

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2015.140533

中国沿海平疣桑椹石磺 *CO I* 基因的遗传多样性与遗传分化

姚理想, 周娜, 沈和定, 刘宸

上海海洋大学 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306

摘要: 基于 *CO I* 序列, 对中国沿海 5 个平疣桑椹石磺(*Platevindex mortoni*)群体的遗传多样性及遗传分化进行了分析, 84 个样本中共检测出单倍型 41 个, 多态性位点 117 个。总体来说, 平疣桑椹石磺具有高的单倍型多样性(0.835 ± 0.039)和核苷酸多样性(0.0572 ± 0.0060)。分子方差分析 (AMOVA) 表明, 65.98% 的变异存在于种群间, 34.02% 的变异发生在种群内。群体间遗传分化固定指数(F_{st})、基因流(N_{em})及遗传距离分析表明, 平疣桑椹石磺已产生了明显的群体间分化。厦门(XM)、湛江(ZJ)和广西(GX)群体间无明显分化, 基因流较大($N_{em} > 5$), 而海南(HN)、苍南(CN)群体分别与其他群体存在显著的分化。单倍型网络图及谱系树同样证实了群体遗传差异的存在。遗传距离模式(IBM)检测显示出, 平疣桑椹石磺群体的遗传距离与地理距离之间不存在明显的线性关系。中性检验及历史动态检验推断, ZJ 和 GX 群体可能经历过历史上的瓶颈效应, XM 群体经历过历史上的种群扩张, 扩张时间推测大约为 0.12 Ma BP, 可能伴随更新世冰期的气候变暖, 海平面上升发生。本研究通过对平疣桑椹石磺 mtDNA 的 *CO I* 基因进行分析, 探讨其遗传多样性及遗传分化过程, 旨在为该物种种质保护, 资源合理开发及生物进化方面研究提供基础资料和理论依据。

关键词: 平疣桑椹石磺; 细胞色素 c 氧化酶亚基 I (CO I); 遗传多样性; 遗传分化

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2015)04-0729-11

大多数海洋生物具有自由活动的浮游幼虫期, 加之受洋流的影响, 群体间基因交流广泛, 常常不存在明显的群体遗传分化^[2]。然而, 海洋生物群体遗传差异的发生也会显著地受到一些物理因素的影响, 如水文障碍、海湾岛屿、浮游幼虫时期以及人类活动等^[3-5]。海洋软体动物研究中, 研究者在小尺度范围内也检测到了明显的遗传差异的存在^[6-7]。Todd 等^[5]在研究具有长时间营浮游生物营养的隅海牛(*Goniadoris nodosa*)面盘幼虫(约 3 个月)和短时间营卵黄营养的后鳃类 *Adalaria proxima* 面盘幼虫(1~2 d)的遗传结构时发现, 两种裸鳃软体动物遗传差异并不相同, *A. proxima* 在小尺度范围内即表现出明显的群体差异, 且没有呈现显著的距离隔离模式; 相反, 相同距离范围

内 *G. nodosa* 却并未显示出群体差异。由此可见, 一些缺乏具有扩散能力幼虫阶段的固着物种也可能容易地移入到新的环境, 而有些营长时间浮游生物营养幼虫阶段的生物小尺度内表现出显著的群体差异^[8-12]。

石磺是用“肺”呼吸的肺螺类, 全身裸露无壳, 平疣桑椹石磺较里氏拟石磺外套膜更加发达, 外套膜外表皮的一层透明质薄膜可有助于防止体内水分蒸发。其中, 平疣桑椹石磺 (*Platevindex mortoni*)属缩眼目(Systellommatophora), 石磺科(Onchidiidae)。常栖息于海滩, 海水与淡水交汇处的滩涂, 潮间带岩石及红树林地区^[1], 广泛分布于中国沿海地带。其生活史具有大约 15 d 的自由面盘幼虫时期, 而后发育成匍匐幼虫, 幼体及成

收稿日期: 2014-12-17; 修订日期: 2015-03-15.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41276157); 上海高校水产学一流学科建设项目.

作者简介: 姚理想(1991-), 女, 在读硕士; 主要从事海洋生物学研究. E-mail: lxyao_crate@163.com

通信作者: 沈和定, 男, 博士, 教授; E-mail: hdshen@shou.edu.cn; Tel: 021-61900446

体依靠腹足爬行运动,很少游泳。周娜等^[13]采用线粒体 *CO I* 基因发现中国沿海里氏拟石磺群体间存在遗传差异。Sun 等^[14]基于 16S rRNA 基因对石磺科贝类物种多样性的系统发育分析发现,中国沿海平疣桑椹石磺不同地理群体聚类存在差异。对于平疣桑椹石磺遗传多样性及群体遗传分化方面的深入研究有待于开展。

因此,本研究通过对平疣桑椹石磺 mtDNA 的 *CO I* 基因进行分析,获取中国沿海平疣桑椹石磺的种群信息,检测其遗传多样性水平,评估种群的适应能力和进化潜力;探讨中国沿海平疣桑椹石磺和其他地理群系石磺种群间的遗传关系,明确不同种群之间的基因交流状况是否因自身生活史和外界海洋环流的影响存在遗传结构;研究中国沿海平疣桑椹石磺的种群动态,推测其可能的进化历史。因石磺科贝类在中国广泛的分布,特殊的生活史,分子遗传多样性及遗传结构方面研究仍是空白,故对其研究具有重要意义。因此,本研究首次通过运用分子的方法对平疣桑椹石磺的线粒体基因进行测序分析,探讨其遗传多样性及遗传分化过程,旨在为该物种种质保护,资源合理开发及生物进化方面研究提供基础资料和理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

实验样本采自中国沿海 5 个地区,共计 84 个个体,其中福建厦门 (XM) 20 个、广东湛江 (ZJ) 16 个、广西钦州 (GX) 17 个、海南东寨港 (HN) 11 个、浙江苍南 (CN) 20 个(表 2)。所有样本经鉴定后均保存于 75% 无水乙醇 4℃ 冰箱中备用。

1.2 DNA 提取、PCR 扩增及测序

基因组 DNA 的提取采用常规的酚-氯仿抽提法。采用引物 *LCO I* 1490: GGT CAACAAATCAT AAAGATATTGG 和 *YHCO I* b: TAAACTTCTGGA TGTCCAAAG AATCA 扩增平疣桑椹石磺 *CO I* 基因。*YHCO I* b 为特异性设计引物,引物由生工生物(上海)公司合成。PCR 反应体系为 50 μL,包括上下游引物各 1 μL、模板 DNA 1 μL、2×*Taq* PCR Master Mix 25 μL 和去离子水 22 μL。反应条件:

94℃ 预变性 5 min; 94℃ 30 s, 54℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 30 个循环; 72℃ 延伸 8 min。PCR 产物经 1.2 % 琼脂糖凝胶电泳检测后送上海美吉生物医药科技有限公司测序。

1.3 数据分析

所得序列采用 Clustal X1.83^[15] 软件进行编辑、校对和排序,并辅以手工校正。MEGA 5.0^[16] 软件统计序列的平均碱基组成,并根据 Kimura 双参数模型计算各群体间的遗传距离,对核苷酸替代最佳模型检验后,构建单倍型 ML 系统树并对拓扑图中各个分支支持率进行 1 000 次自展法重抽样检验。核苷酸不配对分布分析图、序列的单倍型、多态位点数(N_s)、单倍型数(N_h)、平均核苷酸差异数(K)以及单倍型多样性(h)和核苷酸多样性(π)由 DnaSP 5.10^[17] 软件计算得出。采用 Network Monitor^[18] 软件构建单倍型的最小跨度树。Tajima's D 、Fu's F_s 两种中性假说检验采用 Arlequin3.5^[19] 软件进行。利用 Arlequin 3.5 软件中的分子方差分析 (AMOVA) 计算群体间、群体内的遗传分化及 F_{st} 值。采用 IBDWS^[20] 软件中的 Mantel 检测评估平疣桑椹石磺群体的遗传距离和地理距离的相关性。

单倍型序列已经提交到 GenBank, 序列号: gb|GU475132.1, gb|GU166569.1, gb|GU166571.1, gb|GU166575.1, gb|GU166576.1, gb|GU166583.1, gb|GU166587.1。

2 结果与分析

2.1 序列特征及单倍型分布

对基因序列进行比对剪接后获得一个 591 bp 的同源序列,无插入和缺失现象。群体核苷酸 T、C、A、G 的平均含量为 39.54%、17.56%、23.07%、19.83%, 显示出 A+T(62.61%) 含量明显高于 G+C 含量(37.39%), 表现出明显的线粒体基因组反 G 偏移特征。所有群体序列共确定出 117 个变异位点,包括 23 个单变异位点和 94 个简约信息位点。所有变异位点共定义了 41 个单倍型,除 Hap1 和 Hap28 拥有共享单倍型外,39 个单倍型为每个群体特有单倍型, Hap1 是分布最为广泛的单倍型,除 HN 群体外,分布于所有群体,占有单倍型的 39.3%(表 1)。

表 1 平疣桑椹石磺 5 个地理群体单倍型分布
Tab. 1 Haplotype distributions of *Plateindex mortoni* sampled from 5 localities

单倍型 haplotype	群体 population					合计 total
	XM	ZJ	GX	HN	CN	
Hap_1	9	10	10	0	4	33
Hap_2	1	0	0	0	0	1
Hap_3	1	0	0	0	0	1
Hap_4	1	0	0	0	0	1
Hap_5	1	0	0	0	0	1
Hap_6	1	0	0	0	0	1
Hap_7	1	0	0	0	0	1
Hap_8	1	0	0	0	0	1
Hap_9	1	0	0	0	0	1
Hap_10	1	0	0	0	0	1
Hap_11	1	0	0	0	0	1
Hap_12	1	0	0	0	0	1
Hap_13	0	1	0	0	0	1
Hap_14	0	1	0	0	0	1
Hap_15	0	1	0	0	0	1
Hap_16	0	1	0	0	0	1
Hap_17	0	1	0	0	0	1
Hap_18	0	1	0	0	0	1
Hap_19	0	0	1	0	0	1
Hap_20	0	0	1	0	0	1
Hap_21	0	0	1	0	0	1
Hap_22	0	0	1	0	0	1
Hap_23	0	0	1	0	0	1
Hap_24	0	0	1	0	0	1
Hap_25	0	0	1	0	0	1
Hap_26	0	0	0	1	0	1
Hap_27	0	0	0	2	0	2
Hap_28	0	0	0	4	6	10
Hap_29	0	0	0	2	0	2
Hap_30	0	0	0	1	0	1
Hap_31	0	0	0	1	0	1
Hap_32	0	0	0	0	1	1
Hap_33	0	0	0	0	1	1
Hap_34	0	0	0	0	1	1
Hap_35	0	0	0	0	1	1
Hap_36	0	0	0	0	1	1
Hap_37	0	0	0	0	1	1
Hap_38	0	0	0	0	1	1
Hap_39	0	0	0	0	1	1
Hap_40	0	0	0	0	1	1
Hap_41	0	0	0	0	1	1
<i>n</i>	20	16	17	11	20	84

注: XM-福建厦门, ZJ-广东湛江, GX-广西钦州, HN-海南东寨港, CN-浙江苍南.

Note: XM-Xiamen, Fujian; ZJ-Zhanjiang, Guangdong; GX-Qinzhou, Guangxi; HN-Dongzhaigang, Hainan; CN-Cangnan, Zhejiang.

厦门群体(XM)和苍南群体(CN)具有单倍型数最多, 均为 12 个, HN 群体单倍型数最少(6 个)。

2.2 群体遗传多样性

各群体多态位点数(N_s)表现出较明显差异, 显示从 10 到 85 的跨度。湛江群体(ZJ)和广西群体(GX)多态位点数最少(10 个), 而苍南群体(CN)显示出最多的多态位点数, 其次是海南群体(HN)。总体看来, 苍南群体(CN)单倍型多样性(h)和多态位点数(N_s)均为群体较高水平。各群体的单倍型多样性为 0.625~0.889, 差异不明显, 核苷酸多样性为 0.002 0~0.057 2, 差异明显。平均单倍型多样性和核苷酸多样性分别为 0.835 ± 0.039 、 $0.057\ 2\pm0.006\ 0$, 总体看来, 具有高水平核苷酸多样性和单倍型多样性。各群体核苷酸差异数(K)也存在明显差异, XM、ZJ、GX 群体 K 值较低, 仅大于 1, 而 HN 和 CN 群体 K 值较高, 大于 30, 整个群体 K 值也属于较高水平, 为 33.820 7 (表 2)。

2.3 群体遗传分化与网络图分析

5 个群体平疣桑椹石磺 AMOVA 分析结果显示, 65.98% 的变异发生在群体间, 34.02% 的变异发生在群体内, 群体间变异远大于群体内变异, 群体间的遗传分化指数 F_{st} 为 0.659 8 ($P<0.01$), 说明群体间已产生明显的遗传分化(表 3)。进一步的分化指数 F_{st} 和基因流显示, ZJ、XM 和 GX 群体之间分化不明显, F_{st} 均小于零, 基因流较大, $N_{em}>40$ (表 4), 而其他群体间均存在显著的遗传分化, 特别是 HN 群体、CN 群体与其他群体间产生了高度的遗传分化 $F_{st}>0.25$, N_{em} 为 0.051 3~0.138 6,

基因交流非常小。CN 群体与 HN 群体发生了中等程度的遗传分化, F_{st} 为 0.149 5, N_{em} 为 1.422 2。

5 个群体平疣桑椹石磺线粒体 *COI* 基因水平的 Kimura 遗传距离见表 5。由表 5 显示, 5 个群体平疣桑椹石磺之间的遗传距离为 0.002 0~0.133 3, 其中 HN 群体与其余 4 个群体间表现出较大的遗传距离, 其次, CN 群体与其他群体间也显示出较大的遗传距离。ZJ、XM 和 GX 群体间遗传距离较小, ZJ 群体与 GX 群体的遗传距离最小。由此, 说明 HN 群体与其他群体亲缘关系相对较远, CN 群体与其他群体也存在较远的亲缘关系。

经检测 HKY+G 为 ML 系统树的最佳核苷酸替代模型, ML 系统树显示群体所有单倍型分别聚类为 3 个枝系, 其中, Hap27、Hap29 和 Hap31 以极高的支持度聚在一起(图 1)。*COI* 基因单倍型网络图同样显示, 各个单倍型进化枝差异较大, 存在明显的支系结构, 分别以 Hap1 和 Hap28 为中心, 其中, 以 Hap1 为中心有 25 个单倍型从它辐射开来, 呈现星状分布, Hap1 可能是一种较为原始的单倍型。Hap28 是苍南群体(CN)和海南东寨港群体(HN)的共有单倍型, HN 群体除与 CN 群体存在共有单倍型外, 与其他群体差异较远, 无共有单倍型发现, HN 群体共发现 6 个单倍型, 其中 2 个单倍型明显从与 CN 群体共有的 Hap28 衍化而来(图 2)。对所有群体进行地理距离和遗传距离的 Mantel 测试, 发现平疣桑椹石磺群体的遗传距离与地理距离之间不存在明显的线性关系($r=-0.100\ 0$, $P=0.472\ 0$)(图 3)。

表 2 不同群体平疣桑椹石磺的遗传多样性参数
Tab. 2 Neutrality measures and parameters of genetic diversity from *P. mortoni*

群体 population	样本数量 sample size	单倍型数 N_h	多态位点数 N_s	单倍型多样性 h	核苷酸多样性 π	平均核苷酸差异数 K
CN	20	12	85	0.889±0.055	0.0595±0.0111	35.1790
XM	20	12	14	0.811±0.092	0.0024±0.0005	1.4000
ZJ	16	7	10	0.625±0.139	0.0021±0.0007	1.2500
GX	17	8	10	0.669±0.129	0.0020±0.0006	1.1765
HN	11	6	58	0.855±0.085	0.0530±0.0068	31.3091
总计 total	84	41	117	0.835±0.039	0.0572±0.0060	33.8207

注: XM—福建厦门, ZJ—广东湛江, GX—广西钦州, HN—海南东寨港, CN—浙江苍南。
Note: XM—Xiamen, Fujian; ZJ—Zhanjiang, Guangdong; GX—Qinzhou, Guangxi; HN—Dongzhaigang, Hainan; CN—Cangnan, Zhejiang.

表 3 平疣桑椹石磺群体差异的 AMOVA 分析
Tab. 3 Analysis of molecular variance (AMOVA) among populations of *P. mortoni*

变异来源 source of variation	自由度 df	平方和 sum of squares	方差组分 variance components	变异百分比/% variation
群体间 among populations	4	880.727	12.8367 V_a	65.98
群体内 within populations	79	522.832	6.6181 V_b	34.02
总计 total	83	1403.560	19.4549	100

注: F_{st} =0.6598 ($P<0.01$).
Note: F_{st} =0.6598 ($P<0.01$).

表 4 平疣桑椹石磺各群体间的基因流(右上角)和遗传分化指数(左下角)
Tab. 4 The gene flow (above the diagonal) and pairwise F_{st} (below the diagonal) among *P. mortoni* populations

群体 population	CN	XM	ZJ	GX	HN
CN		0.1248	0.1386	0.1342	1.4222
XM	0.6671**		-416.9167	-357.3929	0.0513
ZJ	0.6434**	-0.0006		-42.6229	0.0583
GX	0.6527**	-0.0007	-0.0059		0.0561
HN	0.1495*	0.8298**	0.8108**	0.8168**	

注: 对角线以上为 N_{em} , $N_{em}=1/(4F_{st})-1/4$, *表示显著性水平 $P<0.05$, **表示极显著性水平 $P<0.01$.
Note: The value above the diagonal is N_{em} and $N_{em}=1/(4F_{st})-1/4$, * indicates significant differences ($P<0.05$), ** indicates extremely significant differences ($P<0.01$).

表 5 基于 Kimura 双参数模型的平疣桑椹石磺群体间遗传距离
Tab. 5 Genetic distance among populations of *P. mortoni* calculated based on Kimura 2-parameter model

群体 population	CN	XM	ZJ	GX	HN
CN					
XM	0.1039±0.0122		0.0023±0.0005		
ZJ	0.1039±0.0122				
GX	0.1039±0.0122	0.0022±0.0004	0.0020±0.0005		
HN	0.0738±0.0079	0.1333±0.0146	0.1332±0.0146	0.1331±0.0146	

注: XM-福建厦门, ZJ-广东湛江, GX-广西钦州, HN-海南东寨港, CN-浙江苍南.
Note: XM-Xiamen, Fujian; ZJ-Zhanjiang, Guangdong; GX-Qinzhou, Guangxi; HN-Dongzhaigang, Hainan; CN-Cangnan, Zhejiang.

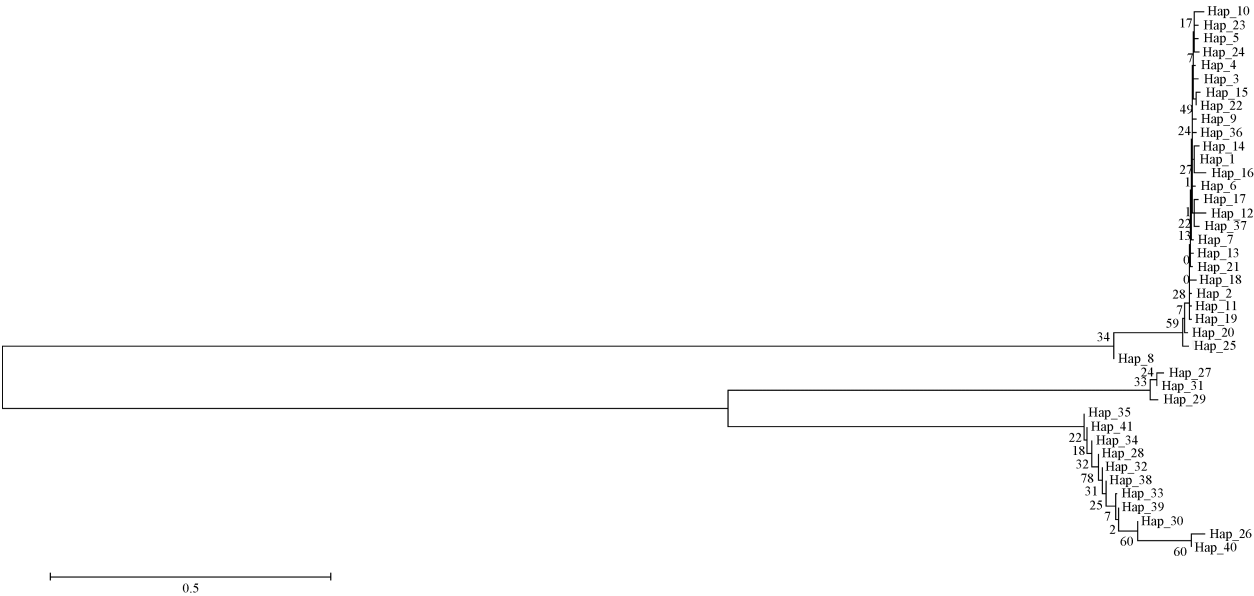


图 1 平疣桑椹石磺 *COI* 单倍型聚类图
Fig.1 *COI* haplotype cluster of *P. mortoni*

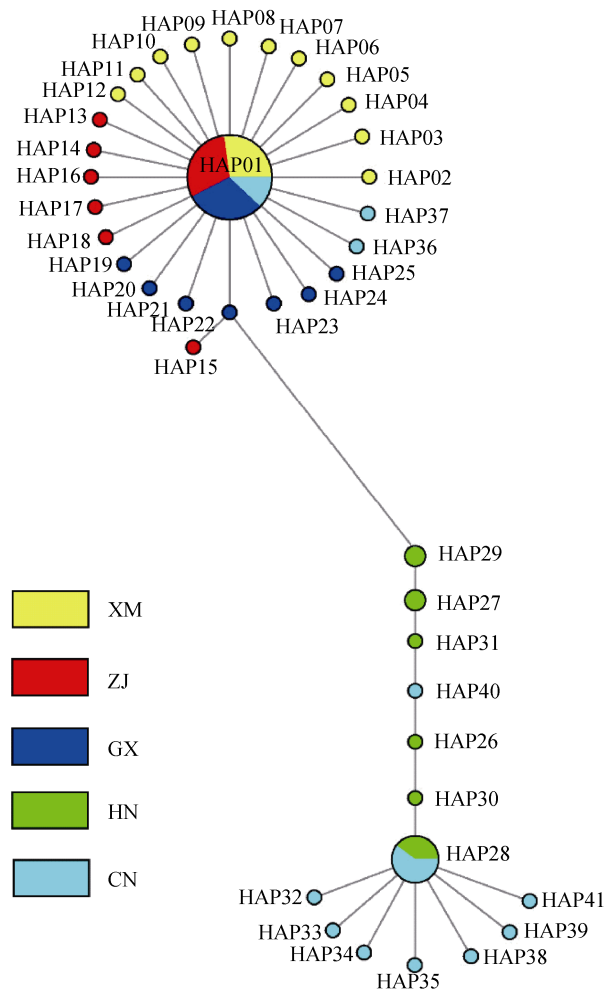


图 2 平疣桑椹石磺 *COI* 单倍型网络图

XM-福建厦门, ZJ-广东湛江, GX-广西钦州, HN-海南东寨港, CN-浙江苍南.

Fig. 2 Network of all mtDNA *COI* sequences haplotypes in *Platevindex mortoni* populations

XM-Xiamen, Fujian; ZJ-Zhanjiang, Guangdong; GX-Qinzhou, Guangxi; HN-Dongzhaigang, Hainan; CN-Cangnan, Zhejiang.

2.4 群体历史动态

中性检验的 Tajima's *D* 和 Fu's *F_s* 检测结果显示 XM、ZJ 和 GX 群体呈显著负性, 而 HN 和 CN 群体 Tajima's *D* 和 Fu's *F_s* 结果显示正值, 中性假说不能被排除(表 6)。失配分析图谱如果呈泊松状分布的单峰, 表示种群积累保存下来的变异大于遗传漂变丧失的变异, 暗示可能发生历史上的种群扩张^[21-24]。各群体失配分析显示, XM 群体呈单峰状, 我们推测 XM 群体可能经历过历史上群体扩张事件, 中性检验也支持我们的推测。而 ZJ 和 GX 群体失配分析没有呈现明显的泊松状单峰分

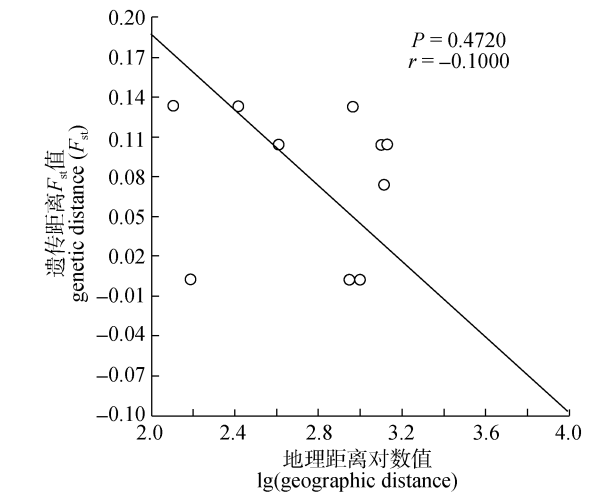


图 3 平疣桑椹石磺的遗传距离模式(IBM)分析

Fig. 3 IBD plots for *P. mortoni* populations

表 6 5 个平疣桑椹石磺地理群体间的中性检验

Tab. 6 The neutrality tests of 5 groups of *P. mortoni*

群体 population	Tajima's <i>D</i> test		Fu's <i>F_s</i> test	
	<i>D</i>	<i>P</i>	<i>F_s</i>	<i>P</i>
CN	1.9168	0.9880	4.9319	0.9690
XM	-2.3620	0.0000	-10.3916	0.0000
ZJ	-2.1826	0.0010	-3.2758	0.0120
GX	-2.2053	0.0000	-4.8125	0.0000
HN	2.7552	1.0000	7.1269	0.9970
总计 total	-0.4156	0.3978	-1.2842	0.3956

布, 结合中性检测呈显著负值, 我们推测两个群体可能经历过历史上的瓶颈效应(图 4)。我们根据公式 $t=\tau/2^{[21]}$ 来估算 XM 群体最近一次群体扩张时间 *T*, 其中 *t* 是表示从种群扩张至今经历了多少代, $T=t\times$ 世代时间。经调查显示, 平疣桑椹石磺的世代时间约为 1 年, 所以这里世代时间=1 年; τ 是错配分布的模型, 各群体 τ 值由 AMOVA 分析得出, XM 的 τ 值为 1.429 7, *COI* 基因的进化速率 μ 设为 1%每百万年^[25]。据此, 我们推断 XM 群体的扩张时间约为 0.12 Ma BP。

3 讨论

3.1 群体遗传多样性与遗传结构

群体遗传多样性是指种内不同群体间或同一群体不同个体间遗传变异总和。群体之间遗传结构的存在体现了遗传多样性, 种内遗传变异的程

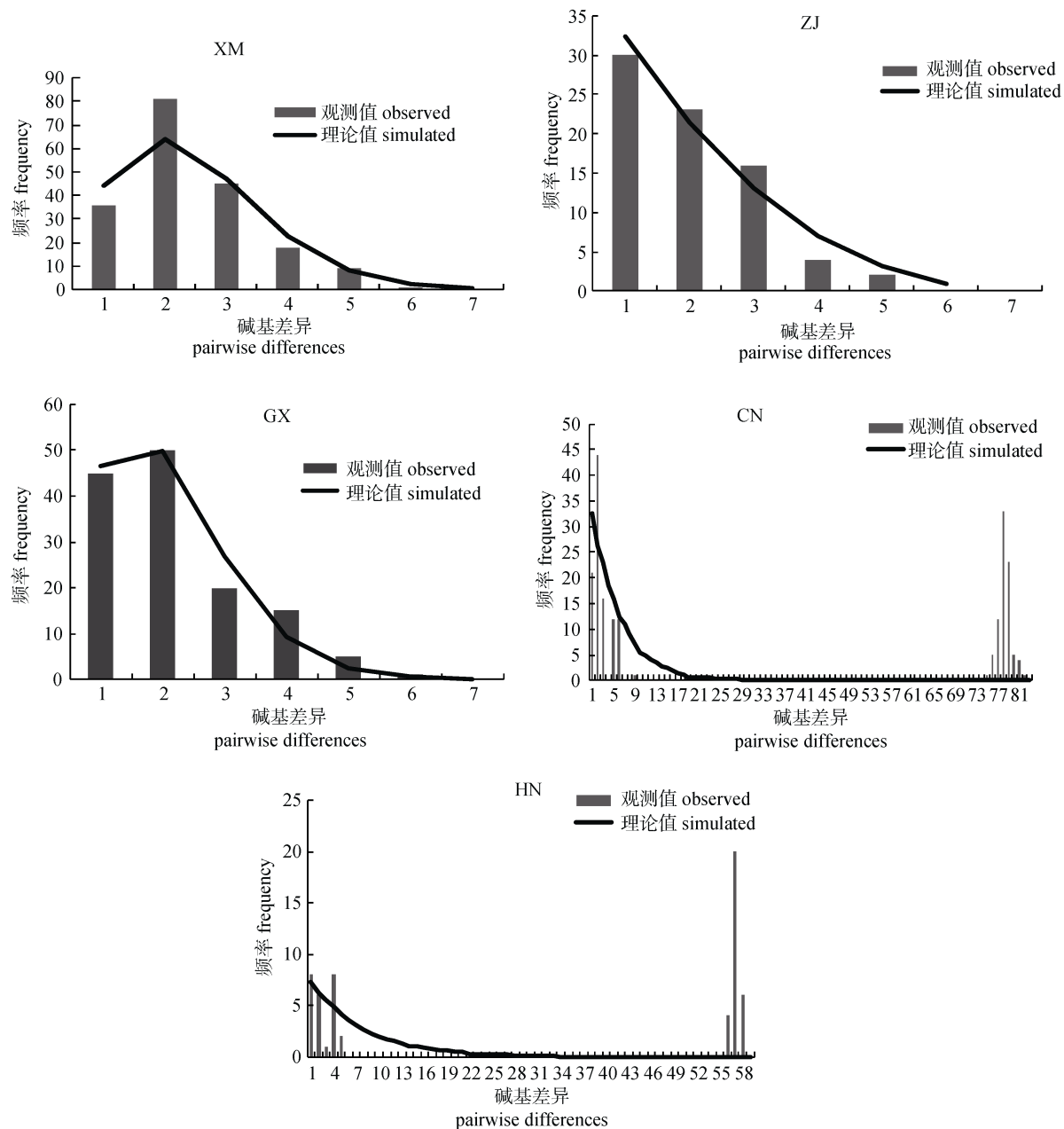


图 4 平疣桑椹石磺各群体的失配分析
Fig. 4 Mismatch distribution of *P. mortoni* populations

度和群体遗传变异的分布式样决定着物种对逆境的抵抗和适应能力以及物种进化潜力^[26]。物种的遗传多样性越丰富, 对环境的抵抗和适应能力越强, 反之, 易受环境的影响^[27]。平疣桑椹石磺多样性指数 h 值范围为 0.625~0.889, 平均 h 值为 0.835 ± 0.039 ; π 值范围为 0.002 0~0.057 2, 平均 π 值为 $0.057\ 2\pm0.006\ 0$, 这与里氏拟石磺多样性指数相比, h 值基本相近(0.974 ± 0.005), π 值略大($0.032\ 2\pm$

$0.001\ 3$)^[13]。Grant 等^[28]曾将单倍型多样性和核苷酸多样性之间的关系分为 4 种类型, 根据其理论标准, 总体看来, 平疣桑椹石磺属于高的单倍型多样性和核苷酸多样性($h>0.5$, $\pi>0.005$), 平疣桑椹石磺整个群体中性检测及动态检验显示, 物种群体大小稳定, 故我们推测, 大而稳定的群体经过长时间的演化导致了平疣桑椹石磺的高 h 值和 π 值; 广阔的生境, 短的更新时间也有利于其保

持高的遗传变异^[29-30]。XM、ZJ 和 GX 群体具有高的 h 值($h>0.5$)和低的 π 值($\pi<0.005$), 推测这 3 个种群可能经历过历史上的瓶颈效应^[28]。

考虑到平疣桑椹石磺 HN 和 CN 群体的特殊性, 我们采用 AMOVA 对可能的群体结构进行分层分析, 主要根据 CN 群体和 HN 群体进行种群的划分, 当 CN 和 HN 单独划为一个组群时, 组群间变异是 75.09%; 当 HN 单独划为一个组群时, 组群间变异是 41.41%; 当 CN 和 HN 划为一个组群时, 组群间变异是 73.15%。因此, *COI* 基因支持 HN 和 CN 群体各自单独划为一个组群, 具有最优的 F_{CT} 值, 鉴于 *COI* 基因对群体结构检测的灵敏性以及 HN 群体与 CN 群体 F_{st} 值大于 0.05 的显著性, 及 CN 群体与大陆沿海其他群体 F_{st} 的显著分化, 我们采用 *COI* 基因的分析结果, 即 HN 群体为一个组群, CN 群体一个组群。无论 F_{st} , 遗传距离还是 AMOVA 分析均显示 GX 群体跟大陆沿海其他群体一个组群的事实。Sun^[14]等基于线粒体基因(16S rDNA 和 *COI*)和核基因(28S rRNA)对中国大陆石磺科种类多样性做了分析, 并指出 *Platevindex mortoni*, *Platevindex* sp. 和 *Onchidium* 'struma' 是一个组群, 而 *Paraoncidium reevesii*, *Onchidella* sp. 和 *Peronia verruculata* 为另一个组群。

3.2 种群遗传分化与历史动态

种群间遗传分化指数和遗传距离是反映种群多态性程度的重要指标, 两者的值越大, 意味着多态程度越高^[31]。Freeland^[32]指出, F_{st} 为 0~0.05 时, 群体间存在低度遗传分化; 在 0.05~0.15 时, 中度遗传分化; 在 0.15~0.25 时, 遗传分化较大; $F_{st}>0.25$ 时, 表示群体间遗传分化极大。将平疣桑椹石磺作为一个整体分析时, 其 F_{st} 为 0.659 8 ($P<0.01$), 暗示平疣桑椹石磺群体间已产生了显著的分化。一般认为, 当 $N_{em}>5$ 时, 群体间可维持一个均一基因库^[33]。分析结果显示, CN 与 HN 群体间存在中度遗传分化, 其 F_{st} 为 0.149 5 ($P<0.05$), N_{em} 为 1.422 2, 而 CN、HN 群体分别与其余群体间的 F_{st} 值显著大于 0.25, N_{em} 均小于 0.5, 显示了存在极大的遗传分化。对于 XM、ZJ 和 GX 群体, 相互间的 F_{st} 值均小于 0, N_{em} 显著大于 5, 表明群

体间分化极低。Kartavtsev 等^[34]提出 *COI* 基因遗传距离在同种群间为 $(0.55\pm0.19)\%$, 而在有生殖隔离的近似种间为 $(4.91\pm0.83)\%$ 。基于 Kartavtsev 等^[34]的标准, HN、CN 群体分别与其他群体甚至出现了近似种的分化水平。此外, HN 和 CN 群体平均核苷酸差异数均大于 30, 说明群体内存在遗传距离在 5% 以上的谱系, 达到了 Hebert 应用 Barcoding 对物种鉴定提出的 2% 的阈值, 推测 HN 和 CN 群体均形成了显著的群体内分化。根据采集样品地的地貌特征及特殊环境, 推测 HN 群体内分化可能是由于东寨港湿地沼泽化, 形成分割破碎的红树林沼泽滩面, 石磺因此被分隔开而逐渐形成 HN 群体间的分化, 甚至有可能存在隐存种或亚种。而 CN 群体生长在坡地沟壑纵横的侵蚀低山范围, 因此推测其与 HN 群体相似, 同样产生了群体间的显著分化。

进一步的单倍型网络图和单倍型谱系进化树分析均显示平疣桑椹石磺有明显的支系结构存在, 其中, HN 群体是与其他群体显著分离开, F_{st} 值、遗传距离和基因流也同样支持 HN 群体与其他群体的差异性, CN 群体也显示出与其他群体的差异, 值得我们关注的是, 位于海南的东寨港群体和位于浙江的苍南群体, 虽然两地距离较远, 但拥有共有的单倍型, HN 群体除与 CN 群体有共有单倍型外, 与其他群体均没有单倍型出现, 甚至在 *COI* 标记的单倍型网络图中显示, HN 的 2 个单倍型明显从它们共有的单倍型衍化而来, 然而另一个值得关注的是, 海南群体存在另外的单倍型显著的独立出来, 因此, 我们推测, HN 群体存在两套遗传基因谱系, 其中, 一套为 HN 群体所特有, 且在较长的历史进化中, 与大陆群体形成了较大的差异, 另一套与 CN 群体有较近的亲缘关系, 两个单倍型进化树显示有些 HN 群体的单倍型和 CN 群体单倍型也聚集在一枝, 也支持了我们的推断。以上分析同样支持了具有短期浮游幼虫时期的海洋生物也可能存在群体遗传差异。大量研究表明, 地理历史事件对现存海洋生物种群结构产生了重大影响, 特别是更新世以来, 全球气候及海洋环境变化是现今许多海洋物种遗传差异产生的原

因^[35-36]。更新世冰期, 中国海平面下降了 120~140 m, 中国的黄海、渤海以及 1/2 东海成为了陆地, 而在间冰期, 冰川消融又造成了海平面的回升^[37]。基于 Grant 等^[28]提出的单倍型多样性和核苷酸多样性的关系, XM、ZJ 和 GX 群体属于高 h 值($h>0.5$)和低 π 值($\pi<0.005$), 推测 3 个种群可能经历过历史上的瓶颈效应^[28], 且种群动态分析也显示 XM 群体经历过历史上的群体扩张事件。综上分析可见, XM 群体可能经历过瓶颈效应后发生了群体扩张, 经计算, 扩张时间约距今 1 200 000 a, 与更新世时期(2 588 000 a~11 700 a)相符, 我们推测 XM 种群可能随着更新世时期气候和冰期的变化发生过种群扩张, ZJ 和 GX 群体同样受到了影响发生过瓶颈效应, 但未检测到扩张事件的发生。与里氏拟石磺相比 ZJ、CN、HN 平疣桑椹石磺群体检测到群体扩张事件发生^[13], 我们推测, 可能与两种石磺的生存环境适应能力有关。里氏拟石磺仅能在滩涂湿润环境生活, 而平疣桑椹石磺除生活在滩涂环境之外, 还能在红树林及岩石环境生存, 其生存适应能力远远大于里氏拟石磺。

参考文献:

- [1] Bouchet P, Rocroi J P. Classification and nomenclator of gastropod families[J]. *Malacologia*, 2005, 47: 1-97.
- [2] Palumbi S R. Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation[J]. *Annu Rev Ecol Syst*, 1994, 25: 547-572.
- [3] Ni L H, Li Q, Kong L F. Microsatellites reveal fine-scale genetic structure of the Chinese surf clam *Mactra chinensis* (Mollusca, Bivalvia, Mactridae) in Northern China[J]. *Mar Ecol*, 2011, 32(4): 488-497.
- [4] Zhan A B, Hu J J, Hu X L, et al. Fine-scale population genetic structure of Zhikong scallop (*Chlamys farreri*): do local marine currents drive geographical differentiation?[J]. *Mar Biotechnol*, 2009, 11(2): 223-235.
- [5] Todd C D, Lambert W J, Thorpe J P. The genetic structure of intertidal populations of two species of nudibranch molluscs with planktotrophic and pelagic lecithotrophic larval stages: are pelagic larvae "for" dispersal?[J]. *J Experim Mar Biol Ecol*, 1998, 228(1): 1-28.
- [6] Luttkhuizen P C, Drent J, Baker A J. Disjunct distribution of highly diverged mitochondrial lineage clade and population subdivision in a marine bivalve with pelagic larval dispersal[J]. *Molec Ecol*, 2003, 12(8): 2215-2229.
- [7] Ridgway G. Interpopulation variation in blue mussels, *Mytilus edulis* L., over short distances[J]. *Sarsia*, 2001, 86(2): 157-161.
- [8] Johannesson K. The paradox of Rockall: why is a brooding gastropod (*Littorina saxatilis*) more widespread than one having a planktonic larval dispersal stage (*L. littorea*)[J]. *Mar Biol*, 1988, 99(4): 507-513.
- [9] Johannesson K, Warmoes T. Rapid colonization of Belgian breakwaters by the direct developer, *Littorina saxatilis* (Olivi)(Prosobranchia, Mollusca)[J]. *Hydrobiologia*, 1990, 56: 99-108.
- [10] Johnson M S, Black R. Pattern beneath the chaos: the effect of recruitment on genetic patchiness in an intertidal limpet[J]. *Evolution*, 1984, 38(6): 1371-1383.
- [11] Johannesson K. Genetic variability and large scale differentiation in two species of littorinid gastropods with planktotrophic development, *Littorina littorea* (L.) and *Melarhaphe* (*Littorina*) *neritoides* (L.)(Prosobranchia: Littorinacea), with notes on a mass occurrence of *M. neritoides* in Sweden[J]. *Biol J Linnean Soc*, 1992, 47(3): 285-299.
- [12] Hedgecock D. Is gene flow from pelagic larval dispersal important in the adaptation and evolution of marine invertebrates[J]. *Bull Mar Sci*, 1986, 39(2): 550-564.
- [13] Zhou N, Shen H D, Chen C. Genetic structure and variation of *Paraoncidium reevesii* from the coastal area of China and Phuket Island of Thailand based on mtCOI[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(1): 33-40.[周娜, 沈和定, 陈诚. 基于线粒体 COI 基因的中国沿海和泰国普吉岛里氏拟石磺群体遗传结构分析[J]. *水产学报*, 2014, 38(1): 33-40.]
- [14] Sun B N, Chen C, Shen H D, et al. Species diversity of Onchidiidae (Eupulmonata: Heterobranchia) on the mainland of China based on molecular data[J]. *Molluscan Res*, 2014, 34(1): 62-70.
- [15] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [16] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Mol Biol Evol*, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [17] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1451-1452.
- [18] Chen Z. Study of genetic diversity in pen shell (*Atrina pectinata*) and ark shell (*Scapharca broughtonii*)[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011.[陈桢. 栉江珧、魁蚶不同

- 群体的遗传多样性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.]
- [19] Excoffier L, Lischer H E L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows[J]. *Mol Ecol Res*, 2010, 10(3): 564–567.
- [20] Jensen J L, Bohonak A J, Kelley S T. Isolation by distance, web service[J]. *BMC Gen*, 2005, 6(1): 13.
- [21] Rogers A R, Harpending H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences[J]. *Mol Biol Evol*, 1992, 9(3): 552–569.
- [22] Aboim M A, Menezes G M, Paulay G, et al. Genetic structure and history of populations of the deep-sea fish *Helicolenus dactylopterus* (Delaroche, 1809) inferred from mtDNA sequence analysis[J]. *Mol Ecol*, 2005, 14(5): 1343–1354.
- [23] Barbosa A M. New measures for assessing model equilibrium and prediction mismatch in species distribution models[J]. *Divers Distrib*, 2013, 19(10): 1333–1338.
- [24] Wilson W H, Gilg I C, Duarte A, et al. Development of DNA mismatch repair gene, MutS, as a diagnostic marker for detection and phylogenetic analysis of algal megaviruses[J]. *Virology*, 2014, 466–467: 123–128.
- [25] Meyer C P, Geller J B, Paulay G. Fine scale endemism on coral reefs: archipelagic differentiation in turbinid gastropods[J]. *Evolution*, 2005, 59(1): 113–125.
- [26] Jiang Y Q. Status quo of the study on the genetic diversity of shrimps[J]. *Oceanogr Res*, 2009, 27(1): 83–89.
- [27] Huenneke L F. Ecological implications of genetic variation in plant populations[M]//Falk D A, Holsinger K E, Eds. *Genetics and Conservation of Rare Plants*. New York: Oxford University Press, 1991: 31–44.
- [28] Grant W S, Bowen B W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation[J]. *J Hered*, 1998, 89(5): 415–426.
- [29] Biodiversity Committee of the Chinese Academy of Sciences. The principle and methods of biodiversity research[M]. Beijing: China Science and Technology Press, 1994: 141–165.[中国科学院生物多样性委员会. 生物多样性原理与方法[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994: 141–165.]
- [30] Frankham R. Relationship of genetic variation to population size in wildlife[J]. *Conserv Biol*, 1996, 10(6): 1500–1508.
- [31] Chen D Q, Zhang C L, Lu C, et al. Polymorphism of D-loop sequence from mitochondrial genomes of different broodstocks of *Gymnocypris przewalskii* (Kessler)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(5): 800–806. [陈大庆, 张春霖, 鲁成, 等. 青海湖裸鲤繁殖群体线粒体基因组 D-loop 区序列多态性[J]. 中国水产科学, 2006, 13(5): 800–806.]
- [32] Freeland J R. *Molecular Ecology*[M]. Chichester: John Wiley & Sons, 2005: 112–116.
- [33] Slatkin M. Gene flow and the geographic structure of natural populations[J]. *Science*, 1987, 236(4803): 787–792.
- [34] Kartavtsev Y P, Lee J S. Analysis of nucleotide diversity at the cytochrome *b* and cytochrome oxidase 1 genes at the population, species, and genus levels[J]. *Russ J Genet*, 2006, 42(4): 341–362.
- [35] Hearty P J, Hollin J T, Neumann A C, et al. Global sea-level fluctuations during the Last Interglaciation (MIS 5e)[J]. *Quat Sci Rev*, 2007, 26(17–18): 2090–2112.
- [36] Liu J X, Gao T X, Yokogawa K, et al. Differential population structuring and demographic history of two closely related fish species, Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) and spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*) in Northwestern Pacific[J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2006, 39(3): 799–811.
- [37] Lv Z M, Xu Y T, Wu C W, et al. Genetic variation in different populations of *Ilisha elongata* in China coastal water based on 16S rRNA gene analysis[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(3): 463–470. [吕振明, 许逸天, 吴常文, 等. 中国沿海鳓不同地理群体 16S rRNA 基因的遗传变异分析[J]. 中国水产科学, 2010, 17(3): 463–470.]

Genetic diversity and differentiation of *Platevindex mortonii* from the coastal area of China based on mitochondrial *CO I* gene

YAO Lixiang, ZHOU Na, SHEN Heding, Liu Chen

College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: The genetic diversity and genetic differentiation of *Platevindex mortonii* were investigated using mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (*CO I*) gene sequences. Groups of nucleotides T, C, A, G contents to an average of 39.54%, 17.56%, 23.07%, 19.83%, showing A + T (62.61%) content is significantly higher than G + C content (37.39%); mitochondrial genome showed obvious anti G migration characteristics. A total of 84 individuals representing 5 collection sites were included in the analysis. Overall, 41 haplotypes were defined and 117 polymorphic sites were observed. In addition to Hap1 and Hap28 which shared haplotype and 39 haplotypes for each group specific haplotypes, Hap1 is the most widely distributed haplotype, except HN group, distributed in all groups, accounting for 39.3% of all haplotypes. Xiamen group (XM) and Cangan population (CN) has the most number of haplotypes, which were 12, and HN group haplotypes at least (6), and 117 polymorphic loci, including 23 single variable sites and 94 parsimony informative sites. Each group of polymorphic loci (N_s) show obvious differences, displayed the span from 10 to 85. The Groups of Zhanjiang (ZJ) and Guangxi (GX) polymorphic loci at least (10), and the Cangan group (CN) showed the most polymorphism loci in number, followed by the Hainan group (HN). Overall, Cangan population (CN) haplotype diversity (H) and the number of polymorphic loci (N_s) are the group of high level. Each group of haplotype diversity was 0.625~0.889, and the difference was not obvious; the nucleotide diversity was 0.002 0~0.057 2, showing obvious differences. The *P. mortonii* populations had both high haplotype diversity (0.835±0.039) and nucleotide diversity (0.057 2±0.006 0). The group number of nucleotide differences (K) also was obviously different, that in groups of XM, ZJ, GX, K was low, only more than 1, while in HN and CN groups, K was high value, which was greater than 30; the entire group also belonged to a higher level, 33.820 7. The AMOVA test of *P. mortonii* populations based on haplotype frequencies revealed that 34.02% of the genetic variation occurred within the populations, whereas 65.98% of the genetic variation occurred among populations. Pairwise fixation index (F_{st}), gene flow (N_m) and genetic distance analysis showing significant genetic divergence appeared in *P. mortonii* populations. HN group and the other four groups showed some genetic distance, and CN group and other groups also showed a large genetic distance. Among small inter groups of ZJ, XM and GX, the genetic distance between ZJ group and GX group had the minimum genetic distance. No obvious genetic differentiations occurred among populations of XM, ZJ and GX ($N_{em}>5$). While the other group had significant genetic differentiation, especially in HN group, CN group and other groups generated a high level of genetic differentiation of $F_{st}>0.25$, N_{em} 0.051 3~0.138 6; gene exchange was very small. The occurrence of a moderate genetic differentiation in CN group and HN group were $F_{st}=0.149 5$ and $N_{em}=1.422 2$. Whereas, the significant genetic divergence was found among HN, CN and the other populations, respectively. Haplotype network and phylogenetic tree analyses also indicated genetic divergence occurred among populations. IBD analysis showed no significant correlation between genetic distance and geographical distance. Neutrality test and demographic analyses indicated bottleneck effect might occur in populations ZJ and GX, population expansion in XM population. The time of expansion of XM population could be 0.12 Ma BP. The phenomenon might occur in Pleistocene period with changes of climate warming and rising of sea level. In this study, based on the analysis of flat wart mulberry *Onchidium* MT DNA of *CO I* gene, to investigate the genetic diversity and genetic differentiation process, aiming for the species conservation of germplasm, and provides the basic data and theoretical basis of the reasonable development of resources and biological evolution.

Key words: *Platevindex mortonii*; cytochrome c oxidase subunit I (*CO I*); genetic diversity; genetic differentiation

Corresponding author: SHEN Heding. E-mail: hdsen@shou.edu.cn