

文章编号: 1674-5566(2009)02-0136-06

浙江近海三疣梭子蟹群体遗传结构的初步分析

刘 勇¹, 许强华^{1,2,3}, 陈新军^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学海洋科学学院, 上海 201306

2. 大洋生物资源开发和利用上海市高校重点实验室, 上海 201306

3. 大洋渔业资源可持续开发省部共建教育部重点实验室, 上海 201306)

摘 要: 对我国浙江近海 4 个采样点(长江口、嵊泗群岛、舟山群岛、洞头群岛)的 147 个三疣梭子蟹个体的线粒体 DNA 16S rRNA 部分序列进行了测定和分析, 获得其基因片段长度为 991 bp, 共发现 14 种单倍型, 11 个核苷酸多态性变异位点。长江口、嵊泗群岛、舟山群岛、洞头群岛 4 个地方群体的平均核苷酸多样性和单倍型多样性分别为 0.000 89 和 0.565。其中, 嵊泗群岛群体的遗传多样性水平最高(核苷酸多样性 0.001 27, 单倍型多样性 0.754), 长江口群体最低(核苷酸多样性 0.000 34, 单倍型多样性 0.322)。长江口与嵊泗群岛群体之间的遗传分化指数最大(0.102 26), 舟山群岛与洞头群岛群体之间遗传分化指数最小(0.025 75); 舟山群岛和洞头群岛群体之间的基因流最大(0.46), 长江口与嵊泗群岛群体之间基因流最小(0.19)。

关键词: 三疣梭子蟹; 16S rRNA; 遗传结构; 基因流; 浙江近海

中图分类号: S917 **文献标识码:** A

Study on population genetic structure of *Portunus trituberculatus* offshore Zhejiang

LIU Yong¹, XU Qiang-hua^{2,3}, CHEN Xin-jun^{2,3}

(1. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2. The Key Laboratory of Shanghai Education Commission for Ocean
Fishery Resources Exploitation, Shanghai 201306

3. The Key Laboratory of Sustainable Exploitation of Oceanic Fisheries
Resources, Ministry of Education, Shanghai 201306, China)

Abstract: The partial sequences of mDNA 16S rRNA of 147 *Portunus trituberculatus* individuals sampled from the coastal waters of the East China Sea in Zhejiang Province (Changjiang estuary, Shengsi islands, Zhoushan islands, Dongou islands) were sequenced and analyzed. A fragment of 991 base pairs of *P. trituberculatus* mDNA 16S rRNA gene was amplified, and 11 polymorphic sites and 14 distinct haplotypes were defined in our study. The mean sequence divergence values between nucleotide and haplotypes diversity was 0.000 89 and 0.565, respectively. Shengsi islands population had the highest genetic diversity ($\pi = 0.001 27$, $h = 0.754$), and Changjiang estuary population possessed the lowest ($\pi = 0.000 34$, $h = 0.322$). The coefficient of genetic differentiation between Changjiang estuary and Shengsi islands populations was the highest

收稿日期: 2008-06-27

基金项目: 上海市捕捞学重点学科 (S30702)

作者简介: 刘 勇 (1982-), 男, 浙江长兴人, 硕士研究生, 专业方向为海洋渔业资源。

通讯作者: 陈新军, Email: xjchen@shou.edu.cn

(0.102 26), and the lowest between Zhoushan and Dongtou islands populations (0.025 75). The largest gene flow was detected between Zhoushan and Dongtou populations (9.46), and the lowest between Changjiang Estuary and Shengsi islands populations (2.19).

Key words: *Portunus triuberculatus*; 16S rRNA; genetic structure; gene flow; offshore Zhejiang

三疣梭子蟹 (*Portunus triuberculatus*) 广泛分布在我国沿海及日本等水域^[1-2], 是我国大型海洋经济蟹类之一, 具有肉质好、食用价值高、生长快等特点, 1981年已被列为我国海洋水产养殖对象^[3]。20世纪50年代起一些学者陆续对其数量分布^[4]、生殖习性^[5]、生理生态、胚胎发育^[6]、病理研究、组织学等进行了研究。但其分子遗传特性的研究仅仅在近年才开展^[7-12], 外国学者研究也主要集中于日本海域, 如 Ina等^[13]曾利用 RFLP技术对日本冈山沿岸海域三疣梭子蟹的种群结构进行研究。而有关浙江近海海域三疣梭子蟹群体遗传结构方面的研究还未见报道。近年来, 我国沿海各地开展了三疣梭子蟹的大规模人工养殖, 这增加了个体间的基因交流, 产生了种质资源的保护、管理等方面的问题。为了有效地管理、利用和保护三疣梭子蟹的种质资源, 本文采用 PCR扩增和序列测定技术^[14-18], 对三疣梭子蟹 mtDNA 16S rRNA基因片段进行初步研究, 以期对浙江沿海三疣梭子蟹的种质资源的管理、保护和持续利用及遗传育种研究提供理论上的科学依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

本实验所用的 147只三疣梭子蟹从 2005年 12月—2007年 3月陆续采集自浙江近海海域的 4个采样点(长江口, 嵊泗群岛, 舟山群岛, 洞头群岛), 4个地点的样本采集个数分别为 33、41、33和 40。活体三疣梭子蟹样品运至上海海洋大学大洋渔业资源可持续开发省部共建教育部重点实验室后, 取螯足和附肢肌肉浸泡于 95%酒精固定, 置于 -20°C 冰箱中保存备用。采样的具体地理位置见图 1。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组总 DNA提取

取约 100 mg 95%酒精保存的三疣梭子蟹肌肉组织, 先用蒸馏水浸泡, 再尽量将其剪碎, 分别放入 1.5 mL 的 Eppendorf 离心管中, 加入 370 μL TNE 抽提缓冲液、20 μL 二硫苏糖醇 (DTT) 溶液、100 μL 10% SDS 溶液和 10 μL 蛋白酶 K (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 56°C 热水浴消化 2~3 h, 然后用酚-氯仿抽提法提取基因组 DNA, 2倍体积的预冷的无水乙醇和 1/10 体积的 NaAc 溶液沉淀, 经 TE 溶液溶解后, 于 -20°C 下保存备用。

1.2.2 PCR扩增

用于扩增 mtDNA 16S rRNA 基因片段扩增所用引物的核苷酸序列为 U: 5' - TAATGCTATACTAAAGATGAAATGT - 3' 和 D: 5' - TTAGAAGATAGAAACCGACCTG - 3'。

PCR扩增在 PTC-100 型 PCR 仪上进行, 25 μL 反应体积内含: 2.0 μL dNTP (含 MgCl_2 , 2.5 mmol/L), 0.65 μL 每个引物 (10 μM), 3 μL 模板 DNA (100~200 ng), 16 μL ddH₂O, 0.2 μL Taq 酶 (2.5 U/ μL) 和 2.5 μL 10 \times buffer 缓冲液 (2.5 U/ μL , 购自上海生工)。

PCR反应程序如下: 95°C 预变性 5 min, 然后 95°C 变性 1 min, 55°C 退火 1 min, 72°C 延伸 1.5 min, 循环 30 次; 最后 72°C 10 min 终延伸, 4°C 保存。PCR 扩增产物在 1.0% 琼脂糖凝胶 (1 \times TAE) 中进行电泳分离, EB 染色, 凝胶成像系统观察并照相记录。



图 1 三疣梭子蟹样本采集地点分布

Fig. 1. Sampling sites of *P. triuberculatus* population

1.2.3 PCR产物纯化和测序

PCR扩增产物用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测,目的片段用上海天根琼脂糖凝胶 DNA回收试剂盒进行纯化回收。使用上海生工的 ABI PRISM测序系统进行双向测序,并进行人工核对、矫正。

1.2.4 数据分析

应用 ClustalW软件进行序列比对^[19],运用 MEGA软件 2.1版本中 Kimura双参数法分析计算单倍型间的序列分歧度^[20]。种群遗传多样性的分析采用 DnaSP软件 3.51版本^[21],其中包括对单倍型多样性 (h)和核苷酸多样性 (π)两个遗传参数的计算^[22]。

应用 ARLEQUIN软件程序分子变异分析法 (Analysis of Molecular Variance, AMOVA)来分析不同分布种群间遗传结构状况。遗传分化指数 F_{ST} 值及其相应 P值 (10 000次排列测验)用于表明种群间的分化程度。基因流的计算,按照 $N_m = 1 / (4 F_{ST}) - 1/4$ 公式而得^[23]。

2 结果

2.1 序列及多态性分析

本研究对浙江近海 4个采样点的 147只三疣梭子蟹样本的 mtDNA 16S rRNA基因片段进行 PCR扩增和序列测定,获得其基因片段长度为 991 bp,共检测出 14种单倍型,除长江口群体外,其他 3个采样点均有自己特有的单倍型,各单倍型所拥有的样本数从 1—93不等 (表 1)。4个地方种群三疣梭子蟹 16S rRNA基因片段共检测到 11个多态性核苷酸变异位点 (表 1),占分析位点总数的 1.11%,基因序列变异是由两个碱基之间的转换/颠换造成,没有发现插入/缺失突变的核苷酸位点。在 4个群体中,长江口群体单倍型数量最少,为 3个,而嵎泗群岛、舟山群岛、洞头群岛 3个地方种群出现的单倍型数量分别为 7、5、6,其中 4号单倍型为 4个地方种群所共有,1号单倍型为 3个地方群体共有,5号、11号单倍型为 2个群体所共有 (表 2)。

表 1 三疣梭子蟹 16S rDNA序列多态性核苷酸位点及各单倍型的分布

Tab 1 The distribution of nucleotides polymorphic loci and haplotypes in 16S rDNA sequences of *P. trituberculatus*

单倍型	多态性位点											个体数
	4	9	10	3	5	6	8	8	8	8	9	
H1	A	A	A	C	T	A	A	T	T	T	A	10
H2	·	·	·	T	·	·	T	·	·	·	·	4
H3	·	·	·	T	·	G	·	·	·	·	·	6
H4	·	·	·	T	·	·	·	·	·	·	·	93
H5	C	·	·	T	·	·	·	·	·	·	·	6
H6	·	·	·	T	·	·	·	·	·	A	·	4
H7	·	·	·	T	·	·	·	·	·	G	·	1
H8	·	·	·	T	·	·	·	G	C	·	·	4
H9	·	·	·	T	G	·	·	·	·	·	·	1
H10	·	·	·	T	G	·	·	·	·	·	·	4
H11	·	·	G	T	·	·	·	·	·	·	·	6
H12	·	C	·	T	·	·	·	·	·	·	·	2
H13	·	C	G	T	·	·	·	·	·	·	·	2
H14	·	·	·	T	·	·	·	·	·	·	T	4

表 2 三疣梭子蟹单倍型数量及分布

Tab 2 Numbers and distribution of haplotypes of *P. trituberculatus*

群体	单倍型	数量
长江口	1, 4, 11	(3)
嵎泗群岛	1, 2, 4, 8, 11, 13, 14	(7)
舟山群岛	1, 4, 5, 10, 12	(5)
洞头群岛	3, 4, 5, 6, 7, 9	(6)

2 2 遗传多样性分析

群体中 mDNA 的核苷酸多样性 (π 值) 是衡量群体多态程度的重要指标, π 值越大, 群体的遗传多态程度就越高。本研究通过对三疣梭子蟹 mDNA 中的 16S rRNA 基因片段的分析, 探讨了长江口、嵊泗群岛、舟山群岛、洞头群岛 4 个地方群体的遗传多样性。研究得出: 上述 4 个群体 mDNA 的核苷酸多样性指数, 即 π 值分别为 0.00034 (长江口)、0.00127 (嵊泗群岛)、0.00068 (舟山群岛)、0.00064 (洞头群岛), 平均为 0.00089 (表 3)。说明在 4 个群体中, 嵊泗群岛群体的遗传多态性水平最高, 舟山群岛和洞头群岛群体其次, 长江口三疣梭子蟹群体的遗传多态性水平最低。单倍型多样性是衡量群体遗传多样性的另一个指标, 群体的单倍型种类越多, 其遗传多样性越高。本研究中, 嵊泗群岛、洞头群岛、舟山群岛和长江口群体中分别检测出 7、6、5、3 个单倍型。长江口、嵊泗群岛、舟山群岛、洞头群岛 4 个地方群体的单倍型多样性 (h) 分别为 0.322 ± 0.097 , 0.754 ± 0.059 , 0.576 ± 0.091 , 0.555 ± 0.084 , 平均为 0.565 ± 0.067 。

表 3 三疣梭子蟹 4 个群体线粒体 16S rRNA 基因的遗传多样性

Tab 3 Genetic diversities of mDNA 16S rRNA sequences in four populations of *Portunus trituberculatus*

群体	个体数量	单倍型数量	碱基差异数量	核苷酸多样性 (π)	单倍型多样性 (h)
长江口	33	3	2	0.00034	0.322 ± 0.097
嵊泗群岛	41	7	7	0.00127	0.754 ± 0.059
舟山群岛	33	5	4	0.00068	0.576 ± 0.091
洞头群岛	40	6	4	0.00064	0.555 ± 0.084
总计	147	14	11	0.00089	0.565 ± 0.067

2 3 遗传结构分析

由表 4 可以看出, 舟山群岛和洞头群岛群体之间的遗传分化指数较小, 为 0.02575, 长江口与嵊泗群岛群体间的遗传分化指数最大, 为 0.10266 ($P < 0.01$)。长江口与嵊泗群岛、嵊泗群岛与洞头群岛等群体之间的遗传分化指数都达到了极显著差异; 长江口与洞头群岛、嵊泗群岛与舟山群岛等群体之间的遗传分化指数达到了显著性差异。

洞头群岛与舟山群岛群体间的基因流最大, 为 9.46 其次是嵊泗群岛与舟山群岛之间, 长江口与嵊泗群岛群体间的基因流最小, 为 2.19 舟山群岛群体与其他各个群体之间存在着较大的基因流动, 其 $N_e m$ 值均在 4.85 ~ 9.46 间变动。

表 4 不同群体间的遗传分化指数 (F_{ST} 值) 和基因流 ($N_e m$ 值)

Tab 4 Genetic differentiation index and gene flow among different populations

种群	长江口	嵊泗群岛	舟山群岛	洞头群岛
长江口	—	2.19	4.85	3.88
嵊泗群岛	0.10266**	—	4.97	3.70
舟山群岛	0.04900	0.04791*	—	9.46
洞头群岛	0.06055*	0.06332**	0.02575	—

注: 横线下方是 F_{ST} 值, 上方为 $N_e m$ 估计值。种群间的基因流以 $N_e m$ 来估算, $N_e m$ 为每一世代种群间的个体迁移数。* 表示有显著性差异 ($P < 0.05$), ** 表示有极显著差异 ($P < 0.01$)。

3 讨论

3 1 浙江近海三疣梭子蟹群体内的遗传多样性

遗传多样性主要是指物种内的不同群体之间以及同一群体内不同个体之间的遗传变异的总和。它不仅是生物进化内在的源泉, 同时也是生物多样性的重要组成部分, 与物种的繁衍或濒危灭绝有着密切

的关系。遗传多样性在一定程度上决定了物种的分布以及数量多样性^[24]。从遗传学角度来看,一个物种遗传多样性水平的高低与其生存、适应及进化能力是紧密关联的,遗传多样性的降低可能导致物种适应性和生活力的降低,并最终导致物种种质的衰退^[25]。

从本实验结果看,浙江近海三疣梭子蟹 147 个个体 mtDNA 的 16S rRNA 基因片段长度为 991 bp,多态性位点为 11 个,在所研究的 4 个群体中,嵎泗群岛群体的核苷酸多样性和单倍型多样性最高,舟山群岛群体其次,长江口群体的核苷酸多样性和单倍型多样性均最低,表明三疣梭子蟹嵎泗群岛群体的遗传多样性水平最高,舟山群岛群体其次,长江口群体的遗传多样性水平则相对较低。除长江口群体之外的其他 3 个群体均有各自的单倍型,说明这些群体依然拥有各自的遗传多样性优势。由于东海三疣梭子蟹在 20 世纪 60 年代被大规模开发利用,捕捞压力过大,造成野生资源的严重衰退,可能导致长江口群体的遗传多样性较低,也可能是附近地区盲目的人工养殖和引种造成的,而嵎泗群岛群体的遗传多样性水平较高,可能是因为地理位置的得天独厚,距离其他群体较远,养殖的群体多用野生蟹来做亲本的缘故。

3.2 浙江近海三疣梭子蟹群体间的遗传多样性

群体间的遗传分化指数 (F_{ST}) 是用来判断群体间的遗传分化情况。根据各群体间的遗传分化指数,可以看出舟山群岛和洞头群岛群体之间的遗传分化指数较小,长江口与嵎泗群岛群体间的遗传分化指数最大。嵎泗群岛群体与其他群体都达到显著的遗传分化(表 4),而嵎泗群岛群体离岸较远,与其他群体间的地理位置相对较远,出现显著分化,很可能是地理隔离造成的。

物种的群体结构是进化遗传学的重要部分,而产生进化的一个重要因素就是基因流^[26]。基因流就是基因在群体中的运动^[27]。一些个体从一个群体迁移到另一个群体会把某些基因带到新的群体,从而产生基因流动,基因流是影响群体内部和群体之间遗传分化的重要因素^[28]。基因流会影响群体间的相似性或特征,基因流越大,群体间的相似性越大,它同时也增加了群体内部的遗传变化。从本研究结果来看,洞头群岛与舟山群岛群体间的基因流为最大,其次是舟山群岛与嵎泗群岛群体之间,长江口与嵎泗群岛群体间的基因流最小。舟山群岛与其他群体之间的基因流均大于 4,表明舟山群岛三疣梭子蟹群体与其他群体之间基因流动较为频繁。

3.3 浙江近海三疣梭子蟹的保护

目前,三疣梭子蟹人工育苗和养殖的蓬勃发展以及苗种的南北大交流,扰乱了原有的生态及遗传特性,造成了三疣梭子蟹种质资源的混杂。因此,有计划地开发利用东海三疣梭子蟹资源是保持其进化潜力和可持续利用的前提。

人工养殖三疣梭子蟹已在浙江近海广泛开展起来。在选育过程中,应选用遗传多样性水平比较高的嵎泗群岛三疣梭子蟹群体作为养殖亲本,提高三疣梭子蟹的环境适应性、生长性能及繁殖性能。同时,浙江近海每年都进行大量的三疣梭子蟹人工增殖放流,这必将对三疣梭子蟹资源的遗传结构产生影响。因此,在人工增殖放流前应对其遗传背景进行一定的调查,避免盲目地增殖放流造成种质资源混杂。与此同时,我们还应该加大对野生三疣梭子蟹资源的保护力度,监测和保护种质资源,建立三疣梭子蟹的保护区和原种场,降低三疣梭子蟹野生遗传资源的衰退速度,防止种质退化和优良性状的丧失,加强蟹苗规范化管理,真正实现三疣梭子蟹资源的合理开发利用。

参考文献:

- [1] 戴爱云,杨思谅,宋玉枝,等.中国海洋蟹类[M].北京:海洋出版社,1986:194-196
- [2] 宋海棠,俞存根,薛利建,等.东海经济虾蟹类[M].北京:海洋出版社,2006:83-85
- [3] 孙颖民,闫 愚,孙进杰.三疣梭子蟹幼体发育[J].水产学报,1984,8(3):219-226
- [4] 俞存根,宋海棠,姚光展.东海蟹类的区系特征和经济蟹类资源分布[J].浙江海洋学院学报(自然科学版),2003,22(2):108-113
- [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[J].浙江水产学院学报,1988,7(1):39-46
- [6] 薛俊增,堵南山,赖 伟.三疣梭子蟹活体胚胎发育的观察[J].动物学杂志,1998,33(6):45-49

- [7] 余红卫,朱东发,韩宝芹.三疣梭子蟹不同组织同工酶的分析[J].动物学杂志,2005,40(1):84—87
- [8] 冯冰冰,李家乐,牛车红,等.我国四大海域三疣梭子蟹线粒体控制区基因片段序列比较分析[J].上海水产大学学报,2008,17(2):134—139.
- [9] 李鹏飞,刘萍,李健,等.莱州湾三疣梭子蟹的生化遗传分析[J].海洋水产研究,2007,28(2):90—96
- [10] 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[J].水产学报,2005,29(6):751—756
- [11] 郭天慧,孔晓喻,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[J].中国海洋大学学报,2004,34(1):22—28.
- [12] 陈淑吟,吉红九,丁亚平,等.吕泗渔场三疣梭子蟹自然群体同工酶与 ISSR遗传多样性分析[J].上海水产大学学报,2008,17(4):406—410
- [13] Inai H, Fujii Y, Karakawa J. Analysis of the population structure of the swimming crab *Portunus trituberculatus* in the coastal waters of Okayama Prefecture by RFLPs in the whole region of mitochondrial DNA [J]. Fish Sci 1999 (65): 655—666.
- [14] Avise J C, Arnold J, Ball R M, et al. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics [J]. Annual Rev Ecol Syst 1987, 18: 489—522.
- [15] Billington N, Hebert P D N. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions [J]. Can J Fish Aquat Sci 1991, 48(sup): 80—94
- [16] 王玉江,高天翔,韩志强,等.中国和越南青蟹线粒体 16S rRNA基因序列分析[J].中国海洋大学学报,2005,35(4):554—558
- [17] 高天翔,任一平,张秀梅等.日本绒螯蟹线粒体 DNA序列研究II: 16S rRNA [J].青岛海洋大学学报,2000,30(3):482—486
- [18] 孙红英,周开亚,陆健健,等.中国大陆绒螯蟹线粒体 16S rDNA序列变异与分子鉴定标记[J].自然科学进展,2002,12(5):485—490.
- [19] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. Nucleic Acids Res 1994 (22): 4673—4680.
- [20] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences [J]. Journal of Molecular Evolution, 1980, 16: 111—120
- [21] Rozas J, Rozas R. DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis [J]. Bioinformatics 1999, 15(2): 174—175.
- [22] Nei M. Molecular Evolutionary Genetics [M]. New York: Columbia University Press, 1987: 512.
- [23] Slack J M. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations [J]. Evolution, 1993, 47: 264—279
- [24] 陈灵芝,马克平.生物多样性科学:原理与实践[M].上海:上海科学技术出版社,2004:93—123.
- [25] 刘亚军,喻子牛,姜艳艳,等.栉孔扇贝 16S rRNA基因片段序列的多态性研究[J].海洋与湖沼,2002,33(5):477—483
- [26] 曲若竹,侯林,吕红丽,等.群体遗传结构中的基因流[J].遗传,2004,26(3):377—382
- [27] Brian C Husband, Spencer C H Barrett. Estimates of gene flow in *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae): effects of range substructure [J]. Heredity, 1995, 75: 549—560
- [28] Slack J M. Gene flow and the geographic structure of natural populations [J]. Science, 1987, 236: 787—792