

小唐学家

JOURNAL OF FISHERIES OF CHINA





## 日本囊对虾两种表型差异类型线粒体的全基因组比较

干攀攀<sup>1,2,3,4</sup>. 谢姝敏1, 于世豪1, 邢超凡<sup>1,2,3</sup>. 狊1, 陈 焕<sup>1,2,3,4</sup>、 阎斌伦<sup>1,2,3,4\*</sup> 高 (1. 江苏海洋大学, 江苏省海洋生物资源与环境重点实验室, 江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏 连云港 222005; 2. 江苏海洋大学, 江苏省海洋生物产业技术协同创新中心, 江苏 连云港 222005: 3. 江苏省海洋资源开发研究院(连云港),江苏连云港 222005; 4. 江苏省农业种质资源保护与利用平台, 江苏南京 210014)

摘要:为了分析日本囊对虾两种表型差异类型的系统发育关系,实验系统比较了两种类型 线粒体全基因组的基因结构、遗传距离和密码子偏好性等特征。结果显示,两种类型线粒 体基因组的基因重叠区、基因间隔和密码子等方面均存在差异。两种类型的线粒体蛋白编 码基因核苷酸序列的相似度为91.10%~95.00%、氨基酸序列的相似度为96.15%~100%。两 种类型的 A+T 富集区的同源性只有 82.60%、分歧度为 15.40%、呈现高度遗传分化。日本 囊对虾两种类型蛋白编码基因的核苷酸序列分歧度大于明对虾属和叉肢螯虾属,但氨基酸 序列的分歧度小于后者。研究发现,基于 cvtb 基因的种间遗传距离大于种内遗传距离的 10倍; 基于 cox1 基因的种间遗传距离分别为类型 I 和类型 II 的种内遗传距离的 14.6 倍和 5.2 倍。两种类型的 nd1、nd4 和 nd5 基因的 Ka/Ks 值大于 1, 表明受到正向选择。基于 20 种隶属9属的对虾线粒体基因组蛋白编码序列构建系统发育树,结果显示能有效区分各属 对虾,其中日本囊对虾的两种类型首先聚类,再与宽沟对虾聚类。研究表明,日本囊对虾 的两种表型差异类型基本达到物种水平,有必要进一步评估更多的性状差异,以提高两种 囊对虾的特异性养殖技术。

关键词:日本囊对虾; 表型差异; 线粒体基因组; 序列分歧; 系统发育 中图分类号: O 343.3; S 917.4 文献标志码:A

日本囊对虾 (Marsupenaeus japonicus) 隶属十 足目 (Decapoda) 对虾科 (Penaeidae) 囊对虾属 (Marsupenaeus),具有生长快、耐干露等优点,是 世界主要养殖虾类,我国南北沿海均有养殖。长 期以来日本囊对虾一直被认为是囊对虾属唯一的 对虾种<sup>[1-2]</sup>。Tsoi等<sup>[3]</sup>研究表明,日本囊对虾具有 两种表型差异类型,主要体现在头胸甲斜纹的模

式,其中类型 I 的斜纹一直延伸到头胸甲底缘腹 面, 而类型Ⅱ个体的斜纹只延伸到头胸甲中部。 类型I群体主要分布于我国南海北部、东海和日 本海域,类型Ⅱ分布于我国南海、东南亚和澳大 利亚海域,两种类型在我国南海北部海域(广东惠 来至广西北海)存在同域分布现象。Tsoi 等[4]利用 分子技术确定日本囊对虾两隐种的系统发育关系

- 资助项目: 江苏省自然科学基金 (BK20210924); 江苏省高等学校自然科学基金 (21KJB240001); 江苏海洋大学江 苏省海洋生物技术重点实验室研究基金 (HS2020001); 江苏省产学研合作项目 (BY2021366); 苏北科 技专项 (SZ-LYG202030); 江苏省优势学科建设工程资助项目 (PAPD)
- 第一作者: 王攀攀(照片), 从事海洋甲壳类种质资源开发和遗传育种研究, E-mail: panw90@126.com
- 通信作者: 阎斌伦, 从事海洋渔业资源增殖放流、种质创新及健康养殖技术研究, E-mail: vanbinlun1962@163.com

版权所有 ©《水产学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0) 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

Copyright © Editorial Office of Journal of Fisheries of China (CC BY-NC-ND 4.0) https://www.china-fishery.cn



1

修回日期: 2022-03-17 收稿日期: 2021-12-20

和分类地位。Wang 等<sup>[5]</sup> 联合单拷贝核基因和简化 基因组数据,支持我国东海沿海日本囊对虾的自 然群体包含两个高度分化的进化单元。



图 1 日本囊对虾两种表型差异类型<sup>[13]</sup>

箭头指示日本囊对虾头胸甲斑纹。

# Fig. 1 Two morphologically similar varieties of *M. japonicus*

The arrow indicates carapace stripe of M. japonicus.

由于长期处于不同气候带, 日本囊对虾的两 种形态变异类型表现出不同的环境适应机制,其 线粒体基因可能也受到不同的选择压力。Tsoi 等<sup>[3,6]</sup> 利用日本囊对虾的 16S rRNA、细胞色素氧化酶亚基 I (cox1)和线粒体控制区 CR 基因,分析日本囊对虾 不同地理群体的遗传距离,结果表明两种类型群 体遗传独立,之间并无共有的单倍型,并根据线 粒体基因的变异速率推断日本囊对虾两种类型的 分化时间为1.1~4.7百万年前,大约处于上新世早 期至更新世早期。Wang 等<sup>[7]</sup> 基于日本囊对虾两种 类型间直系同源基因的同义替换率(Ks)峰值,估 算两种类型的分化时间大约在 0.26~0.69 百万年前。 曾凡荣等<sup>[8]</sup>结合 cvtb 和 cox1 基因分析日本囊对虾 4个自然群体,根据 NJ 系统进化树和单倍型网络 支持东南沿海的日本囊对虾群体可分为2个类群。 游欣欣等<sup>19</sup>根据日本囊对虾两类型 cvtb 基因的稳 定变异位点,利用酶切方法能准确快速地区别鉴 定两种类型。

本实验前期通过在养殖基地构建日本囊对虾 两种类型的杂交配对组合,结果显示,两种类型 之间存在生殖隔离或生殖不兼容,且同期繁育的 日本囊对虾类型 I 幼体的生长速率快于类型 II, 而类型 II 的高温耐受性优于类型 I <sup>[5,10-11]</sup>。然而, 目前对于日本囊对虾的两种类型是否属于不同的 物种尚无定论,在实际生产过程中也不做区分, 而日本囊对虾 80% 以上的亲虾来源于台湾海峡海 域 (类型 I 自然种群),这不利于充分利用两种类 型的优良性状。 线粒体基因组以进化速率快、结构简单、基因排列紧凑且易于扩增测序,被认为是研究虾类物种鉴别及系统发育的理想材料<sup>[12]</sup>。本研究对日本囊对虾两种类型(图1)<sup>[13]</sup>的线粒体基因组进行多方面的对比分析,包括碱基组成、同源性、分歧度、基因结构、遗传距离、密码子偏好性等,并基于对虾科9属22种对虾的线粒体蛋白编码序列进行系统发育分析,研究结果为日本囊对虾的种质创新和隐种鉴定提供了理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 样本采集和 PCR 扩增测序

日本囊对虾类型 I 样品采自我国浙江舟山海 域,类型 II 样品采自海南琼海海域,各取 20 尾个 体的腹节肌肉于无水乙醇中保存。利用海洋动物 基因组 DNA 提取试剂盒 (天根,北京) 提取组织 DNA,利用对虾科 cytb 基因引物和扩增程序进行 PCR 扩增及测序<sup>[8]</sup>。从 GenBank 下载对虾科 9 属 22 种虾的线粒体基因组全序列和蛋白编码氨基酸 序列,包括日本囊对虾的类型 I (NC\_007010.1)和 类型 II (MG772559.1) (表 1)。实验过程中操作人员 严格遵守实验动物相关伦理规范。

#### 1.2 线粒体基因组的结构分析

根据日本囊对虾两种类型线粒体基因组的注释信息,标记各组分的基因位置和长度信息。利用 mVISTA 软件对两种类型的线粒体全基因组序列进行比对,并以凡纳滨对虾的线粒体全基因组序列为参考进行同源比对绘图。利用 DNAStar中的 EditSeq 软件分析两种类型基因组序列的碱基组成。利用 MEGA 7 软件分析两种类型的碱基含量和氨基酸组成。利用 tRNAscan-SE Server (http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/index.html)和 mfold (http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form) 程序预测 tRNA 和 rRNA 结构。

# **1.3** 线粒体基因的同源性、遗传距离和选择压力分析

利用 MegAlign 软件对比分析线粒体编码基因和 rRNA 序列的同源性和分歧度,包括日本囊对虾的两种类型,明对虾属的长毛明对虾和墨吉明 对虾,以及叉肢螯虾属 (Orconectes)的 O. limosus 和 O. sanbornii 的线粒体编码基因和 rRNA 序列。利用 Mega 7 软件对测序获得的两种类型

https://www.china-fishery.cn

属名 genera	物种 species	序列号 accession number
对虾属 Penaeus	斑节对虾 P. monodon	AF217843
	短沟对虾 P. semisulcatus	MG821354
	亚奇对虾 P. acehensis	MG650292
滨对虾属 Litopenaeus	凡纳滨对虾 L. vannamei	EF584003
	细角滨对虾 L. stylirostris	EU517503
沟对虾属 Melicertus	宽沟对虾 M. latisulcatus	MG821353
明对虾属 Fenneropenaeus	中国明对虾 F. chinensis	DQ518969
	长毛明对虾 F. penicillatus	KP637169
	墨吉明对虾 F. merguiensis	KP637168
	印度明对虾 F. indicus	KX462904
囊对虾属 Marsupenaeus	日本囊对虾 I M. japonicus I	NC_007010.1
	日本囊对虾 II M. japonicus II	MG772559.1
仿对虾属 Parapenaeopsis	哈氏仿对虾 P. hardwickii	KU899136
	细巧仿对虾 P. tenella	MK164420
	亨氏仿对虾 P. hungerfordi	MG873460
新对虾属 Metapenaeus	刀额新对虾 M. ensis	KP637170
	周氏新对虾 M. joyneri	MH939247
	近缘新对虾 M. affinis	MG815825
美对虾属 Farfantepenaeus	加州美对虾 F. californiensis	EU497054
沼虾属 Macrobrachium	罗氏沼虾 M. rosenbergii	NC006880
赤虾属 Metapenaeopsis	戴氏赤虾 M. dalei	KU050082
	须赤虾 M. barbata	MG833230

表1 对虲枓线粒体基因组信息
----------------

 Tab. 1
 Mitochondrial genome information of Penaeidae

*cox*1 和 cytb 序列分别进行比对,用 MEGA 软件的 Kimura 双参数模型计算类型间和类型内的遗传距离并估算 P 值 (小于 0.05 代表有显著差异)。

为检测日本囊对虾两种类型线粒体基因组受选择压力的影响情况,利用 Clustal X 软件对两种 类型线粒体基因组的 13 个蛋白编码基因进行多重 比对,将比对序列整理成".axt"文件格式,即第 1 行为序列 ID,第 2、3 行是比对后的序列,用"—" 符号代表缺失。利用 KaKs\_Calculator V 2.0 软件 计算非同义替换率 (Ka)和同义替换率 (Ks)值,选 择 MYN 模型算法。Ka/Ks 大于 1 表示基因受到正 向选择,小于 1 表示受到纯化选择。

# **1.4** 线粒体基因密码子偏好性和对虾科系统发育分析

利用 CodonW 1.4.2 软件 (http://codonw.sourceforge.net/) 对对虾科 9 属 20 种对虾的线粒体蛋白 编码基因序列进行密码子使用偏好性分析,计算 每条蛋白编码序列的有效密码子 (effective number of codon, ENc)和同义密码子相对使用频率 (relative synonymous codon usage, RSCU)。RSCU可作 为衡量密码子偏好程度指标,当RSCU大于1, 表示密码子使用偏好较大<sup>[14]</sup>。基于密码相对使用 频率进行对虾科多物种的聚类分析。利用 Clustal X 对对虾科物种线粒体蛋白编码序列进行多重比对, 以罗氏 沼虾 (NC006880)为外群,应用 MEGAX 软件构建系统发育树。

2 结果

# **2.1** 验证 GenBank 数据库中的日本囊对虾 类型

利用 cytb 基因引物分别 PCR 扩增日本囊对 虾类型 I 和类型 II 各 20 尾个体的肌肉组织 DNA, 测序后与 NCBI 下载的线粒体基因组中的 cytb 序 列进行多重比对 (图 2)。比对结果显示,两种类型 的 cytb 基因序列存在大量的稳定差异位点,而 从 NCBI 下载的 NC\_007010.1 和 MG772559.1 中 的 cytb 序列分别对应日本囊对虾类型Ⅰ和类型Ⅱ, 表明获取的线粒体全基因组序列可以用于后续的 比较分析。



图 2 两种类型日本囊对虾的线粒体 cytb 基因部分序列比对结果

黑色表示碱基完全一致,白色和浅灰色表示比对序列中存在明显的两种碱基,深灰色表示比对序列中绝大多数碱基一致。

#### Fig. 2 Partial cytb fragments of two Marsupenaeus varieties

Black indicates that the bases are identical. White and light grey mean that there are two obvious bases in the alignment sequence, and dark grey means that most bases in the alignment sequence are consistent.

#### 2.2 线粒体基因组结构组成

日本囊对虾类型 I 和类型 II 的线粒体基因组 全长分别为 15 968 和 15 966 bp,均编码 37 个基 因,包括 13 个蛋白编码基因 (PCGs),22 个转运 RNA 基因 (tRNA),2 个核糖体 RNA 基因 (*srRNA* 和 *lrRNA*) (表 2)。蛋白编码基因包括 11 个电子传 递系统基因和 2 个 ATP 合成酶基因 (ATP6 和 ATP8),电子传递系统基因包括 7 个还原酶复合 体 I (*nd*1、*nd*2、*nd*3、*nd*4、*nd*41、*nd*5 和 *nd*6)、3 个氧化酶复合体 IV 基因 (*cox*1、*cox*2 和 *cox*3) 和 1 个细胞色素 b (*cytb*) 基因。

类型 I 存在 15 处基因间隔, tRNA-Gln 与 tRNA-Met 间隔最大,为 29 bp;存在 3 处基因重 叠区 (Atp6 & Atp8 = -7 bp, tRNA-Ser & tRNA-Glu= -1 bp, ND4 & ND4L = -7 bp)。类型 II 存在 16 处 基因间隔,相比类型 I, 16S rRNA 与 tRNA-Val 间隔 8 bp;存在 5 处基因重叠区 (ND2 & tRNA-Trp = -1 bp, Atp6 & Atp8 = -7 bp, ND4 & ND4L = -7 bp, Cytb & tRNA-Ser = -1 bp, tRNA-Val & 12S rRNA = −1 bp)。 为评估日

为评估日本囊对虾两种类型线粒体基因组序 列的差异程度,以凡纳滨对虾的线粒体基因组序 列为参考进行了 mVISTA 分析 (图 3)。与凡纳滨 对虾 (EF584003.1) 类似,日本囊对虾的两种类型 均有 9个蛋白编码基因位于重链上,包括 cox1、 cox2、cox3、nd2、nd3、nd6、cytb、atp6 和 atp8, 而 nd1、nd4、nd4l 和 nd5 基因位于轻链上(表 2, 图 3)。日本囊对虾两种类型的线粒体序列呈现出 较高的相似性,基因区序列的差异高于除控制区 外的基因间隔区的差异。

#### 2.3 碱基组成和密码子差异

日本囊对虾类型 I 的线粒体基因组中,A、T、 C、G含量分别为 32.60%、33.80%、20.40%和 13.20%。A+T和G+C含量分别为66.50%和33.50%, AT含量高于GC,AT-skew值为-0.018,GCskew值为-0.214。蛋白编码基因的A、T、C、G含 量分别为 31.97%、32.67%、21.72%和 13.64%, A+T和G+C含量分别为 64.64%和 35.36%,AT-

*17	基因位置		11 TT Int		长度/bp		基因间区核苷酸	
基因 genes —	gene positions		编码链 coding strand	length		intergenic nucleotides		
	Mj I	Mj II		Mj I	Mj II	Mj I	Mj II	
tRNA-Ile	1~67	1~67	Н	67	67		10	
tRNA-Gln	78~147	78~147	L	70	70	10	10	
tRNA-Met	177~245	177~245	Н	69	69	29	29	
ND2	246~1 246	246~1 247	Н	1 001	1 002	0	0	
tRNA-Trp	1 247~1 314	1 247~1 314	Н	68	68	0	-1	
tRNA-Cys	1 328~1 393	1 328~1 393	L	66	66	13	13	
tRNA-Tyr	1 396~1 460	1 396~1 460	L	65	65	2	2	
COX1	1 463~2 996	1 463~2 996	Н	1 534	1 534	2	2	
tRNA-Leu	2 997~3 063	2 997~3 063	Н	67	67	0	0	
COX2	3 069~3 756	3 069~3 756	Н	688	688	5	5	
tRNA-Lys	3 757~3 825	3 757~3 825	Н	69	69	0	0	
tRNA-Asp	3 829~3 897	3 829~3 897	Н	69	69	3	3	
atp8	3 898~4 056	3 898~4 056	Н	159	159	0	0	
atp6	4 050~4 724	4 050~4 724	Н	675	675	-7	-7	
COX3	4 734~5 523	4 734~5 523	Н	790	790	9	9	
tRNA-Gly	5 524~5 589	5 524~5 589	Н	66	66	0	0	
ND3	5 590~5 941	5 590~5 941	Н	352	352	0	0	
tRNA-Ala	5 942~6 006	5 942~6 006	Н	65	65	0	0	
tRNA-Arg	6 012~6 076	6 012~6 076	Н	65	65	5	5	
tRNA-Asn	6 077~6 140	6 077~6 141	Н	64	65	0	0	
tRNA-Ser	6 141~6 209	6 142~6 208	Н	69	67	0	0	
tRNA-Glu	6 209~6 277	6 209~6 277	Н	69	69	-1	0	
tRNA-Phe	6 297~6 362	6 297~6 362	L	66	66	19	19	
ND5	6 363~8 094	6 363~8 094	L	1 732	1 732	0	0	
tRNA-His	8 095~8 160	8 095~8 160	L	66	66	0	0	
ND4	8 161~9 501	8 161~9 501	L	1 341	1 341	0	0	
ND4L	9 495~9 794	9 495~9 794	L	300	300	-7	-7	
tRNA-Thr	9 797~9 864	9 797~9 864	Н	66	66	2	2	
tRNA-Pro	9 865~9 930	9 865~9 930	L	66	66	0	0	
ND6	9 932~10 447	9 932~10 447	Н	516	516	1	1	
Cytb	10 450~11 585	10 450~11 586	Н	1 136	1 137	2	2	
tRNA-Ser	11 586~11 655	11 586~11 655	Н	70	70	0	-1	
ND1	11 674~12 612	11 674~12 612	L	939	939	18	18	
tRNA-Leu	12 618~12 684	12 618~12 684	L	67	67	5	5	
16SrRNA	12 685~14 051	12 685~14 043	L	1 367	1 359	0	0	
tRNA-Val	14 052~14 123	14 052~14 123	L	72	72	0	8	
12SrRNA	14 124~14 976	14 123~14 976	L	853	854	0	-1	
nCR	14 977~15 968	14 977~15 966	_	992	990	0	0	

#### 表 2 日本囊对虾两类型线粒体基因组结构

注: H.重链, L.轻链, 一.非编码区。 Notes: H. heavy chain, L. light chain, -. noncoding region.

中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries



图 3 线粒体基因组的可视化比对

Fig. 3 Visual alignment of mitochondrial genome

skew 值为-0.01, GC-skew 值为-0.229。类型Ⅱ的线 粒体基因组中, A、T、C、G含量分别为 32.70%、 33.70%、20.50% 和 13.10%。A+T 和 G+C 含量分 别为 66.40% 和 33.60%, AT-skew 值为 -0.015, GC-skew 值为-0.22。蛋白编码基因的 A、T、C、 G含量分别为 32.17%、32.53%、21.81% 和 13.50%, AT-skew 值为-0.004, GC-skew 值为-0.235。

日本囊对虾两种类型的 13 个蛋白质编码基 因编码的氨基酸数目与凡纳滨对虾相同 (图 4)。比 对两种类型各蛋白编码基因的核苷酸序列和氨基 酸序列,发现二者存在较多变异。核苷酸序列的 相似度为 91.10%~95.00%,最低为 nd5 基因,最 高为 nd41 基因。氨基酸序列的相似度为 96.15%~ 100%。其中 cox2 的核苷酸序列相似度为 96.15%~ 100%。其中 cox2 的核苷酸序列相似度为 92.84%, 但氨基酸序列完全一致, cytb 基因的核苷酸序列 相似度为 93.74%,对应的氨基酸序列也完全一致。 两种类型蛋白编码基因的首尾密码子大多数是一 致的 (表 3),其中类型 I 的 atp8 基因的起始密码 子是 ATT, 而类型 II 的是 ATC;类型 I 的 nd2 和 cytb 基因的终止密码子均为 TA-, 而类型 II 的 nd2 和 cytb 基因的终止密码子分别为 TAA 和 TAA。 共有 8 个蛋白编码基因 (nd3、atp6、nd4、cox3、nd1、cox2、cytb 和 nd4l) 以 ATG 作为起始密码子, 而凡纳滨对虾中 nd1 的起始密码子为 ATA。类型 I 只有 6 个蛋白编码基因具有完整的终止密码子 TAA, 而类型 II 具有 8 个基因具有完整的终止密 码子 TAA。

# 2.4 两种类型日本囊对虾 tRNA 和 rRNA 的结构差异分析

日本囊对虾两种类型均有 22 个 tRNA,每个 tRNA 长度为 64~72 bp。两种类型的 tRNA 序列一 致性为 90.91%~100%,差异最大的 tRNA 为 tRNA<sup>Phe</sup>。 各有 2 个 tRNA<sup>Ser(AGN/UCN)</sup>和 tRNA<sup>Leu (CUN/UR)</sup>, tRNA<sup>Ser</sup> 对应的反密码子为 GCT 和 TGA, Trna<sup>Leu</sup> 对应的反 密码子为 TAG 和 TAA。除 tRNA<sup>Ser (AGN)</sup>无二氢尿 嘧啶 (DHU) 环外 (图 5-a),其余 tRNA 均形成典型 的三叶草结构。日本囊对虾类型 I 线粒体基因组 中有 36 处碱基错配,其中 32 处为 U-G 错配,1 处位于 tRNA<sup>Arg</sup> 氨基酸接受臂的 U-U 错配,1 处位 于 tRNA<sup>Ser (AGN)</sup>反密码子臂的 U-U 错配,1 处位于 tRNA<sup>Lys</sup> 氨基酸接受臂 的 U-C 错 配,1 处位于



图 4 线粒体基因的核苷酸和氨基酸序列差异

#### Fig. 4 Differences in nucleic acid and amino acid sequences of mitochondrial genes

	Μ	lj I	Mj II		
基因 genes	起始密码子 initiation codon	终止密码子 termination codon	起始密码子 initiation codon	终止密码子 termination codon	
nd2	ATT	TA-	ATT	TAA	
cox1	ACG	Т	ACG	Т	
cox2	ATG	Т	ATG	Т	
atp8	ATT	TAA	ATC	TAA	
atp6	ATG	TAA	ATG	TAA	
cox3	ATG	Т	ATG	Т	
nd3	ATG	Т	ATG	Т	
nd5	GTG	Т	GTG	Т	
nd4	ATG	TAA	ATG	TAA	
nd41	ATG	TAA	ATG	TAA	
nd6	ATT	TAA	ATT	TAA	
cytb	ATG	TA-	ATG	TAA	
nd1	ATG	TAA	ATG	TAA	

表 3 线粒体基因的首位密码子

Tab. 3 Head and tail codons of mitochondrial genes

注:"-"和"--"表示碱基缺失。

Notes: "-" and "--" represent base deletion.

tRNA<sup>Glu</sup> 氨基酸接受臂的 A-A 错配。类型 II 的线 粒体基因组中共存在 37 处碱基错配,其中 34 处 为 U-G 错配,1 处位于 tRNA<sup>Ser (AGN)</sup> 反密码子臂的 U-U 错配,1 处位于 tRNA<sup>Lys</sup> 的 U-C 错配,1 处位 于 tRNA<sup>Glu</sup> 的 A-A 错配。对比两种类型日本囊对 虾 的 tRNA 二级结构,发现二者的 tRNA<sup>Gly</sup> 和 tRNA<sup>Ala</sup> 的二级结构存在明显差异 (图 5)。类型 I 中 tRNA<sup>Gly</sup>、tRNA<sup>Ala</sup> 的 TψC 臂均为 4 nt,而类型 II 的均为 5 nt,两种类型的 tRNA<sup>Phe</sup>存在 7 处碱基 差异,分布于氨基酸接受臂、DHU 环和 TψC 环。 日本囊对虾两种类型的 2个 rRNA 均位于 L 链,包括 12S rRNA 和 16S rRNA。12S rRNA 介于 tRNA<sup>Val</sup>和控制区 CR 之间,16S rRNA 介于 tRNA<sup>Leu</sup> 和 tRNA<sup>Val</sup>之间。类型 I 的 12S rRNA 和 16S rRNA 的长度分别为 853 和 1 367 bp。类型 II 的 12S rRNA 和 16S rRNA 的长度分别为 854 和 1 359 bp。利用 Mfold 预测 rRNA 的二级结构,结果显示,rRNA 基因序列存在较多的 U-G 配对,两种类型的 12S 和 16S 序列的二级结构均存在差异,其中 16S rRNA 的螺旋和内环结构差异最为明显 (表 4)。

A+T 富集区域不编码任何已知的功能蛋白, 是线粒体基因复制与表达的主要调控区<sup>[15]</sup>。日本 囊对虾类型 I 和 II 的 A+T 富集区长度分别为 992 和 990 bp,介于 12S *rRNA* 和 tRNA<sup>1k</sup> 之间,两个序 列的同源性只有 82.60%,分歧度为 15.40%,呈现 高度遗传分化。类型 I 和类型 II 的 AT 含量分别 为 82.46% 和 82.02%, AT-skew 分别为-0.086 和 -0.096,GC-skew 分别为 0.023 和-0.056。两种类 型的 A+T 富集区没有发现明显的 poly-A 和 (TA)n 等保守区域。

# 2.5 日本囊对虾两个类型线粒体基因分歧度和 遗传距离分析

利用 MegAlign 对比分析了日本囊对虾两种 类型的线粒体编码基因和两种 rRNA 序列,并结 合明对虾属的长毛明对虾和墨吉明对虾及叉肢螯 虾属的 O. limosus 和 O. sanbornii 的线粒体编码基 因和 rRNA 序列。发现除 atp6 和 nd2 外,日本囊 对虾两种类型的其余蛋白编码基因的核苷酸分歧 度均大于长毛明对虾和墨吉明对虾的核苷酸分歧 度(表 5)。另外, atp8、nd1、nd2 和 nd6 的氨基酸

中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries



(a) 类型 I 的 tRNA<sup>Ser (AGN)</sup>, (b)~(c) 分别为类型 I 的 tRNA<sup>Gly</sup> 和 tRNA<sup>Ala</sup>, (d)~(e) 分别为类型 II 的 tRNA<sup>Gly</sup> 和 tRNA<sup>Ala</sup>, 红色圆点表示胞嘧啶与 鸟嘌呤之间的氢键, 蓝色圆点表示尿嘧啶与腺嘌呤或鸟嘌呤之间的氢键。

Fig. 5 Secondary structure of tRNA

(a)  $tRNA^{Ser(AGN)}$  of variety I, (b)-(c)  $tRNA^{Gly}$  and  $tRNA^{Ala}$  of variety I, (d)-(e)  $tRNA^{Gly}$  and  $tRNA^{Ala}$  of variety II. The red dots represent hydrogen bonds between cytosine and guanine, and the blue dots represent hydrogen bonds between uracil and adenine or guanine.

#### 表 4 rRNA 二级结构组分

Tab. 4	Secondary structural	components of rRNA
	•	1

种类 types	Mj I -16S <i>rRNA</i>	Mj II -16S <i>rRNA</i>	Mj I -12S <i>rRNA</i>	Mj II -12S <i>rRNA</i>
外环 external loop	1	1	1	1
螺旋 helix	71	63	40	41
多支环 multi-loop	19	16	11	13
内环 interior loop	25	18	13	11
发夹环 hairpin loop	23	22	14	16
凸包环 bulge loop	4	7	2	3

分歧度大于明对虾属。日本囊对虾两种类型线粒体 DNA 的 13 种蛋白编码基因的核苷酸分歧度大 于叉肢螯虾属的相应基因的分歧度,而几乎所有的编码基因氨基酸序列的分歧度均小于叉肢螯虾属。无论是 13 个蛋白编码基因或者整个全基因的核苷酸序列,日本囊对虾两种类型的分歧度均大 于明对虾属和叉肢螯虾属,但蛋白编码基因的氨 基酸序列分歧度小于明对虾属和叉肢螯虾属。相对于明对虾属,日本囊对虾两种类型 12S rRNA 的分歧度偏大,而 16S rRNA 分歧度偏小。相对于叉肢螯虾属,日本囊对虾两种类型 12S rRNA 和 16S rRNA 的分歧度均偏大。

利用对虾科 cytb 和 cox1 基因引物<sup>[8,16]</sup>,分别 扩增了类型 I 舟山群体和类型 II 海南群体各 30 尾 个体,利用 MEGA 软件进行比对,并计算类型内 和类型间的遗传距离 (表 6)。在 cytb 基因结果中, 类型 I 和类型 II 的类型内遗传距离分别为 0.004 和 0.005,类型间为 0.052。在 cox1 基因结果中, 类型 I 和类型 II 的类型内遗传距离分别为 0.005 和 0.014,类型间为 0.073。

### 2.6 选择压力分析

评估基因序列的替换率 (Ka 和 Ks) 有助于了 解基因受到的选择压力。对日本囊对虾两种类型 进行选择压力分析 (图 6-a),结果显示 nd1、nd4 和 nd5 基因的 Ka/Ks 值大于 1,分别为 1.305、 1.028 和 1.797,这些基因的非同义突变率明显高

甘田	Mj I	Mj I & Mj II		Fm & Fp		Ol & Os	
述凶 — genes	核苷酸 nucleotide	氨基酸 amino acids	核苷酸 nucleotide	氨基酸 amino acids	核苷酸 nucleotide	氨基酸 amino acids	
atp6	5.8	1.4	6.3	1.8	2	1.8	
atp8	8.3	4.0	6.0	1.9	5.2	10.3	
cox1	6.1	0.2	5.0	0.2	1.9	0.4	
cox2	7.7	0.0	3.9	0.0	1.0	0.9	
cox3	7.3	0.4	6.3	0.8	1.7	0.4	
cytb	6.6	0.0	5.6	0.0	1.6	1.3	
nd1	9.6	0.3	7.8	0.0	2.4	1.3	
nd2	7.2	2.4	8.6	1.2	1.5	2.8	
nd3	9.7	1.7	6.0	2.6	3.2	2.6	
nd4	8.7	1.1	7.3	1.8	2.4	1.8	
<i>nd</i> 41	5.3	0.0	4.9	0.0	1.7	1.0	
nd5	9.1	1.0	6.9	2.5	1.9	1.8	
nd6	7.9	2.4	6.6	1.2	2.6	3.6	
CDS	7.7	0.8	6.4	1.1	2.0	1.7	
Full	7.7		5.9		2.1		
12S rRNA	2.5		2.1		1.0		
16S rRNA	3.3		3.8		1.4		

 Tab. 5
 Divergence analysis of protein encoding genes and rRNA in mitochondrial genome

注: Mj I.日本囊对虾类型I, Mj II.日本囊对虾类型II, Fm.墨吉明对虾, Fp.长毛明对虾, Ol.利莫斯螯虾, Os.叉肢螯虾, Full表示线粒体全基因组序列。

Notes: MJ I. *M. japonicus* variety I, MJ II. *M. japonicus* variety II, Fm. *F. merguiensis*, Fp. *F. penicillatus*, Ol. *O. limosu*, Os. *O. sanbornii*, "Full" indicates the complete mitochondrial genome sequence.

### 表 6 遗传距离

Tab. 6Genetics distance

米刑	су	rtb	cox1		
安全 variety	类型 I variety I	类型 II variety II	类型 I variety I	类型 II variety II	
类型 I variety I	0.004 (0.001)	0.052 (0.009)	0.005 (0.001)	0.073 (0.011)	
类型 II variety II	0.052 (0.009)	0.005 (0.002)	0.073 (0.011)	0.014 (0.003)	

注: 括号中数字表示P值。

Notes: the numbers in parentheses represent P values.

于同义突变率,说明这些基因受强烈正向选择, 其他基因的 Ka/Ks 值均明显小于 1,以同义突变 为主,其中 nd4l 的 Ks 值为 0, nd3 和 cytb 基因的 Ka/Ks 值分别为 0.017 和 0.022,表明这些基因受 到强烈的纯化选择。利用 SOPMA 软件进行二级 结构预测,结果显示,两种类型的 nd1、nd4 和 nd5 基因氨基酸序列的二级结构间存在一定差异 (图 6-b),其中 nd4 和 nd5 基因的 α-螺旋和延伸链 数目差异明显。

#### 2.7 密码子偏好性分析

日本囊对虾两种类型线粒体基因组蛋白编码 基因的密码子使用情况见表 7。类型 I 含 3 710 个 密码子,类型 II 含 3 711 个密码子。类型 I 和 II 分别有 30 和 29 个高频密码子,即 RSCU 大于 1, 类型 I 中最高的为 AGA (47/2.26),类型 II 中最高 的为 AGA (52/2.46)。两种类型间只有 1 个密码子 的 RSCU 不一致,即 UCC (1.17/0.95),编码丝氨 酸。RSCU 值大于 1 的密码子主要以 U 或 A 结尾。 使用频率最高的氨基酸为亮氨酸、丝氨酸和异 亮氨酸,类型 I 和 II 中分别占 14.85%/14.61%、 11.11%/11.16% 和 7.88%/8.41%。含量最低的氨基 酸均为色氨酸,类型 I 和类型 II 中分别占 6.24% 和 5.1%。

类型 I 的有效密码子数 (ENc)的平均值为 45.95,其中 nd4l 基因最大,为61; atp8 最小, 为 32.50。类型 II 的 ENc 平均值为 45.19,其中 nd4l 基因最大,为 59.85; nd6 最小,为 36.96。 ENc 等于 35 是密码子偏好性的标准,小于 35 表



图 6 线粒体基因组蛋白编码基因的选择压力分析 (a) 和基因氨基酸序列的二级结构分析 (b) Fig. 6 Selective pressure analysis of protein-coding genes in mitochondrial genome (a) and the secondary structure of amino acid sequences of genes (b)

1. nd5, 2. nd1, 3. nd4, 4. nd6, 5. nd2, 6. atp6, 7. atp8, 8. cox1, 9. cox3, 10.cox2, 11. cytb, 12. nd3, 13. nd4l.

明密码子偏好性较强[17]。

#### 2.8 对虾科系统发育分析

将日本囊对虾两种类型的线粒体基因组氨基 酸全序列与其他 8 属 19 种的对虾科虾类线粒体基 因组全序列进行多重比对分析,以罗氏沼虾 (NC006880)为外群,应用 MEGA X 软件构建系统 发育树,以探究日本囊对虾两种类型的分类地位。 结果显示,同属不同虾种均能聚在一起。日本囊 对虾的两种类型首先聚类,再与沟对虾属的宽沟 对虾聚类 (图 7)。仿对虾属与新对虾属聚类,然后 与赤虾属聚类。明对虾属与对虾属聚类,滨对虾 属与美对虾属聚类。仿对虾属的细巧仿对虾和享 氏仿对虾的的节点支持率较低。

去除色氨酸、甲硫氨酸和终止密码子,基于 剩余 59 个密码子的 RSCU 值,利用 Omicshare 云 平台工具绘制热图 (图 8)。整体上,对虾科 8 个属 的聚类效果与基于氨基酸序列的系统发育树存在 偏差。新对虾属的刀额新对虾和近缘新对虾聚在 一起,但与周氏新对虾距离较远。长毛明对虾和 印度明对虾聚在一起,但与中国明对虾分开。日 本囊对虾类型 I 与凡纳滨对虾聚类紧密,而与类 型 II 和宽沟对虾距离较远。

### 3 讨论

我国东南沿海的日本囊对虾包含两种稳定的 表型差异类型,前期学者利用线粒体基因初步确 定日本囊对虾两种类型的系统发育关系,而少数 基因并不足以保证系统发育树的准确性,尤其是 对近缘种或隐存种。鉴于目前日本囊对虾的隐种 界定尚无定论,本研究对日本囊对虾两种类型的 线粒体基因组进行多方面的对比分析,包括基因 结构、碱基组成、同源性、分歧度、遗传距离、 密码子偏好性等,并基于9属20种的对虾线粒体 基因组的蛋白编码序列构建系统发育树,研究结 果为日本囊对虾的隐种界定提供了新证据。

日本囊对虾两种类型的线粒体基因组结构存 在明显差异,其中类型 I 中有 3 处基因重叠区, 这与多数对虾科动物线粒体基因组情况类似,而 类型 II 共有 5 处基因重叠区,这可能意味着两种 类型的线粒体基因组中存在不同的核酸内切酶作 用位点,通过 mRNA 加工过程将重叠基因分开。 两种类型的线粒体蛋白编码基因核苷酸序列的相 似度为 91.10%~95.00%,其中 nd1、nd3、nd4 和 nd5 的同源性偏低,意味着较多的变异位点,可 作为群体生态学的备选分子标记。长臂虾科 (Palaemonidae) 和匙指虾科 (Atyidae) 线粒体基因组中的 nd4 和 nd5 基因均拥有丰富的多态位点,可用作 分子标记进行物种遗传分析和分歧时间估算<sup>[12,18]</sup>。

Ka和Ks的比值可用来衡量编码基因受选择 压力的程度,当Ka/Ks值大于1,表明受正向选 择(positive selection)<sup>[19]</sup>。申欣等<sup>[20]</sup>研究表明,鼓 虾线粒体基因组的蛋白编码基因的Ka/Ks值均小 于1,受纯化选择(purify selection)。田美等<sup>[21]</sup>研 究发现,海胆纲(Echinoidea)线粒体基因组的 *atp*8基因的Ka/Ks值大于1,受正向选择,而其 余基因均受纯化选择。本研究发现,日本囊对虾

密码子(氨基酸缩写)	数目(同义密码子相对使用频率) count (RSCU)		密码子(氨基酸缩写)	数目(同义密码子相对使用频率) count (RSCU)	
abbreviation)	类型 I variety I	类型 II variety II	abbreviation)	类型 I variety I	类型 II variety II
UUU(F)	147(1.20)	142(1.18)	UAU(Y)	106(1.37)	100(1.30)
UUC(F)	97(0.80)	98(0.82)	UAC(Y)	49(0.63)	54(0.70)
UUA(L)	179(2.05)	178(2.07)	UAA(*)	88(1.44)	89(1.48)
UUG(L)	34(0.39)	32(0.37)	UAG(*)	34(0.56)	31(0.51)
CUU(L)	109(1.25)	96(1.12)	CAU(H)	59(1.19)	62(1.24)
CUC(L)	72(0.82)	81(0.94)	CAC(H)	40(0.81)	38(0.76)
CUA(L)	98(1.12)	105(1.22)	CAA(Q)	79(1.41)	86(1.46)
CUG(L)	32(0.37)	24(0.28)	CAG(Q)	33(0.59)	32(0.54)
AUU(I)	169(1.29)	172(1.31)	AAU(N)	110(1.18)	112(1.20)
AUC(I)	74(0.57)	77(0.59)	AAC(N)	77(0.82)	75(0.80)
AUA(I)	149(1.14)	145(1.10)	AAA(K)	146(1.47)	141(1.37)
AUG(M)	28(1.00)	24(1.00)	AAG(K)	52(0.53)	65(0.63)
GUU(V)	57(1.38)	63(1.47)	GAU(D)	53(1.19)	44(1.09)
GUC(V)	26(0.63)	23(0.54)	GAC(D)	36(0.81)	37(0.91)
GUA(V)	70(1.70)	65(1.52)	GAA(E)	55(1.33)	60(1.45)
GUG(V)	12(0.29)	20(0.47)	GAG(E)	28(0.67)	23(0.55)
UCU(S)	83(1.79)	93(1.88)	UGU(C)	12(0.71)	15(0.94)
UCC(S)	54(1.17)	47(0.95)	UGC(C)	22(1.29)	17(1.06)
UCA(S)	64(1.38)	70(1.41)	UGA(*)	61(1.00)	61(1.01)
UCG(S)	15(0.32)	13(0.26)	UGG(W)	22(1.00)	18(1.00)
CCU(P)	76(1.44)	77(1.44)	CGU(R)	15(0.71)	15(0.72)
CCC(P)	48(0.91)	53(0.99)	CGC(R)	10(0.47)	10(0.48)
CCA(P)	62(1.18)	57(1.07)	CGA(R)	24(1.13)	26(1.25)
CCG(P)	25(0.47)	27(0.50)	CGG(R)	10(0.47)	7(0.34)
ACU(T)	78(1.28)	71(1.16)	AGU(S)	36(0.78)	45(0.91)
ACC(T)	59(0.97)	61(1.00)	AGC(S)	26(0.56)	29(0.59)
ACA(T)	81(1.33)	89(1.45)	AGA(R)	52(2.46)	47(2.26)
ACG(T)	25(0.41)	24(0.39)	AGG(R)	16(0.76)	20(0.96)
GCU(A)	70(1.44)	76(1.61)	GGU(G)	37(1.04)	36(1.06)
GCC(A)	60(1.24)	50(1.06)	GGC(G)	11(0.31)	11(0.32)
GCA(A)	54(1.11)	49(1.04)	GGA(G)	72(2.03)	66(1.94)
GCG(A)	10(0.21)	14(0.30)	GGG(G)	22(0.62)	23(0.68)

### 表 7 密码子使用频率

Tab. 7 Codon usage frequency

注:\*.无对应氨基酸。

Notes: the asterisk indicates the absence of corresponding amino acid.

两种类型的线粒体基因组中的 nd1、nd4 和 nd5 基因的 Ka/Ks 值大于 1,表明受到正向选择。为适应不同的环境条件,满足不同的能量和代谢需求,同一物种或同域近缘种线粒体基因上的选择性进化会促进种群分化和新物种的形成<sup>[22]</sup>。NADH 脱氢酶亚单位 1 基因是呼吸链复合体 I 的主要组成

部分,直接参与电子传递并通过氧化磷酸化产生 ATP。梁利群等<sup>[23]</sup>的研究表明,鲤(*Cyprinus carpio*)的 nd3 基因与低温适应性状存在相关性,且 在低温条件下特异表达。张丽丽等<sup>[24]</sup>的研究表明, 鳀科 (Engraulidae) 鱼类线粒体基因组的 nd6 基因 的 Ka/Ks 值大于 1 (1.139)。周志雄等<sup>[25]</sup>比较分析



图 7 基于线粒体基因组蛋白编码基因的系统发育树

Fig. 7 Molecular phylogenetic analysis based on protein-coding genes of mitochondrial genome

了东方鲀属 (Takifugu spp.) 10 种东方鲀的线粒体 基因组,发现 nd6 基因的 Ka/Ks 值平均为 1.19, 表明经历了正向选择。日本囊对虾的两种类型呈 现邻域分布特征,温度是限制两种类型分布的主 要环境因子,而温度对线粒体选择进化机制的影 响仍需进一步探究。

明对虾与日本囊对虾同为一科,其线粒体蛋 白编码基因的差异水平可作为日本囊对虾两种类 型差异判定的重要参考。蛋白编码基因同源性结 果显示, nd2 基因的核苷酸序列差异大, 而氨基 酸分歧度较小,可能是进化的不彻底,从而发生 更多的同义突变。线粒体蛋白编码基因及 rRNA 间的核苷酸差异证实了日本囊对虾两种类型达到 了种间差异水平。而氨基酸序列的分歧度普遍小 于明对虾属和叉肢螯虾属, 意味着日本囊对虾两 种类型的蛋白编码基因主要发生了同义突变。作 为应用广泛的 DNA 条形码, cox1 和 cytb 基因已 成功应用于不同层级的物种鉴定[26-29]。有研究表 明,线粒体 cox1 基因可用于物种鉴定,种内遗传 距离小于 2%,种间遗传距离大于 2%,且种间遗 传距离至少是种内遗传距离的10倍<sup>[30-31]</sup>。基于 cvtb 和 cox1 基因的结果显示,日本囊对虾两种类 型的种内遗传距离均明显小于 0.02, 种间遗传距 离大于 0.02, 且 cvtb 基因的种间遗传距离大于种 内遗传距离的 10 倍, cox1 基因的种间遗传距离分 别是类型Ⅰ和类型Ⅱ的种内遗传距离的14.6倍和 5.2 倍。前期实验利用单拷贝核基因和简化基因组 技术对我国东南沿海日本囊对虾的8个自然种群 共160个个体进行了遗传结构分析,结果支持我 国东海沿海日本囊对虾的自然群体包含两个高度 分化的进化单元,且两种类型间存在一定程度上 的生殖隔离或不兼容,这支持生物学物种概念<sup>[5]</sup>。 Tsoi 等<sup>[4]</sup>利用分子技术确定日本囊对虾两隐种的 系统发育关系和分类地位。Wang 等<sup>[7]</sup> 对日本囊对 虾两种类型进行比较转录组分析,基于两种类型 间直系同源基因的同义替换率(ds)估算日本囊对 虾两种类型的分化时间大概在 0.26~0.69 百万年前。 Tsoi 等<sup>[3,6]</sup> 基于线粒体基因序列评估两种类型的分 化时间为1.1~4.7百万年前。在中更新世,海平面 最高下降 100~150 m, 东海 (包括台湾海峡) 和南 海北部的沿海陆架露出[32]。这种隔离模式极大地 促进了海洋物种分化<sup>[33]</sup>,如口虾蛄 (Oratosquilla oratoria)<sup>[34]</sup>、中华乌塘鳢 (Bostrychus sinensis)<sup>[35]</sup>。

在系统发育进化研究中,系统发育树的准确 性非常重要,而仅靠单个基因还远远不够。易啸 等<sup>[26]</sup>利用 COI 基因的结果表明,墨吉明对虾和 中国明对虾聚类,而与长毛明对虾和印度明对虾 均不能聚类。前期学者利用线粒体 COI 和 16S rRNA 基因分析对虾科虾类,支持不同的分类单元<sup>[36-37]</sup>。 本研究基于线粒体基因组蛋白编码基因的系统发



图 8 基于 RSCU 值的聚类分析

FP.长毛明对虾,FI.印度明对虾,MJO.周氏新对虾,MD.戴氏赤虾,MB.须赤虾,LS.细角滨对虾,FC.中国明对虾,LV.凡纳滨对虾, MJI.日本囊对虾类型I,PM.斑节对虾,PA.亚奇对虾,MJII.日本囊对虾类型II,PHU.亨氏仿对虾,ME.刀额新对虾,MA.近缘新对虾, ML.宽沟对虾,FCA.加州美对虾,PHA.哈氏仿对虾。

#### Fig. 8 Clustering analysis based on RSCU values

FP. F. penicillatus, FI. F. indicus, MJO. M. joyneri, MD. M. dalei, MB. M. barbata, LS. L. stylirostris, FC. F. chinensis, LV. L. vannamei, MJ I. M. japonicus variety I, PM. P. monodon, PA. P. acehensis, MJ II. M. japonicus variety II, PHU. P. hungerfordi, ME. M. ensis, MA. M. affinis, ML. M. latisulcatus, FCA. F. californiensis, PHA. P. hardwickii.

育关系显示,同属的不同对虾种均首先聚类,属 间不存在混合现象。本研究中日本囊对虾的两种 类型首先聚类,再与沟对虾属的宽沟对虾聚类; 明对虾属与对虾属聚类,滨对虾属与美对虾属聚 类。之前,这6个对虾属均被归于对虾属下的不 同亚属<sup>[1,38]</sup>。直到1998年,Bauer等<sup>[39]</sup>将对虾属 下的6个亚属提升到属级水平。过去基于单个线 粒体基因的系统发育分析,对虾属的斑节对虾和 短沟对虾的系统发育分支常被明对虾属分开<sup>[2,36]</sup>。 朱陇强等<sup>[12]</sup>分析了长臂虾科 14 个物种线粒体基因 组的全序列,结果显示,长臂虾属与沼虾属互为 姊妹关系。本研究基于线粒体全基因组序列,能 有效地区分各属对虾,说明线粒体基因组用于系 统发育树的准确性。然而基于密码子 RSCU 值的 系统发育关系并不能很好地将对虾科进行归类, 属间物种的密码子偏好特异性不足以获得准确的 进化关系,但该指标仍可作为构建系统发育树的 补充和参考。

水产学报, 2023, 47(3): 039105

研究表明,日本囊对虾的两种表型差异类型 基本达到物种水平。Tsoi等<sup>[4]</sup>结合形态和线粒体 基因,提出日本囊对虾的两种形态变异类型属于 两类隐种。因此有必要进一步评估和比较两种囊 对虾更多的性状差异以及对不同环境因子的适应 性差异,以提高两种囊对虾的物种特异性养殖技术。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

#### 参考文献 (References):

- [1] Tirmizi N. Marsupenaeus, a new subgenus of Penaeus Fabricius, 1798 (Decapoda, Natantia)[J]. Pakistan Journal of Zoology, 1971, 3(2): 193-194.
- [2] Lavery S, 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.
- [3] Tsoi K H, Chan T Y, Chu K H. Molecular population structure of the kuruma shrimp *Penaeus japonicus* species complex in western Pacific[J]. Marine Biology, 2007, 150(6): 1345-1364.
- [4] Tsoi K H, Ma K Y, Wu T H, *et al.* Verification of the cryptic species *Penaeus pulchricaudatus* in the commercially important kuruma shrimp *P. japonicus* (Decapoda: Penaeidae) using molecular taxonomy[J]. Invertebrate Systematics, 2014, 28(5): 476-490.
- [5] Wang P P, Chen B H, Zheng J B, *et al.* Fine-scale population genetic structure and parapatric cryptic species of kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*), along the northwestern pacific coast of China[J]. Frontiers in Genetics, 2020, 11: 118.
- [6] Tsoi K H, Wang Z Y, Chu K H. Genetic divergence between two morphologically similar varieties of the kuruma shrimp *Penaeus japonicus*[J]. Marine Biology, 2005, 147(2): 367-379.
- [7] Wang P P, Xing C F, Wang J, et al. Evolutionary adaptation analysis of immune defense and hypoxia tolerance in two closely related *Marsupenaeus* species based on comparative transcriptomics[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 92: 861-870.
- [8] 曾凡荣, 王军, 周孔霖, 等. 基于线粒体Cytb基因探讨我 国日本囊对虾4个地理群体的遗传结构及种群分化[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2010, 49(5): 701-706.

https://www.china-fishery.cn

Zeng F R, Wang J, Zhou K L, *et al.* Genetic structure and population differentiation in four wild populations of *Marsupenaeus japonicus* based on cytochrome *b* gene segment sequence of mitochondrial DNA[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science Edition), 2010, 49(5): 701-706 (in Chinese).

[9] 游欣欣, 董宏标, 曾凡荣, 等. 日本囊对虾 2 种形态变 异体的识别方法: 中国, 201010563289. X[P]. 2011-02-23.

You X X, Dong H B, Zeng F R, *et al.* The identification method of two morphologic variants of *Marsupenaeus japonicus*: CN 201010563289. X[P]. 2011-02-23 (in Chinese).

[10] 董宏标,苏永全,毛勇,等.室内环境下日本囊对虾2种 形态变异类型群体生长特性比较研究[J].热带海洋学 报,2014,33(4):51-60.

Dong H B, Su Y Q, Mao Y, *et al.* Growth characteristics of two morphologically similar varieties of *Marsupenaeus japonicus* under indoor cultivation environment[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2014, 33(4): 51-60 (in Chinese).

 [11] 宋晓红,毛勇,董宏标,等.两种形态变异类型日本囊 对虾稚虾高温耐受性的比较[J].水产学报,2014, 38(1):84-90.

Song X H, Mao Y, Dong H B, *et al.* The thermotolerance of the two morphologically similar varieties of juvenile kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(1): 84-90 (in Chinese).

[12] 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(7):852-862.

Zhu L Q, Zhu Z H, Lin Q, *et al.* Characteristics and phylogenetic analysis of the mitochondrial genome in Palaemonidae[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2021, 28(7): 852-862 (in Chinese).

- [13] 宋晓红. 两种形态变异类型日本囊对虾 α-淀粉酶基因 的克隆、表达与比较 [D]. 厦门: 厦门大学, 2014. Song X H. The cloning, expression and comparion of αamylase genes for the two morphologically similar varieties of *Marsupenaeus japonicus*[D]. Xiamen: Xiamen University, 2014 (in Chinese).
- [14] Sharp P M, Li W H. The codon adaptation index-a measure of directional synonymous codon usage bias, and its 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

potential applications[J]. Nucleic Acids Research, 1987, 15(3): 1281-1295.

- [15] Fernández-Silva P, Enriquez J A, Montoya J. Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA[J]. Experimental Physiology, 2003, 88(1): 41-56.
- [16] Folmer O, Black M B, Wr H, 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.
- [17] Comeron J M, Aguadé M. An evaluation of measures of synonymous codon usage bias[J]. Journal of Molecular Evolution, 1998, 47(3): 268-274.
- [18] 朱陇强,朱志煌,朱雷宇,等.匙指虾科线粒体基因组结构与系统进化分析 [J].大连海洋大学学报,2022, 37(3):428-434.

Zhu L Q, Zhu Z H, Zhu L Y, *et al.* Characteristics and phylogenetic analysis of mitogenome in the Atyidae[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2022, 37(3): 428-434 (in Chinese).

- [19] Hurst L D. The Ka/Ks ratio: diagnosing the form of sequence evolution[J]. Trends in Genetics, 2002, 18(9): 486-487.
- [20] 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 H. Comparison and analysis of *Alpheus japonicus* and *A. distinguendus* complete mitochondrial genome sequences[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2012, 34(5): 147-153 (in Chinese).

- [21] 田美, 申欣, 孟学平, 等. 海胆纲线粒体基因组特征及基因差异位点分析[J]. 水产科学, 2011, 30(3): 174-176.
  Tian M, Shen X, Meng X P, *et al.* Characteristics and different genetic loci in mitochondrial genomes of sea urchin[J]. Fisheries Science, 2011, 30(3): 174-176 (in Chinese).
- [22] Ballard J W O, Whitlock M C. The incomplete natural history of mitochondria[J]. Molecular Ecology, 2004, 13(4): 729-744.
- [23] 梁利群,常玉梅,邹庆薇,等. 鲤NADH泛醌氧化还原酶
   亚基3基因的克隆及低温适应相关性分析[J]. 吉首大
   学学报(自然科学版), 2009, 30(5): 77-81.
   Liang L Q, Chang Y M, Zou Q W, *et al.* Cloning and

correlation analysis of cold adaptation of NADH-

中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

quinone oxidoreductase 3 subunit gene from common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. Journal of Jishou University (Natural Science Edition), 2009, 30(5): 77-81 (in Chinese).

[24] 张丽丽,程起群. 鳀科鱼类线粒体全基因组序列结构 特征及系统发育信息分析[J]. 海洋渔业, 2012, 34(1): 7-14.

Zhang L L, Cheng Q Q. Mitochondrial genome characteristics and phylogenetic information of family Engraulidae (Clupeiformes: Clupeoidei) fishes[J]. Marine Fisheries, 2012, 34(1): 7-14 (in Chinese).

[25] 周志雄,刘波,宫杰,等.基于线粒体基因组的东方鲀属系统发育学及群体遗传学[J].水产学报,2020, 44(11):1792-1803.

Zhou Z X, Liu B, Gong J, *et al.* Phylogeny and population genetics of species in *Takifugu genus* based on mitochondrial genome[J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(11): 1792-1803 (in Chinese).

[26] 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.

> Yi X, Wang P P, Wang J, *et al.* The research of *CO* I based DNA barcoding in Penaeidaes' identification[J]. Journal of Fisheries of China, 2018, 42(1): 1-9 (in Chinese).

[27] 周淑姮,肖方震,刘维俊,等. CO I 基因DNA条形码技 术在福建省蜱类鉴定中的应用[J].中国人兽共患病学 报, 2020, 36(1): 25-31.

Zhou S H, Xiao F Z, Liu W J, *et al.* Application of DNA barcoding of *CO* I gene in identification of ticks in Fujian Province, China[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2020, 36(1): 25-31 (in Chinese).

[28] 袁冬皓,杨天燕,孟玮,等.四种鱚属鱼类线粒体Cytb基因的序列变异及系统发育研究[J].浙江农业学报, 2020,32(1):35-42.

Yuan D H, Yang T Y, Meng W, *et al.* Sequence variation and molecular phylogeny of mitochondrial Cytb gene segments from four *Sillago* species[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2020, 32(1): 35-42 (in Chinese).

[29] 郭照良,郑小壮,陈文坚,等. 基于线粒体COI基因的 DNA条形码在沼虾属种类鉴定中的应用[J]. 湖南农业 大学学报 (自然科学版), 2019, 45(5): 514-521.
Guo Z L, Zheng X Z, Chen W J, et al. Application of COI-based DNA barcoding in Macrobrachium identification[J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Science Edition), 2019, 45(5): 514-521 (in Chinese).

- [30] Hebert P D N, Ratnasingham S, De Waard 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(S1): S96-S99.
- [31] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2003, 270(1512): 313-321.
- [32] Wang L, Sarnthein M, Erlenkeuser H, et al. East Asian monsoon climate during the Late Pleistocene: high-resolution sediment records from the South China Sea[J]. Marine Geology, 1999, 156(1-4): 245-284.
- [33] García-Machado E, De Léon J L P, Gutiérrez-Costa M A, et al. Phylogeographic evidence that the distribution of cryptic euryhaline species in the *Gambusia punctata* species group in Cuba was shaped by the archipelago geological history[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2020, 144: 106712.

- [34] Cheng J, Sha Z L. Cryptic diversity in the Japanese mantis shrimp *Oratosquilla oratoria* (Crustacea: Squillidae): allopatric diversification, secondary contact and hybridization[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 1972.
- [35] Ding S X, Mishra M, Wu H H, et al. Characterization of hybridization within a secondary contact region of the inshore fish, *Bostrychus sinensis*, in the East China Sea[J]. Heredity, 2017, 120(1): 51-62.
- [36] Chan T Y, Tong J, Tam Y K, *et al.* Phylogenetic relationships among the genera of the Penaeidae (Crustacea: Decapoda) revealed by mitochondrial 16S rRNA gene sequences[J]. Zootaxa, 2008, 1694(1): 38-50.
- [37] Voloch C M, Freire P R, Russo C A M. Molecular phylogeny of peneid shrimps inferred from two mitochondrial markers[J]. Genetics and Molecular Research: GMR, 2005, 4(4): 668-674.
- [38] Pérez F I. Western Atlantic shrimps of the genus Penaeus[J]. Fishery Bulletin, 1969, 67(3): 461-591.
- [39] Bauer R T. Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world: keys and diagnoses for the families and genera[J]. Bulletin of Marine Science, 1998, 62(1): 299-301.

### Comparative analysis of mitochondrial complete genomes between two phenotypic variants of *Marsupenaeus japonicus*

WANG Panpan<sup>1,2,3,4</sup>, XIE Shumin<sup>1</sup>, YU Shihao<sup>1</sup>, CHEN Hao<sup>1</sup>, XING Chaofan<sup>1,2,3</sup>, GAO Huan<sup>1,2,3,4</sup>, YAN Binlun<sup>1,2,3,4\*</sup>

(1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Bioresources and Environment, Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China;

2. Co-Innovation Center of Jiangsu Marine Bio-industry Technology, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China;

3. Marine Resource Development Institute of Jiangsu Province (Lianyungang), Lianyungang 222005, China;

4. The Jiangsu Provincial Infrastructure for Conservation and Utilization of Agricultural Germplasm, Nanjing 210014, China)

Abstract: The kuruma shrimp (Marsupenaeus japonicus) includes two morphologically similar varieties, which are distributed mostly allopatrically but coexist in the northern South China Sea. In order to further analyze the phylogenetic relationship between the two phenotypic varieties of M. japonicus, the gene structure, genetic distance and codon preference of their mitochondrial whole genomes. The results showed that there were differences in gene overlap region, gene spacing and codon preference between the two genomes. The similarity of the nucleotide sequences of the mitochondrial protein-encoding genes was between 91.10% and 95%, and the similarity of amino acid sequences was between 96.15% and 100%. The sequence homology of A+T rich regions was only 82.60% and the divergence was 15.40%, indicating a high degree of genetic differentiation. The nucleotide sequence divergence of protein-coding genes between the two varieties was higher than that between Fenneropenaeus and Orconectes, while the divergence of amino acid sequence was smaller than that between the latter. The study found that the interspecific genetic distance based on cytb gene was more than 10 times the intraspecific genetic distance. The interspecific genetic distance based on cox1 gene was 14.6 times and 5.2 times of the intraspecific genetic distance for variety I and variety II, respectively. The Ka/Ks values of nd1, nd4 and nd5 genes were greater than 1, indicating positive selection. Phylogenetic trees were constructed based on the protein coding sequence of 20 Penaeus species belonging to 9 genera, and the result showed that each genus could be effectively differentiated. In the phylogenetic tree, the two varieties of *M. japonicus* were clustered first, and then clustered with Melicertus latisulcatus. In view of these differences between the two Marsupenaeus species, we believe that it is essential and urgent to establish a genetic database for each and reevaluate their suitable ecological conditions in order to improve species-specific culturing techniques.

Key words: *Marsupenaeus japonicus*; phenotypic difference; mitochondrial genome; sequence divergence; phylogenetic analysis

Corresponding author: YAN Binlun. E-mail: yanbinlun1962@163.com

**Funding projects**: Jiangsu Natural Science Foundation Project (BK20210924); Natural Science Foundation of the Jiangsu Higher Education Institutions (21KJB240001); Research Fund of Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology of Jiangsu Ocean University (HS2020001); Jiangsu Province Industry-university-research Cooperation Project (BY2021366); North Jiangsu Province Science and Technology Project (SZ-LYG202030); Jiangsu Advantageous Discipline Construction Project (PAPD)