

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16325

基于线粒体 Cyt b 基因的虾夷扇贝群体遗传结构分析

倪守胜^{1, 2, 3}, 杨钰^{2, 3, 4}, 柳淑芳^{2, 3}, 庄志猛²

1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

3. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266200;

4. 大连海洋大学 水产与生命学院, 辽宁 大连 116023

摘要: 本研究利用线粒体细胞色素 b (Cyt b) 基因标记对虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) 6 个群体 (长岛底播增殖群、海洋岛底播增殖群、獐子岛底播增殖群、旅顺自然群、“獐子红”人工选育群以及日本青森陆奥湾群) 进行种质状况评估, 研究结果表明, 6 个群体 120 个个体的 Cyt b 基因序列共检测到 20 种单倍型, 其中“獐子红”人工选育群单倍型最少, 日本群体单倍型最为丰富, 两者单倍型多样性指数分别为 0.10000 和 0.88400。分子方差分析 (AMOVA) 发现, 日本群体与中国群体间变异百分比为 15.34%, 明显高于作为一个基因池时群体间遗传变异水平; 就中国组群而言, 其 83.41% 的遗传变异来自于群体内部, 组内群体间的变异只占 1.52%, 说明中国群体个体间的遗传变异远大于群体间的遗传变异。F_{st} 分析显示, 中国群体与日本群体之间发生了中等水平的遗传分化 (0.07455~0.17895, F_{st}>0.05)。以遗传距离矩阵构建群体间分子系统树 (UPGMA 树), 拓扑结构图显示中国 5 个群体先聚为一支, 再与日本群体聚为一支。由此可见, 中国养殖区的虾夷扇贝与日本原产地群体间已出现明显的遗传分化, 且虾夷扇贝中国群体的遗传多样性处于较低水平。本研究结果可为虾夷扇贝的种质资源保护与可持续开发利用提供理论依据。

关键词: 虾夷扇贝; Cyt b; 遗传结构; 遗传多样性; 种质资源

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)03-0432-08

虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) 属于软体动物门 (Mollusca), 瓣鳃纲 (Lamellibranchia), 翼形亚纲 (Pterimorphia), 珍珠贝目 (Pterioidea), 扇贝科 (Pectinidae), 是广泛分布于日本、俄罗斯远东及朝鲜部分水域的大型冷水性双壳贝类, 是重要养殖经济贝类之一。20 世纪 80 年代初, 辽宁省水产科学研究院从日本青森县陆奥湾将虾夷扇贝引入中国, 并在山东、辽宁等北方环渤海和北黄海地区的沿海进行人工增养殖, 展开规模化养殖生产^[1-2]。据统计, 2007 年, 全世界虾夷扇贝产区 (主要为中国、日本和俄罗斯) 内其总产量约为 140 万 t, 创造经济价值约 373 万美元^[3]。

作为引进种, 历经数十年的增养殖, 虾夷扇

贝已演变为中国北黄海沿岸的定居种, 并在旅顺沿岸形成自然群体^[4-5]。但近几年随着虾夷扇贝育种及养殖业的逐步发展和养殖规模的逐渐扩大, 中国养殖海区出现了成活率低、发病率高、生长缓慢等一系列问题, 这是否与虾夷扇贝引种数量有限而经多年累代养殖导致其遗传多样性下降有关有待研究。Fujio 等^[6]、高悦勉等^[7-8]曾采用同工酶电泳方法研究发现, 虾夷扇贝养殖群体遗传多样性明显低于野生群体; 鲍相渤等^[9]、丁君等^[10]利用 AFLP 技术研究表明, 虾夷扇贝中国群体遗传多样性较日本群体已明显下降; 但是, 赵莹莹等^[11]、常亚青等^[12]、李春艳等^[13]应用 SSR 分子标记的研究结果则表明中国虾夷扇贝养殖群体仍

收稿日期: 2016-10-30; 修订日期: 2017-01-08.

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划项目 (2012BAD18B03); 山东省泰山学者建设工程专项.

作者简介: 倪守胜 (1991-), 男, 硕士研究生, 从事海洋生物学研究. E-mail: shoushengyongji@126.com

通信作者: 柳淑芳, 研究员, 从事海洋生物学研究. E-mail: liusf@ysfri.ac.cn.

具有较高的遗传多样性水平, 与原产地日本群体的遗传多样性相比下降并不明显。从已有研究结果可见, 研究方法不同、样品数量和取样范围有别, 可能导致研究结果差异较大, 甚至存在分歧。因此非常有必要在中国主要养殖海区开展全面准确的虾夷扇贝群体遗传多样性评估。

动物线粒体 DNA 具有分子小、结构简单、母系遗传、进化速度快且检测简便等特点, 作为一种重要的分子标记被广泛应用于水产动物的群体遗传学、生物地理学和保护生物学研究^[14-16]。线粒体基因组上不同区域的进化速度存在差异, 适合不同水平的进化研究。线粒体基因组中进化较快的片段有 Cyt b 和 D-loop, 且一般认为 D-loop 变异速率是最快的^[17], 因此通常会选择 D-loop 用于种内或近缘种水平种群遗传结构及系统地理分析^[18]。然而, 随着多种动物线粒体基因组测序的完成及相关分析工作的开展, 在鱼类、两栖类、鸟类、哺乳类中均发现线粒体基因组的控制区部分变异速率低于 Cyt b 基因的现象。为了充分了解和有效评估当前中国虾夷扇贝种群的遗传背景, 本研究拟以 Cyt b 基因为分子标记, 分析虾夷扇贝定居群体、增殖养殖群体、人工选育群体和日本原产地群体的遗传多样性和遗传结构, 以期为虾夷扇贝的种质资源保护与开发利用及优良品种的培育工作提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究的虾夷扇贝样品包括 6 个群体, 分别为长岛底播增殖群体(CD)、海洋岛底播增殖群体

(HYD)、獐子岛底播增殖群体(ZZD)、“獐子红”人工选育群体(ZZH)、旅顺自然群体(LS)以及日本自然群体(JP), 样品冰冻保存运输到实验室进行解剖处理。取闭壳肌组织保存于-20℃备用。每个群体随机选取 20 个样品, 样品总数共计 120 个(表 1)。

1.2 基因组 DNA 提取

参考 Sambrook 等^[19]的方法采用酚-氯仿-异戊醇常规方法抽提 DNA, 分别取约绿豆体积一半大小的虾夷扇贝背壳肌组织(约 20 mg), 加入 150 μL 细胞裂解缓冲液(0.5% SDS, Tris 50 mmol/L, EDTA 50 mmol/L, pH 8.0), 剪碎, 补加 450 μL 细胞裂解缓冲液和 5 μL 蛋白酶 K (20 g/L), 56℃ 消化至溶液澄清, 用酚-氯仿抽提, 异戊醇沉淀, 最后溶解于 50 μL 灭菌去离子超纯水, -20℃ 保存备用。

1.3 PCR 扩增与电泳检测

用于 Cyt b PCR 扩增的引物, 根据 GenBank 中虾夷扇贝的 mtDNA 全序列(序列号: AB271769)中 Cyt b 基因, 利用软件 DNASTar Lasergene 7.1 中的 PrimerSelect 进行设计。引物的核苷酸序列为: N-Cyt b-F: 5'-GGCTGCTCAGGTAATTAGAAGGAT-3'; N-Cyt b-R: 5'-ACAGCGGAAAGAAAGCAAAGTAAA-3'。引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。

PCR 反应体系为 50 μL: 10×PCR buffer 5 μL, dNTP Mix (2 nmol/L each) 5 μL, Dream Taq DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.3 μL (Thermo), 正反向引物 (10 μmol/L)各 1 μL, 模板 2 μL, 加超纯水至 50 μL。每组 PCR 均设阴性对照用来检测是否存在污染。反应程序为: 95℃ 3 min; 95℃ 30 s, 50℃ 40 s, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 10 min。

表 1 虾夷扇贝 6 个群体的样品信息
Tab. 1 Information of *Patinopecten yessoensis* samples from 6 stocks

取样地点 sampling location	群体缩写 stock code	类型 type	数量 quantity	取样时间 sampling time
长岛 Changdao Island	CD	底播增殖群体 bottom sowing cultured stock	20	2015.8
海洋岛 Haiyangdao Island	HYD	底播增殖群体 bottom sowing cultured stock	20	2015.7
獐子岛 Zhangzidao Island	ZZD	底播增殖群体 bottom sowing cultured stock	20	2015.7
旅顺 Lyushun	LS	自然群体 natural stock	20	2015.7
獐子岛 Zhangzidao Island	ZZH	人工选育群体 artificial selected stock	20	2015.7
日本 Japan	JP	自然群体 natural stock	20	2016.3

PCR 结束后取扩增产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测,利用凝胶成像系统进行观察并拍照,选取目的条带明显且具有良好特异性的PCR产物,送华大基因测序。采用 N-Cyt *b*-F 和 N-Cyt *b*-R 引物进行双向测通。

1.4 数据分析

所获原始序列首先与其对应峰图进行对比检查,并且采用 DNASTar Lasergene 7.1 软件包^[20]中的 EditSeq V7.1 辅助校对,检查碱基插入和缺失,以确认序列质量。用 Clustal X 软件^[21]对所有序列进行比对排序并去除两端冗余列,用 DnaSP 5.10 软件^[22]确定序列的多态位点数(number of polymorphic sites, *S*)、单倍型数(number of Haplotypes, *H*)、单倍型多样性指数(haplotype diversity, *H_d*)、平均核苷酸差异数(average number of nucleotide differences, *K*)及核苷酸多样性指数(nucleotide diversity, *P_i*)。应用 Arlequin3.0 软件^[23]中的分子变异分析(AMOVA)方法来评估群体间遗传变异,通过 1000 次重抽样来检验不同遗传结构水平上协方差的显著性。采用分化固定指数 *F_{st}* 来评价两两群体间的遗传差异,通过 1000 次重抽样来检验两两群体间 *F_{st}* 的显著性。利用 MEGA5.0 软件^[24]分析序列的核苷酸组成、变异位点数及群体间的 Tamura-Nei 遗传距离,并基于遗传距离构建 UPGMA 分子系统进化树(UPGMA-tree),经 1000 次重复抽样(Boot-straps value)检测其置信度。

2 结果与分析

2.1 虾夷扇贝线粒体 Cyt *b* 基因序列特征

测序得到的目的片段经过 Clustal X 编辑和比

对后,去除引物及测序起始的部分序列,并经过 NCBI 的在线 BLAST 分析,确认得到 571 bp 的 Cyt *b* 基因序列,没有发现插入/缺失突变的核苷酸位点。利用 MEGA5.0 软件计算序列的碱基组成(表 2),6 个群体的碱基组成基本一致,T、C、A、G 四个碱基的平均含量分别为 39.4%、15.7%、20.5%和 24.4%,A+T 含量明显高于 G+C 含量。虾夷扇贝 Cyt *b* 基因序列碱基组成的偏好性符合线粒体 DNA 的碱基组成特征。

2.2 虾夷扇贝群体遗传多样性

应用 DNAsp5.0 软件对虾夷扇贝各群体内及群体间的遗传多样性参数进行计算,结果如表 3 所示。120 条 Cyt *b* 序列共检测到 18 个多态位点、20 种单倍型,单倍型多样性(*H_d*)为 0.74400,核苷酸多样性指数(*P_i*)为 0.00199,平均核苷酸差异数(*K*)为 1.13300。其中,日本群体核苷酸多样性指数 *P_i* 最高,为 0.00342,单倍型最丰富,单倍型多样性指数(*H_d*)为 0.88400;中国各群体的遗传多样性参数均低于日本群体,其中“獐子红”人工选育群体的各参数均处于最低水平。

2.3 虾夷扇贝群体遗传结构

6 个虾夷扇贝群体的群内遗传距离大小依次为:日本自然群体(0.00343)>海洋岛底播增殖养殖群体(0.00225)>长岛底播增殖养殖群体(0.00184)>旅顺自然群体(0.00182)>獐子岛底播增殖养殖群体(0.00168)>“獐子红”人工选育群体(0.00018)。日本自然群体和海洋岛底播增殖群体的遗传距离最大(0.00338),獐子岛底播增殖群体和“獐子红”人工选育群体遗传距离最小(0.00096)(表 4)。

根据虾夷扇贝样品来源,将样品划分为不同

表 2 虾夷扇贝 6 个群体 Cyt *b* 基因片段的碱基组成
Tab. 2 The base compositions of Cyt *b* gene fragments among 6 stocks of *Patinopecten yessoensis*

碱基 base	群体 stock						均值 mean
	CD	HYD	LS	ZZD	ZZH	JP	
T	39.4	39.5	39.4	39.4	39.4	39.4	39.4
C	15.7	15.6	15.8	15.8	15.8	15.8	15.7
A	20.5	20.5	20.5	20.4	20.5	20.5	20.5
G	24.4	24.4	24.3	24.4	24.3	24.3	24.4
A+T	59.9	60.0	59.9	59.8	59.9	59.9	59.9
G+C	40.1	40.0	40.1	40.2	40.1	40.1	40.1

注:各群体来源见表 1。
Note: The stock locations are shown in tab. 1.

表 3 虾夷扇贝 6 个群体 Cyt b 遗传多样性参数
Tab. 3 Summary of genetic diversity of 6 *Patinopecten yessoensis* stocks

参数 parameter	群体 stock						总计* total*
	CD	HYD	ZZD	LS	ZZH	JP	
S	7	6	6	8	1	10	18
H	8	7	6	8	2	10	20
H _d	0.74200	0.82100	0.63700	0.69500	0.10000	0.88400	0.74400
P _i	0.00183	0.00224	0.00168	0.00182	0.00018	0.00342	0.00199
K	1.04700	1.27900	0.95800	1.03700	0.10000	1.95300	1.13300

注: 各群体来源见表 1. S: 多态位点数; H: 单倍型数; H_d: 单倍型多样性指数; K: 平均核苷酸差异数; P_i: 核苷酸多样性指数; *表示基于 6 个群 120 个个体进行计算的总群体遗传多样性参数.

Note: The stock locations are shown in tab. 1. S: number of polymorphic sites; H: number of haplotypes; H_d: haplotype diversity; K: average number of nucleotide differences; P_i: nucleotide diversity; * denotes population genetic diversity parameters based on 6 stocks of 120 individuals.

表 4 6 个虾夷扇贝群体的群内及群间遗传距离
Tab. 4 Genetic distance of interstock/intrastock of *Patinopecten yessoensis*

群体 stock	ZZH	ZZD	LS	JP	HYD	CD
ZZH	0.00018					
ZZD	0.00097	0.00168				
LS	0.00105	0.00176	0.00182			
JP	0.00219	0.00276	0.00294	0.00343		
HYD	0.00140	0.00208	0.00209	0.00338	0.00225	
CD	0.00105	0.00170	0.00184	0.00292	0.00208	0.00184

注: 各群体来源见表 1; 遗传距离基于 Tamura-Nei 模型计算.
Note: The stock locations are shown in tab. 1; genetic distance was calculated based on Tamura-Nei model.

的基因池进行 AMOVA 分析, 以估算虾夷扇贝群体的遗传变异分布特征(表 5)。如果将 120 个样品作为一个基因池, 仅有 7.39%的变异来自于群体间, 遗传变异主要存在于群体内个体间(92.61%)。将 1 个日本群体与 5 个中国群体划分为两个基因池进行分析, 则日本组群和中国组群间变异百分比为 15.34%, 明显高于作为一个基因池时群体间

遗传变异水平。就中国组群而言, 其 83.41%的遗传变异来自于群体内部, 组内群体间的变异只占 1.52%, 说明中国群体个体间的遗传变异远大于群体间的遗传变异, 且与日本群体存在一定程度的遗传分化。

在群体遗传学中, F_{st} 值代表群体间的遗传分化程度, $F_{st}<0.05$ 表示遗传分化较弱, $0.05<F_{st}<0.15$ 表示遗传分化呈中等水平, $0.15<F_{st}<0.25$ 表示遗传分化水平较高, $F_{st}>0.25$ 表示遗传分化程度极大^[25]。虾夷扇贝群体间的遗传分化指数(F_{st})分析结果显示, 日本群体与中国各群体间遗传分化程度较高(0.07455~0.17895)。中国群体的“獐子红”人工选育群体与海洋岛底播养殖群体及旅顺自然群体间遗传分化呈中等水平(0.05263~0.13816); 旅顺自然群体与长岛底播增殖群体及獐子岛底播增殖群体之间遗传分化程度却较弱(−0.03900~0.00175), 表明这三个群体之间具有较高的遗传同质性(表 6)。

表 5 虾夷扇贝 6 个群体线粒体 Cyt b 的分子方差分析
Tab. 5 Analysis of molecular variance of *Patinopecten yessoensis* based on cytochrome b sequence data

变异来源 source of variation	平方和 sum of squares	变异组成 variance components	变异百分比/% percentage of variation
一个基因池 one gene pool (虾夷扇贝群体 <i>Patinopecten yessoensis</i> stock)			
群体间 among stocks	6.892	0.04236	7.39
群体内 within stocks	60.550	0.53114	92.61
两个基因池 two gene pools (中国群体 Chinese stock, 日本群体 Japanese stock)			
组群之间 among groups	3.992	0.09800	15.34
组群内群体间 among stocks within group	2.900	0.00969	1.52
群体内 within stocks	60.550	0.53114	83.41

表 6 基于 Cyt b 基因序列的虾夷扇贝 6 个群体间 F_{st} 值
Tab. 6 F_{st} analysis among 6 stocks of *Patinopecten yessoensis* based on Cyt b sequences

群体 stock	CD	HYD	ZZD	LS	ZZH	JP
CD	0.00000					
HYD	0.01843	0.00000				
ZZD	-0.03900	0.05618	0.00000			
LS	0.00752	0.02698	0.00263	0.00000		
ZZH	0.04386	0.13816	0.03828	0.05263	0.00000	
JP	0.09774	0.15954	0.07455	0.10629	0.17895	0.00000

注：各群体来源见表 1。
Note: The stock locations are shown in tab. 1.

2.4 系统进化树

以 Tamura-Nei 遗传距离矩阵构建群体间分子系统树(UPGMA 树)(图 1)。拓扑结构图显示 6 个虾夷扇贝群体可分为两支,日本群体单独一支,中国 5 个群体聚为一支,獐子岛底播增殖群体和“獐子红”人工选育群体遗传距离较近。

3 讨论

3.1 虾夷扇贝日本群体与中国群体之间的遗传分化

遗传多样性是生物多样性的基础和核心,遗传多样性越高则生物适应生存的能力越强,具有更丰富的育种和遗传改良潜力,在水产生物的遗传育种过程中,遗传多样性高低常常是选择育种材料的一个重要参考指标^[26]。基于线粒体 Cyt b 基因分析虾夷扇贝的群体遗传结构,结果表明,中国群体与日本群体之间发生了中等水平的遗传

分化(0.07455~0.17895, $F_{st}>0.05$),二者的遗传距离较远(0.00219~0.00338);且中国各群体遗传多样性指数均低于日本原产地群体,其核苷酸多样性指数 P_i 为 0.00018~0.00224,单倍型数 H 为 2~8,单倍型多样性指数 H_d 为 0.10000~0.82100。虾夷扇贝自日本原产地进入中国后,历经几十年的增殖和人工驯养,已经适应了中国北黄海沿岸的水域环境,逐渐演变为定居种,因此与原产地群体间出现了一定程度的遗传分化。但总体而言,虾夷扇贝中国定居群体和增殖殖群体的遗传多样性均低于日本原产地群体,原因可能是中国的虾夷扇贝的引种范围较小、引种数量较少^[1-2],长期人工育苗中亲贝数量少导致近交,进而造成遗传漂变,使得纯合子比例升高,种群遗传多样性下降。鲍相渤等^[9]及丁君等^[10]采用 AFLP 技术对虾夷扇贝群体遗传多样性的研究结果也支持了本研究的观点。

3.2 虾夷扇贝中国群体的遗传多样性

虾夷扇贝中国群体的样品主要来自定居自然群、底播增殖殖群和人工选育群,群体遗传学分析结果显示,虾夷扇贝中国各群体的遗传多样性均处于较低水平,核苷酸多样性指数较低,群体间遗传距离较小,遗传分化水平较弱($F_{st}<0.05$),有的群体间甚至存在遗传同质化现象。例如,獐子岛、海洋岛及长岛 3 个底播增殖殖群体间,遗传距离较近(0.00170~0.00208),群体间遗传相似度较高($F_{st}=-0.03900\sim0.00175$),表明 3 个群体之间具有较高的遗传同质性。

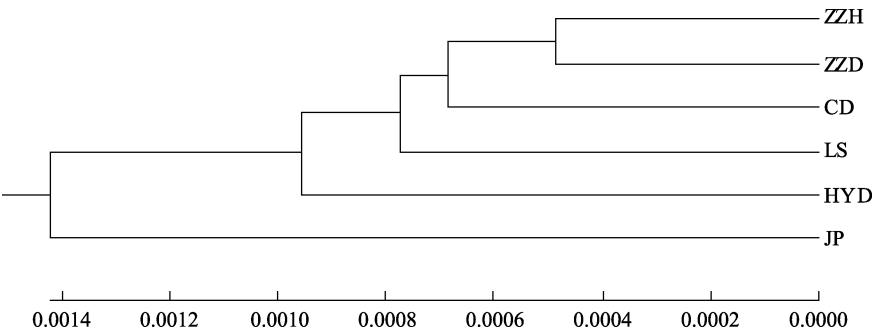


图 1 基于遗传距离模型的 6 个虾夷扇贝群体间 UPGMA 树

各群体来源见表 1,经 1000 次重复检验,系统进化树按比例绘制,标尺单位长度表示系统进化树分支长度所代表的遗传距离。
Fig. 1 UPGMA phylogenetic tree based on genetic distance by Tamura-Nei model of six stocks of *Patinopecten yessoensis*. The stock locations are shown in tab. 1, through 1000 iterations, and the tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree.

而“獐子红”人工选育群体, 其各遗传参数均处于最低水平, 且该群体与獐子岛底播增殖养殖群体间的遗传距离最近(0.00097), 在 UPGMA 系统进化树上二者优先聚集为一个独立小分支, 且两群体的遗传相似度最高($F_{st}=0.03828$)。根据“獐子红”人工选育群体的系谱资料选育过程, 其亲本来源为獐子岛底播增殖养殖群体, 作为人工选育品种, 育苗和生长过程与其他群体几乎没有基因交流, 在人工选择和自然选择的共同作用下, 极易产生种群分化, 打破群体自然交配规律, 使群体遗传不再按 Hardy-Weinberg 平衡规律进行, 因而人工选育群体的遗传多样性参数均处于最低水平。这一现象提示, 应该重视人工选育群体的遗传多样性评估工作, 以拓宽其遗传基础, 丰富其遗传背景, 增加其遗传多样性, 培育出更多的用于大规模养殖的虾夷扇贝优良品种。

关于旅顺自然群体, 据早期的物理标记放流研究报道, 旅顺自然苗种主要来自于獐子岛底播增殖群体后代, 但没有证据表明自然苗种与长岛底播增殖群体有关^[5]。本研究采用的分子标记分析结果显示, 旅顺自然群体与獐子岛、海洋岛及长岛 3 个底播增殖养殖群体间遗传距离较近, 群体间遗传分化不明显($F_{st}<0.05$), 推测中国虾夷扇贝底播增殖养殖群体对旅顺自然群体的形成均有一定贡献。本研究分子标记的分析结果不完全支持早期物理标记的研究结果, 虾夷扇贝中国定居群体的形成和扩散过程尚有待于更进一步的研究。

4 结论

基于线粒体 Cyt b 基因分析虾夷扇贝的群体遗传结构研究表明, 虾夷扇贝中国群体间的遗传距离较小, 遗传分化程度较弱, 遗传变异水平较低, 与原产地日本群体相比已出现明显的遗传多样性下降现象。因此, 为保证中国虾夷扇贝增殖业的可持续发展, 一方面, 建议加大引进种贝的数量与范围, 以增加亲贝的来源范围、数量, 打破瓶颈效应; 另一方面, 建议加强中国主要海区虾夷扇贝种质资源的相互流通, 在群体遗传结构差别较大的群体之间进行杂交育种, 以保证种质资源的遗传多样性, 降低近交繁殖的概率。

参考文献:

- [1] Wang Q C. The introduction of the Japanese scallop, *Patinopecten yessoensis*, into China and its aquaculture promising in north area of China[J]. Fisheries Science, 1984(4): 24–27. [王庆成. 虾夷扇贝的引进及其在我国北方增养殖的前景[J]. 水产科学, 1984(4): 24–27.]
- [2] Wang Q C, Liu Y F. The artificial seed-rearing of *Patinopecten yessoensis*[J]. Fisheries Science, 1982(2): 1–9. [王庆成, 刘永峰. 虾夷扇贝人工育苗的试验[J]. 水产科学, 1982(2): 1–9.]
- [3] FAO. “*Patinopecten yessoensis*”[R/OL]. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Fisheries Global Information System. 26 November, 2010. <http://www.fao.org/fisheries/en>
- [4] Li W J, Xue Z F, Li H L, et al. Scallop (*Patinopecten yessoensis*) larva collection from sea[J]. Fisheries Science, 2007, 26(5): 259–262. [李文姬, 薛真福, 李华琳, 等. 虾夷扇贝海区采苗技术初步研究[J]. 水产科学, 2007, 26(5): 259–262.]
- [5] Li W J, Xue Z F, Li H L, et al. Research on the source of yesso scallop *Patinopecten yessoensis* larvae along the coast of Bohai in Dalian[J]. Fisheries Science, 2008, 27(11): 588–591. [李文姬, 薛真福, 李华琳, 等. 大连旅顺渤海侧沿海虾夷扇贝幼虫来源调查[J]. 水产科学, 2008, 27(11): 588–591.]
- [6] Fujio Y, Brand E. Differences in degree of homozygosity between seed and sown populations of the Japanese Scallop *Patinopecten yessoensis*[J]. Nippon Suisan Gakk, 1991, 57(1): 45–50.
- [7] Gao Y M, Li G X. Biochemical genetic analyze of isozymes from *Patinopecten yessoensis*[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2003, 18(4): 269–272. [高悦勉, 李国喜. 虾夷扇贝同工酶的生化遗传分析[J]. 大连水产学院学报, 2003, 18(4): 269–272.]
- [8] Gao Y M, Li G X, Zhao Y L. Genetic structure of Japanese scallop *Patinopecten yessoensis* hatched population in Dalian sea areas[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2004, 19(2): 142–145. [高悦勉, 李国喜, 赵银丽. 大连沿海虾夷扇贝养殖群体遗传结构的研究[J]. 大连水产学院学报, 2004, 19(2): 142–145.]
- [9] Bao X B, Dong Y, He C B, et al. Studies of Japanese Scallop (*Mizuhopecten yessoensis*) germplasm by using AFLP markers[J]. Biotechnology Bulletin, 2009(4): 126–129. [鲍相潮, 董颖, 赫崇波, 等. 基于 AFLP 技术对中国虾夷扇贝群体种质资源的研究[J]. 生物技术通报, 2009(4): 126–129.]
- [10] Ding J, Wang T, Chang Y Q, et al. AFLP analysis on genetic diversity and differentiation of different populations of *Patinopecten yessoensis*[J]. Journal of Yantai University:

- Natural Science and Engineering Edition, 2010, 23(1): 47–53. [丁君, 王婷, 常亚青, 等. 基于 AFLP 技术的不同群体虾夷扇贝遗传结构及多样性研究[J]. 烟台大学学报: 自然科学与工学版, 2010, 23(1): 47–53.]
- [11] Zhao Y Y, Zhu X C, Sun X W, et al. Polymorphic microsatellite loci of the Japanese scallop *Patinopecten yessoensis*[J]. Acta Zoologica Sinica, 2006, 52(1): 229–233. [赵莹莹, 朱晓琛, 孙效文, 等. 虾夷扇贝的多态性微卫星座位[J]. 动物学报, 2006, 52(1): 229–233.]
- [12] Chang Y Q, Chen X X, Ding J, et al. Genetic diversity in five scallop populations of the Japanese scallop (*Patinopecten yessoensis*)[J]. Acta Ecologica Sinica, 2007, 27(3): 1146–1152. [常亚青, 陈晓霞, 丁君, 等. 虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) 5 个群体的遗传多样性[J]. 生态学报, 2007, 27(3): 1146–1152.]
- [13] Li C Y, Ding J, Chang Y Q, et al. Isolation of microsatellite markers in Japanese scallop and its application in genetic structure analysis[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16(1): 39–46. [李春艳, 丁君, 常亚青, 等. 虾夷扇贝微卫星标记的分离及其养殖群体的遗传结构分析[J]. 中国水产科学, 2009, 16(1): 39–46.]
- [14] Wei G L, Xu G C, Gu R B, et al. Studies on the genetic diversity of farmed and wild populations of *Coilia nasus* by analysing mitochondrial DNA Cyt *b* genes[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2012, 34(6): 1216–1221. [魏广莲, 徐钢春, 顾若波, 等. 基于 mtDNA Cyt *b* 序列分析养殖与野生刀鲚群体的遗传多样性[J]. 江西农业大学学报, 2012, 34(6): 1216–1221.]
- [15] Wu R X, Liu S F, Zhuang Z M, et al. Genetic structure of *Larimichthys polyactis* in Yellow Sea and East China Sea based on cytochrome *b* gene segment sequence of mitochondrial DNA[J]. Progress in Natural Science, 2009, 19(9): 924–930. [吴仁协, 柳淑芳, 庄志猛, 等. 基于线粒体 Cyt *b* 基因的黄海、东海小黄鱼(*Larimichthys polyactis*)群体遗传结构[J]. 自然科学进展, 2009, 19(9): 924–930.]
- [16] Yu T, Wu B, Yang A G, et al. Genetic diversity analysis of *Chlamys farreri*, *Patinopecten yessoensis*, and their offspring based on COI and Cyt *b* sequences[J]. Marine Sciences, 2016, 40(3): 1–9. [于涛, 吴彪, 杨爱国, 等. 栉孔扇贝、虾夷扇贝及其杂交子代线粒体 COI 和 Cyt *b* 基因遗传多样性分析[J]. 海洋科学, 2016, 40(3): 1–9.]
- [17] Xiao W H, Zhang Y P. Genetics and evolution of mitochondrial DNA fish[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2000, 24(4): 384–391. [肖武汉, 张亚平. 鱼类线粒体 DNA 的遗传与进化[J]. 水生生物学报, 2000, 24(4): 384–391.]
- [18] Li N, Chen S B, Xie Q L, et al. Polymorphisms of mitochondrial Cyt *b* gene and D-loop region in sweetfish (*Plecoglossus altivelis* Temminck et Schlegel) from Zhejiang and Fujian Provinces[J]. Hereditas, 2008, 30(7): 919–925. [李娜, 陈少波, 谢起浪, 等. 闽浙地区香鱼线粒体 Cyt *b* 基因和 D-loop 区序列多态性分析[J]. 遗传, 2008, 30(7): 919–925.]
- [19] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [20] Burland T G. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software[J]. Meth Mol Biol, 2000, 132: 71–91.
- [21] Jeanmougin F, Thompson J D, Gouy M, et al. Multiple sequence alignment with Clustal X[J]. Trends Biochem Sci, 1998, 23(12): 403–405.
- [22] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. Bioinformatics, 2009, 25(11): 1451–1452.
- [23] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis[J]. Evol Bioinform Online, 2005, 1: 47–50.
- [24] 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.
- [25] Wright S. Evolution in mendelian populations[J]. Bull Math Biol, 1990, 52(1): 241–295.
- [26] Deng C Y. Comparative analysis of Cyt *b* and D-loop sequence of mitochondrial DNA from four populations of *Carassius auratus*[J]. Modern Agricultural Sciences and Technology, 2015(9): 277–279. [邓朝阳. 鲫 4 个群体线粒体 Cyt *b* 序列和 D-loop 区的比较分析[J]. 现代农业科技, 2015(9): 277–279.]

Population-genetics analysis of the Japanese scallop *Patinopecten yessoensis* based on mitochondrial Cyt *b* gene

NI Shousheng^{1, 2, 3}, YANG Yu^{2, 3, 4}, LIU Shufang^{2, 3}, ZHUANG Zhimeng²

1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

3. Functional Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266200, China;

4. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China

Abstract: The introduced Japanese scallop *Patinopecten yessoensis* has been farmed in China, primarily along the coasts of the Bohai Sea and the North Yellow Sea, since the 1980s. Following the adaptation and localization of *P. yessoensis* in China, specific problems have appeared after several decades of aquafarming: especially low survival and slower grow. This can be associated with an effectively small population that experiences inbreeding, eventually leading to unknown degrees of decline in its genetic diversity after several generations. Consequently, it is important to carry out genetic diversity research on *P. yessoensis* in its main mariculture area of China. In this study, mitochondrial cytochrome-b (Cyt *b*) gene-sequencing techniques were used to determine genetic diversity and variations among six stocks of *P. yessoensis*: the bottom-sowing cultured stocks of Changdao, Haiyangdao and Zhangzidao; the natural stocks of Lüshun and Japan; and the artificial selected stock of Zhangzihong. A total of 20 haplotypes were found among 120 sequences of Cyt *b* gene from the six stocks of *P. yessoensis*. The minimum number of haplotypes was found in the Zhangzihong artificial breeding stock, and the maximum number occurred in the Japan Aomori Mutsu Bay stock, with a haplotype diversity (H_d) of 0.10000 and 0.88400, respectively. Analysis of molecular variance (AMOVA) showed the percentage of variation between the Japan and China groups was 15.34%, which was significantly higher than when measured as one genetic pool. For the China group, 83.41% of the genetic variation come from within the stocks, and only 1.52% of the variation was among the stocks in the group, indicating that genetic variation between individuals of the China group was higher than between the stocks. F_{st} analysis showed a moderate level of genetic variance among the Japan stock and China stocks (0.07455–0.17895, $F_{st} > 0.05$). The genetic distance between the six stocks of *P. yessoensis* was calculated based on the Tamura-Nei model; the maximum genetic distance was found between the Japan Aomori Mutsu Bay stock and the Haiyangdao bottom-sowing cultured stock; the minimum genetic distance was found between the Zhangzidao bottom-sowing cultured stock and the Zhangzihong artificial breeding stock. The UPGMA method was used to construct a phylogenetic tree based on genetic distances among the six stocks of *P. yessoensis*; the tree shows that the five China stocks clustered into a genetic branch, and then these clustered together with the Japan group. These results demonstrate obvious genetic differentiation between the China stocks and the Japan stock of this scallop. Moreover, genetic diversity was lower in the *P. yessoensis* China stocks as compared with the Japanese stock. The findings of this study could be usefully applied to scientific strategies for the protection, sustainable development and commercial utilization of scallop germplasm resources.

Key words: *Patinopecten yessoensis*; Cyt *b* gene; genetic structure; genetic diversity; germplasm resources

Corresponding author: LIU Shufang. E-mail: liusf@ysfri.ac.cn