

基于线粒体 D-loop 基因的中国海三疣梭子蟹 遗传多样性与遗传分化研究

董志国^{1,2,3*}, 李晓英¹, 王普力⁴, 王文进¹, 张庆起⁵, 阎斌伦¹, 孙效文³

(1. 淮海工学院江苏省海洋生物技术重点建设实验室, 江苏 连云港 222005;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

3. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150001

4. 连云港市环境监测中心站, 江苏 连云港 222001;

5. 赣榆县海洋渔业技术指导站, 江苏 连云港 222100)

摘要: 为探明分布于中国四大海区的天然三疣梭子蟹群体遗传多样性与遗传分化状况, 实验以大连(DL)、东营(DY)、连云港(LYG)、舟山(ZS)、湛江(ZJ)和漳州(ZZ)6个三疣梭子蟹地理群体为研究对象, 采用线粒体控制区 D-loop 全基因序列为分子标记, 对中国海三疣梭子蟹野生群体的遗传多样性及群体遗传结构进行了分析。结果发现, 在用于分析的 1 141 bp 的 D-loop 全基因序列中共有 185 个变异位点, 129 个简约信息位点。60 个个体中共计 48 个单倍型, 单倍性多样性指数和核苷酸多样性指数显示中国沿海三疣梭子蟹群体具有较高的遗传多样性, 而且三疣梭子蟹在过去没有出现很强的选择效应, 群体大小稳定。6 群体三疣梭子蟹遗传分化指数(F_{ST})为 0.189 7, 将中国沿海三疣梭子蟹作为一个大群体来讲已产生了中度分化, 群体分化时间推断为(19.68~26.05)万年。LYG 分别和 DY、ZJ、ZZ, 以及 ZJ 和 ZZ 这 4 组之间无明显分化, 基因流较大($N_e m > 5$), 而其他 11 个群组间已存在一定程度的分化。特别是 ZS 与其它 5 群体产生了高度的遗传分化, DL 与其他 4 群体发生了中度分化。遗传距离与地理距离不存在显著的相关性, 群体发生与扩散可能有更复杂的原因。

关键词: 三疣梭子蟹; D-loop; 遗传多样性; 遗传分化; 地理群体

中图分类号: Q 347; S 917.4

文献标志码: A

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)属于十足目(Decapoda)、梭子蟹科(Portunidae), 广泛分布在中国四大海域以及日本、朝鲜、马来西亚群岛等水域。中国海梭子蟹资源丰富, 在过去几十年, 三疣梭子蟹的捕捞产量不断增长, 2010 年中国梭子蟹海洋捕捞产量达 35 万 t^[1], 但对舟山沿岸 2000—2009 年的研究结果显示其自然资源已呈现显著的衰退趋势^[2]。对长江口及其邻近的东海域三疣梭子蟹的线粒体 16S rRNA gene 群体研究结果表明, 三疣梭子蟹群体具有中等程度的单倍型多样性和相对较低的序

列分歧, 基于单倍型的空间扩散构架分析表明三疣梭子蟹具有相同遗传背景^[3]。对辽东湾、莱州湾、海州湾和舟山的三疣梭子蟹 4 个野生群体线粒体 16S rRNA 和 CO I 基因片段研究也发现种内变异较低^[4], 孙钦艳等^[5]对大连、潍坊、日照和舟山 4 个三疣梭子蟹地理群体的线粒体 DNA ND 5 基因序列分析结果也发现群体的遗传分化较小。相反, 对栖息于中国沿海三疣梭子蟹群体的形态多样性研究表明, 不同地理群体存在显著的形态差异^[6-7]; 用 mtDNA CO I 对长江口及其邻近的东海海域三疣梭子蟹群体

收稿日期:2013-03-20 修回日期:2013-05-24

资助项目:国家“十二五”科技支撑计划重大项目(2011BAD138B03); 国家自然科学基金项目(31072213); 江苏省科技支撑计划(BE2013370); 江苏省海洋生物技术重点实验室开放课题(2006HS002, HS08001)

通信作者:董志国, E-mail: dzg7712@163.com

研究认为群体间产生了明显的分化,基因流受到限制^[8],以线粒体 D-loop 部分片段(530 bp)为分子标记的研究结果也表明,四大海域三疣梭子蟹不同群体间有一定遗传分化^[9]。鉴于在三疣梭子蟹群体遗传学主要观点存在的分歧,需要用更多的分子证据全面探讨中国沿海三疣梭子蟹的群体结构和遗传状况。

D-loop 是线粒体上一段非编码区,称为控制区,位于 mtDNA 的 tRNA-Pro 和 tRNA-Phe 之间,是线粒体上进化速度最快,变异最丰富的区域,是研究种内和种间关系的非常有效的标记之一^[10]。中国南海三疣梭子蟹资源丰富,但其群体遗传结构及其与中国北方海区的系统关系、群体遗传多样性与遗传分化状况较少开展研究。因此,实验应用线粒体 D-loop 全长基因对中国海四大海区三疣梭子蟹遗传多样性和系统地理学开展深入研究,为不同学者的主要观点分歧找到更加科学的证据,最终为三疣梭子蟹种质资源保护与恢复、自然海区增殖放流和新品种的选育实施提供理论和科学指导。

1 材料与方法

1.1 样本采集

实验用 6 个地理群体三疣梭子蟹于 2005 年 9 月至 2006 年 1 月分别采集于辽宁大连(DL)、山东东营(DY)、江苏连云港(LYG)、浙江舟山(ZS)、福建漳州(ZZ)和广东湛江(ZJ)等自然海区(图 1),样本分别来自中国的渤海、黄海、东海和南海这四大海区。采集到的三疣梭子蟹活体运回实验室, -70 °C 低温冰箱保存。

1.2 DNA 抽提与 PCR 及测序

取附肢肌肉组织约 50 mg,先用蒸馏水将组织清洗干净,按照常规的酚-氯仿法提取 DNA。根据 GenBank 中三疣梭子蟹线粒体基因组序列(GenBank accession no. AB093006.1), D-loop 全基因的上游和下游用 Primer permier 5.0 软件设计特异 D-loop 引物, F: 5'-CGAGCTACTACACG-CAACAAC-3', R: 5'-GACGGTGTAATCCGTT-ACG A-3'。PCR 反应总体积为 50 μ L,包括 5 μ L 10 \times PCR Buffer, 4 μ L 25 mmol/L MgCl₂, 1 μ L 10 mmol/L dNTP, 4 μ L 2.5 mmol/L 双向引物, 0.4 μ L Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L), 3 μ L DNA 模板。PCR 反应条件为 94 °C 预变性 5 min 后进行降落

PCR, 94 °C 变性 45 s, 53 °C 退火 45 s(每 5 个循环降低 2 °C), 72 °C 延伸 1.5 min, 15 个循环, 接下来进行 94 °C 变性 45 s, 47 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 15 个循环, 最后 72 °C 充分延伸 10 min 4 °C 保存。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 染色后在凝胶成像系统检测。PCR 产物用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒(上海生工)进行纯化, 并送上海生工用 ABI 377 DNA sequencer (Applied Biosystems) 双向测序。

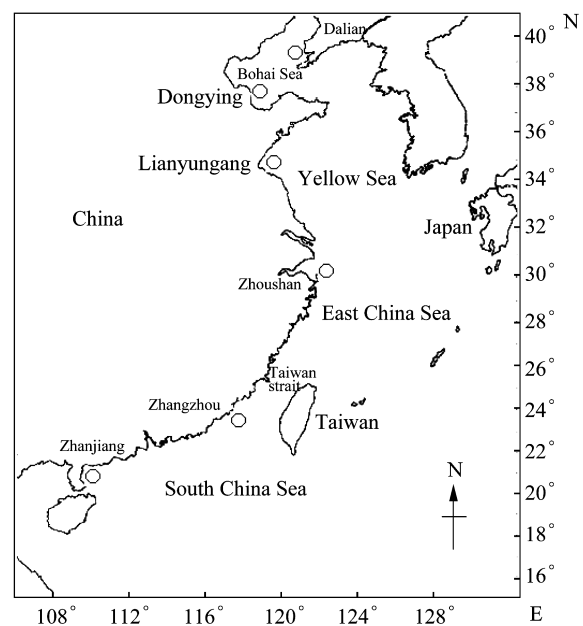


图 1 三疣梭子蟹的样本采集分布图

“O”代表采样地。

Fig. 1 Sample locations of *P. trituberculatus* along China coast

Locations of the 6 studied geographical populations along coast of China sea and the sample sites indicated by the circle.

1.3 数据处理

测得序列用 SeqMan 软件进行比对,并辅以人工校对。运用群体遗传分析软件 Arlequin 3.1.1 软件计算单倍型多样性 H_d 、核苷酸多样性 π 和群体遗传分化指数 F_{ST} , 并进行 Tajima's D 中性检验(Neutrality tests)和单倍型间的分子变异分析(AMOVA)。采用 MEGA4.0 软件分析碱基组成及核苷酸位点的替换数,计算群体间和群体内 Kumar 2-parameter 模型的遗传距离,构建 UPGMA 系统树并对拓扑图中的各个分支的支持率进行 1 000 次自展法重抽样检验。

2 结果与分析

2.1 三疣梭子蟹线粒体 DNA 序列特征及单倍型分布

实验测定了 6 群体 60 个三疣梭子蟹个体的 D-loop 基因序列,经比对后得到长度为 1 141 bp 的 D-loop 基因完整序列作进一步的分析。在 D-loop 基因完整序列中含有变异位点 185 个,占分析序列长度的 16.2%,含有 129 个简约信息位点,58 个转换位点(Ts),8 个颠换位点(Tv),平均转换比(Ts/Tv)为 7.25。碱基含量的平均值分别为:A = 39.2%、T = 36.9%、C = 8.8% 和 G = 15.1%。其 A + T 含量(76.1%)明显高于 C + G

含量(23.9%),表现出显著的碱基组成偏向性。

经统计 60 个个体共计 48 个单倍型(见 GenBank 中提交的序列 JQ868610-JQ868657 和表 1)。6 群体间只有 DL 与 DY 共享一种单倍型 AE (JQ868614);LYG 群体和 ZJ 群体中每个个体均为一种单倍型;而 DL 群体的 11 个个体含有 6 种单倍型,其中有 4 个个体共享单倍型 AC (JQ868612);DY 群体的 11 个个体含有 7 种单倍型,BA(JQ868616)为 4 个个体所共享;ZS 群体的 10 个个体中以及 ZZ 群体的 6 个个体中都有两个个体共享一种单倍型,分别是 DA(JQ868633)和 FB(JQ868654)。

表 1 三疣梭子蟹单倍型遗传信息
Tab.1 The haplotype information of *P. trituberculatus*

群体 stock	样本数 sample no.	单倍型数 haplotype no.	单倍型 haplotype	GenBank 登录号 accession no.	单倍型多样性 haplotype diversity	核苷酸多样性 nucleotide diversity π	Tajima's <i>D</i>
DL	11	6	AA AB AC AD AE AF	JQ868610-JQ868615	0.854 5 ± 0.085 2	0.024 0 ± 0.012 9	0.704 8
DY	11	7	AE BA BB BC BD BF	JQ868614, JQ868616-JQ868621	0.872 7 ± 0.089 1	0.021 4 ± 0.011 5	-0.961 9
LYG	11	11	CA CB CC CD CE CF CG CH CI CJ CK	JQ868622-JQ868632	1.000 0 ± 0.038 8	0.022 7 ± 0.012 2	-0.197 6
ZS	10	9	DA DB DC DD DE DF DG DH DI	JQ868633-JQ868641	0.977 8 ± 0.054 0	0.015 7 ± 0.008 7	1.658 5
ZJ	11	11	EA EB EC ED EE EF EG EH EI EJ EK	JQ868642-JQ868652	1.000 0 ± 0.038 8	0.033 0 ± 0.017 8	-0.364 0
ZZ	6	5	FA FB FC FD FE	JQ868653-JQ868657	0.933 3 ± 0.121 7	0.028 2 ± 0.016 7	0.213 9

2.2 群体遗传多样性及遗传分化

群体遗传多样性 对 6 个群体的遗传多样性分析,由表 1 可看出,6 个群体的单倍型多样性指数为 0.854 5 ~ 1.000 0,核苷酸多样性指数 π 为 0.015 7 ~ 0.033 0,多样性程度处于同一水平。ZS 群体 π 值最低 0.015 7,ZJ 群体最高为 0.033 0,表明中国海三疣梭子蟹具有丰富的遗传多样性。采用 Tajima's *D* 值进行中性检验,均不显著 ($P > 0.1$),符合中性突变,说明这 6 个群体的三疣梭子蟹在过去没有出现很强的选择效应和群体扩张模式,群体大小稳定。

群体遗传结构与遗传分化 6 群体三疣梭子蟹 AMOVA 分析结果见表 2,方差剖分显示遗传差异主要发生在群体内,占 81.03%,群体间的遗传分化指数 F_{ST} 为 0.189 7 ($P < 0.05$),说明群

体间产生一定程度的遗传分化。

6 群体三疣梭子蟹基于线粒体 D-loop DNA 水平的 Kimura 遗传距离和遗传分化指数见表 3。由表 3 可见,6 群体三疣梭子蟹之间遗传距离为 0.037 4 ~ 0.049 5,其中 DL 群体与 ZZ 群体的遗传距离最大,ZS 和 DY 群体的遗传距离其次,LYG 群体和 DY 群体的遗传距离最小,说明 DL 与 ZZ、ZS 与 DY 群体之间的亲缘关系相对较远,而 LYG 与 DY 之间的亲缘关系相对最近,总体上遗传距离并不大。

表 3 显示 LYG 分别和 DY、ZJ、ZZ,以及 ZJ 和 ZZ 之间分化不明显, $F_{ST} < 0.05$ 、 $P > 0.01$,基因流较大, $N_e m > 5$ (表 4),而其他组合均存在较明显分化,特别是 ZS 与其它 5 群体产生了高度的遗传分化, $F_{ST} > 0.25$ 、 $N_e m$ 为 0.4 ~ 0.6,基因流较

低。DL 与其他 4 群体发生了中度分化, F_{ST} 为 19% 的进化速率为分子钟, 表 4 显示群体分化时间 0.11 ~ 0.21, $N_e m$ 为 0.94 ~ 1.83。以每百万年 间为 (19.68 ~ 26.05) 万年。

表 2 三疣梭子蟹群体分子变异分析结果
Tab.2 AMOVA results of *P. trituberculatus* stocks

遗传差异来源 source of variation	自由度 df	平方和 sum. of square	方差组分 variance components	各方差所占比例 percent of variation
群体间 inter-stock	5	210.514	2.964 1Va	18.97
群体内 intra-stock	54	683.604	12.659 3Vb	81.03
总计 total	59	894.118	15.623 4	100

$F_{ST} = 0.1897, (P < 0.05)$ 。

表 3 三疣梭子蟹群体间的遗传分化指数 (左下角) 和遗传距离 (右上角)
Tab.3 Pairwise F_{ST} and pairwise distance of *P. trituberculatus* stocks

	DL	DY	LYG	ZS	ZJ	ZZ
DL		0.041 8	0.041 7	0.044 5	0.046 2	0.049 5
DY	0.154 0*		0.037 4	0.048 2	0.043 1	0.047 7
LYG	0.148 8*	0.021 7		0.043 2	0.041 1	0.042 1
ZS	0.353 8*	0.391 3*	0.344 0*		0.047 1	0.046 5
ZJ	0.110 6*	0.056 2*	-0.010 6	0.289 0*		0.046 1
ZZ	0.210 4*	0.173 4*	0.046 7	0.390 8*	0.044 8	

注: 左下角是基于 Kimura 2P 的配对 F_{ST} , * 表示差异极显著 ($P < 0.01$); 右上角为遗传距离。

Notes: The pairwise F_{ST} based on Kimura 2P in lower left corner, the asterisk showing a significant difference $P < 0.01$ and genetic distance among the stocks in top right corner.

表 4 三疣梭子蟹群体间的基因流与群体分化时间
Tab.4 Gene flow and differentiation time of *P. trituberculatus* stocks

	DL	DY	LYG	ZS	ZJ	ZZ
DL		22.00	21.95	23.42	24.32	26.05
DY	1.373 4		19.68	25.37	22.68	25.11
LYG	1.430 6	11.260 1		22.74	21.63	22.16
ZS	0.456 7	0.388 9	0.476 8		24.79	24.47
ZJ	2.010 4	4.202 4	-23.879 5	0.615 0		24.26
ZZ	0.938 2	1.1918	5.098 7	0.389 7	5.326 6	

注: 左下角是 $N_e m, N_e m = 1/(4F_{ST}) - 1/4$, 粗斜体示 $N_e m > 5$; 右上角为分化时间, $\times 10\ 000$ Years, 分子钟为 0.19/MY, 参考文献[11]。

Notes: The value of $N_e m$ in lower left corner and $N_e m = 1/(4F_{ST}) - 1/4$; differentiation time of stocks in top right corner, $\times 10\ 000$ Years, molecular clock 0.19/MY.

2.3 系统发育关系分析

用 MEGA 4.0 软件的 UPGMA 法对 6 个群体三疣梭子蟹 mtDNA 控制区的 60 个序列构建系统发育树如图 2。由图 2 可以看出, 在三疣梭子蟹 6 群体内和群体间形成多个分支, 不同群体的个体分布在多个分支中, 说明 6 群体三疣梭子蟹系统发生的分化程度不是太严重。但在 ZS 和 DL 群体中部分个体形成各自独特的分支, 且具有较高的置信度, 表现出群体间遗传分化的真实性。为了进一步

分析群体间的遗传关系, 以群体遗传距离为单位构建的聚类树更直观地反映出这一关系 (图 3)。由图可见, DY 与 LYG 群体聚为一支, 然后依次与 DL、ZJ、ZS 和 ZZ 群体相连, 表明东营与连云港群体之间的亲缘关系较近, 与漳州群体亲缘关系最远。为验证遗传距离与地理距离的相关性, 对其进行了回归分析, 结果见图 4。以地理距离和遗传距离构建的方程相关性较低, 相关系数 $R^2 = 0.138\ 3$, $P = 0.172\ 2 > 0.05$ 。

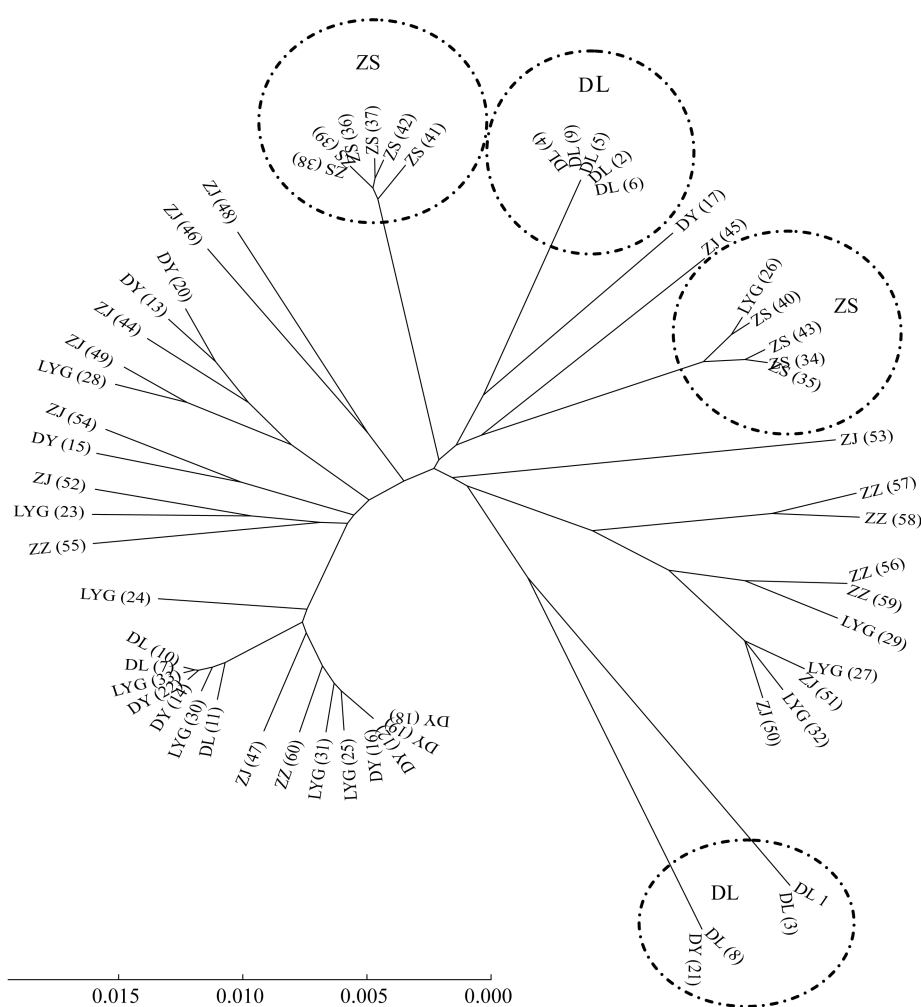


图 2 三疣梭子蟹 D-loop 单倍型聚类图

基于 Kimura 2-parameter 距离校正法的 UPMGA 聚类图, 圈中表示各独立的分支。

Fig. 2 D-loop haplotype cluster of *P. trituberculatus* stocks

The UPMGA cluster tree was based on Kimura 2-parameter corrected distance, the circle shows a single branch.

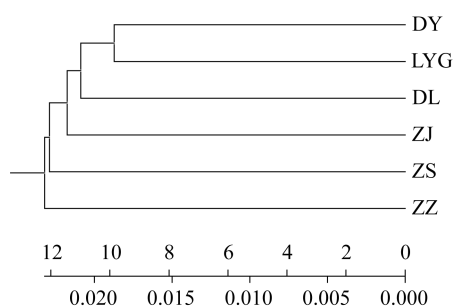


图 3 基于 UPMGA 的三疣梭子蟹群体系统聚类图
标尺上刻度为分化时间, 单位为万年; 标尺下刻度为遗传距离。

Fig. 3 The cluster of *P. trituberculatus* stocks based on UPMGA

The ruler upper scale for the differentiation time, unit for million years; the lower scale for the genetic distance.

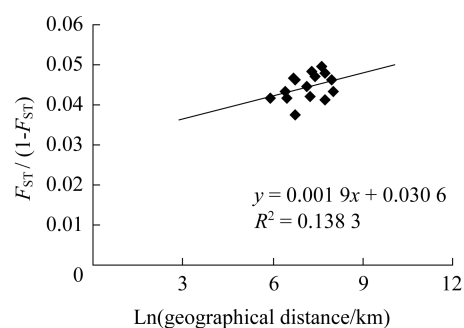


图 4 地理距离和遗传距离的回归曲线

地理距离以沿海岸线的直线距离或者是调整过的距离。

Fig. 4 The regression curve of geographic distance and genetic distance

Geographic distance from coastal line distance or adjusted distance.

3 讨论

3.1 三疣梭子蟹 D-loop 基因结构与遗传多样性分析

相对于漫长的分子进化速率来讲,实验所用 2005—2006 年的标本来反映当前遗传多样性状况应该是有效的,这主要是因为自然群体本身足够大,加之繁殖后代的代数有限,不足以在遗传上产生显著的差异,相关研究也表明近十几年人工放流对海州湾三疣梭子蟹天然资源的遗传状况并未产生明显影响^[12]。D-loop 基因由于是线粒体 DNA 的非编码区,其碱基替换速率快,一般认为是线粒体基因组上进化最快的部分,它的变异速率为 mtDNA 完整分子或是其它区域的 5~10 倍,作为分子钟的进化速率每百万年高达 19%^[11],这种高度的多态性,在研究群体遗传时对于一些样本难以获得的研究对象来讲是非常有效的。实验所用 60 个样本,特别是漳州群体由于酒精保存和长时间运输等原因导致部分样本的 DNA 降解而难以提取,造成样本略少的结果,但 D-loop 作为分子标记由于其丰富的多态性,反映群体的系统进化和遗传分化应该是有效的。6 群体 60 个三疣梭子蟹样本 D-loop 基因全序列中共发现 185 个变异位点(占分析位点总数 16.2%),其中 48 个单倍型,其中平均 A+T 含量达 76.1%,明显高于 C+G 含量。该结果与其他十足目动物线粒体控制区 A+T 含量特别高的研究结果相符^[13-15]。此外,已报道的中国沿海 9 群体三疣梭子蟹的 D-loop 部分序列,其 A+T 含量达 73.2%^[9],这种差异可能与序列的完整性有关,而吴惠仙等^[16]的研究结果与本结果基本一致。

一个物种的遗传多样性高低与其适应能力、生存能力和进化潜力密切相关。群体遗传多样性每损失 10%,就会对其繁殖能力、存活率、生长等重要生理性状产生极大的负面影响^[17]。核苷酸多样性是指群体内任意两个个体 mtDNA 序列每个位点的平均核苷酸差异数,其大小反映了遗传多样性程度的高低。 π 值较高则说明遗传多样性较高,反之亦然。已有研究表明,当核苷酸多样性指数在 0.001 0~0.004 7 时,其群体的遗传多样性较低^[18]。实验中,三疣梭子蟹 6 群体 mtDNA 核苷酸多样性 π 值较大,变化范围为 0.015 7~0.033 0,其上限高于冯冰冰等^[9]的研究结果

(0.016~0.026),可能与研究地理群体的不同、所用 D-loop 的长度大小不一致有关。但本实验结果表明,中国海区三疣梭子蟹遗传多样性较高,远高于对其它一些动物的核苷酸多样性指数 π ^[19-20]。本结果显示中国沿海三疣梭子蟹 D-loop 基因具有很高的遗传多样性,特别适宜作为群体、家系、品系鉴定的分子标记。

实验显示 6 个群体三疣梭子蟹的单倍型多样性指数 H_d 变化范围为 0.854 5~1.000 0。一般认为群体内能够维持较高单倍型多样性的可能原因是较大的群体数量、环境异质性和具有适应群体快速增长的生活史和行为生态特性^[21]。根据群体单倍型多样性和核苷酸多样性之间的关系并将群体的扩张事件分为 4 种类型^[22]:①低单倍型多样性和低核苷酸多样性($H_d < 0.5, \pi < 0.5\%$),表明群体最近发生了瓶颈效应或由单一、少数系群发生了奠基者效应;②高单倍型多样性和低核苷酸多样性,属于瓶颈效应后伴随着迅速的群体成长与突变的积累;③低单倍型多样性和高核苷酸多样性,可能来自于多个独立群体发生了交流,或曾经稳定的大群体发生了瓶颈效应;④高单倍型多样性和高核苷酸多样性,说明群体可能由一个大而稳定的群体经过长时间演化所产生或由多个不同系群的群体二次接触所形成。中国海 6 群体三疣梭子蟹应属于第 4 种类型,即在历史上三疣梭子蟹沿海群体均具有较大的群体数量,这是其维持各自较高遗传多样性的基础。采用 Tajima's D 值进行中性检验结果表明符合中性突变,说明这 6 个群体的三疣梭子蟹在过去没有出现很强的选择效应和群体扩张模式,群体大小稳定也证明中国海三疣梭子蟹具有稳定的遗传多样性。

3.2 三疣梭子蟹群体遗传分化

Freeland^[23] 据 F_{ST} 大小划定了群体的分化程度:低度分化 $F_{ST} = 0 \sim 0.05$,中度分化 $F_{ST} = 0.05 \sim 0.25$,高度分化 $F_{ST} > 0.25$,成为一般接受的群体遗传分化标准。本研究将中国四大海区的 6 群体三疣梭子蟹作为一个整体,其 F_{ST} 为 0.189 72 ($P < 0.05$),这说明将中国沿海三疣梭子蟹作为一个大群体来讲已产生了中等程度的分化。这一结果支持 Liu 等^[8]和冯冰冰等^[9]的研究结果,但不支持对长江口及其邻近的东海域三疣梭子蟹的线粒体 16S rRNA 基因群体研究^[3],辽东湾、莱州

湾、海州湾和舟山的三疣梭子蟹 4 个野生群体线粒体 16S rRNA 和 CO I 基因片段研究^[4], 大连、潍坊、日照和舟山 4 个三疣梭子蟹地理群体的线粒体 DNA ND 5 基因序列分析^[5], 这些结果均发现群体的遗传分化较小。一般来说, 当 $N_e m > 5$ 时, 群体间能维持一个均一的基因库^[24], 实验结果显示 LYG 分别和 DY、ZJ、ZZ, 以及 ZJ 和 ZZ 之间分化不明显 $F_{ST} < 0.05$ 、 $N_e m > 5$ (表 4), 而其他组合均存在较明显分化, 特别是 ZS 与其它 5 群体产生了高度的遗传分化, $F_{ST} > 0.25$ 、 $N_e m$ 为 0.4 ~ 0.6, 基因流较低。DL 其他 4 群体发生了中度分化, F_{ST} 为 0.11 ~ 0.21, $N_e m$ 为 0.94 ~ 1.83。刘爽等^[25]应用 AFLP 分子标记技术对我国三疣梭子蟹黄海和东海两群体研究发现遗传多样性均处于同一水平, 基因流较高为 6.07, 而本实验结果并不完全支持这一结论。东海 ZS 群体与黄海、南海、甚至与同处东海的 ZZ 群体均显示出严重的遗传分化; 而来自于黄渤海的 DL 群体与东海、南海存在着中度分化的特征, 而且这种分化似乎无地域规律, 更趋向于独立的分化如孤岛效应。对于 ZS 和 DL 群体与中国四大海区三疣梭子蟹群体分化的原因和特殊性需要在更广泛层面上开展调查研究, 方能找到可靠的分化证据。

3.3 三疣梭子蟹群体遗传距离及亲缘关系

遗传距离的估计在分析群体间遗传关系、预测杂种优势和指导亲本选配等方面有重要作用。实验中 6 群体三疣梭子蟹之间遗传距离变异范围为 0.037 4 ~ 0.049 5, 遗传距离较小。Hedgecock 等^[26]提出甲壳动物同种不同群体间的遗传距离为 0.05 ~ 0.11。鉴于中国四大海域三疣梭子蟹群体间的遗传距离较小(0.037 4 ~ 0.049 5), 属三疣梭子蟹的不同地理群体。冯冰冰等^[9]研究显示群体的遗传距离更小(0.018 ~ 0.025), 这可能与所用 D-loop 序列较短有关。

在 UPGMA 法构建的三疣梭子蟹 mtDNA 控制区系统发育树中(图 2), 6 个群体三疣梭子蟹群体内和群体间形成多个分支, 不同群体的个体分布在多个分支中, 说明 6 群体三疣梭子蟹遗传距离相近, 但在 ZS、DL 群体中部分个体形成各自独特的分支, 表现出群体间显著的遗传分化。以 D-loop 进化速率每百万年高达 19%^[12]作为分子钟构建的群体系统树(图 3), 显示中国海三疣梭子蟹分化时间为(19.68 ~ 26.05)万年前, 属第四

纪更新世, 又称冰川期, 主要以由于海平面下降和气温较低为特征, 这些地质事件可能是引起三疣梭子蟹分化的主要原因。6 个群体的亲缘关系与它们的地理位置并无完全的相关性(图 4), 但部分群体遗传距离与地理距离有一定的相关性。吴惠仙等^[16]对渤海、黄海和东海不同群体的三疣梭子蟹 mtDNA D-loop 片段序列变异研究结果显示, 中国沿海各海区三疣梭子蟹群体亲缘关系的远近与地理位置的远近无关, 这与本结果一致。这可能与它们的进化过程和环境的影响有关, 但还需要进一步的证实。

参考文献:

- [1] 中国农业部渔业局. 2011 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011: 33 - 52.
- [2] 贺舟挺, 张洪亮, 李鹏飞. 2000—2009 年舟山市蟹笼渔业的发展概况[J]. 浙江海洋学院学报: 自然科学版, 2011, 30(4): 313 - 317.
- [3] Xu Q H, Liu R L, Liu Y. Genetic population structure of the swimming crab, *Portunus trituberculatus* in the East China Sea based on mtDNA 16S rRNA sequences [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2009, 371(2): 121 - 129.
- [4] 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: 自然科学版, 2010, 40(3): 54 - 60.
- [5] 孙钦艳, 王敏强, 苏培, 等. 三疣梭子蟹不同地理群体线粒体 DNA ND5 基因序列的变异与分析[J]. 大连海洋大学学报, 2010, 25(6): 518 - 522.
- [6] 高保全, 刘萍, 李健, 等. 三疣梭子蟹 4 个野生群体形态差异分析[J]. 中国水产科学, 2007, 14(2): 223 - 228.
- [7] 董志国, 李晓英, 阎斌伦, 等. 中国海五种群三疣梭子蟹的形态差异分析[J]. 海洋通报, 2010, 29(4): 421 - 426.
- [8] Liu Y, Liu R L, Ye L C, et al. Genetic differentiation between populations of swimming crab *Portunus trituberculatus* along the coastal waters of the East China Sea[J]. Hydrobiologia, 2009, 618: 125 - 137.
- [9] 冯冰冰, 李家乐, 牛东红, 等. 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[J]. 动物学杂志, 2008, 43(2): 28 - 36.
- [10] 谢振宇, 杜继曾, 陈学群, 等. 线粒体控制区在鱼类种内遗传分化中的意义[J]. 遗传, 2006, 28(3): 362 - 368.

- [11] Brown W M. The mitochondrial genome of animals [M] // MacIntyre R J. Molecular Evolutionary genetics. New York: Plenum Press, 1985: 95 - 130.
- [12] 董志国. 中国沿海三疣梭子蟹群体形态、生化与分子遗传多样性研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2012: 104 - 110.
- [13] Miller A D, Murphy N P, Burrige C P, *et al.* Complete mitochondrial DNA sequences of the Decapod Crustaceans *Pseudocarcinus gigas* (Memppidea) and *Macrobrachium rosenbergii* (Palaemonidae) [J]. Marine Biotechnology, 2005, 7 (4): 339 - 349.
- [14] 徐敬明. 蟹类线粒体 DNA 的研究与应用 [J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2006, 36 (6): 879 - 884.
- [15] 郭天慧, 孔晓瑜, 陈四清, 等. 三疣梭子蟹线粒体 DNA 16S rRNA 和 CO I 基因片段序列的比较研究 [J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2004, 34 (1): 22 - 28.
- [16] 吴惠仙, 徐雪娜, 薛俊增, 等. 中国沿海三疣梭子蟹的遗传结构和亲缘关系分析 [J]. 海洋学研究, 2009, 27 (3): 48 - 53.
- [17] Allendorf F W, Ryman N, Utter F. Genetic management of hatchery stock [M] // Ryman N, Utter F, Eds. Population genetics and fishery management. Seattle and London: Washington Sea Grant Publications/University of Washington Press, 1987: 141 - 159.
- [18] Lan H, Shi L M. The origin and genetic differentiation of native breeds of pigs in southwest China: An approach from mitochondrial DNA Polymorphism [J]. Biochemical Genetics, 1993, 31 (1 - 2): 51 - 60.
- [19] 张成福, 徐利娟, 姬秋梅, 等. 西藏牦牛 mtDNA D-loop 区的遗传多样性及其遗传分化 [J]. 生态学报, 2012, 32 (5): 1387 - 1395.
- [20] 冉光鑫, 代应贵, 岳晓炯. 稀有白甲鱼西江种群 mtDNA D 环区的结构及遗传多样性 [J]. 上海海洋大学学报, 2012, 21 (2): 176 - 182.
- [21] Nei M. Molecular evolutionary genetics [M]. New York: Columbia University Press, 1987: 1 - 89.
- [22] Grant W S, Bowen B W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation [J]. The Journal of Heredity, 1998, 89 (5): 415 - 426.
- [23] Freeland J R. Molecular ecology [M]. Chichester: John Wiley & Sons, 2005: 112 - 116.
- [24] Slatkin M. Gene flow and the geographic structure of natural population. (mutation, genetic drift, and natural selection lead to genetic differentiation) [J]. Science, 1987, 236 (4803): 787 - 792.
- [25] 刘爽, 薛淑霞, 孙金生. 黄海和东海三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 的 AFLP 分析 [J]. 海洋与湖沼, 2008, 39 (2): 152 - 156.
- [26] Hedgecock D, Tracey M L, Nelson K. Genetics [M] // Abele L G, Eds. The biology of Crustacea. New York: Academic Press, 1982: 283 - 403.

**Genetic diversity and genetic differentiation of swimming crab
(*Portunus trituberculatus*) from six geographical populations of
China Sea based on mitochondrial D-loop gene**

DONG Zhiguo^{1,2,3*}, LI Xiaoying¹, WANG Puli⁴, WANG Wenjin¹,
ZHANG Qingqi⁵, YAN Binlun¹, SUN Xiaowen³

(1. Key Laboratory of Marine Biotechnology of Jiangsu Province, Huaihai Institute of Technology,
Jiangsu, Lianyungang 222005, China;

2. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150001, China;

4. Lianyungang Environmental Monitoring Central Station, Lianyungang 222001, China;

5. Ganyu Fishery Technical Extension Center, Lianyungang 222100, China)

Abstract: A swimming crab is one of the most economically important edible marine crabs in the East Asia area, and it is widely distributed in the coastal waters of China, Japan and Korea. To assess the level of genetic diversity and genetic variation of swimming crab populations along China coasts, the species from the six geographical populations from China Sea (Dalian, Dongying, Lianyungang, Zhangzhou, Zhoushan and Zhanjiang) were studied based on mitochondrial D-loop whole gene sequences. There were 1 141 bp, 185 variation sites and 129 parsimony informative sites in D-loop whole gene sequences. And there were 48 haplotypes among 60 swimming crab individuals. Nucleotide diversity index and Haplotype diversity index together revealed a high genetic diversity and low selective effect for swimming crab populations in China Sea. The genetic differentiation index F_{ST} of total six populations was 0.189 72, which meant that the genetic differentiation among populations was moderate and significant ($P < 0.05$) and the inferred differentiation time was about $(196.8 - 260.5) \times 10^3$ years. Low gene flow indicated that there were genetic differentiations among the fifteen groups, except between LYG and DY, ZJ, ZZ, respectively, in addition between ZJ and ZZ ($N_e m > 5$). Especially, there were pronounced levels of genetic differentiation between ZS and the others and a moderate genetic differentiation between DL and LYG, DY, ZJ and ZZ, respectively. The genetic distance had no significant correlation with geographical distance, so there may be more intricate reasons in population occurrence and spread.

Key words: *Portunus trituberculatus*; D-loop; genetic diversity; genetic differentiation; geographical populations

Corresponding author: DONG Zhiguo. E-mail: dzg7712@163.com.