

# 基于线粒体 COI 基因序列 探讨长江华溪蟹的遗传分化

郑芳, 吕秀玲, 孙红英, 赵强

(南京师范大学生命科学学院, 江苏省生物多样性与生物技术重点实验室, 江苏 南京 210097)

**[摘要]** 测定了长江华溪蟹 3 个亚种, 包括指名亚种, 桐柏亚种和陕县亚种共 39 个样本的线粒体细胞色素氧化酶亚基 I (COI) 基因部分的序列。重建的系统发生结果显示, 长江华溪蟹分化成 2 个分支, 一支代表雄性第 1 腹肢末节呈平直型的指名亚种支; 另一支则代表雄性第 1 腹肢末节弯向背内方的内弯型支, 包括稍向内弯的桐柏亚种和明显内弯的陕县亚种在内。在内弯型支内, 桐柏亚种和陕县亚种之间的遗传距离为 0.018, 是两大分支间的 1/10。提示长江华溪蟹 COI 基因的遗传分化与其雄性第 1 腹肢末节弯曲程度的形态分化基本一致。

**[关键词]** 长江华溪蟹, 形态变异, 遗传分化, COI 基因

**[中图分类号]** Q953 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2006)02-0103-03

## Genetic Differentiation of *Sinopotamon yangtsekiense* based on Mitochondrial Cytochrome Oxidase Subunit I Gene

Zheng Fang, Lü Xiuling, Sun Hongying, Zhao Qiang

(Jiangsu Key Laboratory for Biodiversity and Biotechnology, School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

**Abstract:** Partial sequence of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene (COI) was examined for 39 specimens representing three subspecies of *Sinopotamon yangtsekiense*, *S. y. yangtsekiense*, *S. y. tongbaiense* and *S. y. shanxianense*. The reconstructed phylogenetic results indicate that *Sinopotamon yangtsekiense* diverge into two clades: one clade characterized by the straight terminal segment of male pleopod 1, the other one characterized by the terminal segment being curved towards dorso-innerly, i. e. *tongbaiense* curved slightly and *shanxianense* curved sharply. The genetic divergence between the straight and the curved is 0.08, while the genetic divergence between the curved slightly and the curved sharply is as low as 0.018. All these are in agreement with the differentiation in morphological feature.

**Key words:** *Sinopotamon yangtsekiense*, morphological variation, genetic differentiation, COI gene

## 0 引言

长江华溪蟹 (*sinopotamon yangtsekiense*) 隶属溪蟹总科 (Potamoidea), 溪蟹科 (Potamidae), 华溪蟹属 (*Sinopotamon*)。由于山脉、水系等自然地理条件的限制, 溪蟹的地理分化与形态变异极为突出。长江华溪蟹主要分布于长江、淮河流域, 经淮河上游 (见于河南桐柏), 向西北扩展至黄河流域 (见于河南陕县)。戴爱云<sup>[1]</sup>依据形态学特征, 将长江华溪蟹划分成 3 个亚种, 即指名亚种 (*S. y. yangtsekiense* Bott, 1967), 桐柏亚种 (*S. y. tongbaiense* Dai et Chen, 1981) 和陕县亚种 (*S. y. shanxianense* Dai et Chen, 1981)。

从遗传分化的角度阐明亚种之间的形态变异与地理分化, 是目前动物系统地理学研究的热点问题之一。随着 PCR 技术和 DNA 测序技术的日趋成熟, 通过 DNA 序列信息了解物种之间的遗传分化变得越来越普遍。线粒体 DNA 以其进化速率快, 遵循母系遗传等特点, 成为种群遗传学研究的有效标记之一。本文以线粒体细

收稿日期: 2005-04-28.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (3047023, 30271023)。

作者简介: 郑芳, 女, 1980—, 硕士研究生, 主要从事动物学的学习与研究。E-mail: zhengfang1102@126.com

通讯联系人: 孙红英, 女, 1964—, 博士, 副教授, 主要从事动物学的教学与研究。E-mail: sunhongying@njnu.edu.cn

胞色素氧化酶亚基 I (Cytochrome oxidase subunit I, COI) 基因片段为标记,以采自 3 个亚种模式产地的长江华溪蟹为材料,通过测定、分析 COI 基因的部分序列,从分子水平探讨长江华溪蟹亚种的遗传分化。

1 材料和方法

1.1 实验材料

研究使用的长江华溪蟹包括采自 3 个亚种模式产地的标本 39 只(表 1)。以采自浙江开化的 2 只凹肢华溪蟹(*S. depressum*)标本为外群。所有标本用 95% 乙醇浸制保存。

表 1 研究使用的长江华溪蟹标本

亚种	采集地	个体数	单元型编号	序列在 GenBank 中的检索号
指名亚种 <i>S. y. yangtsekiense</i>	安徽广德	9	H12 ~ 14	AY896808 ~ AY896810
	安徽宁国	5	H15 ~ 19	AY896801 ~ AY896815
桐柏亚种 <i>S. y. tongbaiense</i>	河南桐柏	10	H24 ~ 26, H30	AY896819 ~ AY896821
陕县亚种 <i>S. y. shanxianense</i>	河南陕县	15	H28 ~ 29	AY896824 ~ AY896825

1.2 总 DNA 提取、PCR 扩增及序列测定

取腹肢肌肉约 0.05 g,用 SDS/蛋白酶 K 裂解,酚/氯仿法提取总 DNA。根据蟹类 COI 基因序列<sup>[2-5]</sup>中的保守区设计引物 HCC1 和 CCIL<sup>[6]</sup>,用于扩增长江华溪蟹 COI 基因约 657 bp 的片段。PCR 反应体积为 30  $\mu$ L,含 10  $\times$  Buffer 3.0  $\mu$ L,0.2 mmol/L dNTP,2.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,引物各 0.6  $\mu$ L,1U Taq 酶(Promega)以及约 50 ng 的 DNA 模板。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 4 min,然后进行循环反应如下,95 $^{\circ}$ C 变性 40 s,52 $^{\circ}$ C 退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s,待循环 30 次后,在 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。反应在 PTC-200 型热循环仪(MJ 公司)上完成。PCR 产物经 1% 琼脂糖 EB 凝胶电泳检测后,使用纯化试剂盒(维特洁公司)进行纯化。纯化后的 PCR 产物使用 ABI BigDye 测序试剂盒,在 ABI 3700 型全自动遗传分析仪上进行序列测定。

1.3 系统发生分析

测得的序列经 SeqMan II(DNASTAR Inc)软件拼接,并通过反向重复测序进行校正。所获序列用 Clustal X 软件<sup>[7]</sup>进行比对。用 MEGA 2.1 软件<sup>[8]</sup>中的 Kimura 双参数法计算遗传距离。用 Modeltest 3.06<sup>[9]</sup>计算位点间碱基替代率的 Gamma 分布参数。用 PAUP 4.0 b10 软件包<sup>[10]</sup>以邻接法(NJ),最大简约法(MP)和最大似然法(ML)构建分子系统树。系统分析以凹肢华溪蟹的相应序列做外群(序列在 GenBank 中的检索号为 AY896826 ~ 7),用自引导检验(Bootstrap test)估计各分支的自引导值,重复检验次数为 1 000 次。

2 结果

2.1 序列分析

39 条 COI 基因部分序列比对后共有 657 个位点。其中多态位点 84 个,简约信息位点 73 个;碱基转换与颠换的比值达到 13.71。基于其碱基变异,定义了 14 种单元型(表 1)。

2.2 系统发生分析

用 NJ,MP 和 ML 法构建的系统发生树拓扑结构基本一致(图 1)。结果表明,长江华溪蟹形成 2 个分支。其中,一支由所有的指名亚种标本组成,称为指名支;另一支包括了桐柏和陕县 2 个亚种的所有标本,称为桐陕支,2 分支的支持率达到 100%。值得注意的是,在桐陕支中,陕县亚种的单元型聚为单独的一支,位于由桐柏亚种单元型构成的梯状分支的最内部,暗示了陕县亚种源于桐柏亚种的派生关系。

2.3 遗传距离分析

表 2 给出了 3 个亚种种群内和种群间的遗传距离。指名亚种与陕县亚种种群之间的遗传距离最大,达到 0.085;其次为指名亚种与桐柏亚种种群之间的遗传距离(0.075);而桐柏与陕县 2 个亚种种群之间的遗传距离(0.018)甚至低于指

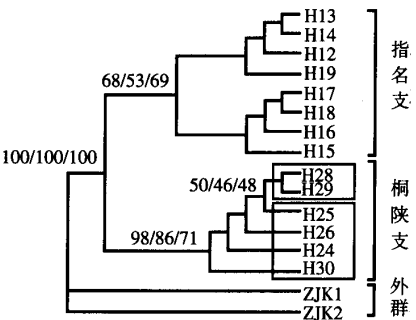


图 1 根据 COI 部分序列构建的长江华溪蟹 NJ, MP 和 ML 树  
支上数值从左向右依次为 NJ,MP 和 ML 树重复检验的自引导值

名亚种种群内的遗传距离(0.041).

表2 长江华溪蟹3个亚种种群内和种群间的遗传距离(基于 Kimura 双参数模型)

	亚种内	亚种间		
		指名亚种	桐柏亚种	陕县亚种
指名亚种	0.041 ± 0.006 *			
桐柏亚种	0.025 ± 0.004 *	0.075 ± 0.009 *		
陕县亚种	0.002 ± 0.001 *	0.085 ± 0.011 *	0.018 ± 0.003 *	

\* 标准误差.

3 讨论

长江华溪蟹已有的3个亚种在形态学上的差异,包括外眼缘和前外缘的齿数;腹部第6节宽与长的比值;雄性第1腹肢的特征(末第二节与末节长度的比值,末节腹叶与背叶长度的比值,末节腹叶的弯曲度);以及雄性第2腹肢末第二节与末节长度的比值等.已有的对上述性状差异显著性的分析表明,雄性第1腹肢的性状,特别是末节的弯曲度在3个地理亚种之间差异最为显著<sup>[1]</sup>.指名亚种的第1腹肢末节较平直;桐柏亚种第1腹肢末节稍弯向背内方;而陕县亚种的第1腹肢末节明显弯向背内方<sup>[11]</sup>.

戴爱云等<sup>[1]</sup>对雄性第1腹肢末节弯曲度的CD和t检验统计分析提示,平直型与稍向内弯和明显内弯型之间的差异极显著(CD = 1.48 ~ 2.64 > 1.28,  $t = 9.02 \sim 13.9 > 3$ ).本文对COI基因部分序列的研究结果表明,长江华溪蟹明显地分化成2个分支,一支代表腹肢末节平直型;而另一支则代表内弯型,包括稍向内弯和明显内弯.在平直型与内弯型这2个分支之间的遗传距离达到了0.075 ~ 0.085,这种差异水平已接近仿溪蟹科(Potamonautidae) *Potamonautes* 属内物种之间的平均遗传距离(0.08)<sup>[12]</sup>.在内弯型内部,戴爱云等<sup>[1]</sup>对雄性第1腹肢末节弯曲程度的显著性检验提示,稍向内弯型和明显内弯型之间  $t$  值大于3( $t = 5.35$ ),但CD检验结果不显著(CD = 0.81 < 1.28).本文基于COI基因片段的序列变异分析表明,稍向内弯与明显内弯型之间的遗传分化水平很低(0.018),仅相当于平直型与内弯型之间遗传差异的1/10.提示从COI基因检测到的长江华溪蟹的遗传分化与其雄性第1腹肢末节弯曲程度上的形态分化基本一致.

[参考文献]

[1] 戴爱云, 陈国孝. 长江华溪蟹的两个新亚种[J]. 动物学报, 1981, 27(2): 172 - 179.

[2] Sun H Y, Zhou K Y, Song D X. 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(1): 207 - 217.

[3] Tang B P, Zhou K Y, Song D X, et al. Molecular systematics of the Asian mitten crabs, genus *Eriocheir* (Crustacea: Brachyura)[J]. Mol Phylogenet Evol, 2003, 29(2): 309 - 316.

[4] Schubart C D, Cuesta J A, Diesel R, et al. Molecular phylogeny, taxonomy, and evolution of nonmarine lineages within the American grapsoid crabs (Crustacea: Brachyura)[J]. Mol Phylogenet Evol, 2000, 15(2): 179 - 190.

[5] Schubart C D, Diesel R, Hedges S B. Rapid evolution to terrestrial life in Jamaican crabs[J]. Nature, 1998, 393(4): 363 - 365.

[6] 吕秀玲. 长江华溪蟹线粒体基因组及其种群遗传结构研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2005.

[7] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The Clustal X: windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acid Res, 1997, 24(5): 4876 - 4882.

[8] Kumar S, Koichiro T, Jakobsen I B, et al. Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA), Version 2.1[CP/DK]. Tempe, AZ, USA: Arizona State University, 2001.

[9] Posada D, Crandall K A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution[J]. Bioinformatics, 1998, 14(9): 817 - 818.

[10] Swofford D L. PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\* and Other Methods). version 4[CP/DK]. Sinauer Associates, Sunderland, MA. 2002.

[11] 戴爱云. 中国动物志 节肢动物门 甲壳动物亚门 软甲纲 十足目 束腹蟹科 溪蟹科[M]. 北京: 科学出版社, 1999.

[12] Daniels S R. Examining the genetic structure among populations of the commoncape *Potamonautes perlatus* from river systems in South Africa reveals hydrographic boundaries[J]. Journal of Crustacean Biology, 2003, 23(4): 936 - 950.

[责任编辑:孙德泉]