

西施舌 3 个群体 H2A 基因和 *nad6-nad1* 片段序列比较研究

朱明, 申欣, 朱笑琳, 屠海森, 杨婕, 孟学平

(淮海工学院 海洋学院, 江苏省海洋生物产业技术协同创新中心, 江苏 连云港 222005)

摘要: 西施舌(*Coelomacra antiquata*)浮游幼虫 EST 序列拼接获得组蛋白 H2A ORF 及其两翼的非编码区, 在 ORF 两翼设计引物 Can-H2AF 和 Can-H2AR, 扩增 H2A 基因片段; 从 *nad6* 3'端和 *nad1* 5'端设计引物, 扩增两基因区域 DNA 序列, 测序并进行核苷酸序列差异分析, 研究漳州西施舌分化水平。结果: 共获得西施舌 3 个群体 H2A 基因 606bp 或 616bp 基因区 DNA 片段 23 条, 检测到 9 种基因型(Gen)。西施舌漳州群体 H2A 基因 AT 含量(51.51%)高于日照、北海群体 AT 含量(50.58%); 序列比对分析显示, 简约信息位点占 4.05%。基于 H2A 基因的漳州群体与日照/北海混合群体间遗传距离平均为 0.044, 漳州群体, 混合群体内遗传距离分别为 0.003 和 0.004, 群体间与群体内遗传距离之比为 11~14.7; AMOVA 分析结果显示, 漳州群体和混合群体间发生了极显著遗传分化($F_{ST}=0.937, P<0.01$)。从 *nad6-nad1* 片段中共检出 7 种单倍型(Hap), 漳州群体与日照群体无共享单倍型, 基于 *nad6-nad1* 的漳州群体与日照群体间遗传距离为 0.199~0.202, 群体间与群体内遗传距离之比 50~66, 两个群体间 *nad1* 多肽链一级结构存在极大差异, 有 9 个位点的氨基酸不同, 日照西施舌缺失 6 个氨基酸。线粒体 DNA 显示西施舌漳州与日照群体发生了明显的遗传分化。

关键词: 西施舌(*Coelomacra antiquata*); 组蛋白 H2A 基因; *nad6-nad1* 区域; 遗传分化

中图分类号: Q959 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2015)09-0026-07

doi: 10.11759/hyhx20130803001

基于形态学^[1-2]和同功酶^[1]资料、扩增片段长度多态性(AFLP)和 16S rRNA 基因^[3]、内转录间隔区 1(ITS1)^[4]、细胞色素 c 氧化酶亚基 1 基因(*cox1*)^[5]、细胞色素 b 基因(*cob*)^[6]等核 DNA 和线粒体 DNA 资料分析显示, 中国黄、渤海西施舌(即墨、胶南、日照、连云港和启东)以及南方的广西北海群体与福建群体(长乐、漳州)发生了高水平的遗传分化^[1]。作者用比较线粒体基因组学的资料^[7]从全基因组结构差异角度揭示漳州西施舌发生了明显的分化, RAPD 分析也认为福建(长乐)群体发生了明显的分化^[8], 福建群体可能是西施舌的一个亚种或是腔蛤蜊属的新种。上述资料为西施舌群体遗传分化提供了有力的形态学与分子生物学证据, 但是根据现有资料确定福建西施舌是西施舌的亚种或是隐种, 证据尚显不足, 还需更多的资料证实。

组蛋白是真核生物染色质的基本单位—核小体的重要结构成份, 也是基因表达调控的重要成份^[9-10], 特别是与核小体的组蛋白变体与基因转录、DNA 复制和染色体的异染色化有关^[11]。组蛋白 H2A 家族的成员之一 H2AX 与 DNA 损伤修复、基因组稳定性维持及肿瘤抑制有关^[12-13], 组蛋白还有抗菌作用^[14]。后生

动物组蛋白基因为多拷贝, 如海胆基因组有 2 套编码无多腺苷酸尾 mRNA 的组蛋白基因, 其中编码核心组蛋白的基因有 34 个, 分散存在于基因组的不同位置, 还有编码组蛋白变体的基因^[15]。组蛋白基因很保守, 如亲缘关系较远的后生动物海胆组织的 H3 与小牛胸腺 H3 序列只差 1 个氨基酸, 小牛胸腺 H3 与豌豆 H3 只有 4 个氨基酸不同。组蛋白中 H2A 的保守性为中度, 若福建西施舌与其他群体 H2A 仍然存在明显的差异, 则能补充说明上述分子生物学资料证据, 因此, 基于组蛋白核苷酸的西施舌群体遗传差异分析资料显得尤为重要。NADH 脱氢酶亚基 6 基因(*nad6*)和亚基 1(*nad1*)基因间有 2 个 tRNA 基因和 1 个非编码区^[7], 因此, 在 *nad6* 的 5'端和 *nad1* 的 3'端

收稿日期: 2014-12-16 修回日期: 2015-02-19

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK20131210); 国家自然科学基金项目(40906067); 连云港科技局国际科技合作项目(GH1204); 江苏省“青蓝工程”人才基金项目(苏教师[2010]27号); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD); 江苏省科技厅前瞻性研究项目(BE2014335); 江苏省农业自主创新资金项目(CX(13)2041)

作者简介: 朱明(1967-), 男, 江苏泗阳人, 硕士, 副教授, 主要从事海洋生物学研究, E-mail: zhuming2382@163.com; 孟学平, 通信作者, E-mail: mxp2002@hotmail.com

设计引物扩增的片段(*nad6~nad1*)包括 *nad6* 3'、*nad1* 5'端部分序列, *tRNA^{Gln}* 和 *tRNA^{Thr}* 2 个 tRNAs 基因序列及其之间的非编码区(约 100bp), *nad6~nad1* 区域能够同时反映蛋白质编码基因、tRNA 基因和非编码区核苷酸差异, 可提供有效的群体差异分析资料。核基因组 DNA 和线粒体 DNA 资料相互印证, 分析结果更有说服力。

1 材料和方法

1.1 实验材料

本研究用西施舌(*Coelomactra antiquata*)采自山东日照、福建漳州、广西北海沿海。取西施舌斧足肌肉酒精固定 4℃ 保存备用。

1.2 DNA 提取

取乙醇保存西施舌组织浸出乙醇或新鲜组织研碎, 用 SDS-蛋白酶 K 裂解组织, 酚-氯仿抽提蛋白质, 乙醇沉淀 DNA。详细步骤参考文献[4]操作, 个别步骤稍作修改。

1.3 H2A 区和 *nad6~nad1* 片段扩增及序列测定

用 SeqMan 软件对作者已经测定的西施舌浮游幼虫表达序列标签(ESTs)进行拼接, 获得含有组蛋白 H2A 编码区的 DNA 序列, 用 Primer-BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)在线从编码区两翼的非编码区设计上下游引物, 引物名称及序列如下: HP83-F: GAA AGT CCC TGC CGA ACA; HP83-R: GAA GCA CAC TCG CAC ACC T; PCR 退火温度为 52℃, 25μL 体系, 延伸时间 40 s, 35 个循环。根据西施舌^[16-17]、四角蛤蜊^[7]和中国蛤蜊(作者测序未登录)*nad6* 3'端和 *nad1* 5'端分别设计扩增 *nad6~nad1* 片段上下游引物 YJ-4clam-na6-F: GCY GCT GCK CGY ATD TGT AG 和 YJ-4clam-nd1-R: TGY GCA ATA GCA CGY ATA GC。扩增条件: 退火温度 54℃, 延伸时间 45 s。PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测后送生工生物工程(上海)有限公司双向测序。

1.4 DNA 序列生物信息学分析

双向测序结果用 DNASTar 软件包中的 SeqMan 拼接, 结合测序峰图对序列进行人工校对。用 ClustalX (1.83)对序列进行比对并取齐, 用 SPSS 17.0 进行碱基含量差异显著性分析; 用 DnaSP v5.1 软件

进行基因型或单倍型确定; 用 MEGA4.0 进行核苷酸序列差异分析: 统计变异位点、简约信息位点, 根据 Kimura 2-parameter(K-2P)计算遗传距离; 用 Arlequin v3.1 进行分子方差分析(AMOVA), 群体间遗传分化指数(F_{ST})计算采用 pairwise difference 模型。

2 结果

2.1 H2A 基因区核苷酸序列基本信息

本研究共获得西施舌日照(RZ, 10 个样本)、北海(BH, 7 个样本)和漳州(ZZ, 6 个样本)3 个群体 H2A 基因区(包括 H2A 编码基因和基因两翼的非编码区)序列 23 条, 去除两端不可信序列后所得序列长度为 606bp(RZ, BH)或 616bp(ZZ), 同源序列存在长度多态性; 经 DnaSPv5 对 23 条序列分析共获得 9 种基因型(Gen), 其中, Gen1~3、Gen 5 由日照和北海群体共享, Gen 4 为日照群体独享, 北海群体无独享单倍型, 说明日照、北海西施舌存在基因交流。Gen6-9 为漳州群体独享, 西施舌漳州群体与其他 2 个群体无交叉共享基因型, 无基因交流; Gen 1~5 (RZ, BH)碱基平均含量(%)分别为 T: 23.0、C: 26.2、A: 27.5、G: 23.3, Gen 6~9(ZZ)碱基平均含量(%)分别为 T: 23.3、C: 26.0、A: 28.2、G: 22.5, 前者的 AT 含量(%)为 50.6, 后者的为 51.5, 碱基含量存在差异。

2.2 H2A 基因序列比对分析

将 H2A 基因区片段 23 个序列进行比对分析, 共获得 616 个比对位点(图 1), 其中变异位点(V)30 个, 占比对位点的 4.86%, 简约信息位点(Pi)25 个, 占 4.05%。日照、北海群体合并为一组计算, 组内 V 位点 4 个, Pi 位点 1 个, 漳州群体内 V 位点 5 个, 无 Pi 位点; 在 616 个比对位点中, H2A 开放阅读框(ORF)(375bp)相对保守, 只有 6 个变异位点, 占变异位点的 20%(此区在图 1 中只列出一部分), 其中有 3 个位点为漳州群体共享单核苷酸突变位点, 变异发生在密码子的第 3 位, 未引起氨基酸组成的改变; 两翼分别是基因上游和下游非编码区, 其中 1~106 位点为上游非编码区, 漳州群体在此区 10~19 位点有一段 10 碱基(CCCGCTGATC)的插入序列(图 1 左侧虚框所示), 在 56~96 位点区有一碱基高变区(图 1 右侧虚框所示); 482~616 位点为下游非编码区, 此区漳州群体有 7 个共享单核苷酸变异位点。序列比对发现, H2A 基因 ORF 的上游变异较大, 有插入序列和高变区, 而 ORF 的下游变异相对小, 但 ZZ 群体 ORF 上、下游序列中均有标

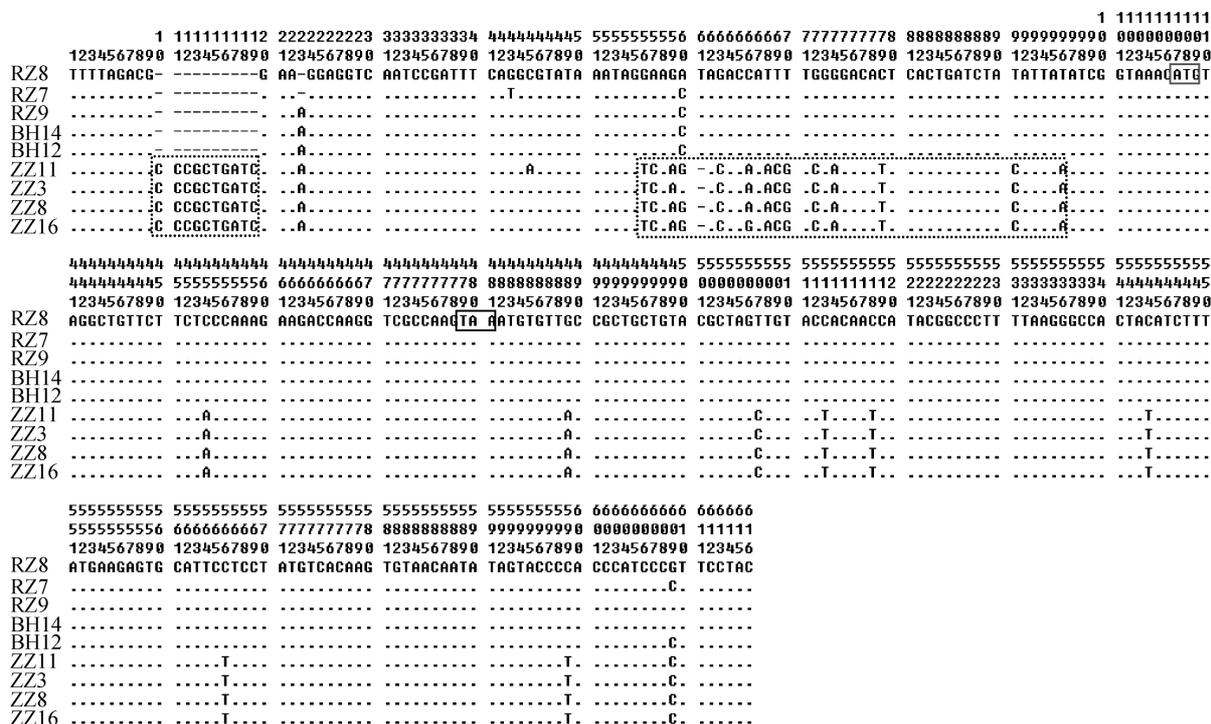


图 1 西施舌 H2A 基因区两翼部分序列比对

Fig.1 Flanking sequences comparison of H2A gene of *Coelomactra antiquata*

ZZ、RZ 和 BH 分别为漳州、日照、北海群体；虚框中是基因上游区高变区；实框中是起始终止密码

ZZ, RZ and BH were the Populations of Zhangzhou, Rizhao and Beihai gridlines are variable region of the upstream region of gene, real box is start stop codon

志性的变异位点，可作为 ZZ 群体的分子标记。

H2A 基因区基因型序列比对显示，在 30 个变异位点中，西施舌漳州群体有 23 个共享变异位点，其中在基因区有 3 个共享变异位点，两翼序列中有 20 个。日照、北海西施舌有 26 个共享变异位点(图 2)，漳州西施舌与日照、北海西施舌无共享变异位点，说明无基因交流。

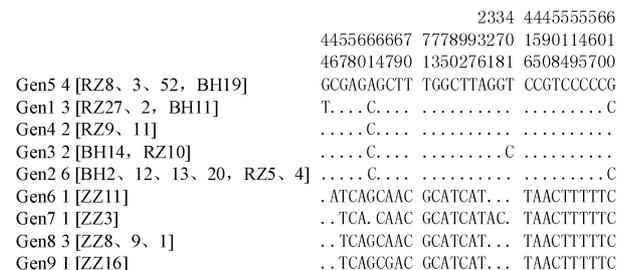


图 2 西施舌 H2A 基因型序列比对

Fig.2 H2A genotype sequence comparison of *Coelomactra antiquata*

Gen. 基因型; RZ、BH 和 ZZ 分别为日照、北海、漳州群体，其后的数字为样本编号

Gen. Genotype; RZ, BH and ZZ were the groups of Rizhao, Beihai and Zhangzhou and the number of the samples was the sample code

2.3 基于 H2A 基因区的遗传距离

根据基因型核苷酸序列，用 Clustalx 软件比对后，用 MEGA 软件计算遗传距离(K-2P) (表 1)，将漳州群体分为一组，日照、北海群体分为另一组(混合组)。结果显示，混合组组内遗传距离 0.002~0.005，平均为 0.003，漳州组组内遗传距离为 0.002~0.007，平均为 0.004，混合组与漳州组间的遗传距离为 0.041~0.048，平均为 0.044。组间遗传距离与组内(漳州组)遗传距离之比为 11。分子方差分析(AMOVA)显示两组间的 $F_{ST} = 0.9370 (P < 0.01)$ ，说明两群体间发生了极显著的遗传分化。

2.4 西施舌漳州、日照群体 nad6~nad1 片段差异分析

PCR 扩增产物经双向测序获得 710bp 左右的 nad6~nad1 片段，将全部序列经 Clustalx 取齐后得到 547 个比对位点，从 2 个群体中共获得 20 条 nad6~nad1 序列(每个群体 10 个样本)，核苷酸含量统计显示 RZ 群体 T、C、A、G 含量分别为 40.5%、10.5%、27.5%、21.5%，A+T 平均含量为 68%，明显高于 C+G

表 1 基于西施舌 H2A 基因区核苷到序列的遗传距离

Tab.1 Genetic distances based on H2A gene region nucleotide sequence of *Coelomacra antiquata*

群体	单倍型	Gen 5	Gen 1	Gen 4	Gen 3	Gen 2	Gen 6	Gen 7	Gen 8
日照	Gen5								
	Gen 1	0.005							
北海	Gen 4 *	0.002	0.003						
	Gen 3	0.003	0.005	0.002					
漳州	Gen 2	0.003	0.002	0.002	0.003				
	Gen 6	0.044	0.044	0.044	0.046	0.043			
	Gen 7	0.044	0.046	0.046	0.048	0.044	0.007		
群体	Gen 8	0.043	0.043	0.043	0.044	0.041	0.002	0.005	
	Gen 9	0.043	0.043	0.043	0.044	0.041	0.003	0.007	0.002

Gen: 基因型, *: 日照群体独享; Gen 1~3, Gen 5: 日照群体共享; Gen 6~9: 漳州群体共享

含量。ZZ 群体 T、C、A、G 含量分别为 38.5%、11.0%、28.1%、22.4%，A+T 平均含量为 66.6%。2 个群体中的 T、G 含量存在显著差异($P < 0.01$)，RZ 群体 T 显著高于 ZZ 群体，而 G 显著低于 ZZ 群体。

对 *nad6~nad1* 片段的核苷酸序列检测获得 7 种单倍型(hap)，其中漳州西施舌 10 个个体有 2 种单倍型(hap1, hap2)，RZ 群体 10 个个体有 5 种单倍型(hap3~hap7)，漳州群体与日照群体无交叉共享单倍型；对 7 种单倍型进行序列比对显示，变异位点占比对位点的 16.5%(图 3)，简约信息位点占 15.7%。2 群体间的遗传距离(K-2P)0.199~0.202，平均为 0.200，群体内平均遗传距离分别为 0.003(RZ)和 0.004(ZZ)，群体间与群体内遗传距离之比为 50~66。

nad6 和 *nad1* 之间有 *tRNA^{Gln}* 和 *tRNA^{Thr}* 2 个 tRNA 基因和 tRNAs 基因间非编码区。用于比对的序列 5' 端 *nad6* 部分因质量差全部被切除，*tRNA^{Gln}* 5' 端部分被切除，3' 端只剩下 9 个碱基，其后依次是 96bp 的非编码区(NCR96)，*tRNA^{Thr}*、4bp 的非编码区和最后的 368bp 的 *nad1* 区域(图 3)。图 3 显示在 NCR96(96 个位点)区，漳州、日照群体有 4 处碱基缺失/插入，且在 *tRNA^{Thr}*、*nad1* 编码区均有碱基缺失和插入序列，两个群体 *nad6~nad1* 片段的一级结构存在极大的差异，包括单核苷酸的高频率突变与碱基的缺失和插入(图 3)。将此 *nad1* 片段翻译成氨基酸序列，序列比对发现在 N-端前 20 个氨基酸变异很大(图 4)，此区日照西施舌 *nad1* 缺失“QILWVQ”6 个氨基酸，且在第 3、6、13、14、16、17、20、25、113 位等 9 个座位的氨基酸不同。

3 讨论

本研究结果显，H2A 基因型 Gen1~3, Gen5 为北海群体和日照群体所共享，而北海群体与漳州群体发生了明显的遗传分化，这种现象不符合地理距离

产生遗传分化的理论。说明在进化历史过程中，西施舌日照、北海群体有基因交流发生。日照与北海的地理距离很远，通过海洋进行的基因交流几率很小，基因交流由人为生成的可能性相对大，其确切原因有待进一步研究。然而基因型 Gen6~9 为漳州西施舌特有，与日照、北海西施舌无共享现象，只有 Gen8 为漳州西施舌 3 个不同个体共享。这说明漳州西施舌与日照、北海西施舌无基因交流。*nad6~nad1* 序列分析也显示漳州群体和日照群体无交叉共享单倍型，从线粒体基因角度证实演化历史上这 2 个群体间无基因交流，已经发生了遗传分化。

关于福建(长乐、漳州)西施舌遗传分化的研究已有报道，*cox1* 分析显示福建(长乐、漳州，称为 DH 组)西施舌与黄、渤海、北部湾(称为 BH 组)西施舌间的遗传距离为 0.0837，而 DH 组和 BH 组组内遗传距离分别为 0.0047 和 0.0035，组间与组内遗传距离之比为 17.8 和 23.5^[5]。基于 *cox1* 钵水母纲 13 个属属内种间遗传距离(K-2P)在 0.056~0.381，种内平均遗传距离为 0.013，种间与种内遗传距离之比为 4.3~29.3^[18]，西施舌 DH 与 BH 组间与组内遗传距离之比在此范围内；*cob* 分析显示长乐西施舌与非长乐西施舌(大连、启东、北海群体)间的遗传距离为 0.191~0.209，而长乐群体和非长乐群体内平均遗传距离为 0.010，群体间与群体内遗传距离之比为 19.1~20.9 倍^[6]；16S rRNA 分析显示长乐群体与非长乐群体(辽宁大连、山东即墨、胶南、日照、连云港、启东、广西)间的遗传距离平均为 0.081，群体内的遗传距离为 0.007，两者之比为 11.6^[19]，上述研究显示长乐群体与非长乐群体间遗传距离之比均大于 11.6；ITS1 分析显示长乐群体与非长乐群体间的平均遗传距离为 0.0329，群体内遗传距离平均为 0.0088，群体间与群体内遗传距离之比为 3.7^[4]；ITS2 分析显示长乐群体非长乐群体间遗传距离平均为 0.029，群

但有规律可循, ITS1 和 ITS2 群体间与群体内遗传距离之比值在 2.4~4.2, 不大于 5, 而线粒体基因组此值大于 10, 这达到了“10×”规则的标准^[20-21], 说明福建(长乐、漳州)与其他群体西施舌发生了明显的分化。特别是来自组蛋白基因两翼序列的证据证明, 漳州西施舌发生了明显的分化。组蛋白 H2A 基因在核心组蛋白中属中度保守, 但在漳州和非漳州西施舌群体中相对保守, 只有 3 个漳州群体特征性核苷酸突变位点, 但通过这 3 个位点的碱基可识别漳州西施舌。H2A 基因的两侧非编码区突变率高, 在群体分子遗传学研究中具有重要意义, 特别是组蛋白 H2A 编码区上游-77 至-86 位的插入序列和-11 至-50 区的高变区可以作为漳州西施舌明显的分子标记(图 1 方框), 在群体鉴别中具有重要意义。

本研究扩增了 *nad6* 和 *nad1* 基因之间的核苷酸序列, 用来比对的 DNA 序列包括 *trnQ*(9bp)部分序列、2 个非编码区(96bp+4bp)、*trnT*(63bp)全序列和 *nad1*(371bp)部分序列(图 3), 此 DNA 片段的总碱基数虽不多, 但所包涵的信息却很丰富, 这些信息显示西施舌日照、漳州群体这个区域核苷酸差异极为明显, 2 个群体的 7 种单倍型有 90 个变异位点, 2 个群体 *nad1* 编码的氨基酸有 6 个位点不同, 可见此区域是区分日照、漳州西施舌的更加有效的分子标记。而漳州西施舌共享变异位点 84 个, 占变异位点的 93.3%。本研究结果为西施舌的系统演化研究提供了来自核基因组和线粒体基因组的重要参考。

参考文献:

- [1] Kong L F, Li Q, Qiu Z X. Genetic and morphological differentiation in the clam *Coelomacra antiquata* (Bivalvia: Veneroida) along the coast of China [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2007, 343 (1): 110-117.
- [2] 刘德经, 朱善央. 福建与江苏西施舌群体形态差异研究[J]. *南方水产*, 2010, 6 (2): 29-34.
- [3] Kong L F, Li Q. Genetic comparison of cultured and wild populations of the clam *Coelomacra antiquata* (Spengler) in China using AFLP markers[J]. *Aquaculture*, 2007, 271: 152-161.
- [4] 孟学平, 高如承, 申欣, 等. 西施舌 5 个地理群体 ITS1 序列变异及系统发生分析[J]. *生态学报*, 2010, 30 (20): 5555-5561.
- [5] 孟学平, 高如承, 申欣, 等. 基于 COI 的中国西施舌 DNA 条形码[J]. *水产科学*, 2011, 30 (10): 626-630.
- [6] 孟学平, 申欣, 张波, 等. 西施舌 Cytb 基因核苷酸差异分析[J]. *水产科学*, 2010, 29 (9): 537-542.
- [7] Meng X P, Shen X, Zhao N N, et al. The complete mitochondrial genome of the clam *Macraa veneriformis* (Bivalvia: Mactridae): Has a unique non-coding region, missing atp8 and typical tRNA^{Ser}[J]. *Mitochondrial DNA*, 2013, 24(6): 613-615.
- [8] 孟学平, 王帅, 高如承, 等. 西施舌群体遗传结构及分化的 RAPD 分析[J]. *海洋科学*, 2011, 35 (2): 6-9.
- [9] 陈伟, 罗辽复. 基于组蛋白甲基化信息的 H2A.Z 和 H2A 核小体识别[J]. *生物物理学报*, 2009, 25 (4): 269-274.
- [10] Marzluff W F, Duronio R J. Histone mRNA expression: multiple levels of cell cycle regulation and important developmental consequences[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2002, 14(6): 692-699.
- [11] 张琼. 蜘蛛组蛋白 H3 基因保守序列的克隆与进化分析[D]. 武汉: 湖北大学, 2006.
- [12] 倪冠英, 何淑梅, 董娟聪, 等. 电离辐射对 Jurkat 细胞 γ -H2AX 蛋白表达的影响[J]. *吉林大学学报*, 2010, 36 (5): 895-899.
- [13] 涂文志, 尚增甫, 李兵, 等. 与细胞周期 G2 / M 期进程相关的 H2AX 磷酸化[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2012, 28 (4): 339-345.
- [14] 李成华. 栉孔扇贝核心组蛋白的基因结构及 H2A 抗菌活性的研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2007.
- [15] Marzluff W F, Sakallah S, Kelkar H. The sea urchin histone gene complement[J]. *Developmental Biology*, 2006, 300(1): 308-320.
- [16] Meng X P, Shen X, Zhao N N, et al. Mitogenomics reveals two subspecies in *Coelomacra antiquata* (Mollusca: Bivalvia) [J]. *Mitochondrial DNA*, 2013, 24 (2): 102-104.
- [17] 孟学平, 申欣, 赵娜娜, 等. 漳州西施舌线粒体基因组全序列: 腔蛤属(*Coelomacra*)存在新种的证据[J]. *海洋学报*, 2013, 35(3): 213-222.
- [18] Ortman B D, Bucklin A, Pages F, et al. DNA barcoding the Medusozoa using mtCOI[J]. *Deep-Sea Research II*, 2010, 57: 2148-2156.
- [19] 孟学平, 申欣, 赵娜娜, 等. 基于 ITS2 和 16S rRNA

- 的西施舌群体遗传差异分析[J]. 生态学报, 2013, 33(24): 7882-7891.
- [20] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proceeding of the Royal Society B: Biology Science, 2003, 270 (1512): 313-321.
- [21] Hebert P D N, Penton E H, Burns J M, et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101 (41): 14812-14817.

Comparative studies of the histone H2A gene and *nad6-nad1* fragment sequences in three populations of *Coelomacra antiquata*

ZHU Ming, SHEN Xin, ZHU Xiao-lin, TU Hai-miao, YANG Jie, MENG Xue-ping

(College of Marine Science of Huaihai Institute of Technology, Co-Innovation Center of Jiangsu Marine Bio-industry Technology, Lianyungang 222005, China)

Received: Dec., 16, 2014

Key words: *Coelomacra antiquata*; histone H2A gene; *nad6-nad1* fragment; genetic differentiation

Abstract: The H2A ORF and its two wings untranslated region of *Coelomacra antiquata* planktonic larvae were obtained by splicing EST sequences. Histone PCR primers (Can-H2AF and Can-H2AR) were designed in two wing sequences of the ORF. H2A fragments (including coding and uncoding regions) were amplified and sequenced. The DNA regions between *nad6* and *nad1* gene were amplified, and the nucleotide sequence divergence of H2A gene and *nad6-nad1* fragment was analyzed. We obtained 23 DNA fragments of H2A gene, and the size of the fragments is 606 bp (RZ, BH populations) or 616 bp (ZZ population). Nine kinds of genotypes (Gen) were detected from three populations of *C. antiquata*. The AT content (51.51%) of H2A gene in ZZ population is higher than that (50.58%) of RZ and BH populations. H2A gene sequence alignment analysis of nine genotypes showed that there are 616 comparison sites, and the parsimony informative sites accounted for 4.05%. There are 23 variable sites shared by Zhangzhou population, 27 variable sites shared by Beihai and Rizhao populations. The average genetic distance between mixed population and ZZ population was 0.044. It is 0.003 within mixed populations and 0.004 within ZZ population. The genetic distance ratio between intergroup and intrapopulation is 11~14.7; AMOVA analysis showed that there was significant genetic differentiation ($F_{ST} = 0.937$, $P < 0.01$) between Zhangzhou groups and mixed groups (RZ and BH). The cumula 2-parameter distance ratio interpopulation (Rizhao and Zhangzhou) to intrapopulation based on *nad6-nad1* is 50~66, it also suggested high level genetic differentiation in Zhangzhou population of *C. antiquata*.

(本文编辑: 梁德海)