DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.18051

基于线粒体 COI 基因序列的磷虾目分子系统进化

谌微,马春艳,冯春雷,王伟,王鲁民,马凌波

中国水产科学研究院东海水产研究所,农业农村部远洋与极地渔业创新重点实验室,农业农村部东海渔业资源开发利用重点实验室,上海 200090

摘要: 为探讨磷虾目物种的系统进化关系, 以磷虾目的 50 种磷虾为研究对象, 分析其线粒体 COI 基因序列的分子 变异, 构建系统发育树, 初步探讨了磷虾种属间亲缘关系。所分析 COI 基因可比序列长度为 519 bp, 共包含 258 个变异位点,全部为碱基替换,无插入/缺失位点。四种碱基含量分别为 A 27.58%、T 35.47%、G 18.88%、C 18.07%, 碱基 A+T 含量(63.05%)显著高于 G+C 含量(36.95%),表现出明显的 T 偏倚特点。50 种磷虾的种间遗传距离为 0.065~0.306, 其平均值为 0.186; 而种内遗传距离为 0~0.071, 其平均值为 0.017, 平均种间距离约为种内距离的 11 倍。根据物种鉴定最小种间遗传距离 0.020 的观点, COI 基因序列间的差异能够很好地区分各磷虾种。基于 COI 基因分别构建了 4 种系统进化树: 邻接树(neighbor-joining, NJ)、极大似然树(maximum likelihood, ML)、最大简约树(maximum parsimony, MP)及 UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic means)树。它们拓扑结构基本 一致, 均可分为三大支系: 假磷虾属处于系统树的基部, 是磷虾目中最早分化出来的一支; 而包含磷虾种类最多的磷虾属则最后分化出来,表明其为磷虾类中相对较新的一个属。本研究较全面地阐述了磷虾目的系统进化关系, 结果表明磷虾目的线粒体 COI 序列变异可以用来研究磷虾属、种的分类单元及其系统进化问题,具有较好的理论和应用价值。

磷虾目(Euphausiacea)隶属于节肢动物门 (Arthropoda)、甲壳动物亚门(Crustacea)、软甲纲 (Malacostraca)、真虾总目(Eucarida),是一类较大 型的海洋浮游甲壳动物。磷虾目现存物种包含 2 科: 深海磷虾科(Bentheuphausiidae)和磷虾科 (Euphausiidae),其中深海磷虾科只有 1 个物种, 即深海磷虾(*Bentheuphausia amblyops*),而磷虾科 包含 10 属共 85 个物种,其中的磷虾属(*Euphausia*) 是包含磷虾种类最多的属,共包含 31 个种^[1]。磷 虾目的种类远不如浮游桡足类多,但其在海洋中 的数量及分布范围,不亚于桡足类,在海洋浮游 动物群落中占据重要地位^[2]。更为重要的是,磷虾 是许多经济鱼类和须鲸的重要饵料,也是重要的 渔业捕捞对象,在海洋生态系统中发挥着重要的 作用^[3-4]。

迄今为止,对磷虾资源的渔业开发主要集中 在南大洋、日本以及加拿大沿岸水域,随着科技 和社会的发展,食品和能源需求日益增加,磷虾 资源越来越受到各国政府及学者的重视。磷虾种 类中的南极磷虾(Euphausia superba)、太平洋磷虾 (Euphausia pacifica)、小型磷虾(Euphausia nana) 及挪威大磷虾(Meganyctiphanes norvegica)是磷虾 渔业的主要捕捞对象,这其中又以南极磷虾的储 量为最多^[5]。近年来,我国相继开展了南极和南大

收稿日期: 2018-03-03; 修订日期: 2018-05-08.

基金项目:科技部科技基础性工作专项(2013FY110700);中央级公益性科研院所基本科研业务费(2014A11);国家科技支撑计 划课题(2013BAD13B03);国家自然科学基金青年科学基金项目(41406190).

作者简介: 谌微(1989-), 助理研究员, 研究方向为水产动物遗传育种. E-mail: 328160296@qq.com

通信作者:马凌波,研究员,研究方向为水产生物技术及水产动物遗传育种. E-mail: malingbo@sina.com

洋科考,派人、派船前往南极考察海域环境,并捕 捞南极磷虾^[2]。同时也对磷虾资源开展了科学研 究,这些研究主要集中在磷虾的分类^[6]、发育^[7-8]、 资源调查及生态学^[9-10]等方面,而对于磷虾的分 子遗传学及系统进化研究却很少,因此,急需对 其分子系统进化方面开展研究,明确种属间的进 化关系,为以后磷虾资源的开发利用及资源保护 提供理论基础。

磷虾的外部形态非常相似,不易确定其具体的分类地位,种与种之间仅依靠外部形态的相似程度判断其亲缘关系的远近并不准确,必须借助分子生物学的方法进行区分。线粒体 DNA 序列差异,尤其是线粒体 COI 基因序列,是研究进化关系相近种类的良好工具,可以为形态相似的种类的进化关系提供可靠依据^[11]。本文测定了南极磷虾 29 个个体的 COI 片段序列,并结合 GenBank数据库中存储的磷虾物种的 COI 序列,以磷虾目 11 属 50 种的 285 个磷虾为研究对象,对其线粒体 COI 基因序列变异进行分析,构建系统发育树,探讨各物种之间的系统发育关系,以期为磷虾目 生物的科学研究、磷虾资源的科学开发及保护提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究使用的 29 个南极磷虾样本为 2013 年 6 月采自南极 48.2 海区(60.27°S, 46.35°W)。样本 在海区采集后,立即冰冻保存,运回实验室后储 存于-80℃冰箱待用。其他磷虾个体的 COI 基因 序列下载自 GenBank 数据库。

1.2 DNA 提取

使用海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒 (北京,天根生化科技有限公司)提取南极磷虾肌 肉总 DNA,具体操作步骤为:取组织样品约30 mg 于 2.0 mL 离心管中,加入 200 µL GA Buffer 及 20 µL 蛋白酶 K,充分混匀后于 56℃恒温水浴中 直至组织完全裂解;加入 200 µL GB Buffer,充分 颠倒混匀,70℃放置 10 min,至溶液变清亮;加入 200 µL 无水乙醇,充分颠倒混匀,离心并将上清 液及絮状物全部移入 CB3 吸附柱中,离心去除滤 液;向CB3吸附柱中加入500μLGDBuffer,离心 去除滤液;向CB3吸附柱加入600μLPW漂洗液, 离心去除蛋白质及其他杂质,重复一次该漂洗操 作;最后向CB3吸附柱中加入100μLTE溶液, 得到磷虾DNA原液,4℃保存备用。

1.3 COI 基因片段引物合成与扩增

磷虾 COI 引物参照 GenBank 中南极磷虾线粒 体序列(登录号: EU583500)^[12]设计,引物序列为: 正向引物 LXCF: 5'-CAG GTA GTT TAA TTG GAG ATG AC-3',反向引物 LXCR: 5'-AAT GTT GGT AGA GAA TAG GGT CA-3' (由上海生工合 成)。PCR 反应总体积为 25 µL,包括 10×PCR buffer 2.5 µL, dNTP 2 µL (2.5 mmol/L),上下游引 物各 1 µL (10 mmol/L), Taq DNA 聚合酶 0.4 µL (2.5 U/µL),模板 DNA 100 ng,加双蒸水至总体积 25 µL。样品在 PTC200 PCR 仪(美国 Bio-Rad)上 进行扩增。CO I 扩增反应条件: 94℃预变性 5 min; 94℃ 45 s, 50℃ 45 s, 72℃ 1 min, 35 个循环;最后 72℃延伸 5 min,产物放 4℃冰箱保存备用。

1.4 COI 基因序列测定和序列下载

PCR 产物用 1.5%琼脂糖凝胶电泳后, 经凝胶 成像系统拍照检测。产物合格后送至上海杰李生 物技术有限公司进行纯化后在 ABI PRISM[™] 3730XL DNA Analyzer 测序仪上进行测序, 以本 研究设计合成的引物 LXCF、LXCR 作为测序引 物进行双向测序并拼接。

为了尽可能全面地探讨磷虾目的系统发育关系,将本研究测定的南极磷虾 COI 序列与从 GenBank数据库下载的其他磷虾种的 COI 序列综 合分析。磷虾的种类名称、序列数、序列登录号 等相关信息如表 1 所示。

1.5 数据分析

经测序及拼接完以后,将所得序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 同源检测确认,再通过 Clustal X 1.83^[13]对序列进行编辑排序及校正。采 用 DnaSP 5.1 软件^[14]计算序列的碱基含量、多态 位点数(V)、简约信息位点数(P)、单倍型多样性 (H_d)、核苷酸多样性(*π*)等参数。利用 MEGA 5.1 软件^[15]计算各密码子碱基平均分布,并应用木村

属 genus	种类 species	序列数 number of sequence	序列登录号 GenBank accession number
深海磷虾属 Bentheuphausia	Bentheuphausia amblyops	2	EF467302, GU183771
磷虾属 Euphausia	Euphausia crystallorophias	21	KT586595-KT586614, AF177183
	Euphausia lucens	9	GQ890508–GQ890515, AF177185
	Euphausia pacifica	3	AF177184, HQ700929, EF595678
	Euphausia superba	58	本研究 29个, GQ305872GQ305876, GQ305878GQ305901
	Euphausia mutica	5	KT8648764/5/6, EF467304, AY601085
	Euphausia krohni	1	AY601083
	Euphausia longirostris	1	AF177189
	Euphausia vallentini	3	GQ890506/7, AF177188
	Euphausia tricantha	1	AF177187
	Euphausia similis	1	AF177186
	Euphausia sibogae	3	KT864862/4, EF467305
	Euphausia diomedeae	7	KT864866-KT864871, FJ409646
	Euphausia sanzoi	5	KU752552-KU752556
	Euphausia lamelligera	1	AY601084
	Euphausia gibboides	1	AY601081
	Euphausia eximia	1	AY601080
	Euphausia distinguenda	1	AY601079
	Euphausia brevis	1	AY601078
	Euphausia americana	1	AY601076
	Euphausia recurva	3	GQ890503/4/5
大磷虾属 Meganyctiphanes	Meganyctiphanes norvegica	16	FJ581747–FJ581756, AF177191, AY601091, KT208867, KT208832, KT208792, KT208489
臂磷虾属 Nematobrachion	Nematobrachion sexspinosum	1	GU183772
	Nematobrachion flexipes	1	AY047602
线脚磷虾属 Nematoscelis	Nematoscelis tenella	1	AY601090
	Nematoscelis microps	1	AY601089
	Nematoscelis gracilis	1	AY601088
	Nematoscelis atlantica	3	GU183773/4, AY601087
	Nematoscelis megalops	2	AY047603, KT952483
	Nematoscelis difficilis	1	AY047601
夜明磷虾属 Nyctiphanes	Nyctiphanes australis	2	AF177190, DQ889163
	Nyctiphanes simplex	1	AY601092
假磷虾属 Pseudeuphausia	Pseudeuphausia sinica	20	AY754819, AY947483–AY947494, KF977317– KF977323
	Pseudeuphausia latifrons	4	KF977313-KF977316
手磷虾属 Stylocheiron	Stylocheiron affine	11	KT864843–KT864849, KT864851/2/3, AF371984
	Stylocheiron abbreviaium	/	K1804834-K1804838, EF40/301, GU185//3
	Stylocheiron maximum	1	A 1 001075
	Stylocheiron sunmit	2	AF3/1763, UU163//7
	Stylocheiron elongatum	2	AF5/1900, UU165//8
	Stylocheiron carinatum	3	00103//0//, AF3/198/
	Siylocneiron longicorne	1	AF3/1988

表 1 磷虾目 50 种磷虾的 COI 基因序列信息 Tab. 1 Information of COI genes of 50 Euphausiid species

(待续 to be continued)

(续表1	Tab.	1 con	tinued)
------	------	-------	---------

属 genus	种类 species	序列数 number of sequence	序列登录号 GenBank accession number				
长脚磷虾属 Tessarabrachion	Tessarabrachion oculatum	1	DQ003707				
拟櫻磷虾属 Thysanoessa	Thysanoessa inermis	30	KM653456/57/59/60/74/77/83/84/86/89/90/96 /97/98, KM653504/10/17/18/20/24/28/36/55/ 58/60, KP241402/20/31/74/86				
	Thysanoessa longipes	4	KM653052/3, EF595679, AY601094				
	Thysanoessa raschii	30	KF011114-KF011143				
	Thysanoessa longicaudata	1	KT952487				
	Thysanoessa spinifera	2	EF595681, DQ003710				
櫻磷虾属 Thysanopoda	Thysanopoda orientalis	2	FJ409647, DQ003708				
	Thysanopoda aequalis	2	AY601095, GU183780				
	Thysanopoda obtusifrons	3	GU183782/3, AY601097				

资生的双参数替代模型(K-2-P)计算磷虾种内、种间及属内、属间的遗传距离,分别采用邻接法 (neighbor-joining, NJ)、极大似然法(maximum likelihood, ML)、最大简约法(maximum parsimony, MP)及基于距离的 UPGMA 法(unweighted pairgroup method with arithmetic means)共4种方法构 建磷虾系统进化树, bootstrap 置信值估算重复次 数为1000次。

2 结果与分析

2.1 磷虾目 COI 基因序列特征

经PCR扩增并测序后,获得了29个南极磷虾 样本的 COI 基因部分序列, 扩增长度约 650 bp。 利用所测的29个南极磷虾COI序列与从GenBank 数据库中下载的 50 种磷虾的 COI 序列进行分析, 经比对及人工校正后,最终获得用于分析的共有 序列大小为 519 bp, 编码 173 个氨基酸。序列的 平均碱基组成为: A 27.58%、T 35.47%、C 18.07%、 G 18.88%、碱基 A+T(63.05%)含量明显高于 G+C (36.95%)(表 2)。在氨基酸密码子的第1、2、3位 点的偏好性方面,从第1到第3位点的A+T含量 逐渐递增, 第3密码子 A+T 含量最高, 其含量达 到 84.14%, 表现出明显的 T 碱基偏倚特点。在序 列变异上, 该 COI 基因片段中的不变位点为 261 个, 变异位点为 258 个, 其中单变异位点 26 个, 简约信息位点 232 个, 无插入或缺失位点, 全部 为转换或颠换。在总计285条序列中共检测到197 个单倍型, 单倍型多样性 0.9917, 核苷酸多样性 为 0.1513。

表 2 50 种磷虾的 COI 基因部分序列的 密码子碱基平均分布

Tab. 2 Average nucleotide distribution of COI gene partial sequence in the 50 Euphausiacea species

%

碱基 base	总频率 total	密码子第 1 位点 the first base of codon	密码子第 2 位点 the second base of codon	密码子第 3 位点 the third base of condon
Т	35.47	20.99	44.49	40.94
С	18.07	18.38	25.92	9.92
А	27.58	27.82	11.72	43.20
G	18.88	32.82	17.87	5.94
A+T	63.05	48.81	56.21	84.14
C+G	36.95	51.19	43.79	15.86

2.2 磷虾目种间及种内遗传距离

基于 Kimura-2-parameter 法计算了 50 种磷虾 种内和种间遗传距离(由于数据量太大,在本文中 不予列出)。各磷虾的种间遗传距离范围在 0.065~ 0.306,其平均值为 0.186,种内遗传距离范围在 0~0.071,其平均值为 0.017。从整体水平上看,磷 虾的种间距离约为种内距离的 11 倍,遗传距离最 大的磷虾种为 B. amblyops 和 E. lamelligera,遗传 距离为 0.306,遗传距离最小的为 E. sibogae 和 E. distinguenda,遗传距离最小的为 E. sibogae 和 E. distinguenda,遗传距离为 0.065。此外,为了更准 确地比较种内与种间遗传距离的差异,对样本数 较多的磷虾种单独加以分析,比较了 6 种磷虾的 种内及种间的遗传距离(表 3)。从结果来看,6 种 磷虾的平均种间遗传距离为 0.169~0.206,平均值 为 0.187,其各自的种内遗传距离为 0.002~ 0.011, 平均值为 0.008。其种间与种内的遗传距离比值为 15.8~91.8, 6 种磷虾的种间与种内遗传距离之比 达到 23.4 倍。南极磷虾种内遗传距离为 0.011, 与 其他 49 种磷虾的种间平均遗传距离为 0.194, 种 间距离为种内距离的 17.6 倍。该结果表明, 基于 COI 基因序列间的差异能够很好地对不同磷虾种 进行区分。

对磷虾目 11 属磷虾的属间及属内遗传距离 进行了分析,结果如表4所示。由于深海磷虾属、 大磷虾属及长脚磷虾属都只包含一个物种,属内 距离不进行计算,其他 8 属的属内遗传距离在 0.010~0.163,平均值为0.092。11 属的属间遗传距 离在0.113~0.247,平均值为0.180,属间距离约为 属内距离的 1.96 倍,差异不明显。结果表明,仅 通过 COI 基因序列并不能区分各个磷虾属,该序 列不适合作为磷虾属间差异分析的依据。

2.3 磷虾目系统发育分析

根据磷虾 COI 基因片段序列, 以十足目的中

国对虾(Fenneropenaeus chinensis)和糠虾目的黑 褐新糠虾(Neomysis awatschensis)作为外群,分别 采用邻接法(NJ)、极大似然法(ML)、最大简约法 (MP)及非加权组平均法(UPGMA)构建磷虾目2科 11 属 50 种磷虾的分子系统发育树。由于本研究 的磷虾样本数量众多(285条序列),全部用来构建 系统树反而不能直观反映各磷虾种之间的进化关 系,因而对于拥有单倍型数目大于1的物种,统 一选取该磷虾种的优势单倍型进行系统树的构 建。通过4种方法构建的基于 COI 基因的磷虾目 系统进化树, 其拓扑结构基本保持一致, 准确度 能相互得到验证。从系统树的结果可知, 十足目 最先分化出来,磷虾目与糠虾目的亲缘关系近于 十足目。磷虾目中有7个属可分别聚为独立支系, 在余下的 4 属中, 手磷虾属(Stylocheiron)的种类 比较分散,不同方法构建的系统树有所差异,分 别将其分为 2~4 支, 其中有 3 个种单独聚为 1 支,

表 3 6 种磷虾种间及种内遗传距离 Tab. 3 Pairwise-species and within-species genetic distance among the 6 Euphausiacea species

物种 species	样本数 sample size	平均种间距离 interspecific distance	种内距离 intraspecific distance	种间/种内距离比值 distance ratio	
晶磷虾 Euphausia crystallorophias	21	0.206	0.008	25.7	
南极磷虾 Euphausia superba	58	0.194	0.011	17.6	
挪威大磷虾 Meganyctiphanes norvegica	16	0.169	0.004	42.2	
中华假磷虾 Pseudeuphausia sinica	20	0.196	0.010	19.6	
无刺拟樱磷虾 Thysanoessa inermis	30	0.173	0.011	15.8	
拉氏拟樱磷虾 Thysanoessa raschii	30	0.184	0.002	91.8	
平均值 average	—	0.187	0.008	23.4	

表 4 磷虾目 11 个磷虾属间及属内遗传距离

Tab. 4 Pairwise-species and within-species genetic distance in 11 Euphausiacea genus

属 genus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	属内 intra-genus
深海磷虾属 Bentheuphausia											n/c
磷虾属 Euphausia	0.246										0.135
大磷虾属 Meganyctiphanes	0.240	0.172									n/c
臂磷虾属 Nematobrachion	0.199	0.175	0.121								0.088
线脚磷虾属 Nematoscelis	0.217	0.204	0.159	0.151							0.115
夜明磷虾属 Nyctiphanes	0.234	0.188	0.144	0.150	0.156						0.079
假磷虾属 Pseudeuphausia	0.245	0.211	0.189	0.161	0.192	0.188					0.010
手磷虾属 Stylocheiron	0.247	0.217	0.187	0.181	0.183	0.192	0.212				0.163
长脚磷虾属 Tessarabrachion	0.220	0.204	0.141	0.134	0.147	0.153	0.185	0.174			n/c
拟樱磷虾属 Thysanoessa	0.222	0.190	0.155	0.153	0.165	0.179	0.199	0.197	0.114		0.063
櫻磷虾属 Thysanopoda	0.203	0.185	0.138	0.113	0.151	0.156	0.175	0.191	0.121	0.149	0.080

另外4个种与它们相距较远且分散。此外,4种系 统发育树都将拟樱磷虾属(Thysanoessa)与长脚磷 虾属(Tessarabrachion)聚为1支。

邻接树总体上可分为3大支(图1),第1支由 十足目的中国对虾最先分支出来单独成支,处在 进化树的底部;第2支由1个外群种和5个磷虾 种组成,分别是糠虾目的黑褐新糠虾,假磷虾属 和手磷虾属的3种磷虾;第3支系最大,由余下的 10属45种磷虾组成,其中第3支系又分成4个小 分支,第1小分支由手磷虾属余下的4种、深海 磷虾属、拟樱磷虾属及长脚磷虾属组成,第2小 分支由线脚磷虾属6种磷虾单独构成,第3小分 支由夜明磷虾属、大磷虾属、臂磷虾属及樱磷 虾属共8种磷虾组成,第4小分支由磷虾属单独 组成。

最大似然树总体上也分为 3 大支(图 2), 第 1 支由 2 个外群种及 5 种磷虾构成, 其分成 3 个小 支系, 最早分支出来的是作为外群的中国对虾和 黑褐新糠虾, 其次是假磷虾属, 最后是手磷虾属 的 3 种磷虾; 第 2 支由手磷虾属余下的 4 种、深 海磷虾属及线脚磷虾属共 11 种磷虾组成; 第 3 支 由余下的 45 种磷虾组成, 分为 3 个小支系, 分别 是樱磷虾属、臂磷虾属、拟樱磷虾属及长脚磷虾 属共 11 种磷虾组成的第 1 小支系, 大磷虾属及夜 明磷虾属共 3 种磷虾组成的第 2 小支系, 以及磷 虾属 20 种单独组成的第 3 小支系。

最大简约树同样可分为 3 个大支(图 3), 第 1 支由两个外群种及假磷虾属组成; 第 2 支包含 2 个小分支, 第 1 小分支由手磷虾属的 3 种、夜明 磷虾属及线脚磷虾属共 11 种磷虾组成, 第 2 小分 支由拟樱磷虾属、长脚磷虾属、手磷虾属余下的 4 种及深海磷虾属共 11 种磷虾组成; 第 3 支由磷 虾属、大磷虾属、臂磷虾属、樱磷虾属共 26 种磷 虾组成。

基于距离构建的 UPGMA 树能较好地区分大 部分磷虾目的属(图 4),除手磷虾属在发育树中比 较分散外,有 7 个属独立成支。最先分化出来的 是十足目的中国对虾,其次是糠虾目的黑褐新糠 虾,磷虾目中最先分化出来的是深海磷虾科的唯 一种即深海磷虾。余下的磷虾种可分为3 大支,磷 虾属为第 1 支,其中假磷虾属虽独立成支,但包含在磷虾属中;第 2 支则由线脚磷虾属和夜明磷 虾属组成,第 3 支分 3 个小支系,第 1 小支系由拟 樱磷虾属和长脚磷虾属组成,第 2 小支系为大磷 虾属,第 3 小支系由臂磷虾属与樱磷虾属组成。

3 讨论

磷虾全部为海生种,分布广,数量大,在海 洋浮游生物群落中占据重要地位,是许多经济鱼 类、海豹和鲸类的重要饵料,也是重要的渔业捕 捞对象,磷虾类的南极磷虾资源极为丰富,被誉 为"世界未来的食品库"。由于磷虾营漂浮生活, 具有一定游泳能力,其不同种群间基因流较小, 因此更易积累遗传分化^[16]。陶振铖等^[17]通过研究 发现太平洋磷虾的中国近海群体与东太平洋群体 的发育途径存在差别。虽然磷虾的形态学研究基 础较好,但该类群中也可能存在隐种分化^[18],如 王敏晓等^[19]发现太平洋两侧的太平洋磷虾同样 可能存在亚种甚至隐种的分化。在形态鉴定基础 上,利用线粒体 DNA 序列差异可为磷虾物种的 鉴定及系统进化关系提供补充资料。

从碱基组成来看,本研究 50 种磷虾的 COI 基 因碱基组成为: A+T 为 63.05%, G+C 为 36.95%, A+T碱基含量显著高于G+C碱基含量,该结果与 Asakawa 等^[20]提出的后生动物线粒体基因的碱基 组成具有明显的偏倚性的结论相一致。有关线粒 体COI基因的碱基组成已在许多生物中进行了报 道,如虾类^[21]、蟹类^[22-24]等甲壳类的碱基组成都 具有特定的碱基偏倚特点,本研究结果证明了磷 虾类的线粒体碱基组成存在明显的 T 碱基偏倚特 点。从遗传距离来分析,50种磷虾的种间遗传距 离在0.065~0.306、其平均值为0.186、种内遗传距 离范围在 0~0.071, 平均值为 0.017, 平均种间距 离约为种内距离的11倍。此外,对样本数量较多 的 6 种磷虾单独分析, 其平均种间距离与种内距 离之比达到了 23.4 倍, 南极磷虾种间距离为种内 距离的 17.6 倍。根据 Hebert 等^[11]所推荐的 COI 基因物种鉴定最小种间遗传距离 0.02, 且种间距 离与种内距离差异需达到10倍以上的观点,利用 该结果可以对磷虾种进行较好地区分。以上结果



图 1 基于 COI 序列构建的磷虾目 NJ 系统树 枝上数字分别表示置信度.

Fig. 1 Neighbor-joining phylogenetic tree in the Euphausiacea based on COI sequences The values of bootsrap confidence level are indicated above the branch.



图 2 基于 COI 序列构建的磷虾目 ML 系统树

枝上数字分别表示置信度.

Fig. 2 Maximum likelihood phylogenetic tree in the Euphausiacea based on COI sequences The values of bootsrap confidence level are indicated above the branch.



图 3 基于 COI 序列构建的磷虾目 MP 系统树枝上数字分别表示置信度.

Fig. 3 Maximum parsimony phylogenetic tree in the Euphausiacea based on COI sequences The values of bootsrap confidence level are indicated above the branch.



Fig. 4 UPGMA phylogenetic tree in the Euphausiacea based on COI sequences

表明, 基于磷虾 COI 基因序列间的差异能够很好 地对不同磷虾种进行区分, 这对于磷虾目的分类 鉴定具有重要的应用价值。

在磷虾目系统发育树中, 基于 COI 基因构建 的 NJ 树、ML 树及 MP 树的拓扑结构相似, 假磷 虾属均处于系统树的基部, 而磷虾属则是最后分 支出来,揭示其在磷虾目中为较新的一个属。结 合 UPGMA 树分析, 在磷虾目总共 11 个属中, 有 7个属可分别聚为独立支系。手磷虾属(Stylocheiron) 分散为 2~4 支, 只有 3 个种单独聚为 1 支, 另外 4 个种在 NJ、ML、MP 3 种树中与深海磷虾属 (Bentheuphausia)聚为1支, 而在 UPGMA 树中则 分散成 3 个不同群, 手磷虾属的分类结果与郑重 等^[2]的研究得出手磷虾属存在较多变型种及多个 群的结论互相印证。从 NJ 系统树及 ML 系统树可 知,磷虾属与夜明磷虾属及大磷虾属的关系较近, 这与 Bucklin 利用磷虾科的 8 属 14 种线粒体 CO I 和 16SrRNA 序列构建的磷虾的进化关系图相一 致(未发表数据,引自 www.zoogene.org)。通过分 析两个外群在进化树中的位置,4种树的结果均 表明, 在真虾总目中, 磷虾目与糠虾目的关系更 接近,其次才是十足目,这与 Jarman 等^[25-26]利用 28S rRNA 研究得到磷虾目与糠虾目的亲缘关系 近于十足目的结果相一致。此外,本研究还有一 个重要的发现,在4种系统进化树中,长脚磷虾 属的唯一种裂眼长脚磷虾(Tessarabrachion oculatum)无一例外地都与拟樱磷虾属聚在一起。根据 这个研究结果,可考虑剔除长脚磷虾属,将该磷 虾种并入拟樱磷虾属, 当然, 这需要以后获取更 多的样本加以验证,并联合该领域的专家来做进 一步的探讨。

本研究较全面地阐述了磷虾目 11 属磷虾的 系统进化关系,同时也表明基于线粒体 COI 基因 构建的磷虾目分子系统树可以用来探讨磷虾目 属、种分类单元的系统发育问题,具有重要的理 论和现实意义。此外,作为深海磷虾科的单一种 深海磷虾在 NJ、ML、MP 树中并未与磷虾科形成 明显分化,而是与手磷虾属聚为一支,显示其与 手磷虾属关系较近,而 UPGMA 树中的深海磷虾 较早地分化出来,与磷虾科分化明显,支持了 Brinton^[27]所认为的它是现存的磷虾中最原始的 一个物种的观点,这与前 3 种树得出的结果存在 差异,究其原因,尚需要作进一步的探讨。由于有 些磷虾种类的样本采集不易,有关深海磷虾的进 化地位,手磷虾属内部系统进化关系以及长脚磷 虾属的剔除与否,还需要投入更多的时间及精力, 收集更多的样本作进一步的研究。

参考文献:

- de C Baker A, Boden B P, Brinton E. A Practical Guide to the Euphausiids of the World[M]. London: Natural History Museum, 1990.
- [2] Zheng Z, Li S J, Guo D H. Marine Krill Biology[M]. Xiamen: Xiamen University Press, 2011. [郑重, 李少菁, 郭东 晖. 海洋磷虾类生物学[M]. 厦门: 厦门大学出版社, 2011.]
- [3] Boden B P, Johnson M W, Brition E. Euphausiacea (Crustacea) of the North Pacific[M]. Berkeley: University of California Press, 1955.
- [4] Mauch J, Fisher I R. The biology of Euphausiids[J]. Advance in Marine Biology, 1969, 7: 1-454.
- [5] Huang H L, Chen X Z, Feng C L. Analysis of development status of antarctic krill resources[J]. Fishery Modernization, 2007, 34(1): 48-51. [黄洪亮,陈雪忠, 冯春雷. 南极磷虾资 源开发现状分析[J]. 渔业现代化, 2007, 34(1): 48-51.]
- [6] Xu Z L. Distribution patterns of pelagic euphausiids in the East China Sea[J]. Acta Ecologica Sinica, 2007, 27(9): 3678-3686. [徐兆礼. 东海浮游磷虾类的生态类型[J]. 生 态学报, 2007, 27(9): 3678-3686.]
- [7] Zhu G P. Population biology of antarctic krill Euphausia superba I—age, growth and mortality[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2011, 35(5): 862-868. [朱国平. 南极磷虾种 群生物学研究进展 I: 年龄、生长与死亡[J]. 水生生物学 报, 2011, 35(5): 862-868.]
- [8] Zhu G P. Population biology of antarctic krill *Euphausia superba* II—reproduction[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2013, 37(4): 751-758. [朱国平. 南极磷虾种群生物学研究 进展 II: 繁殖[J]. 水生生物学报, 2013, 37(4): 751-758.]
- [9] Yue D D, Wang L M, Huang H L, et al. Status of development and countermeasures on utilization technology of antarctic krill resources in China[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2015, 17(3): 159-166. [岳冬冬,王 鲁民,黄洪亮,等. 我国南极磷虾资源开发利用技术发展 现状与对策[J]. 中国农业科技导报, 2015, 17(3): 159-166.]
- [10] Huang H L, Chen X Z, Liu J. Analysis of the status and trend of the Antarctic krill fishery[J]. Chinese Journal of Polar

Research, 2015, 27(1): 25-30. [黄洪亮, 陈雪忠, 刘健. 南极磷虾渔业近况与趋势分析[J]. 极地研究, 2015, 27(1): 25-30.]

- [11] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proceedings of the Royal Society B, 2003, 270: 313-322.
- [12] Shen X, Wang H Q, Ren J F, et al. The mitochondrial genome of *Euphausia superba* (Prydz Bay) (Crustacea: Malacostraca: Euphausiacea) reveals a novel gene arrangement and potential molecular markers[J]. Molecular Biology Reports, 2010, 37(2): 771-784.
- [13] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The Clustal-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25: 4876-4882.
- [14] Librado P, Rozas, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. Bioinformatics, 2009, 25: 1451-1452.
- [15] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28: 2731-2739.
- [16] Papetti C, Zane L, Bortolotto E, et al. Genetic differentiation and local temporal stability of population structure in the Euphausiid *Meganyctiphanes norvegica*[J]. Marine Ecology Progress Series, 2005, 289: 225-235.
- [17] Tao Z C, Li C L, Sun S. Spatial distribution of larvae and larval development of *euphausia* pacifica in the Yellow Sea
 [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2013, 44(5): 1152-1161. [陶振铖, 李超伦, 孙松. 黄海太平洋磷虾的幼体分 布及发育途径[J]. 海洋与湖沼, 2013, 44(5): 1152-1161.]
- [18] Bucklin A, Wiebe P H, Smolenack S B, et al. DNA barcodes for species identification of Euphausiids (Euphausiacea, Crustacea)[J]. Journal of Plankton Research, 2007, 29(6): 483-493.
- [19] Wang M X, Cheng F P, Li C L, et al. DNA barcoding of zooplankton in the Jiaozhou Bay for species identification[J].
 Oceanologia et Limnologia Sinica, 2011,42(5):702-710. [王

敏晓,程方平,李超伦,等. 基于线粒体 cox1 片段序列的 胶州湾浮游动物 DNA 条形码分析[J]. 海洋与湖沼, 2011, 42(5): 702-710.]

- [20] Asakawa S, Kumazawa Y, Araki T, et al. Strand-specific nucleotide composition bias in echinodermand vertebrate mitochondrial genomes[J]. Journal of Molecular Evolution, 1991, 32(6): 511-520.
- [21] Yi X, Wang P P, Wang J, et al. The research of COI-based DNA barcoding in Penaeidaes' identification[J]. Journal of Fisheries of China, 2018, 42(1): 1-9. [易啸, 王攀攀, 王军, 等. 基于线粒体 COI 的 DNA 条形码在对虾科种类鉴定中的研究[J]. 水产学报, 2018, 42(1): 1-9.]
- [22] Guo T H, Kong X Y, Chen S Q, et al. A study of the sequences of mitochondrial 16S rRNA and COI gene fragments of *Portunus trituberculatus*[J]. Periodical of Ocean University of China, 2004, 34(1): 22-28. [郭天慧, 孔晓瑜, 陈四清, 等. 三疣梭子蟹线粒体 DNA 16SrRNA 和 COI 基因片段序列的比较研究[J]. 中国海洋大学学报, 2004, 34(1): 22-28.]
- [23] Ge J C, Xu Z Q, Li X H, et al. Genetic characters of *Eriocheir sinensis* populations from four water systems revealed by mitochondrial COI gene sequence[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(1): 16-22. [葛家春, 许志强, 李晓晖, 等. 利用线粒体 COI 序列分析 4 水系中华绒螯蟹群 体遗传学特征[J]. 中国水产科学, 2011, 18(1): 16-22.]
- [24] Ma H Y, Ma C Y, Lix C, et al. The complete mitochondrial genome sequence and gene organization of the mud crab (*Scylla paramamosain*) with phylogenetic consideration[J]. Gene, 2013, 519: 120-127.
- [25] Jarman S N, Nicol S, Elliott N G, et al. 28S rDNA evolution in Eumalacostraca and the phylogenetic position of krill[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2000, 17(1): 26-36.
- [26] Jarman S N. The evolutionary history of krill inferred from nuclear large subunit rDNA sequence analysis[J]. Biological Journal of the Linnean Society, 2001, 73: 199-212.
- [27] Brinton E. The distribution of Pacific Euphausiids[M]. La Jolla: Bulletin of the Scripps Institution of Oceanography, 1962, 8(2): 51-270.

Study on phylogenetic relationships of Euphausiacea based on mitochondrial COI gene sequences

CHEN Wei, MA Chunyan, FENG Chunlei, WANG Wei, WANG Lumin, MA Lingbo

Key and Open Laboratory of Marine and Estuarine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China

Abstract: In order to study the phylogenetic relationship of Euphausiacea, 50 Euphausiacea species were selected and used for the construction of a phylogenetic tree. The mitochondrial COI gene was amplified using PCR techniques. The results showed that a 519 bp COI gene fragment was obtained and sequenced, with 258 mutation sites, all of which were base substitutions, and no insertion/deletion sites. The contents of A, T, G, and C were 27.58%, 35.47%, 18.88%, and 18.07% respectively. Additionally, the content of A+T (63.05%) was significantly higher than that of G+C (36.95%). The genetic distance within species ranged from 0 to 0.071 and the average value was 0.017. The genetic distance among species ranged from 0.065 to 0.306, and the average value was 0.186, which was about 11 times that of the former. With regards to the minimum interspecific genetic distance of 0.020, the difference between the COI gene sequences could distinguish the Euphausiacea species efficiently. Four phylogenetic trees were constructed: neighbor-joining tree (NJ), maximum likelihood tree (ML), maximum parsimony tree (MP), and UPGMA tree. Their topological structures were basically the same, i.e. they can be divided into three branches. Pseudeuphausia was on the bottom of the phylogenetic tree, which was one of the earlier species of Euphausiacea. The Euphausia, which contained the most species, finally was branched out, indicating that it was a relatively newer genus of Euphausiacea. The phylogenetic relationships among 11 Euphausiacea genera have been comprehensively discussed in this paper. The results showed that the phylogenetic tree constructed based on the mitochondrial COI gene could be used to study the phylogenetic relationships between the Euphausiacea species and was of notable theoretical and practical value.

Key words: Euphausiacea; mitochondrial DNA; COI; phylogenetic relationships Corresponding author: MA Lingbo. E-mail: malingbo@sina.com