

我国沿海三疣梭子蟹 9 个野生群体线粒体 CR 和 CO I 片段比较分析

冯冰冰^① 李家乐^{①*} 牛东红^① 陈琳^② 郑岳夫^② 郑凯宏^②

(^①上海水产大学 省部级共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室 上海 200090;

^②浙江省象山县水产技术推广站 浙江象山 315700)

摘要: 通过对我国沿海三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 9 个野生群体线粒体 DNA 控制区 (putative control region, CR) 基因片段和细胞色素氧化酶亚基 I (COI) 基因片段进行扩增和测序, 分别得到长度为 530 bp 和 584 bp 的片段。分析结果表明: CR 83 条序列 A+T 平均含量为 73.2%, 共检测到 91 个变异位点, 83 个个体具有 66 种单倍型 (haplotype); COI 94 条序列 A+T 平均含量为 62.2%, 共检测到 34 个变异位点, 94 个个体具有 34 种单倍型 (haplotype)。用 MEGA 3.1 软件构建 9 个群体 NJ 分子树, 聚类结果显示, 黄海、东海、渤海 6 个群体之间的相对遗传距离比较近, 聚为一大支, 南海 3 个群体相对遗传距离比较近, 聚为一大支。AMOVA 分析表明, 群体间的遗传分化指数 (F_{st}) 为 -0.074 54~0.270 87, 其中部分群体间达到显著差异 ($P < 0.05$) 与极显著差异 ($P < 0.01$), 说明我国三疣梭子蟹不同野生群体间存在一定遗传分化。

关键词: 三疣梭子蟹; 线粒体 DNA; 控制区; COI; 遗传多样性; 遗传分化

中图分类号: Q951 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2008)02-28-09

Compared Analysis on the Sequences of Mitochondrial CR Gene and CO I Gene Fragments of Nine Wild Stocks of *Portunus trituberculatus* from the Marginal Seas of China

FENG Bing-Bing^① LI Jia-Le^{①*} NIU Dong-Hong^① CHEN Lin^②

ZHENG Yue-Fu^② ZHENG Kai-Hong^②

(^①The Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecology, Certificated by the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090;

^②Xiangshan Fisheries Technology Station, Xiangshan 315700, China)

Abstract: Mitochondrial CR gene and CO I gene fragments were amplified and sequenced from 9 wild stocks of *Portunus trituberculatus* in China. Respectively, 530 bp and 584 bp long partial gene fragments of the CR gene and the COI gene were obtained. A+T mean contents of the CR sequences and the CO I sequences were respectively 73.2% and 62.2%. Moreover, 66 haplotypes were identified from 83 samples with 91 variation sites of CR gene and 33 haplotypes were identified from 96 samples with 42 variation sites of COI gene. The genetic distance and cluster analysis showed that genetic distances were nearest among six stocks of Yellow Sea, East China Sea, Bohai Sea, while

基金项目 上海市重点学科建设项目(Y1101), 浙江象山县科技局项目(061301);

* 通讯作者, E-mail: jlli@shfu.edu.cn;

第一作者介绍 冯冰冰, 男, 硕士研究生, 研究方向: 水产动物种质资源与种苗工程; E-mail: shuishui_ffb@sohu.com.

收稿日期: 2007-09-26, 修回日期: 2008-01-05

the genetic distances were nearest among three stocks of South China Sea. The fixation indices (F_{st}) were from -0.074 54 to 0.270 87 between any two stocks and some of them got to significant and great significant level. So these indicated that there were some genetic differentiations in different wild stocks of *P. trituberculatus* in China.

Key words: *Portunus trituberculatus*; mtDNA; Putative control region; COI; Genetic diversity; Genetic differentiation

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*), 俗称海蟹或大蟹, 属于甲壳纲十足目梭子蟹科, 广泛分布在我国山东、浙江、广西、广东、福建、海南以及日本、朝鲜、马来西亚群岛等水域^[1]。三疣梭子蟹是我国大型海洋经济蟹类, 是沿海重要的渔业对象。国内外对有关三疣梭子蟹的养殖习性、生理生态、胚胎发育、生化遗传等方面的研究较多^[2-9], 而对三疣梭子蟹的遗传多样性方面报道较少, 仅出现在利用同工酶对舟山海域野生三疣梭子蟹遗传多样性分析^[10], 对潍坊养殖三疣梭子蟹 mtDNA 16S rRNA 和 COI 基因片段序列进行比较, 研究种内变异程度^[11]等方面。

除刺细胞动物和等脚类外, 多细胞动物的线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 都是一个环形 DNA 分子^[12, 13], 序列长度在 14~17 kb 之间^[14]。由于它具有母系遗传、进化速度快、核苷酸替代率高等特点, mtDNA 已成为群体遗传学以及系统发育等研究的有效遗传标记^[15]。其中, CR 和 COI 片段的进化速率在所有线粒体片段中相对较快, 较适合种内群体的研究。本研究利用 mtDNA CR 和 COI 片段分析了我国三疣梭子蟹 9 个野生群体的遗传多样性及遗传结构, 以期为我国三疣梭子蟹的种质保护和利用提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料 分别于 2006 年 6~9 月从我国沿海: 渤海的潍坊(WF)、黄骅(HH), 黄海的青岛(QD)、连云港(LY), 东海的象山(XS)、莆田(PT), 南海的南澳(NA)、湛江(ZJ)、乌石(WS), 采集当地的野生三疣梭子蟹, 在采集地或带回实验室各取 2 只活体蟹用无水乙醇固定, 备用。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 每个群体随机选

取 9~12 只个体, 每只个体取 0.5 g 螯部肌肉组织剪碎后, 加入 500 μ l 组织匀浆缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH=8.0; 50 mmol/L EDTA, pH=8.0), 混匀后加入终浓度为 1% 的 SDS 和 200 μ g/ml 的蛋白酶 K, 55 $^{\circ}$ C 裂解至澄清。采用苯酚-氯仿的抽提方法提取基因组 DNA。紫外分光光度计测定样品 DNA 的 OD₂₆₀、OD₂₈₀ 值, 确定其浓度和纯度, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 PCR 反应及产物的纯化和测序 CR 序列片段扩增引物根据三疣梭子蟹 mtDNA 全序列中的控制区片段^[16], 用 Primer 5.0 设计得出, CR-AR: 5' ACT ACA CGC AAC AAC TCT CA 3', CR-BR: 5' AAT CTT TCT GGA TTC TCC TA 3'; 用于 COI 序列片段扩增的 2 个引物分别为 LCO1490: 5' GGT CAA ATC ATA AAG ATA TTG G 3' 和 HCO2198: 5' TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA 3'^[17], 均由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 反应体系 25 μ l, 含模板 DNA 50~100 ng, Mg²⁺ 1.5 mmol/L, 10 \times Buffer 2.5 μ l, dNTP 0.2 mmol/L, Taq 酶 1 U, 上、下游引物各 0.2 μ mol/L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 50 s, 45 $^{\circ}$ C/48 $^{\circ}$ C 退火 50 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 后延伸 10 min; 4 $^{\circ}$ C 终止反应。每次反应都设不含模板的空白对照。PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶检测, 电泳缓冲液为 0.5 \times TBE (pH 8.0), 电压为 5 V/cm, 常温电泳, EB 染色, 于凝胶成像系统下观察并拍照记录。PCR 产物的纯化和测序工作由国家人类基因组南方研究中心完成。

1.2.3 序列分析 DNA 序列用 Bioedit^[18] 进行编辑并辅以人工核查, 用 Clustal X 1.81^[19] 进行同源排序比对, 并确定序列长度。用 DnaSp 4.0^[20] 计算群体单倍型多态性 (haplotype diversity) 和核苷酸多样性指数 (nucleotide diversity)、平均核苷酸差异数 (average number of

nucleotide differences)、基因流 (Nm) 等。用 MEGA 3.1^[21] 计算不同序列间的碱基组成、变异位点、简约信息位点和不同地理种群的 Kimura 2-paramter 遗传距离, 采用邻接法 (NJ) 构建分子系统树。用 ARLEQUIN Version 3.1^[22] 中的分子变异分析 (analysis of molecular variance, AMOVA) 方法分析群体间及不同组群间的遗传分化指数 (F_{st}), 并用排列测验法 (Permutation test) 检验 F_{st} 的显著性 (重复次数为 1 000)。

2 结果

2.1 三疣梭子蟹群体 CR 和 COI 基因部分序列碱基组成 经 PCR 扩增, 均得到了特异性很好的 CR 基因片段和 COI 基因片段 (图 1)。电泳检测表明, CR 和 COI 序列长度大约分别为 600 bp 和 700 bp, 测序结果通过 BLAST 分析比较确认所得片段为 CR 和 COI 基因片段。经 Clustal W 同源排序, 除去引物和部分端序列得到了长度为 530 bp 和 584 bp 的序列。

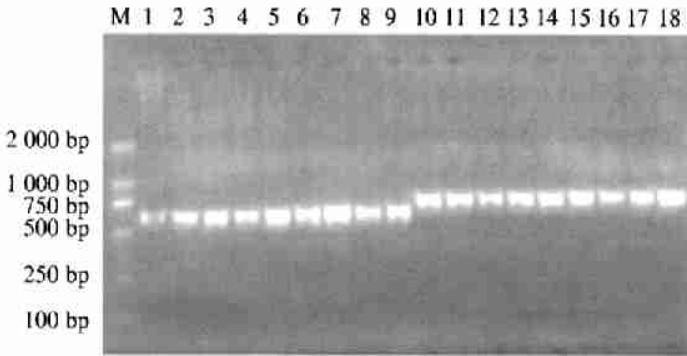


图 1 三疣梭子蟹 mtDNA CR 及 COI 基因部分片段

Fig. 1 mtDNA CR gene and COI gene fragments of *P. trituberculatus*

M. D2000 DNA 分子量标准; 1~ 9 控制区片段, 分别为潍坊、黄骅、青岛、连云港、象山、莆田、南澳、湛江、乌石群体;

10~ 18 COI 片段, 分别为潍坊、黄骅、青岛、连云港、象山、莆田、南澳、湛江、乌石群体。

M. D2000 DNA ladder marker; 1- 9 CR gene of Weifang, Huanghua, Qingdao, Lianyungang, Xiangshan, Putian, Nan'ao, Zhanjiang and Wushi stock; 10- 18 COI gene of Weifang, Huanghua, Qingdao, Lianyungang, Xiangshan, Putian, Nan'ao, Zhanjiang and Wushi stock.

利用 MEGA 3.1 软件计算三疣梭子蟹群体控制区序列碱基组成 (表 1), CR 基因序列 T、C、A、G 和 A + T 的平均含量分别为 36.6%、16.1%、36.6%、10.7%、73.2%, A + T 含量显著高于 G + C 含量。同样, 计算三疣梭子蟹群体 COI 序列碱基组成 (表 2), COI 基因序列 T、C、A、G 和 A + T 的平均含量分别为 35.9%、21.3%、26.3%、16.5%、62.2%, A + T 含量显著高于 G + C 含量。

2.2 三疣梭子蟹群体遗传多样性分析 利用 DnaSp 4.0 软件计算群体遗传多样性参数, 结果分别见表 3 和表 4。

表 1 三疣梭子蟹 9 个群体 CR 基因片段的碱基组成 (%)

Table 1 Base compositions of CR gene fragments of nine stocks of *P. trituberculatus*

群体 Stocks	T	C	A	G	A+T
潍坊 Weifang	36.6	16.1	36.8	10.5	73.4
黄骅 Huanghua	36.6	16.2	36.5	10.7	73.1
青岛 Qingdao	36.7	16.0	36.7	10.6	73.4
连云港 Lianyungang	36.8	16.0	36.4	10.9	73.2
象山 Xiangshan	36.8	15.9	36.4	10.9	73.2
莆田 Putian	36.6	16.1	36.6	10.7	73.2
南澳 Nan'ao	36.5	16.3	36.6	10.6	73.1
湛江 Zhanjiang	36.6	16.1	36.7	10.6	73.3
乌石 Wushi	36.4	16.4	36.6	10.6	73.0
平均值 Average	36.6	16.1	36.6	10.7	73.2

表 2 三疣梭子蟹 9 个群体 COI 基因片段的
碱基组成(%)

Table 2 Base compositions of COI gene fragments
of nine stocks of *P. trituberculatus*

群体 Stocks	T	C	A	G	A+T
潍坊 Weifang	36.0	21.3	26.3	16.5	62.3
黄骅 Huanghua	36.0	21.2	26.4	16.5	62.4
青岛 Qingdao	35.9	21.3	26.3	16.5	62.2
连云港 Lianyungang	36.0	21.2	26.4	16.4	62.4
象山 Xiangshan	36.0	21.2	26.2	16.6	62.2
莆田 Putian	36.0	21.2	26.4	16.5	62.4
南澳 Nan'ao	35.9	21.3	26.3	16.4	62.2
湛江 Zhanjiang	35.9	21.3	26.4	16.4	62.3
乌石 Wushi	35.8	21.4	26.4	16.4	62.2
平均值 Average	35.9	21.3	26.3	16.5	62.2

根据 CR 基因序列计算遗传多样性参数, 在 83 个三疣梭子蟹个体中, 共检测到了 66 个单倍型, 且每个群体都具有各自的单倍型, 91 个核苷酸多态位点, 包括 27 个单一变异位点 (singleton variable sites), 64 个简约信息位点

(parsimony informative sites), 其中缺失/插入位点 2 个, 转换位点 76 个, 颠换位点 3 个, 转换、颠换同时存在位点 10 个, 转换与颠换的比值为 6.6:1, 平均核苷酸差异数为 12.11754, 核苷酸多样性指数为 0.02295 ± 0.00072 。结果显示, 潍坊和黄骅群体遗传多样性参数较高, 青岛和象山群体遗传多样性参数较低, 且群体内部没有显著差异。而根据 COI 基因序列计算遗传多样性参数, 在 94 个三疣梭子蟹个体中, 共检测到了 34 个单倍型, 且所有群体只有一个共享单倍型, 34 个核苷酸多态位点, 包括 18 个单一变异位点, 16 个简约信息位点, 转换位点 23 个, 颠换位点 9 个, 转换、颠换同时存在位点 2 个, 转换与颠换的比值为 2.3:1, 平均核苷酸差异数为 2.12583, 核苷酸多样性指数为 0.00364 ± 0.00036 。连云港群体遗传多样性参数较高, 湛江群体遗传多样性参数较低, 且群体内部没有显著差异。

表 3 三疣梭子蟹 9 个群体 CR 基因片段遗传多样性参数

Table 3 Genetic diversity parameters of CR gene fragments among nine stocks of *P. trituberculatus*

群体 Stocks	个体数 Number	单倍型数 Number of haplotypes	单倍型多态性 Haplotype diversity	平均核苷酸差异数 Average number of nucleotide differences	核苷酸多样性指数 Nucleotide diversity
潍坊 Weifang	9	9	1.000 ± 0.052	13.66667	0.02588 ± 0.00268
黄骅 Huanghua	9	9	1.000 ± 0.052	13.44444	0.02541 ± 0.00230
青岛 Qingdao	9	9	1.000 ± 0.052	8.69444	0.01644 ± 0.00221
连云港 Lianyungang	10	9	0.978 ± 0.054	10.66667	0.02016 ± 0.00288
象山 Xiangshan	8	7	0.964 ± 0.077	10.28571	0.01944 ± 0.00289
莆田 Putian	9	9	1.000 ± 0.052	12.30556	0.02326 ± 0.00225
南澳 Nan'ao	10	7	0.911 ± 0.077	11.24444	0.02126 ± 0.00222
湛江 Zhanjiang	10	10	1.000 ± 0.045	11.60000	0.02193 ± 0.00237
乌石 Wushi	9	9	1.000 ± 0.052	10.75000	0.02036 ± 0.00344
总数 Total	83	66	0.992 ± 0.004	12.11754	0.02295 ± 0.00072

2.3 三疣梭子蟹群体遗传距离和聚类分析

从表 5 和表 6 可以看出, 乌石群体与其他群体间的遗传距离较远, CR 基因和 COI 基因显示结果基本一致。群体间的基因流值一部分大于 5, 说明群体间存在着一定的基因交流。利用

MEGA 3.1 软件构建三疣梭子蟹 9 群体 NJ 分子进化树(图 2, 3)。聚类结果均显示黄海、东海、渤海 6 个群体聚为一大支, 南海 3 个群体聚为一大支。

表 4 三疣梭子蟹 9 个群体 COI 基因片段遗传多样性参数

Table 4 Genetic diversity parameters of COI gene fragments among nine stocks of *P. trituberculatus*

群体 Stocks	个体数 Number	单倍型数 Number of haplotypes	单倍型多态性 Haplotype diversity	平均核苷酸差异数 Average number of nucleotide differences	核苷酸多样性指数 Nucleotide diversity
潍坊 Weifang	12	7	0.833±0.100	2.272 73	0.003 89±0.000 87
黄骅 Huanghua	11	7	0.909±0.066	2.036 36	0.003 49±0.000 78
青岛 Qingdao	10	8	0.956±0.059	1.555 56	0.002 66±0.000 37
连云港 Lianyungang	12	8	0.848±0.104	2.969 70	0.005 09±0.001 23
象山 Xiangshan	10	7	0.911±0.077	2.822 22	0.004 83±0.001 03
莆田 Putian	10	6	0.778±0.137	1.666 67	0.002 85±0.000 94
南澳 Nan'ao	10	4	0.644±0.152	1.311 11	0.002 25±0.000 69
湛江 Zhanjiang	11	3	0.564±0.134	1.054 55	0.001 81±0.000 48
乌石 Wushi	8	6	0.929±0.084	2.464 29	0.004 20±0.001 05
总数 Total	94	34	0.837±0.035	2.125 83	0.003 64±0.000 36

表 5 基于 CR 基因的三疣梭子蟹群体间基因流(上三角)和 Kimura 2 paramter 遗传距离(下三角)

Table 5 Gene flow (upper right) and the Kimura 2 paramter genetic distance (lower left) between the *P. trituberculatus* stocks based on CR gene

群体 Stocks	黄骅 Huanghua	连云港 Lianyungang	南澳 Nan'ao	莆田 Putian	青岛 Qingdao	潍坊 Weifang	乌石 Wushi	象山 Xiangshan	湛江 Zhanjiang
黄骅 Huanghua		3.52	4.43	6.02	4.86	3.44	1.87	5.80	3.46
连云港 Lianyungang	0.023 8		2.30	3.38	3.63	2.43	1.24	5.48	2.78
南澳 Nan'ao	0.023 8	0.023 2		4.87	2.32	2.19	3.25	2.28	2.56
莆田 Putian	0.024 0	0.022 8	0.022 5		4.45	3.52	1.66	3.76	3.03
青岛 Qingdao	0.021 0	0.019 1	0.021 0	0.020 1		2.76	0.90	4.44	2.32
潍坊 Weifang	0.026 8	0.025 4	0.026 6	0.025 6	0.022 8		1.38	2.84	2.12
乌石 Wushi	0.026 5	0.026 1	0.022 0	0.025 9	0.026 0	0.028 8		1.08	1.79
象山 Xiangshan	0.022 1	0.019 6	0.022 6	0.021 9	0.018 0	0.024 2	0.026 4		2.34
湛江 Zhanjiang	0.024 9	0.022 9	0.023 8	0.024 1	0.021 4	0.027 1	0.024 8	0.022 9	

表 6 基于 COI 基因三疣梭子蟹群体间基因流(上三角)和 Kimura 2 paramter 遗传距离(下三角)

Table 6 Gene flow (upper right) and the Kimura 2 paramter genetic distance(lower left) between the *P. trituberculatus* stocks based on COI gene

群体 Stocks	黄骅 Huanghua	连云港 Lianyungang	南澳 Nan'ao	莆田 Putian	青岛 Qingdao	潍坊 Weifang	乌石 Wushi	象山 Xiangshan	湛江 Zhanjiang
黄骅 Huanghua		5.62	3.48	4.09	2.72	4.04	1.40	4.71	3.04
连云港 Lianyungang	0.004 3		4.39	6.05	3.50	4.81	1.69	3.78	3.76
南澳 Nan'ao	0.003 0	0.003 8		3.72	3.39	9.92	1.89	2.74	17.39
莆田 Putian	0.003 2	0.003 9	0.002 6		3.82	4.78	1.03	5.05	2.71
青岛 Qingdao	0.003 3	0.004 1	0.002 5	0.002 8		6.31	1.01	2.40	2.45
潍坊 Weifang	0.003 8	0.004 6	0.003 0	0.003 4	0.003 2		2.37	3.11	9.10
乌石 Wushi	0.004 7	0.005 5	0.003 6	0.004 7	0.004 6	0.004 4		1.23	2.45
象山 Xiangshan	0.004 2	0.005 1	0.003 8	0.003 8	0.004 1	0.004 6	0.005 7		2.22
湛江 Zhanjiang	0.002 8	0.003 6	0.001 9	0.002 5	0.002 4	0.002 8	0.003 2	0.003 7	

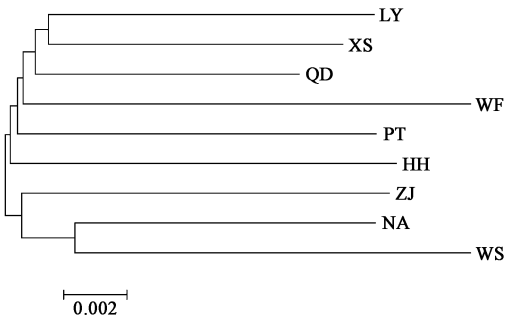


图 2 基于 CR 基因三疣梭子蟹 9 个群体的 NJ 分子进化树

Fig. 2 NJ phylogenetic tree based on CR of nine stocks of *Portunus trituberculatus*

HH: 黄骅群体; WF: 潍坊群体; QD: 青岛群体; LY: 连云港群体; XS: 象山群体; PT: 莆田群体; NA: 南澳群体; ZJ: 湛江群体; WS: 乌石群体; 后图同。标尺 0.002 为枝长标准, 表示遗传距离。

HH: Huanghua stock; WF: Weifang stock; QD: Qingdao stock; LY: Lianyungang stock; XS: Xiangshan stock; PT: Putian stock; NA: Nan'ao stock; ZJ: Zhanjiang stock; WS: Wushi stock. As same as following fig. 3. Bar of 0.002 mean branch scale bar.

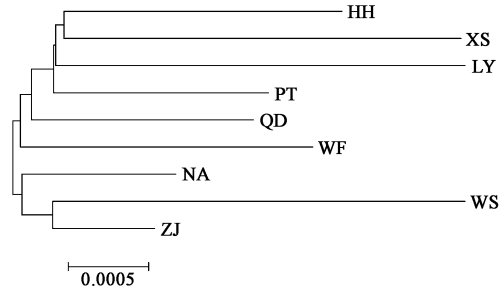


图 3 基于 COI 基因三疣梭子蟹 9 个群体的 NJ 分子进化树

Fig. 3 NJ phylogenetic tree based on COI of nine stocks of *Portunus trituberculatus*

标尺 0.0005 为枝长标准, 表示遗传距离。

Bar of 0.0005 mean branch scale bar.

2.4 三疣梭子蟹群体遗传结构 AMOVA 分析的结果显示, 基于 CR 和 COI, 三疣梭子蟹 9 个群体间的遗传分化指数 (F_{st}) 分别为 0.064 34 ($P < 0.01$) 和 0.531 9 ($P < 0.01$), 差异均极显著。同时按地域将 9 个群体分为渤海、黄海、东海和南海 4 个组群进行 AMOVA 分析, 结果均显示, 组群间的遗传分化均不显著 ($P > 0.05$)。

按 NJ 树将 9 个群体中南海 3 个群体分为一组群, 其他 6 个群体分为一组群体的组合进行 AMOVA 分析, 结果均显示, 组群间的遗传分化极显著。除此之外, 去除南海 3 个群体, 对其他 6 个群体进行 AMOVA 分析, 6 个群体间的遗传分化不显著。

基于 CR, 三疣梭子蟹 9 个群体, 进行群体间两两组对, 共获得 36 个组对, 其中 27 个组对的 F_{st} 值统计检验为差异不显著 ($P > 0.05$), 4 个组对的 F_{st} 值统计检验为差异显著 ($P < 0.05$), 5 个组对的 F_{st} 值统计检验为差异极显著 ($P < 0.01$)。基于 COI, 三疣梭子蟹 9 个群体的 36 个组对中, 29 个组对的 F_{st} 值统计检验为差异不显著 ($P > 0.05$), 2 个组对的 F_{st} 值统计检验为差异显著 ($P < 0.05$), 5 个组对的 F_{st} 值统计检验为差异极显著 ($P < 0.01$) (表 7)。

3 讨论

3.1 三疣梭子蟹 CR 和 COI 基因的碱基组成特点 研究表明, 三疣梭子蟹 mtDNA CR 基因碱基序列中 AT 平均含量为 73.2%, mtDNA COI 基因碱基序列中 AT 平均含量为 62.2%, 明显高于 GC 含量, 这与三疣梭子蟹^[6]、可口美青蟹 (*Callinectes sapidus*)^[23]、巨大拟滨蟹 (*Pseudocarcinus gigas*)^[24]、日本绒螯蟹中华亚种 (*Eriocheir japonica sinensis*)^[25] 等研究的 AT 平均含量明显高于 GC 含量结果一致, 符合节肢动物 mtDNA AT 含量高的规律^[26]。

3.2 遗传多样性分析 在线粒体序列变异中, 变异位点的转换较易在近亲种间频繁地发生, 而颠换在较远缘种间逐渐明显; 在同一物种中, 转换往往在数量上远超过颠换^[27]。本研究中 mtDNA CR 和 COI 序列转换与颠换比分别为 6.61 和 2.31, 这与核苷酸的替换主要以转换为主、转换多于颠换、表现较高的转换偏向^[28] 的规律相符。由此可知, 我国沿海四个海区的 9 个群体三疣梭子蟹线粒体变异仍为种内变异, 并未发现亚种分化。

表 7 三疣梭子蟹各群体间的遗传分化指数 (F_{st})

Table 7 Fixation index (F_{st}) between any stocks of *P. trituberculatus*

群体 Stocks	黄骅 Huanghua	连云港 Lianyungang	南澳 Nan'ao	莆田 Putian	青岛 Qingdao	潍坊 Weifang	乌石 Wushi	象山 Xiangshan	湛江 Zhanjiang
黄骅 Huanghua		0.021 32	- 0.004 39	- 0.038 38	- 0.020 05	0.019 59	0.111 74*	- 0.043 55	0.023 48
连云港 Lianyungang	- 0.005 70		0.087 04*	0.026 46	0.017 60	0.074 08**	0.201 78**	- 0.031 31	0.058 09
南澳 Nan'ao	0.033 77	0.012 62		- 0.013 37	0.080 74	0.090 82	0.033 10	0.078 50	0.070 61
莆田 Putian	0.015 10	- 0.016 17	0.020 47		- 0.011 18	0.016 78	0.131 51*	- 0.000 58	0.040 51
青岛 Qingdao	0.066 58	0.037 80	0.031 53	0.017 62		0.049 15	0.270 87**	- 0.018 65	0.081 04
潍坊 Weifang	0.025 55	0.011 90	- 0.047 64	0.004 15	- 0.019 39		0.166 50*	0.037 72	0.096 63
乌石 Wushi	0.179 69**	0.147 61**	0.111 40	0.246 00**	0.250 32**	0.085 35		0.222 03**	0.125 69**
象山 Xiangshan	0.000 72	0.028 80	0.060 61	- 0.011 01	0.080 30*	0.052 87	0.202 53**		0.073 70
湛江 Zhanjiang	0.055 56	0.033 44	- 0.074 56	0.067 21	0.082 09	- 0.038 28	0.073 48	0.098 38*	

对角线上为基于 CR 基因, 对角线下为基于 CO I 基因。* 表示差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

Lower left about CO I gene, upper right about CR gene. * Mean significance ($P < 0.05$), ** Mean great significance ($P < 0.01$).

三疣梭子蟹 9 个群体 mtDNA CR 和 CO I 基因片段的核苷酸多样性指数分别为 $0.022 95 \pm 0.000 72$ 和 $0.003 72 \pm 0.000 47$, 其中 mtDNA CR 基因片段核苷酸多样性指数低于深圳海域斑节对虾 (*P. monodo*) CR 基因片段核苷酸多样性指数 $0.052 78^{[29]}$, 接近日本对虾 (*P. japonicus*) CR 基因片段核苷酸多样性指数 $0.025 1 \pm 0.000 7^{[30]}$; mtDNA CO I 序列核苷酸多样性指数高于中国对虾 (*P. chinensis*) CO I 基因片段核苷酸多样性指数 ($0.000 4$)^[31], 以及小褐美对虾 (*P. subtilis*)、保罗美对虾 (*P. paulensis*)、巴西美对虾 (*Fafantepenaeus brasiliensis*) 三种虾的 CO I 基因片段核苷酸多样性指数 ($0.002 5, 0.000 0, 0.000 4$)^[32], 低于南方滨对虾 (*P. schmitti*) 的 CO I 基因片段的核苷酸多样性指数 ($0.004 7$)^[32], 说明我国沿海野生三疣梭子蟹平均核苷酸多样性指数在亲缘关系较近的海洋物种中尚处于相对较高水平, 同时其平均单倍型多态性比较高。综合这些数据表明, 我国沿海野生三疣梭子蟹遗传多样性相对

比较丰富, 而且这也与同工酶研究舟山群体遗传多样性较高^[10]的结果比较一致。

3.3 亲缘关系和遗传分化分析 群体之间的遗传距离能反映群体间的亲缘关系。本研究中三疣梭子蟹 9 个群体基于 CR 和 CO I 的遗传距离分别为 $0.018 0 \sim 0.028 8$ 和 $0.001 9 \sim 0.005 7$ 之间, 虽然两个基因片段得到的群体间遗传距离有差异, 但都反映了乌石群体与其他群体间的遗传距离较远, 特别与黄海、东海、渤海三大沿海的群体距离较远。通过对三疣梭子蟹 9 个群体构建 NJ 分子进化树 (图 2, 3), 聚类结果显示, 黄海、东海、渤海 6 个群体之间的相对遗传距离比较近, 聚为一大支, 而南海 3 个群体聚为一大支, 这与我国东海以北的三大海域的地理位置相对比较近有一定的关系, 而我国南海 3 个群体相对遗传距离比较近, 表明黄海、东海、渤海三海域的三疣梭子蟹亲缘关系比较近。由此看来, 我国四大沿海的三疣梭子蟹的亲缘关系在一定程度上反映了它们一定的地理分布情况, 地位位置越近的群体其亲缘关系也越近, 地

理关系远的群体其亲缘关系也较远。

在 AMOVA 分析中, 按 NJ 树将 9 个群体中南海 3 个群体分为一组群, 其他 6 个群体分为一组群体的组合, CR 和 COI 结果均显示, 组群间的遗传分化极显著。同样, AMOVA 分析两两群体间的 F_{st} 值显示, 南海的乌石群体与南海以外的其他群体间的 F_{st} 值统计检验都是差异显著 ($P < 0.05$) 和差异极显著 ($P < 0.01$)。由此可以推测, 我国沿海三疣梭子蟹至少存在两大类群, 一个位于南海, 另一个位于东海和东海以北。在过去的 80 万年里, 气候约以 10 万年的周期波动; 冰期引起的海平面变化非常强烈, 冰盛期的海平面大约下降 120~140 m^[33]。由于冰期的海平面下降, 台湾海峡成为陆桥, 致使亚洲大陆与台湾岛通过陆桥相连^[34, 35]。更新世冰期的气候变迁导致海平面下降使西北太平洋边缘海之间产生隔离, 有可能成为我国沿海三疣梭子蟹两大类群之间产生分化的原因。此类遗传分化也存在于我国泥蚶 (*Tegillarca granosa*)^[36] 和青蛤 (*Cyclina sinensis*)^[37] 等海洋生物群体间。

一般来说, 当群体间基因流大于 5 时, 能维持一个均一的基因库^[38]。从表 5 和表 6 可以看出, 两两群体间基因流大于 5 的情况基本出现于同一类群中。至于为何基于 COI 片段分析的潍坊群体分别与南澳、湛江群体间的基因流大于 5, 尚待进一步研究。

本研究从线粒体 CR 基因和 COI 基因部分序列获得的我国沿海野生三疣梭子蟹的遗传多样性参数, 在一定程度上说明了目前我国沿海野生三疣梭子蟹的遗传多样性相对来说比较丰富; 从 AMOVA 分析得到我国沿海野生三疣梭子蟹存在一定程度的遗传分化, 可以明显分为南北两大类群, 因此要对南北两大类群展开合理有效保护, 防止种质退化。特别是近些年来, 我国东海及其以北的沿海开展了大规模的三疣梭子蟹人工养殖、半人工采苗、人工育苗等养殖活动, 增加了个体间的基因交流, 可能会对三疣梭子蟹的遗传多样性造成一定影响, 所以要提前进行种质资源保护, 在人工养殖和育种

过程中, 应该采取增大繁殖群体、定期筛选等措施来防止因近交衰退和遗传漂变等导致的遗传多样性水平降低, 以保护我国具有较高经济价值的三疣梭子蟹优良种质资源。

参 考 文 献

- [1] 戴爱云, 杨思谅, 宋玉枝等. 中国海洋蟹类. 北京: 海洋出版社, 1986, 194~196
- [2] 孙颖民, 宋志乐, 严瑞深等. 三疣梭子蟹生长的初步研究. 生态学报, 1984, 4(1): 57~64
- [3] 薛俊增, 堵南山, 赖伟. 中国三疣梭子蟹 *Portunus triuberculatus* Miers 的研究. 东海海洋, 1997, 15(4): 60~65.
- [4] 薛俊增, 堵南山, 赖伟. 三疣梭子蟹活体胚胎发育的观察. 动物学杂志, 1998, 33(6): 45~49.
- [5] 宋海棠, 丁跃平, 许源剑. 浙江北部近海三疣梭子蟹生殖习性研究. 浙江水产学院学报, 1988, 7(1): 39~46.
- [6] 李太武, 苏秀榕. 三疣梭子蟹消化系统的组织学研究. 辽宁师范大学学报(自然科学版), 1994, 17(1): 22~28
- [7] 余红卫, 朱冬发, 韩宝芹. 三疣梭子蟹不同组织同工酶的分析. 动物学杂志, 2005, 40(1): 84~87.
- [8] 朱冬发, 余红卫, 王春琳. 三疣梭子蟹个体发育早期的同工酶谱变化. 水产学报, 2005, 29(6): 751~756.
- [9] 王国良, 金珊, 李政等. 三疣梭子蟹养殖群体同工酶的组织特异性及生化遗传分析. 台湾海峡, 2005, 24(4): 474~480
- [10] 高保全, 刘萍, 李健等. 三疣梭子蟹野生群体同工酶的遗传多态性分析. 水产学报, 2007, 31(1): 1~6
- [11] 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. 中国海洋大学学报, 2004, 34(1): 230~236.
- [12] Warner R, Gall J. The mitochondrial DNA of *Hydra attenuata* and *Hydra littoralis* consists of two linear molecules. *Arch Sci*, 1985, 38: 439~445.
- [13] Raimond R, Marcade I, Bouchon D, et al. Organization of the large mitochondrial genome in the isopod *Armadillidium vulgare*. *Genetics*, 1999, 151: 203~210
- [14] Wolstenholme D R. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *International Review of Cytology*, 1992, 141: 173~216
- [15] Halletman E M. Population Genetics: Principle and Applications for Fisheries Scientist. Bethesda, MD: American Fisheries Society, 2003, 59~100
- [16] Yamauchi M M, Miya M U, Nishida M. Complete mitochondrial DNA sequence of the swimming crab, *Portunus triuberculatus* (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Gene*,

- 2003, **311**: 129~ 135.
- [17] Folmer O, Black M, Hoeh W, *et al.* DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Marine Biol Biotechnol*, 1994, **3**: 294~ 299
- [18] Hall T A. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucl Acid Symp Ser*, 1998, **41**: 95~ 98
- [19] 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. *Nucleic Acids Research*, 1997, **25**: 4 876~ 4 882
- [20] Rozas J, Sanchez delBarrio J C, Messenguer X, *et al.* DnaSp, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 2003, **19**: 2 496~ 2 497.
- [21] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, **5** (2): 150~ 163
- [22] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.01: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 2005, **1**: 47~ 50
- [23] Place A R, Feng X J, Steven C R, *et al.* Genetic markers in blue crabs (*Callinectes sapidus*) II: Complete mitochondrial genome sequence and characterization of genetic variation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2005, **319**: 15~ 27.
- [24] Miller A D, Murphy N P, Burridge C P, *et al.* Complete mitochondrial DNA sequences of the Decapod Crustaceans *Pseudosquilla gigas* (Menippidae) and *Macrobrachium rosenbergii* (Palaemonidae). *Marine Biotechnology*, 2005, **7** (4): 339~ 349
- [25] Sun H Y, Zhou K Y, Song D X. Mitochondrial genome of the Chinese mitten crab *Eriocheir japonica sinensis* (brachyuran: Thoracostracata: Grapsoidae) reveals a novel gene order and two target regions of gene rearrangements. *Gene*, 2005, **349**: 207~ 217.
- [26] 张秀梅, 高天翔, 王溪宏. 冲绳日本绒螯蟹线粒体 DNA 12S rRNA 序列的研究. 湛江海洋大学学报, 2000, **20** (2): 11~ 15
- [27] Kocher T D, Thomas W K, Meyer A, *et al.* Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *PNAS*, 1989, **86**: 619~ 620
- [28] Stephen A K, Dawn S W. Phylogeography and systematics of the mud turtle, *Kinosternon bairii*. *The Revolution in Biology*, 2001, **3**: 797~ 801.
- [29] 姜永杰, 周发林, 黄建华等. 深圳海域斑节对虾野生种群线粒体控制区序列的多态性分析. 南方水产, 2006, **2** (1): 54~ 57.
- [30] Tzeng T D, Yeh S Y, Hui C F. Population genetic structure of the kuruma prawn (*Penaeus japonicus*) in East Asia inferred from mitochondrial DNA sequences. *Marine Science*, 2004, **61**: 913~ 920
- [31] Quan J X, Zhuang Z M, Deng J Y, *et al.* Low genetic variation of *Penaeus chinensis* as revealed by mitochondrial DNA COI and 16S rRNA gene sequences. *Biochemical Genetics*, 2001, **39**: 279~ 284
- [32] Gusmão J, Lazoski C, Solé-Cava A M. A new species of *Penaeus* (Crustacea: Penaeidae) revealed by allozyme and cytochrome oxidase I analyses. *Marine Biology*, 2000, **137**: 435 ~ 446
- [33] Lambeck K, Esat T M, Potter E K. Links between climate and sea levels for the past three million years. *Nature*, 2002, **419**: 199~ 206
- [34] Wang P X. Response of Western Pacific marginal seas to glacial cycles: paleoceanographic and sedimentological features. *Marine Geology*, 1999, **156**: 5~ 39.
- [35] Voris H K. Maps of Pleistocene sea levels in Southeast Asia: shorelines, river systems and time duration. *J Biogeogr*, 2000, **27**: 1 153~ 1 167.
- [36] 李成华, 李太武, 宋林生等. 福建南北泥蚶种内分化的 RAPD 分析. 动物学研究, 2003, **25**(5): 362~ 366.
- [37] 潘宝平, 宋林生, 卜文俊等. 青蛤两个易于群体的遗传多样性与分化研究. 水生生物学报, 2005, **29**(4): 372~ 378
- [38] Slatkin M. Gene flow and the geographic structure of natural population. *Science*, 1987, **236**: 787~ 792.