

## 平耳孔蜈蚣细胞色素 b 基因序列变异分析

左宝平, 宋大祥, 周开亚, 孙红英\* (南京师范大学生命科学学院, 江苏省生物多样性与生物技术重点实验室, 江苏南京 210046)

**摘要** [目的] 对中国平耳孔蜈蚣种群的地理变异进行初步探讨。[方法] 中国平耳孔蜈蚣标本经 95% 乙醇浸制后进行总基因组提取、PCR 扩增和测序, 最后进行序列分析。[结果] 共定义 26 个单元型, 单元型之间的平均遗传距离为 0.13。种群的遗传多样性波动范围较大, 系统发生树中各样地平耳孔蜈蚣的单元型呈现一种混杂的分布格局。[结论] 根据节肢动物分子钟, 推断现代平耳孔蜈蚣遗传分布格局均比较古老, 早在第三纪中期就已经形成, 可见更新世冰期对平耳孔蜈蚣种群没有影响。

**关键词** 基因序列变异分析; 细胞色素 b; 平耳孔蜈蚣

中图分类号 Q959 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)07-02883-03

**Analysis on Mitochondrial cob Gene Sequences of *Qostigmus* (O.) politus**

**ZUO BAO Ping et al** (Jiangsu Key Lab for Biodiversity and Biotechnology, College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing, Jiangsu 210046)

**Abstract** [Objective] The research aimed to preliminarily discuss the geographic variation of *Qostigmus* (O.) politus. [Method] The samples of *Qostigmus* (O.) politus were preserved by 95% ethanol, and then been extracted for its total genome to undergo PCR amplification and sequencing. At last, its sequences were analyzed with Clustal X1.83 software. [Result] A total of 26 haplotypes were defined by sequences variance, and 58 individuals were collected from 11 locations in five populations. Phylogenetic tree (Bayesian) of haplotypes was very confusion, which showed that the range of genetic diversity was very large, influenced by glacial periods in the Pleistocene. [Conclusion] According to molecular clock of arthropods, the data suggested that the distribution pattern of *Qostigmus* (O.) politus was very original, which formed after the middle of Tertiary Period. So it wasn't influenced by glacial periods in the Pleistocene.

**Key words** Genetic variation analysis; Cytochrome b; *Qostigmus* (O.) politus

平耳孔蜈蚣 (*Qostigmus politus* Karsch) 广泛分布于中国东部地区, 目前关于平耳孔蜈蚣的研究, 仅有宋志顺等<sup>[1]</sup> 在中国耳孔蜈蚣属(蜈蚣目蜈蚣科) 研究中对该物种的形态分类与地理分布的描述。对于该物种的种群遗传变异的研究, 国内外尚未见有报道。笔者采用线粒体细胞色素 b 基因标记, 基于 DNA 序列变异, 对中国平耳孔蜈蚣种群的地理变异进行初步探讨。

## 1 材料与方法

**1.1 试验材料** 研究中平耳孔蜈蚣样品样地的选择, 参考已报道的平耳孔蜈蚣在中国的地理分布, 以及张荣祖<sup>[2]</sup> 提出的中国动物地理区划, 包括东北区、华北黄淮亚区、华北黄土高原亚区、华中区和华南区 5 个动物地理区在内的 11 个样地采集 58 只标本(表 1)。标本经 95% 乙醇浸制保存。

表 1 平耳孔蜈蚣的采样地、样本数量与单元型

Table 1 The sampling sites, sample size and haplotype of *Qostigmus politus*

采集地点 Sampling sites	数量 Number	种群 Population	单元型 Haplotype
辽宁葫芦岛山神庙 Shanshengmiao of Huludao City, Liaoning	6	东北种群	LN1-4, LN2-1, LN3-1
山东莱阳市龙门 Longmen of Laiyang City, Shandong	5	华北种群黄淮平原亚区	SD1-3, SD2-1, SD3-1
山西晋中市灵石 Lingshi of Jinzhong City, Shanxi	7	华北种群黄土高原亚区	HB1-1, SJZ1-5, SJZ2-1
山西运城永济 Yongji of Yuncheng City, Shanxi	7	华北种群黄土高原亚区	SYC1-4, SYC2-2, SYC3-1, SYC4-1
河北承德市郊 Chengde suburb of Hebei	15	华北种群黄土高原亚区	HB1-10, HB2-2, HB3-2, HB4-1, HB5-1
陕西渭南华阴市 Huayin of Weinan City, Shaanxi	6	华北种群黄土高原亚区	SHY1-4, SHY2-1, SHY3-1
陕西省西安市周至马召 Mazao Township of Zhouzhi County, Xian City of Shaanxi	3	华北种群黄土高原亚区	SXA1-1, SXA2-1, SYC1-1
河南栾川县 Luanchuan County of Henan	2	华中种群	SYC2-2
陕西汉中南郑 Nanzheng County of Hanzhong City, Shaanxi	1	华中种群	SNZ1-1
江苏南京紫金山 Nanjing Purple Mountain of Jiangsu	3	华中种群	JS1-1, JS2-1
广西花坪检查站 Huaping checkpoint of Guangxi	3	华南种群	GX1-3
总计 Total	58	5	26

## 1.2 试验方法

**1.2.1 总基因组提取、PCR 扩增和测序。** 首先用液氮研磨标本, 然后采用含蛋白酶 K 的裂解液(浓度 30 mmol/L tris-HCl, pH 值 8.0, 浓度 0.1 mol/L EDTA, 浓度 0.1 mol/L NaCl, 浓度

基金项目 国家自然科学基金重点资助项目(30130040)。

作者简介 左宝平(1980-), 女, 辽宁葫芦岛人, 硕士研究生, 研究方向: 多足动物分子生物学。\* 通讯作者, 博士生导师, 教授。

收稿日期 2008-12-11

1% SDS) 55 ℃ 水浴 2~4 h, 用饱和酚 氯仿 异戊醇 (25:24:1) 抽提 2 次, 氯仿 异戊醇 (24:1) 抽提 1 次, 随后用低温无水乙醇 (-20 ℃) 沉淀 DNA, 干燥后溶于 TE 中, 置 -20 ℃ 保存备用。

PCR 扩增引物序列: primer1, 405 (5'-GGA TAT GTA TTA CCA TGA GGA CAA ATA TG 3'); primer2, 1080 (5'-CTA CTG GAC GGG CTC CGA TTC AGG TTA G 3')。PCR 反应总体积为 30 μl, 包括 DNA 模板, 浓度 10 mmol/L dNTP 2 μl, 10 × Buffer 3.0 μl, 浓度 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 3.0 μl, 10 pmol/L 引物各 2 μl, 1 U Taq 酶加 ddH<sub>2</sub>O 补足 30 μl, 以 ddH<sub>2</sub>O 作对照。反应体系在 95 ℃ 预变性 5 min, 然后进入如下循环: 95 ℃ 变性 35 s, 52 ℃ 退火 35 s, 72 ℃ 延伸 90 s, 循环次数为 35 次, 循环结束后在 72 ℃ 延伸 10 min。反应产物经 PCR 清洁试剂盒 (上海华舜) 纯化, 用 ABI PRISM BigDye 测序反应试剂盒 (Perkin Elmer) 在 ABI 3730 全自动 DNA 测序仪上进行双向 DNA 序列测定<sup>[3]</sup>。

**1.2.2 序列分析。**双向测序后得到的结果用 Clustal X 1.83<sup>[4]</sup> 软件, 结合人工调整对所测 DNA 序列进行比对, 获得了 cob 基因 546 bp 的一致序列, 并从 GenBank 中下载唇足纲

(*Scutigera cdeoprata*, NC\_005870, 研究中代号为 Scu) 和倍足纲 (*Thyropygus* sp, NC\_003344, 研究中代号为 Thy)<sup>[5]</sup> cob 基因的同源序列为外群。用 Mega v3.0<sup>[6-7]</sup> 软件进行序列碱基组成及其含量、变异位点分析, 基于 Kimura 2-parameter 模型计算种群间的遗传距离 (p-distance)。用 Modeltest 3.7 软件经启发式相似速率测试搜索获得序列进化的最适模型为 K81uf + I + G, 最适模型参数的计算由 PAUP 4.0 b10<sup>[8]</sup> 软件包完成。基于该最适模型用贝叶斯法 (Bayesian Inference)<sup>[9-10]</sup> 构建系统发生树, 贝叶斯法采用 MrBayes v 3.0B4 软件, 构建 2 000 000 代的贝叶斯树。

## 2 结果与分析

**2.1 序列变异和种群遗传多样性** 获得的 58 条 cob 基因部分序列, 没有发现插入缺失, 序列比对后的长度为 546 bp, 变异位点 (Variable Site) 有 227 个, 简约信息多态位点 (Parsimony Informative Polymorphic Site) 195 个, 共定义了 26 种单元型 (Haplotype), 5 个种群之间具有共享单元型, 并且存在较多的鉴别位点 (表 2)。基于 PAUP 4.0<sup>[8]</sup> 计算的单元型之间的遗传距离从 0.1% 到 26.2%, 平均遗传距离为 13.0%。

表 2 平耳孔蜈蚣遗传多样性分析

Table 2 Genetic diversity analysis of *O. pditus*

种群 Population	取样数量 个 Sample quantity	单元型数量 个 Haplotype quantity	变异位点数 个 Variation sites	单元型多样性 Haplotype diversity	核苷酸多样性 Nucleotide diversity
东北种群 Northeast population	6	3	62	0.600	0.037 85
华北黄淮平原亚区种群 Hanghuai plain subregion population of North China	5	3	89	0.700	0.075 46
华北种群黄土高原亚区 Loess Plateau subregion of North China population	38	16	178	1.000	0.098 05
华南种群 South China population	3	1	0	0	0
华中种群 Central China population	6	4	175	1.000	0.181 62
合计 Total	58	26	227	0.947	0.112 82

**2.2 种群间遗传分化** 对 5 个地理种群进行遗传距离分析, 结果显示: 东北种群平耳孔蜈蚣和东北种群黄淮平原亚区的遗传距离较小, 为 0.088~0.109; 华北种群黄淮平原亚区和华北种群黄土高原亚区遗传距离较小, 为 0.096~0.114; 而

华中种群和东北种群的遗传距离较大, 为 0.269~0.319; 华中种群和东北种群黄土高原亚区的遗传距离也较大, 为 0.263~0.313; 华中种群和东北种群黄淮平原亚区的遗传距离最大, 为 0.278~0.330 (表 3)。

表 3 平耳孔蜈蚣 5 个地理种群间的遗传距离

Table 3 Pair-wise genetic distance among five geographical populations of *O. pditus*

种群 Population	东北种群 Northeast population	华北种群黄淮平原亚区 Hanghuai plain subregion population of North China	华北种群黄土高原亚区 Loess Plateau subregion of North China population	华中种群 Central China population	华南种群 South China population
东北种群 Northeast population					
华北种群黄淮平原亚区 Hanghuai plain subregion population of North China	0.088 ~0.109				
华北种群黄土高原亚区 Loess Plateau subregion of North China population	0.110 ~0.132	0.096 ~0.114			
华中种群 Central China population	0.269 ~0.319	0.278 ~0.330	0.263 ~0.313		
华南种群 South China population	0.155 ~0.179	0.154 ~0.178	0.149 ~0.174	0.213 ~0.253	

**2.3 种群单元型之间的系统发生关系** 通过 Modeltest 3.7

计算出适合 cob 基因的贝叶斯法分析的最适模型为 K81uf + I

+ G, 序列位点间的碱基替代率(Variable Substitution Rates Among Sites) 为0.72, 其Gamma 分布参数(Gamma Distribution Parameter) 为0.74, 似然率对数的负值为2 074.177。

基于贝叶斯法的系统发生分析<sup>[11]</sup>, 各地方种群中的单元型呈现一种混杂的分布格局(图1)。除华南种群外, 其他种群未聚为单系类群。由此可见该物种为一个广泛交流的物种。

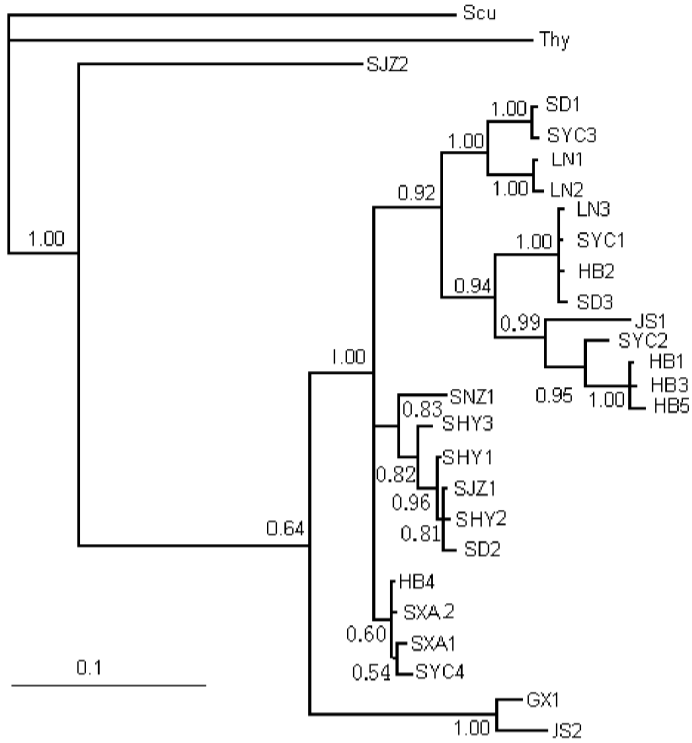


图1 基于贝叶斯法的耳孔蜈蚣单元型系统发生树

Fig.1 Phylogenetic trees of *O. politus* phylogram based on Bayesian method

### 3 结论与讨论

中国大陆平耳孔蜈蚣的5个种群中, 华北黄土高原亚区种群和华中种群的单元型多样性( ) 最高, 为1.00, 其次是华北黄淮平原亚区种群, 再次是东北种群, 最后为华南种群,  $h = 0$ , 因为其只具有一种单元型。华中平耳孔蜈蚣种群核苷酸多样性(  $h$  ) 最高为0.181 62, 其次是华北黄土高原亚区, 再次是华北黄淮平原亚区、东北种群, 最后为华南种群。单元型多样性(  $h$  ) 范围为0 ~ 1.000, 核苷酸多样性指数( ) 介于0 ~ 0.181 62, 可见5个种群的遗传多样性波动范围均比较大。

由以上结果可以看出东北种群具有较高的单元型多样性和较低的核苷酸多样性, 揭示了东北地区平耳孔蜈蚣种群具有较高的遗传多样性和基因交流水平。华北黄土高原亚区种群混有华中种群的单元型, 形成此格局可能是由于二者地理位置较为接近, 地理阻隔较少, 种群间进行了混合<sup>[12]</sup>。

结合节肢动物遗传变异的分子钟2.3%/MYA, 推断出: 东北种群和华北黄土高原亚区种群分歧时间大约在30百万年前的渐近世、始新世之间, 华北黄淮平原亚区种群分歧时间大约在40百万年前的第三纪始新世, 华南种群和华中种群分歧时间大约在120百万年前的新生代的第三纪古新世

白垩纪中生代末期。现代平耳孔蜈蚣遗传分布格局比较古老, 早在第三纪中期就已经形成, 可见更新世的冰期对平耳孔蜈蚣没有影响, 因为在冰期之前它们就已经开始分化<sup>[13]</sup>。从5个种群的分歧时间可以看出, 华南种群和华中种群为古老的平耳孔蜈蚣种群, 而东北种群和华北黄淮平原亚区种群为较现代的种群, 所以种群的遗传多样性波动范围较大, 形成这样的分布格局也体现了动物对温度的适应性<sup>[14]</sup>。

华北黄土高原亚区种群和华中种群具有共享单元型SHY2, 但是从种群的分歧时间上看, 二者大约发生在100百万年前, 现代种群出现共享单元型的原因可能是2个种群间出现了基因交流<sup>[15-16]</sup>。

今后, 随着对平耳孔蜈蚣等多足动物地理学研究的逐渐深入, 通过增加取样密度, 同时结合微卫星DNA标记对各地理种群进行更深入、精细的分析, 将有助于获得对平耳孔蜈蚣种群演化历史更为详细的了解, 从而进一步揭示平耳孔蜈蚣种群地理分布格局的形成原因。

### 参考文献

- [1] 宋志顺, 盖永华, 宋大祥, 等. 中国耳孔蜈蚣属(蜈蚣目: 蜈蚣科) 部分种类研究[J]. 河北大学学报: 自然科学版, 2005, 25(3): 296-304.
- [2] 张荣祖. 中国动物地理[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [3] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning: laboratory manual[M]. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- [4] JEANMUGIN F J D, THOMPSON M, GOUY D G, et al. Multiple sequence alignment with Clustal X[J]. Trends Biochem Sci, 1998, 23: 403-405.
- [5] 孙红英, 周开亚, 宋大祥. 节肢动物线粒体基因组与系统发生重建[J]. 动物学研究, 2003, 24(6): 467-479.
- [6] KUMARS, TAMURA K, JAKOBSENI, et al. MEGA: molecular evolutionary genetic analysis software[J]. Bioinformatics, 2001, 17: 1244-1245.
- [7] KUMARS, TAMURA K, NEI M. MEGA 3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. Brief Bioinform, 2004, 5: 150-163.
- [8] SWOFFORD D L. PAUP\* phylogenetic analysis using parsimony and other methods[M]. Beta version 4.0b 10. Sinauer Associates, Sunderland, MA, 2002.
- [9] TEMPLETON A R., SING C F. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination[J]. Genetics, 1993, 134: 659-669.
- [10] YANG Y H, ZHANG D X, LI Y M, et al. Mitochondrial DNA diversity and preliminary biogeographic inference of the evolutionary history of the black spotted pond frog *Rana nigromaculata* population in China[J]. Acta Zool Sin, 2004, 50(2): 193-201.
- [11] 陆佩红. 分子系统地理学研究进展[J]. 生物学教学, 2006, 31(2): 4-5.
- [12] 杨玉慧, 张德兴, 李义明, 等. 中国黑斑蛙种群的线粒体DNA多样性和生物地理演化过程的初探[J]. 动物学报, 2004, 50(2): 193-201.
- [13] 徐馨. 第四纪冰期中的我国植物群[C]// 中国地理学会冰川冻土分会和中国科学院兰州冰川冻土研究所. 中国第四纪冰川冰缘学术讨论会文集. 北京: 科学出版社, 1985: 125-128.
- [14] 张德兴, 闫路娜, 康乐, 等. 对中国飞蝗种下阶元划分和历史演化过程的几点看法[J]. 动物学报, 2003, 49(5): 675-681.
- [15] SUN HY, ZHOU KY, LU JJ, et al. Sequence variation and molecular identification markers of mitochondrial 16S rDNA from Eriocheir of mainland China[J]. Progress in Natural Science, 2002, 12(5): 460-465.
- [16] SUN HY, ZHOU KY, SONG D X. Mitochondrial genome of the Chinese mitten crab *Eriocheir japonica sinensis* (Decapoda: Brachyura: Thracidremita: Gapsoidae) reveals a novel gene order and two target regions of gene rearrangements[J]. Gene, 2005, 349: 207-217.