

# 基于简化基因组测序的三门湾海域 无脊椎动物的遗传多样性分析

常雪晴<sup>1,2</sup>, 黄伟<sup>3</sup>, 李卓卿<sup>1,2</sup>, 王星火<sup>1,2</sup>,  
马路阔<sup>3</sup>, 王有基<sup>1,2</sup>

(1.上海海洋大学海洋生物科学国际联合研究中心 中国科学技术部, 上海 201306; 2.上海海洋大学水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 3.自然资源部第二海洋研究所 国家海洋局海洋生态系统与生物地球化学重点实验室, 浙江 杭州 310012)

**摘要:**本研究通过简化基因组测序(2b-RAD)技术,对浙江省三门湾海域定居性优势无脊椎动物(哈氏仿对虾、口虾蛄、脊尾白虾、三疣梭子蟹、曼氏无针乌贼、棒锥螺和牡蛎)进行遗传结构和遗传多样性分析,以评估三门湾海域水生无脊椎动物资源现状,并为渔业可持续发展提供物种遗传资源监测依据。7个物种共获得12336~108139个SNP位点,变异位点比例为0.168%~1.571%。遗传分析结果显示,7个物种的平均核苷酸多样性( $Pi$ )为0.147~0.306,平均观测杂合度( $Ho$ )为0.142~0.289,多态信息含量(Polymorphism Information Content,  $PI$ )为0.124~0.234,个体间平均遗传距离为0.118~0.246。本研究表明,三门湾水域7种代表性无脊椎动物中,生物群体变异位点比例较低,遗传多样性水平较低,且相同种群个体间的遗传分化较小,结合本次对三门湾海域渔业资源调查分析,这可能与人工增殖放流等因素有关。

**关键词:**无脊椎动物; 简化基因组测序; SNP; 遗传多样性

中图分类号:S932 文献标识码:A 文章编号:1007-6336(2022)02-0267-05

## Genetic diversity analysis of invertebrates in the Sanmen bay area based on restriction site-associated DNA sequencing

CHANG Xue-qing<sup>1,2</sup>, HUANG Wei<sup>3</sup>, LI Zhuo-qing<sup>1,2</sup>, WANG Xing-huo<sup>1,2</sup>,  
MA Lu-kuo<sup>3</sup>, WANG You-ji<sup>1,2</sup>

(1.International Research Center for Marine Biosciences at Shanghai Ocean University, Ministry of Science and Technology, Shanghai 201306, China; 2.Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3.Key Laboratory of Marine Ecosystem and Biogeochemistry, State Oceanic Administration, Second Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, Hangzhou 310012, China)

**Abstract:** To evaluate the status of aquatic invertebrate resources and provide a basis for genetic monitoring of species resources for the sustainable development of fisheries in the Sanmen bay, Zhejiang province, in this study the restriction site-associated DNA sequencing (2b-RAD) technique was used to analyze the genetic structure and genetic diversity of seven dominant invertebrates (*Parapenaeopsis hardwickii*, *Oratosquilla*

收稿日期:2020-12-30, 修订日期:2021-05-03

基金项目:国家重点研发计划项目(2018YFD0900901; 2019YFD0901101); 国家自然科学基金项目(42076169); 中国亚太经合组织合作基金(2029901); 卫星海洋环境动力学国家重点实验室自主课题重点项目(SOEDZZ1902)

作者简介:常雪晴(2000—),女,安徽合肥人,本科生,水产养殖专业, E-mail: 1527947751@qq.com

通讯作者:王有基,男,博士,教授, E-mail: youjiwang2@gmail.com

*oratoria*, *Exopalaemon carinicauda*, *Portunus trituberculatus*, *Sepiella maindroni*, *Turritella terebra bacillum* and *Crassostrea sikmea*) in this bay. In this investigation, 12336~108139 SNP sites were obtained in 7 species, and the proportion of variant sites was 0.168%~1.571%. The results of genetic analysis showed that the average nucleotide diversity ( $Pi$ ) of the seven species was 0.147~0.306, the observed heterozygosity ( $Ho$ ) was 0.142~0.289, and the polymorphism information content ( $PIC$ ) was 0.124~0.234. The average genetic distance was 0.118~0.246. This study showed that among the 7 representative invertebrates in the Sanmen Bay, the proportion of biological population variation sites was low, and the population genetic diversity was low. Moreover, the genetic differentiation among individuals of the same population was small. Combined with the survey of fishery resources in the Sanmen bay, the above results may be related to artificial enhancement and releasing.

**Key words:** invertebrates; restriction-site-associated DNA sequencing; SNP; genetic diversity

三门湾位于浙江省东部沿海(28°57'N—29°22'N, 121°25'E—121°58'E),三面环山,一面临海,是浙江省内仅次于杭州湾的第二大半封闭海湾<sup>[1]</sup>。三门湾海域面积约775 km<sup>2</sup>,海湾岸线总长304 km,其中基岩岸线186 km,湾内水深5~10 m,为海洋无脊椎动物的生长、繁衍创造了得天独厚的自然条件,现已发展为浙江省海水养殖的重要基地之一<sup>[2]</sup>。

甲壳类和贝类等无脊椎动物具有较高的经济价值以及无可替代的生态功能,被认为是我国海洋渔业资源和生态系统的重要组成部分。遗传多样性是生物多样性和生态系统多样性的基础,是生物在长期进化和发展过程中形成的自然属性,具有广泛性、特异性和适应性等特点<sup>[3]</sup>。种群的遗传多样性水平可以反映出种群对环境变化的适应能力,可为评估环境变化对种群的进化潜力和动态变化的影响提供重要借鉴<sup>[4]</sup>。此前已有渔业资源调查围绕沿海地区游泳动物的物种多样性展开研究<sup>[5-7]</sup>,然而近年来三门湾海域及周边地区人类活动增多,生物群落和水域环境受到一定影响,三门湾海域渔业资源呈现出一定的衰退趋势<sup>[2,7]</sup>。本研究通过简化基因组测序(2b-RAD)技术,针对三门湾海域的无脊椎动物展开研究,选择海区内数量占优势,对生境影响较大,并且易于鉴定的种类,包括哈氏仿对虾(*Parapenaeopsis hardwickii*)、口虾蛄(*Oratosquilla oratoria*)、脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)、曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni de Rochebrune*)、棒锥螺(*Turritella bacillum*)和牡蛎

(*Crassostrea sikmea*)共7种,系统分析这些物种的核基因组遗传多样性状况和线粒体基因组的遗传多样性状况、遗传多样性和群体结构,以期三门湾海域生物种群分类进化、种质资源保护和海洋生态环境修复提供科学依据和背景资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

按照《建设项目对海洋生物资源影响评价技术规程》(SC/T 9110—2007)和《海洋渔业资源调查规范》(SC/T 9403—2012),于2019年8月(夏季)、11月(秋季)、2020年2月(冬季)和5月(春季),采用底拖网开展渔业资源调查。结合调查水域的实际情况设置站位,以保证调查站位的合规性和合理性,选取的30个调查站位分布于28°43'00"N—29°09'39"N, 121°37'12"E—122°05'31"E(图1)。采集头足类(曼氏无针乌贼)、甲壳类(哈氏仿对虾、口虾蛄、脊尾白虾和三疣梭子蟹)和贝类(棒锥螺和牡蛎)共7种代表性无脊椎物种样本,采集后立即冷冻保存,运回实验室,用以分析生物的遗传多样性。

### 1.2 实验方法

将所有样品各取肌肉30 mg,剪碎,加入200  $\mu$ L DNA裂解液和5  $\mu$ L蛋白酶K,65  $^{\circ}$ C水浴消化,每半小时振荡一次,直至完全溶解。待冷却后,加入酚氯仿200  $\mu$ L,混匀后静置1 min,进行离心。取100  $\mu$ L上清液,加入100  $\mu$ L异丙醇并进行离心。除去上清液后加入1 mL 75%乙醇,并进行离心。弃上清液后加入50  $\mu$ L双蒸水混匀,

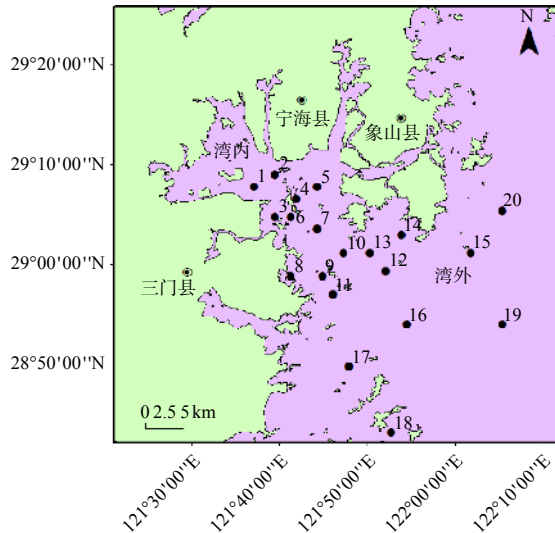


图1 三门湾生物遗传多样性调查站位

Fig. 1 Sampling stations of biological genetic diversity in the Sanmen bay

通过琼脂糖检测和 NanoDrop 2000 紫外分光光度计 (Thermo Fisher Scientific) 对抽提 DNA 的质量和浓度进行检测。DNA 产物置于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

测序文库使用 2b-RAD 标签串联技术构建<sup>[8]</sup>。每个基因组 DNA 样品均用 IIB 型限制酶 (Bsa XI) 剪切, 并与标准 5'-NNN-3' 接头连接建库。文库质量控制合格后, 在 Illumina Hiseq Xten 平台进行 Paired-end 测序。

### 1.3 数据分析

从测序数据中提取含有酶切识别位点的片段, 使用 Stacks 软件包中的 ustacks 软件 (version 1.34) 进行聚类, 构建参考序列<sup>[9]</sup>。利用 SOAP 软件 (version 2.21) 将测序数据比对到参考序列<sup>[10]</sup>, 使用最大似然法进行位点分型<sup>[11]</sup>。利用 Genepop

软件 (Version 1.0.5) 对 SNP 位点的分型结果进行处理<sup>[12]</sup>, 得到参考序列数 (Tag number)、SNP 位点数和变异位点比例 (SNP 位点数/tag number\*27 bp), 并计算其有效等位基因数 ( $N_e$ )、期望杂合度 ( $H_e$ )、观测杂合度 ( $H_o$ )、多态信息含量 ( $PIC$ )。利用 vcftools 软件 (Version 0.1.14) 计算核苷酸多样性 ( $P_i$ ) 和转换/颠换 ( $T_s/T_v$ ) 的比值<sup>[13]</sup>, 并利用 plink (v1.9) 软件计算 1-IBS 矩阵 (遗传距离)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 SNP 分型结果及遗传变异评估

简化基因组测序 (2b-RAD) 技术主要利用 IIB 型限制性内切酶, 可快速进行全基因组范围高通量 SNP 筛查和分析, 具有成本低, 方便快捷, 获得的标记数目多等优势, 可以很好地应用于群体遗传多样性的分析研究<sup>[14]</sup>。为进一步评估三门湾海域生物的种群结构与资源现状, 本研究利用该技术分析了三门湾 7 个无脊椎动物种群的遗传多样性。

SNP 分型结果中各位点的突变类型特点见表 1。在 7 个群体中发现的变异位点 (SNP 位点) 数为 33174 ~ 108139 个, 变异位点比例变化范围为 0.17% ~ 1.57%。碱基转换突变的数量均高于颠换数量, 转换/颠换 ( $T_s/T_v$ ) 的变化范围为 1.2675 ~ 1.8702。通过对 SNP 位点特征的分析发现, 本次研究的 4 种甲壳类生物群体的变异位点比例均处于较低水平。

### 2.2 遗传多样性分析

三门湾海域 7 种无脊椎动物的遗传多样性水平如表 2 所示。哈温平衡  $p$  值 (HW-P) 均大于 0.05 表明所调查的 7 个群体均达到了遗传平

表 1 SNP 分型结果及突变类型特点

Tab.1 SNP typing results and characteristics of mutation types

种类	个体数量	SNP位点数	参考序列数	变异位点比例	转换	颠换	转换/颠换R值
哈氏仿对虾	13	108139	383242	1.05%	64599	43540	1.4837
口虾蛄	15	12336	217990	0.17%	7945	4391	1.8094
脊尾白虾	10	42114	297277	0.52%	24985	17129	1.4586
三疣梭子蟹	15	85304	325007	0.97%	55583	29721	1.8702
曼氏无针乌贼	8	39388	400123	0.36%	23442	15946	1.4701
棒锥螺	10	90601	213613	1.57%	54209	36392	1.4896
牡蛎	10	33174	80684	1.52%	18544	14630	1.2675

衡。观测杂合度和期望杂合度的变化范围分别为 0.1421 ~ 0.2888 和 0.1416 ~ 0.2853, 表明这 7 个群体的遗传多样性水平较低。多态信息含量(*PIC*)和核苷酸多样性(*Pi*)的变化范围分别为 0.1248 ~ 0.2341 和 0.1473 ~ 0.3061, 表明这 7 个物种遗传信息的序列间多样性较小, 并且 *PIC* 均

小于 0.25, 为低度多态, 表明这 7 个物种的 DNA 变异程度较低。有效等位基因数(*Ne*)变化范围为 1.196 ~ 1.463, 表明等位基因在群体中的分布较为均匀。种群内个体间遗传距离(1-*IBS*)的变化范围为 0.1177 ~ 0.2457, 表明每个种群内个体间的遗传分化很小。

表 2 三门湾海域 7 种无脊椎动物群体遗传变异的评估

Tab.2 Evaluation of population genetic variation of seven invertebrates in the Sanmen bay

种类	哈温平衡 <i>p</i> 值( <i>HW-P</i> )	观测 杂合度( <i>Ho</i> )	期望 杂合度( <i>He</i> )	多态信息 含量( <i>PIC</i> )	核苷酸 多样性( <i>Pi</i> )	观测等位 基因数( <i>Na</i> )	有效等位 基因数( <i>Ne</i> )	遗传距离 (1- <i>IBS</i> )
哈氏仿对虾	0.74	0.1471	0.1836	0.1575	0.1916	2	1.269	0.1760
口虾蛄	0.79	0.1421	0.1416	0.1248	0.1473	2	1.196	0.1177
脊尾白虾	0.77	0.1688	0.1854	0.1614	0.1968	2	1.261	0.1711
三疣梭子蟹	0.77	0.1926	0.1962	0.1659	0.2037	2	1.299	0.1675
曼氏无针乌贼	0.70	0.2888	0.2853	0.2341	0.3061	2	1.463	0.2457
棒锥螺	0.76	0.1981	0.2274	0.1924	0.2404	2	1.342	0.2145
牡蛎	0.77	0.2299	0.2418	0.2018	0.2554	2	1.378	0.2168

遗传多样性是物种在长期进化过程中遗传变异和对环境适应的结果, 是物种可持续生存和发展的重要基础<sup>[15]</sup>。研究种群的遗传结构和遗传分化可以更有效地保护和利用种质资源<sup>[16]</sup>。观测杂合度(*Ho*)、期望杂合度(*He*)、多态信息含量(*PIC*)、核苷酸多样性(*Pi*)和有效等位基因数(*Ne*)都是衡量种群遗传多样性的重要指标<sup>[17]</sup>。本研究中三门湾海域 7 种无脊椎动物的群体遗传多样性参数较低, 表明该海域这 7 种无脊椎动物的群体遗传多样性水平均较低, 并且同一种类个体间的遗传分化较小, 遗传结构较稳定。

然而, 本次对三门湾海域渔业资源调查却发现, 游泳动物资源密度较 2013 年明显提升, 2019 年秋季以及 2020 年春、冬季调查游泳生物重量密度均值分别为 414.92 kg/km<sup>2</sup>、311.44 kg/km<sup>2</sup>、275.32 kg/km<sup>2</sup>, 均高于 2013 年 9 月、5 月、1 月调查值 213.34 kg/km<sup>2</sup>、208.37 kg/km<sup>2</sup>、95.15 kg/km<sup>2</sup>。三门湾游泳生物重量资源密度明显增加, 这可能与东海休渔期延长、休渔制度和保护措施有关。此外, 资源密度的提高可能与农业部门组织的增殖放流工作的稳步实施密切相关。近年来, 随着海洋环境污染问题和人类活动加剧, 中国近海渔业资源日益萎缩<sup>[18]</sup>。实施人工增殖放流, 在一定程度上可以缓解渔业资源衰退。然而, 在人工繁育放流过程中, 繁殖使用的亲本数量较少,

造成有效繁殖群体较少, 进而导致有效群体显著降低, 可能是造成遗传多样性降低的直接原因<sup>[19]</sup>。对大西洋鲑(*Salmo salar*)的遗传多样性研究发现, 大量放流人工培育苗种会造成遗传多样性的急剧下降<sup>[20]</sup>。海洋生物通常表现出很强的产卵能力, 即有限的亲本便可繁殖大量子代, 尤其在甲壳类中, 如三疣梭子蟹(*P. trituberculatus*)存在明显的繁殖贡献不平衡现象<sup>[21]</sup>。冀萌萌等<sup>[7]</sup>于 2014 年 11 月和 2015 年 5 月进行的三门湾渔业资源调查结果发现, 三门湾存在大量三疣梭子蟹的产卵亲体, 据此推测, 三门湾可能存在三疣梭子蟹的产卵场与索饵场。本次拖网调查的结果也发现了上述现象, 在多样性组成上, 本次拖网调查发现 2019 年秋季和 2020 年春、冬季游泳动物渔获物生物量多样性指数(*H'*)均值分别为 1.55、1.17、1.24, 均低于 2013 年 9 月、5 月、1 月对应的调查数据 3.08、2.43、2.60。随着人工繁殖技术大量推广, 易造成当地无脊椎动物群体尤其是虾蟹类野生资源退化, 遗传组成及遗传结构发生变化, 遗传多样性水平降低。在紫海胆(*Paracentrotus lividus*)的研究中发现, 养殖群体的遗传多样性显著低于野生群体, 且存在较小的有效等位基因数(*Ne*)和紧密的亲缘关联性关系<sup>[22]</sup>。此外, 环境变化影响物种的进化和多样性, 由于三门湾渔业生产资料涉及浙江



省台州市所辖三门县、宁波市所辖宁海县、象山、三门县3个县, 本次渔业资源调查发现以上3个县依然存在近岸海域富营养化、养殖区域资源空间利用不合理等问题, 进而导致生物群落结构和生态系统退化, 这也降低了区域保持生物多样性的生态功能, 在一定程度上造成了三门湾物种多样性下降, 总体呈现较低水平的状态。

### 3 结论

本研究表明, 三门湾水域7种代表性无脊椎动物种群中, 变异位点比例均较低, 并且相同种群个体间的遗传分化较小。本研究中三门湾海域7种无脊椎动物群体的遗传多样性水平均较低。结合本次对三门湾海域渔业资源调查分析, 这可能与相关海域人工增殖放流、近岸海水富营养化、养殖区域资源空间利用不合理等因素有关。因此, 未来需重点关注三门湾海域有关生物群体遗传多样性水平较低的现状, 加强渔业种质资源保护, 利用简化基因组或全基因组等技术进一步揭示生物遗传背景, 开展多学科、多课题的交叉和综合研究, 制定合理的渔业资源保护与利用策略。同时, 注重生态环境修复, 减少输入污染, 保护水域生态结构和功能, 保障海洋渔业的可持续发展。

### 参考文献:

- [1] 谢彩琴, 艾为明, 彭欣, 等. 三门核电站周边海域浮游植物多样性与季节变化[J]. *科技通报*, 2015, 31(7): 222-228.
- [2] 刘镇盛, 王春生, 张志南, 等. 三门湾浮游动物的季节变动及微型浮游动物摄食影响[J]. *生态学报*, 2006, 26(12): 3931-3941.
- [3] 曹宏杰, 倪红伟. 土壤微生物多样性及其影响因素研究进展[J]. *国土与自然资源研究*, 2015 (3): 85-88.
- [4] 贾超峰, 刘海林, 许津, 等. 大黄鱼种质遗传多样性研究进展[J]. *海洋通报*, 2017, 36(1): 12-18.
- [5] 李双, 李琪, 于红, 等. 浙闽沿海葡萄牙牡蛎群体遗传结构及种群历史分析[J]. *中国水产科学*, 2015, 22(6): 1260-1269.
- [6] 邓园, 宋娜, 刘名, 等. 基于线粒体DNA Cyt b序列的双齿围沙蚕群体遗传多样性分析[J]. *水生生物学报*, 2014, 38(3): 597-601.
- [7] 冀萌萌, 田阔, 胡成业, 等. 三门湾春、秋季游泳动物群落组成及物种多样性研究[J]. *水生态学杂志*, 2016, 37(2): 42-48.
- [8] WANG S, LIU P P, LV J, et al. Serial sequencing of isologous RAD tags for cost-efficient genome-wide profiling of genetic and epigenetic variations[J]. *Nature Protocols*, 2016, 11(11): 2189-2200.
- [9] CATCHEN J, HOHENLOHE P A, BASSHAM S, et al. Stacks: an analysis tool set for population genomics[J]. *Molecular Ecology*, 2013, 22(11): 3124-3140.
- [10] LI R Q, LI Y R, KRISTIENSEN K, et al. SOAP: short oligonucleotide alignment program[J]. *Bioinformatics*, 2008, 24(5): 713-714.
- [11] FU X T, DOU J Z, MAO J X, et al. RADtyping: an integrated package for accurate *de novo* codominant and dominant RAD genotyping in mapping populations[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e79960.
- [12] ROUSSET F. Genepop'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2008, 8(1): 103-106.
- [13] DANECEK V, SILHAVY P. The fault-tolerant control system based on majority voting with kalman filter[C]//2011 34th International Conference on Telecommunications and Signal Processing (Tsp). Budapest, Hungary: IEEE, 2011: 472-477.
- [14] 贾磊, 张博, 刘克奉, 等. 基于2b-RAD简化基因组测序的半滑舌鳎群体遗传多样性分析[J]. *水产研究*, 2017, 4(4): 125-133.
- [15] LIU F, QU Y K, GENG C, et al. Analysis of the population structure and genetic diversity of the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) in China using SSR markers[J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2020, 47: 59-71.
- [16] FU Y R, LI S K, GUO Q Q, et al. Genetic diversity and population structure of two endemic *Cupressus* (Cupressaceae) species on the Qinghai-Tibetan plateau[J]. *Journal of Genetics*, 2019, 98(1): 14.
- [17] BOTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32(3): 314-331.
- [18] 王四杰. 山东省海洋渔业资源增殖开发现状与问题[J]. *齐鲁渔业*, 2009, 26(1): 52-54.
- [19] 刘文雷, 刘滨玮, 刘奇, 等. 人工放流海洋生物的遗传和生态影响研究综述[J]. *安徽农学通报*, 2020, 26(1): 68-70.
- [20] CHRISTIE M R, MARINE M L, FRENCH R A, et al. Effective size of a wild salmonid population is greatly reduced by hatchery supplementation[J]. *Heredity*, 2012, 109(4): 254-260.
- [21] 刘海映, 吕海波, 崔帆, 等. 放流三疣梭子蟹遗传多样性和贡献率初步研究[J]. *水产科学*, 2016, 35(6): 613-619.
- [22] SEGOVIA-VIADERO M, SERRÃO E A, CANTERAS-JORDANA J C, et al. Do hatchery-reared sea urchins pose a threat to genetic diversity in wild populations?[J]. *Heredity*, 2016, 116(4): 378-383.