

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00270

长竹蛏不同地理居群的遗传多样性

陈燕妮 孙振兴 常林瑞

(鲁东大学生命科学学院, 烟台 264025)

摘要: 研究以大连、烟台、莱州、青岛和赣榆近海 5 个不同地理居群的长竹蛏(*Solen strictus* Gould)为实验材料, 利用 ISSR 分子标记进行了遗传多样性的研究。结果表明, 13 个 ISSR 引物在 5 个居群中共扩增出 200 个位点, 平均每个引物记录 15.4 个位点, 5 个居群的多态位点比例为 43.56%—60.43%。长竹蛏在物种水平上的 Nei's 基因多样性指数和 Shannon's 信息指数分别为 0.2854 和 0.4390, 在居群水平上分别为 0.1674 和 0.2530。NJ 聚类分析显示, 青岛居群与赣榆居群的亲缘关系最近, 而烟台居群与其他 4 个居群的亲缘关系较远。经 Mantel 检测, 长竹蛏 5 个居群间的遗传距离与地理距离并无相关性($r = -0.0834$, $P > 0.1$)。AMOVA 分子变异分析表明, 长竹蛏的遗传变异有 47.71% 发生在居群间, 52.29% 发生在居群内, 居群内的遗传变异大于居群间的遗传变异。长竹蛏 5 个居群间的遗传分化系数(G_{st})为 0.2889, 基因流(N_m)为 1.3194。结果表明, 长竹蛏具有较高的遗传多样性, 但居群间已发生了一定程度的遗传分化。

关键词: 长竹蛏; 遗传多样性; ISSR 标记

中图分类号: Q347 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)02-0270-08

长竹蛏(*Solen strictus* Gould)为竹蛏科双壳贝类, 是我国沿海潮间带常见的一种蛏类, 其个体大、肉味鲜美, 富含营养, 在食用贝类中占有重要的地位, 是一种可发展养殖的经济贝类。近年来, 随着分子生物学技术在水生生物中的广泛应用, 有关蛏类的分子遗传研究也受到人们的关注^[1,2], 但这些研究大多集中在缢蛏(*Sinonovacula constricta*)的遗传多样性^[3]和基因序列变异分析^[4]等方面, 而有关长竹蛏的群体遗传学研究国内外尚未见报道。ISSR (Inter simple sequence repeat)分子标记具有丰富的多态性、稳定的可重复性, 在许多水生生物的群体遗传学研究中获得了理想的效果^[5,6]。在水生贝类方面, 已有用 ISSR 标记分析四角蛤蜊(*Macrta veneriformis*)^[7]、地中海贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)^[8]、马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)^[9]和大珠母贝(*Pinctada maxima*)^[10]、扁玉螺(*Neverita didyma*)^[11]等群体遗传多样性的报道, 说明 ISSR 标记是研究水生贝类遗传多样性的有效手段。发展长竹蛏养殖的

重要途径是人工培育竹蛏苗^[12,13], 而为了避免长竹蛏人工繁殖时选择亲贝的盲目性, 亟须探明野生长竹蛏的遗传背景。因此, 本文利用 ISSR 标记, 对我国黄、渤海海域 5 个不同地理居群的野生长竹蛏的遗传多样性进行了研究, 以期揭示长竹蛏的群体遗传多样性和遗传结构状况, 为评价长竹蛏的种质资源等提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用野生长竹蛏分别采自辽宁大连(DL)、山东烟台(YT)、山东莱州(LZ)、山东青岛(QD)和江苏赣榆(GY)近海 5 个地理居群(图 1)。长竹蛏活体运回实验室, 解剖取足肌, 分装样品袋中置于 -74°C 超低温冰箱保存。取样长竹蛏的平均壳长为 (73.64 ± 5.16) mm, 平均体质量为 (8.76 ± 0.92) g。

1.2 方法

基因组 DNA 提取采用酚-氯仿抽提法, 具体步

收稿日期: 2009-06-21; 修订日期: 2009-12-12

基金项目: 山东省高校实验技术研究项目(2005-396)资助

作者简介: 陈燕妮(1981—), 女, 山东烟台人; 硕士研究生; 主要研究方向为海洋动物遗传学。E-mail: 311master@163.com

通讯作者: 孙振兴(1956—), 男, 教授; 主要研究方向为海洋动物遗传与育种。E-mail: sunzx@public.ytptt.sd.cn

骤参见文献[14], -20℃保存备用。ISSR 引物根据加拿大哥伦比亚大学公布的序列, 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。经优化的 PCR 反应体系为: 25 μL 总体积中包括 1 × PCR 缓冲液、2.5 mmol/L 的 Mg²⁺、0.25 mmol/L 的 dNTP、0.5 μmol/L 的 ISSR 引物、1 U 的 *Taq* DNA 聚合酶、40 ng 模板 DNA。PCR 反应程序为 94℃预变性 5min, 94℃变性 45s, 52℃退火 45s, 72℃延伸 90s, 45 个循环后, 72℃延伸 10min, 4℃保存。利用 PCR 优化体系, 从 30 个 ISSR 引物中筛选出了 13 个重复性好、特异性高的引物用于 PCR 扩增(表 1)。在 PE-9600 型 PCR 仪上进行扩增, 扩增产物以 100—3000 bp 的 DNA 标准分子量(MBI-Fermentas 公司产品)为参照, 以 1.5%的琼脂糖凝胶进行电泳分离, 电泳条件为 1 × TBE 缓冲液、电压 100V, 电泳后在凝胶成像系统下观察并拍照。

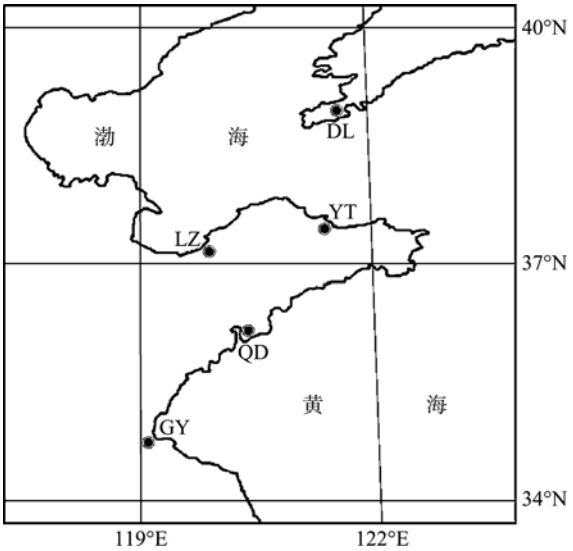


图 1 长竹蛎各居群的地理位置示意图
Fig. 1 The geographic locations map of five *Solen strictus* populations

表 1 用于 ISSR 分析的 13 个引物序列
Tab. 1 Sequences of 13 primers used in ISSR analysis

引物编号 Primer code	引物序列(5'-3') Primer sequence	引物编号 Primer code	引物序列(5'-3') Primer sequence
UBC 807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	UBC 825	ACA CAC ACA CAC ACA CT
UBC 808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	UBC 834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT
UBC 809	AGA GAG AGA GAG AGA GG	UBC 835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC
UBC 811	GAG AGA GAG AGA GAG AC	UBC 836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA
UBC 812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	UBC 840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT
UBC 814	CTC TCT CTC TCT CTC TA	UBC 842	GAG AGA GAG AGA GAG AYG
UBC 815	CTC TCT CTC TCT CTC TG		

Note: Y=(C, T)

1.3 数据统计分析

ISSR 为显性标记, 由同一引物扩增的电泳迁移率一致的条带作为同一位点, 记录清晰稳定的电泳条带, 按条带的有无分别记为“1”和“0”, 构成 ISSR 表型数据矩阵。用 POPGENE (version 1.32)软件^[15]计算以下遗传参数: 多态位点比例、观测等位基因数、有效等位基因数、Nei's 基因多样性指数、Shannon's 信息指数、居群间的遗传分化系数和基因流、遗传相似度和 Nei's 遗传距离。以 DCFA (version 1.1)软件^[16]计算欧氏距离平方, 利用 WINAMOVA (version 1.55)软件对居群间和居群内的遗传变异进行分子变异分析(Analysis of molecular variance, AMOVA)^[17]。基于 Nei's 遗传距离, 用 MEGA (version 4.0)软件^[18]中的邻接法(Neighbor-joining, NJ), 分别对 5 个居群以及这些居群中的 100 只个体进行

聚类分析。以地理测距软件计算各居群之间的海上最近地理距离, 用 TFPGA(version 1.3)软件对遗传距离和地理距离的相关性进行 Mantel 检测^[19]。

2 结 果

2.1 不同居群的遗传多样性

对长竹蛎 5 个居群的样品进行扩增的结果显示, 扩增产物的分子量大多在 200—1500 bp 之间(图 2), 利用 13 个 ISSR 引物共扩增出 200 个位点, 平均每个引物记录 15.4 个位点。长竹蛎 5 个居群的多态位点比例、观测等位基因数、有效等位基因数、Nei's 基因多样性指数和 Shannon's 信息指数(表 2)。从表 2 可见, 大连居群的多态位点比例明显高于其他居群, 赣榆居群的多态位点比例次之, 莱州居群和青岛居群的多态位点比例较为接近, 烟台居群的多态

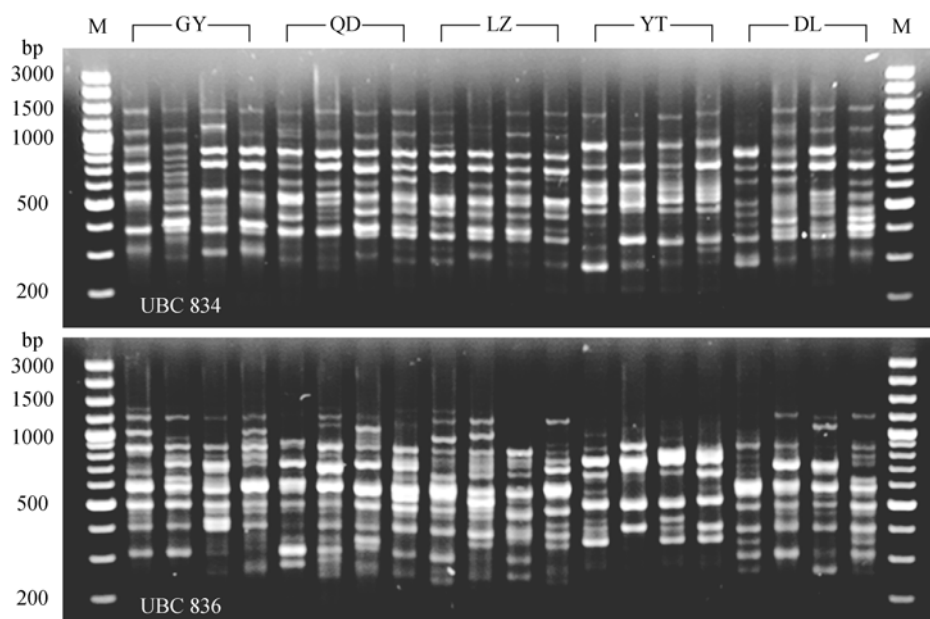


图2 引物 UBC834 和 836 对长竹蛎部分个体扩增的电泳图

Fig. 2 Electrophoretogram of ISSR-PCR product in *Solen strictus* using primer UBC834 and UBC836

M. DNA 标准分子量; GY. 赣榆居群; QD. 青岛居群; LZ. 莱州居群; YT. 烟台居群; DL. 大连居群; 下同

M. Marker; GY. Ganyu population; QD. Qingdao population; LZ. Laizhou population; YT. Yantai population; DL. Dalian population; the same as follows

表2 长竹蛎 5 个居群的遗传多样性

Tab. 2 The genetic diversity within five populations of *Solen strictus*

居群名称 Population name	多态位点比例 Proportion of polymorphic loci (%)	观测等位基因数 Observed number of alleles	有效等位基因数 Effective number of alleles	Nei's 基因多样性指数 Nei's gene diversity (<i>h</i>)	Shannon's 信息指数 Shannon's information index (<i>I</i>)
大连 DL	60.43	1.6043 ± 0.4898	1.3226 ± 0.3632	0.1919 ± 0.1927	0.2921 ± 0.2745
烟台 YT	43.56	1.4356 ± 0.4966	1.2506 ± 0.3526	0.1468 ± 0.1925	0.2204 ± 0.2774
莱州 LZ	52.15	1.5215 ± 0.5003	1.2633 ± 0.3386	0.1593 ± 0.1862	0.2440 ± 0.2691
青岛 QD	49.08	1.4908 ± 0.5007	1.2784 ± 0.3551	0.1649 ± 0.1932	0.2490 ± 0.2786
赣榆 GY	57.98	1.5798 ± 0.4944	1.3384 ± 0.3726	0.1985 ± 0.1983	0.2984 ± 0.2830
均值 Mean	52.64	1.5069	1.2827	0.1674	0.2530

位点比例最低。结合 Nei's 基因多样性指数(*h*)和 Shannon's 信息指数(*I*)来看, 大连和赣榆居群的遗传多样性水平较高, 其次为莱州和青岛居群, 而烟台居群的遗传多样性水平较低。方差分析的结果表明, Nei's 基因多样性指数($F = 4.2768$, $P < 0.005$)和 Shannon's 信息指数($F = 4.7438$, $P < 0.001$)在 5 个居群之间存在显著差异。

长竹蛎在居群水平上, 平均每个位点的有效等位基因数 $N_e = 1.2827$, Nei's 基因多样性指数(*h*)和 Shannon's 信息指数(*I*)分别为 0.1674 和 0.2530; 在物种水平上, $N_e = 1.4713$, *h* 和 *I* 值分别为 0.2854 和 0.4390。总体而言, 长竹蛎仍具有较高的遗传多样性水平。

2.2 居群及其个体间的遗传距离与聚类分析

由 POPGENE 计算出长竹蛎 5 个居群的两两居群之间的 Nei 无偏倚遗传距离范围为 0.1138—0.2756, 遗传相似度范围为 0.7591—0.8925(表 3), 5 个居群间的平均遗传距离为 0.1827, 平均遗传相似度为 0.8342。进一步根据遗传距离矩阵采用 NJ 法进行聚类分析(图 3)表明, 青岛居群与赣榆居群的亲缘关系最近, 其次是莱州居群与青岛、赣榆两个居群的亲缘关系较近, 再次之为大连居群, 而烟台居群与以上 4 个居群的亲缘关系较远。经 Mantel 检测, 长竹蛎 5 个居群间的遗传距离与它们之间的地理距离并无相关性($r = -0.0834$, $P > 0.1$)。

表 3 长竹蛏 5 个居群间的遗传距离和遗传相似度
Tab. 3 Genetic distances and genetic identities index among five populations of *Solen strictus*

居群名称 Population name	大连 DL	烟台 YT	莱州 LZ	青岛 QD	赣榆 GY
大连 DL	—	0.8324	0.8476	0.8903	0.8691
烟台 YT	0.1835	—	0.7591	0.7957	0.7805
莱州 LZ	0.1654	0.2756	—	0.8459	0.8286
青岛 QD	0.1162	0.2285	0.1673	—	0.8925
赣榆 GY	0.1404	0.2478	0.1880	0.1138	—

注: 对角线右上方为遗传相似度, 左下方为遗传距离

Note: Genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal)

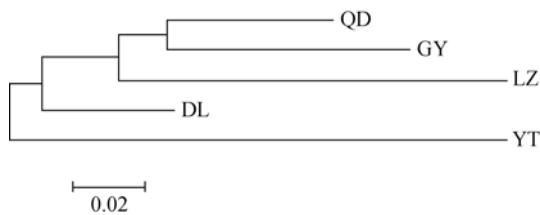


图 3 基于 Nei's 遗传距离的长竹蛏 5 个居群的 NJ 聚类图

Fig. 3 Dendrogram of NJ cluster analysis based on Nei's unbiased genetic distance of the five *Solen strictus* populations

基于 Nei 无偏倚遗传距离, 对长竹蛏 5 个居群的 100 只个体进行 NJ 聚类分析的结果(图 4)。可以看出: 在个体之间, 各居群内的个体分别聚成独立的分支, 说明居群内个体间有高度的遗传相似性; 在居群之间, 青岛居群与赣榆居群首先聚在一起, 然后依次为大连居群、莱州居群和烟台居群, 这与 5 个居群的聚类结果(图 3)基本一致。

2.3 遗传变异与分化

通过 AMOVA 的等级剖分法计算出的居群间和居群内对总遗传变异的贡献率表明, 长竹蛏 47.71% 的变异发生在居群间, 52.29% 的变异发生在居群内(表 4), 显示长竹蛏群体的遗传变异主要来自居群内, 但居群间的变异也处于较高水平。长竹蛏 5 个居群间的遗传分化系数(G_{st})为 0.2889, 由 G_{st} 估算的基因流(N_m)为 1.3194, 说明长竹蛏居群间虽然存在着基因流, 但居群间已发生了一定程度的遗传分化。

表 4 长竹蛏 5 个居群遗传变异的 AMOVA 分析
Tab. 4 Analysis of molecular variance (AMOVA) of *Solen strictus* five populations

变异来源 Source of variance	自由度 Degree of freedom	离差平方和 Sum of square deviation	均方 Mean square	变异组分 Variance component	变异百分率 Percentage of variation (%)	P^*
居群间 Among populations	4	2391.8600	597.9650	28.3447	47.71	<0.001
居群内 Within populations	95	2951.7500	31.0710	31.0711	52.29	<0.001

注: * 交换 1000 次单倍型的显著性检验

Note: * Significant differences were calculated using 1000 permuted samples

3 讨论

3.1 长竹蛏的遗传多样性

Nei's 基因多样性指数(h)和 Shannon's 信息指数(I')是衡量物种遗传多样性的重要参数^[20]。利用 ISSR 方法得到的几种海洋贝类在物种水平上的 h 和 I' 值: 大珠母贝(*Pinctada maxima*)分别为 0.2832 和 0.4372^[10], 四角蛤蜊(*Macra veneriformis*)分别为 0.3070 和 0.4760^[7], 扁玉螺(*Neverita didyma*)分别为 0.3395 和 0.5113^[11]。与本文得到的长竹蛏物种水平上的 h 和 I' 值分别为 0.2854 和 0.4390 相比, 长竹蛏的遗传多样性水平虽然低于四角蛤蜊和扁玉螺, 但与大珠母贝较为接近, 在种的水平上仍具有较高的遗传多样性; 而在居群水平上的遗传多样性相对较低, 并且不同居群的遗传多样性存在明显差异。从群体遗传学角度来说, 物种的遗传多样性水平与其适应能力、繁殖能力和进化潜力密切相关, 遗传多样性水平的降低往往会导致生物对环境的适应能力减弱、种质衰退等^[21]。研究遗传多样性的目的, 就是为了最大限度地保持种内的遗传多样性水平, 维持物种进化潜力和群体的自然繁殖能力, 以确保种质资源的可持续利用。由于各种人为因素对长竹蛏栖息环境的不利影响和过度采捕, 已对长竹蛏种质资源产生了严重地威胁, 因此应采取建立种质保护

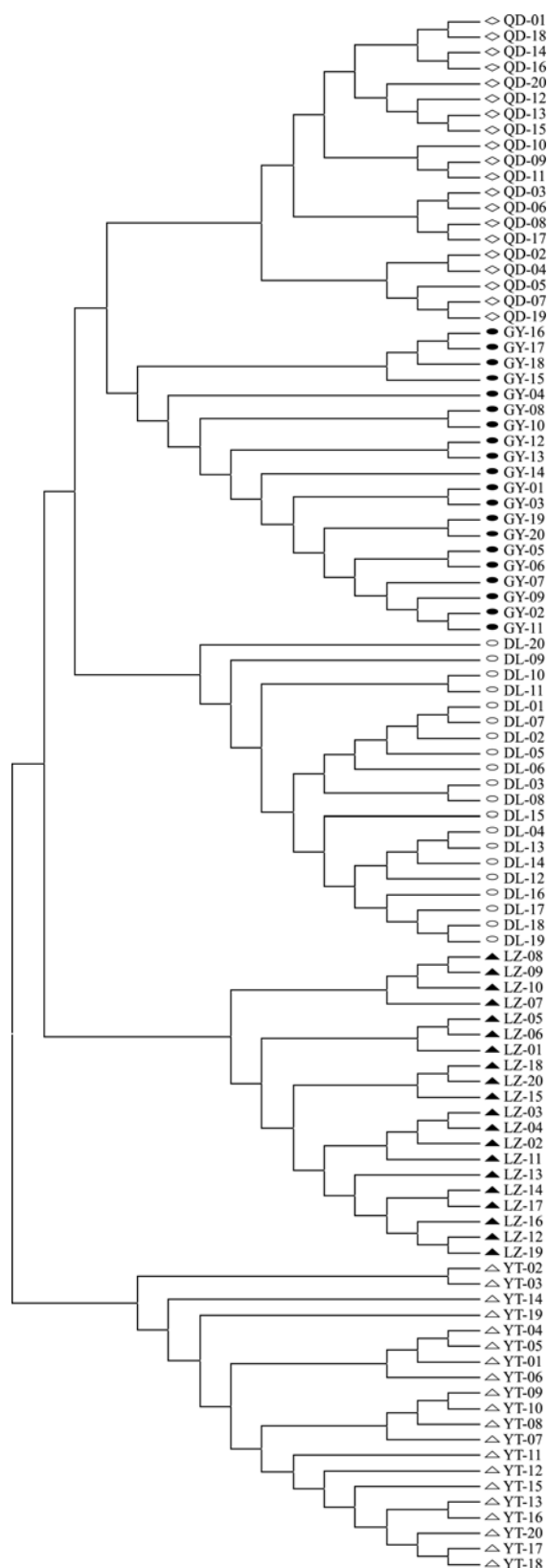


图4 基于 Nei's 遗传距离的长竹蛎 5 个居群 100 个个体的 NJ 聚类图

Fig. 4 Dendrogram of NJ cluster analysis based on Nei's unbiased genetic distance of the 100 individuals *Solen strictus* from five populations

区等必要的措施。根据本文所得遗传多样性参数看, 赣榆居群($h = 0.1985$, $I = 0.2984$)和大连居群($h = 0.1919$, $I = 0.2921$)可能存在着相对丰富的遗传种质, 应加以重点保护, 并可作为人工繁殖选择亲贝时的首选种质。

3.2 长竹蛎居群间的亲缘关系与遗传分化

聚类分析的先后顺序可反映出种群间亲缘关系的远近, 通过估算遗传距离并构建系统树, 可以评价种群间的遗传结构和分化程度^[22]。本文聚类分析的结果表明, 在长竹蛎 5 个居群中, 青岛居群与赣榆居群的亲缘关系最近, 而烟台居群与莱州居群之间的亲缘关系最远(表 3、图 3), 这可能与各居群所处的地理位置有关。从地理位置上看, 赣榆与青岛两地同处于黄海西南部, 海流水团运动有利于居群间的基因交流; 而它们与处于黄海北部的大连、烟台以及处于渤海的莱州, 由于受到山东半岛的地理屏障, 阻碍了来自渤海和黄海西北部的海流水团运动, 这种特殊的地理隔离导致了居群间的基因流受阻。虽然烟台与莱州的海上距离较近, 但两地间受到山东半岛北部海岸凸出(图 1)的影响, 海流水团交换明显不如青岛与赣榆之间流畅, 加之莱州湾是渤海的一个内湾, 与外海的海流水团交换都受到一定影响, 客观上也形成了地理隔离, 这也说明居群间亲缘关系的远近与地理距离之间并不一定存在必然联系。另一方面, 从长竹蛎 5 个居群 100 个个体的聚类结果看, 它们分别按照地理分布聚成相对独立的分支, 各居群的个体间完全没有交叉现象, 说明 5 居群间缺乏有效地基因交流, 也表明长竹蛎居群间的遗传分化水平较高, 这与 AMOVA 分析显示居群间变异较高的结果是一致的。

本文中长竹蛎 5 个居群间的平均遗传距离为 0.1827, 平均遗传相似度为 0.8342, 这与 Thorpe^[23]认为同一物种的居群间遗传距离为 0.03—0.2, 遗传相似度为 0.8—0.97 的观点一致。但长竹蛎 5 个居群间的遗传分化系数(G_{st})为 0.2889, 由此可见, 长竹蛎居群之间已经出现了较大程度的遗传分化^[24]。一般认为, 影响居群遗传结构最重要的因素是基因交流程度和繁育方式^[25]。根据群体遗传学理论, 不管居群大小, 如果基因流 $Nm < 1$, 遗传漂变就成为影响居群遗传结构的主要因素; 当居群间的基因流 $Nm \geq 1$ 时, 就可以防止由遗传漂变引起的居群间遗传分化^[26]。本文得出长竹蛎 5 个居群间的基因流

$N_m = 1.3194$, 说明居群间存在着一定程度的基因流, 因此, 遗传漂变不是影响居群分化的主要因素。导致长竹蛏居群遗传分化的因素可能与其繁育方式和所处环境有关, 长竹蛏是雌雄异体, 体外受精, 浮游幼虫期较短, 加之成体营埋栖生活, 主要是垂直移动, 水平移动的范围较小, 这些都在很大程度上影响了基因的交流; 长竹蛏不同居群所处的环境不完全相同, 它们所承受的生境选择压力存在差异, 必然引起居群间的变异和分化。此外, 由于物种不同居群间分布不连续造成的地理隔离, 以及人为因素影响等造成的有效繁育群体数量减少, 都是影响基因交流的障碍^[27], 最终导致居群间的遗传分化。

致谢:

鲁东大学生命科学学院黄清荣高级实验师、闫冬春副教授、王磊副教授、宿红艳副教授等为本实验使用仪器提供了诸多便利, 刘庆同学协助采集部分样品, 在此一并表示感谢。

参考文献:

- [1] Chen L M, Kong X Y, Yu Z N, *et al.* Sequence comparison and phylogenetic analysis of mtDNA 16S rRNA and COI gene fragments in three species of razor shell [J]. *Marine Sciences*, 2005, **29**(8): 27—32 [陈丽梅, 孔晓瑜, 喻子牛, 等. 3 种蛏类线粒体 16S rRNA 和 COI 基因片段的序列比较及其系统学初步研究. 海洋科学, 2005, **29**(8): 27—32]
- [2] Wu R X, Wang J, Su Y Q, *et al.* The polymorphism of genomic DNA in three species of razor shell [J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2008, **47**(5): 739—742 [吴仁协, 王军, 苏永全, 等. 3 种蛏基因组 DNA 的多态性研究. 厦门大学学报(自然科学版), 2008, **47**(5): 739—742]
- [3] Wang D Q, Li T W, Su X R. Comparison of genetic diversity between hatchery stock and wild population of *Sinonovacula constricta* Lamarck in Xiangshan Bay [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2005, **12**(2): 138—143 [王冬群, 李太武, 苏秀榕. 象山缢蛏养殖群体和野生群体遗传多样性的比较. 中国水产科学, 2005, **12**(2): 138—143]
- [4] Niu D H, Li J L, Shen H D, *et al.* Sequence variability of mitochondrial DNA-COI gene fragment and population genetic structure of six *Sinonovacula constricta* populations [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2008, **30**(3): 109—116 [牛东红, 李家乐, 沈和定, 等. 缢蛏六群体线粒体 DNA-COI 基因序列变异及群体遗传结构分析. 海洋学报, 2008, **30**(3): 109—116]
- [5] Liu Y G, Chen S L, Li J, *et al.* Genetic diversity in three Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) populations revealed by ISSR markers [J]. *Aquaculture*, 2006, **255**(1-4): 565—572
- [6] Yang T Y, Guan J Y, Chen H X. Genetic diversity of three geographical populations of *Squaliobarbus curriculus* revealed by ISSR analysis [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, **32**(4): 529—533 [杨太有, 关建义, 陈宏喜. 三个地理群体赤眼鲷遗传多样性的 ISSR 分析. 水生生物学报, 2008, **32**(4): 529—533]
- [7] Hou L, Lu H L, Zou X Y, *et al.* Genetic characterizations of *Macra veneriformis* (Bivalve) along the Chinese coast using ISSR-PCR markers [J]. *Aquaculture*, 2006, **261**(3): 865—871
- [8] Varela M A, Gonzalez T A, Marinas L, *et al.* Genetic divergence detected by ISSR markers and characterization of microsatellite regions in *Mytilus* mussels [J]. *Biochemical Genetics*, 2007, **45**(7-8): 565—578
- [9] Lü L L, Du X D, Wang Y, *et al.* Genetic diversity of three populations and the first generations of hybridization between different populations of pearl oyster, *Pinctada martensii* (Dunker) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, **32**(1): 26—32 [吕林兰, 杜晓东, 王嫣, 等. 马氏珠母贝 3 个野生种群及种群间杂交后代遗传多样性的 ISSR 分析. 水生生物学报, 2008, **32**(1): 26—32]
- [10] Jiang Y P, He M X, Huang L M, *et al.* ISSR analysis of genetic diversity in two populations of pearl oyster *Pinctada maxima* [J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2008, **27**(3): 61—65 [姜因萍, 何毛贤, 黄良民, 等. 两个大珠母贝群体遗传多样性的 ISSR 分析. 热带海洋学报, 2008, **27**(3): 61—65]
- [11] Sun S W, Sun Z X, Ge Y H, *et al.* Genetic structure of natural population of *Neverita didyma* based on ISSR markers [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, **28**(11): 5499—5505 [孙始威, 孙振兴, 葛宜和, 等. 基于 ISSR 标记的扁玉螺(*Neverita didyma*)自然居群遗传结构. 生态学报, 2008, **28**(11): 5499—5505]
- [12] Wang Y. Primary study on artificial rearing of *Solen strictus* [J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2001, **20**(1): 27—31 [王云. 长竹蛏人工育苗技术的初步研究. 台湾海峡, 2001, **20**(1): 27—31]
- [13] Zheng S Y. The artificial rearing technology of razor shell at rearing room [J]. *Fisheries Science and Technology Information*, 2006, **33**(4): 154—156 [郑升阳. 长竹蛏室内人工育苗技术. 水产科技情报, 2006, **33**(4): 154—156]
- [14] 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* (Beijing), 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. 遗传, 2006, **28**(12): 1549—1554]
- [15] Yeh F C, Boyle T J B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits [J]. *Belgian Journal of Botany*, 1997, **129**(2): 157
- [16] Zhang F M, Ge S. Data analysis in population genetics. I. analysis of RAPD data with AMOVA [J]. *Biodiversity Sci-*

- ence, 2002, **10**(4): 438—444 [张富民, 葛颂. 群体遗传学研究中的数据处理方法I. RAPD数据的 AMOVA 分析. 生物多样性, 2002, **10**(4): 438—444]
- [17] Excoffier L, Smouse P E, Quattro J M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data [J]. *Genetics*, 1992, **131**(2): 479—491
- [18] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, **24**(8): 1596—1599
- [19] Miller M P. Tools for population genetic analysis (TFPGA) version 1.3 [CP/OL]. <http://www.marks-geneticsoftware.net/tfpga.htm>. 1997
- [20] Labate J A. Software for population genetic analyses of molecular marker data [J]. *Crop Science*, 2000, **40**(6): 1521—1528
- [21] Sokal R R, Jacquez G M, Wooten M C. Spatial autocorrelation analysis of migration and selection [J]. *Genetics*, 1989, **121**(4): 845—855
- [22] Jiang P, Shi J Q, Zhang Y, *et al.* Microsatellite variation analysis of genetic diversity in six wild populations of naked common carp [*Gymnocypris przewalski* (Kessler)] [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, **29**(2): 939—945 [蒋鹏, 史建全, 张研, 等. 应用微卫星多态分析青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalski* (Kessler))六个野生群体的遗传多样性. 生态学报, 2009, **29**(2): 939—945]
- [23] Thorpe J P. The molecular clock hypothesis: Biochemical evolution, genetic differentiation and systematic [J]. *Annual Review of Ecology Systematics*, 1982, **13**(1): 139—168
- [24] Buso G S C, Rangel P H, Ferreira M E. Analysis of genetic variability in South American wild rice populations (*Oryza glumaepatula*) with isozymes and RAPD markers [J]. *Molecular Ecology*, 1998, **7**(1): 107—117
- [25] Vignieri S N. Streams over mountains: influence of riparian connectivity on gene flow in the Pacific jumping mouse (*Zapus trinotatus*) [J]. *Molecular Ecology*, 2005, **14**(7): 1925—1937
- [26] Walker C W, Vila C, Landa A, *et al.* Genetic variation and population structure in Scandinavian wolverine (*Gulo gulo*) populations [J]. *Molecular Ecology*, 2001, **10**(1): 53—63
- [27] Baille D, Barriere A, Felix M A. *Oscheius tipulae*, a widespread hermaphroditic soil nematode, displays a higher genetic diversity and geographical structure than *Caenorhabditis elegans* [J]. *Molecular Ecology*, 2008, **17**(6): 1523—1534

GENETIC DIVERSITY OF DIFFERENT GEOGRAPHICAL POPULATIONS IN *SOLEN STRICTUS* REVEALED BY ISSR MARKERS

CHEN Yan-Ni, SUN Zhen-Xing and CHANG Lin-Rui

(College of Life Science, Ludong University, Yantai 264025, China)

Abstract: The razor shell *Solen strictus* is a member of family Solenidae (Veneroida) bivalve. The *Solen strictus* distributes widely along the coasts of the Bohai Sea and the Yellow Sea in China, where is a commercial important and potential mariculture species. In this study, genetic diversity in five different geographical populations of the *Solen strictus* were analyzed by the Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. The samples of the five populations were taken from the off-shores of Dalian (DL), Yantai (YT), Laizhou (LZ), Qingdao (QD) and Ganyu (GY), respectively. The objectives of present study are: 1) use clear amplified ISSR fragments to examine the genetic variation within and among populations of *Solen strictus*; 2) lay a foundation of selecting the parent *Solen strictus* for artificial propagation.

Total genomic DNA was extracted from vivisectional foot muscle of two-year-old *Solen strictus* with standard method. DNA samples were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use. The ISSR primers were made by Sangon Inc. (Shanghai, China), and we used 13 primers which were screened from 30 primers. PCR amplification reaction was carried out in a $25\text{ }\mu\text{L}$ mixture that included $1\times$ PCR buffer, 2.5 mM of MgCl_2 , 0.25 mM of dNTP, $0.5\text{ }\mu\text{M}$ of primer, 1 unit of Taq DNA polymerase, and approximately 40 ng of template DNA. The PCR cycling conditions were: preamplification denaturation at $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 min followed by 45 cycles, each cycle included 45s denaturation at $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 45s annealing at $52\text{ }^{\circ}\text{C}$, 90s extension at $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, and then a final extension at $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 min, amplified products resolved by electrophoresis in 1.5% agarose gels.

Genetic parameters were calculated by using software POPGENE (version 1.32) that included percentages of polymorphic loci, observed number of alleles, effective number of alleles, Nei's gene diversity, Shannon's information

index, genetic differentiation coefficient (G_{st}), gene flow (N_m) and Nei's unbiased genetic distances. The genetic variation within and among populations of the *Solen strictus* was estimated by an analysis of molecular variance (AMOVA) using software WINAMOVA (version 1.55). The dendrogram was constructed on Nei's unbiased genetic distance and neighbor-joining (NJ) cluster analysis which was determined for the five populations and the 100 individuals from these populations by software MEGA (version 4.0), respectively. The Mantel test was taken for correlation between genetic and geographic distance with software TFPGA (version 1.3).

The results showed that total of 200 loci from five populations were amplified with 13 primers, average 15.4 loci each primer. The proportion of polymorphic loci in the five populations ranged from 43.56 % to 60.43 %. The Nei's gene diversity and Shannon's information index of *Solen strictus* was 0.2854 and 0.4390 at species level, 0.1674 and 0.2530 at population level, respectively. NJ cluster analysis indicated that QD population and GY population were the nearest in genetic relationships, and the genetic distance between YT population and other four populations were farther. There was no correlation between genetic and geographic distance among the five populations studied by the Mantel test ($r = -0.0834$, $P > 0.1$). The AMOVA demonstrated that the among-population component accounted for 47.71 % of the total variation, while the within-population component accounted for 52.29 %. The within-population genetic variation was apparently larger than the among-population. The genetic differentiation coefficient (G_{st}) and the gene flow (N_m) were 0.2889 and 1.3194, respectively among the five populations.

These data indicates that the genetic diversity of *Solen strictus* is relatively high, and there is genetic differentiation of some extent among the five populations of *Solen strictus*. The genetic differentiation among populations could be attributed to the limited remotion and the discontinuous habitat. Anyhow, the results of above research will be helpful for the conservation and utilization of resources, and provide a basis for artificial propagation of *Solen strictus*.

Key words: *Solen strictus*; Genetic diversity; ISSR marker