

基于 16S rRNA 序列初步探讨贻贝属的系统发育

沈玉帮¹, 李家乐¹, 牟月军²

(1. 上海海洋大学 农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 200090; 2. 浙江省嵊泗县科学技术局, 浙江 嵊泗 202450)

摘要:通过比较贻贝属 5 个物种包括中国的两种贻贝的线粒体 16S rRNA 基因部分序列, 来初步确定它们的系统发育关系和了解中国沿海两种贻贝的遗传多样性情况。以 *Perna viridis* 为外群, 采用 NJ 法和 MP 法构建分子系统树。系统发育分析表明, 5 种贻贝 (*Mytilus californianus*, *M. coruscus*, *M. galloprovincialis*, *M. edulis*, *M. trossulus*) 在系统树上依次进行分叉, 呈放射状。*M. californianus* 最为原始, *M. coruscus* 次之。每一个贻贝物种都形成单系。其中, *M. edulis* 和 *M. trossulus* 是非常相似的, *M. coruscus* 和 *M. californianus* 的亲缘关系近。同时发现, 我国沿海分布的紫贻贝 (*M. galloprovincialis*) 和厚壳贻贝 (*M. coruscus*) 的遗传多样性都较高, 但厚壳贻贝的遗传多样性要低于紫贻贝, 可能是由于厚壳贻贝过度被渔民开采等导致厚壳贻贝群体大小降低的缘故。这里系统发育分析为将来进行物种进化、迁移和育种方面的比较研究提供理论基础。

关键词: 贻贝属; 16S rRNA; 系统发育; 单倍型

中图分类号: Q789

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2009)12-0050-06

线粒体基因组序列已经被广泛应用于系统发育研究。绝大多数线粒体基因组含有相同数目和相同类型的基因——2 个 rRNA 基因, 22 个 tRNA 基因、13 个蛋白基因和一个非编码区^[1,2]。与核基因相比, 线粒体基因具有更多的优点, 因为线粒体基因有许多平行进化同源基因 (paralogous gene), 它们能够使分析更加复杂化。另外, 线粒体基因组的基因结构、遗传密码, 以及其他的更高层次的信息在系统发生重建中已经作为强有力的工具^[3]。16S rRNA 基因编码序列可以分为 5' 部分和 3' 部分, 而且每一个部分包括 3 个功能区域^[4]。对 16S rRNA 基因研究发现它的次级结构提供了非常适合系统发育研究的信息^[5]。

贻贝属是所有海洋无脊椎动物中分布最为广泛的属之一。不管是在港湾还是海洋环境, 不管是在潮下带还是潮间带, 都有分布, 而且贻贝已经成为研究海洋生物的种群分化和物种形成的一个非常有意义的模型。在中国和欧洲许多国家, 贻贝已经成为重要的养殖经济贝类。该属隶属于软体动物门、瓣鳃纲、异柱目、贻贝科。 *Mytilus edulis*、紫贻贝 (*M. galloprovincialis*)、*M. trossulus* 这 3 种贻贝广泛分布于欧洲沿海, 并且相互之间发生了一定程度的渐渗, 从而产生了地理变异 (geographical variation)^[6,7]。有人认为地中海的 *M. galloprovincialis* 是在更新世的时候从 *M. edulis* 的祖先进化而来^[8,9], 而 *M. trossulus* 则被认为可能是更为普遍古

老种类的残余体 (relict)^[10,11]。厚壳贻贝 (*M. coruscus*) 的研究相对较少, Scarlatto^[12] 第一次报道了来自于亚洲太平洋沿海的厚壳贻贝。加利福尼亚贻贝 (*M. californianus*) 主要分布于北美西部沿海, 南美及其他地方也有分布, 它主要生活在潮间带, 个体相对来说比较大^[13]。中国沿海的贻贝主要有紫贻贝 (*M. galloprovincialis*)、厚壳贻贝 (*M. coruscus*)。紫贻贝主要分布于中国北部沿海; 厚壳贻贝分布于黄渤海以及东海^[14]。对贻贝属不同物种之间的进化关系到目前还没有完全明确。

本研究运用线粒体 16S 基因部分序列对不同贻贝物种进化关系进行研究, 同时初步了解中国紫贻贝和厚壳贻贝两种贻贝多样性水平和遗传差异, 为贻贝种质资源的利用与保护提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料采集与 DNA 抽提

实验所用的厚壳贻贝为 2006 年 8 月采自浙江嵊泗县花鸟镇海域的野生贻贝。野生紫贻贝为 2006

收稿日期: 2008-10-16; 修回日期: 2009-03-16

基金项目: 国家“863”计划项目 (2006AA10A410); 上海市教委重点学科资助项目 (Y1101); 上海市优青项目 (B-8101-06-15)

作者简介: 沈玉帮 (1981-), 男, 江苏盐城人, 硕士研究生, 主要从事水产种质资源研究; 李家乐, 通信作者, 教授, E-mail: jlli@shfu.edu.cn

年7月采自青岛鳌山湾海域,样品采用95%酒精固定保存。

基因组DNA的提取参照Toro J的方法^[15],在约100 mg 外套膜中加入500 μ L 组织匀浆缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH8.0; 50 mmol/L EDTA, pH8.0),混匀后加入终浓度为1%的SDS和200 mg/L的蛋白酶K,于55℃水浴下消化至澄清。加等体积的饱和酚:氯仿:异戊醇(体积比为25:24:1)抽提,提取上清液再加入等体积的氯仿:异戊醇(体积比24:1)抽提,然后加入2倍体积预冷的无水乙醇沉淀,收集沉淀物,最后将沉淀溶解于100 μ L的TE(100 mmol/L Tris-HCl; 1 mmol/L EDTA; pH=8.0)中。溶解后加入10 mg/L的RNase A, 37℃水浴1 h,以去除RNA。DNA分别经1%琼脂糖电泳和Eppendorf AG22331 分光光度计检测后,用TE(pH=8.0)稀释到浓度为20 mg/L,最终在-20℃下保存备用。

1.2 PCR 扩增和测序

用于扩增16S rRNA 基因片段的引物序列为,上游引物F:5'-TGAGCGTGCTAAGGTAGC-3';下游引物R:5'-AGCCAACATCGAGGTCGC-3'^[16]。PCR 扩增在Eppendorf Mastercycle 5333 型PCR 仪上进行。PCR 反应体积为50 μ L,其中包括模板DNA 100 ng,各种dNTP 0.2 mmol/L,每个引物浓度为1 μ mol/L, *Taq* DNA 聚合酶2 U(天根公司),10 $\times$ 缓冲液5 μ L, Mg^{2+} 4.0 mmol/L,加灭菌双蒸水至50 μ L。每次反应都设不含模板的对照实验。PCR 反应条件为:94℃预变性2 min,然后进行35个循环,每个循环包括94℃ 1 min,52℃ 30 s,72℃ 1 min,最后72℃延伸10 min。PCR 扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳分离,EB 染色,于凝胶成像系统下观察并照相记录。

纯化后的PCR 产物送往上海生工生物工程有限公司直接进行测序反应,测序时采用双向测序。

1.3 数据分析

测序所获得的青岛紫贻贝和嵎泗厚壳贻贝序列先进行手工校正,删除每条序列两端信号比较差的,然后将序列输入到GenBank 中对所获的序列进行验证,发现这些序列确实是线粒体16S rRNA。在GenBank 数据库中获得了不同贻贝物种的相关序列有:*M. californianu*(AF317544, AF317057, U68770), *M. edulis*(AF023545, AF023544, AF023542, AF023549); *M. galloprovincialis*(U22885, AF023558, AF023556, U22887); *M. trossulus*(AJ293733, AJ293734,

AJ293737)。获得序列后又详细查到这些序列已出现的文章,尽量保证序列是属于同一群体。所有序列运用Clustal X 软件^[17]进行序列比对。用Mega 3.0软件中的Kimura 双参数(Kimura-2-parameter)模型估算遗传距离,还有估计中国沿海两种贻贝的一些其他的序列特征,如核苷酸碱基组成、转换与颠换比等。

运用邻接法(neighbor-joining, NJ)和最大简约法(Maximum parsimony, MP)构建分子系统树。运用Mega 3.0 软件,自引导法(bootstrap analysis)用来估计系统发育树分枝点的支持率^[18],设置为1 000次重复(允许每次获得的树最大数目为100)。

2 结果

2.1 16S rRNA 序列变异

将29个个体进行序列比对时,得到282 bp 的16S rRNA 基因部分序列。总共获得了14个单倍型,厚壳贻贝6个,单倍型多态性为0.428 6,紫贻贝8个,其单倍型多态性为0.533 3,厚壳贻贝与紫贻贝之间没有发现共有的单倍型。作者已经将14个单倍型上传到GenBank 中,序列号为EU251406-EU251419。

被扩增的14条厚壳贻贝序列的T、C、A、G 4种碱基含量分别为32.1%、15.1%、31.5%、21.3%。其中G+C的含量为36.4%。表现出明显的碱基组成的偏向性。被扩增的15条紫贻贝序列的T、C、A、G的含量分别为31.8%、16.3%、30.6%、21.3%。其中G+C的含量为37.6%。跟厚壳贻贝类似,G+C的含量比较高。在282个序列位点中,有142个多态位点,其中101个是简约信息位点,41个单一多态位点。所有序列中转换数为10个,颠换数为6个,平均转换与颠换比(T_i/T_v)为1.5。

2.2 遗传距离和遗传分化

不同贻贝群体的16S 基因的遗传距离和遗传分化指数 F_{ST} (表1)。不同物种间遗传距离为0.002~0.077。*M. trossulus*与*M. edulis*之间的遗传距离最小(0.002),而紫贻贝(*M. galloprovincialis*)青岛群体与*M. californianus*之间的遗传最大(0.077)。*M. californianus*与厚壳贻贝(*M. coruscus*)遗传距离为0.065,要小于与其他物种的遗传距离。从遗传分化指数 F_{ST} 来看,两个*M. galloprovincialis*群体的分化最小,其他各物种间都有较大的分化。厚壳贻贝与其他几种贻贝之间分化显著。

表 1 贻贝不同群体间的平均 K-2-P 遗传距离(左下角)和遗传分化指数 F_{ST} (右上角)

Tab.1 The average K-2-P genetic distance(below diagonal)and F_{ST} (above diagonal) among distinct populations of genus *Mytilus*

贻贝	1	2	3	4	5	6
<i>M. californianus</i>		0.913 0 *	0.936 9	0.934 8	0.677 1 *	0.709 9 *
<i>M. galloprovincialis</i>	0.074		0.833 3 *	0.879 5	0.041 2	0.854 3 * *
<i>M. edulis</i>	0.076	0.007		0.764 7 *	0.156 2	0.874 4 * *
<i>M. trossulus</i>	0.077	0.008	0.002		0.182 4	0.867 7 * *
<i>M. galloprovincialis</i> QD	0.077	0.010	0.011	0.012		0.719 2 * *
<i>M. coruscus</i>	0.065	0.042	0.046	0.047	0.047	

注: *, $P<0.05$; **, $P<0.01$

2.3 系统发育分析

图 1 是以翡翠贻贝 *Perna viridis* (序列号: AB265680)为外群,采用 Kimura 双参数模型构建的 16S 基因的 NJ 分子系统树。枝长表示分歧度,枝上的数值是经过 1 000 次重复抽样检查所获得的支持率。从图中可以看出, *M. californianus* 与其他贻贝物种最初产生两个分支后,厚壳贻贝 (*M. coruscus*) 以及剩下的 3 种进一步分叉,呈放射状。 *M.*

trossulus 是最后一分支。 *M. trossulus* 与 *M. edulis* 的亲缘关系最近。贻贝属中每一个贻贝物种都形成一个单系。但是本试验所得的数据对于 *M. edulis*、*M. galloprovincialis*、*M. trossulus* 这 3 种贻贝形成的一个分支提供了非常高的支持率,但这个分支内各个物种间并没有提供非常高的支持率。最大简约树(图 2)的结果支持 NJ 树所得到的大部分关系。每个节点的支持率两者基本一致。

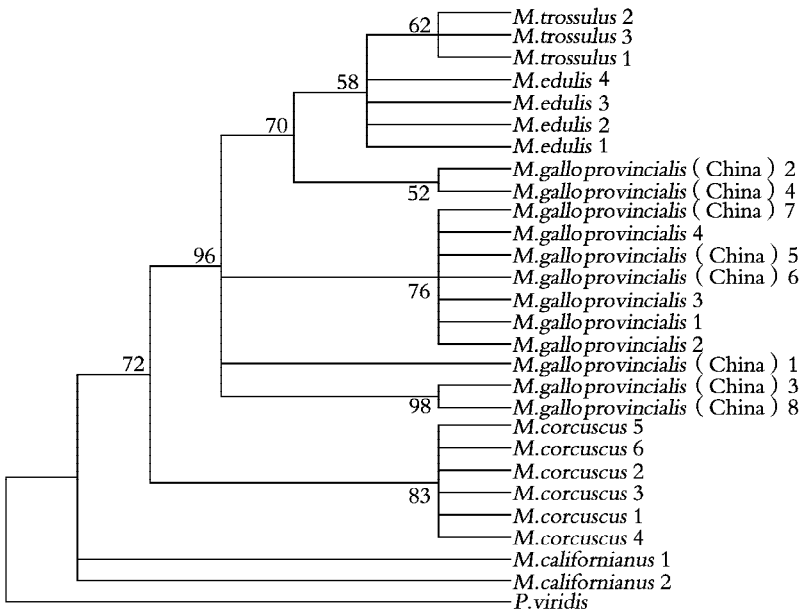


图 1 基于线粒体 16S rRNA 部分序列构建的贻贝属贝类的邻接树(节点处的数字为 1 000 次 bootstrap 检验的支持率)

Fig.1 A neighbor-joining tree of the genus *Mytilus* based on partial sequence of 16S rRNA gene (numbers at nodes are percent recovery in bootstrap analysis (1 000 replicates))

注:数字代表不同单倍型

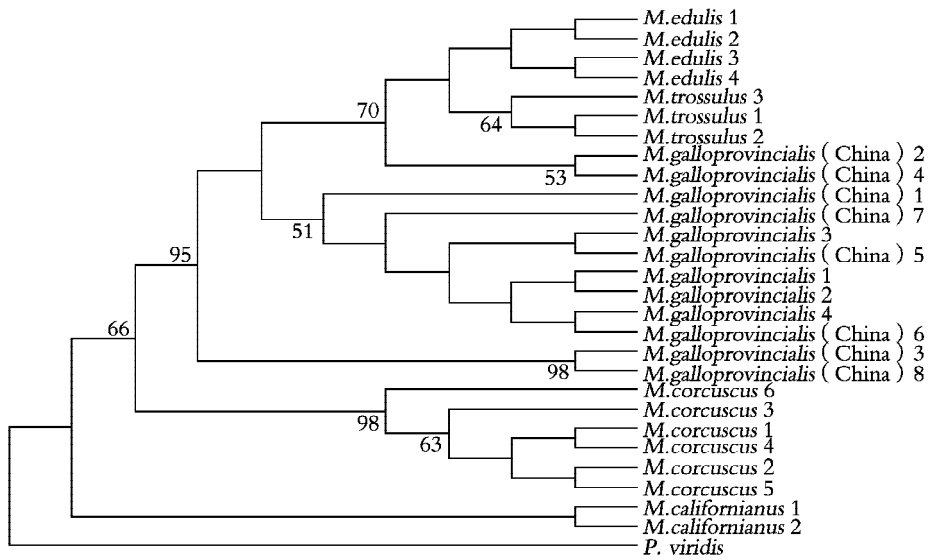


图 2 基于线粒体 16S rRNA 部分序列构建的贻贝属贝类的 MP 树(节点处的数字为 1 000 次 bootstrap 检验的支持率)

Fig. 2 A Maximum parsimony tree of the genus *Mytilus* based on partial sequence of 16S rRNA gene (number at nodes is percented recovery in bootstrap analysis (1 000 replicates))

注:数字代表不同单倍型

3 讨论

本研究讨论了贻贝属不同物种的进化关系。对于贻贝的分类研究国外做了大量的报道^[19~22],特别是 *M. galloprovincialis*, *M. edulis*, *M. trossulus* 一直难以区分,由于形态很相似。后来分子生物学的迅速发展,很多分类专家运用分子标记对其进行了进一步研究。Koehn 等^[23]通过 5 个同工酶基因座对北美东部地区的贻贝进行了研究,认为 *M. galloprovincialis*, *M. edulis*, *M. trossulus* 是不同的物种,因为发现其中任何一种都有自己的不同的等位基因,而且来自不同地理范围的群体有类似的等位基因频率。McDonald 等^[24]根据同工酶和形态特征,运用一系列多元统计方法对贻贝属进行了分析,认为这 3 种贻贝构成了一个大的类群,但每种贻贝都有自己独立的遗传和形态表型。本研究中分子数据的系统发育分析同意形态上的推断,这 3 个物种在 NJ 树和 MP 树中形成姐妹分类,并且都各自形成了一个单系,但是在每个物种枝节的支持率不高。从遗传距离来看,这 3 个物种之间的遗传距离没有远大于 *M. galloprovincialis* 种内遗传距离;从遗传分化指数 F_{ST} 来看,它们之间的 F_{ST} 都在 0.7 以上(表 1)。对于 3 种贻贝的进化关系,发现 *M. edulis* 和 *M. trossulus* 是最相似的,因为它们之间的遗传距离最小(表 1),而且在 NJ 树和 MP 树中先聚为一个分支(图 1, 2),与 Wenne 等^[25]运用线粒体 DNA 对这 3 种贻贝的进化关系研究结果是一致的。除了在非常

小的时候, *M. edulis* 与 *M. californianus*、厚壳贻贝在形态上是很好区分的^[26]。Gosling^[7]研究发现厚壳贻贝与 *M. californianus* 的亲缘关系近。本研究发现 *M. californianus* 最为古老,而厚壳贻贝次之。*M. californianus* 跟其他几种贻贝相比,与厚壳贻贝的遗传距离最小(0.065),而且在进化树中的位置也是相邻的。这 5 种贻贝在进化树上并没有形成集群,而是按照 *M. californianus*, 厚壳贻贝, 紫贻贝, *M. edulis*, *M. trossulus* 顺序依次进行分叉,呈放射状。

一个物种遗传多样性水平的高低与其生存、适应及进化能力是紧密关联的,遗传多样性的降低将可能导致物种适应性和生活力的降低,并最终导致物种种质的衰退。本研究所测定的 29 个贻贝样本个体,共发现 14 个单倍型,而且两者之间没有发现共享的单倍型;在 276 个序列位点中,有 142 个多态位点,其中 101 个是简约信息位点,41 个单一多态位点。发现这两个物种遗传多样性水平都较高,两者之间多样性水平差异不大,紫贻贝略高,可能是紫贻贝群体大小要比厚壳贻贝大,但是并不代表厚壳贻贝降低了,因为早期的资料很少或者没有,无参考资料可比较。也存在厚壳贻贝由于过度采捕等原因已经导致了群体大小出现了降低的这种可能。在线粒体中,16S 进化速度相对来说比较慢,为了更准确地对厚壳贻贝、紫贻贝的遗传多样性进行估计,需要对国内贻贝线粒体 DNA 的其他区域(如 COI、D-loop 等)测序进行进一步研究。因为目前中国海域贻贝

遗传背景研究还很少,需要运用细胞生物学、分子生物学等方法对中国海域的贻贝的遗传结构和遗传变异水平进行进一步研究,为有效地管理、利用和保护贻贝种质资源和进行优良种质培育提供遗传学基础。

参考文献:

- [1] Boore J L. Animal mitochondrial genomes [J]. **Nucleic Acids Research**, 1999, 27: 1 767-1 780.
- [2] Yokobori S, Fukuda N, Aoyama T, *et al.* Long-term conservation of six duplicated structural genes in cephalopod mitochondrial genomes [J]. **Molecular Biology and Evolution**, 2004, 21: 2 034-2 046.
- [3] Boore J L, Brown W M. Big trees from little genomes: mitochondrial gene order as a phylogenetic tool [J]. **Current Opinion in Genetics and Development**, 1998, 8: 668-674.
- [4] Gutell R R, Lee J C, Cannone J J. The accuracy of ribosomal RNA comparative structure models [J]. **Curr Opin Struct Biol**, 2002, 12: 301-310.
- [5] Titus T A, Frost D R. Molecular homology assessment and phylogeny in the lizard family Opluridae (Squamata; Iguania) [J]. **Mol Phylogenet Evo**, 1996, 6: 49-62.
- [6] Skibinski D O F, Beardmore J A, Cross D F. Aspects of the population genetics of *Mytilus* (Mytilidae; Mollusca) in the British Isles [J]. **Biol J Linn Soc**, 1983, 19: 137-183.
- [7] Gosling E. Systematics and geographic distribution of *Mytilus* [A]. Gosling E. The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and culture [C]. Amsterdam: Elsevier Science, 1992. 1-20.
- [8] Barsotti G, Meluzzi C. Osservazioni su *Mytilus edulis* L. e *Mytilus galloprovincialis* Lmk [J]. **Conchiglie**, 1968, 4: 50-58.
- [9] Seed R. Systematic evolution and distribution of mussels belonging to the genus *Mytilus*: an overview [J]. **Am Malacol Bull**, 1992, 9: 123-137.
- [10] Varvio S L, Koehn R K, Vainola R. Evolutionary genetics of the *Mytilus edulis* complex in the North Atlantic region [J]. **Mar Biol**, 1988, 98: 51-60.
- [11] Vainola R, Hvilsum M M. Genetic divergence and a hybrid zone between Baltic and North Sea *Mytilus* populations (Mytilidae; Mollusca) [J]. **Biol J Linn Soc**, 1991, 43: 127-148.
- [12] Scarlatto O A. Bivalve mollusks of temperate latitudes of the western portion of the Pacific Ocean [M]. Moscow: Oprel Faune SSSR, 1981, 126: 1-461.
- [13] Suchanek T H. The role of distribution in the evolution of life history strategies in the intertidal mussels *Mytilus edulis* and *Mytilus californianus* [J]. **Oecologia**, 1981, 50: 143-152.
- [14] 王春琳, 邵力, 王一农, 等. 海水名特优水产品苗种培育手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2003.
- [15] Toro J, Innes D J, Thompson. Genetic variation among life-history stages of mussels in *Mytilus edulis*-*Mytilus trossulus* hybrid zone [J]. **Marine biology**, 2004, 145: 713-725.
- [16] 黄艳艳, 欧阳珊, 吴小平, 等. 中国蚌科线粒体 16S rRNA 序列变异及系统发育 [J]. **水生生物学报**, 2003, 27(3): 258-263.
- [17] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools [J]. **Nucleic Acids Research**, 1997, 25: 4 876-4 882.
- [18] Swofford J D. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other methods), Version 4. 0b10 [M]. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.
- [19] McDonald J H, Koehn R K. The mussels *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* on the Pacific of North America [J]. **Marine Biology**, 1988, 99: 111-118.
- [20] Edwards C A, Skibinski D O F. Genetic variation of mitochondrial DNA in mussel (*Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*) populations from South West England and South Wales [J]. **Marine Biology**, 1987, 94: 547-556.
- [21] Varvio S L, Koehn R, Vainola R. Evolutionary genetics of the *Mytilus edulis* complex in the North Atlantic region [J]. **Marine Biology**, 1988, 98: 51-61.
- [22] Koehn R K. The genetics and taxonomy of species in the genus *Mytilus* [J]. **Aquaculture**, 1991, 94: 125-145.
- [23] Koehn R K, Hall J G, Innes D J, *et al.* Genetic differentiation in *Mytilus edulis* in eastern North America [J]. **Marine Biology**, 1984, 79: 117-126.
- [24] McDonald J H, Seed R, Koehn R K. Taxonomy of the genus *Mytilus* [J]. **Marine biology**, 1990, 94: 125-145.
- [25] Wenne R, Skibinski D O F. Mitochondrial DNA heteroplasmy in European populations of the mussel, *Mytilus* [J]. **Mar Biol**, 1995, 122: 619-624.
- [26] Ahmed M, Sparks A K. Chromosome number, structure and autosomal polymorphism in the marine mussels *Mytilus edulis* and *Mytilus californianus* [J]. **The Biological Bulletin**, 1971, 138(1): 1-13.

Molecular phylogenetics of genus *Mytilus* based on the 16S rRNA sequences

SHEN Yu-bang¹, LI Jia-le¹, MU Yue-jun²

(1. The Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecology (AGRA), the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China; 2. Science and Technology Bureau of Shengsi, Shengsi 202450, China)

Received: Oct. , 16, 2008

Key words: *Mytilus*; 16s ribosome RNA; phylogeny; haplotype

Abstract: In this paper we compared the partial sequences of the mitochondrial 16S ribosomal RNA of the five species of genus *Mytilus* including two species in China to primarily determine their phylogenetic relationships and estimate the genetic diversity of two species of *Mytilus* along the coast of China. The phylogenetic trees were reconstructed based on neighbor-joining and maximum parsimony methods. *Perna viridis* was used as an outgroup. The phylogenetic analysis revealed that five species of mussel *Mytilus*, *M. californianus*, *M. coruscus*, *M. galloprovincialis*, *M. edulis*, *M. trossulus*, diverged in the basal polytomy at the base of the *Mytilus* radiation. *M. californianus* is the most basal among all species of genus *M. ytilus*, and the secondary is *M. coruscus*. The individuals of the each of five species solely cluster a monophyletic clade, respectively. *M. edulis* and *M. trossulus* are the most similar to the three closely related species. *M. coruscus* is a closer relative of *M. californianus* than of *M. edulis*, *M. galloprovincialis*, *M. trossulus*. And we found that while the genetic diversity of both *M. coruscus* and *M. galloprovincialis* distributed along the coast of China was higher, the genetic diversity of *M. coruscus* was lower than that of *M. galloprovincialis*, this may be caused by declined population size due to overexploitation and human activity. This molecular phylogeny provides the theoretic foundation for future comparative studies of species evolution, immigration and breeding strategies.

(本文编辑:康亦兼)