

8个地理种群红条毛肤石鳖 *COI* 基因的遗传多样性分析徐浩文¹, 马铭¹, 黄玲^{1,2*}

(1. 鲁东大学生命科学学院, 山东烟台 264025; 2. 南通大学生命科学学院, 江苏南通 226371)

摘要 [目的]分析我国8个沿海潮间带红条毛肤石鳖地理种群的 *COI* 基因的遗传多样性。[方法]利用聚合酶链式反应(PCR)技术扩增8个地区80个红条毛肤石鳖样品的 *COI* 基因。使用 DNASP5.10.01、MEGA7.0 等软件对所得序列进行分析,得到片段碱基含量、遗传距离以及遗传多样性参数等数据,并通过构建系统发育树的方式,结合遗传多样性数据分析结果。[结果]获得的 *COI* 基因片段长度为 659 bp, *COI* 基因位于线粒体编码区中,平均 A、T、C、G 的碱基含量分别 20.4%、41.7%、14.9% 和 23.0%,存在明显的 AT 偏向,结合 *Acanthochiton crinita* 为外群系统发育树的结果来看,中国沿海地区红条毛肤石鳖种群分成2个明显的聚群,将它们定义为北方群体和南方群体,遗传距离为 0.000 66~0.087 85。单倍型遗传多样性数据显示,多样性数值较高,但核苷酸多样性较低。[结论]红条毛肤石鳖北方群体的遗传多样性与南方群体存在差异,2个群体应该分别采取相应措施来保护遗传多样性。

关键词 红条毛肤石鳖; *COI* 基因; 遗传多样性

中图分类号 S917.4 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)12-0074-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.12.021



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Genetic Diversity Analysis of *COI* Gene in 8 Geographical Populations of *Acanthochiton rubrolineatus*

XU Hao-wen¹, MA Ming¹, HUANG Ling^{1,2} (1. College of Life Sciences, Ludong University, Yantai, Shandong 264025; 2. College of Life Sciences, Nantong University, Nantong, Jiangsu 226371)

Abstract [Objective] To analyze the genetic diversity of *COI* gene in *Acanthochiton rubrolineatus* from 8 littoral geographical populations of China. [Method] *COI* gene of 80 samples of *A. rubrolineatus* from 8 geographical populations were amplified by polymerase chain reaction (PCR technology). And we used DNASP5.1001, MEGA7.0 and other softwares to analyze the sequences, calculate the data of fragment base content, distance and other genetic diversity parameters, and analyze the results by the means of constructing phylogenetic trees in combination of genetic diversity data. [Result] The length of *COI* gene fragment was 659 bp, *COI* gene was located in the encoding region of mitochondria, and the average content of bases A, T, G, C was 20.4%, 41.7%, 14.9%, 23.0% respectively, showing a significant AT bias. Combined with the results of phylogenetic trees with the outgroup of *Acanthochiton crinita*, we found that all haplotypes of *A. rubrolineatus* populations in China coasts were clustered into two apparent geographic lineages in phylogenetic trees, named as Northern group and Southern group, the genetic distance ranged from 0.000 66 to 0.087 85. The results of haplotype genetic diversity reflected that Hd was high, but the nucleotide diversity was low. [Conclusion] There were obvious differences between the northern group and southern group of *A. rubrolineatus* in China, and the northern and southern group should be protected separately by taking some measures.

Key words *Acanthochiton rubrolineatus*; *COI* gene; Genetic diversity

红条毛肤石鳖(*Acanthochiton rubrolineatus*)隶属软体动物门多板纲石鳖目毛肤石鳖科,生活在潮间带中、低潮区岩石岸,主要分布在我国黄渤海到广东沿岸,此外,日本也有分布^[1],是我国最常见的石鳖种群。石鳖属于多板纲比较原始的软体动物,包含超过 940 种现生种以及 430 种石鳖化石标本,在白垩纪至今漫长的进化历程中,其化石形态变化不大^[2-3],在研究软体动物的起源与进化中有重要的地位和意义,红条毛肤石鳖身体两侧对称,长椭圆形,背部中央凸出,并披有 8 块石灰质的壳板^[4],上面有 3 道暗红色横纹。相对于其他物种,石鳖物种没有明显的经济价值,目前未见到人工养殖石鳖的相关报道,但具有重要的环境指示价值,是良好的水质指示剂,对于保护生态环境具有重要的作用。目前对红条毛肤石鳖的研究主要集中在形态、齿舌新型磁性纳米材料、食用药用价值等方面^[5-7],而遗传多样性分析并不多见。遗传多样性是分析生物多样性重要的手段,通过种群遗传多样性的分析可以揭示进化历史和种群进化的可能性^[8],具有更高遗传多样性的物种或者种群能够更好地适应环境改变^[9],遗传多样性越高,或者变异越强的物种,其生存能力

往往越强。探究红条毛肤石鳖遗传多样性对于了解石鳖乃至软体动物进化历程,对维持生物多样性具有重要的意义,同时遗传多样性的研究也可以对野生种资源的保护和资源的可持续利用提供文献参考。

分子标记是以基因突变为基础来分析物种遗传与变异的方法,常见的分子标记有 RNA 核糖体(16S rRNA、28S rRNA)^[10]、细胞色素 B(cytochrome b, Cytb)^[11]、细胞色素氧化酶亚基 I(cytochrome oxidase subunit I, COI)等^[12],笔者用到的分子标记是位于线粒体 DNA 中的 *COI* 基因。线粒体 DNA 是探究动物群体遗传学常用的分子标记,常用来进行群体遗传学的分析^[13],线粒体 DNA 不包含内含子、间隔区和重复序列,母系遗传,具有较高的序列替换速率^[14]。*COI* 基因是线粒体编码蛋白最大的一个编码区,变化速率快,相对于线粒体 rRNA 基因更加保守,被广泛应用在生物类群的种质鉴定和低阶分类阶元的系统学研究中^[15-16],在海洋动物遗传群体的研究中应用较为广泛^[17-18]。

1 材料与方法

1.1 样品采集 样品采集自我国沿海 8 个地区,包括大连(DL)、烟台(YT)、威海(WH)、青岛(QD)、连云港(LYG)、舟山(ZS)、玉环(YH)和厦门(XM)。采样的地点多为海岸潮间带礁石滩,采样时间选择退大潮时,具体采样方法参考张枫轩^[19]的方法。

基金项目 国家自然科学基金项目(31371252)。

作者简介 徐浩文(1994—),男,山东济南人,硕士研究生,研究方向:分子生态学。*通信作者,教授,博士,硕士生导师,从事分子生态与进化研究。

收稿日期 2020-03-03

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取。取红条毛肤石鳖腹部肌肉组织,每次取绿豆粒大小的肌肉组织,将组织在 1.5 mL 离心管中充分剪碎,用天根海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒(TIANamp Marine Animals DNA Kit, DP324-03)提取总 DNA。总 DNA 使用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行 DNA 检测,胶图中出现清晰明亮条带,说明提取的 DNA 片段质量较高,可以进行后续的扩增操作,随后按照编号将结果较好的 DNA 置于 -20 °C 冰箱中保存备用。

1.2.2 PCR 扩增。通过 GenBank 数据库中查找石鳖 *COI* 序列,并通过 Primer5.0 软件遵循引物设计原则设计引物,得到正向反向引物序列分别为 5' - GGTCAACAATCATAAAGATATTGG - 3'、5' - TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATC - 3',由上海生工生物公司合成,将引物稀释后按照 22 μ L 水, 25 μ L *Taq* 酶(TaKaRa *Taq*TM Version 2.0), 1 μ L DNA, 上下游引物各 1 μ L 的比例配成 50 μ L 的反应体系,具体 PCR 反

应程序如下:94 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 30 s,50 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 2 min,共 35 个循环;72 °C 延伸 10 min 后,温度降至室温,10 °C 下保存。

1.2.3 序列处理和分析。PCR 所得产物经检测合格后送往上海生工生物有限公司进行测序,所得测序产物用 DNASTAR 软件中的 Seqman 软件进行剪切与拼接,使用 MEGA7.0 软件对拼接序列进行比对,所有序列均在 GenBank 数据库中进行 BLAST 同源检测,确定为目的红条毛肤石鳖的 DNA 序列;利用 MEGA7.0 对序列按地区进行分组整合,计算各组之间的遗传距离、各组之间碱基组成以及以 *Acanthochitona crinita* 为外群构建单倍型系统发育树,利用 DNASP5.10.01 软件对序列进行遗传多样性数据的收集分析等。

2 结果与分析

2.1 产物检测结果 PCR 扩增后的产物电泳检测结果如图 1 所示,表明目的基因的扩增效果较好。



图 1 PCR 扩增产物电泳结果

Fig.1 Electrophoresis results of PCR amplification products

2.2 碱基含量分析 获得的 *COI* 基因片段裁切整齐对比后长度为 659 bp,作为下一步分析使用,通过 MEGA7.0 分析得到碱基组成结果(表 1)。由表 1 可知,红条毛肤石鳖的 *COI* 基因碱基片段各地区碱基组成差异不明显,碱基 A、T、C、G 的平均含量分别为 20.4%、41.7%、14.9%和 23.0%,存在明显的 AT 偏向,是一种比较普遍的碱基偏向性,其他生物的研究中也报道过这种碱基偏向^[20-21]。

表 1 各地理种群 *COI* 基因片段的碱基含量

Table 1 Base content of *COI* gene fragments in different geographical populations %

种群 Populations	A	T	C	G	A+T
DL	20.1	41.8	14.4	23.6	61.9
YT	20.3	41.6	14.7	23.4	61.9
WH	20.3	41.6	14.8	23.3	61.9
QD	20.3	41.2	14.8	23.7	61.5
LYG	20.3	41.5	14.9	23.3	61.8
ZS	20.6	42.0	15.1	22.3	62.6
YH	20.7	42.0	15.1	22.2	62.7
XM	20.7	42.0	15.0	22.3	62.7
平均 Average	20.4	41.7	14.9	23.0	62.1

2.3 各地区遗传距离分析 通过 MEGA7.0 软件计算各地理种群间遗传距离,所得结果见表 2。由表 2 可知,各地理种群间遗传距离为 0.000 66~0.087 85,遗传距离差距较大。北方地理种群遗传距离为 0.002 96~0.016 10,南方地理种群的遗传距离为 0.000 66~0.087 85,南北方地理种群间遗传距离较大,说明南北方地理种群间存在较大的分化差异,南方地理种群的分化程度更大。

2.4 红条毛肤石鳖 *COI* 基因遗传多样性分析 通过 DNASP 软件对红条毛肤石鳖种群进行遗传多样性分析结果见表 3。由表 3 可知,*COI* 基因片段的变异位点(S)为 8~24 个,单倍型多样性(Hd)为 0.844~1.000,核苷酸多样性(π)为 0.004 07~0.012 75,各地区单倍型多样性数值较高,但核苷酸多样性指数较低,该结果与王儒晓等^[22]的研究结果相一致。Tajima's D 检验^[23]和 Fu's Fs 检验^[24]常被用于评估种群的历史动态。Tajima's D 和 Fu's Fs 的检验结果如果是负数,且脱离中性检测比较明显,说明种群或许经历过群体的扩张。从表 3 可以看出,南方种群的扩张比较明显,北方种群除威海可能由于遗传漂变出现了正值,其他地区也都出现了不同程度的扩张,其中,北方种群中青岛的扩张程度比较大,南方种群中玉环和厦门的扩张程度较大,具体扩张时间还需

要借助其他手段进行探讨。

表2 基于 *COI* 基因的 Kimura 2-parameter 模型各地区种群间遗传距离

Table 2 The genetic distance among different populations based on Kimura 2-parameter model of *COI* gene

种群 Populations	DL	YT	WH	QD	LYG	ZS	YH	XM
DL	—							
YT	0.015 50	—						
WH	0.015 19	0.009 31	—					
QD	0.016 10	0.008 46	0.005 42	—				
LYG	0.015 88	0.008 13	0.005 02	0.002 96	—			
ZS	0.080 24	0.085 92	0.086 86	0.087 24	0.087 82	—		
YH	0.080 27	0.085 95	0.086 89	0.087 27	0.087 85	0.001 49	—	
XM	0.080 84	0.086 53	0.087 39	0.087 85	0.088 43	0.002 15	0.000 66	—

表3 基于 *COI* 基因片段的各地区遗传多样性参数

Table 3 Genetic diversity parameters based on *COI* gene fragment

种群 Populations	<i>h</i>	<i>S</i>	Hd	π	Tajima's D	Fu's Fs
DL	6	22	0.911	0.011 53	-0.215 49	1.349
YT	7	24	0.867	0.012 75	-0.151 69	0.512
WH	5	9	0.844	0.005 97	0.943 22	0.922
QD	7	11	0.867	0.004 07	-1.586 02	-2.563
LYG	9	15	0.978	0.007 83	-0.050 25	-3.431
ZS	9	8	0.978	0.005 94	-0.281 16	-4.400
YH	10	11	1.000	0.004 68	-0.97 183	-8.232
XM	9	12	0.978	0.005 42	-1.628 06	-4.712
所有种群 All populations	26	68	0.841	0.041 84	2.404 63*	5.797

注:*S*:变异位点数;*h*:单倍型数;Hd:单倍型多样性; π :核苷酸多样性;*代表差异显著($P<0.05$)

Note:*S*:The number of variable sites;*h*:Number of haplotype; Hd:Haplotype diversity; π :Nucleotide diversity;* stands for significant differences ($P<0.05$)

2.5 系统发育树分析 系统发育树常常被用来反映物种间的进化关系,基于 *COI* 基因片段以 *Acanthochitona crinita* 为外群构建系统发育树的结果如图2所示。从图2可以看出,来

自8地区80条序列共定义了26个单倍型,结果显示以连云港为界限的北方与南方2个群体的单倍型分成2个明显的进化枝,红色代表北方区域的单倍型集合,蓝色代表南方区域的单倍型集合,2个集合之间存在明显的遗传差异,系统发育树分析与遗传距离结果相一致,说明南北方地区红条毛肤石鳖存在较大的分化差异。

3 结论

红条毛肤石鳖是石鳖中分布很狭隘的一个种群,由于其特殊的生活习性,人们往往容易将它忽略。这个物种具有较高的科学研究价值和生态价值,但是由于近年来频繁的人类活动,海水污染严重以及生态环境被破坏等因素影响,红条毛肤石鳖的野生种群数目正在急剧下降,为了阻止这种趋势,对红条毛肤石鳖进行一个综合的遗传多样性分析来寻求对策建立保护措施显得尤为必要。笔者分析了来自我国8个地区红条毛肤石鳖的遗传多样性,结果显示我国红条毛肤石鳖存在明显的南北方分化差距,在进行生物多样性保护时应区分南方地区以及北方地区,分别采取对应措施来保护野生的红条毛肤石鳖种群。

参考文献

- [1] 张均龙,史振平,王承,等.基于壳板和齿舌形态对中国沿岸几种常见多板纲软体动物的分类研究[J].海洋科学,2015,39(11):96-107.
- [2] SCHWABE E.A catalogue of Recent and fossil chitons (Mollusca:Polyplacophora).Addenda[J].Novapex,2005,6(4):89-105.
- [3] PUCHALSKI S S,EERNISSE D J,JOHNSON C C.The effect of sampling bias on the fossil record of chitons (Mollusca,Polyplacophora)[J].American malacological bulletin,2008,25(1):87-95.
- [4] 於宏华,赵青松,徐镇,等.红条毛肤石鳖生殖周期的研究[J].宁波大学

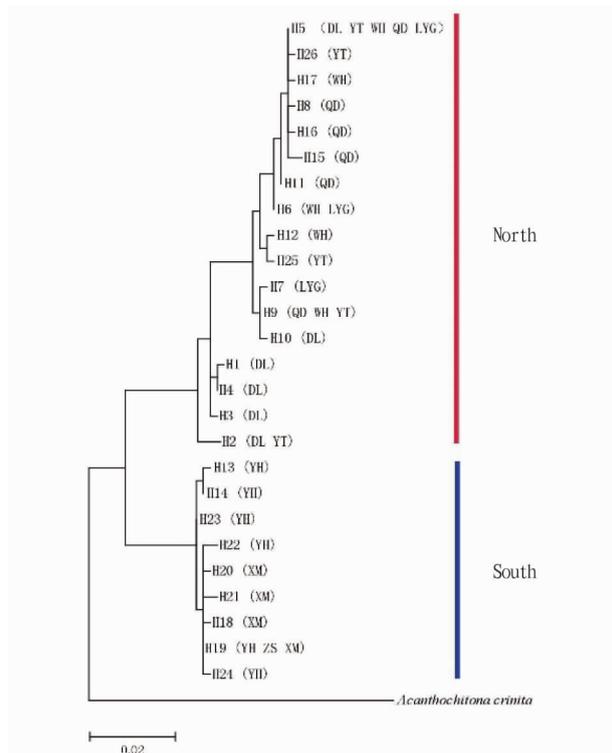


图2 基于 *COI* 基因序列的系统发育树分析

Fig.2 Phylogenetic tree analysis based on *COI* gene sequences

- 学报(理工版),2006,19(1):35-39.
- [5] 钱霞,刘维,赵见高.红条毛肤石鳖齿舌牙齿内的纳米磁性矿物质[J].科学通报,2002,47(1):10-13.
- [6] 陈道海,孙世春.9 种石鳖壳板的形态研究[J].中国海洋大学学报(自然科学版),2010,40(6):53-60.
- [7] 易磊.精编本草纲目[M].上海:上海科学技术出版社,2010.
- [8] SOLTIS P S, SOLTIS D E. Genetic variation in endemic and widespread plant species [J]. *Aliso: A journal of systematic and evolutionary botany*, 1991, 13(1): 215-223.
- [9] REED D H, FRANKHAM R. Correlation between fitness and genetic diversity [J]. *Conservation biology*, 2003, 17(1): 230-237.
- [10] LYDEARD C, MULVEY M, DAVIS G M. Molecular systematics and evolution of reproductive traits of North American freshwater unionacean mussels (Mollusca: Bivalvia) as inferred from 16S rRNA gene sequences [J]. *Philosophical transactions: Biological sciences*, 1996, 351(1347): 1593-1603.
- [11] ROPIQUET A, HASSANIN A. Molecular evidence for the polyphyly of the genus *Hemitragus* (Mammalia, Bovidae) [J]. *Molecular phylogenetics & evolution*, 2005, 36(1): 154-68.
- [12] SPRINGER M S, DOUZERY E. Secondary structure and patterns of evolution among mammalian mitochondrial 12S rRNA molecules [J]. *Journal of molecular evolution*, 1996, 43(4): 357-373.
- [13] 申绍祥. 基于线粒体 DNA 的长江上游四种薄鳅属鱼类遗传多样性研究[D]. 重庆: 西南大学, 2018.
- [14] ARANA M V, GALLO L A, VENDRAMIN G G, et al. High genetic variation in marginal fragmented populations at extreme climatic conditions of the Patagonian Cypress *Austrocedrus chilensis* [J]. *Molecular phylogenetics & evolution*, 2010, 54(3): 941-949.
- [15] 程汉良, 夏德全, 吴婷婷, 等. 6 种帘蛤科贝类及 4 个地理种群文蛤线粒体 *COI* 基因片段序列分析[J]. 海洋学报: 中文版, 2007, 29(5): 109-116.
- [16] 郑文娟, 朱世华, 沈锡权, 等. 基于线粒体 *COI* 基因序列探讨泥蚶的遗传分化[J]. 动物学研究, 2009, 30(1): 17-23
- [17] 谌微, 张凤英, 王景, 等. 基于 *COI* 基因序列的东、黄海区野生与养殖大黄花鱼遗传多样性分析[J]. 中国水产科学, 2016, 23(6): 1255-1267.
- [18] 吴晓雯, 张华伟, 余海, 等. 基于 DNA 条形码对浙南岛屿日本花棘石鳖的遗传特征分析[C]//浙江省第四届动物学博士与教授论坛、动物学与经济强省-浙江省动物学研究及发展战略研讨会论文集. 杭州: 浙江省科学技术协会, 2017.
- [19] 张枫轩. 一些常见的海洋无脊椎动物的采集方法[J]. 海洋科学, 1984, 8(6): 63.
- [20] 陈梦璇, 于立强, 靖美东. 我国不同地区小鼠 Y 染色体 *Zfy1* 基因遗传差异分析[J]. 安徽农业科学, 2019, 47(8): 90-92.
- [21] 李石磊, 张明, 王庆志, 等. 16 种环节动物线粒体基因排列、特征比较及系统发育分析[J]. 水产科学, 2015, 34(2): 104-112.
- [22] 王儒晓, 李媛媛, 刘传林, 等. 环渤海红条毛肤石鳖种群遗传多样性研究[J]. 四川动物, 2019, 38(1): 20-27.
- [23] TAJIMA F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism[J]. *Genetics*, 1989, 123(3): 585-595.
- [24] FU Y X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection[J]. *Genetics*, 1997, 147(2): 915-925.

(上接第 69 页)

>1.00 ~ 2.00 mm。6 个粒级范围内, 植被类型对 >1.00 ~ 2.00 mm 粒级没有影响, 对其余 5 个粒级均有影响。

(2) 5 种植被下, 每 50 g 土壤中, 水稳性团聚体各粒级质量分数平均为 1.94 ~ 36.09 g, 其中 >2.00 ~ 5.00 mm 粒级最小, ≤0.25 mm 粒级最大。水稳性团聚体中超过 70% 的是 <0.25 mm 的微团聚体, 而 >0.25 mm 的水稳性团聚体约占 30%。

(3) 5 种植被类型下, 团聚体破碎率为 20.34% ~ 70.17%, 均值为 49.55%, 土壤团聚体破碎率大小顺序为柠条、欧李、侧柏、苜蓿、油松。

参考文献

- [1] 王小云. 不同水土保持植物种类对土壤物理性质的影响[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(26): 113-115.
- [2] 王小云. 不同作物间坡面径流和泥沙流失量特征与差异分析[J]. 干旱区资源与环境, 2017, 31(11): 100-104.
- [3] 石利军, 王小云, 胡振华. 土地利用方式对土壤基本性质及肥力的影响[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(6): 106-108.
- [4] 王秀颖, 高晓飞, 刘和平, 等. 土壤水稳性大团聚体测定方法综述[J]. 中国水土保持科学, 2011, 9(3): 106-113.
- [5] 徐爽, 王益权. 不同类型土壤团聚体化学稳定性分析[J]. 农业机械学报, 2014, 45(4): 173-178.
- [6] 卢金伟, 李占斌. 土壤团聚体研究进展[J]. 水土保持研究, 2002, 9(1): 81-85.
- [7] 任镇江, 罗友进, 魏朝富. 农田土壤团聚体研究进展[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(2): 1101-1105.
- [8] 丁文峰, 丁登山. 黄土高原植被破坏前后土壤团粒结构分形特征[J]. 地
- 理研究, 2002, 21(6): 700-706.
- [9] 韩加强, 高晓飞, 路炳军, 等. 水土保持对褐土水稳性大团聚体的影响研究[J]. 水土保持研究, 2012, 19(6): 50-53.
- [10] YODER R E. A direct method of aggregate analysis of soils and a study of the physical nature of erosion losses [J]. *Journal of the American society of agronomy*, 1936, 28(5): 337-351.
- [11] 白秀梅, 韩有志, 郭汉清. 庞泉沟自然保护区典型森林土壤大团聚体特征[J]. 生态学报, 2014, 34(7): 1654-1662.
- [12] 陈恩凤, 关连珠, 汪景宽, 等. 土壤特征微团聚体的组成比例与肥力评价[J]. 土壤学报, 2001, 38(1): 49-53.
- [13] 何淑勤, 郑子成. 不同土地利用方式下土壤团聚体的分布及其有机碳含量的变化[J]. 水土保持通报, 2010, 30(1): 7-10.
- [14] LAL R. Physical management of soils of the tropics: Priorities for the 21st century [J]. *Soil science*, 2000, 165: 191-207.
- [15] 苏静, 赵世伟. 土壤团聚体稳定性评价方法比较[J]. 水土保持通报, 2009, 29(5): 114-117.
- [16] ELLIOTT E T, CAMBARDELLA C A. Physical separation of soil organic matter [J]. *Agriculture ecosystems and environment*, 1991, 34: 407-419.
- [17] PUGET P, CHENU C, BALESSENT J. Dynamics of soil organic matter associated with particle-size fractions of water-stable aggregates [J]. *European journal of soil science*, 2000, 51(4): 595-605.
- [18] BARRIOS E, BURESH R J, KWESIGA F, et al. Light fraction soil organic matter and available nitrogen following trees and maize [J]. *Soil science society American journal*, 1997, 61(3): 826-831.
- [19] 邱莉萍, 张兴昌, 张晋爱. 黄土高原长期培肥土壤团聚体中养分和酶的分布[J]. 生态学报, 2006, 26(2): 364-372.
- [20] 陈恩凤, 周礼恺, 武冠云. 微团聚体的保肥供肥性能及其组成比例在评断土壤肥力水平中的意义[J]. 土壤学报, 1994, 31(1): 18-25.
- [21] 蒋定生, 李新华, 范兴科, 等. 论晋陕蒙接壤地区土壤的抗冲性与水土保持措施体系的配置[J]. 水土保持学报, 1995, 9(1): 1-7.