

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2015.14239

4 个斧文蛤群体微卫星标记的遗传多样性分析

滕爽爽^{1,2}, 方军^{1,2}, 金文辉³, 肖国强^{1,2}, 邵艳卿^{1,2}, 柴雪良^{1,2,3}, 张炯明^{1,2}

1. 浙江省海洋水产养殖研究所, 浙江 温州 325001;

2. 浙江省近岸水域生物资源开发和保护重点实验室, 浙江 温州 325001;

3. 温州医科大学, 浙江 温州 325035

摘要: 为研究斧文蛤(*Meretrix lamarckii*)不同地理群体(浙江苍南群体、福建长乐群体、福建宁德群体以及广东汕头群体)的遗传结构和系统发生关系, 采用 13 对微卫星分子标记, 对 4 个不同地理群体进行了分析。结果显示, 13 对引物共检测出 63 个等位基因, 每个位点等位基因数(N_a)2~7 个, 平均每个位点观测等位基因数(N_o)为 4.87; 有效等位基因数(N_e)为 1.927~2.591; 平均观测杂合度(H_o)为 0.437~0.562; 平均期望杂合度(H_e)为 0.446~0.549; 平均多态信息含量(PIC)为 0.383~0.490; Hardy-Weinberg 平衡检验表明, 4 个群体的大部分微卫星位点都偏离平衡状态($P < 0.05$); UPMGA 聚类分析表明, 浙江苍南群体与福建宁德群体聚为一支, 福建长乐群体和广东汕头群体聚为一支; 群体间遗传变异指数 F_{st} 为 0.230 9, 表明 4 个斧文蛤群体间的遗传变异为 23.09%。研究表明, 斧文蛤 4 个不同地理群体遗传多样性处于中等多态水平; 4 个群体的遗传距离与它们实际的地理分布情况基本一致; 4 个地理群体间的变异较大, 遗传分化水平较高。该研究为斧文蛤种质资源的有效保存、管理和恢复提供了理论依据。

关键词: 斧文蛤; 微卫星; 遗传多样性

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2015)03-0580-08

斧文蛤(*Meretrix lamarckii*)隶属于瓣鳃纲(Bivalvia), 帘蛤目(Venerida), 帘蛤科(Veneridae), 文蛤属(*Meretrix*), 为亚热带、热带海产双壳底栖贝类, 常埋栖于潮下带至水深 20 m 的浅海沙质海底, 主要分布于我国东南沿海、台湾等地。沿海地区经济的快速发展, 沿岸海域环境的污染, 使海洋生物生境发生了变化, 再加上过度采捕, 导致斧文蛤资源遭到了严重破坏, 斧文蛤数量日趋减少并濒临枯竭。因此亟需对斧文蛤的自然资源进行管理、保护并开展人工增殖。目前关于斧文蛤人工繁育、增养殖技术等基础研究资料十分匮乏, 仅有张炯明等^[1]对斧文蛤开展了人工繁育试验, 董迎辉等^[2]利用电镜和荧光显微技术研究了斧文蛤精子超微结构和受精细胞学, 齐晓艳等^[3]研究了文蛤(*Meretrix meretrix*)微卫

星标记在斧文蛤中的通用性, 而对斧文蛤群体的遗传结构、遗传多样性的研究未见报道。

微卫星标记作为近年来使用最为广泛的分子标记之一, 具有数量多、多态性丰富、共显性、可重复性高以及分析方法简便、快捷等优点^[4], 在分析水产动物种群遗传结构中已被广泛使用, 如马氏珠母贝(*Pinctada fucata*)^[5]、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)^[6]、虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)^[7-8]、文蛤^[9-11]、皱纹盘鲍(*Haliotis discushanna*)^[12]、泥蚶(*Tegillarca granosa*)^[13]、缢蛏(*Sinonovacula constricta*)^[14-16]等。而斧文蛤在遗传多样性和遗传分化的研究报道仅限于潘宝平等^[17]、Chen 等^[18]利用线粒体 16S rRNA、COI 基因片段及核糖体 DNA 转录间隔区(ITS)进行系统分类的研究, 至

收稿日期: 2014-05-28; 修订日期: 2014-08-06.

基金项目: 海洋公益性行业科研专项子任务(201205021-5); 国家贝类产业技术体系项目(CARS-48).

作者简介: 滕爽爽(1983-), 女, 助理研究员, 研究方向为贝类遗传与育种. E-mail: tengjiayu925@aliyun.com

通信作者: 张炯明, 高级工程师. E-mail: zjm-9630@163.com

今未见有利用微卫星标记分析斧文蛤不同地理群体遗传多样性的报道。本研究分别采集了浙江、福建等地 4 个斧文蛤群体, 利用本实验室开发的斧文蛤 SSR 引物对 4 个群体进行比较分析, 以便对斧文蛤遗传多样性水平进行评估, 为斧文蛤种质资源的有效保存、管理和恢复提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

4 个不同地理群体斧文蛤分别采自浙江苍南 (CN, 60 个个体)、福建长乐 (CL, 40 个个体)、福建宁德 (ND, 45 个个体)和广东汕头 (ST, 62 个个体)。解剖斧文蛤样品, 取闭壳肌于无水乙醇中保存。

1.2 DNA 提取、PCR 扩增及产物检测

基因组 DNA 采用酚-氯仿法抽提, 提取出的 DNA 用 TE 溶解, 用紫外分光光度计测量浓度, 再配制成 100 ng/ μ L, 4 $^{\circ}$ C 备用。PCR 反应体系为 15 μ L, 包括 10 $\times$ PCR buffer 1.5 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 1.2 μ L, 10 μ mol/L 上下游引物各 1.5 μ L, *Taq* 酶(5 U/ μ L) 0.075 μ L, DNA 模板 1.5 μ L, 加 ddH₂O 至 15 μ L。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 热变性 30 s, 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 进行 30 个循环; 最后一步 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 扩增结束后将产物于 4 $^{\circ}$ C 保存。扩增产物用 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。本研究所采用的引物由本课题组开发设计而成^[19], 引物序列及退火温度见表 1。

表 1 斧文蛤 13 对微卫星引物序列信息
Tab. 1 Characteristics of 13 microsatellites for *Meretrix lamarkii*

位点 locus	引物序列 (5'-3') primer sequence (5'-3')	重复单元 repeat motif	退火温 度/ $^{\circ}$ C T_m	等位基 因数 N_a	观测杂合 度 H_o	期望杂 合度 H_e	多态信息 含量 PIC	序列号 GenBank access number
<i>Mel06</i>	F: GCAAATGGACTGCAAGGC R: TCGGTGAGAAGCGATTGA	(TA) ₆	48	2	0.15	0.14	0.13	KF195940
<i>Mel09</i>	F: ACTACTAGGAAGCTTCAT R: GACAGTTTGGTTAAGAAT	(ATG) ₆	43	5	0.65	0.69	0.56	KF195943
<i>Mel10</i>	F: GTGTATCTTAATTGTCGGTA R: TTTTGAAGTCAAAGGGAG	(AC) ₇	46	2	0.10	0.10	0.09	KF195940
<i>Mel12</i>	F: CATTATTAGGTGTCCTTTAG R: TTGCTTGTGTTTACTGAG	(CAGAA) ₄	44	3	0.40	0.35	0.31	KF195946
<i>Mel14</i>	F: GCCATAGTAGTCAGAGGG R: AGAGATTATAGTGAACAAAGC	(CATT) ₆	48	3	0.45	0.53	0.44	KF195948
<i>Mel15</i>	F: GAGGCTGTAGGTGGAAGG R: GGTGACGGGTTTGAAGAG	(CA) ₁₁	51	3	0.45	0.67	0.58	KF195949
<i>Mel17</i>	F: AAGGATTAGTAAAAAGCGTA R: ACCTGTAGCCAACAAGAA	(AT) ₇	44	3	0.40	0.35	0.31	KF195951
<i>Mel20</i>	F: CATTCCATTCTGTTAGTT R: CAATATGTCTTTTCCTTC	(AT) ₇	42	2	0.50	0.38	0.30	KF195954
<i>Mel21</i>	F: AAGCATAACATAGGAACG R: CTTACATTTTACCACGAA	(CA) ₇	42	2	0.35	0.30	0.25	KF195955
<i>Mel24</i>	F: GACTGGGACAGAGGCACC R: ACCCGAGGACAAATACGC	(GTT) ₄	45	3	0.60	0.60	0.51	KF195958
<i>Mel26</i>	F: TTTTACCTTTCCCGAATA R: GATGTTACGATGCCACTT	(AT) ₆	44	5	1.00	0.77	0.71	KF195960
<i>Mel27</i>	F: TATAGATTTTCCTTGTTTC R: TTCCTTGTTAAGTTTGCT	(TC) ₈	42	3	0.50	0.65	0.56	KF195961
<i>Mel28</i>	F: CTGCCACAGAATCATAGA R: CTTCAAATCAGCAACTCA	(AT) ₈	45	5	0.40	0.61	0.55	KF195962

1.3 数据统计

根据电泳图谱,并参照引物设计时预期片段的大小统计条带,应用 Popgene 1.32 软件计算等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、shannon 指数(I)、期望杂合度(H_e)和观察杂合度(H_o),并对每个位点偏离哈代-温伯格平衡值(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)进行卡方检验。多态信息含量(polymorphic information content, PIC)的计算参照 Botstein 等^[20]的方法,计算公式如下:

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n P_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2$$

其中: P_i 、 P_j 是某个位点第 i 、 j 个等位基因的基因频率, n 为该位点上的等位基因数。

2 结果与分析

2.1 斧文蛤 4 个地理群体各个位点的微卫星遗传结构分析

表 2 中给出了 13 对微卫星引物在 4 个群体中的实验分析结果。13 对引物在 4 个斧文蛤群体中分别检测到 57、45、52 和 45 个等位基因,基于不同群体检出的等位基因不一致,共检测出 63 个不同等位基因。其中位点 *Mel14* 和 *Mel28* 等位基因数最多,均为 7 个,表现为高度多态。图 1 和图 2 是不同位点在斧文蛤广东汕头群体中分离的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳图。位点 *Mel14* 在斧文蛤广东群体中分离得到 6 个等位基因,而位点 *Mel24* 在斧文蛤广东群体中只分离得到 2 个等位基因。每个位点等位基因数(N_a)为 2~7 个,平均每个位点等位基因数(N_a)为 4.87,有效等位基因数(N_e)为 1.927~2.591,平均观测杂合度(H_o)为 0.460~0.575,平均期望杂合度(H_e)为 0.469~

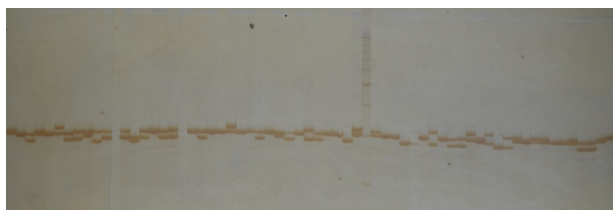


图 1 微卫星位点 *Mel14* 在斧文蛤广东汕头群体中的分离

Fig. 1 Segregation of locus *Mel14* in the population of *Meretrix lamarckii* from Shantou, Guangdong

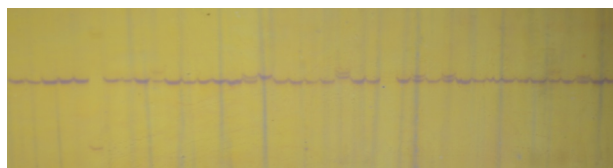


图 2 微卫星位点 *Mel24* 在斧文蛤广东汕头群体中的分离

Fig. 2 Segregation of locus *Mel24* in the population of *Meretrix lamarckii* from Shantou, Guangdong

0.548, 平均多态信息含量(PIC)为 0.402~0.493,说明 4 个群体遗传多样性处于中等偏上水平;Hardy-Weinberg 平衡检验发现,4 个群体的大部分微卫星位点都偏离平衡状态($P < 0.05$)。

2.2 斧文蛤不同群体间遗传分化

应用 Popgene 1.32 软件对 4 个斧文蛤群体进行了 F -统计量及基因流分析(表 3)。4 个斧文蛤群体中 *Mel10*、*Mel14*、*Mel15*、*Mel20*、*Mel26*、*Mel28* 等 6 个位点的近交系数 F_{is} 为正值,其余位点的近交系数 F_{is} 为负值; F_{is} 值为 -0.640 8~0.368 3,平均值为 -0.052 7。各位点的总群体近交系数为 -0.432 0~0.596 7,平均值为 0.190 4。度量群体间遗传差异程度的 F_{st} 为 0.069 1~0.555 8,平均值为 0.230 9,大于种间无遗传分化的标准($F_{st}=0 \sim 0.05$),基因流 N_m 为 0.199 8~3.366 9,平均值为 0.832 6,表现出较低的基因交流水平。

对 4 个群体的遗传相似度和遗传距离进行分析,结果如表 4。浙江苍南群体与福建宁德群体的遗传相似度最大,为 0.708 8;浙江苍南群体与福建长乐群体遗传距离最大,为 0.617 8。利用 MEGA 4 分析软件对 4 个群体进行聚类分析,获得聚类树图(图 3)。4 个斧文蛤群体分为 2 大支系,

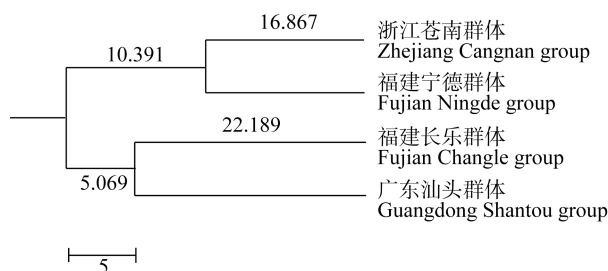


图 3 根据群体间遗传距离用 UPGMA 法构建的 4 个斧文蛤群体的系统进化树

Fig. 3 The phylogenetic tree based on genetic distances of 4 strains of *Meretrix lamarckii* by UPGMA assay

表 2 13 个微卫星位点在 4 个斧文蛤群体中的遗传多样性分析
Tab. 2 Genetic diversity analysis in four populations of *Meretrix lamarckii* for the 13 polymorphic loci

群体 population	参数 parameter	位点 locus													平均值 mean
		Mel106	Mel109	Mel110	Mel112	Mel114	Mel115	Mel117	Mel120	Mel121	Mel124	Mel126	Mel127	Mel128	
浙江苍南 CN	等位基因数 N_a	3	5	4	4	7	6	2	6	5	2	2	5	6	4.5
	有效等位基因数 N_e	2.247	3.301	1.387	1.425	3.145	4.480	1.926	3.418	3.219	1.185	1.586	2.773	3.594	2.620
	shannon 指数 I	0.885	1.296	0.597	0.572	1.470	1.565	0.674	1.409	1.243	0.292	0.556	1.129	1.448	1.010
	观测杂合度 H_o	0.978	0.667	0.208	0.256	0.400	0.615	0.804	0.921	0.612	0.171	0.362	0.922	0.388	0.527
	期望杂合度 H_e	0.561	0.704	0.282	0.302	0.692	0.787	0.486	0.717	0.696	0.158	0.374	0.646	0.729	0.548
	多态信息含量 PIC	0.457	0.639	0.266	0.271	0.652	0.739	0.365	0.660	0.626	0.144	0.301	0.574	0.677	0.493
	HWE	0.000	0.002	0.000	0.820	0.000	0.115	0.000	0.001	0.000	0.582	0.824	0.000	0.000	
福建长乐 CL	等位基因数 N_a	2	4	3	3	7	5	2	4	2	2	3	2	6	3.6
	有效等位基因数 N_e	1.271	2.533	1.497	1.899	2.903	3.093	1.998	2.193	2.000	1.832	1.454	2.000	3.126	2.210
	shannon 指数 I	0.369	1.033	0.625	0.750	1.372	1.284	0.693	1.043	0.693	0.647	0.597	0.693	1.409	0.862
	观测杂合度 H_o	0.182	0.703	0.389	0.636	0.658	0.321	0.900	0.357	1.000	0.697	0.250	0.375	0.526	0.568
	期望杂合度 H_e	0.216	0.614	0.337	0.481	0.664	0.689	0.508	0.554	0.507	0.461	0.317	0.508	0.689	0.527
	多态信息含量 PIC	0.190	0.526	0.307	0.386	0.616	0.619	0.375	0.507	0.375	0.351	0.290	0.375	0.648	0.448
	HWE	0.331	0.857	0.588	0.170	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.133	0.000	
福建宁德 ND	等位基因数 N_a	3	5	4	4	6	5	3	4	3	2	4	2	7	4.1
	有效等位基因数 N_e	1.346	2.868	1.380	1.829	2.748	3.215	2.160	2.232	2.213	1.810	1.715	1.427	3.788	2.282
	shannon 指数 I	0.508	1.236	0.589	0.785	1.229	1.349	0.832	0.948	0.863	0.640	0.742	0.476	1.587	0.907
	观测杂合度 H_o	0.211	0.974	0.256	0.539	0.605	0.429	0.974	0.290	0.921	0.622	0.359	0.367	0.564	0.575
	期望杂合度 H_e	0.261	0.661	0.279	0.459	0.645	0.699	0.544	0.561	0.555	0.454	0.422	0.305	0.746	0.527
	多态信息含量 PIC	0.241	0.588	0.262	0.389	0.584	0.645	0.429	0.469	0.445	0.347	0.364	0.255	0.704	0.457
	HWE	0.283	0.000	0.094	0.903	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.022	0.000	0.244	0.000	
广东汕头 ST	等位基因数 N_a	2	4	5	3	6	4	4	3	2	2	2	2	6	3.6
	有效等位基因数 N_e	1.200	2.191	1.431	2.016	2.438	2.657	1.584	1.940	1.656	1.362	1.895	1.523	3.164	1.988
	shannon 指数 I	0.306	0.964	0.629	0.732	1.180	1.137	0.748	0.719	0.585	0.436	0.665	0.527	1.431	0.774
	观测杂合度 H_o	0.150	0.516	0.224	0.914	0.590	0.382	0.417	0.261	0.544	0.316	0.412	0.441	0.509	0.460
	期望杂合度 H_e	0.168	0.548	0.304	0.508	0.595	0.629	0.372	0.490	0.400	0.268	0.477	0.347	0.690	0.469
	多态信息含量 PIC	0.153	0.476	0.282	0.385	0.545	0.569	0.347	0.377	0.318	0.231	0.361	0.285	0.652	0.402
	HWE	0.388	0.420	0.000	0.000	0.918	0.000	0.804	0.008	0.006	0.170	0.323	0.034	0.000	

表 3 13 个微卫星位点的固定指数及基因流
Tab. 3 Fixation index and gene flow of 13 polymorphic loci

位点 locus	群体内近交系数 F_{is}	总群体近交系数 F_{it}	群体间遗传分化系数 F_{st}	基因流 N_m
Me106	-0.2758	0.2679	0.4419	0.3158
Me109	-0.1447	-0.0656	0.0691	3.3669
Me110	0.0920	0.5967	0.5558	0.1998
Me112	-0.3560	-0.0303	0.2402	0.7908
Me114	0.1209	0.2519	0.1489	1.4286
Me115	0.3683	0.4285	0.0953	2.3734
Me117	-0.6408	-0.4320	0.1272	1.7150
Me120	0.2005	0.3744	0.2175	0.8994
Me121	-0.4424	-0.2431	0.1382	1.5591
Me124	-0.3638	0.0841	0.3284	0.5112
Me126	0.1200	0.4591	0.3853	0.3988
Me127	-0.1804	0.1142	0.2496	0.7516
Me128	0.2958	0.3710	0.1069	2.0892
平均值 mean	-0.0527	0.1904	0.2309	0.8326

表 4 4 个斧文蛤群体的 Nei's 遗传相似度和遗传距离
Tab. 4 Nei's genetic similarity and genetic distance between four *Meretrix lamarckii* populations

群体 population	浙江苍南 CN	福建长乐 CL	福建宁德 ND	广东汕头 ST
浙江苍南 CN	****	0.5391	0.7088	0.5763
福建长乐 CL	0.6178	****	0.5699	0.6381
福建宁德 ND	0.3442	0.5622	****	0.6224
广东汕头 ST	0.5511	0.4493	0.4742	****

注: 对角线以上为遗传相似度, 对角线以下为遗传距离。
Note: Nei's genetic similarity is above diagonal and genetic distance is below diagonal.

浙江苍南群体与福建宁德群体聚为一支, 福建长乐群体和广东汕头群体聚为一支。

3 讨论

3.1 斧文蛤群体的遗传多样性分析

本实验采用的 13 对引物来源于本课题组根据斧文蛤转录组测序数据, 筛选设计 28 对 SSR 引物^[19], 28 个 EST-SSR 位点之间没有显著的连锁不平衡关系, 除了位点 Me106 和 Me110 外, 其他位点均未偏离哈温平衡。本实验选取的 13 个位点包含了这两个偏离哈温平衡的位点。4 个群体的哈温平衡检测发现, 大部分位点偏离了哈温平衡, 这可能与样本数量不足或者存在无效等位基因 (null allele) 有关。13 对微卫星引物的多态信息含量为 0.09~0.71, 依据 Botstein 等^[20]的划分标准, 有 5 个位点为中度多态位点, 6 个位点为高度多态

位点, 这些微卫星位点在斧文蛤遗传多样性分析中可提供有效的信息。4 个斧文蛤群体的平均多态信息含量介于 0.402~0.493, 其中浙江苍南群体的平均多态信息含量最高, 为 0.493, 最接近 0.5; 4 个群体的平均多态信息含量均处于中度偏上水平, 具有较好的遗传变异。刘阳等^[21]对中华鳖 (*Trionys sinensis*) 5 个群体的微卫星分析中, 多态信息含量为 0.402~0.466; 吉磊等^[22]对卵形鲳鲹 (*Trachinotus ovatus*) 3 个养殖群体的微卫星分析中, 多态信息含量为 0.490~0.550; 他们的多态信息含量都低于 0.5 或者在 0.5 附近。原因有两方面: (1) 样品数量不够充足, 福建长乐群体 40 个, 福建宁德群体 45 个, 当时海边采集样品, 没有取到更多数量的斧文蛤, 因此不能更加准确地反映一个群体的遗传变异水平; (2) 引物 Me124 在 4 个群体中都只扩增出 2 个等位基因, 引物 Me127 在 3 个群体

中都只扩增出 2 个等位基因; 引物 Me106、Me117、Me121、Me126 分别在 2 个群体中都只扩增出 2 个等位基因, 推测这些引物本身多态信息含量低或者是保守位点。

3.2 斧文蛤群体的遗传分化

根据 Nei's 指数法对斧文蛤 4 个群体的遗传结构进行遗传距离和遗传相似性统计分析, 浙江苍南群体与福建宁德群体遗传相似性最大(0.708 8), 遗传距离最小(0.344 2), 聚为一支; 福建长乐群体和广东汕头群体遗传相似性次之(0.638 1), 遗传距离亦次之(0.449 3), 聚为一支。遗传距离远近与它们实际的地理距离基本一致。邵艳卿等^[23]对泥蚶 6 个群体的遗传分析, 也得出地理距离较近的群体间遗传距离较近的结论; 牛东红等^[24]对缢蛏 6 个群体遗传结构进行分析, 认为亲缘关系大致反映了各个群体的地理位置关系, 地理位置较远的群体, 遗传距离也较远; 郭昱嵩等^[25]利用微卫星标记对多鳞鱻(*Sillago sihama*) 4 个野生地理群体进行遗传结构分析, 得出遗传距离与地理距离呈正相关关系的结论; 朱滔等^[26]利用微卫星标记对 3 个翘嘴鲈(*Siniperca chuatsi*) 群体的遗传分析, 也得出其遗传距离与地理分布一致的结论。因此, 运用 Nei's 遗传相似性和遗传距离分析, 可以明确群体间的亲缘关系远近, 为避免生产中的近亲繁殖导致种质退化提供遗传学依据。

斧文蛤 4 个群体间的遗传分化系数 F_{st} 为 0.230 9, 表明斧文蛤 4 个地理群体 23.09% 遗传变异来自群体间, 76.91% 的变异来自群体内部。斧文蛤 4 个不同地理群体遗传分化水平较高, 分析其原因有两个: (1) 与斧文蛤本身的生活习性特点有关, 斧文蛤埋栖于潮下带至浅海的沙质海底, 自身不能随意移动, 因而生活地理位置基本保持不变; (2) 斧文蛤尚未开展人工养殖, 虽有少量室内人工繁育试验的开展^[1], 但未对斧文蛤野生群体造成人为基因流。

3.3 斧文蛤种质资源的保护

本研究中的 4 个群体均来自当地的野生群体, 群体间的遗传分化水平较高, 群体之间遗传物质互相污染程度较小, 来自不同区域的野生群体的

种质资源较好。但是, 本研究所用的群体数量有限, 而国内关于斧文蛤种质资源的研究非常匮乏, 因此对斧文蛤的种质资源也不能过分乐观。为了更好地保护当地野生斧文蛤种质资源, 应加强对国内斧文蛤群体的调查、取样、保存及遗传学研究, 彻底查清斧文蛤的种质资源状态, 制定合理的保护措施, 做好资源保护、繁育及资源恢复等工作。

参考文献:

- [1] Zhang J M, Xiao G Q, Shao Y Q, et al. *Meretrix lamarckii* artificial breeding technology test [C]. Chinese Animal Society, Chinese Society for Oceanology and Limnology. The Ninth Congress of the Shellfish and the Fifteenth Academic Conference Abstracts, 2011. [张炯明, 肖国强, 邵艳卿, 等. 斧文蛤(*Meretrix lamarckii*)人工繁育技术试验[C]. 中国动物学会. 中国海洋湖沼学会贝类学分会第九次会员代表大会暨第十五次学术讨论会会议摘要集, 2011.]
- [2] Dong Y H, Lin Z H, Yao H H. Studies on ultrastructure of spermatozoon and cytological change of nuclear behavior on fertilization in *Meretrix lamarckii* [J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(3): 356–364. [董迎辉, 林志华, 姚韩韩. 斧文蛤精子超微结构与受精过程的细胞学变化[J]. 水产学报, 2011, 35(3): 356–364.]
- [3] Qi X Y, Dong Y H, Yao H H, et al. Identification of 30 microsatellite markers in *Meretrix meretrix* and their transferability in *Meretrix lamarckii* and *Meretrix lyrata* [J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(8): 1147–1154. [齐晓艳, 董迎辉, 姚韩韩, 等. 文蛤 30 个微卫星标记的开发及在斧文蛤和帘文蛤中的通用性检测[J]. 水产学报, 2013, 37(8): 1147–1154.]
- [4] Powell W, Machray G C, Provan J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats [J]. Trends Plant Sci, 1996, 1: 215–222.
- [5] Guan Y Y, Liu W G, He M X. Genetic variation during four generations of selective breeding in the pearl oyster *Pinctada fucata* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(4): 764–770. [管云雁, 刘文广, 何毛贤. 马氏珠母贝选育群体 4 个世代的遗传变异[J]. 中国水产科学, 2013, 20(4): 764–770.]
- [6] Li H L, Song L S, Liu B Z, et al. Studies on the genetic structure of different population of *Chlamys farreri* and their hybrids' heterosis [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2002, 33(2): 188–195. [李红蕾, 宋林生, 刘宝忠, 等. 栉孔扇贝不同种群的遗传结构及其杂种优势[J]. 海洋与湖沼, 2002, 33(2): 188–195.]
- [7] Zhao Y Y, Zhu X C, Sun X W, et al. Microsatellite enrich-

- ment by magnetic beads in Japanese scallop, *Patinopecten yessoensis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(5): 749–755.[赵莹莹, 朱晓琛, 孙效文, 等. 磁珠富集法筛选虾夷扇贝微卫星序列[J]. 中国水产科学, 2006, 13(5): 749–755.]
- [8] 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.]
- [9] Lu X, Wang H X, Liu B Z, et al. Microsatellite-based genetic and growth analysis for a diallel mating design of two stocks of the clam, *Meretrix meretrix*[J]. Aquacult Res, 2012, 43(2): 260–270.
- [10] Zhu D L, Dong Y H, Lin Z H, et al. Genetic analysis among four strains of different shell colors and decorative patterns of *Meretrix Meretrix* using microsatellite markers[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(2): 202–209.[朱东丽, 董迎辉, 林志华, 等. 利用微卫星标记对文蛤 4 个壳色花纹品系的遗传分析[J]. 水产学报, 2012, 36(2): 202–209.]
- [11] Chen S Y, Ji H J, Xu G P, et al. Microsatellite enrichment by magnetic beads in *Meretrix Meretrix* and characteristic analysis[J]. Biotechnology Bulletin, 2009(12): 134–138, 143.[陈淑吟, 吉红九, 许广平, 等. 文蛤微卫星 DNA 的筛选及其特性分析[J]. 生物技术通报, 2009(12): 134–138, 143.]
- [12] Li L, Sun Z X, Yang S D, et al. Analysis of genetic variation of abalone (*Haliotis discus hannai*) populations with microsatellite markers[J]. Hereditas, 2006, 28(12): 1549–1554.[李莉, 孙振兴, 杨树德, 等. 用微卫星标记分析皱纹盘鲍群体的遗传变异[J]. 遗传, 2006, 28(12): 1549–1554.]
- [13] Liu B, Teng S S, Shao Y Q, et al. Isolation and characterization of 39 novel polymorphic EST-SSR loci for the blood clam, *Tegillarca granosa*[J]. Conserv Genet Res, 2012, 4(2): 375–378.
- [14] Liu B, Shao Y Q, Teng S S, et al. Genetic variation of cultured population structure in *Sinonovacula constricta* using microsatellites[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(2): 69–73.[刘博, 邵艳卿, 滕爽爽, 等. 乐清湾养殖缢蛭群体遗传结构的微卫星标记分析[J]. 中国农学通报, 2012, 28(2): 69–73.]
- [15] Liu B, Shao Y Q, Teng S S, et al. Characterization, development and utilization of EST-derived microsatellites in *Sinonovacula constricta*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2012, 43(1): 132–137.[刘博, 邵艳卿, 滕爽爽, 等. 缢蛭 EST-SSR 分布特征及引物开发利用[J]. 海洋与湖沼, 2012, 43(1): 132–137.]
- [16] Liu B, Shao Y Q, Wang K, et al. microsatellite analysis of genetic diversity and phylogenetic relationship of four different geographica population of *Sinonovacula constricta*[J]. Marine Sciences, 2013, 37(8): 96–102.[刘博, 邵艳卿, 王侃, 等. 4 个缢蛭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.]
- [17] Pan B P, Wu Q, Zhang S P, et al. Molecular phylogeny of *Meretrix* (mollusca bivalvia) based on 16SrRNA 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.]
- [18] Chen A H, Li Z X, Feng G N. Phylogenetic relationships of the Genus *Meretrix* (Mollusca: Veneridae) based on mitochondrial COI gene sequences[J]. Zool Res, 2009, 30(3): 233–239.
- [19] Liu B, Teng S S, Chai X L, et al. Characterization of 28 polymorphic SSR loci from *Meretrix lamarkii* Deshayes[J]. Conserv Genet Res, 2014, 6(1): 13–15.
- [20] 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.
- [21] Liu Y, Shi Y, Zhu X P, et al. Genetic diversity in five populations of *Trionyx sinensis* revealed by microsatellite markers[J]. Genomics and Applied Biology, 2012, 31(2): 141–146.[刘阳, 史燕, 朱新平, 等. 中华鳖 5 个群体遗传多样性的微卫星分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2012, 31(2): 141–146.]
- [22] Ji L, Ou Y J, Li J E. Genetic polymorphism of three cultured populations of golden pompano *Trachinotus ovatus* as revealed by microsatellites[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2011, 30(3): 62–68.[吉磊, 区又君, 李加儿. 卵形鲳鲹 3 个养殖群体的微卫星多态性分析[J]. 海洋生物学, 2011, 30(3): 62–68.]
- [23] Shao Y Q, Chai X L, Dong Y H, et al. The effect of geographical distance on gene flow: Case study of 6 *Tegillarca granosa* populations using AFLPs[C]. Chinese Animal Society, Chinese Society for Oceanology and Limnology, the Fourteenth Congress of the Shellfish Academic Conference Abstracts, 2009.[邵艳卿, 柴雪良, 董迎辉, 等. 地理距离对基因流的影响: 6 个泥蚶群体的 AFLP 分析[C]. 中国动物学会. 中国海洋湖沼学会贝类学分会第十四次学会研讨会论文摘要汇编, 2009.]
- [24] 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.]
- [25] Guo Y S, Yan C Z, Zhang Y L, et al. SSR analysis in four wild populations of silver sillago *Sillago sihama*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 4(2): 267–276.[郭昱嵩, 颜程钟, 张宇岚, 等. 多鳞鱖(*Sillago sihama*)4个野生地理群体的微卫星标记分析[J]. 海洋与湖沼, 2013, 4(2): 267–276.]
- [26] Zhu T, Liang X F, Peng M Y, et al. Isolation and characterization of polymorphic EST-SSRs markers in three *Siniperca chuatsi* population[J]. *Journal of Jinan University: Natural Science*, 2013, 34(3): 347–352.[朱滔, 梁旭方, 彭敏燕, 等. 翘嘴鲌EST-SSR标记的开发及3个群体遗传多态性分析[J]. 暨南大学学报: 自然科学版, 2013, 34(3): 347–352.]

Analysis of genetic diversity in four different *Meretrix lamarckii* geographical populations using microsatellite markers

TENG Shuangshuang^{1,2}, FANG Jun^{1,2}, JIN Wenhui³, XIAO Guoqiang^{1,2}, SHAO Yanqing^{1,2}, CHAI Xueliang^{1,2,3}, ZHANG Jiongming^{1,2}

1. Zhejiang Mariculture Research Institute, Wenzhou 325001, China;

2. Zhejiang Key Laboratory of Exploitation and Preservation of Coastal Bio-resource, Wenzhou 325001, China;

3. Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China

Abstract: Thirteen polymorphic microsatellite markers were examined in four different *Meretrix lamarckii* geographical populations to assess the naturally occurring *Meretrix lamarckii* resource. The four populations were sampled in Cangnan City, Zhejiang Province; Changle City, Fujian Province; Ningde City, Fujian Province; and Shantou City, Guangdong Province. Sixty-three alleles were found in the 13 microsatellite markers. Allele number per locus was 2–7, and the mean number of alleles was 4.87. Mean effective number of alleles, mean observed and expected heterozygosity, and mean polymorphism information content were 1.927–2.591, 0.437–0.562, 0.446–0.549, and 0.383–0.490, respectively. All of these genetic indices indicate medium genetic diversity in the four populations. The Hardy-Weinberg balance test showed that most of the microsatellite sites in the four populations deviated from equilibrium ($P < 0.05$). An unweighted pair group method with arithmetic mean cluster analysis indicated that the Cangnan population clustered with the Ningde population into one clade, and the Changle and Shantou populations were in a second group, which was consistent with their actual geographical locations. The F_{st} value was 0.230 9, suggesting that the genetic variation in the four *M. lamarckii* populations was 23.09%, which was high, and that the genetic differentiation level was high.

Key words: *Meretrix lamarckii*; microsatellite; genetic diversity

Corresponding author: ZHANG Jiongming. E-mail: zjm-9630@163.com