

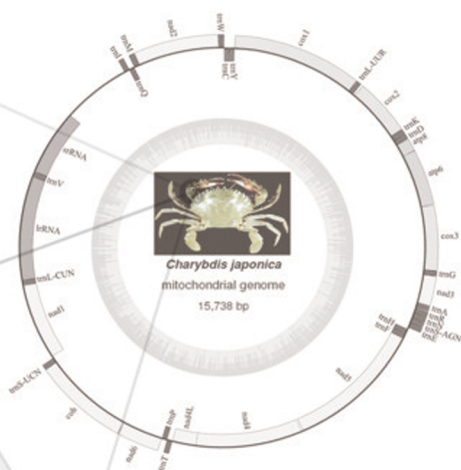
M

itochondrial DNA
of Crabs

蟹类线粒体

DNA研究

徐敬明 / 著



电子科技大学出版社

重庆文理学院学术专著出版资助项目

M

徐敬明 / 著

mitochondrial DNA
of Crabs

蟹类线粒体 DNA研究



电子科技大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

蟹类线粒体 DNA 研究 / 徐敬明著. —成都: 电子科技大学出版社, 2013. 11
ISBN 978-7-5647-2031-5

I. ①蟹… II. ①徐… III. ①蟹类—线粒体—基因工程—研究 IV. ①Q959.223.03

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 264625 号

内 容 提 要

本书在总结蟹类线粒体 DNA 组成、特征及其应用基础上, 重点阐述了笔者对厚蟹、方蟹及世界范围内其他研究者对蟹类线粒体 DNA 的研究成果; 对基于线粒体 DNA 分子标记的蟹类分子系统亲缘关系及其种群的遗传结构、分化情况、基因流及幼体扩散能力, 以及种群分布格局现状及其种群历史动态(是否受更新世冰期地质、气候或海流等的影响, 或存在种群扩张, 快速殖化, 群体瓶颈、隔离分化以及混匀等)对其世系结构和地理分化的影响等问题进行了分析探讨, 以揭示蟹类分子亲缘关系及其种群响应气候变化或环境变迁的机制。

本书可供分子系统学及分子系统地理学研究领域的研究生及研究人员阅读。

重庆文理学院学术专著出版资助项目

蟹类线粒体 DNA 研究

Mitochondrial DNA of Crabs

徐敬明 著

出 版: 电子科技大学出版社(成都市一环路东一段 159 号电子信息产业大厦 邮编: 610051)
策划编辑: 万晓桐
责任编辑: 万晓桐
主 页: www.uestcp.com.cn
电子邮箱: uestcp@uestcp.com.cn
发 行: 新华书店经销
印 刷: 成都君区印务有限公司
成品尺寸: 185mm×260mm 印张 6.25 字数 156 千字
版 次: 2013 年 11 月第一版
印 次: 2013 年 11 月第一次印刷
书 号: ISBN 978-7-5647-2031-5
定 价: 22.00 元

■ 版权所有 侵权必究 ■

- ◆ 本社发行部电话: 028-83202463; 本社邮购电话: 028-83201495。
- ◆ 本书如有缺页、破损、装订错误, 请寄回印刷厂调换。

目 录

第一章 蟹类线粒体 DNA 研究概况.....	1
1.1 蟹类线粒体 DNA 组成与特征.....	1
1.2 蟹类线粒体 DNA 多态性及其应用.....	3
1.2.1 线粒体 DNA 在蟹类分子系统学中的应用.....	4
1.2.2 线粒体 DNA 在蟹类分子群体遗传学中的应用.....	6
第二章 基于线粒体 DNA 的蟹类分子系统学.....	8
2.1 基于 12S rRNA 基因的蟹类分子系统学.....	9
2.1.1 基于 12S rRNA 基因的厚蟹分子系统分析.....	9
2.1.2 基于 12S rRNA 基因的牙买加中部溪流淡水蟹类分子系统分析.....	14
2.1.3 基于 12S rRNA 基因的 4 种青蟹分子系统分析.....	14
2.1.4 基于 12S rRNA 基因的中国沿海 10 种方蟹分子系统分析.....	15
2.2 基于 16S rRNA 基因的蟹类分子系统学.....	18
2.2.1 基于 16S rRNA 基因的厚蟹分子系统分析.....	18
2.2.2 基于 16S rRNA 基因的中国沿海 10 种方蟹分子系统分析.....	23
2.2.3 基于 16S rRNA 基因的东太平洋瓷蟹分子系统分析.....	26
2.2.4 基于 16S rRNA 基因的雕刻方蟹科构建.....	27
2.2.5 基于 16S rRNA 基因的台南泽蟹属蟹类分类系统的分子评估.....	29
2.2.6 基于 16S rRNA 基因的拟地蟹总科系统分类和生物地理学分析.....	30
2.2.7 基于 16S rRNA 基因的方蟹科蟹类系统发育关系重构.....	33
2.3 基于 COI 基因的蟹类分子系统学.....	34
2.3.1 基于 COI 基因的厚蟹分子系统分析.....	35
2.3.2 基于 COI 基因的中国沿海 10 种方蟹分子系统分析.....	46
2.3.3 基于 COI 基因的蟹类物种厘定.....	49
2.4 基于线粒体 DNA 多基因的蟹类分子系统学.....	52
2.4.1 基于 12S rRNA 和 16S rRNA 基因的蟹类分子系统分析.....	52
2.4.2 基于 16S rRNA 和 COI 基因的蟹类分子系统分析.....	55
2.4.3 基于 12S rRNA、16S rRNA 和 COI 等基因的蟹类分子系统分析.....	59

第三章 基于线粒体 DNA 的蟹类分子系统地理学.....	65
3.1 基于 COI 基因的蟹类分子系统地理学.....	66
3.1.1 基于 COI 基因的天津厚蟹和侧足厚蟹分子系统地理学.....	66
3.1.2 基于 COI 基因的印度洋锯缘青蟹分子系统地理学.....	76
3.1.3 基于 COI 基因的粗腿厚纹蟹群体遗传结构和分子系统地理学.....	76
3.1.4 基于 COI 基因的小黄食草蟹遗传结构和分子系统地理学.....	77
3.1.5 基于 COI 基因的波多黎各淡水蟹类分子系统地理学.....	77
3.1.6 基于 COI 基因的中国东海三疣梭子蟹的遗传分化.....	77
3.1.7 基于 COI 基因的北海道毛蟹的遗传分化和群体遗传结构.....	78
3.1.8 基于 COI 基因的海南岛拟穴青蟹群体遗传多样性.....	79
3.2 基于 16S rRNA 基因的蟹类分子系统地理学.....	79
3.3 基于 ND2 基因的蟹类分子系统地理学.....	81
3.4 基于 Cytb 和 COI 基因的蟹类分子系统地理学.....	81
3.5 基于 16S rRNA 和 COI 等基因的蟹类分子系统地理学.....	83
展 望.....	87
参考文献.....	88

第一章 蟹类线粒体 DNA 研究概况

动物线粒体 DNA 为细胞核外遗传物质, 较之核 DNA, 具有分子结构简单, 一级结构的碱基突变率高, 母性遗传, 核苷酸歧义度大, 进化速度快等特点。近年来, 随着分子生物学技术的发展, 关于动物线粒体 DNA 的研究日趋深入和广泛; 线粒体 DNA 作为一种有效的分子遗传标记, 对研究蟹类的起源进化、亲缘关系、群体遗传结构以及与其生产性能的关系等方面都具有重要意义。

1.1 蟹类线粒体 DNA 组成与特征

大量不同动物线粒体基因组全序列测定的结果表明, 蟹类等动物线粒体基因由大致为 15~20kb 的双链(重链 H 和轻链 L)环状 DNA 分子组成(如图 1.1 所示)。

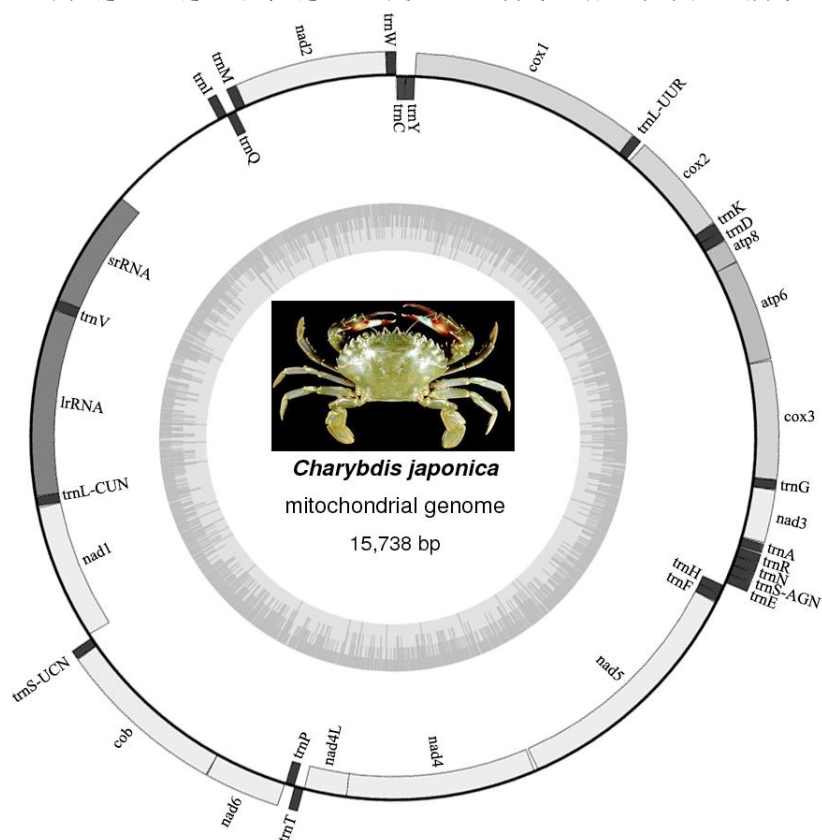


图 1.1 日本蠅线粒体 DNA 基因组结构图 (Liu et al,2010)

基因组含有 22 种 tRNA 基因、大小两种 rRNA 基因 (12S rRNA、16SrRNA) 和 13 种蛋白编码基因 (PCG), 后者包括了与线粒体内膜相结合的酶复合体的亚单位: 细胞色素 b (Cytb)、两个 ATP 酶的亚单位 (ATPase6、ATPase8)、3 个细胞色素 C (Cyt c) 氧化酶的亚单位 (COI, II, III)、7 个 NADH 还原酶复合体的亚单位 (ND1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6); 基因组中还有 1 个非编码区, 在脊椎动物中称 D-loop, 在无脊椎动物中称 AT-丰富区 (AT-rich region) 或控制区 (putative control region)。

迄今为止, 已有三疣梭子蟹等 18 种蟹类的线粒体 DNA 的全序列被测定, 其线粒体 DNA 的序列组成见表 1.1。

表 1.1 18 种蟹类线粒体 DNA 的序列组成

种名 Species	科 Family	序列长度 (bp) Length (bp)	基因组成 Base Composition of mitochondrial DNAs	GC (%)	GenBank 检索 号 GenBank accession number
<i>Eriocheir sinensis</i>	Varunidae	16354	13PCGs, 22tRNAs, AT-rich region	28.4	NC_006992
<i>Eriocheir japonica</i>	Varunidae	16352	13PCGs, 22tRNAs, AT-rich region	28.4	NC_011597
<i>Eriocheir hepuensis</i>	Varunidae	16335	13PCGs, 22tRNAs, AT-rich region	28.5	NC_011598
<i>Pseudocarcinus gigas</i>	Eriphiidae	15515	13PCGs, 22tRNAs, AT-rich region	29.5	NC_006891
<i>Callinectes sapidus</i>	Portunidae	16263	13PCGs, 22tRNAs, AT-rich region	30.9	NC_006281
<i>Portunus trituberculatus</i>	Portunidae	16026	13PCGs, 22tRNAs, AT-rich region	29.8	NC_005037
<i>Charybdis japonica</i>	Portunidae	15738	13PCGs, 22tRNAs, AT-rich region	30.8	NC_013246
<i>Scylla serrata</i>	Portunidae	15775	13PCGs, 22tRNAs, AT-rich region	27.5	NC_012565
<i>Scylla olivacea</i>	Portunidae	15723	13PCGs, 22tRNAs, AT-rich region	30.6	NC_012569
<i>Scylla tranquebarica</i>	Portunidae	15833	13PCGs, 22tRNAs, AT-rich region	26.2	NC_012567
<i>Scylla paramamosain</i>	Portunidae	15825	13PCGs, 22tRNAs, AT-rich region	27.0	NC_012572
<i>Geothelphusa dehaani</i>	Potamidae	18197	13PCGs, 23tRNAs, AT-rich region	25.1	NC_007379
<i>Xenograpsus testudinatus</i>	Xenograpsidae	15798	13PCGs, 22tRNAs, AT-rich region	26.1	NC_013480
<i>Gandalfus yunohana</i>	Bythograeidae	15567	13PCGs, 22tRNAs, AT-rich region	30.1	NC_013713
<i>Austinograea alayseae</i>	Bythograeidae	15620	13PCGs, 22tRNAs, AT-rich region	33.2	NC_020314
<i>Austinograea rodriguezensis</i>	Bythograeidae	15611	13PCGs, 22tRNAs, AT-rich region	31.2	NC_020312
<i>Pachygrapsus crassipes</i>	Grapsidae	15652	13PCGs, 22tRNAs, AT-rich region	33.7	NC_021754
<i>Ilyoplax deschampsii</i>	Dotillidae	15460	13PCGs, 22tRNAs, AT-rich region	30.4	NC_020040

由表 1.1 看出,蟹类线粒体基因组全序列的长度在 15.4~18.2kb 之间,其基因种类的组成类似于其他后生动物;GC 含量为 25.1%~33.7%,表现为 AT 含量明显高于 GC 含量之特点。18 种蟹类中,除 *Geothelphusa dehaani* 多了一个 trnL^{cun} 外,其他均为 13PCGs、2rRNAs 和 22tRNAs,它们的序列长度彼此差异较小,但 AT-丰富区或控制区的序列长度则在某些种类间差异较大,如 *Pseudocarcinus gigas* 是 593bp,但 *Callinectes sapidus* 却为 1435bp;从基因排列顺序上看,多数蟹类的基因排列顺序是相同的,如同日本蟳(*Charybdis japonica*)一样除了 trnA^{his} 的位置重排外(Liu et al,2010),其他基因排列顺序与其祖先泛甲壳类(Pancrustacean)的基因排列顺序相同;但是,同属于淡水蟹类的 *Geothelphusa dehaani* 和 3 种绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*、*Eriocheir japonica*、*Eriocheir hepuensis*)的基因排列明显不同于其他蟹类乃至其他节肢动物线粒体 DNA 的基因排列顺序。前者表现为 3 个基因(trnQ 、 trnL^{uuc} 和 trnH)位置序列的变化;而后者表现为 8 个基因、1 个基因块和 1 个非编码区发生了重新排列,造成了线粒体基因排列顺序的显著变化(Sun et al, 2005),形成泛甲壳类[即甲壳动物-昆虫支系(Crustacean-insect clade),又称泛甲壳类(Pancrustacean)]线粒体 DNA 的另一种基因重排类型。与十足目动物线粒体基因排列顺序的比较研究显示,在绒螯蟹中所发现的基因块的重排,对十足目高级阶元的系统发生研究是有用的信息,能是其适应于非海洋生活过程中快速进化以及承受更多选择压力的结果。

1.2 蟹类线粒体 DNA 多态性及其应用

线粒体 DNA 的多态性是指线粒体 DNA 在同种群体内或群体间表现出的变异现象,这种现象可以通过序列测定和限制性内切酶等方法来分析。线粒体 DNA 多态性可分为位点多态性和长度多态性两类,长度多态性大部分来源于串联重复序列,此外还有长度不等的插入和缺失。

线粒体 DNA 多态性检测的方法主要有:内切酶图谱法、限制性内切酶片段长度多态法(RFLP)、PCR-RFLP法、探针法(也称杂交法)和直接测序法。由于不同物种的线粒体 DNA 各有其特异性限制酶切图谱,因此,利用线粒体 DNA-RFLP 技术可研究物种的起源及其遗传分化、种内及种间的系统发生和亲缘关系,并可根据种内或种间线粒体 DNA 的歧异程度计算遗传距离来推算群体间的亲缘关系、分歧年代和演化过程等。如 Imai 等(2002a)用线粒体 DNA 的 RFLP 方法报道了青蟹(*Scylla*)种内种间遗传多样性和相互关系,结果证明 3 种青蟹间明显不同,种群内部有很小的遗传差异。直接测序法则是通过测定线粒体 DNA 全序列或部分基因片段序列来比较不同物种或个体间相关序列的差异,从而探讨进化关系。线粒体 DNA 的 RFLP 分析与 DNA 序列分析相比,不仅简单、快速、耗费低,而且从理论上讲,只要选择的酶足够多,就可检测到足够的变异,但它毕竟是一种间接检测 DNA 序列变异的方法,不能检测出酶切后相同长度 DNA 片段内的碱基变异;因此,与 DNA 序列相比,提供的信息有限。近年来,随着 PCR 技术的广泛应用,特别是全自动序列分析技术在分子生物学领域的推广,促进了线粒体 DNA 在动物起源、种群分化

与系统发生、分类及遗传等方面的重要进展；当前，线粒体DNA多态性的研究主要集中于DNA的序列分析。

1.2.1 线粒体 DNA 在蟹类分子系统学中的应用

随着 DNA 测序技术和生物信息学的飞速发展，分子系统学日臻完善。线粒体 DNA 因其具有独特的优点，在蟹类分子系统学研究中得到了比较广泛的应用。用线粒体 DNA 序列研究物种的进化关系时，首先要根据研究的对象与目的，选择适当的线粒体 DNA 区域，测定目标片段的序列；对近缘物种的研究，应选用进化速率较快的区域（如 COI），而对远缘物种的研究，应选用相对保守的区域（如 12S rRNA 和 16S rRNA）。然后通过线粒体 DNA 同源序列的比较，采用基本的加权规则以及一定的系统重建途径与方法（如简约法、距离法、似然法等）综合分析线粒体 DNA 序列，提取进化信息，构建分子系统进化树，从而为形态学分类提供佐证，并成为形态学分类的重要补充。

因蟹类全线粒体基因组测序的工作量较大，所以已测序的种类还比较少，仅上述 18 种蟹类。因此，对某些基因片段序列的研究就显得较有价值，已完成测序的有关蟹类的线粒体核酸序列为 12 315 个（2013 年 8 月 5 日，核苷酸数据库查询，关键词：Brachyura mitochondrial）。有关蟹类线粒体核酸序列的研究主要围绕 12S rRNA（1106 个）、16S rRNA（2640 个）和 COI（6355 个）基因片段展开，而对 COII（128 个）、Cytb（688 个）和 NADH（346 个）等基因则研究得相对较少；一般说来，12S rRNA 和 16S rRNA 基因作为非编码基因，具有较高的保守性，易于进行 PCR 引物的设计和扩增，适合于种及其以上分类阶元的差异研究；而 COI 基因作为编码基因，因其变异性较大，为 12S rRNA 和 16S rRNA 基因变异性的两倍以上，具有较佳的解析度，已成为相近种类之间及种内种群差异研究常用的分子标记。由于对蟹类的 12S rRNA、16S rRNA 和 COI 基因研究的相对集中，从而使得蟹类系统学在分子水平上有了较深入的研究。

高天翔等（2000a；2000b）进行了日本绒螯蟹的 12S rRNA 和 16S rRNA 基因片段的引物设计、PCR 扩增及序列测定，其研究结果表明日本绒螯蟹的碱基含量同其他甲壳类相似，都具有 AT 含量高，GC 含量低的特征；同时也证明利用动物线粒体 DNA 的同源性，参考其他节肢动物的已知序列设计甲壳类的相应片段的引物具有普遍性，为进一步进行日本绒螯蟹的系统进化研究及种质资源保护研究提供了理论依据。长期以来，绒螯蟹属（*Eriocheir*）种间的亲缘关系一直存在较大的争议。高天翔等（1999；2000c）先后对中华绒螯蟹和日本绒螯蟹的 12S rRNA 序列进行了测定，发现两种绒螯蟹该片段碱基序列长度相同，均为 457bp，两个群体共有 5 处碱基序列差异，以该序列片段的碱基差异作为遗传标记能更准确地探讨绒螯蟹属种间的系统进化关系。邱高峰等（2001）扩增了中华绒螯蟹和狭额绒螯蟹 16S rRNA 片段，并与日本绒螯蟹和中国台湾绒螯蟹的 16S rRNA 同源序列比较，发现中华绒螯蟹与日本绒螯蟹亲缘关系最近。孙红英等（2002a）对中国大陆绒螯蟹 16S rRNA 序列变异与分子鉴定标记进行了研究，认为 16S rRNA 的 PCR/RFLP 差异可作为正确鉴定中华绒螯蟹和合浦绒螯蟹的分子鉴定标记，16S rRNA 片段中 1 个固定位点的碱基替代可作为区分中华绒螯蟹两种单元型的分子鉴定标记。孔晓瑜等（2001）扩增了黄河口中华绒螯蟹线粒体细胞色素氧化酶 I 亚基基因（COI）片段，并比较它与珠江流域

中华绒螯蟹COI序列和日本绒螯蟹COI序列的差异,发现黄河口中华绒螯蟹与珠江流域中华绒螯蟹COI序列完全相同,而与日本绒螯蟹差异非常明显,倾向于支持存在中华绒螯蟹和日本绒螯蟹,或它们为同一种的两个地理亚种的观点。孙红英等(2003)测定了5种绒螯蟹类的16S rRNA部分片段的序列,构建了NJ树、ML树和MP树;序列歧异数据比较和各系统发生树都支持新绒螯蟹属(*Neoeriocheir*)为1个独立的属,不支持平绒螯蟹属(*Platyeriocheir*)是1个有效的属,绒螯蟹属所有其他成员聚为1个单系的分支,支持中华绒螯蟹、合浦绒螯蟹与日本绒螯蟹属于同一个物种。Tang等(2003)利用COI基因和核基因ITS对亚洲绒螯蟹的分子系统进行了研究,得出了与孙红英等相似的结论。而Zhao等(2002)研究了产于中国南北5个水系的绒螯蟹COI基因,支持中华绒螯蟹和日本绒螯蟹为不同的两个种。由此可见,关于绒螯蟹属蟹类的系统发育,很多学者还持有不同的见解,尚难统一。所以,有必要对其进行更深入的研究。

由于青蟹(*Scylla*)的形态分类也有很多争议,因此,围绕着青蟹的线粒体DNA开展了一些有意义的研究工作。Keenan等(1998)利用形态学特征、同功酶和COI、16S rRNA基因对青蟹属的分类进行了重新探讨,认为该属有4种青蟹:*S. serrata*、*S. olivacea*、*S. tranquebarica*和*S. paramamosain*;通过对COI和16S rRNA的序列分析,清楚地揭示了4种青蟹的遗传差别和关系(Keenan, 1999)。Imai等(2004)利用PCR-RFLP技术,以16S rRNA和ITS-1为标记成功将4种青蟹区分开,证明了*S. serrata*雄性与*S. olivacea*雌性杂交后代在自然界的存在(Imai et al, 2005);还用D-loop区域为标记确定了一青蟹种群幼体的祖先(Imai et al, 2002b),拓展了蟹类线粒体DNA的研究领域。高天翔等(2005)对3种青蟹的12S rRNA基因进行了分析,研究结果支持3种青蟹为不同物种的观点。王玉江等(2005)分析了中国和越南青蟹的16S rRNA基因,结果表明所研究的中国和越南青蟹均为*S. paramamosain*。为确定青蟹的分类地位及其资源的合理利用与保护提供了理论依据。

Schubart等(1998)对北美特别是牙买加的*Sesarma*属蟹类16S rRNA和COI基因进行了研究,探讨了该属17种蟹类之间的系统关系,估算了跨地峡的*Sesarma*属16S rRNA和COI的分子钟分别为0.65%/Myr和1.66%/Myr,而牙买加陆生*Sesarma*属蟹类的分子钟则分别为0.88%/Myr和2.33%/Myr,得出了牙买加*Sesarma*属为快速进化的陆生蟹类类群。Schubart等(2000a)利用16S rRNA对美洲方蟹科非海洋蟹类的系统发生、分类与进化进行了研究,确认了方蟹科现行大多数亚科的分类系统,对一些属进行了重新分类,且方蟹科不同血统蟹类在内陆的进化过程中形成了多种形式的非海洋生活蟹类并不同程度地脱离了海洋。Schubart等(2000b)还利用16S rRNA和COI基因对西北大西洋泥蟹的系统发生进行了研究,发现形态分类没有准确反映某些属的歧化。Harrison等(1999)利用形态特征和COI基因研究了*Cancer*属蟹类的分类系统和进化的历史。Wetzer等(2003)利用12S rRNA和16S rRNA基因对生活在热带珊瑚礁水域的*Carpilius*属蟹类进行了系统发生研究。Harrison等(2004)对大西洋*Austinixa*属蟹类的16S rRNA和COI基因进行了研究,发现16S rRNA基因较COI基因是揭示*Austinixa*属蟹类种间水平系统发生更有用的遗传标记。徐敬明等(2006)对山东日照沿海的两种相手蟹(*Sesarma*)的16S rRNA基因进行了研究,发现与北美的相手蟹类存有很大的遗传差异。

在约4886种或亚种(Ng et al, 2008)蟹类中,由于进行过线粒体DNA基因研究的还仅

占极少数, 而且在已经研究过的蟹类中, 大多也是只对1个或两个基因进行了研究, 加之基于不同的基因标记得到的结果也不尽相同, 因此, 关于蟹类种属乃至科之间的系统发育关系远未得到详细阐明, 亟待对其进行更广泛、更详尽和更全面的研究。

1.2.2 线粒体 DNA 在蟹类分子群体遗传学中的应用

利用蟹类线粒体 DNA 研究技术可了解蟹类种群的遗传结构, 并探求其形成的原因。当前以线粒体 DNA 作为分子遗传标记在蟹类分子群体遗传学中的应用主要表现在下列几个方面。

种群的识别: 传统的形态标记、细胞学标记、同工酶标记等已较多且成功地应用于某些蟹类的种群识别, 但再全面的形态学、细胞学和同工酶分析往往也很难清楚地揭示其重要的遗传变异, 而线粒体 DNA 的丰富变异已成为种群识别的重要分子标记。相关的工作揭示出类群间的线粒体 DNA 单倍型频率变化具有一定的范围, 且线粒体 DNA 的变异范围还与生境密切相关。Meyran 等 (1997) 对 *Gammarus* 属蟹类的 COI 基因进行了研究, 发现在其种内水平即种群个体之间存在着高水平的基因变异, 表明该基因是群体生物学研究中非常有效的分子标记。高天翔等 (2000d) 对日本绒螯蟹放流群体的 12S rRNA 基因进行了测序, 其碱基含量与日本绒螯蟹太平洋天然群体和日本海天然群体的碱基含量基本相似, 而太平洋群体与日本海群体的碱基序列完全相同, 说明二者之间发生着频繁的基因交流; 同时也说明 12S rRNA 基因序列非常保守。Fratini 等 (2002) 研究了 *Scylla serrata* 不同群体的 COI 基因, 发现群体间存在明显的遗传差异, 表明群体间基因流的减少。郭天慧等 (2004) 对三疣梭子蟹的 16S rRNA 和 COI 基因进行了研究, 发现其种内的变异较低, 也说明其个体之间存在着高水平的基因流动。

类群的起源和分化: 种群线粒体 DNA 单倍型的地理分化, 可以反映其地理分隔的历史。通过对不同种群线粒体 DNA 多态性的比较, 再与地质变迁的资料相结合, 可阐明现今种群相互间的亲缘关系, 推测它们的起源与分化, 还可探讨地理隔离等因素在物种形成中的作用。Tam 等 (1996) 研究了美国 *Emerita* 属蟹类的 16S rRNA 和 COI 基因, 认为其是 1 个古老的类群且它们的分布被历史上的气候和地理事件所改变。Chu 等 (1999) 对中国海 *Charybdis* 属部分蟹类的 COI 基因进行了研究, 发现 *C. affinis* 和 *C. japonica* 之间缺少基因交流, 且二者之间的遗传距离很小, 表明有很近的亲缘关系, 其辐射分化的时间最近, 大约发生在 260 万年前。Stillman 等 (2001) 对太平洋东部 *Petrolisthes* 属和 *Pachycheles* 属蟹类的系统发生地理学进行了研究, 估算 *Petrolisthes armatus* 的 16S rRNA 的分子钟为 0.53%/Myr, 并认为 0.53%/Myr 的分子钟对于近期的歧异 (recent divergences) 更为可靠。Sturmbauer 等 (1996) 计算了跨越地峡的 *Uca* 属蟹类 16S rRNA 的分子钟为 0.96%/Myr。

类群的地理分化: 用线粒体 DNA 方法检测地理隔离在蟹类群体间产生的遗传差异, 是近些年来蟹类分子群体遗传学研究的热点之一。蟹类的分布由于受到水系的限制, 存在着较广泛的地理隔离, 线粒体 DNA 单倍型的频率变异表现出明显的地理分化。所以, 利用种内线粒体 DNA 的遗传多样性, 结合地理分布的资料, 可从分子水平进行动物地理学的深入研究。Gopurenko 等 (1999) 分析了整个分布范围内 *Scylla serrata* 样本 COI 基

因单倍型的系统地理分布,认为其在距今的 100 万年内经历了起源于西太平洋并沿印度-西太平洋快速分布的历史扩散事件;还发现分布在澳大利亚北部的 *S. serrata* 与其他地区分布的该种青蟹在 549bp 的 COI 序列上有大约 2% 的差异,推测分布在澳大利亚北部的 *S. serrata* 可能是该属的 1 个新种。Daniels 等(2002)利用 12S rRNA、16S rRNA、COI 基因结合形态学指标及等位酶位点对非洲南部淡水蟹类(*Potamonautes*)的动物区系进行了研究,对数据的综合分析表明小体型山间溪流蟹类聚为一支,大体型河流蟹类聚为另一支,明显地形成了其不同的生物地理类型。Pfeiler 等(2005)研究了东太平洋的 *Callinectes bellicosus* 9 个群体的 COI 和 Cytb 基因,发现其群体遗传结构缺乏,表明在一个广阔的地理区域存在着群体之间的高水平的基因流动,且其群体扩展的时期在更新世。

可见,不同蟹类的群体的遗传结构和基因流动是有明显差异的,主要表现为两种情况:其一是群体遗传结构缺乏,群体间存在着频繁的基因交流;其二是群体间存在着明显的遗传差异,群体间缺乏基因交流或基因流动减少。此外,不同蟹类的辐射分化的时间差异也较大。所有这些都是与古地质、古气候的变迁紧密关联的,这些历史上的气候和地理事件(特别是过去 100 万年所经历的一系列冰期-间冰期变化)必然对蟹类的遗传多样性的数量及分布产生了强烈的影响。但蟹类的遗传结构是如何受到影响的,还有待于从对更多蟹类的多个线粒体 DNA 基因的研究中获得。

关于蟹类线粒体 DNA 的研究主要集中在国外,国内起步较晚,主要对绒螯蟹、梭子蟹及青蟹等经济种类进行了零星研究。相对于鱼类、鸟类及哺乳类来讲,蟹类的线粒体 DNA 的分子标记的种类还较少,如对蟹类线粒体 DNA 控制区等方面的研究几乎还是空白。由于对蟹类线粒体 DNA 的研究还不够细致和系统,加之不同研究者所使用的扩增引物的差异及序列分析处理方法的不同,迄今为止也没有形成统一的分子钟及关于属种等分类阶元之间遗传距离或遗传差异的标准。目前,在进行物种分类、系统进化及群体遗传等研究时,已有将遗传多样性分析结果与物种形态、生理特征、生态环境及地理分布等因素综合起来考虑的趋势,以便得出一个更客观、系统而深入的认识。随着分子生物学的发展和蟹类遗传多样性研究技术的不断完善,线粒体 DNA 技术在蟹类的系统发育、群体遗传及生物地理学等方面的应用会越来越广,并将为进一步研究其种群遗传、保护生物学和渔业资源管理开拓更广阔的前景。

第二章 基于线粒体 DNA 的蟹类分子系统学

生物系统学 (Systematics) 是研究物种的发生系统及其进化过程中相互关系的科学。是以系统学的方法研究生物的相互关系和系统发育, 阐述生物起源演化的进程, 并力求使揭示的这一过程最大限度地符合自然本身。传统的生物系统演化及物种多样性研究, 主要基于形态学和解剖学证据作为标记, 而主要根据形态性状的经典分类有一定的局限性, 有些毫不相干的物种因为长期生活在共同的环境中会逐渐演化出相似的形态性状, 这种相似性往往会给分类造成麻烦; 同时, 由于可提供的有效信息较少, 无法满足系统发育分析的需要。

因此, 传统的形态学分类受到诸多限制, 人们在对物种的鉴定和自然分布等方面存在着认识上的差异, 从而影响到研究成果的准确性和可比性; 致使不同研究者对分类阶元的划分和某些种的归属问题可能产生不同的见解。所以说, 生物系统学成为生命科学中争议最多的领域之一。传统的系统与分类的理论基础都是建立在分类群的性状分析之上的, 这些性状都是表现型; 从分子遗传学角度来看, 表现型的差异归根结底应追溯到基因型的差异即在 DNA 序列上的差异。这种对基因序列差异的比较研究无疑为系统与进化提供了最直接的证据。

分子系统学 (Molecular Phylogenetics) 通过检测生物大分子所包含的遗传信息, 定量地分析和解释这些分子数据在物种分类、系统发育和进化上的意义, 从而在分子水平上研究生物多样性、系统发育和遗传演化的一门科学。分子系统学是近 30 年来发展起来的一门综合性的前沿学科, 研究结果对于保护生物多样性 (其是遗传多样性) 揭示生物进化历程及机理具有十分重要的意义。

分子系统学的研究方法主要有分子细胞遗传学 (Molecular Cytogenetics)、分子杂交 (DNA-DNA Hybridization)、核酸限制性内切酶酶切位点分析 (Restriction Site Analysis) 和核酸序列分析等。在上述几种研究方法中, 目前最常用也最为方便的方法是直接测序法。分子数据的采用丰富了系统学研究的手段, 极大地推动了这一学科的发展。通常假定同源序列都是从同一祖先不断进化而来的, 在物种的进化过程中, 基因序列发生了取代、插入或缺失, 从而最终导致了物种的分化。人们在分子数据的收集和分子系统学应用上存在着一些争论, 大多数学者认为分子学特征较形态学特征有更大的优越性, 如 DNA 仅有 4 种碱基组成、碱基数量大、碱基之间相互独立、容易比较它们之间的差异以及可完全排除环境因素的干扰等, 这是形态学特征无法做到的, 所以认为分子学特征适合于分类及系统进化的研究。但在分子学研究中有时缺乏在形态学比较中有代表性的分类群, 有经验的形态学家基于众多的样本群体进行研究; 而分子系统学家则被迫用有限的样本, 靠测定几个样本作为代表来产生系统树。如果单从分子角度来说, 分子系统树间的不一致如同形态学上的不一致一样存在普遍和显著性, 但在一些形态学数据不完整、或存在缺陷、或很难分析的情况下, 分子系统学就显示出强大的应用能力。所以, 形态学特征

与分子学特征是相互补充的,只要选用适合的分析方法进行研究,就会得出一致性的结论。如果把形态学特征与分子学特征结合起来研究,对生物系统进化过程的解释将会更加合理和完美。分子系统学的新近进展,已经为生物分类等问题的解决提供了许多方面的崭新见解。

对 DNA 序列进行系统发育分析的主要步骤是:序列比对、建立取代模型、进化树构建以及进化树评估。建树的方法主要有距离法和特征法,距离法的代表是算术平均的不加权的组对法(UPGMA)、最小进化法(ME)和邻接法(NJ);特征法中最常采用的是最大简约法(MP)和最大似然法(ML)。近些年来,越来越多的人使用贝叶斯方法(BI)进行建树。对同一组数据采用不同的建树方法进行分析获得的结论有时也存在着差异;对一组数据来说,推断的进化树的数量是十分巨大的,而其中只能有一种树完全真实地反映了真实的进化关系,因此,当样本的数量很大时,无论采用何种建树方法所得到的任何推测树,要完全等同于真实的进化树都是十分困难的。分子系统学的研究表明,有些结果与传统形态分类是矛盾的;而有些则很好地支持了形态分类的结果。目前,分子分类的结果还不足以推翻建立在形态分类基础上的进化关系,但是却有助于对形态分类的结果进行验证,这是对形态分类的有益补充。

近些年来,线粒体 DNA 的 12S rRNA、16S rRNA 和 COI 基因由于其通用引物的有效性、实用性及其适宜的变异水平,在蟹类分子系统学中得到了广泛应用,成为推断种间系统发生关系的重要分子标记。

2.1 基于 12S rRNA 基因的蟹类分子系统学

线粒体 DNA 12S rRNA 基因序列经常被用于蟹类分子系统学的研究,因其具有较高的保守性,易于进行 PCR 引物的设计和扩增,多用于蟹类种及其以上分类阶元的差异研究。

2.1.1 基于 12S rRNA 基因的厚蟹分子系统分析

2.1.1.1 厚蟹 12S rRNA 基因序列及变异

徐敬明对天津厚蟹、侧足厚蟹、伍氏厚蟹和日本厚蟹的 12S rRNA 基因进行了 PCR 扩增(引物:12L4: 5'-GTGCCAGCCGCCGCGTTA-3', 12H2: 5'-ATGCACTTTCCA GTACATCTAC-3')和序列测定。天津厚蟹和侧足厚蟹 12S rRNA 基因片段长度均为 568bp,每个群体的 3 个个体之间没有序列差异。天津厚蟹 6 个群体的所有个体的序列都相同;侧足厚蟹出现两个单倍型(Haplotype),泉州、宁波群体的所有个体的序列都相同,为 1 个单倍型且与天津厚蟹的序列完全相同即二者共享同 1 个单倍型(Hap1),侧足厚蟹海口、北海群体的所有个体的序列都相同,为另一个单倍型(Hap2),与前 8 个群体的个体间序列差异(变异度)为 0.53%,二者比对分别在 109 位点有 1 个 C/A 颠换、359 位点有 1 个 G/A 转换、417 位点有 1 个 A/G 转换。

伍氏厚蟹 12S rRNA 基因片段长度均为 565bp,每个群体的 3 个个体之间没有序列差异;出现两个单倍型,日照群体和塘沽群体各共享 1 个单倍型,两个群体的个体间序列

差异为 0.71%，二者比对分别在 135 位点有 1 个 G/C 颠换、392 位点有 1 个 G/A 转换、421 位点有 1 个 T/C 转换、478 位点有 1 个 T/C 转换。

日本厚蟹 12S rRNA 基因片段长度均为 565bp，3 个个体之间没有序列差异。

上述厚蟹 12S rRNA 基因片段的 A、T、G、C 含量见表 2.1，它们的 A、T、G、C 含量只有略微的差异，A+T 含量明显高于 G+C 含量。

表 2.1 厚蟹 12S rRNA 基因片段碱基组成

代码 ID	种类 Species	采集地点 Site of collection	碱基含量（%）					序列长度 Total length/bp
			Content					
			A	T	G	C	A+T	
HKL	侧足厚蟹 <i>H. latimera</i>	海南海口	41.0	34.9	15.0	9.1	75.9	568
BHL		广西北海	41.0	34.9	15.0	9.1	75.9	568
QZL		福建泉州	40.8	34.9	15.0	9.3	75.7	568
NBL		浙江宁波	40.8	34.9	15.0	9.3	75.7	568
NBT	天津厚蟹 <i>H. tientsinensis</i>	浙江宁波	40.8	34.9	15.0	9.3	75.7	568
RZT		山东日照	40.8	34.9	15.0	9.3	75.7	568
WHT		山东威海	40.8	34.9	15.0	9.3	75.7	568
TGT		天津塘沽	40.8	34.9	15.0	9.3	75.7	568
PJT		辽宁盘锦	40.8	34.9	15.0	9.3	75.7	568
DDT		辽宁丹东	40.8	34.9	15.0	9.3	75.7	568
RZJ	日本厚蟹 <i>H. japonica</i>	山东日照	38.9	34.7	16.5	9.9	73.6	565
RZW	伍氏厚蟹	山东日照	39.5	35.2	15.6	9.7	74.7	565
TGW	<i>H. wuana</i>	天津塘沽	39.3	35.6	15.9	9.2	74.9	565
*	短螯厚蟹 <i>H. leachii</i>	肯尼亚 Kenya	39.1	34.2	15.5	11.2	73.3	412
DLD	宽身大眼蟹 <i>Macrophthalmus dilatatum</i>	辽宁大连	39.0	35.7	16.5	8.8	74.7	577
平均 Average			40.3	34.9	15.3	9.5	75.2	557.6

*短螯厚蟹(*H. leachii*)序列来自 GenBank，检索号(Accession number)为：DQ343258；HK：海口，BH：北海，QZ：泉州，NB：宁波，RZ：日照，WH：威海，TG：塘沽，PJ：盘锦，DD：丹东（下同）

天津厚蟹和侧足厚蟹的共享单倍型（Hap1）与日本厚蟹（RZJ3）比对共有 56 处变异和 7 处插入/缺失，其中转换 41 处，颠换 15 处，序列差异为 9.95%（不包括插入/缺失）。侧足厚蟹海口、北海群体的共享单倍型（Hap2）与日本厚蟹（RZJ3）比对共有 58 处变异和 7 处插入/缺失，其中转换 42 处，颠换 16 处，序列差异为 10.30%（不包括插入/缺失）。天津厚蟹和侧足厚蟹的共享单倍型（Hap1）与伍氏厚蟹日照群体（RZW3）比对共有 52 处变异和 7 处插入/缺失，其中转换 37 处，颠换 15 处，序列差异为 9.24%（不包括插入/缺失）；而与伍氏厚蟹塘沽群体（TGW3）比对共有 51 处变异和 7 处插入/缺失，其中转

换 37 处, 颠换 14 处, 序列差异为 9.06% (不包括插入/缺失)。侧足厚蟹海口、北海群体的共享单倍型 (Hap2) 与伍氏厚蟹日照群体 (RZW3) 比对共有 54 处变异和 7 处插入/缺失, 其中转换 38 处, 颠换 16 处, 序列差异为 9.59% (不包括插入/缺失); 而与伍氏厚蟹塘沽群体 (TGW3) 比对共有 53 处变异和 7 处插入/缺失, 其中转换 38 处, 颠换 15 处, 序列差异为 9.41% (不包括插入/缺失)。日本厚蟹 (RZJ3) 与伍氏厚蟹日照群体 (RZW3) 比对共有 26 处变异, 无插入/缺失, 其中转换 24 处, 颠换 2 处, 序列差异为 4.60%; 而与伍氏厚蟹塘沽群体 (TGW3) 比对共有 22 处变异, 无插入/缺失, 其中转换 21 处, 颠换 1 处, 序列差异为 3.89%。短螯厚蟹与天津厚蟹和侧足厚蟹的共享单倍型 (Hap1) 比对共有 35 处变异和 168 处插入/缺失, 其中转换 21 处, 颠换 14 处, 序列差异为 8.62% (不包括插入/缺失); 而与侧足厚蟹海口、北海群体的共享单倍型 (Hap2) 比对结果与 Hap1 的比对结果相同。短螯厚蟹与伍氏厚蟹日照群体 (RZW3) 比对共有 46 处变异和 163 处插入/缺失, 其中转换 23 处, 颠换 23 处, 序列差异为 11.30% (不包括插入/缺失); 而与伍氏厚蟹塘沽群体 (TGW3) 比对共有 43 处变异和 163 处插入/缺失, 其中转换 20 处, 颠换 23 处, 序列差异为 10.57% (不包括插入/缺失)。短螯厚蟹与日本厚蟹 (RZJ3) 比对共有 52 处变异和 163 处插入/缺失, 其中转换 28 处, 颠换 24 处, 序列差异为 12.78% (不包括插入/缺失) (如图 2.1 所示)。

```
[
[      1111222233 3444444455 5555556666 7777888888 9990000011 1111222333 ]
[      0135456912 9012346812 3457893456 1237235678 0120245612 3456569045 ]
DLD    GTGATTATGG GCGCTAAATT AGTAATAAAT GCAGTGTTAT ATAGATGTTT GGGCAAGGGA
H.leachii -----
RZJ3    ACAG..TGT. A.T.AGG-.A .AATTAGGGC AAGAC.AATA TGTA.AA-C. TAATG.ATAG
RZW3    ACAG..TGT. AAT.AGG-.A GAACTAGGGC AAGACAAATA TGTAAGAA-.. TA.TGGATAG
TGW3    ACAG..TGT. AAT.AGG-.A GAACTAGGGC AAGACAAATA TGTAAGAA-.. TA.TGGATAG
Hap2    A.AGCA-GTA AATAGG.-AA TAA.TA..G. AAGAC.AATA TATA.AA-.A TAAT..A.AG
Hap1    A.AGCA-GTA AATAGG.-AA TAA.TA..G. AAGAC.AATA TATA.AA-.C TAAT..A.AG

[      1111111111 1111111111 1111222222 2222222333 3333333333 3333333333 ]
[      3366666667 7777778888 8889001366 6789999000 0000013344 4445566666 ]
[      7901456791 2346780124 6899582323 4423456123 4568902524 6891314578 ]
DLD    TAACTTAAAG GGAGAGTAAA GTTGGTGTCT ATTACTTTTA ATAATTGATA AGAATTTTAA
H.leachii --T.AA.CGA A.G..ACCT. -.AAAACTA GAAAGGCC..G T.G---TGCT ..G.-A.A.G
RZJ3    GT.T..CT.A T..TTA.T. .-...AAACTA TAGG.C.AA. -----TGCT G.GG-AC.G.
RZW3    CT.T..CT.A T..TTA.TT. -...AAACTA TAAG...AA. -----TGCT GAG.-A..GG
TGW3    GT.T..CT.A T..TTA.TT. -...AAACTA TAAG...AA. -----TGCT GAG.-A..GG
Hap2    AT.T..CT.A TA.ATA.CTG -CA.AAACTG TAAGT.CAA. TA.---TGCT G.GG-A...G
Hap1    AT.T..CT.A TA.ATA.CTG -CA.AAACTG TAAGT.CAA. TA.---TGCT G.GG-A...G

[      3333333334 4444444444 4444444444 4444444444 4444555555 55555555 ]
[      6777777790 0000111233 3344444555 5556666788 9999000001 12355566 ]
[      9012467880 3456023503 4901249134 5790134279 0134467890 98934526 ]
DLD    AAGATTTACT AAGTGGGAAT TCTATGGTAT TGAATGCGTA TAA-ATTAAA CA-GCCCA
H.leachii TTAT.AA.T. GGCC.AA.-A .T.GCAAC.A AATT..TA.. GTGACA.T.. TGCATTTG
RZJ3    TTT.CGG.TA .G.CTAA.-A .TG.C.ACGA AATTC...CT .TG-CAA..G TG-ATTT.
RZW3    TTT.CGA.TA G..CTAA.-A CTA.C.AC.A AATT....T .CG-CAA... TG-ATTT.
TGW3    TTT.CGA.TA GG.CTAA.-A .TA.C.AC.A AATT....T .TG-CAA... TG-ATTT.
Hap2    TT.T.G.TT. GG.C.AAG-A CTGGCAA..A AATT.ATA.C .TG-CAACG. TG-ATTT.
Hap1    TT.T.G.TT. GG.C.AA.-A CTGGCAA..A AATT.ATA.C .TG-CAACG. TG-ATTT.
```

图 2.1 厚蟹及外群 12S rRNA 基因片段变异位点

2.1.1.2 厚蟹种内和种间遗传距离与系统发育分析

利用 Kimura 双参数法计算得到了厚蟹种内和种间遗传距离（如表 2.2 所示）。种内遗传距离：天津厚蟹和侧足厚蟹（视为同一种）Hap1 与 Hap2 之间的遗传距离（种内平均遗传距离）为 0.53%；伍氏厚蟹种内平均遗传距离即日照群体(RZW3)与塘沽群体(TGW3)之间的遗传距离为 0.71%。种间净遗传距离：日本厚蟹和伍氏厚蟹之间的净遗传距离为 4.07%；而与天津厚蟹和侧足厚蟹之间的净遗传距离为 10.77%。伍氏厚蟹与天津厚蟹和侧足厚蟹之间的净遗传距离为 9.46%。短螯厚蟹与日本厚蟹、伍氏厚蟹及天津厚蟹和侧足厚蟹之间的净遗传距离分别为：14.08%、11.49%和 11.38%。

表 2.2 厚蟹种内和种间遗传距离

	DLD	<i>H. leachii</i>	RZJ3	RZW3	TGW3	Hap2	Hap1
DLD							
<i>H. leachii</i>	0.2222						
RZJ3	0.2554	0.1408					
RZW3	0.2554	0.1229	0.0481				
TGW3	0.2552	0.1141	0.0405	0.0071			
Hap2	0.2712	0.1165	0.1124	0.1038	0.1018		
Hap1	0.2714	0.1165	0.1082	0.0997	0.0977	0.0053	

以宽身大眼蟹（DLD）为外群，基于 12S rRNA 基因片段序列采用 NJ 法和 MP 法构建的厚蟹系统进化树的拓扑结构基本一致（如图 2.2，图 2.3 所示）。天津厚蟹和侧足厚蟹的 10 个群体首先聚到一起，支持率为 100%；伍氏厚蟹日照群体与塘沽群体聚在一起后又与日本厚蟹聚为一支，表明伍氏厚蟹与日本厚蟹的亲缘关系较近。

天津厚蟹 6 个群体的所有个体的 12S rRNA 基因片段序列都相同；侧足厚蟹出现 2 个单倍型，泉州、宁波群体的所有个体的序列都相同，为 1 个单倍型且与天津厚蟹的序列完全相同即二者共享同 1 个单倍型，侧足厚蟹海口、北海群体的所有个体的序列都相同，为另一个单倍型，即侧足厚蟹一半的个体与天津厚蟹序列相同共享同一单倍型。NJ 法和 MP 法构建的系统进化树显示天津厚蟹和侧足厚蟹的 10 个群体首先聚到一起，且支持率为 100%。尽管天津厚蟹和侧足厚蟹的外形非常相似，难以区分，但由于雄性个体下眼缘隆脊（突起）形状的不同，而一直将其分为独立的 2 个种（Dai et al,1991；Sakai et al,1980）。天津厚蟹和侧足厚蟹二者均有许多个体（其中很多个体分布在不同地域）共享同一单倍型，具有相同的序列，揭示天津厚蟹和侧足厚蟹应为同一种蟹类。NJ 法和 MP 法构建的系统进化树显示天津厚蟹和侧足厚蟹的 10 个群体的所有个体或单倍型首先聚到一起，成为独立的 1 支，且都具有很高的支持率，也支持二者为同一物种。