

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.18033

基于 COI 和 16S rRNA 的库页岛马珂蛤遗传多样性和分子系统进化研究

孙明媛^{1,2}, 朱锐^{1,2}, 孙晓晴¹, 张研¹, 李尚琪¹, 王红伟¹, 李炯棠¹

1. 中国水产科学研究院, 农业农村部水生动物基因组学重点实验室, 北京 100141;

2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 本研究以库页岛马珂蛤(*Pseudocardium sachalinense*)为研究对象, 讨论 COI 和 16S rRNA 两种 DNA 条形码在贝类的遗传多样性、分子进化和种类鉴定的适用性, 并利用两种条形码评估库页岛马珂蛤的遗传多样性。本文在获得库页岛马珂蛤线粒体全基因组的基础上, 测序获得库页岛马珂蛤群体的 COI 和 16S rRNA 序列, 发现 COI 基因核苷酸多样性为 0.00195, 高于 16S rRNA 核苷酸多样性(0.00073)。基于 COI 基因的单倍型多样性为 0.76, 大于 16S rRNA 的单倍型多样性(0.318)。其次, 用全线粒体基因组构建 8 种贝类的系统进化树为参考, 发现基于 COI 和 16S rRNA 的系统进化树与参考一致, 提示这两种条形码片段可用于推断贝类的分子进化关系。最后, 分别对马珂蛤科和帘蛤科 15 属 17 种贝类的 COI 基因和 16SrDNA 进行序列比较, 发现 COI 基因和 16S rRNA 的种间遗传距离均是种内距离的 62 倍。以上结果说明, 16S rRNA 与 COI 基因一样, 能有效地构建马珂蛤科和帘蛤科的系统发育关系和物种鉴定, 但在分析库页岛马珂蛤的遗传多样性时利用 COI 基因比 16S rRNA 能发现更多的遗传变异。

关键词: DNA 条形码; COI; 16S rRNA; 马珂蛤科; 帘蛤科; 遗传多样性

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)04-0891-11

库页岛马珂蛤(*Pseudocardium sachalinense*), 又称北极贝, 是一种主要生活在北太平洋潮下带 5~15 m 深的沙底浅海区双壳纲冷水性贝类^[1]。从分子水平上研究该物种的遗传结构特征, 可以了解该物种适应低温的分子机制。作为一种经济型贝类, 其富含不饱和脂肪酸, 特别是 Omega 3 和 Steresterol B 能降低体内胆固醇含量^[2]。近几年来, 持续的捕捞和气候变化给使得北极贝的养殖区域逐渐缩小。Horii 等^[3]发现北极贝的养殖深度从水下 3~13 m 深缩小到水下 7~13 m 深。在开展北极贝的人工繁殖、多样性保护以及可持续利用的同时, 急需评估北极贝的遗传多样性。但是目前有关北极贝的遗传多样性方面研究尚未见有报道。DNA 条形码技术为评估物种的遗传多样性提供

快速而简便的策略^[4-6]。

动物线粒体基因组上的细胞色素 C 氧化酶亚基 I (cytochrome C oxidase subunit I, COI) 基因和 16S rRNA 是两种常见的 DNA 条形码基因^[7-8], 广泛应用于遗传多样性评估、系统进化和种类鉴定等领域。但是二者在不同物种的鉴别能力和评估群体遗传多样性有差异。Xia 等^[9]认为在亚洲蛸螺中 COI 基因要比 16S rRNA 更适合做 DNA 条形码。但 Zheng 等^[10]发现在水螅虫中 16S rRNA 作为 DNA 条形码的效果比 COI 基因更好。这两种 DNA 条形码已应用于部分贝类的序列分析^[11-12]。但目前尚未利用这两种 DNA 条形码研究北极贝的遗传多样性、分子进化和种类鉴定。本研究在获得北极贝全长线粒体基因组的基础上, 通过扩

收稿日期: 2018-01-25; 修订日期: 2018-04-08.

基金项目: 科技部科技基础性工作专项(2013FY110700); 中国水产科学研究院基本业务费项目(2014A11JC07).

作者简介: 孙明媛(1992-), 硕士研究生, 研究方向为生物信息学. E-mail: 2308168595@qq.com

通信作者: 李炯棠, 副研究员, 从事生物信息学研究. E-mail: lijtc@cafs.ac.cn

增和测序 COI 和 16S rRNA 两种 DNA 条形码序列,分析北极贝的系统进化和遗传多样性,为研究北极贝的系统进化和种质资源保护提供数据支持;并评估这两种 DNA 条形码在贝类分子进化、遗传多样性和种类鉴定的结果一致性,为在上述研究中选择合适的 DNA 条形码提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 样品采集及 DNA 提取

本研究采集 101 个来自北太平洋地区的北极贝个体。采用 DNeasy Blood&Tissue Kit (QIAGEN)试剂盒按照说明书提取北极贝肌肉组织的基因组 DNA,并保存于-20℃备用。

1.2 全基因组测序、拼接及基因预测

选择一个个体的基因组 DNA,经过片段化和加测序接头等一系列步骤,构建一个插入片段大小为 300 bp 的测序文库。使用 Illumina HiSeq 4000 进行双末端测序,每个方向测序长度为 150 bp。利用 SolexaQA^[13]软件去除测序原始 reads 中的低质量碱基和短 reads。使用 SOAPdenovo^[14]按照默认参数,将获得的 reads 组装成 contig。使用 BLAT^[15]将 contig 与近缘贝类 *Macra chinensis* (GenBank 序列号: EF043341.1)的线粒体基因组进行同源检索。获得的同源 contig,再通过 SSPACE^[16]拼接成一条长序列。最后利用 Gapcloser^[14]结合双末端测序 read 补全该长序列上的空洞区域,以获得完整的线粒体基因组。利用 MITOS^[17]预测编码蛋白基因, tRNA 和 rRNA。用 Sequin 整理注释结果并递交至 GenBank 数据库(序列号: MG431821)。利用 OGDRAW 绘制线粒体图谱^[18]。

1.3 COI 基因和 16S rRNA 的 PCR 扩增、测序

分别以 101 个个体的基因组 DNA 为模板,扩增 COI 基因片段和 16S rRNA。COI 基因片段的扩增引物为 F: 5'-GGTCAACAAATCATAAAGAT-ATTGG-3', R: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAA-AAATCA-3'^[19]。16S rRNA 扩增引物为: F: 5'-C-GCCTGTTTATCAAAAACAT-3', R: 5'-CCGGTC-TGAACTCAGATCACGT-3'^[20]。PCR 反应体系为 20μL,包括上下游引物各 0.5 μL、含 Taq 酶的 PCR 混合反应液(北京康为世纪生物科技有限公司)

10 μL,基因组 DNA 模板 1 μL,加双蒸去离子水至总体积 20 μL。PCR 样品在 GeneAmp PCR System 9700 型 PCR 仪(ABI)上进行扩增。扩增条件为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 45 s,在适宜的退火温度下退火 1 min, 72℃ 延伸 60 s,循环 35 次;最后 72℃ 延伸 10 min。COI 基因和 16S rRNA 的适宜退火温度分别为 54℃ 和 44℃。扩增产物送至北京天一辉远生物技术有限公司测序。

对于每一个测序产物,去除两端的低质量碱基,利用 DNASTar 软件包对正反向序列进行拼接。将所得序列同时在 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)和 BOLD (barcode of life database)网站进行同源比对,获得与之最相似的序列,确认是否为 COI 基因或者 16S rRNA。为比较利用 COI 基因和 16S rRNA 分析北极贝遗传多样性的差异,保留同时有 COI 基因和 16S rRNA 的个体。

1.4 基因序列下载

为评估 COI 基因和 16S rRNA 用于构建物种系统发育关系的准确性,从 GenBank 下载帘蛤目 7 个物种的线粒体全基因组序列(表 1),分别属于马珂蛤科、帘蛤科和满月蛤科(作为外类群)。

表 1 马珂蛤科和帘蛤科线粒体全基因组信息
Tab. 1 Mitochondrial genomes of eight species in Mactridae and Veneridae

科 family	物种 species	GenBank 序列号 GenBank accession
满月蛤科 Lucinidae	<i>Loripes lacteus</i>	EF043341.1
帘蛤科 Veneridae	织锦巴非蛤 <i>Paphia textile</i>	NC_016890.1
帘蛤科 Veneridae	菲律宾帘蛤 <i>Ruditapes decussatus</i>	NC_035757.1
帘蛤科 Veneridae	斧文蛤 <i>Meretrix lamarckii</i>	NC_016174.1
帘蛤科 Veneridae	青蛤 <i>Cyclina sinensis</i>	KU097333.1
马珂蛤科 Mactridae	中国蛤蜊 <i>Macra chinensis</i>	NC_025510.1
马珂蛤科 Mactridae	西施马珂蛤 <i>Coelomactra antiquata</i>	JN692486.1
马珂蛤科 Mactridae	库页岛马珂蛤 <i>Pseudocardium sachalinense</i>	MG431281

为利用 COI 和 16S rRNA 研究遗传距离,本研究从测序获得的 COI 基因和 16S rRNA 序列分

别随机挑选 2 个北极贝个体的序列。另外从 NCBI 16S rRNA 序列。所分析物种的 COI 基因和 16S rRNA 基因的相关信息如表 2 所示。

表 2 马珂蛤科与帘蛤科 15 属 17 种贝类 COI 和 16S rRNA 信息
Tab. 2 Information of COI gene and 16S rRNA from 17 species in Mactridae and Veneridae

序号 No.	物种 species	属 genus	科 family	COI GenBank 序列号 GenBank accession	16S rDNA GenBank 序列号 GenBank accession
Gp_1	中国蛤蜊 <i>Mactra chinensis</i>	蛤蜊属 <i>Mactra</i>	马珂蛤科 Mactridae	KC205926.1 KC205925.1	DQ356386.1 JN674599.1
Gp_2	西施马珂蛤 <i>Coelomactra antiquata</i>	蛤蜊属 <i>Coelomactra</i>	马珂蛤科 Mactridae	HQ009290.1 HQ009289.1	FJ653658.1 FJ653657.1
Gp_3	曲水獭马珂蛤 <i>Lutraria arcuata</i>	獭蛤属 <i>Lutraria</i>	马珂蛤科 Mactridae	JN674603.1 JN674602.1	JN674567.1 JN674566.1
Gp_4	<i>Mactra alta</i>	蛤蜊属 <i>Mactra</i>	马珂蛤科 Mactridae	JN674620.1 JN674619.1	JN674584.1 JN674583.1
Gp_5	楔形蛤蜊 <i>Rangia cuneata</i>	<i>Rangia</i>	马珂蛤科 Mactridae	KT959440.1 KT959412.1	KP052753.1 KP052752.1
Gp_6	尼可巴马珂蛤 <i>Meropesta nicobarica</i>	立蛤属 <i>Meropesta</i>	马珂蛤科 Mactridae	KX713478.1 JN674606.1	KX713234.1 JN674570.1
Gp_7	北极贝 <i>Pseudocardium sachalinense</i>	马珂蛤属 <i>Pseudocardium</i>	马珂蛤科 Mactridae	JN674605.1 JN674604.1 本研究	JN674568.1 KP090055.1 本研究
Gp_8	<i>Mactra cumingii</i>	蛤蜊属 <i>Mactra</i>	马珂蛤科 Mactridae	JN674612.1 JN674611.1	JN674576.1 JN674575.1
Gp_9	侏儒蛤 <i>Mulinia lateralis</i>	<i>Mulinia</i>	马珂蛤科 Mactridae	KT959431.1 KT959410.1	KT959503.1 KT959494.1
Gp_10	短嘴簾蛤 <i>Callista brevisiphonata</i>	<i>Callista</i>	帘蛤科 Veneridae	KY872701.1 HM124569.1	JN969934.1 HM124677.1
Gp_11	青蛤 <i>Cyclina sinensis</i>	青蛤属 <i>Cyclina</i>	帘蛤科 Veneridae	KP976217.1 KP976216.1	DQ356379.1 HM124681.1
Gp_12	枝条纵帘蛤 <i>Gafrarium dispar</i>	加夫蛤属 <i>Gafrarium</i>	帘蛤科 Veneridae	HQ703094.1 HQ703093.1	DQ356372.1 HM124692.1
Gp_13	<i>Gemma gemma</i>	<i>Gemma</i>	帘蛤科 Veneridae	KU905996.1 KF644283.1	KC429299.1 GQ166563.1
Gp_14	裂纹哥特蛤 <i>Katelsia hiantina</i>	<i>Katelsia</i>	帘蛤科 Veneridae	GQ855257.1 GQ855256.1	JN969943.1 HM124699.1
Gp_15	日本格特蛤 <i>Marcia japonica</i>	蛤蜊属 <i>Marcia</i>	帘蛤科 Veneridae	GQ855262.1 GQ855261.1	DQ356367.1 HM124700.1
Gp_16	斧文蛤 <i>Meretrix lamarckii</i>	文蛤属 <i>Meretrix</i>	帘蛤科 Veneridae	HQ703191.1 HQ703190.1	DQ389105.1 HM124704.1
Gp_17	菲律宾帘蛤 <i>Ruditapes decussatus</i>	帘蛤属 <i>Ruditapes</i>	帘蛤科 Veneridae	KC789433.1 KC789432.1	HQ634141.1 JF808190.1

1.5 遗传多样性、系统发育和遗传距离分析

利用测序获得的 COI 基因和 16S rRNA 序列研究北极贝的群体多样性。分别使用 MEGA^[21]进行同源序列比对, 用 DnaSP 软件统计多态位点数(number of polymorphic sites)和突变位点总数(total number of mutations)、核苷酸多样性(nucleotide diversity, P_i)、单倍型数(number of haplotype, H)、单倍型多样性(haplotype diversity,

H_d)等。

分别利用上述 8 种贝类线粒体全基因组蛋白质序列, COI 基因片段和 16S rRNA 序列构建系统发育树。提取每个线粒体全基因组上所有的蛋白质序列, 按照北极贝基因顺序排列, 使用 MEGA6^[21]软件利用最大似然法(maximum likelihood, ML)构建系统发育树。参数分别为 1000 次重复抽样评估, 替换模型为 Jones-Taylor-Thornton

(JTT)。将扩增所得北极贝 COI 片段利用 BLASTN 比对到其他 7 种贝类线粒体全基因组, 获得最相似的同源片段, 使用 MEGA6 软件构建 ML 系统发育树。同理, 获得其他 7 种贝类线粒体全基因组上与北极贝 16S rRNA 片段的同源序列, 并构建系统发育树。

利用来自马珂蛤科(9 种)和帘蛤科(8 种)共 17 个物种的 COI 基因和 16S rRNA 序列, 使用 MEGA6 软件, 基于 Kimura-2-parameter 模型计算遗传距离。

2 结果与分析

2.1 北极贝线粒体全基因组结构特征

本研究获得 146033213 对高质量的 illumina 测序片段, 提交至 NCBI 的 SRA 数据库(SRA 编号: SRX3412216)。拼接后线粒体全基因组总长为 17978 个碱基, 其中 A 含量为 24.26%, C、G、T 含量分别为 15.67%、24.93%和 35.13%。

该基因组上有 12 个蛋白编码基因、23 个 tRNA 基因和 2 个 rRNA 基因。12 个蛋白编码基因共编码 3920 个氨基酸, 碱性氨基酸(R 和 K) 216 个, 酸性氨基酸(D 和 E) 201 个, 极性氨基酸(N、C、Q、S、T 和 Y) 954 个, 非极性氨基酸(A、I、L、F、W 和 V) 1801 个, 非极性氨基酸为主。此外, 在 12 种蛋白质中, 利用率最高的氨基酸为 L 和 S, 利用率最低的为 Q 和 R, 疏水性氨基酸明显高于亲水性氨基酸(表 3)。结果表明该线粒体的蛋白主要为疏水蛋白。12 个蛋白质编码基因的起始子为 ATG 或 ATA, 有 5 个蛋白质编码基因用 TAA 作终止子, 3 个蛋白质编码基因(COX3、NAD6 和 NAD4L)的终止密码子为 TAG, 含有不完整 T 为终止子的蛋白质编码基因包括 COX2、COB、NAD4 和 ATP6。23 个 tRNA 基因中包括两个 tRNA^{Ser}(反密码子分别为 AGA 和 TCA)、两个 tRNA^{Leu}(反密码子分别为 TTA 和 CTA)以及重复的 tRNA^{Met} (反密码子均为 ATG)。

表 3 蛋白编码基因的氨基酸使用情况
Tab. 3 Amino usage of the PCGs

基因 gene	Ho. 1	Ho. 2	Lo. 1	Lo. 2
ATP6	S(13.15%)	F/L(12.35%)	H(0.80%)	Q/R(1.59%)
COX1	F(10.66%)	L(10.48%)	Q(0.53%)	C(1.42%)
COX2	G/S(9.20%)	L(8.46%)	Q(1.74%)	R(1.99%)
COX3	L(10.99%)	F(9.3%)	Q(0.85%)	C(1.41%)
COB	L(12.27%)	F(9.14%)	E(1.57%)	Q/R(2.09%)
NAD1	L(13.51%)	V(10.81%)	H/Q(1.01%)	C/D/W(1.69%)
NAD2	L(14.41%)	S(13.26%)	H(0.58%)	D(0.86%)
NAD3	L(14.58%)	F(12.50%)	Q/T/W(0.69)	K(1.39%)
NAD4	L(14.20%)	S(10.27%)	R(0.91%)	H(1.21%)
NAD5	L(15.51%)	S(11.8%)	Q(0.84%)	H(1.69%)
NAD6	L(15.09%)	V(12.58%)	Q(0.63%)	D/E/H/N(1.26%)
NAD4L	L(15.62%)	S(13.54%)	D/W(0.00%)	N/P/K(1.04%)

注: Ho.1 表示使用频率最高的氨基酸, Ho.2 表示频率次高的氨基酸, Lo.1 表示使用频率最低的氨基酸, Lo.2 表示频率次低的氨基酸。
Note: Ho.1 means the amino acid with the highest frequency; Ho.2 means the amino acid with the second highest frequency; Lo.1 means the amino acid with the lowest frequency; Lo.2 means the amino acid with the second lowest frequency.

2.2 北极贝遗传多样性分析

本研究最终有 45 个体同时扩增得到 COI 基因和 16S rRNA 片段。将 45 条北极贝 COI 序列与 NCBI 中下载的马珂蛤科与帘蛤科的 COI 序列, 经比对校正后, 所获得一致序列的片段长度为

668 bp。利用 45 条北极贝 COI 基因片段评估北极贝的遗传多样性。结果表明, 在 668 个位点中有 22 个变异位点(3.29%), 包含 16 个转换位点和 6 个颠换位点, 转换与颠换的比为 2.67。共检测到 19 个单倍型, 单倍型多样性(H_d)为 0.760 ± 0.068 ,

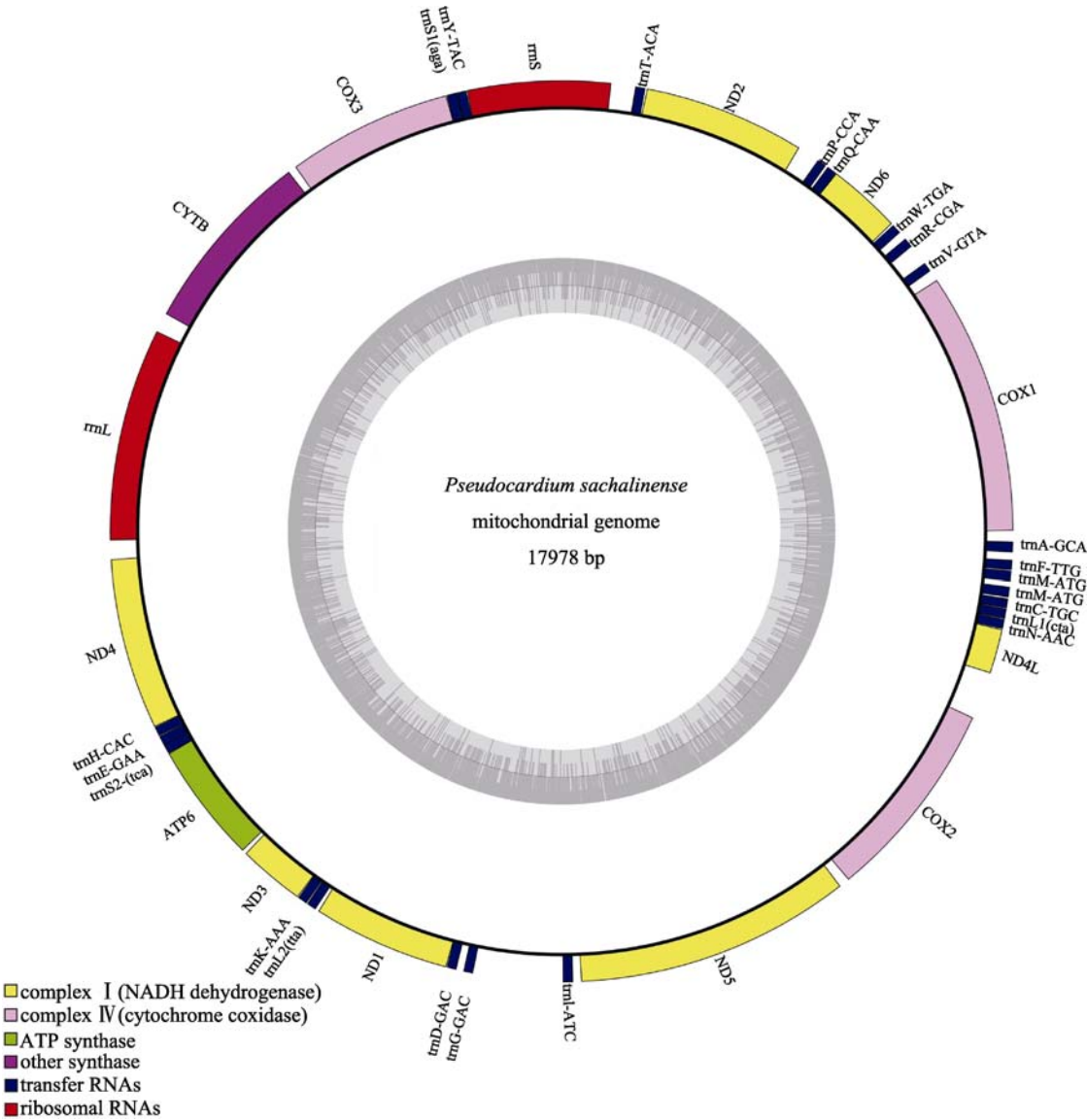


图 1 北极贝线粒体基因组全序列图谱

Fig. 1 Gene map of mitochondrial genome of *Pseudocardium sachalinense*

核苷酸多样性(P_i)为 0.00195, 核苷酸差异平均数(K)为 1.257(表 4)。

将 45 条北极贝的 16S rRNA 序列与 NCBI 中下载的马珂蛤科与帘蛤科的 16S rRNA 序列, 经比对校正后, 所获得一致序列的片段长度为 472 bp。利用 45 条北极贝 16S rRNA 序列评估北极贝的遗传多样性。结果表明, 在 472 个位点中变异位点共有 8 个(1.69%), 包含 6 个转换位点和 2 个颠换位点, 转换与颠换的比为 3。共检测到 4 个单倍型, 单倍型多样性(H_d)为 0.318 ± 0.086 , 核苷酸多样性(P_i)为 0.00073, 核苷酸差异平均数(K)

为 0.337(表 4)。基于 COI 基因和 16S rRNA 的序

表 4 北极贝种群 COI 和 16S rRNA 基因序列多样性

基因 gene	遗传多样性 genetic diversity			
	K	P_i	H_d	H
COI	1.257	0.00195	0.760 ± 0.068	19
16S rRNA	0.337	0.00073	0.318 ± 0.086	4

注: K 表示核苷酸差异平均数, P_i 表示核苷酸多样性, H_d 表示单倍型多样性, H 表示单倍型数目。
Note: K means the average number of nucleotide differences; P_i means nucleotide diversity; H_d means haplotypes diversity; H means the number of haplotypes.

列分析均提示北极贝的群体多样性较低。

2.3 马珂蛤科和帘蛤科的系统进化

为研究北极贝的遗传背景和分类地位，将北极贝粒体基因组全蛋白序列与其他 7 种双壳贝类线粒体基因组全蛋白序列进行多重序列比对后，以满月蛤科的 *L. lacteus* 作外群。系统进化树由两大支构成，一支是帘蛤科的 4 个物种组成，另一支由马珂蛤科的 3 个物种组成；这两支再汇合成

一大支(图 2a)。进化分析表明，北极贝属于马珂蛤科；在帘蛤目中，相比满月蛤科，马珂蛤科与帘蛤科进化距离最近。

分别利用这八种贝类的 COI 基因一致性序列(约 668 bp)和 16S rRNA 一致性序列(约 472 bp)构建系统进化树(图 2b 和图 2c)。两种系统进化树都表明北极贝与马珂蛤科的其他两个物种聚在一起。这与上述构建的系统进化树结果一致。

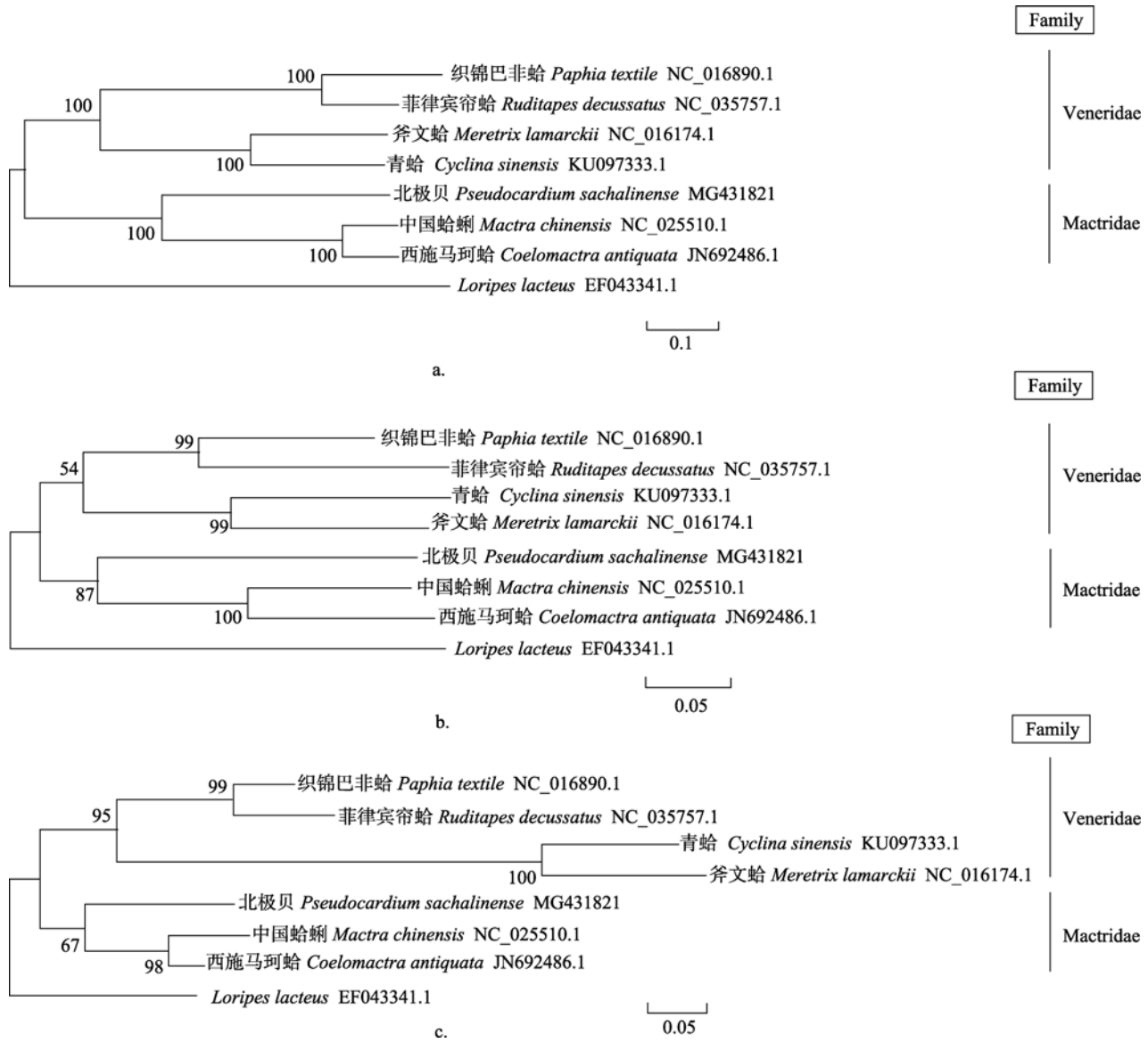


图 2 三种数据构建的系统进化树

a. 利用线粒体蛋白构建进化树; b. 利用 COI 基因构建进化树; c. 利用 16S rRNA 构建进化树.
数字表示 1000 次重复的 bootstrap 值. 标尺分别代表遗传距离单位为 0.1/百万年和 0.05/百万年.

Fig. 2 Phylogenetic tree constructed using mitochondrial proteins, COI and 16S rRNA
a. tree using mitochondria proteins; b. tree using COI gene; c. tree using 16S rRNA. The number is the bootstrap value in 1000 replications. Scales are the genetic distances of 0.1/million years and 0.05/million years.

2.4 遗传距离

基于 Kimura-2-parameter 模型, 分别利用 COI 序列和 16S rRNA 计算马珂蛤科和帘蛤科 17 种贝类的种内和种间遗传距离。利用 COI 序列计算的结果表明, 17 种帘蛤目 COI 基因种内遗传距离平均值为 0.019, 种间遗传距离平均值为 1.17, 种间遗传距离是种内距离的 62 倍, 符合 Hebert 等^[8]提出的“10×规则”, 即 COI 序列的种间遗传距离为种内遗传距离的 10 倍以上才足以用来区分物种。因此, COI 序列可用于科间的物种鉴定。

表 5 显示马珂蛤科 9 种贝类的种内和种间遗传距离。马珂蛤科 COI 基因种内遗传距离平均值为 0.019, 种内遗传距离最大的是 *M. lateralis* (0.132)。北极贝的种内遗传距离为 0.002, 仅比 *R. cuneate* (0)略高, 比其他 6 种马珂蛤科贝类的低。

马珂蛤科的种间遗传距离平均值为 0.286, 种间遗传距离最大的是 *L. arcuata* 和 *M. nicobarica* (0.359), 遗传距离最小的是 *C. antiquata* 和 *P. sachalinense* (0.141)。种间遗传距离是种内遗传距离的 15.9 倍, 表明 COI 序列也可用于马珂蛤科内的物种鉴定。

表 6 显示帘蛤科 COI 基因的种内遗传距离平均值为 0.02。其中, *G. dispar* 的种内遗传距离最大 (0.144), 其他贝类的种内距离都不超过 0.01。COI 序列种间遗传距离平均值为 0.349, 最大的是 *G. dispar* 和 *M. japonica*(0.492), 遗传距离最小的是 *K. hiantina* 和 *M. japonica*(0.205)。相比而言, 帘蛤科各种贝类之间遗传距离较大, 马珂蛤科的种间遗传距离较小。

基于 16S rRNA 序列计算的结果表明, 17 种帘

表 5 马珂蛤科 COI 基因的种间遗传距离和种内遗传距离
Tab. 5 Genetic distances of inter-species and intra-species in Mactridae using COI sequences

	Gp_1	Gp_2	Gp_3	Gp_4	Gp_5	Gp_6	Gp_7	Gp_8	Gp_9
Gp_1	0.005								
Gp_2	0.190	0.010							
Gp_3	0.259	0.257	0.005						
Gp_4	0.236	0.226	0.291	0.002					
Gp_5	0.268	0.279	0.274	0.347	0.000				
Gp_6	0.296	0.331	0.359	0.316	0.302	0.009			
Gp_7	0.207	0.141	0.253	0.250	0.244	0.321	0.002		
Gp_8	0.299	0.288	0.298	0.322	0.211	0.306	0.286	0.003	
Gp_9	0.314	0.313	0.284	0.356	0.278	0.329	0.301	0.267	0.132

注: 对角线的数字表示种内的遗传距离, 其他数字表示对应列和行的物种间遗传距离。
Note: The number on the diagonal line represents the intra-species genetic distance. Other numbers are the inter-species genetic distances between two species in the corresponding column and row.

表 6 帘蛤科 COI 基因的种间遗传距离和种内遗传距离
Tab. 6 Genetic distances of inter-species and intra-species in Veneridae using COI sequences

	Gp_10	Gp_11	Gp_12	Gp_13	Gp_14	Gp_15	Gp_16	Gp_17
Gp_10	0.008							
Gp_11	0.253	0.002						
Gp_12	0.434	0.408	0.144					
Gp_13	0.257	0.234	0.449	0.002				
Gp_14	0.373	0.369	0.457	0.349	0.003			
Gp_15	0.383	0.383	0.492	0.366	0.205	0.000		
Gp_16	0.223	0.252	0.416	0.278	0.343	0.388	0.000	
Gp_17	0.367	0.404	0.463	0.384	0.251	0.246	0.354	0.003

注: 对角线的数字表示种内的遗传距离, 其他数字表示对应列和行的物种间遗传距离。
Note: The number on the diagonal line represents the intra-species genetic distance. Other numbers are the inter-species genetic distances between the two species in the corresponding column and row.

蛤目物种的种内遗传距离平均值为 0.018, 种间遗传距离平均值为 1.117, 种间遗传距离是种内距离的 62 倍, 也符合“10×规则”。因此, 16S rRNA 序列可用于科间的物种鉴定。表 7 显示马珂蛤科 9 种贝类的种内和种间遗传距离。16S rRNA 种内遗传距离平均值为 0.016, 种内遗传距离最大的是 *C. antiquata* (0.075)。北极贝的种内遗传距离为 0, 与 *M. alta* 和 *M. chinensis* (0)相同, 比其他 6 种马珂蛤科贝类的低。马珂蛤种间遗传距离平均值为 0.273, 种间遗传距离最大的是 *M. chinensis* 和 *M. lateralis*(0.366); 种间遗传距离最小的是 *C. antiquata* 和 *P. sachalinense* (0.1)。种间遗传距离是种内距离的 17.1 倍, 表明 16S rRNA 序列也可用于马珂蛤科内的物种鉴定。

在帘蛤科 8 种贝类中, 16S rRNA 种内遗传距离平均值为 0.02(表 8), 种内遗传距离最大的是 *C. sinensis* (0.135), 其他贝类种内距离都不超过 0.01。16S rRNA 序列种间遗传距离平均值为 0.327, *M. lamarckii* 和 *R. decussatus* 的种间遗传距离最大 (0.511), 种间遗传距离最小的是 *K. hiantina* 和 *M. japonica* (0.165)。利用 16S rRNA 序列分析发现, 马珂蛤科的种间遗传距离比帘蛤科的种间遗传距离小, 同基于 COI 序列分析的结果一致。

3 讨论

3.1 北极贝线粒体基因组结构特征分析

GenBank 目前仅收录 4 种马珂蛤科贝类的线粒体全基因组^[22-24]。本研究证明北极贝属于马

表 7 马珂蛤科 16S rRNA 的种间遗传距离和种内遗传距离
Tab. 7 Genetic distances of inter-species and intra-species in Mactridae using 16S rRNA sequences

	Gp_1	Gp_2	Gp_3	Gp_4	Gp_5	Gp_6	Gp_7	Gp_8	Gp_9
Gp_1	0.005								
Gp_2	0.115	0.075							
Gp_3	0.364	0.334	0.000						
Gp_4	0.231	0.208	0.352	0.000					
Gp_5	0.316	0.317	0.308	0.307	0.003				
Gp_6	0.337	0.339	0.307	0.321	0.261	0.005			
Gp_7	0.104	0.100	0.348	0.207	0.293	0.315	0.000		
Gp_8	0.366	0.319	0.282	0.318	0.122	0.232	0.330	0.003	
Gp_9	0.296	0.272	0.254	0.300	0.216	0.245	0.244	0.240	0.056

注: 对角线的数字表示种内的遗传距离, 其他数字表示对应列和行的物种间遗传距离。
Note: The number on the diagonal line represents the intra-species genetic distance. Other numbers are the inter-species genetic distances between the two species in the corresponding column and row.

表 8 帘蛤科 16S rRNA 的种间遗传距离和种内遗传距离
Tab. 8 Genetic distances of inter-species and intra-species in Veneridae using 16S rRNA sequences

	Gp_10	Gp_11	Gp_12	Gp_13	Gp_14	Gp_15	Gp_16	Gp_17
Gp_10	0.010							
Gp_11	0.219	0.135						
Gp_12	0.292	0.290	0.007					
Gp_13	0.172	0.240	0.245	0.000				
Gp_14	0.326	0.355	0.270	0.299	0.007			
Gp_15	0.361	0.396	0.317	0.356	0.165	0.003		
Gp_16	0.323	0.381	0.412	0.356	0.371	0.455	0.000	
Gp_17	0.465	0.430	0.344	0.399	0.191	0.223	0.511	0.000

注: 对角线的数字表示种内的遗传距离, 其他数字表示对应列和行的物种间遗传距离。
Note: The number on the diagonal line represents the intra-species genetic distance. Other numbers are the inter-species genetic distances between the two species in the corresponding column and row.

珂蛤科, 拼接获得的北极贝线粒体全基因组丰富了马珂蛤科的线粒体基因组资源。大多数贝类的线粒体基因组的基因组成相对稳定, 包括 13 个编码蛋白基因、2 个 rRNA 和 22 个 tRNA^[25]。但是在双壳贝类各物种间, 线粒体基因组在基因结构和基因排列顺序等方面显示多样性。以本研究所选择的 5 个满月蛤科和帘蛤科的物种为例, 线粒体均包含 *ATP8* 基因^[26]。马珂蛤科的所有物种均缺失 *ATP8* 基因。Meng 等^[27]观察到西施马珂蛤缺失 *ATP8*。*ATP8* 基因是 ATP 合酶的一个亚基, 参与 ATP 合成和细胞的能量产生。*ATP8* 基因的缺失可能与马珂蛤科物种生存于水温较低的环境有关: 能量代谢水平较低, 导致 *ATP8* 基因缺失^[25]。不同于 *ATP8* 基因有明显科间的特异性, 不同物种间 tRNA 数目不一, 且组成也不尽相同。马珂蛤科的 tRNA 数目分布在 21~23 个, 北极贝有 23 个 tRNA。在帘蛤科内, 除了 *P. textile* 有 23 个 tRNA 外, 其余物种均有 22 个 tRNA。

除了基因组成在不同物种有差别外, 基因排列顺序也有差别。在马珂蛤科中, 系统进化分析将 *C. antiquata* 和 *M. chinensis* 聚类在一起, 它们的 12 个线粒体蛋白顺序一致, 而北极贝的 *ND1* 和 *ND2* 基因在线粒体上顺序与上述两个物种不一致。在帘蛤科中, *P. textile* 和 *R. decussatus* 聚类在一起, 13 个线粒体蛋白顺序在这两个物种一致。同样地, 聚类在一起的 *M. lamarckii* 和 *C. sinensis* 中观察到基因顺序的一致性。这些结果表明, 在进化距离相近的物种间, 编码基因排列顺序一致。但是即使在进化距离相近的物种间, tRNA 和 rRNA 顺序也有差异。因此相比于 tRNA 和 rRNA, 编码基因的组成、排列顺序和同源性更能指征物种间的进化关系。贝类线粒体基因组在基因组成和排列方式等方面的多样性可能反映了不同物种的环境适应性和进化过程^[27]。

3.2 两种 DNA 条形码在贝类的适用性分析

COI 基因和 16S rRNA 已分别应用于贝类的序列分析^[11-12]。但是目前尚未有研究对这两种 DNA 条形码在贝类的遗传多样性、分子进化和种类鉴定的结果进行系统和详细的比较。陈丽梅等^[28]利用 16S rRNA 和 COI 基因片段评估 3 种蛭类

线粒体的种间遗传距离, 发现二者之间结果吻合度高。An 等^[29]比较 16S rRNA 和 COI 基因分析 6 种太平洋鲍的系统进化, 发现 COI 基因能更有效构建系统进化关系。本研究选择北极贝以及马珂蛤科和帘蛤科, 从遗传多样性、分子进化和种类鉴定三个方面详细分析 COI 片段和 16S rRNA 序列作为 DNA barcode 的适用性。首先, 在评估北极贝遗传多样性方面, 基于 COI 基因的核苷酸多样性(P_i)为 0.00195, 高于基于 16S rRNA 基因的核苷酸多样性(P_i 为 0.00073), COI 序列在分析北极贝核苷酸多样性时比 16S rRNA 序列能发现更多的遗传变异。石林波等^[30]利用 COI 基因和 16S rRNA 序列研究福建华溪蟹的遗传多样性时, 也发现 COI 序列的序列变异率要高于 16S rRNA 基因。这与 16S rRNA 基因较 COI 基因明显保守有关。这些结果表明 COI 序列更适用于遗传多样性分析^[31]。其次, 本研究分别选用线粒体所有编码蛋白基因、COI 片段和 16S rRNA 片段构建系统发育树。除分支置信度和遗传距离有所差别, 这三种方法构建系统发育树的物种聚类结果一致, 表明 COI 基因和 16S rRNA 片段可用于构建系统进化关系。再次, 在评估科间的种间和种内遗传距离方面, 总体上这两种条形码计算的种间遗传距离均超过种内遗传的 10 倍以上, 符合“10×规则”^[8], 表明二者均可用于马珂蛤科和帘蛤科之间的物种鉴定。但是二者在评估科内的种内遗传距离和种间遗传距离有一定差异。譬如, 在马珂蛤科内, 基于 COI 基因评估发现种内遗传距离最大的是 *M. lateralis* (0.132), 而利用 16S rRNA 评估则发现种内遗传距离最大的是 *C. antiquata* (0.075)。基于 COI 基因评估发现种间遗传距离最大的是 *L. arcuata* 和 *M. nicobarica* (0.359), 利用 16S rRNA 评估则发现 *M. chinensis* 和 *M. lateralis* 种间遗传距离最大(0.366)。这些差异可能与 COI 基因和 16S rRNA 的不同变异速度相关。因此在评估种间和种内遗传距离时, 尽可能综合分析这两种 DNA 条形码的分析结果。

参考文献:

- [1] Plazzi F. The detection of sex-linked heteroplasmy in *Pseudocardium sachalinense* (Bivalvia: Mactridae) and its impli-

- cations for the distribution of doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA[J]. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 2015, 53(3): 205-210.
- [2] Tabakaeva O V, Tabakaev A V. Lipids and fatty acids from soft tissues of the bivalve mollusk *Spisula sachalinensis*[J]. *Chemistry of Natural Compounds*, 2017, 53(1): 16-20.
- [3] Horii T, Murakami O, Sakurai I. Effect of density on growth in Sakhalin surf clam *Pseudocardium sachaliense*[J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 2002, 68: 666-673.
- [4] Hebert P D, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2003, 270: 313-321.
- [5] Hebert P D, Ratnasingham S, deWaard J R. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species[J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2003, 270 (Suppl 1): S96-S99.
- [6] Shen Y J, Guan L H, Wang D Q. DNA barcoding and evaluation of genetic diversity in Cyprinidae fish in the mid-stream of the Yangtze River[J]. *Ecology and Evolution*, 2016, 6(9): 2702-1713.
- [7] Chen S Y, Wang J H, Chen W L, et al. Application of 16S rRNA and COI gene sequence analysis on grouper species identification[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2012(10): 124-130. [陈双雅, 王嘉鹤, 陈伟玲, 等. 16S rRNA 基因和 CO I 基因序列分析在石斑鱼物种鉴定中的应用[J]. *生物技术通报*, 2012(10): 124-130.]
- [8] Hebert P D, Stoeckle M Y, Zemlak T S, et al. Identification of birds through DNA barcodes[J]. *PLoS Biology*, 2004, 2(10): e312.
- [9] Yun X, Hai F G, Rui P, et al. COI is better than 16S rRNA for DNA barcoding Asiatic salamanders (Amphibia: Caudata: Hynobiidae)[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2012, 12(1): 48-56.
- [10] Zheng L M, He J R, Lin Y S, et al. 16S rRNA is a better choice than COI for DNA barcoding hydrozoans in the coastal waters of China[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2014, 33(4): 55-76.
- [11] Zhao T, Wu Q, Pan B P. Molecular phylogeny of Veneridae (Mollusca, Bivalvia) based on 16S rRNA sequences[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(6): 1500-1505. [赵婷, 吴琪, 潘宝平. 我国重要帘蛤科(Veneridae)贝类的 16S rRNA 序列系统学分析[J]. *海洋与湖沼*, 2013, 44(6): 1500-1505.]
- [12] Chen J, Li Q, Kong L, et al. How DNA barcodes complement taxonomy and explore species diversity: the case study of a poorly understood marine fauna[J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(6): e21326.
- [13] Cox M P, Peterson D A, Biggs P J. SolexaQA: At-a-glance quality assessment of Illumina second generation sequencing data[J]. *BMC Bioinformatics*, 2010, 11: 485.
- [14] Luo R B, Liu B H, Xie Y L, et al. SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read *de novo* assembler[J]. *GigaScience*, 2012, 1: 18.
- [15] Kent W J. BLAT—the BLAST-like alignment tool[J]. *Genome Research*, 2002, 12(4): 656-664.
- [16] Boetzer M, Henkel C V, Jansen H J, et al. Scaffolding pre-assembled contigs using SSPACE[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(4): 578-579.
- [17] Bernt M, Donath A, Juhling F, et al. MITOS: improved *de novo* metazoan mitochondrial genome annotation[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2013, 69(2): 313-319.
- [18] Lohse M, Drechsel O, Kahlau S, et al. OrganellarGenomeDRAW—a suite of tools for generating physical maps of plastid and mitochondrial genomes and visualizing expression data sets[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41: W575-W581.
- [19] Folmer O, Black M, Hoeh W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates[J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, 3(5): 294-299.
- [20] Ni H L, Kong L F, Huang S Q, et al. DNA barcoding and phylogeny in the family Mactridae (Bivalvia: Heterodonta): Evidence for cryptic species[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2012, 44: 164-172.
- [21] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2013, 3(12): 2725-2729.
- [22] Shen X, Meng P X, Chou H K, et al. Comparative mitogenomic analysis reveals cryptic species: A case study in Mactridae (Mollusca: Bivalvia)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2014, 12: 1-9.
- [23] Yuan Y, Kong L F, Li Q. Mitogenome evidence for the existence of cryptic species in *Coelomactra antiquate*[J]. *Genes & Genomics*, 2013, 35(6): 693-701.
- [24] Gan M H, Tan M H, Thai B T, et al. The complete mitogenome of the marine bivalve *Lutraria rhynchaena* Jonas 1844 (Heterodonta: Bivalvia: Mactridae)[J]. *Mitochondrial DNA Part A: DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, 2016, 27(1): 335-336.
- [25] Song W T, Gao X G, Li Y F, et al. Comparison of mitochondrial genomes of bivalves[J]. *Hereditas*, 2009, 31(11): 1127-1134. [宋文涛, 高祥刚, 李云峰, 等. 双壳贝类线粒体基因组结构的比较[J]. *遗传*, 2009, 31(11): 1127-1134.]
- [26] Liu B Z, Li Y, Zhang S P, et al. Complete mtDNA of *Meretrix lusoria* (Bivalvia: Veneridae) reveals the presence of an *atp8* gene, length variation and heteroplasmy in the control region[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D*:

- Genomics and Proteomics, 2010, 5(4): 256-264.
- [27] Xue P M, Zhao N N, Shen X, et al. Complete mitochondrial genome of *Coelomactra antiquata* (Mollusca: Bivalvia): The first representative from the family Mactridae with novel gene order and unusual tandem repeats[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 2012, 7(2): 175-179.
- [28] Chen L M, Kong X Y, Yu Z N, et al. Sequence comparison and phylogenetic analysis of mtDNA 16S rDNA and COI gene fragments in three species of razor shell[J]. Marine Science, 2005, 29(8): 27-32. [陈丽梅,孔晓瑜,喻子牛,等. 3种蛸类线粒体 16S rRNA 和 COI 基因片段的序列比较及其系统学初步研究[J]. 海洋科学, 2005, 29(8): 27-32.]
- [29] An H S, Jee Y J, Min K S, et al. Phylogenetic analysis of six species of pacific abalone (Haliotidae) based on DNA sequences of 16S rRNA and cytochrome c oxidase subunit I mitochondrial genes[J]. Marine Biotechnology (NY), 2005, 7(4): 373-380.
- [30] Su T F, Huang J H, Wu J F, et al. Genetic polymorphism of mitochondrial DNA sequence in *Babylonia areolata* and *Babylonia formosae*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(3): 369-376. [苏天凤, 黄建华, 吴进锋, 等. 2种东风螺线粒体基因序列多态性研究[J]. 中国水产科学, 2007, 14(3): 369-376.]
- [31] Shi L B, Zhao X Y, Wang Y, et al. Genetic diversity on mitochondrial DNA COI and 16S rRNA of *Sinopotamon fukienense*[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2013, 29(7): 671-675. [石林波, 张小燕, 汪雁, 等. 福建华溪蟹线粒体 DNA COI 和 16S rRNA 基因序列的遗传多样性[J]. 中国人兽共患病学报, 2013, 29(7): 671-675.]

Genetic diversity and phylogeny of *Pseudocardium sachalinense* based on COI and 16S rRNA barcoding

SUN Mingyuan^{1,2}, ZHU Rui^{1,2}, SUN Xiaoqing¹, ZHANG Yan¹, LI Shangqi¹, WANG Hongwei¹, LI Jiongtang¹

1. Key Laboratory of Aquatic Genomics, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: This study analyzed the phylogeny, genetic diversity, and species identification of *Pseudocardium sachalinense* using the COI gene and 16S rRNA. Firstly, we obtained the complete mitochondrial genome of *P. sachalinense* using Illumina sequencing. Compared with the mitochondrial genomes of the other close species, ATP8 was missing and tRNA^{Met} was duplicated in this genome. Based on the sequences of COI and 16S rRNA from the *P. sachalinense* population, the nucleotide diversities of the COI gene and 16S rRNA were 0.00195 and 0.00073, respectively. The haplotype diversity of the COI gene was 0.76, larger than that of 16S rRNA (0.318). Secondly, a phylogenetic tree based on the mitochondrial proteins of species in Mactridae and Veneridae were constructed using the maximum likelihood (ML) method. Using this tree as a reference, we also constructed the ML phylogenetic trees using COI and 16S rRNA genes, respectively. These two trees were consistent with the reference, suggesting that these two DNA barcodes could be applied to the phylogenetic analysis. Thirdly, we analyzed the genetic distances based on sequences of the COI gene and 16S rRNA from 17 species in Mactridae and Veneridae. The average inter- and intra-species Kimura-2-parameter (K2P) distances based on COI sequences were 1.17 and 0.019, respectively. The average inter- and intra-species Kimura-2-parameter (K2P) distances based on 16S rRNA sequences were 1.117 and 0.018, respectively. The results suggested that for both the COI gene and 16S rRNA, the average inter-species genetic distances were 62 times larger than the intra-species distances. These results indicated that 16S rRNA could function as the COI gene to efficiently construct the phylogenetic tree and species identification. However, the COI gene could be used more effectively than 16S rRNA to analyze the genetic diversity of *P. sachalinense*.

Key words: DNA barcode; COI; 16S rRNA; Mactridae; Veneridae; genetic diversity

Corresponding author: LI Jiongtang. E-mail: lijt@cafs.ac.cn