

基于线粒体 16S rRNA 探讨渤海海区矮拟帽贝种群生态遗传

史博洋¹, 李媛媛¹, 王儒晓¹, 曲江勇^{1,2*}, 郭承华^{1*}, 刘传林¹, 侯建海¹, 房辉¹, 刘楚童¹

(1. 烟台大学生命科学学院, 山东烟台 264005; 2. 海南两栖爬行动物国家重点实验室, 海南热带海洋学院, 海南三亚 572000)

摘要: 采用聚合酶链式反应和直接测序的方法研究了渤海海区15个矮拟帽贝*Patelloida pygmaea*种群遗传多样性与环境因子的关系。180个个体的16S rRNA部分序列(615 bp)共发现264个多态性位点, 153个转换, 114个颠换, 界定32个单倍型。所有个体碱基含量依次为C(18.12%)、T(27.74%)、A(33.07%)、G(21.07%); 单倍型多样性为 $0.835 1 \pm 0.019 1$, 核苷酸多样性为 0.449 ± 0.214 。矮拟帽贝大陆沿岸种群核苷酸多样性($0.191 8 \pm 0.091 7$)高于岛屿种群($0.107 3 \pm 0.081 6$)。种群历史动态结果显示, 矮拟帽贝经历了种群近期扩张。与环境因子相关性研究发现, 遗传距离、序列变异、核苷酸多样性与日照时数、日照百分率分别呈显著正相关($P < 0.05$); 形态相关分析结果表明, 变异主成分(长度、宽度)与年均降水量呈显著负相关($P < 0.05$); 年均降水量、日照时数、日照百分率是影响矮拟帽贝形态变异、遗传多样性的主导因子, 环境越稳定地区种群的遗传多样性越高。

关键词: 矮拟帽贝; 16S rRNA; 生态遗传; 遗传多样性

中图分类号: Q145

文献标志码: A

文章编号: 1000-7083 (2017) 04-0000-00

Population Ecological Genetics of *Patelloida pygmaea* Based on Mitochondrial 16S rRNA Fragment Sequences in the Bohai Sea

SHI Boyang¹, LI Yuanyuan¹, WANG Ruxiao¹, QU Jiangyong^{1,2*}, GUO Chenghua^{1*}, LIU Chuanlin¹, HOU Jianhai¹, FANG Hui¹, LIU Chutong¹

(1. College of Life Sciences, Yantai University, Yantai, Shandong Province 264005, China; 2. Hainan Key Laboratory for Herpetological Research, Hainan Tropical Ocean University, Sanya, Hainan Province 572000, China)

Abstract: The relationship between genetic diversity and environmental factors of 15 *Patelloida pygmaea* populations in the Bohai Sea was studied by PCR and DNA sequencing. A total of 264 polymorphic loci were found in the 16S rRNA partial sequence of the 180 individuals, and 153 transitions as well as 114 transversions were defined by 32 haplotypes. The base contents of C, T, A and G were 18.12%, 27.74%, 33.07%, and 21.07%, respectively. The haplotype diversity was $0.835 1 \pm 0.019 1$, and the nucleotide diversity was 0.449 ± 0.214 . Moreover, the nucleotide diversity of *P. pygmaea* population in the coast ($0.191 8 \pm 0.091 7$) was higher than that of island ($0.107 3 \pm 0.081 6$), and the results of population demographic history indicated that the populations of *P. pygmaea* may have experienced a recent demographic expansion. The correlation analysis between environmental factors and genetic factors showed that the genetic distance, sequence variation and nucleotide diversity of *P. pygmaea* were significantly positive correlated with sunshine duration and sunshine percentage ($P < 0.05$). The result of morphological correlation analysis showed that the main components (length and width) were significantly negative correlated with the annual average precipitation ($P < 0.05$). Average annual precipitation, sunshine duration and sunshine percentage were the dominant factors of *P. pygmaea* morphological variation, and the population genetic diversity will be higher in the the area with high environmental stability.

Keywords: *Patelloida pygmaea*; 16S rRNA; ecological genetical; genetic diversity

环境因子在物种的进化过程中发挥着重要作用, 物种的分布、行为、生理和遗传结构通常都会受到环境因子的影响, 探究环境因子与生物多样性的相关性是生态遗传研究的重要内容之一(Scheiner, 1993)。通常种群占据不同地理环境并呈现梯度性遗传变化, 这种结果主要受自然选择与环境变迁影响(Jin & Liu, 2008), 遗传结构分化和自然环境变迁之间的相互作用是目前生态地理学关注的焦点。同类物种生活在不同环境下(温度、降水、日照等)的地理种群遗传多样性存在地理变异, 如荒漠沙蜥*Phrynocephalus przewalskii*的遗传多样性与纬度、降水量的显著正相关, 大石鸡*Alectoris magna*、雉鸡甘肃亚种*Phasianus colchicus strauschi*的遗传多样性与温度呈显著负相关, 以及同种生物因环境而产生的形态改变影响基因频率等(Michod, 1981; Nevo, 1981; 曲江勇, 刘迺发, 2012)。环境对生物的影响(环境的演替、种群遗传结构的多变)伴随着表型与基因型的变化继而改变种群结构, 环境促进演替使种群遗传分化趋于平衡稳定(Slatkin, 1987)。

分子标记作为研究种群遗传结构和地理分化的重要工具, 目前已广泛用于解决动物生态遗传等问题(Wayne &

收稿日期:2017-01-12

接受日期:

基金项目:国家自然科学基金地区基金项目(31460562); 烟台大学博士科研启动经费(SM15B01); 2016年国家级大学生创新创业训练计划项目(201611066009); 烟台大学研究生科技创新基金项目; 烟台大学开放实验室项目

作者简介:史博洋, 硕士研究生, 主要从事海洋生物学研究, E-mail:sby_hope@163.com

*通信作者Corresponding author, E-mail:qjy@ytu.edu.cn; gch@ytu.edu.cn

Robert, 2004)。动物线粒体DNA具有分子量小、进化速度快、结构简单、表现为母系遗传等特点,非常适于动物群体遗传学和系统进化研究(Canapa *et al.*, 2000),其中16S rRNA基因进化速率适中,适合种群水平的遗传多样性及遗传结构研究(Honda *et al.*, 2002)。

矮拟帽贝 *Patelloida pygmaea* 隶属软体动物门Mollusca腹足纲Gastropoda原始腹足目Archaeogastropoda笠贝科Acmaeidae(Surhone *et al.*, 2010),中国习见种类,沿岸、岛屿均有分布。矮拟帽贝遍布整个潮间带(海岸带以上到浅层潮下带),栖息附着在大型水生植物、激浪区礁岩、珊瑚藻及其他贝壳等表面,主要摄食藻类与浮游植物(Lindberg, 1990; Takenori & Takashi, 1993; Kirkendale & Meyer, 2004; Nakano & Ozawa, 2007)。目前矮拟帽贝研究主要集中在系统学和分类学等领域,包括种水平鉴定、形态变异、遗传多样性等(Nakai *et al.*, 2006; Gonzálezwevar *et al.*, 2010),种群系统地理研究较少。国内研究重点多为具有较大经济价值的贝类,分布广泛但无经济价值的潮间带贝类的系统地理格局受历史因素、现今环境和生态因素的影响,其遗传进化、系统地理分布格局未得到深入研究(Ni *et al.*, 2012)。

本研究以矮拟帽贝线粒体DNA 16S rRNA部分序列,探究矮拟帽贝的生态遗传,揭示种群遗传多样性随环境因子的变异规律,为中国矮拟帽贝种群遗传研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集、DNA 提取及序列获取

矮拟帽贝采样点见图1,测量壳长、壳宽、壳高、壳周长、长斜边、短斜边、壁厚等;返回实验室称量壳干重、计算头端角度与尾端角度(表1),存于无水乙醇中备用。

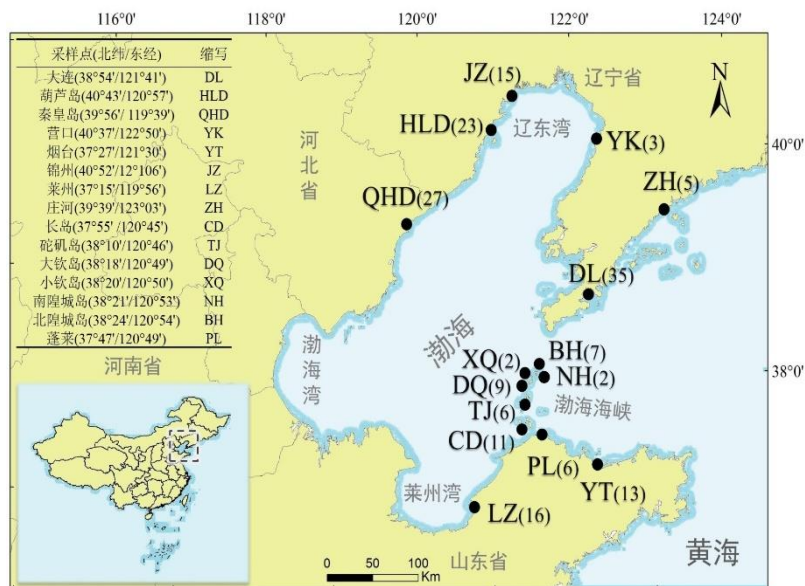


图1 矮拟帽贝地理种群采集点

Fig. 1 The sampling sites of *Patelloida pygmaea* in the Bohai Sea
括号内为样品数量。

The number in the brackets is the sample size.

DNA 提取: DNeasy®组织&血液试剂盒(GTIN: 04053228006077, Lot: 151046088, GIAGEN, 德国)。PCR 扩增: 选用 16S rRNA 通用引物(华大基因合成), 16Sar-L: 5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3'; 16SbrH: 5'-CCGGTCTG AACTCAGATCACGT-3'(Folmer *et al.*, 1994), PCR 扩增反应体系(25 μ L): 12.5 μ L Taq MIX(0.625 U Taq 酶、0.2 mmol \cdot L⁻¹ dNTP、1.5 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂; Lot: A3701A, TaKaRa, 中国大连); 0.15 μ L (100 μ M)上下游引物、1 μ L DNA 模板(80~100 ng)。PCR 反应条件设置: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 49 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 结束后取 4 μ L 于 1% 琼脂糖凝胶电泳检测(1 \times TBE、5 V/cm 恒压、Goldenview 染色)(琼脂糖, Lot: 142075, BIOWEST, 西班牙; Goldenview, Lot: OHO9RL, 济南力戈科技有限公司)。PCR 产物送北京六合华大公司进行 ABI PRIMS 3730 双向测序。

1.2 环境因子

选取经度、纬度、年均温度、温度变异系数、年均降水量、降水量变异系数、年均日照时数、日照率作为环境因子(表 2), 从国家气象数据共享服务网获取 10 个地点近 30 年气象数据, 并计算气温、降水量变异系数(砣矶岛、大钦岛、小钦岛、北隍城岛、南隍城岛等地区气象站因缺少相关数据, 未被国家气象数据共享服务网收录)。

1.3 数据分析

双向测序结果用 Conting 进行拼接,通过 CLUSTAL_X 1.83 进行序列比对,单倍型用 DnaSP v5 统计(Librado & Rozas, 2009)。通过 ARLEQUIN 3.5 计算群体多样性指数:单倍型多样性(h)、核苷酸多样性(π)、序列平均核苷酸差异数(k)、扩张系数(Tau)、有效种群大小(θ)、种群分化系数(F_{st}); AMOVA 分析(Excoffier & Lischer, 2010); 通过 MEGA7 计算遗传距离(D)与序列变异(S)(Kumar *et al.*, 2016); 样品所测壳长、壳宽、壳高、壳周长、短斜边、头端角度、长斜边、尾端角度、干重、壁厚等形态数据用平均数与标准差表示,形态变异采用主成分分析与相关性分析。以上统计分析均在 SPSS 19.0 (Arbuckle, 2010)完成。

表 1 15 个矮拟帽贝种群形态数据的平均数与标准差(平均数±标准差)

Table 1 Mean values and standard deviation ($\bar{X}\pm SD$) of the morphological data 15 *Patelloida pygmaea* populations

种群 Population	壳长 Lengt h/mm	壳宽 Width /mm	壳高 Height/ mm	壳周长 Perimeter/ cm	短斜边 Short hypotenuse/ mm	长斜边 Long hypotenuse/ mm	头端角度 Headend angle/°	尾端角 度 End angle/°	干重 Dry mass/g	壁厚 Wall thickness/ mm
大连	13.63 ±2.67	1096± 2.31	6.14±0.9 7	3.92±0.82	7.77±1.40	10.63±1.80	50.91±5.40	34.67± 5.08	0.25±0. 13	0.53±0.13
葫芦岛	9.89± 1.93	8.14± 1.87	5.09±1.2 1	2.95±0.66	6.03±1.48	8.08±1.57	54.67±4.18	37.28± 4.69	0.15±0. 11	0.54±0.16
秦皇岛	11.04 ±1.24	8.82± 1.05	5.02±0.6 9	3.26±0.35	6.13±0.77	8.89±1.15	53.09±4.83	33.65± 4.44	0.14±0. 06	0.51±0.12
营口	9.48± 0.82	7.85± 0.90	4.75±0.6 8	2.89±0.35	5.73±0.96	7.68±0.82	53.77±3.90	36.89± 4.18	0.10±0. 04	0.50±0.11
烟台	12.37 ±1.03	9.91± 0.93	5.43±0.9 3	3.91±0.30	7.07±1.04	9.40±0.76	48.86±4.57	34.48± 5.21	0.20±0. 09	0.55±0.13
锦州	11.47 ±1.57	9.36± 0.98	5.24±0.5 0	3.42±0.37	6.38±0.53	9.17±1.42	52.52±4.35	34.25± 5.45	0.18±0. 07	0.62±0.12
莱州	10.37 ±1.23	8.39± 1.04	5.02±0.5 8	3.15±0.52	6.09±0.59	8.30±1.03	52.59±4.96	36.33± 6.57	0.15±0. 04	0.49±0.07
庄河	7.07± 0.53	5.75± 0.55	3.01±0.5 0	1.84±0.12	3.57±0.45	4.97±0.47	39.17±9.07	27.10± 7.23	0.03±0. 01	0.48±0.10
长岛	10.90 ±1.25	8.80± 1.01	5.37±0.7 3	3.35±0.36	6.39±0.78	8.56±1.23	51.44±5.47	35.81± 4.22	0.20±0. 07	0.71±0.15
砣矶岛	12.16 ±1.22	9.63± 1.11	5.14±0.6 8	3.71±0.38	5.98±0.88	9.27±1.09	47.25±5.61	28.51± 5.33	0.18±0. 07	0.62±0.11
大钦岛	13.42 ±1.33	10.66 ±1.32	6.41±0.6 7	4.13±0.44	7.11±0.60	10.34±1.96	49.27±10.9 0	30.97± 3.74	0.23±0. 12	0.54±0.09
小钦岛	20.97 ±3.21	17.33 ±2.71	8.43±0.9 6	6.44±0.90	11.17±1.66	15.64±1.97	47.22±4.74	31.42± 2.88	0.58±0. 27	0.71±0.19
南隍城岛	16.57 ±1.11	13.49 ±1.02	8.00±0.6 6	5.46±0.36	9.57±0.90	13.40±0.75	53.83±3.77	35.31± 4.42	0.63±0. 11	0.80±0.11
北隍城岛	14.84 ±1.49	12.05 ±1.37	7.25±0.9 6	4.39±0.44	8.97±1.40	11.55±0.78	51.08±2.92	37.06± 4.95	0.38±0. 12	0.78±0.12
蓬莱	9.92± 1.43	8.52± 1.31	4.52±0.6 5	3.03±0.46	5.74±0.93	7.52±1.09	48.91±4.20	34.89± 2.40	0.12±0. 06	0.45±0.10

表 2 10 个矮拟帽贝地理种群近 30 年环境因子

Table 2 Environmental factors of 10 *Patelloida pygmaea* populations in recent 30 years

地点 Site	年平均气温 Annual average temperature/°C	气温变异系数 Temperature variation coefficient/%	年平均降水量 Annual average precipitation/mm	降水量变异系数 Precipitation variation coefficient/%	日照时数 Sunshine hours/h	日照百分率 Sunshine percentage/%
---------	---	--	--	--	-----------------------------	-----------------------------------

锦州	9.9±0.7	4.51	568.60±157.6	29.09	2 647.9	59.7
葫芦岛	9.7±0.7	4.00	579.85±147.4	30.72	2 716.8	61.4
营口	9.1±0.6	4.00	581.15±166.4	26.92	2 661.6	60.1
秦皇岛	11.1±0.6	4.58	600.21±138.2	25.71	2 536.1	57.2
庄河	9.3±0.5	6.59	736.10±156.5	28.62	2 429.7	54.8
大连	11.3±0.6	6.70	579.75±170.0	25.42	2 670.5	60.1
烟台	13.1±0.6	7.07	588.60±151.3	27.72	2 550.8	57.7
莱州	13.3±0.6	5.38	603.65±175.6	21.26	2 781.9	62.7
长岛	12.5±0.5	5.31	544.60±167.3	29.32	2 668.7	60.1
蓬莱	12.5±0.5	5.59	608.00±163.7	23.02	2 594.4	58.4

表3 15个矮拟帽贝地理种群遗传多样性

Table 3 Genetic diversity of 15 *Patelloida pygmaea* populations

地点 Site	单倍型数量 n	遗传距离 D	序列变异 S	单倍型多样性 h	核苷酸多样性 π	平均两两差异数 k	扩张系数 Tau
大连	4	0.170	0.219	0.856(0.040)	0.179 3(0.087 7)	109.573(48.193)	0.004
葫芦岛	2	0.149	0.194	0.486(0.105)	0.155 7(0.077 5)	94.648(42.229)	—
秦皇岛	3	0.114	0.147	0.821(0.043)	0.121 3(0.060 1)	74.006(32.990)	6.850
营口	2	0.077	0.085	1.000(0.272)	0.071 1(0.053 8)	37.333(22.667)	398.930
烟台	5	0.101	0.122	0.808(0.113)	0.122 5(0.063 5)	75.205(34.681)	429.000
锦州	3	0.173	0.225	0.562(0.095)	0.181 0(0.092 4)	110.067(50.113)	—
莱州	4	0.180	0.235	0.800(0.068)	0.185 5(0.094 2)	112.758(51.131)	287.707
庄河	1	—	—	—	—	—	—
长岛	5	0.080	0.101	0.782(0.093)	0.091 5(0.048 4)	56.109(26.311)	1.938
砣矶岛	2	0.071	0.079	0.600(0.129)	0.099 8(0.058 3)	61.200(30.948)	—
大钦岛	1	0.047	0.052	0.917(0.073)	0.066 0(0.036 0)	40.472(19.453)	2.436
小钦岛	1	0.004	0.004	1.000(0.500)	0.003 3(0.004 1)	2.000(1.7320)	—
南隍城岛	2	0.000	0.000	1.000(0.500)	0.001 6(0.002 3)	1.000(1.000)	—
北隍城岛	2	0.077	0.081	0.810(0.130)	0.100 0(0.056 5)	61.333(30.261)	9.373
蓬莱	1	—	—	—	—	—	—

表4 矮拟帽贝分子方差分析

Table 4 AMOVA analysis of *Patelloida pygmaea*

变异来源	自由度	平方和	方差分量	变异百分比	P 值
Source of variation	df	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	P value
种群间 Among populations	14	3 819.561	20.220	33.07	<0.001
种群内 Within populations	165	6 751.600	40.919	66.93	<0.001

表5 矮拟帽贝遗传多样性、形态与环境因子相关性分析

Table 5 Relationship correlation of genetic diversity and morphology of *Patelloida pygmaea* with environmental factors

	经度	纬度	年平均气温	气温变异系数	年平均降水	降水量变异系数	日照时数	日照百分率
遗传距离 D	0.33	0.46	0.093	-0.233	-0.557	-0.029	0.686*	0.692*
序列变异 S	0.29	0.44	0.101	-0.227	-0.537	-0.036	0.681*	0.686*
单倍型多样	0.36	0.35	0.156	-0.200	-0.654	-0.038	0.483	0.493
核苷酸多样	0.30	0.43	0.149	-0.176	-0.570	-0.005	0.655*	0.662*
壳长	0.36	0.24	0.454	-0.223	-0.703*	-0.123	0.355	0.350
壳宽	0.37	0.24	0.459	-0.194	-0.728*	-0.155	0.381	0.375

注 Note: * $P < 0.05$.

2 结果

2.1 序列变异与遗传多样性

180个矮拟帽贝样本的 mtDNA 16SrRNA 部分序列中,共发现了 264 个多态位点,碱基组成为 C(18.12%)、T(27.74%)、A(33.07%)、G(21.07%),转换/颠换比为 1.34(缺失位点少于 5%),界定 32 种单倍型。总体单倍型多样性 0.835 1,核苷酸多样性 0.449,核苷酸两两差异度为 118.533。除庄河、蓬莱外其他地理种群单倍型多样性较高(表 3);陆地种群的核苷酸多样性、遗传距离与序列变异整体高于岛屿种群,扩张系数与种群遗传多样性表明种群存在近期扩张;AMOVA 分析可知变异主要来自种群内(66.93%, $P<0.001$)(表 4)。

2.2 遗传多样性与环境因子间的相关性

所有环境因子经正态分布检验,结果显示均为正态分布,通过 Person 相关性检验(表 5),发现矮拟帽贝种群遗传距离、序列变异、核苷酸多样性与日照时数、日照百分率呈显著正相关($P<0.05$);其他数据间无显著相关性。主成分分析显示,壳长、壳宽为变异关键因子(贡献值:74.6%、18.4%),壳长、壳宽与环境因子相关性分析结果表明:壳长、壳宽与年均降水量呈显著负相关($r = -0.703 / -0.728$, $P = 0.023 / 0.017$)。

3 讨论

通过对矮拟帽贝 15 个种群的线粒体 16S rRNA 基因序列研究表明,各地理种群较高的单倍型多样性(0.486~1.000)和较低的核苷酸多样性(0.001 6~0.185 5),符合 Grant 和 Bowen(1998)提出的海洋类生物较高的单倍型多样性和较低的核苷酸多样性模式,该类型种群可能经历过历史扩张事件(Bowen *et al.*, 2001), Tau 值与 θ 值也表明该物种存在近期历史扩张(所有个体 CI 95%: $Tau = 426.109$ 、 $\theta_0 = 0$ 、 $\theta_1 = inf$);大陆沿岸种群与岛屿种群遗传差异显著,大陆沿岸种群遗传多样性整体高于岛屿种群,且分化显著($F_{st} = 0.099$ 、 $P < 0.001$),暗示存在显著的陆岛遗传模式,大陆沿岸种群更易扩展与进化,推测大陆沿岸种群更为古老($\pi_{大陆沿岸} = 0.1978$ 、 $\pi_{岛屿} = 0.1073$),岛屿种群基因频率受陆地基因流影响显著(Finston & Peck, 1995; 曲若竹等, 2004)。

气候因子是影响生物进化的重要因子,其中温度和降水量则是影响陆生动物进化的两个最重要生态因子,对外温动物与内温动物均具有显著影响,且气候对不同地区的同类物种的影响程度也不同。渤海不同地理种群矮拟帽贝遗传结构研究结果表明,16S rRNA 序列的遗传距离、序列变异、核苷酸多样性与日照时数、日照百分率呈显著正相关,说明日照是影响矮拟帽贝遗传多样性的重要因素,日照时数越大,遗传多样性越高。温度是影响贝类遗传变异的关键环境因子(Kim *et al.*, 2009),海表温度作为海水热力状况的物理量,受太阳辐射影响显著(Joos & Spahni, 2008),推测矮拟帽贝作为潮间带生物,栖息地以岩石海床为主,日照改变海面温度继而影响种群遗传多样性,且环境越不稳定,遗传多样性越低,与海洋无脊椎动物生态研究结果基本一致(Monari *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2009)。

形态变异主成分(壳长、壳宽)与环境因子相关性分析表明,降水量是影响形态变异的主要因素,与遗传存在差异的主要原因是自然选择导致物种基因遗传与形态变异的模式不同,即选择压力对不同的类型作用不同(Corre *et al.*, 2002)。形态量度和其他环境因子的相关性趋势与遗传分析一致,说明表型通常是受基因控制和影响,自然选择对表型作用实际上是作用于基因或基因型,即环境因素可以通过影响个体表型进而影响基因型频率(Huang *et al.*, 2007)。稳定环境中,较小的自然选择压力使不同的基因型被最大限度地保留,因此遗传多样性较高;在气候不稳定区域,种群保留适应多变环境的基因型而在选择压力下淘汰其他基因型,遗传多样性会降低。

参考文献:

- 曲江勇,刘迺发. 2012. 环境因子对雉鸡甘肃亚种种群遗传多样性的影响[J]. 四川动物, 31(4): 518-523.
- 曲若竹,侯林,吕红丽,等. 2004. 群体遗传结构中的基因流[J]. 遗传, 26(3): 377-382.
- Arbuckle JL. 2010. IBM SPSS Amos 19 user's guide[M]. Chicago: Amos Development Corporation.
- Bowen BW, Bass AL, Rocha LA, *et al.* 2001. Phylogeography of the trumpetfishes(*Aulostomus*): ring species complex on a global scale[J]. *Evolution*, 55(5): 1029-1039.
- Canapa A, Barucca M, Caputo V, *et al.* 2000. A molecular analysis of the systematics of three Antarctic bivalves[J]. *Bolletino di Zoologia*, 67(sup1): 127-132.
- Corre VL, Roux F, Reboud X. 2002. DNA polymorphism at the FRIGIDA gene in *Arabidopsis thaliana*: extensive nonsynonymous variation is consistent with local selection for flowering time[J]. *Molecular Biology & Evolution*, 19(8): 1261-1271.
- Excoffier L, Lischer HEL. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows[J]. *Molecular Ecology Resources*, 10(3): 564-567.
- Finston TL, Peck SB. 1995. Population structure and gene flow in Stomion: a species swarm of flightless beetles of the Galápagos Islands[J]. *Heredity An International Journal of Genetics*, 75(4): 390-397.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, *et al.* 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse

- metazoan invertebrates[J]. *Molecular Marine Biology & Biotechnology*, 3(5): 294-299.
- Gonzálezwevar CA, Nakano T, Cañete JI, *et al.* 2010. Molecular phylogeny and historical biogeography of *Nacella* (Patellogastropoda: Nacellidae) in the Southern Ocean[J]. *Molecular Phylogenetics & Evolution*, 56(1): 115-124.
- Grant W, Bowen BW. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation[J]. *Journal of Heredity*, 89(5): 415-426.
- Honda M, Yasukawa Y, Ren H, *et al.* 2002. Phylogenetic relationships of the Asian box turtles of the genus *Cuora* sensu lato (Reptilia: Bataguridae) inferred from mitochondrial DNA sequences[J]. *Zoologicalence*, 19(11): 1305-1312.
- Huang Z, Liu N, Luo S, *et al.* 2007. Ecological genetics of rusty-necklaced partridge (*Alectoris magna*): environmental factors and population genetic variability correlations[J]. *Korean Journal of Genetics*, 29(2): 115-120.
- Jin YT, Liu NF. 2008. Ecological genetics of *Phrynocephalus vlangalii* on the North Tibetan (Qinghai) Plateau: correlation between environmental factors and population genetic variability[J]. *Biochemical Genetics*, 46(9-10): 598-604.
- Joos F, Spahni R. 2008. Rates of change in natural and anthropogenic radiative forcing over the past 20,000 years[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(5): 1425-1430.
- Kim M, Ahn IY, Cheon J, *et al.* 2009. Molecular cloning and thermal stress-induced expression of a pi-class glutathione S-transferase (GST) in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*[J]. *Comparative Biochemistry & Physiology Part A Molecular & Integrative Physiology*, 152(2): 207-213.
- Kirkendale LA, Meyer CP. 2004. Phylogeography of the *Patelloida profunda* group (Gastropoda: Lottiidae): diversification in a dispersal-driven marine system[J]. *Molecular Ecology*, 13(9): 2749-2762.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets.[J]. *Molecular Biology & Evolution*, 33(7): 1870.
- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5[J]. *Bioinformatics*, 25(11): 1451-1452.
- Lindberg DR. 1990. Systematics of *Potamacmaea fluvia tilis* (Blanford): a brackish water patellogastropod (Patelloidinae: Lottiidae)[J]. *Journal of Molluscan Studies*, 56(2): 309-316.
- Michod RE. 1981. Ecological genetics[J]. *Science*, 212(4491): 154-155.
- Monari M, Matozzo V, Foschi J, *et al.* 2007. Effects of high temperatures on functional responses of haemocytes in the clam *Chamelea gallina*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 22(1-2): 98-114.
- Nakai S, Miura O, Maki M, *et al.* 2006. Morphological and habitat divergence in the intertidal limpet *Patelloida pygmaea*[J]. *Marine Biology*, 149(3): 515-523.
- Nakano T, Ozawa T. 2007. Worldwide phylogeography of limpets of the order Patellogastropoda: molecular, morphological and palaeontological evidence[J]. *Journal of Molluscan Studies*, 73(1): 79-99.
- Nevo E. 1981. Genetic variation and climatic selection in the lizard *Agama stellio* in Israel and Sinai[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 60(6): 369-380.
- Ni G, Li Q, Kong L, *et al.* 2012. Phylogeography of the bivalve *Tegillarca granosa* in coastal China: implications for management and conservation[J]. *Marine Ecology Progress*, 452: 119-130.
- Scheiner SM. 1993. Genetics and evolution of phenotypic plasticity[J]. *Annual Review of Ecology & Systematics*, 24(1): 35-68.
- Slatkin M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations[J]. *Science*, 236(4803):787.
- Surhone LM, Tennoe MT, Henssonow SF. 2010. *Patelloida pygmaea*[M]. Saarbrücken: Betascript Publishing.
- Takenori S, Takashi O. 1993. Anatomy and systematic position of Yayoiacmea, a new genus for Japanese tiny limpet "Collisella" oyamai Habe, 1955 (Gastropoda: Lottiidae)[J]. *The Japanese Journal of Malacology*, 52: 193-209.
- Wayne, Robert K. 2004. Molecular markers, natural history and evolution[M]. Stamford: Sinauer Associates: 25-86.
- Yu JH, Song JH, Choi MC, *et al.* 2009. Effects of water temperature change on immune function in surf clams, *Mactra veneriformis* (Bivalvia: Mactridae)[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 102(1): 30-35.