

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2015.140397

大竹蛏 5 个野生群体遗传多样性的微卫星分析

张志伟, 陈爱华, 张志勇, 陆勤勤, 张朝晖, 姚国兴, 蔡永祥, 吴杨平, 曹奕, 张雨

江苏省海洋水产研究所, 江苏 南通 226007

摘要: 运用微卫星标记对大竹蛏(*Solen grandis*)辽宁丹东(DD)、河北秦皇岛(QHD)、山东日照(RZ)、江苏吕四(LS)和广西北海(BH)近海 5 个不同地理野生群体共计 150 个样品进行了遗传多样性分析。结果表明: 14 个位点多态信息含量范围为 0.696~0.853, 均呈现高度多态性, 每个位点检测到的等位基因数 8~22 个, 共检测到 199 个等位基因, 平均等位基因数为 14.2, 等位基因丰富度为 11.05, 5 个群体的期望杂合度分别为 0.769 (DD), 0.791 (QHD), 0.826 (RZ), 0.815 (LS), 0.785 (BH), 观察杂合度分别为 0.837 (DD), 0.812 (QHD), 0.875 (RZ), 0.809 (LS), 0.858 (BH), 表明各群体处于较高的遗传多样性水平。Hardy-Weinberg 平衡检验显示, 仅有 Sg16 位点在丹东群体显著偏离平衡, 其余位点在 5 个群体均正常, 表明各群体遗传较稳定, 处于平衡状态。5 个群体间的遗传距离在 0.141 2~0.340 9, DD 和 QHD 的遗传距离最小, DD 和 BH 的遗传距离最大; 基于 D_a 遗传距离构建的 UPGMA 聚类树显示, 距离相邻的 DD、QHD 渤海湾群体聚为一支, RZ、LS 黄海群体聚为另一支, 最后与南海群体 BH 聚在一起, 聚类结果与地理位置密切联系, 基于贝叶斯遗传聚类得到了相同的结果。分析群体间的 F_{st} 值可知, 两两群体间的 F_{st} 值在 0.039 1~0.094 7, 群体间产生了中等程度的遗传分化, 并且达到了极显著水平($P=0.000 1$)。由此可见, 中国沿海各地理群体野生大竹蛏种质遗传多样性较为丰富, 但不同群体间存在显著的遗传分化, 故各增殖放流海区应当加强对放流苗种及繁殖亲本的种质检测, 防止异地繁养等人为因素对大竹蛏各野生种群遗传结构造成破坏。

关键词: 大竹蛏; 微卫星; 野生群体; 遗传多样性

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2015)04-0740-09

大竹蛏(*Solen grandis*, Dunker, 1861)隶属瓣鳃纲(Lamellibranchia), 异齿亚纲(Heterodonta), 帘蛤目(Veneroida), 竹蛏科(Solenidae), 竹蛏属, 广泛分布于中国沿海各地, 常栖息在潮间带中、下区和浅海泥沙滩海底, 栖息水深 30~40 cm^[1]。大竹蛏生长速度较快, 个体较大, 肉嫩味鲜, 出肉率高, 贝肉蛋白质含量高达 82.7%^[2], 必需氨基酸种类齐全, 营养价值高, 是优质的蛋白源, 此外大竹蛏还具有医疗药用价值。近年来, 随着大竹蛏人工繁殖技术的突破^[3], 苗种供应已基本解决, 中国沿海多个省份每年都进行大竹蛏苗种增

殖放流活动。科研人员开展了不同环境因子对其苗种生长、存活影响的试验^[4], 确定了大竹蛏稚贝存活及生长的温度、盐度适宜范围及最适范围^[5], 分析了饵料种类及投喂方式对大竹蛏幼虫生长、存活及变态的影响^[6], 研究了大竹蛏稚贝的滤水率^[7]。大竹蛏繁殖生物学及养殖生态学的研究, 为海水养殖新对象的开发利用奠定了基础。

有关大竹蛏种质遗传多样性的研究鲜有报道, 仅见同工酶^[8]和 AFLP 的方法^[9]。由于同工酶为生化遗传标记, 检测到的遗传变异水平较低; AFLP 虽然能够检测到较高的遗传变异, 但由于其显性

收稿日期: 2014-09-25; 修订日期: 2014-11-13.

基金项目: 江苏省自然科学基金(BK2012235); 江苏省“六大人才高峰”(2013-NY-013); 浙江省近岸水域生物资源开发与保护重点实验室开放课题(J2013008).

作者简介: 张志伟(1977-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向为水产动物遗传育种与生物技术. E-mail: zhzhwei2005@126.com

通信作者: 张志勇, 研究员. E-mail: 13906292412@139.com

标记的特点, 无法判别单个个体为纯合子或杂合子。所以, 现有的结果不足以为该物种的保护利用提供充足的理论依据, 在大竹蛏各海区自然种群尚未受到外界干扰的情况下, 摸清不同海区本底遗传多样性状况尤为重要。通过对各不同海区野生大竹蛏样品的采集与保存, 进一步查清我国沿海大竹蛏遗传多样性状况, 描绘各种群的遗传特征, 可以有效避免种质混杂。微卫星为共显性标记, 能够区分个体在不同位点的纯合性或杂合性, 同时具有多态性高、突变快、引物通用性强、便于检测等优点, 被广泛应用于种群遗传、亲子鉴定、疾病诊断与遗传育种等多个领域。本研究采用微卫星标记技术, 对中国沿海辽宁、河北、山东、江苏、广西 5 个不同省份的野生大竹蛏进行遗传变异分析, 揭示该物种本底遗传多样性水平, 探究各地理群体遗传特征, 为合理保护和有效利用大竹蛏自然种质资源提供科学依据和理论指导。

1 材料和方法

1.1 样品来源

试验用样品均为自然海区(图1)野生大竹蛏成体, 挑取鲜活样品各30粒剪取腹足放入95%的酒精中固定备用, 采样时间、地点等具体信息见表1。

1.2 基因组 DNA 提取

取 95%酒精固定的腹足约 0.1 g, 用滤纸吸干、剪刀剪碎后放入 1.5 mL 的离心管, 加入 450 μ L STE (150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl,

1 mmol/L EDTA)缓冲液, 25 μ L 的 10% SDS, 10 μ L 蛋白酶 K (20 mg/mL)混匀, 55 $^{\circ}$ C消化过夜, 用苯酚、氯仿及酚/氯仿各抽提一次, 等体积的异丙醇沉淀, 12 000 r/min 离心 30 min, 沉淀用 70%的乙醇洗 2 次, 再用 50 μ L 双蒸水溶解, 在 0.8%的琼

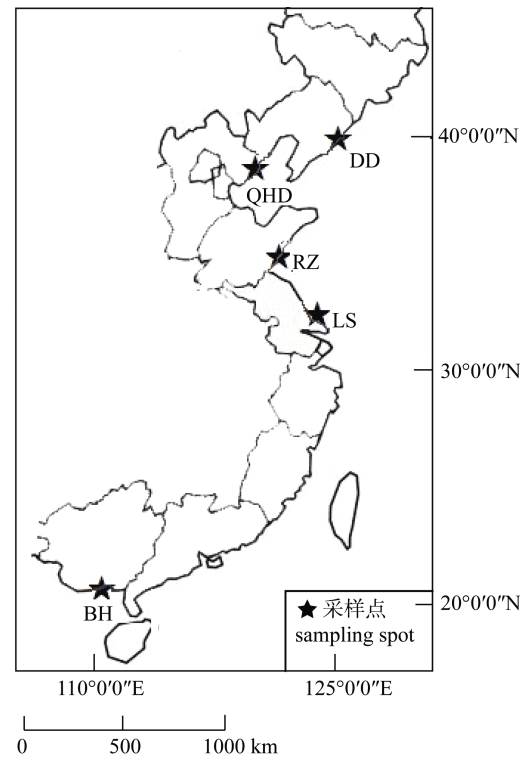


图 1 大竹蛏采样点分布示意图
BH: 北海群体; DD: 丹东群体; LS: 吕四群体; QHD: 秦皇岛群体; RZ: 日照群体。
Fig. 1 Map of sampling site of *Solen grandis*
BH: Beihai population; DD: Dandong population; LS: Lyusi population; QHD: Qinhuangdao population; RZ: Rizhao population.

表 1 样品采集时间、地点、数量
Tab. 1 Site, date, and the amount of the samples in this study

群体 population	采集地点 sampling site	经纬度 latitude and longitude	采集时间 sampling date	样本数量 number
北海群体(BH) Beihai population	广西省北海铁山 Tieshan Harbor, Beihai, Guangxi	21 $^{\circ}$ 27'N 109 $^{\circ}$ 26'E	2012-01-30	200
吕四群体(LS) Lyusi populaton	江苏南通吕四港 Lyusi Harbor, Nantong, Jiangsu	32 $^{\circ}$ 04'N 121 $^{\circ}$ 37'E	2008-07-26	100
日照群体(RZ) Rizhao population	山东日照石臼港 Shijiu Harbor, Rizhao, Shandong	35 $^{\circ}$ 22'N 119 $^{\circ}$ 33'E	2012-10-18	150
秦皇岛群体(QHD) Qinhuangdao population	河北秦皇岛市大蒲河镇 Dapuhe town, Qinhuangdao, Hebei	39 $^{\circ}$ 41'N 119 $^{\circ}$ 17'E	2012-12-10	100
丹东群体(DD) Dandong population	辽宁丹东市东港区 Donggang Harbor, Dandong, Liaoning	39 $^{\circ}$ 50'N 124 $^{\circ}$ 07'E	2012-12-15	120

脂糖凝胶上检测 DNA 的质量和浓度。

1.3 SSR 引物序列

参照文献[10]合成大竹蛭微卫星引物 14 对, 由上海生工生物工程公司合成, 引物序列及 PCR 反应条件见表 2。

1.4 PCR 反应体系及反应程序

反应总体积为 25 μ L, 包括 1 $\times$ PCR Buffer,

Mg²⁺浓度 1.5 mmol/L, 0.2 mmol/L dNTPs, 1.0 μ mol/L 引物, *Taq* 酶 1.0 U, 模板约 100 ng。反应的程序为: 首先进行 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, *T_m* 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 反应进行 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物用 ABI3730 进行毛细管电泳, 确定个体的等位基因大小。

表 2 引物名称、序列及 PCR 反应条件
Tab. 2 Microsatellite loci, primer sequences and conditions of PCR

座位 locus	引物序列 (5'-3') primer sequences (5'-3')	退火温度/ $^{\circ}$ C ann. temp	座位 locus	引物序列 (5'-3') primer sequences (5'-3')	退火温度/ $^{\circ}$ C ann. temp
<i>Sg03</i>	F: ttccagtaataaagcgacg R: gactctggtaagaaggattg	46	<i>Sg15</i>	F: aagggtagtcccagggtct R: ccgtgttttactgaggtcc	58
<i>Sg04</i>	F: tcattctacaatccacccc R: ctttattcattttctactgct	50	<i>Sg16</i>	F: ccaaggaagatacaacgca R: gccgacccagtgtatgag	58
<i>Sg05</i>	F: atcaataagacacgcgttcag R: tatcccaatatcatagcct	46	<i>Sg18</i>	F: aaatgtgaaagtgcctac R: taatgctcaactaccga	46
<i>Sg10</i>	F: acccagaccacaagaagca R: gggcgggtgaagtgaagata	65	<i>Sg22</i>	F: caggataatgtgactgggtg R: tatcagagggtatcaacaaca	50
<i>Sg11</i>	F: atgaacattccgcccaca R: ccccttcactttaatttctctg	58	<i>Sg23</i>	F: tcaacctatgttaccttttac R: cttcagttagattgggagca	50
<i>Sg13</i>	F: ctggatggtaagggttcaa R: ctgcaaatcactaagctaagac	58	<i>Sg24</i>	F: tgttcttttctttaccctc R: tatgtaaagcaatggaaaag	46
<i>Sg14</i>	F: tcgttagatgtttactttggtt R: cagtatcacgccgcagac	58	<i>Sg26</i>	F: tcctctggagtatgaacaac R: gatacggcgcagaaaa	50

1.5 数据统计与分析

用 MICROSATELLITE ANALYSER 软件(MSA, Dieringer and schlotterer, 2003)计算各微卫星位点在 5 个群体中的总等位基因数(A_T)、平均等位基因数(A_M)、等位基因丰富度(也称有效等位基因数目, Allelic richness, A_R) 及固定指数(Fixation index, F_{is})、期望杂合度(H_e)、观察杂合度(H_o)、遗传分化系数(F_{st})等指标, 用 GENEPOP V3.3 (Raymond & Rousset 1995)计算哈代温伯格平衡, 杂合度及不同位点间的连锁不平衡检验。利用 POPULATIONS 软件(<http://bio-informatics.org/~tryphon/populations/>)计算群体间的遗传距离并构建 UPGMA 系统聚类树。用 STRUCTURE 2.2 软件进行群体中各个体的遗传聚类分析, 推断各样本分属某个群体的最大概率。

2 结果与分析

2.1 14 个微卫星位点特征及在大竹蛭 5 个群体中的 Hardy-Weinberg 平衡检验

14 个微卫星位点在 5 个大竹蛭地理群体检测

到的等位基因数分别为 108、118、133、143、141 个, 以 LS 群体最多, BH 群体次之, DD 群体最少, 总群体等位基因数为 8~22 个, 共检测到 199 个等位基因, 其中位点 *Sg4* 和 *Sg23* 的微卫星测序图如图 2。各位点的多态信息含量 PIC 介于 0.696~0.853, 均表现出高度的多态性, 其中以 *Sg15* 最小 0.696, *Sg04* 最大 0.853。

14 个位点在大竹蛭群体内的遗传分化系数 F_{st} 为 0.039~0.098, 其中小于 0.05 的有 3 个, 分别为 *Sg15*、*Sg22*、*Sg24*, 表明大竹蛭群体在这 3 个位点群体分化微弱, 剩余 11 个位点的 F_{st} 为 0.05~0.10, 表明大竹蛭 5 个群体在这些位点处于中等程度的遗传分化。

利用 Hardy-Weinberg 定律对 14 个位点在大竹蛭 5 个群体中的平衡状态进行检验, 结果显示(表 3): 仅有位点 *Sg16* 在 DD 群体显著偏离了平衡, 占总群体位点数(14 个位点与 5 个群体的组合)的 1.11%, 其余群体位点组合均符合 Hardy-Weinberg 平衡。

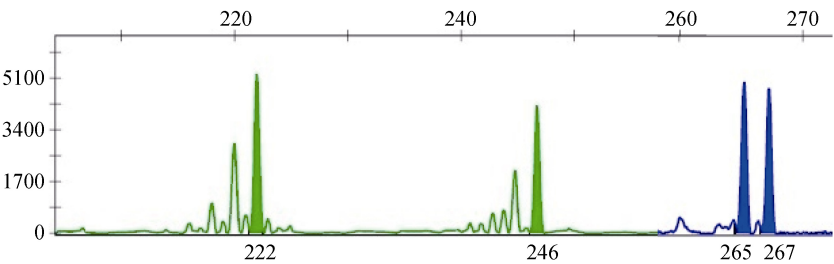


图 2 大竹蛏 *Sg23*(左)和 *Sg04*(右)基因分型结果

Fig. 2 Genotype of the microsatellite loci *Sg23* (left) and *Sg04* (right) in *Solen grandis*

表 3 14 个微卫星位点在大竹蛏 5 个野生群体扩增等位基因数、遗传分化指数、多态信息含量及 Hardy-Weinberg 平衡检验
Tab. 3 Allele number, Global F_{st} , PIC and Hardy-Weinberg equilibrium from 14 microsatellite loci among 5 wild populations of *Solen grandis*

	<i>Sg03</i>	<i>Sg04</i>	<i>Sg05</i>	<i>Sg10</i>	<i>Sg11</i>	<i>Sg13</i>	<i>Sg14</i>	<i>Sg15</i>	<i>Sg16</i>	<i>Sg18</i>	<i>Sg22</i>	<i>Sg23</i>	<i>Sg24</i>	<i>Sg26</i>
DD	7	9	7	7	9	13	6	7	5**	6	6	10	6	10
QHD	8	11	7	9	6	16	6	8	5	7	12	9	5	9
RZ	8	11	9	12	11	11	7	7	7	9	13	8	9	11
LS	9	14	10	11	11	12	7	6	8	8	14	12	10	11
BH	10	15	8	12	10	14	6	6	8	8	14	10	7	13
合计 total	11	22	13	15	16	22	8	9	10	11	16	15	12	19
Global F_{st}	0.065	0.083	0.062	0.065	0.067	0.098	0.097	0.046	0.080	0.065	0.039	0.069	0.048	0.062
PIC	0.807	0.853	0.819	0.832	0.802	0.852	0.751	0.696	0.730	0.821	0.835	0.804	0.709	0.852

注: “**”表示 $P<0.01$. BH: 北海群体, DD: 丹东群体, LS: 吕四群体, QHD: 秦皇岛群体, RZ: 日照群体.
Note: “**” means $P<0.01$. BH: Beihai population; DD: Dandong population; LS: Lyusi population; QHD: Qinhuangdao population; RZ: Rizhao population.

2.2 大竹蛏 5 个群体内遗传变异分析

5 个群体的大竹蛏样品平均等位基因数、等位基因丰富度均以 LS 群体最高, 分别为 10.2 和 10.13, 观察杂合度、期望杂合度均以 RZ 群体最高, 分别为 0.875、0.826, LS 群体期望杂合度次之为 0.815, 但其观察杂合度最低, 为 0.809。5 个群体中, 仅 LS 群体近交系数为 $0.007>0$, 其余 4 个群体的近交系数均 <0 , 其中以 BH 群体最小, 为 -0.093 , DD 群体次之, 为 -0.088 (表 4)。

2.3 5 个大竹蛏群体间遗传分化

对 5 个群体的遗传分化指数 F_{st} 进行计算(表 5), 14 个位点的遗传分化指数在 0.039 0~0.094 7, DD 与 BH 两群体间遗传分化最大为 0.094 7, LS 与 RZ 两群体间遗传分化最小为 0.039 0, 5 个群体两两间的遗传分化程度中等, 显著性检验结果($P=0.000\ 1$)显示达到了极显著水平。

根据 Nei(1972)的标准, 利用软件 POPULATIONS 计算种群间遗传距离 D_a (表 5)。结果表明, 大竹蛏 5

表 4 大竹蛏 5 个群体在 14 个微卫星位点的遗传变异情况
Tab. 4 Genetic and variation at fourteen microsatellite loci assessed for the 5 *Solen grandis* populations

群体 population	等位基因 A_M	等位基因丰富度 A_R	观察杂合度 H_O	期望杂合度 H_e	近交系数 F_{is}
DD	7.7	7.71	0.837	0.769	-0.088
QHD	8.4	8.38	0.812	0.791	-0.026
RZ	9.5	9.45	0.875	0.826	-0.059
LS	10.2	10.13	0.809	0.815	0.007
BH	10.1	10.1	0.858	0.785	-0.093

注: BH: 北海群体, DD: 丹东群体, LS: 吕四群体, QHD: 秦皇岛群体, RZ: 日照群体.
Note: BH: Beihai population; DD: Dandong population; LS: Lyusi population; QHD: Qinhuangdao population; RZ: Rizhao population.

表 5 大竹蛭 5 个群体间的遗传分化指数和遗传距离
Tab. 5 Genetic differentiation and genetic distance between 5 *Solen grandis* populations

群体	DD	QHD	RZ	LS	BH
DD		0.1412	0.2240	0.2730	0.3056
QHD	0.0391**		0.1888	0.2050	0.3209
RZ	0.0586**	0.0468**		0.1643	0.2677
LS	0.0857**	0.0568**	0.0390**		0.2851
BH	0.0947**	0.0940**	0.0792**	0.0869**	

注: 对角线以下的数字为遗传分化指数, 对角线以上的数字为遗传距离, “***”表示 $P<0.01$. BH: 北海群体; DD: 丹东群体; LS: 吕四群体; QHD: 秦皇岛群体; RZ: 日照群体.

Note: The data below diagonal mean genetic differentiation (F_{st}) and above mean genetic distance (D_a). “***”means $P<0.01$. BH: Beihai population; DD: Dandong population; LS: Lyusi population; QHD: Qinhuangdao population; RZ: Rizhao population.

个群体间的遗传距离在 0.141 2~0.320 9, 其中 DD 与 QHD 群体间的遗传距离最小, RZ 与 LS 次之, QHD 与 BH 群体间的遗传距离最大。根据遗传距离得出 5 个群体的 UPGMA 聚类树如图 3 所示, DD 和 QHD 两个群体遗传距离最近, 首先聚到一起; RZ 与 LS 群体相聚在一起; 4 个群体汇聚后最后与 BH 群体相聚。基于贝叶斯遗传聚类结果(图 4)同样显示, 当 $K=2$ 时, DD 与 QHD 群体归为一支, 其他 3 个群体为另一支; 当 $K=5$ 时, 比较发现, 除 DD 群体与 QHD 群体间存在一定的基因交流外, 其他各群体内个体间异质性很低。

3 讨论

3.1 微卫星标记的选择及其特征分析

有关大竹蛭种质遗传多样性方面的研究最早

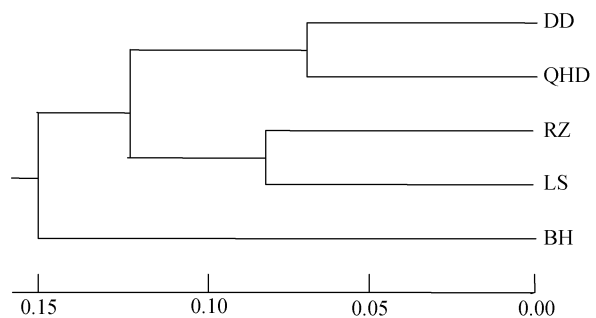


图 3 5 个大竹蛭野生群体的 UPGMA 聚类分析图
BH: 北海群体; DD: 丹东群体; LS: 吕四群体; QHD: 秦皇岛群体; RZ: 日照群体.

Fig. 3 Cluster dendrogram among 5 populations of *Solen grandis*
BH: Beihai population; DD: Dandong population; LS: Lyusi population; QHD: Qinhuangdao population; RZ: Rizhao population.

见张志伟等^[8]的报道, 采用不连续垂直聚丙烯酰胺凝胶电泳对大竹蛭 5 种组织 6 种同工酶进行组织特异性分析, 并对吕四渔场海域大竹蛭自然种群生化遗传多样性进行了初步研究。研究结果显示, 大竹蛭同工酶的活性及酶谱特征具有明显的组织特异性, 显示了较高的遗传多样性水平。然而, 由于同工酶为生化遗传标记, 所揭示的物种遗传多样性水平仅局限于蛋白质层面, 多态性相对较低。近年来, 随着现代分子生物学技术的飞速发展, 越来越多的基因组分子遗传标记显示出了强大的优越性。Yuan 等^[11]克隆测序了大竹蛭的线粒体全基因组序列, 邵艳卿等^[12]用 AFLP 技术对浙南地区分布的小萼蛭(*Siliqua minimai*)、缢蛭(*Sinonovacula constricta*)和大竹蛭 3 种蛭基因组 DNA 多态性进行了比较, 发现这 3 种蛭的核 DNA 遗传多样性水平以缢蛭最为丰富, 小萼蛭次之, 大竹蛭最低。Sun 等^[13]构建了大竹蛭全长 cDNA 文库并鉴别出防御、免疫等相关基因。乔洪金等^[14]从大竹蛭 cDNA 文库中筛选到 5 对多态性较高的微卫星引物, 但检测到的等位基因数目从 2~7 个不等, 与张滔^[15]的研究结果相一致, 明显少于本研究结果 8~22, 可能是由于 PCR 产物检测方法不同造成的。本研究采用的 14 个大竹蛭微卫星位点多态性信息含量范围为 0.696~0.853。根据 Botstein 等^[16]提出的标准, $PIC>0.5$ 属于高度多态性位点, $0.25<PIC<0.5$ 为中度多态位点, $PIC<0.25$ 为低度多态位点。本次研究的 14 个微卫星位点均为高度多态位点, 能够充分揭示大竹蛭不同群体遗传多样性水平。

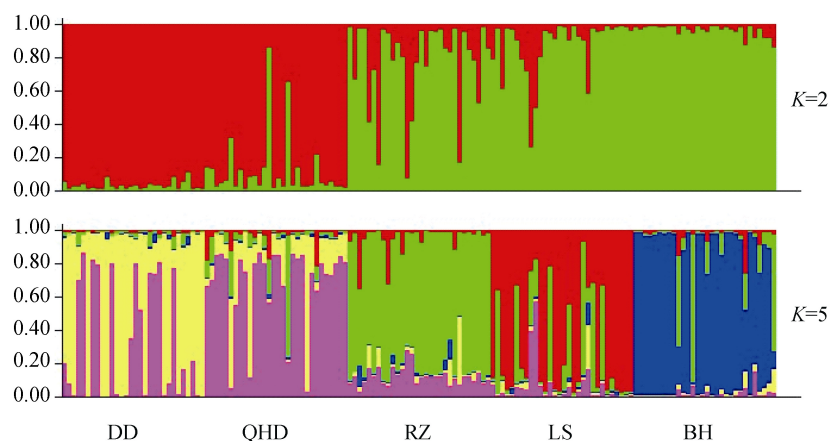


图4 5个大竹蛏群体的贝叶斯遗传聚类关系

BH: 北海群体; DD: 丹东群体; LS: 吕四群体; QHD: 秦皇岛群体; RZ: 日照群体.

Fig. 4 Bayesian clustering analysis of the 5 wild *solen grandis* populations

BH: Beihai population; DD: Dandong population; LS: Lyusi population; QHD: Qinhuangdao population; RZ: Rizhao population

3.2 大竹蛏群体内的遗传分化

本研究中仅有一个微卫星位点在单个群体中显著偏离了 Hardy-Weinberg 平衡, 占总群体位点数的 1.11%, 其余群体位点组合均符合 Hardy-Weinberg 平衡。结果表明, 大竹蛏 5 个群体均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态, 各等位基因在群体中分布频率相对稳定, 观测杂合度和期望杂合度之间没有显著差异, 说明大竹蛏 5 个自然野生群体数量足够大, 均处于随机交配状态, 同时没有受到选择、突变、迁移和遗传漂变等人为因素或外界自然环境因素影响。

F_{is} 指群体内个体之间的近交系数, 取值范围均为 $-1 \sim 1$ 。当 F_{is} 值为极显著的正值时, 则表示群体内近交程度较严重; 如是极显著的负值时, 群体内观测杂合度大于期望杂合度, 则表示群体内存在远交^[17]。本研究 5 个群体中, 仅 LS 群体近交系数 $0.007 > 0$, 表明群体杂合子缺失, 存在一定程度的近交效应, 这可能与近年来大规模增殖放流活动有关, 应当引起足够重视; 其余 4 个群体的近交系数均 < 0 , 其中以 BH 群体最小为 -0.093 , DD 群体次之为 -0.088 , 表明各群体杂合子过剩, 群体内个体间基因交流频繁, 存在一定程度的远交效应。

本研究揭示大竹蛏 5 个群体期望杂合度依次为: RZ (0.826)、LS (0.815)、QHD (0.791)、BH (0.785)、

DD (0.769), 黄海群体高于渤海和南海群体, 这与张滔等^[9]研究结果相一致, 他们利用 7 对 AFLP 引物, 对丹东、烟台、莱州、日照和南通 5 个地理群体的 141 只大竹蛏个体进行了扩增, 比较发现日照群体的多态位点比例、遗传多样性水平高于其他 4 个群体。但本研究中 5 个群体的大竹蛏样品平均等位基因数、等位基因丰富度均以 LS 群体(南黄海)最高, 分别为 10.2 和 10.13, 期望杂合度仅低于 RZ 群体(黄海), 高于 DD 群体(北黄海)、QHD 群体(渤海)和 BH 群体(南海), 笔者认为造成该结果的原因可能是由于黄海中南部独特的气候和地貌特征所引起的, 或者是两者采用了不同的分子标记方法造成的, 具体原因有待进一步深入研究。

3.3 大竹蛏群体间的遗传分化

基因分化系数是表征群体间遗传分化程度的重要参数, 当该参数在 $0 \sim 0.05$ 时, 群体间遗传分化较弱; 在 $0.05 \sim 0.15$ 时, 遗传分化中等; $0.15 \sim 0.25$ 时, 遗传分化较大; 当大于 0.25 时, 表示群体间分化极大^[18]。本研究结果表明, 14 个位点的遗传分化指数在 $0.039 \sim 0.0947$, DD 与 BH 两群体间遗传分化最大为 0.0947, LS 与 RZ 两群体间遗传分化最小为 0.0390, 5 群体两两间的遗传分化程度中等, 显著性检验结果 ($P=0.0001$) 显示达到了极显著水平。物种整体遗传多样水平较高,

但居群间出现了明显的遗传分化,类似的结果出现在长竹蛭 (*Solen strictus*)^[19] 和三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*)^[20] 等物种上,表明这些水产生物尚未受到异地移养、人工增殖放流等人为因素的影响,遗传结构处于自然稳定状态。

大竹蛭 5 个群体间的遗传距离在 0.141 2~0.320 9。聚类结果显示,DD 和 QHD 两群体遗传距离最小,首先聚到一起;RZ 与 LS 群体相聚在一起,4 群体汇聚后最后与 BH 群体相聚。结果表明,遗传距离与地理距离成正相关关系。牛东红等^[21] 运用 ISSR 标记研究缢蛭 6 个群体遗传结构时发现类似的规律,但刘博等^[22] 运用微卫星标记的方法研究缢蛭 4 个群体遗传多样性和系统发生关系时并未发现相似结果,推测可能与近年来缢蛭无序养殖有关,或是由分子标记种类不同造成的。

3.4 大竹蛭种质资源保护与开发利用

大竹蛭为兼具营养价值和药用价值的海洋经济贝类,人工繁殖技术的突破为其推广养殖提供了苗种供应的难题。目前,中国沿海各省份除了进行资源增殖放流外,同时还在探索大竹蛭的养殖技术与模式,种质资源遗传多样性的研究能够为该品种的开发提供充足的理论依据。从本研究对 5 个不同地理野生群体大竹蛭的多样性分析可知,目前大竹蛭野生资源具有较高的遗传多样性,各群体仍然处于随机交配的自然状态,没有受到人工增殖放流、异地繁养等人为因素的影响,此时对该资源加强保护显得尤为必要。为此,特提出以下保护措施:(一)建立大竹蛭自然保护区和原种场,制定科学合理的保护措施,建立有效的监控体系,对该品种进行就地保护,避免外来群体样本对本地资源的污染。(二)加强放流过程中繁殖用亲本和放流苗种的遗传多样性监测,确保放流对象为本地亲本繁殖的子一代苗种,同时采用更为有效合理的放流程序,防止人工繁殖群体对野生群体遗传结构造成破坏,确保大竹蛭野生种质资源得到有效保护和合理利用。

参考文献:

[1] International Bank for Shellfish: *Solen grandis*. The Taiwan

Malacefauna Database [2009-08-11]. [国际贝库: 大竹蛭. 台湾贝类资料库[2009-08-11].]

- [2] Dai C J. Evaluation on nutrition components of the soft part in *Solen grandis*[J]. Journal of Jimei University: Natural Science, 2002, 7(4): 304–308. [戴聪杰. 大竹蛭软体部分营养成分分析及其评价[J]. 集美大学学报: 自然科学版, 2002, 7(4): 304–308.]
- [3] Chen A H, Yao G X, Zhang Z W. Studies on artificial propagation of *Solen grandis* Dunker in pilot scale[J]. Marine Fisheries, 2009, 31(1): 66–72. [陈爱华, 姚国兴, 张志伟. 大竹蛭生产性人工繁育试验[J]. 海洋渔业, 2009, 31(1): 66–72.]
- [4] Chen A H, Zhang Z W, Yao G X, et al. The influence of different environmental factors on the growth and survival rate of juvenile of bamboo clam *Solen grandis*[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2008, 17(5): 259–263. [陈爱华, 张志伟, 姚国兴, 等. 环境因子对大竹蛭稚贝生长及存活的影响[J]. 上海水产大学学报, 2008, 17(5): 259–263.]
- [5] Chen A H, Yao G X, Zhang Z W, et al. Effects of temperature, salinity and sediment on the growth and survival of *Solen grandis* Dunker juveniles[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2010, 29(5): 94–97. [陈爱华, 姚国兴, 张志伟, 等. 温度、盐度和底质对大竹蛭稚贝生长及存活的影响[J]. 热带海洋学报, 2010, 29(5): 94–97.]
- [6] Yan X W, Zhao S X, Zhang P, et al. Effects of stocking density and alga species on larval growth, survival and metamorphosis in bamboo clam *Solen grandis*[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2010, 25(5): 386–390. [闫喜武, 赵生旭, 张澎, 等. 培育密度及饵料种类对大竹蛭幼虫生长、存活及变态的影响[J]. 大连水产学院学报, 2010, 25(5): 386–390.]
- [7] Wu Y P, Chen A H, Yao G X, et al. The filtration rate of juvenile *Solen grandis* Dunker [J]. Marine Science, 2011, 35(1): 6–9. [吴杨平, 陈爱华, 姚国兴, 等. 大竹蛭稚贝滤水率的研究[J]. 海洋科学, 2011, 35(1): 6–9.]
- [8] Zhang Z W, Yao G X, Chen A H. The tissue specificity and the genetic diversity of the allozymes of *Solen grandis* Dunker[J]. Marine Science, 2009, 33(3): 41–43. [张志伟, 姚国兴, 陈爱华. 大竹蛭同工酶组织特异性与多态性初步研究[J]. 海洋科学, 2009, 33(3): 41–43.]
- [9] Zhang T, Liu X Q, Sun Z X, et al. Genetic diversity of five geographical populations in *Solen grandis* by AFLP markers[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2013, 44(2): 525–530. [张滔, 刘相全, 孙振兴, 等. 大竹蛭(*Solen grandis*)不同地理群体遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 海洋与湖沼, 2013, 44 (2): 525–530.]
- [10] Yuan Y, Li Q, Kong L F, et al. Isolation and characterization

- of polymorphic microsatellite loci in the grand jackknife clam *Solen grandis* (Bivalvia: Veneroida)[J]. *Genes Genom*, 2010, 32(3): 191–197.
- [11] Yuan Y, Li Q, Kong L F, et al. The complete mitochondrial genome of the grand jackknife clam, *Solen grandis* (Bivalvia: Solenidae): a novel gene order and unusual non-coding region[J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(2): 1287–1292.
- [12] Shao Y Q, Lu R M, Dong Y H, et al. The genetic structure and diversity analysis of three species of razor clam using AFLP markers[J]. *Marine Science*, 2009, 33(10): 26–30. [邵艳卿, 陆荣茂, 董迎辉, 等. 三种蛏的遗传多样性分析[J]. *海洋科学*, 2009, 33(10): 26–30.]
- [13] Sun G H, Liu X Q, Ren L H, et al. Construction of a full-length cDNA Library of *Solen grandis* Dunker and Identification of Defense- and Immune-Related Genes[J]. *J Ocean Univ China*, 2014, 13(1): 169–173.
- [14] Qiao H J, Liu X D, Sun G H, et al. Isolation and characterization of microsatellite markers from cDNA library of *solen grandis*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43 (6): 1128–1133. [乔洪金, 刘相全, 孙国华, 等. 大竹蛏 (*Solen grandis*) cDNA 文库中微卫星标记的筛选[J]. *海洋与湖沼*, 2012, 43 (6): 1128–1133.]
- [15] Zhang T. Study on the genetic diversity of *solen grandis* populations[D]. Yantai: Ludong University. 2012. [张滔. 大竹蛏群体遗传多样性研究[D]. 烟台: 鲁东大学, 2012.]
- [16] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. *Am J Hum Genet*, 1980, 32(3): 314–331.
- [17] Weir B S, Cockerham C C. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure[J]. *Evolution*, 1984, 38(6): 1358–1370.
- [18] Wright S. Evolution and the genetics of population variability within and among natural population[M]. Chicago: University of Chicago Press, 1978: 4.
- [19] Li X P, Liu P, Li J, et al. Genetic diversity among five wild populations of *Portunus trituberculatus*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(6): 1327–1334. [李晓萍, 刘萍, 李健, 等. 应用 SSR 分析 5 个三疣梭子蟹野生群体的遗传多样性[J]. *中国水产科学*, 2011, 18(6): 1327–1334.]
- [20] Chen Y N, Sun Z X, Chang L R. Genetic diversity of different geographical populations in *Solen strictus* revealed by ISSR markers[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, 34(2): 270–277. [陈燕妮, 孙振兴, 常林瑞. 长竹蛏不同地理居群的遗传多样性[J]. *水生生物学报*, 2010, 34(2): 270–277.]
- [21] Niu D H, Li J L, Feng B B, et al. ISSR analysis on genetic structure of six *Sinonovacula constricta* populations[J]. *Chinese Journal of Applied Environmental Biology*, 2009, 15(3): 332–336. [牛东红, 李家乐, 冯冰冰, 等. 缢蛏 6 个群体遗传结构的 ISSR 分析[J]. *应用与环境生物学报*, 2009, 15(3): 332–336.]
- [22] Liu B, Shao Y Q, Wang K, et al. Microsatellite analysis of genetic diversity and phylogenetic relationship of four different geographical populations of *Sinonovacula constricta*[J]. *Marine Science*, 2013, 37(8): 96–102. [刘博, 邵艳卿, 王侃, 等. 4 个缢蛏群体遗传多样性和系统发生关系的微卫星分析[J]. *海洋科学*, 2013, 37(8): 96–102.]

Microsatellite analysis of genetic diversity of five wild populations of *Solen grandis* (Dunker)

ZHANG Zhiwei, CHEN Aihua, ZHANG Zhiyong, LU Qinqin, ZHANG Chaohui, YAO Guoxing, CAI Yongxiang, WU Yangping, CAO Yi, ZHANG Yu

Jiangsu Institute of Marine Fisheries, Nantong 226007, China

Abstract: The grand jackknife clam *Solen grandis* (Dunker, 1861) is a commercial marine bivalve that is found in coastal waters of China, Japan, and Korea from the shallow subtidal to depths of 20 m. It has high nutritive and medical value according to traditional Chinese medicine. In addition, it is adaptable and has high growth rates and great market potential. Currently, this clam is only available from natural sources. Over the last few decades, however, overfishing and environmental pollution have caused dramatic declines in natural stocks of *S. grandis*, and production is low and unstable. Fortunately, methods of artificial breeding and cultivation of the jackknife clam are developing. Previous studies on *S. grandis* focused primarily on morphological and ecological characteristics, allozyme analysis, and evaluation of its nutrition components. Little is known about the molecular ecology of *S. grandis* or its genetic background. Thus, it is important to evaluate genetic differences among populations along the coast of China. In this study, 14 microsatellite DNA markers were used to examine the genetic diversity and differentiation among five wild populations of the grand jackknife clam. A total of 150 samples were collected from Dandong (DD) in Liaoning Province, Qinhuangdao (QHD) in Hebei Province, Rizhao (RZ) in Shandong Province, Lyusi (LS) in Jiangsu Province, and Beihai (BH) in Guangxi Province. Comparisons of 199 alleles among the five populations showed that, in the fourteen loci, polymorphism information content (PIC) values ranged from 0.696 to 0.853 with high polymorphism. The number of alleles ranged from 8 to 22 and the average number (A_M) and richness (A_R) of alleles were 14.2 and 11.05, respectively. Expected (H_e) and observed heterozygosity (H_o) ranged 0.769–0.826 and 0.809–0.858, respectively, suggesting high levels of genetic diversity in all populations. Only the *Sg16* locus in the DD population deviated significantly from Hardy-Weinberg equilibrium, further indicating stability in the genetic diversity of all populations. The genetic distance among the five populations ranged from 0.141 2 to 0.340 9, with minimum and maximum distances between DD and QHD and between DD and BH, respectively. The UPGMA tree indicated highest similarity among geographically close populations, clustering DD with QHD and RZ with LS, the structure of which was confirmed by Bayesian cluster analysis. The F_{st} were 0.039 1–0.094 7, suggesting a moderate degree of differentiation among the five wild populations. Overall, the results suggest a high level of genetic diversity and differentiation among five grand jackknife clam populations from geographically distinct locations along the coast of China. Precaution should be taken to protect the germplasm of this species, particularly when designing stock enhancement programs.

Key words: *Solen grandis*; microsatellite; wild population; genetic diversity

Corresponding author: ZHANG Zhiyong. E-mail: 13906292412@139.com