及贡献率

Tab. 4 Factor loadings of principal components and contribution ratio extracted from 5 morphological characters among six different *Meretrix meretrix* populations

性状 trait	主成分 principal component	
	1	2
壳宽/壳长(GH/AB)	0.800	-0.273
壳高/壳长(CD/AB)	0.308	0.573
韧带长/壳长(DE/AB)	0.230	0.775
椭圆长/壳长(DF/AB)	0.822	-0.223
椭圆宽/壳长(MN/AB)	0.621	0.076
各主成分贡献率/% contribution ratio	36.98	21.17

注: * 表示负荷值>0.700, 为主要贡献变量。
Note: Variables with the main contribution to each factor are explained by * marked loading >0.700.

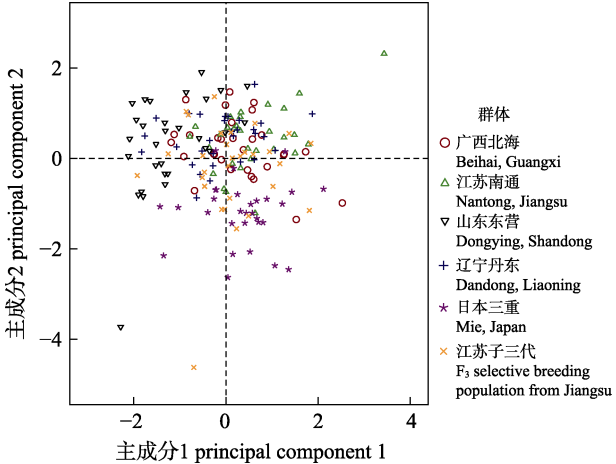


图 3 6 个不同文蛤群体形态比例性状的 2 个主成分散布图

Fig. 3 Scatterplot scores for the 2 principal components based on morphological proportion among six different *Meretrix meretrix* populations

(DF/AB)、椭圆宽/壳长(MN/AB)。6 个文蛤群体的判别公式如下:

广西文蛤群体: $Y_G=1190.689a+791.667b+611.078c-270.654d+182.555e-837.561$
江苏文蛤群体: $Y_S=1143.942a+798.129b+603.16c-238.369d+239.321e-837.561$
山东文蛤群体: $Y_D=1151.948a+810.465b+603.092c-300.039d+103.671e-802.512$
辽宁文蛤群体: $Y_L=1135.999a+811.466b+585.734c-266.365d+226.429e-819.943$
三重文蛤群体: $Y_J=1152.085a+747.755b+626.720c-237.956d+192.429e-806.087$
江苏子三代文蛤群体: $Y_{SF3}=1204.368a+866.114b+436.349c-223.65d+220.652e-807.118$

6 个不同文蛤群体的形态性状判别分析结果为: 判别准确率 P_1 为 40%~96.67%, P_2 为 46.43%~93.55%, 6 个不同群体的综合判别率为 62.78% (表 5)。判别准确率最高的为日本三重文蛤群体, 其 P_1 为 96.67%, P_2 为 93.55%, 显著高于我国文蛤群体的判别准确率。

2.2 SSR 标记分析结果

2.2.1 6 个不同文蛤群体的遗传多样性水平 12 对 SSR 引物在 6 个不同文蛤群体中共检测到 78 个等位基因, 平均每个位点等位基因数为 6.5 个。6 个群体分别检测到的等位基因数为 62、68、59、60、56、67 个。各群体有效等位基因数范围为

2.55~3.46, Shannon's 信息指数范围为 0.602~0.779, 多态信息含量 PIC 介于 0.485~0.612 之间, 均表现出高度的多态性(表 6), 表明 6 个文蛤群体遗传多样性均相对丰富。其中江苏南通群体的遗传多样性水平最高, 江苏选育子三代群体各项遗传多样性参数均值略低于江苏南通群体, 二者之间并无显著性差异($P>0.05$)。

2.2.2 6 个不同文蛤群体的遗传分化状况与 SSR 聚类分析结果 经过软件分析计算, 6 个不同文蛤群体间的遗传分化系数 F_{st} 为 0.0208~0.1135, 其中广西文蛤群体、江苏文蛤群体、江苏选育子三代群体未出现明显分化, 其余群体均出现中等程度分化。同时利用 Popgene 32 软件计算了 6 个不同文蛤群体间的遗传距离(表 7)。并根据该数据

通过 MEGA 软件绘制出了 6 个不同文蛤群体及其个体的 UPGMA 聚类图(图 5, 图 6)。聚类分析结果表明: 江苏南通文蛤群体与其选育后代江苏子三代文蛤群体先聚为一类, 之后与广西文蛤聚为一类, 山东文蛤则与辽宁文蛤聚为一类, 之后我国 4 个主产区文蛤聚类后再与日本文蛤群体聚在一起, 此结果与形态聚类分析一致(图 5)。图 6 个体的 UPGMA 聚类图结果表明: 6 个群体中江苏南通文蛤群体与其选育后代江苏子三代文蛤群体有 6 个个体相互混杂(20%), 其余大部分个体各自独立汇聚成一支。只有零星个体出现在其他群体中, 分类准确率为 91.3% (164/180)。从不同群体角度来看, 个体间的聚类结果与群体间的聚类结果相一致。

表 5 6 个不同文蛤群体形态性状判别分析结果
Tab. 5 Discriminant results of morphological proportion of six different *Meretrix meretrix* populations

群体 population	样品数量 number	判别正确/% accuracy		预测分类 predicted species membership					
		P_1	P_2	G	S	D	L	J	SF ₃
广西北海(G) Beihai, Guangxi	30	50	57.69	15	3	2	4	0	6
江苏南通(S) Nantong, Jiangsu	30	53.33	48.65	2	18	0	4	1	5
山东东营(D) Dongying, Shandong	30	86.67	81.25	2	0	26	1	0	1
辽宁丹东(L) Dandong, Liaoning	30	53.33	59.26	2	7	2	16	0	3
日本三重(J) Mie, Japan	30	96.67	93.55	1	0	0	0	29	0
江苏子三代(SF ₃) F ₃ , Jiangsu	30	40	46.43	4	9	2	2	1	12
合计 total	180	62.78	69.30	26	37	32	27	31	27

表 6 微卫星分析得到的 6 个不同文蛤群体遗传多样性参数
Tab. 6 Genetic diversity of six different *Meretrix meretrix* populations by SSR

群体 population	等位基因数 N_a	有效等位基因数 N_e	多态信息含量 PIC	Shannon's 信息指数 I	观察杂合度 H_o	期望杂合度 H_e
广西北海(G) Beihai, Guangxi	5.17±0.18 ^a	3.01±0.07 ^a	0.523±0.021 ^a	0.685±0.041 ^a	0.658±0.03 ^a	0.637±0.028 ^a
江苏南通(S) Nantong, Jiangsu	5.67±0.22 ^b	3.46±0.13 ^b	0.612±0.032 ^b	0.779±0.029 ^b	0.719±0.027 ^b	0.701±0.023 ^b
山东东营(D) Dongying, Shandong	4.92±0.16 ^a	2.84±0.10 ^c	0.504±0.026 ^a	0.626±0.013 ^c	0.587±0.038 ^c	0.568±0.032 ^c
辽宁丹东(L) Dandong, Liaoning	5±0.25 ^a	2.98±0.13 ^a	0.518±0.01 ^a	0.632±0.02 ^c	0.636±0.024 ^a	0.613±0.018 ^a
日本三重(J) Mie, Japan	4.67±0.18 ^c	2.55±0.09 ^d	0.485±0.018 ^c	0.602±0.015 ^d	0.565±0.043 ^c	0.548±0.036 ^c
江苏子三代(SF ₃) F ₃ , Jiangsu	5.58±0.2 ^b	3.39±0.12 ^b	0.597±0.024 ^b	0.746±0.034 ^b	0.683±0.035 ^b	0.688±0.026 ^b

注: 同行上标标有不同小写字母者表示组间存在显著性差异($P<0.05$); 标有相同小写字母者表示组间无显著性差异($P>0.05$).
Note: The different superscripts mean the differences are significant ($P<0.05$), while the same superscript means the difference is not significant ($P>0.05$).

表 7 6 个不同文蛤群体间遗传分化系数和遗传距离

Tab. 7 Genetic distance and genetic diversity coefficient of six different *Meretrix meretrix* populations

群体 population	广西北海 Beihai, Guangxi	江苏南通 Nantong, Jiangsu	山东东营 Dongying, Shandong	辽宁丹东 Dandong, Liaoning	日本三重 Mie, Japan	江苏 子三代 F ₃ , Jiangsu
广西北海 Beihai, Guangxi	—	0.0182	0.0455	0.0487	0.0877	0.0220
江苏南通 Nantong, Jiangsu	0.0395	—	0.0437	0.0490	0.0910	0.0106
山东东营 Dongying, Shandong	0.0799	0.0764	—	0.0357	0.0775	0.0430
辽宁丹东 Dandong, Liaoning	0.0943	0.0885	0.0651	—	0.0839	0.0495
日本三重 Mie, Japan	0.1135	0.1020	0.0913	0.0925	—	0.0892
江苏子三代 F ₃ , Jiangsu	0.0424	0.0208	0.0844	0.0894	0.0968	—

注: 对角线以上为遗传距离, 对角线以下为遗传分化系数.

Note: The data above diagonal are genetic distance (D_a) and the date below diagonal are genetic differentiations (F_{st}).

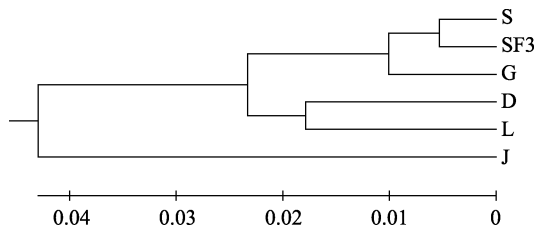


图 4 基于微卫星标记的 6 个不同文蛤群体的 UPGMA 聚类图

D: 山东东营群体, G: 广西北海群体, J: 日本三重群体,
L: 辽宁丹东群体, S: 江苏南通群体, SF3: 江苏子三代群体.

Fig. 4 The UPGMA dendrogram of individuals from six different *Meretrix meretrix* populations by SSR

D: Population from Dongying, Shandong; G: Population from Beihai, Guangxi; J: Population from Mie, Japan;
L: Population from Dandong, Liaoning;
S: Population from Nantong, Jiangsu;
SF3: F₃ selective breeding population from Jiangsu.

3 讨论

3.1 两种方法对不同海域文蛤及选育群体亲缘关系的分析结果

从多元统计方法中的显著性分析结果来看, 日本三重文蛤群体在形态比例性状上与我国所供试的 5 个文蛤群体都存在着显著性差异($P<0.05$), 我国不同海域文蛤群体及选育群体的形态比例性状差异并不明显; 主成分分析则表明: 日本文蛤的分布独立为一个区域, 其余群体分布互相重叠, 而判别分析表明, 日本三重文蛤群体的形态可辨

别率高达 90%以上, 显著高于我国文蛤群体的判别准确率。这些结果均表明日本文蛤群体与我国文蛤群体形态上差异明显, 相对容易辨别。

从通过微卫星手段获得的遗传分化指数(F_{st})来看, 日本文蛤与我国文蛤的遗传差异较大($F_{st}>0.1$); 江苏南通文蛤与其选育后代江苏子三代文蛤、广西群体之间分化程度较小($F_{st}<0.05$), 渤海湾的山东文蛤群体与辽宁文蛤群体之间分化程度不够明显, 但与其他群体间有中等程度的分化($0.05<F_{st}<0.1$)^[20], 该结果与形态性状的显著性分析结果相符合。在文蛤群体间亲缘关系聚类分析结果上, 多元统计方法和微卫星标记鉴定的结论一致: 江苏南通文蛤群体与其选育后代江苏子三代文蛤群体先聚为一类, 之后与广西文蛤聚为一类, 再与山东文蛤和辽宁文蛤聚为一类, 最后与三重文蛤群体聚为一类。但在个体分型方面, 形态分析的综合判别准确率为 62.78%, 而微卫星标记的鉴别准确度高达 91.3%。两种分析方法在个体鉴别准确度方面存在较大差异。

王超等^[21]通过 16S rRNA 及 COI 基因测序比对的手段, 认为日本三重文蛤与我国沿海文蛤之间遗传分化已达到亚种水平, 吴杨平等^[15]则通过多变量形态分析认为日本文蛤属于丽文蛤, 与文蛤差异较大, 本研究结果验证了以上结论。

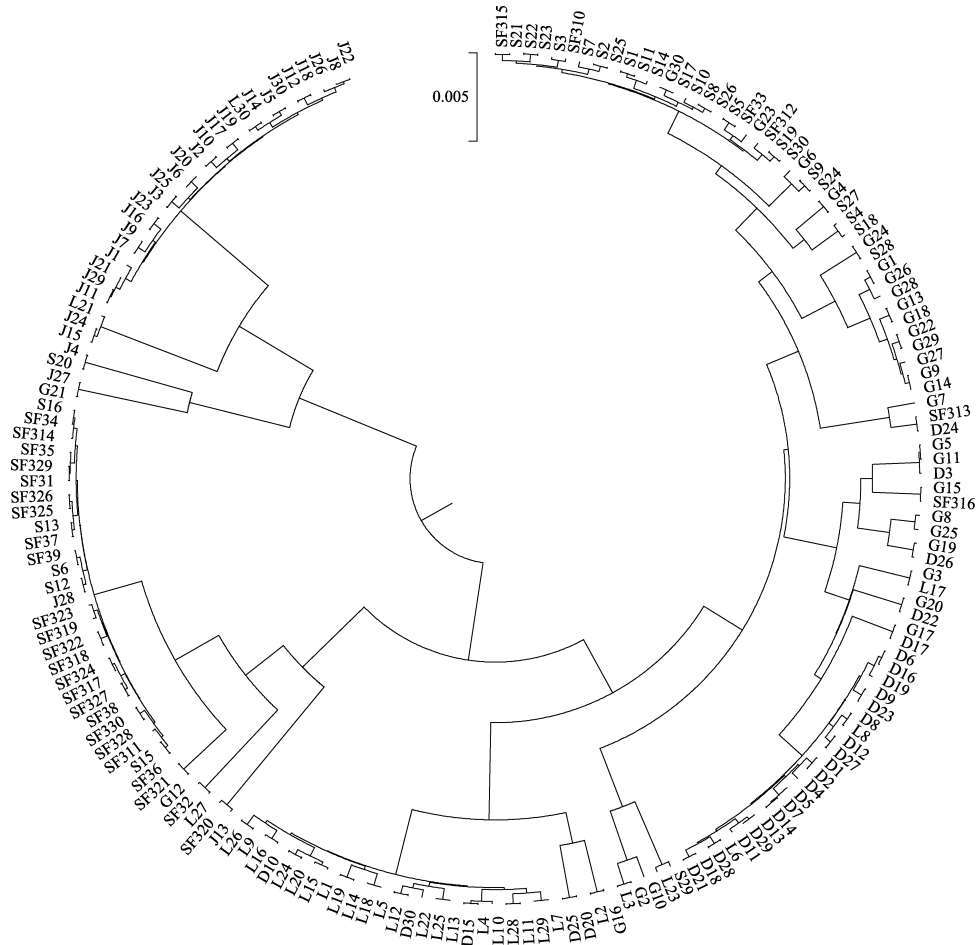


图 5 基于微卫星标记的 6 个不同文蛤群体个体的 UPGMA 聚类图
Fig. 5 The UPGMA dendrogram of individuals from six different *Meretrix meretrix* populations by SSR

3.2 两种方法所得结果存在差异的原因分析及进行联合分析的必要性

运用多元统计方法进行形态分析及微卫星标记手段获得的群体间的亲缘关系结果一致,但在个体分型方面,微卫星标记的鉴别准确度却远高于形态分析结果。出现该差异的原因有以下几点:(1)个体受生存环境变化如饵料、气温、水质、盐度等因素的影响较大,产生的形态变化导致错误鉴定;(2)形态学鉴定只能从表观形态上鉴定个体所属的地理种群,当不同海域文蛤形态相近时,难以进行明确鉴定。而分子标记能够从基因方面准确地将不同个体所属种群鉴定出来^[22]。

多元统计方法进行形态分析能够准确地进行个体性状描述,用直观的标记研究可度量性状的遗传显得更简单、更方便,所以该方法仍是种群鉴定的研究基础,但其受环境影响较大,鉴定准

确率不高,在开始研究前有必要采用分子标记鉴定方法来对形态分析结果进行补充验证。而分子标记方法不受环境的影响,也不受基因表达与否的限制,数量丰富,遗传稳定,鉴定准确率高,但其只能间接反映生物的相关目标性状,在具体研究过程中要结合形态分析数据才能够体现其研究价值^[23]。只有将形态学标记、分子标记、以及其他技术方法(如生化分析、免疫学分析等)有机结合在一起,运用多种技术分析才能弥补各种方法本身存在的不足,才能更全面的揭示研究事物的本质,也只有这样才能更好的为文蛤的研究及选育工作服务。

3.3 研究结果对于文蛤种质保护及选育工作的帮助

本研究通过两种手段对日本文蛤群体及我国沿海主产区的文蛤群体之间的亲缘关系进行了梳

理, 对我国文蛤种质保护及选育工作提供了以下帮助: (1) 对当前我国文蛤种质资源进行了初步挖掘和评价。两种方法均得出广西文蛤与江苏文蛤亲缘关系相对较近的结论, 与林志华等^[24]运用 AFLP 标记获得的结果存在差异。其原因可能与采用的分子标记方法不同相关, 同时亦表明由于近年来我国文蛤自北而南的异地移养增多, 广西地区原种可能出现种质混杂状况。为保证文蛤种质资源的可持续利用, 必须对该地文蛤异地移养严格监管, 建立可追溯系统, 避免当地原始种群基因污染状况加剧。同时通过研究结果使得将亲缘关系最远的江苏文蛤群体与三重文蛤群体进行杂交选育以获得新品种存在可能性, 但其杂交子代是否能够具备杂种优势仍需通过后续工作来进行评估。(2) 验证了江苏文蛤群体选育的可行性。吴杨平等^[25]在进行文蛤选育过程中发现江苏红壳色文蛤有着显著生长优势, 因此开始对其进行群繁选育, 但其在繁育数代后, 是否会出现近交衰退, 带来遗传多样性的下降, 导致优良性状的消失, 一直不得而知。而本研究结果表明: 在选育至子三代时, 其遗传多样性与原种相比并无显著差异($P>0.05$), 这就说明通过该途径培育文蛤新品种是完全可行的。

参考文献:

- [1] Zhang S P, Wang H X, Xu F S. Taxonomic study on *Meretrix* (Bivalvia, Veneridae) from China seas[J]. Acta Zootaxonomica Sinica, 2012, 37(3): 473-479. [张素萍, 王鸿霞, 徐凤山. 中国近海文蛤属(双壳纲, 帘蛤科)的系统分类学研究[J]. 动物分类学报, 2012, 37(3): 473-479.]
- [2] Tang B J, Liu B Z, Wang G D, et al. Effects of various algal diets and starvation on larval growth and survival of *Meretrix meretrix*[J]. Aquaculture, 2006, 254(1-4): 526-533.
- [3] Liu T, Zou Y, Wang Y J, et al. Morphological variations among four populations of ark shell *Scapharca broughtonii*[J]. Fisheries Science, 2019, 38(5): 676-681. [刘童, 邹琰, 王英俊, 等. 4 个群体形态差异比较分析[J]. 水产科学, 2019, 38(5): 676-681.]
- [4] Niu H B, Nie H T, Zhao L Q, et al. Morphological variation analysis of the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) populations along the coast of Liaoning Province[J]. Marine Sciences, 2015, 39(11): 54-60. [牛泓博, 聂鸿涛, 赵力强, 等. 沿海菲律宾蛤仔不同地理群体形态差异研究[J]. 海洋科学, 2015, 39(11): 54-60.]
- [5] Li J. Studies on quantitative characters, nutrient components and larval ecology of Japanese *Dosinia* (*Dosinorbis japonica*)[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2018. [李杰. 日本镜蛤(*Dosinorbis japonica*)数量性状、营养成分及幼体生态学研究[D]. 大连: 大连海洋大学, 2018.]
- [6] Pan B P, Wu Q, Zhang S P, et al. Molecular phylogeny of *Meretrix* (Mollusca, Bivalvia) based on 16S rRNA genes and ITS1 sequences[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2006, 37(4): 342-347. [潘宝平, 吴琪, 张素萍, 等. 文蛤属(*Meretrix*) 16S rRNA 基因及 ITS1 序列的系统学分析[J]. 海洋与湖沼, 2006, 37(4): 342-347.]
- [7] Sun Z H, Liu Z G, Ou Y Y, et al. AFLP analysis of genetic diversity of four shell color strains (F_1) of *Chlamys nobilis*[J]. Marine Sciences, 2015, 39(7): 37-42. [孙宗红, 刘志刚, 欧燕燕, 等. 华贵栉孔扇贝四种壳色选育系 F_1 遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 海洋科学, 2015, 39(7): 37-42.]
- [8] Xu L, Li Q, Xu C X, et al. Genetic diversity and effective population size in successive mass selected generations of black shell strain Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) based on microsatellites and mtDNA data[J]. Aquaculture, 2019, 500: 338-346.
- [9] Huang J, Pan X L, Xu M, et al. Morphological and SNP markers for analysis of genetic structure of hybrid progeny and their parental populations of *Pinctada fucata martensii*[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2019, 38(6): 80-89. [黄景, 潘肖兰, 许濛, 等. 形态学和 SNP 标记分析马氏珠母贝杂交子代及其亲本群体的遗传结构[J]. 热带海洋学报, 2019, 38(6): 80-89.]
- [10] Han L. Comparative with the ribosomal repeat unit of five Veneridae species and their phylogeny[D]. Jinan: Shangdong University, 2019. [韩冷. 五种帘蛤科贝类的核糖体基因簇比较与系统发育研究[D]. 济南: 山东大学, 2019.]
- [11] Xiang M Y, Zeng L K, Li Z, et al. Analysis of 4 populations scallops and 4 species scallops based on partial 16S rRNA gene sequences[J]. Chinese Fishery Quality and Standards, 2018, 8(3): 68-74. [相明玥, 曾令坤, 李祯, 等. 基于 16S rRNA 序列对 4 种扇贝 4 个群体亲缘关系分析[J]. 中国渔业质量与标准, 2018, 8(3): 68-74.]
- [12] Xue D X, Wang H Y, Zhang T, et al. Population genetic structure and demographic history of *Atrina pectinata* based on mitochondrial DNA and microsatellite markers[J]. PLoS One, 2014, 9(5): e95436.
- [13] Zhang S. Applications of morphological marker and molecular marker in shrimp and crab[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2008. [张姝. 分子标记/形态标记在虾、蟹研究中的应用[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2008.]

- [14] Wu Q S, Wang X Q, Zeng Z N, et al. Advance in taxonomic studies of oysters in China[J]. Journal of Fujian Fisheries, 2011, 33(1): 67-72. [巫旗生, 王晓清, 曾志南, 等. 中国牡蛎分类方法研究进展[J]. 福建水产, 2011, 33(1): 67-72.]
- [15] Wu Y P, Yao G X, Chen A H, et al. Multivariate morphometric analysis of two species of *Meretrix*, with notes on Japanese *Meretrix lusoria*'s validity[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(9): 1410-1418. [吴杨平, 姚国兴, 陈爱华, 等. 文蛤属 2 种贝类多变量形态分析及日本文蛤的物种有效性[J]. 水产学报, 2011, 35(9): 1410-1418.]
- [16] Lu X, Wang H X, Liu B Z, et al. An effective method for parentage determination of the clam (*Meretrix meretrix*) based on SSR and COI markers[J]. Aquaculture, 2011, 318(1-2): 223-228.
- [17] Lu X, Wang H X, Dai P, et al. Characterization of EST-SSR and genomic-SSR markers in the clam, *Meretrix meretrix*[J]. Conservation Genetics Resources, 2011, 3(4): 655-658.
- [18] Wang H X, Huan P, Lu X, et al. Mining of EST-SSR markers in clam *Meretrix meretrix* larvae from 454 shotgun transcriptome[J]. Genes & Genetic Systems, 2011, 86(3): 197-205.
- [19] Wu S Q, Luo H Y, Zhang Z, et al. Principal component and path analysis of phenotypic traits of Yunlong grouper with different month ages[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2019, 34(5): 680-687. [吴水清, 罗辉玉, 张哲, 等. 不同月龄云龙石斑鱼表型性状的主成分与通径分析[J]. 大连海洋大学学报, 2019, 34(5): 680-687.]
- [20] Wright S. Evolution and the genetics of population variability within and among natural population[M]. Chicago: University of Chicago Press, 1978: 4.
- [21] Wang C, Chen A H, Cao Y, et al. Genetic relationship analysis of six *Meretrix meretrix* populations from different sea areas[J]. Marine Fisheries, 2016, 38(3): 262-272. [王超, 陈爱华, 曹奕, 等. 6 个不同海域文蛤地理群体的亲缘关系分析[J]. 海洋渔业, 2016, 38(3): 262-272.]
- [22] Hebert P D N, Ratnasingham S, DeWaard J R. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species[J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2003, 270(Suppl 1): S96-S99.
- [23] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2003, 270(1512): 313-321.
- [24] Lin Z H, Dong Y H, Li N, et al. The genetic structure and diversity analysis of different geographical populations of *Meretrix meretrix* using morphological parameters and AFLP markers[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2008, 39(3): 245-251. [林志华, 董迎辉, 李宁, 等. 基于形态参数和 AFLP 标记的文蛤(*Meretrix meretrix*)不同地理群体遗传变异分析[J]. 海洋与湖沼, 2008, 39(3): 245-251.]
- [25] Wu Y P, Yao G X, Chen A H, et al. Morphological diversions in the color of *Meretrix meretrix* offspring and comparison of breeding effects[J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2012, 31(3): 412-419, 446. [吴杨平, 姚国兴, 陈爱华, 等. 红壳色文蛤选育子代各壳色的形态分化及养殖效果的比较[J]. 台湾海峡, 2012, 31(3): 412-419, 446.]

Phylogenetic relationships among different populations and selective breeding of *Meretrix meretrix*, based on *multivariate statistical analysis* and simple sequence repeat markers

CAO Yi¹, CHEN Aihua¹, WU Yangping¹, ZHANG Yu¹, CHEN Suhua¹, ZHANG Zhidong², TIAN Zhen²

1. Jiangsu Institute of Marine Fisheries, Nantong 226007, China;

2. College of Fisheries and Life, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: In recent years, due to frequent translocation, the genetic background of Asiatic hard clams, *Meretrix meretrix*, has become unclear. This affects the protection of the germplasm and selective breeding, thus hindering the sustainable development of the Asiatic hard clam aquaculture industry. We aimed to explore the germplasm resources of Asiatic hard clam populations from different sea areas and evaluate the breeding potential of the different populations. To do so, the phylogenetic relationships between five populations from different sea areas in China, a selectively bred F₃ population from Jiangsu, China, and a population from Japan, were analyzed using multivariate statistical methods such as cluster analysis, principal component analysis, discriminant analysis, and microsatellite markers. The results indicate that: (1) There were significant differences between the morphological characteristics of the Asiatic hard clam population from Japan and the five Chinese populations tested ($P < 0.05$), which were verified by principal component analysis and discriminant analysis. The genetic differences between the population from Japan and the five Chinese populations were also significant ($F_{st} > 0.1$). (2) The results of the cluster analyses using the two different methods were consistent. The initial broodstocks from Nantong and Jiangsu and their offspring (the F₃ selective-breeding population) were clustered together first and then grouped with the population from Guangxi. The population from Shandong was clustered with the population from Liaoning. Chinese populations clustered together and then clustered with the population from Japan. The accuracy with which individuals were identified was higher when using simple-sequence repeat (SSR) markers (91.3%) than when using multivariate statistical methods (62.78%). (3) No significant difference in genetic diversity was found among initial broodstocks from Nantong, Jiangsu, and their offspring, the selectively bred F₃ population ($P < 0.05$). This experiment shows that the differences between populations from Japan and China are clearly reflected at the morphological and genetic level. The reasons underlying the differences found using the two methods (SSR and multivariate statistical methods) were analyzed, and the necessity of joint analysis using these two methods is explained. Our results also reflect the effects of frequent translocation on the germplasm. Based on our results, we recommend cross breeding between distant populations to protect the germplasm resources of Asiatic hard clams. The selectively bred F₃ population was regarded as the offspring of populations from Jiangsu. SSR marker data suggests that this population has the potential for continuous breeding. Furthermore, the feasibility of cultivating new varieties of Asiatic hard clams by mass selection was verified.

Key words: *Meretrix meretrix*; multivariate statistical analysis; simple-sequence repeat (SSR); germplasm resource; selective breeding population; phylogenetic relationship

Corresponding author: CHEN Aihua. E-mail: chenah540540@aliyun.com