

学校编码: 10384

密级_____

学号: 22320120153455

厦门大学

博士学位论文

中国沿岸背尖贝属帽贝分类、分布及其对温度耐受性比较研究

Taxonomy, distribution and comparative study of thermal tolerance in *Nipponacmea* limpets along China coast

于姗姗

指导教师姓名: Gray Williams 教授

专业名称: 海洋生物学

论文提交日期: 2015 年 4 月

论文答辩日期: 2015 年 5 月

2015 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版)，允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

()1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

()2.不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人(签名)：

年 月 日

目 录

摘要.....	1
ABSTRACT.....	3
缩略语表中英文对照表	6
第一章 绪论.....	7
1.1 DNA 条形码研究进展.....	7
1.1.1 DNA 条形码简介	7
1.1.2 常用 DNA 条形码.....	7
1.1.3 DNA 条形码功能	10
1.1.4 软体动物 DNA 条形码研究进展.....	11
1.2 气候变化背景下海洋生物的地理分布及生理适应.....	13
1.2.1 生物地理分布与环境变化.....	13
1.2.2 生理适应与生物分布.....	15
1.3 本文中涉及与生物适合度相关的指标.....	18
1.3.1 生理指标.....	18
1.3.2 分子指标.....	19
1.4 研究目标物种.....	21
1.5 研究目标.....	22
1.6 研究内容.....	22
第二章 中国沿岸背尖贝属帽贝分类、系统发育及系统地理学研究	24
2.1 前言.....	24
2.2 材料方法.....	24

2.2.1 样品采集.....	24
2.2.2 仪器、试剂与溶液配制.....	24
2.2.3 样品鉴定.....	25
2.2.4 DNA 提取.....	25
2.2.5 COI、28S rDNA 及组蛋白 3 (H3) 扩增测序.....	26
2.2.6 PCR 产物检测及测序.....	27
2.2.7 系统发育分析.....	28
2.2.8 种群遗传分析.....	28
2.3 实验结果.....	29
2.3.1 背尖贝属帽贝的物种鉴定.....	29
2.3.2 背尖贝属帽贝的系统发育研究.....	29
2.3.3 背尖贝属帽贝的系统地理学研究.....	33
2.4 讨论.....	37
2.4.1 DNA 条形码及系统发育分析.....	37
2.4.2 中国背尖贝分布的“屏障”.....	38
2.4.3 背尖贝系统地理学分析.....	39
第三章 物种间温度耐受能力对背尖贝属帽贝分布的影响.....	41
3.1 前言.....	41
3.2 材料方法.....	42
3.2.1 样品采集.....	42
3.2.2 实验设计.....	42
3.2.3 心率测定.....	43
3.2.4 仪器、试剂与溶液配制.....	43
3.2.5 背尖贝总 RNA 的提取与 cDNA 第一链的合成.....	43

3.2.6 背尖贝内参基因及目的基因克隆.....	45
3.2.7 背尖贝 <i>hsp70</i> 、 <i>hsp90</i> 基因的表达量检测	47
3.2.8 背尖贝 HSP70 蛋白表达量检测	49
3.2.9 统计分析.....	50
3.3 实验结果.....	50
3.3.1 半致死温度和 ABT.....	50
3.3.2 <i>hsp</i> 基因表达.....	51
3.3.3 HSP70 蛋白表达	53
3.4 讨论.....	54
3.4.1 温度对中国沿岸背尖贝分布的影响.....	54
3.4.2 背尖贝 LT_{50} 与 ABT 温度差值.....	55
3.4.3 背尖贝热休克蛋白不同表达模式.....	55
3.4.4 背尖贝热耐受能力和栖息地环境温度.....	55
第四章 背尖贝属帽贝细胞质苹果酸脱氢酶的温度适应：蛋白质热敏感性和潮间带生物分布	58
4.1 前言.....	58
4.2 材料方法.....	58
4.2.1 样品采集.....	58
4.2.2 仪器、试剂与溶液配制.....	58
4.2.3 酶液提取.....	59
4.2.4 背尖贝 cMDH 酶促动力学测定	59
4.2.5 背尖贝 cMDH 热稳定性测定	59
4.2.6 背尖贝 cMDH 序列测定	60
4.2.7 背尖贝 cMDH 模型构建	60

4.2.8 统计分析.....	60
4.3 实验结果.....	60
4.3.1 酶促动力学.....	60
4.3.2 酶热稳定性.....	61
4.3.3 cMDH 氨基酸序列和系统发育分析	62
4.3.4 cMDH 分子模型	63
4.4 讨论.....	69
4.4.1 背尖贝 cMDH 酶促动力学及热稳定性差异比较	69
4.4.2 背尖贝 cMDH 酶促动力学、稳定性与生理适应	70
4.4.3 背尖贝 cMDH 酶促动力学和稳定性的内在机制	71
第五章 背尖贝属帽贝间能量代谢相关分子标记表达模式对耐热性的影响.....	73
5.1 前言.....	73
5.2 材料方法.....	73
5.2.1 样品采集.....	73
5.2.2 实验设计.....	73
5.2.3 心率测定.....	75
5.2.4 仪器、试剂与溶液配制.....	75
5.2.5 背尖贝总 RNA 的提取与 cDNA 第一链的合成.....	75
5.2.6 背尖贝目的基因克隆.....	76
5.2.7 背尖贝 <i>hsp70</i> 、 <i>mdh</i> 、 <i>pk</i> 基因的表达量检测	76
5.2.8 苹果酸脱氢酶活力测定.....	76
5.2.9 统计分析.....	78
5.3 实验结果.....	78

5.3.1 背尖贝心率测定结果.....	78
5.3.2 背尖贝 <i>hsp70</i> 基因表达.....	81
5.3.3 背尖贝 <i>mdh, pk</i> 基因表达.....	81
5.3.4 背尖贝苹果酸脱氢酶活力.....	85
5.4 讨论.....	85
5.4.1 心脏功能与热耐受能力.....	85
5.4.2 能量代谢相关指标与热耐受性.....	86
5.4.3 代谢抑制与热耐受能力.....	87
第六章 结语.....	89
6.1 主要研究成果.....	89
6.2 主要创新点.....	91
6.3 不足之处.....	91
6.4 研究展望.....	91
在学期间参加的科研项目及成果.....	92
参考文献.....	93
附 录.....	116
附录 1: 本文所用到的主要仪器.....	116
附录 2: 本文所用到的主要试剂.....	117
附录 3: 主要溶液配制.....	119
致谢.....	122

Content	
Abstract in Chinese	1
Abstract in English	3
Abbreviations	6
Chapter 1 Introduction	7
1.1 Development of DNA barcoding	7
1.1.1 The overview of DNA barcoding.....	7
1.1.2 Frequently-used DNA barcoding.....	7
1.1.3 Function of DNA barcoding.....	10
1.1.4 Development of DNA barcoding in mollusk.....	11
1.2 The geographical distribution and physiological adaptation of marine organisms under the scenario of climate change	13
1.2.1 Biogeographical distribution and environmental change.....	13
1.2.2 Physiological adaptation and biogeographical distribution.....	15
1.3 Biological markers related to fitness	18
1.3.1 Physiological markers	18
1.3.2 Molecular markers	19
1.4 Research target species	21
1.5 Research object	22
1.6 Research content	22
Chapter 2 DNA Barcoding and Phylogeographic analysis of <i>Nipponacmea</i> limpets in China	24
2.1 Introduction	24
2.2 Materials and methods	24
2.2.1 Sample collection.....	24
2.2.2 Reagents and instruments.....	24
2.2.3 Species identification.....	26

2.2.4 DNA extraction.....	26
2.2.5 COI、 28S rDNA and H3 genes amplification and sequencing.....	26
2.2.6 Sequencing of PCR products	27
2.2.7 Phylogenetic analyses.....	28
2.2.8 Population genetic analysis.....	28
2.3 Results.....	29
2.3.1 Identification of <i>Nipponacmea</i> species.....	29
2.3.2 Phylogenetic analyses of <i>Nipponacmea</i> species.....	29
2.3.3 Phylogeographic analysis of <i>Nipponacmea</i> species.....	33
2.4 Discussion.....	37
2.4.1 DNA barcoding and phylogenetic analyses.....	37
2.4.2 Barriers to the distribution of <i>Nipponacmea</i> in China.....	38
2.4.3 Phylogeography of <i>Nipponacmea</i> limpets.....	39
Chapter 3 Effects of thermal tolerance on the distribution of <i>Nipponacmea</i> species.....	41
3.1 Introduction.....	41
3.2 Materials and methods.....	42
3.2.1 Sample collection.....	42
3.2.2 Experimental design.....	42
3.2.3 Heart rate.....	43
3.2.4 Reagents and instruments.....	43
3.2.5 RNA extraction and synthesis of first cDNA strands.....	43
3.2.6 Cloning of reference genes and target genes.....	45
3.2.7 Expression of <i>hsp70</i> and <i>hsp90</i> genes.....	47
3.2.8 Expression of HSP	49
3.2.9 Statistic analysis.....	50
3.3 Results.....	50
3.3.1 Lethal temperature and Arrhenius break temperature.....	51
3.3.2 Genes encoding heat shock proteins.....	51

3.3.3 HSP70 expression.....	53
3.4 Discussion.....	54
3.4.1 Effect of temperature on the biogeography of <i>Nipponacmea</i> limpets in China.....	54
3.4.2 Temperature difference between LT ₅₀ and ABT.....	55
3.4.3 Different expression patterns of heat shock protein.....	55
3.4.4 Thermal tolerance and habitat temperature.....	55
Chapter 4 Temperature adaptation of cytosolic malate dehydrogenases for <i>Nipponacmea</i> limpets: thermal sensitivity of protein correlates with the biogeographic distribution.....	58
4.1 Introduction.....	58
4.2 Materials and methods.....	58
4.2.1 Sample collection.....	58
4.2.2 Reagents and instruments.....	58
4.2.3 MDH extraction.....	59
4.2.4 Determination of cMDH enzymatic kinetics.....	59
4.2.5 Determination of cMDH thermal stability.....	59
4.2.6 Sequencing of <i>cmdh</i>	60
4.2.7 Construction of three-dimensional model of cMDH.....	60
4.2.8 Statistic analysis.....	60
4.3 Results.....	60
4.3.1 Enzymatic kinetics of cMDH.....	60
4.3.2 Thermal stability of cMDH.....	61
4.3.3 Amino acid sequences and phylogenetic analyses of cMDH.....	62
4.3.4 Three-dimensional model of cMDH.....	63
4.4 Discussion.....	69
4.4.1 Comparison of enzymatic kinetics and thermal stability of cMDH of <i>Nipponacmea</i> limpets.....	69
4.4.2 Relationship between enzymatic kinetics, thermal stability of cMDH and	

physiological adaptability of <i>Nipponacmea</i> limpets.....	70
4.4.3 The intrinsic mechanism of enzymatic dynamics and thermal stability of <i>Nipponacmea</i> limpets.....	71
Chapter 5 Primary study on the difference of thermal tolerance between <i>Nipponacmea</i> species: effects of energy metabolism factor expression pattern on thermal tolerance.....	73
5.1 Introduction.....	73
5.2 Materials and methods.....	73
5.2.1 Sample collection.....	73
5.2.2 Experimental design.....	73
5.2.3 Heart rate.....	75
5.2.4 Reagents and instruments.....	75
5.2.5 RNA extraction and synthesis of first cDNA strands.....	75
5.2.6 Cloning of target genes.....	76
5.2.7 Expression of <i>hsp70</i> , <i>mdh</i> and <i>pk</i> genes.....	76
5.2.8 Determination of MDH activity.....	76
5.2.9 Statistic analysis.....	78
5.3 Results.....	78
5.3.1 Heart rate.....	78
5.3.2 Expression of <i>hsp70</i>	81
5.3.3 Expression of metabolic markers.....	81
5.3.4 Activity of MDH.....	85
5.4 Discussion.....	85
5.4.1 Cardiac performance and heat tolerance.....	85
5.4.2 Metabolic markers and heat tolerance.....	86
5.4.3 Metabolic depression and heat tolerance.....	87
Chapter 6 Conclusion and Prospect... ..	89
6.1 Research finding.....	89

6.2 Contributions	91
6.3 Disadvantage	91
6.4 Perspective	91
Research projects involved and achievements obtained in the period of doctoral degree study	92
Reference	93
Appendix	116
Appendix 1 Instruments used in this research	116
Appendix 2 Reagents used in this research	117
Appendix 3 Preparations of solutions	119
Acknowledges	122

摘要

作为生物圈最脆弱的系统之一，潮间带生态系统是研究全球变化对群落动态影响的理想系统。全球变化带来的环境变化如温度升高、海水酸化和海平面升高等可影响生物行为、生理以及进化适应，从而改变潮间带生物的种群动态和群落结构。而面对环境变化，物种间由于适应能力的差异，会出现“胜利者”和“失败者”。背尖贝（Genus *Nipponacmea*）是常见潮间带生物，广泛分布于我国沿海中-高潮间带岩石上。本研究利用 DNA 条形码研究中国沿岸背尖贝的分类、系统发育以及地理分布格局，并测定不同温度下背尖贝属间生理和分子适应的差异，了解生物适应环境条件的生理机理，阐明环境决定潮间带生物分布的内在机制。主要研究结果如下：

1) 为了研究背尖贝属帽贝在中国沿岸的分布，我们依据线粒体基因 COI 及核基因 28S rDNA 和 Histone 3 基因三个分子标记对来自中国沿岸 14 个采样点共计 274 个背尖贝样品进行了分类研究，共发现了背尖贝属的三个种：*Nipponacmea radula*, *N. fuscoviridis* 及 *N. nigrans*。研究发现种内遗传差异远远小于种间差异，这表明基于线粒体基因 COI 及核基因 28S rDNA 和 Histone 3 基因的 DNA 条形码技术在背尖贝属的鉴定中具有可行性。

2) 基于 COI 基因对三个物种进行了系统地理学研究。结果显示 *N. radula* 和另外两个物种 *N. fuscoviridis* 及 *N. nigrans* 分布在长江两侧并存在着明显的生物地理隔离。南方种 *N. fuscoviridis* 单倍型组成呈星状并具有一个有绝对优势的主单倍型；而北方种 *N. radula* 具有 5 个主单倍型。依据 F_{st} 分析相邻的种群之间没有显著差异。此外，相邻的种群间具有相似的单倍型组成。中国沿岸背尖贝属帽贝的这种生物地理分布可能是由于长江口区域性的水文环境、三角洲地区大范围的泥滩以及南北方水温差异造成的。

3) 为了探讨温度对背尖贝分布的影响，我们比较了具有不同地理分布的 *N. fuscoviridis* 及 *N. radula* 的热耐受能力。*N. fuscoviridis* 和 *N. radula* 的心率 ABT 温度分别为 36.84 ± 1.04 °C 和 36.74 ± 1.27 °C。*N. fuscoviridis* 的 LT_{50} 为 44.19 ± 0.34 °C，高于 *N. radula* 的 42.44 ± 0.17 °C。两个物种的 HSP 蛋白及 *hsp* 基因的表

达模式也有显著差异：在 *N. fuscoviridis* 中，当温度达到 42 °C 时，HSP70 蛋白表达量达到最大值，而在 *N. radula* 中 HSP70 蛋白表达量在 40 °C 达到最大值。此外，*N. fuscoviridis* 中 *hsp70* 及 *hsp90* 基因的诱导表达温度也高于 *N. radula*。这些结果表明温度是影响中国沿岸背尖贝分布的一个重要的因素。根据 *N. fuscoviridis* 及 *N. radula* 栖息地的原位温度数据，我们发现 *N. fuscoviridis* 的栖息地厦门夏季最大环境温度约为 44 °C，这一温度超过了其 ABT 温度，并接近 LT₅₀。然而 *N. radula* 栖息地青岛中潮间带最大环境温度约为 38 °C，稍高于 ABT 温度，低于 LT₅₀。因此在南方分布的 *N. fuscoviridis* 更容易受到气候变暖的威胁。

4) 研究了具有不同地理分布的 *N. fuscoviridis* 和 *N. radula* 细胞质苹果酸脱氢酶对温度适应的差异。结果显示，北方种 *N. radula* cMDH 米氏常数 (K_m^{NADH}) 相比南方种 *N. fuscoviridis* 对温度的升高更加敏感。在热处理过程中 *N. fuscoviridis* cMDH 的热稳定性显著高于 *N. radula*。为了分析影响这两种帽贝 cMDH 酶促动力学和热稳定性差异的内在机制，克隆并测序了两种帽贝的 *cmdh* 基因全长，根据猪 cMDH 三维模型构建了两种帽贝的 cMDH 三维模型，并对氨基酸差异位点的氢键形成进行了分析。结果显示，在辅因子结合区域以及在酶促反应中具有限速作用的区域氨基酸的替换使 *N. fuscoviridis* 相比 *N. radula* 可以形成更稳定的氢键，这可能是酶功能和结构对温度的适应，也是造成二者对温度适应差异的一个内在原因。

5) 为了研究具有不同耐热能力的背尖贝 *N. fuscoviridis* 及 *N. radula* 应对高温机制的差异，测定了在不同温度下背尖贝在变温模式下心脏功能、热应激指标热休克蛋白 70 (HSP70) 以及能量代谢相关指标苹果酸脱氢酶 (MDH) 以及丙酮酸激酶 (PK) 的变化。结果显示当温度由 25 °C 升至 35 °C (接近两物种 ABT 温度) 的过程中 *N. fuscoviridis* 的心率温度系数 (Q_{10}) 显著高于 *N. radula*；而在 35 °C 恒温热激过程中，*N. fuscoviridis* 的心率在一段时间出现缓慢下降并恢复至未热激水平，这可能是一种在胁迫环境下降低代谢以减少能量损失的调控方式。此外 *N. fuscoviridis* 体内苹果酸脱氢酶活性水平显著高于 *N. radula*，高温下能量代谢机制的不同可能是 *N. fuscoviridis* 及 *N. radula* 耐热性存在差异的一个重要原因。

关键词：背尖贝；环境变化；生理适应；温度；潮间带

Abstract

As one of the most fragile ecosystem, intertidal ecosystem is the ideal system to investigate the effects of global change on population dynamics. Environmental changes caused by global change, such as the temperature rises, ocean acidification and sea level rise may affect the biological behavior, physiology and evolutionary adaptation, thereby changing the intertidal community structure and dynamics of biological populations. Facing the environmental change, the differences between the species due to the acclimatization and genetic adaptation will determine ‘winners’ and ‘losers’. *Nipponacmea* limpets are common intertidal species, widely distributed in middle to high intertidal zone along China coast. In the present study, DNA barcoding were used for the study of taxonomy, phylogenetic analysis and phylogeographic analysis. The differences of physiological and molecular adaptation under different temperature were also compared between *Nipponacmea* species to investigate the intrinsic physiological mechanism, and to clarify the mechanism of how the biological environment determined the distribution of intertidal species. The main results are as follows:

1) To identify the *Nipponacmea* limpets along the coast of China, their taxonomy was investigated with three molecular markers (one mitochondrial gene, COI; two nuclear markers, 28S rDNA and H3). Three species (*N. radula*, *N. fuscoviridis* and *N. nigrans*) were found among 274 individuals collected from 14 sites. Intraspecific variation was far less than interspecific variation and obvious barcoding gaps existed. These results indicate that the three *Nipponacmea* species can be efficiently identified by DNA barcoding.

2) The phylogeographic patterns of the three species were also analysed using COI sequences. There was clear biogeographic separation between the northern *N. radula* and the southern two species (*N. fuscoviridis* and *N. nigrans*), with the Yangtze River estuary as a barrier. In the southern *N. fuscoviridis*, there was a star-shaped

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.