

渤海湾口虾蛄线粒体 COI 基因的遗传多样性研究

张代臻¹, 丁 鸽^{1, 2}, 张华彬¹, 唐伯平¹

(1 江苏省滩涂生物资源与环境保护重点建设实验室, 盐城师范学院, 江苏 盐城 224051)
(2 盐城工学院化学与生物工程学院, 江苏 盐城 224003)

[摘要] 口虾蛄 (*Oratosquilla oratoria*) 是我国沿海重要的渔业种, 本文对渤海湾口虾蛄 COI 基因的遗传多样性进行研究, 在 48 条 633bp 的 COI 序列中, 存在 19 个变异位点, 且转换高于颠换; 不同水域间的平均遗传距离为 0.004 9, 单元型 HP3、HP5、HP14 是渤海湾不同水域的共享单元型, 且 HP5 和 HP17 是渤海湾较为原始的类型, 并且歧点分布分析显示渤海湾口虾蛄种群经历过快速扩张过程. 本研究将为全面研究渤海湾口虾蛄的遗传多样性、评估野生种质资源情况等积累基本数据.

[关键词] 口虾蛄, COI 基因, 遗传多样性

[中图分类号] Q958 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2010)04-0080-04

Genetic Diversity of *Oratosquilla oratoria* From Different Sea Area of Bohai Bay by Mitochondrial COI Gene

Zhang Daizhen¹, Ding Ge^{1, 2}, Zhang Huabin¹, Tang Boping¹

(1 Jiangsu Provincial Key Laboratory of Coastal Wetland Bioresources and Environmental Protection, Yancheng Normal University, Yancheng 224051, China)
(2 Chemical and Biological Engineering College, Yancheng Institute of Technology, Yancheng 224003, China)

Abstract *Oratosquilla oratoria* (Crustacea: Squillidae) is the most dominant species of Bohai Bay. In the study, the genetic diversity of *O. oratoria* from Bohai Bay was studied by 48 mitochondrial COI sequences. 19 variable sites were defined in 633 sites of the aligned sequences. And the number of transitions was more than transversions. The average genetic distance among sea areas was 0.004 9, and HP3, HP5 and HP14 were shared by different sea areas of Bohai Bay. HP5 and HP17 were the ancestral haplotypes of Bohai Bay by parsimony network. Result of mismatch distribution implied rapid expansion of Bohai population. Genetic diversity analysis of COI sequences will be usable for further assessing the genetic structure of *O. oratoria*.

Key words *Oratosquilla oratoria*, COI gene, Genetic diversity

中国沿海口足类极为丰富, 其中虾蛄科 (Squillidae) 是口足类中的最大一科, 而隶属于虾蛄科、口虾蛄属 (*Oratosquilla*) 的口虾蛄 (*Oratosquilla oratoria*) 是我国沿海地区重要的渔业种类^[1-5]. 但大量捕捞可能会引起其野生资源多样性的降低^[3]. 渤海湾水深 60m 以内的浅海是口虾蛄重要的地理分布区^[2], 因此, 此海域口虾蛄遗传多样性状况可反映其野生种群的现状. 线粒体基因具有替换速率快、变异性大、母系遗传及易于扩增等优点, 在种群水平存在有用的信息位点, 被广泛应用到甲壳动物种下水平分析^[6-9]. 而目前未见有通过线粒体 DNA 序列探讨口虾蛄的种群遗传多样性的报道.

本文通过对渤海湾口虾蛄线粒体 COI 基因序列的遗传变异特征进行研究, 比较分析 3 个海域 COI 基因的多样性以及各种单元型间的进化关系, 为渤海湾口虾蛄野生群体的遗传多样性研究和资源保护提供科学依据.

收稿日期: 2010-07-12
基金项目: 江苏省高校自然科学基金项目 (09KJD180005, 07KJA18017)、盐城师范学院校级项目 (XKR2010003).
通讯联系人: 唐伯平, 教授, 研究方向: 动物系统学. E-mail: boptan@163.com

1 材料和方法

1.1 材料

试验口虾蛄标本是 2009年采集于渤海湾的东营海域、葫芦岛海域和天津海域的野生种群,每个海域各挑选 16只共计 48只,分别编号为 DY01-16 HLD01-16和 TJ01-16 在实验室中经 95%乙醇浸泡固定后,长期保存在 - 20℃的冰箱中.

1.2 DNA提取、扩增和测序

取口虾蛄背部肌肉约 0.1 g 用 ddH₂O洗脱标本中的乙醇,然后用常规酚/氯仿抽提法提取总基因组 DNA^[10].

PCR 反应在 ABI 9700 PCR 扩增仪上进行,引物为 KLCO F1490 5-ggt caa caa atc ata aag ata ttg g-3和 KHCO F2198 5-taa act tca ggg tga cca aaa aat ca-3 反应总体积 30 μL,其中含 Taq DNA 聚合酶 1.0U (Promega), dNTP 0.2 mmol/L, MgCl₂ 2.0 mmol/L, 10× Buffer 3.0 μL, 上、下游引物各 0.5 μmol/L, DNA 模板约 5~ 10 ng 循环参数为: 94℃预变性 5 m in 以下过程重复 32循环: 94℃变性 30 s 50℃退火 45 s 72℃延伸 90 s 最后 72℃补齐 10m in 反应产物经 PCR 产物胶回收试剂盒 (上海华舜)纯化,用 ABI PRISM BigDye 测序反应试剂盒 (Peik in-E mer)在 ABI 3730全自动 DNA 测序仪上完成序列测定.

1.3 数据分析

测得序列用 DNASTar软件完成序列校对, Mega3. 0软件完成核苷酸的组成、变异位点; 双参数法模型 (Kinura 2-parameter)估计遗传距离^[11]; TCS1. 18软件以最大统计简约法构建单元型网络图^[12, 13]; Arlequin 软件计算核苷酸和单元型多样性^[14]; DnaSP4. 50初步分析种群动态变化^[15].

2 结果

2.1 线粒体 CO I基因序列特征

本研究共测得东营、葫芦岛和天津 3个水域 48个样本的 CO I基因序列片段 633 bp, 经比对检测到 19 个变异位点, 约占总位点数的 3%; 其中简约信息位点 7个, 变异位点均表现为碱基替代, 未发现有碱基插入 缺失. 变异多发生在密码子的第三位 (18个), 仅 1个变异发生在密码子的第一位, 分析显示核苷酸多样性为 0. 004 85 转换与颠换的比值为 2. 7, 转换高于颠换. 在线粒体 CO I基因序列中发现胸腺嘧啶含量 (36. 7%) 和腺嘌呤含量 (27. 8%) 的偏歧, AT 的百分含量为 64. 5%. 根据密码子翻译出的氨基酸情况, 在 633 bp 的 CO I基因序列翻译成的 211个氨基酸中, 所有变异位点未导致氨基酸序列的变化. 48条序列共定义 18个单元型 (HP1-HP18), 单元型多样性为 0. 947.

2.2 单元型间的遗传分化

基于 Kinura 2-parameter模型计算出 18个单元型之间的遗传距离为 0. 002~ 0. 011, 平均遗传距离为 0. 005 而葫芦岛、天津和东营 3个水域之间的遗传距离为 0. 004 3~ 0. 005 3, 平均值为 0. 004 9. 在检测到的 18个单元型中, 在葫芦岛海域定义了 8个, 天津海域 8个, 东营海域 5个, 并且单元型 HP3在葫芦岛和天津海域均有分布, 而在天津和东营海域均检测到了单元型 HP5 且有 9个样本共享这一单元型, 占总样本数的 18. 8%; 单元型 HP14是葫芦岛和东营海域的共享单元型; 除此之外的 15个单元型均不存在共享情况, 是各自海域的特有单元型 (表 1).

表 1 18个单元型在 3个海域中的分布情况

Table 1 The distribution of eighteen hap types in three sea area

海域名称	HP1	HP2	HP3	HP4	HP5	HP6	HP7	HP8	HP9	HP10	HP11	HP12	HP13	HP14	HP15	HP16	HP17	HP18
葫芦岛			+ 2	+ 2		+ 2							+ 1	+ 2		+ 2	+ 3	+ 2
天津	+ 2	+ 1	+ 2		+ 3		+ 2		+ 2		+ 2				+ 2			
东营					+ 6			+ 2		+ 2		+ 4		+ 2				

注: HP1-HP18代表不同的单元型; + 表示此单元型在该海域存在, 加号后数字表示检测到的数量.

2.3 单元型简约网络图和歧点分布分析

单元型简约网络图显示了单元型间的最小突变步数, 由 CO I基因定义的 18个单元型的网络关系分成

两个簇,一个是以 HP5 为中心单元型的簇 I 另一个是以 HP17 为中心的簇 II 其它单元型均以 HP5 和 HP17 为中心呈星状辐射分布,并且中心单元型 HP5 和 HP17 以一步突变步数连接在一起(图 1);在单元型简约网络图中存在以小圆圈表示的未检测到的单元型;并且由网络图看出,葫芦岛、天津和东营海域的单元型没有明显的分化,18 个单元型以互相交错的形式聚合在一起,其中占 18.8% 样本数的天津和东营海域共享的单元型 HP5 位于网络图的中心,暗示 3 个水域间存在较近的遗传关系.并且 HP5 和 HP17 位于网络图的中心位置,提示它们可能起始于同一个祖先或近期存在着明显的基因交流.

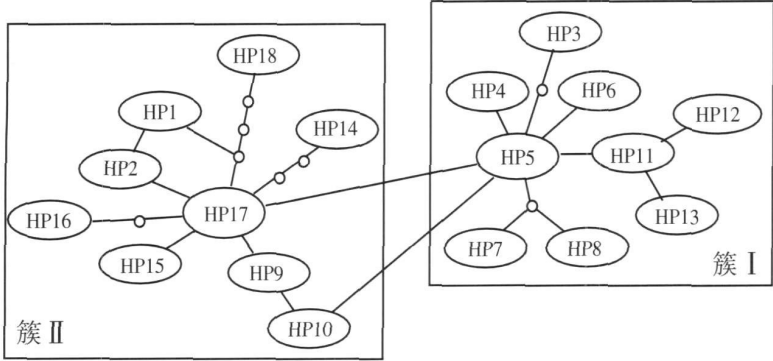


图 1 基于 48 个样本的 18 个单元型之间的简约网络图

Fig.1 The parsimony network of eighteen haplotypes from forty-eight samples

整个渤海湾口虾蛄 COI 基因序列的歧点分布分析结果显示,单元型碱基差异的分布呈单峰分布(图 2).同时,无限突变位点模型的中性检验值 $Tajima's D$ 为负值 ($D = -1.025\ 03$ $P > 0.1$).

3 讨论

3.1 渤海湾口虾蛄 COI 基因特点

渤海湾口虾蛄 COI 基因序列的变异位点约占总分析位点数的 3%,且大多变异发生在密码子第三位(95%),或发生在密码子第一位(5%),但均没有导致氨基酸的改变,显示出了密码子的兼并性.在基因片段中胸腺嘧啶含量和腺嘌呤含量为 64.5%,明显高于 GC 含量(35.5%),这与虾类、蟹类、贝类等发现的规律一致^[16-18].另外本研究显示 COI 基因在渤海湾口虾蛄种群中具有较高的核苷酸多样性和单元型多样性,可作为渤海湾口虾蛄的种群遗传多样性研究的一种分子标记.

3.2 种群遗传分化

研究中的渤海湾 48 个个体定义了 18 个单元型,显示出很高的单元型多样性.在 18 个单元型中,单元型 HP3、HP5、HP14 是 3 个水域中两两共享的单元型,显示了 3 个水域之间紧密的遗传关系,提示水域间频繁的基因交流.并且有 9 个个体共享 HP5 这一单元型,显示 HP5 的原始性,HP5 所在的天津和东营海域存在着口虾蛄较原始的种群;而同样位于网络图中心的 HP17 也是较为原始的单元型.通过双参数模型计算单元型之间的平均遗传距离与海域之间的平均遗传距离非常相近,海域间的遗传距离在 0.004 3~0.005 3 之间,没有明显的不同海域间的分化,并且在单元型简约网络图也并未将不同海域划分成明显的不同单元,而是相互交错形成了 2 个大簇,位于网络图中央的 HP5 和 HP17 为较原始单元型,而其他单元型为其衍生单元型,网络图提示渤海湾不同海域的种群可能起源于一个祖先种群,后来经历种群扩张过程形成了目前的不同种群,而原始的单元型 HP5 和 HP17 是扩张前的祖先单元型.并且 HP5 和 HP17 仅以一步的突变步数连接在一起,显示祖先单元型之间非常近的遗传关系,可能在历史上同属一个种群,进一步提示渤海湾不同种群起源于同一个种群的可能性.以整个渤海湾种群为对象的歧点分布结果显示,观察值的曲线成典型的单峰分布,也暗示渤海湾口虾蛄种群在历史上存在着一个快速扩张的事件, $Tajima$ 的负值

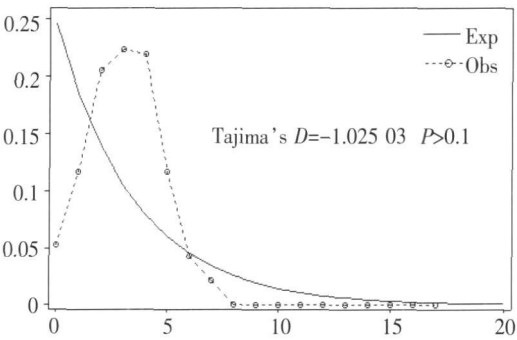


图 2 基于 COI 基因序列的歧点分布

Fig.2 Mismatch distribution analysis based on COI gene sequences

也进一步证实了这一事件,但不显著 ($p > 0.1$),所有结论将在今后研究工作中通过加大样本量作进一步验证,更好地揭示渤海湾口虾蛄的种群结构.

[参考文献]

- [1] 堵南山. 甲壳动物学[M]. 北京: 科学出版社, 1993
- [2] 黄宗国. 中国海洋生物种类与分布[M]. 北京: 海洋出版社, 2008
- [3] Keita K, Takashi Y, Takan ichi S et al. Age estimation of the wild population of Japanese mantis shrimp *Oreatosquilla oratoria* (Crustacea: Stomatopoda) in Tokyo Bay, Japan using lipofuscin as an age marker[J]. Fisheries Science, 2005, 71: 141-150
- [4] 林月娇, 刘海映, 徐海龙, 等. 大连近海口虾蛄形态参数关系的研究[J]. 大连水产学院学报, 2008, 23(3): 215-217.
- [5] 王春琳, 徐善良, 梅文骧, 等. 口虾蛄的生物学基本特征[J]. 浙江海洋学院学报, 1996, 15(1): 60-62
- [6] 路心平, 马凌波, 乔振国, 等. 利用线粒体 DNA 标记分析中国东南沿海拟穴青蟹种群遗传结构[J]. 水产学报, 2009, 33(1): 15-23
- [7] 麦维军, 谢珍玉, 张吕平, 等. 中国明对虾与 5 种虾类线粒体 16S rRNA 和 COI 基因片段的序列比较及其系统学初步研究[J]. 海南大学学报: 自然科学版, 2009, 27(1): 15-23
- [8] 刘明月, 蒋琦辰, 杨家新. 不同海域中国花鲈的细胞色素 b 序列的遗传分析[J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2010, 33(1): 102-106
- [9] 戴建华, 殷文莉, 彭奎东. 青鱼线粒体 DNA 限制性酶切图谱的研究[J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2002, 25(4): 100-104
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [11] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. Briefings in Bioinformatics, 2004, 5: 150-163
- [12] Templeton A R, Crandall K A, Sing C F. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation[J]. Genetics, 1992, 132: 619-633
- [13] Clement M, Posada D, Crandall K A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies[J]. Molecular Ecology, 2000, 9: 1657-1659
- [14] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver 3.01: An integrated software package for population genetics data analysis[J]. Evolutionary Bioinformatics Online, 2005, 1: 47-50
- [15] Rozas J, Sanchez-DeBarrio J C, Messeguer X, et al. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods[J]. Bioinformatics, 2003, 19(18): 2496-2497.
- [16] 汪江一, 徐芬, 刘绪生, 等. 基于部分 18S rDNA, 28S rDNA 和 COI 基因序列的索科线虫亲缘关系[J]. 动物学报, 2007, 53(5): 835-844
- [17] 孔晓瑜, 喻子牛, 刘亚军, 等. 中华绒螯蟹与日本绒螯蟹线粒体 COI 基因片段的序列比较研究[J]. 青岛海洋大学学报, 2001, 31(6): 861-866
- [18] 徐敬明, 张俊丽, 方华华, 等. 相手蟹属两种蟹类线粒体 16S rDNA 基因序列的比较[J]. 水产学报, 2006, 25(9): 443-447.

[责任编辑: 孙德泉]