

# 基于线粒体细胞色素氧化酶 I 亚基(COI)基因的两种枝吻纽虫系统发育关系分析\*

## Molecular Phylogeny of Two Nemertean with a Branched Proboscis based on the Sequences of Mitochondrial COI Gene

吴斌, 阎冰, 周浩郎

WU Bin, YAN Bing, ZHOU Hao-lang

(广西科学院广西红树林研究中心, 广西红树林保护与利用重点实验室, 广西北海 536000)

(Guangxi Mangrove Research Center of Guangxi Academy of Sciences, Key Lab of Guangxi Mangrove Conservation and Utilization, Beihai, Guangxi, 536000, China)

**摘要:**为了探讨纽虫之间的遗传差异及亲缘关系,对取自北海和湛江的中华枝吻纽虫(*Dendrorhynchus sinensis*)26个样本和湛江枝吻纽虫(*Dendrorhynchus zhanjiangensis*)3个样本的线粒体细胞色素氧化酶 I 亚基(COI)基因部分片段进行序列测定,并结合从 GenBank 下载的其他纽虫序列,分析它们之间的系统发育关系。结果显示,中华枝吻纽虫 26 个个体共检测 17 个单倍型,湛江枝吻纽虫 3 个个体共检测到 2 个单倍型,其长度均为 615bp;枝吻纽虫个体核苷酸序列 A、T、G、C 的含量相近,碱基组成均表现出 A+T 含量偏倚,即 A+T 含量明显高于 G+C 含量。中华枝吻纽虫的 17 个单倍型以及湛江枝吻纽虫的 2 个单倍型之间的遗传距离分别为 0.002~0.013 和 0.008;而两种枝吻纽虫 COI 基因序列的遗传差异很大,彼此之间的遗传距离都在 0.194 以上,加之分子系统树(NJ)的拓扑结构也显示,作为同属的两种枝吻纽虫没有聚成 1 支,而是各自成支,这些表像都支持两种枝吻纽虫分别为独立有效物种的观点。中华枝吻纽虫的 17 个单倍型聚为 1 支后,与 *Cerebratulus marginatus*, *C. lacteus* 聚为 1 大支,而湛江枝吻纽虫的 2 个单倍型聚为 1 支后,与 *Lineus ruber* 和 *L. longissimus* 聚为 1 大支,表明枝吻纽虫属(*Dendrorhynchus*)并非单系。

**关键词:**中华枝吻纽虫 湛江枝吻纽虫 线粒体 DNA COI 基因 系统发生

中图分类号:Q179, Q953 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2013)03-0215-04

**Abstract:** The sequences of mitochondrial COI gene of two nemertean with a branched proboscis (*Dendrorhynchus zhanjiangensis* and *D. sinensis*) from the coast of Beihai and Zhanjiang were determined and subjected to phylogenetic analysis with other nemertean obtained from the GenBank. The lengths of sequences of *D. sinensis* (seventeen haplotypes from twenty six individuals) and *D. zhanjiangensis* (two haplotypes from three individuals) were all 615bp. The A, T, G and C contents of them were similar, and the AT content was higher than the GC content. The genetic distances among the seventeen haplotypes of *D. sinensis* and the two haplotypes of *D. zhanjiangensis* were very small (0.002~0.013 and 0.008) whereas the genetic distances between the two nemertean were very large (in more than 0.194), implying that they were independent effective species respectively. Topological structure of the molecular phylogenetic tree constructed by Neighbor-Joining method showed that *D. sinensis* and *D.*

*zhanjiangensis* did not form a clade, but on the contrary, *D. sinensis* and two species of *Cerebratulus marginatus* and *C. lacteus* were clustered into a distinct clade. Therefore, the results indicated that the genus of *Dendrorhynchus* was not monophyletic.

**Key words:** *Dendrorhynchus sinensis*, *D. zhanjiangensis*, mitochondrial DNA, COI gene, phylogeny

收稿日期:2013-02-20

修回日期:2013-04-10

作者简介:吴斌(1965-),男,研究员,博士,主要从事海洋生物分子与生理生态研究。

\*广西自然科学基金项目(桂科自 0832071);广西科学院基本科研业务费项目(09YJ17HS03);广西海洋生物技术重点实验室开放基金项目(GLMBT-08)资助。

枝吻纽虫隶属于异纽目(Heteronemertea)纵沟纽虫科(Lineidae),共有8种,除欧洲和南极洲以外的沿海海岸都已有发现<sup>[1,2]</sup>。迄今为止,我国报道了4种枝吻纽虫,分别是分布于广东湛江的湛江枝吻纽虫(*Dendrorhynchus zhanjiangensis*)、中华枝吻纽虫(*Dendrorhynchus sinensis*)、疣多枝吻纽虫(*Polydendrorhynchus papillaris*)<sup>[3~5]</sup>和浙江奉化的浙江枝吻纽虫(*Dendrorhynchus zhejiangensis*)<sup>[2]</sup>。文献[1]对枝吻纽的形态、生态及组织学研究后,认为前3种枝吻纽虫为同一物种,即湛江枝吻纽虫。但是从科学的角度来看此观点还需进一步验证。

动物线粒体DNA因具有分子量小、母系遗传、比核DNA进化速率快等特征而广泛应用于进化生物学研究,其中的细胞色素氧化酶I亚基(COI)基因则因其变异性较大,而多用于种间区分及分子系统学研究<sup>[6,7]</sup>。针对纽虫分子系统基于COI基因的研究已有一些报道<sup>[8~13]</sup>,但是关于中国的枝吻纽虫仅见王孟前等对浙江枝吻纽虫的18S rDNA序列进行的研究<sup>[14]</sup>。本研究选用线粒体COI基因作为分子标记,对产于中国的湛江枝吻纽虫和中华枝吻纽虫进行序列测定和分析;再结合从GenBank下载的有关纽虫的基因序列,对其进行分子系统关系分析,探讨纽虫之间的遗传差异及亲缘关系,以期对纽虫的种质鉴定提供分子遗传学资料,为进一步研究纽虫的分子系统提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

两种枝吻纽虫采集于广东湛江和广西北海沿海潮间带泥滩,标本带回实验室后,所有个体均分别切出一部分冷冻保存备用,其余部分用Bouin液固定。固定的标本经组织切片和形态鉴定确定种类<sup>[3~5]</sup>,中华枝吻纽虫样本量26,湛江枝吻纽虫样本量3,其它信息见表1。

### 1.2 DNA提取

取3种纽虫的肌肉约30mg,采用E. Z. N. A.™ SQ Tissue DNA Kit(Omega Bio-tek, Inc.)从肌肉组织中提取基因组DNA。将DNA放入-20℃冰箱保存备用。

### 1.3 PCR扩增

以COI1490: 5'-GGTCAACAAATCATA-AAGATATTGG-3'和COIH2198: 5'-TAAACT-

TCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'为引物对COI基因部分片段进行PCR扩增<sup>[15]</sup>。扩增时的反应体积为25μl,反应液中含2.5μl 10×PCR buffer,2.0μl MgCl<sub>2</sub>(15mM),2.0μl dNTPs(2.5mM),1.0μl 模板DNA,引物各0.5μl(10μM),0.2μl Taq酶(5U/μl),无菌去离子水补足到25μl。PCR循环参数为:95℃预变性5min后,94℃变性40s,50℃退火50s,72℃延伸1min,循环35次,72℃延伸8min,4℃保存。

### 1.4 序列测定

用含有溴化乙锭的1.0%琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物,并用凝胶成像系统观察照相。用1.0%琼脂糖凝胶,TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit(宝生物工程(中国)有限公司)回收和纯化扩增效果良好的样品,纯化产物送至英潍捷基贸易有限公司广州实验室进行正反链双向测序。

### 1.5 数据分析

首先核对测序胶图的正反向序列,然后由DNASTAR软件对其进行编辑、校对和比对,并分析排序结果,所有序列均为两端去引物后的序列。用MEGA4.0软件统计序列的碱基含量,基于Kimura双参数法计算种间种内的遗传距离,并进行相关的系统发生和分子进化分析。

## 2 结果与分析

不包括引物,在中华枝吻纽虫的26个个体中共检测到17个单倍型(COI基因片段长度均为615bp),其中北海3个个体和湛江3个个体共享1个主体单倍型(记为HapA1),另外有北海的2个个体与湛江的2个个体共享另一个单倍型(记为HapA2),其他15个单倍型中,其中北海的2个个体共享1个单倍型(记为HapA3),此外北海和湛江还各有13个和1个单倍型(记为HapA4~HapA17);26个个体核苷酸序列中A、T、G、C的含量相近,其平均值分别为14.0%、42.4%、29.3%、14.3%。湛江枝吻纽虫的3个个体中共检测到2个单倍型(COI基因片段长度也均为615bp),其中2个个体共享1个单倍型(记为HapB1),另一个个体独享1个单倍型(记为HapB2);3个个体的核苷酸序列A、T、G、C的含量相近,其平均值分别为16.8%、41.2%、28.6%、13.4%。碱基含量均表现出A+T含量明显高于G+C含量。上述单倍型序列的GenBank登录号见表1。

表 1 测序用纽虫取样信息

Table 1 Sampling data of *P. papillaris*, *D. sinensis* and *D. zhanjiangensis* used in sequence analysis mitochondrial COI gene

种类 Species	样本量(只) Sample size	采集地点(经纬度) Localities (latitude and longitude coordinates)	采样时间 Date of collection	单倍型 Haplotype	GenBank 登录号 GenBank Accession Number
中华枝吻纽虫 <i>Dendrorhynchus sinensis</i>	6	湛江 Zhanjiang (21° 15' 14. 42" N, 110° 25' 42. 73" E)	2009-08	A1-A17	KC602686~ KC602702
	20	北海 Beihai (21° 29' 51. 43" N, 119° 08' 13. 66" E)	2009-08		
湛江枝吻纽虫 <i>Dendrorhynchus zhanjiangensis</i>	3	湛江 Zhanjiang (21° 15' 14. 42" N, 110° 25' 42. 73" E)	2009-08	B1-B2	KC602703~ KC602704

序列比对显示,在中华枝吻纽虫的 17 个单倍型中,无碱基的插入、缺失,序列间共有 21 个变异位点,其中简约信息位点 6 个,各单倍型之间的遗传距离为 0.002~0.013;在湛江枝吻纽虫种的 2 个单倍型中,亦无碱基的插入、缺失,序列间有 5 个变异位点,无简约信息位点,2 个单倍型之间的遗传距离为 0.008。

从图 1 可以看出,两种枝吻纽虫的 19 个单倍型比对获得的 615bp 的序列中,无碱基的插入、缺失,序列间共有 120 个变异位点,其中简约信息位点 107 个;中华枝吻纽虫与湛江枝吻纽虫所有单倍型之间的遗传距离为 0.194~0.207。

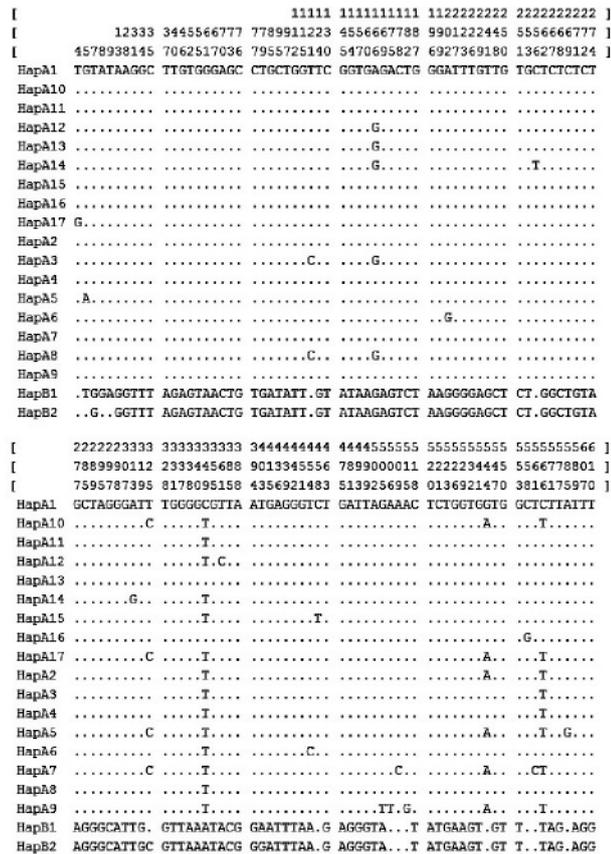


图 1 枝吻纽虫 COI 基因片段变异位点

Fig. 1 The variation sites of COI gene fragment of

*D. sinensis* and *D. zhanjiangensis*

把两种枝吻纽虫的 19 种单倍型与已报道的 4 种纽虫(种名及 GenBank 序列号见图 2)序列比对,获得了 530bp 的同源序列(无插入缺失),共有变异位点 178 个,其中简约信息位点 127 个。将上述 23 条序列用 NJ 法构建系统发生树(图 2)。图 2 是以序列数据集 1000 次重复抽样检验的自引导值表示系统树各个节点的支持率,仅显示各分支上得到的大于 50% 的支持率。

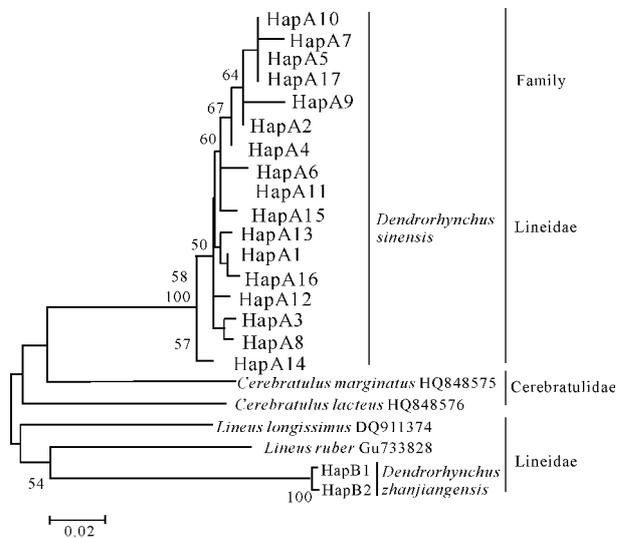


图 2 两种枝吻纽虫及其它 4 种纽虫的 COI 基因分子系统树

Fig. 2 Neighbor-joining molecular phylogenetic tree of COI gene of *D. sinensis*, *D. zhanjiangensis* and other four Nematineans

从图 2 可以看出,中华枝吻纽虫的 17 个单倍型聚为一支后,与 *Cerebratulus marginatus* 再聚为一支。而湛江枝吻纽虫 2 个单倍型聚为一支后,与 *Lineus ruber* 聚为一支。结果表明,枝吻纽虫属并非单系,支持这两种纽虫分别为独立有效物种。

### 3 讨论

Sun 通过对湛江枝吻纽虫、中华枝吻纽虫、疣多枝吻纽虫的形态、生态及组织学的比较研究,倾向于 3 种枝吻纽虫为同一物种的观点,即湛江枝吻纽

虫<sup>[1]</sup>。但是,本研究发现两种枝吻纽虫 COI 基因序列的遗传差异特别大,它们彼此之间的遗传距离都在 0.194 以上,远远高于 Chen 等人<sup>[12]</sup>报道的不同种类纽虫 COI 基因序列彼此之间的遗传距离的下限为 0.043。图 2 的拓扑结构也显示,中华枝吻纽虫(17 个单倍型聚为 1 支)和湛江枝吻纽虫(2 个单倍型聚为 1 支)没有聚成 1 支,而是各自成支;此外,湛江枝吻纽虫和中华枝吻纽虫的种内差异很小,前者的种内遗传距离仅为 0.008,后者则为 0.002~0.013,远低于 0.043 的下限。因此,分子数据支持两种枝吻纽虫分别为独立物种,原分类地位有效。

但是,由于中华枝吻纽虫的 17 个单倍型聚为 1 支后,没有与湛江枝吻纽虫聚为 1 支,而是与两种脑纽虫(*Cerebratulus marginatus*, *C. lacteus*)聚为 1 支(图 2)。18S rDNA 序列的研究也表明浙江枝吻纽虫与 *C. lacteus* 的亲缘关系最近,二者构成同一分支<sup>[14]</sup>。同样的,图 2 还显示,湛江枝吻纽虫的两个单倍型聚为 1 支后,与 *Lineus ruber* 和 *L. longissimus* 聚为 1 大支。此种分子系统关系表明枝吻纽虫属(*Dendrorhynchus*)并非单系。

在纽虫形态分类中, *C. marginatus*, *C. lacteus* 隶属于脑纽科(Cerebratulidae),而枝吻纽虫则属于纵沟纽虫科(Lineidae),但是基于 COI 基因序列的分子数据(图 2)提示,它们在科属划分上存在与形态分类结果的不一致。因此,还需要对更多纽虫种类以及更多基因的深入研究后才能进一步确定枝吻纽虫及其他纽虫的科属划分以及它们之间的系统发育关系。

#### 4 结论

经过对中华枝吻纽虫和湛江枝吻纽虫的 COI 基因部分序列的测定。结果表明,两种枝吻纽虫 COI 基因序列的遗传差异很大,彼此之间的遗传距离都在 0.194 以上。分子系统树的拓扑结构也显示,中华枝吻纽虫和湛江枝吻纽虫分别为独立有效的物种。从结果还可以看出,中华枝吻纽虫更倾向于划入脑纽科。这说明有关枝吻纽虫和其他纽虫科属的划分,还有待于对更多种类和更多基因的深入研究。

#### 参考文献:

[1] Sun S C. On nemerteans with a branched proboscis from Zhanjiang, China[J]. Journal of Natural History, 2006, 40(15-16):943-965.  
 [2] 吕慈仙,李太武,江锦坡,等. 浙江沿海最新发现一种枝

吻类纽虫[J]. 水产科学, 2008, 27(12):652-654.  
 [3] 尹左芬,曾葵. 纵沟纽虫科(Lineidae)、枝吻纽虫属(*Dendrorhynchus*)的一新种——湛江枝吻纽虫(*D. zhanjiangensis*)的研究[J]. 海洋通报, 1984, 3(6):51-58.  
 [4] 尹左芬,曾葵. 异纽类纵沟纽虫科一新属新种——中华枝吻纽虫[J]. 海洋与湖沼, 1985, 16(4):323-335.  
 [5] 尹左芬,曾葵. 纵沟纽虫科(Lineidae)具分枝吻纽虫的一新属新种——疣多枝吻纽虫(*Polydendrorhynchus papillaris*) [J]. 山东海洋学院学报, 1986, 16(4):1-9.  
 [6] 吕国庆,李思发. 鱼类线粒体 DNA 多态研究和应用进展[J]. 中国水产科学, 1998, 5(3):94-103.  
 [7] 徐敬明. 蟹类线粒体 DNA 的研究与应用[J]. 中国海洋大学学报:自然科学版, 2006, 36(6):879-884.  
 [8] Thollesson M, Norenburg J L. Ribbon worm relationships: a phylogeny of the phylum Nemertea [J]. Proc Biol Sci, 2003, 270:407-415.  
 [9] 陈海霞. 细首科纽虫分子系统发育及三种纽虫线粒体基因组的研究[D]. 青岛:中国海洋大学, 2009.  
 [10] Thornhill D J, Mahon A R, Norenburg J L, et al. Open-ocean barriers to dispersal: a test case with the Antarctic Polar Front and the ribbon worm *Parborlasia corrugatus* (Nemertea: Lineidae) [J]. Mol Ecol, 2008, 17(23):5104-5117.  
 [11] Kajihara H, Olympia M, Kobayashi N, et al. Systematics and phylogeny of the hoplonemertean genus *Diplomma* (Nemertea) based on molecular and morphological evidence[J]. Zool J Linn Soc, 2011, 161:695-722.  
 [12] Chen H X, Strand M, Norenburg J L, et al. Statistical parsimony networks and species assemblages in cephalotrichid nemerteans (Nemertea) [J]. PLoS ONE, 2010, 5(9):e12885.  
 [13] Andrade S C S, Strand M, Schwartz M, et al. Disentangling ribbon worm relationships: multi-locus analysis supports traditional classification of the phylum Nemertea[J]. Cladistics, 2012, 28(2):141-159.  
 [14] 王孟前,李太武,江锦坡,等. 浙江沿海一新纽虫的 18S rDNA 序列研究[J]. 科技通报, 2010, 26(1):67-71.  
 [15] Folmer O, Black M, Hoeh W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates[J]. Mol Mar Biol Biotechnol, 1994, 3:294-299.

(责任编辑:尹 闯)