

# 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

高俊娜<sup>1,2</sup> 刘 萍<sup>2\*</sup> 李 健<sup>2</sup> 潘鲁青<sup>1</sup> 高保全<sup>2</sup> 陈 萍<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>中国海洋大学, 青岛 266003)

(<sup>2</sup>中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

**摘 要** 采用 PCR 扩增技术对三疣梭子蟹日本北海道群体、韩国东海岸群体和我国山东即墨市会场村群体 3 个野生群体的 16S rRNA 和 COI 基因片段进行了扩增和测序, 分别得到了长度为 523 和 658bp 的片段。通过统计变异位点、平均核苷酸差异数和核苷酸多样性指数, 分析比较了不同群体间的序列差异和遗传多样性水平。结果显示, 我国会场三疣梭子蟹野生群体的遗传多样性水平较低。用 MEGA 4.0 软件中的 NJ 法构建的分子进化树, 基于 16S rRNA 片段构建的 NJ 系统树所反映的分类关系与基于 COI 基因片段构建的系统树并不一致, 主要不同在于与日本蟬的分类关系上, 基于 16S rRNA 基因片段构建的 NJ 系统树显示梭子蟹科的 3 个属聚为两大支: 三疣梭子蟹不同的单倍型先聚在一起, 再和梭子蟹属的远海梭子蟹及塞氏梭子蟹聚为一支; 而青蟹属的 3 种蟹先聚在一起, 再和日本蟬聚为一支。而基于 COI 基因片段构建的系统树显示, 梭子蟹属先与青蟹属的两种蟹聚为一支, 然后再与日本蟬聚在一起。本研究共发现 19 种单倍型, 我国会场群体与日本北海道群体、韩国东海岸群体均有共享单倍型, 表明我国会场群体与国外两个野生群体的遗传背景相似。这些资料为我国三疣梭子蟹的种质资源保护和利用提供了基础的分子生物学依据。

**关键词** 三疣梭子蟹 16S rRNA 基因 COI 基因 遗传多样性

**中图分类号** Q953 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2010)05-0059-0010

## Comparison of genetic characteristics of three *Portunus trituberculatus* populations based on the sequences of mitochondrial 16S rRNA and COI gene

GAO Jun-na<sup>1,2</sup> LIU Ping<sup>2\*</sup> LI Jian<sup>2</sup> PAN Lu-qing<sup>1</sup>  
GAO Bao-quan<sup>2</sup> CHEN Ping<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Ocean University of China, Qingdao 266003)

(<sup>2</sup>Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

**ABSTRACT** 16S rRNA and COI fragments from two mitochondrial genes of *Portunus trituberculatus* sampled from three sites (Hokkaido of Japan, the east coast of South Korea and

国家高技术研究发展计划项目(2006AA10A406)、国家自然科学基金(30871933)和青岛市科技计划项目(07-2-3-5-jch)共同资助

\* 通讯作者。E-mail: liuping@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85823291

收稿日期: 2009-12-31; 接受日期: 2010-01-13

作者简介: 高俊娜(1984-), 女, 硕士研究生, 主要从事海水养殖生物种质资源与遗传育种研究。E-mail: happygao123@126.com

Huichang, Jimo of China) were amplified and sequenced. The variable sites, nucleotide diversity, average number of nucleotide differences and nucleotide diversity index were calculated, and the sequence differences and genetic diversity levels among three different populations were compared. The results show that levels of genetic diversity of Chinese wild population are low. The molecular phylogenetic tree of 16S rRNA was different with that of COI gene, which was constructed using NJ method with software MEGA 4.0. Their main difference was in the classification relationship with *Charybdis*. The phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences show that *Portunidae* are clustered into two branches: different haplotypes of *P. trituberculatus* clustered first, then with *P. pelagicus* and *P. sayi*; the three kinds of *Scylla* clustered first, then with *Charybdis japonica*. In this study, 19 haplotypes were obtained, and Huichang, Hokkaido and east coast of South Korea populations possessed shared haplotypes, indicating that these three wild *P. trituberculatus* populations had similar genetic background. These findings are expected to provide molecular biological basis for the protection and utilization of *P. trituberculatus* resources in China.

**KEY WORDS** *Portunus trituberculatus* 16S rRNA gene COI gene  
Genetics diversity

三疣梭子蟹 *Portunus trituberculatus* 隶属于甲壳纲 Crustacea、十足目 Decapoda、梭子蟹科 Portunidae、梭子蟹属 *Portunus*, 广泛分布在我国山东、浙江、广西、广东、福建、海南以及日本、朝鲜、韩国、马来西亚群岛等水域, 是大型海洋蟹类, 具有肉质好、食物链短、生长快、产量较高等优点, 具有重要的经济价值, 是沿海重要的渔业对象 (Hamasaki *et al.* 2006; 戴爱云等 1997)。三疣梭子蟹大规模人工养殖已经在我国沿海地区广泛展开, 这不仅增加了个体间的基因交流, 而且随着养殖规模的发展和环境恶化, 对野生资源的影响越来越大, 造成了种质退化和遗传多样性降低等问题。因此对三疣梭子蟹种质资源保护和种群遗传结构的研究逐渐深入, 国内海洋生物工作者完成了许多关于三疣梭子蟹遗传多样的研究工作 (高保全等 2007; 郭天慧等 2004; 刘勇等 2009; 冯冰冰等 2008; 刘爽等 2008; 王敏强等 2008)。由于我国三疣梭子蟹人工养殖亲本主要为天然海捕亲蟹, 因此尽可能避免野生群体遗传多样性降低方面的研究显得十分重要。

本研究利用线粒体 16S rRNA 和 COI 基因两个基因片段, 对采自我国即墨市会场村、日本北海道和韩国东海岸的三疣梭子蟹野生群体进行了遗传分析。目的是搞清不同地区三疣梭子蟹的 DNA 变异水平, 探明会场村三疣梭子蟹的遗传多样性水平, 为确定会场三疣梭子蟹的分类地位、进而对其进行资源保护提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

试验用三疣梭子蟹系 2007 年分别取自我国山东省即墨市会场村、日本北海道以及韩国东海岸, 带回实验室后  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 基因组 DNA 的提取与检测

从每个群体中随机选 8~10 个个体, 每个个体取约 100 g 螯足肌肉, 剪碎组织, 加入 475  $\mu\text{l}$  组织匀浆缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 50 mmol/L EDTA, pH 8.0), 充分混匀, 依次加入终浓度为 10% 的 SDS 和 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的蛋白酶 K,  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  裂解至澄清。采用苯酚-氯仿法提取基因组 DNA。用 DNA 定量仪测定样品 DNA 的浓度和纯

度, -20 ℃保存备用。1%琼脂糖凝胶电泳检测, GeneFinder 染色, 全自动凝胶成像系统拍照。

### 1.2.2 PCR 扩增

16S rRNA 基因片段扩增的引物为: 16S AR: 5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3', 16S BR: 5'-CCG-GTCTGAACTCAGATCACG-3'; COI 基因片段扩增的引物为: COIL1490: 5'-GGTCAACAAATCATA-AAGATATTGG-3', COIH2198: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'。PCR 反应总体积为 25  $\mu$ l, 其中含模板 DNA 50~100 ng, 10 $\times$ PCR buffer 2.5  $\mu$ l, 上、下游引物各 0.12  $\mu$ mol/L, dNTPs 0.2 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 2 mmol/L, Taq 酶 1 U。在 iCycler 热循环仪(Bio-Rad)上进行 PCR 反应: 94 ℃预变性 2 min; 94 ℃变性 45 s, 48 ℃退火 1 min, 72 ℃延伸 1 min, 35 个循环; 72 ℃延伸 5 min。

### 1.2.3 DNA 序列测定

扩增产物用 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测, 将 PCR 产物送往上海生工生物工程有限公司, 纯化后直接进行双向测序。

### 1.2.4 序列分析

将测得的全部序列用 Bioedit 软件进行编辑并辅以人工核查, 用 Clustal X 1.83 软件比对, 并确定序列长度。用 DnaSP 5.0 软件计算群体的遗传多样性参数。MEGA 4.0 软件计算序列的碱基组成、变异位点、简约信息位点、转换/颠换以及不同群体间的 Kimura2-paramter 遗传距离, 用邻接法(NJ)构建系统树, 系统树各结点的支持率以序列数据集 1 000 次重复抽样检验的自引导值(Bootstrap value)表示。用于平均核苷酸差异比对的 GenBank 上 6 种蟹为: 拟穴青蟹、锯缘青蟹、远海梭子蟹、红星梭子蟹、榄绿青蟹、塞氏梭子蟹和日本蟳, 其外缘序列登录号及片段长度信息示于表 1。

表 1 外源序列物种名称, 来源和长度  
Table 1 Origin, length and abbreviations of sequences in foreign groups

科/属/种 Family/Genus/Species	缩写 Abbreviation	登录号 Locus	片段长度(bp) Length of Fragment
远海梭子蟹 Portunidae/ <i>Portunus</i> / <i>Portunus pelagicus</i>	<i>P. pelagicus</i>	GenBank-DQ388052(16S) GenBank-DQ889124(COI)	520 657
塞氏梭子蟹 Portunidae/ <i>Portunus</i> / <i>Portunus sayi</i>	<i>P. sayi</i>	GenBank-DQ388053(16S)	522
红星梭子蟹 Portunidae/ <i>Portunus</i> / <i>Portunus sanguinolentus</i>	<i>P. sanguinolentus</i>	GenBank-EU284144(COI)	709
拟穴青蟹 Portunidae/ <i>Scylla</i> / <i>Scylla paramamosain</i>	<i>S. paramamosain</i>	GenBank-AY841366(16S) GenBank-EU664329(COI)	511 522
锯缘青蟹 Portunidae/ <i>Scylla</i> / <i>Scylla serrata</i>	<i>S. serrata</i>	GenBank-AF109318(16S) GenBank-GU055502(COI)	562 535
榄绿青蟹 Portunidae/ <i>Scylla</i> / <i>Scylla olivacea</i>	<i>S. olivacea</i>	GenBank-AF109321(16S)	562
日本蟳 Portunidae/ <i>Charybdis</i> / <i>Charybdis japonica</i>	<i>Ch. japonica</i>	GenBank-EU586119(16S) GenBank-EU586120(COI)	520 677

## 2 结果与分析

### 2.1 线粒体 16S rRNA 基因片段序列分析

图 1 为三疣梭子蟹不同单倍型及其他 6 种蟹的 16S rRNA 基因序列比较结果, 可见对 3 个群体 27 个样品

的线粒体 16S rRNA 基因片段进行 PCR 扩增和序列测定,得到长度为 523bp 的基因片段,共出现 3 种单倍型 (Haplotype1、2、3),其中一种单倍型与 GenBank 中的序列完全相同,另外两种单倍型序列在 GenBank 中注册 (登陆号码为 GU321227 和 GU321228)。我国会场群体中检测到两个单倍型 (Haplotype2, Haplotype3),日本北海道群体中检测到两个单倍型 (Haplotype1, Haplotype3),韩国东海岸群体 1 个单倍型 (Haplotype3),其中 Haplotype3 为 3 个群体共享。共检测到 4 个变异位点,包括 1 个单一变异位点、1 个简约信息位点和两个插入/缺失位点。韩国东海岸群体没有检测到多态位点,我国会场群体检测到两个多态位点:251 位出现 1 个 C-T 转换,403 位出现 1 个 A-T 颠换,两个插入/缺失位点:255 位插入 1 个 T,406 位插入 1 个 A。日本北海道群体检测到 1 个多态位点,1 个插入/缺失位点。251 位出现 1 个 C-T 的转换,255 位插入 1 个 T。统计发现,三疣梭子蟹种内的单倍型多态性 ( $Hd$ : 0.145)、平均核苷酸差异数 ( $K$ : 0.217) 和核苷酸多样性指数 ( $Pi$ : 0.000 14) 均较低,而与拟穴青蟹、锯缘青蟹、远海梭子蟹、塞氏梭子蟹及日本蜆间的平均核苷酸差异数均为 1.333 33,核苷酸多样性指数分别为 0.002 62、0.002 58、0.002 57、0.002 56 和 0.002 68。显然,利用 16S rRNA 基因片段可发现种间的较大差异,但看不出种内的明显差异。经分析,不同群体的碱基含量基本一致, A、T、G、C 含量平均为 35%、35.7%、17.8%、11.5%, A+T 含量明显高于 G+C 含量,符合无脊椎动物线粒体 DNA 序列特征。

Hap-1	---	TCATTA-	AGGTTTATGT	TAAATTTAA	TTAATGAACT	CTTTCATAAA	TGATTACTCT	[240]	
Hap-2	---	...A-	.G.T...	T..T....	.....	C.A.	...T.....	[240]	
Hap-3	---	...A-	.G.T...	T..T....	.....	C.A.	...T.....	[240]	
<i>S. paramamosain</i>	---	TCATT-	.T.G...	C...-	.....	T..T.	...A.....	[240]	
<i>S. serrata</i>	AAAT	....-	....T...	....G.	.....	A.	.....	[240]	
<i>S. olivacea</i>	AAAT	...A-	.AG..T...	.G.-	.....	A.	.....	[240]	
<i>P. pelagicus</i>	---	...AT	.A..T...	T..T.A.	.....	C.A.	...T.....	[240]	
<i>P. sayi</i>	---	..TA.A	.TA..T...	T.G.T....	C.....	A.	...T.....	[240]	
<i>Ch. japonica</i>	AAATG	..AT	CGCTTTAAAA	AAATG..AT	.G..G...	C..AC.	...T...T	[240]	
Hap-1	..	A.T..TA	TTTTTATATG	-.GATACAT	GTTTGTATA.	AAAT.GTGC	C.AAGATAA	[480]	
Hap-2	..	A.T..T.	...T...TG	-.GATA..	G...TATA.	..AT.G...	C.AAG....	[480]	
Hap-3	..	A.T..T.	...T...TG	-.GATA..	G...TATA.	..AT.G...	C.AAG....	[480]	
<i>S. paramamosain</i>	GTAG	...TA.	...TA....	..AATAG...	.....	-ATA	AATA....	TTT.....	[480]
<i>S. serrata</i>	A..A...	G...	-G....	..GG..A...	.....	-G.-G..G....	..CC.....	[480]	
<i>S. olivacea</i>	..GA...	C....	G....	..T..A....	.....	-A..-.....	..A.AA....	[480]	
<i>P. pelagicus</i>	A-GA.	T..T.	...T...TG	-.GATA..	...TATA-	..AGTG...	..CAAG....	[480]	
<i>P. sayi</i>	A-GA.	T..CT.	..A..CT..TG	-.A..A...	...T-GGG	T..AT.G...	..C.AAA....	[480]	
<i>Ch. japonica</i>	A-GA.	T..T.	...-T....	.....A...	...T-TAT	T..A-.....	..A.A..TT	[480]	
Hap-1	ATTTAATAAAA	GTTTATGTCA	CACTTAAAAA	GTTGTCCTT	AATTTT	-----	-----	[576]	
Hap-2	.....	.....	.....	.....	AATTTT	-----	-----	[576]	
Hap-3	.....	.....	.....	.....	AATTTT	-----	-----	[576]	
<i>S. paramamosain</i>	.....	.....	A.....	.....	-----	-----	-----	[576]	
<i>S. serrata</i>	.....	.....	.....	.....	AATTTTCGGA	CTAGTCGACG	-----	[576]	
<i>S. olivacea</i>	.....	.....	.....	.....	AATTTTCGGA	CTAGTCGACG	-----	[576]	
<i>P. pelagicus</i>	.....	.....	.....	.....	AATTTT	-----	-----	[576]	
<i>P. sayi</i>	.....	.....	G....	C...C....	AATTTT	-----	-----	[576]	
<i>Ch. japonica</i>	.....	.....	.....	.....	AATTTT	-----	-----	[576]	

注:“-”表示插入或缺失;“.”表示相同的碱基 缩写种名见表 1

Note:“-”means insertion or missing;“.”means same base; abbreviation are listed in Table 1

图 1 三疣梭子蟹不同单倍型及其他 6 种蟹的 16S rRNA 基因序列比较

Fig. 1 Comparison of 16S rRNA gene sequences in haplotypes of *P. trituberculatus* and other 6 crabs

用 MEGA 4.0 软件,将 3 个群体的 3 个单倍型分别与远海梭子蟹等 5 种蟹和 1 种蜆的对应 16S rRNA 基因片段序列做 NJ 聚类分析,经 1 000 次 Bootstrap 检验后获得置信度,再用 Kimura 双参法算出个体间遗传距离(表 2)。从表 2 中可以看出,三疣梭子蟹的种内遗传距离为 0.002~0.004,而与远海梭子蟹、塞氏梭子蟹间的遗传距离为 0.072~0.074 和 0.095~0.111,与青蟹属和日本蜆间的遗传距离为 0.122~0.150 和 0.120~

0.125。图 2 为基于 16S rRNA 基因片段构建的系统树,可见梭子蟹科的 3 个属聚为两大支:三疣梭子蟹不同的单倍型先聚在一起,再和梭子蟹属的远海梭子蟹及塞氏梭子蟹聚为一支;青蟹属的 3 种蟹先聚在一起,再和日本蟳聚为一支。

表 2 基于 16S rRNA 基因片段计算的三疣梭子蟹各单倍型及外群间的遗传距离

Table 2 Genetic distances of 16S rRNA gene among *P. trituberculatus* haplotypes and the foreign groups

物种 Species	1	2	3	4	5	6	7	8
Hap-1								
Hap-2	0.002							
Hap-3	0.002	0.004						
远海梭子蟹 <i>P. pelagious</i>	0.074	0.076	0.072					
塞氏梭子蟹 <i>P. sayi</i>	0.097	0.100	0.095	0.111				
拟穴青蟹 <i>S. paramamosain</i>	0.125	0.127	0.122	0.155	0.165			
锯缘青蟹 <i>S. serrata</i>	0.147	0.150	0.145	0.163	0.168	0.072		
榄绿青蟹 <i>S. olivacea</i>	0.130	0.132	0.128	0.160	0.155	0.083	0.100	
日本蟳 <i>Ch. japonica</i>	0.123	0.125	0.120	0.142	0.128	0.155	0.130	0.145

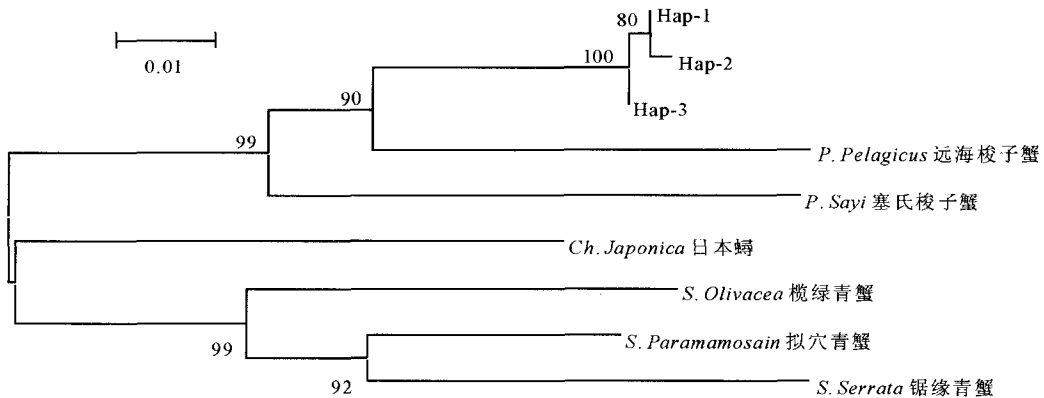


图 2 三疣梭子蟹 16S rRNA 基因序列进化树

Fig. 2 The molecular phylogenetic tree of 16S rRNA gene in *P. trituberculatus*

## 2.2 线粒体 COI 基因片段序列分析

表 3 为三疣梭子蟹 3 个野生群体 COI 基因片段的遗传多样性参数结果,可见日本北海道群体的各项遗传多样性参数值较高,韩国东海岸群体次之,我国会场群体的遗传多样性参数值较低,表明我国会场野生三疣梭子蟹的遗传多样性水平较低。表 4 为三疣梭子蟹不同群体单倍型数量及分布,可见共出现 19 种单倍型(已在 GenBank 中注册,注册号为 GU321229~GU321244)。在 3 个群体中共检测到 33 个变异位点,包括 17 个单一变异位点、15 个简约信息位点和 1 个插入/缺失位点。共有转换 21 个,颠换 11 个,转换/颠换为 1.909。不同群体各碱基含量基本一致,A、T、G、C 含量平均为 26.3%、36.6%、16.5%、20.6%,A+T 含量明显高于 G+C 含量,符合无脊椎动物线粒体 DNA 序列特征。表 5 为基于 COI 片段计算的三疣梭子蟹种内和种间遗传距离结果,可见三疣梭子蟹种内遗传距离为 0.000~0.020,平均遗传距离为 0.006,种间的遗传距离在 0.168~1.538 之间。图 4 为三疣梭子蟹 COI 基因序列分子进化树,可见三疣梭子蟹不同的单倍型先聚在一起,再和梭子蟹属的远海梭子蟹及塞氏梭子蟹相聚,然后和青蟹属的两种蟹相聚,最后和日本蟳聚在一起。

Hap-1	ATTTTATTG AGATATAGAA ACC-GTCTTT TTACATTTA TT-TGTATCC ATATATGGGG	[210]
Hap-2	.....C.....	[210]
Hap-3	.....T...TT	[210]
Hap-4	...C.C..C.....T.	[210]
Hap-5	.....	[210]
Hap-6	.....	[210]
Hap-7	.....	[210]
Hap-8	.....	[210]
Hap-9	.....	[210]
Hap-10	.....T.....	[210]
Hap-11	.....	[210]
Hap-12	.....TA.....	[210]
Hap-13	.....	[210]
Hap-14	.....T.....T...TT	[210]
Hap-15	.....C.C.....	[210]
Hap-16	.....C.....	[210]
Hap-17	.....	[210]
Hap-18	.....	[210]
Hap-19	.....	[210]
<i>P. sanguinolentus</i>	...C.....G. G. A- A... T. C...T	[210]
<i>P. pelagicus</i>	.....T- C.....C.....	[210]
<i>S. serrata</i>	-----AT..C...T T---T. GG . C. --CC. . GAC. A. CT- T. .CG. . AT	[210]
<i>S. paramamosain</i>	-----T---T. GG . C. --C. . GAC. A. T- T. .CG. . AT	[210]
<i>Ch. japonica</i>	.GA. CCACCC ...GG. GAG. .GT-AC. AGA GATGCA. A. . C. - . C. .... AGACGATT	[210]
Hap-1	TTGGAATGTT TGA CTCTCTC TTAT--ACCT TCTTTGCGAA TGCCTGCGTG A-TCGTGATT	[420]
Hap-2	.....	[420]
Hap-3	.....	[420]
Hap-4	.....	[420]
Hap-5	.....	[420]
Hap-6	.....	[420]
Hap-7	.....	[420]
Hap-8	.....	[420]
Hap-9	.....	[420]
Hap-10	.....	[420]
Hap-11	.....G.....	[420]
Hap-12	.....	[420]
Hap-13	.....	[420]
Hap-14	...C.....	[420]
Hap-15	.....C.....	[420]
Hap-16	.....	[420]
Hap-17	.....	[420]
Hap-18	.....	[420]
Hap-19	.....C.....	[420]
<i>P. sanguinolentus</i>	.....C. ....C.....C. C-.....G...T. ....C. T. A. T-.....	[420]
<i>P. pelagicus</i>	.....C. ....C...T. ---G. A. G. C. T...A. A. T-.....C.	[420]
<i>S. serrata</i>	GA. TG. ACCG ....AAA. .CTG---A .G. C. AT. .G. .TTA. TA. T G-. A. .A.	[420]
<i>S. paramamosain</i>	GA. TG. ACCG ....AAAA. .CTG---A GG. C. AA. .G. .TTA. TA. T -. A. .A.	[420]
<i>Ch. japonica</i>	A. ACGTGTA. .C. .GAG. C. GCTGGC. TGC .A. A. ATA. G .AAGA. A. GA .A. .ATC. A	[420]

Hap-1	GGATTTTCCT CA--TTAGAG TATAACATTT TGATATGGAT TATATGAATC TCTCTTATTC	[630]
Hap-2	.....G.....	[630]
Hap-3	.....	[630]
Hap-4	.....G.....C.....	[630]
Hap-5	.....G.....	[630]
Hap-6	.....G.....C.....	[630]
Hap-7	.....	[630]
Hap-8	.....	[630]
Hap-9	.....	[630]
Hap-10	.....G.....G.....	[630]
Hap-11	.....G.....	[630]
Hap-12	.....G.....	[630]
Hap-13	.....	[630]
Hap-14	.....G.....	[630]
Hap-15	.....	[630]
Hap-16	.....	[630]
Hap-17	.....	[630]
Hap-18	.....	[630]
Hap-19	.....	[630]
<i>P. sanguinolentus</i>	.....T.....T.....C.....C.....G.....A.C.C.....C.T.....G.C..CC.C.	[630]
<i>P. pelagicus</i>	.....T.....C.....G.....C.T.....A.G.....C.....T.C.....C.C.....	[630]
<i>S. serrata</i>	A---.C..TG ..-CA.T.T .G..---.. .A.GT.ATTC ..-C.A.TAA AAAA.CT..T	[630]
<i>S. paramamosain</i>	A---.CC..G T.-CA.C.T .G..---.. .ACGT.ATTC A..C.A.TAA AAAACCC..T	[630]
<i>Ch. japonica</i>	AT...A..AG G.TG.A.T... .G.----- .G..GT..A ..A.AT.TAA .TATA.GCAA	[630]
Hap-1	TTAATATTAT CTCGCCTGCG GGTGAGCCCG TCTTCCACTC CTC-----	[720]
Hap-2	-----	[720]
Hap-3	-----	[720]
Hap-4	-----	[720]
Hap-5	-----	[720]
Hap-6	-----	[720]
Hap-7	-----	[720]
Hap-8	-----	[720]
Hap-9	-----	[720]
Hap-10	-----	[720]
Hap-11	-----	[720]
Hap-12	-----	[720]
Hap-13	-----	[720]
Hap-14	-----	[720]
Hap-15	-----	[720]
Hap-16	-----	[720]
Hap-17	-----	[720]
Hap-18	.....T.....	[720]
Hap-19	-----	[720]
<i>P. sanguinolentus</i>	CCC.C.C.C. . .T.T...A. T.....T. .TA.T...CT A..TATTTG TCCCTGAGTT	[720]
<i>P. pelagicus</i>	.CC.....G. . .T..... T...T...T. A.C.....CT G.T-----	[720]
<i>S. serrata</i>	-----	[720]
<i>S. paramamosain</i>	-----	[720]
<i>Ch. japonica</i>	.GCG.CAATA TCT.T.A.TC .AAA.AA-TA AGG...T.. T.TGTTGTGA CA-----	[720]

注：“-”表示插入或缺失；“.”表示相同的碱基

Note:“-”means insertion or missing;“.”means same base

图 3 三疣梭子蟹不同单倍型及其他 5 种蟹的 COI 基因序列比较

Fig. 3 Comparison of COI gene sequences in haplotypes of *P. trituberculatus* and other 5 crabs

表3 三疣梭子蟹3个野生群体COI基因片段的遗传多样性参数

Table 3 Genetic diversity parameters of COI gene in different wild populations of *P. trituberculatus*

群体 Populations	样本数(N) Number of Samples	多态位点数(P) Number of variable sites	单倍型数(H) Number of haplotypes	单倍型多态性(Hd) Haplotype diversity	平均核苷酸差异数(K) Average number of nucleotide differences	核苷酸多样性指数(Pi) Nucleotide diversity
韩国东海岸(KK)	9	16	7	0.944	4.389	0.006 67
日本北海道(JJ)	8	17	7	0.964	4.964	0.007 54
我国会场(HC)	10	13	7	0.867	2.711	0.004 12
总计 Total	27	33	19	0.946	3.966	0.006 03

表4 三疣梭子蟹不同野生群体单倍型数量及分布

Table 4 Amount and distribution of haplotypes in different wild populations of *P. trituberculatus*

群体 Populations	单倍型 Haplotypes	数量 Amount
韩国东海岸(KK)	Hap-1、Hap-2、Hap-3、Hap-4、Hap-5、Hap-6、Hap-7	7
我国会场(JJ)	Hap-7、Hap-8、Hap-9、Hap-10、Hap-11、Hap-12、Hap-13	7
日本北海道(HC)	Hap-11、Hap-14、Hap-15、Hap-16、Hap-17、Hap-18、Hap-19	7

表5 基于COI基因片段计算的三疣梭子蟹种内和种间遗传距离

Table 5 Calculated intraspecific and interspecific genetic distances of COI gene

物种 Species	1	2	3	4	5
三疣梭子蟹 <i>P. trituberculatus</i>	0.008				
远海梭子蟹 <i>P. pelagicus</i>	0.168				
红星梭子蟹 <i>P. sanguinolentus</i>	0.224	0.255			
锯缘青蟹 <i>S. serrata</i>	1.053	1.210	1.302		
拟穴青蟹 <i>S. paramamosain</i>	1.135	1.202	1.266	0.130	
日本鲷 <i>Ch. japonica</i>	1.197	1.390	1.538	1.230	1.213

### 3 讨论

本实验得到的三疣梭子蟹3个群体两个基因片段各碱基组成基本一致,A+T比例也相差不大,分别为70.7%、62.9%。A+T的含量明显高于G+C。该结果与许多研究者在贝类、甲壳类、头足类等线粒体基因中观察到的结论一致(孔晓瑜等 2001;高天翔等 2000)。线粒体上的不同基因具有不同的解析能力,同一基因在不同的物种间解析能力也不同(李咏梅等 2009)。在线粒体基因组中,12S rRNA和16S rRNA基因进化速率低、比较保守,而COI基因在不少无脊椎动物中检测到了较大的变异(Howland *et al.* 1995; Spicer *et al.* 1995)。Meyran等(1997)认为,在近缘种类的鉴定上,COI序列比16S rRNA基因序列更灵敏。从本实验结果可以看出,在16S rRNA基因中,3个群体共检测到4个变异位点,而COI基因检测到33个变异位点。由此可见,COI序列呈现较丰富的变异,可用于群体内遗传多样性分析。同时COI基因也更适于种群遗传学和种间差异的研究。

本文利用16S rRNA和COI基因片段序列分析方法,证明3个群体间16S rRNA基因相对于COI基因来说差异不明显,这与该基因片段的保守性有关。16S rRNA基因共检测到3种单倍型,各项遗传多样性参数较低,而COI基因片段,共检测到19种单倍型,各项遗传多样性参数均较高。研究结果显示,我国会场群体和韩国东海岸群体、日本北海道群体都有共享单倍型,说明我国的三疣梭子蟹野生群体和国外的两个群体之间遗传相似度很高。遗传多样性参数显示我国会场群体的核苷酸多样性指数低于国外两个群体,而单倍型多态性指



数比国外两个群体略低、差异不大。会场群体核苷酸多样性指数 0.004 12 高于戴艳菊等(2010)所研究的核苷酸多样性指数最高的莱州湾群体(0.001 7)、低于冯冰冰等(2008a)研究的核苷酸多样性指数最高的连云港群体 0.005 09±0.001 23,但是对比日本北海道群体和韩国东海岸群体,本实验结果综合戴艳菊等(2010)以及冯冰冰等(2008b)所做的研究,我国三疣梭子蟹野生群体核苷酸多样性指数较低,表明我国三疣梭子蟹野生群体遗传多样性水平较低,原因可能是由于近年来我国沿海地区大规模的开发,人为干扰,捕捞强度增大使得三疣梭子蟹野生资源急剧下降,或者是由于盲目的人工移植和引种造成的,具体原因有待进一步研究。

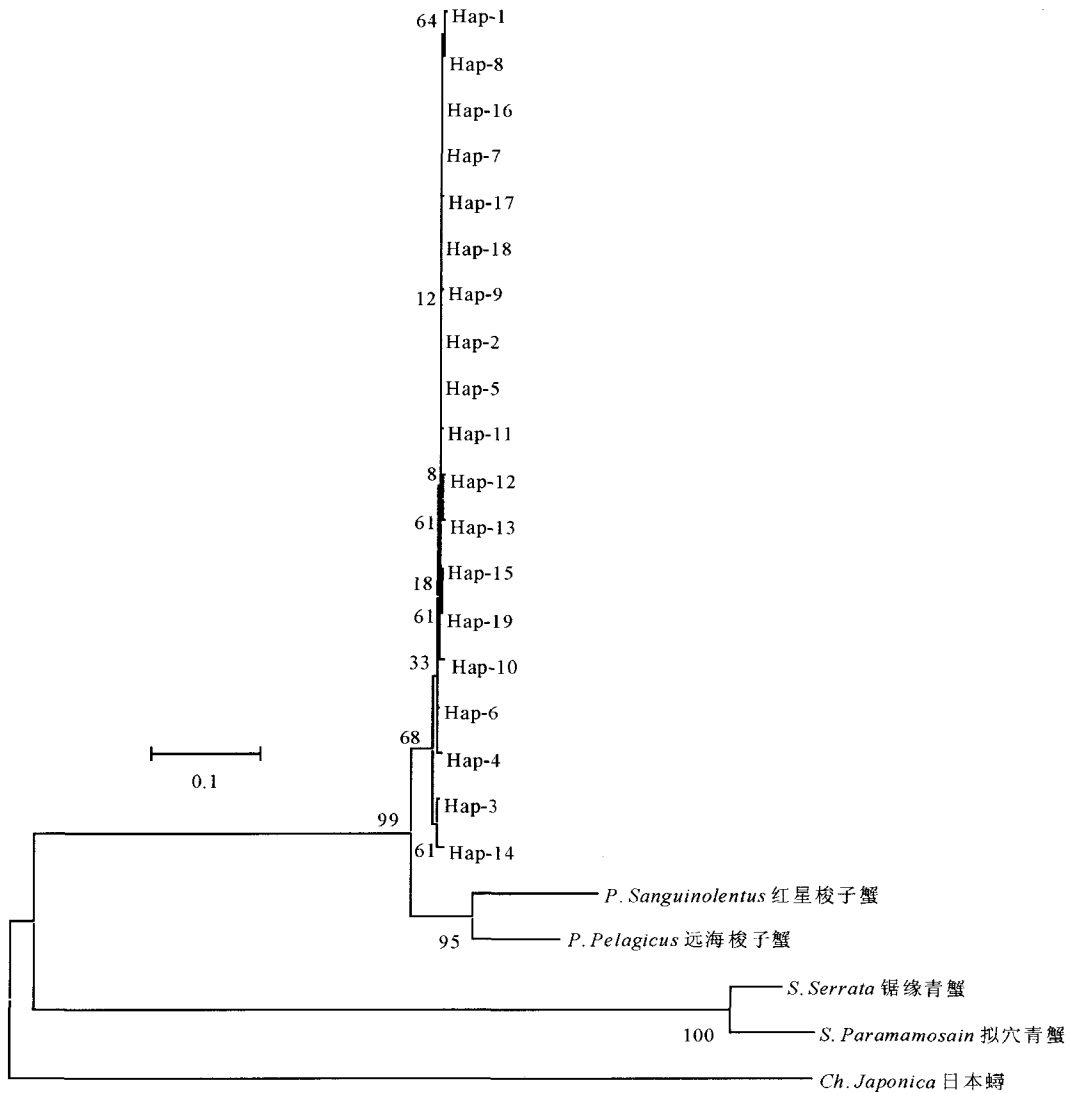


图 4 三疣梭子蟹 COI 基因序列分子进化树

Fig. 4 The molecular phylogenetic tree of COI gene in *P. trituberculatus*

作者对 3 个群体进行了聚类分析,从遗传距离分析来看,我国会场群体和日本北海道群体的平均遗传距离为 0.006,与韩国东海岸群体的平均遗传距离为 0.005,韩国东海岸群体与日本北海道群体的平均遗传距离为 0.007。单倍型研究发现,16S rRNA 基因片段产生 3 个单倍型,COI 基因片段产生 19 种单倍型,从所产生的单倍型及与其他种的分子进化树可以看出,3 个群体的所有单倍型先聚在一起,再与红星梭子蟹 *P. sanguinolentus* 和远海梭子蟹 *P. pelagicus* 聚在一起,然后与锯缘青蟹 *S. serrata* 和拟穴青蟹 *S. paramamosain* 在一

起,最后与日本蟳 *Ch. japonica* 聚在一起,该结果与传统分类学一致(戴爱云等 1986;金 珊等 2004)。而基于 16S rRNA 基因片段构建的 NJ 系统树所反映的分类关系与基于 COI 基因片段构建的系统树并不一致,主要不同在于蟳的分类关系上,基于 16S rRNA 基因片段构建的 NJ 系统树显示出梭子蟹科的 3 个属聚为两大支:三疣梭子蟹不同的单倍型先聚在一起,再和梭子蟹属的远海梭子蟹及塞氏梭子蟹 *Portunus sayi* 聚为一支。而青蟹属的 3 种蟹先聚在一起,再和日本蟳聚为一支。在本研究中,16S rRNA 和 COI 基因片段得到的系统树,种内与外群的趋势出现了不一致。原因可能是两个片段的进化速率不一样造成的,因此今后应选择线粒体 DNA 的其他基因区域(如 CO II、ND 5 等)进行研究,以得到更多的 DNA 序列数据。另外从本实验结果可以看出,利用线粒体 COI 基因检测到的三疣梭子蟹群体遗传多样性水平显著高于基于线粒体 16S rRNA 的结果,可见由于分子标记进化速度不同所能检测到的多样性水平有一定的差异。今后,作者拟通过微卫星或 AFLP 技术进一步在核基因水平上进行群体遗传结构的研究,为三疣梭子蟹优良种质的筛选提供更全面的理论基础。

## 参 考 文 献

- 孔晓瑜,喻子牛,刘亚军,高天翔,武云飞. 2001. 中华绒螯蟹与日本绒螯蟹线粒体 CO I 基因片段的序列比较研究. 中国海洋大学学报, 31(6):861~866
- 王敏强,崔志峰,刘晓玲,朱强远,赵海滨. 2008. 两种三疣梭子蟹居群线粒体 Cyt b 和 S-rRNA 基因片段序列变异研究. 烟台大学学报(自然科学与工程版), 21(3): 192~196
- 冯冰冰,李家乐,牛东红,陈 琳,郑岳夫. 2008a. 我国沿海三疣梭子蟹 9 个野生群体线粒体 CR 和 COI 片段比较分析. 动物学杂志, 43(2):28~36
- 冯冰冰,李家乐,牛东红,陈 琳,周志强. 2008b. 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. 上海水产大学学报, 17(2): 134~139
- 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 爽,薛淑霞,孙金生. 2008. 黄海和东海三疣梭子蟹的 AFLP 分析. 海洋与湖沼, 39(2): 152~156
- 李咏梅,陈秀荔,赵永贞,陈晓汉. 2009. 钦州湾牡蛎线粒体 16S rRNA 和 COI 基因片段的序列变异分析. 广州海洋大学学报, 29(3): 11~17
- 金 珊,赵青松,王春琳,陈寅儿. 2004. 梭子蟹科 6 种海产蟹的 RAPD 标记. 动物学研究, 25(2): 172~176
- 郭天慧,孔晓瑜,陈四清,喻子牛. 2004. 三疣梭子蟹线粒体 DNA16S rRNA 和 COI 基因片段序列的比较研究. 中国海洋大学学报, 34(1): 230~236
- 高天翔,张秀梅,吉崎悟朗,渡边精一. 2000. 日本绒螯蟹线粒体 DNA 序列研究 12S rRNA. 青岛海洋大学学报, 30(1): 43~47
- 高保全,刘 萍,李 健,戴芳钰. 2007. 三疣梭子蟹野生群体同工酶的遗传多态性分析. 水产学报, 31(1): 1~6
- 黄培堂(译). 2002. 分子克隆实验指南(第 3 版). 北京:科学出版社,461~469
- 戴爱云,冯钟琪,宋玉枝,黄志翔,吴赫昌. 1977. 三疣梭子蟹渔业生物学的初步调查. 动物学杂志, (2): 30~33
- 戴爱云,杨思谅,宋玉枝,陈国孝. 1986. 中国海洋蟹类. 北京:海洋出版社, 189
- 戴艳菊,刘 萍,高保全,李 健,王清印. 2010. 三疣梭子蟹 4 个野生群体线粒体 16S rRNA 和 COI 片段的比较分析. 中国海洋大学学报, 40(3): 54~63
- Hamasaki, K., Fukunaga, K., and Kitada, S. 2006. Batch fecundity of the swimming crab *Portunus trituberculatus* (Brachyura: Portunidae). Aquaculture, 253: 359~365
- Howland, D. E., and Hewitt, G. M. 1995. Phylogeny of the coleoptera based on mitochondrial cytochrome oxidase I sequence data. Insect Mol. Biol. 4: 203~205
- Meyran, J. C., Monnerot, M., and Taberlet, P. 1997. Taxonomic status and phylogenetic relationships of some species of the genus *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda) deduced from mitochondrial DNA sequences. Mol. Phylogenet. Evol. 8(1): 1~10
- Spicer, G. B. 1995. Phylogenetic utility of the mitochondrial cytochrome oxidase gene; molecular evolution of the *Drosophila buzzatii* species complex. Mol. Evol. 41: 749~759
- Wilbur, A. E., Hilbish, T. J., Foighil, D. A., and Gaffney, P. M. 1998. Mitochondrial cytochrome oxidase I gene sequence support an Asian origin for the Portuguesse oyster *Crassostrea angulata*. Mar. Biol. 131: 497~503