

北部湾拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)群体遗传结构及其扩张分析*

宋忠魁¹ 李梦芸^{1,2} 聂振平¹ 孙奉玉^{1,3} 赵鹏¹ 苏琼¹

(1. 广西海洋研究所 广西海洋生物技术重点实验室 北海 536000; 2. 湖南农业大学生物科学技术学院 长沙 410128;
3. 南华大学药学与生命科学院 衡阳 421001)

提要 利用线粒体 16S rRNA 基因片段分析北部湾拟穴青蟹群体遗传结构及其扩张历史。结果表明, 16S rRNA 基因片段长度在 521—523bp 之间, 6 个拟穴青蟹群体具 21 种单倍型。群体总体水平的单倍型多样性(h)和核苷酸多样性(π)分别为 0.6259 和 0.001851。群体间遗传距离与地理距离之间无相关性。群体间遗传分化系数(G_{st})在 0.02008—0.04362 之间, 基因流(N_m)值在 5.48—12.20 之间。AMOVA 分析表明, 群体间遗传变异占 0.1%, 群体内遗传变异占 99.9%。群体间固定指数(F_{st})的绝对值在 0.00026—0.02977 之间, 暗示群体间没有产生遗传分化。单倍型邻接树和单倍型中介网络图显示, 单倍型没有按采样地形成谱系分支。中性检验和错配分析揭示, 北部湾拟穴青蟹群体在历史上经历过群体扩张。群体扩张时间大致在更新世晚期的 0.04698 — 0.01879MY 前或 0.04520—0.01808MY 前。
关键词 北部湾, 拟穴青蟹, 遗传结构, 群体扩张, 16S rRNA 基因

中图分类号 Q347

拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)隶属于甲壳纲、十足目、短尾亚目、梭子蟹科、青蟹属, 是中国东南沿海青蟹属优势种(林琪等, 2007)。因其较高的经济价值, 拟穴青蟹成为中国东南沿海重要渔业对象之一。正因为如此, 拟穴青蟹的种质资源现状才备受人们关注。迄今为止, 应用各类标记技术包括核 DNA 标记(如 RAPD、AFLP、微卫星等)和线粒体 DNA 标记监控中国东南沿海拟穴青蟹的群体遗传结构及遗传分化已获得了一些重要结论(林琪, 2008¹⁾; 路心平等, 2009; 舒妙安等, 2011)。例如, 中国东南沿海拟穴青蟹群体间的遗传分化程度不高, 但群体间分化显著; 北部湾群体又与其它群体间的遗传分化显著。北部湾拟穴青蟹群体遗传结构的认知仅见于孙奉玉等(2012)利用 RAPD 标记的报道, 尚需其它尤其是不同类型的遗传标记提供更加丰富的证据。

应用线粒体 DNA 标记分析海洋动物群体遗传结

构和群体扩张涉及到的基因包括细胞色素氧化酶亚基 I(COI)基因、细胞色素 b (Cyt b)基因、16S rRNA 基因以及线粒体 DNA 控制区等(陈骁等, 2008; 刘至治等, 2009; 路心平等, 2009; 吕振明等, 2010, 2011; 傅蒙娜等, 2010; Yang *et al.*, 2007), 其中 16S rRNA 基因相对保守(谭树华等, 2009), 但其应用并没有因此受到限制。吕振明等(2010, 2011)基于 16S rRNA 基因部分序列分析了中国沿海 7 个短蛸群体遗传结构, 揭示了短蛸群体的遗传分化; 也分析了中国沿海鳊 4 个不同地理群体遗传分化, 证实了鳊群体的地理分化。16S rRNA 基因也曾用于日本囊对虾、三疣梭子蟹等海洋甲壳类动物的群体遗传结构分析, 为日本囊对虾和三疣梭子蟹进行有效的资源管理提供了数据支撑(刘勇等, 2009; 谭树华等, 2009)。上述事实说明, 16S rRNA 基因用于海洋动物群体遗传结构分析是一类有效的线粒体 DNA 标记。

* 广西科学基金项目, 0991275 号; 广西科学研究与技术开发计划项目, 09322003 号; 广西科学研究与技术开发计划项目, 11107012-11 号; 广西海洋生物技术重点实验室主任基金课题, 0801 号。宋忠魁, 副教授, E-mail: songsir2003@yahoo.com.cn

1) 林琪, 2008. 中国青蟹属种类组成和拟穴青蟹群体遗传多样性的研究. 厦门: 厦门大学博士学位论文, 1—102

收稿日期: 2011-11-21, 收修改稿日期: 2011-12-28

截止目前 16S rRNA 基因在拟穴青蟹中的应用仅限于种质资源身份鉴别, Keenan 等(1998)通过分析 COI 和 16S rRNA 基因序列特征鉴定出青蟹属的第 4 个种(即拟穴青蟹); 王玉江等(2005)基于 16S rRNA 基因序列分析认定, 所分析的中国和越南青蟹是拟穴青蟹; 吉鹏宇等(2008)利用了 COI 和 16S rRNA 基因序列分析了来自广东、福建、海南等区域的 6 个群体均为拟穴青蟹。毋庸置疑, 上述研究为 16S rRNA 基因运用到拟穴青蟹群体遗传学奠定了一个比较好的基础。基于分析 16S rRNA 基因序列, 认知来自北部湾的 6 个拟穴青蟹群体的遗传结构并探讨群体扩张事件, 为该区域拟穴青蟹野生资源的有效管理和合理利用提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用拟穴青蟹的 6 个野生群体在 2009 年 5 月—2010 年 5 月期间搜集, 样本鉴定依据林琪等(2007)描述的拟穴青蟹形态学特征。6 个采样点分别是防城港市珍珠湾(简称 ZZW)、钦州市钦州湾(简称 QZW)、合浦闸口(简称 ZK)、合浦党江(简称 DJ)、湛江流沙湾(简称 LSW)、越南清化(简称 QH), 采样点信息见表 1。共计分析拟穴青蟹样本数 113 个个体, 每个群体分析的样本数见表 2。所有样本均活体运回实验室, 速冻处死, 螯足于 -70°C 保存备用。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 取约 50mg 拟穴青蟹螯足肌肉组织, 以常规酚/氯仿法抽提基因组 DNA, 空气晾干, 灭菌超纯水溶解。采用核酸蛋白测定仪(Eppendorf, Germany)测定样品的总 DNA 浓度, 以 1.0%琼脂糖凝胶电泳($0.5\times\text{TBE}$)检测其质量, 于 -20°C 保存备用。

1.2.2 16S rRNA 基因片段 PCR 扩增、测序 PCR 反应在 BIO-RAD S1000TM Thermal Cyclers 上进行。

PCR 反应所使用的引物对和 PCR 反应体系以及扩增程序均参考高俊娜等(2010)的方法。选择 100bp Ladder plus (东盛生物)作为 Marker, 1.5%琼脂糖凝胶(含 0.5mg/L EB)电泳检测 PCR 扩增产物, 自动凝胶成像仪(Alpha innotech, USA)观察拍照。

PCR 扩增产物系单一条带且符合理论长度, 扩增引物同时也用作测序引物, 委托上海美吉生物医药科技有限公司广州分公司直接双向测序。

1.2.3 数据处理 使用 DNASTar 软件包中的 SeqMan 程序和 EditSeq 程序完成序列拼接、可疑位点判读、引物序列剪除等操作。执行 clustalx1.81 程序(Thompson *et al*, 1997)比对序列, 运行 seaview 程序(Galtier *et al*, 1996)检查比对结果并辅以手工校正。采用 MEGA 4.0 (Tamura *et al*, 2007)软件统计所有序列的平均碱基组成、转换/颠换比(配对缺失假设和核苷酸差异数量模型)、一致位点、可变位点、简约信息位点、单态性位点等; 基于 Kimura 双参数(K2-P)模型计算群体内和群体间的遗传距离, 并构建单倍型邻接(neighbor-joining)树(配对缺失假设和 1000 次自展重复)。用 Google-earth 估测地理距离, 用 TFGA1.3 (Miller, 1997)中的 Mantel 检测群体间遗传距离和地理距离间的相关性。

利用 Dnasp v5 软件(Librado *et al*, 2009)统计单倍型, 计算群体间遗传分化系数(G_{st})和基因流(N_m), 开展单倍型错配分布分析。利用 Arlequin 3.5.1.2 软件(Excoffier *et al*, 2010)统计单倍型多样性(h)、核苷酸多样性(π)及其标准差, 开展选择性中性检验, 执行其中的 AMOVA 分析以评估群体遗传结构(1000 次重排后的显著性检验), 计算群体间固定指数(F_{st})值及其 P 值(100 次重排后的显著性检验)。应用 NETWORK 4.6.1.0 软件(www.fluxus-engineering.com/network_terms.htm)构建单倍型中介(median-joining)网络图。

群体扩张时间(T)参考刘至治等(2009)报道中的

表 1 拟穴青蟹 6 个群体的采样点信息

Tab.1 Sampling location information of six *S. paramamosain* populations

群体	采样点	纬度	经度
珍珠湾	新阳村附近	21°35'57.21"—21°31'31.18"	108°11'50.06"—108°13'41.49"
钦州湾	红光村附近	21°49'33.51"—21°41'07.76"	108°33'01.14"—108°40'58.59"
闸口	交东村附近	21°44'07.33"—21°31'10.38"	109°32'53.48"—109°32'53.50"
党江	犀牛角镇近岸海域	21°38'43.85"—21°35'07.20"	109°04'36.19"—109°03'42.38"
流沙湾	静嘉近海海域	20°26'27.06"—20°23'51.06"	109°53'50.05"—110°00'02.41"
清化	流沙镇近海海域	19°52'19.24"—19°40'35.28"	105°57'43.20"—105°54'35.81"

数据分析方法进行, 整合后的公式如下: $T = \frac{\tau}{4\mu\kappa} \times$

代时; 其中 (τ)的期望值利用 Arlequin 3.5.1.2 软件进行错配分布(Mismatch distribution)分析并基于两类模型(sudden expansion 和 spatial expansion)计算, μ 是核苷酸进化速率(线粒体基因进化速率一般按 1%—2.5%每百万年计算), κ 是序列中核苷酸的数量, 代时取 1 (拟穴青蟹 1 年达到性成熟)。

2 结果与分析

2.1 序列变异和单倍型分析

结果见表 2。共计分析拟穴青蟹 6 个群体的 113 条序列, 其中 106 条序列的长度是 521bp, 4 条序列的长度是 522bp, 3 条序列的长度是 523bp。序列比对后的排列位点是 528 个, 其中一致位点 510 个(含 3 个 gap 位点, 排列位置分别为 17 位、18 位和 248 位), 可变位点 14 个(gap 位点不计入, 见表 2), 含 6 个简约信息位点、8 个单态性位点。此外, 有 4 个 gap 位点仅因 1 条序列有碱基插入造成, 未纳入一致位点和可变位点统计, 相应排列位置分别是 14 位、48 位、498 位和 514 位。碱基组成分析显示, A、T、C、G 的平均含量依次为 35.7%、35.9%、10.6%、17.8%, 表现出明显的反 G 偏倚。序列的平均转换/颠换比约等于 5.0。

处理 gap 为第 5 种状态共定义 21 种单倍型, 单倍型序列的 GenBank 登录号为 JQ929620—JQ929640。各个单倍型在群体中的分布见表 2, H4、H9 单倍型在 6 个群体中均有分布视为中心单倍型或主体单倍型, 13 种单倍型仅在单个群体中分布可作为独有单倍型, 另有 6 种单倍型为共享单倍型。单倍型 H4 频次最高(68/113=60.2%), 单倍型 H9、H12 尾随其后, 其频次分别是 9.7%和 6.2%。

2.2 群体的单倍型多样性(h)和核苷酸多样性(π)

拟穴青蟹群体的单倍型多样性(h)和核苷酸多样性(π)以及标准差的估算结果见表 3。按 h 值从高到低的顺序排列是: ZK > QZW > QH > ZZW > LSW > DJ; 按 π 值从高到低的顺序排列是: ZK > QZW > ZZW > LSW > QH > DJ; 说明 h 值反映的群体趋势并没有与 π 值反映的趋势保持一致。6 个群体中的 ZK 和 QZW 群体的 h 和 π 值均高于总体水平($h = 0.6259 \pm 0.0517$, $\pi = 0.001851 \pm 0.001402$), 其余 4 个群体的 h 和 π 值低于总体水平, DJ 群体的 h 和 π 值最低($h = 0.4561 \pm 0.1317$, $\pi = 0.001167 \pm 0.001081$)。

2.3 群体间(内)遗传距离和地理距离、遗传分化系数(G_{st})和基因流(N_m)

基于 Kimura 双参数模型产生的群体间(内)的遗传距离结果见表 4。群体间遗传距离介于 0.0006—0.0016 之间, 群体内遗传距离介于 0.0002—0.0018 之间。其中, QZW 群体内遗传距离要大于与其它群体间的遗传距离, ZK 群体内遗传距离要小于与其它群体间的遗传距离, 其余群体间(内)的遗传距离比较呈现出波动。Mantel test 结果表明拟穴青蟹 6 个群体间的遗传距离与地理距离之间无相关性($r=0.1925$, $P=0.6710$)。

遗传分化系数(G_{st})和基因流(N_m)值的结果见表 5。DJ 和 ZZW 群体之间的遗传分化程度最低($G_{st} = 0.02008$), 基因流值最高($N_m = 12.20$); LSW 和 QH 群体之间的遗传分化程度最高($G_{st} = 0.04362$), 基因流值最低($N_m = 5.48$)。

2.4 AMOVA 分析和群体间比较分析

AMOVA 分析结果见表 6, 显示群体间遗传变异占 0.1%, 群体内遗传变异占 99.9%, 表明拟穴青蟹的 6 个群体的绝大部分的遗传变异来自群体内而不是群体间。期间产生的固定指数值等于 0.00102, 变异组分的显著性检验产生的 P 值等于 0.42424, 表明群体间未发生遗传分化。基于群体间比较的固定指数(F_{st})值及其 P 值见表 7, 两两群体间 F_{st} 的绝对值介于 0.00026—0.02977 之间, 其中 ZK 和 DJ 群体之间的 F_{st} 的绝对值最低, LSW 和 QH 群体之间的 F_{st} 的绝对值最高, 所有的 P 值均大于 0.05。群体间比较分析再次印证了群体间未发生遗传分化。

2.5 单倍型邻接(neighbor-joining)树和单倍型中介(median-joining)网络图

选择青蟹属的其余 3 个种, 即: 锯缘青蟹(*Scylla serrata*, AF109318)、紫螯青蟹(*Scylla tranquebarica*, AF109320)、榄绿青蟹(*Scylla olivacea*, AF109321), 以及三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*, FJ919807)作为外类群构建单倍型邻接树, 结果见图 1。21 种单倍型并没有形成大的谱系分支, 自展值在 50%以上的支系有三个, 每个支系涉及到 4 个以上的地理群体。从聚类图可以看出, 单倍型聚类并没有展示出地域性特色(比如, 某一支系包括了 2 个以上地理群体所有单倍型, 且其单倍型不参与形成其它支系), 每一地理群体所拥有的单倍型也没有依据采样地聚成分支(即单一地理群体所有单倍型聚成分支, 且其单倍型不参与形成其它支系)。

表 2 单倍型序列变异及其在群体中的分布

Tab.2 Sequence variation of haplotypes and their distribution in the six *S. paramamosain* populations

单倍型	核苷酸位置																				群体							
																					ZZW	QZW	ZK	DJ	LSW	QH		
	1	1	1	1	2	2	4	1	1	2	2	2	2	3	3	3	4	4	4	5	5							
H1	G	-	-	-	A	T	-	A	G	G	-	A	A	G	G	A	C	A	-	T	-	1		1				
H2	.	-	-	-	G	.	-	.	.	.	A	-	G	-						1	
H3	.	-	G	-	G	.	-	.	.	.	A	-	G	-		1					
H4	.	-	-	-	G	.	-	.	.	.	-	-	G	-	12	11	8	14	11	12	
H5	.	-	-	-	G	.	-	.	.	.	-	G	-	G	-	2		1				1
H6	.	-	G	-	G	.	-	.	.	.	-	G	-	G	-		1					
H7	.	-	G	-	G	.	-	.	.	.	-	-	G	-			2				
H8	.	-	G	C	G	.	-	.	.	.	-	-	G	-			1		1		
H9	.	-	-	-	G	.	-	.	.	.	-	.	.	.	A	.	.	.	-	G	-	2	4	1	2	1	1	
H10	T	-	-	-	G	.	-	.	.	.	-	.	.	.	A	.	.	.	-	G	-			1				
H11	.	-	-	-	G	.	-	.	.	.	-	.	T	-	G	-					1		
H12	.	A	-	-	G	.	-	.	.	.	-	-	G	-			1				
H13	.	-	-	-	G	.	-	.	.	.	-	T	G	-	1						
H14	.	-	-	-	G	.	-	.	.	.	-	T	.	.	-	G	-	1				2		
H15	.	-	-	-	G	.	-	.	.	.	-	T	.	-	G	T		1					
H16	.	-	-	-	G	.	-	G	.	.	-	.	.	A	-	G	-				1			
H17	.	-	-	-	G	.	-	.	.	A	-	-	G	-							1
H18	.	-	-	-	G	.	-	.	A	.	-	-	G	-			1				1
H19	.	-	-	-	.	.	-	.	A	.	-	-	G	-							1
H20	.	-	-	-	.	.	-	.	.	.	-	-	G	-		1	2	2			2
H21	.	-	-	-	.	C	G	.	.	.	-	G	-	G	-			1				

注：数字竖读以指示变异位点在单倍型序列的比对位置，“.”示相同碱基，“-”示位点缺失

表 3 拟穴青蟹群体的单倍型多样性和核苷酸多样性以及选择性中性检验

Tab.3 Haplotype diversity (h) and nucleotide diversity (π) of the six *S. paramamosain* populations and selective neutrality test

群体	单倍型多样性	核苷酸多样性	Tajima's D 检验	Fu's F_s 检验
珍珠湾	0.6023±0.1242	0.001568±0.001313	-1.55897 ($P=0.03500$)	-2.98580 ($P=0.00300$)
钦州湾	0.6433±0.1078	0.002053±0.001581	-1.22929 ($P=0.11100$)	-2.12729 ($P=0.04500$)
闸口	0.8421±0.0772	0.003228±0.002201	-1.68691 ($P=0.03200$)	-7.10173 ($P=0.00000$)
党江	0.4561±0.1317	0.001167±0.001081	-1.37975 ($P=0.07200$)	-1.17712 ($P=0.08800$)
流沙湾	0.5882±0.1348	0.001544±0.001306	-1.37718 ($P=0.07400$)	-3.23793 ($P=0.00100$)
清化	0.6082±0.1272	0.001527±0.001290	-1.38098 ($P=0.07400$)	-4.57618 ($P=0.00000$)
总体	0.6259±0.0517	0.001851±0.001402	-1.94160 ($P=0.00300$)	-21.36178 ($P=0.00000$)

表 4 基于 K2-P 模型的拟穴青蟹群体内(示对角线)和群体间(对角线下)遗传距离以及地理距离(km, 对角线上)

Tab.4 Genetic distances within (diagonal elements) and among (below diagonal) the six *S. paramamosain* populations based on K2-P model and the corresponding geographic distances (km, above diagonal)

群体	珍珠湾	钦州湾	闸口	党江	流沙湾	清化
珍珠湾	0.0010	38.83	140.79	88.63	220.77	306.54
钦州湾	0.0014	0.0018	101.60	53.28	204.32	344.13
闸口	0.0006	0.0011	0.0002	53.53	156.80	434.87
党江	0.0011	0.0015	0.0008	0.0013	165.20	383.77
流沙湾	0.0011	0.0014	0.0007	0.0012	0.0012	422.49
清化	0.0012	0.0016	0.0009	0.0014	0.0013	0.0015

表 5 拟穴青蟹群体间遗传分化系数(G_{st} , 对角线下)和基因流(N_m , 对角线上)Tab.5 Genetic diversity (G_{st} , below diagonal) and gene flow (N_m , above diagonal) for pairwise populations of *S. paramamosain*

群体	珍珠湾	钦州湾	闸口	党江	流沙湾	清化
珍珠湾	—	10.80	8.56	12.20	9.73	9.86
钦州湾	0.02262	—	10.30	9.60	7.89	6.40
闸口	0.02838	0.02370	—	9.30	6.76	11.97
党江	0.02008	0.02538	0.02619	—	7.16	12.00
流沙湾	0.02504	0.03071	0.03567	0.03372	—	5.48
清化	0.02473	0.03759	0.02046	0.02041	0.04362	—

表 6 拟穴青蟹 6 个群体的 AMOVA 分析

Tab.6 Analysis of molecular variance (AMOVA) for the six *S. paramamosain* populations

变异来源	自由度	方差和	变异组分	变异百分率(%)
群体间	5	2.489	0.00050	0.10
群体内	107	52.255	0.48836	99.90
总计	112	54.743	0.48886	—

图 2 示 NETWORK 构建的拟穴青蟹 16S rRNA 基因单倍型中介网络图, 主体单倍型 H4 是聚类的中心, 其余单倍型围绕单倍型 H4 呈星状(star-like)排列, 说明单倍型 H4 是相对原始的; 绝大部分单倍型之间只保留 1 步变异, 仅少数单倍型之间(H4 H15, H4 H16, H20 H21)保留 2—3 步变异。单倍型中介网络图进一步支持了单倍型邻接分析, 拟穴青蟹 6 个地理群体的单倍型并没有依据采样地形成分支(clade)。

2.6 选择性中性检验和单倍型错配分布分析

选择性中心检验结果见表 3。Tajima's D 检验和 Fu's F_s 检验的结果均为负值, 且所有群体作为一个整体分析时, 无论是 Tajima's D 检验还是 Fu's F_s 检验所产生的 P 值均小于 0.05, 暗示拟穴青蟹群体曾经发生过群体扩张。选择性中性检验中的 Tajima's D 值反映的是群体的古老事件, 而 Fu's F_s 值反映的是群体的近期事件(Fu, 1997; Su *et al.*, 2001)。 F_s 值的绝对值远大于 D 值的绝对值, 说明拟穴青蟹群体在近期积累了更多的突变。

单倍型错配分布分析结果见图 3。期望分布呈现为一条平滑的单峰型曲线, 吻合了选择性中性检验所获得的推论。基于 sudden expansion 和 spatial expansion 模型估算群体扩张时间分别是 0.04698—0.01879MY (million year, 百万年)和 0.04520—0.01808MY。

表 7 拟穴青蟹群体间固定指数(F_{st} , 对角线下)及其对应 P 值(对角线上)Tab.7 Fix indice (F_{st} , below diagonal) and their corresponding P values (above diagonal) for pairwise populations of *S. paramamosain*

群体	珍珠湾	钦州湾	闸口	党江	流沙湾	清化
珍珠湾	—	0.72973	0.31532	0.82883	0.63964	0.62162
钦州湾	-0.00885	—	0.54955	0.61261	0.34234	0.27027
闸口	0.00412	-0.00524	—	0.41441	0.14414	0.72973
党江	-0.01400	-0.00330	-0.00026	—	0.27027	0.77477
流沙湾	-0.00711	0.00429	0.01577	0.01029	—	0.09910
清化	-0.00460	0.02093	-0.01180	-0.01333	0.02977	—

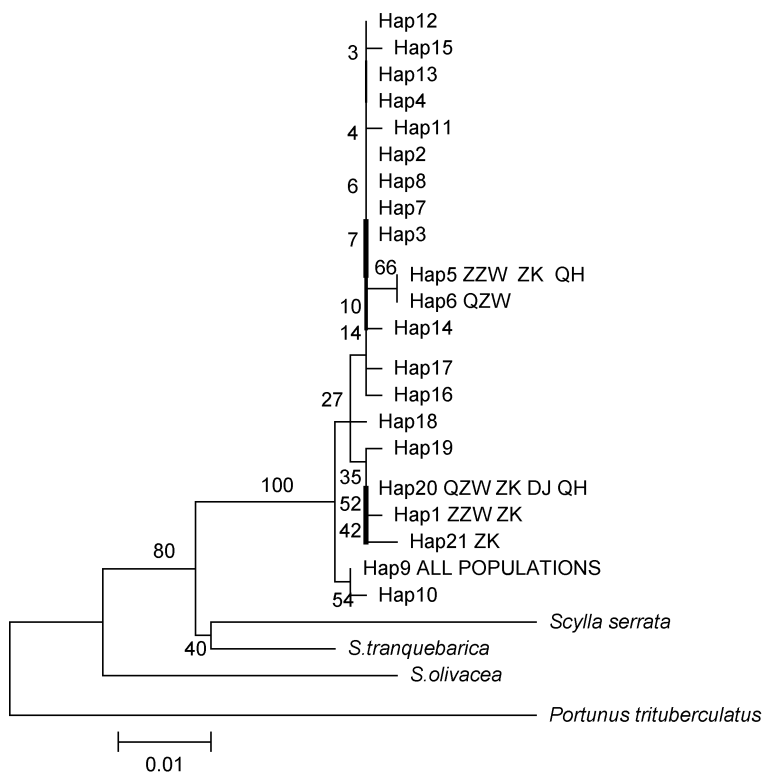


图 1 基于 Kimura 双参数模型构建的拟穴青蟹 16S rRNA 基因单倍型邻接树

Fig.1 Neighbor-joining tree of *S. paramamosain* 16S rRNA gene haplotype constructed by Kimura two parameters models

注: 枝上数值代表自展值, 1000 次重复; 自展值大于 50% 的亚支尾随相应群体

3 讨论

3.1 拟穴青蟹群体遗传多样性

关于拟穴青蟹群体遗传多样性高低的评估, 来自核 DNA 遗传标记的结果是矛盾的。在林琪(2008)¹⁾的研究结果中, “RAPD 和 AFLP 分子标记的结果均显示拟穴青蟹的遗传多样水平较低”, 但舒妙安等(2011)基于微卫星分析的结果认为, 拟穴青蟹群体的

遗传多样水平较高。孙奉玉等(2012)的 RAPD 研究结果与林琪(2008)¹⁾的研究结果保持一致, 认为拟穴青蟹群体遗传多样性在海产虾蟹类动物中相对较低。细胞色素氧化酶亚基 I(COI)基因序列分析给出的结果是, 中国东南沿海拟穴青蟹群体表现为较高的单倍型多样性和有限的核苷酸多样性水平(路心平等, 2009)。

本文报道的拟穴青蟹群体的单倍型多样性指数(h)和核苷酸多样性指数(π)介于 0.4561—0.8421 之间和介于 0.001167—0.003228 之间。与路心平等(2009)基于 COI 基因序列分析的结果比较, 16S rRNA 基因揭示的拟穴青蟹群体总体的单倍型多样性和核苷酸多样性水平均偏低。与同样使用 16S rRNA 基因的日本囊对虾群体和三疣梭子蟹群体的研究结果比较, 拟穴青蟹群体的两个遗传参量介于日本囊对虾群体的两个遗传参量之间, 普遍高于三疣梭子蟹群体(刘勇等, 2009; 谭树华等, 2009)。与同样使用 16S rRNA 基因的中国螯群体和短螯群体的研究结果比较, 拟穴青蟹群体的总体的单倍型多样性指数低于中国螯群体, 拟穴青蟹群体的单倍型多样性指数与短螯群体的单倍型多样性指数相当(吕振明等, 2010, 2011)。

单倍型多样性指数(h)和核苷酸多样性指数(π)是衡量群体遗传多样性的重要指标。无论是基于 COI 基因还是基于 16S rRNA 基因, 拟穴青蟹群体均表现为高的单倍型多样性和低的核苷酸多样性水平。Lavery 等(1996)总结出这一现象在诸多无脊椎动物可以观察到, 这类无脊椎动物具备如下一些特征, 比如: 生活史包含浮游扩散阶段、巨大的固定群体、极高

1) 林 琪, 2008. 中国青蟹属种类组成和拟穴青蟹群体遗传多样性的研究. 厦门: 厦门大学博士学位论文, 1—102

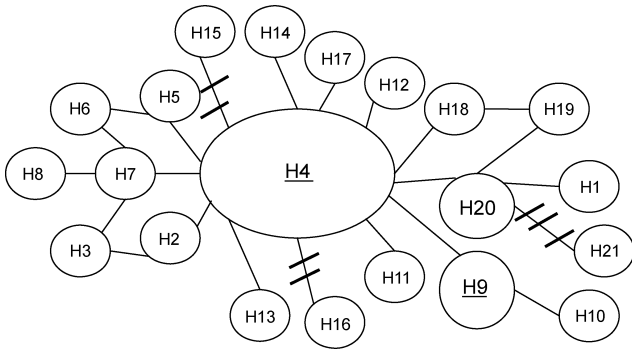


图2 拟穴青蟹 16S rRNA 基因单倍型中介网络图

Fig.2 The median-joining network of 16S rRNA gene haplotype generated from six *S. paramamosain* populations

注: 圆圈大小大致代表单倍型频次, 短划线标注单倍型间核苷酸变异数在 2 次以上的, 圆圈中下划线标注中心单倍型

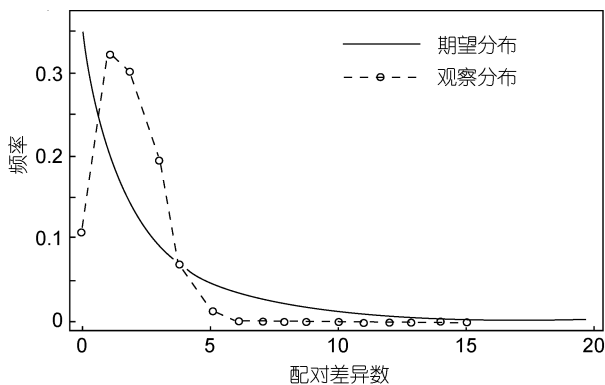


图3 拟穴青蟹 16S rRNA 基因单倍型错配分布图

Fig.3 Mismatch-distribution analysis of 16S rRNA gene haplotype in six *S. paramamosain* populations

注: 实线代表期望分布, 虚线代表观察分布

的生育力等; 这一现象也可能反映了目标物种拥有较大的母系效应群体(Lavery *et al.*, 1996)。作者认为 16S rRNA 基因揭示的单倍型多样性指数和核苷酸多样性指数之所以低于 COI 基因可能缘于 16S rRNA 基因的相对保守。单倍型多样性指数和核苷酸多样性指数并没有绝对的相关性, 譬如, 流沙湾群体的单倍型多样性指数高于清化群体, 但核苷酸多样性指数低于后者。单倍型多样性指数和核苷酸多样性指数反映的结果不一致也可能与供试群体的样本数有关。

3.2 拟穴青蟹群体遗传结构

基于遗传距离分析发现, 群体间遗传距离接近甚至小于群体内遗传距离。从 G_{st} 值和 N_m 值来看, 所有群体间的 G_{st} 值均小于 0.05, 表明群体间遗传分化程度低(Buso *et al.*, 2002); 所有群体间的 N_m 值均大于 4, 表明群体间以随机交配的方式进行基因交流(Hartl *et al.*, 1989)。AMOVA 分析结果也证实了群体间遗传

分化程度低, 首先是群体间遗传变异仅占 0.1%, 总的固定指数(F_{st})值远远小于 0.05。群体间比较分析表明两两群体间没有发生遗传分化, 其中 F_{st} 绝对值远远小于 0.05, 而对应 P 值大于 0.05。负的 F_{st} 值表明, 来自同一个群体的两个随机个体间有比较大的差异, 而不是来自不同群体的两个随机个体间有比较大的差异(Yang *et al.*, 2007)。

孙奉玉等(2012)曾利用 RAPD 标记揭示文章中提及的 6 个地理群体间发生了中等程度的遗传分化, 表明 RAPD 标记比 16S rRNA 基因能发掘更加丰富的遗传变异。这一事实在大弹涂鱼群体和半滑舌鳎群体中就有发现, 给出的解释是编码基因仅是单一位点, RAPD 标记能扫描整个基因组(韩志强等, 2007; 刘至治等, 2009)。

路心平等(2009)利用 COI 基因分析了来自中国东南沿海拟穴青蟹的 10 个地理种群的遗传结构, 结果是“10 个种群的总体遗传分化程度较低(F_{st} 0.05), 但是极为显著($P < 0.005$)”。文章揭示的拟穴青蟹群体总体遗传分化程度低 ($F_{st} < 0.05$), 且不显著 ($P >> 0.005$)。两者的差异是否与取样群体的地理距离有关, 是否与所使用的基因位点不同有关有待进一步探讨。此外, 基于 16S rRNA 基因分析的两两群体间 F_{st} 绝对值远远小于来自微卫星标记对中国沿海拟穴青蟹群体的评估(舒妙安等, 2011)。

3.3 遗传分化与地域分布的相关性

从遗传距离与地理距离的相关性来看, 拟穴青蟹 6 个地理群体的遗传分化不符合距离隔离模式(脚踏模型)。单倍型邻接树(图 1)显示, 单倍型聚类并没有按采样点分开。单倍型中介网络图(图 2)支持了单倍型邻接树的结果, 也暗示了 21 种单倍型之间的关系。单倍型邻接树和单倍型中介网络图均表明, 拟穴青蟹 6 个地理群体的单倍型分布没有表现出地理分布特色。联合上述提及的拟穴青蟹群体总体遗传分化程度低且不显著的特征, 从保护生物学的角度可以建议, 所分析的北部湾 6 个拟穴青蟹地理群体可以作为一个地理单元经营管理。

3.4 拟穴青蟹群体扩张分析

群体扩张并不是 F_s 测试显著性的唯一解释, 比如正选择作用中搭载效益(genetic hitchhiking)、负选择作用中的背景选择(background selection)等也可能导致类似的变异模式(Fu, 1997; Su *et al.*, 2001)。如果在系统发育分析中没有观察到明显的群体细分, 则可以否决遗传搭载效益(Su *et al.*, 2001)。从单倍型邻

接树来看, 群体单倍型并没有形成明显的谱系划分, 说明 F_s 测试显著性并不是因为遗传搭载效益引起的。线粒体 16S rRNA 基因的编码产物与能量供应无关, 尚无数据显示该位点遭受选择作用。此外, 也没有观察到群体间类似的多态性方式。因此, 群体扩张是 F_s 测试显著性最可能的原因。

单倍型错配分布分析揭示, 期望分布属于泊松分布模式, 直观地显示所分析的拟穴青蟹群体曾经发生过群体扩张事件。从拟穴青蟹群体的扩张时间推定, 拟穴青蟹群体扩张大致发生在更新世晚期。

4 结语

至此, 拟穴青蟹群体使用了两种线粒体基因(COI 基因和 16S rRNA 基因)来分析群体遗传结构和群体扩张事件。总体上言, 基于 16S rRNA 基因的分析结果支持了基于 COI 基因的分析结果。某些结论(结果)的出入可能与使用的基因位点不同和所取样的群体不同有关, 譬如, 在群体总体水平上的遗传分化评估两种基因的分析结果是有些许出入的。拟穴青蟹群体扩张事件得到了进一步的夯实, 在这点上, 作者基于 16S rRNA 基因数据进行了更加细化的分析, 并推定出拟穴青蟹群体扩张大致时间(0.04698—0.01879MY 或 0.04520—0.01808MY)处于更新世晚期(12.60—0.01MY)。在未来的研究中, 有必要使用更加丰富的序列数据信息和群体信息并结合地质历史事件诠释拟穴青蟹群体的进化历程。

参 考 文 献

- 王玉江, 高天翔, 韩志强等, 2005. 中国和越南青蟹线粒体 16S rRNA 基因序列分析. 中国海洋大学学报, 35(4): 554—558
- 吉鹏宇, 沈琪, 唐小林等, 2008. 六个青蟹群体的线粒体 16S rRNA 和 COI 基因部分序列差异. 海洋湖沼通报, (4): 69—77
- 吕振明, 许逸天, 吴常文等, 2010. 中国沿海螯不同地理群体 16S rRNA 基因的遗传变异分析. 中国水产科学, 17(3): 463—470
- 吕振明, 李焕, 吴常文等, 2011. 基于 16S rDNA 序列的中国沿海短螯种群遗传结构. 中国水产科学, 18(1): 29—37
- 刘勇, 许强华, 陈新军, 2009. 浙江近海三疣梭子蟹群体遗传结构的初步分析. 上海海洋大学学报, 18(2): 136—141
- 刘至治, 杨金权, 王正琦等, 2009. 长江口及其南部邻近地区大弹涂鱼种群遗传结构及种群历史分析. 动物学研究, 30(1): 1—10
- 孙奉玉, 宋忠魁, 赵鹏等, 2012. 广西沿海及其邻近海区拟穴青蟹群体遗传多样性的 RAPD 分析. 南方水产科学, 8(2): 31—36
- 陈骁, 杨圣云, 潘聪, 2008. 我国南部海域条纹斑竹鲨线粒体 DNA 控制区遗传多态性研究. 海洋学报, 30(6): 115—121
- 林琪, 李少菁, 黎中宝等, 2007. 中国东南沿海青蟹属(*Scylla*)的种类组成. 水产学报, 31(2): 211—219
- 高俊娜, 刘萍, 李健等, 2010. 利用 16S rRNA 和 COI 基因序列对三疣梭子蟹不同群体遗传特征的比较分析. 渔业科学进展, 31(5): 59—68
- 韩志强, 庄志猛, 高天翔等, 2007. 半滑舌鳎 DNA 的群体遗传变异. 中国水产科学, 14(2): 192—200
- 傅蒙娜, 王军, 丁少雄等, 2010. 基于线粒体 DNA 细胞色素 *b* 序列分析 3 个条纹斑竹鲨群体的遗传结构和遗传分化. 热带海洋学报, 29(6): 86—91
- 舒妙安, 周宇芳, 朱晓宇等, 2011. 中国沿海拟穴青蟹群体遗传多样性的微卫星分析. 水产学报, 35(7): 977—984
- 路心平, 马凌波, 乔振国等, 2009. 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. 水产学报, 33(1): 15—23
- 谭树华, 王桂忠, 李少菁, 2009. 中国沿海日本囊对虾线粒体 16S rRNA 基因序列变异及遗传分化. 生态学报, 29(12): 6805—6810
- Buso G S C, Rangel P H, Ferreira M E, 2002. Analysis of genetic variability in South American wild rice populations (*Oryza glumaepatula*) with isozymes and RAPD markers. Molecular Ecology, 7(1): 107—117
- Excoffier L, Lischer H E L, 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular Ecology Resources, 10: 564—567
- Fu Y X, 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics, 147: 915—925
- Galtier N, Gouy M, Gautier C, 1996. SEAVIEW and PHYLO-WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. Computer Applications in the Biosciences, 12: 543—548
- Hartl D L, Clark A G, 1989. Principle of population genetics, 2nd ed. Sunderland: Sinauer Press, 1—682
- Keenan C P, Davies P J F, Mann D L, 1998. A revision of the genus *Scylla* de Hann, 1833 (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Portunidae). The Raffles Bulletin of Zoology, 46: 217—245
- Lavery S, Moritz C, Fielder D R, 1996. Indo-Pacific population structure and evolutionary history of the coconut crab *Birgus latro*. Molecular Ecology, 5: 557—570
- Librado P, Rozas J, 2009. DnaSPv5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics, 25: 1451—1452
- Miller M P, 1997. Tools for population genetic analysis (TFPGA): Version 1.3. Arizona, Flagstaff, Northern Arizona University, Department of Biological Sciences, 1—33

- Su B, Fu Y X, Wang Y X *et al*, 2001. Genetic diversity and population history of the red panda (*Ailurus fulgens*) as inferred from mitochondrial DNA sequence variations. *Molecular Biology and Evolution*, 18(6): 1070—1076
- Tamura K, Dudley J, Nei M *et al*, 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596—1599
- Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F *et al*, 1997. The Clustal-X windows interface: Flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25: 4876—4882
- Yang M C, Chen C A, Hsieh H L *et al*, 2007. Population subdivision of the tri-spine horseshoe crab, *Tachypleus tridentatus*, in Taiwan Strait. *Zoological Science*, 24: 219—224

POPULATION GENETIC STRUCTURE AND EXPANSION ANALYSIS OF GREEN MUD CRAB (*SCYLLA PARAMAMOSAIN*) FROM BEIBU GULF

SONG Zhong-Kui¹, LI Meng-Yun^{1,2}, NIE Zhen-Ping¹, SUN Feng-Yu^{1,3},
ZHAO Peng¹, SU Qiong¹

(1. Guangxi Key Laboratory for Marine Biotechnology, Guangxi Institute of Oceanology, Beihai, 536000;
2. College of Biology and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, 410128;
3. Pharmacy and Life Science, South China University, Hengyang, 421001)

Abstract Mitochondrial 16S rRNA gene fragment was employed to analyze population genetic structure and expansion history of green mud crab (*Scylla paramamosain*) from Beibu gulf. The 16S rRNA gene fragments ranged from 521 to 523bp in length and 21 haplotypes were defined in six geographic stocks of green mud crab. Total haplotype diversity (h) and nucleotide diversity (π) were 0.6259 and 0.001851, respectively. No correlation was detected between genetic distances and geographic distances. Genetic differentiation coefficients (G_{st}) of pairwise populations extended from 0.02008 to 0.04362, while gene flows (N_m) from 5.48 to 12.20. An analysis of molecular variance (AMOVA) showed that variance within populations accounted for 0.1%, while among populations accounted for 99.9%. The absolute values of fixation indices in the scope of 0.00026—0.02977 suggested no genetic differentiation for pairwise populations. Neighbour-joining tree and median-joining network generated from haplotype data set displayed no apparent lineage clades association with sampling locations. Neutral test and mismatch-distribution analysis disclosed that the populations of green mud crab from Beibu gulf had ever experienced population expansion, whose expansion time was roughly estimated at the late Pleistocene (0.04698—0.01879MY ago or 0.04520—0.01808MY ago).

Key words Beibu gulf, *Scylla paramamosain*, Genetic structure, Population expansion, 16S rRNA gene