

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15307

菲律宾蛤仔人工选育群体与野生群体的遗传多样性分析

聂鸿涛^{1,2}, 李佳¹, 霍忠明¹, 郭炜¹, 闫喜武^{1,2}

1. 大连海洋大学, 辽宁省贝类良种繁育工程技术研究中心, 辽宁 大连 116023;

2. 大连海洋大学, 农业部北方海水增养殖重点实验室, 辽宁 大连 116023

摘要: 本研究利用 10 对微卫星标记对菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)人工选育群体与野生群体进行遗传多样性分析。结果表明, 每个位点的等位基因数为 3~12 个, 期望杂合度范围为 0.307~0.757, 观测杂合度范围 0.208~0.583。等位基因丰富度 AR 的大小范围是 3.0~10.7, PCR 扩增产物片段大小在 178~390 bp, 共得到 63 个等位基因, 平均等位基因数范围从 4.4(白蛤)到 5.1(龙王塘野生群体), 野生群体等位基因丰富度最大(5.278), 白蛤群体的等位基因丰富度最小(4.267)。哈迪-温伯格检验发现 4 个群体和 10 对微卫星的 40 个组合中, 有 21 个组合显著偏离哈迪-温伯格平衡状态。Kruskal-Wallis 检验表明各个群体间的平均等位基因丰富度无显著差异。4 个群体遗传分化系数 F_{st} 在 0.086~0.180, 遗传分化最大的是白斑马蛤群体与龙王塘野生群体($F_{st}=0.180$), 遗传分化最小的是白蛤群体和海洋橙群体($F_{st}=0.086$)。人工选育群体表现为中度分化水平($F_{st}: 0.086\sim0.113$); 龙王塘野生群体与人工选育群体表现为较大分化水平($F_{st}: 0.134\sim0.180$)。结果表明, 人工选育群体的遗传多样性仍然比较高, 但连续的选育对群体的遗传多样性和遗传分化有一定程度的影响。

关键词: 菲律宾蛤仔; 微卫星; 群体遗传; 遗传多样性

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)03-0538-09

菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)隶属軟體动物门、帘蛤目、帘蛤科、蛤仔属, 我国是菲律宾蛤仔养殖大国。世界近 300 万 t 蛤仔年产量主要来自中国大陆近海的养殖, 大约占中国贝类产量的 30%, 占海水养殖总产量的 20%, 占世界菲律宾蛤仔总产量的 90%以上^[1]。近年来, 课题组先后通过定向选育和杂交获得了菲律宾蛤仔的壳色选育系和杂交系(两道红、海洋红、珍珠白、斑马蛤、黑斑马、红斑马、白斑马)^[1-3], 通过家系育种获得了高产抗逆的海洋橙^[4]。近些年来, 无论是国内还是国外对菲律宾蛤仔的研究都越来越多, 其研究主要集中在养殖生态学^[5]、增养殖技术^[6]、病理学^[7]、基因克隆^[8]及分子标记辅助育种^[9-10]等

方面。

微卫星标记具有共显性遗传特性、数量多、分布广泛而均匀、多态性丰富、杂合度高、通用性好、扩增反应所需模板量少、结果稳定、检测方便等优点^[11]。微卫星标记在遗传育种中的应用包括用于监控不同的育种方法产生的遗传变异, 调查野生和养殖种群的遗传分化, 评估和确定养殖种群的亲缘关系。因此, 微卫星标记在群体遗传学、亲缘关系鉴定、遗传多样性分析等方面应用十分广泛^[12-14]。针对菲律宾蛤仔群体遗传多样性的报道, 国外学者利用微卫星标记分析了韩国及意大利地中海菲律宾蛤仔群体的遗传多样性^[15-17]。国内 Xing 等^[18]利用 10 对微卫星标记分析了 4 个菲律

收稿日期: 2015-08-05; 修订日期: 2016-01-09.

基金项目: 国家自然科学基金(31302183); 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-48); 国家高技术研究发展计划项目(2012AA10A400);

辽宁省高等学校杰出青年学者成长计划(LJQ2014076).

作者简介: 聂鸿涛(1984-), 男, 博士, 助理研究员, 从事海洋贝类遗传育种研究. E-mail: htne@dlou.edu.cn

通信作者: 闫喜武, 教授. E-mail: yanxiwu@dlou.edu.cn

宾蛤仔野生群体和2个养殖群体的遗传多样性。Nie等^[19]利用12对微卫星标记对辽宁沿海8个菲律宾蛤仔野生群体进行了遗传结构分析。目前关于贝类人工选育群体遗传多样性的分析已有不少报道,例如,王学颖等^[20]对马氏珠母贝(*Pinctada martensi*)金黄壳色系和基础群体遗传结构进行比较,王庆志等^[21]对长牡蛎(*Crassostrea gigas*)人工选育群体进行了微卫星分析,而菲律宾蛤仔人工选育群体与野生群体的遗传多样性分析还未见报道。本研究通过微卫星标记对不同壳色蛤仔品系与野生蛤仔的遗传多样性及遗传分化状况加以分析,查明不同壳色品系蛤仔的遗传多样性水平与遗传分化程度,以期为蛤仔不同壳色品系选育工作提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料与DNA提取

本研究采用的蛤仔样品为辽宁省贝类良种繁育工程技术研究中心多年人工选育的不同壳色品

系材料,海洋橙品系是本课题组采用家系与群体选育技术,经过5代优选,培育出的壳色稳定遗传,生长、抗逆性状优良的蛤仔。取闭壳肌、足加无水乙醇固定。DNA提取采用酚/氯仿法。

1.2 PCR扩增与聚丙烯酰胺凝胶电泳

微卫星是通过菲律宾蛤仔转录组序列开发的SSR引物,序列信息见表1,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR反应体系10 μL:包括0.2 mmol/L dNTP, 1×PCR buffer, 1 μmol/L的正反引物, 0.25 U *Taq* DNA聚合酶(大连宝生物公司), 1.5 mmol/L MgCl₂和100 ng 模板DNA。PCR反应条件为94℃预变性3 min; 94℃变性1 min, 退火温度1 min, 72℃延伸1 min, 进行35个循环;最后72℃延伸5 min。扩增产物于8%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,银染显色^[19]。

1.3 数据统计与整理

遗传多样性的参数计算包括等位基因数(N_A)、等位基因丰富度(A_R)、基因多样性(G_D)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)和近交系数(F_{IS})等。其

表1 菲律宾蛤仔10个微卫星引物序列和退火温度
Tab. 1 Characteristics of the 20 polymorphic microsatellite loci from *Ruditapes philippinarum*

位点 locus	退火温度/℃ Annealing temperature	核心序列 repeat motif sequence	引物序列(5'-3') primer sequence(5'-3')
<i>RpT142</i>	60	(TA) ₅	F: CAATGGTGCTCAGAGGTAG R: CAAGAGCTGCGTAGGAT
<i>RpT178</i>	48	(AAT) ₅	F: GAATGTCGGTTCTATG R: CAAACATCTAACGCTCGT
<i>RpT190</i>	50	(AT) ₅	F: CGGTTGATAGGCTAACATGC R: TTGCTGTTGTGGTTGT
<i>RpT206</i>	60	(AT) ₅	F: TACCAACGCTCCTACAACGTGAT R: TCCCATTCACTTCCAGCA
<i>RpT214</i>	52	(TG) ₅	F: GGTAGCGTGACTCTTGGAT R: TGCCCTGTGAACGTGTTCT
<i>RpT223</i>	58	(AT) ₅	F: GTCAGGGACTTGGTCTTCT R: TCTTAGCAACGGGATAGC
<i>RpT228</i>	56	(AT) ₅	F: AGTCTCGCTTGACAGGA R: CCCAAGAAGGGAGTTATG
<i>RpT238</i>	60	(CAA) ₄	F: RCGCCTCTGTGCTTGATT R: TGCAGCTGTGCGAAATAG
<i>RpT241</i>	58	(AT) ₅	F: CAGGACTGGACCAAAGTG R: AAGGCACCATAATATGTCAG
<i>RpT242</i>	48	(TC) ₅	F: CGCCTATTGCTGGATGTT R: TGGAGGAAGACCGATTGAC

中 N_A 、 H_o 、 H_e 由 MSAnalyser 软件进行计算^[22], A_R 、 F_{IS} 通过 FSTAT 2.9.3 进行计算^[23]。然后通过 SPSS19.0 的 Kruskal-Wallis 检验来检验各群体间的 A_R 是否存在差异^[24]。哈迪-温伯格平衡检验及群体间各群体的遗传分化系数(F_{st})通过 Genepop4.0 软件^[25]进行计算。

2 结果与分析

2.1 遗传多样性

10 对微卫星引物在 4 个群体中的 PCR 扩增共得到 63 个等位基因, 等位基因数量为 3~12 个, 期望杂合度为 0.307~0.757, 观测杂合度为 0.208~0.583。等位基因丰度是 3.0~10.7, PCR 扩增产物片段大小在 178~390 bp(表 2)。其中, 野生群体的平均

等位基因数最多, 为 5.1; 等位基因丰度最大, 为 5.278。白蛤群体等位基因丰度最小, 为 4.267。Kruskal-Wallis 检验表明各个群体间的平均 A_R 差异性不显著($df=3, P=0.412$)。平均 H_e 最大的是白蛤群体(0.641), 平均 H_o 最小的是白斑马群体(0.578)。平均 H_o 最大的是海洋橙群体(0.412), 平均 H_o 最小的是龙王塘群体(0.335)。哈迪-温伯格平衡检验结果显示, 在 40 个群体-位点组合中有 21 个群体-位点组合显著偏离哈迪-温伯格平衡状态($P<0.01$), 在 4 个群体中都没有出现偏离的位点有 $RpT241$ 和 $RpT242$ 。在 4 个群体中偏离哈迪-温伯格平衡相对最少的是养殖白斑马群体, 仅在微卫星引物 $RpT142$ 、 $RpT190$ 、 $RpT206$ 中显著偏离。另外 3 个群体则都有 5 对微卫星引物显著偏离哈迪-温伯格平衡。

表 2 菲律宾蛤仔 4 个群体在 10 个微卫星位点上的多样性指数
Tab. 2 Genetic diversity indexes of four *Ruditapes philippinarum* populations

微卫星位点 locus	群体 population				合计 total
	白斑马 white zebra	白蛤 white	海洋橙 orange	龙王塘 longwangtang	
<i>RpT142</i>					
N_A	5	6	5	5	8
A_R	5.842	4.000	5.000	6.971	6.680
G_D	0.510	0.516	0.496	0.795	
S	344~380	344~390	344~380	340~370	340~390
H_e	0.529	0.506	0.545	0.579	0.540
H_o	0.270	0.184	0.167	0.417	0.259
F_{IS}	0.639	0.528	0.608	0.476	
P	0.0001*	0.0000*	0.0000*	0.0004*	
<i>RpT178</i>					
N_A	5	5	6	4	6
A_R	4.995	5.000	5.946	3.998	5.812
G_D	0.706	0.739	0.746	0.616	
S	320~360	320~360	320~370	330~370	320~370
H_e	0.735	0.704	0.741	0.609	0.697
H_o	0.486	0.526	0.378	0.108	0.375
F_{IS}	0.254	0.342	0.493	0.824	
P	0.0016*	0.0273	0.0000*	0.0000*	
<i>RpT190</i>					
N_A	4	4	4	5	6
A_R	4.000	3.842	4.000	4.946	5.978
G_D	0.724	0.525	0.754	0.771	
S	240~266	244~266	240~260	244~270	240~270
H_e	0.520	0.716	0.749	0.763	0.687

(待续 to be continued)

(续表 2 Tab.2 continued)

微卫星位点 locus	群体 population				合计 total
	白斑马 white zebra	白蛤 white	海洋橙 orange	龙王塘 longwangtang	
H_o	0.132	0.132	0.405	0.162	0.208
F_{IS}	0.818	0.749	0.462	0.790	
P	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	
<i>RpT206</i>					
N_A	4	4	3	4	4
A_R	3.995	4.000	3.000	4.000	4.000
G_D	0.518	0.757	0.463	0.665	
S	190–196	190–196	192–196	190–196	190–196
H_e	0.750	0.515	0.459	0.659	0.596
H_o	0.278	0.237	0.162	0.211	0.222
F_{IS}	0.543	0.633	0.650	0.683	
P	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	
<i>RpT214</i>					
N_A	6	6	4	10	10
A_R	5.994	5.916	4.000	9.944	8.474
G_D	0.713	0.633	0.721	0.788	
S	292–340	284–330	284–330	276–340	276–340
H_e	0.631	0.709	0.720	0.785	0.711
H_o	0.474	0.447	0.639	0.595	0.539
F_{IS}	0.372	0.251	0.114	0.245	
P	0.0346	0.0218	0.3684	0.0020*	
<i>RpT223</i>					
N_A	7	5	6	5	12
A_R	5.000	6.994	6.000	4.998	10.744
G_D	0.735	0.812	0.820	0.670	
S	320–374	336–374	320–358	380–398	320–398
H_e	0.811	0.734	0.815	0.668	0.757
H_o	0.711	0.649	0.459	0.514	0.583
F_{IS}	0.118	0.125	0.440	0.234	
P	0.1533	0.0786	0.0000*	0.0574	
<i>RpT228</i>					
N_A	4	5	6	6	6
A_R	5.000	4.000	5.999	5.998	5.795
G_D	0.773	0.749	0.786	0.734	
S	180–186	180–190	180–192	180–192	180–192
H_e	0.742	0.763	0.782	0.726	0.753
H_o	0.278	0.054	0.526	0.162	0.255
F_{IS}	0.930	0.629	0.330	0.779	
P	0.0000*	0.0000*	0.0111	0.0000*	
<i>RpT238</i>					
N_A	4	6	5	6	8
A_R	6.000	4.000	4.921	5.920	7.830

(待续 to be continued)

(续表 2 Tab.2 continued)

微卫星位点 locus	群体 population				合计 total
	白斑马 white zebra	白蛤 white	海洋橙 orange	龙王塘 longwangtang	
G_D	0.764	0.426	0.634	0.553	
S	240~282	240~290	230~270	220~290	220~290
H_e	0.427	0.759	0.635	0.553	0.594
H_o	0.459	0.459	0.763	0.605	0.572
F_{IS}	0.398	-0.077	-0.204	-0.095	
P	0.3108	0.0000*	0.7961	0.3970	
<i>RpT241</i>					
N_A	3	3	5	4	5
A_R	3.000	2.921	4.946	4.000	4.390
G_D	0.353	0.422	0.483	0.401	
S	188~198	178~196	178~198	178~196	178~196
H_e	0.424	0.354	0.481	0.402	0.415
H_o	0.579	0.421	0.378	0.421	0.450
F_{IS}	-0.194	-0.372	0.216	-0.049	
P	1.0000	1.0000	0.0335	0.5306	
<i>RpT242</i>					
N_A	2	3	2	2	3
A_R	3.000	2.000	2.000	2.000	3.000
G_D	0.653	0.211	0.216	0.147	
S	278~284	278~284	278~284	278~284	278~284
H_e	0.212	0.651	0.217	0.147	0.307
H_o	0.237	0.528	0.243	0.158	0.291
F_{IS}	0.191	-0.121	-0.125	-0.072	
P	1.0000	0.0984	1.0000	1.0000	
平均 mean					
N_A	4.400	4.700	4.600	5.100	
A_R	4.683	4.267	4.581	5.278	
G_D	0.645	0.579	0.612	0.614	
H_e	0.578	0.641	0.614	0.589	
H_o	0.390	0.364	0.412	0.335	
F_{IS}	0.407	0.269	0.298	0.382	

注: N_A 为等位基因数, A_R 为等位基因丰度, G_D 为基因多样性, H_e 为期望杂合度, H_o 为观测杂合度, F_{IS} 为近交系数, *表示经邦弗朗尼校正后偏离哈迪-温伯格平衡($P<0.05$)。

Note: N_A , number of alleles; A_R , allelic richness; G_D , gene diversity; H_e , the expected heterozygosity; H_o , the observed heterozygosity; F_{IS} , inbreeding coefficient. * Indicates significant departure from Hardy-Weinberg equilibrium after Bonferroni correction($P<0.05$).

2.2 遗传分化

4 个群体间不同位点的遗传分化系数 F_{st} 值为 0.086~0.180(表 3), 遗传分化最大的是白斑马群体与龙王塘野生群体, 遗传分化最小的是白蛤群体和海洋橙群体。所有群体总的 F_{st} 为 0.128, 说明 4 个群体的变异中约有 12.8% 是由不同群体间的基因差异产生的。4 个群体相互间的 Nei 氏遗传距离

在 0.206~0.355 (表 3)。白蛤群体和海洋橙群体遗传距离最近, 而遗传距离最远的是龙王塘野生群体和白斑马群体。4 个群体 F_{IS} 为 0.269~0.407, 除了 *RpT238* 和 *RpT242* 在白蛤、海洋橙和龙王塘群体, 以及 *RpT241* 在白斑马、白蛤和龙王塘群体 F_{IS} 较低外, 其余 F_{IS} 都较高。

依据计算得到 Nei 氏遗传距离, 利用 UPGMA

表3 菲律宾蛤仔4个群体遗传相似性系数(F_{st} 对角线下方)和Nei氏遗传距离(对角线上方)Tab. 3 Pairwise F_{st} (under diagonal) and Nei's unbiased genetic distances (above diagonal) of *Ruditapes philippinarum*

群体 population	白斑马 white zebra	白蛤 white	海洋橙 orange	龙王塘 longwangtang
白斑马 white zebra	0	0.212	0.231	0.355
白蛤 white	0.098	0	0.206	0.330
海洋橙 orange	0.113	0.086	0	0.243
龙王塘 longwangtang	0.180	0.154	0.134	0

法构建进化树(图1)。野生龙王塘群体独立为一支; 养殖白蛤群体与养殖海洋橙群体最先汇成一支, 再与养殖白斑马群体汇为一支。结果表明, Nei氏遗传距离和 F_{st} 的结果相同。

3 讨论

遗传多样性是选择育种的基础, 因此对人工选育群体进行遗传多样性的监测十分必要, 人工选育过程中遗传多样性降低在许多水产动物中已有报道^[26-28]。本研究微卫星分析结果显示, 在群体水平上期望杂合度是0.578~0.641, 观测杂合度

是0.335~0.412, 说明4个群体的多态性水平较高, 但 H_e 与 H_o 的变化范围低于Yasuda等^[29]对日本群体的报道。每个位点的等位基因数为3~12个, 平均等位基因数为4.4~5.1; 平均等位基因丰度为4.27~5.24, 表示4个群体的多态性水平为中等水平, 其中龙王塘野生群体平均 N_A 和 A_R 最高, 表明人工选育群体的多态性水平比龙王塘野生群体相对较低。研究结果表明, 人工选育群体的遗传多样性比野生群体有一定程度的下降, 但仍处于较高水平, 人工选育群体与养殖群体遗传多样性差异不大, 在其他海洋贝类中也有类似报道^[30-31]。

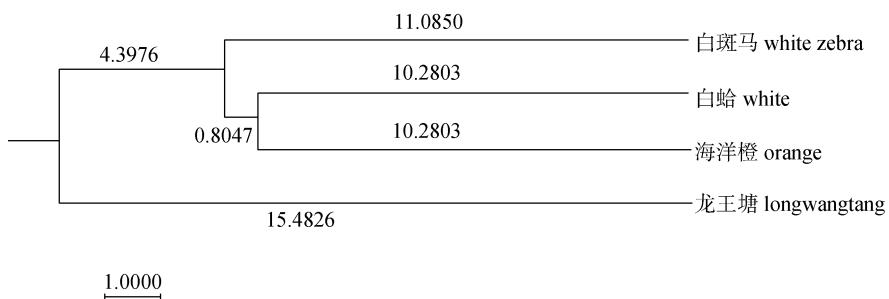


图1 根据Nei氏遗传距离用UPGMA法构建的菲律宾蛤仔4个群体的进化树

Fig. 1 UPGMA dendrogram of four *Ruditapes philippinarum* populations based on Nei's unbiased genetic distances

遗传分化系数(F_{st})是反映群体间遗传分化程度的重要参数。王学颖等^[20]对马氏珠母贝金黄壳色系和基础群体遗传结构比较研究中得到的 F_{st} 值为0.0031~0.1478。田野等^[32]对泥蚶(*Tegiccarca granosa*)人工选育群体进行微卫星分析, 得到4个群体中12个位点的 F_{st} 值0.0347~0.4549, 平均值为0.1930。一般认为, F_{st} 值在0~0.05, 群体间的分化不显著; 在0.05~0.15, 群体间为中等遗传分化程度; 在0.15~0.25, 群体间的分化程度较大。本研究中, 4个群体间不同位点的遗传分化系数 F_{st} 值为0.086~0.180, 平均值为0.128。结果表明

有12.8%的变异是由群体分化导致的, 而87.2%的变异来源于群体内, 人工选育的3种不同壳色群体之间的 F_{st} 值在0.05~0.15, 表现为中度分化水平; 龙王塘野生群体与人工选育群体的 F_{st} 值在0.15~0.25, 表现为较大分化水平。群体间的遗传变异程度处于中等水平。

哈迪-温伯格检验结果表明4个群体都出现了偏分离, 其中偏离哈迪-温伯格平衡较多的微卫星位点有RpT142、RpT190和RpT206, 且在所有群体中都偏离, 可能是无效等位基因、基因分型误差、取样量较少和近交等原因^[33], 4个群体的

观测杂合度和期望杂合度差异都较大, 所以推测偏分离可能主要是无效等位基因引起的, 以前的研究也发现菲律宾蛤仔微卫星普遍存在无效等位基因现象^[19], 在牡蛎等贝类中也有类似报道^[34]。 F_{IS} 在4个群体中为正值的比例为77.5%, 说明群体内可能出现一定水平的近交现象, 造成不同程度的杂合子缺失。另外, 无效等位基因、样本量较小、性别比例失衡、稀有等位基因丢失等因素也可能是杂合子缺失的原因^[35]。本研究中, 除了RpT238和RpT242在白蛤、海洋橙和龙王塘群体, 以及RpT241在白斑马、白蛤和龙王塘群体 F_{IS} 较低外, 其余 F_{IS} 都较高, 表明可能出现了非随机交配现象。野生群体与人工选育群体相比遗传多样性较高, 遗传信息丢失的现象却同样存在, 海区的环境污染和过度捕捞等人为因素致使野生种群的数量下降都有可能造成这种现象而引起遗传结构的变化, 最终导致偏离哈迪-温伯格平衡。

综上所述, 本研究对菲律宾蛤仔人工选育群体与野生群体的遗传多样性进行了研究, 发现选育群体的遗传多样性比野生群体有一定程度的下降, 但选育群体的遗传多样性仍然比较高, 连续的选育过程对群体的遗传多样性和遗传分化有一定程度的影响。本研究结果对于后续的菲律宾蛤仔的育种工作具有指导意义。

参考文献:

- [1] Zhang G F, Yan X W. Clam Aquaculture[M]. Beijing: Science Press, 2010. [张国范, 闫喜武. 蛤仔养殖学[M]. 北京: 科学出版社, 2010.]
- [2] Yan X W, Zhang Y H, Huo Z M, et al. Studies on phenotypic traits of different shell color strains F_2 of Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(6): 701–709. [闫喜武, 张跃环, 霍忠明, 等. 不同壳色菲律宾蛤仔品系 F_2 的表型性状[J]. 水产学报, 2010, 34(6): 701–709.]
- [3] Yan X W, Zhang Y H, Sun H Q, et al. Three way crosses between two-band red and white zebra strains of Manila clam, *Ruditapes philippinarum* [J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(8): 1190–1197. [闫喜武, 张跃环, 孙焕强, 等. 菲律宾蛤仔两道红与白斑马品系的三元杂交[J]. 水产学报, 2010, 34(8): 1190–1197.]
- [4] Yan X W, Zhang Y H, Sun H Q, et al. The effect of hybridization of inbreeding between two generations for orange strain of manila clam *Ruditapes philippinarum* [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2011, 42(2): 309–316. [闫喜武, 张跃环, 孙焕强, 等. 菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)海洋橙品系两个世代的杂交与近交效应[J]. 海洋与湖沼, 2011, 42(2): 309–316.]
- [5] Jiang Z H, Wang J, Tang Q S. Studies on physiological ecology of short-necked clam (*Ruditapes philippinarum*) I. Effects of temperature, body weight and feeding state on oxygen consumption rate and ammonia excretion rate [J]. Marine Fisheries Research, 1999, 20(1): 40–43. [姜祖辉, 王俊, 唐启升. 菲律宾蛤仔生理生态学研究 I. 温度、体重及摄食状态对耗氧率及排氨率的影响[J]. 海洋水产研究, 1999, 20(1): 40–43.]
- [6] Ren F H, Liu J M, Yang H, et al. The problems and strategy on breeding of clam (*Ruditapes philippinarum*) in ponds in Liaoning Province [J]. Fisheries Science, 2003, 22(5): 39–41. [任福海, 刘吉明, 杨辉, 等. 辽宁菲律宾蛤仔土池育苗存在的问题与对策[J]. 水产科学, 2003, 22(5): 39–41.]
- [7] Liang Y B, Zhang X C, Wang L J, et al. Prevalence of *Perkinsus* sp. in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* along northern coast of Yellow sea in China [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2001, 32(5): 502–510. [梁玉波, 张喜昌, 王立俊, 等. 北黄海菲律宾蛤仔帕金虫流行病害的研究[J]. 海洋与湖沼, 2001, 32(5): 502–510.]
- [8] Hu G W, Yan X W, Qin Y J, et al. Molecular cloning and expression analysis of inhibitor of growth protein 3 (ING3) in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum* [J]. Mol Biol Rep, 2014, 41: 3583–3590.
- [9] Jin D, Qin Y J, Yan X W, et al. Establishment of SRAP reaction conditions and the genetic analysis of three strains with different shell colors in Manila clam *Ruditapes philippinarum* [J]. Journal of Dalian Ocean University, 2013, 28(4): 361–366. [金迪, 秦艳杰, 闫喜武, 等. 菲律宾蛤仔 SRAP 标记体系的建立及不同壳色品系的遗传学分析[J]. 大连海洋大学学报, 2013, 28(4): 361–366.]
- [10] Niu H B, Nie H T, Zhu D P, et al. Identification of EST-SSR markers associated with growth-related traits in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* [J]. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(6): 1910–1916. [牛泓博, 聂鸿涛, 朱德鹏, 等. 菲律宾蛤仔 EST-SSR 标记与生长性状的相关分析[J]. 生态学报, 2015, 35(6): 1910–1916.]
- [11] Wang Y H, Fu D K, Xia J J. The genetic diversity of the noble scallop (*Chlamys nobilis*, Reeve 1852) in China assessed using five microsatellite markers [J]. Mar Genom, 2013, 9: 63–67.
- [12] Nie H T, Li Q, Kong L F. Development of four multiplex

- PCRs in the Zhikong scallop (*Chlamys farreri*) and their validation in parentage assignment[J]. *Biochem Syst Ecol*, 2012, 44: 96–101.
- [13] 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: 488–497.
- [14] Nie H T, Li Q, Kong L F, et al. Genotyping based on telomeric microsatellite loci for verifying triploidy in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. *Biochem Syst Ecol*, 2014, 54: 326–332.
- [15] Mura L, Cossu P, Cannas A, et al. Genetic variability in the Sardinian population of the manila clam, *Ruditapes philippinarum*[J]. *Biochem Syst Ecol*, 2012, 41: 74–82.
- [16] An H S, Park W J, Cho K C, et al. Genetic structure of Korean populations of the clam *Ruditapes philippinarum* inferred from microsatellite marker analysis[J]. *Biochem Syst Ecol*, 2012, 44: 186–195.
- [17] Chiesa S, Marzano F N, Minervini G, et al. The invasive Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850) in Northern Adriatic Sea: population genetics assessed by an integrated molecular approach[J]. *Fish Res*, 2011, 110(2): 259–267.
- [18] Xing K, Gao M L, Li H J. Genetic differentiation between natural and hatchery populations of Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) based on microsatellite markers[J]. *Genet Mol Res*, 2014, 13(1): 237–245.
- [19] Nie H T, Niu H B, Zhao L Q, et al. Genetic diversity and structure of Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) populations from Liaodong peninsula revealed by SSR markers[J]. *Biochem Syst Ecol*, 2015, 59: 116–125.
- [20] Wang X Y, Gao Y Z, Du X D, et al. Genetic structure of the third generation yellow colored line and base stock of pearl oyster *Pinctada martensii* as revealed by SSR marker system[J]. *Marine Science Bulletin*, 2012, 31(3): 324–328. [王学颖, 高远镇, 杜晓东, 等. 马氏珠母贝金黄壳色系 F3 和基础群体遗传结构比较[J]. 海洋通报, 2012, 31(3): 324–328.]
- [21] Wang Q Z, Li Q, Kong L F. Genetic variability assessed by microsatellites in mass selection lines of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(10): 1529–1536. [王庆志, 李琪, 孔令锋. 长牡蛎 3 代人工选育群体的微卫星分析[J]. 水产学报, 2012, 36(10): 1529–1536.]
- [22] Dieringer D, Schlötterer C. Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets[J]. *Mol Ecol Notes*, 2003, 3(1): 167–169.
- [23] Goudet J. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3)(CP/OL). <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html.2001>.
- [24] Breslow N. A generalized Kruskal-Wallis test for comparing K samples subject to unequal patterns of censorship[J]. *Biometrika*, 1970, 57(3): 579–594.
- [25] Raymond M, Rousset F. GENEPOL (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism[J]. *J Hered*, 1995, 86(3): 248–249.
- [26] Appleyard S A, Ward R D. Genetic diversity and effective population size in mass selection lines of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)[J]. *Aquaculture*, 2006, 254: 148–159.
- [27] Loughnan S R, Domingos J A, Smith-Keune C, et al. Broodstock contribution after mass spawning and size grading in barramundi (*Lates calcarifer*, Bloch)[J]. *Aquaculture*, 2013, 404: 139–149.
- [28] Vela-Avitúa S, Montaldo H H, Márquez-Valdelamar L, et al. Decline of genetic variability in a captive population of Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* using microsatellite and pedigree information[J]. *Electron J Biotechnol*, 2013, 16(4): 11.
- [29] Yasuda N, Nagai S, Yamaguchi S, et al. Development of microsatellite markers for the Manila clam *Ruditapes philippinarum*[J]. *Mol Ecol Notes*, 2007, 7: 43–45.
- [30] English L J, Maguire G B, Ward R D. Genetic variation of wild and hatchery populations of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in Australia[J]. *Aquaculture*, 2000, 187(3–4): 283–298.
- [31] Yu H, Li Q. Genetic variation of wild and hatchery populations of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* assessed by microsatellite markers[J]. *J Genet Genomics*, 2007, 34(12): 1114–1122.
- [32] Tian Y, Shao Y Q, Xiao G Q, et al. Analysis of genetic variability in selective breeding populations of *Tegiccarca granosa* by microsatellites[J]. *Marine Science*, 2015, 39(4): 1–7. [田野, 邵艳卿, 肖国强, 等. 泥蚶人工选育群体的微卫星分析[J]. 海洋科学, 2015, 39(4): 1–7.]
- [33] Hedgecock D, Li G, Hubert S, et al. Widespread null alleles and poor cross-species amplification of microsatellite DNA loci cloned from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. *J Shellfish Res*, 2004, 23: 379–386.
- [34] Li Q, Yu H, Yu R. Genetic variability assessed by microsatellites in cultured populations of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in China[J]. *Aquaculture*, 2006, 259: 95–102.
- [35] Hedgecock D, Sly F. Genetic drift and effective population sizes of hatchery-propagated stocks of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. *Aquaculture*, 1990, 88: 21–38.

Analysis of genetic variability in selected lines and a wild population of *Ruditapes philippinarum* using microsatellite markers

NIE Hongtao^{1,2}, LI Jia¹, HUO Zhongming¹, GUO Wei¹, YAN Xiwu^{1,2}

1. Engineering and Technology Research Center of Shellfish Breeding of Liaoning Province, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;
2. Key Laboratory of Mariculture & Stock Enhancement in North China's Sea, Ministry of Agriculture; Dalian Ocean University, Dalian 116023, China

Abstract: The Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, which is widely distributed along the coasts of China, is an economically important marine bivalve species in China's aquaculture industry. The world production of this species was 3.6 million metric tons in 2010. As a country, China accounts for the largest proportion (~90%) of the total global production of Manila clams, producing about 3.0 million metric tons annually. This species includes several pedigree lines, such as White, Zebra, Liangdao Red, and Marine Red that are distributed in the coastal areas in North China. Microsatellite markers are a powerful tool because of their high level of polymorphism, stability, and co-dominance. As a result, they are used widely in studies of genetic diversity and population differentiation. In this study, 10 microsatellite markers were analyzed in three selected lines and one wild population of *Ruditapes philippinarum*. The number of alleles per locus ranged from 3 to 12, and allelic richness range was 3.0–10.7. Among all SSR loci, the mean number of alleles breeding populations of white zebra strain was 4.4. Allelic richness was lowest in the breeding white clam population (4.267). The average number of alleles and allelic richness was highest in the wild population from Longwangtang (5.100 and 5.278, respectively). There was no difference in average allelic richness among all groups (Kruskal-Wallis test, $df=3$, $P=0.412$). Expected heterozygosity ranged from 0.307 to 0.757, and observed heterozygosity ranged from 0.208 to 0.583. The 77.5% inbreeding coefficient (F_{IS}) was positive, indicating that there is a certain level of inbreeding within populations, resulting in varying degrees of loss of heterozygosity. The F_{ST} values between the three shell color strains of *R. philippinarum* were between 0.05 and 0.15, indicating a moderate level of differentiation. The F_{ST} values for comparisons between the Longwangtang population and the three shell colored lines were 0.15–0.25, indicating a greater level of differentiation. Our results suggest that genetic variation has not been significantly affected by mass selection and there remains high genetic variability in the mass selection lines, suggesting that there is still potential for increased gains in future selective breeding programs.

Key words: *Ruditapes philippinarum*; microsatellite markers; population genetics; genetic diversity

Corresponding author: YAN Xiwu. E-mail: yanxiwu@dlou.edu.cn