

# 基于线粒体 16S rRNA 基因研究 5 个栉江珧野生群体的遗传多样性

严加坤<sup>1,2</sup>, 杨爱国<sup>2</sup>, 周丽青<sup>2</sup>, 吴彪<sup>2</sup>, 白临建<sup>1,2</sup>, 刘志鸿<sup>2</sup>

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 农业部黄渤海渔业资源可持续利用重点开放实验室, 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

**摘要:** 采用通用引物对山东长岛、文登、日照、广东湛江和海南三亚等 5 个地理群体栉江珧(*Atrina pectinata*) 16S rRNA 序列进行扩增、测序分析, 得到 59 条 441bp 的核苷酸序列。其中 T、C、A、G 和 A+T 的平均含量分别为 29.91%、17.41%、25.74%、26.94% 及 55.65%, AT 含量高于 GC 含量, 共检测到了 9 个单倍型和 26 个核苷酸多态位点。群体多样性分析表明, 文登群体具有较高的遗传多样性水平。AMOVA 分析表明, 五群体间总遗传分化系数  $F_{st} = 0.5007 (P < 0.001)$ , 群体间遗传分化略大于群体内, 群体间存在较高的遗传分化。基于群体间遗传距离构建 NJ 和 UPGMA 分子进化树, 5 个地理群体的栉江珧聚为两个支, 长岛、文登、日照群体聚为一支, 海南和湛江群体聚为另一支。

**关键词:** 栉江珧(*Atrina pectinata*); 16S rRNA; 遗传多样性

中图分类号: S968.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2013)02-0036-07

栉江珧(*Atrina pectinata*), 俗称大海红、带子, 隶属于软体动物门(Mollusca)瓣鳃纲(Lamellibranchia)贻贝目(Mytiloida)江珧科(Pinnidae)江珧属(*Atrina*), 是一种广温、广盐性贝类, 主要分布在温带、热带海洋, 在我国广泛分布于各大海区。栉江珧闭壳肌大而圆, 味道鲜美, 是一种具有较高经济价值的大型海产贝类。但是, 过度的捕捞和人工育苗工作的相对滞后导致栉江珧资源量下降, 种质资源退化和遗传多样性水平降低等问题。目前我国正开展有关栉江珧的人工育苗和养殖方面的研究。为了更好地利用和保护栉江珧的种质资源, 开展有关栉江珧动物的遗传结构和遗传变异水平的研究是非常必要的。

有关栉江珧的研究主要集中在繁殖生物学、人工育苗以及同工酶<sup>[1-3]</sup>等方面, 分子遗传学方面的研究较少。动物线粒体 DNA(mtDNA) 具有绝大多数母系遗传、进化速度快、结构简单序列短、易于扩增等优点, 已经作为一种优良的分子标记广泛应用于动物的群体遗传学和系统进化研究<sup>[4-7]</sup>。本研究对分布于中国沿海 5 个野生群体的栉江珧的 mtDNA 16S rRNA 基因序列片段进行了扩增和测序, 对栉江珧群体遗传特性的进行研究, 为栉江珧种质资源的研究和保护提供背景基础资料, 并为进一步的栉江珧家系选育、亲本选择及分子辅助育种等相关研究工作的开展提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

2011 年 3 月至 2012 年 2 月共收集我国北方(山东长岛 CD、山东文登 WD、山东日照 RZ)和南方(广东湛江 ZJ 和海南三亚 HN)5 个海区的野生种群, 活体运回实验室。测量相关生物学数据后, 取肌肉存于 -80 备用。

### 1.2 基因组 DNA 提取及 PCR 扩增

基因组 DNA 提取 取 100 mg 肌肉于 1.5 mL 离心管, 加入 TE 抽提液 400  $\mu$ L, 用剪刀将组织充分剪碎, 加入 40  $\mu$ L SDS 和 10  $\mu$ L (20 g/L)蛋白酶 K 充分混匀, 55  $^{\circ}$ C 水浴至澄清。加入 300  $\mu$ L 6 mol/L 的 NaCl 溶液, 12 000 r/min 离心移取上清。用等体积的酚氯仿( $V_{酚}:V_{氯仿}:V_{异戊醇}=25:24:1$ )抽提上清 2 次, 加入 2 倍体积的无水乙醇和 1/3 体积的 3 mol/L NaCl 于 -20

收稿日期: 2012-05-23; 修回日期: 2012-10-10

基金项目: 山东省科技发展计划项目(2010GHY10513); 山东省自然科学基金项目(ZR2009DQ006); 青岛市成果转化项目(10-3-4-17-chg); 青岛市南区 2011 年第二批科技发展资金项目(2011-5-023-QT); 国家科技基础条件平台项目

作者简介: 严加坤(1988-), 男, 硕士研究生, 主要从事贝类遗传育种研究, E-mail: himingse@163.com; 杨爱国, 通信作者, 电话: 0532-85811982, E-mail: yangag@ysfri.ac.cn

析出；离心后用 70%乙醇洗两次，加入 50 μL ddH<sub>2</sub>O 水溶解。用 1%琼脂糖电泳检测 DNA 完整度，用紫外分光光度计测 DNA 浓度，-20 保存备用。

PCR 扩增 基因片段扩增所用引物的核苷酸序列为：16S F: CGCCTGTTTATCAAAAA CAT, 16SR: CCGGTCTGAACTCAGATCACGT.; PCR 反应体系为 1.5U Taq 酶、10×buffer 3 μL、dNTP 3.6 μL、primer(10 μm)0.5μL、基因组 DNA100 ng 及双蒸水补足 30 μL 体系。PCR 反应程序为：94 预变性 5 min，之后 94 30 s、57 30 s、72 1 min、35 个循环，最后 72 延伸 10 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后由华大基因纯化测序。

### 1.3 数据处理

测序结果经 EditSeq、Seqman 根据测序峰图人工编辑、整理。经 clustal w<sup>[8]</sup>比对确定序列长度，用 DNAsp 5.01<sup>[9]</sup>软件计算各个群体的单倍型、单倍型多态性、多态位点数、平均核苷酸差异数、核苷酸多样性指数等。用 MEGA5.01<sup>[10]</sup>计算不同序列间的碱基组成、变异位点、简约信息位点和不同地理种群的 Kimura2-paramter 遗传距离。采用 Kimura2-paramter 距离矩阵采用邻接法(NJ)以及非加权配对算

数平均法(UPGMA)构建单倍型分子系统树，系统树中节点的自举置信水平应用自引导(bootstrap)估计，共 1 000 次循环。用 ARLEQUIN 3.11<sup>[11]</sup>中的分子变异分析(AMOVA)分析方法估算遗传变异在群体内和群体间的分布及遗传分化系数(fixation indices,  $F_{st}$ )，并用排列测验法(permutation test)检验  $F_{st}$  的显著性(重复次数为 1000)。基因流  $N_m$  由公式  $N_m=[(1/F_{st})-1]/2$  计算得出。

## 2 结果与分析

### 2.1 线粒体 16S rRNA 基因片段序列分析

测序得到的目的片段经过 clustal W 比对后，去除引物、及测序起始的部分序列，得到 441bp 的同源序列。经过在线 BLAST 分析，确认所得目的片段为 16S 基因。利用 MEGA5.01 软件计算 16S 序列的碱基组成(表 1)，北方(长岛、日照、文登)3 个群体碱基组成基本一致，而南方(湛江、海南)两个群体则完全一致，在碱基组成上表现出较为显著的南北方差异。T、C、A、G 和 A+T 的平均含量分别为 29.91%、17.41%、25.74%、26.94%及 55.65%，A+T 含量显著高于 G+C 含量，这与线粒体 DNA 碱基组成特点是相符的。

表 1 栉江珧群体 16S rRNA 序列片段碱基组成

Tab. 1 Base compositions (%) of 16S rRNA sequences of *A. pectinata* from the five populations

碱基	长岛 CD	日照 RZ	文登 WD	海南 HN	湛江 ZJ	均值
T	30.16	30.14	30.18	29.48	29.48	29.91
C	17.23	17.25	17.25	17.69	17.69	17.41
A	25.79	25.79	25.83	25.64	25.62	25.74
G	26.81	26.81	26.74	27.19	27.21	26.94
A+T	55.95	55.93	56.01	55.12	55.10	55.65

5 个群体共检测到 26 个变异位点，为碱基的替换和颠换。26 个变异位点共定义 9 种单倍体型。单体型 1 和 2 为北方 3 个群体所共享，单体型 3 为南方 2 个群体共享，其余均为单一群体所有。单体型及其在 5 个群体中的分布如表 2 所示。

### 2.2 栉江珧群体遗传多样性分析

利用 DNAsp5.0 计算群体内遗传多样性参数，结果如表 3 所示。5 个群体的核苷酸多样性指数( $P_i$ )为 0.01808，单倍体多态性( $H_d$ )为 0.6867。其中，文登群体核苷酸多样性指数最高为 0.00297，日照群体单倍体多态性最高位 0.5606，两者最低的均出现在湛江

群体均为 0.0000。

对群体间的遗传多样性指数进行分析。群体间的平均核苷酸差异数(表 4)为 0.500~16.322，最低的 0.273 出现在海南与湛江群体之间，而最高则出现在海南与文登群体之间。南北方群体在核苷酸多样性方面有较大的差异性。

研究发现，栉江珧南北方群体特异性序列也存在着较大差异(图 1)。

栉江珧群体变异及遗传结构分析。基因流( $N_m$ )及遗传分化系数( $F_{st}$ )(表 5)，遗传分化系数最高出现在湛江与长岛群体之间，同样湛江群体与北方其他两个群体也表现出较大的遗传分化。基因流最大出

表 2 16S 基因单倍型片段序列及变异位点

Tab. 2 Variable nucleotide positions in part of the 16S rRNA region of 10 haplotypes, and number of individuals of each haplotype found in each locality

单体型	11111222 222222222 333344 8878999012 2234445557 467900 2480045076 7893780452 502368	变异位点				
		长岛 CD	日照 RZ	文登 WD	海南 HN	湛江 ZJ
Hap-1	TAGAACTATG GTCGGTTGAT AGGGTG	9	8	9	0	0
Hap-2	..... G.....	3	2	2	0	0
Hap-3	CG.GGTCG.A CCT.A.GA.A G.....	0	0	0	9	11
Hap-4	CG.GGTCG.A C.TAA.GA.A G.....	0	0	0	1	0
Hap-5	CG.GGTCG.A CCT.ACGA.A G.....	0	0	0	1	0
Hap-6	.....G.....	0	1	0	0	0
Hap-7	.....C.....	0	1	0	0	0
Hap-8	..A..... GTCAG.	0	0	1	0	0
Hap-9	.....T	0	0	1	0	0

表 3 栉江珧 16S 遗传多样性参数比较

Tab. 3 Summary of genetic diversity of different *A. pectinata* populations

遗传多样性参数	长岛 CD	日照 RZ	文登 WD	海南 HN	湛江 ZJ	总计
单倍体型 $H$	2	4	4	3	1	9
单倍体多态性 $H_d$	0.4091	0.5606	0.5256	0.3455	0.0000	0.6867
多态位点 $S$	1	3	7	3	0	26
平均核苷酸差异数 $K$	0.4091	0.6364	1.3077	0.5455	0.0000	7.9743
核苷酸多样性指数 $P_i$	0.00093	0.00144	0.00297	0.00124	0.00000	0.01808

表 4 栉江珧群体间平均核苷酸差异数  $K$  及遗传距离  $D$

Tab. 4 Average number of nucleotide differences between populations ( $K$ ) and the pairwise distances matrix for the 16S rRNA gene fragment ( $D$ )

群体	长岛 CD	日照 RZ	文登 WD	海南 HN	湛江 ZJ
CD		0.00002	0.00004	0.01743	0.01761
RZ	0.500		0.00006	0.01760	0.01778
WD	0.827	0.949		0.01742	0.01759
HN	15.841	16.091	16.322		0.00003
ZJ	15.750	16.000	16.231	0.273	

注: 对角线左下方为  $K$ , 右上方为  $D$

```

111111111 111111111 111111111 111111111 111111112 222222222 222222222 222222222 222222222 222222222 222222222
666666667 777777778 888888889 999999990 000000001 111111112 222222223 333333334 444444445 555555556 666666667
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
北方North China CTGTGCAACT TTACTAGGTA GGTAGGTTGA CTAATAAAA GTTTAGCTGG GGCAGCTAGG GAAAAGGTAA AACTTCCCA TTGATTGTAT ACTGATAGGT TTTGATCCAA
南方South China .....G.....G.....TC.....G.....ACC.....T.....A.G.....A.....
    
```

图 1 南北方群体特异性序列差异片段

Fig.1 Specific sequences of 16S gene among the *A. pectinata* populations in North and South China

表 5 基因流 ( $N_m$ ) 和遗传分化系数  $F_{st}$

Tab. 5 Gene flow ( $N_m$ ) and genetic fixations index ( $F_{st}$ ) between and within five populations of *A. pectinata*

群体	长岛 CD	日照 RZ	文登 WD	海南 HN	湛江 ZJ
CD		11.5011	13.6406	0.0155	0.0066
RZ	- 0.04545		20.8500	0.0191	10.101
WD	- 0.03805	- 0.02457		0.0301	0.021
HN	0.96987	0.96328	0.94323		
ZJ	0.98701	0.98011	0.95972	0	

注: 对角线左下方为  $F_{st}$ , 右上方为  $N_m$

现在湛江与海南群体之间,说明两个群体之间有非常高的基因交流频率。对 5 个群体进行 AMOVA 分析,如表 6 所示。遗传分化系数( $F_{st}$ )为 0.5007 ( $P<0.001$ ,  $P=0.0000$ )表明在整个变异中群体间的变

异占 50.07%,可见在群体间遗传分化高于群体内遗传分化程度,群体间存在较为显著的遗传分化,结合基因流作者认为导致群体分化高的主要原因存在于南北方地理隔离。

表 6 栉江珧群体间遗传差异的分子方差分析

Tab. 6 Analysis of molecular variance (AMOVA) among populations of *A. pectinata*

变异来源	自由度	平方和	方差	百分比
群体间	4	9.701	0.18969 <sup>a</sup>	50.07
群体内	54	10.214	0.18916 <sup>b</sup>	49.93
总计	58	190915	0.37884	

注: 上标 a 和 b 表示差异显著程度,  $P<0.001$ , 其通过将样本经过 1023 次随机排列改变计算而得到

聚类分析采用 NJ 法和 UPGMA 法分别构建 5 个不同地理群体的分子进化树, 5 个群体的个体分为两支, 其中北方 3 群体聚为一支, 南方 2 个群体聚为一支(图 2)。但南北方群体各自之间存在大范围的交叉, 这一点也说明它们各自之间存在较为广泛的基因交流。

### 3 讨论

线粒体 DNA 进化速度快、结构简单碱基的置换率高, 从而增加了种内、种间的遗传差异, 因此线粒体 DNA 在研究种内不同群体遗传多样性及属内不同物种间系统进化关系时具有广泛的应用前景。16S rRNA 作为线粒体 DNA 中进化速率适中, 遗传变异性相对较小的一段序列, 目前在研究群体多样性水平方面得到广泛应用<sup>[12-15]</sup>。Boulding 等<sup>[15]</sup>运用 16S rRNA 对 3 个群体虾夷扇贝多样性水平进行研究, 发现 16S 在虾夷扇贝群体中具有丰富的遗传多样性水平。此外在栉孔扇贝、斑节对虾、牡蛎、中国对虾<sup>[16]</sup>等养殖物种中同样检测到丰富的 16S 变异水平。本研究对 5 个群体栉江珧 16S rRNA 进行扩增、测序, 得到 441bp 目的片段、A+T 含量为 55.65%、明显高于 G+C 含量, 这是与牛东红等<sup>[18]</sup>对缢蛏、刘亚军等<sup>[12]</sup>对栉孔扇贝、苏天凤等<sup>[13]</sup>对近江牡蛎及刘亚军等对栉孔扇贝研究中的 AT 含量高于 GC 含量的结果是相一致的。59 条序列中共检测到变异位点 26 个, 构成 9 种单倍体型, 单倍体型多态性 0.6867, 略高于周发林所作的南海斑节对虾(0.6335±0.0500)。5 个群体中除湛江、长岛群体外均检测到属于各自的单体型, 湛江群体与海南群体共享一个单体型, 说明其他 3

个群体均具有各自的遗传优势。核苷酸多样性指数 5 个群体几乎均低于缢蛏<sup>[18]</sup>0.01889、脉红螺<sup>[19]</sup>0.0027 及栉孔扇贝<sup>[12]</sup>0.00343, 而 5 个群体中又以湛江的 0.0000 最低、长岛群体次之 0.00093, 综上结合表 5, 作者认为湛江群体极有可能在与海南群体基因交流过程中失去了遗传优势, 而长岛群体多样性水平低有可能因为地处封闭的内海, 基因交流过于简单并且长岛靠近辽宁大连江珧柱在大连比较畅销, 可能由此大量捕捞栉江珧, 导致野生资源相对匮乏、遗传多样性水平降低。

由表 4 可以看出南北方群体之间遗传差异极为显著, 而各自之间差异并不明显, 说明由于地理隔离南北方两方在进化中各自保留了自己的遗传特征。在 clustal w 比对时, 发现两处南北方群体各自具有的特异性碱基的颠换、替换如图 1 所示, 利用这两处差异可以很好地区分开南北方群体。结合表 3 和表 4, 可以看出虽然南方群体群体内表现出较低的遗传多样性水平, 但由于南北方的地理隔离, 南北方群体间的遗传多样性差异显著。综上作者认为在栉江珧遗传育种时, 应该尽量选用这种位于南北方两方的亲本比如海南群体与文登群体搭配, 以增加子代的遗传多样性水平, 以期提高养殖栉江珧的出柱率。

但是, 虽然本研究中发现 5 个群体的栉江珧存在一定的遗传差异, 但群体变异较少、多样性水平丰富度不够。因此要提高检测的遗传多样性的水平, 需要结合线粒体 COI 序列、微卫星分析等得到更多的数据, 以更全面详实、客观的分析栉江珧群体遗传水平。

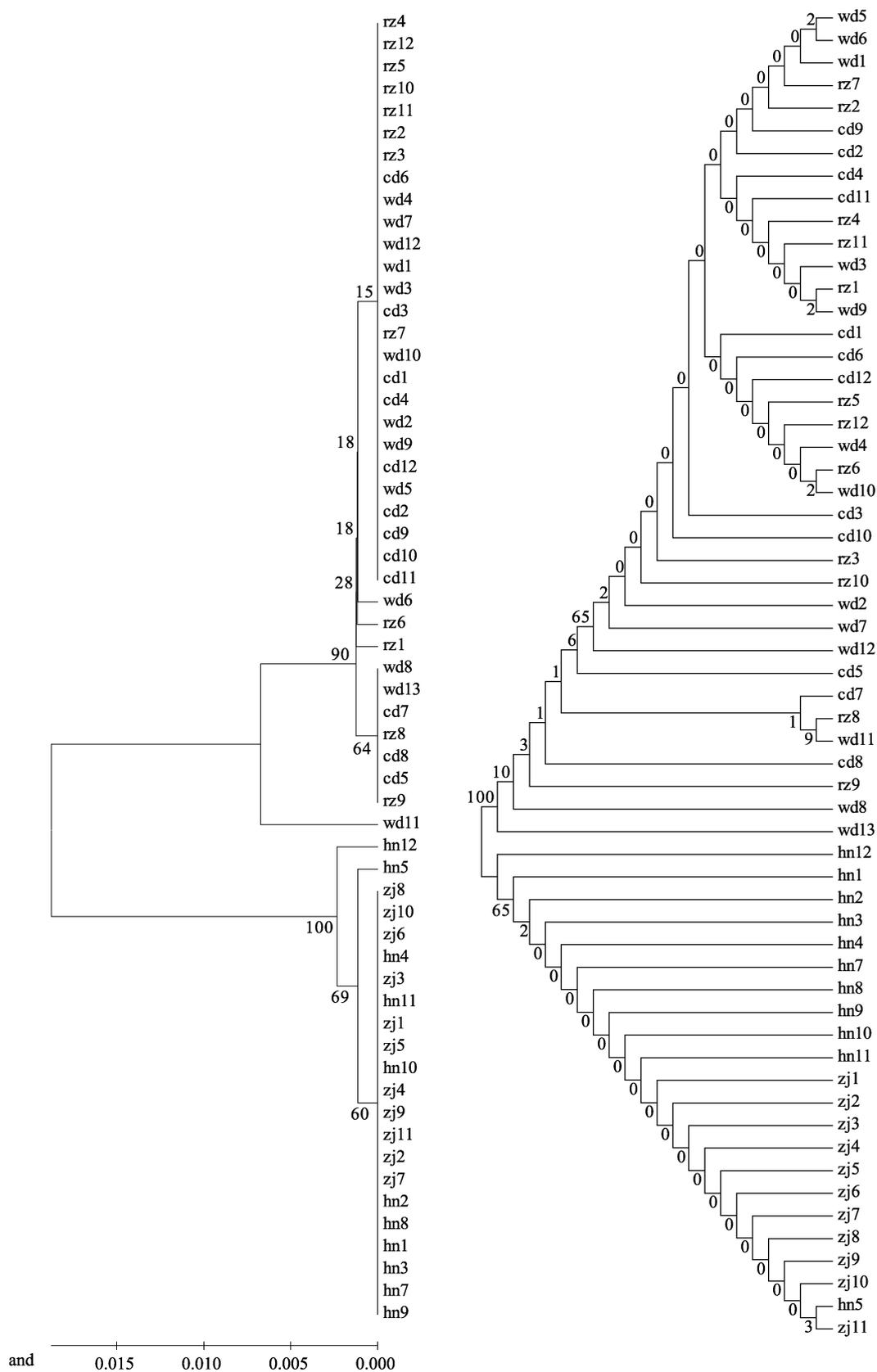


图 2 基于 16S 序列构建的 UPGMA 和分子 NJ 系统树

Fig.2 UPGMA and NJ trees of 16S gene constructed from genetic distance among the *A. pectinata* individuals

参考文献:

- [1] 余祥勇, 王梅芳, 杨书婷, 等. 无裂栉江珧种内同工酶表型差异的比较研究[J]. 热带海洋, 2000, 4: 45-50.
- [2] 余祥勇, 王梅芳, 杨书婷, 等. 有棘和无棘两种表型栉江珧同工酶差异的比较[J]. 湛江海洋大学学报, 1999, 2: 6-8.
- [3] 于瑞海, 王昭萍, 李琪, 等. 栉江珧工厂化育苗技术研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2007, 5: 23-27.
- [4] 张红云. 栉江珧繁殖生物学及人工苗种繁育技术研究[D]. 厦门: 集美大学, 2010.
- [5] Canapa A. Molecular Data from the 16S rRNA Gene for the Phylogeny of Pectinidae (Mollusca: Bivalvia)[J]. Journal of Molecular Evolution, 2000, 50(1): 93-97.
- [6] Martínez-Navarro E M, Galián J, Serrano J. Phylogeny and molecular evolution of the tribe Harpalini (Coleoptera, Carabidae) inferred from mitochondrial cytochrome-oxidase I[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2005, 35(1): 127-146.
- [7] Shih H T, Suzuki H. Taxonomy, phylogeny, and biogeography of the endemic mudflat crab *HelicelChasmagnathus* complex (Crustacea : Brachyura : Varunidae) from East Asia[J]. Zoological Studies, 2008, 47(1): 114-125.
- [8] Thompson J D Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice[J]. Nucleic Acids Research, 1994, 22(22): 4673-4680.
- [9] LIBRADO P R, Dna S P. A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. Bioinformatics, 2009, 25: 1451-1452.
- [10] Tamura K. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular biology and evolution, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [11] Excoffier L, Laval G, Schneider S A. An integrated software package for population genetics data analysis[J]. Evolutionary Bioinformatics Online, 2005, 5: 47-50.
- [12] 刘亚军, 喻子牛, 姜艳艳, 等. 栉孔扇贝 16SrRNA 基因片段序列的多态性研究[J]. 海洋与湖沼, 2002, 33(5): 477-483.
- [13] 苏天凤, 江世贵, 周发林, 等. 江牡蛎 16S rRNA 基因片段序列变异分析[J]. 高技术通讯, 2005, 15(2): 100-103.
- [14] Anderson F E. Phylogeny and historical biogeography of the loliginid squids (Mollusca: Cephalopoda) based on mitochondrial DNA sequence data[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2000, 15(2): 191-214.
- [15] Boulding E C, Boom J D C, Beckenbach A T. Genetic Variation in One Bottlenecked and Two Wild Populations of the Japanese Scallop (*Patinopecten yessoensis*): Empirical Parameter Estimates from Coding Regions of Mitochondrial DNA[J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1993, 50(6): 1147-1157.
- [16] 邱高峰, 常林瑞, 徐巧婷, 等. 中国对虾 16S rRNA 基因序列多态性的研究[J]. 动物学研究, 2000, 21(1): 35-40.
- [17] 周发林, 江世贵, 姜永杰, 等. 中国南海野生斑节对虾 5 个地理群体线粒体 16S rRNA 基因序列比较分析[J]. 水产学报, 2009, 2: 208-214.
- [18] 牛东红, 李家乐, 汪桂玲, 等. 缢蛏六群体 16S rRNA 基因片段序列的差异分析[J]. 上海水产大学学报, 2007, 1: 1-6.
- [19] 杨建敏, 李琪, 郑小东, 等. 中国沿海脉红螺(*Rapana venosa*)自然群体线粒体 DNA 16S rRNA 遗传特性研究[J]. 海洋与湖沼, 2008, 3: 257-262.

## The genetic diversity of five populations of *Atrina pectinta* in China based on mitochondrial 16S rRNA gene

YAN Jia-kun<sup>1,2</sup>, YANG Ai-guo<sup>2</sup>, ZHOU Li-qing<sup>2</sup>, WU Biao<sup>2</sup>, BAI Lin-jian<sup>1,2</sup>, LIU Zhi-hong<sup>2</sup>

(1. College of Fisheries and Life, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

**Received:** May,23,2012

**Key words:** *Atrina pectinta*; 16S rRNA; Genetic diversity

**Abstract:** Mitochondrial 16S rRNA gene fragments of *Atrina pectinta* sampled from five locations (Changdao, Wendeng, Rizhao, Zhanjiang and Sanya) were amplified with universal primer; the PCR products were sequenced, and 441bp nucleotide sequences were obtained. The T, C, A, G and A+T contents in this fragment were 29.91%, 17.41%, 25.74%, 26.94% and 55.65%, respectively. The AT content was higher than the GC content. The diversity of the population analysis showed that the population of Wendeng had higher level of genetic diversity. Nine haplotypes were defined among five populations, which were from 26 segregating sites. The fixation indices ( $F_{st}$ ) analyzed by AMOVA totaled to  $F_{st} = 0.5007$  ( $P < 0.001$ ) showing that the genetic fixation inter-populations was a little larger than that intra-populations and indicated significant genetic fixation among the five populations. The Neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree and UPGMA phylogenetic tree were made from the five populations of *A. pectinta*. The result showed that the population of WD, CD and RZ might have originated from one clade, while populations of HN and ZJ from another.

(本文编辑: 梁德海)