

线粒体基因片段在梭子蟹系统发育及物种鉴定中的应用

张 姝^{1,2}, 李喜莲^{1,2}, 崔朝霞², 王鸿霞², 王春琳³, 刘小林¹

(1. 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨陵 712100; 2. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 3. 宁波大学 生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 测定三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*) 9 个个体 *COI* 基因部分序列 467 bp, 7 个个体 *16S rRNA* 基因部分序列 519 bp, 同时测定样品蟹 1 个个体 *COI* 基因部分序列 468 bp。结合 GenBank 中收集的梭子蟹科 *COI*, *16S rRNA* 两个基因所有同源序列信息, 使用 Kimura 双参数模型采用邻接法 (NJ)、最大简约法 (MP) 构建梭子蟹科分子系统发育树; 将样品蟹测得的 *COI* 基因序列和已知蜞属的其他蟹同源序列 (429 bp) 进行比对分析。结果分析表明: 两个基因片段序列平均碱基 AT 数量分数都明显高于 GC 数量分数; 梭子蟹属与美青蟹属关系最近, 蜞属应为区别于梭子蟹属、美青蟹属、青蟹属的另一支, 支持蜞属应划分在短桨蟹亚科的观点; 根据遗传距离以及转换/颠换 (*R*) 值分析, 判定出样品蜞为锐齿蜞。本试验运用线粒体基因片段探讨了梭子蟹类的系统发育关系以及样品蟹的种类鉴定, 为线粒体基因片段在梭子蟹的物种鉴定和系统发育重建中的开发和利用提供重要参考。

关键词: 线粒体基因; 梭子蟹; 系统发育; 分子分类

中图分类号: Q178; Q953

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)04-0009-10

线粒体 DNA (mtDNA) 遗传方式为母性遗传, 与核 DNA 相比, 具有结构简单、一级结构的碱基突变率高、进化速度快等特点, 开发潜力较大。近年来, 陆续报道了 5 种蟹类的线粒体基因组全序列^[1-5]。但线粒体基因组序列全长的测定费时而且花费大, 因此根据不同的物种以及物种亲缘关系的远近选取适合的线粒体基因片段, 构建正确、可信度高的分子系统发育树, 可为有争议、未定义种的鉴别以及从基因的角度阐释生命起源进化等提供科学的工具。随着分子生物学技术的发展以及蟹类研究的推进, 线粒体 DNA 作为一种有效的分子遗传标记, 在蟹类的系统发育重建及分类研究等方面也得到越来越多的应用。

蟹类的分子分类研究运用的线粒体序列主要为 *16S rRNA*, *COI* 等基因片段。*COI* 基因较 *12S rRNA*, *16S rRNA* 等基因变异高, 突变率为 1.4%/Ma^[6], 更适于对亲缘关系较近的物种的研究, 作为分子分类工具 (Barcode) 一般用于区分种间差异^[7-9], 也常联合其他线粒体基因共同分析^[10-13]。马凌波等^[14]利用 *COI* 基因部分序列成功鉴别出采于中国东南沿海的样品为 *Scylla paramamosian*。可见 *COI* 基因在判别蟹类的物种鉴定上有较大的潜力。线粒体 *16S rRNA* 基因在系统发育研究中的适用性较好^[15, 16], 不仅在一些微生物的分子分类鉴定和分子检测中发挥了巨大的作用^[17], 更被广泛用于研究不同阶元的系统发育关系^[18-20]。

梭子蟹隶属节肢动物门, 甲壳纲, 十足目, 属于高等蟹类, 具有真正的蟹类形态, 体形宽大, 额部平拱, 一般呈梭形, 末对步足为桨状, 可以游泳, 为中国重要的经济甲壳类动物。梭子蟹科约 35 个属 300 余种, 我国大约有 60 种。由于种类繁多, 其中一些种类的分类地位并不明确, 如蜞属的争议是其隶属梭子蟹亚科还是短桨蟹亚科。同时, 蜞属种类较多, 近缘种从形态上难以鉴别。作者运用线粒体 *COI*, *16S rRNA* 基因部分序列的信息, 探讨梭子蟹类的系统发育关系, 并运用 *COI* 基因序列对样品蜞的种类进行鉴定, 为梭子蟹的系统发育重建研究及蜞属的物种鉴定等方面提供重要参考。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 样品分别采自辽宁省丹东 (DD)、辽宁省营口 (YK)、山东省莱州 (LZ)、山东省青岛 (QD)、浙江省宁波 (ZJ)。样

收稿日期: 2007-06-06; 修回日期: 2008-01-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (40676085); 国家高技术研究发展计划项目 (2006AA10A406)

作者简介: 张姝 (1982-), 女, 重庆万州人, 硕士研究生, 主要从事水生生物遗传资源与分子系统学研究, E-mail: zhangshu1222@yahoo.com.cn; 崔朝霞, 通讯作者, E-mail: zhxcui@yahoo.com.cn

品蟹(蜆)采自广东省湛江,是当地一种常见的蟹类,采样时先对其形态初步观察,根据其末对步足呈桨状、体形不为典型的梭形、额具 6 齿、前侧缘具 6 齿、具细微颗粒及隆线等特征,确认为蜆属蟹类。样品采集后低温冷冻运输回实验室, - 20 °C 保存。

1.2 提取基因组 DNA

取附肢肌肉大约 50 mg, 采用高盐法^[21], 稍做修改进行基因组提取, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测后备用。

1.3 线粒体基因片段扩增

线粒体 *COI* 基因片段扩增采用通用引物 LCO1490: 5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3'; HCO2198: 5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'。16S *rRNA* 基因片段扩增采用通用引物, 16Sar-L: 5'-CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT-3'; 16Sbr-H: 5'-CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T-3'。PCR 扩增在 Bio-rad MyCycler™ PCR 仪上进行。反应体系为 25 μL, 包括 2.5 μL 10× buffer, 1.5 μL Mg²⁺ (25 mmol/L), 0.5 μL dNTP (10 mmol/L), 0.3 μL 每条引物 (10 μmol/L), 1 U Taq 酶 (上海 Promega), 其余用超纯水补足。PCR 反应程序: 95 °C 预变性 3 min, 然后 30 个循环包括 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s。最后, 72 °C 延伸 7 min。PCR 扩增产物经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 电泳缓冲液为 0.5× TBE (pH 8.0), 电压为 100 V/cm, EB 染色, 凝胶成像系统下观察并拍照记录。

表 1 测定样品的线粒体基因部分序列的各碱基平均数量分数

Tab. 1 The average content of base of partial fragment in the sampled specimen

样品名称	样品数量	A (%)	T (%)	C (%)	G (%)	A + T (%)	C + G (%)
三疣梭子蟹 <i>COI</i> 基因	9	25.7	38.9	19.7	15.7	64.6	35.4
样品蜆 <i>COI</i> 基因	1	25.6	38.1	20.7	15.6	63.6	36.4
三疣梭子蟹 <i>16S rRNA</i> 基因	7	35.1	34.8	12.2	17.9	69.9	30.1

1.4 PCR 产物纯化及测序

PCR 产物用 Biospin Gel Extracion Kit 进行胶回收, 送上海捷瑞生物工程有限公司测序。测序结果经 DNASTar5.01 软件进行人工核对矫正。

1.5 分子系统发育分析以及物种的鉴定

在 GenBank 中收集梭子蟹科 *COI* 基因和 *16S rRNA* 基因的同源序列, 用 Clustal X 和 MEGA 3.1 软件对测定的三疣梭子蟹序列和 GenBank 中其他蟹类的同源片段序列进行编辑、排序, 使用 Kimura 双参数模型采用邻接法 (NJ) 构建分子系统发育树; 采用 Clustal X 软件, 选取样品蟹和 GenBank 中蜆属所有 *COI* 基因同源序列进行比对分析。

2 结果

2.1 线粒体基因片段测定

2.1.1 *COI* 基因片段测定

测得三疣梭子蟹 9 个个体 (DD16, DD22, DD24, YK1, YK17, QD9, QD11, ZJ35, LZ3) *COI* 同源序列 467 bp, 样品蜆 1 个个体 *COI* 序列 468 bp。平均 A, T, C, G 数量分数组成见表 1 (A, T, C, G (%) 分别表示碱基 A, T, C, G 的数量分数), 均表现出明显的偏倚性, A + T 都显著高于 G + C。三疣梭子蟹 *COI* 序列比对分析表明, 碱基间的替代主要以转换为主, 转换/颠换 (R) = 3.172, 序列间不存在插入和缺失的位点, 三个变异位点包括 181 bp (G-T) 和 430 bp (G-A) 位点上各有一处转换, 235 bp (G-A) 位点上碱基的颠换 (图 1(a)), 个体间序列变异为 0.5%。

2.1.2 *16S rRNA* 基因片段测定

测定三疣梭子蟹 7 个个体(DD2, DD4, ZJ1, ZJ9, Yk4, Yk10, Yk27) *16S rRNA* 基因同源序列 519

bp。 *16S rRNA* 基因非常保守, 长为 519 bp 的同源序列中不存在插入和缺失的位点, 只在 224 bp 处有一个 C-T 转换, 个体间序列变异为 0.2% (图 1(b))。

```

1 CTACGCTATAATGGCTATTGGTATTTTAGGATTTATTGTCTGAGCTCACCATATATTAC
61 AGTCGGTATAGACGTCGACACTCGAGCATATTTTACATCTGCTACTATGATTATTGCAGT
121 TCCCCTGGAATTAATAATTTTCAGGTGACTAAGAACTCTTCATGGCACTCAAATTAATTA
181 TAGACCTTCTATGCTGTGAGCTTTAGGATTCATTTTCCTTTTCACCGTAGGAGGCTTAAC
241 AGGAGTTGTTCTTGCAAATTTCTTCTATTGATATTATCCTTCACGATACATATTATGTAGT
301 TGCCCATTTCCACTATGTTTTATCTATGGGAGCAGTCTTTGGCATCTTTGCCGGTATTGC
361 TCATTGATTCCCTTTATTTACAGGGATGTCTCTTAACCCTAAATGAATAAAAAATTCACTT
421 TACAATTATGTTTATTGGTGTTAACTTTACTTTCTTCCCTCAACATT
    
```

(a)

```

1 CCTGCTCACTGATAAAAAATTATTAATAGCCGCGGTATCTTGACCGTGCAAAGGTAGCAT
61 AATCATTAGTTTTTTAATTGAAAACCTGTATGAATGGTTGGACAAAGAAAAAGCTGTCT
121 CTTTCATTAATAATTGAATTTAACTTCTAAGTGAAAAGGCTTAGATATTTTAGAGGGACGA
181 TAAGACCCTATAAAGCTTTATAAATTTAGAAATTTTATATATTTTTTTAATAATGATAATCT
241 TTTGAAAATTTATTGGGTTGGGGCAACAAAAGTATAATTATTAATAACTGCTAGAAAGTA
301 TTACAATTGTTTTTGTGATAAAGAAAATTAGTTGATCCCTGAAAGGGATTAAGATCA
361 AGTTACTTTAGGGATAACAGCGTAATTTATCTGAGAGTCCTTATCAAAGAATAAGTTT
421 GCGACCTCGATGTTGAATTAATAATGTCTTTATAGTGCAGCAGCTATATAAGAAGGTCTG
481 TTCGACCTTTAATTTTTTACGTGATCTGAGTTCAGACCGGA
    
```

(b)

图 1 三疣梭子蟹 *COI* (a) 和 *16S rRNA* (b) 基因部分序列

Fig. 1 The sequences of partial *COI* gene(a) and partial *16S rRNA* gene(b) of *Portunustrituberculatus*

2.2 蟹类系统发育分析

2.2.1 梭子蟹 *COI* 序列分析及分子系统发育树的构建

蟹类 *COI* 序列扩增多采用 Folmer 等^[22] 和 Palumbi 等^[23] 设计的通用引物。两对引物扩增不同的 *COI* 片段, 且无重叠部分。本试验采用 Palumbi 等设计的通用引物, 扩增片段为 *COI* 基因的后半段。在 GenBank 中收集梭子蟹科 *COI* 基因序列, 共计 7 个属 22 个种的数据。其中除去 3 个属 6 个种 *COI* 片段序列为 *COI* 基因序列的前半段外, 与本试验测定 *COI* 序列同源的数据包括 4 个属(梭子蟹属(*Portunus*)、美青蟹属(*Callinectes*)、蜷属(*Charybdis*)、青蟹属(*Scylla*)) 16 个种(表 2) 的数据。比对处理后得到 433 bp 的同源序列, 其中变异位点 163 个, 简约信

息位点 132 个, 单个突变位点 31 个, 序列平均总变异为 17.2%。序列之间没有插入或缺失的位点, 碱基组成及转换/颠换值见表 3。构建的分子系统发育树(图 2) 显示, 青蟹属 4 个种中, 拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*) 和紫螯青蟹(*Scylla tranquebarica*) 先聚在一起, 再和锯缘青蟹(*Scylla serrata*) 相聚, 最后和榄绿青蟹(*Scylla olivacea*) 相聚; 蜷属中近亲蜷(*Charybdis affinis*) 和日本蜷(*Charybdis japonica*), 锐齿蜷(*Charybdis acuta*) 和钝齿蜷(*Charybdis helleri*), 锈斑蜷(*Charybdis feriatius*) 和 *Charybdis jaubertensis* 等亲缘关系较近的聚在一起; 梭子蟹亚科 4 个属分为两大支, 梭子蟹属、美青蟹属、青蟹属聚为一支, 蜷属的 9 个种类聚为另一支。

表 2 用于分析的梭子蟹物种信息

Tab. 2 The data of portunid crab

种名	地理分布	GenBank 登录号
远海梭子蟹(<i>Portunus pelagicus</i> Linnaeus, 1766)	中国广西、广东、福建、浙江、台湾、日本、澳大利亚、泰国、马来群岛、东非等地	AF082732(<i>COI</i>) DQ388052(<i>16S rRNA</i>)
三疣梭子蟹(<i>Portunus trituberculatus</i> Miers, 1876)	中国广西、广东、福建、浙江、山东半岛、渤海湾、辽东半岛, 日本、朝鲜、马来群岛、红海	本试验测定
塞氏梭子蟹(<i>Portunus sayi</i> Gibbes, 1850)	大西洋沿岸, 美国等	DQ388053(<i>16S rRNA</i>)
拟穴青蟹(<i>Scylla paramamosain</i> Stimpador, 1949)	中国浙江、福建、广东、广西、海南、台湾等沿岸水域, 以及东南亚、澳大利亚、日本等海域	AY750937(<i>COI</i>) AY841366(<i>16S rRNA</i>)
紫螯青蟹(<i>Scylla tranquebarica</i> Fabricius, 1798)	中国浙江、福建、广东、广西、海南、台湾等沿岸水域, 以及东南亚、澳大利亚、日本等海域	AY373353(<i>COI</i>) AF109320(<i>16S rRNA</i>)
榄绿青蟹(<i>Scylla olivacea</i> Herbst, 1796)	澳大利亚等	AY373356(<i>COI</i>) AF109321(<i>16S rRNA</i>)
锯缘青蟹(<i>Scylla serrata</i> Forskal, 1775)	中国广东、福建、台湾、浙江沿海以及日本、越南、泰国、菲律宾、印度尼西亚、夏威夷、澳大利亚、新西兰、非洲东南部与红海等	AY97002(<i>COI</i>) AF109318(<i>16S rRNA</i>)
<i>Callinectes affinis</i> Fausto, 1860	南大西洋, 巴西等	QD407677(<i>16S rRNA</i>)
<i>Callinectes similes</i> Williams, 1966	南大西洋和墨西哥湾	U75209 (<i>16S rRNA</i>)
可口美青蟹(<i>Callinectes sapidus</i> Rathbun, 1896)	南大西洋和墨西哥湾	AY682077(<i>COI</i>) AJ298190(<i>16S rRNA</i>)
钝齿蜆(<i>Charybdis hellerii</i> A. Milne Edwards, 1867)	中国广西、广东, 新可里多尼亚、马来群岛、安达曼、巴基斯坦、波斯湾、红海、地中海、东非	AY351872(<i>COI</i>) DQ407666(<i>16S rRNA</i>)
日本蜆(<i>Charybdis japonica</i> A. Milne Edwards, 1861)	中国广东、福建、浙江、台湾、山东半岛、辽东半岛, 日本、马来西亚、红海	AY351869(<i>COI</i>)
锈斑蜆(<i>Charybdis feriatius</i>)	中国广西、广东、福建、台湾, 日本、澳洲、印度、坦桑尼亚、非洲东岸、南非及马达加斯加	AY351877(<i>COI</i>) DQ062727(<i>16S rRNA</i>)
<i>Charybdis jaubertensis</i>	澳大利亚	AY351879(<i>COI</i>)
近亲蜆(<i>Charybdis affinis</i> Dana, 1852)	中国东南沿海、台湾, 日本、印尼、泰国、新加坡、印度	AF082733(<i>COI</i>)
锐齿蜆(<i>Charybdis acuta</i> A. Milne Edwards, 1869)	中国东南沿海、台湾, 日本	AY351869(<i>COI</i>)
武士蜆(<i>Charybdis miles</i> De Haan, 1835)	中国东海和南海及日本、澳大利亚、菲律宾、新加坡、印度等	AY351870(<i>COI</i>)
直额蜆(<i>Charybdis truncata</i> Fabricius, 1798)	印度、西太平洋、中国台湾地区	AY351876(<i>COI</i>)
善泳蜆(<i>Charybdis natator</i> Herbst, 1794)	广泛分布于印度- 西太平洋暖水海域	AY351874(<i>COI</i>)

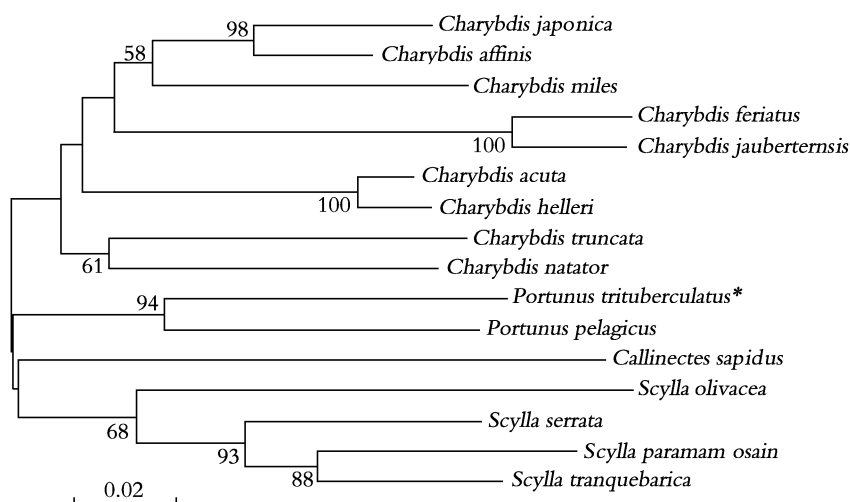


图2 基于 *COI* 基因部分序列而使用 Kimura 双参数模型构建的梭子蟹 NJ 树

Fig. 2 Neighbor Joining tree of portunid crab constructed with Kimura 2-parameter model based on partial *COI* gene sequences

* 表示用于分析的序列为本试验所测定(图3,图4同),图2中节点支持率低于50则不显示

* stand for this experiment detected sequences, the same as Fig. 3 and Fig. 4 bootstrapvalue less than 50 are not displayed in Fig. 2

2.2.2 梭子蟹 *16S rRNA* 序列分析及分子系统发育树的构建

在 GenBank 中收集梭子蟹科 *16S rRNA* 基因序列,共计 10 个属 44 个种的数据,选取梭子蟹属、美青蟹属、蜆属、青蟹属,4 个属共 12 个种基因序列信息。其中蜆属和青蟹属的所有 *16S rRNA* 信息都采用,梭子蟹属、美青蟹属由于数据过多只采用部分代表信息进行分析(表 2)。比对后得到 500 bp 同源序列,其中变异位点 157 个,简约信息位点 108 个,单个突变位点 49 个,序列平均总变异为 13%。序列

之间存在插入或缺失的位点,发现美青蟹属 3 个个体在 355 bp 和 356 bp 处与其他三个属种类同源序列间存在碱基的缺失,碱基组成及转换/颠换值见表 3。使用 *16S rRNA* 同源序列构建的 NJ 分子系统发育树(图 3)显示:梭子蟹亚科 4 个属分为两支,梭子蟹属、美青蟹属聚为一支,蜆属、青蟹属聚为另一支;MP 法构建的系统发育树(图 4)显示:梭子蟹亚科 4 个属中梭子蟹属、美青蟹属、青蟹属先后聚在一起后再和蜆属种类相聚。

表 3 线粒体基因片段同源序列分析结果

Tab.3 Homologous sequences analysis of partial mitochondrial fragment

分析	生物属	N	T(%)	C(%)	A(%)	G(%)	转换/颠换(R)
<i>COI</i> 基因片段同源序列分析	蜆属	9	38.8	18.5	26.7	16	1.604
	梭子蟹属	2	38.3	18.9	26.8	16	2.351
	青蟹属	4	39.3	18	27	15.7	2.764
	美青蟹属	1	35.8	21.2	26.3	16.7	-
<i>16S rRNA</i> 基因片段同源序列分析	蜆属	2	37.0	10.9	33.9	18.2	0.833
	梭子蟹属	3	34.5	12.9	34.6	17.9	2.035
	青蟹属	4	34.7	11.2	35.9	18.2	2.556
	美青蟹属	3	34.1	13.6	33.8	18.5	1.946

注: N 表示分析序列的种类数

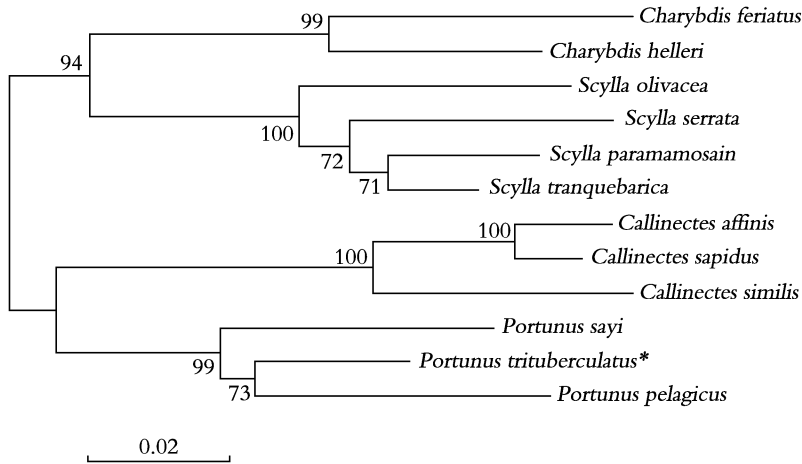


图3 基于 *16S rRNA* 基因部分序列而使用 Kimura 双参数模型构建的梭子蟹 NJ 树

Fig. 3 Neighbor Joining tree of portunid crab constructed with Kimura 2-parameter model based on partial *16S rRNA* gene sequences

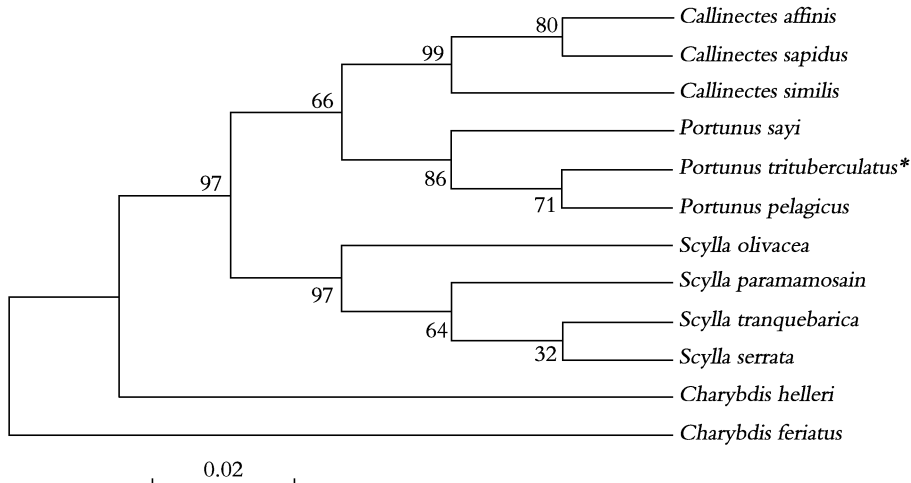


图4 基于 *16S rRNA* 基因部分序列而构建的梭子蟹 MP 树

Fig. 4 Maximum Parsimony tree of portunid crab based on partial *16S rRNA* gene sequences

枝上的数值为 1 000 次重复抽样检验得到的支持率, 树长为 274, 一致性指数为 0.718 9, 保留指数为 0.694 4

Numbers around branches are percentage of bootstrap values by 1 000 replicates. Tree length is 274, CI is 0.718 9, RI is 0.694 4

2.3 样品蜆与蜆属基因同源序列比较

将样品蜆测得的 *COI* 基因序列和已知蜆属 9 个物种(表 2) 共 10 个个体的序列进行比对, 得到 429 bp 同源序列, 利用 MEGA4.0 估算出遗传距离, 结果显示: 9 个物种与样品蜆的遗传距离为 0.014~0.175, 样品蜆与钝齿蜆和锐齿蜆的遗传距离最近, 分别为 0.014 和 0.017, 序列同源性最高, 序列间不存

在插入或缺失的位点。三种蟹类的序列比对结果如图 5, 样品蜆、钝齿蜆和锐齿蜆三种蟹两两之间序列的转换/颠换 (*R*) 值: 样品蜆- 锐齿蜆(2.176), 样品蜆- 钝齿蜆(0.741), 锐齿蜆- 钝齿蜆(1.016), 可以看出样品蜆、锐齿蜆分别和钝齿蜆序列间的 *R* 值(0.741, 1.016) 相近, 判定样品蜆为锐齿蜆。

```

样品蛭 CTATAATGGCTATTGGTATCCTAGGATTTATTGTCTGAGCCCATCATATATTCACAGTTGGATAGACGTGACACCCGAGCATACTTTACATCAGTACTATAAATTATTGCTGTGCCTA 120
钝齿蛭 CTATAATGGCTATTGGTATCCTAGGATTTATTGTCTGAGCCCATCATATATTCACAGTTGGATAGACGTGACACCCGAGCATACTTTACATCAGTACTATAAATTATTGCTGTGCCTA 120
锐齿蛭 CTATAATGGCTATTGGTATTTCTAGGATTTATTGTCTGAGCCCATCATATATTCACAGTTGGATAGACGTGACACCCGAGCATACTTTACATCAGTACTATAAATTATTGCTGTGCCTA 120
*****

样品蛭 CTGGAATTAATAATTTTTAGATGACTTAGAACCCCTTCATGG@ACTCAAATTAACATATAGACCTTCTCTACTATGGGCCCTTGGTTTTATTTTCTTATTCACAGTAGGAGGACTTACTGGAG 240
钝齿蛭 CTGGAATTAATAATTTTTAGATGACTTAGAACCCCTTCATGGTACTCAAATTAACATATAGACCTTCTCTATTTATGGGCCCTTGGTTTTATTTTCTTATTCACAGTAGGAGGACTTACTGGAG 240
锐齿蛭 CTGGAATTAATAATTTTTAGATGACTTAGAACCCCTTCATGGTACTCAAATTAACATATAGACCTTCTCTACTATGGGCCCTTGGTTTTATTTCTTTTCACAGTAGGAGGACTTACTGGAG 240
*****

样品蛭 TAGTTCTGGCAAATTTCTCTATCGATATTATTTCCACGACACATATTATGTTGTAGCCCAATTCATTATGTTCTTCTATAGGAGCTGTATTTCGGAATTTTCGCTGGTATCGCCCAAT 360
钝齿蛭 TAGTTCTGGCAAATTTCTCTATCGATATTATTTCCACGACACATATTATGTTGTAGCCCAATTCATTATGTTCTTCTATAGGAGCTGTATTTCGGAATTTTCGCTGGTATCGCCCAAT 360
锐齿蛭 TAGTTCTAGCAAATTTCTCTATCGATATTATTTCAACGACACATATTATGTTGTAGCCCAATTCATTATGTTCTTCTATAGGAGCTGTATTTCGGAATTTTCGCTGGTATCGCCCAAT 360
*****

样品蛭 GATTCCTTTATTTACTGGGCTTTCATTAACCCCTAAGTGAATGAAAATTCACCTTTACTATCATATTTA 429
钝齿蛭 GATTCCTTTATTTACTGGGCTTTCATTAACCCCTAAGTGAATGAAAATTCACCTTTATAATCATATTTA 429
锐齿蛭 GATTCCTTTATTTACTGGGCTTTCATTAACCCCTAAGTGAATGAAAATTCACCTTTACTATTTATATTTA 429
*****
    
```

图 5 样品蛭和钝齿蛭、锐齿蛭 *COI* 基因同源序列比对结果

Fig. 5 Homologous sequences alignment of partial *COI* gene fragment in sampled crab, *Charybdis hellerii* and *Charybdis acuta*

注: 灰度处表示序列间的差异位点

Note: The nucleotide differences of the sequences were marked with shadow

3 讨论

三疣梭子蟹线粒体 *COI* 基因和 *16S rRNA* 基因同源序列的分析表明, AT 碱基数量分数都明显高于 GC 碱基的数量分数, 这与许多研究者在蟹类的线粒体基因中观察到的结果相似^[7, 24], 高 AT 数量分数是无脊椎动物线粒体 DNA 序列中普遍存在的现象。*COI* 基因在种内的变异较小(0.5%), 这与其他蟹类 *COI* 基因研究结果一致^[14, 25, 26]; *COI* 基因的同源序列三处碱基变化都发生在密码子的第一位, 使编码的氨基酸发生改变, 辽宁省营口群体(YK1, YK17)在 181 bp 位点上的碱基都为 C 而其他种群这个位点都为 T, 此位点的碱基变异可能是区分营口群体与其他种群的特异标记, 但需要更多的数据进行验证。*16S rRNA* 基因较 *COI* 基因更为保守, 个体间序列变异仅为 0.2%, 适用于种以上水平的变异分析。对三疣梭子蟹种群的研究需要选择进化速率更快的线粒体序列如 D-Loop 区信息作为分子遗传标记。

郭天慧等^[25]对三疣梭子蟹线粒体 DNA *16S rRNA* 和 *COI* 基因片段进行初步研究, 利用 GenBank 中的 *16S rRNA* 同源序列构建了梭子蟹科部分属的系统发育树; Mantelatto 等^[27]利用线粒体 *16S rRNA* 基因片段序列对西大西洋分布的梭子蟹属的 14 个种的系统发生关系进行了研究, 也构建了梭子蟹科部分种类的系统发育树。以上研究都没有将蛭属纳入分析, 利用分子手段研究蛭属与梭子

蟹亚科关系尚未见报道。由表 3 可以看出, 蛭属转换/颠换值(*R*)最小, 青蟹属和美青蟹属、梭子蟹属都明显大于蛭属; 梭子蟹属、美青蟹属、青蟹属 A, T, C, G 数量分数相当, 蛭属 A, T 碱基数量分数较前面三属高。基于线粒体 *COI* 基因和 *16S rRNA* 基因部分片段序列分析比较表明, 蛭属与梭子蟹属、美青蟹属、青蟹属在序列碱基数量分数和 *R* 值上具有一定的差异, 蛭属种类序列碱基组成和排列机制有所不同。

本研究中构建的分子系统发育树显示, 青蟹属 4 个种, *S. paramamosain* 和 *S. tranquebarica* 先聚在一起, 再和 *S. serrata* 相聚, 最后和 *S. olivacea* 相聚, 与马凌波等^[14]对青蟹属的研究结果相同; 蛭属种类间亲缘关系与 Smith 等^[28]研究结果基本一致; 梭子蟹亚科 4 个属分为两大支, 梭子蟹属、美青蟹属、青蟹属聚为一支, 蛭属的 9 个种类聚为另一支。传统分类学主要是依据体形以及头胸甲、口器、前侧齿的数目等来区分蟹类。戴爱云^[29]在《中国海洋蟹类》一书中以前侧齿是否多于 7 个作为标准, 将青蟹属、梭子蟹属和蛭属区分开来。梭子蟹属和青蟹属聚为一支再和蛭属聚到一起, 符合传统分类学从前侧齿数目来区分属的结果, 金珊等^[30]对梭子蟹科 6 种海产蟹的 RAPD 标记研究也得出类似的结论。美青蟹属在中国没有分布, 也具有 9 个前侧齿, 头胸甲形状等形态特征与亚洲的一些游水蟹品种十分相似, 包括产自印度尼西亚、菲律宾的远海梭子蟹和产自中国的三疣梭子蟹。美青蟹属与梭子蟹属、青蟹属亲缘

关系较近,与蛭属关系较远,与传统分类相一致。

基于 *16S rRNA* 基因部分片段序列信息构建的 MP 和 NJ 系统发育树所反映的分类关系并不完全一致,主要不同在于蛭属的分类关系上。NJ 树显示,梭子蟹亚科 4 个属分为两支,梭子蟹属、美青蟹属聚为一支,蛭属、青蟹属聚为另一支。MP 树显示:梭子蟹亚科 4 个属中梭子蟹属、美青蟹属、青蟹属先后聚在一起后再和蛭属种类相聚。分析原因主要是因为两者采取的计算方法不同, Felsenstein 指出,如果在进化时间范围内碱基变更的量较小,则简约法是很合理的。此外,最大简约法对于分析某些特殊的分子数据如插入、缺失等序列是更为有用。梭子蟹线粒体 *16S rRNA* 基因保守,碱基的变异较小,比较的序列间具有碱基的插入和缺失,因此认为最大简约法反应的属间拓扑结果更为合理,即蛭属应为区别于梭子蟹属、美青蟹属、青蟹属的另一支系。结合本研究中构建的所有系统发育树,有一些分类关系始终是一致的:梭子蟹属与美青蟹属的亲缘关系最近;塞氏梭子蟹是与美青蟹属关系最近的梭子蟹属物种等。这些结论与 Stephenson 等^[31]的形态学分类鉴定及 Mantelatto 等^[27]的研究结果相一致。

蛭属由 de Haan 于 1833 年命名,在中国海洋蟹类一书中将其划分在梭子蟹亚科^[29],在台湾蟹类总名录上面划分为短桨蟹亚科^[32]。从本研究线粒体基因同源序列分析得出的结论,蛭属应为区别于梭子蟹亚科的属,支持蛭属应划分在短桨蟹亚科的观点。蛭属中又分亚属,其中一些种的鉴别比较困难。Pfeiler 等^[33]对 *Callinectes bellicosus* 不同群体进行了研究,结果表明: *COI* 基因序列在种间的变异远大于种群间的差异,也说明 *COI* 基因在区分和鉴别种类方面有较大的优势。Chu 等^[34]对中国 4 种蛭的 *COI* 基因序列的差别进行了研究,在从台湾和珠江所取样品中, *Charybdis affinis* 和 *Charybdis japonica* 两个种内不同个体间都没有序列变异,研究显示 *COI* 基因序列种内的变异不大。由于 *COI* 基因序列是区分种间差异的有效分子标记,因此可以利用 *COI* 基因序列将因地理环境等因素造成表形各异的不同物种和其他种区分开来。本研究中样品蛭与钝齿蛭以及锐齿蛭序列差异最小,计算出的遗传距离仅为样品蟹与其他蛭属种类的约 1/10。*COI* 基因在种内较保守,一般种间变异较大,说明样品蛭应为钝齿蛭或锐齿蛭中的一种。进一步分析发现,样品蛭与钝齿蛭同缘序列间有 6 个变异位点,碱基的转换和颠换各 3 处;样品蛭与锐齿蛭序列间有 7 个变异位点,包括 4 处碱基间的转换和 2 处颠换。样品蛭与钝齿蛭序列差异最小,但序列间有 3 处碱基颠换,比

样品蛭与锐齿蛭间的颠换还多一处。蟹类 *COI* 基因全长约 1.5 kb,本文用于比对分析的片段序列仅为 429 bp,不到总长的 1/3,信息含量较少,特别是序列间的差异非常小时,不能仅仅依靠序列碱基的差异来判定种类的归属。使用 MEGA4.0 计算得出样品蛭、钝齿蛭和锐齿蛭三种蟹两两之间序列的转换/颠换(*R*)值,再根据同类(亲缘关系更为相近)序列内部的一致性,样品蛭、锐齿蛭为同类而钝齿蛭即为非同类,说明样品蛭和锐齿蛭亲缘关系更近,而且样品蛭与锐齿蛭序列间的差异仅为 0.017,远小于一般种间的差异,因此判定样品蛭为锐齿蛭。在蛭属其他种类关系的研究中此规律也同样适用。后将样品蛭送中国科学院海洋研究所标本馆鉴定,从形态学上也基本确认为锐齿蛭。钝齿蛭和锐齿蛭在传统的分类中属于近缘种,隶属同一个亚属,从腕足是否具刺来区分两个种,钝齿蛭腕足具刺而锐齿蛭不具刺。本研究利用 *COI* 基因部分序列信息,并提出采用转换/颠换(*R*)值进行多重分析的有效方法,鉴别出了样品蟹的种类。分子分类采用的分子标记是 DNA 水平遗传变异的直接反映,能对各发育时期的个体、各个组织、器官甚至细胞作检测,既不受环境的影响,也不受基因表达与否的限制,信息丰富,遗传稳定。特别是对于幼体和成体表形差异很大的蟹类,从形态区分有较大的困难,或是样品残缺如由于冰冻运输致使附肢脱落等,一些重要的形态特征无法观察考证,分子标记就能显示其极大的优越性。结合 GenBank 中丰富的基因序列信息,线粒体基因作为分子标记在蟹类系统发育重建以及分类学鉴定等方面有很好的应用前景。

参考文献:

- [1] Hickerson M J, Cunningham C W. Dramatic mitochondrial gene rearrangements in the hermit crab *Pagurus longicarpus* (Crustacea, anomura) [J]. *Mol Biol Evol*, 2000, 17 (4): 639-644.
- [2] Yamauchi M M, Miya M U, Nishida M. Complete mitochondrial DNA sequence of the swimming crab. *Portunus trituberculatus* (Crustacea: Decapoda: Brachyura) [J]. *Gene*, 2003, 311: 129-135.
- [3] Miller A D, Murphy N P, Burrige C P, et al. Complete mitochondrial DNA sequences of the decapod crustaceans *Pseudocarcinus gigas* (Menippidae) and *Macrobrachium rosenbergii* (Palaemonidae) [J]. *Mar Biotechnol*, 2005, 7 (4): 339-349.
- [4] Sun H, Zhou K, Song D. Mitochondrial genome of the Chinese mitten crab *Eriocheir japonica sinensis* (Brachyura: Thoracotremata: Grapsoidea) reveals a

- novel gene order and two target regions of gene rearrangements[J]. **Gene**, 2005, 349: 207-217.
- [5] Segawa R D, Aotsuka T. The mitochondrial genome of the Japanese freshwater crab, *Geothelphusa dehaani* (Crustacea: Brachyura): Evidence for its evolution via gene duplication[J]. **Gene**, 2005, 355: 28-39.
- [6] Knowlton N, Weigt L A. New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama[J]. **Proceeding of the Royal Society London Series B**, 1998, 265: 2257-2263.
- [7] 孔晓瑜, 喻子牛, 刘亚军, 等. 中华绒螯蟹与日本绒螯蟹线粒体 COI 基因片段的序列比较研究[J]. 青岛海洋大学学报, 2001, 31(6): 861-866.
- [8] Zhao J L, Murphy R W, Li S F. Relationships of mitten crabs (*Eriocheir*) from inland rivers of China inferred from cytochrome oxidase subunit I sequences [J]. **Biochemical Systematics and Ecology**, 2002, 30: 931-941.
- [9] Harrison M K, Crespi B J. Phylogenetics of Cancer crabs (Crustacea: Decapoda: Brachyura) [J]. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 1999, 12(2): 186-199.
- [10] Schubart C D, Diesel R, Hedges S B. Rapid evolution to terrestrial life in Jamaican crabs[J]. **Nature**, 1998, 393: 363-365.
- [11] Schubart C D, Neigel J E, Felder D L. Molecular phylogeny of mud crabs (Brachyura: Panopeidae) from the northwestern Atlantic and the role of morphological stasis and convergence[J]. **Marine Biology**, 2000, 137: 11-18.
- [12] Shih H T, Ng P K L, Schubart C D, *et al.* Phylogeny and phylogeography of the genus *Geothelphusa* (Crustacea: Decapoda, Brachyura, Potamidae) in southwestern Taiwan based on two mitochondrial genes[J]. **Zoological Science**, 2007, 24(1): 57-66.
- [13] Tang B P, Zhou K Y, Song D X, *et al.* Molecular systematics of the Asian mitten crabs, genus *Eriocheir* (Crustacea: Brachyura) [J]. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 2003, 29(2): 309-316.
- [14] 马凌波, 张凤英, 乔振国, 等. 中国东南沿海青蟹线粒体 COI 基因部分序列分析[J]. 水产学报, 2006, 30(4): 463-468.
- [15] Kochzius M, Soller R, Khalaf M A, *et al.* Molecular phylogeny of the lionfish genera *Dendrochirus* and *Pterois* (Scorpaenidae, Pteroinae) based on mitochondrial DNA sequences [J]. **Mol Phyl Evol**, 2003, 28: 396.
- [16] Harrison S J. Evolution, biogeography, and the utility of mitochondrial 16S and COI genes in phylogenetic analysis of the crab genus *Austiniuxa* (Decapoda: Pinnotheridae) [J]. **Mol Phyl Evol**, 2004, 30(3): 743.
- [17] 洪义国, 孙谧, 张云波, 等. 16S rRNA 在海洋微生物系统分子分类鉴定及分子检测中的应用[J]. 海洋水产研究, 2002, 23(1): 78-83.
- [18] Kuo C H, Huang S, Lee S C. Phylogeny of hagfish based on the mitochondrial 16S rRNA gene [J]. **Mol Phylogenetic Evol**, 2003, 28(3): 448-457.
- [19] Orti G, Petry P, Porto J I R, *et al.* Patterns of nucleotide change in mitochondrial ribosomal RNA genes and the phylogeny of piranhas [J]. **J Mol Evol**, 1996, 42(1): 169-182.
- [20] Orti G, Meyer A. The radiation of characiform fishes and the limits of resolution of mitochondrial ribosomal DNA sequences [J]. **Syst Biol**, 1997, 46(1): 75-100.
- [21] Salan M A, Lciar M. Universal and rapid salt extraction of high quality genomic DNA for PCR based techniques [J]. **Nucleic Acids Reseach**, 1997, 25(22): 4692-4693.
- [22] Folmer O, Black M, Hoeh W, *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: 294-299.
- [23] Palumbi S, Martin A, Romano S, *et al.* The simple fool's guide to PCR version 2.0 [M]. Honolulu: Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory, University of Hawaii, 1991.
- [24] 郭天慧, 孔晓瑜, 陈四清, 等. 三疣梭子蟹线粒体 DNA 16S rRNA 和 COI 基因片段序列的比较研究 [J]. 中国海洋大学学报, 2004, 34(1): 22-28.
- [25] 郑芳, 吕秀玲, 孙红英, 等. 基于线粒体 COI 基因序列探讨长江华溪蟹的遗传分化 [J]. 南京师大学报(自然科学版), 2006, 29(2): 103-105.
- [26] Roman J, Palumbi S R. A global invader at home: population structure of the green crab, *Carcinus maenas*, in Europe [J]. **Molecular Ecology**, 2004, 13: 2891-2898.
- [27] Mantelatto F L, Robles R, Felder D L. Molecular phylogeny of the western Atlantic species of the genus *Portunus* (Crustacea, Brachyura, Portunidae) [J]. **Zoological Journal of the Linnean Society**, 2007, 150: 211-220.
- [28] Simth P J, Webber W R, McVEAGH S M, *et al.* DNA and morphological identification of an invasive swimming crab, *Charybdis japonica*, in New Zealand water [J]. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, 2003, 37: 753-762.
- [29] 戴爱云, 杨思谅, 宋玉枝, 等. 中国海洋蟹类 [M]. 北京: 海洋出版社, 1986. 189.
- [30] 金珊, 赵青松, 王春琳, 等. 梭子蟹科六种海产蟹的 RAPD 标记 [J]. 动物学研究, 2004, 25(2): 172-176.
- [31] Stephenson W, Williams W T, Lance G N. Numerical approaches to the relationships of certain American swimming crabs (Crustacea: Portunidae) [J]. **Proceedings of the United States of Natural Museum**, 1968, 124(3645): 1-25.
- [32] 黄襁麟, 王嘉祥, 何平合, 等. 台湾产短尾蟹类之注

- 解名录(甲壳类:十足目)[A]. 中国台湾博物馆. 中国台湾博物馆专题论著(11)[C]. 中国台湾: 中国台湾博物馆, 2001. 18.
- [33] Pfeiler E, Hurtado L A, Knowles L L, *et al.* Population genetics of the swimming crab *Callinectes bellicosus* (Brachyura: Portunidae) from the eastern Pacific Ocean[J]. *Marine Biology*, 2005, 146: 559-569.
- [34] Chu K H, Tong J, Chan T Y. Mitochondrial cytochrome oxidase I sequence divergence in some Chinese species of *Charybdis* (Crustacea: Decapoda: Portunidae)[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1999, 27 (5): 461-468.

The Applications of mitochondrial DNA in phylogeny reconstruction and species identification of portunid crab

ZHANG Shu^{1,2}, LI Xi-lian^{1,2}, CUI Zhao-xia², WANG Hong-xia², WANG Chun-lin³, LIU Xiao-lin¹

(1. College of Animal Sciences and Technology, Northwest SciTech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China; 2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 3. College of Life Science& Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Received: Jun. , 6, 2007

Key words: mitochondrial DNA; portunid crab; phylogeny; barcode

Abstract: The partial sequences of *COI* and *16S* genes were determined from *Portunus trituberculatus*, and partial sequences of *COI* was determined from sampled specimen. All homologous partial sequences of *COI* and *16S* in Portunidae were collected from GenBank and aligned with the homologous sequences of *P. trituberculatus*. The NJ tree and MP tree were constructed using Kimura 2-parameter model. Homologous sequences (429 bp) of sampled specimen and genus *Charybdis* were aligned. The results show that the average content of AT is obviously higher than that of GC in both genes. *Charybdis* is a different group which separated from *Portunus*, *Callinectes* and *Scylla*. *Charybdis* should be included in subfamily Thalamininae but not in subfamily Portuninae. Sampled specimen is identified as *Charybdis acuta* for its genetic distance and *R* value. This experiment researched on the phylogenetic relationships of portunid crab and identification of sampled specimen, and it provides important information for the phylogeny reconstruction and species identification of portunid crab.

(本文编辑: 刘珊珊)