

基于线粒体 *COI* 基因序列的 4 个海域口虾蛄群体的遗传多样性研究

董 鑫, 邢 坤, 隋宥珍, 刘海映

(大连海洋大学 海洋科技与环境学院, 大连 116023)

摘要: 为比较中国不同海域口虾蛄(*Oratosquilla oratoria*)群体的遗传特性, 作者对采自皮口、绥中、青岛和广州 4 个海域的口虾蛄群体的线粒体 *COI* 基因序列进行扩增和测序, 比较并分析了其遗传多样性和系统进化关系。获得 585bp 的口虾蛄线粒体 *COI* 基因序列, 发现变异位点 54 个, 占总位点数的 9.2%。*COI* 基因序列 A+T 含量(64.8%)显著高于 G+C 含量(35.2%), 符合节肢动物线粒体 DNA 碱基组成的特点。转换与颠换的平均比值是 7.84, 碱基替换未达到饱和。100 个样本的线粒体 *COI* 基因序列共定义 35 个单倍型, 单倍型多样性(*Hd*)为 0.9162, 平均核苷酸多样性(π)为 0.0203。4 个群体均具有高的单倍型多样性和低的核苷酸多样性的特点, 说明 4 个海域口虾蛄的遗传多样性均处于中等水平, 但广州海域的遗传多样性水平最高。AMOVA 分析表明, 来自于群体间的遗传差异(84.53%)明显高于来自群体内的差异(15.47%)。遗传分化系数(F_{st})表明皮口、绥中、青岛 3 个海域间几乎没有发生分化($F_{st}<0$), 而广州海域口虾蛄遗传分化较大。从 GenBank 上下载了 19 条粤东海域口虾蛄的同源序列与本实验获得序列共同构建 NJ 系统发育树, 结果显示皮口、绥中、青岛聚为一支, 广州和粤东(深圳和汕尾)聚为另一支。单倍型系统发育树和单倍型进化网络关系图均显示出广州海域口虾蛄群体较大的遗传分化。

关键词: 口虾蛄(*Oratosquilla oratoria*); 线粒体 *COI*; 遗传多样性; 系统发育

中图分类号: Q347 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2015)07-0029-08

doi: 10.11759/hyxx20140412002

口虾蛄(*Oratosquilla oratoria*)隶属节肢动物门(Arthropoda)、甲壳动物亚门(Crustacea)、软甲纲(Malacostraca)、口足目(Stomatopoda)、虾蛄科(Squillae)、口虾蛄属(*Oratosquilla*)^[1], 俗称虾爬子、螳螂虾、虾虎等, 具有很高的营养价值和经济价值, 是中国沿海地区重要的经济虾类之一。近年来, 人们对海鲜食品的需求不断增加, 因而加速了人们对海洋经济生物的索取力度, 口虾蛄作为中国近海捕捞的优势种^[2], 其资源量随着捕捞压力的增大而逐步减小^[3], 加之生态环境的不断恶化, 野生口虾蛄资源受到严重威胁, 所以亟需对口虾蛄的种质资源现状进行研究。

目前对口虾蛄的研究多集中在形态学^[4]、生物学特征^[5]、生理生态^[6]和人工育苗^[7]等方面, 关于从分子水平上研究其种群遗传多样性的报道也日渐增多, Zhang 等^[8]用 11 个微卫星标记初步分析了葫芦岛、青岛、烟台 3 个海域口虾蛄群体的遗传多样性状况, 得到观测等位基因数为 2~11 个不等, 遗传多样性水平较高。张代臻^[9-13]等用细胞色素 C 氧化酶亚基 I(mtDNA *COI*)标记的方法研究了黄海海域、渤海海

域和粤东海域口虾蛄的遗传多样性和遗传结构, 结果显示黄海水域口虾蛄的单倍型多样性和核苷酸多样性水平均高于渤海海域而低于粤东海域。目前尚未见应用线粒体 *COI* 标记的方法对包括南北方海域的口虾蛄野生种质资源现状进行综合详细报道。

线粒体 DNA(mitochondrial DNA, 简称 mtDNA)相对于核 DNA 具有结构简单、母系遗传、进化速率快、几乎不发生重组、富含系统发育信号等特点, 是作为种属进化研究的良好标记^[14]。其中, *COI* 是目前应用最多、结构和进化动力学研究比较清楚的基因之一, 且其能被通用引物所扩增, 所以被广泛应用于动物近缘种间的系统进化研究。本研究对分布于皮口、绥中、青岛、广州 4 个海域口虾蛄群体的遗

收稿日期: 2014-04-12; 修回日期: 2014-06-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41006079); 辽宁省特色产业计划产业化项目(2010416022); 浙江省近岸水域生物资源开发与保护重点实验室开放基金(J2012009)

作者简介: 董鑫(1988-), 女, 江苏连云港人, 硕士研究生, 主要从事海洋遗传分子生物学研究, E-mail: 632457940@qq.com; 邢坤, 通信作者, 电话: 0411-84762089, E-mail: xingkun@dlou.edu.cn

传多样性和遗传结构进行研究, 以期为口虾蛄野生种质资源的合理开发和保护提供分子生物学依据, 并为口虾蛄在 *COI* 方面的研究积累更多可利用数据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验材料是 2011 年~2013 年采集于皮口、绥中、青岛、广州 4 个海域的口虾蛄样本, 共计 100 只(表 1)。样本活体运回实验室后, 置于 -80°C 冰箱中冷冻备用。

表 1 口虾蛄样本采集信息

Tab. 1 *Oratosquilla oratoria* sampling information

群体	样本数(只)	取样地点
皮口(PK)	27	皮口近海
绥中(SZ)	29	绥中近海
青岛(QD)	27	青岛近海
广州(GZ)	17	广州大亚湾

1.2 DNA 的提取、扩增及测序

用已灭菌的剪刀取口虾蛄背部肌肉组织, 置于加入液氮的研钵中充分研磨, 用购于上海生工的 Ezup 柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒提取, DNA 溶解于 TE 溶液中, 琼脂糖凝胶电泳检验其纯度后 -20°C 保存备用。

COI 扩增所用引物为通用引物, 引物序列: LCO1490: 5'-GGTCAAATCATAAAGATATTGG-3'和 HCO2198: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'。PCR 反应的总体积为 25 μL , 其中 10 $\times$ Buffer 2.5 μL 、Taq DNA polymerase (5 U/ μL) 0.2 μL 、dNTPs (各 2.5 mmol/L) 2 μL 、上下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL 、DNA 模板 1 μL 、ddH₂O 补足体积。在 Eppendorf PCR 仪上进行扩增, 反应程序均为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s, 32 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 最后延伸 10 min。

PCR 产物经过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 利用凝胶成像系统进行拍照和比较, 挑选较好的 PCR 产物送至上海生工生物工程股份有限公司进行双向测序, 测序仪为 XL3730 基因分析仪。

1.3 外群的选择及序列分析

鬼虾蛄 (*Squilla empusa*) 在分类学上与口虾蛄关系密切, 因此本研究选择鬼虾蛄作为外群分析口虾蛄野生群体的亲缘关系^[15]。

用 ClustalX 1.83^[16]对所测序列进行比对并人工校对。采用 Mega4.0^[17]软件统计序列的碱基组成、变异位点、简约信息位点、转换和颠换的比率和不同群体间的遗传距离, 并以邻接法^[18](Neighbor-Joining, NJ)基于 Kimura 双参数(Kimura 2-parameter)模型构建群体和单倍型的系统发育树(以 Bootstrap 法^[19]1000 次重复来检验系统树各分支的置信度)。用 DnaSp5.1 软件^[20]计算群体的单倍型数, 单倍型多态性(*Hd*), 核苷酸多样性指数(π)及平均核苷酸差异数(*K*)等。应用 Arlequin3.5 软件中的分子方差分析(AMOVA)估算遗传变异的分布和遗传分化系数(*F*-statistics, F_{st})^[21]。用软件 TCS1.21^[22]来分析单倍型的进化网络关系。

2 结果与分析

2.1 *COI* 序列特征及遗传多样性分析

本研究采用的是无脊椎动物通用引物, 对 4 个海域口虾蛄 *COI* 进行 PCR 扩增和测序, 共得到 100 个样本的 *COI* 序列, 经 ClustalX 比对后, 去除引物及序列起始的部分序列, 与 GenBank 上下载的口虾蛄的同源 *COI* 基因序列进行 MEGA 比对后, 确认得到 585bp 的序列。4 个群体的碱基组成基本一致, *COI* 基因序列的 A、G、C、T 平均含量分别为 28.2%、17.6%、17.6%、36.6%, A+T 含量(64.8%)显著高于 G+T 含量(35.2%)。4 个群体口虾蛄所有序列中共存在简约信息位点 54 个。转换与颠换的平均比值是 7.84, 转换高于颠换。

所有样本共定义 35 个单倍型, 分别命名为 Hap1~Hap35(表 2)。在皮口、绥中、青岛和广州共检测到的单倍型数分别为 14 个、17 个、16 个和 11 个。其中 5 个单倍型涵盖的样本数最多, 分别为 Hap1、Hap2、Hap7、Hap8 和 Hap16。被共享个体数最多的是 Hap2, 为皮口、青岛、绥中 3 个海域的 26 个样本所共享。被两个以上种群共享的单倍型有 16 个, 被 3 个以上种群共享的单倍型有 7 个, 即 Hap1、Hap2、Hap6、Hap7、Hap8、Hap16、Hap20。4 个群体的单倍型及遗传多样性系数见表 3。4 个群体的整体单倍型多样性和平均核苷酸多样性值是 0.9162 和 0.0203。单倍型多样性最高的为广州群体($Hd=0.9338$), 最低为皮口群体($Hd=0.8783$)。核苷酸多样性以广州群体最高($\pi=0.0049$), 以皮口群体最低($\pi=0.0032$)。4 个海域中广州群体的遗传多样性最高, 明显高于其他 3 个海域。

表 2 口虾蛄 *COI* 序列的核苷酸变异位点及各单倍型的分布

Tab. 2 Distribution of nucleotide variation sites and haplotypes in *COI* sequences of *O. oratoria*

单倍型	1111 1111222222 2222223333 3333333444 4444445555 5555						群体单倍型数分布				
	144790025 5668011223 4467880133 4568899111 2334672234 5678										
	1601313914 7067547098 1784394914 0282514258 1392354954 6215						PK	SZ	QD	GZ	总数
Hap1	ATGTTCTTCC TTATCTCAGA ACGGGACTCC TTCATACTTG AACTGACATA CCTC						4	1	1		6
Hap2	T.....						8	10	8		26
Hap3	G.....T.....T.....						1				1
Hap4	G.....A.T.....								1		1
Hap5	T.....A.....A.....T..						1				1
Hap6	A.....A.....						2	1	1		4
Hap7	T..T.....A.....						1	2	2		5
Hap8	T.....T.....						3	2	3		8
Hap9	G.....T.....						1	1			2
Hap10	C.....C.....T.....A.....							1			1
Hap11	T.....A.....T..							1	1		2
Hap12	C.....T.....C.....							1	1		2
Hap13	T..C.....T..						1				1
Hap14	.C.....T.....A.....T							1	1		2
Hap15	T.....C.....G.....							1	1		2
Hap16	T.....A.....						1	2	2		5
Hap17	..C...T.....T.....							1	1		2
Hap18	T.....T..T.....A.....							1	1		2
Hap19	C.....TG..C.....C.							1	1		2
Hap20	T.....T.A.....						1	1	1		3
Hap21	T.....T.....							1	1		2
Hap22	T.....A...A.....T						1				1
Hap23	T.....G.....						1				1
Hap24	T..C.....						1				1
Hap25	..A.CTC..T GCG..CTGAG GTACAGT.TT .C..CGT..C GG.CA.TGGG TT..									4	4
Hap26	..A.CTC..T GCG..CTGAG GT.C.GT.TT .C.GCGT..C GG.CA.TGGG TT..									2	2
Hap27	..A.CTC..T GCG..CTGAG GT.C.GT.TT .C.GCGT..C GG.CA.TGG TT..									1	1
Hap28	..A.CTC..T GCGC..CTGAG GTAC.GT.TT .C.GCGT..C G..CA.TGGG TT..									1	1
Hap29	..A.CTC..T GCG..CTGAG GTAC.GT.TT .C.GCGT..C GG.CA.TGGG .T..									2	2
Hap30	..A.CTC..T GCG.TCTGAG GTAC.GT.TT .C.GCGT..C GG.CA.TGG TT..									2	2
Hap31	..A.CTC..T GCG..CTGAG GTAC.GT.TT .C.GCGT..C GG.CA.TGGG TT..									1	1
Hap32	..A.CTC..T GCGTCTGAG GTAC.GT.TT .C.GCGT.CC G..CA.TGGG TT..									1	1
Hap33	CTC..T GCG.TCTGAG GTAC.GT.TT .C.GCGT..C GG.CA.TGG TT..									1	1
Hap34	..A.CTC..T GCG..CTGAG GTAC.GT.TT .C.GCGT..C GG.CA.TGAG TT..									1	1
Hap35	..A.CTC..T GCG.TCTGAG GTAC.GT.TT .C.GCGT.CC GG.CA.TGGG TT..									1	1

表 3 基于 *COI* 基因序列得出的 4 个口虾蛄群体遗传多样性参数

Tab. 3 Parameters of genetic diversity in 4 *O. oratoria* populations based on *COI* sequences

群体	变异位点	单倍型	单倍型多样性	核苷酸多样性	平均核苷酸差异数
皮口	10	14	0.8783	0.0032	1.8836
绥中	19	17	0.8968	0.0039	2.2698
青岛	19	16	0.9060	0.0039	2.3020
广州	11	11	0.9338	0.0049	2.9118
均值			0.9162	0.0203	11.8390

2.2 群体遗传结构分析

利用 *COI* 序列比较 4 个海域口虾蛄种群的遗传分化, 由 Arlequin3.5 软件的 AMOVA 计算表明, 来自于群体间的遗传差异(84.53%)明显高于来自群体内的差异(15.47%)(表 4)。遗传分化系数(F_{st})在广州与皮口群体间最高($F_{st}=0.9358$)(表 5)。皮口、绥中、青岛 3 个群体的 F_{st} 值均为负值, 表明 3 个群体间几乎没有发生遗传分化, 存在高度的遗传同质性; 而广州与皮口、绥中、青岛 3 个群体间的 F_{st} 值(0.9287~0.9358)均较高, 说明广州群体与其他 3 个群体间的遗传分化很大。

表 4 4 个口虾蛄群体线粒体 *COI* 变异区序列的 AMOVA 结果

Tab. 4 The result of AMOVA based on *COI* gene of mtDNA in 4 *O. oratoria* populations

变异来源	自由度	平方和	方差分量	总变异百分比(%)
群体间	3	476.737	6.38294 Va	84.53*
群体内	96	112.183	1.16857 Vb	15.47
总数	99	588.920	7.5515	

注: 遗传分化系数(F_{st}): 0.84525

表 5 4 个口虾蛄群体间的平均遗传距离和 F_{st} 值

Tab. 5 Mean distance between 4 *O. oratoria* populations and F_{st}

品种	群体间平均遗传距离及 F_{st} 值			
	皮口	青岛	绥中	广州
皮口		-0.0012	-0.0013	0.9358
青岛	0.00370		-0.0343	0.9287
绥中	0.00357	0.00365		0.9292
广州	0.04573	0.04567	0.04574	

注: 对角线以上为群体间的 F_{st} 值, 对角线以下为群体间的遗传距离

采用 MEGA4.0 软件根据 Kimura 双参数模型计算各群体间的遗传距离, 由表 5 可知, 皮口和绥中群体的遗传距离最近, 为 0.00357; 广州和绥中群体的遗传距离最远, 为 0.04574。广州与皮口、青岛、绥中 3 个群体间的遗传距离均较远(0.04567~0.04574), 皮口、青岛、绥中群体间的遗传距离很近(0.00357~0.00370)。

2.3 系统发育和嵌套分析

从 GenBank 下载 19 条粤东海域(汕尾和深圳)的口虾蛄 *COI* 序列和鬼虾蛄的 *COI* 序列, 与本研究所

检测的 100 条口虾蛄样本的 *COI* 同源基因序列构建群体的 NJ 系统发育树(图 1), 整体分析系统进化关系。由图 1 可知, 进化树主要分为 3 个分支: 皮口、绥中、青岛 3 个海域口虾蛄群体遗传距离较近首先聚为一个小支, 与广州和粤东(汕尾和深圳)海域口虾蛄群体相聚的小支聚为一个大支, 最后才与外群鬼虾蛄群体聚在一起。从构建的单倍型 NJ 系统进化树可以看出(图 2), 绥中、青岛、皮口 3 个海域的口虾蛄的所有个体以嵌套的方式聚集在一起, 没有形成明显的地理格局, 广州群体特有的单倍型形成单独的分支。

基于单倍型的进化网络关系图(图 3)(圆代表单倍型, 斜线代表演变事件, 小圆点代表未检测到的单倍型)可知, 广州群体特有单倍型形成的进化网络关系图独立于皮口、绥中和青岛单倍型形成的进化

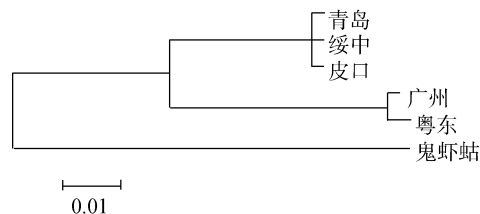


图 1 基于 *COI* 基因序列构建的 NJ 系统进化树

Fig. 1 Neighbor-joining tree based on *COI* gene sequences

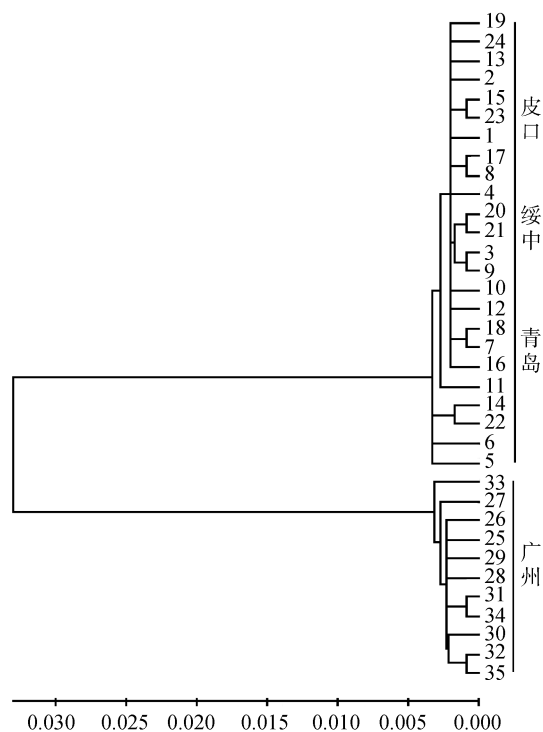


图 2 35 个口虾蛄单倍型的 NJ 系统进化树

Fig. 2 Neighbor-joining tree of 35 *O. oratoria* haplotypes

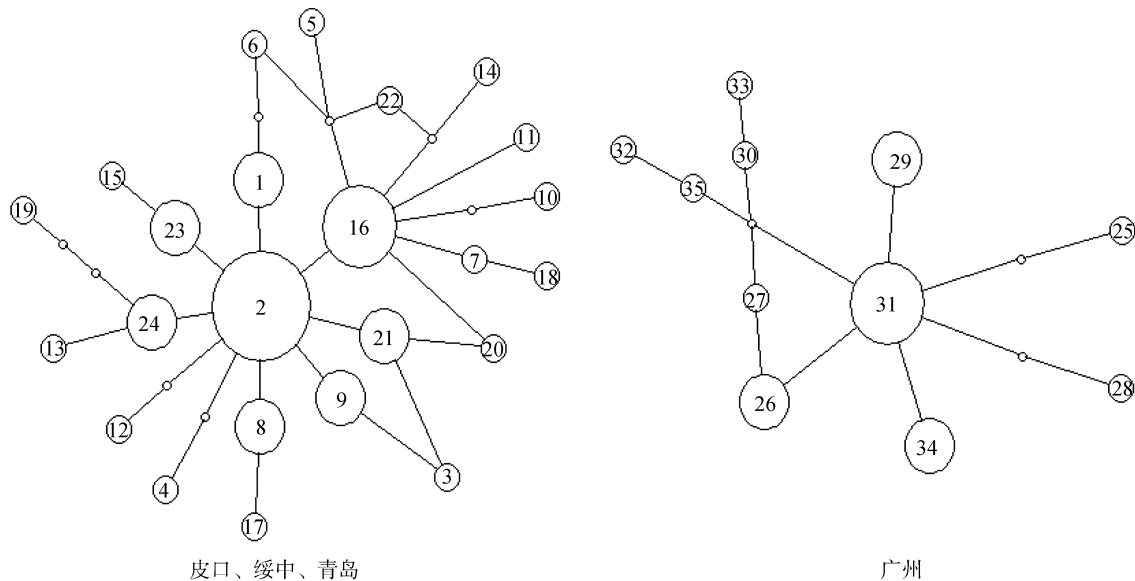


图3 口虾蛄群体所有单倍型进化网络关系图

Fig. 3 Haplotype network from all haplotypes based on *COI* sequence of *O. oratoria*

网络图之外,形成了明显的地理谱系结构,广州单倍型与其他3个群体单倍型遗传分化明显。

图3显示,在皮口、绥中和青岛单倍型形成的进化网络关系图中, Hap2 是最主要最原始的单倍型, Hap1、Hap8、Hap9、Hap16、Hap21、Hap23 和 Hap24 是由其直接拓展而出,呈星状辐射分布,其他单倍型由以上7个单倍型间接拓展出来,其中由 Hap16 拓展出的单倍型数最多,皮口、绥中和青岛单倍型没有明显的分化,24个单倍型以相互交错的形式聚合在一起。在广州特有单倍型形成的进化网络关系图中, Hap31 是最原始的单倍型, Hap26、Hap29 和 Hap34 以一步突变与其连接在一起,其他单倍型从以上3个单倍型间接拓展出来,其中 Hap26、Hap27、Hap30 和 Hap33 聚合成一组,显示出较近的亲缘关系。

3 讨论与结论

本实验所研究的口虾蛄100条 *COI* 同源序列中, A、G、C、T 的平均含量为 28.2%、17.6%、17.6%、36.6%, 这与江苏连云港与盐城海域(A=27.6%、G=17.7%、C=17.6%、T=37.1%)^[10]、粤东海域(A=27.1%、G=18.9%、C=17.6%、T=36.4%)^[13]、渤海湾葫芦岛海域(A=27.8%、G=17.9%、C=17.6%、T=36.8%)^[11]、黄海海域(A=27.5%、G=17.8%、C=17.6%、T=37.1%)^[9] 所研究的口虾蛄平均碱基组成相当,说明口虾蛄 *COI* 序列具有相似的组成特点。A+T 含量(64.8%)明显高于 G+C 含量(35.2%),该结果与许多研究者在农

田金龟子、虾类、蟹类等 *COI* 中观察到的结果相似^[23-25], AT 含量高是节肢动物线粒体 DNA 碱基组成中普遍存在的现象。本研究中,转换与颠换的平均比值是 7.84,转换高于颠换,说明4个群体中口虾蛄 *COI* 序列替换未达到饱和。一般在 mtDNA 序列的变异中,转换较易在近亲种间频繁发生,而颠换则发生在远缘种间,在同物种内部,转换高于颠换^[26]。

遗传多样性参数是衡量群体遗传多样性程度的重要指标之一。根据线粒体基因序列的单倍型多样性(*Hd*)和核苷酸多样性(π),将海洋生物的遗传多样性分为4种类型:低 *Hd*(<0.5)和低 π ($<0.5\%$),高 *Hd*(>0.5)和低 π ($<0.5\%$),低 *Hd*(<0.5)和高 π ($>0.5\%$),高 *Hd*(>0.5)和高 π ($>0.5\%$)^[27]。本研究中4个群体的遗传多样性均表现出高的单倍型多样性和低的核苷酸多样性的特点,因此属于第二种类型,说明4个海域口虾蛄群体的遗传多样性均处于中等水平。广州海域口虾蛄群体的单倍型多样性和核苷酸多样性均为最高,可知广州海域口虾蛄的遗传多样性最高。近年来,虽然中国近海口虾蛄的捕捞量有所下降,但其现存资源量仍很高^[28],因此,尽管口虾蛄资源处于过度捕捞的状态,然而大的资源量仍维持了口虾蛄中等水平的遗传多样性。群体这种高的单倍型多样性和低的核苷酸多样性的特点,表明物种经历了一个由较小的有效种群在近期快速增长为一个大的种群的过程^[27]。本研究中的4个口虾蛄群体的平均核苷酸多样性($\pi=0.0203$)明显高于粤东海域^[13]($\pi=$

0.00755)、渤海湾^[12]($\pi=0.00485$)和黄海海域^[9]($\pi=0.00512$)的口虾蛄群体,整体单倍型多样性与以上海域研究结果相当,是由于本研究中的口虾蛄样本来自中国的黄海(皮口和青岛)、渤海(绥中)和南海(广州)3大海域,取样范围较以往研究都大,因此口虾蛄的核苷酸多态性高。

遗传距离是评价种群遗传变异差异水平的另一重要指标。根据 MEGA4.0 计算的遗传距离分析,皮口和绥中海域口虾蛄的遗传距离最近(0.00357),广州和绥中海域口虾蛄的遗传距离最远(0.04574)。研究认为,遗传距离在 0.01 以上的,表示群体的遗传变异较大^[29],广州与其他 3 个群体间的遗传差异值均显著大于 0.01,反映了广州群体较大的遗传变异水平,这可能是由于广州口虾蛄栖息地保护较好,没有遭到人为破坏,种群发展比较稳定,积累的变异较多,因此遗传变异水平较高;皮口、绥中、青岛群体间的遗传距离均小于 0.01,表明 3 个群体的遗传差异较小,3 个海域口虾蛄之间有着频繁的基因交流,这可能是由于口虾蛄为广温、广盐性生态类群,其生活水温为 6~31℃,适盐范围为 12~35,其生存空间范围大,可以在栖息地渔场及邻近大部分海域移动生存^[28]。

群体的 NJ 进化树显示,皮口、绥中和青岛 3 个群体聚为一支,广州与粤东(深圳和汕尾)群体聚为另一支。5 个群体的系统发育关系在一定程度上是由群体的地理位置分布情况决定的,广州在地理位置上与粤东的深圳和汕尾相近,而与皮口、绥中、青岛 3 个海域相距甚远,这与本实验构建的 NJ 进化树结果相一致,展现了广州群体与其他 3 个群体间较远的亲缘关系。从单倍型进化树上也可以看出皮口、绥中和青岛 3 个群体的单倍型嵌套聚集形成一支,没有形成明显的地理分化格局,而广州群体特有单倍型独立形成另一支,说明广州群体与其他 3 个群体间具有显著的遗传分化。口虾蛄群体所有单倍型形成的进化网络关系图也显示出广州群体与皮口、绥中和青岛 3 个海域的口虾蛄群体间大的遗传分化,结果与单倍型的 NJ 系统发育树一致。

在线粒体基因组序列中,受选择压力的不同而导致各个区域进化速率的不同。如 D-Loop 由于不编码蛋白质受到的选择压力少,所以进化速度较快,比较适用于群体遗传学及近缘种间的分析研究^[30]。16S rRNA、12S rRNA 及 CO 氧化酶亚单位等适用于种属间至科以下分类阶元的探讨^[31-32]。COI 与 Cytb

进化速率适中,适合种群水平差异的研究^[33]。

基于对口虾蛄线粒体 COI 序列的检测,了解口虾蛄的遗传多样性后,有助于对其野生资源制定具体的科学的保护措施。本研究获得的遗传多样性较好的广州种群,遗传多样性相对较低的皮口、绥中和青岛种群,为以后口虾蛄的科学育苗、野生种质资源保护和合理开发利用提供了新的依据。作者测定的口虾蛄 COI 序列丰富了 GenBank 报道的同种同源序列,提供了更多可供研究的基因片段。今后,可再进行 COI 作为 DNA 条形码对口虾蛄科进行物种识别的可行性的探讨^[34]。

参考文献:

- [1] 堵南山. 甲壳动物学[M]. 北京: 科学出版社, 1993.
- [2] 李涛, 张秀梅, 张沛东, 等. 山东半岛南部近岸海域渔业资源群落结构的季节变化[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2011, 41(1): 41-50.
- [3] 盛福利, 曾晓起, 薛莹. 青岛近海口虾蛄的繁殖及摄食习性研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2009, 39(S1): 326-332.
- [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, 梅文骧. 口虾蛄的生物学基本特征[J]. 浙江水产学院学报, 1995, 15(1): 60-62.
- [6] 王春琳, 母昌考, 丁爱侠, 等. 口虾蛄同工酶的组织特异性及生化遗传分析[J]. 海洋与湖沼, 2004, 35(3): 258-263.
- [7] 蒋霞敏, 王春琳, 赵青松, 等. 虾蛄的人工养殖技术研究[J]. 东海海洋, 1999, 17(2): 47-50.
- [8] Zhang D Z, Ding G, Ge B M, et al. Development and characterization of microsatellite loci of *Oratosquilla oratoria* (Crustacea: Squillidae)[J]. Conservation Genetics Resources, 2012, 4(1): 147-150.
- [9] 张代臻, 丁鸽, 周婷婷, 等. 黄海海域口虾蛄种群的遗传多样性[J]. 动物学杂志, 2013, 2: 012.
- [10] 张代臻, 丁鸽, 彭旭, 等. 江苏连云港与盐城海域口虾蛄种群的遗传多样性[J]. 四川动物, 2013, 1: 29-34.
- [11] 张代臻, 丁鸽, 张华彬, 等. 渤海湾葫芦岛海域口虾蛄 mt COI 基因序列多态性研究[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(3): 55-57.
- [12] 张代臻, 丁鸽, 张华彬, 等. 渤海湾口虾蛄线粒体

- COI* 基因的遗传多样性研究[J]. 南京师大学报(自然科学版), 2010, 33(4): 80-83.
- [13] 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.
- [14] John S S, Smith W L. Phylogeny and biogeography of the Malagasy and Australasian rainbowfishes (Teleostei: Melanotaeniidae): Gondwanan vicariance and evolution in freshwater[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2004, 33(3): 719-734.
- [15] 郭鹏, 张服基. 亚洲蝮亚科蛇属间系统发生支序分析(蛇亚目: 蝮科)[J]. 生命科学研究, 2000, 4(3): 262-266.
- [16] 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.
- [17] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [18] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425.
- [19] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap[J]. Evolution, 1985, 39(4): 783-791.
- [20] 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.
- [21] Weir B S, Cockerham C C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure[J]. Evolution, 1984, 38: 1358-1370.
- [22] Clement M, Posada D, Crandall K A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies[J]. Molecular Ecology, 2000, 9(10): 1657-1659.
- [23] 孙娜, 郭晓华, 刘广纯. 金龟子部分种类 *COI* 基因序列比较分析[J]. 沈阳农业大学学报, 2009, 40(6): 688-692.
- [24] Zhang Q Y, Cheng Q Q, Guan W B. Mitochondrial *COI* gene sequence variation and taxonomic status of three macrobrachium species[J]. Zoological Research, 2009, 30(6): 613-619.
- [25] Chow S, Suzuki N, Imai H, et al. Molecular species identification of spiny lobster phyllosoma larvae of the genus *Panulirus* from the northwestern Pacific[J]. Marine Biotechnology, 2006, 8(3): 260-267.
- [26] Thomas D, Kocher W, Thomas K, et al. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1989, 86(16): 6196-6200.
- [27] Grant W A S, Bowen B W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation[J]. Journal of Heredity, 1998, 89(5): 415-426.
- [28] 俞存根, 陈全震, 陈小庆, 等. 舟山渔场及邻近海域虾蛄类的种类组成和数量分布[J]. 大连海洋大学学报, 2011, 26(2): 153-156.
- [29] Posada D, Crandall K A. Selecting the best-fit model of nucleotide substitution[J]. Systematic Biology, 2001, 50(4): 580-601.
- [30] 胡文革, 段子渊, 王金富, 等. 新疆 3 种雅罗鱼线粒体 DNA 控制区序列的差异和系统进化关系[J]. 遗传学报, 2004, 31(9): 970-975.
- [31] Apostolidis A P, Mamuris Z, Triantaphyllidis C. Phylogenetic relationships among four species of Mullidae (Perciformes) inferred from DNA sequences of mitochondrial cytochrome b and 16S *rRNA* genes[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2001, 29(9): 901-909.
- [32] Thacker C E. Molecular phylogeny of the gobioid fishes (Teleostei: Perciformes: Gobiidae)[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2003, 26(3): 354-368.
- [33] 肖志忠, 肖永双, 马道远, 等. 基于线粒体 DNA 部分片段探讨条石鲷与斑石鲷的亲缘关系[J]. 海洋学报, 2011, 33(5): 115-123.
- [34] Hebert P D, Cywinska A, Ball S L. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 2003, 270(1512): 313-321.

Genetic diversity of *Oratosquilla oratoria* from four sea waters based on the mitochondrial *COI* gene sequences analysis

DONG Xin, XING Kun, SUI You-zhen, LIU Hai-ying

(College of Marine Science and Environment, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

Received: Apr., 12, 2014

Key words: *Oratosquilla oratoria*; *COI* gene; genetic diversity; phylogeny

Abstract: *Oratosquilla oratoria* is an important economic species in coastal areas of China and has high nutritional value. This paper analyzes and summarizes the hereditary feature of *O.oratoria* from different sea waters by a comparative study. Four populations of *O.oratoria* were collected from Pikou, Suizhong, Qingdao and Guangzhou sea waters of China. The genetic diversity and phylogenetic relationship were analyzed by amplifying and sequencing the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (*COI*) gene of *O.oratoria*. A total of 54 variable sites (9.2%) and 35 haplotypes were detected in 585 bp sites for 100 *COI* sequences. *COI* sequences were analyzed and the results indicated that the A+T content (64.8%) was higher than that of C+G (35.2%), corresponding with the characteristics of Arthropods's mitochondrial *COI* gene. The ratio of TV and TS was 7.84, indicating that the base substitution of *COI* gene was not saturated in *O.oratoria*. The average values of haplotype and nucleotide diversity were 0.9616 and 0.02027. The results of haplotype and nucleotide diversity analysis in four different populations of *O.oratoria* showed a middle genetic diversity, but the genetic diversity level of Guangzhou was the highest. AMOVA analysis showed that the genetic difference among populations (84.53%) was significantly higher than that within populations (15.47%). The fix index (F_{st}) across all populations revealed that there were no genetic differentiations among Pikou, Suizhong and Qingdao sea waters ($F_{st}<0$), but Guangzhou had a high level. Nineteen homologous sequences of *O.oratoria* of the eastern coast of Guangdong province were downloaded from GenBank, together with the sequences obtained in this study, a neighbor-joining tree was constructed. The results revealed that the five populations could be divided into two groups, one group included Pikou, Suizhong and Qingdao populations and the other group included Guangzhou and the east coast of Guangdong province. The haplotype phylogenetic tree and haplotype network from all haplotypes was constructed which all revealed the big genetic differentiation of *O.oratoria* in Guangzhou seawaters. The genetic variation and the genetic structure of four *O.oratoria* populations were analyzed. These results could provide a molecular biology basis for protection and reasonable utilization of germplasm resources of *O.oratoria* in the coastal areas of China.

(本文编辑: 谭雪静)