

丁 鸽,张代臻,张华彬,等. 山东海域口虾蛄种群的遗传多样性研究[J]. 江苏农业科学,2016,44(1):254-256.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.01.075

山东海域口虾蛄种群的遗传多样性研究

丁 鸽¹, 张代臻², 张华彬², 唐伯平²

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

摘要:为探讨山东海域口虾蛄种群的遗传多样性,本研究对山东东营、烟台、长山岛、青岛、日照 5 个样地 72 个样本,通过线粒体 *CO I* 基因进行遗传多样性评价,共获得了 72 条 580 bp 的 DNA 序列,定义了 30 个单元型,31 个变异位点,分析得出单元型多样性为 0.870 0,核苷酸多样性为 0.004 024;种群间遗传距离在 0.000 9~0.003 8 之间。种群内单元型间遗传距离分别为烟台(0.004 1)、青岛(0.004 2)、东营(0.002 7)和日照(0.002 9)。同时揭示烟台、青岛的遗传多样性较高,而东营、日照遗传多样性则相对较低。系统发生树体现了山东海域种群单元型交错分布特性。歧点分布和中性检验值揭示口虾蛄在历史上存在快速扩张的事实。

关键词:口虾蛄;种群;遗传多样性

中图分类号: S931.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)01-0254-03

山东海岸线跨越渤海与黄海,具有丰富的海洋生物资源,海产品口虾蛄(*Oratosquilla oratoria*)别称皮皮虾、虾耙子等,是口足目的优势种,属于节肢动物门(Arthropoda)甲壳纲(Crustacea)口足目(Stomatopoda)虾蛄科(Squillidae)口虾蛄属^[1]。口虾蛄生活在水深不足 60 m 的浅海海域^[2],因其味道鲜美、营养丰富且具有较大的经济价值,是沿海重要的养殖渔业种之一。近年来,随着沿海经济的快速增长,对口虾蛄的大量捕捞而导致其野生资源迅速减少,这势必导致野生口虾蛄群体遗传多样性的降低。加之工业污水、养殖废水的任意排放导致生态环境日益破坏,严重影响了近海生态环境,破坏了口虾蛄等海洋生物的生境^[3],目前亟需对海洋生物资源的遗传状况进行科学评价。

线粒体 DNA 具有结构简单、母系遗传、变异大、无组织特异性特点,尤其编码线粒体细胞色素 C 氧化酶基 I (cytochrome c oxidase subunit I, CO I) 的基因被作为物种鉴别和遗传水平评价的遗传标记,在海洋动物的分类、遗传多样性分析和资源评价等领域应用广泛^[4-6],本研究通过线粒体 *CO I* 基因对山东海域的东营、烟台、青岛、长山岛及日照等 5 个样地 72 只口虾蛄的遗传多样性水平进行评价,为口虾蛄野生资源的遗传状况和资源保护提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究中所用的口虾蛄样本采集于山东海域的东营、烟台、青岛、长山岛及日照 5 个地方(表 1)。样本肌肉组织保存于体积分数 95% 的乙醇中备用。

表 1 本研究用口虾蛄的样本情况

样地	代号	数量	时间
东营	DY	16	2009
烟台	YT	8	2009
青岛	QD	20	2009
长山岛	CSD	20	2010
日照	RZ	8	2011
合计		72	

1.2 方法

1.2.1 材料预处理及基因组提取 用灭菌的剪刀取口虾蛄背部肌肉置于 1.5 mL 离心管内,加入 1 mL 双蒸水脱乙醇,每隔 2 h 换水 1 次,直到乙醇被彻底洗脱,然后用常规的酚-氯仿法提取总基因组 DNA。

1.2.2 PCR 扩增及测序 PCR 反应在 ABI 9700 PCR 扩增仪上进行,用于 *CO I* 基因扩增的特异性引物为 KLCOI-1490: 5'-GGTCAAATCATAAAGATATTGG-3' 和 KLCOI-2198: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'。PCR 总体积为 30 μ L,反应体系中含有 3 μ L 10 \times buffer,2 μ L dNTPs,1 μ L DNA 模板,3 μ L MgCl₂,上下游引物(10 pmol/L)各 1 μ L 及 0.2 μ L *Taq* 酶。加 18.8 μ L ddH₂O 补足反应体系。PCR 反应:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,50 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,运行 30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 0.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。经 PCR 产物胶回收试剂盒(上海华舜)纯化后,用 ABI PRISM BigDye 测序反应试剂盒(Perkin-Elmer)在 ABI 3730 全自动 DNA 测序仪上完成序列测定。

1.2.3 数据的统计分析 序列经 Dnastar 软件进行拼接后,结合人工校对,再使用 Clustal X 软件对该序列进行 DNA 序列对位排列^[7]。获得的比对序列用 Mega 3.0 软件分析序列核苷酸的碱基组成和单元型,计算基于 Kimura 双参数的单元型及种群遗传距离^[8]。用 Arlequin 3.01 软件计算种群内以及种群间的核苷酸多样性水平、单元型多样性水平等^[9]。DnaSP 4.10 和 Arlequin 3.01 软件分析不同种群间的遗传分

收稿日期:2014-12-22

基金项目:国家自然科学基金(编号:41301050);江苏省自然科学基金(编号: BK2011421);江苏省高校自然科学基金(编号: 12KJA180009);江苏省高层次人才项目(编号: XKR2010003)。

作者简介:丁 鸽(1982—),女,山东烟台人,博士,副教授,主要从事种群遗传多样性研究。E-mail: zhangdzye@126.com。

化指数(F_{st})、基因交流大小(N_m)及中性检验等^[10];Mega 和 MrBayes 软件构建单元型的遗传进化系统树^[8,11]。

2 结果

2.1 *CO I* 基因片段碱基组成及序列变异分析

通过基因组提取、PCR 扩增、纯化和测序,本研究分别测得山东的东营、烟台、长山岛、青岛、日照 5 个区域共 72 个样本的 *CO I* 基因序列片段,经过对位排列和序列剪接后共存在 580 位点(表 2),在这些位点中,统计得到 4 种核苷酸碱基含量的平均值分别为 A = 27. 6% , T = 37. 1% , G = 17. 7% ,

C = 17. 6% , 其中 T 的含量最高, C 的含量最低, A + T (64. 7%) 明显高于 G + C(35. 3%)。在 580 位点中共定义了 31 个变异位点,且变异位点中转换与颠换的比值为 3. 113,可见转换高于颠换。

2.2 种群的单元型分析

根据获得的山东海域口虾蛄 72 条序列,统计分析共定义了 30 个单元型,分别命名为 H1 ~ H30。在 30 个单元型中,被共享个体数最多的是 H4,被来自东营、烟台、青岛、长山岛及日照种群共计 24 个体共享,占据了个体总数的 1/3。此外,被共享单元型还有 H1、H2、H3、H5、H15、H20、H26(表 2)。

表 2 口虾蛄单元型间的变异位点和样本数量

单元型	变异位点	样本数量 (个)	样本编号
	00111111112222333334444445555 2901344778267913469013345824567 9513706698102612702701795248432		
H1	ATTCTACATAGGATTTCATGTACGTACCTC	8	DY5 - 1、DY5 - 2、DY7 - 1、DY7 - 2、CSD13、QD13、QD16、RZ3
H2 C..... CG. A.....	2	DY6 - 1、DY6 - 2
H3 C..... C.....	2	DY8 - 1、DY8 - 2
H4 C.....	24	DY9 - 1、DY9 - 2、DY1 - 1、DY1 - 2、DY10 - 1、DY10 - 2、CSD17、CSD9、CSD6、CSD3、CSD18、CSD15、CSD14、CSD11、YT1、YT18、QD2、QD7、QD8、QD11、RZ1、RZ2、RZ6、RZ7
H5	... T..... C.....	6	DY3 - 1、DY3 - 2、CSD1、YT10、QD17、10
H6 T... C.....	1	CSD20
H7 A. C..... C.....	1	CSD19
H8 T... C..... CG. A.....	1	CSD16
H9 A..... C... A.....	1	CSD10
H10	G..... C... A.....	1	CSD8
H11 GC..... AC.....	1	CSD7
H12 C.....	1	CSD5
H13 C..... T..	1	CSD12
H14	. C..... G..... C... A.....	1	CSD4
H15	. . C..... GC..... C..... C.	2	CSD2、QD1
H16 C... A.....	1	YT2
H17 C..... C... A.....	1	YT4
H18	. C..... CG..... C... A.....	1	YT8
H19 C..... AC... A.....	1	YT9
H20 C..... C.....	4	YT20、QD12、QD19、RZ8
H21 C..... T	1	QD6
H22 C..... C.....	1	QD3
H23 C..... C..... T..	1	QD4
H24 C... C.....	1	QD5
H25	. C..... C..... A... C. C.....	1	QD9
H26 G... C.....	2	QD15、QD14
H27 C. T... TT..	1	QD18
H28 C..... C.....	1	QD20
H29 A. G....	1	RZ4
H30 G. G..... C.....	1	RZ5

在遗传多样性分析中,5 个种群中单元型多样性(表 3)最高的是烟台种群(0. 964 29),远超平均单元型多样性水平,其次青岛的单元型多样性水平(0. 947 37)也远高于平均水平,但是长山岛(0. 852 63)、东营(0. 800 00)、日照(0. 785 71)却远远低于平均单元型多样性水平,且日照的单元型多样性水平最低。核苷酸多样性水平方面,东营和日照较低,分别为

0. 002 70 和 0. 002 89,而烟台(0. 004 06)、青岛(0. 004 17)、长山岛(0. 004 30)的核苷酸多样性都远超平均值。

2.3 种群间的遗传距离及系统树

本研究通过双参数模式计算了种群间的遗传距离(表 4),根据所获得的结果可以看出,种群间的遗传距离在 0. 000 9 ~ 0. 003 8 之间,而遗传距离最小的种群则是青岛和

表 3 口虾蛄 5 个种群的遗传多样性指数

种群	样本数量 (个)	单元型数 (个)	单元型多 样性指数	核苷酸多 样性指数	变异位点数 (个)
东营	16	5	0.800 00	0.002 70	6
烟台	8	7	0.964 29	0.004 06	7
青岛	20	13	0.947 37	0.004 17	18
长山岛	20	13	0.852 63	0.004 30	19
日照	8	5	0.785 71	0.002 89	6

长山岛之间(0.000 9),遗传距离最大的是东营和烟台种群之间(0.003 8)。5 个种群内部单元型之间的遗传距离从大到小依次为长山岛(0.004 3)、青岛(0.004 2)、烟台(0.004 1)、日照(0.002 9)、东营(0.002 7)(表 4)。基于 30 个单元型构建的系统发生数将所有单元型分为 3 个大支,而 5 个种群没有明显以地理分布而聚集成 5 个簇,而是互相交错分布,未形成显著的种群遗传结构(图 1)。

表 4 口虾蛄 5 个种群间的遗传距离

种群	遗传距离				
	东营	烟台	青岛	长山岛	日照
东营	0.002 7				
烟台	0.003 8	0.004 1			
青岛	0.003 5	0.001 3	0.004 2		
长山岛	0.003 5	0.001 3	0.000 9	0.004 3	
日照	0.002 7	0.001 3	0.003 6	0.003 6	0.002 9

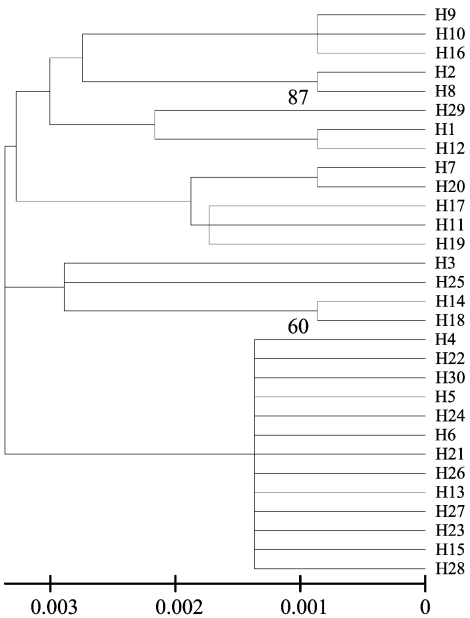


图 1 基于 CO I 基因序列构建的分子系统进化树

根据 Arlequin 3.01 软件对山东海域口虾蛄的歧点分布和中性检验进行分析,结果显示,5 个种群歧点分布均呈单峰结构,中性检验 Fu's Fs 值和 Tajima's D 值为,日照 Fu's Fs: -1.543, Tajima's D: -1.280 11;青岛 Fu's Fs: -8.255, Tajima's D: -1.970 85;长山岛 Fu's Fs: -8.022, Tajima's D: -2.020 16;东营 Fu's Fs: -0.304, Tajima's D: -0.457 21;烟

台 Fu's Fs: -3.990, Tajima's D: -0.603 86。

3 结论

在本研究测得口虾蛄线粒体 CO I 基因片段中,A + T 的百分含量远大于 G + C 的平均含量,变异位点中含有转换与颠换的比值为 3.113,转换明显大于颠换,所有数据与甲壳动物的线粒体组成特征吻合^[12]。种群遗传多样性对其环境适应力有很大的影响,遗传多样性的降低直接导致了其对环境适应力的降低,通过对山东海域口虾蛄遗传多样性进行初步研究,分析得出单元型多样性为 0.870 0,核苷酸多样性为 0.004 024;种群间遗传距离在 0.000 9 ~ 0.003 8 之间。烟台、青岛的遗传多样性较高,而东营、日照遗传多样性则相对较低。种群内单元型间遗传距离分别为烟台(0.004 1)、青岛(0.004 2)、东营(0.002 7)和日照(0.002 9)。构建的系统发生数中 5 个种群没有明显以地理分布而单独聚集,未形成显著的种群遗传结构,歧点分布和中性检验值揭示口虾蛄在历史上存在快速扩张的事实。

参考文献:

[1]王春琳,徐善良,梅文骧,等. 口虾蛄的生物学基本特征[J]. 浙江水产学院学报,1996,15(1):60-62.

[2]黄宗国. 中国海洋生物种类与分布[M]. 北京:海洋出版社,1994.

[3]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.

[4]孙始威,吴克,陈燕妮,等. 分子遗传标记技术在海洋动物遗传研究中的应用[J]. 齐鲁渔业,2009(1):6-9,60.

[5]毕相东,杨雷,侯俊利,等. CO I 基因在海洋动物分子系统学研究中的应用[J]. 水产科学,2008(2):105-108.

[6]黄映萍,王莹,苗素英. 粤东海域口虾蛄遗传多样性[J]. 动物学杂志,2011,46(2):82-89.

[7]Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research,1997,25(24):4876-4882.

[8]Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. Briefings in Bioinformatics,2004,5(2):150-163.

[9]Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis [J]. Evolutionary Bioinformatics Online,2005(1):47-50.

[10]Rozas J, Sánchez-Delbarrio J C, Messeguer X, et al. DNASP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods [J]. Bioinformatics,2003,19(18):2496-2497.

[11]Huelsenbeck J P, Ronquist F. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. Version 2.01. Distributed by the author [D]. Rochester: Department of Biology, University of Rochester,2001.

[12]张代臻,丁鸽,周婷婷,等. 黄海水域口虾蛄种群的遗传多样性[J]. 动物学杂志,2013,48(2):232-240.