

河蚬微卫星引物筛选及洪泽湖野生群体遗传结构分析

丁怀宇^{1,2}, 姜虎成², 冯建彬^{1,2*}, 孙骥³, 李家乐²

(1. 淮阴师范学院江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室, 江苏 淮安 223300;

2. 上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;

3. 江苏省盱眙县水产技术指导站, 江苏 盱眙 211700)

摘要: 利用磁珠富集法筛选了河蚬 10 对中高度多态性的微卫星引物, 并分析了洪泽湖河蚬 4 个野生群体的遗传结构。结果表明, 每个群体至少有 4 个位点经 Bonferroni 校正后显示杂合不足, 显著偏离了 Hardy-Weinberg 平衡 ($P < 0.013$); 4 个群体平均期望杂合度均大于 0.752, 显示出较高的遗传多样性水平, 蒋坝、临淮群体遗传多样性高于高良涧和老子山群体; 突变-漂移平衡分析结果显示, 4 个群体在 IAM 模型下偏离了突变-漂移平衡, 高良涧群体在 TPM 模型下偏离了突变-漂移平衡, 且表现杂合过剩, 说明少数群体即将或曾经经历瓶颈效应, 群体数量已出现波动; 群体间 AMOVA 分析表明, 洪泽湖河蚬群体间遗传分化程度较低 ($F_{ST} = 0.0177 < 0.05$), 仅有 1.77% 的变异来自群体间, 并没有形成显著的遗传结构, 在种质资源保护和管理上可视作一个单元, 这为河蚬种质资源保护和合理开发利用提供了理论指导。

关键词: 河蚬; 微卫星; 遗传结构; 洪泽湖

中图分类号: Q 346+.5; S 917

文献标志码: A

河蚬 (*Corbicula fluminea*) 俗称蚬、黄蚬, 隶属于瓣鳃纲 (Lamellibranchia), 蚬科 (Corbiculidae), 蚬属 (*Corbicula*), 原产于我国及东亚、东南亚等国家江河湖泊等淡水及河口水域^[1], 现已广泛分布于世界各地水域^[2-3]。河蚬味道鲜美, 富含许多特殊的活性营养成分^[4-5], 一直都深受中国、日本、韩国及东南亚等国家居民的喜爱。近年来, 国内外市场上对河蚬需求量的逐渐增大, 河蚬养殖业刚刚起步就已成为淡水经济贝类养殖的热点之一。但养殖所用苗种主要来自于采捕野生苗, 由此引起的无序采捕加上栖息环境的破坏使其天然资源量呈现下降趋势, 如 20 世纪 80 年代初期洪泽湖年产河蚬 32 万 t, 到 90 年代初减少到 21.29 万 t^[6-7], 这极大地制约了河蚬产业的发展。洪泽湖底栖软体动物中的优势种是河蚬^[7], 在 2007 年 12 月被列为首个国家级河蚬种质资源保护区。有关洪泽湖贝类遗传多样性的研究, 仅见对三角帆蚌^[8]的遗传资源进行

了研究报道, 所以充分了解洪泽湖河蚬种质资源现状, 对有效保护及合理开发利用其天然资源具有重要的生态和经济价值。

国内外有关河蚬的研究, 目前主要集中在营养价值^[4-5]、生物学^[9-11]以及作为环境指示生物^[12-13]等方面, 未发现有关河蚬种质资源遗传多样性和群体遗传结构的研究。微卫星标记具有多态性高、共显性等优点, 已广泛应用于淡水贝类的群体遗传学、种质鉴定及 QTL 定位等研究领域^[14-16]。因此, 本研究首先利用磁珠富集法分离微卫星标记, 然后再将其用于洪泽湖河蚬遗传多样性及群体遗传结构分析, 以期为其种质资源保护利用及良种选育提供科学理论指导。

1 材料与方 法

1.1 样本来源及 DNA 提取

2010 年 8 月下旬, 在洪泽湖湖区随机采集 4

收稿日期: 2011-05-23 修回日期: 2011-07-04

资助项目: 国家自然科学基金项目 (31001111); 江苏省高校自然科学基金基础研究面上项目 (07KJD240026); 江苏省苏北科技发展计划项目 (BN2009036); 农业部水产种质资源与利用重点开放实验室项目 (KFT2008-3); 江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室开放课题 (HZHL0803)

通讯作者: 冯建彬, E-mail: jbfeng@shou.edu.cn

个野生群体(表1,图1),无水乙醇固定后带回实验室,苯酚-氯仿法^[17]提取外套膜肌肉组织基因组DNA,TE(pH 8.0)溶解后测定浓度和纯度,-20℃保存备用。

表1 河蚬样本采集位置及数目
Tab.1 Sample sites and number of *C. fluminea* in Hongze Lake

群体 population	采集地 sample site	样本数 sample number
临淮 LH	洪泽县高良涧镇	36
蒋坝 JB	洪泽县蒋坝镇	50
老子山 LZS	泗洪县临淮镇	46
高良涧 GLJ	洪泽县老子山镇	44

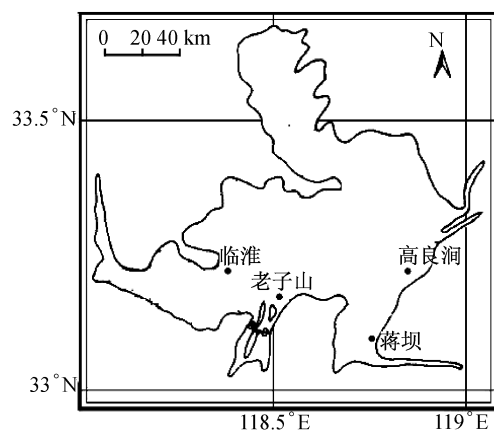


图1 洪泽湖流域4个河蚬群体的采样位点

Fig.1 Four sample sites of *C. fluminea* population in Hongze Lake

1.2 微卫星标记的筛选

微卫星富集文库构建及引物筛选参照 FENG 等^[18]及 YUE 等^[19]的方法,即基因组DNA经内切酶 *Sau3A* I 部分裂解后,分离纯化 200~1 000 bp DNA 片段,用 T_4 DNA 连接酶与 Brown 接头(5'-CGTCCG ACGGTACCGAATTCT-3'; 5'-GTCAAG-AATTCGGTACCGTCGAC-3')进行连接,再将重组 DNA 片段经 pGEM-T 载体连接并转化到大肠杆菌 DH5 α 中,从而建立河蚬核心序列为 CA 的基因组文库,随机挑选并测定部分克隆的序列,筛选出含微卫星 DNA 序列的克隆,在其核心序列的两端设计了相应的 PCR 引物。

1.3 微卫星反应

选用 10 对较高多态性的微卫星引物用于遗传结构等分析研究,PCR 反应体系为 10 μ L,包括:1 \times PCR Buffer,1.5 mmol/L Mg^{2+} ,200 μ mol/L

L dNTP,200 μ mol/L 上下游引物,0.1 U *Taq* 酶,100 ng 模板,灭菌去离子水补齐。

PCR 反应采取改良后的半降落 PCR 方法(Semi-touchdown PCR),以减少非特异性条带产生,反应条件为 95℃ 4 min;94℃ 30 s;($T_m + 4$)℃ 30 s,递减 1℃ 至 T_m ℃;72℃ 30 s;($T_m + 4$)℃ ~ ($T_m + 1$)℃ 各 4 个循环, T_m ℃ 时 30 个循环;72℃ 8 min;4℃ 保存。

PCR 产物经 1.5% 琼脂糖电泳检验合格后,用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,标准分子量为 pUC18 DNA/*Msp* I,电泳电压 8 V/cm,快速银染法染色^[20],扫描后观察分析。

1.4 数据分析

根据条带位置确定基因型,利用 GENPOP 4.0^[21] 进行群体遗传分析,计算等位基因数(number of allele, A)、观测杂合度(observed heterozygosity, H_o)和期望杂合度(expected heterozygosity, H_e),利用马尔可夫链(Markov chain)方法进行 Hardy-Weinberg 平衡检验,采用 Bonferroni 方法校正的显著性标准,根据 P 值判断杂合缺失或过剩。用 BOTSTEIN 等^[22]的公式计算微卫星位点多态信息含量(polymorphism information content, PIC)。

利用 ARLEQUIN 3.1^[23] 计算群体遗传分化的 F -统计量(F -statistics, F_{ST})及分子方差分析(AMOVA)。利用 DISPAN^[24] 计算群体间 Nei 氏遗传距离(genetic distance, D_A),并基于该遗传距离用 MEGA 4.0^[25] 构建 UPGMA 系统发育树。

根据各位点等位基因频率,基于无限等位基因模型(infinite allele model, IAM)、逐步突变模型(step-wise mutation model, SMM)和双相突变模型(two-phased model of mutation, TPM),利用 BOTTLENECK 3.4^[26] 计算平均期望杂合度(expected average heterozygosity, H_{EQ}),重复为 1 000 个,并通过符号检验(sign test)和 Wilcoxon 符号秩次检验(wilcoxon sign-rank test)分析杂合过度是否显著,以通过分析群体突变-漂移平衡来估计群体数量动态变化。

2 结果

2.1 微卫星特征

基于随机挑选并测定的 25 个阳性克隆基因序列,设计了 14 对微卫星引物,其中有 10 对具有

多态性,引物序列及产物大小等如表 2 所示。碱基重复类型中,除 *Cof* 06 位点 TA/AT 重复外,其余位点均为 CA/GT;微卫星类型中,3 个位点为完美型,其余为非完美型^[27]。

10 对微卫星引物在 4 个群体中的扩增结果如表 3 所示,等位基因数介于 2~26 个之间;有效等位基因数介于 1.97~17.94 之间;观测杂合度介于 0.444~0.827 之间,期望杂合度介于 0.495~0.947 之间,仅位点 *Cof* 01、*Cof* 02 在 4 个

群体中的观测杂合度均大于期望杂合度,*Cof* 03、*Cof* 11、*Cof* 13 和 *Cof* 14 在个别群体中的观测杂合度均大于期望杂合度,显示出杂合过度,其余共 33 个位点观测杂合度均小于期望杂合度,显示出了杂合不足;多态信息含量 *PIC* 介于 0.372~0.941 之间,根据 FENG 等^[18] 提出位点多态性标准,*Cof* 01 和 *Cof* 02 位点为度多态位点 ($0.25 < PIC < 0.5$),其它 8 个位点均为高度多态位点 ($PIC > 0.5$)。

表 2 河蚬 10 对微卫星引物
Tab. 2 Sequences of microsatellite primers of *C. fluminea*

位点 locus	核心序列 motif	引物序列(5'-3') primer sequence	复性温度/°C T_m	产物大小/bp size range	GenBank 登录号 GenBank accession no.
<i>Cof</i> 01	(AC) ₅	F:CGACCACAGTAAGCATCCGTA R:GCCTGAGAAGTTCATAGCCGT	53.5	131~141	JF772217
<i>Cof</i> 02	(TG) ₅	F:TCACCGATCATTCTACA R:TTACGCATTTACACACC	59	107~115	JF772218
<i>Cof</i> 03	(CA) ₅ ... (CA) ₄	F:TGAACCAGACGAATGATA R:TGGGTACTCTTTGTAGCA	53.5	118~132	JF772219
<i>Cof</i> 04	(TG) ₆ ... (TG) ₇	F:GTGGCATTGATTAGTGGTC R:TAACCGATAGACAGTGGACA	59	183~257	JF772220
<i>Cof</i> 06	(TA) ₄ (AC) ₁₃	F:GATCTCTGTCAATTACCAA R:CAACAAAACCTCAACCAACT	59	97~131	JF772222
<i>Cof</i> 07	(AC) ₂₁	F:GCCATGCAATTCCAATTACGCTAC R:ATGCTAAATGCTCGGTTACCTGTG	53.5	118~150	JF772223
<i>Cof</i> 08	(AC) ₇ ... (AC) ₆	F:TAACCGATAGACAGTGGACAGA R:AGATGTGGCATTGATTAGTGG	65	203~259	JF772224
<i>Cof</i> 11	(AC) ₅ ... (AC) ₄ ... (CA) ₄	F:CAGAGCGGACACGATTTTC R:GTGTTTCGTCACCAAGCCTA	48.5	180~214	JF772226
<i>Cof</i> 12	(TG) ₈ ... (GT) ₄	F:ACTATTGCTTGTCTGCTGC R:CTATCTACGCACTACCCA	59	105~129	F772227
<i>Cof</i> 14	(TG) ₄ ... (GT) ₇ ... (GT) ₅	F:GCTGTCAAGACATTTTATGC R:AACAAAGTTACAGAGCGGACA	45.5	123~151	JF772228

表 3 河蚬 10 个微卫星位点有效等位基因数、杂合度及多态信息含量
Tab. 3 Statistics of number of effective alleles, expected and observed heterozygosity and polymorphism information content for 10 microsatellite loci of *C. fluminea*

位点 locus	等位基因数 number of alleles, A	有效等位基因数 number of effective alleles, N_e	观测杂合度 observed heterozygosity, H_o	期望杂合度 expected heterozygosity, H_e	多态信息含量 polymorphism information content, PIC
<i>Cof</i> 01	6	2.03	0.683	0.508	0.411
<i>Cof</i> 02	2	1.97	0.827	0.495	0.372
<i>Cof</i> 03	5	3.36	0.739	0.704	0.648
<i>Cof</i> 04	26	11.82	0.803	0.919	0.909
<i>Cof</i> 06	17	11.19	0.556	0.914	0.904
<i>Cof</i> 07	11	5.55	0.608	0.822	0.796
<i>Cof</i> 08	26	17.94	0.753	0.947	0.941
<i>Cof</i> 11	15	5.48	0.790	0.820	0.796
<i>Cof</i> 12	11	4.60	0.444	0.786	0.765
<i>Cof</i> 14	9	2.55	0.714	0.610	0.537
total	12.80	6.65	0.692	0.752	0.708

2.2 群体遗传多样性

蒋坝群体平均等位基因数最大($A = 9.90$), 临淮、高良涧群体其次, 老子山群体最小($A = 8.40$); 临淮群体平均观测杂合度最大($H_o = 0.744$), 其次, 蒋坝群体($H_o = 0.704$) 和老子山群体($H_o = 0.674$), 高良涧群体最小($H_o = 0.649$); 蒋坝群体的平均期望杂合度最大($H_e = 0.760$), 其次, 高良涧群体($H_e = 0.750$) 和临淮群体($H_e = 0.741$), 老子山群体最小($H_e = 0.710$); 除临淮群体外, 其它 3 个群体的平均观测杂合度均小于平均期望杂合度(表 4)。综上可知, 蒋坝、临淮群体遗传多样性大于老子山和高良涧群体。

2.3 Hardy-Weinberg 平衡分析

4 个群体各位点的 Hardy-Weinberg 平衡检验

结果如表 4 所示, 显著性标准经 Bonferroni 法校正后, 各群体仍至少有 4 个位点显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡, 其中蒋坝群体有 4 个位点, 高良涧群体有 6 个位点, 临淮和老子山群体有 7 个位点; 在杂合过度位点中, 仅 4 个群体的 Cof 02 位点以及老子山群体的 Cof 01 位点显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡; 在杂合不足位点中, 4 个群体共有 19 个位点显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡, 占杂合不足位点的 73.08%。Cof 03 位点在 4 个群体中均未偏离 Hardy-Weinberg 平衡, 其它位点至少在 1 个群体中显著偏离了 Hardy-Weinberg 平衡, 其中 Cof 02、Cof 06 位点在 4 个群体中显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡。

表 4 河蚬群体微卫星遗传多样性

Tab.4 Summary statistics analysis of genetic diversity in *C. fluminea* populations

位点 locus		Cof 01	Cof 02	Cof 03	Cof 04	Cof 06	Cof 07	Cof 08	Cof 11	Cof 12	Cof 14	平均 mean
蒋坝 JB	A	3	2	4	15	14	9	23	13	9	7	9.90
	H_o	0.583	0.860*	0.718	0.800	0.625*	0.583*	0.844	0.813	0.351*	0.857	0.704
	H_e	0.501	0.500	0.711	0.872	0.926	0.818	0.943	0.851	0.836	0.641	0.760
临淮 LH	A	3	2	4	18	14	7	21	13	9	4	9.50
	H_o	0.833	0.778*	0.818	0.857*	0.688*	0.656*	0.625*	0.800*	0.536*	0.853	0.744
	H_e	0.535	0.482	0.728	0.932	0.907	0.702	0.922	0.868	0.760	0.573	0.741
高良涧 GLJ	A	4	2	5	18	13	8	17	8	7	6	8.80
	H_o	0.732	0.854*	0.658	0.794*	0.385*	0.585	0.758*	0.714	0.364*	0.651*	0.649
	H_e	0.542	0.495	0.686	0.914	0.875	0.827	0.920	0.789	0.774	0.678	0.750
老子山 LZS	A	4	2	4	21	11	7	16	8	6	5	8.40
	H_o	0.619*	0.804*	0.767	0.758*	0.537*	0.622*	0.750*	0.826	0.543	0.511*	0.674
	H_e	0.456	0.505	0.690	0.939	0.880	0.809	0.907	0.719	0.679	0.513	0.710

注: * : 经 Bonferroni 校正后仍显著或极显著偏离 Hardy-Weinberg。

Notes: * Deviations from Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.013$) after Bonferroni correction.

2.4 瓶颈效应分析

4 个群体在 IAM、TPM 和 SMM 3 种突变模型假设下的平均期望杂合度 H_{EQ} 如表 5 所示, 10 个位点中, IAM 假设下除 Cof 14 位点外其它位点 H_E 均高于 H_{EQ} , 且在 Cof 02、Cof 04 位点差异显著 ($P < 0.05$), 在 Cof 06、Cof 08 位点差异极显著 ($P < 0.01$); TPM 假设下, 有 5 个位点的 H_E 低于 H_{EQ} , 其余位点 H_E 高于 H_{EQ} , 且在 Cof 02、Cof 06 位点差异显著 ($P < 0.05$), 在 Cof 08 位点差异极显著 ($P < 0.01$); 在 SMM 假设下, 有 4 个位点 H_E 高于 H_{EQ} , 其余位点的 H_E 低于 H_{EQ} , 且在 Cof 01、Cof 02、Cof 04 和 Cof 11 位点差异显著 ($P <$

0.05), 在 Cof 14 位点差异极显著 ($P < 0.01$)。

符号检验和 Wilcoxon 符号秩次检验的结果见表 6, IAM 模型下, 符号检验及 Wilcoxon 符号秩次检验中 4 个群体显著或极显著偏离了突变-漂移平衡, 表现出杂合显著过剩; TPM 模型下, 仅有高良涧群体在 Wilcoxon 符号秩次检验中极显著偏离了突变-漂移平衡, 且表现出杂合显著过剩, 其它群体杂合过剩均不显著; SMM 模型下, 仅有高良涧群体在 Wilcoxon 符号秩次检验中显著偏离了突变-漂移平衡, 且表现出杂合显著不足, 其它群体杂合不足均不显著。

表 5 河蚬群体微卫星位点瓶颈效应分析
Tab. 5 Bottleneck test by locus in *C. fluminea* populations

位点 locus	H_E	IAM			TPM			SMM		
		H_{EQ}	DH/sd	Prob.	H_{EQ}	DH/sd	Prob.	H_{EQ}	DH/sd	Prob.
Cof01	0.508	0.499	0.053	0.431	0.602	-0.768	0.187	0.707	-2.695	0.024 *
Cof02	0.495	0.149	2.140	0.025 *	0.169	1.952	0.037 *	0.180	1.858	0.040 *
Cof03	0.704	0.444	1.384	0.041 *	0.547	1.140	0.084	0.646	0.625	0.290
Cof04	0.919	0.875	1.026	0.081	0.919	-0.004	0.424	0.939	-1.107	0.048 *
Cof06	0.913	0.792	1.532	0.002 **	0.862	1.438	0.016 *	0.903	0.560	0.345
Cof07	0.822	0.687	1.096	0.064	0.780	0.668	0.280	0.844	-0.687	0.209
Cof08	0.947	0.870	1.782	0.000 **	0.917	1.621	0.003 **	0.938	0.448	0.243
Cof11	0.820	0.763	0.616	0.295	0.839	-0.454	0.248	0.888	-3.406	0.010 *
Cof12	0.786	0.694	0.794	0.226	0.790	-0.077	0.375	0.847	-1.944	0.052
Cof14	0.610	0.624	-0.096	0.375	0.729	-1.455	0.084	0.805	-4.545	0.002 **

注:DH/sd; H_E 与 H_{EQ} 的差与标准偏差之比.*: H_E 与 H_{EQ} 差异显著($P < 0.05$);**: H_E 与 H_{EQ} 差异极显著($P < 0.01$)。

Notes:DH/sd:Ratio of deviation to the standard deviation of H_E and H_{EQ} . *:Significant difference ($P < 0.05$); **:Extremely significant difference ($P < 0.01$).

表 6 河蚬群体突变-漂移平衡分析
Tab. 6 Departures from mutation-drift equilibrium in *C. fluminea* populations

群体 population	符号检验 sign test						Wilcoxon 检验 Wilcoxon sign-rank		
	SMM		IAM		TPM		SMM	IAM	TPM
	H_e/H_d	Prob.	H_e/H_d	Prob.	H_e/H_d	Prob.	Prob.	Prob.	Prob.
蒋坝 JB	10/0	0.003 **	7/3	0.317	6/4	0.578	0.001 **	0.032	1.000
临淮 LH	10/0	0.004 **	7/3	0.337	5/5	0.418	0.001 **	0.160	0.625
高良涧 GLJ	10/0	0.004 **	9/1	0.033 *	3/7	0.075	0.001 **	0.002 **	0.375
老子山 LZS	9/1	0.030 *	7/3	0.326	4/6	0.202	0.002 **	0.131	0.557
合计 total	9/1	0.033 *	5/5	0.439	4/6	0.210	0.003 **	0.432	0.131

注: H_e/H_d :杂合过剩与不足位点数之比;*表示显著偏离平衡($P < 0.05$);**表示极显著偏离平衡($P < 0.01$)。

Notes: H_e/H_d :Ratio of loci number with heterozygosity excess to deficiency. * Significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.05$); ** Extremely significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.01$).

2.5 群体遗传分化

4个群体间遗传分化分析如表7所示,蒋坝与临淮群体之间遗传固定指数最小($F_{ST} = -0.005$),临淮与老子山群体间最大($F_{ST} = 0.038$),老子山与其它3个群体间的遗传分化极显著($P < 0.01$),临淮与高良涧群体间遗传分化($P < 0.05$),其它群体之间分化不显著($P > 0.05$)。4个群体间遗传变异的AMOVA分析结果如表8所示,群体间遗传变异占总变异量的1.77%,且达到极显著水平($P < 0.01$)。群体间的 D_A 遗传距离如表7所示,蒋坝与老子山群体之间 D_A 遗传距离最大($D_A = 0.161$),蒋坝与临淮群体间最小($D_A = 0.115$),基于 D_A 遗传距离构建的UPGMA系统发育树如图2所示,可以看

出4个群体分为2个族群,其中蒋坝和临淮为一族群,老子山和高良涧为另一族群。

表 7 河蚬群体间 F_{ST} 统计量 (F_{ST} , 对角线下) 和遗传距离 (D_A , 对角线上)

Tab. 7 Pairwise F_{ST} estimates (F_{ST} , below diagonal) and genetic distance (D_A , above diagonal) among *C. fluminea* populations

群体 population	蒋坝 JB	临淮 LH	高良涧 GLJ	老子山 LZS
蒋坝 JB		0.115	0.141	0.161
临淮 LH	-0.005		0.125	0.140
高良涧 GLJ	0.003	0.009 *		0.118
老子山 LZS	0.026 **	0.038 **	0.018 **	

Notes: *. $P > 0.05$, **. $P < 0.01$.

表 8 河蚬群体分子方差分析
Tab. 8 AMOVA analysis among *C. fluminea* populations

变异来源 source of variation	自由度 d_f	平方和 sum of squares	方差组分 variance components	方差比例/% percentage of variance
群体间 among populations	3	6.257	0.01621Va	1.77
群体内个体间 between individuals within populations	172	114.487	-0.23537Vb	-25.66
个体内 within individuals	176	200	1.13636Vc	123.89
总变异 total variation	351	320.744	0.9172	

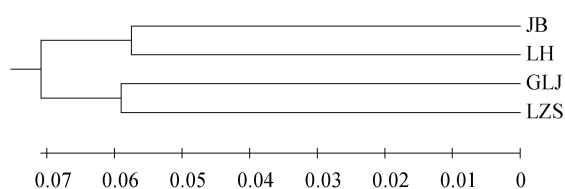


图 2 基于 D_A 遗传距离的 UPGMA 聚类树
Fig. 2 UPGMA clustering tree based on D_A genetic distance

3 讨论

3.1 群体遗传多样性分析

本研究获得了河蚬 CA/GT 碱基重复的微卫星位点,还获得了 1 个 TA/AT 碱基重复位点,其中完美型微卫星位点所占比例低于非完美型,这与虾夷扇贝类似^[28],而与人类和其他动物不同,其原因一方面与所抽样测序的克隆较少,且仅使用了 CA 重复序列探针,所以不能完全反映其微卫星的分布情况有关,另一方面与河蚬所处生态环境条件相关,为适应洪泽湖复杂多变的自然环境,其基因组中频繁发生碱基替换、错配和不等交换等现象从而增加了基因多态性。

本研究所用的 10 个微卫星位点包括 2 个中度多态位点,8 个高度多态位点,平均期望杂合度为 0.752,可见这些位点都能有效用于洪泽湖河蚬野生群体的遗传结构分析,也显示出它们具有较高的遗传多样性以及相对较大的选择潜力,在保护其天然种质特性的前提下可进行必要的良种选育工作。

4 个群体中,蒋坝、临淮群体遗传多样性高于老子山和高良涧群体,其主要原因是由于 4 个群体所处的地理及水域环境差异引起的,首先临淮群体位于洪泽湖上游入水口,蒋坝群体位于洪泽湖下游出水口,蒋坝、临淮群体所在水域的水质也显著好于老子山、高良涧群体^[29-30],因而蒋坝、临

淮水体流动性和水质均好于老子山和高良涧群体,更利于喜欢生活在流水偏多且敞开的水域中的河蚬生长和繁殖^[7]。另外,4 个群体中除临淮群体外其余 3 个群体均出现了平均杂合不足,说明了临淮群体的遗传多样性相对最好,这是由于临淮群体位于泗洪洪泽湖湿地自然保护区内,河蚬天然资源得到了有效的保护,而其它群体没有得到有效保护,受到了无序采捕或捕捞过度,引发了遗传结构和遗传多样性的改变。

研究结果显示,4 个群体 26 个杂合不足位点中有 19 个位点显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡,占杂合不足位点的 73.08%,表现出显著的杂合显著不足;14 个杂合过度位点中有 5 个位点显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡,占杂合过度位点的 35.7%,显示出杂合显著过度。每个群体的 10 个位点中至少有 3 个位点显著的杂合不足,至多有 2 个位点杂合过度。因此,总体上可以看出洪泽湖河蚬群体出现了显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡,呈现出遗传多样性下降的趋势。因此,在今后的洪泽湖河蚬种质资源保护中,应当采取有效的措施,划定种质资源保护区,建立休渔制度,充分避免过度和无序采捕,从而尽可能地减少杂合度缺失现象,以恢复洪泽湖河蚬的天然种质特性;在其种质资源利用中,可适当地利用遗传多样性相对较高的蒋坝、临淮群体,进行优异种质筛选和良种选育工作,为养殖产业提供优质、健康的苗种。

3.2 瓶颈效应分析

突变-漂移平衡的群体,微卫星位点显示杂合过度的概率应大致等于杂合不足的概率。群体在进化中经历瓶颈效应后,等位基因数目和杂合度均会降低,其中等位基因丢失比杂合度降低速度快,从而引起杂合过度,而且这一作用将保持数代直至群体再次回到遗传平衡状态^[31],因此通过分析杂合度是否过度可以判断群体数量是否下降。另外,某位点上等位基因数目对群体大小的

波动也较敏感,也可以作为瓶颈效应检测的一种标志。某群体是否具有显著数量的杂合过剩的位点,常用符号检验和 Wilcoxon 符号秩次检验方法来进行检验。本研究同时采用这两种检验方法,并基于无限等位基因模型(IAM)、逐步突变模型(SMM)和双相突变模型(TPM)三种模型,检验杂合度过量或杂合度缺失及等位基因多样性以判断群体是否偏离突变-漂移平衡。但由于杂合过剩作为群体数量下降的瞬态效应,只是在 IAM 模型下得到证实^[31],而在 SMM 模型下并不一定都能观察到,也只有少数微卫星位点完全符合一步的逐步突变模型^[26],故采用 IAM 和 TPM 两种模型较为合适。研究结果显示,在 IAM 模型下两种检验方法都显示 4 个群体显著或极显著偏离了突变-漂移平衡,表现出杂合显著过剩,在 TPM 模型下,仅高良涧群体在 Wilcoxon 符号秩次检验中极显著偏离了突变-漂移平衡,且表现出杂合显著过剩,其它群体杂合过剩均不显著,由于 TPM 模型综合了 IAM 和 SMM 模型,因此认为洪泽湖河蚬少数群体即将或曾经经历瓶颈效应,群体数量刚开始出现下降,也可能是由于保护区建设和休渔制度始见成效,使洪泽湖河蚬群体数量正从瓶颈效应中恢复过来,但无论如何都应继续实施保护性措施,以防止群体数量再度下降。

3.3 群体间遗传分化

分析结果显示,4 个群体间遗传距离最大的为蒋坝与老子山群体之间仅为 0.161,远远小于物种间遗传距离的临界值^[32],且蒋坝和临淮群体亲缘关系较近,老子上和高良涧群体亲缘关系较近,总变异的 1.77% 来自于群体间,说明仅有微弱的遗传分化存在于群体间^[33],另外临淮与高良涧群体间遗传分化显著($P < 0.05$)以及老子山与其它 3 个群体间的遗传分化极显著($P < 0.01$),而其它两两群体之间分化并不显著($P > 0.05$),可见整个洪泽湖河蚬并没有形成显著的遗传结构,其主要原因是由于洪泽湖是一个过水性湖泊,4 个群体同处洪泽湖湖区内,地理位置差异不大,河蚬在精卵排放后到面盘幼虫期可随着湖区不同水域之间水体交换以及频繁交错的捕捞活动在湖区内随机扩散,引起河蚬在湖区不同位置之间的频繁基因交流,因而洪泽湖河蚬仍保持着群体内遗传变异,遗传分化微弱。临淮与高良涧群体之间遗传分化显著,这是由于高良涧群体处在洪泽

湖东北部,不在洪泽湖湖区水体流动主要方向上,而老子山和蒋坝群体分别处在水体流动中游和下游,因而群体间基因交流较少;而老子山群体与其他群体间分化极显著,这主要是由于老子山群体遗传杂合不足程度最大,遗传多样性下降较多引起的。综上所述,基于本研究结果显示洪泽湖整个河蚬群体遗传分化程度微弱,且没有现成显著的遗传结构,因而在其种质资源保护和管理上可将整个洪泽湖湖区视作一个单元进行有效操作。

总之,以上分析结果初步揭示了洪泽湖河蚬的遗传多样性现状,并弄清了洪泽湖河蚬的群体遗传结构,这为洪泽湖河蚬种质资源的深入研究提供一定的参考,特别是为今后良种选育中亲本的选择工作奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] 刘月英,张文珍,王跃先. 中国经济动物志-淡水软体动物[M]. 北京:科学出版社,1979:119-123.
- [2] AGUIRRE W, POSS S G. Non-indigenous species in the Gulf of Mexico ecosystem: *Corbicula fluminea* (Muller, 1774) [C]. Gulf States Marine Fisheries Commission(GSMFC), 1999.
- [3] KIRKENDALE L, CLARE J. The Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) "rediscovered" on Vancouver Island[J]. The Victoria Naturalist, 2008, 65(3): 12-16.
- [4] 祝雯,林志铿,吴祖建,等. 河蚬中活性蛋白 COFp-a 的分离纯化及其活性[J]. 中国水产科学, 2004, 11(4): 349-353.
- [5] 韩鹏,王勤,陈清西. 河蚬软体部分营养成分分析及评价[J]. 厦门大学学报:自然科学版, 2007, 46(1): 115-117.
- [6] 袁永许,王兴元,陈安来,等. 洪泽湖螺蚬资源调查报告[J]. 水产养殖, 1994(6): 15-16.
- [7] 严维辉,潘元潮,郝忱,等. 洪泽湖底栖生物调查报告[J]. 水利渔业, 2007, 27(3): 65-66.
- [8] 王建军,李家乐,汪桂玲,等. 我国五大湖三角帆蚌群体 ITS-1 序列变异分析[J]. 湖泊科学, 2008, 20(2): 208-214.
- [9] 王庆志,常亚青. 大洋河河蚬的繁殖生物学研究[J]. 大连水产学院学报, 2010, 25(1): 8-13.
- [10] 刘其根,沈和定. 河蚬的耗氧率和排氨率[J]. 上海水产大学学报, 1999, 8(4): 298-303.
- [11] 徐钢春,顾若波,闻海波,等. 温度、体重和饵料密度对河蚬滤食率与同化率的影响[J]. 上海水产大学学报, 2007, 16(2): 151-156.

- [12] 金小伟,查金苗,许宜平,等. 3 种氯酚类化合物对河蚬的毒性和氧化应激[J]. 生态毒理学报,2009,4(6):816-822.
- [13] 周会,刘丛强,蒋倩,等. 河蚬壳体 $\delta^{13}\text{C}$: 由水体溶解无机碳重建过去环境变化的代用指标[J]. 科学通报,2010,55(34):3333-3339.
- [14] LI J L, WANG G L, BAI Z Y. Genetic variability in four wild and two farmed freshwater pearl mussel *Hyriopsis cumingii* from Poyang Lake in China estimated by microsatellites [J]. Aquaculture, 2009, 287:286-291.
- [15] JIA M J, LI J L, WANG S L. Isolation and characterization of 18 polymorphic microsatellite loci from freshwater pearl mussel (*Cristaria plicata*) [J]. Conservation Genetics, 2010, 11, 1131-1133.
- [16] 汪桂玲,袁一鸣,李家乐. 中国五大湖三角帆蚌群体遗传多样性及亲缘关系的 SSR 分析[J]. 水产学报,2007,31(2):152-158.
- [17] SAMBROOK J, RUSSELL D W. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edition [M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 2001.
- [18] FENG J B, LI J L. Twelve polymorphic microsatellites in Oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* [J]. Molecular Ecology Resources, 2008, 8(5):986-988.
- [19] YUE G H, CHEN F, ORBAN L. Rapid isolation and characterisation of microsatellites from the genome of Asian arowana (*Scleropages formosus*) [J]. Molecular Ecology, 2000, (9):1007-1009.
- [20] BASSAM B J, CAETANO A G, GRESSHOFF P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels [J]. Analytical Biochemistry, 1991, 196(1):80-83.
- [21] FRANCOIS R. GENEPOP '007: a complete e-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux [J]. Molecular Ecology Resources, 2008, 8:103-106.
- [22] BOTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. The American Journal of Human Genetics, 1980, 32(3):314-331.
- [23] EXCOFFIER L, LAVAL G, SCHNEIDER S. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis [J]. Evolutionary Bioinformatics Online, 2005, 1:47-50.
- [24] NEI M, JAJIMA F, TATENO Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data [J]. Journal of Molecular Evolution, 1983, 19(2):153-170.
- [25] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, et al. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24:1596-1599.
- [26] CORNUET J M, LUIKART G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data [J]. Genetics, 1997, 144(4):2001-2014.
- [27] WEBER J L. Informativeness of human $(dC-dT)_n \cdot (dG-dT)_n$ polymorphisms [J]. Genomics, 1990, 7(4):524-530.
- [28] 赵莹莹,朱晓琛,孙效文. 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.
- [29] 吴延东,刘绪庆,陈飞龙. 洪泽湖水质状况的主成分分析和聚类分析[J]. 淮阴工学院学报, 2010, 19(1):71-76.
- [30] 范亚民,何华春,崔云霞,等. 洪泽湖水域的环境演变遥感分析[J]. 污染防治技术, 2008, 21(6):29-33,84.
- [31] MARUYAMA T, FUERST P A. Population bottlenecks and nonequilibrium models in population genetics. II. Number of alleles in a small population that was formed by a recent bottleneck [J]. Genetics, 1985, 111:675-689.
- [32] THORP J P. The molecular clock hypothesis: Biochemical evolution, genetic differentiation and systematic [M]. Annual Review of Ecology and Systematics, 1982, 13(1):139-168.
- [33] BALLOUX F, LUGON M N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers [J]. Molecular Ecology, 2002, 11(2):155-165.

Isolation of microsatellite loci and population genetic structure analysis of wild *Corbicula fluminea* in Hongze Lake

DING Huai-yu^{1,2}, JIANG Hu-cheng², FENG Jian-bin^{2*}, SUN Ji³, LI Jia-le²

(1. Jiangsu Key Laboratory for Eco-Agricultural Biotechnology around Hongze Lake, Huai'an 223300, China;

2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources,

Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai 201306, China;

3. Xuyi Fisheries Technical Guidance Station, Xuyi 211700, China)

Abstract: Asian clam (*Corbicula fluminea*) is a commercially important freshwater bivalve in South and East Asia. However, food clam mainly comes from the wild resources, and the natural populations have declined greatly and rapidly due to overfishing and natural habitats degradation. In China, the germplasm resource protection zone of *C. fluminea* has been set up in Hongze Lake to protect the natural resources. In this paper, genetic structure of four wild *C. fluminea* populations in Hongze Lake was analyzed using ten polymorphic microsatellite DNA loci isolated and characterized by magnetic beads enrichment methods. The results showed that at least four of the loci were observed to have significant heterozygosity deficiency and obvious deviations from Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.013$) after Bonferroni correction in the four populations. Although values of expected heterozygosity were all above 0.752 and displayed high genetic diversity in the four populations, the level of genetic diversity fluctuated obviously. For example, the genetic diversity of the Jiangba and Linhuai populations was higher than that of the Gaoliangjian and Laozishan populations. The departure from mutation-drift equilibrium with partly heterozygote excesses was detected in all the *C. fluminea* populations under the IAM models and in Gaoliangjian population under the TPM models using Bottleneck software, which might indicate that the population structure has suffered bottleneck effects in the past, or was about to experience bottleneck effects, as well as the recent population fluctuation. AMOVA analysis across all populations and loci showed that there were the low levels of genetic divergences among the four populations ($F_{ST} = 0.0177 < 0.05$). 1.77% of genetic variation was attributed to among populations. It suggested that all *C. fluminea* populations in Hongze Lake could be protected and managed as a single unit in genetic resource. All the study results would offer theoretical direction for the protection and utilization of the *C. fluminea* germplasm in Hongze Lake.

Key words: *Corbicula fluminea*; microsatellite; genetic structure; Hongze Lake

Corresponding author: FENG Jian-bin. E-mail: jbfeng@shou.edu.cn