

2 种东风螺线粒体基因序列多态性研究

苏天凤, 黄建华, 吴进锋, 江世贵

(中国水产科学研究院 水产种质资源与养殖技术重点开放实验室, 南海水产研究所, 广东 广州 510300)

摘要:对来自粤东和粤西的方斑东风螺(*Babylonia areolata* (Link))和台湾东风螺(*Babylonia formosae* (Sowerby))的线粒体 16S rRNA 和 CO I 基因片段的序列进行分析, 并对其遗传变异进行了比较研究。得到的序列总长度分别为 506 bp (16S rRNA) 和 640 bp (CO I)。2 种东风螺序列的碱基组成均显示较高的 A+T 比例(16S rRNA 基因 63.5%, CO I 基因 62.4%)。对位排序比较表明, 16S rRNA 基因片段变异较小, 台湾东风螺和方斑东风螺各存在 1 个碱基变异位点; 方斑东风螺 CO I 片段有 12 个碱基存在变异, 包括 3 个简约信息位点和 9 个单一多态位点; 台湾东风螺 CO I 片段有 17 个碱基存在变异, 包括 4 个简约信息位点和 13 个单一多态位点。数据分析结果表明: 2 种东风螺线粒体的 CO I 基因比 16S rRNA 基因具有更高的多态性, CO I 基因序列更适用于东风螺种群的遗传多样性分析。方斑东风螺的平均核苷酸差异和核苷酸多样性分别为 2.68 和 0.004 2, 台湾东风螺则分别为 5.62 和 0.007 8, 说明台湾东风螺的遗传多样性高于方斑东风螺。无论是方斑东风螺和台湾东风螺, 粤东群体的平均核苷酸差异和核苷酸多样性都大于粤西群体, 说明粤东群体的遗传多样性高于粤西群体。[中国水产科学, 2007, 14(3): 369—376]

关键词:方斑东风螺; 台湾东风螺; 线粒体; 16S rRNA 基因; CO I 基因; 遗传多样性

中图分类号: Q959

文献标识码: A

文章编号: 1005—8737—(2007)03—0369—08

东风螺隶属于软体动物门(Mollusca), 腹足纲(Gastropoda), 前鳃亚纲(Prosobranchia), 新腹足目(Neogastropoda), 蛾螺科(Buccinidae), 东风螺属(*Babylonia*), 俗称花螺、泥螺、南风螺等, 是中国沿海重要的经济软体动物, 分布于热带、亚热带海域^[1]。其肉质鲜美, 是国内外市场十分畅销的优质海产贝类, 也是一种新兴的养殖品种。在中国的海南、广东和福建等省东风螺养殖业呈上升趋势, 在很大程度上代替了遭受病害重创的九孔鲍(*Haliotis diversicoloe aquatilis*)养殖业。分布在中国的东风螺主要种类有方斑东风螺(*Babylonia areolata* Link)、泥东风螺(*B. lutosa* Lamarck)和台湾东风螺(*B. formosae* Sowerby)3 种^[2]。

在动物分子分类和系统进化领域, 线粒体 mtDNA 因其具有分子小、结构简单、演化快速、群体内稳定性高、母系遗传、无重组、检测方便等优点而被广泛应用于分子标记、系统进化研究、遗传多样性分析及种类鉴定等方面^[3-6]。20 世纪 90 年代以来, 中国对方斑东风螺、台湾东风螺的繁殖生物学^[7-9]、

幼体生理生态学^[10-13]、成体摄食生理生态^[14-15]及生长发育特征等方面^[16]进行了研究。本研究利用序列分析法, 对来自粤东和粤西的方斑东风螺、台湾东风螺的线粒体 16S rRNA 和 CO I 基因片段的序列进行比较, 并分析 2 个不同地理群体的方斑东风螺和台湾东风螺的序列组成特性、系统关系以及序列多态性, 以期为进一步的遗传分析、种质鉴定和系统进化研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

粤东海域(YD)的方斑东风螺和台湾东风螺于 2005 年 5 月购自广东省惠来县, 粤西海域(YX)的方斑东风螺和台湾东风螺于 2005 年 7 月购自广东湛江市。所购东风螺均为捕螺船所获野生材料。运回实验室鉴定后取其腹足肌, 双蒸水清洗后—76 ℃冰箱保存备用。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 从购回的野生材料中

收稿日期: 2006—03—15; 修订日期: 2006—11—01。

基金项目: 广东省农业攻关项目(2004B20301015), 广东省科技计划项目(2005B60301006), 中国水产科学研究院青年基金(2003—青—01)。

作者简介: 苏天凤(1969—), 女, 副研究员, 从事渔业生物多样性保护与种质资源保存研究。E-mail: lu5555@sohu.com

通讯作者: 江世贵。E-mail: jiangsg@21cn.com

随机选取粤西方斑东风螺(7个)和台湾东风螺(5个),粤东方斑东风螺(5个)和台湾东风螺(5个),分别剪取其腹足肌约100 mg于1.5 mL离心管中剪碎,采用常规的“酚-氯仿”提取基因组DNA^[17]。

1.2.2 PCR扩增 引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成。16S rRNA基因引物序列为:16S AR,5'-CGC CTG TTT A(ATC)(CT) AAAAAC AT-3';16S BR,5'-CCG GTC TGA ACT CAG (AC)TC A(CT)G T-3'^[18]。CO I基因引物序列为:CO I L1490;5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3';CO I H2198;5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'^[19]。用于PCR反应的试剂购自宝生物工程(大连)有限公司。PCR反应在德国BIO-Metra T1Thermocycler PCR仪上进行。PCR反应总体积为50 μ L,其中10 $\times$ Ex Taq Buffer 5 μ L,Ex Taq polymerase 0.3 μ L (1.5 U),dNTPs(2.5 mmol $\cdot$ L⁻¹) 4 μ L,10 pmol $\cdot$ μ L⁻¹引物2 μ L,1 μ L模板DNA,其余为灭菌蒸馏水。16S rRNA基因扩增条件为:94 $^{\circ}$ C预变性5 min,94 $^{\circ}$ C 45 s,50 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min共进行32个循环,72 $^{\circ}$ C延伸5 min。CO I基因扩增条件为:94 $^{\circ}$ C预变性5 min,94 $^{\circ}$ C 45 s,48 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min共进行32个循环,72 $^{\circ}$ C延伸5 min。

1.2.3 PCR产物的检测 扩增产物在1.5%TBE琼脂糖凝胶中电泳,使用英国Syngene公司的Gen-Genius全自动凝胶成像分析系统照像。用琼脂糖凝胶回收试剂盒(宝生物)纯化后送至上海联合基因公司测序。

1.2.4 序列分析 测得序列片段用Clustal X进行多重对比分析,用Mega2.0^[20]软件分析序列长度、计算碱基组成。用DNASP4.0^[21]进行K值、P_i值、单倍型的分布分析。用香螺属的拟虾夷法螺(*Neptunea intersculpta*)相应序列(GenBank序列

号AB044265)为16S rRNA基因的外群进行对位排序,用宝贝科的隐居焦掌贝(*Palmadusta clandestina*)相应序列(GenBank序列号AY534466)做CO I基因的外群进行对位排序,根据Kimura双参数模型计算遗传距离(D),相应的标准误差用Bootstrap方法(重复数为1 000)计算。NJ系统树采用Mega2.0软件构建,采用Bootstrap(重复数为1 000)检验分子系统树各分支的置信度。

2 结果与分析

2.1 2种东风螺16S rRNA和CO I基因片段碱基组成

对来自粤东、粤西的方斑东风螺和台湾东风螺总DNA进行PCR扩增,均获得了特异性很好的PCR产物。通过BLAST分析比较所得片段为16S rRNA和CO I基因片段。经CLUSTAL X同源排序,除去引物及部分端部序列,分别得到了506 bp的16S rRNA基因片段(方斑东风螺和台湾东风螺序列号分别为DQ314761和DQ314762)和640 bp(CO I,方斑东风螺和台湾东风螺序列号DQ314763和DQ314764)的核苷酸片段,其序列单倍型分别如图1、图2所示。

2个地理群体2种东风螺的16S rRNA和CO I基因片段的碱基组成如表1所示。16S rRNA基因序列极其保守,来自粤东、粤西两地的方斑东风螺的碱基组成完全相同,来自粤东、粤西两地的台湾东风螺的碱基组成也只有一个碱基的差异,碱基组成平均为29.1%(T)、15.5%(C)、34.4%(A)、21.0%(G)、63.5%(A+T);CO I基因片段相对变异稍高一些,碱基组成平均T 38.1%、C 18.6%、A 23.8%、G 19.5%、A+T 62.4%、A+T含量明显高于G+C。这一结果与其他贝类的16S rRNA和CO I基因一致^[22-26]。

表1 2种东风螺16S rRNA和CO I基因片段的碱基组成

Tab. 1 Base composition of 16S rRNA gene and CO I gene fragments of <i>B. areolata</i> and <i>B. formosae</i> %										
群体 Group	16S rRNA					CO I				
	T	C	A	G	A+T	T	C	A	G	A+T
粤西方斑东风螺 <i>B. areolata</i> (YX)	28.9	15.6	34.0	21.5	62.9	38.0	18.4	23.9	19.7	62.9
粤东方斑东风螺 <i>B. areolata</i> (YD)	28.9	15.6	34.0	21.5	62.9	38.0	18.5	23.8	19.7	62.8
粤西台湾东风螺 <i>B. formosae</i> (YX)	29.2	15.4	34.8	20.6	64.0	38.1	18.8	23.9	19.2	62.0
粤东台湾东风螺 <i>B. formosae</i> (YD)	29.3	15.4	34.8	20.5	64.1	38.2	18.6	23.8	19.3	62.0
平均值 Mean	29.1	15.5	34.4	21.0	63.5	38.1	18.6	23.8	19.5	62.4

2.2 2种东风螺 16S rRNA 基因序列变异分析

16S rRNA 基因片段的遗传变异较小。22 个东风螺共有 4 个单倍型(图 1)。粤西群体中,方斑东风螺的 7 个序列完全相同,均为 **H1** 型;台湾东风螺的 5 个序列也完全相同,均为 **H3** 型。因此,粤西群

的方斑东风螺和台湾东风螺各有 1 种单倍型。粤东群中, 5 个方斑东风螺和 5 个台湾东风螺各有 1 个个体在 491 位点处存在 1 个颠换(G—T)位点, 方斑东风螺有 H1 和 H2 2 种单倍型; 台湾东风螺有 H3 和 H4 2 种单倍型。

								80
H1	AGTCGGGCCT	GCCCAGTGAA	AGTTTTTAAC	GGCCCGGTA	CTCTGACCGT	GCAAAGGTAG	CATAATCATT	TGCCTTATAA
H2								
H3	... C.		G.					
H4	... C.		G.					
								160
H1	TTGAAGGCTG	GTATGAATGG	TTTGACAAGA	ATATAGCTGT	CTCTTTATAA	TTTGCTAGAA	TTTATTTTGT	AAGTGAAGAA
H2								
H3			A.				C. A.	
H4			A.				C. A.	
								240
H1	GCTTACATAA	AATTGAAGGA	CAAGAAGACC	CTATCGAGCT	TTAAAAAAAC	TAACGGATTA	AGAAATTATT	TATAAAAAAC
H2								
H3	... T.					... TA. . C. .	. A. GG.	A. T
H4	... T.					... TA. . C. .	. A. GG.	A. T
								320
H1	AAATCCACTAG	ACATTTTtAGT	IGGGGCGACT	GAGGAACAAA	AAAAGCTTCC	TTTAAGGTAT	TAGATAAACG	CACGAGTATT
H2								
H3	... T. T. .	. T.		A. G.		. C. . CA. .	C. . A. . CTA	TG. AG.
H4	... T. T. .	. T.		A. G.		. C. . CA. .	C. . A. . CTA	TG. AG.
								400
H1	GATCCAGAAA	TTTTGATTAA	AGGAAATAGT	TACCGTAGGG	ATAACAGCAT	AATCTTTTTT	AAGAGCCCAT	ATCGAAAAAA
H2								
H3								
H4								
								480
H1	AGGTTTGTGA	CCTCGATGTT	GGACCAGAAT	ATCCTGAAGA	TGTAGCAGTC	TTTAAGGGTT	GGTCTGTTCG	ACCATTAAAA
H2								
H3				A.				
H4				A.				
								506
H1	TTCTACGIGA	GCTGAGITCA	GACCGG					
H2		T.						
H3								
H4		T.						

图1 方斑东风螺和台湾东风螺基于线粒体16S rRNA基因片段序列的4个单倍型

注: H_1 、 H_2 、 H_3 和 H_4 分别代表东风螺各单倍型.

Fig. 1 Four haplotypes of *B. areolata* and *B. formosae* based on sequence alignment of partial mitochondrial 16S rRNA gene fragments

Note: H_1 , H_2 , H_3 and H_4 represent their haplotypes.

2.3 2种东风螺 COI 基因序列变异分析

与 16S rRNA 基因片段相比,COI 基因片段序列变异稍大一些(图 2)。对于方斑东风螺,如果以单倍型 1 作为标准进行比较分析,共发现 12 个变异位点,约占分析位点总数的 1.86%,其中单一多态位点 9 个,简约信息位点 3 个。单一多态位点分布于 12、26、38、48、52、299、410、428、640 位点;简约信息位点分布于 3、28、45 位点。在方斑东风螺的核苷酸序列中检测到 3 种变异类型,分别是转换、颠换、

转换/颠换。其中转换 6 次,颠换 5 次,转换/颠换 1 次。对于台湾东风螺,以单倍型 1 作为标准进行比较分析,共发现 17 个变异位点,约占分析位点总数的 2.66%,其中单一多态位点 13 个,简约信息位点 4 个。单一多态位点分布于 2、3、4、5、6、20、107、152、264、344、560、608、611 位点;简约信息位点分别分布于 272、308、392、494 位点。在台湾东风螺的核苷酸序列中检测到 2 种变异类型,分别是转换和颠换,其中转换 13 次,颠换 4 次。

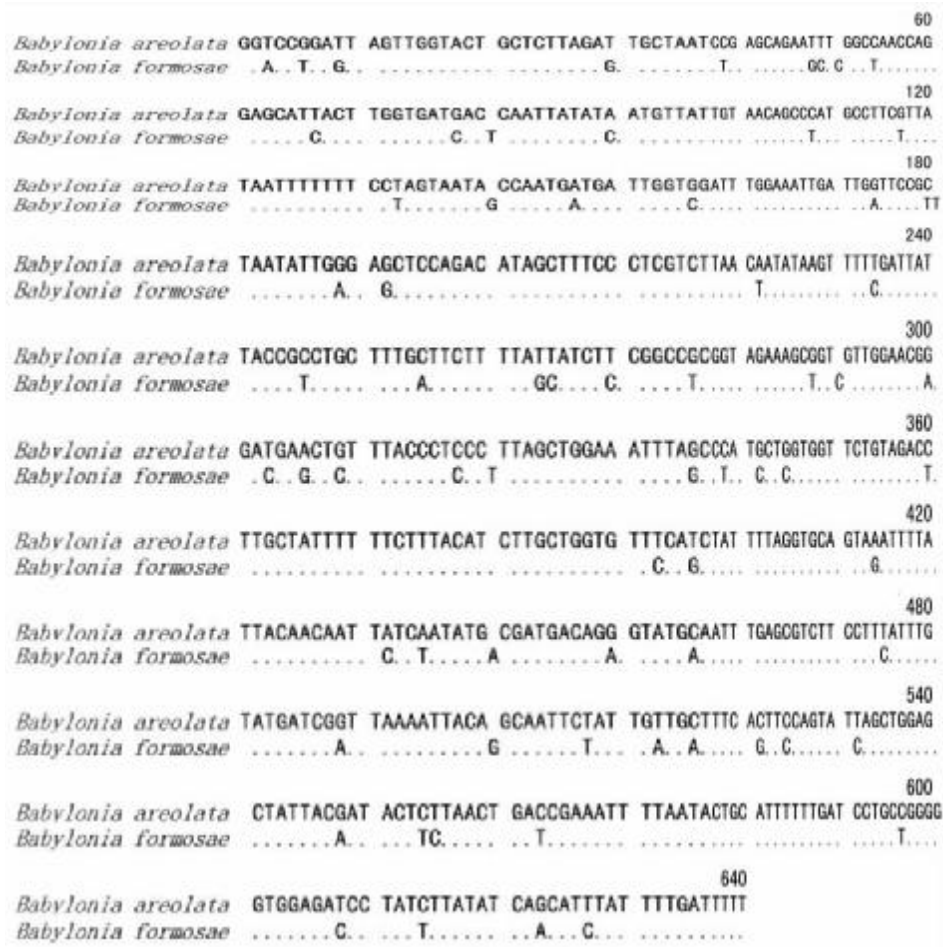


图 2 方斑东风螺和台湾东风螺 CO I 基因片段序列比较(单倍型 1)

Fig. 2 Sequence alignment of partial CO I gene fragment between *B. areolata* and *B. formosae*(haplotype 1)

2.4 2 种东风螺 CO I 基因片段多态性参数

对方斑东风螺和台湾东风螺 2 群体的遗传多样性进行计算,变异位点数、简约信息位点数、单倍型数、平均核苷酸差异(K 值)、核苷酸多样性(P_i)等分析数据见表 2。根据变异位点数、 K 值和 P_i 值 3 个指标,按地理位置进行群体比较,粤东群体方斑东

风螺和台湾东风螺的变异位点数、 K 值和 P_i 值均大于对应的粤西群体;在不同种间进行比较,方斑东风螺的变异位点数、 K 值和 P_i 值低于台湾东风螺,说明粤东种群体的遗传多样性高于粤西种群,台湾东风螺的遗传多样性高于方斑东风螺。

表 2 东风螺种群间的 CO I 基因核苷酸遗传多态性

Tab. 2 Nucleotide polymorphism of CO I gene between *B. areolata* and *B. formosae*

种类 Species	<i>n</i>	单倍型数 Number of haplotype	变异位点数 Number of variation site	简约信息位点 Parsimony site	平均核苷 酸差异 K	核苷酸 多样性 P_i
粤东方斑东风螺(YD) <i>B. areolata</i>	7	7	9	3	3.19	0.004 9
粤西方斑东风螺(YX) <i>B. areolata</i>	5	3	5	0	2.00	0.003 1
总计 Total	12	9	12	3	2.68	0.004 2
粤东台湾东风螺(YD) <i>B. formosae</i>	5	4	13	2	5.60	0.008 8
粤西台湾东风螺(YX) <i>B. formosae</i>	5	3	5	2	1.50	0.002 3
总计 Total	10	7	17	4	5.62	0.007 8

K :平均核苷酸差异; P_i :核苷酸多样性。
 K :Average nucleotide differences; P_i :Nucleotide diversity.

方斑东风螺的平均核苷酸差异和核苷酸多样性分别为 2.68 和 0.004 2,台湾东风螺则分别为 5.62 和 0.007 8,台湾东风螺均大于方斑东风螺,说明台湾东风螺的遗传多样性高于方斑东风螺。

2.5 3 种东风螺遗传距离和系统树

BLAST 分析发现泥东风螺(*B. lutosa*)的 16S

rRNA 基因(GenBank 序列号 AB044255)与台湾东风螺极其相似,日本东风螺(*B. japonica*)的 CO I 基因(GenBank 序列号 AF373888)与台湾东风螺极其相似,因此,也将它们序列与外群一起根据 Kimura 双参数模型计算出遗传距离(*D*,表 3、4)进行比较分析。

表 3 基于 16S rRNA 基因片段序列的 3 种东风螺及其外群之间的遗传距离

Tab. 3 Genetic distances(*D*) among three *Babylonia* species and outgroup based on 16S rRNA gene fragments

遗传距离 Genetic distance	台湾东风螺 <i>B. formosae</i>	泥东风螺 <i>B. lutosa</i>	方斑东风螺 <i>B. areolata</i>	拟虾夷法螺 <i>N. intersculpta</i>
台湾东风螺 <i>B. formosae</i>	0.001 0			
泥东风螺 <i>B. lutosa</i>	0.001 5	—		
方斑东风螺 <i>B. areolata</i>	0.061 7	0.062 6	0.000 8	
拟虾夷法螺 <i>N. intersculpta</i>	0.107 1	0.105 4	0.109 4	—

注:数字矩阵中对角线为群体内的遗传距离,对角线左下方为群体间的遗传距离,“—”表示数据缺失。
Note:The numbers in diagonal of matrix indicate genetic distances of intrapopulation. The down-left ones indicate genetic distances of interpopulation. “—”indicates missing data.

由表 3 可知,台湾东风螺种群内的遗传距离($D=0.001\ 0$)稍大于方斑东风螺($D=0.000\ 8$);种间泥东风螺和方斑东风螺的遗传距离最高为 0.062 6,其次是方斑东风螺和台湾东风螺($D=0.061\ 7$),最低为泥东风螺和台湾东风螺($D=0.001\ 5$)。外群拟虾夷法螺与 3 种东风螺的遗传距离在 0.105 4 和 0.109 4 之间。

由 CO I 基因片段所得到的遗传距离可知,台湾东风螺种群内的遗传距离($D=0.006\ 1$)也大于方斑东风螺($D=0.003\ 9$);种间台湾东风螺和方斑东风螺的遗传距离最高为 0.126 3,其次是方斑东风螺和日本东风螺($D=0.125\ 7$),最低为日本东风螺和台湾东风螺($D=0.004\ 2$)。外群隐居焦掌贝与 3 种东风螺的遗传距离在 0.193 8 和 0.197 9 之间。

表 4 基于 CO I 基因片段序列的 3 种东风螺及其外群之间的遗传距离

Tab. 4 Genetic distances(*D*) of CO I gene fragments among three *Babylonia* species and outgroup based on CO I gene fragments

遗传距离 Genetic distance	台湾东风螺 <i>B. formosae</i>	日本东风螺 <i>B. japonica</i>	方斑东风螺 <i>B. areolata</i>	隐居焦掌贝 <i>P. clandestina</i>
台湾东风螺 <i>B. formosae</i>	0.006 1			
日本东风螺 <i>B. japonica</i>	0.004 2	—		
方斑东风螺 <i>B. areolata</i>	0.126 3	0.125 7	0.003 9	
隐居焦掌贝 <i>P. clandestina</i>	0.194 1	0.193 8	0.197 9	—

注:数字矩阵中对角线为群体内的相似系数,左下方为群体间的遗传距离,“—”表示数据缺失。
Note:The numbers in diagonal of matrix indicate genetic distances of intrapopulation. The down-left ones indicate genetic distances of interpopulation, “—”for the missing data.

挑选有变异的个体和外群进行聚类分析,分别得到 3 种东风螺的 NJ 树(图 3、4)。从图 3 中可看出,泥东风螺与台湾东风螺种群先聚在一起,后与方斑东风螺种群相聚;从图 4 中可看出,日本东风螺先

与台湾东风螺聚在一起,后与方斑东风螺种群相聚。这说明了台湾东风螺与日本东风螺及泥东风螺亲缘关系较近而与方斑东风螺的关系较远。

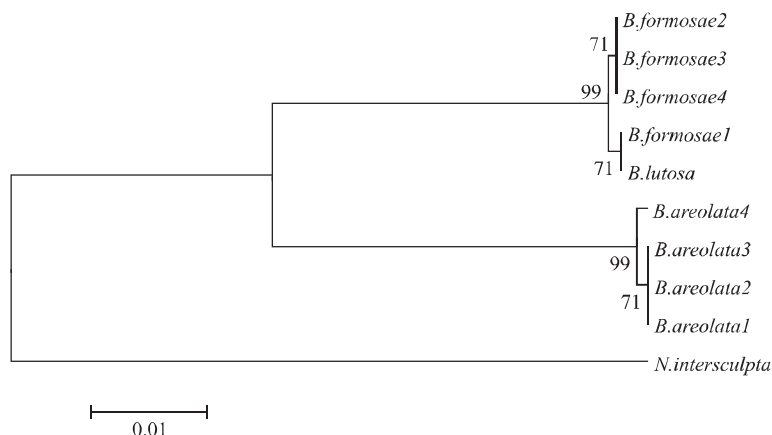


图 3 基于 3 种东风螺和外群 16S rRNA 基因片段的 NJ 系统树

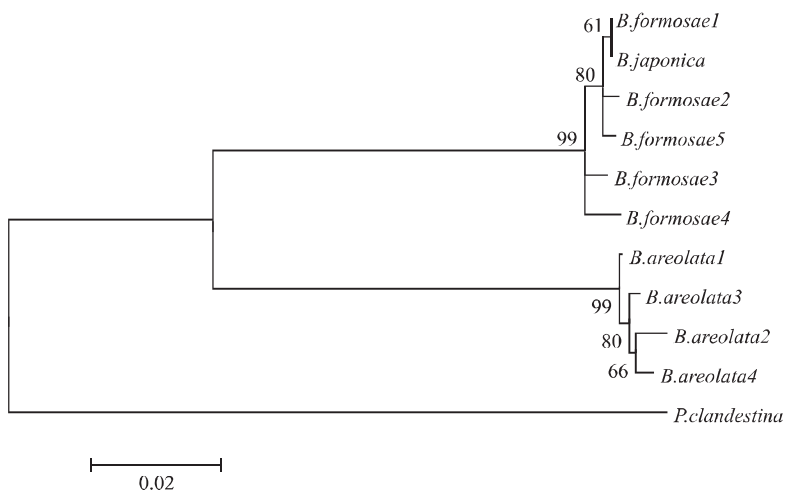
Fig. 3 NJ phylogenetic trees based on 16S rRNA gene sequences of three *Babylonia* species and outgroup

图 4 基于 3 种东风螺和外群 CO I 基因片段的 NJ 系统树

Fig. 4 NJ phylogenetic trees based on CO I gene sequences of three species and outgroup

3 讨论

3.1 16S rRNA 和 CO I 基因变异比较研究

线粒体基因已成为进化生物学和群体遗传学研究中重要的分子标记。目前,用的最多的线粒体基因为 *cyt b*、12S rRNA、16S rRNA、CO I 和 D-loop 等基因。就某个基因而言,其进化速率与其功能重要性直接相关。具有重要功能的基因进化速率相对会慢一些,反之则较快。由于不同基因的进化速率不同,因此在进行系统学、起源和进化、种群识别和种质鉴定及种群遗传多样性研究时,对基因就有一定的选择性。但是,对于不同的种或者种群,即使是在相同的区域,基因的进化速率也有一定的差异^[3],

因此在无背景资料的情况下选择哪个线粒体基因具有一定的盲目性。一般来说,D-loop 基因由于是线粒体 DNA 的非编码区,其碱基替换速率快,在进行种群遗传多样性研究时多选取此基因^[5-6];其次是 CO I 和 *cyt b* 基因,12S rRNA 和 16S rRNA 相对比较保守。本研究结果也证实了此观点。

在长度为 506 bp 的 16S rRNA 基因片段中,粤西群体的方斑东风螺和台湾东风螺没有碱基的区别,粤东群体的方斑东风螺和台湾东风螺也只有 1 个碱基的差别;而在长度为 640 bp 的 CO I 基因中,粤东群体的方斑东风螺有 9 个碱基的变异,粤西方斑东风螺有 5 个碱基变异,方斑东风螺共有 12 碱基的变异;粤东群体台湾东风螺有 13 个碱基的变异,

粤西群体台湾东风螺有3个碱基变异,台湾东风螺共有17个碱基的变异。由此可见,在本研究得到的2种东风螺的16S rRNA和CO I基因序列中,CO I基因中种内和种间变异都高于16S rRNA基因,说明在2个东风螺的种类中,CO I的进化速率要比16S rRNA基因要快,16S rRNA基因相对保守一些。同时也说明了16S rRNA基因不适于做东风螺种群的遗传多样性研究,而CO I基因则可以。

3.2 方斑东风螺和台湾东风螺的遗传多样性比较研究

从表2中可以看出CO I基因片段序列反映出来的分别来自2个地理种群的2种东风螺2个群体遗传多样性水平。从变异位点数、平均核苷酸差异和核苷酸多样性这3个指标上来看,粤东种群遗传多样性明显高于粤西种群;台湾东风螺种群的遗传多样性高于方斑东风螺种群的遗传多样性。从表4中种群内遗传距离来看,台湾东风螺种群内的遗传距离也大于方斑东风螺。

分析其原因,很可能主要是与两种东风螺所处环境有关。虽然2种东风螺均属中国东、南沿海的暖水性种类,但分布还是有一定的差别。二者相比,方斑东风螺属于外海种群,台湾东风螺属于近海种群,由于外海的温盐度变化较近海变化要小,台湾东风螺要适应变化较大生存环境,可能就必须积累较大的变异。

遗传多样性是生物多样性的基本组成部分,是生态多样性和物种多样性的基础。它通常被认为是种内不同群体之间和一个群体内不同个体之间的遗传变异总和。一个种群没有遗传多样性就不能进化,也无法适应其生存环境的变化^[27]。对于任何一个物种来说,其遗传多样性越丰富,对环境变化的适应能力就越强,就越容易扩展其分布范围和开拓新的环境^[28]。反之,是否可以认为环境适应能力越强,种群和种的遗传多样性越丰富,本研究结果在一定程度上支持这个论点,但是否具有普遍适应性,还需要其他物种研究的证明。

参考文献:

- [1] 王如才. 中国水生贝类原色图鉴[M]. 杭州:浙江科学技术出版社,1988.
- [2] 陈利雄,吴进锋. 东风螺的增养殖技术及产业化前景[J]. 齐鲁渔业,2004,21(10):9-11.
- [3] 郭新红,刘少军,刘巧,等. 鱼类线粒体DNA研究新进展[J].

遗传学报,2004,31(9):983-1000.

- [4] Rosel P E, Rojas-Bracho L. Mitochondrial DNA variation in the critically endangered vaquita *Phocoena sinus* (Norris and MacFarland)[J]. Mar Mammal Sci,1999,15(4):990-1003.
- [5] Baker C S, Perry A, Bannister J L, et al. Abundant mitochondrial DNA variation and world-wide population structure in humpback whales[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1993,90:8239-8243.
- [6] Hoelzel A R, Halley J, O'Brien S J, et al. Elephant seal genetic variation and the use of simulation models to investigate historical population bottlenecks[J]. Heredity,1993,84:443-449.
- [7] 柯才焕,李得雪. 台湾东风螺的生殖腺组织学和生殖周期[J]. 台湾海峡,1991,10(3):213-220.
- [8] 柯才焕,李得雪. 台湾东风螺繁殖行为研究[C]//贝类学论文集:第4集. 青岛:青岛海洋大学出版社,1994:141-148.
- [9] 郑怀平,朱建新,柯才焕,等. 温盐度对波部东风螺胚胎发育的影响[J]. 台湾海峡,2000,19(1):1-5.
- [10] 罗杰,杜涛,刘楚吾. 酸碱度、盐度对方斑东风螺卵囊孵化率和不同饵料对幼虫生长发育、存活的影响[J]. 海洋科学,2004,28(6):5-9.
- [11] 郑怀平,周时强,柯才焕,等. 饥饿对波部东风螺幼虫存活、生长及变态的影响[J]. 水产学报,2000,24(6):510-515.
- [12] 郑怀平,柯才焕,周时强,等. 温盐度对波部东风螺幼虫存活、生长及变态的影响[J]. 台湾海峡,2001,20(2):216-223.
- [13] 柯才焕,李才青,李复雪,等. 两种东风螺幼体附着和变态的化学诱导研究[J]. 海洋学报,1996,18(4):90-95.
- [14] 柯才焕,符艳,汤鸿,等. 波部东风螺对饵料的摄食和对饵料蛋白质的消化率[J]. 海洋科学,1997,21(5):5-7.
- [15] 刘德经,肖思祺. 台湾东风螺生态学的初步研究[J]. 中国水产科学,1998,5(1):93-96.
- [16] 吴进锋,陈利雄,张汉华,等. 两种东风螺繁殖及苗种生长发育的比较[J]. 南方水产,2006,2(1):39-42.
- [17] 刘红艳,江世贵,苏天凤,等. 3个水域黄鳍鲷线粒体DNA D-loop基因序列多态性研究[J]. 水产学报,2004,28(4):371-374.
- [18] Anderson F E. Phylogeny and historical biogeography of the loliginid squids (Mollusca:Cephalopoda) based on mitochondrial DNA sequence data[J]. Mol Phyl Evol,2000,15(2):191-214.
- [19] Folmer O, Black M, Hoeh W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates[J]. Mol Mar Biol Biotechnol,1994,3:294-299.
- [20] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, et al. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software[J]. Bioinformatics,2001,17(12):1244-1245.
- [21] 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.
- [22] 苏天凤,江世贵,周发林,等. 近江牡蛎16S rRNA基因片段序列变异分析[J]. 高技术通讯,2005,15(2):100-103.
- [23] 苏天凤,江世贵,朱彩艳,等. 广西钦州湾养殖牡蛎16S rRNA基因片段序列变异分析[J]. 中国水产科学,2005,12(1):1-4.
- [24] 陈丽梅,孔晓瑜,喻子牛,等. 3种蛭类线粒体DNA 16S rRNA

- 和 CO I 基因片段序列比较及其系统学初步研究[J]. 海洋科学, 2005, 29(8): 27—32.
- [25] 刘亚军, 喻子牛, 姜艳艳, 等. 栉孔扇贝 16S rRNA 基因片段序列的多态性研究[J]. 海洋与湖沼, 2002, 33(5): 477—483.
- [26] Zheng Xiaodong, Wang Rucai, Xiao Shu, et al. Genetic diversity in populations of *Sepiella maindroni* using 16S rRNA gene [J]. *Sequ Analys High Technol Lett*, 2003, 9(1): 1—4.
- [27] 张永明, 孟令国, 张跃伟. 遗传多样性研究在种质资源保护和利用中的应用[J]. 西藏科技, 2005, (4): 11—13.
- [28] 钱迎倩, 马克平. 生物多样性研究的原理与方法[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994: 123—140.

Genetic polymorphism of mitochondrial DNA sequences in *Babylonia areolata* and *Babylonia formosae*

SU Tian-feng, HUANG Jian-hua, WU Jing-feng, JIANG Shi-gui

(Key Laboratory of Fishery Genetic Resources and Aquaculture, Chinese Academy of Fishery Sciences, South China Sea Fisheries Institute, Guangzhou 510300, China)

Abstract: In order to clarify the nucleotide sequence and genetic diversity of *Babylonia areolata* and *Babylonia formosae*, we analyzed the segments of mtDNA 16S rRNA and CO I gene of 22 individuals from west Guangdong waters and east Guangdong water by the methods of PCR and sequencing. Nucleotide sequences of 506 bp for 16S rRNA gene and 640 bp for CO I gene were obtained, respectively. A high percentage of A+T base composition in the two sequences was observed. Alignment indicated that variation level of intra-species was low in 16S rRNA gene sequences, only one variable site was detected for 16S rRNA gene in *B. formosae* and *B. areolata* respectively; 12 polymorphic sites were detected in CO I gene fragments in *B. areolata* and 3 were parsimony informative sites, 9 were singleton variable sites; 17 polymorphic sites were detected in CO I gene fragments in *B. formosae* and 3 were parsimony informative sites; 14 were singleton variable sites. Analysis of 16S rRNA and CO I gene fragments indicated that there were more genetic polymorphism for CO I gene than 16S rRNA gene between *B. areolata* and *B. formosae*. So CO I gene sequence analysis was suitable for *Babylonia* species analysis of genetic polymorphism. The average number of nucleotide differences and nucleotide diversity of *B. areolata* population were 2.68 and 0.004 2, while those of *B. formosae* population were 5.62 and 0.007 8, which demonstrated that *B. formosae* population had more genetic polymorphism than *B. areolata*. For both of *B. areolata* and *B. formosae*, their average number of nucleotide differences and nucleotide diversity of population from east Guangdong water were larger than population from west Guangdong waters. So there was more genetic polymorphism in east Guangdong waters than that in west Guangdong water. Based on 16S rRNA gene sequence data, the intrapopulation genetic distance of *B. formosae* (0.001 0) was a little larger than that of *B. areolata* (0.000 8). The interpopulation genetic distance between *B. lutosa* and *B. areolata* was the largest (0.062 6). According to the CO I gene sequence data, the intrapopulation genetic distance of *B. formosae* (0.006 1) was also larger than that of *B. areolata* (0.003 9). The interpopulation genetic distance between *B. formosae* and *B. areolata* was the largest (0.126 3). In the molecular phylogenetic tree constructed by the method of NJ based on the 16S rRNA gene, *B. lutosa* and *B. formosae* assembled first, then *B. areolata* assembled. For the CO I gene, *B. japonica* and *B. formosae* assembled first, then *B. areolata*, which indicated *B. formosae* had a closer relationship with *B. japonica* and *B. lutosa* than with *B. areolata*. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(3): 369—376]

Key words: *Babylonia areolata*; *Babylonia formosae*; mitochondrial DNA; 16S rRNA gene; CO I gene; genetic polymorphism

Corresponding author: JIANG Shi-gui. E-mail: jiangsg@21cn.com