

李晓玲, 郑亦佳, 陈丹妮, 等. 基于线粒体 *COI* 基因序列的 2 种仿对虾遗传差异[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(16): 82–86.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.16.014

基于线粒体 *COI* 基因序列的 2 种仿对虾遗传差异

李晓玲¹, 郑亦佳¹, 陈丹妮¹, 蒋艳琳¹, 杨天燕¹, 孟 玮², 郭易佳¹, 褚梦洁¹

(1. 浙江海洋大学水产学院, 浙江舟山 316022; 2. 浙江省海洋水产研究所/浙江省海洋渔业资源可持续利用技术研究重点实验室/农业部重点渔场渔业资源科学观测实验站, 浙江舟山 316021)

摘要: 哈氏仿对虾和细巧仿对虾是东海经济虾类资源中主要的仿对虾属种类, 为调查研究浙江省舟山市近海这 2 种虾类种质资源现状及亲缘关系, 通过 PCR 扩增获得 2 种仿对虾线粒体 DNA 细胞色素氧化酶亚基 I, 基因长度为 632 bp 的序列片段, 共检测到 101 个变异位点, 其中简约信息位点 99 个, 哈氏仿对虾有 4 种单倍型, 细巧仿对虾有 3 种单倍型。统计碱基组成发现, 二者在目的片段上的 A + T 含量分别为 62.0%、62.9%, 均显著高于 C + G 含量。细巧仿对虾的单倍型多样性与核苷酸多样性均高于哈氏仿对虾, 采用邻接法构建分子系统树, 并基于木村双参数遗传距离计算 2 种仿对虾的分化时间约在 5.93 百万年前。初步摸清了哈氏仿对虾和细巧仿对虾遗传多样性现状并比较了两者间的遗传差异, 研究结果以期对仿对虾属经济物种的遗传信息和系统发育提供分子生物学参考依据。

关键词: 哈氏仿对虾; 细巧仿对虾; 线粒体 *COI* 基因; 遗传差异

中图分类号: S917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)16-0082-05

仿对虾属 (*Parapenaeopsis*) 隶属于节肢动物门 (Arthropoda)、甲壳动物亚门 (Crustacea)、软甲纲 (Malacostraca)、十足目 (Decapoda)、枝鳃亚目 (Dendrobranchiata)、对虾科 (Penaeidae), 是广泛分布于我国东海海域的一种广温性、广盐性中小型对虾类^[1]。国内关于仿对虾的研究大部分集中在形态学^[2-3]、资源调查^[4-6]以及人工繁育技术^[7-8]等方面, 且研究对象多针对属或种的分类阶, 而对于亲缘关系较近的种间比较研究则相对较少。哈氏仿对虾 (*P. hardwickii*) 和细巧仿对虾 (*P. tenella*) 作为东海经济虾类资源中占有重要地位的仿对虾属种类, 对二者遗传多样性的比较研究尚未见相关报道。

线粒体 DNA 具有母系遗传、进化速度快、结构简单等特点^[9], 位于其上的 *COI*、*COII*、*Cyt b*、16S rRNA 等基因被广泛应用于甲壳动物群体遗传学和系统发育关系分析^[10-13]。其中, 线粒体细胞色素氧

化酶亚基 I (cytochrome oxidase subunit I, *COI*) 基因作为 DNA 条形码, 成为近年来普遍接受和青睐的物种分类鉴定的分子标记之一^[14]。本研究基于线粒体 *COI* 基因序列, 分析比较东海海域常见的 2 种仿对虾——哈氏仿对虾和细巧仿对虾遗传多样性现状, 并结合 GenBank 中下载的近缘种序列比对分析, 探讨两者的亲缘关系, 以期从分子生物学角度为仿对虾属物种种质资源背景提供基础数据资料。

1 材料与方法

1.1 材料采集和 DNA 提取

本研究用到的哈氏仿对虾 (HF, 13 尾) 和细巧仿对虾 (XF, 6 尾) 均于 2018 年 10 月采自浙江省舟山嵎泗列岛近海, 参考《东海经济虾蟹类》^[15]和《虾蟹生物学》^[16]等书籍, 利用传统形态学方法分类鉴定后, 剪取适量肌肉组织, 采用传统的酚-三氯甲烷法^[17]提取基因组 DNA, 溶解于 100 μL 灭菌水中, 置于 -20 ℃ 冰箱保存备用。

1.2 PCR 扩增

本研究用于扩增 2 种仿对虾 *COI* 基因序列的通用引物^[18]由上海桑尼生物科技有限公司合成, 具体序列见表 1。PCR 扩增的反应体系为 25.00 μL, 包括 0.25 μL 浓度为 5 U/μL 的 *Taq* 酶, 正反向引物 (10 μmol/L) 各 1.00 μL, 10 × buffer 缓冲液 (含

收稿日期: 2019-10-17

基金项目: 浙江省重点研发计划 (编号: 2019C02056); 国家级大学生创新创业训练计划 (编号: 201910340011); 浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划 (编号: 2019R411013); 浙江海洋大学水产省一流学科大学生创新性科研项目。

作者简介: 李晓玲 (1997—), 女, 江苏南通人, 主要从事海洋生物资源与环境研究。E-mail: 1103198570@qq.com。

通信作者: 孟 玮, 博士, 高级工程师, 主要从事渔业资源学研究。E-mail: mengwei1982@hotmail.com@163.com。

Mg^{2+}) 2.50 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2.00 μ L, 模板 DNA (50 ng) 1.00 μ L, 灭菌双蒸水 17.25 μ L。PCR 扩增的程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 48 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

表 1 本研究所用引物序列

引物名称	序列(5'→3')
<i>COI</i> -FR L1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTG
<i>COI</i> -RR H2198	TAAACTTCAGGTGACCAAAAAATCA

取 PCR 扩增产物 3 μ L 与等量的 6 \times DNA Loading buffer 混合均匀, 经 1.5% 琼脂糖凝胶于水平电泳槽中, 电泳分离 15 min 左右, 取出凝胶用在紫外光呈像系统中观察并拍照保存, 选取条带明亮、特异性强的扩增产物送上海美吉生物医药科技有限公司进行双向测序。

1.3 数据处理

使用 DNASTAR 软件^[19]对测序结果进行排序、拼接, 经人工检验后截取同源片段; 使用 DnaSP 5.10 软件^[20]进行序列分析, 统计序列碱基及氨基酸组成、比较密码子不同位点的使用频率, 计算保守位点 (conserved sites)、变异位点 (variable sites) 及简约信息位点 (parsimony - informative sites), 获取 DNA 多态位点信息以及多样性参数; 采用 MEGA 5.05 (molecular evolutionary genetics analysis) 软件^[21]进行聚类分析, 以邻接法 (neighbor - joining,

NJ) 构建分子系统进化树并重复抽样分析 (bootstrap analysis, 重复数 = 1 000); 用其中的 Kimura 2 - parameter model 模型计算个体间遗传距离和种间平均遗传距离。

2 结果与分析

2.1 *COI* 基因序列分析

利用 DNASTAR 软件进行排序, 得到 2 种仿对虾类 *COI* 部分基因 632 bp 长度的同源片段 (图 1)。共检测到 101 个多态位点, 无碱基的插入与缺失, 其中单一变异位点 2 个、简约信息位点 99 个。哈氏仿对虾检测到 4 个单倍型, 包含 4 个多态位点, 均为单变异位点; 细巧仿对虾检测到 3 个单倍型, 包含 2 个多态位点, 其中单变异位点和简约信息位点各 1 个。哈氏仿对虾和细巧仿对虾 *COI* 基因序列碱基组成信息见图 2。哈氏仿对虾 *COI* 基因片段的 T、C、A、G 的含量分别为 35.4%、19.9%、26.6% 和 18.1%, A + T 的含量为 62.0%; 细巧仿对虾 *COI* 基因片段的 T、C、A 和 G 的含量分别为 34.8%、19.3%、28.1% 和 17.8%, A + T 的含量为 62.9%。2 种仿对虾 A + T 的含量均明显高于 C + G 的含量, 符合多数甲壳类动物线粒体 *COI* 基因序列的研究结果^[2,10,13,18]。密码子第 3 位点 T 和 A 碱基含量明显高于 C 和 G, 其中 A 碱基比例最高, 分别为 39.5% (哈氏仿对虾) 和 44.0% (细巧仿对虾)。

	111	1111111111	2222222222	2222222222	3333333333	3344444444	4444445555	5555555555	5555555666	6	
	111223345	5668899013	4566678889	0122234444	5557788999	0122334467	8812256778	8999990111	1234455667	7788899000	1
	6358470651	4691403212	1658910362	1926870179	2570958147	0517092545	1740632170	9235891013	6514629470	3625814046	5
#HF-hap1	GTATTGAGT	TTTCTCAAT	CTTCTCGAA	CCCTACCC	CTTTAGCCAT	CTACTCGACT	TCAGTTTAC	CTTAGTAACC	ACCCCTCTAT	CTTTATGACT	T
#HF-hap2G..
#HF-hap3A..	A.....
#HF-hap4G.....
#XF-hap1	ACTCTGAAA	CCCT.CTCGA	TCCTTA.ATG	TTTCTATTTA	TCCAGAAAGA	ACTTCTATTTC	ATTTCGAATT	TCCCACCGTA	TATTACTCTA	TCAA.AATTA	C
#XF-hap2	ACTCTGAAA	CCCTCCTCGA	TCCTTA.ATG	TTTCTATTTA	TCCAGAAAGA	ACTTCTATTTC	ATTTCGAATT	TCCCACCGTA	TATTACTCTA	TCAA.AATTA	C
#XF-hap3	ACTCTGAAA	CCCTCCTCGA	TCCTTA.ATG	TTTCTATTTA	TCCAGAAAGA	ACTTCTATTTC	ATTTCGAATT	TCCCACCGTA	TATTACTCTA	TCAA.AATTA	C

HF 表示哈氏仿对虾, XF 表示细巧仿对虾, “.”表示该位点与 #HF-hap1 对应位点的碱基一致, “-”表示该位点为缺失位点。下图同

图 1 2 种仿对虾不同单倍型在 *COI* 基因片段的变异位点

2.2 遗传多样性分析

使用 DnaSP 软件计算 2 种仿对虾遗传多样性参数。由表 2 可知, 2 种仿对虾共检测到 7 种单倍型, 平均单倍型多样性 (H_d) 为 0.713 5, 平均核苷酸多样性 (π) 为 0.072 07, 平均核苷酸差异数 (k) 为 45.474。尽管细巧仿对虾数量低于哈氏仿对虾, 但遗传多样性指标均明显高于后者。

使用 MEGA 软件将 *COI* 基因序列翻译成对应的氨基酸序列, 获得编码肽链长度为 210 的氨基酸序列。由图 3 可知, 2 种仿对虾间尽管存在 4 处氨

基酸变异位点, 但由于同义替换不改变编码氨基酸, 因此哈氏仿对虾 3 种单倍型仅编码 1 种氨基酸多肽链。细巧仿对虾 4 种单倍型共编码了 2 种氨基酸多肽链, 其中 XF - hap2、XF - hap3 和 XF - hap4 编码的氨基酸种类一致。

2.3 遗传距离和聚类分析

对 2 种仿对虾分别计算种内个体间与种间遗传距离, 结果 (表 3) 显示, 2 种仿对虾种间的遗传距离为 0.178, 个体间遗传距离分别为 0.000 ~ 0.005 (哈氏仿对虾) 和 0.000 ~ 0.003 (细巧仿对虾)。其中,

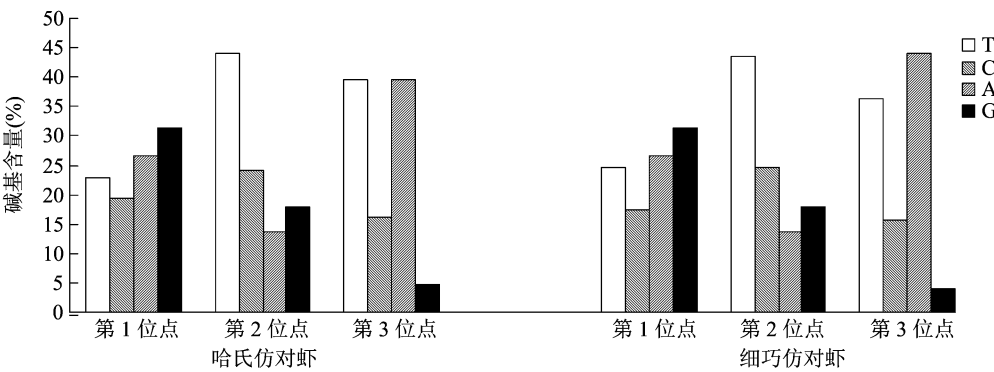


图2 2 种仿对虾 *COI* 基因密码子 3 个位点序列碱基组成

表 2 哈氏仿对虾和细巧仿对虾 *COI* 基因片段的遗传多样性参数

物种	样本数 (尾)	多态位点数 (个)	单倍型数 (种)	单倍型多样性	核苷酸多样性	平均核苷酸差异数
哈氏仿对虾	13	4	4	0.423 1	0.000 98	0.615
细巧仿对虾	6	2	3	0.733 3	0.001 37	0.867
总计	19	101	7	0.713 5	0.072 07	45.474

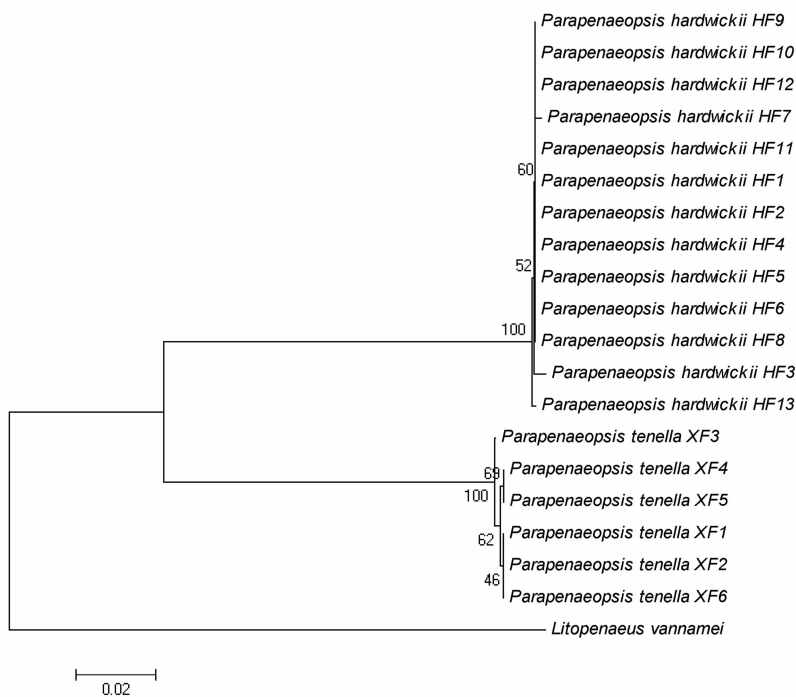
	1	1111111112	2222222223	3333333334	4444444445	5555555556	6666666667	7777777778	8888888889	9999999990	0000000001
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
#HF-hap1	VTGALSIIIR	AELGQPGNLI	GDDQIYNVVV	TAHAFVIIFF	IVIPIIIIGGF	GN*LVPLILG	APDIAFPRIN	NISF*LLPPS	LTLLLLRGIV	ERGVGTG*TV	YPPLARGIAH
#HF-hap2
#HF-hap3
#HF-hap4
#XF-hap1	M..	M..	S..	W..
#XF-hap2	M..	M..	S..	W..
#XF-hap3	M..	M..	S..	W..
	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111112	2222222222	2222222222
	1111111112	2222222223	3333333334	4444444445	5555555556	6666666667	7777777778	8888888889	9999999990	0000000001	0000000001
#HF-hap1	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
#HF-hap2	AGASVDIGIF	SLHLGVSSI	LGAVNFITTV	INIRSSGITI	DRIPLFV*SV	FITALLLLLS	LPVLAGAITI	LLTDRNLNTS	FFDPAGGGDP	ILYQHLP*FF
#HF-hap3
#HF-hap4
#XF-hap1
#XF-hap2
#XF-hap3

图3 哈氏仿对虾和细巧仿对虾 *COI* 扩增片段编码的肽链氨基酸序列

哈氏仿对虾的最大遗传距离出现在 3 号和 13 号个体间,细巧仿对虾的最大遗传距离出现在 3 号和 4 号、3 号和 5 号之间。为进一步比较 2 种仿对虾间的遗传差异并探究其亲缘关系,以凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 为外群 (GenBank 登录号: HQ127455),采用邻接法构建分子系统发生树。由图 4 可知,2 种仿对虾同种不同个体间以较高的置信值分别聚类,二者相聚之后再与外群聚类。

表 3 基于 *COI* 基因片段不同单倍型的 Kumara 2-parameter 遗传距离

单倍型	遗传距离						
	HF-hap1	HF-hap2	HF-hap3	HF-hap4	XF-hap1	XF-hap2	XF-hap3
HF-hap1	0.000						
HF-hap2	0.000	0.000					
HF-hap3	0.002	0.002	0.000				
HF-hap4	0.003	0.003	0.005	0.000			
XF-hap1	0.178	0.178	0.176	0.180	0.000		
XF-hap2	0.176	0.176	0.174	0.178	0.002	0.000	
XF-hap3	0.178	0.178	0.176	0.180	0.002	0.003	0.000



各分支上的数字为 Bootstrap 1 000 个循环的自举检验值

图4 基于 *COI* 基因序列的 NJ 分子系统进化树

3 结论与讨论

受到转录、翻译及碱基突变压力等因素的影响,不同基因在遗传密码子的使用上通常呈现出一定的偏好性^[22]。2种仿对虾 *COI* 基因片段的碱基组成呈现出明显的高 A + T 含量特征,这与虾蟹类线粒体 DNA *COI* 序列中普遍存在的现象一致^[23],且密码子 3 个位点碱基组成基本也符合这一规律。从 A + T 含量具体大小来看,密码子第 3 位点 > 第 2 位点 > 第 1 位点,且密码子第 3 位点 A + T 含量明显高于第 1、第 2 位点。进一步比较二者在 *COI* 基因片段编码的肽链氨基酸序列组成发现,除亮氨酸和丝氨酸组成比例有细微差异外,其余各氨基酸组成大致相同,推测这与密码子兼并性有关,发生在密码子第 3 位点碱基的同义突变没有改变其编码的氨基酸^[24]。此外,2种仿对虾同源蛋白质的氨基酸序列具有明显的相似性,氨基酸序列较高的同源性也表明二者较近的亲缘关系^[25]。

遗传多样性又称为遗传变异,是生物多样性的基础,其水平高低揭示了物种进化的潜力及抵御不良环境能力的强弱^[26]。本研究对 2 种仿对虾遗传多样性参数进行统计发现,尽管细巧仿对虾样本数和单倍型数较少,但其遗传多样性均高于哈氏仿对

虾。毛智超等比较了哈氏仿对虾线粒体 *COI* 与 16S rRNA 基因片段的遗传多样性,发现前者变异程度更高,通过计算得出的 *COI* 基因片段核苷酸多样性(0.000 87)略低于本研究结论(0.000 98)^[18],推测可能与本研究分析的片段长度较短和样本数偏少有关。合理的取样数量是开展群体遗传学研究的前提和基础^[27],由于样本数量和采样海域的限制,获得的信息量有限,在后续的研究中还将进一步扩大采样规模和数量,以更加全面准确地反映该物种的遗传多样性现状^[28]。

早在 20 世纪 60 年代,Zuckermandl 等就提出生物在进化水平存在“分子时钟”这一假说^[29],结合现代基因库和古化石证据能够大致估算出不同生物门类的起源和进化时间^[30]。本研究参考 Baldwin 等基于 *COI* 基因估算对虾科 3%/百万年的核苷酸分歧速率,根据种间遗传距离推算出细巧仿对虾分化时间较哈氏仿对虾早 5.93 百万年^[31],与同类研究中 5.55 百万年的结果相当^[18]。研究表明,仿对虾属分化时间为中新世末期至 20 新世早期,更新世冰期—间冰期的气候周期性波动引起海平面高度的改变,导致物种栖息地范围经历了不同程度的收缩和扩张,推测西北太平洋边缘海之间的隔离是造成包括仿对虾在内的多种海洋生物发生遗传分化

的主要原因。

本研究随机采集了浙江省舟山海域嵊泗列岛附近分布的哈氏仿对虾和细巧仿对虾,由于二者亲缘关系较近,仅凭形态学特征难以准确区分,在采样过程中容易出现混淆。而基于线粒体 *COI* 基因序列构建的系统发育树可清晰地将哈氏仿对虾和细巧仿对虾分为 2 支,使之得到有效区分,显示出分子测序技术在区分形态相似种中的优越性,能够较好地验证基于形态学鉴定的物种或分类^[32-33],同时也为今后深入开展该海区虾蟹类种质资源、亲缘关系和遗传多样性研究提供基础资料。

参考文献:

[1] 刘瑞玉,王永良. 中国近海仿对虾属的研究[J]. 海洋与湖沼, 1987,18(6):523-539.

[2] 徐 琰. 中国近海仿对虾属分子系统演化 and 近似种问题的研究[D]. 青岛:中国科学院研究生院:海洋研究所,2005.

[3] 宋海棠,俞存根,薛利建. 东海哈氏仿对虾的数量分布和生长特性研究[J]. 水生生物学报,2009,33(1):15-21.

[4] 李明云,倪海儿,竺俊全,等. 东海北部哈氏仿对虾的种群动态及其最高持续渔获量[J]. 水产学报,2000,24(4):364-369.

[5] 徐开达,薛利建,贺舟挺,等. 东海北部哈氏仿对虾资源量评估[J]. 福建水产,2010(1):23-28.

[6] 金忠文,汪忠强,尤尔茂. 哈氏仿对虾人工繁殖技术研究[J]. 海洋科学,2002,26(5):18-20.

[7] 张曹进,姚国兴,吴国钧,等. 哈氏仿对虾人工育苗技术研究[J]. 水产科技情报,2011,38(6):281-283.

[8] Goldstein P Z, Desalle R. Integrating DNA barcode data and taxonomic practice: determination, discovery, and description[J]. BioEssays,2010,33(2):135-147.

[9] 陈复生,付承玉,汪泰初. 动物线粒体基因分子系统学研究进展[J]. 安徽农业科学,2003,31(4):596-598,601.

[10] 易 啸,王攀攀,王 军,等. 基于线粒体 *COI* 的 DNA 条形码在对虾科种类鉴定中的研究[J]. 水产学报,2018,42(1):1-9.

[11] 王成辉,李思发,刘至治. 3 种中华绒螯蟹群体线粒体 *COII* 基因序列测定与进化分析[J]. 水产学报,2008,32(1):8-12.

[12] 曾凡荣,王 军,周孔霖,等. 基于线粒体 *Cyt b* 基因探讨我国日本囊对虾 4 个地理群体的遗传结构及种群分化[J]. 厦门大学学报(自然科学版),2010,49(5):701-706.

[13] 刘 帅,李墨非,叶 嘉,等. 基于线粒体 16S rRNA 和 *COI* 基因序列探讨对虾属(*Penaeus*)物种系统发生关系[J]. 生物杂志,2012,29(5):37-42.

[14] Hebert P N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proceedings of the Royal Society B - Biological Sciences,2003,270(1512):313-321.

[15] 宋海棠,俞存根,薛利建,等. 东海经济虾蟹类[M]. 北京:海洋出版社,2006.

[16] 王红勇,姚雪梅. 虾蟹生物学[M]. 北京:中国农业出版社,2007.

[17] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,1982.

[18] 毛智超,段亚飞,刘 萍,等. 哈氏仿对虾线粒体 16S rRNA 和 *COI* 基因的序列比较及其与仿对虾属之间的系统进化分析[J]. 水产学报,2016,40(7):1006-1017.

[19] Burland T G. DNA star's laser gene sequence analysis software[J]. Methods Mol Biol,2000,132:71-91.

[20] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. Bioinformatics,2009,25(11):1451-1452.

[21] Kumar S, Nei M, Dudley J, et al. MEGA: a biologist - centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences[J]. Briefings in Bioinformatics,2008,9(4):299-306.

[22] 谭生军. 密码子及密码子对使用偏好性的研究[D]. 南京:南京大学,2012.

[23] 方李宏,薛俊增,董双林. 甲壳动物线粒体 DNA 的研究[J]. 海洋湖沼通报,2004(2):59-65.

[24] Meyer A. Evolution of mitochondrial DNA in fishes [J]. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes,1993,2:1-36.

[25] 刘汉超. 介绍四种鉴定生物亲缘关系的方法[J]. 中学生理科月刊(高中版),2004(8):3,5.

[26] 施立明. 遗传多样性及其保存[J]. 生物科学信息,1990(4):158-164.

[27] 金 燕,卢宝荣. 遗传多样性的取样策略[J]. 生物多样性,2003,11(2):155-161.

[28] 王桢姚,姚东林,谢少林,等. 基于线粒体 *Cyt b* 和 *COI* 基因序列的华南鲤群体遗传结构分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(18):179-183.

[29] Zuckerrandl E, Pauling L B. Horizons in biochemistry [M]. New York: Academic Press,1962.

[30] 唐先华,赖旭龙,钟 杨,等. 分子钟假说与化石记录[J]. 地学前缘,2002,9(2):465-474.

[31] Baldwin J D, Bass A L, Bowen B W, et al. Molecular phylogeny and biogeography of the marine shrimp *penaeus* [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution,1998,10(3):399-407.

[32] Morrison C, Rios R, Duffy J. Phylogenetic evidence for an ancient rapid radiation of caribbean sponge - dwelling snapping shrimps (synalpheus) [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution,2004,30(3):563-581.

[33] Hultgren K M, Duffy J E. Multi - locus phylogeny of sponge - dwelling snapping shrimp (caridea: alpheididae: synalpheus) supports morphology - based species concepts[J]. Journal of Crustacean Biology,2011,31(2):352-360.