

辽宁沿海5个毛蚶群体遗传多样性的ISSR分析

赵文*, 张雷, 毕进红

(大连海洋大学辽宁省水生生物学重点实验室, 辽宁 大连 116023)

摘要: 采用ISSR技术,对辽宁沿海5个毛蚶群体的遗传多样性进行了研究。在选择的12个随机引物中共检测到137个扩增片段,长度在200~2500 bp,每个个体获得的扩增条带在9~15条不等。利用POPGEN 3.2和MEGA 2统计软件,获得实验数据,确立了5个群体间的亲缘关系。结果表明,毛蚶5个地理群体分化不明显,没有形成不同的地理种群;聚类分析显示,丹东和庄河亲缘关系最近,然后依次为金州、营口、锦州;5个群体无论是在多态位点比例还是在平均杂合度上都处于较高水平,说明毛蚶当前种质资源状况良好,遗传多样性水平较高。

关键词: 毛蚶; 遗传多样性; ISSR

中图分类号: S 917

文献标志码: A

毛蚶(*Scapharca subcrenata*)俗称毛蛤、麻蚶等,隶属于软体动物门(Mollusca)、瓣鳃纲(Lanellibranchia)、异齿亚纲(Heterodonta)、蚶目(Areoida)、蚶科(Aridae),是中国和日本等国家海域常见的经济贝类^[1]。近年来,由于人们滥采滥捕,再加上环境污染,致使毛蚶天然资源日趋衰竭,毛蚶遗传多样性和资源保护利用的研究已十分必要。海洋经济动物群体遗传多样性有助于人们更加清楚地认识和了解海洋生物资源状况,从而为采取适当策略保护和合理利用现有资源提供理论指导,也可用于推测和掌握群体内遗传变异水平、群体间的遗传分化状况和系统发生关系,从而为海洋生物的分类学分类学和系统进化研究提供参考。目前,关于海湾扇贝(*Argopecten irradians*)^[2-8]、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)^[2,9-13]、虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)^[2,14-16]、菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)^[17]、文蛤(*Meretrix meretrix*)^[19]、马氏珠母贝(*Pinctada martensi*)^[20]、魁蚶(*Anadara uropygimelana*)^[21]和巨蜆属牡蛎(*Crassostrea*)^[22]等海洋双壳贝类、对虾^[23]和刺参^[24]等海洋经济动物群体遗传多样性已有很多报道。关于毛蚶遗传多样性的研究报道较少^[25],本文采用了ISSR(inter-simple sequence repeat)分子

标记的方法对辽宁沿海五个地理群体的毛蚶进行了分析,旨在为其资源可持续利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

2008年3月至6月从辽宁沿海的锦州、丹东、营口、金州、庄河各采集毛蚶30枚,将其活体带回实验室,测量壳长、壳高和体质量等形态参数(表1)。

1.2 药品与仪器

EDTA,十二烷基硫酸钠,Tris碱,蛋白酶K,饱和酚,氯仿,异戊醇,乙酸,琼脂糖,溴酚蓝,蔗糖,3 mol/L 乙酸钠,溴化乙锭,Tris-乙酸,dNTP Mix, *Taq* DNA Polymerase, ISSR Primers。超速离心机,PCR仪,电子天平,电泳装置,凝胶成像系统,灭菌锅,加样枪。

1.3 总DNA的提取

将毛蚶活体取回实验室,剪其腹足,用双蒸水冲掉泥砂,剪碎后放入匀浆器中,加入预冷双蒸水(灭菌)在冰浴中研磨。把研磨好的匀浆放入1.5 mL离心管中,加0.5 mL TE溶液,25 μ L 10%的SDS,10 μ L蛋白酶K,混匀后放入恒温箱中。在55 $^{\circ}$ C恒温箱中消化2~4 h,在消化的过程中,间

收稿日期:2010-12-07 修回日期:2011-03-19

资助项目:国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD09A01);辽宁省教育厅创新团队项目(2007T016)

通讯作者:赵文, E-mail: zhaowen@dlou.edu.cn

隔一段时间颠倒离心管,使消化完全。当2~4 h后,匀浆液变得澄清,说明消化完全,取出离心管。加入等体积的饱和酚,缓慢混匀20 min,10 000 r/min离心10 min。

表1 毛蚶5个群体的表型性状
Tab.1 Phenotypic traits of 5 stocks of *S. subcrenata*

性状 trait	群体 stock				
	锦州 Jinzhou	丹东 Dandong	金州 Jinzhou, Dalian	营口 Yingkou	庄河 Zhuanghe, Dalian
壳长/mm shell length	39.00 ± 2.89	46.34 ± 4.72	55.13 ± 3.22	31.72 ± 2.96	42.46 ± 2.63
壳高/mm shell height	32.47 ± 3.01	35.92 ± 3.76	37.04 ± 1.50	26.59 ± 2.84	34.48 ± 3.15
体重/g body weight	24.61 ± 5.13	30.88 ± 8.39	24.79 ± 2.84	19.25 ± 5.69	30.53 ± 5.84

用剪掉头的枪头吸取上清液于另一离心管中(不可吸取蛋白层),加入等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)混合液,再次混匀20 min,12 000 r/min离心10 min,重复两次。

取上清液,加入氯仿:异戊醇(24:1)混合液混匀20 min,12 000 r/min离心10 min。

取上清液加入1/20体积的3 mol/L(pH = 5.2)NaAc,2倍体积冷的无水乙醇,混匀后可出现白色絮状DNA团块。3 000 r/min离心1 min,使DNA贴在离心管管底,用75%乙醇充分洗涤后,倒出乙醇,自然干燥后加入TE或双蒸水100 μL溶解,置于4℃存放。

1.4 DNA模板的鉴定

取所提DNA样品5 μL, *Hind* III DNA Marker(上海生工生物工程有限公司)作标准分子量,0.8%琼脂糖凝胶,80 V电泳40 min,用凝胶成像系统拍照,检查DNA有无smear现象。DNA浓度的测定基于本实验样品数目大小和实验条件的原因,无法用紫外分光光度计来检测DNA的准确含量。本实验采用了溴化乙锭荧光法来测定DNA的含量。凝胶电泳中所使用的溴化乙锭可以嵌入DNA中,溴化乙锭在紫外光激发下可以发出荧光,而且,荧光的强度和DNA的总含量成正比。Marker每条带的荧光强度都是已知的,可以通过对比样品和Marker的荧光强度,算出样品DNA大概的含量。具体操作如下:取DNA样品5 μL, *Hind* III DNA Marker做标准分子量,0.8%琼脂糖凝胶,80 V电泳40 min,用凝胶成像系统拍照,根据Marker每条带的DNA含量估计出样品DNA的浓度。

1.5 ISSR引物的筛选

ISSR引物 购于上海生工生物工程有限公司。分别从5个群体中任选1个个体用于引物筛选,筛选出的引物序列见表2。

表2 ISSR引物序列
Tab.2 The sequences of primers of ISSR

引物 primer	序列 sequence
ISSR1	VHV(CA) ₈
ISSR2	VHV(gT) ₇
ISSR3	(Ag) ₈ YC
ISSR4	(Ag) ₈ g
ISSR5	(gA) ₈ C
ISSR6	(gTg)C
ISSR7	(AC) ₈ T
ISSR8	(AC) ₈ Tg
ISSR9	(Ag) ₈ Tg
ISSR10	(Tg) ₈ g
ISSR11	(Ag) ₈ C
ISSR12	(AC) ₈ C

ISSR反应条件 反应体系25 μL,2.5 μL 10 × Buffer、1.5 mmol/L MgCl₂、200 nmmol/L ISSR引物、2%甲酰胺、1 U *Taq* 酶、0.10 mmol/L dNTPs、10 ng DNA、加双蒸水至总体积25 μL。反应程序为94℃预变性5 min,39个循环(94℃ 30 s,52℃ 1 min,72℃ 2 min),最后72℃延伸7 min。扩增产物在含有EB的2%琼脂糖凝胶中电泳检测,凝胶成像系统观察并拍照,用DL2000作为分子量标记。

ISSR数据处理 ISSR为显性标记,同一引物扩增产物中电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性,按扩增阳性(1)和扩增阴性(0)来记录电泳带谱,PCR扩增的电泳结果也就成了0、1数据矩阵。将每一扩增条带看作具有2个等位基因(0和1)的位点,然后假设所研究的居群内基因频率处于Hardy-Weinberg平衡,利用平衡定律 $P^2 + Q^2 + 2PQ = 1$ (P 为显性基因频率、 Q 为隐性基因频率)计算各基因的频率(基因频率矩阵)后用于下一步统计。随机扩增多态DNA片段共享

度根据 Nei 公式: $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, 其中 F 为共享度即遗传相似系数, N_{xy} 为 X 和 Y 两个群体共有的扩增带; N_x 、 N_y 为 X 和 Y 群体分别拥有的扩增带。根据 $D = 1 - F$ 算出两个群体之间的平均遗传距离指数。利用 POPGEN 3.2 软件计算, 得出以下遗传多样性指标, 遗传距离 (genetic distance, D)、遗传相似系数 (genetic similarity, S)、平均观测等位基因数 (observed number of alleles, N_a)、平均有效等位基因数 (effective number of alleles, N_e)、平均基因多样性指数即平均杂合度 (Nei's gene diversity, H_t)、平均 Shannon 多样性指数 (Shannon's information index, I) 以及基因流 (gene flow) 的估计值 N_m 、遗传分化系数 (coefficient of gene differentiation, G_{ST})。分别用 MEGA2 和 PHYLIP-3.28 程序中

的 UPGMA 法构建聚类分析图。

2 结果

从 30 个引物中筛选出 12 个能扩增出清晰可辨条带的引物。对 5 个群体的毛蚶共 150 个个体进行了多态性扩增, 共获得 137 个基因座位, 其中有 104 个座位为多态性座位, 所占比率为 76.2%, 单个个体获得的标记数为 9~15, 平均单个引物获得多态性座位为 11.4 个, 扩增片段长度大多在 200~2 500 bp。用 POPGEN 3.2 分别计算整个群体、5 个地理群体之间、5 个群体内个体之间的基因多态性以及整个群体之间的基因流。由遗传距离通过 MEGA 2 中的 UPGMA 进行聚类分析。

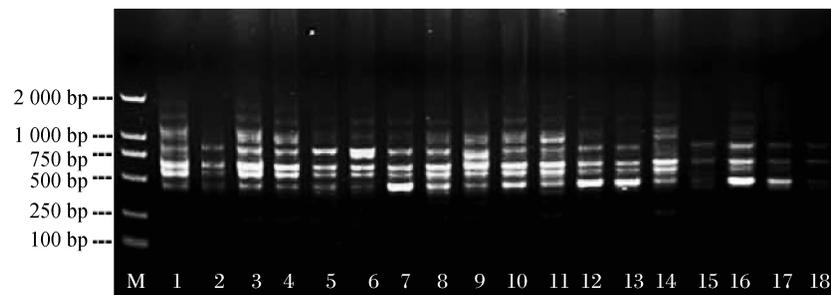


图1 锦州群体 ISSR12 引物扩增结果电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis profiles of ISSR marker of Jinzhou stocks

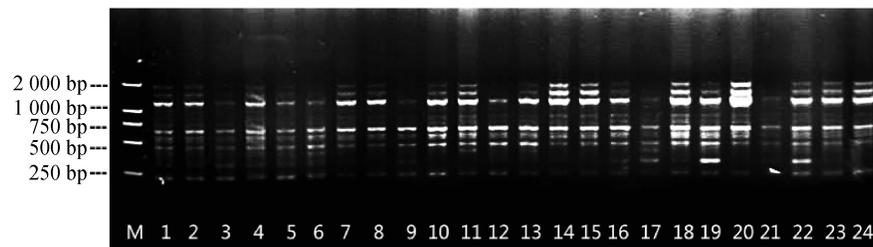


图2 金州群体 ISSR9 引物扩增结果电泳图谱

Fig. 2 Electrophoresis profiles of ISSR marker of Jinzhou, Dalian stocks

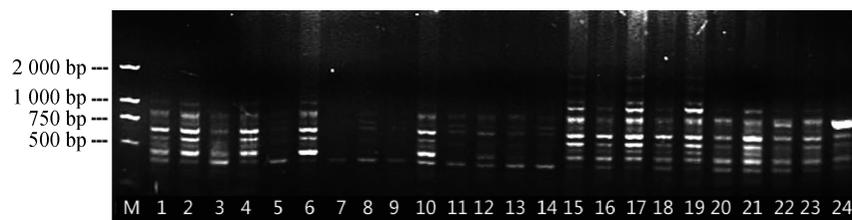


图3 营口群体 ISSR5 引物扩增结果电泳图谱

Fig. 3 Electrophoresis profiles of ISSR marker of Yingkou stocks

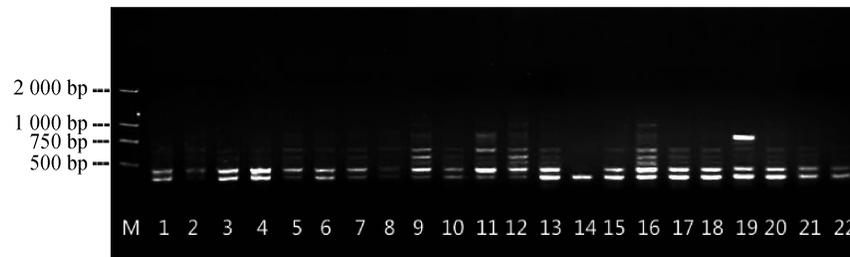


图4 丹东群体 ISSR5 引物扩增结果电泳图谱 (M 代表 PCR Marker)

Fig. 4 Electrophoresis profiles of ISSR marker of Dadong stocks

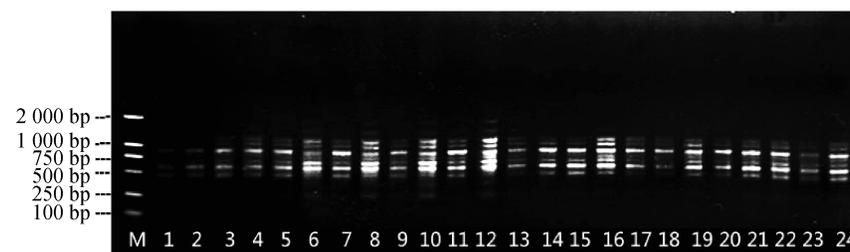


图5 庄河群体 ISSR5 引物扩增结果电泳图谱 (M 代表 PCR Marker)

Fig. 5 Electrophoresis profiles of ISSR marker of Zhuanghe, Dalian stocks

2.1 5个地理群体内的遗传多样性

12个引物对5个地理群体扩增所获得的多态性基因座位数和比率见表3,多态性座位最多的是锦州群体,106条。最少的是金州和庄河,102条。在ISSR扩增反应中,这五个群体获得多态性座位比率分别为75.10%、76.64%、74.45%、77.37%和74.45%。

5个群体的基因多样性见表4, N_a 值介于1.7445~1.7737,平均值为1.7562; N_e 值介于1.5528~1.6046,平均值为1.5746; H_i 值介于0.3092~0.3301,平均值为0.3197; I 值介于0.4482~0.4728,平均值为0.4620;锦州群体的 H_i 值和 I 值在这5个群体中最高,因此,锦州群体的遗传多样性在这5个群体中最高。

表3 5个地理群体多态性位数及比率
Tab. 3 The number of polymorphic loci and their percentage of them of the 5 stocks

群体 stock	多态基因座位数目 number of polymorphic loci	多态基因座位比率/% percentage of polymorphic loci
锦州 Jinzhou	106	77.37
丹东 Dandong	105	76.64
金州 Jinzhou, Dalian	102	74.45
营口 Yingkou	103	75.10
庄河 Zhuanghe, Dalian	102	74.45

表4 5个地理群体内的遗传多样性

Tab. 4 The genetic diversity of the 5 stocks

群体 stock	N_a	N_e	H_i	I
锦州 Jinzhou	1.7518	1.6046	0.3301	0.4728
丹东 Dandong	1.7664	1.5650	0.3178	0.4617
金州 Jinzhou, Dalian	1.7445	1.5528	0.3092	0.4482
营口 Yingkou	1.7737	1.5713	0.3208	0.4658
庄河 Zhuanghe, Dalian	1.7445	1.5793	0.3204	0.4615
平均 mean	1.7562	1.5746	0.3197	0.4620

2.2 5个群体间的遗传多样性

ISSR扩增获得的5个群体间的基因多样性和基因流见表5。 N_a 值的范围是1.8832~1.9489,平均值为1.9150; N_e 值介于1.5965~1.7214,平均值为1.6188; H_i 值介于0.3400~0.3983,平均值为0.3514; I 值介于0.5014~0.5738,平均值为0.5166;其中,丹东和庄河群体间的 H_i 和 I 最小,分别为0.3400和0.5014;锦州和丹东间的 H_i 和 I 则最大,分别为0.3983和0.5738。

N_m 值的范围介于2.1795~7.3907,平均值为5.6215,其中,丹东和庄河群体间基因流水平最高,为7.3907;而锦州和丹东间基因流水平最低,仅为4.8310,这与丹东和庄河间 G_{ST} 最小,锦州和丹东间 G_{ST} 最大是对应的。这说明了在两两随机的五个群体之间,丹东和庄河群体之间的遗传多样性水平最低,而锦州和丹东群体的遗传多样性水平最高。

表 5 5 个地理群体之间的基因多样性和基因流
Tab. 5 The N_m and gene diversity between the 5 stocks

群体 stock	N_a	N_c	H_t	I	G_{ST}	N_m
锦州—丹东 Jinzhou-Dandong	1.934 3	1.721 4	0.398 3	0.573 8	0.186 6	2.179 5
锦州—金州 Jinzhou-Jinzhou, Dalian	1.934 3	1.600 9	0.347 5	0.515 4	0.093 8	4.831 0
锦州—营口 Jinzhou-Yingkou	1.883 2	1.609 7	0.345 7	0.507 1	0.071 9	6.457 1
锦州—庄河 Jinzhou-Zhuanghe, Dalian	1.897 8	1.608 7	0.346 1	0.508 8	0.073 3	6.325 0
丹东—金州 Dandong-Jinzhou, Dalian	1.905 1	1.596 5	0.342 3	0.501 7	0.074 2	6.235 8
丹东—营口 Dandong-Yingkou	1.927 0	1.608 7	0.346 8	0.511 9	0.075 0	6.167 3
丹东—庄河 Dandong-Zhuanghe, Dalian	1.883 2	1.607 6	0.340 0	0.501 4	0.063 4	7.390 7
金州—营口 Jinzhou, Dalian-Yingkou	1.948 9	1.607 1	0.348 9	0.517 4	0.087 8	5.193 6
金州—庄河 Jinzhou, Dalian-Zhuanghe, Dalian	1.905 1	1.607 7	0.346 0	0.509 5	0.080 8	5.691 8
营口—庄河 Yingkou-Zhuanghe, Dalian	1.927 0	1.619 2	0.352 4	0.519 0	0.080 1	5.742 8
平均 mean	1.915 0	1.618 8	0.351 4	0.516 6	0.088 7	5.621 5

从表 6 可以看出,辽宁沿海 5 个地理群体的毛蚶具有较高的遗传多样性水平,而且存在着基因流动, $G_{ST}=0.116 4 < 0.5$,说明了由于基因流的作用,群体内的变异要远大于群体间的变异,而成为了变异的主要方式。

表 6 5 个地理群体的基因多样性及基因流
Tab. 6 The N_m and genetic diversity of the 5 stocks

N_a	N_c	H_t	I	G_{ST}	N_m
1.744 5	1.579 3	0.320 4	0.461 5	0.116 4	3.797

2.3 5 个群体间的 + 遗传相似系数和遗传距离 ISSR 扩增获得群体间的遗传相似系数和遗传

距离见表 7。遗传距离在 0.066 0 ~ 0.102 4,平均值为 0.084 5,遗传相似系数在 0.902 7 ~ 0.936 2,平均值为 0.919 1;其中,锦州和丹东间的遗传相似系数最小,为 0.902 7,遗传距离最大,为 0.102 4;而丹东和庄河间由于存在高水平的基因流,遗传相似系数最大,为 0.936 2,遗传距离最小,为 0.066。通过比较不同组合之间的各项指标发现,基因流水平的高低、遗传相似性的程度和群体之间的地理距离有关,地理位置离的越远的群体,基因流水平越低,遗传分化指数越高,遗传相似系数越小;相反,地理距离越近的两群体,基因流水平越高,遗传分化指数越小,遗传相似性就越大。

表 7 5 个地理群体之间的遗传相似系数和遗传距离
Tab. 7 The genetic identity and genetic distance between the 5 stocks

群体 stock	锦州 Jinzhou	丹东 Dandong	金州 Jinzhou, Dalian	营口 Yingkou	庄河 Zhuanghe, Dalian
锦州 Jinzhou	****	0.902 7	0.904 9	0.926 8	0.925 4
丹东 Dandong	0.102 4	****	0.926 4	0.923 4	0.936 2
金州 Jinzhou, Dalian	0.100 0	0.076 5	****	0.910 1	0.918 1
营口 Yingkou	0.076 0	0.079 6	0.094 2	****	0.916 5
庄河 Zhuanghe, Dalian	0.077 6	0.066 0	0.085 5	0.087 2	****

根据表 7 得到的遗传距离,应用 MEGA 2 统计软件,通过 UPGMA 法得到聚类分析图(图 6)。从图 6 中可以清晰的看出,丹东和庄河群体的亲缘关系近,锦州和营口群体的亲缘关系近,金州与丹东和庄河的亲缘关系较近。

图 7 是根据 5 个地理群体遗传距离,应用 PHYLIP-3.68 中的 Neighbor 中 UPGMA 构建聚类分析图。

由图 6、图 7 可知,根据 5 个地理群体遗传距离,应用不同的软件构建的系统进化树结果一致。

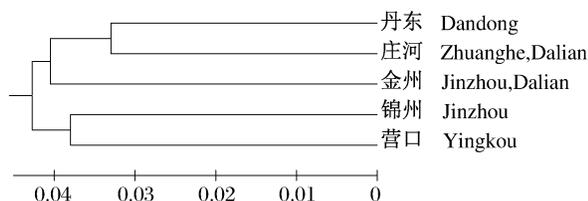


图6 5个地理群体系统进化树

Fig. 6 The cluster analysis of the five different stocks based on genetic distance

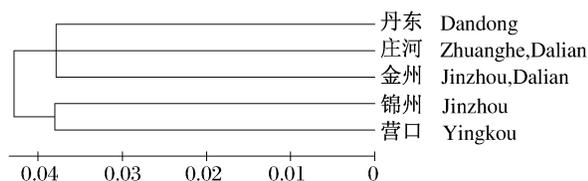


图7 5个地理群体系统进化树

Fig. 7 The cluster analysis of the five different stocks based on genetic distance

3 讨论

3.1 群体内的遗传多样性

生物多样性关系到资源的开发和管理及环境的保护,生物多样性包括3个层次:生态系统多样性、物种多样性和遗传多样性。其中,遗传多样性是生物多样性的核心,保护生物多样性最终是要保护其遗传多样性^[26]。

从表3可以清楚看到五个毛蚶群体所得到的多态位点比例均在70%以上,平均杂合度(H_i)和遗传系数(G_{ST})也均处于较高水平,这表明当前条件下各地理群体毛蚶的种质资源良好,环境对其本身的胁迫作用在当前阶段表现的不甚明显。5个地理群体的 $G_{ST} = 0.1164 < 0.5$,说明群体内的变异远大于群体间的变异,是群体变异的主要方式。

3.2 群体间的遗传多样性

从ISSR扩增得到的结果可以看出,无论是整个群体还是群体间的遗传多样性水平都较高。其中, N_a 和 N_e 是衡量群体遗传变异的两个遗传指标,现行用于评价遗传多样性的主要参数借用群体遗传学中有关遗传变异的参数,即多态位点比例(P)和平均杂合度(H)^[27]。某一位点是否是多态,扩增条带有无的判定常带有人们主观的色彩,在不同的判断水平得出不同的结论。而杂合度相对较客观,故可作为评价遗传多样性的主要指标^[4]。本论文就以 H_i 和 I 做为主要指标来研

究毛蚶的遗传多样性。ISSR扩增所获得的 H_i 值为0.3204。 I 值为0.4615,张国范等^[26]调查表明贝类的杂合度水平大多在0.1~0.2,平均杂合度为无脊椎动物偏高估计值,本实验得到的毛蚶杂合度值要略高于这个水平。ISSR的扩增结果表明,锦州和丹东间的指标最大,丹东和庄河间的指标最小。其中,金州,庄河,丹东这3个群体之间的距离较近,锦州和营口之间的距离较近,而金州,庄河和丹东与锦州,营口之间则相对较远(图5),可以认为,群体间的遗传多样性和它们之间的距离有密切的关系,距离远的群体间的基因多样性丰富,而距离较近的群体由于容易发生基因流,遗传多样性水平相对较低。通过计算不同组群体的 G_{ST} 了解群体具有最大或最小的遗传分化程度^[29],从表7还可以看出, G_{ST} 随着群体间地理距离的增大而增大,这都是由于基因流作用的结果。

ISSR的聚类分析图显示,锦州和营口先聚到了一起,丹东和庄河聚在一起形成组合,金州与丹东和庄河聚合之后和它们形成一个组合,最后这两个组合聚在一起。虽然,这5个地理群体毛蚶之间的 H_i 和 I 较高,锦州和丹东间的 H_i 和 I 则最大,分别为0.3983和0.5738,但这五个地理群体仍然隶属于同一地理群体。THORP^[30]通过分析研究认为遗传相似系数 $S < 0.85$ (遗传距离 $D > 0.15$)的两个群体,不可能是同一物种,同科属间 $S = 0.1 - 0.5$ ($D = 0.5 - 0.9$);而同种群体 $S = 0.8 - 0.97$ ($D = 0.03 - 0.2$);不同物种间 S 为0.2~0.8($D = 0.2 - 0.8$)。在本实验中,ISSR扩增获得的毛蚶5个地理群体间的遗传相似系数在0.9027~0.9362,遗传距离在0.0660~0.1024;从中可以看出最大的遗传距离值0.1024也是介于0.03~0.20,说明本实验所选的锦州、丹东、金州、营口、庄河这5个地理群体之间的遗传物质差别不大,仍然隶属于同一地理群体。

3.3 群体间的基因流

一些个体从一个群体迁移到另一个群体就会把某些基因带到新的群体,从而产生基因流动。基因流是影响群体内部和群体之间遗传变异程度的重要因素^[31]。基因流和突变是把新的遗传因素带到某一群体仅有的两种方式。基因流增加了群体内部的遗传变化,这种变化是由于一些个体从其他群体带来该群体没有或少有的基因。基因流会影

响群体间的相似性或特征,基因流会使出现在一个群体中的基因带给另一个群体,基因流越大,群体间的相似性越大,相反,如果群体之间由于生殖隔离或地理隔离而无法相互杂交,群体间的基因流水平则会降低,基因流水平的下降又会使群体内的交配增加,进而导致群体内的基因型越来越相似,而群体之间的相似性则越来越小,直至后来分化成为不同的种群。研究群体之间基因流的方式通常可分为直接方式和间接方式^[32]。对动物基因流进行研究时直接的方式为标记重捕法,用来检测个体的迁移力,估计群体间迁移生物的数量,从而测定群体散布的程度。这种传统的方法在实际操作中有很大的困难,随着科技进步,对基因流的研究已进入分子生物学阶段。本文所采用的是 N_m 指标,ISSR 揭示出了群体间较高水平的基因流(表5)。而且不难看出,地理位置离的越近的两个群体,之间的基因流水平越高,正是由于群体间较高水平的基因流,才增加了群体内的遗传多样性而减少了群体间的差异性。这五个群体之间的遗传分化系数 G_{ST} 都偏小,最大值低于0.2。ISSR 扩增得出群体之间的遗传相似系数都很大,最小值超过0.8,同样说明了基因流使群体内呈现出较高的遗传多样性,群体之间呈现出较大的遗传相似性。基因流对于群体遗传学、进化生物学、生态学等都有重要意义。一个物种的进化潜力和抵御不良环境的能力既取决于种内遗传变异的大小,也有赖于遗传变异的种群结构^[33-34]。

4 结论

通过对辽宁沿海5个地理群体毛蚶的ISSR分析得出如下结论:(1)5个地理群体均具有较高的遗传多样性,其中锦州群体的遗传多样性水平最高;(2)5个地理群体间存在基因流,由于基因流的作用,群体内的变异要远大于群体间的变异,而成为了变异的主要方式;(3)群体间的遗传多样性和它们之间的距离有密切的关系,距离远的群体间的基因多样性丰富,而距离较近的群体由于容易发生基因流,遗传多样性水平相对较低;(4)5个地理群体之间的遗传物质差别不大,仍然隶属于同一地理群体。

参考文献:

[1] 蔡英亚. 贝类学概论[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979:34-35.

- [2] 陈省平,包振民,潘洁,等. 4种养殖扇贝的群体遗传多样性及特异性 AFLP 标记研究[J]. 海洋学报, 2005,27(2):160-164.
- [3] ROBERTS S, GOETZ F. Expressed sequence tags analysis of genes expressed in the bay scallop, *Argopecten irradians* [J]. Biological Bulletin, 2003, 205:227-228.
- [4] ROBERTS S, ROMANO C, GERLACH G. Characterization of EST derived SSRs from the bay scallop, *Argopecten irradians* [J]. Molecular Ecology Notes, 2005,5:567-568.
- [5] SONG L, XU W, LI C, et al. Development of expressed sequence tags from the bay scallop, *Argopecten irradians irradians* [J]. Marine Biotechnology, 2006,8:161-169.
- [6] LI H, LIU X, HU J, et al. A set of polymorphic microsatellite loci for the bay scallop, *Argopecten irradians* [J]. Molecular Ecology Notes, 2007, 7: 422-424.
- [7] CAMPANELLA J J, BOLOGNA P A X, KIM L E J, et al. Molecular genetic evidence suggests Long Island as the geographic origin for the present population of bay scallops in Barnegat Bay, New Jersey [J]. Journal of Shellfish Research, 2007, 26: 303-306.
- [8] QIN Y, LIU X, ZHANG H, et al. Genetic mapping of size related quantitative trait loci (QTL) in the bay scallop (*Argopecten irradians*) using AFLP and microsatellite markers [J]. Aquaculture, 2007, 272: 281-290.
- [9] 潘洁,包振民,赵洋,等. 栉孔扇贝不同地理群体的遗传多样性分析[J]. 高技术通讯, 2002, 12: 78-82.
- [10] 李红蕾,宋林生,王玲玲,等. 栉孔扇贝 EST 中微卫星标记的筛选[J]. 高技术通讯, 2003, 12: 72-75.
- [11] ZHAN A, BAO Z, YAO B, et al. Polymorphic microsatellite markers in the Zhikong scallop, *Chlamys farreri* [J]. Molecular Ecology Notes, 2006, 6:127-129.
- [12] ZHAN A, BAO Z, HU X, et al. Isolation and characterization of 150 novel microsatellite markers for Zhikong scallop (*Chlamys farreri*) [J]. Molecular Ecology Notes, 2007, 7:1015-1022.
- [13] CUI Z, LI Q. Expressed sequence tag derived microsatellite markers for the Zhikong scallop (*Chlamys farreri*) and their utility in two other scallop species [J]. Aquaculture Research, 2008, 38: 1-4.

- [14] 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, 23(3): 1145-1152.
- [15] SATO M, KAWAMATA K, ZASLAVSKAYA N, et al. Development of microsatellite markers for Japanese scallop (*Mizuhopecten yessoensis*) and their application to a population genetic study[J]. Marine Biotechnology, 2005, 7: 713-728.
- [16] LI Q, KONG L, YU R. Genetic variation in Chinese hatchery populations of the Japanese scallop (*Patinopecten yessoensis*) inferred from microsatellite data [J]. Aquaculture, 2007, 269: 211-219.
- [17] 刘相全,包振民,胡景杰,等. 两种蛤仔群体遗传多样性的形态参数及 AFLP 分析[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(3): 359-364.
- [18] 刘相全,包振民,胡景杰,等. 基于形态参数和 AFLP 标记的文蛤 (*Meretrix meretrix*) 不同地理群体遗传变异分析[J]. 海洋与湖沼, 2008, 39(3): 245-251.
- [19] 董迎辉,林志华,柴雪良. 文蛤山东种群与江苏种群杂交及自繁子代的遗传差异分析[J]. 水产学报, 2009, 33(4): 557-564.
- [20] 石耀华,洪葵,郭希明,等. 马氏珠母贝 EST 微卫星的筛选[J]. 水产学报, 2008, 32(2): 174-181.
- [21] 陈琳琳,孔晓瑜,周立石,等. 魁蚶核糖体 DNA 基因转录间隔区的序列特征[J]. 中国水产科学, 2005, 12(1): 104-108.
- [22] 刘必谦,戴继勋. 巨蜆属牡蛎遗传多样性研究[J]. 水产学报, 1998, 22(3): 193-198.
- [23] 刘萍,孟宪红,何玉英. 中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 黄、渤海 3 个野生地理群遗传多样性的微卫星 DNA 分析[J]. 海洋与湖沼, 2004, 35(3): 252-257.
- [24] 谭杰,孙慧玲,刘萍,等. 3 个仿刺参地理种群遗传变异的微卫星 DNA 分析[J]. 水产学报, 2007, 31(4): 438-442.
- [25] 李旭光,阎斌伦,许广平,等. 毛蚶三个地理群体生化遗传特征分析[J]. 海洋渔业, 2007, 29(3): 208-213.
- [26] 张国范,张福绥. 贝类遗传多样性及其永续利用(I)[J]. 海洋科学, 1993, 9(5): 17-21.
- [27] 王家玉(译). 分子群体遗传学与进化论[M]. 北京: 农业出版社, 1984.
- [28] AYALA F J, KIGER J A. Modern genetics [M]. The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc, 1984.
- [29] 钱韦,葛颂,洪德元. 采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性[J]. 植物学报, 2000, 42(7): 741-750.
- [30] THORP J P. The molecular clock hypothesis: biochemical evolution, genetic differentiation, and systematics [M]. Annual Review of Ecology Systematics, 1982, 13(1): 139-168.
- [31] SLATKIN M. Gene flow and the geographic structure of natural populations [J]. Science, 1987, 236: 787-792.
- [32] SLATKIN M. Rare alleles as indicator of gene flow [J]. Evolution, 1985, 39: 53-65.
- [33] GRANT V. The evolutionary process: A critical study of evolutionary theory [M]. New York: Columbia University Press, 1991.
- [34] MILLAR C, LIBBY W J. Strategies for conserving clinical: Ecotypic and disjunct population diversity in widespread species [M] // FALK D A, HOLSINGER K E. Eds. Genetics and conservation of rare plants. New York: Oxford University Press, 1991: 149-170.

ISSR analyses of genetic diversity within and among five stocks of *Scapharca subcrenata* along Liaoning coast

ZHAO Wen* , ZHANG Lei, BI Jin-hong

(Key Laboratory of Hydrobiology in Liaoning Province, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

Abstract: The ark shell *Scapharca subcrenata* is a benthic bivalve distributed along the intertidal and subtidal zones of mud or silty sand shores of China, Japan, and Korea. It is a species of considerable economic value with a significant potential to further the development and diversification of aquaculture. Over the last two decades, the yields of this natural resources in China have decreased dramatically due to the marine reclamation works, reckless overcatching and environmental pollutions. The inter-simple sequence repeats DNA (ISSR) technique was applied to assess the genetic diversity among five stocks of *Scapharca subcrenata* (Jinzhou stock, Dandong stock, Jinzhou stock, Yingkou stocks and Zhanghe stock). Under predetermined optimal reaction conditions, 137 ISSR sites were detected ranging from 200 bp to 2 500 bp with 12 primers. The number of amplified bands ranged from 9 to 15 in every individual. The experimental data were analyzed with POPGEN3. 2 and MEGA2 software. The result showed that no evident differentiation existed among the five stocks, and they all belong to one community; the nearest phylogenetic relationship occurs between the Dandong stock and Zhuanghe stock, then between the Yingkou and Jinzhou groups in turn; the high level of mean heterozygosities suggests that the resource of *Scapharca subcrenata* was in good condition with high genetic variation.

Key words: *Scapharca subcrenata*; genetic diversity; ISSR

Corresponding author: ZHAO Wen. E-mail: zhaowen@dlou. edu. cn