

# 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)4 个野生群体 ITS1 序列分析及系统进化分析\*

李远宁<sup>1,2</sup> 马朋<sup>2</sup> 刘萍<sup>2</sup> 李琪<sup>1</sup>

(1. 中国海洋大学 青岛 266003; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

**摘要** 对我国沿海 4 个野生群体三疣梭子蟹的核糖体 RNA 转录单元内间隔区 ITS1 基因片段进行克隆和测序, 获得长度为 515—571bp 的 ITS1 核苷酸序列, 在 4 个群体的三疣梭子蟹中共检测到变异位点 56 个, 多态位点比例为 9.5%, 其中简约信息位点 25 个, 共检测到 40 种单倍型。通过统计单倍型多态性、平均核苷酸差异数和核苷酸多样性指数, 结果显示: 舟山群体多样性指数最高, 其次是鸭绿江口群体和海洲湾群体, 莱州湾群体最低。在三疣梭子蟹 ITS1 序列中共发现 5 种微卫星位点, AMOVA 分析结果显示 4 个群体间的遗传差异显著。另外, 将本研究所得序列结合 GenBank 数据库中十足目 12 种蟹 ITS1 序列构建系统进化树, 系统树显示同属的不同种各自聚支, 与形态学分类吻合。

**关键词** 三疣梭子蟹, ITS1, 遗传多样性, 系统进化

**中图分类号** Q789

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)属于甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、梭子蟹科(Portunidae)、梭子蟹属(*Portunus*), 广泛分布在中国南北沿海, 以及日本、朝鲜、马来西亚群岛等水域(戴爱云等, 1986; 堵南山, 1993), 是我国海产大型经济蟹类, 经济价值高(施慧等, 2008), 是沿海重要的渔业资源。近年来我国沿海各地进行了人工养殖、半人工采苗、人工育苗等养殖活动, 增加了个体间的基因交流, 从而产生了种质资源的保护、管理等方面的问题(郭天慧等, 2004)。有效地管理、利用和保护三疣梭子蟹的种质资源, 以便为今后的优质良种培育提供帮助, 对三疣梭子蟹的遗传结构和遗传变异水平进行研究显得尤为重要。

第 1 转录间隔区(internal transcribed spacer 1, ITS-1)位于 18S rRNA 和 5.8S rRNA 基因之间的非编码间隔区, 第 2 转录间隔区(internal transcribed spacer 2, ITS-2)是介于 5.8S 和 28S rRNA 基因之间的非编码间隔区(何毛贤等, 2004)。ITS1 序列具有较大的变异性、

信息量丰富、序列短和易于扩增的特点, 在海洋动物系统进化、分类和种质鉴定、遗传多样性研究等方面研究中具有广泛的应用(Kenehington *et al.*, 2002; Insua *et al.*, 2003; King *et al.*, 1999), 本研究利用 ITS1 序列变异来分析 4 个野生群体的遗传多样性和亲缘关系, 以期揭示三疣梭子蟹的遗传多样性水平, 为我国的种质保护和生产实践提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用野生三疣梭子蟹共 60 个个体, 4 个野生群体分别为鸭绿江口野生群体(YL)采自辽宁省鸭绿江口近海、莱州湾野生群体(LZ)采自山东省昌邑市下营港近海、海州湾野生群体(HZ)采自江苏连云港市海州湾近海、舟山野生群体(ZS)采自浙江舟山群岛近海、活体带回实验室后-80℃保存备用。

### 1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取与检测 每个群体中随

\* 国家高技术研究发展计划项目(2012AA10A409)和山东省科技发展计划项目(2011GHY11526)资助。李远宁, 硕士研究生, 主要从事海水养殖动物遗传育种研究, E-mail: andylyn1988@yahoo.com.cn

通讯作者: 刘萍, 研究员, E-mail: liuping@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2012-03-20, 收修改稿日期: 2012-05-28

机抽取 15 个个体, 每个个体取约 100mg 腹部肌肉, 剪碎组织, 加入 475  $\mu$ l 组织匀浆缓冲液(10mmol/L Tris-Hcl, pH=8.0; 50mmol/L EDTA, pH=8.0), 充分混匀, 依次加入终浓度为 10%的 SDS 和 20  $\mu$ g/ml 的蛋白酶 K, 55 $^{\circ}$ C 裂解至澄清, 用酚、酚 氯仿(1:1)和氯仿各抽提 1 次。用 DNA 定量仪测定样品 DNA 的浓度和纯度, 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 全自动凝胶成像系统拍照, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

**1.2.2 PCR 扩增** ITS1 序列 PCR 扩增正向引物为: 5'-GTAACAAGGTTTCCGTAG GTG-3', 反向引物为: 5'-TTGCTGCGGTCTTCATCG-3'。由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2min, 94 $^{\circ}$ C 变性 45s, 48 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 反应总体积体系为 25 $\mu$ l, 10  $\times$  PCR buffer 2.5 $\mu$ l, dNTPs 0.2mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 2mmol/L, *Taq* 酶 1U, 上、下游引物各 0.12 $\mu$ mol/L, 模板 DNA 50—100ng。

**1.2.3 序列测定** 取 PCR 产物在 1.5%的琼脂糖凝胶中进行电泳分离, 切下目的条带, 用胶回收试剂盒(TaKaRa)纯化回收 PCR 扩增产物, 与 pMD18-T 载体连接后转化 DH5 感受态细胞中, 采用蓝白斑挑选阳性克隆, 阳性克隆送上海生物工程有限公司测序。

**1.2.4 序列分析** 将测得的序列用 Bioedit 软件进行编辑并辅以人工核查, 用 ClustalX 1.83 软件比对, 并确定序列长度。用 DnaSp5.0 软件计算各个群体的单倍型, 单倍型多态性, 多态位点数, 平均核苷酸差异数, 核苷酸多样性指数, 用 SSRHunter3.1 软件查找简单重复序列, 用 Arlequin3.1 (Excoffier *et al.*, 2005) 中的分子变异分析(AMOVA)分析方法估算遗传变异在群体内和群体间的分布及遗传分化系数( $F$ -statistics,  $F_{st}$ ), 计算并用排列测验法(permutation test)检验  $F_{st}$  的显著性(重复次数为 1000)。MEGA4.0 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、不同群体间的 Kimura2-paramter 遗传距离, 用邻接法(NJ)构建系统树, 系统树各节点的支持率以序列数据

集 1000 次重复抽样检验的自引导值(Bootstrap value)表示。

## 2 结果

### 2.1 序列分析

将 PCR 产物进行克隆、测序, 去掉两侧 18S rRNA 与 5.8S rRNA 基因序列, 利用 MEGA4.0 软件分析显示, ITS1 序列长度介于 515—571bp 之间, 具有长度多态性。各群体样品 ITS1 序列 4 种碱基平均含量见表 1, ITS1 序列表现出一定的反 G 偏倚(即 G 的含量低于其它 3 种碱基的含量)。ITS1 序列 GC 平均含量在 50%左右, 稍高于脊椎动物全基因组 40%—45%的平均含量。4 个群体共检测到变异位点 56 个, 多态位点比例为 9.5%, 其中简约信息位点 25 个, 单一变异位点 31 个, 56 个变异位点中 C/T 转换为 21 个, A/G 转换为 17 个, A/T 颠换为 7 个, T/G 颠换为 4 个, A/C 颠换为 6 个, A/C/T 颠换位点 1 个, ITS1 变异位点中转换位点高于颠换位点。从 GenBank 数据库中提取梭子 5 属 12 种蟹 ITS1 序列, 绒螯蟹属的 GC 含量显著高于 AT 含量, 其它 4 属 GC 含量都在 50%左右, 其详细资料见表 2。

微卫星序列(SSR)是由 1—6 个核苷酸的串联重复片段构成, 在三疣梭子蟹 ITS1 序列中发现多种类型微卫星位点, 共有(AATC)<sub>3-4</sub>、(ACA)<sub>3</sub>、(TC)<sub>3</sub>、(TAC)<sub>3-6</sub>、(ACT)<sub>3</sub> 等 5 种微卫星位点, 它们出现的位点分别为(70)、(141)、(217)、(277、462)、(278)。

利用 DnaSp5.0 计算群体遗传多样性参数见表 3, 由平均核苷酸差异数和核苷酸多样性指数显示, 4 群体中舟山湾群体多样性指数最高, 其次是鸭绿江口群体、海洲湾群体, 莱州湾群体最低。共检测到 40 种单倍型, 多态位点的分布见表 4, Hap\_9 为 3 个群体共享, Hap\_2 为海州湾群体和莱州湾群体共享, Hap\_18、Hap\_35 为海州湾群体和舟山群体共享, Hap\_17 为鸭绿江口群体、海州湾群体和莱州湾群体共享, Hap\_20 为鸭绿江口群体、莱州湾群体和舟山湾

表 1 4 个野生群体三疣梭子蟹 ITS1 序列的碱基组成

Tab.1 Nucleotide composition of ITS1 sequences of *P. trituberculatus* from four wild populations

群体	T%	C%	A%	G%	C+G%	序列长度(bp)
鸭绿江口(YL)	24.2	27.8	26.0	21.9	49.7	539—571
莱州湾(LZ)	24.0	28.0	25.6	22.4	50.4	542—558
海洲湾(HZ)	24.2	27.9	25.8	22.1	50.0	515—561
舟山(ZS)	24.2	27.9	25.7	22.2	50.1	536—565

表 2 外源序列物种名称、来源和微卫星类型  
Tab.2 Origin, Family and microsatellite type of outgroup sequences

科/属名	种名	登录号	微卫星类型	C+G%
梭子蟹科/梭子蟹属	纤手梭子蟹 <i>Portunus gracilimanus</i>	AM410548.1	(ACA) <sub>(3,5)</sub> , (GCT) <sub>3</sub> (GA) <sub>3</sub> , (TC) <sub>3</sub> , (AT) <sub>3</sub>	52.4
Portunidae/ <i>Portunus</i>	红星梭子蟹 <i>Portunus sanguinolentus</i>	AM410544.1	(GCTA) <sub>3</sub> , (TAC) <sub>6</sub> (TG) <sub>3</sub> , (TA) <sub>3</sub> , (AG) <sub>3</sub>	48.6
方蟹科/绒螯蟹属	中华绒螯蟹 <i>Eriocheir sinensis</i>	HQ534060	(CA) <sub>3</sub>	57.1
Grapsidae/ <i>Eriocheir</i>	狭颚绒螯蟹 <i>Eriocheir leptognathus</i>	AF253519	(CG) <sub>3</sub>	61.1
	日本绒螯蟹 <i>Eriocheir japonica</i>	AF517680	(CA) <sub>3</sub>	59.8
	台湾绒螯蟹 <i>Eriocheir formosa</i>	AF517681	(CAT) <sub>4</sub> , (CA) <sub>3</sub>	59.7
	合浦绒螯蟹 <i>Eriocheir hepuensis</i>	AF517679	(CA) <sub>3</sub>	59.9
	拜氏雪蟹 <i>Chionoecetes bairdi</i>	AB193502	(AC) <sub>3</sub>	49.7
	远东海域雪蟹 <i>Chionoecetes opilio</i>	AB193500	(TAC) <sub>4</sub> , (AC) <sub>3</sub> ; (GGT) <sub>4</sub>	49.4
	日本雪蟹 <i>Chionoecete japonicus</i>	AB193505	(AC) <sub>3</sub> , (GGT) <sub>4</sub>	50.1
石蟹科/拟石蟹属	勘察加拟石蟹 <i>Paralithodes camtschaticus</i>	AB194391	(GT) <sub>4</sub>	52.8
Lithodidae/ <i>Paralithodes</i>				
石蟹科/石蟹属	金霸王蟹 <i>Lithodes aequispinus</i>	AB236928	(GT) <sub>4</sub>	51.4
Lithodidae/ <i>Lithodes</i>				

表 3 三疣梭子蟹 4 个野生群体 ITS1 基因片段的遗传多样性参数  
Tab.3 Genetic diversity parameter of ITS1 gene fragments among four wild populations of *P. trituberculatus*

群体	样本数 $N$	单倍型数 $H$	单倍型多态性 $H_d$	平均核苷酸差异数 $K$	核苷酸多样性指数 $P_i$
YL	15	12	0.962	8.019	0.01536
LZ	15	14	0.990	6.267	0.01211
HZ	15	11	0.905	6.438	0.01303
ZS	15	13	0.981	8.210	0.01573
总计	60	40	0.962	5.218	0.01071

群体共享, 其余单倍体为各群体所特有。

## 2.2 群体间的遗传结构分析

群体间的分子变异等级分析(AMOVA 分析), 将每个群体作为一组进行 AMOVA 分析, 具体结果见表 5, AMOVA 分析结果显示群体间的分子变异不显著 ( $F_{st}=0.00423$ ,  $P>0.05$ ), 表明在整个遗传变异中群体间的变异占 0.423%, 99.577% 的遗传变异来自于群体内部, 群体间的遗传分化系数在从 0.42480—0.75000 ( $F_{st}<0.05$ )。群体间的遗传距离, 鸭绿江口群体和莱州湾群体的遗传距离最大为 0.01232, 其次是莱州湾群体和舟山湾群体 0.01121, 海州湾群体和舟山湾群体遗传距离最小 0.01016, 莱州湾群体和海州湾群体遗传距离也较小 0.01121 (表 6)。

## 2.3 遗传距离与系统进化关系

将扩增获得的三疣梭子蟹 ITS1 序列结合 GenBank 中检索到的 5 属 12 种蟹 ITS1 序列, 利用 MEGA4.0 软件计算种间的遗传距离(表 7), 勘察加拟石蟹与日本雪蟹间的遗传距离最大为 1.67267, 拜氏雪蟹与日本雪蟹的遗传距离最小为 0.02480, 三疣梭

子蟹与与金霸王蟹的遗传距离最大为 1.45039, 红星梭子蟹的遗传距离最小为 0.65463。对其构建 NJ 系统发生树, 用 Bootstrap 法检验, 1000 次重复抽样得到结点的置信度如图 1 所示, 从系统树可以看出, 同属的不同种聚在一起, 物种间的界限非常明晰, 符合形态学的分类关系。

## 3 讨论

### 3.1 目的片段序列分析

遗传多样性是指种内不同种群间或一个种群内部不同的个体的遗传变异, 即一方面, 遗传多样性是物种多样性和生态多样性的基础(施立明, 1990), 另一方面, 物种多样性和遗传多样性是生态系统多样性的基础(陈灵芝, 1993)。遗传多样性的研究越来越受到了国内外学者的关注, 核糖体 RNA 基因以其序列上的特殊性在海洋动物的遗传多样性研究中具有不可替代的作用。ITS1 为核基因组序列, 由于该序列属于非编码的间隔区, 没有自然选择的压力, 具有较大的变异性, 使得该序列成为较好的分子系统学分

表 4 ITS1 基因核苷酸多态位点及各单倍型在群体中的分布  
Tab.4 ITS1 nucleotide polymorphic sites and the haplotype distribution in the population

核苷酸多态位点	111	1112222222	2222222222	2333333333	3444444445	555555	群体单倍型数总计			
	2226667111	9990122333	3456777788	8124455667	9012478892	466888	YL	LZ	HZ	ZS
	5682346014	2363317123	9648057934	5384659364	7816104919	926038				
Hap_1	AATATTATT	TTCAATA-TA	CGTACCTATA	CCTCTACAGG	CCCAACTACA	ATACAT	1	0	0	0
Hap_2	.....	.....	.....	.....	.....	..G..C	0	1	1	0
Hap_3	.....	.....	..A.....	.....	TA.....C.....	..G..C	0	0	1	0
Hap_4	.....	.....	..A.....	.....	..G.....	..G..C	0	0	0	1
Hap_5	.....	..C.....G-	.....	..A.....	.....	..G..C	1	0	0	0
Hap_6	..T.....	.....	.....	..A...G..	.....	..G..C	0	1	0	0
Hap_7	..T.....	.....C-..	.....	.....	..G.....	..G..C	2	0	0	0
Hap_8	..T.....	.....C.....-	.....	.....	..G.....	..G..C	1	0	0	0
Hap_9	..T.....	.....	.....	.....	..G.....	..G..C	3	1	5	2
Hap_10	..T.....	.....	T.....	.....	..G.....	..G..C	0	0	0	1
Hap_11	..T.....	.....	..C.....	.....	..TG.....	..G..C	0	1	0	0
Hap_12	..T.....	.....	.....	.....	..G....T..	..G..C	0	0	0	1
Hap_13	..T.....	.....-AT	..C.....	.....T...	.....	..G..C	0	0	1	0
Hap_14	G..T.....	.....-AT	..C.....	.....GT...	.....	..G..C	0	0	1	0
Hap_15	..TC.....	.....-AT	..C.....	.....GT...	.....	..G..C	0	1	0	0
Hap_16	..T.....	.....G.-..	..C.....	.....GT...	..T.....	..G..C	0	1	0	0
Hap_17	..TC...GC	.....A..	..C.....	.....T...	.....	..G..C	1	1	1	0
Hap_18	..TC...GC	.....A..	..C.....	.....GT...	.....	..G..C	0	0	1	1
Hap_19	..TC.G.GC	.....G..	..C.....	.....T...	.....	..G..C	0	1	0	0
Hap_20	..TC...GC	.....A..	..C.....	.....T..T...	.....	..G..C	1	1	0	1
Hap_21	..TC...GC	.....A..	..C.....	.....T...	.....G..	..G..C	0	1	0	0
Hap_22	..TC...C	..T...A..	..C.....	.....T..T...	.....	..G..C	0	0	0	1
Hap_23	..TC...GC	.....A..	..CG.....	.....T...	.....	..G..C	0	0	0	1
Hap_24	..TC...GC	.....A..	..C.....	.....GT...	.....G.....	..CG..C	0	0	1	0
Hap_25	..TC...GC	.....A..	..C.....	.....Hap GT...	.....C.G..C	..G..C	0	0	1	0
Hap_26	..TC...GC	..G..A..	..C.....	.....GT...	.....	..G..C	0	1	0	0
Hap_27	..TC...GC	.....A..	..C...-CCT	A...GT...	.....	..G..C	0	2	0	0
Hap_28	..TC...GC	.....A..	..C..AGCCT	A...GT...	.....T...	..G..C	0	0	0	1
Hap_29	..G.TC...GC	.....A..	..C.....	.....T...	.....	..G..C	0	0	0	1
Hap_30	..TC...GC	.....A..	..C.....	.....A.....	.....	..G..C	0	0	1	0
Hap_31	..TC...GC	.....T..	.....	.....TA.....	.....	..G..C	0	1	0	0
Hap_32	..TC...GC	C.....-	.....	.....	.....G.....	..G..C	1	0	0	0
Hap_33	..TC...GC	.....-	.....	.....	.....G..C.....	..G..C	0	0	0	1
Hap_34	..T.....	.....-	.....	.....A...T	TA.....	..G.GC	1	0	0	0
Hap_35	..T.....	.....-	.....	.....A...T	TA.....	..G..C	0	0	1	2
Hap_36	..T.....	.....-	.....T.....	.....A...T	TA.....	..G..C	1	0	0	0
Hap_37	..T.C.....	.....-	.....	.....A-	TA.....	..G..C	1	0	0	0
Hap_38	..AT.....	.....C..	.....	.....-	TA.....	..G..C	0	0	0	1
Hap_39	..T.....	.....-	.....	.....-	TA.....	..G..C	0	1	0	0
Hap_40	..TC...GC	.....A..	..C.....	.....A...-	TA.....G..	..GA.C	1	0	0	0

注: “.”表示与第一行序列碱基相同

表 5 群体间的遗传变异的分子变异等级分析(AMOVA)  
Tab.5 Analysis of molecular variance (AMOVA)

变异来源	自由度 df	平方和	方差组分	方差比例(%)
群体间	3	41.317	0.05497	42.279
群体内	56	725.067	12.94762	
总变异	59	766.383	13.00259	

表 6 群体间的相对遗传距离(左下方)和  $F_{st}$ (右上方)

Tab.6 Pairwise genetic distances (lower left) and  $F_{st}$  (upper right)

群体	鸭绿江口 YL	莱州湾 LZ	海州湾 HZ	舟山 ZS
YL	—	0.75000**	0.61621**	0.53906**
LZ	0.01232	—	0.42480**	0.61621**
HZ	0.01039	0.01047	—	0.05859**
ZS	0.01082	0.01121	0.01016	—

析片段, 目前, ITS1 已广泛应用于系统发生关系和群体遗传多样性等方面的研究(俞海菁等, 2000; Schilthuizen *et al.*, 1995; 凌去非等, 2006)。

从本实验序列比对的变异位点数看, 三疣梭子蟹 ITS1 序列的进化速率比线粒体 COI 基因进化速率快, 群体间的变异程度也较大, 说明 ITS1 序列也适合三疣梭子蟹群体间遗传分析。Kinght 等(1993)认为, 如果转换/颠换的比值小于 2.0, 此基因的突变可能已达到饱和状态, 受进化噪音影响的可能性较大, 本研究 ITS1 序列转换/颠换比约为 2.17, 说明三疣梭子蟹未出现颠换转换饱和现象。此外, 三疣梭子蟹 ITS1 序列具有长度多态性, 长度的变化范围不大, 为 515—571bp, 插入/缺失位点丰富, 最长的插入/缺失序列达

28bp, 这些插入/缺失位点主要位于重复区, 所以微卫星 DNA 简单重复序列的重复次数不同是这种长度多态性产生的主要原因。本研究三疣梭子蟹 ITS1 序列共发现(AATC)<sub>3-4</sub>、(ACA)<sub>3</sub>、(TC)<sub>3</sub>、(TAC)<sub>3-6</sub>、(ACT)<sub>3</sub> 等 5 种微卫星位点, 结合 GenBank 数据库中梭子蟹科其它属的 ITS1 序列发现(表 3), 同属的种类大多会有同样的微卫星类型, 例如梭子蟹属的(ACA)<sub>n</sub>、绒螯蟹属的(CA)<sub>n</sub>, 这些位点能否作为鉴别属间的分子标记还需要更多的数据加以证实。

对果蝇所进行的相关研究表明, 高 GC 含量是一个比较原始的特征(Rodriguez *et al.*, 2000)。对 4 个群体三疣梭子蟹的 ITS1 序列碱基组成分析发现, GC 含量在 50%左右, GenBank 数据库中下载的 5 属中除绒螯蟹属外其它属 GC 含量也在 50%左右, 绒螯蟹属 GC 含量较高, 在 60%左右, 可以推测绒螯蟹属在进化上较其它几个属更原始。

### 3.2 遗传多样性分析

本研究分析了三疣梭子蟹 4 个群体的 ITS1 序列, 结果表明舟山湾群体遗传多样性指数最高, 这与高保全等(2007)利用同工酶研究的舟山湾群体遗传多样性较高的结果比较一致。莱州湾群体最低, 这与樊祥国等(2009)研究的莱州湾群体遗传多样性较低的结果一致, 4 个群体单倍型多态性都在 0.90 以上, 接近于姜志勇等(2007)研究的福建缢蛭(*Sinonovacula constricta*)野生群体与养殖群体的单倍型多态性(1.0), 核苷酸多样性指数和单倍型多态性均高于高于吴琪等(2007)研究的硬壳蛤(*Mercenaria mercenaria*)养殖群

表 7 基于 ITS1 的 Kumara2-parameter 遗传距离(左下方)

Tab.7 Kumara2-parameter genetic distances (lower left) based on ITS1 gene fragments

物种	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. <i>Portunus sanguinolentus</i>												
2. <i>Portunus trituberculatus</i>	0.51051											
3. <i>Portunus gracilimanus</i>	0.67737	0.65463										
4. <i>Chionoecetes japonicus</i>	0.86443	0.98814	0.97090									
5. <i>Chionoecetes bairdigenes</i>	0.87606	0.94311	0.97090	0.02480								
6. <i>Chionoecetes opiliogenes</i>	0.87708	1.00274	0.98519	0.00408	0.02901							
7. <i>Eriocheir leptognathus</i>	0.93007	0.84412	0.85005	0.55146	0.53583	0.54313						
8. <i>Eriocheir japonica</i>	0.96038	0.80662	0.83868	0.56023	0.54460	0.55183	0.08218					
9. <i>Eriocheir sinensis</i>	0.96038	0.80662	0.85201	0.56916	0.55353	0.56068	0.08218	0.00820				
10. <i>Eriocheir hepuensis</i>	0.96038	0.80662	0.83868	0.56023	0.54460	0.55183	0.08218	0.00000	0.00820			
11. <i>Eriocheir formosa</i>	1.02479	0.87781	0.85332	0.56874	0.55287	0.56023	0.08200	0.02491	0.02491	0.02491		
12. <i>Lithodesae quispinus</i>	1.36857	1.45039	1.55350	1.42620	1.37228	1.41548	1.43115	1.38102	1.41329	1.38102	1.43901	
13. <i>Paralithodes camtschaticus</i>	1.39888	1.38781	1.58131	1.67267	1.58315	1.65203	1.56197	1.50270	1.54273	1.50270	1.57344	0.02485

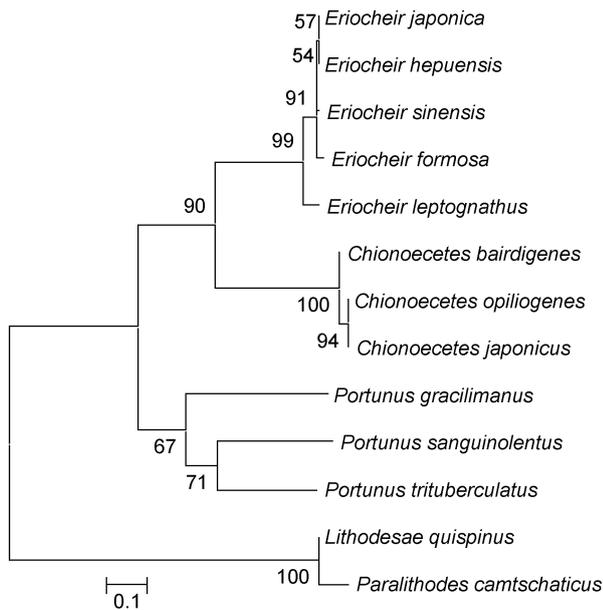


图 1 ITS1 基因序列构建的 NJ 分子进化树

Fig.1 NJ phylogenetic tree based on ITS1 gene sequences

体核苷酸多样性指数(0.0030)、单倍型多态性(0.4), 且大多数个体具有自己独特的单倍型, 说明 4 个群体遗传多样性还较丰富, 这与李晓萍等(2011)利用微卫星研究的结果相一致。

群体遗传学认为,  $F_{st}$  值可以表示群体间的遗传分化程度, 一般  $F_{st}$  值接近 0 时, 说明群体间没有发生遗传分化。  $F_{st}$  值在 0.00—0.05 之间表示分化较弱, 0.05—0.25 之间表示分化中等, 在 0.25 以上表示遗传分化极大(宋春妮等, 2011), 根据各群体间的遗传分化指数(表 7), 说明 4 个群体间的遗传分化达到中等或分化极大, 并且分化程度都达到了极显著水平。

分析其原因, 莱州湾群体与其它群体遗传距离较大, 莱州湾群体生活于封闭性强的渤海, 该群体是个地方性种群, 越冬后, 在 4 月上中旬开始生殖洄游, 繁殖场所为渤海湾和莱州湾近岸浅水区河口附近; 12 月初开始越冬洄游, 越冬场所为渤海深水区, 至来年 3 月(邓景耀等, 1986)。整个生命活动主要局限于渤海之内, 这可能造成了莱州湾群体与其它群体间产生了地理隔离。海州湾群体和舟山湾群体遗传距离较小, 是因为这两个群体生活于东海水域, 两个水域处于一种开放状态, 舟山群体三疣梭子蟹活动范围比较广, 北可达黄海南部的吕泗、大沙渔场(宋海棠等, 1989), 可能海州和舟山群体的三疣梭子蟹存在基因交流。

现代杂种优势理论认为, 杂种优势的大小在一

定程度上取决于亲本间遗传差异的大小, 即遗传距离的大小, 可以说差别越大的群体间杂交, 所产生的杂种优势越大, 将亲缘关系较远的群体进行杂交, 以获得养殖性能较好的优势品种(孙少华等, 2000), 从而增强群体对环境的适应能力, 所以本结果为人工优良繁育提供了数据参考。

### 3.3 系统进化关系

在研究生物间的系统进化关系时, 最重要的途径是构建分子系统进化树。分子系统树就是在生物大分子进化速率相对恒定的理论上利用生物大分子间的序列差异或结构的比较而构建出来的, 可以很直观地揭示出不同生物的各类群间及种群间的系统进化关系(毕相东等, 2005)。利用核基因组序列 ITS1 差异性构建的分子系统树已经解决了很多物种间系统发生关系问题, 许志强等(2009)构建了蚌科 6 种类的系统发生关系, 为蚌科系统分类研究提供更多的信息。本文结合 GenBank 数据库中十足目的 5 属构建 NJ 分子进化树(图 1), 聚类结果显示, 同属的不同种各自聚支, 与形态学分类吻合。 *Eriocheir* 与 *Chionoecetes* 以 89% 的置信度聚为一支, 然后与 *Portunus* 聚为一支, *Paralithodes* 与 *Lithodes* 以 100% 的置信度聚为一支, 说明 *Eriocheir* 与 *Chionoecetes*、 *Paralithodes* 与 *Lithodes* 亲缘关系较近。

综上所述, 本研究的 4 个野生群体的遗传多样性还较丰富, 但近年来我国沿海开展了大规模的三疣梭子蟹人工养殖、半人工采苗、人工育苗等养殖活动, 增加了个体间的基因交流, 从三疣梭子蟹资源的可持续开发利用角度出发, 制定科学的保护措施, 建立有效的监控体系, 加强野生群体遗传多样性监测, 在人工养殖和育种过程中, 应该采取增大繁殖群体、定期筛选等措施来防止因近交衰退和遗传漂变等导致的遗传多样性水平降低, 以保护我国具有较高经济价值的三疣梭子蟹优良种质资源。

### 参 考 文 献

- 邓景耀, 康元德, 朱金声等, 1986. 渤海三疣梭子蟹的生物学. 甲壳动物学论文集. 北京: 科学出版社, 77—82
- 毕相东, 侯林, 刘晓惠等, 2005. 核糖体 RNA 基因在海洋动物分子系统学中的应用. 应用与环境生物学报, 11(6): 779—783
- 许志强, 葛家春, 李晓晖等, 2009. 基于 rDNA ITS 序列研究蚌科 6 种类的系统发生关系. 淡水渔业, 39(1): 16—20
- 孙少华, 桑润滋, 师守望等, 2000. 肉牛杂交优势预测评估及其应用研究. 遗传学报, 27(7): 580—589
- 李晓萍, 刘萍, 宋协法, 2011. 三疣梭子蟹微卫星富集文库

- 的构建与群体遗传分析. 中国水产科学, 18(1): 194—201
- 吴琪, 潘鹤婷, 潘宝平, 2007. 帘蛤科两种经济贝类种群的 ITS-1 序列遗传多样性分析. 天津师范大学学报, 27(1): 20—23
- 何毛贤, 黄良民, 2004. 长耳珠母贝核 rRNA 基因 ITS-2 序列分析. 热带海洋学报, 23(5): 81—84
- 宋春妮, 李健, 刘萍等, 2011. 日本蟳微卫星富集文库的建立与多态性标记的筛选. 水产学报, 35(1): 35—42
- 宋海棠, 丁耀平, 许源剑, 1989. 浙江近海三疣梭子蟹洄游分布和群体组成特征. 海洋通报, 8(1): 66—74
- 陈灵芝, 1993. 中国的生物多样性现状及其保护对策. 北京: 科学出版社, 1—9, 99—113, 210—212
- 俞海菁, 张亚平, 林飞棧等, 2000. 探讨 rDNA ITS 区作为果蝇 *Drosophila nasuta* 分子系统发育研究的价值. 遗传学报, 27(1): 18—25
- 施慧, 许文军, 徐汉祥等, 2008. 引起三疣梭子蟹“牛奶病”的酵母菌 18S rRNA 序列测定与分析. 海洋水产研究, 29(4): 34—38
- 施立明, 1990. 遗传多样性及其保存. 生物科学信息, (2): 158—164
- 姜志勇, 牛东红, 陈慧等, 2007. 福建缙蛭野生群体与养殖群体的 ITS-1 和 ITS-2 分析. 海洋渔业, 29(4): 314—318
- 凌去非, 李思发, 张海军等, 2006. 丁鲷不同群体 ITS1 区序列分析. 水利渔业, 26(6): 24—25
- 高保全, 刘萍, 李健等, 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
- 郭天慧, 孔晓瑜, 陈四清等, 2004. 三疣梭子蟹线粒体 DNA 16S 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
- 堵南山, 1993. 甲壳动物学(下). 北京: 科学出版社, 882—883
- 樊祥国, 高保全, 刘萍等, 2009. 三疣梭子蟹 4 个野生群体遗传差异的同工酶分析. 渔业科学进展, 30(4): 84—89
- 戴爱云, 杨思谅, 宋玉枝等, 1986. 中国海洋蟹类. 北京: 海洋出版社, 213—214
- Excoffier L, Laval G, Schneider S, 2005. Arlequin ver.3.01: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionar Bioinformatics Online, 1: 47—50
- Insua A, Lopez-Pinon Mj, Freire R *et al*, 2003. Sequence analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer region in some scallop species (Mollusca: Bivalvia: Pectinidae). Genome, 46(4): 595—604
- Kenehington E, Bird C J, Osborn J *et al*, 2002. Novel repeat elements in the nuclear ribosomal RNA operon of the flat oysters *Ostrea edulis* C Linnaeus and *O. angasi* Sowerby. Shell Research, 21: 697—705
- King T L, Eakles M S, Gjetvaj B *et al*, 1999. Intraspecific phylogeography of *Lasmigona subviridis* (Bivalvia: Unionidae): conservation implications of range discontinuity. Molecular Ecology, 8(12): S65—S78
- Kinght A, Mindell D P, 1993. Substitution bias, weighting of DNA sequence evolution, and the phylogenetic positions of Fea's viper. Systematic Biology, 42(1): 18—31
- Rodriguez T F, Tarrío R, Ayala F J, 2000. Evidence for a high ancestral GC content in *Drosophila*. Molecular Biology and Evolution, 17(2): 1710—1717
- Schilthuisen M, Gittenberger E, Gulyaev A P, 1995. Phylogenetic relationships inferred from the sequence and secondary structure of ITS1 rRNA in *Albinaria* and putative *Isabellaria* species (Gastropoda, Pulmonata, Clausiliidae). Mol Phylogenet Evol, 4(4): 457—462

## THE GENETIC DIVERSITY AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF ITS1 IN MITOCHONDRIAL DNA OF FOUR POPULATIONS OF *PORTUNUS TRITUBERCULATUS*

LI Yuan-Ning<sup>1,2</sup>, MA Peng<sup>2</sup>, LIU Ping<sup>2</sup>, LI Qi<sup>1</sup>

(1. Ocean University of China, Qingdao, 266003; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, 266071)

**Abstract** The ribosomal DNA internal transcribed spacer 1 (ITS1) of four wild populations of *Portunus trituberculatus* was cloned and sequenced. 515—571bp ITS1 fragments were obtained. 56 polymorphic sites were detected. The proportion of polymorphic sites was 9.5%, in which parsimony informative sites were up to 25, 40 haplotypes were identified from 60 samples. Haplotype diversity, nucleotide diversity, average number of nucleotide differences and average number of nucleotide substitutions per site were calculated to analyze and compared. The results showed that the colonies from the Zhoushan had highest levels of genetic diversity, followed by Yalu River estuary and Haizhou Bay, Laizhou Bay is the lowest. 5 kinds of microsatellites were found in *P. trituberculatus*. AMOVA analysis results show that the four groups showed significant genetic differences. The molecular phylogenetic tree constructed with NJ method using software MEGA 4.0 to study several species of the Decapoda molecular phylogeny. According to the NJ tree, different species of the same genera were grouped together, in consistence with the morphological taxonomy.

**Key words** *Portunus trituberculatus*, ITS1, Genetics diversity, Phylogenetic