

对虾科物种线粒体基因组特征和系统发育分析

朱雷宇, 朱志煌, 方民杰, 朱陇强, 林琪

Characteristics and phylogenetic analysis of mitochondrial genome in the Penaeidae

ZHU Leiyu, ZHU Zhihuang, FANG Minjie, ZHU Longqiang, LIN Qi

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20211003577>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

白洋淀流域宽鳍遗传多样性及种群历史动态

Genetic diversity and population historical dynamics of *Zacco platypus* in Baiyangdian Basin

上海海洋大学学报. 2021, 30(5): 837 <https://doi.org/10.12024/jsou.20200903178>

凡纳滨对虾繁育相关基因 *Allatostatin-AR* 的克隆与表达分析

Cloning and expression of breeding- & development-related gene *Allatostatin-A receptor* from *Litopenaeus vannamei*

上海海洋大学学报. 2023, 32(1): 20 <https://doi.org/10.12024/jsou.20210503463>

基于线粒体 *Cytb* 序列的3个宽体金线蛭群体遗传多样性分析

Genetic diversity analysis of three populations of *Whitmania pigra* Whitman based on mitochondrial *Cytb* gene

上海海洋大学学报. 2020, 29(1): 9 <https://doi.org/10.12024/jsou.20181102429>

云南澜沧江上游短尾高原鳅遗传多样性分析

Genetic diversity analysis of *Triplophysa brevicauda* in the upper reaches of Lancang River in Yunnan Province

上海海洋大学学报. 2022, 31(1): 52 <https://doi.org/10.12024/jsou.20201203236>

基于DNA条形码的武夷光唇鱼物种有效性

Species validity of *Acrossocheilus wuyiensis* based on DNA barcode

上海海洋大学学报. 2022, 31(4): 858 <https://doi.org/10.12024/jsou.20210403418>

文章编号: 1674-5566(2023)02-0292-11

DOI:10.12024/jsou.20211003577

对虾科物种线粒体基因组特征和系统发育分析

朱雷宇^{1,2}, 朱志煌¹, 方民杰¹, 朱陇强¹, 林 琪¹

(1. 福建省水产研究所 福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室, 福建 厦门 361013; 2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 综合分析对虾科 (Penaeidae) 21 个物种线粒体基因组的全序列, 发现其线粒体基因组的长度为 15 893 ~ 16 071 bp, A + T 含量为 64.59% ~ 70.61%。 K_a/K_s 分析表明, 对虾科物种线粒体 13 个蛋白质编码基因 (protein-coding genes, PCGs) 中, *atp8* 基因的 K_a/K_s 最高, 表明在对虾科中 *atp8* 基因受到了较弱的选择压力; 在差异位点的分析中, 发现 *nd5* 和 *rnl* 基因的差异位点比例较高, 是理想的分子标记, 可用于分析对虾不同群体之间的遗传多样性; 在密码子的使用中, 被编码的氨基酸均体现相似的偏好性。同时, 采用 ML (Maximum likelihood) 和 BI (Bayesian inference) 方法构建系统发育树, 结果显示, 这两种方法构建的系统发育树拓扑结构完全一致, 且同属物种也都归为一类或者单独归为一支。本研究为快速鉴定对虾科生物提供了可靠的分子标记, 为分析对虾科物种遗传多样性提供理论依据。

关键词: 对虾科; 线粒体基因组; 结构特征; 系统发育

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

对虾科 (Penaeidae) 隶属节肢动物门 (Arthropoda) 软甲纲 (Malacostraca) 十足目 (Decapoda) 对虾总科 (Penaeoidea), 共有 26 个属约 200 多种^[1-2]。对虾个体较大, 味道鲜美, 营养价值高, 在渔业经济中占有非常重要的地位。它们广泛分布于亚热带与热带的近岸浅水海域^[3], 其中, 我国海域记录的对虾科物种有 72 种^[4]。

以往关于对虾的研究^[5-9]多集中于形态、繁育、营养、病害等方面。然而, 一些对虾在形态上非常相似, 仅通过形态学上的差异来进行鉴定无法准确地确定其亲缘关系。目前, 有关对虾的分类学研究^[3, 10-11]也十分广泛, 但这些系统发育研究多是通过单基因序列建立的系统进化树来开展分析的, 往往不能较好地解决较为复杂的物种分类问题^[12]。至今, 对于对虾物种的系统发育关系仍然存在着较大的争议。

线粒体基因组 (Mitochondrial DNA, mtDNA) 呈闭合环状, 作为核外遗传物质, 其结构简单, 具有母系遗传等特性^[13-14], 通常被用于甲壳类动物

的系统发育研究。目前, GenBank 数据库中已公布 22 个对虾科物种的线粒体全基因组序列, 剔除 1 个基因组序列显示为待验证状态的物种, 剩余 21 个物种的全基因组序列被用于开展分子系统学相关研究。

生物在进化过程中伴随着基因的改变, 同时受到自然选择作用, 一般表现为生物机体的生物功能和形态发生变化。生物体通过自然选择作用, 不断适应多变的自然环境, 让种群得以延续^[15-16]。在对编码蛋白质的 DNA 序列的研究中, 为了检验选择压力对该物种进化速率的影响, 通过计算非同义替换率 (K_a) 与同义替换率 (K_s) 的比值来表示该基因在进化过程中存在的 3 种情况: $K_a/K_s > 1$ 表示基因受到了正向选择; $K_a/K_s = 1$ 表示基因受到了中性选择; $K_a/K_s < 1$ 表示基因受到纯化选择^[17-18]。

本研究系统地对 21 个对虾科物种线粒体全基因组序列的结构特征、选择压力、分子标记、差异位点进行了分析, 利用 13 个蛋白质编码基因

收稿日期: 2021-10-08 修回日期: 2022-06-21

基金项目: 福建省海洋与渔业结构调整专项 (2017HYJG03, 2020HYJG01, 2020HYJG08); 福建省海洋服务与渔业高质量发展专项 (FJHY-YYKJ-2022-1-7)

作者简介: 朱雷宇 (1998—), 男, 硕士研究生, 研究方向为虾类分子系统学。E-mail: zhuleiyu1998@163.com

通信作者: 林 琪, E-mail: xmqlin@sina.com

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部 (CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

(Protein-coding genes, PCGs) 构建系统发育树,探讨对虾科各物种之间的系统发育关系,为对虾科物种的分类学、生态学方面的研究提供依据,为寻找其合适的分子标记、评估种群遗传多样性提供参考。

1 材料与方法

1.1 数据的获取

从 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) 公共数据库中检索并获取 21 种对虾科线粒体基因组全序列,其中未检索到中文名称的物种直接用拉丁名表示,物种相关的信息见表 1。

1.2 同义与非同义替代分析

为了分析对虾科物种线粒体基因组 13 个 PCGs 的选择压力,运用 MEGA 5.0 软件^[19] 对 21 个物种进行单基因比对。采用 $K_aK_s_calculator$ 2.0 软件^[20] 计算它们的同义替换率(K_s)和非同义替换率(K_a)。计算方法选择近似法中的 Yang-Nielsen 法(γ -MYN)^[21],遗传密码子选择无脊椎动物线粒体密码子。

1.3 基因差异位点分析

将 21 个对虾科物种的 13 个 PCGs 和 2 个核糖体 RNA 基因运用 MEGA 5.0 软件^[18] 进行多重序列比对。然后通过 DnaSP 6 软件^[22] 分析对虾线粒体基因组的基因差异位点。

表 1 对虾科线粒体基因组的基本特征

Tab. 1 Basic characteristics of mitogenome of Penaeidae

分类 Classification	种名 Species	GenBank 接收号 GenBank accession No.	长度 Length/ bp	AT 含量 AT content/ %	非编码 区长度 non-coding control region length/ bp	非编码控制区 AT 含量 non-coding control region AT content/%
明对虾属 <i>Fenneropenaeus</i>	墨吉明对虾 <i>Fenneropenaeus merguensis</i>	NC_026884	16 023	67.91	1 001	81.52
	长毛明对虾 <i>Fenneropenaeus penicillatus</i>	NC_026885	16 040	68.19	1 000	83.10
	印度明对虾 <i>Fenneropenaeus indicus</i>	NC_031366	16 071	68.05	1 001	79.52
	中国明对虾 <i>Fenneropenaeus chinensis</i>	NC_009679	16 004	68.85	937	82.71
对虾属 <i>Penaeus</i>	斑节对虾 <i>Penaeus monodon</i>	NC_002184	15 984	70.61	991	81.54
	短沟对虾 <i>Penaeus semisulcatus</i>	MG821354	16 002	68.59	789	82.26
	<i>Penaeus acchensis</i>	MG650292	15 991	69.60	993	81.27
滨对虾属 <i>Litopenaeus</i>	细角滨对虾 <i>Litopenaeus stylirostris</i>	NC_012060	15 988	68.59	999	80.68
	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	NC_009626	15 990	67.70	995	82.91
美对虾属 <i>Farfantepenaeus</i>	加州美对虾 <i>Farfantepenaeus californiensis</i>	NC_012738	15 975	67.04	990	81.01
囊对虾属 <i>Marsupenaeus</i>	日本囊对虾 <i>Marsupenaeus japonicus</i>	NC_007010	15 968	66.46	992	82.46
沟对虾属 <i>Melicertus</i>	宽沟对虾 <i>Melicertus latisulcatus</i>	NC_040140	15 971	64.74	927	80.26
仿对虾属 <i>Parapenaeopsis</i>	哈氏仿对虾 <i>Parapenaeopsis hardwickii</i>	KU899136	15 959	69.65	933	83.92
	亨氏仿对虾 <i>Parapenaeopsis hungerfordi</i>	NC_038069	15 952	64.59	717	74.06
	细巧仿对虾 <i>Parapenaeopsis tenella</i>	MK164420	15 893	69.28	997	80.54
鹰爪虾属 <i>Trachypenaeus</i>	鹰爪虾 <i>Trachypenaeus curvirostris</i>	NC_050695	15 968	68.67	1 011	83.48
新对虾属 <i>Metapenaeus</i>	近缘新对虾 <i>Metapenaeus affinis</i>	NC_039179	16 027	65.92	673	84.84
	刀额新对虾 <i>Metapenaeus ensis</i>	NC_026834	15 944	65.69	1 001	82.22
	周氏新对虾 <i>Metapenaeus joyneri</i>	NC_042173	16 008	68.20	1 007	82.92
赤虾属 <i>Metapenaeopsis</i>	须赤虾 <i>Metapenaeopsis barbata</i>	NC_040139	15 973	67.58	1 074	82.12
	戴氏赤虾 <i>Metapenaeopsis dalei</i>	NC_029457	15 939	67.98	996	80.82

1.4 遗传距离分析

将对虾科 21 个物种线粒体基因组的 13 个 PCGs 通过 MEGA 5.0 软件^[19] 进行比对,用 Kimura 双参数法计算各物种之间的相对遗传距离。

1.5 密码子使用模式分析

剔除对虾科 21 个物种线粒体基因组 13 个 PCGs 的终止密码子,通过 MEGA 5.0 软件^[19] 进行比对,并计算密码子的偏好性。最后将计算结果利用 TBtools 软件^[23] 绘制热谱图。

1.6 系统发育分析

采用 MUSCLE 软件^[24] 对对虾科 21 个物种线粒体基因组 13 个 PCGs 序列进行整理,并进行串联比对。在外群的选择上,选取进化更为原始的匙指虾科 (Atyidae) 红鼻虾 (*Caridina gracilipes*) 用于系统发育分析。整理比对过后的数据通过 Gblocks^[25] 在线系统进行校正,去除不可靠的对齐序列。之后运用 jModelTest 软件^[26] 估算最适的核苷酸替代模型,根据估算的结果,选择 GTR + I + G 核苷酸替代模型。

在系统发育分析中,采用最大似然法 (Maximum likelihood, ML) 和贝叶斯法 (Bayesian inference, BI) 来构建系统发育树。其中,ML 进化树运用 PhyML 3.1 软件^[27] 进行构建,自展值 (Bootstrap) 设置为 1 000,以评估其分枝节点的可靠性 (Bootstrap probability, BP)。BI 进化树则运用 MrBayes v3.2.6 软件^[28] 进行构建,运行世代数设置为 10 000 000,运行 4 条蒙特卡罗马尔夫链 (Markov chain monte carlo, MCMC),其中包括 3 条热链和 1 条冷链。运行每 500 世代取样 1 次,最后去掉运算开始的前 25% 取样,剩下的取样则用于测算贝叶斯后验概率 (Posterior probability, PP)。

2 结果与分析

2.1 对虾科线粒体基因组的基本特征

用于分析的 21 个对虾科物种线粒体全基因组序列,长度为 15 893 ~ 16 071 bp (表 1)。其中,序列最长的为印度明对虾 (*F. indicus*),序列最短的为细巧仿对虾 (*P. tenella*)。由表 1 可知,在 21 个物种中,线粒体基因组主编码链的 A + T 含量最高的为 70.61% (斑节对虾 *P. monodon*),最低的为 64.59% (亨氏仿对虾 *P. hungerfordi*),平均值

为 67.82%。

所有 21 个物种的线粒体基因组成与大部分无脊椎动物一样,均包括 13 个 PCGs、2 个核糖体 RNA 基因、22 个转运 RNA 基因,共 37 个编码基因和 1 个非编码控制区 (Control region, CR)^[29]。在基因排列顺序方面,所有 21 个物种均与十足目线粒体基因组的原始排列顺序一样,遵循 *trnI*, *trnQ*, *trnM*, *nd2*, *trnW*, *trnC*, *trnY*, *cox1*, *trnL2*, *cox2*, *trnK*, *trnD*, *atp8*, *atp6*, *cox3*, *trnG*, *nd3*, *trnA*, *trnR*, *trnN*, *trnS1*, *trnE*, *trnF*, *nd5*, *trnH*, *nd4*, *nd4L*, *trnT*, *trnP*, *nd6*, *cytb*, *trnS2*, *nd1*, *trnL1*, *rnlL*, *trnV*, *rnsS* 的排列顺序,见图 1。在 13 个 PCGs 中,有 9 个基因 (*nd2*, *cox1*, *cox2*, *atp8*, *atp6*, *cox3*, *nd3*, *nd6*, *cytb*) 编码在重链上,4 个基因 (*nd5*, *nd4*, *nd4L*, *nd1*) 编码在轻链上,如图 1。

21 种对虾线粒体基因组 CR 区均位于 *rnsS* 基因与 *trnI* 基因之间。其分析结果显示,A + T 含量最高的为 84.84% (近缘新对虾 *M. affinis*),最低的为 74.06% (亨氏仿对虾 *P. hungerfordi*),平均值为 81.63%,AT 含量明显要大于 GC 含量 (表 1)。CR 区序列最长的为须赤虾 (*M. barbata*),为 1 074 bp;最短的为近缘新对虾 (*M. affinis*),为 673 bp。同时,经序列比对,所有 21 个对虾物种 CR 区的保守位点仅有 48 个,序列相似度仅为 3.65%,为不保守序列。

2.2 同义与非同义替代分析

根据 BURKENROA^[30] 对于对虾科分类,以 21 个对虾科物种的 13 个 PCGs 为分析对象,分别对这些物种中的 Penaeini、Trachypenaeini 和 Parapenaeini 群体,以及新对虾属物种进行选择压力分析 (图 2)。

在 Penaeini 群体中 [图 2(a)]: *cox1* 基因的 K_a/K_s 最低 (平均值为 0.018),其次是 *cytb*、*cox2*、*cox3*、*nd1* 基因 (平均值分别为 0.027、0.050、0.076、0.091),说明在 Penaeini 群体中,这些基因承受着较强的选择压力和功能束缚;而 *atp8* 基因的 K_a/K_s 最高 (平均值为 0.465),其次为 *nd6*、*nd2*、*nd4*、*nd3* 基因 (平均值分别为 0.349、0.337、0.260、0.218),表明在 Penaeini 群体中上述基因受到了较弱的选择压力。

13 个 PCGs 中, *atp8* 基因的 K_a/K_s 标准差最高 (0.085),其次是 *nd2*、*nd3*、*nd4L* 基因 (分别为 0.084、0.056、0.051),说明在 Penaeini 群体内,这

些基因存在明显的种间选择压力差异。*cox1* 基因的 K_a/K_s 标准差最低(0.004),其次是 *cytb*、*cox2*、*cox3* 基因(分别为0.008、0.015、0.015),说明这些基因的种间选择压力差异较小。

在 Trachypenaeini 和 Parapenaeini 群体以及新对虾属中[图 2(b)]: K_a/K_s 值最低的为 *cox1* 基因(平均为0.029),其次是 *cytb*、*cox2*、*cox3*、*atp6* 基因(平均值分别为0.068、0.073、0.090、0.112),说明在 Trachypenaeini 和 Parapenaeini 群体以及新对虾属中,这些基因所承受的选择压力较强;而 K_a/K_s 最高的为 *atp8* 基因(平均值为0.805),其次为 *nd6*、*nd4L*、*nd2*、*nd4* 基因(平均值

分别为0.582、0.404、0.326、0.276),表明在 Trachypenaeini、Parapenaeini 群体以及新对虾属中,这些基因所承受的选择压力较弱。

13 个 PCGs 中,*atp8* 基因的 K_a/K_s 标准差最高(0.243),其次是 *nd4L*、*nd6*、*nd4* 基因(分别为0.182、0.077、0.054),说明 Trachypenaeini、Parapenaeini 群体以及新对虾属中,这些基因存在较强的种间选择压力差异。*cox1* 基因的 K_a/K_s 标准差最低(0.004),其次是 *cox2*、*cytb*、*cox3*、*atp6* 基因(分别为0.011、0.013、0.017、0.017),说明这些基因的种间选择压力差异较小。

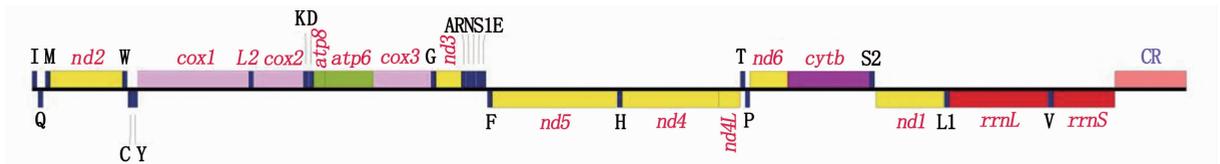
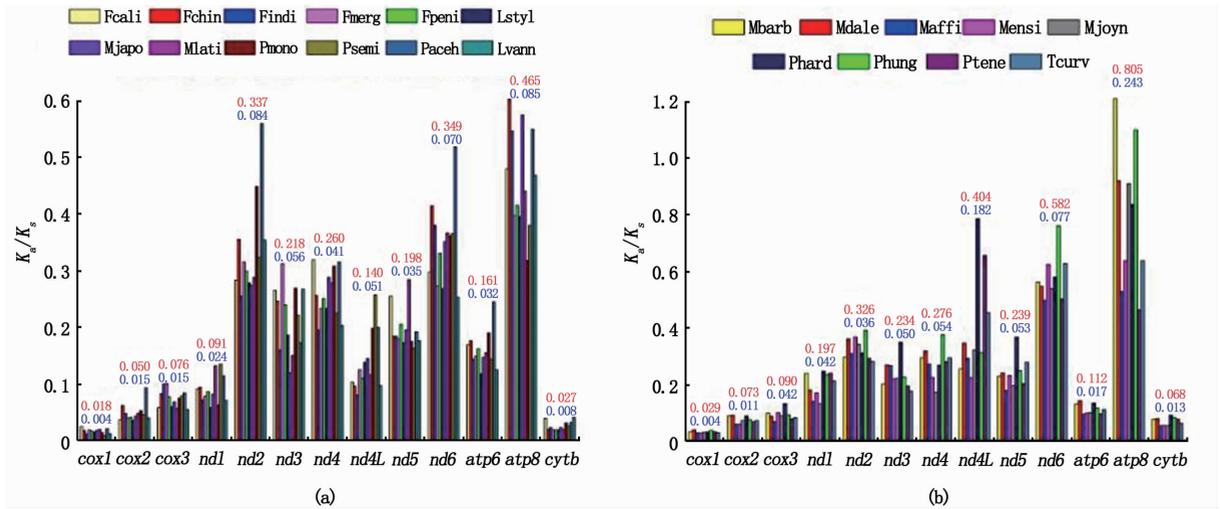


图 1 对虾科线粒体基因组排列顺序

Fig.1 The mitochondrial gene arrangement of Penaeidae



(a) Penaeini 群体。Fcali. 加州美对虾; Fchin. 中国明对虾; Findi. 印度明对虾; Fmerg. 墨吉明对虾; Fpeni. 长毛明对虾; Lstyl. 细角滨对虾; Mjapo. 日本囊对虾; Mlati. 宽沟对虾; Pmono. 斑节对虾; Psemi. 短沟对虾; Paceh. *Penaeus acchensis*; Lvann. 凡纳滨对虾; (b) Trachypenaeini、Parapenaeini 群体和新对虾属。Mbarb. 须赤对虾; Mdale. 戴氏赤对虾; Maffi. 近缘新对虾; Mensi. 刀额新对虾; Mjoyn. 周氏新对虾; Phard. 哈氏仿对虾; Phung. 亨氏仿对虾; Ptene. 细巧仿对虾; Tcurv. 鹰爪对虾。

(a) Penaeini group. Fcali. *Farfantepenaeus californiensis*; Fchin. *Fenneropenaeus chinensis*; Findi. *Fenneropenaeus indicus*; Fmerg. *Fenneropenaeus merguensis*; Fpeni. *Fenneropenaeus penicillatus*; Lstyl. *Litopenaeus stylirostris*; Mjapo. *Marsupenaeus japonicus*; Mlati. *Marsupenaeus laticulcatus*; Pmono. *Penaeus monodon*; Psemi. *Penaeus semisulcatus*; Paceh. *Penaeus acchensis*; Lvann. *Litopenaeus vannamei*; (b) Trachypenaeini、Parapenaeini groups and *Metapenaeus*. Mbarb. *Metapenaeopsis barbata*; Mdale. *Metapenaeopsis dalei*; Maffi. *Metapenaeus affinis*; Mensi. *Metapenaeus ensis*; Mjoyn. *Metapenaeus joyneri*; Phard. *Parapenaeopsis hardwickii*; Phung. *Parapenaeopsis hungerfordi*; Ptene. *Parapenaeopsis tenella*; Tcurv. *Trachypenaeus curvirostris*.

图 2 对虾科物种线粒体基因组选择压力分析

Fig.2 Selection pressure analysis of mitogenomes in the family Penaeidae

2.3 分子标记

对虾科线粒体基因组的 13 个 PCGs 和 2 个核糖体 RNA 基因的差异位点分析详见表 2。从分析结果可以看出: *cox1* 基因最为保守, 差异位点比例在 40% 以下 (38.81%); 7 个基因 (*cox3*、*cox2*、*cytb*、*nd1*、*nd4L*、*nd4*、*atp6*) 差异位点比例为 40% ~ 50%; 5 个基因 (*nd3*、*atp8*、*nd5*、*nd6*、*nd2*) 差异位点比例为 50% ~ 60%; 2 个基因 (*rrnL*、

rrnS) 差异位点比例为 60% ~ 70%, 其中, 差异位点比例最高的为 *rrnL* 基因 (65.35%)。

由表 2 可知, 差异位点数最多的基因为 *nd5* (912 个), 其次为 *rrnL* (713 个), 且这两个基因的差异位点比例较高 (均大于 50%)。因此, 在对虾群体遗传学的研究中, *nd5* 和 *rrnL* 基因是较为理想的分子标记。

表 2 对虾科线粒体基因组的基因变异位点分析

Tab. 2 Analysis of gene variation sites in the mitogenome of Penaeidae

参数 Parameter	基因名称 Gene name														
	<i>atp6</i>	<i>atp8</i>	<i>cob</i>	<i>cox1</i>	<i>cox2</i>	<i>cox3</i>	<i>nd1</i>	<i>nd2</i>	<i>nd3</i>	<i>nd4</i>	<i>nd4L</i>	<i>nd5</i>	<i>nd6</i>	<i>rrnL</i>	<i>rrnS</i>
总位点数* Total number of sites	675	159	1 135	1 528	688	781	936	994	349	1 341	275	1 716	495	1 091	683
保守位点数 Invariable sites	340	75	639	935	394	460	505	402	171	683	146	804	201	378	240
变异位点数 Variable sites	335	84	496	593	294	321	431	592	178	658	129	912	294	713	443
简约突变数 Parsimony informative sites	314	68	471	555	268	292	390	542	161	580	110	806	262	400	244
单现突变数 Singleton variable sites	21	16	25	38	26	29	41	50	17	78	19	106	32	313	199
变异位点比例 Ratio of variable sites/%	49.63	52.83	43.70	38.81	42.73	41.10	46.05	59.56	51.00	49.07	46.91	53.15	59.39	65.35	64.86

注: * 总位点数不包含缺失位点。

Notes: * The total number of sites does not include missing sites.

2.4 遗传距离分析

在 Penaeini 群体中, 遗传距离最小的为墨吉明对虾 (*F. merguensis*) 和长毛明对虾 (*F. penicillatus*, 0.062 8), 遗传距离最大的为 *P. acehensis* 和宽沟对虾 (*M. latisulcatus*, 0.264 1),

见图 3。在 Trachypenaeini、Parapenaeini 群体以及新对虾属中, 遗传距离最小的为戴氏赤虾 (*M. dalei*) 和须赤虾 (*M. barbata*, 0.150 2), 遗传距离最大的为亨氏仿对虾 (*P. hungerfordi*) 和戴氏赤虾 (0.29806), 见图 3。

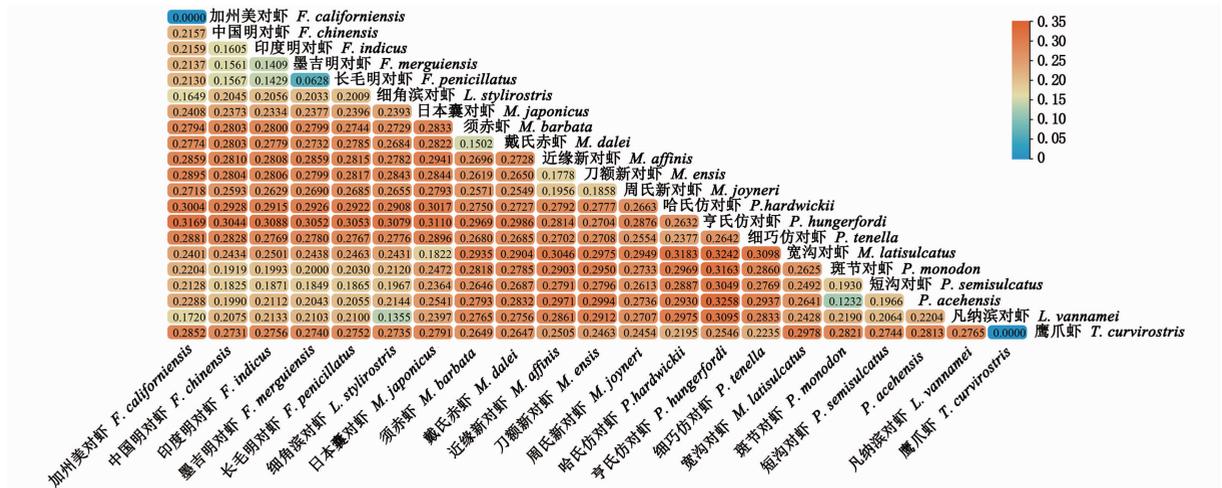
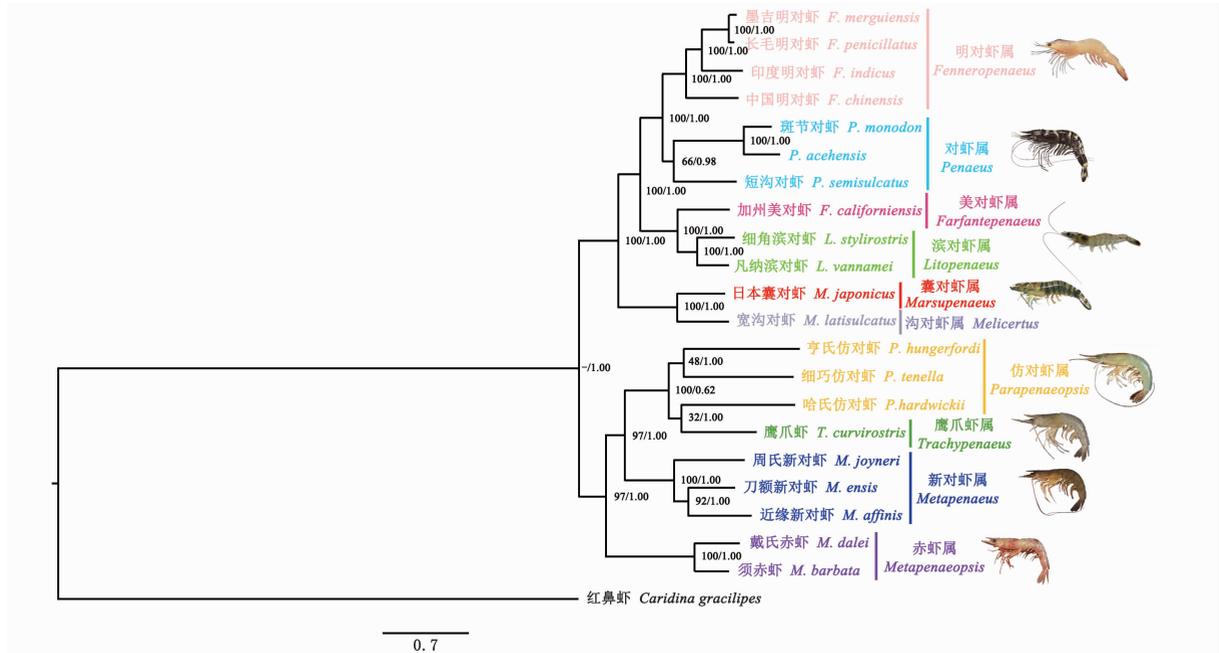


图 3 对虾科物种线粒体基因组 13 个 PCGs 遗传距离

Fig. 3 Genetic distance of 13 protein-coding genes in the mitogenome of Penaeidae species

在整个对虾科内,遗传距离最小的为长毛明对虾和墨吉明对虾(0.062 8),遗传距离最大的为亨氏仿对虾和 *P. aechensis*(0.325 8),见图 3。

同时,基于 21 个对虾科物种的 13 个 PCGs 所构建的进化树结果也完全支持遗传距离分析结果(图 4)。



分支上的数值为后验概率和自展值(BP/PP).

The values on the branches are the bootstrap probability and posterior probability (BP/PP).

图 4 利用 ML 和 BI 方法从线粒体基因组 13 个 PCGs 的核苷酸序列构建的系统发育树

Fig. 4 A phylogenetic tree constructed from the nucleotide sequence of 13 PCGs in the mitogenome using ML and BI methods

2.5 密码子的使用

在所分析的 21 个对虾科物种中,编码异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu1, Leu2)、苯丙氨酸(Phe)、缬氨酸(Val)、丙氨酸(Ala)、甘氨酸(Gly)、丝氨酸(Ser2)、苏氨酸(Thr)的密码子数较多(>200),编码半胱氨酸(Cys)、蛋氨酸(Met)、精氨酸(Arg)、天冬氨酸(Asp)、谷氨酰胺(Gln)、谷氨酸(Glu)、赖氨酸(Lys)、组氨酸(His)的密码子较少(<100),见图 5。

2.6 系统发育分析

以红鼻虾(*Caridina gracilipes*)为外群,通过最大似然法和贝叶斯法构建系统发育树,这两种方法构建的系统发育树拓扑结构完全一致(图 4)。系统发育树显示除了一个没有 BP 的分支

外,其他大部分节点均具有较高的可信度。系统发育树结果表明,进化树结构包括 2 大进化支,且同属物种也都归为一类或者单独归为一支。

其中,第一进化支包括明对虾属、对虾属、滨对虾属、美对虾属、囊对虾属、沟对虾属,均属于 Penaeini 群体。在这一大支内,囊对虾属和沟对虾属率先分化,单独聚为一支;滨对虾属和美对虾属聚为一支,遗传关系较近(BP = 100, PP = 1.00);最后,明对虾属和对虾属聚为另外一支。第二进化支包括 3 个亚支,其中:赤虾属率先分化,属于 Parapenaeini 群体;新对虾属单独聚为一支;仿对虾属与鹰爪虾属聚为一支,属于 Trachypenaeini 群体。

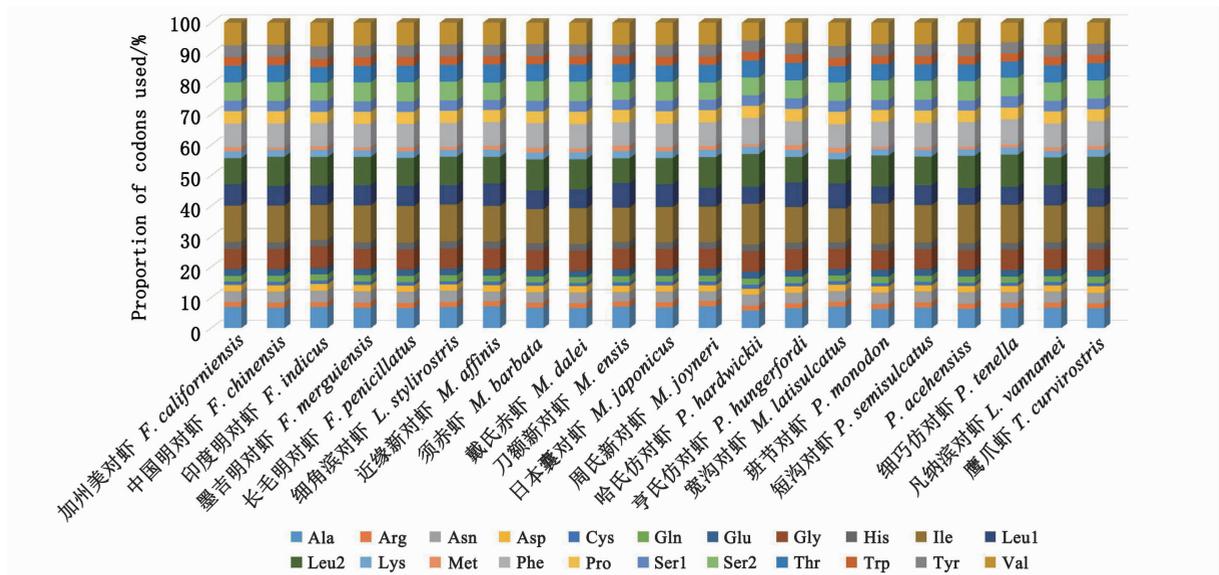


图5 对虾科物种线粒体基因组密码子的使用模式

Fig. 5 Codon usage pattern in mitochondrial genome of Penaeidae species

3 讨论

3.1 对虾科线粒体基因组特征

动物的线粒体基因组为典型的共价闭环环状分子结构^[31]。在本研究中,对虾科 21 个物种线粒体基因组的长度及 A + T 含量等分析结果均符合十足目动物线粒体基因组的基本特征^[32-34]。与泛甲壳类线粒体基因组原始序列^[35-36]相比,对虾科物种的线粒体基因组排列顺序均未发生变化,说明对虾科物种在进化中比较保守。在 13 个 PCGs 中,有 9 个基因 (*nd2*、*cox1*、*cox2*、*atp8*、*atp6*、*cox3*、*nd3*、*nd6*、*cytb*) 编码在重链上,4 个基因 (*nd5*、*nd4*、*nd4L*、*nd1*) 编码在轻链上(图 1),这也与其他甲壳类动物情况相同^[32-33],而 13 个 PCGs 的编码位置也与其他甲壳类动物情况相同^[37-38]。

CR 区在线粒体 DNA 复制和转录中不可缺少,相比编码区,其碱基替换率要高出 5 ~ 10 倍,序列和长度变异大,且多态性丰富,是线粒体 DNA 的高变区^[39]。在所研究的 21 个对虾物种线粒体基因组 CR 区中,序列长度为 673 ~ 1 074 bp,表现出较多的 AT 偏好性现象,符合 CR 区少 G 偏倚性的特点^[40],同时,CR 区也表现出较高的不保守性。

3.2 选择压力和差异位点

在遗传学中, K_a/K_s 值通常被用作于分析物种线粒体基因组蛋白质编码基因选择压力的指标, $K_a/K_s > 1$ 、 $K_a/K_s = 1$ 和 $K_a/K_s < 1$ 分别表示

基因受到正向选择、中性进化和纯化选择^[17]。在本研究中,Penaeini 群体内,*cox1* 基因的 K_a/K_s 值最低,*atp8* 基因的 K_a/K_s 最高,而在 Trachypenaeini 和 Parapenaeini 群体以及新对虾属内也遵循同样的规律,说明在对虾科物种中,*cox1* 基因承受着较强的选择压力,*atp8* 基因承受着较弱的选择压力。在关于其他后生动物线粒体基因的研究中, K_a/K_s 值最小的一般都为 *cox1* 基因^[33-34,41],这也与申欣等^[33]针对凡纳滨对虾 (*L. vannamei*) 和中国明对虾 (*F. chinensis*) 的研究结果一致。由于 *cox1* 基因功能重要且其结构相对保守,受到较强的纯化选择作用,所以 K_a/K_s 值较小。同时,*atp8* 基因之所以承受较弱的选择压力,可能与大多后生动物线粒体基因组的 *atp8* 基因存在缺失有关^[41-44]。在群体遗传学和生物地理学的研究中,选择一个合适的分子标记是至关重要的^[44]。本研究基于 NCBI 数据库中现有的 21 个对虾科物种,对其 13 个 PCGs 和 2 个核糖体 RNA 进行了差异位点分析,发现 *cox1* 基因最为保守,不适宜用来开展对虾群体遗传学研究,而较为理想的分子标记有 *nd5* 和 *rnl* 基因,可用于分析对虾不同物种和群体之间的生物多样性。

3.3 系统发育关系

目前,对于对虾物种的系统发育关系仍然存在着较大的争议。BURKENROAD^[30]曾提出将对虾科分为 3 个群体,分别为 Penaeini、Trachypenaeini 和 Parapenaeini,然而按照此种方

法分类,新对虾属物种却不属于这 3 个群体之中。此外,在关于对虾属亲缘关系分类上,有关专家认为对虾属虾类之间的亲缘关系较近,不需要细分为其他独立属^[45],但随着新发现对虾数量的不断增多,这种分类方法也不能很好地反映出不同物种间的差异。一些对虾物种在形态学上非常相似,例如戴氏赤虾和须赤虾、斑节对虾(*P. monodon*)和短沟对虾(*P. semisulcatus*)等^[3],仅通过形态学特征进行分类难度较大。因此,通过分子手段对这些物种进行详细的系统发育研究显得尤为重要。

本研究运用 ML 和 BI 方法构建的系统发育树拓扑结构完全一致,且具有较高的可信度。进化结果显示:第一进化支包括明对虾属、对虾属、滨对虾属、美对虾属、囊对虾属、沟对虾属,均属于 *Penaeni* 群体, *Trachypenaeni* 和 *Parapenaeni* 群体也都分别聚为一支,这与形态学分类结果^[30]一致。同时,滨对虾属与美对虾属聚为一支,两个属之间亲缘关系较近,这与 ALMA 等^[46]的分析结果一致。仿对虾属与鹰爪虾属聚为一支,这与易啸等^[11]通过蛋白质编码基因构建的系统发育树结果一致。斑节对虾(*P. monodon*)和短沟对虾(*P. semisulcatus*)尽管形态上非常相似,但却没有聚为一支,而新对虾属单独聚为一支,没有和 *Trachypenaeni*、*Parapenaeni* 群体聚在一起,这与前人^[11, 47]的研究一致。

同时,本研究从分子水平得出的分类结果与前人的基本一致。其中,仿对虾属与鹰爪虾属聚为一支,新对虾属单独聚为一支,最后三属同聚于一个进化支,说明新对虾属与这两属之间遗传关系较近。然而在传统分类中,新对虾属既不属于 *Trachypenaeni* 群体也不属于 *Parapenaeni* 群体。因此,新对虾属物种的分类地位还需进一步研究确定。

本研究首次对对虾科线粒体基因组特征进行了分析,并且从线粒体基因组水平探讨了对虾科 21 个物种之间的系统发育关系,以期为今后对虾科物种的遗传结构分析、进化关系研究以及对虾资源开发等研究提供理论基础。

参考文献:

- [1] HOLTHUIS L B. The recent genera of the Caridean and Stenopodidean shrimps (Crustacea: Decapoda): with an appendix on the order Amphionidacea [M]. Leiden; National Natuurhistorisch Museum, 1993: 328.
- [2] 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: 233.
- [3] 易啸,王攀攀,王军,等. 基于线粒体 *CO I* 的 DNA 条形码在对虾科物种鉴定中的研究[J]. 水产学报, 2018, 42(1): 1-9.
YI X, WANG P P, WANG J, et al. The research of *CO I*-based DNA barcoding in Penaeidae's identification [J]. Journal of Fisheries of China, 2018, 42(1): 1-9.
- [4] 黄宗国,林茂. 中国海洋物种多样性[M]. 北京: 海洋出版社, 2012: 778.
HUANG Z G, LIN M. The living species in China's seas [M]. Beijing: China Ocean Press, 2012: 778.
- [5] 张倩,王全超,于洋,等. 凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 形态性状与净肉重和出肉率的关系[J]. 海洋与湖沼, 2018, 49(3): 653-661.
ZHANG Q, WANG Q C, YU Y, et al. Correlation of morphometric attributes to net weight and fillet yield of *Litopenaeus vannamei* [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2018, 49(3): 653-661.
- [6] 陈晓琰,王国霞,孙育平,等. 饲料中添加低聚木糖对凡纳滨对虾幼虾消化酶活力、肠道形态及细菌数量的影响[J]. 动物营养学报, 2018, 30(4): 1522-1529.
CHENG X Y, WANG G X, SUN Y P, et al. Effects of dietary xylo-oligosaccharides on digestive enzymes activities, intestinal morphology and bacteria numbers of juvenile *Litopenaeus vannamei* [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2018, 30(4): 1522-1529.
- [7] 孙美超,曹梅,罗楚涵,等. 凡纳滨对虾白斑综合征概述与防治研究进展[J]. 河北渔业, 2021(7): 37-44.
SUN M C, CAO M, LUO C H, et al. Research progress of white spot syndrome in *Litopenaeus vannamei* [J]. Hebei Fisheries, 2021(7): 37-44.
- [8] 闫明磊,王鑫磊,黄旭雄,等. 饲料胆固醇含量对凡纳滨对虾免疫相关基因表达及耐低温低溶解氧胁迫能力的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2019, 28(5): 735-743.
YAN M L, WANG X L, HUANG X X, et al. Effects of dietary cholesterol content on immune related genes and resistances to low temperature and low dissolved oxygen stress in white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. Journal of Shanghai Ocean University: 2019, 28(5): 735-743.
- [9] 冀德伟,张敏,闫茂仓,等. 4 种饵料对选育中间养成阶段的凡纳滨对虾投喂效果分析[J]. 上海海洋大学学报, 2021, 30(2): 266-275.
JI D W, ZHANG M, YAN M C, et al. Effects of four diets on the growth performance in *Litopenaeus vannamei* during the middle stage of selective breeding [J]. Journal of Shanghai Ocean University: 2021, 30(2): 266-275.
- [10] 刘帅,李墨非,叶嘉,等. 基于线粒体 16S rRNA 和 *CO I* 基因序列探讨对虾属 (*Penaeus*) 物种系统发生关系[J].

- 生物学杂志, 2012, 29(5): 37-42.
- LIU S, LI M F, YE J, et al. The molecular phylogenetic analysis of *Penaeus* based on 16S rRNA and *CO I* sequences [J]. *Journal of Biology*, 2012, 29(5): 37-42.
- [11] 易啸, 毛勇, 苏永全. 基于 2 种核蛋白编码基因序列研究 16 种对虾系统发育关系[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2017, 56(6): 838-844.
- YI X, MAO Y, SU Y Q. Phylogenetic relationship of 16 species of Penaeid shrimps inferred from two nuclear protein-coding genes [J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2017, 56(6): 838-844.
- [12] CHENG J, GAO T X, MIAO Z Q, et al. Molecular phylogeny and evolution of Scomber (Teleostei: Scombridae) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences [J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2011, 29(2): 297-310.
- [13] SHEN H, BRABAND A, SCHOLTZ G. Mitogenomic analysis of decapod crustacean phylogeny corroborates traditional views on their relationships[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2013, 66(3): 776-789.
- [14] ZHU L Q, ZHU Z Z, ZHU L Y, et al. The complete mitogenome of *Lysmata vittata* (Crustacea: Decapoda: Hippolytidae) with implication of phylogenomics and population genetics [J]. *PLoS One*, 2021, 16(11): e0255547-e0255547.
- [15] YU L, WANG X Y, JIN W, et al. Adaptive evolution of digestive RNASE1 genes in leaf-eating monkeys revisited: new insights from ten additional colobines [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2010, 27(1): 121-131.
- [16] YU L, JIN W, WANG X Y, et al. Evidence for positive selection on the leptin gene in cetacea and pinnipedia [J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): 265-279.
- [17] 杨子恒. 计算分子进化[M]. 上海: 复旦大学出版社, 2008: 49.
- YANG Z H. *Computational molecular evolution* [M]. Shanghai: Fudan University Press, 2008: 49.
- [18] YANG Z H. *Computational molecular evolution*[M]. New York: Oxford University Press, 2006.
- [19] 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(10): 2731-2739.
- [20] ZHANG Z, LI J, ZHAO X Q, et al. K_aK_s -Calculator: calculating K_a and K_s through model selection and model averaging [J]. *Genomics Proteomics & Bioinformatics*, 2006, 4(4): 259-263.
- [21] WANG D P, WAN H L, ZHANG S, et al. Gamma-MYN: a new algorithm for estimating K_a and K_s with consideration of variable substitution rates [J]. *Biology Direct*, 2009, 4: 20.
- [22] ROZAS J, FERRER-MATA A, SÁNCHEZ-DELBARRIO J C, et al. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2017, 34(12): 3299-3302.
- [23] CHEN C, CHEN H, ZHANG Y, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [24] EDGAR R C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity [J]. *BMC Bioinformatics*, 2004, 5(1): 113.
- [25] CASTRESANA J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2000, 17(4): 540-552.
- [26] DARRIBA D, TABOADA G L, DOALLO R, et al. jModelTest 2: more models, new heuristics and high-performance computing [J]. *Nature Methods*, 2012, 9(8): 772.
- [27] GUINDON S, GASCUEL O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood [J]. *Systematic Biology*, 2003, 52(5): 696-704.
- [28] RONQUIST F, TESLENKO M, VAN DER MARK P, et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space [J]. *Systematic Biology*, 2012, 61(3): 539-542.
- [29] ZHAO Y, ZHU X, LI Y, et al. Mitochondrial genome of Chinese grass shrimp, *Palaemonetes sinensis* and comparison with other Palaemoninae species [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 17301.
- [30] BURKENROAD M D. *Natural classification of dendrobranchiata, with a key to recent genera* [M]. Rotterdam: A A Balkema, 1983: 279-290.
- [31] LIU Y, CUI Z X. Complete mitochondrial genome of the Chinese spiny lobster *Panulirus stimpsoni* (Crustacea: Decapoda): genome characterization and phylogenetic considerations [J]. *Molecular Biology Reports*, 2001, 38(1): 403-410.
- [32] BAEZA J A. The complete mitochondrial genome of the Caribbean spiny lobster *Panulirus argus* [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 17690.
- [33] 申欣, 李晓, 徐启华. 日本鼓虾与鲜明鼓虾线粒体基因组全序列的分析比较 [J]. *海洋学报*, 2012, 34(5): 147-153.
- SHEN X, LI X, XU Q. Comparison and analysis of *Alpheus japonicus* and *A. distinguendus* complete mitochondrial genome sequences [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2012, 34(5): 147-153.
- [34] SHEN X, REN J F, CUI Z X, et al. The complete mitochondrial genomes of two common shrimps (*Litopenaeus vannamei* and *Fenneropenaeus chinensis*) and their phylogenomic considerations [J]. *Gene*, 2007, 403(1): 98-109.
- [35] BOORE J L, LAVROV D V, BROWN W M. Gene translocation links in insects and crustaceans [J]. *Nature*, 1998, 392(6677): 667-668.
- [36] KILPERT F, PODSIADLOWSKI L. The complete mitochondrial

- genome of the common sea slater, *Ligia oceanica* (Crustacea, Isopoda) bears a novel gene order and unusual control region features[J]. *BMC Genomics*, 2006, 7(9): 241-258.
- [37] 申欣. 对虾科线粒体基因组特征及基因差异位点分析[J]. *水产科学*, 2010, 29(12): 711-717.
SHEN X. Analysis of Mitochondrial genome characteristics and differences in genetic Loci in Penaeidae[J]. *Fisheries Science*, 2010, 29(12): 711-717.
- [38] 申欣, 孙名安. 长臂虾科线粒体基因组特征分析及分子标记探讨[J]. *水产科学*, 2011, 30(6): 347-351.
SHEN X, SUN M A. Analysis of mitochondrial genome characteristics and exploration of molecular markers in Palaemonidae[J]. *Fisheries Science*, 2011, 30(6): 347-351.
- [39] 吴常信. *动物遗传学*[M]. 北京: 高等教育出版社, 2009: 212.
WU C X. *Animal genetics*[M]. Beijing: Higher Education Press, 2009: 212.
- [40] 何震晗, 肖珊, 王韶韶, 等. 黄鳍棘鲷线粒体 D-loop 序列的遗传结构[J]. *水产学报*, 2021, 45(3): 345-356.
HE Z H, XIAO S, WANG S S, et al. Genetic structure of D-loop sequence in *Acanthopagrus latus* [J]. *Journal of fisheries*, 2021, 45(3): 345-356.
- [41] 朱陇强, 朱志煌, 林琪, 等. 长臂虾科线粒体基因组结构与系统进化分析[J]. *中国水产科学*, 2021, 28(4): 852-862.
ZHU L Q, ZHU Z H, LIN Q, et al. Characteristics and phylogenetic analysis of mitochondrial genome in the Palaemonidae[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, 28(4): 852-862.
- [42] BOORE J L, MEDINA M, ROSENBERG L A. Complete sequences of the highly rearranged molluscan mitochondrial genomes of the Scaphopod *Graptacme eborea* and the bivalve *Mytilus edulis*[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2004, 21(8): 1492-1503.
- [43] 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.
- [44] DELLAPORTA S L, XU A, SAGASSER S, et al. Mitochondrial genome of *Trichoplax adhaerens* supports Placozoa as the basal lower metazoan phylum [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(23): 8751-8756.
- [45] SHANE L, CHAN T Y, TAM Y K, et al. Phylogenetic relationships and evolutionary history of the shrimp genus *Penaeus s. l.* derived from mitochondrial DNA[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2004, 31(1): 39-49.
- [46] ALMA B P U, ALEJANDRO V R, ADRIANA M A, et al. The mitochondrial genomes of the yellowleg shrimp *Farfantepenaeus californiensis* and the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* (Crustacea: Decapoda) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D*, 2009, 4(1): 45-53.
- [47] VOLOCH C M, FREIRE P R, RUSSO C A M. Molecular phylogeny of penaeid shrimps inferred from two mitochondrial makers[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2005, 4(4): 668-674.

Characteristics and phylogenetic analysis of mitochondrial genome in the Penaeidae

ZHU Leiyu^{1,2}, ZHU Zhihuang¹, FANG Minjie¹, ZHU Longqiang¹, LIN Qi¹

(1. Key Laboratory of Cultivation and High-value Utilization of Marine Organisms in Fujian Province, Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361013, Fujian, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The complete sequence of the mitochondrial genomes of 21 species in the Penaeidae were comprehensively analyzed, and the results showed that the length of the mitochondrial genome is 15 893 to 16 071 bp, A + T content is from 64.59% to 70.61%. The K_a/K_s analysis showed that among 13 protein-coding genes (PCGs) in the mitochondria of Penaeidae species, the K_a/K_s of *atp8* gene was the highest, indicating that the *atp8* gene may have subjected to relatively weak selection pressure in Penaeidae. In the analysis of the different sites, it was found that the *nd5* and *rrnL* genes were ideal molecular markers. And the codon usage analysis showed that the encoded amino acid preferences were similar. At the same time, more systematic and comprehensive ML (Maximum likelihood) and BI (Bayesian inference) methods were adopted to construct a phylogenetic tree. The results showed that the topological structure of the phylogenetic tree constructed by these two methods was completely the same, and the species of the same genus were also classified into one category or separated into a branch. This study provides reliable molecular markers for the rapid identification of Penaeidae species, and provides a theoretical basis for analyzing the genetic diversity of Penaeidae species.

Key words: Penaeidae; mitogenome; structure characteristics; phylogeny