

中华虎头蟹线粒体 16S rRNA 和 CO I 基因的 序列比较及其系统进化分析

刘 萍*, 段亚飞, 毛智超, 李吉涛, 高保全, 李 健

(中国水产科学研究院黄海水产研究所,农业部海洋渔业可持续发展重点实验室,山东 青岛 266071)

摘要:为研究中华虎头蟹野生群体的种质资源及遗传多样性状况,采用 PCR 扩增获得中华虎头蟹线粒体 DNA 的 16S rRNA 和 CO I 基因片段,分别对其进行序列比较及系统进化分析。16S rRNA 和 CO I 基因片段的 A+T 平均含量分别为 67.7% 和 61.4%,A+T 含量显著高于 G+C 含量。长度为 515 bp 的 16S rRNA 基因片段共检测出单倍型 4 种,多态性位点 4 个,均为单一变异位点;长度为 653 bp 的 CO I 基因片段共检测出单倍型 11 种,多态性位点 23 个,其中简约信息位点 5 个和单一变异位点 18 个。CO I 基因片段比 16S rRNA 基因片段具有较大的变异,更适于中华虎头蟹种群的遗传多样性分析。基于 16S rRNA 和 CO I 基因片段的遗传距离与系统进化分析结果一致,表明中华虎头蟹与梭子蟹科的蟹类亲缘关系最近,方蟹科与沙蟹科的蟹类聚为一支,与传统分类结果基本一致;而脊椎动物 2 个基因片段的系统进化分析结果不一致。根据 16S rRNA 基因片段的遗传距离推测出 4 科 7 种蟹的大致分化时间发生在古新世至始新世。

关键词:中华虎头蟹;线粒体 DNA;16S rRNA 基因;CO I 基因;序列分析

中图分类号:Q 785;S 917.4

文献标志码:A

中华虎头蟹 (*Orithya sinica*), 又称乳斑虎头蟹, 隶属于节肢动物门 (Arthropoda)、甲壳纲 (Crustacea)、十足目 (Decapoda)、馒头蟹科 (Calappidae)、虎头蟹属 (*Orithya*), 是我国与朝鲜半岛沿海特有的近海温水性大型经济蟹类^[1]。中华虎头蟹肉味鲜美、营养丰富, 又因其色泽鲜艳、外形似虎头, 具有较高的食用和观赏价值。中华虎头蟹主要来源于海洋野生资源, 因每年可捕获的时间短暂, 自然资源稀少, 市场供不应求, 经济价值巨大^[2-3]。随着近年来捕捞强度的增大及生态环境的不断恶化, 中华虎头蟹资源日渐衰退, 其种质资源及遗传多样性方面的研究则显得尤为重要。目前, 国内外对中华虎头蟹的相关研究报道较少, 主要集中在生物学特性方面^[4-7], 而其遗传学方面的研究尚未见报道。

线粒体 DNA 具有母系遗传、结构简单、进化速

率快和缺少重组等特点, 因而作为有效分子标记被广泛应用于动物种群遗传结构、物种遗传多样性及系统进化等研究^[8-11]。由于其较强的中间解析和鉴别能力, 16S rRNA 和 COI 基因在无脊椎动物和脊椎动物的系统进化、种类鉴别及种群遗传多样性的研究中得到较为广泛的应用^[12-17]。本研究对来自青岛丁字湾的中华虎头蟹野生群体线粒体 DNA 的 16S rRNA 和 COI 基因片段进行了序列测定和比较分析, 并对其与其他蟹类及脊椎动物的遗传距离和系统进化关系进行了探讨, 以期中华虎头蟹的遗传资源、物种间亲缘关系和系统进化等研究提供基础分子生物学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

实验所用野生中华虎头蟹于 2013 年 3 月采

收稿日期:2013-06-09 修回日期:2013-08-27

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2012AA10A409);山东省科技发展计划项目(2011GHY11526)

通信作者:刘 萍,E-mail:liuping@ysfri.ac.cn

自山东青岛丁字湾,体质量(150 ± 0.25)g,活体运回实验室,取蟹足于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2 基因组 DNA 的提取及检测

从中华虎头蟹野生群体中选取 30 个样本,分别取蟹足肌肉约 0.1 g,加入 600 μL 组织匀浆缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 50 mmol/L EDTA, pH 8.0),用剪刀剪碎组织,混匀。依次加入终浓度为 10% 的 SDS 和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的蛋白酶 K, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 裂解至澄清。采用醋酸铵法提取基因组 DNA。

1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 样品的完整性,并用全自动凝胶系统拍照。核酸定量仪测定基因组 DNA 浓度和纯度,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 PCR 扩增和测序

以中华虎头蟹基因组 DNA 为模板,采用无脊椎动物 16S rRNA 和 COI 基因片段的通用引物进行 PCR 扩增。16S rRNA 基因片段扩增引物为:16S AR:5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3', 16S BR:5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACG-3'; COI 基因片段扩增引物为 COI L1490:5'-GGTCAACAA-ATCATAAAGATATTGG-3', COI H2198:5'-TAAACCTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3'。所用引物均由生工生物工程(上海)有限公司合成。

PCR 反应总体积为 50 μL ,包括 10 \times Taq buffer 5 μL , 2 mmol/L dNTP Mix 5 μL , 25 mmol/L MgCl_2 4 μL , Taq 酶 1.25 U, 上、下游引物(浓度为 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)各 1.2 μL , 模板 DNA 50~100 ng, 无菌双蒸水补足体积至 50 μL 。PCR 反应程序: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 45 s, $48\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min。

PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后,于紫外灯下切割目的片段,用 DNA 胶回收试剂盒[生工生物工程(上海)有限公司]进行纯化回收,操作按试剂盒说明书进行。回收产物送往上海桑尼生物科技有限公司进行双向测序。

1.4 序列分析

利用 DNASTar 软件(DNASTar, Inc)中的 SeqMan 程序对双向测序结果进行拼接^[18],采用 Bioedit 软件进行序列编辑,并辅以人工核查^[19]。利用 DNAMAN 软件进行序列比对,并确定序列长度。DnaSP 5.0 软件计算序列的碱基组成、多态位点数及遗传多样性参数^[20]。MEGA 4.0 软件基于 Kimura-2-parameter 模型计算中华虎头蟹种内及与外群物种间的遗传距离,并利用邻接法(neighbor-

joining, NJ)构建系统进化树^[21],节点的置信度检验采用 Bootstrap 分析(1 000 个循环)。根据线粒体 16S rRNA 分子钟^[22],基于各物种间的 16S rRNA 遗传距离,推算其大致的分化时间。

2 结果

2.1 16S rRNA 和 COI 基因片段的 PCR 扩增

采用醋酸铵法提取中华虎头蟹基因组 DNA,经核酸定量仪检测,所有样品的 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 均为 1.8~2.0,表明其纯度较高;经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,其完整性较好,符合实验要求。采用特异性引物分别对 16S rRNA 和 COI 基因片段进行 PCR 扩增,均得到特异性较好的 PCR 产物。

2.2 16S rRNA 和 COI 基因片段的序列分析

对中华虎头蟹 16S rRNA 和 COI 基因片段的 PCR 扩增产物进行测序。测得的序列经 DNAMAN 软件比对,去除引物及两侧冗余序列,分别得到长度为 515 bp 的 16S rRNA 基因片段和长度为 653 bp 的 COI 基因片段。BLAST 分析表明,所测得的序列均为 16S rRNA 和 COI 基因片段,与其他虾蟹类具有高度相似性。DnaSP 5.0 软件分析表明,16S rRNA 基因片段的碱基 A、G、T、C 和 A+T 平均含量分别为 33.7%、21.0%、34.0%、11.3% 和 67.7%。COI 基因片段的碱基 A、G、T、C 和 A+T 平均含量分别为 27.7%、17.2%、33.7%、21.4% 和 61.4%。16S rRNA 和 COI 基因片段的 A+T 含量都显著高于 G+C 含量,符合虾蟹类线粒体 DNA 16S rRNA 和 COI 基因片段的序列特征^[14-15, 23-24]。

16S rRNA 基因片段共检查出 4 种单倍型(hap1~hap4),多态性位点 4 个,均为单一多态性位点;其中转换位点 4 个,主要为 A/G 转换;无颠换位点,不存在插入和缺失位点(表 1)。COI 基因片段共检测出 11 种单倍型(hap1~hap11),多态性位点 23 个,包括单一多态性位点 18 个和简约信息位点 5 个;其中转换位点 18 个, A/G 和 T/C 转换数量相同;颠换位点 5 个,主要为 A/C 颠换,转换与颠换比约为 3.6,不存在插入和缺失位点(表 2)。COI 基因片段中共存在 4 个 A/C 颠换,分别在第 88、234 和 235 位点;1 个 A/T 颠换,发生在第 231 位点。与 COI 基因片段相比,16S rRNA 基因片段的遗传变异较小,序列相对保守。16S rRNA 和 COI 基因片段的各单倍型已提交至 GenBank, 16S rRNA(登录号:KF364355-KF364358), COI(登录

号;KF364344-KF364354)。

利用 DnaSP 5.0 软件对中华虎头蟹 16S rRNA 和 CO I 基因片段的遗传多样性参数进行统计(表 3),发现 16S rRNA 的各项遗传多样性参数均低于 CO I,进一步说明 16S rRNA 基因片段比 CO I 基因片段较为保守。

表 1 中华虎头蟹不同单倍型 16S rRNA 基因序列的变异位点分布

Tab.1 Variable sites of 16S rRNA gene sequence from different haplotypes of *O. sinica*

核苷酸多态位点 nucleotide polymorphic sites	123 1393 5004
hap 1	GACA
hap 2	.G..
hap 3	A...
hap 4	..TG

注:表上方数字自上至下为碱基变异位点在 16S rRNA 基因序列中的位置,“.”表示与第一行序列碱基相同
Notes:Numbers above the table indicate the location of the variable sites in the 16S rRNA gene sequences;“.” means the same base with the first line

表 2 中华虎头蟹不同单倍型 CO I 基因序列的变异位点分布

Tab.2 Variable sites of CO I gene sequence from different haplotypes of *O. sinica*

核苷酸多态位点 nucleotide polymorphic sites	111222222333445666 11488159133339057036134 48718405914586918251035
hap 1	GCGGCCTATTCCGCGCGGCCTTA
hap 2C.
hap 3	...A.....T.....
hap 4C.....
hap 5	...A.....C.
hap 6AG.A.....AAATC..
hap 7	...A.....T.T.....
hap 8	.T.A.....AAA.....G
hap 9A.....
hap 10	ATAA.....G
hap 11	...A.T.....T.....

注:表上方数字自上至下为碱基变异位点在 CO I 基因序列中的位置,“.”表示与第一行序列碱基相同
Notes:Numbers above the table indicate the location of the variable sites in the CO I gene sequences;“.” means the same base with the first line

表 3 中华虎头蟹 16S rRNA 和 CO I 基因片段的遗传多样性参数

Tab.3 Genetic diversity parameters of 16S rRNA and CO I gene fragments of *O. sinica*

基因类型 gene types	样本数(N) number of samples	多态性位点 (P) number of variable sites	单倍型数 (H) number of haplotypes	单倍型多态性 (H _d) haplotype diversity	平均核苷酸差异数 (K) average number of nucleotide differences	核苷酸多样性指数 (P _i) nucleotide diversity
16S rRNA	30	4	4	0.499	0.605	0.00 117
CO I	30	23	11	0.816	4.000	0.00 613

2.3 基于 16S rRNA 基因序列的不同物种间的遗传距离及系统进化分析

选取 GenBank 中的 6 种蟹类(方蟹科、梭子蟹科和沙蟹科)和 4 种脊椎动物(尖嘴鲈科、负子蟾科、鳄科和鼠科)的 16S rRNA 基因序列为外群,其相关信息见表 4。由表 4 可知,6 种蟹类的碱基 T、C、A 和 G 含量差异较小,A + T 含量均明显高于 G + C 含量,而同一科的物种其碱基含量则更为接近。4 种脊椎动物的碱基含量也符合上述特征。

将扩增得到的中华虎头蟹 16S rRNA 基因片段 4 种单倍型(hap1 ~ hap4)结合 GenBank 中检索到的 3 科 6 种蟹和 4 科 4 种脊椎动物的 16S

rRNA 基因片段,利用 MEGA 4.0 软件的 Kimura-2-parameter 模型计算种间的遗传距离(表 5)。基于 16S rRNA 基因片段,中华虎头蟹 4 种单倍型的遗传距离为 0.000 ~ 0.009,平均为 0.004。10 种蟹的遗传距离为 0.003 ~ 0.358,4 种脊椎动物的遗传距离为 0.304 ~ 0.422。所有蟹类中,三疣梭子蟹与弧边招潮蟹的遗传距离最大,为 0.358;中华绒螯蟹与日本绒螯蟹的遗传距离最小,为 0.003。不同科的蟹类之间,梭子蟹科与沙蟹科的遗传距离最大,为 0.315 ~ 0.358;方蟹科与沙蟹科的遗传距离最小,为 0.207 ~ 0.219。4 种脊椎动物中,爬行类与哺乳类的遗传距离最大,为 0.422;鱼类和两栖类的遗传距离最小,为 0.304。

表 4 外群物种 16S rRNA 基因序列基本信息
Tab.4 The data of 16S rRNA gene sequences of outgroup species

物种 specie	科 family	碱基含量/% base content					长度/bp length	GenBank 登录号 GenBank accession number
		T	C	A	G	A + T		
中华绒螯蟹 <i>Eriocheir sinensis</i>	方蟹科	37.7	10.3	34.9	17.1	72.6	525	AF312718
日本绒螯蟹 <i>Eriocheir japonica</i>	方蟹科	37.7	9.3	35.7	17.3	73.4	440	AF516707
红星梭子蟹 <i>Portunus sanguinolentus</i>	梭子蟹科	34.0	11.6	35.8	18.6	69.8	371	AM410531
三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	梭子蟹科	35.3	11.7	35.3	17.7	70.6	524	GU321228
弧边招潮蟹 <i>Uca arcuata</i>	沙蟹科	36.5	10.5	33.8	19.2	70.3	526	AB535406
四角招潮蟹 <i>Uca tetragonon</i>	沙蟹科	36.0	11.2	34.0	18.8	70.0	520	AB535405
尖吻鲈 <i>Lates calcarifer</i>	尖吻鲈科	23.2	25.0	29.8	22.0	53.0	568	DQ532892
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	负子蟾科	23.2	23.1	36.6	17.1	59.8	856	HQ225680
非洲尖吻鳄 <i>Mecistops cataphractus</i>	鳄科	27.4	27.9	28.1	16.6	55.5	645	GQ144572
黑鼠 <i>Rattus rattus</i>	鼠科	31.2	24.9	27.0	16.8	58.2	714	JQ668025

表 5 基于 16S rRNA 基因片段的 Kimura-2-parameter 遗传距离(左下)
Tab.5 Kimura-2-parameter genetic distances based on the 16S rRNA gene fragments(lower left)

物种 specie	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	—													
2	0.003	—												
3	0.000	0.003	—											
4	0.006	0.009	0.006	—										
5	0.258	0.262	0.258	0.262	—									
6	0.262	0.262	0.262	0.266	0.003	—								
7	0.306	0.306	0.306	0.311	0.330	0.330	—							
8	0.283	0.283	0.283	0.288	0.325	0.325	0.106	—						
9	0.301	0.306	0.301	0.292	0.207	0.211	0.342	0.358	—					
10	0.268	0.263	0.268	0.268	0.215	0.219	0.315	0.346	0.130	—				
11	0.682	0.682	0.682	0.690	0.743	0.743	0.741	0.682	0.734	0.718	—			
12	0.735	0.735	0.735	0.744	0.767	0.767	0.730	0.676	0.827	0.780	0.304	—		
13	0.730	0.730	0.730	0.730	0.721	0.721	0.763	0.709	0.759	0.701	0.338	0.406	—	
14	0.623	0.623	0.623	0.623	0.696	0.696	0.742	0.693	0.692	0.668	0.350	0.329	0.422	—

注:1. 中华虎头蟹 hap1, 2. 中华虎头蟹 hap2, 3. 中华虎头蟹 hap3, 4. 中华虎头蟹 hap4, 5. 中华绒螯蟹, 6. 日本绒螯蟹, 7. 红星梭子蟹, 8. 三疣梭子蟹, 9. 弧边招潮蟹, 10. 四角招潮蟹, 11. 尖吻鲈, 12. 非洲爪蟾, 13. 非洲尖吻鳄, 14. 黑鼠

Notes:1. *Orithyia sinica* hap1, 2. *Orithyia sinica* hap2, 3. *Orithyia sinica* hap3, 4. *Orithyia sinica* hap4, 5. *Eriocheir sinensis*, 6. *Eriocheir japonica*, 7. *Portunus sanguinolentus*, 8. *Portunus trituberculatus*, 9. *Uca arcuata*, 10. *Uca tetragonon*, 11. *Lates calcarifer*, 12. *Xenopus laevis*, 13. *Mecistops cataphractus*, 14. *Rattus rattus*

利用 MEGA 4.0 软件,对上述物种的 16S rRNA 基因片段构建 NJ 系统进化树(图 1)。系统进化关系表明,所有物种首先分为两支:脊椎动物和无脊椎动物。无脊椎动物中,同一科的不同蟹类首先汇聚,物种间的系统进化关系界限较为明显,与形态学的分类关系相符。所有蟹类中,中华虎头蟹 4 种不同单倍型首先聚合;方蟹科与沙蟹科聚为一支,然后与梭子蟹科相聚,最后再与中华虎头蟹聚合在一起,与遗传距离分析结果基本

一致。脊椎动物中,两栖类和鱼类首先聚为一支,然后和爬行类相聚,最后和哺乳类聚合在一起。

根据 Stillman 等^[22]提出的线粒体 16S rRNA 分子钟,基于上述的 4 科 7 种蟹和 4 种脊椎动物的 16S rRNA 遗传距离,对其大致的分化时间进行了推算,结果见表 6。蟹类中,梭子蟹科与沙蟹科的分化时间最大,为 55.8 ~ 64.5 百万年;方蟹科与沙蟹科的分化时间最小,为 36.4 ~ 41.9 百万年。脊椎动物中,爬行类与哺乳类的分化时间最

大,为 74.7 百万年;鱼类和两栖类的分化时间最小,为 55.1 百万年。蟹类与脊椎动物之间,弧边招潮蟹与非洲爪蟾的分化时间最大,为 143.9 百

万年;三疣梭子蟹与非洲爪蟾的分化时间最小,为 110.4 百万年。

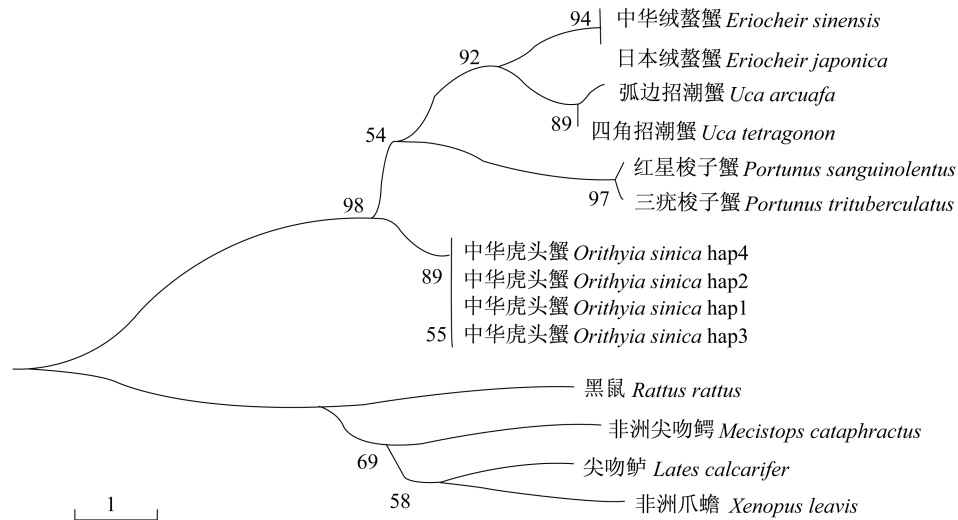


图 1 基于 16S rRNA 基因序列构建的 NJ 系统进化树

Fig.1 NJ phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences

表 6 基于 16S rRNA 遗传距离估算的不同物种间的分化时间(单位:百万年)

Tab.6 Differentiation time deduced from 16S rRNA genetic distances from different species(Unit: million years)

物种 specie	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	—										
2	47.2	—									
3	47.9	0.57	—								
4	52.5	59.8	59.8	—							
5	47.4	58.9	58.9	1.6	—						
6	54.9	36.4	37.2	60.2	64.5	—					
7	50.0	41.1	41.9	55.8	61.1	23.4	—				
8	120.9	136.9	136.9	119.1	114.7	129.4	131.3	—			
9	121.7	124.2	124.2	123.6	110.4	143.9	133.4	55.1	—		
10	131.1	127.2	127.2	124.5	118.1	127.5	120.0	58.9	73.0	—	
11	113.8	124.7	124.7	124.2	116.1	117.9	117.2	61.9	58.7	74.7	—

注:1. 中华虎头蟹 hap1, 2. 中华绒螯蟹, 3. 日本绒螯蟹, 4. 红星梭子蟹, 5. 三疣梭子蟹, 6. 弧边招潮蟹, 7. 四角招潮蟹, 8. 尖吻鲈, 9. 非洲爪蟾, 10. 非洲尖吻鳄, 11. 黑鼠

Notes: 1. *Orithya sinica* hap1, 2. *Eriocheir sinensis*, 3. *Eriocheir japonica*, 4. *Portunus sanguinolentus*, 5. *Portunus trituberculatus*, 6. *Uca arcuata*, 7. *Uca tetragonon*, 8. *Lates calcarifer*, 9. *Xenopus laevis*, 10. *Mecistops cataphractus*, 11. *Rattus rattus*

2.4 基于 CO I 基因序列的不同物种间的遗传距离及系统进化分析

选取 GenBank 中的 6 种蟹类(方蟹科、梭子蟹科和沙蟹科)和 4 种脊椎动物(尖吻鲈科、负子蟾科、鳄科和鼠科)的 CO I 为外群,其相关信息

见表 7。由表 7 可知,6 种蟹类的碱基 T、C、A 和 G 含量差异较小, A + T 含量明显高于 G + C 含量,而同一科的物种其碱基含量则更为接近。4 种脊椎动物的碱基含量也符合上述特征。

基于本研究 PCR 扩增获得的中华虎头蟹

CO I 基因片段 11 种单倍型 (hap1 ~ hap11) 和 GenBank 检索到的 3 科 6 种蟹和 4 科 4 种脊椎动物的 CO I 基因片段, 利用 MEGA 4.0 软件的 Kimura-2-parameter 模型计算种间的遗传距离 (表 8)。遗传距离显示, 中华虎头蟹 11 种单倍型之间的遗传距离为 0.002 ~ 0.022, 平均 0.008 (表 9); 7 种蟹之间的遗传距离为 0.046 ~ 0.299, 4 种脊椎动物之间的遗传距离为 0.239 ~ 0.338。所有

蟹类中, 红星梭子蟹与日本绒螯蟹的遗传距离最大, 为 0.276; 中华绒螯蟹与日本绒螯蟹的遗传距离最小, 为 0.046。不同科的蟹类之间, 梭子蟹科与方蟹科的遗传距离最大, 为 0.227 ~ 0.299; 方蟹科与沙蟹科的遗传距离最小, 为 0.181 ~ 0.213。4 种脊椎动物之间, 鱼类与爬行类的遗传距离最大, 为 0.338; 两栖类与哺乳类的遗传距离最小, 为 0.239。

表 7 外群物种 CO I 基因序列基本信息
Tab. 7 The datas of CO I gene sequences of outgroup species

物种 specie	科 family	碱基含量/% base content					长度/bp length	GenBank 登录号 GenBank accession number
		T	C	A	G	A + T		
中华绒螯蟹 <i>Eriocheir sinensis</i>	方蟹科	34.7	20.1	27.7	17.5	62.4	686	HQ534047
日本绒螯蟹 <i>Eriocheir japonica</i>	方蟹科	35.5	19.7	27.5	17.4	63.0	651	FJ750329
红星梭子蟹 <i>Portunus sanguinolentus</i>	梭子蟹科	35.4	22.9	22.9	18.8	58.3	658	JX502944
三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	梭子蟹科	36.5	20.7	26.4	16.4	62.9	658	JX502943
弧边招潮蟹 <i>Uca arcuata</i>	沙蟹科	33.1	21.1	28.6	17.2	61.7	658	JX502938
四角招潮蟹 <i>Uca tetragonon</i>	沙蟹科	35.3	18.5	28.3	17.9	63.6	658	AB535431
尖吻鲈 <i>Lates calcarifer</i>	尖吻鲈科	29.3	30.1	21.8	18.8	51.1	652	DQ108026
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	负子蟾科	32.5	23.0	27.6	16.9	60.1	652	GQ862300
非洲尖吻鳄 <i>Mecistops cataphractus</i>	鳄科	27.4	27.9	28.1	16.6	55.5	645	GQ144581
黑鼠 <i>Rattus rattus</i>	鼠科	30.1	25.6	28.3	16.0	58.4	658	KC617858

表 8 基于 CO I 基因片段的 Kimura-2-parameter 遗传距离 (左下方)
Tab. 8 Kimura-2-parameter genetic distances based on the CO I gene fragments (lower left)

物种 specie	1	2	3	4	5	6	7	10	11	12	13
1	—										
2	0.241	—									
3	0.229	0.046	—								
4	0.201	0.249	0.217	—							
5	0.231	0.273	0.276	0.201	—						
6	0.199	0.209	0.213	0.203	0.238	—					
7	0.223	0.181	0.187	0.225	0.222	0.168	—				
8	0.355	0.371	0.389	0.397	0.375	0.379	0.416	—			
9	0.372	0.350	0.356	0.363	0.361	0.352	0.334	0.278	—		
10	0.373	0.372	0.367	0.396	0.396	0.368	0.363	0.338	0.284	—	
11	0.347	0.341	0.334	0.342	0.364	0.345	0.354	0.280	0.239	0.294	—

注: 1. 中华虎头蟹 hap1, 2. 中华绒螯蟹, 3. 日本绒螯蟹, 4. 三疣梭子蟹, 5. 红星梭子蟹, 6. 弧边招潮蟹, 7. 四角招潮蟹, 8. 尖吻鲈, 9. 非洲爪蟾, 10. 非洲尖吻鳄, 11. 黑鼠

Notes: 1. *Orithya sinica* hap1, 2. *Eriocheir sinensis*, 3. *Eriocheir japonica*, 4. *Portunus trituberculatus*, 5. *Portunus sanguinolentus*, 6. *Uca arcuata*, 7. *Uca tetragonon*, 8. *Lates calcarifer*, 9. *Xenopus laevis*, 10. *Mecistops cataphractus*, 11. *Rattus rattus*

表 9 中华虎头蟹不同单倍型 CO I 基因片段的 Kimura-2-parameter 遗传距离(左下方)
 Tab.9 Kimura-2-parameter genetic distances based on the CO I gene fragments of different haplotypes of *O. sinica* (lower left)

	hap1	hap2	hap3	hap4	hap5	hap6	hap7	hap8	hap9	hap10	hap11
hap1	—										
hap2	0.002	—									
hap3	0.003	0.005	—								
hap4	0.002	0.003	0.005	—							
hap5	0.003	0.002	0.006	0.005	—						
hap6	0.012	0.014	0.016	0.014	0.015	—					
hap7	0.005	0.006	0.002	0.006	0.008	0.017	—				
hap8	0.009	0.011	0.009	0.011	0.012	0.022	0.011	—			
hap9	0.002	0.003	0.005	0.003	0.005	0.014	0.006	0.011	—		
hap10	0.008	0.009	0.008	0.009	0.011	0.020	0.009	0.008	0.009	—	
hap11	0.005	0.006	0.002	0.006	0.008	0.017	0.003	0.011	0.006	0.009	—

基于上述 9 种蟹和 4 种脊椎动物的 CO I 基因片段,利用 MEGA 4.0 软件构建 NJ 系统进化树(图 2)。结果表明,蟹类 CO I 的系统进化分析结果与 16S rRNA 一致,而基于 16S rRNA 和

CO I 基因片段的 4 种脊椎动物的系统进化分析结果则不一致。在脊椎动物分支中,两栖类和爬行类首先聚为一支,然后与哺乳类相聚,最后又与鱼类聚合在一起。

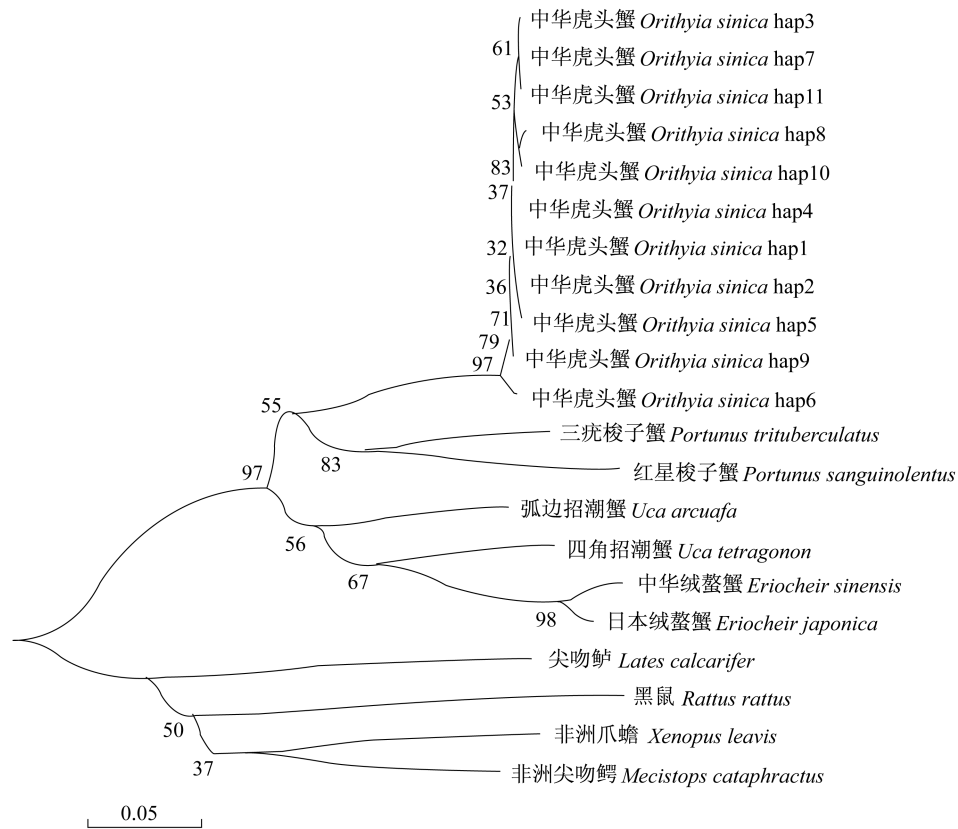


图 2 基于 CO I 基因序列构建的 NJ 系统进化树

Fig.2 NJ phylogenetic tree based on CO I gene sequences

3 讨论

3.1 中华虎头蟹 16S rRNA 和 CO I 基因片段的序列比较

本研究采用 PCR 技术对中华虎头蟹线粒体 16S rRNA 和 CO I 基因片段进行扩增,分别得到 515 和 653 bp 的基因序列。序列碱基组成分析表明,16S rRNA 和 CO I 基因的 A + T 平均含量分别为 67.7% 和 61.4%,均明显高于 G + C 平均含量,该结果与三疣梭子蟹、日本蟳 (*Charybdis japonica*) 和脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicauda*) 等甲壳动物的研究结论一致^[14-15,23-24]。研究报道表明,线粒体 DNA 上不同的基因其解析能力不同,而同一基因在不同的物种间其解析能力也不同^[25]。目前,在蟹类线粒体 DNA 研究中,16S rRNA 和 CO I 基因片段得到较为广泛的应用。在无脊椎动物中,16S rRNA 基因进化速率相对较低,保守性相对较高,而 CO I 基因则具有较为丰富的变异^[26-27]。Meyran 等^[28] 研究表明,在近缘物种鉴定中,CO I 基因比 16S rRNA 基因则更为灵敏,效果更好。

本研究中,中华虎头蟹野生群体 30 个样本中,16S rRNA 基因共检测出 4 种单倍型和 4 个多态性位点,而 COI 基因则共检出 11 种单倍型和 23 个多态性位点。结果表明,与中华虎头蟹 COI 基因片段相比,其 16S rRNA 基因片段的遗传变异较小,序列相对保守,该结果与三疣梭子蟹^[29]、日本蟳^[24] 和脊尾白虾^[15,23] 等虾蟹类的相关研究一致。基于 16S rRNA 和 COI 基因片段的中华虎头蟹野生群体的遗传多样性分析表明,16S rRNA 基因片段的各项遗传多样性参数均低于 COI 基因片段。中华虎头蟹不同单倍型的 16S rRNA 和 COI 基因片段的遗传距离分析结果显示,16S rRNA 基因片段平均为 0.004,而 COI 基因片段平均为 0.008,表明中华虎头蟹 COI 基因片段比 16S rRNA 基因片段具有更强的分辨率。由此可知,COI 基因序列具有丰富的变异,更适于中华虎头蟹种群的遗传多样性研究。线粒体 DNA 中,不同区域的核苷酸具有不同的突变速率,或者不同的基因片段所承受的选择压力不同,是造成线粒体不同基因片段变异存在差异的主要原因^[30]。

3.2 遗传距离及系统进化研究

分子系统进化树构建是研究生物间系统进化

关系最重要的手段^[31]。分子系统进化树是在核酸或氨基酸等大分子进化速率相对稳定的基础上,基于相互之间的序列差异或结构的比较而得以构建,可以很直观地体现出不同物种之间的系统进化关系^[32]。利用 16S rRNA 和 CO I 基因构建的分子系统进化树已经解决了许多物种间的系统发生关系的问题,刘帅等^[33] 构建对虾属 23 种对虾的分子系统进化树,为对虾属物种系统发生关系的研究提供了更多的信息。鉴于 16S rRNA 和 CO I 基因在无脊椎动物和脊椎动物的系统发生和遗传进化研究及种质资源鉴定等研究中所具有的应用价值,本研究从 GenBank 中检索到梭子蟹科、方蟹科、沙蟹科和 4 种脊椎动物的 16S rRNA 和 CO I 基因片段序列,构建其 NJ 系统进化树,以探讨中华虎头蟹与其他几个蟹科和脊椎动物的遗传距离和系统进化关系。

本研究中,基于 16S rRNA 基因片段构建的 NJ 系统进化树显示,无脊椎动物分支中,虎头蟹科和梭子蟹科具有相对较近的亲缘关系,而方蟹科和沙蟹科则紧密聚为一支;脊椎动物分支中,两栖类和鱼类首先聚为一支,然后和爬行类相聚,最后和哺乳类聚合在一起。基于 CO I 基因片段构建的 NJ 系统进化树显示,无脊椎动物分支中几个蟹科的亲缘关系与 16S rRNA 进化树结果基本一致;而在脊椎动物分支中,两栖类和爬行类首先聚为一支,然后与哺乳类相聚,最后又与鱼类聚合在一起,与 16S rRNA 进化树结果不太一致,说明 16S rRNA 可能比 CO I 基因更适用于脊椎动物不同物种之间的系统分类。根据蟹类形态分类学研究结果,方蟹科和沙蟹科属于爬行亚目,虎头蟹科和梭子蟹科属于腹胚亚目短尾下目。因此,本研究中,方蟹科与沙蟹科、虎头蟹科与梭子蟹科之间的进化关系与形态分类学一致。

分子钟假说认为,某一特定的大分子(DNA 或蛋白质)在所有世系中,核苷酸替代速率在时间上是稳定的。Stillman 等^[22] 对太平洋东部岩瓷蟹类系统发生地理学的研究估算岩瓷蟹 (*Petrolithes armatus*) 的线粒体 16S rRNA 的分子钟为 0.53% My,即每百万年进化 0.53%。他们通过对各个支系分化时间的估计认为 0.53% My 的分子钟对于近期的分化更为可靠,而比较保守的哺乳类 0.2% My 的分子钟比较适合于估计远古的分化。本研究利用 Stillman 等^[22] 提出的线

粒体 16S rRNA 分子钟,对蟹类 4 个科(馒头蟹科、方蟹科、梭子蟹科和沙蟹科)和脊椎动物 4 个科(尖嘴鲈科、负子蟾科、鳄科和鼠科)共 13 个物种之间的分化时间进行估计,结果显示 4 个科蟹类是从共同的古代海生蟹类祖先向着不同的方向发生适应辐射的结果,这些辐射分化的时间基本上发生在古新世(65.0 ~ 53.5 百万年)至始新世(53.5 ~ 37.0 百万年)。

由于中华虎头蟹野生种群较为难得,所以本研究仅对采自青岛丁字湾的中华虎头蟹群体进行了种质资源及遗传多样性分析。在将来的研究工作中,拟采集更为广泛海域的样本,并结合核基因(AFLP、微卫星等)进行群体遗传结构的研究,为中华虎头蟹种质资源保护和遗传多样性研究提供新的材料。

参考文献:

- [1] 沈嘉瑞,刘瑞玉. 我国的虾蟹[M]. 北京:科学出版社,1976.
- [2] 王红伟,原振政,祁峰,等. 中华虎头蟹幼体发育的初步观察[J]. 大连海洋大学学报,2012,27(3): 231 - 235.
- [3] 魏国庆,曹琛,蔡恒辉,等. 中华虎头蟹生活习性、繁殖习性及其幼体形态的初步观察[J]. 中国水产,2012(4):67 - 69.
- [4] 蔡恒辉,曹琛,魏国庆,等. 干露、盐度、温度变化对中华虎头蟹仔蟹的影响[J]. 水产科学,2012,31(9):560 - 563.
- [5] 廖永岩,吴蕾,蔡凯,等. 盐度和温度对中华虎头蟹(*Orithya sinica*)存活和摄饵的影响[J]. 生态学报,2007,27(2):627 - 639.
- [6] Koo J G, Jee J H, Kim J M, *et al.* Effect of water temperature on survival, growth and intermolt period of tiger crab, *Orithya sinica* (Linnaeus) larvae[J]. Journal Fish Pathology, 2004, 17(2): 139 - 144.
- [7] Jee J H, Koo J G, Keum Y H, *et al.* Effects of diet and sediment type on survival, growth and moulting of juvenile tiger crab, *Orithya sinica* L [J]. Aquaculture Research, 2007, 38(1): 26 - 35.
- [8] Englbrecht C C, Freyhof J, Nolte A, *et al.* Phylogeography of the bullhead *Cottus gobio* (Pisces: Teleostei: Cottidae) suggests a pre-Pleistocene origin of the major central European populations[J]. Molecular Ecology, 2000, 9(6): 709 - 722.
- [9] Whitehead A, Anderson S L, Kuivila K M, *et al.* Genetic variation among interconnected populations of *Catostomus occidentalis*: Implications for distinguishing impacts of contaminants from biogeographical structuring[J]. Molecular Ecology, 2003, 12(10): 2817 - 2833.
- [10] 徐梅英,李继姬,郭宝英,等. 基于线粒体 DNA 12S rRNA 和 CO III 基因序列研究中国沿海 7 个长蛸(*Octopus variabilis*)野生群体的遗传多样性[J]. 海洋与湖沼,2011,42(3):387 - 396.
- [11] 张辉,高天翔,庄志猛,等. 中国对虾养殖群体与野生群体线粒体控制区序列的比较[J]. 水产学报,2010,34(8):1149 - 1155.
- [12] 孔晓瑜,姜艳艳,相建海,等. 魁蚶线粒体 16S rRNA 和 CO I 基因片段序列测定及其应用前景[J]. 海洋科学,2001,25(12):46 - 48.
- [13] 毛阳丽,蔡厚才,李成久,等. 基于线粒体 CO I 与 16S rRNA 基因序列探讨贻贝属的系统发育[J]. 南方水产,2010,6(5):28 - 36.
- [14] 高俊娜,刘萍,李健,等. 利用 16S rRNA 和 CO I 基因序列对三疣梭子蟹不同群体遗传特征的分析[J]. 渔业科学进展,2010,31(5):59 - 68.
- [15] 马朋,刘萍,李健,等. 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)3 个野生群体 mtDNA 16S rRNA 序列差异及长臂虾科系统进化关系[J]. 海洋与湖沼,2012,43(1):174 - 179.
- [16] 宋娜,高天翔,王志勇. 中国近海路氏双髻鲨线粒体 DNA 控制区序列比较[J]. 水产学报,2012,36(8):1153 - 1158.
- [17] 陈丽梅,李琪,李赞. 4 种海参 16S rRNA 和 CO I 基因片段序列比较及系统学研究[J]. 中国水产科学,2008,15(6):935 - 942.
- [18] 韩俊英,李健,李吉涛,等. 脊尾白虾热休克蛋白 HSP70 基因的克隆及其表达分析[J]. 水产学报,2011,35(8):1130 - 1138.
- [19] Kelly M E. Analysis of deoxyribonucleic acid (DNA) sequence data using BioEdit [J]. Forensic DNA Biology, 2013, 129 - 132.
- [20] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data [J]. Bioinformatics, 2009, 25(11): 1451 - 1452.
- [21] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA 4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4. 0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596 - 1599.
- [22] Stillman J H, Reeb C A. Molecular phylogeny of eastern pacific porcelain crabs, genera *Petrolisthes* and *Pachycheles*, based on the mtDNA 16S rDNA sequence: phylogeographic and systematic

- implications [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2001, 19(2): 236 - 245.
- [23] 马朋, 刘萍, 李健, 等. 脊尾白虾 3 个野生群体线粒体 *CO I* 基因的遗传多样性及其系统发育分析 [J]. *渔业科学进展*, 2011, 32(6): 50 - 56.
- [24] 高俊娜, 刘萍, 李健, 等. 日本蟳线粒体 16S rRNA 和 *CO I* 基因序列比较分析 [J]. *中国海洋大学学报: 自然科学版*, 2010, 40(12): 57 - 63.
- [25] 李咏梅, 陈秀荔, 赵永贞, 等. 钦州湾牡蛎线粒体 16S rRNA 和 *CO I* 基因片段的序列变异分析 [J]. *广州海洋大学学报*, 2009, 29(3): 11 - 17.
- [26] Howland D E, Hewitt G M. Phylogeny of the coleopteran based on mitochondrial cytochrome oxidase I sequence data [J]. *Insect Molecular Biology*, 1995, 4(3): 203 - 205.
- [27] Spicer G B. Phylogenetic utility of the mitochondrial cytochrome oxidase gene; molecular evolution of the *Drosophila buzzatii* species complex [J]. *Molecular Evolution*, 1995, 41(6): 749 - 759.
- [28] Meyran J C, Monnerot M, Taberlet P. Taxonomic status and phylogenetic relationships of some species of the genus *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda) deduced from mitochondrial DNA sequences [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1997, 8(1): 1 - 10.
- [29] 戴艳菊, 刘萍, 高保全, 等. 三疣梭子蟹 4 个野生群体线粒体 16S rRNA 和 *CO I* 基因片段的比较分析 [J]. *中国海洋大学学报*, 2010, 40(3): 54 - 60.
- [30] Zheng X D, Wang R C, Wang X F, *et al.* Genetic variation in population of the common Chinese cuttle fish *Sepiella maindroni* (Mollusca: Cephalopoda) using allozymes and mitochondrial DNA sequence analysis [J]. *Journal of Shellfish Research*, 2001, 20(3): 1159 - 1165.
- [31] 李远宁, 马朋, 刘萍, 等. 三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 4 个野生群体 ITS1 序列分析及系统进化分析 [J]. *海洋与湖沼*, 2012, 43(4): 768 - 774.
- [32] 毕相东, 侯林, 刘晓惠, 等. 核糖体 RNA 基因在海洋动物分子系统学中的应用 [J]. *应用与环境生物学报*, 2005, 11(6): 779 - 783.
- [33] 刘帅, 李墨非, 叶嘉, 等. 基于线粒体 16S rRNA 和 *CO I* 基因序列探讨对虾属 (*Penaeus*) 物种系统发生关系 [J]. *生物学杂志*, 2012, 29(5): 37 - 42.

Sequence comparison and phylogenetic analysis of mtDNA 16S rRNA and CO I gene sequences in *Orithya sinica*

LIU Ping^{*}, DUAN Yafei, MAO Zhichao, LI Jitao, GAO Baoquan, LI Jian
(Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea
Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: To study the germplasm resources and genetic diversity in the wild population of *Orithya sinica*, the mitochondrial DNA 16S rRNA and CO I gene sequences were obtained from *O. sinica* wild populations by PCR amplification. A + T base content of 16S rRNA and CO I gene sequences were 67.7% and 61.4%, respectively, which were significantly higher than G + C base content. From 515 bp of 16S rRNA gene sequences, 4 haplotypes and 4 polymorphic sites were detected, and they were all singleton variable sites. As for 653 bp of CO I gene sequences, 11 haplotypes and 23 polymorphic sites were detected, including 18 singleton variable sites and 5 parsimony informative sites. CO I gene sequences have more variations than 16S rRNA gene sequences, indicating that CO I gene sequences were suitable for analysis of genetic diversity of *O. sinica*. The results of genetic distances and phylogenetic analysis of 16S rRNA and CO I gene sequences were consistent with each other, showing that *O. sinica* have much closer relationship with crabs of Portunidae, and crabs of Grapsidae were together with that of Ocypodidae, which were consistent with classical taxonomy. Differentiation time of 11 species of crabs and vertebrates was deduced based on the genetic distance of 16S rRNA gene sequences, and the results showed that the radiation differentiation time of four families of crabs was between Paleocene and Eocene. This study is expected to provide important information for the protection and utilization of *O. sinica* resources of China.

Key words: *Orithya sinica*; mtDNA; 16S rRNA gene; CO I gene; sequence analysis

Corresponding author: LIU Ping. E-mail: liuping@ysfri.ac.cn