

## 哈氏仿对虾线粒体16S rRNA和CO I基因的序列比较及其与仿对虾属之间的系统进化分析

毛智超<sup>1,2</sup>, 段亚飞<sup>3</sup>, 刘萍<sup>2\*</sup>, 李健<sup>2</sup>, 陈萍<sup>2</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东青岛 266071;

3. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东广州 510300)

**摘要:** 为调查研究哈氏仿对虾浙江象山群体的种质资源、物种间的亲缘关系及遗传多样性状况, 采用PCR扩增获得哈氏仿对虾线粒体DNA的16S rRNA和CO I基因片段, 分别对其进行序列比较和系统进化分析。16S rRNA基因片段的T、C、A和G的含量分别是35.76%、19.48%、26.74%和17.88%; CO I基因片段的T、C、A和G的含量分别是35.36%、12.68%、30.54%和21.43%; A+T含量显著高于G+C含量。16S rRNA基因片段长度为558 bp, 共检测出1种单倍型, 没有多态性位点; CO I基因片段长度为688 bp, 共检测出7种单倍型, 6个多态性位点。CO I基因片段比16S rRNA基因片段变异丰富, 更适于哈氏仿对虾种群的遗传多样性分析。基于16S rRNA和CO I基因片段的系统进化分析结果不太一致, 结合形态学分析表明, 哈氏仿对虾是仿对虾属独立的分支, 与细巧仿对虾和亨氏仿对虾种类亲缘关系较近。根据CO I基因片段的遗传距离推测出仿对虾属的大致分化时间发生在中新世末期至上新世早期。

**关键词:** 哈氏仿对虾; 16S rRNA基因; CO I基因; 序列分析; 系统进化

**中图分类号:** Q 785; S 917.4

**文献标志码:** A

哈氏仿对虾(*Parapenaopsis hardwickii*), 隶属于节肢动物门(Arthropoda), 甲壳纲(Crustacea), 十足目(Decapoda), 对虾科(Penaeidae), 仿对虾属(*Parapenaopsis*), 是我国东海舟山渔场和南海粤西外罗虾场重要的经济虾类<sup>[1]</sup>。哈氏仿对虾因其体形与对虾相似, 个体较大、味道鲜美, 且鲜虾市场价格仅次于中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*), 近年来成为代替对虾类出口创收外汇的重要经济虾类。哈氏仿对虾苗种繁育主要依赖野生亲本<sup>[2]</sup>。然而, 随着海洋资源的过度捕捞及大量外来物种引进的影响, 哈氏仿对虾资源日渐减少, 良种缺乏, 开展其种质资源及遗传多样性方面的研究显得至关重要。目前, 关于哈氏仿对虾的研究主要集中在生物学性状<sup>[1, 3]</sup>和

人工育苗<sup>[2]</sup>等方面, 而其遗传学方面的研究则相对较少。

线粒体基因结构相对简单, 具有母性遗传特点, 进化速度较快且不易发生重组, 是一种应用广泛的分子标记<sup>[4-6]</sup>。线粒体DNA基因片段中, 16S rRNA和CO I基因片段因其较强的中间解析和鉴别能力, 广泛应用于种群遗传结构、遗传多样性及系统进化等方面, 在解决虾类物种起源和分歧问题方面提供了较好的遗传学证据<sup>[7-9]</sup>。刘瑞玉等<sup>[10]</sup>运用形态分类学方法揭示仿对虾属之间的亲缘关系, 尤其是对体型相同难以区分的哈氏仿对虾、细巧仿对虾(*Parapenaopsis tenella*)、缺刻仿对虾(*Parapenaopsis incisa*)、角突仿对虾(*Parapenaopsis cornuta*)、中华仿对虾

收稿日期: 2015-06-09 修回日期: 2015-12-10

资助项目: 国家科技基础条件平台项目(2016DKA30470); 国家虾产业技术体系专项(CARS-47)

通信作者: 刘萍, E-mail: liuping@ysfri.ac.cn

(*Parapenaeopsis sinica*)和亨氏仿对虾(*Parapenaeopsis hungerfordi*)之间的分类做出了形态特征的鉴别<sup>[10]</sup>。而历史地质环境和海洋洋流的变化会极大地改变虾类的遗传多样性,简单的形态学分类可能会由于人为因素的影响而产生较大误差;从分子水平对物种进行分类鉴定,不仅能够更加准确,而且可以为物种的系统进化提供基本的理论依据,揭示哈氏仿对虾与其他仿对虾属之间的亲缘进化关系,构建仿对虾属的系统分化关系,佐证刘瑞玉等<sup>[10]</sup>根据形态特征做出的仿对虾属之间的分类关系。此外,利用分子钟来估计物种的分歧时间以及重建生物进化的时间尺度在甲壳类系统进化方面得到广泛应用<sup>[11-12]</sup>,可以对哈氏仿对虾及其他仿对虾属之间的分化进行追本溯源,分析阐述几种仿对虾之间的亲缘关系,探寻仿对虾属的分化源头。

海洋生物种质资源是海洋生物育种、养殖生产和海洋渔业可持续发展的重要物质基础。本实验对采自浙江象山的哈氏仿对虾野生群体线粒体16S rRNA和CO I基因片段进行序列测定和比较分析,并对其与其他对虾类的系统进化关系进行探讨,以期对哈氏仿对虾的遗传资源保护和系统进化等研究提供基本的数据支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验所用哈氏仿对虾野生群体于2014年4月采自浙江象山近海,体质量(5.20±1.48)g,活体带回实验室后于-80℃保存。

### 1.2 基因组DNA的提取及检测

从哈氏仿对虾野生群体中随机选取30个样本,分别取腹部肌肉约0.1g,加入600μL组织匀浆缓冲液(10mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 50mmol/L EDTA, pH 8.0)进行组织破碎。依次加入终浓度10% SDS和20μg/mL蛋白酶K, 55℃水浴2.5h至液体澄清,期间每30min轻摇一次。采用酚氯仿法提取基因组DNA。

1.2%琼脂糖凝胶电泳检测DNA样品的完整性,并用全自动凝胶系统拍照。核酸定量仪测定DNA样品的浓度和纯度,-20℃保存备用。

### 1.3 PCR扩增及质量鉴定

以哈氏仿对虾基因组DNA为模板,采用无

脊椎动物CO I和16S rRNA基因片段通用引物进行PCR扩增(表1)。16S rRNA基因片段扩增引物为16S AR和16S BR,分别位于线粒体1-rRNA基因的第106bp、第693bp的位置,能扩增587bp长度的片段,因其进化速率慢,主要以替换为主,可用保守引物或者通用引物进行PCR扩增,且易于进行引物的设计和扩增,比较适合于种及其以上阶元的分析;CO I基因片段扩增引物为CO I L1490和CO I H2198,分别位于线粒体CO XI基因的第15bp和第812bp的位置,能扩增797bp的长度,其基因产物是细胞色素氧化酶亚基I,密码子第三位碱基不受自然选择压力的影响,可以自由变异,且CO I的演化速率是其他蛋白编码基因的3倍,有足够的变异能够将物种区别开来,CO I还具有较少的插入和缺失,两端序列相对保守,是较好的分子标记,被众多学者在研究中使用<sup>[13]</sup>。本实验所用引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表1 本实验所用引物序列

Tab. 1 Primer sequences used in this study

引物名称 primer name	序列(5'-3') sequence
16S AR	CGCCTGTTTATCAAAAACAT
16S BR	CCGGTCTGAACTCAGATCACG
CO I L1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTG G
CO I H2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAAT CA

PCR反应体系总体积为50μL,包括10×PCR buffer 5μL, dNTPs 0.2mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 2mmol/L, Taq酶1.25U,上、下游引物各0.12μmol/L,模板DNA 50~100ng。PCR反应条件:94℃预变性2min;94℃变性45s,48℃退火1min,72℃延伸1min,35个循环;72℃延伸5min。为避免测序机器读序失误,或者PCR反应出现引物非特异性扩增,每个样品做2个平行,送2管PCR产物进行测序,最后每个样品经过测序得到4条基因序列,运用ContigExpress软件来拼接和确认正确的碱基和序列。

利用1.2%琼脂糖凝胶电泳对PCR扩增产物进行检测,电泳缓冲液为1×TBE(pH 8.0),电压为4V。然后于紫外灯下切割目的片段,并用DNA胶回收试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]进行纯化回收,回收产物送往上海桑尼生物科技有限公司进行双向测序。

## 1.4 序列分析

利用DNASp软件中的Seqman程序对测序结果进行拼接,采用Bioedit软件进行编辑并辅以人工核查。利用DnaSp 5.0软件计算序列的单倍型、单倍型多态性、多态位点数、平均核苷酸差异数和核苷酸多样性指数。MEGA 4.0软件基于Kimura-2-parameter模型计算哈氏仿对虾种内及与外群物种间的遗传距离,利用邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统进化树,系统树各节点的支持率以序列数据集1000次重复抽样检验的自引导值(Bootstrap value)表示。根据线粒体CO I分子钟,基于各物种间的CO I遗传距离,推算其大致的分化时间。

## 2 结果

### 2.1 16S rRNA和CO I基因片段的序列分析

对哈氏仿对虾16S rRNA和CO I基因片段的PCR扩增产物进行测序,利用DNAMAN软件对测得的序列进行比对,除去引物及端部冗余序列,分别得到558 bp的16S rRNA基因片段和688 bp的CO I基因片段,不包含引物序列。通过BLAST分析比较,确认所得片段均为16S rRNA和CO I基因片段,与其他仿对虾具有高度相似性。利用DNASp 5.0软件计算30个样品的16S rRNA和CO I基因片段的碱基组成,16S rRNA基因片段的碱基T、C、A、G和A+T的平均含量分别为35.76%、19.48%、26.74%、17.88%和62.65%;CO I基因片段的碱基T、C、A、G和A+T的平均含量分别为35.36%、12.68%、30.54%、21.43%和65.89%,符合甲壳类线粒体DNA 16S rRNA和CO I基因片段的序列特征<sup>[14]</sup>。

16S rRNA只检测到一种单倍型,不存在变异位点。CO I基因片段共检测到7种单倍型(Hap1~Hap7),6个多态性变异位点,包括5个单一变异

位点和1个简约信息位点。其中,转换位点5个,包括3个C/T转换,分别在第38、465和516位点;2个A/G转换,分别在第297和第303位点。颠换位点1个,为A/T颠换,在第378位点。转换和颠换比为5,无插入和缺失位点(表2)。与CO I基因片段相比,16S rRNA基因片段极其保守,遗传变异相对较小。16S rRNA和CO I基因片段的各单倍型已提交至GenBank,16S rRNA登录号为KR781020,CO I登录号为KR258740~KR258746。

表2 哈氏仿对虾不同单倍型CO I基因序列的变异位点分布

Tab. 2 Variable sites of CO I gene sequence from different haplotypes of *P. hardwickii*

核苷酸多态位点 site	23045 393761 873856
Hap 1	CGAATC
Hap 2	T....
Hap 3	...C.
Hap 4	...T..
Hap 5	..A....
Hap 6	..G...
Hap 7	...T.T

注:表上方数字自上至下为碱基变异位点在COI基因序列中的位置,“.”表示与第一行序列碱基相同

Notes: Numbers above the table indicate the location of the variable sites in the COI gene sequences; “.” means the same base with the first line.

利用DNASp 5.0软件对哈氏仿对虾16S rRNA和CO I基因片段的遗传多样性参数进行统计(表3),结果表明,16S rRNA的各项遗传多样性参数均为0,进一步验证16S rRNA基因片段比CO I基因片段较为保守。CO I片段编码的肽链长度为224个氨基酸,碱基替换在氨基酸密码子1、2和3位置上都存在,但主要发生在第3位密

表3 哈氏仿对虾16S rRNA和CO I基因片段的遗传多样性参数

Tab. 3 Genetic diversity parameter of 16S rRNA and CO I gene fragments of *P. hardwickii*

基因类型 gene	样本数 N	多态位点数 P	单倍型数 H	单倍型多态性 H <sub>d</sub>	平均核苷酸差数 K	核苷酸多样性数 P <sub>i</sub>
16S rRNA	30	0	1	0.000	0.000	0.00000
CO I	30	6	7	0.478	0.601	0.00087

注: H: 单倍型数, H<sub>d</sub>: 单倍型多态性, P: 多态位点数, K: 平均核苷酸数, P<sub>i</sub>: 核苷酸多样性

Notes: H: Number of haplotypes, H<sub>d</sub>: Haplotype diversity, P: number of variable sites, K: average number of nucleotide differences, P<sub>i</sub>: nucleotide diversity

码子上, 尽管30个个体存在6个位点的差异, 但是没有检测到氨基酸发生突变。

## 2.2 基于16S rRNA基因序列的不同物种间的遗传距离及系统进化分析

选取GenBank中的5种虾类(仿对虾属、新对虾属、明对虾属、囊对虾属和对虾属)的16S rRNA基因序列作为外群, 11种虾类的碱基T、C、A和G含量差异较小, A+T含量均明显高于G+C含量, 而同一属的物种其碱基含量则更为接近(表4)。

将扩增得到的哈氏仿对虾16S rRNA基因片段1种单倍型(Hap1)结合GenBank中检索到的11种虾类的16S rRNA基因片段序列, 利用MEGA 4.0软件的Kimura-2-parameter模型计算种间遗传距离(表5)。基于16S rRNA基因片段, 仿对虾属的遗传距离为0.049~0.119。11种虾类中, 缺刻仿对虾和斑节对虾之间的遗传距离最大, 为0.173; 长毛明对虾和墨吉明对虾之间的遗传距离最小, 为0.007。不同属的虾类之间, 仿对虾属与对虾属之间的遗传距离最大, 为0.135~0.173; 仿对虾属与新对虾属之间的遗传距离最小, 为

表4 外群物种16S rRNA基因序列基本信息

Tab. 4 The data of 16S rRNA gene sequences of outgroup species

种名 species	属名 genus	登录号 accession number	碱基含量/% base content					长度/bp length
			T	C	A	G	A+T	
墨吉明对虾 <i>Fenneropenaeus merguensis</i>	明对虾属	AY143984	30.05	12.71	34.11	20.13	67.16	472
长毛明对虾 <i>Fenneropenaeus penicillatus</i>	明对虾属	AF279816	30.05	12.66	30.69	20.39	66.74	466
近缘新对虾 <i>Metapenaeus affinis</i>	新对虾属	AY264904	35.84	12.67	28.71	22.77	64.55	505
沙栖新对虾 <i>Metapenaeus moyebi</i>	新对虾属	FJ435639	35.00	14.04	30.38	20.58	65.38	520
斑节对虾 <i>Penaeus monodon</i>	对虾属	EU084997	34.17	12.07	34.85	18.91	69.02	439
日本囊对虾 <i>Marsupenaeus japonicus</i>	囊对虾属	DQ187946	30.66	13.5	32.29	20.55	65.95	511
亨氏仿对虾 <i>Parapenaeopsis hungerfordi</i>	仿对虾属	AY622206	35.15	11.57	31.88	21.4	67.03	458
角突仿对虾 <i>Parapenaeopsis cornuta</i>	仿对虾属	JF899808	35.42	11.57	32.53	20.48	67.95	415
细巧仿对虾 <i>Parapenaeopsis tenella</i>	仿对虾属	FJ435641	35.53	11.58	31.14	21.76	66.67	501
中华仿对虾 <i>Parapenaeopsis sinica</i>	仿对虾属	KR781022	35.46	12.53	31.21	20.81	66.67	471
缺刻仿对虾 <i>Parapenaeopsis incisa</i>	仿对虾属	KR781021	35.39	12.58	31.13	20.9	66.52	469

0.113~0.152。

基于上述11种虾类的16S rRNA基因片段, 利用MEGA 4.0软件构建NJ分子系统进化树(图1)。结果表明, 仿对虾属首先紧密聚为一支, 然后与新对虾属聚为一支, 最后与对虾类群聚合在一起。仿对虾分支中, 哈氏仿对虾与细巧仿对虾、亨氏仿对虾聚为一支, 而中华仿对虾和角突仿对虾、缺刻仿对虾聚为一支。对虾类群中, 2种明对虾首先聚为一支, 然后与斑节对虾聚为一支, 最后与日本囊对虾聚合在一起。

## 2.3 基于CO I基因序列的不同物种间的遗传距离及系统进化分析

选取GenBank中的5种虾类(仿对虾属、新对

虾属、明对虾属、囊对虾属和对虾属)的CO I基因序列作为外群, 11种对虾类的碱基T、C、A和G含量差异较小, A+T含量均明显高于G+C含量, 而同一属的虾类其碱基含量则更为接近。

将扩增得到的哈氏仿对虾CO I基因片段7种单倍型(Hap1~Hap7)和GenBank中检索到的4种对虾属11种虾类的CO I基因片段, 利用MEGA 4.0软件的Kimura-2-parameter模型计算种间的遗传距离(表7)。遗传距离显示, 哈氏仿对虾7种单倍型之间的遗传距离为0.001~0.004, 平均0.003(表8)。基于CO I基因片段, 仿对虾属内种间的遗传距离为0.135~0.213; 11种虾类之间的遗传距离为0.004~2.038。11种虾类中, 角突仿对虾和斑节对虾之间的遗传距离最大, 为2.038; 长

表 5 基于16S rRNA基因片段的Kumara2-parameter遗传距离(左下)

Tab. 5 Kumara2-parameter genetic distances (lower left) based on 16S rRNA gene fragment

物种 species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	-											
2	0.119	-										
3	0.119	0.064	-									
4	0.079	0.095	0.087	-								
5	0.117	0.049	0.056	0.084	-							
6	0.101	0.108	0.108	0.064	0.114	-						
7	0.152	0.141	0.149	0.141	0.144	0.161	-					
8	0.161	0.172	0.164	0.135	0.173	0.149	0.097	-				
9	0.146	0.160	0.155	0.140	0.146	0.149	0.095	0.076	-			
10	0.146	0.150	0.144	0.127	0.152	0.135	0.155	0.152	0.157	-		
11	0.146	0.158	0.152	0.138	0.143	0.149	0.092	0.079	0.007	0.158	-	
12	0.132	0.136	0.130	0.113	0.141	0.124	0.158	0.170	0.166	0.061	0.166	-

注: 1. 哈氏仿对虾hap1, 2. 角突仿对虾, 3. 中华仿对虾, 4. 细巧仿对虾, 5. 缺刻仿对虾, 6. 亨氏仿对虾, 7. 日本囊对虾, 8. 斑节对虾, 9. 长毛明对虾, 10. 沙栖新对虾, 11. 墨吉明对虾, 12. 近缘新对虾

Notes: 1. *Parapenaeopsis hardwickii* Hap1, 2. *Parapenaeopsis sinica*, 3. *Parapenaeopsis cornuta*, 4. *Parapenaeopsis tenella*, 5. *Parapenaeopsis hungerfordi*, 6. *Parapenaeopsis incisa*, 7. *Marsupenaeus japonicus*, 8. *Penaeus monodon*, 9. *Fenneropenaeus merguensis*, 10. *Fenneropenaeus penicillatus*, 11. *Metapenaeus moyebi*, 12. *Metapenaeus affinis*

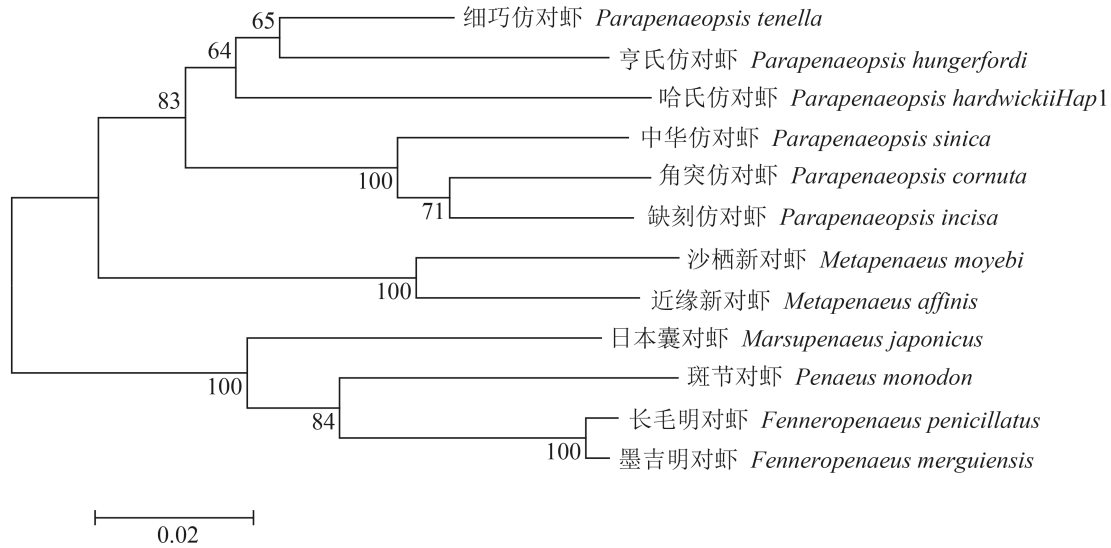


图 1 基于16S rRNA基因片段的NJ分子系统进化树

Fig. 1 NJ molecular phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences

毛明对虾和墨吉明对虾之间的遗传距离最小, 为0.004。不同属的虾类之间, 仿对虾属与对虾属之间的遗传距离最大, 为1.488~2.038; 明对虾属与新对虾属之间的遗传距离最小, 为0.209~0.216。

基于上述11种虾类的CO I 基因片段构建的

NJ分子系统进化树结果表明, 仿对虾属CO I 的系统进化分析结果与16S rRNA基本一致, 而基于16S rRNA和CO I 基因片段的对虾类系统进化分析结果则不一致。在对虾类分支中, 新对虾和明对虾首先聚为一支, 然后与日本囊对虾和斑

表6 外群物种CO I基因序列基本信息

Tab. 6 The data of CO I gene sequences of outgroup species

种名 species	属名 genus	登录号 accession number	碱基含量/% base content					长度/bp length
			T	C	A	G	A+T	
墨吉明对虾 <i>Fenneropenaeus merguensis</i>	明对虾属	AY143990	36.57	19.24	27.03	16.69	63.60	629
长毛明对虾 <i>Fenneropenaeus penicillatus</i>	明对虾属	AY264899	27.27	19.83	16.65	36.25	63.52	847
沙栖新对虾 <i>Metapenaeus moyebi</i>	新对虾属	FJ435653	28.34	21.72	17.47	32.47	60.81	847
近缘新对虾 <i>Metapenaeus affinis</i>	新对虾属	AY264886	28.69	22.20	17.00	32.11	60.80	847
斑节对虾 <i>Penaeus monodon</i>	对虾属	AY795562	27.66	17.76	18.20	36.39	64.05	687
日本囊对虾 <i>Marsupenaeus japonicus</i>	囊对虾属	AY787755	27.64	18.19	18.90	35.26	62.90	709
细巧仿对虾 <i>Parapenaeopsis tenella</i>	仿对虾属	FJ435655	29.16	19.13	15.23	36.48	65.64	847
角突仿对虾 <i>Parapenaeopsis cornuta</i>	仿对虾属	KP072694	28.46	22.37	17.50	31.66	60.12	657
亨氏仿对虾 <i>Parapenaeopsis hungerfordi</i>	仿对虾属	FJ435656	29.16	21.84	14.99	34.00	63.16	847
中华仿对虾 <i>Parapenaeopsis sinica</i>	仿对虾属	KR349255	28.57	22.76	18.11	30.56	59.14	602
缺刻仿对虾 <i>Parapenaeopsis incisa</i>	仿对虾属	KR349256	28.33	21.83	18.33	31.5	59.83	600

表7 基于CO I基因片段的Kumara-2-parameter遗传距离(左下方)

Tab. 7 Kumara-2-parameter genetic distances (lower left) based on CO I gene fragment

物种 species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	-											
2	0.211	-										
3	0.190	0.135	-									
4	0.166	0.195	0.208	-								
5	0.196	0.184	0.196	0.170	-							
6	0.213	0.174	0.142	0.212	0.212	-						
7	1.493	1.613	1.849	1.475	1.512	1.424	-					
8	1.519	1.675	2.038	1.519	1.447	1.488	0.180	-				
9	1.429	1.437	1.426	1.305	1.400	1.404	1.624	1.505	-			
10	1.429	1.437	1.426	1.305	1.400	1.404	1.624	1.505	0.004	-		
11	1.463	1.506	1.525	1.322	1.439	1.415	1.729	1.593	0.211	0.216	-	
12	1.464	1.489	1.488	1.324	1.423	1.402	1.747	1.607	0.209	0.214	0.009	-

注: 1. 哈氏仿对虾Hap1, 2. 中华仿对虾, 3. 角突仿对虾, 4. 细巧仿对虾, 5. 亨氏仿对虾, 6. 缺刻仿对虾, 7. 日本囊对虾, 8. 斑节对虾, 9. 墨吉明对虾, 10. 长毛明对虾, 11. 沙栖新对虾, 12. 近缘新对虾

Notes: 1. *Parapenaeopsis hardwickii* Hap1, 2. *Parapenaeopsis sinica*, 3. *Parapenaeopsis cornuta*, 4. *Parapenaeopsis tenella*, 5. *Parapenaeopsis hungerfordi*, 6. *Parapenaeopsis incisa*, 7. *Marsupenaeus japonicus*, 8. *Penaeus monodon*, 9. *Fenneropenaeus merguensis*, 10. *Fenneropenaeus penicillatus*, 11. *Metapenaeus moyebi*, 12. *Metapenaeus affinis*

节对虾聚合在一起。

根据Baldwin等<sup>[15]</sup>提出的线粒体CO I分子钟, 基于上述的11种虾类的CO I的遗传距离, 对其大致的分化时间进行了推算(表9)。所有虾

类中, 斑节对虾与角突仿对虾之间的分化时间最大, 为67.95百万年; 长毛明对虾与墨吉明对虾之间的分化时间最小, 为0.3百万年。不同属之间, 仿对虾属与对虾属之间的分化时间最

表 8 哈氏仿对虾不同单倍型 *CO I* 基因片段的 Kimura-2-parameter遗传距离(左下方)

Tab. 8 Kimura-2-parameter genetic distances based on the *CO I* gene fragments of different haplotypes of *P. hardwickii* (lower left)

物种 species	Hap1	Hap2	Hap3	Hap4	Hap5	Hap6	Hap7
Hap1	-						
Hap2	0.001	-					
Hap3	0.001	0.003	-				
Hap4	0.001	0.003	0.003	-			
Hap5	0.001	0.003	0.003	0.003	-		
Hap6	0.001	0.003	0.003	0.003	0.003	-	
Hap7	0.003	0.004	0.004	0.001	0.004	0.004	-

大, 为48.23~67.95百万年; 明对虾属与新对虾属之间的分化时间最小, 为6.97~7.13百万年。

### 3 讨论

#### 3.1 哈氏仿对虾16S *rRNA*和 *CO I* 基因片段的比较分析

本研究采用PCR技术对哈氏仿对虾线粒体16S *rRNA*和 *CO I* 基因片段进行扩增, 分别得到558和688 bp的基因序列。序列分析表明, 16S *rRNA*和 *CO I* 基因片段的A+T含量均明显高于G+C含量, 与其他虾蟹类的研究结果一致<sup>[16-18]</sup>。哈氏仿对虾野生群体30个样本中, 16S *rRNA*基因片段共检测出1种单倍型, 不存在突变位点; 而

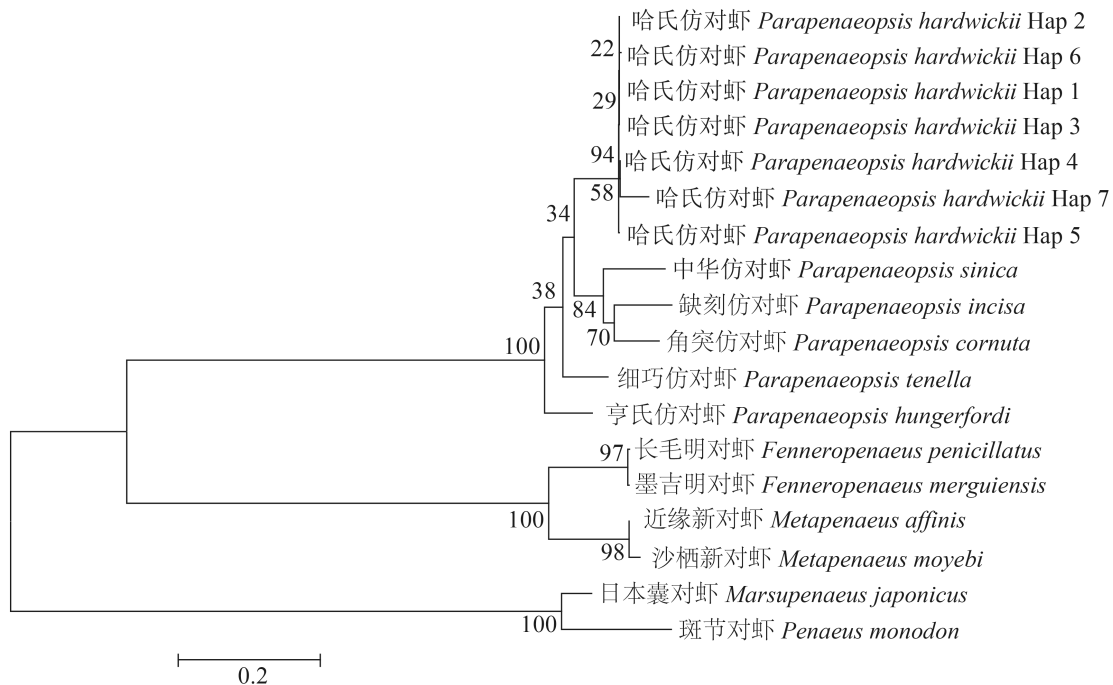


图 2 基于 *CO I* 基因序列的NJ分子系统进化树

Fig. 2 NJ molecular phylogenetic tree based on *CO I* gene sequences

*CO I* 基因共检测出7种单倍型和6个多态性位点。结果表明, 与 *CO I* 基因片段相比, 哈氏仿对虾16S *rRNA*基因片段遗传变异较小, 序列比较保守。线粒体DNA不同区域的核苷酸具有不同的突变速率, 或者不同的基因片段所承受的选择压力不同, 是造成线粒体不同基因片段变异存在差异的主要原因<sup>[19]</sup>。因此, 推测本研究所获取的哈氏仿对虾的基因交流仅限于该地理群体, 而与其他地理群体虾生活轨迹不交叉或交

叉较小; 另一方面可能与16S *rRNA*基因片段比较保守有关, 这与无脊椎动物中16S *rRNA*具有较高的保守性, *CO I* 具有较大的分歧速率相符合<sup>[20-21]</sup>。此外, 徐琰等<sup>[22]</sup>对哈氏仿对虾、亨氏仿对虾和细巧仿对虾进行16S *rRNA*基因的遗传多样性分析, 也出现只有一种单倍型的现象, 种内个体间16S *rDNA*基因序列位点变异率为0%, 进一步佐证了哈氏仿对虾16S *rRNA*基因的单倍型极少或者只出现一种的遗传多样性偏低的特点, 也有可能哈

表9 基于CO I基因片段遗传距离估算的不同物种间的分化时间  
Tab.9 Differentiation time deduced based on CO I genetic distances

million years

物种 species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	-											
2	7.05	-										
3	6.30	4.51	-									
4	5.55	6.50	6.93	-								
5	6.54	6.13	6.53	5.68	-							
6	7.10	5.80	4.73	7.07	7.08	-						
7	49.78	53.76	61.65	49.16	50.41	47.47	-					
8	50.63	55.84	67.95	50.63	48.23	49.60	6.00	-				
9	47.64	47.90	47.53	44.52	46.68	46.81	54.14	50.15	-			
10	47.64	47.90	47.53	44.52	46.68	46.81	54.14	50.15	0.12	-		
11	48.77	50.20	50.83	44.05	47.98	47.16	57.65	53.09	7.04	7.20	-	
12	48.80	49.64	49.60	44.12	47.44	46.72	58.24	53.57	6.97	7.13	0.3	-

注: 1. 哈氏仿对虾Hap1, 2. 中华仿对虾, 3. 角突仿对虾, 4. 细巧仿对虾, 5. 亨氏仿对虾, 6. 缺刻仿对虾, 7. 日本囊对虾, 8. 斑节对虾, 9. 墨吉明对虾, 10. 长毛明对虾, 11. 沙栖新对虾, 12. 近缘新对虾

Notes: 1. *Parapenaopsis hardwickii* Hap1, 2. *Parapenaopsis sinica*, 3. *Parapenaopsis cornuta*, 4. *Parapenaopsis tenella*, 5. *Parapenaopsis hungerfordi*, 6. *Parapenaopsis incisa*, 7. *Marsupenaeus japonicus*, 8. *Penaeus monodon*, 9. *Fenneropenaeus merguensis*, 10. *Fenneropenaeus penicillatus*, 11. *Metapenaeus moyebi*, 12. *Metapenaeus affinis*

氏仿对虾16S rRNA基因的唯一单倍型是仿对虾属的一个特例, 期望后期工作者能发现不同的单倍型, 对哈氏仿对虾16S rRNA基因进行补充。本研究中哈氏仿对虾16S rRNA基因片段与中华仿对虾、细巧仿对虾、缺刻仿对虾、角突仿对虾和亨氏仿对虾的序列差异分别是12.9%、9.3%、12.2%、12.7%和10.9%, 均大于Schubart的1.5%的种间差异标准<sup>[23]</sup>。由此表明, 16S rRNA基因不适合哈氏仿对虾种内的遗传多样性分析, 而对于仿对虾属内种间的鉴定分析具有较好的分辨率。CO I基因在哈氏仿对虾群体内具有一定程度的变异, 适合用于分析哈氏仿对虾自然群体的遗传多样性。

在线粒体序列变异中, 变异位点的转换较易在近亲种间较频繁地发生, 而颠换在较远缘种间逐渐明显; 在同种动物中, 转换往往在数量上远超过颠换<sup>[24]</sup>。本研究中哈氏仿对虾CO I基因片段共检测到6个变异位点, 其中转换颠换比约为5, 说明哈氏仿对虾自然群体的CO I基因序列的变异尚未达到饱和, 这与核苷酸的替换主要以转换为主, 转换多于颠换, 表现出较高的转换偏向的规律。此外, 哈氏仿对虾CO I

基因片段的核苷酸多样性指数为0.000 87, 远低于其他虾蟹类, 如脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)、中华虎头蟹(*Orithyia sinica*)等, 表明浙江舟山地区的哈氏仿对虾种群的多态位点比例和遗传多样性水平较低, 该地区哈氏仿对虾群体的自然繁殖近交频繁, 种质资源相对单一, 缺乏与南海等其他区域哈氏仿对虾的基因交流, 导致舟山地区的哈氏仿对虾自然群体的种质资源退化比较严重, 进行人工育苗时需要引入其他地理群体, 培养优势品种。

### 3.2 遗传距离及系统进化分析

分子系统进化分析是研究生物间系统进化发生关系的重要手段。分子系统进化树是基于物种之间的序列差异, 在核苷酸等大分子进化速率相对稳定的基础上构建而成, 可以直观地分析不同物种之间的系统进化关系<sup>[25-26]</sup>。本研究中, 基于16S rRNA和CO I基因片段构建的NJ系统进化树表明, 仿对虾属的角突仿对虾、缺刻仿对虾和中华仿对虾的亲缘关系较近, 与形态学分类一致, 主要与3种虾的交接器的形状相似<sup>[27]</sup>有关。但基于16S rRNA和CO I基因片段的哈氏仿对虾与细巧仿对虾、亨氏仿对虾之间的关系有



些不一致。在16S *rRNA*进化树中,哈氏仿对虾与细巧仿对虾、亨氏仿对虾的亲缘关系较近;而在CO I进化树中,哈氏仿对虾、细巧仿对虾和亨氏仿对虾均是仿对虾属内单独的分支。徐琰等<sup>[22]</sup>同样发现哈氏仿对虾、细巧仿对虾和亨氏仿对虾之间的聚类不太清晰,从进化树分析上不能说明细巧仿对虾、亨氏仿对虾是哈氏仿对虾的姊妹种。从形态分类上看,由于细巧仿对虾和亨氏仿对虾由于第1、2对步足不具上肢(肢鳃)的形态特征,使得两种虾位于仿对虾属内分化的上游,是仿对虾属内分化形成最早的两种虾,可能是姊妹种。而哈氏仿对虾则第1、2对步足具有上肢(肢鳃),所以结合进化树和形态特征分析,哈氏仿对虾可能是仿对虾属内辐射分化产生的一个独立分支,并不是细巧仿对虾、亨氏仿对虾的姊妹种。

此外,基于16S *rRNA*和CO I基因片段的6种对虾的系统进化分析也存在结果不一致的现象。研究表明,明对虾无肝脊,如有,则适度清楚或不太清楚;囊对虾具有独特的前端开口的囊状纳精囊<sup>[28]</sup>。Perez等<sup>[29]</sup>将对虾科内的6个亚属(滨对虾亚属、明对虾亚属、囊对虾亚属、美洲对虾亚属、沟对虾亚属和对虾亚属)升至属级水平,同时对所有对虾科内29个物种进行分类,使得明对虾属和囊对虾属从对虾属中独立出来。此外,刘瑞玉<sup>[10]</sup>同样支持将明对虾和囊对虾单独成立属的分类阶元<sup>[28, 30]</sup>。新对虾属和仿对虾属在早期的对虾科分类系统里,在分类地位上是以属的形式出现。因此,基于16S *rRNA*基因片段的系统进化分析结果和形态学分类特征比较吻合,由此说明,16S *rRNA*基因比较适合对虾科内属间和种间的系统进化分析。

分子钟假说认为,某一特定的大分子(DNA或蛋白质)在所有世系中,其核苷酸分歧速率在时间上是稳定的<sup>[10]</sup>。Baldwin等<sup>[15]</sup>以上新世中期(约350万年前)巴拿马地峡首次开放作为分子钟标准,估算出对虾科CO I基因核苷酸分歧速率为3%/百万年,即每百万年进化3%。本研究利用CO I分子钟对11种虾类之间的分化时间进行了估计,结果显示哈氏仿对虾是仿对虾属辐射分化中相对较早的物种,起源时间比细巧仿对虾晚5.55百万年,比中华仿对虾早7.05百万年;中华仿对虾和角突仿对虾属于仿对虾属的辐射分化的末支。仿对虾属与斑节对虾的亲缘关系

最远,分化时间为48.23~67.95百万年;仿对虾属与新对虾属的亲缘关系最近,分化时间为44.05~50.83百万年。总体上,仿对虾属、明对虾属和囊对虾属都起源于对虾属,发生在中新世末期至上新世早期。

#### 参考文献:

- [1] 何贤保,俞存根,覃涛,等.舟山渔场及附近海域虾类群落结构特征分析[J].水生生物学报,2013,37(3): 553-559.  
He X B, Yu C G, Qin T, *et al.* The analysis of the community characteristics of shrimps in zhoushan fishing ground and its adjacent waters[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2013, 37(3): 553-559 (in Chinese).
- [2] 张曹进,姚国兴,吴国钧,等.哈氏仿对虾人工育苗技术研究[J].水产科技情报,2011,38(6): 281-283.  
Zhang C J, Yao G X, Wu G J, *et al.* The technique study of artificial breeding for *Parapenaeopsis hardwickii*[J]. Fisheries Science & Technology Information, 2011, 38(6): 281-283 (in Chinese).
- [3] 宋海棠,俞存根,薛利建.东海哈氏仿对虾的数量分布和生长特性研究[J].水生生物学报,2009,33(1): 15-21.  
Song H T, Yu C G, Xue L J. Study on the biomass distribution and growth property of *Parapenaeopsis hardwickii* in the east China sea[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2009, 33(1): 15-21 (in Chinese).
- [4] Byrne M, Rowe F, Uthicke S. Molecular taxonomy, phylogeny and evolution in the family Stichopodidae (Aspidochirota: Holothuroidea) based on CO I and 16S mitochondrial DNA[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2010, 56(3): 1068-1081.
- [5] 李莉好,喻达辉,黄桂菊,等.三种海豚线粒体CO I基因的序列分析[J].动物学杂志,2007,42(3): 20-27.  
Li L H, Yu D H, Huang G J, *et al.* Sequence analysis of mitochondrial CO I gene in three dolphin species[J]. Chinese Journal of Zoology, 2007, 42(3): 20-27 (in Chinese).
- [6] 罗家聪,肖永双,宋林,等.中国文昌鱼系统分类的线粒体CO I和Cyt b基因片段分析[J].南方水产,2007,3(2): 8-14.  
Luo J C, Xiao Y S, Song L, *et al.* Phylogenetic separation of lancelets in China revealed by mitochondrial CO I and Cyt b gene analysis[J]. South

- China Fisheries Science, 2007, 3(2): 8-14 (in Chinese).
- [7] Li J J, Ye Y Y, Wu C W, *et al.* Genetic diversity and population structure of *Septiella japonica* (Mollusca: Cephalopoda: Decapoda) inferred by mitochondrial DNA (CO I) variations[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2014, 56: 8-15.
- [8] 潘鹤婷, 袁媛, 吴琪, 等. 缀锦蛤亚科(Tapetinae)贝类线粒体DNA序列的系统学分析[J]. 海洋与湖沼, 2008, 39(3): 284-290.
- Pan H T, Yuan Y, Wu Q, *et al.* Molecular phylogeny of tapetinae (mollusca, bivalvia) based on mtDNA sequence[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2008, 39(3): 284-290 (in Chinese).
- [9] Yuan T, He M X, Huang L M. Intraspecific genetic variation in mitochondrial 16S rRNA and CO I genes in domestic and wild populations of Huaguizhikong scallop *Chlamys nobilis* Reeve[J]. Aquaculture, 2009, 289(1-2): 19-25.
- [10] 刘瑞玉, 王永良. 中国近海仿对虾属的研究[J]. 海洋与湖沼, 1987, 18(6): 523-539.
- Liu R Y, Wang Y L. Studies on Chinese species of the genus *Parapenaeopsis* (Decapoda, Crustacea)[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1987, 18(6): 523-539 (in Chinese).
- [11] 陈星, 沈永义, 张亚平. 线粒体DNA在分子进化研究中的应用[J]. 动物学研究, 2012, 33(6): 566-573.
- Chen X, Shen Y Y, Zhang Y P. Review of mtDNA in molecular evolution studies[J]. Zoological Research, 2012, 33(6): 566-573 (in Chinese).
- [12] Raghava G P, Solanki R J, Soni V, *et al.* Fingerprinting method for phylogenetic classification and identification of microorganisms based on variation in 16S rRNA gene sequences[J]. BioTechniques, 2000, 29(1): 108-112, 114-116.
- [13] 高俊娜. 三疣梭子蟹和日本蟳的线粒体DNA序列比较分析及三疣梭子蟹蜕皮抑制激素基因的SNP位点筛选[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.
- Gao J N. Mitochondrial DNA sequence analysis of *Portunus trituberculatus* and *Charybdis japonica* and identification of single nucleotide polymorphisms of MIH in *Portunus trituberculatus*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011 (in Chinese).
- [14] 高俊娜, 刘萍, 李健, 等. 利用16S rRNA和CO I 基因序列对三疣梭子蟹不同群体遗传特征的比较分析[J]. 渔业科学进展, 2010, 31(5): 59-68.
- Gao J N, Liu P, Li J, *et al.* Comparison of genetic characteristics of three *Portunus trituberculatus* populations based on the sequences of mitochondrial 16S rRNA and CO I gene[J]. Progress in Fishery Sciences, 2010, 31(5): 59-68 (in Chinese).
- [15] Baldwin J D, Bass A L, Bowen B W, *et al.* Molecular Phylogeny and biogeography of the marine shrimp *Penaeus*[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 1998, 10(3): 399-407.
- [16] Bouchon D, Souty-Grosset C, Raimond R. Mitochondrial DNA variation and markers of species identity in two penaeid shrimp species: *Penaeus monodon* Fabricius and *P. japonicus* Bate[J]. Aquaculture, 1994, 127(2-3): 131-144.
- [17] Li J J, Ye Y Y, Wu C W, *et al.* Genetic variation of *Mytilus coruscus* Gould (Bivalvia: Mytilidae) populations in the east China sea inferred from mtDNA CO I gene Sequence[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2013, 50: 30-38.
- [18] Xu Z H, Chen J L, Cheng D F, *et al.* Genetic variation among the geographic population of the grain aphid, *Sitobion avenae* (Hemiptera: Aphididae) in China inferred from mitochondrial CO I gene sequence[J]. Agricultural Sciences in China, 2011, 10(7): 1041-1048.
- [19] Zheng X D, Wang R C, Wang X F, *et al.* Genetic variation in population of the common Chinese cuttlefish *Septiella maindroni* (Mollusca: Cephalopoda) using allozymes and mitochondrial DNA sequence analysis[J]. Journal of Shellfish Research, 2001, 20(3): 1159-1165.
- [20] 毕潇潇, 高天翔, 肖永双, 等. 4种鳕鱼线粒体16S rRNA、CO I 和Cyt b基因片段序列的比较研究[J]. 南方水产, 2009, 5(3): 46-52.
- Bi X X, Gao T X, Xiao Y S, *et al.* Sequence comparison of mtDNA 16S rRNA, CO I and Cyt b gene fragments in four species of Gadidae fish[J]. South China Fisheries Science, 2009, 5(3): 46-52 (in Chinese).
- [21] Howland D E, Hewitt G M. Phylogeny of the Coleoptera based on mitochondrial cytochrome oxidase I sequence data[J]. Insect Molecular Biology, 1995, 4(3): 203-215.
- [22] 徐琰. 中国近海仿对虾属分子系统演化和近似种问题的研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2005.
- Xu Y. Study on the molecular phylogeny of Chinese coastal genus *Parapenaeopsis* and the classification

- status of close species[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2005 (in Chinese).
- [23] Schubart C D, Koller P. Genetic diversity of freshwater crabs (Brachyura: Sesamidae) from central Jamaica with description of a new species[J]. *Journal of Natural History*, 2005, 39(6): 469-481.
- [24] 刘萍, 段亚飞, 毛智超, 等. 中华虎头蟹线粒体16S *rRNA*和CO I基因的序列比较及其系统进化分析[J]. *水产学报*, 2013, 37(10): 1441-1451.
- Liu P, Duan Y F, Mao Z C, *et al.* Sequence comparison and phylogenetic analysis of mtDNA 16S *rRNA* and CO I gene sequences in *Orithya sinica*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(10): 1441-1451 (in Chinese).
- [25] Qi P Z, Guo B Y, Xie C X, *et al.* Assessing the genetic diversity and population structure of *Culter alburnus* in China based on mitochondrial 16S *rRNA* and CO I gene sequences[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2013, 50: 390-396.
- [26] 马朋, 刘萍, 李健, 等. 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)3个野生群体mtDNA 16S *rRNA*序列差异及长臂虾科系统进化关系[J]. *海洋与湖沼*, 2012, 43(1): 174-179.
- Ma P, Liu P, Li J, *et al.* The genetic diversity of the 16S *rRNA* gene in the mitochondrial DNA of three wild populations of *Exopalaemon carinicauda*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43(1): 174-179(in Chinese).
- [27] 麦维军, 张吕平, 沈琪, 等. 中国近海13种对虾分子系统演化和近似种问题的研究[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(18): 11122-11126.
- Mai W J, Zhang L P, Shen Q, *et al.* Study on molecular evolutionary of 13 kinds of Penaeidae in the offshore of China and allied species[J]. *Journal of Anhui Agriculture Sciences*, 2011, 39(18): 11122-11126 (in Chinese).
- [28] 刘瑞玉. 关于对虾类(属)学名的改变和统一问题[C]//甲壳动物学论文集, (第四辑). 北京: 科学出版社, 2003: 104-122.
- Liu R Y. On the unification of the scientific name of penaeid shrimp (Crustacea Decapoda)[C]//Transactions of the Chinese Crustacean Society No. 4. Beijing: Science Press, 2003: 104-122 (in Chinese).
- [29] Farfante I P, Kensley B. Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world: Keys and diagnoses for the families and genera[M]. Paris: Museum National d'Histoire Naturelle, 1997: 1-223.
- [30] 堵南山. 甲壳动物学(下册)[M]. 北京: 科学出版社, 1993.
- Du N S. Crustacean Zoology (Volume 2)[M]. Beijing: Science Press, 1993 (in Chinese).

## Sequence comparison in *Parapenaeopsis hardwickii* and its phylogenetic analysis of mtDNA 16S rRNA and CO I gene sequences with genus *Parapenaeopsis*

MAO Zhichao<sup>1,2</sup>, DUAN Yafei<sup>3</sup>, LIU Ping<sup>2\*</sup>, LI Jian<sup>2</sup>, CHEN Ping<sup>2</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, 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;

3. Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

**Abstract:** To investigate the germplasm resources and genetic diversity of the wild population *Parapenaeopsis hardwickii*, 558 base of the 16S rRNA and 688 bp base of the CO I gene sequences were obtained from *P. hardwickii* wild populations by PCR amplification. T, C, A and G base content of 16S rRNA gene sequences were 35.76%, 19.48%, 26.74% and 17.88%, while CO I gene sequences were 35.36%, 12.68%, 30.54% and 21.43% respectively. One haplotype and no polymorphic sites were detected in 16S rRNA gene sequences, while 7 haplotypes and 6 polymorphic sites were in CO I gene sequences, including 5 singleton variable sites and 1 parsimony informative sites. The variations of CO I gene sequences were more than 16S rRNA gene sequences, showing that CO I gene sequences were adaptive for genetic diversity analysis in *P. hardwickii*. The molecular phylogenetic analysis based on 16S rRNA and CO I gene sequences were not consistent with each other, indicating that *P. hardwickii* was a sole branch in the genus *Parapenaeopsis*, and had closer relationships with *Parapenaeopsis tenella* and *Parapenaeopsis hungerfordi*. Based on the genetic distance of CO I gene sequences, the differentiation time of 12 shrimp species were deduced, and the results showed that the radiation differentiation time of genus *Parapenaeopsis* was between the Late Miocene Epoch and the Early Pliocene Epoch.

**Key words:** *Parapenaeopsis hardwickii*; 16S rRNA; CO I gene; sequence analysis; phylogenetic analysis

**Corresponding author:** LIU Ping. E-mail: liuping@ysfri.ac.cn

**Funding projects:** National Science and Technology Basic Conditions Platform (2016DKA30470); National Shrimp Industry Technology System (CARS-47)