

南海海域红斑后海螯虾(*Metanephrops thomsoni*)的 分子识别与群体遗传分化*

范艳波¹ 王中锋¹ 郭昱嵩¹ 颜云榕^{1,2} 刘楚吾¹

(1. 广东海洋大学水产学院 南海水产经济动物增养殖广东普通高校重点实验室 湛江 524025;

2. 广东海洋大学南海渔业资源监测与评估中心 湛江 524088)

提要 利用 16S rRNA 基因序列分子识别红斑后海螯虾, 然后对海南附近海域(18°30'—19°00'N, 111°30'—112°30' E)、北部湾口海域(15°41' N, 110°40' E)和南沙群岛海域(5°20'—5°29' N, 110°09'—111°26' E)三个地理群体进行 ITS1 的扩增测序。16S rRNA 基因序列的结果表明所取样本准确; 三个地理群体分别得到 616—623bp、619bp 和 614bp 的 ITS1 全长序列, A、G、T、C 含量平均分别为 22.3%、29.4%、17.8%和 30.6%; 其中 562 个保守位点, 39 个多态位点。ML 和 NJ 聚类分析显示三个地理群体共聚为三个大支, 其中海南群体有群体分化。表明红斑后海螯虾三个地理群体分化极其显著, 且海南群体具有相对高的遗传多样性。

关键词 红斑后海螯虾, 16S rRNA, ITS1, 遗传多样性

中图分类号 S917

红斑后海螯虾(*Metanephrops thomsoni*)分布于黄海南部、东海和南海, 以及日本和菲律宾海域(刘文亮, 2010)¹⁾。栖息于 200m 左右水深的深海沙泥底, 以各种海底生物及小鱼为食。有关红斑后海螯虾的研究, 国内外报道不多。Chan 等(2009)对后海螯虾属(*Metanephrops*)现存的 17 种和 3 个化石种的研究表明, 后海螯虾起源于白垩纪时期的南极洲。白垩纪晚期冈瓦纳大陆分裂, 后海螯虾随着大陆架的漂移形成分化。Chan(1998)和 Tshudy 等(2007)发现中国台湾、南海北部、日本海域的红斑后海螯虾大螯足具有显著红色环斑, 而菲律宾海域的没有红色环斑, Chan 等(2009)的进一步研究表明, 这两种不同体色的红斑后海螯虾可以分为两个独立的种。随着现代分子生物学技术高速发展, 通过获得物种特定遗传标记的数据, 构建系统进化树, 可以对传统分类提供重要佐证以

及补充或修正, 对红斑后海螯虾自然资源的保护及合理开发利用具有重要意义。

16S rRNA 基因适合于遗传多样性、种类鉴定和亲缘关系的研究(郭宪光等, 2004; 江世贵等, 2005), 已广泛应用于甲壳动物、软体动物和鱼类等水生生物的分类研究。核糖体转录间隔区 ITS (internal transcribed spacer)包括 ITS1 和 ITS2 两部分, 分别存在于核糖体 RNA 基因的 18S 和 5.8S 之间及 5.8S 和 28S 之间。根据 rRNA 基因的保守性能方便的扩增 ITS 区段。由于 ITS 区不加入成熟核糖体, 所以受到的选择压力较小, 进化速率较快, 可以提供丰富的变异位点和信息位点, 可用这一序列来探讨不同物种之间的系统发生关系; 在亲缘关系的建立和鉴定上, ITS1 一般适合于相近的种和同种的不同地理群体及不同品系的研究(牛宪立等, 2009; 王庆等, 2007; 唐伯平等,

* 国家自然科学基金资助项目, 31101904 号, 31201996 号; 广东省科技计划项目资助, 2010B020308004 号。范艳波, 硕士研究生, E-mail: sky_van_@126.com

1) 刘文亮, 2010. 中国海域螯虾类和海蛄虾类分类及地理分布特点. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士学位论文, 31—32

通讯作者: 郭昱嵩, 副教授, E-mail: gysrabbit@163.com

收稿日期: 2012-02-13, 收修改稿日期: 2012-05-06

2002)。本文通过 16S rRNA 基因序列对红斑后海螯虾进行辅助物种识别后, 扩增南海海域其三个地理群体的 ITS1 区段并进行测序分析, 构建系统发育树并揭示其群体分化程度。

1 材料与方法

1.1 材料

海南(HN)附近海域(18°30'—19°00'N, 111°30'—112°30' E)、北部湾口(the mouth of Beibu Gulf, BG)海域(15°41' N, 110°40' E)和南沙(NS)群岛海域(5°20'—5°29' N, 110°09'—111°26' E)拖网捕捞的红斑后海螯虾(*Metanephrops thomsoni*), 冷冻运回。每个地理群体中随机选取样本 10 只, 取肌肉无水酒精中保存备用。

1.2 主要仪器与试剂

PCR 扩增仪为 Hema 8000 型, 高速冷冻离心机为 eppendorf Centrifuge 5430R 型。PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成, *Taq* DNA 聚合酶、PCR Markers、dNTPs、蛋白酶 K 等购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 基因组 DNA 的制备

参照卢圣栋(1993)及 Sambrook 等(1996)方法提取 DNA, 置于 4℃ 下保存备用。

1.4 基因片段的 PCR 扩增

16S rRNA 基因的引物(Schubart *et al.*, 2000)为: F: 5'-CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT-3', R: 5'-AGA TAG AAA CCA ACC TGG-3'。ITS1 区段的引物(Chu *et al.*, 2001)为: F: 5'-CAC ACC GCC CGT CGC TAC TA-3', R: 5'-ATT TAG CTG CGG TCT TCA TC-3'。PCR 反应总体积 25 μ l, 包括 14.7 μ l ddH₂O, 2.5 μ l 10 \times Buffer(含 Mg²⁺), 2.5 μ l dNTPs, 引物 F/R(浓度 5 μ mol/L)各 2.0 μ l, 0.3 μ l *TaKaRa*[®] *Taq* 聚合酶, 1.0 μ l DNA 模板。PCR 反应热循环程序: 94 预变性 3min; 94℃ 变性 30s, 50℃ (16S rRNA) / 58℃ (ITS1)退火 30s, 72℃ 延伸 50s, 35 次循环; 最后延伸 10min。PCR 产物经 10mg/ml (1.0%)琼脂糖凝胶检测后, 送上海生工生物工程技术服务有限公司进行双向测序。

1.5 数据分析

采用 MEGA5.05 软件对序列进行比对分析, 序列比对产生的插入和缺失均未记入。统计 DNA 序列的碱基组成和核苷酸位点的总突变数及替换数, 计算群体内和群体间的 DNA 序列差异及 Pairwise distance 遗传距离。采用最大似然法(Maximum Likelihood, ML)和邻近连接法(Neighbor-joining, NJ)构建分

子系统树, 系统树分支的置信度采用自引导法(bootstrap analysis, BP)重复检测, 设置为 1000 次重复(Kimura, 1980)。采用 DNASP5.10 计算单倍型(Haplotype), 单倍型多样性指数(Haplotype diversity, H_d), 单倍型多样性指数方差(Variance of Haplotype diversity, D)及标准差(Standard Deviation of Haplotype diversity, σ), 核酸多样性指数(Nucleotide diversity, P_i), 抽样方差(Sampling variance of P_i , D)及标准差(Standard deviation of P_i , σ), 遗传分化参数固定指数(F statistics, F_{st})和近邻统计指数(nearest neighbor statistic, S_{nn})。基因流(Nm)根据公式 $Nm = (0.5/F_{st}) - 0.5$, 于 Excel 中计算得到(Librado *et al.*, 2009)。

2 结果

2.1 16S rRNA 序列

本实验获得的红斑后海螯虾 16S rRNA 序列片段 560bp (GenBank 登录号: JQ229830)经 blast 与 Chan 等(2009)测定的红斑后海螯虾(*M. thomsoni*)16S rRNA 的序列片段 490bp (GenBank 登录号: EU186119 和 EU186120)有 479bp 重合, 重合部分相似度为 99%, 证实了本实验所取的样本为红斑后海螯虾。

2.2 ITS1 区段的序列变异情况

对三个地理群体的红斑后海螯虾进行 ITS1 区段的扩增测序, 经过 blast 比对剪切 18S rRNA 和 5.8S rRNA 片段, 得到全长序列为海南(HN)群体 616—623bp、北部湾口(BG)群体 619bp 和南沙(NS)群体 614bp, 变异幅度不大, 主要由微卫星序列重复次数不同造成(图 1)。A、T、C、G 含量平均分别为 22.3%、17.8%、30.6%和 29.4%, G+C 平均含量 60.0%。30 个个体检测到 4 种单倍型(Haplotype)(GenBank 登录号 JQ229831—JQ229834), 其中海南群体两个单倍型, 单倍型多样性指数 $H_d = 0.726$, 方差 $D = 0.00108$, 标准差 $\sigma = 0.033$; 核酸多样性指数 $P_i = 0.02901$, 抽样方差 $D = 0.0000011$, 标准差 $\sigma = 0.00107$; 统计显著性(Statistical significance) $P < 0.02$ 。39 个多态位点, 其中 38 个简约变异位点。3 个地理群体所有序列间转换数为 11 个, 颠换数 8 个, 平均转换与颠换比(Ti/Tv 值)约为 1.34。插入和缺失位点共 41 个。

2.3 基于 ITS1 基因的种间遗传距离分析和聚类分析

采用 MEGA5.0 软件对红斑后海螯虾 3 个地理群体 ITS1 进行比对后作 ML 和 NJ 聚类分析, 用 Kimura 双参数法计算上述 30 个个体之间的遗传距离, 其中海南(HN)群体两聚类分支之间的遗传距离为 0.011,

NS1 AGCCAGCCTGACGAGGGGGAGAGAGAGCGTCGATGGACGGCGCGCGCGGACGAC---AGACGGGAGCCTGGGCGGCTGCCCGCCTGCCTGCCTGCCTGC

NS2 AGCCAGCCTGACGAGGGGGAGAGAGAGCGTCGATGGACGGCGCGCGCGGCGACGAC---AGACGGGAGCCTGGGCGGCTGCCCGCCTGCCTGCCTGCCTGC

NS3 AGCCAGCCTGACGAGGGGGAGAGAGAGCGTCGATGGACGGCGCGCGCGCGGACGAC---AGACGGGAGCCTGGGCGGCTGCCCGCCTGCCTGCCTGCCTGC

NS4 AGCCAGCCTGACGAGGGGGAGAGAGAGCGTCGATGGACGGCGCGCGCGGCGACGAC---AGACGGGAGCCTGGGCGGCTGCCCGCCTGCCTGCCTGCCTGC

NS5 AGCCAGCCTGACGAGGGGGAGAGAGAGCGTCGATGGACGGCGCGCGCGCGGACGAC---AGACGGGAGCCTGGGCGGCTGCCCGCCTGCCTGCCTGCCTGC

NS6 AGCCAGCCTGACGAGGGGGAGAGAGAGCGTCGATGGACGGCGCGCGCGCGGACGAC---AGACGGGAGCCTGGGCGGCTGCCCGCCTGCCTGCCTGCCTGC

NS7 AGCCAGCCTGACGAGGGGGAGAGAGAGCGTCGATGGACGGCGCGCGCGCGGACGAC---AGACGGGAGCCTGGGCGGCTGCCCGCCTGCCTGCCTGCCTGC

NS8 AGCCAGCCTGACGAGGGGGAGAGAGAGCGTCGATGGACGGCGCGCGCGCGGACGAC---AGACGGGAGCCTGGGCGGCTGCCCGCCTGCCTGCCTGCCTGC

NS9 AGCCAGCCTGACGAGGGGGAGAGAGAGCGTCGATGGACGGCGCGCGCGCGGACGAC---AGACGGGAGCCTGGGCGGCTGCCCGCCTGCCTGCCTGCCTGC

NS10 AGCCAGCCTGACGAGGGGGAGAGAGAGCGTCGATGGACGGCGCGCGCGCGGACGAC---AGACGGGAGCCTGGGCGGCTGCCCGCCTGCCTGCCTGCCTGC

BG1 AGCCAGCCTGACGAGGGGGAGAGAGAGCGTCGACGGACGGCGCGCGCGCGGCGACGTCAGACGGGAGCCTGGGCGGCTGCCCGCCTGCCTGCCTGCCTGC

BG2 AGCCAGCCTGACGAGGGGGAGAGAGAGCGTCGACGGACGGCGCGCGCGCGGCGACGTCAGACGGGAGCCTGGGCGGCTGCCCGCCTGCCTGCCTGCCTGC

BG3 AGCCAGCCTGACGAGGGGGAGAGAGAGCGTCGACGGACGGCGCGCGCGCGGCGACGTCAGACGGGAGCCTGGGCGGCTGCCCGCCTGCCTGCCTGCCTGC

BG4 AGCCAGCCTGACGAGGGGGAGAGAGAGCGTCGACGGACGGCGCGCGCGCGGCGACGTCAGACGGGAGCCTGGGCGGCTGCCCGCCTGCCTGCCTGCCTGC

BG5 AGCCAGCCTGACGAGGGGGAGAGAGAGCGTCGACGGACGGCGCGCGCGCGGCGACGTCAGACGGGAGCCTGGGCGGCTGCCCGCCTGCCTGCCTGCCTGC

BG6 AGCCAGCCTGACGAGGGGGAGAGAGAGCGTCGACGGACGGCGCGCGCGCGGCGACGTCAGACGGGAGCCTGGGCGGCTGCCCGCCTGCCTGCCTGCCTGC

BG7 AGCCAGCCTGACGAGGGGGAGAGAGAGCGTCGACGGACGGCGCGCGCGCGGCGACGTCAGACGGGAGCCTGGGCGGCTGCCCGCCTGCCTGCCTGCCTGC

BG8 AGCCAGCCTGACGAGGGGGAGAGAGAGCGTCGACGGACGGCGCGCGCGCGGCGACGTCAGACGGGAGCCTGGGCGGCTGCCCGCCTGCCTGCCTGCCTGC

BG9 AGCCAGCCTGACGAGGGGGAGAGAGAGCGTCGACGGACGGCGCGCGCGCGGCGACGTCAGACGGGAGCCTGGGCGGCTGCCCGCCTGCCTGCCTGCCTGC

BG10 AGCCAGCCTGACGAGGGGGAGAGAGAGCGTCGACGGACGGCGCGCGCGCGGCGACGTCAGACGGGAGCCTGGGCGGCTGCCCGCCTGCCTGCCTGCCTGC

HN1 A---AGCCTGACGAGGGGGTAAAGAGAGCGTCGACGGACGGCGCGCGCGG---C---GTCAGACGGGAGCCTGGGCGGCTGCCTGCCTGCCTGCCTGC

HN2 A---AGCCTGACGAGGGGGTAAAGAGAGCGTCGACGGACGGCGCGCGCGG---C---GTCAGACGGGAGCCTGGGCGGCTGCCTGCCTGCCTGCCTGC

HN3 A---AGCCTGACGAGGGGGTAAAGAGAGCGTCGACGGACGGCGCGCGCGCGG---GTCAGACGGGAGCCTGGGCGGCTGCCTGCCTGCCTGCCTGC

HN4 A---AGCCTGACGAGGGGGTAAAGAGAGCGTCGACGGACGGCGCGCGCGCGG---GTCAGACGGGAGCCTGGGCGGCTGCCTGCCTGCCTGCCTGC

HN5 A---AGCCTGACGAGGGGGTAAAGAGAGCGTCGACGGACGGCGCGCGCGCGG---GTCAGACGGGAGCCTGGGCGGCTGCCTGCCTGCCTGCCTGC

HN6 A---AGCCTGACGAGGGGGTAAAGAGAGCGTCGACGGACGGCGCGCGCGCGG---GTCAGACGGGAGCCTGGGCGGCTGCCTGCCTGCCTGCCTGC

HN7 A---AGCCTGACGAGGGGGTAAAGAGAGCGTCGACGGACGGCGCGCGCGCGG---GTCAGACGGGAGCCTGGGCGGCTGCCTGCCTGCCTGCCTGC

HN8 A---AGCCTGACGAGGGGGTAAAGAGAGCGTCGACGGACGGCGCGCGCGCGG---GTCAGACGGGAGCCTGGGCGGCTGCCTGCCTGCCTGCCTGC

HN9 A---AGCCTGACGAGGGGGTAAAGAGAGCGTCGACGGACGGCGCGCGCGCGG---GTCAGACGGGAGCCTGGGCGGCTGCCTGCCTGCCTGCCTGC

HN10 A---AGCCTGACGAGGGGGTAAAGAGAGCGTCGACGGACGGCGCGCGCGCGG---GTCAGACGGGAGCCTGGGCGGCTGCCTGCCTGCCTGCCTGC

图 1 红斑后海螯虾 ITS1 序列中的微卫星 DNA 比对

Fig.1 Comparison of the microsatellite DNAs in ITS1 from *M. thomsoni*

南沙(NS)群体与北部湾口(BG)群体之间的遗传距离为 0.044, 南沙(NS)群体与海南(HN)群体之间的遗传距离为 0.036—0.049, 北部湾口(BG)群体与海南(HN)群体之间的遗传距离为 0.036—0.045。ML 和 NJ 聚类树上分为三支, 其中北部湾口(BG)群体和南沙(NS)群体各聚为一支, 海南(HN)群体内分化明显(图 2)。30 个样本整体的固定指数 $F_{st} = 0.96664$, 邻近统计指数 $S_{nn} = 1.00000$, $P < 0.001$, 表明三个地理群体分化极显著; $Nm = 0.01$, 表明三个地理群体间的基因流极弱(表 1)。

3 讨论

Chan(1998)和 Tshudy 等(2007)发现中国沿海和日本的红斑后海螯虾大螯足具有显著红色环斑, 而菲律宾海域的没有红色环斑。Chan 等(2009)研究表明, 两种不同体色的红斑后海螯虾可以分成两个独立的种。本实验所取三个地理群体的红斑后海螯虾, 大螯足均具有显著红色环斑, 采样点不涉及菲律宾海域。同时, 16S rRNA 基因序列分析证实了本实验所取红斑后海螯虾样本为同一个种。

ITS1 为多拷贝基因(Hillis *et al.*, 1991)。有些生物

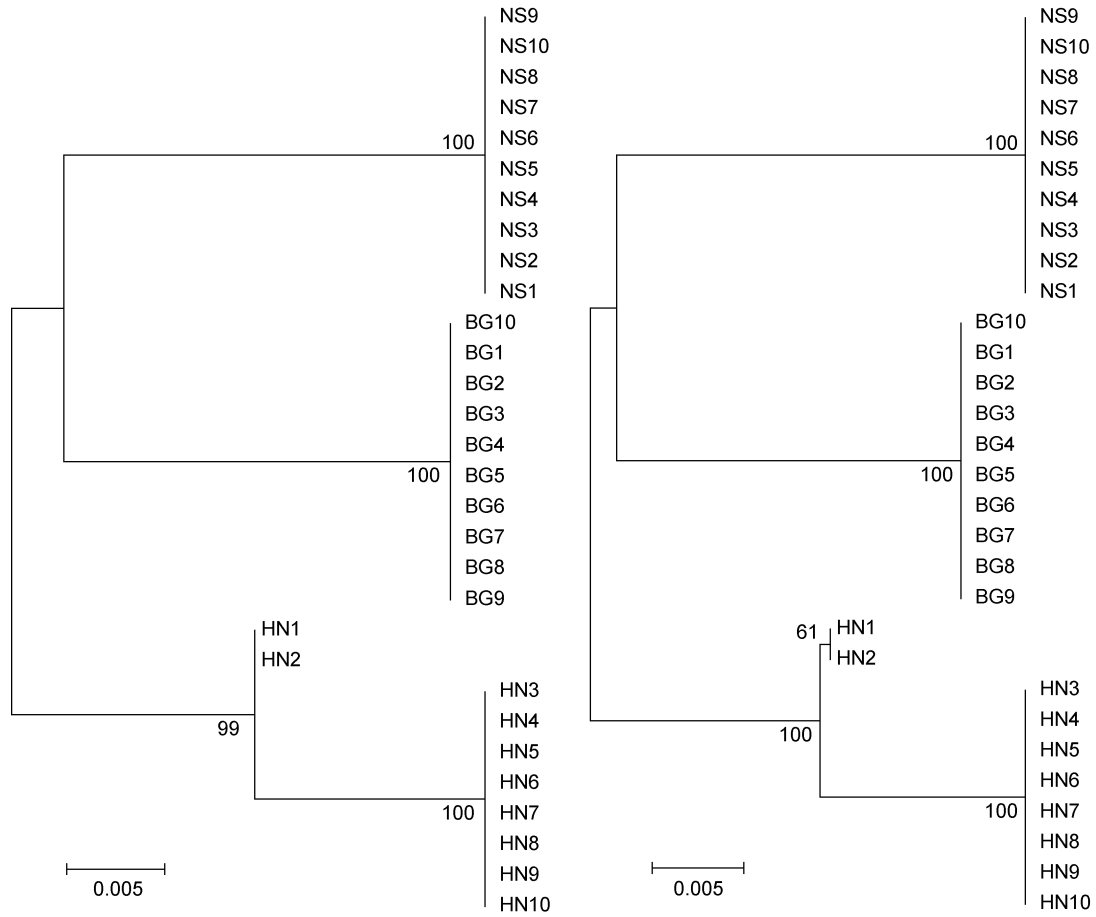


图 2 基于 ITS1 序列构建出的 ML 树(左)和 NJ 树(右)

Fig.2 Maximum Likelihood tree (left) and Neighbor-joining tree (right) based on ITS1 sequences

表 1 基于 ITS1 的三个地理群体分化系数 F_{st}/S_{nn} (左下)与基因流 Nm (右上)

Tab.1 F_{st}/S_{nn} (below diagonal) and Nm (above diagonal) based on ITS1 sequences in three geographic populations

群体	海南	北部湾口	南沙
海南	—	0.01	0.01
北部湾口	0.95022***/1.00000***	—	0.00
南沙	0.95322***/1.00000***	1.00000***/1.00000***	—

注: ***表示 $P < 0.001$

类群中 ITS1 片段由于微卫星重复次数不同而产生较窄长度变异具有种间序列长度多态性(Huyse *et al.*, 2004), 微卫星序列通过复制滑移使序列产生插入或缺失(Schlötterer *et al.*, 1992)。这一片段被成功地应用于多种动物的系统发生关系与进化研究(Crespi *et al.*, 2004; Presa *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2002; Remigio *et al.*, 1997), 解决了一些长期有争议的分类学问题。ITS1 序列种内长度多态性在对虾类中已有报道(Wanna *et al.*, 2006)。红斑后海螯虾 ITS1 的序列长度多态性并不十分明显, 序列长度范围为 614—623bp, 主要由微卫星 DNA 简单重复序列 GCC、CGG、CCTG 的重复次

数不同而引起(图 1)。高的 GC 含量(60%)表明红斑后海螯虾比较原始, 起源与分化较早, 与 Chan 等(2009)的研究一致。基于 ITS1 序列的系统进化分析, 三个地理群体的红斑后海螯虾分为明显的三大支(图 2), 其中海南群体内分化明显, 表明南海海域的红斑后海螯虾分化程度非常高, 并且海南群体具备较丰富的遗传多样性。

三个群体的固定指数均在 0.95 以上, 基因流都极微弱(表 1), 群体之间几乎没有交流。推测可能与后海螯虾的生活习性有关。南海海流具有季风漂流特征, 冬季为西南向的漂流, 夏季为东北向的漂流。后

海螯虾多在春夏两季繁殖, 交配后, 受精卵粘附在雌虾后四对游泳足上, 经 2—3 周, 孵化出蚤状幼体, 经过数次蜕皮后变为末期幼体。如 Okamoto(2008)在 2002 年 5 月和 6 月孵化出日本后海螯虾(*M. japonicas*) 蚤状幼体。末期幼体是已完成变态的仔虾, 习性与成虾完全一致, 栖息于深海沙泥底, 以爬行为主, 主要捕食各种海底生物及小鱼。由于红斑后海螯虾的抱卵行为, 蚤状幼体的游泳能力及末期幼体与成体的底栖爬行生活, 推测洋流对三个地理群体间的基因交流几乎没有影响($Nm = 0.01$)。

国内外有关红斑后海螯虾的报道不多。本文基于 ITS1 序列研究旨在揭示南海红斑后海螯虾的群体分化特征, 为南海红斑后海螯虾的研究积累基础数据。

参 考 文 献

- 王 庆, 傅洪拓, 2007. 核 rDNA ITS 区序列在水产动物研究中的应用. 安徽农学通报, 13(11): 99—101
- 牛宪立, 姬可平, 吴 群等, 2009. rDNA ITS 区序列分子标记技术在植物学研究中的应用. 生物信息学, 7(4): 269—271
- 卢圣栋, 1993. 现代分子生物学实验技术. 北京: 高等教育出版社, 61—62
- 江世贵, 张殿昌, 吕俊霖等, 2005. 3 种野鲮亚科鱼类 16S rRNA 基因序列分析. 南方水产, 1(1): 1—5
- 郭宪光, 张耀光, 何舜平等, 2004. 16S rRNA 基因序列变异与中国鲃科鱼类系统发育. 科学通报, 49(14): 1371—1379
- 唐伯平, 周开亚, 宋大祥, 2002. 核 rDNA ITS 区序列在无脊椎动物分子系统学研究中的应用. 动物学杂志, 37(4): 67—73
- Chan T Y, 1998. Shrimps and Prawns. In: Carpenter K E, Niem V H ed. FAO Identification Guide for Fisheries Purposes. The Living Marine Resources of the Western Central Pacific. FAO, Rome, 851—971
- Chan T Y, Ho K C, Li C P *et al*, 2009. Origin and diversification of the clawed lobster genus *Metanephrops* (Crustacea: Decapoda: Nephropidae). Mol Phylogen & Evo, 50(3): 411—422
- Chen C A, Chen C P, Fan T Y *et al*, 2002. Nucleotide sequences of ribosomal internal transcribed spacers and their utility in distinguishing closely related *Perinereis* polychaetes (Annelida: Polychaeta: Nereididae). Mar Biotech, 4(1): 17—29
- Chu K H, Li C P, Ho H Y, 2001. The first Internal Transcribed Spacer (ITS-1) of ribosomal DNA as a molecular marker for phylogenetic and population analyses in crustacea. Mar Biotechnol, 3(4): 355—361
- Crespi B J, Fulton M J, 2004. Molecular systematics of Salmonidae: combined nuclear data yields a robust phylogeny. Mol Phylogenet Evol, 31(2): 658—679
- Hillis D M, Dixon M T, 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. Q Rev Biol, 66(4): 411—453
- Huyse T, Houdt J V, Volckaert F A M, 2004. Paleoclimatic history and vicariant speciation in the “sand goby” group (Gobiidae, Teleostei). Mol Phylogenet Evol, 32(1): 324—336
- Kimura M, 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol, 16(2): 111—120
- Librado P, Rozas J, 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics, 25(11): 1451—1452
- Okamoto K, 2008. Japanese nephropid lobster *Metanephrops japonicus* lacks zoeal stage. Fish Sci, 74(1): 98—103
- Presa P, Pardo B G, Martinez P *et al*, 2002. Phylogeographic congruence between mtDNA and rDNA ITS markers in brown trout. Mol Biol Evol, 19(12): 2161—2175
- Remigio E A, Blair D, 1997. Relationships among problematic North American stagnicoline snails (Pulmonata: Lymnaeidae) reinvestigated using nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. Can J Zool, 75(9): 1540—1545
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, 1996. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Beijing: Sci Press: 463—469
- Schlötterer C, Tautz D, 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. Nucleic Acids Res, 20(2): 211—215
- Schubart C D, Neigel J E, Felder D L, 2000. Use of the mitochondrial 16S rRNA gene for phylogenetic and population studies of Crustacea. Crust Issues, 12: 817—830
- Tshudy D, Chan T Y, Sorhannus U, 2007. Morphology based cladistic analysis of *Metanephrops*: the most diverse extant genus of clawed lobster (Nephropidae). J Crust Biol, 27(3): 463—476
- Wanna W, Chotigeat W, Phongdara A, 2006. Sequence variations of the first ribosomal internal transcribed spacer of *Penaeus* species in Thailand. Exper Mar Biol & Ecol, 331(1): 64—73

MOLECULAR RECOGNITION AND POPULATION GENETIC DIFFERENTIATION OF *METANEPHROPS THOMSONI* IN SOUTH CHINA SEA

FAN Yan-Bo¹, WANG Zhong-Duo¹, GUO Yu-Song¹, YAN Yun-Rong^{1,2}, LIU Chu-Wu¹

(1. Key Laboratory of Aquaculture in South China Sea for Aquatic Economic Animal of Guangdong Higher Education Institutes, Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, 524025; 2. Center of South China Sea Fisheries Resources Monitoring and Assessment, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, 524088)

Abstract The research on the clawed lobster species *Metanephrops thomsoni*, distributed in the coastal areas of China, Japan and Philippines, are rarely reported in the world. Regularly, the 16S ribosomal RNA sequences (16S rRNA) and the internal transcribed spacer 1 (ITS1) were used for the genetic diversity analysis and species identification. After recognized the *M. thomsoni* using 16S rRNA (GenBank Accession No.JQ229830), the length of ITS1 sequences from three geographic populations, Hainan (18°30'—19°00'N, 111°30'—112°30'E), the mouth of Beibu Gulf (15°41'N, 110°40'E) and Nansha Islands (5°20'—5°29'N, 110°09'—111°26'E) was 616—623bp, 619bp and 614bp, respectively. The average contents of A, G, T and C was 22.3%, 29.4%, 17.8% and 30.6% separately, and containing 562 conserved loci and 39 polymorphic loci in ITS1 sequences of these three populations. There were four Haplotypes (GenBank Accession No.JQ229831—JQ229834) and their statistical significance was $P < 0.02$. The results of phylogenetic cladistics suggested that three different areas of *M. thomsoni* were classified into three branches based on Maximum Likelihood tree and Neighbor-joining tree, especially the significant differentiation was displayed in Hainan geographic populations. The analytical result of ITS1 sequences indicated that three geographic populations of *M. thomsoni* have significant differentiation and Hainan geographic population has large genetic diversity especially.

Key words *Metanephrops thomsoni*, 16S rRNA, ITS1, Genetic diversity