

文章编号:1000-0615(2009)01-0015-09

## 利用线粒体 DNA 标记分析中国东南沿海 拟穴青蟹种群遗传结构

路心平<sup>1,2,3</sup>, 马凌波<sup>2</sup>, 乔振国<sup>2</sup>, 张凤英<sup>2</sup>, 马春艳<sup>2</sup>

(1. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071;

2. 中国水产科学研究院东海水产研究所农业部海洋与河口渔业重点开放实验室, 上海 200090;

3. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要:**为研究我国东南沿海拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)的种群遗传结构,对 10 个地理种群 130 只拟穴青蟹的线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 细胞色素氧化酶亚基 I (COI) 基因片段序列进行分析。522 bp 的 DNA 片段共发现 17 个变异位点,定义了 21 种单倍型,其中单倍型 2 为 10 个地方种群的共享单倍型,占个体总数的 56.15%,而大部分单倍型为稀有单倍型,只在少数种群的个别个体中出现。10 个种群的单倍型多样性水平为  $h=0.6738$ ,核苷酸多样性水平为  $\pi=0.1987\%$ ,基本呈由南到北递减的趋势。10 个种群的总体遗传分化程度较低( $F_{ST}\approx 0.05$ ),但是极为显著( $P<0.005$ )。基于单倍型频率和序列遗传距离法分析的共同结果,广西北海种群与大多数种群的遗传分化显著,而海南三亚种群分别与海南红树林和广东台山种群遗传分化显著。Mantel 检验显示种群间的遗传分化程度与地理距离没有显著的相关性。分子进化中性检验结果表明,自然选择在分子进化过程中起了重要作用,并暗示该物种在最近经历了一个快速的种群爆发及扩张事件。

**关键词:**拟穴青蟹;细胞色素氧化酶亚基 I;单倍型;种群遗传结构

**中图分类号:**Q 347;S 917

**文献标识码:**A

青蟹属 (*Scylla*) 隶属节肢动物门 (Arthropoda)、甲壳纲 (Crustacea)、十足目 (Decapoda)、梭子蟹科 (Portunidae),在我国主要分布于南部海岸到印尼爪哇海之间的南海水域<sup>[1]</sup>,以及我国长江以南的沿岸海域<sup>[2]</sup>。分布于中国沿海海域的青蟹大多是拟穴青蟹 (*Scylla paramamosian*) 而不是原先认为的锯缘青蟹 (*S. serrata*)<sup>[3-4]</sup>,青蟹属其余 3 种少量分布在我国北部湾和海南<sup>[5]</sup>。

青蟹是我国东南沿海重要的海水养殖品种之一,近年来遗传育种工作也在国内逐步开展起来,但是目前对我国东南沿海青蟹的种群遗传学背景仍很不了解,严重的限制了遗传育种工作的开展。在国内,目前只有黎中宝等<sup>[6-7]</sup>曾通过形态判别

和等位酶遗传分析,对分布在我国 6 个锯缘青蟹(该种应该为拟穴青蟹)自然群体进行了研究,认为这 6 个群体的形态特征比率非常相似,各群体间没有基因替换的现象,而且群体所有位点中共享大多数常见等位基因,其生化遗传特征非常相似。拟穴青蟹属于挖穴生活类型 (mamosain 类型)<sup>[5]</sup>,从生活习性上看,拟穴青蟹不同地理种群间的遗传差异容易受到地理阻隔和地理环境的影响。虽然从形态判别和等位酶水平看,拟穴青蟹的自然种群间差异不显著,但是在 DNA 分子水平采用更为合适的分子标记进行研究仍然很有必要。

线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 是核外 DNA,具有分子结构稳定、母系遗传、替换

收稿日期:2008-02-04 修回日期:2008-09-18

资助项目:国家科技支撑计划专题(2006BAD03B08-09);中央级公益性科研院所基本科研业务费重点项目(2007Z01);国家科技基础条件平台建设子项目课题(2004DKA30470-004)

通讯作者:马凌波, Tel:021-65688139, E-mail: malingbo@vip.sina.com

速率相对快、缺少重组等特征,已被证明其为动物群体进化研究中的一种有用的分子标记<sup>[8-10]</sup>。而细胞色素氧化酶亚基 I (COI) 序列是线粒体 DNA 标记中最为常用标记之一,其进化速率中等,目前被广泛应用于鱼类和甲壳类等海洋生物的种群遗传学研究中<sup>[11]</sup>。目前该标记已经在研究印度洋和西太平洋等区域的锯缘青蟹 (*S. serrata*) 的种群遗传结构中得到应用<sup>[12-13]</sup>。Gopurenko 等<sup>[12]</sup>通过分析 COI 序列,对 3 个印度洋种群,3 个澳大利亚种群及 3 个太平洋种群的锯缘青蟹 (*S. serrata*) 的遗传特征进行了研究,而 Fratini 等<sup>[13]</sup>同样采用 COI 序列标记进一步分析了印度洋东部非洲海域的锯缘青蟹种群遗传特征。但是迄今,将 mtDNA 用于拟穴青蟹不同种群的遗传多样性和遗传结构研究尚未见报道。

本研究通过测序分析我国东南沿海 (包括北部湾、海南东部,海南北部,海南南部,广东中部,闽东和浙南等 6 块海域 11 个采集地点) 的拟穴青蟹的 COI 序列,了解广泛分布在我国长江以南沿海拟穴青蟹的不同种群的遗传多样性状况、遗传差异以及生物地理特征,为青蟹的遗传资源保护和遗传育种工作提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

实验所用青蟹材料采集时间为 2005 年 7 月 19 日至 8 月 10 日间,均为采集点近海采集的野

生成体,采集时记录地理坐标,活体运回实验室,取足步肌肉,-86℃保存备用。10 个采集地点分别为:广西北海 (BH)、广西防城 (FC)、广西山口 (SK)、海南海口红树林 (HSL)、海南文昌 (WC)、海南万宁和乐 (HL)、海南三亚 (SY)、广东台山 (TS)、福建宁德 (ND)、浙江温州 (WZ) 等 (图 1)。各采样地点的经纬度和采集样本数见表 1。

### 1.2 总 DNA 的提取

剪取 100 mg 青蟹肌肉组织,使用蛋白酶 K-饱和酚/氯仿法<sup>[3-4]</sup>提取 DNA,ddH<sub>2</sub>O 溶解,并放于 4℃冰箱保存备用。

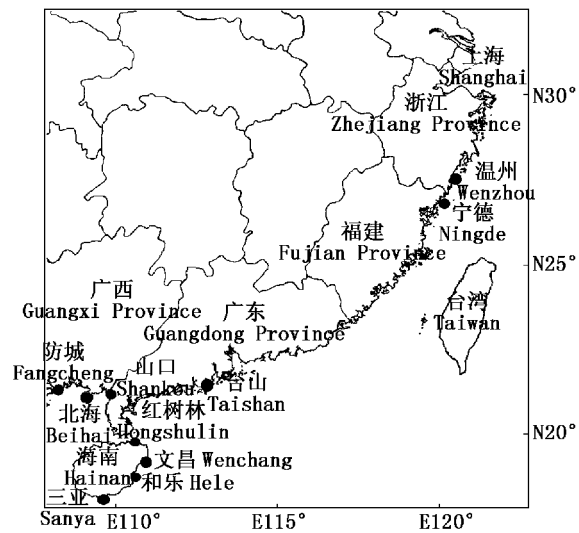


图 1 青蟹样品采集地点示意图  
Fig.1 Location and collection sites for mtDNA analysis of the mud crab in Southeastern China

表 1 不同地理种群的单倍型分布和遗传多样性  
Tab.1 *S. paramamosain* haplotype distribution and genetic diversity among 10 localities of Southeastern China

采样地点 locality	经纬度 longitude and latitude	单倍型 haplotypes																				N	N <sub>hap</sub>	h	π
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20				
三亚 SY	E109.31°, N18.14°	1	3							1	1						2	1	1			10	6	0.8889 ± 0.0910	0.4175 ± 0.2887
和乐 HL	E110.39°, N18.80°	1	8	1			1	1	1	1												14	7	0.6923 ± 0.1366	0.1880 ± 0.1518
文昌 WC	E110.72°, N19.61°	3	4	2	1		2		1													13	6	0.8590 ± 0.0633	0.2614 ± 0.1936
红树林 HSL	E110.35°, N20.02°	18					1	1	1	2									1	1	1	26	8	0.5262 ± 0.1176	0.1455 ± 0.1231
北海 BH	E109.07°, N21.28°	7	1				1						6	3	1	1						20	7	0.8070 ± 0.0587	0.2407 ± 0.1775
防城 FC	E108.20°, N21.37°	3								1	1											5	3	0.7000 ± 0.2184	0.2309 ± 0.2041
山口 SK	E109.71°, N21.46°	4					1			1												6	3	0.6000 ± 0.2152	0.1281 ± 0.1301
台山 TS	E112.78°, N22.27°	1	13			1	1															16	3	0.3500 ± 0.1478	0.0929 ± 0.0945
宁德 ND	E119.31°, N26.39°	2	4	1																		7	3	0.6667 ± 0.1598	0.1463 ± 0.1384
温州 WZ	E120.39°, N28.01°	9		1	1	1	1															13	5	0.5385 ± 0.1611	0.1578 ± 0.1353
合计 total		8	73	5	3	2	7	1	2	4	3	3	1	6	3	1	3	1	1	1	1	130	21	0.6738 ± 0.0465	0.1987 ± 0.1476

注: N 表示每个地点的样品数, N<sub>hap</sub> 表示每个种群发现的单倍型数, h 和 π 分别为单倍型多样性和核苷酸多样性  
Notes: N is the number of analysed individuals from each localities; N<sub>hap</sub> is the number of different haplotypes found in each population; h and π are the haplotype and nucleotide diversity, respectively

### 1.3 mtDNA 序列的 PCR 扩增和序列测定

根据青蟹属 mtDNA COI 特异性引物 Mtd-10<sup>[2]</sup>和 C/N2769<sup>[14]</sup>序列,经修正后进行扩增,修正后引物序列分别为 Mtd-10-sp (5'-CTGATTCTTTGGTCACCCAGAAGT-3') 和 C/N2769-sp (5'-TTAAGTCCTAGAAAATGTTGGGGAA-3')。PCR 反应体系为 50  $\mu$ L,包括 10  $\times$  PCR 反应缓冲液 5  $\mu$ L (成分:100 mmol/L Tris-Cl, 50 mmol/L KCl, 15 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1.3 mg/mL BSA, 0.01% Gelatin, pH 8.4); 基因组 DNA (20  $\mu$ g/mL) 1  $\mu$ L; dNTP (各 2.5 mmol/L) 1  $\mu$ L, 引物 (5  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L; Taq 酶 (5 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L; ddH<sub>2</sub>O 补足体积。PCR 反应试剂购自宝生物公司 (TAKARA)。样品在 PTC-200 DNA 扩增仪 (MJ 公司) 上进行扩增。94  $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 94  $^{\circ}$ C 45 s, 55  $^{\circ}$ C 45 s, 72  $^{\circ}$ C 60 s, 37 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4  $^{\circ}$ C 保存。扩增产物在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳, PCR 产物由上海联合基因科技集团有限公司采用扩增引物双向测序, 避免测序可能产生的错误。本实验获得序列提交至 GeneBank (登录号: EU664319 - EU664339)。

### 1.4 数据分析

测序结果采用 MEGA4.0 软件<sup>[15]</sup>进行比对。种群内的遗传多样性水平采用单倍型多样性 ( $h$ ) 和核苷酸多样性 ( $\pi$ ) 估算, 其中  $h$  表示种群内 2 个随机选择的单倍型不同的概率, 核苷酸多样性表示一个种群内各单倍型两两间的核苷酸差异的平均百分比<sup>[16]</sup>。这两项指标通过 ARLEQUIN 2.001 软件进行估算。采用 Network 4.500 软件<sup>[17]</sup>构建单倍型间的进化网络图。

Tajima's  $D$  检验<sup>[18]</sup>和 Fu's  $F_s$  检验<sup>[19]</sup>通过 ARLEQUIN 2.001 软件进行, 用以验证数据是否偏离分子中性进化。群体间的遗传差异采用 ARLEQUIN 2.001 中的分子方差 (AMOVA) 分析<sup>[20]</sup>, 采用单倍型频率以及单倍型间的 Tajima 和 Nei 遗传距离<sup>[21]</sup>分别估算  $F_{ST}$  指数<sup>[22]</sup>。 $F_{ST}$  值的显著性水平在种群间无分化的假设下, 由种群间单倍型平均 10 000 次置换 (permutation) 计算,  $P$  值为置换导致  $F_{ST}$  值大于或等于观察值的比例。

Mantel 检验<sup>[23]</sup>采用 ARLEQUIN 软件进行, 检验是否遗传距离 (各地理单元间比较单倍型频

率得到的  $F_{ST}$  值) 与地理距离具有相关性, 显著性通过 1 000 次置换检验。

## 2 结果

### 2.1 线粒体 COI 基因序列变异分析

利用针对拟穴青蟹的特异性扩增引物 Mtd-10-sp 和 C/N2769-sp 扩增得到 596 bp 的产物, 经测序和序列比对后得到 522 bp 的可比序列。10 个地理种群 128 只青蟹样本的 522 bp 的 COI 基因可比序列中 T、C、A、G 平均含量分别为 37.1%、17.5%、29.3%、16.1%。T + A 含量超过了 60%, 明显高于 G + C。所有序列中共存在 17 个变异位点 (占全部碱基数的 2.68%) (表 2), 其中 7 个变异位点为简约位点。转换和颠换分别是 12 个和 5 个, 没有插入和缺失。

**2.2 地理种群的单倍型和核苷酸遗传多样性分析** 17 个多态位点共定义了 21 种单倍型, 其中单倍型 2 在 10 个地理种群中均发现, 为 10 个地理种群的共享单倍型, 在各地理种群中都占最大的比例 (30% ~ 81%), 在总共 130 个个体中有 73 个, 占个体总数的 56.15%, 单倍型 6 和单倍型 1 分别在 6 个和 5 个地理种群中发现 (表 1)。8 种单倍型为稀有单倍型, 只在 1 个个体中发现。

种群内的遗传多样性水平通过单倍型 ( $h$ ) 和核苷酸多样性 ( $\pi$ ) 估算, 见表 1。各个地理种群 (除台山种群) 内的单倍型多样性水平 ( $h$ ) 都较高, 其中海南三亚 (SY) 种群的  $h$  值最高为  $0.8889 \pm 0.0910$ 。而广东台山 (TS) 种群  $h$  值最低, 只有  $0.3500 \pm 0.1478$ , 与其它种群相差较大。核苷酸多样性水平 ( $\pi$ ) 分析表明, 7 个地理种群的  $\pi$  值都较低, 其中最高的海南三亚 (SY) 种群为 0.4175% 左右, 而最低的广东台山种群为 0.0945% 左右, 单倍型间的核苷酸差异为 1 至 3 个碱基, 序列差异小于 1%。

根据各单倍型的频率和核苷酸差异, 基于简约法原理, 采用 Network 4.500 软件构建单倍型间的最小生成树 (图 2)。从图 2 可以看出, 整个进化网络呈星状, 单倍型 2 位于进化网络的中心, 大多数单倍型与之直接相连, 只存在一个核苷酸的差异。

表 2 21 个单倍型可比序列的变异位点情况

Tab. 2 Variable sites among 21 mitochondrial haplotypes of *S. paramamosain* from the Southeastern China

单倍型 haplotypes	单倍型间变异位点 variable nucleotide sites among haplotypes																量 number	
	007	015	027	075	126	132	138	141	207	234	252	297	300	438	454	462		513
	A	C	G	T	T	C	G	T	T	T	G	C	G	T	T	A		T
HAP1	A	C	G	T	T	C	G	T	T	T	G	C	G	T	T	A	T	8
HAP2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	73
HAP3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	T	.	.	5
HAP4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	A	.	.	.	.	3
HAP5	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	T	A	.	.	.	.	2
HAP6	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	T	.	.	.	.	.	7
HAP7	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	T	A	.	.	.	.	1
HAP8	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	2
HAP9	.	.	.	C	.	.	.	C	.	.	.	T	.	.	.	.	.	4
HAP10	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	3
HAP11	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	3
HAP12	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	.	C	.	.	.	1
HAP13	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	6
HAP14	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	C	.	.	.	3
HAP15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	C	.	1
HAP16	.	.	A	.	.	.	.	C	.	.	.	T	.	.	.	.	.	3
HAP17	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	T	.	.	C	.	.	1
HAP18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	1
HAP19	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	.	.	.	.	.	1
HAP20	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	T	.	.	1
HAP21	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	1

注:所有单倍型均与单倍型 1 进行比较,表示相同的核苷酸位点,HAP1-21 分别表示单倍型 1-21

Notes: all haplotypes are compared with haplotype 1; indicates identical nucleotides; HAP1-21 represents haplotype 1-21

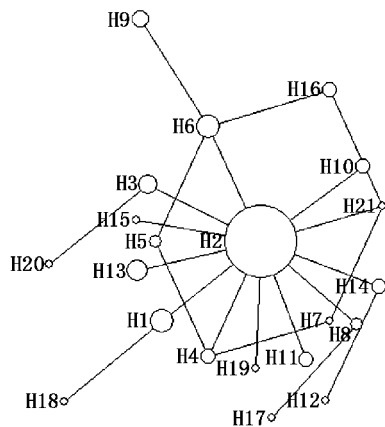


图 2 拟穴青蟹各单倍型间的系统进化网络图

Fig. 2 A network of phylogenetic relationships among all haplotypes found in *S. paramamosain*

### 2.3 10 个地理种群的遗传结构分析

种群间的遗传距离 种群间的遗传距离分别采用通过单倍型统计数据(基于单倍型频率)以及序列遗传距离数据(基于序列分歧值)来分析,二者得到的结果基本一致。但是只考虑单倍型频率的情况下, $F_{ST}$  值比较高一些( $F_{ST} =$

0.05585,  $P < 0.005$ ), 而通过序列遗传距离得到的  $F_{ST}$  值低一些( $F_{ST} = 0.05007$ ,  $P < 0.005$ )。这表明我国沿海各地理种群间的遗传分化主要基于单倍型的分布的差异,而不是单倍型间序列的分歧。

在种群间两两比较时发现(表 3),基于两种数据分析,广西北海种群(BH)与文昌(WC)、和乐(HL)、红树林(HSL)、台山(TS)、温州(WZ)等 5 个种群间都存在显著的遗传分化,三亚(SY)种群与台山(TS)和红树林(HSL)等 2 个种群遗传分化显著( $P < 0.05$ )。在基于单倍型频率数据分析时,海南文昌(WC)种群还与广东台山(TS),海南红树林(HSL)以及浙江温州(WZ)种群存在显著的遗传差异,而在基于序列遗传距离数据分析时,北海(BH)种群与宁德(ND)种群存在显著的遗传差异。

种群间的基因流 根据种群间的单倍型频率和序列遗传距离分别计算种群间的  $N_m$  值(表 3),结果发现,10 个地理种群间的基因流  $N_m$  值均大于 1,种群间存在不同程度的基因流。其中,遗

传差异不显著的种群间基因流水平都很高,部分种群间的  $N_m$  值趋于无限大。而遗传分化显著的种群间,相互交流的个体数则受到了限制,基本在 10 以内。

**种群 AMOVA 分析** 将 10 个地理种群按所在地理区域的远近分为海南南部、海南北部、海南东部、北部湾、广东和闽浙等 6 个不同地理组合,进行 3 个水平的分子变异分析(AMOVA 分析)(包括不同地理组合间,地理组合内的不同种群间以及种群内等 3 个层次)。根据单倍型频率和遗传距离分别分析,结果表明,种群间平均  $F_{ST}$  值为 0.055 85 或 0.050 07(表 4),种群间存在显著的遗传分化。分子变异主要发生在地理种群内,占 94.42% 或 94.99%。而组合间和种群间的

变异则较小,合计分别为 5.58% 或 5.01% (表 4)。

**种群的 Mantel 检验和分子中性进化检验** 通过 Mantel 检验,发现种群间的  $F_{ST}$  值(通过单倍型频率获得)与地理距离没有显著的相关性( $F_{ST}$  值由距离决定的比值为 0.024%,  $P > 0.05$ ),结果提示简单的距离分离模式不适合本文数据。

中性进化检验采用 Tajima  $D$  检验和 Fu 的  $F_s$  检验。结果显示, $D$  值为负值,显著偏离突变-漂离平衡( $D = -1.890 90$ ,  $P < 0.05$ ),而 Fu 的  $F_s$  检验结果( $F_s = -14.085$ ,  $P < 0.05$ )表明在较近的未来,我国东南沿海的拟穴青蟹可能经历了一个快速的种群爆发及扩张事件。

表 3 青蟹各地理种群之间遗传分化程度和基因交流情况

Tab.3  $F_{ST}$  and gene flow between 10 geographic units of mud crab from southeastern China

种群比 population comparison	文昌 WC	和乐 HL	红树林 HSL	三亚 SY	台山 TS	北海 BH	山口 SK	防城 FC	温州 WZ	宁德 ND
A. $F_{ST}$ 值 $F_{ST}$ value										
文昌 WC		-0.0267	0.0540	-0.0185	0.0302	0.0960	-0.0178	0.0571	0.0306	-0.0538
和乐 HL	0.0065		-0.0215	0.0105	-0.0074	0.0671	-0.0933	0.0252	0.0196	-0.0117
红树林 HSL	0.1268	-0.0179		0.0921	0.0023	0.0908	-0.0355	0.0153	0.0364	0.0538
三亚 SY	-0.0117	0.0092	0.1036		0.1004	0.1074	-0.0114	0.0479	0.0535	0.0219
台山 TS	0.1841	0.0224	-0.0060	0.1780		0.1015	-0.0046	0.0870	-0.0238	0.0538
北海 BH	0.0615	0.0746	0.1513	0.0432	0.2134		0.0352	0.0343	0.0975	0.0965
山口 SK	0.0338	-0.0909	-0.0510	0.0307	-0.0073	0.0784		0.0112	-0.0091	0.0609
防城 FC	0.0301	-0.0587	-0.0563	-0.0043	0.0293	0.0583	-0.0807		0.0774	0.0619
温州 WZ	0.0916	-0.0281	-0.0277	0.0835	-0.0356	0.1263	-0.0788	-0.0433		0.1083
宁德 ND	-0.0436	-0.0581	0.0273	-0.0047	0.0493	0.0816	-0.0243	-0.0383	0.0107	
B. M 值 M value										
文昌 WC		inf	8.767	inf	16.014	4.704	inf	8.249	15.791	inf
和乐 HL	76.391		inf	46.967	inf	6.946	inf	19.337	24.902	inf
红树林 HSL	3.441	inf		4.923	212.637	5.004	inf	32.053	13.228	8.782
三亚 SY	inf	53.735	4.323		4.478	4.155	inf	9.936	8.834	22.331
台山 TS	2.214	21.788	inf	2.307		4.423	inf	5.242	inf	8.779
北海 BH	7.623	6.194	2.803	11.074	1.842		13.706	14.057	4.628	4.678
山口 SK	14.264	inf	inf	15.750	inf	5.872		44.108	inf	7.702
防城 FC	16.061	inf	inf	inf	16.512	8.073	inf		5.954	7.569
温州 WZ	4.954	inf	inf	5.486	inf	3.455	inf	inf		4.114
宁德 ND	inf	inf	17.785	inf	9.637	5.626	inf	inf	46.179	

注:对角线上方数值由 Tajima & Nei 距离法计算获得,对角线下方数值由单倍型频率计算获得,黑体加粗数值表示显著差异( $P < 0.05$ )

Notes:  $F_{ST}$  values and consequently M values, are calculated from haplotypic frequencies (below the diagonal) and from genetic divergence data among haplotypes calculated with the method of Tajima and Nei (1984) (above the diagonal). Statistically significant values are shown in bold text ( $P < 0.05$ )

表 4 拟穴青蟹种群结构的分子变异(AMOVA)分析

Tab. 4 Evidence of population structure of *S. paramamosain* based on analysis of molecular variation (AMOVA)

遗传变异来源 source of variation	自由度 df	变异(%) variation	F 指数(hapl) F index	显著性 P	变异(%) variation	F 指数(Seq) F index	显著性 P
种群间 among populations	7	5.58	$F_{ST}=0.05585$	<b>0.00426</b>	5.01	$F_{ST}=0.05007$	<b>0.00455</b>
种群内 within populations	118	94.42			94.99		

注: F 指数由单倍型频率(hapl)以及根据 Tajima 和 Nei 方法获得的单倍型间的遗传差异值分别计算得到,显著性 P 通过 10 000 次重复计算得到并以黑体显示

Notes: F index was estimated using both haplotypic frequencies (hapl) and genetic divergence data among haplotypes (seq) calculated with the method of Tajima and Nei. Probability P was calculated from 10 000 replications. Statistically significant P values are shown in bold text

### 3 讨论

#### 3.1 我国东南沿海拟穴青蟹的遗传多态性

本文线粒体 COI 序列分析数据表明我国南部沿海 10 个地理种群的单倍型多样性水平( $h = 0.35 \sim 0.89$ ) (表 1) 属于中等偏高的水平,这与锯缘青蟹的结果( $h = 0.11 \sim 0.85$ )<sup>[7]</sup> 基本一致。但是单倍型间的序列分歧值却很低,例如与单倍型 2 相比,其余 15 个单倍型中有 12 个单倍型与它只存在 1 个核苷酸的差异,这也体现在种群内核苷酸多样性水平( $\pi$ ) 较低,10 个种群的核苷酸多样性水平  $\pi$  为 0.093% ~ 0.418%。从单倍型多样性和核苷酸多样性两个指标都可以看出,我国东南沿海拟穴青蟹的遗传多样性水平基本呈现由南到北逐渐减少的趋势,其特征为较高的单倍型多样性水平和有限的核苷酸多样性水平。这种特征不仅存在于拟穴青蟹以及锯缘青蟹,而且存在于多种海洋无脊椎动物,尤其是具有浮游幼体阶段的海洋甲壳类动物<sup>[11]</sup>,这一般被认为是该类生物具有较大的母系有效种群规模所导致的结果<sup>[24]</sup>。

#### 3.2 我国沿海拟穴青蟹的种群遗传结构特征

在本研究中,由于部分种群的样本个体数比较少,例如防城、山口、宁德、三亚等种群的样品数都在 10 个之内,这很可能在一定程度上影响了这些种群的统计和分析结果的可靠性。而采集样品中部分种群间的距离较近,例如防城和山口种群与北海种群位于距离较近的北部湾之内,文昌种群和和乐种群也同处于距离小于 100 km 之内的海区,将以上两块距离较近区域的样品合并后进行分析,结果并未出现较大的差别。AMOVA 分

析同样证实,合并后的组合间的变异只占 1.0% 左右, $F_{ST}$  值为 0.010,而且 P 值为不显著( $P > 0.05$ )。

本文研究发现,广西北海种群除了与同在北部湾区域内的防城和山口种群遗传差异不明显外,与其它区域的至少 5 个地理种群(文昌、和乐、红树林、台山和温州种群)的遗传差异都很显著,在基于序列遗传距离分析是还与温州种群存在显著遗传差异。这表明位于北部湾的拟穴青蟹与其它海域的种群个体基因交流较少,其主要原因很可能是因为北部湾海域与我国其它海域相比较处于一个较封闭的环境。

此外,海南三亚种群尽管样品个体数较少,但是分析结果表明它也与海南海口红树林种群以及广东台山种群存在较显著的遗传差异,而且在序列遗传距离上与北海种群也存在显著的遗传差异,与距离较近的和乐和文昌种群之间则基因交流较多。本文得到的 10 个种群间的遗传分化指数  $F_{ST}$  值为 0.05 左右(表 4),这与锯缘青蟹不同自然种群间的遗传差异水平( $F_{ST}$  值 = 0.04 和 0.02)<sup>[10]</sup> 基本相似,都处于较低的,但是显著的遗传分化水平。

本文结果表明拟穴青蟹虽然也有浮游幼体阶段,而且具有较强的扩散能力,但是它们不同自然种群在遗传上并不是均一的,种群间的基因流应该受到了包括海流、海岸地形以及游动能力等因素的限制。因为目前对于拟穴青蟹的幼体扩散能力,成体栖息游动特征以及地区海流的状况等因素还没有详细的文献报道和研究,我们还不知道这些因素分别在多大程度上影响了拟穴青蟹的种群遗传结构特征。但是目前已有许多种海洋无脊

椎动物被证实自然地理种群的遗传结构并不仅仅依赖于它们所表现出来的扩散能力,它还受到诸如洋流、地理阻隔和生活史特征等诸多因素的影响<sup>[25-26]</sup>。

### 3.3 我国沿海拟穴青蟹生物地理格局和种群演化

根据本文结果,很显然,简单的距离隔离模式并不能解释我国南部沿海拟穴青蟹的种群遗传结构特征,因为不同地理种群间的遗传差异大小与种群间的地理距离没有显著的相关性,例如:距离较远的广东台山种群与海南红树林种群间的遗传差异不显著,而距离较近的海南红树林与海南文昌种群的遗传差异显著, $F_{ST}$ 值达到 0.1268,因此缺乏明显的按地理单元划分的地理分布格局。

各地理种群的单倍型谱系分布特征是,一个单倍型即单倍型 2 在每个种群中都存在,而且占了最大的比例,部分单倍型为少量种群所共享,另外还存在稀有单倍型只在一个种群中一个个体发现(表 2)。这种单倍型分布方式被认为是一个较近的外来入侵事件和随后地理种群遗传分化的结果<sup>[27]</sup>。这一现象在锯缘青蟹的种群遗传结构分析中也同样发现<sup>[10]</sup>。

由于本文采样地点以及样本量的限制,种群进化的具体细节参数(扩张时间、种群数量大小等)还有待于今后更进一步的研究。此外,从单个或者少量几个基因评估青蟹不同种群的遗传多样性和特征是远远不够的,要清楚了解青蟹的种群遗传背景还需要综合运用多种分子标记进一步研究,以得出更全面和客观的结论。

### 参考文献:

- [1] Keenan C P, Davie P J F, Mann D L. A revision of the genus *Scylla* De Haan, 1833 (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Portunidae) [J]. Raffles Bull Zool, 1998, 46: 217-245.
- [2] Roehrdanz R L. An improved primer for PCR amplification of mitochondrial DNA in a variety of insect species [J]. Insect Mol Biol, 1993, 2: 89-91.
- [3] 张凤英,马凌波,乔振国,等. 青蟹线粒体 COI 假基因的分离和特征分析[J]. 遗传, 2006, 28(1): 43-49.
- [4] 马凌波,张凤英,乔振国,等. 中国东南沿海青蟹线粒体 COI 基因部分序列分析[J]. 水产学报, 2006, 30(4): 463-468.
- [5] 林琪,李少菁,黎中宝,等. 中国东南沿海青蟹属(*Scylla*)的种类组成[J]. 水产学报, 2007, 31(2): 211-219.
- [6] 黎中宝,李少菁,王桂忠. 中国东南沿海锯缘青蟹群体的形态判别分析[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2004, 43(1): 102-106.
- [7] 黎中宝,李少菁,王桂忠,等. 锯缘青蟹等位酶的生化遗传研究[J]. 中国生态农业学报, 2004, 12(2): 61-64.
- [8] Imai H, Obata Y, Sekiya S, et al. Mitochondrial DNA markers confirm successful stocking of mud crab juveniles (*Scylla paramamosain*) into a natural population [J]. Suisanzoshoku, 2002, 50: 149-156.
- [9] Imai H, Cheng J H, Hamasaki K, et al. Identification of four mud crab species (genus *Scylla*) using ITS-1 and 16S rDNA markers [J]. Aquat Living Resour, 2004, 17: 31-34.
- [10] Klinbunga S, Boonyapaladee A, Pratoomchat B. Genetic diversity and species-diagnostic markers of mud crabs (genus *Scylla*) in eastern Thailand determined by RAPD analysis [J]. Mar Biotechnol, 2000, 2: 180-187.
- [11] Bucklin A, Smolenack S B, Bentley A M, et al. Gene flow patterns of the euphausiid *Meganicytiphanes norvegica* in the NW Atlantic based on mtDNA sequences for cytochrome b and cytochrome oxidase I [J]. Plankton Res, 1997, 11: 1763-1781.
- [12] Gopurenko D, Hughes J M, Keenan C P. Mitochondrial DNA evidence for rapid colonisation of the Indo-West Pacific by the mud crab *Scylla serrata* [J]. Mar Biol, 1999, 134: 227-233.
- [13] Fratini S, Vannini M. Genetic differentiation in the mud crab *Scylla serrata* (Decapoda: Portunidae) within the Indian Ocean [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2002, 272: 103-116.
- [14] Gopurenko D, Hughes J M. Regional patterns of genetic structure among Australian populations of the mud crab *Scylla serrata* (Crustacea: Decapoda) evidence from mitochondrial DNA [J]. Mar Freshwater Res, 2002, 53: 849-857.
- [15] 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: 1596-1599.
- [16] Nei M. Molecular evolutionary genetics [M]. New York: Columbia University Press, 1987, 1-511.

- [17] Polzin T, Daneschm S V . On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs [ J ]. Operations Research Letters, 2003, 31: 12 –20.
- [18] Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism [ J ]. Genetics, 1989, 123: 585 –595.
- [19] Fu Y X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection [ J ]. Genetics, 1997, 147: 915 –925.
- [20] Exoffier L, Smouse P E, Quattro J M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes; application to human mitochondrial DNA restriction data [ J ]. Genetics, 1992, 131: 47 –491.
- [21] Tajima F, Nei M. Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequence [ J ]. Mol Biol Evol, 1984, 1: 269 –285.
- [22] Wright S. The genetical structure of populations [ J ]. Ann Eugen, 1951, 15: 323 –354.
- [23] Mantel N, The detection of disease clustering and generalized regression approach [ J ]. Cancer Res, 1967, 27: 209 –220.
- [24] Lavery S, Moritz C, Fielder D R. Indo-Pacific population structure and evolutionary history of the coconut crab *Birgus latro* [ J ]. Molecular Ecology, 1996, 5: 557 – 570.
- [25] Palumbi S R, Grabowsky G, Duda T, *et al.* Speciation and population genetic structure in tropical Pacific sea urchins [ J ]. Evolution, 1997, 51: 506 –517.
- [26] Hedgecock D. Temporal and spatial genetic structure of marine animal populations in the California current [ J ]. Ca ICOFI Rep, 1994, 35: 73 – 81.
- [27] Baker C S, Cipriano F, Palumbi S R. Molecular genetic identification of whale and dolphins products from commercial markets in Korea and Japan [ J ]. Molecular Ecology, 1996, 5: 671 –685.



## Population genetic structure of *Scylla paramamosain* from the coast of the Southeastern China based on mtDNA COI sequences

LU Xin-ping<sup>1,2,3</sup>, MA Ling-bo<sup>2</sup>, QIAO Zhen-guo<sup>2</sup>,  
ZHANG Feng-ying<sup>2</sup>, MA Chun-yan<sup>2</sup>

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Key and Open Laboratory of Marine and Estuarine Fisheries Certificated by the Ministry of Agriculture, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;

3. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** *Scylla paramamosain* (Decapoda: Portunidae) is a swimming crab that is widespread in the coast of Southeastern China and commonly found in estuarine and mangrove waters. Although it has been reported that no significant morphological and isozyme differences were found among populations of *S. paramamosain* in China, it is still necessary to study the genetic structure of *S. paramamosain* by more sensitive and stable molecular markers. Genetic diversity and structure of 10 populations of *S. paramamosain* were investigated and analyzed at the mtDNA label in this study. A total of 130 crabs from ten representative localities along the coast of Southeastern China were collected. A 522bp length fragment of the mitochondrial DNA cytochrome oxidase subunit I (mtDNA COI) gene was amplified and sequenced. Intraspecific variation of mtDNA COI gene was investigated in 130 individuals. We examined 522 base pairs (bp) and identified 21 different haplotypes. Each population sample is characterised by a single most frequent haplotype (Hap 2) with the highest frequency of 56.15%, shared among all ten populations, and a small number of rare ones, typically present in only one or two individuals and representative of several specific populations. The average haplotype ( $h$ ) and nucleotide diversity ( $\pi$ ) of ten populations is 0.6738 and 0.1987%, respectively. Analysis of molecular variance (AMOVA) and  $F_{ST}$  statistics analysis of mtDNA haplotype frequencies and sequence divergence data revealed a significant genetic differentiation ( $F_{ST} = 0.05$ ,  $P < 0.005$ ) among populations. In pairwise population comparisons, a highly significant genetic differentiation exists only between population BH and other 5 populations based on  $F_{ST}$  values from haplotype frequency and distance method, while population SY differs from HSL and TS significantly. Using a Mantel test, we found no significant correlation between pairwise population  $F_{ST}$  values (estimated by haplotypic frequencies) and geographic distances, suggesting that a simple model of isolation by distance is not appropriate for our data. Tests of neutral evolution (Tajima's  $D$  and Fu's  $F_s$ ) revealed the  $D$  statistic was negative with a significant deviation from mutation-drift equilibrium, and result of Fu's  $F_s$ -test, which was devised specifically to detect population expansion and is more sensitive to the presence of singletons in a sample, showed a highly significant value.

**Key words:** *Scylla paramamosain*; cytochrome oxidase subunit I; haplotype; population genetic structure