

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2015.14503

浙闽沿海葡萄牙牡蛎群体遗传结构及种群历史分析

李双, 李琪, 于红, 孔令锋

中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003

摘要: 利用线粒体细胞色素氧化酶亚基因(mt *CO I*)对浙闽沿岸 5 个葡萄牙牡蛎(*Crassostrea angulata*)自然群体的遗传结构及其种群历史进行分析。结果表明, 葡萄牙牡蛎群体的遗传多样性处于较高水平, 在 183 条序列中检测到 44 个多态性位点, 共定义了 39 个单倍型; 平均单倍型多样度和平均核苷酸多样性分别为 0.8524 和 0.00406, 平均核苷酸差异数在不同群体内差异较小。AMOVA 分析显示, 绝大多数的遗传变异都来自于群体内个体间(91.94%), 组间和组内群体间均不存在明显的遗传分化。两两群体间的 ϕ_{ST} 值较低(−0.01193~0.11486), 但宁德群体与其他群体间出现了显著的低程度遗传差异。单倍型网络关系图整体上呈星状拓扑结构, 不同地理来源的单倍型无明显分支。贝叶斯系统发生树上, 各单倍型交错分布, 没有表现出明显的地理分化。中性检验和错配分析均表明葡萄牙牡蛎群体经历了历史扩张, 扩张时间在更新世末期的 25 万到 21 万年前。

关键词: 葡萄牙牡蛎; 线粒体 *CO I*; 遗传多样性; 种群结构; 历史动态

中图分类号: S96

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2015)06-1260-10

更新世的气候变化被认为是影响海洋生物遗传多样性和种群结构的主要历史事件^[1]。冰期海平面波动产生的气候震荡导致西北太平洋边缘海的结构和面积发生显著改变^[2], 许多物种的分布范围和数量经历反复的收缩和扩张, 这对物种的遗传多样性分布和遗传格局产生了极大的影响^[3-4]。东海(包括渤海和黄海)是西北太平洋最大的边缘海, 深受历史冰期的影响。冰期海平面下降时, 东海面积缩小, 仅为现在的 1/3, 物种聚集到了冲绳海槽。间冰期时, 东海与其他边缘海得以再次连接, 孑遗的物种随着海平面的升高而扩散到新的栖息地, 从而形成新的遗传格局。东海作为一个较浅的边缘海, 是研究冰后期种群遗传分化的理想场所。

浙江和福建两省濒临东海, 拥有曲折的海岸线、众多的港湾岛屿和环流, 为物种的局部分化提供了可能。浙闽沿岸有终年北上的中国台湾暖

流(黑潮的支流), 季节性的中国沿岸流(夏季北流, 冬季南流)和中国长江冲淡水(冬季顺浙江沿岸南下, 入春后向东北转向)^[5]。浮游幼虫在海流的推动下扩散, 可促进不同地理群体间的基因交流, 使具有浮游期的物种常在不同地理群体间表现出遗传均质性^[6-7]。

葡萄牙牡蛎(*Crassostrea angulata*)属于软体动物门(Mollusca), 双壳纲(Bivalvia), 珍珠贝目(Pterioidea), 牡蛎科(Ostreidae), 巨蛎属, 自然分布于中国长江以南的潮间带地区, 尤以浙江和福建沿海最常见, 为当地的优势牡蛎种^[8], 是研究海洋生物遗传格局成因的理想材料。此外, 中国沿海养殖的牡蛎有相当一部分苗种来源于自然海区的天然苗, 因此充分认识其种群的遗传多样性水平和遗传结构对于保护及可持续利用葡萄牙牡蛎种质资源具有重要意义。本研究利用线粒体 DNA(mt DNA)细胞色素氧化酶亚基因(*CO I*)片段

收稿日期: 2014-12-08; 修订日期: 2015-01-27.

基金项目: 国家 863 计划项目(2012AA10A405-6); 国家自然科学基金项目(41276138); 山东省自主创新专项(2013CXC80202).

作者简介: 李双(1989-), 女, 硕士研究生, 专业方向为水产动物遗传育种. E-mail: shellfishli1989@gmail.com

通信作者: 李琪, 教授. E-mail: qili66@ouc.edu.cn

分析浙闽沿海 5 个葡萄牙牡蛎野生群体的遗传结构与种群历史,旨在为其种质资源保护与合理利用提供基础资料。

1 材料与方 法

1.1 样品的采集与保存

实验样品采自 2004 年 1 月至 2013 年 7 月, 包含 5 个群体, 每个群体采集 29~43 个个体, 共计 183 个实验样品 (图 1 和表 1)。活体样品运回实验室后立即将其闭壳肌剥离, 并置于-80℃ 超低温

冰箱保存。

1.2 DNA 的分离、物种鉴定和序列测定

取闭壳肌约 100 mg, 据苯酚-氯仿抽提法提取基因组 DNA^[9]。用紫外分光光度计测定 DNA 含量, 并用 1%琼脂糖凝胶电泳检测其纯度, 随后将其稀释到 100 ng/μL, 保存于 4℃ 冰箱备用。由于牡蛎的广栖性和贝壳可塑性, 基于形态的分类较为困难, 因此实验牡蛎均用分子手段进行鉴定^[10]。利用通用引物 LCO-1490 和 HCO-2198^[11]扩增线粒体 *COI* 基因的部分片段。PCR 反应体系总体积

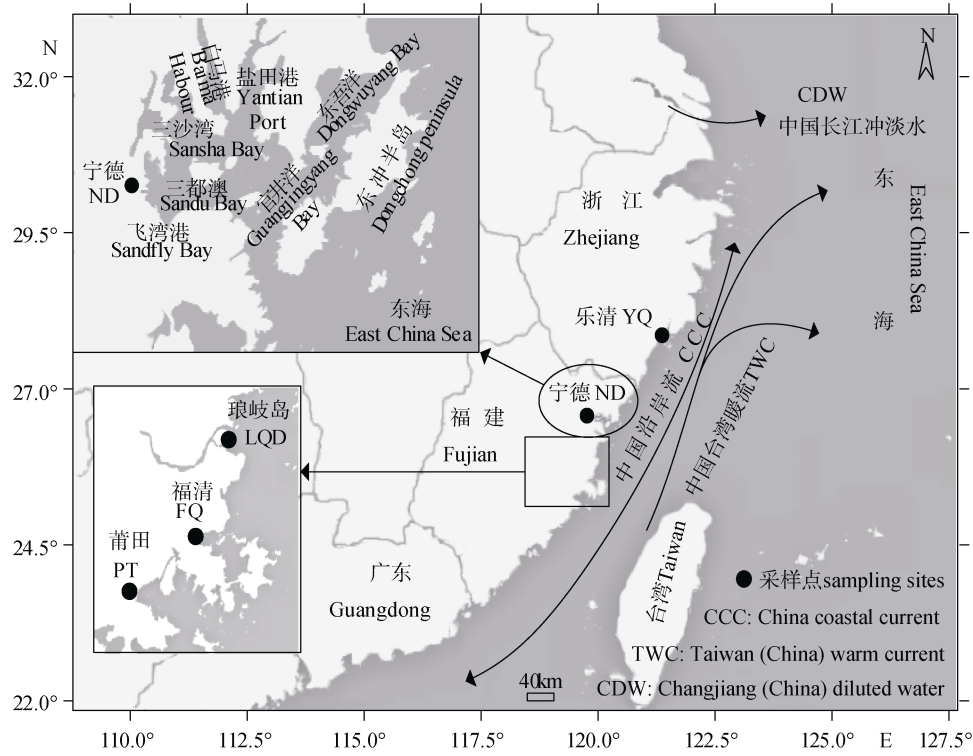


图 1 葡萄牙牡蛎的取样位置以及浙闽沿岸的主要海流

采样点: FQ-福清, LQD-琅岐岛, ND-宁德, PT-莆田, YQ-乐清.

Fig. 1 Sampling sites of *Crassostrea angulata* and main ocean currents in the coast of Zhejiang and Fujian provinces
Sampling sites: FQ-Fuqing, LQD-Langqidao, ND-Ningde, PT-Putian, YQ-Yueqing.

表 1 葡萄牙牡蛎的基本信息
Tab. 1 Basic information of *Crassostrea angulata*

采样地 sampling site	采样时间 sampling time	个体数 individual number	采集地经纬度 longitude and latitude
1 乐清(YQ)	2009.12	43	E 121.006°N28.085°
2 宁德(ND)	2013.07	39	E 119.553°N 26.665°
3 琅岐岛(LQD)	2013.02	39	E 119.586°N 26.083°
4 福清(FQ)	2005.11	29	E 119.472°N 25.669°
5 莆田(PT)	2004.01	33	E 119.106°N 25.420°

为 30 μL , 内含模板 DNA 100 ng, 10 $\times$ PCR buffer 3 μL , MgCl_2 2.0 mmol/L, dNTPs 25 mmol/L, 正反引物(F/R)各 10 $\mu\text{mol/L}$ 以及 *Taq* DNA 聚合酶 (TaKaRa) 1.5 U。反应条件为: 94 $^\circ\text{C}$ 预变性 3 min 后进行 35 个循环(94 $^\circ\text{C}$ 45 s, 52 $^\circ\text{C}$ 45 s, 72 $^\circ\text{C}$ 45 s), 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 扩增产物经过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 用 EB 染色后在凝胶成像系统上拍照记录。PCR 产物的纯化和测序工作由深圳华大基因科技服务有限公司完成, 纯化产物在 ABI 3730 XM 自动测序仪上进行双向测序。

1.3 数据分析

1.3.1 序列分析 用 DNASTAR 对初始序列进行拼接、组合、编辑, 然后利用软件 MEGA 5.0^[12] 中的 CLUSTAL W 程序在默认设置下进行比对, 并人工校正以检查结果的可靠性。通过 BLAST 在线分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)证实比对后的序列确为葡萄牙牡蛎的 *COI* 基因片段。用 DnaSP V5^[13] 统计群体的总单倍型数和总多态位点数。用 Arlequin 3.5^[14] 计算每个群体的单倍型数目(H)、多态位点数(s)、单倍型多样性(h)、核苷酸多样性(π)以及两两序列比对平均核苷酸差异数(k)。将本实验中得到的所有单倍型都提交到 GenBank 数据库(*COI* 登录号: KP216768~KP216806)。利用 jModelTest^[15] 软件中的赤池信息准则(Akaike information criterion)确定线粒体 *COI* 的核苷酸最佳进化模型。

1.3.2 群体遗传结构和系统发生分析 为推断葡萄牙牡蛎的遗传结构, 按照采样地的地理结构特点(图 1), 将所有群体分为 2 组。利用分子方差分析(Analysis of Molecular Variance, AMOVA)^[16] 评估群体分组合理性以及遗传变异的来源, 通过 1000 次重抽样来检验不同遗传结构水平上(组间 Φ_{CT} , 组内群体间 Φ_{SC} , 群体内个体间 Φ_{ST})的协方差的显著性。

在 Tamura-Nei 模型下, 计算 Φ_{ST} 值以评估两两群体的遗传差异, 并通过 1000 次重抽样来检验 Φ_{ST} 值的显著性, 并对多重检验进行班费罗尼校正^[17]。另外, 用 IBDWS(Isolation by Distance; IBD)^[18] 在线软件进行 Mantel 检测, 评估葡萄牙牡蛎群体的遗传距离和地理距离的相关性, 关联的

显著性用 10000 次重抽样检测。构建贝叶斯系统发生树, 以确定单倍型间的进化关系。在 MrBayes 3.1.2^[19] 软件中, 利用 jModelTest 筛选出的 HKY + G 模型构建贝叶斯树, 运行 4 个马尔科夫链, 共 10^7 代, 每 1000 代抽样, 将老化值(burnin)设为 200 万代, 剩余的代数用来构建 50% 一致树。使用 TCS 1.21^[20] 软件, 在 95% 简约统计水平下构建单倍型网络关系图。

1.3.3 群体历史动态分析 采用两种常用方法来检测葡萄牙牡蛎的群体历史动态。首先, 根据 Tajima's D ^[21] 检验和 Fu's F_s ^[22] 检验的统计值来判断中性假说是否成立。若二者是负值且显著偏离中性($P < 0.05$), 则可能是由于群体发生扩张引起的。其次, 核苷酸不配对分布(Mismatch Distribution)分析用来检验是否经历群体扩张。在平衡群体中, 核苷酸不配对分布分析通常呈多峰分布, 但在经历过近期群体扩张的群体中常呈现明显的单峰分布。采用广义非线性最小方差法(general non-linear least-squares)计算扩张参数 τ , 利用公式 $t = \tau / 2\mu k$ 将其转化为实际的扩张时间, 其中 τ 是突然扩张模型下的参数, μ 是所研究的整个序列长度的突变速率, t 是自群体扩张开始到现在的时间。上述分析以及显著性的统计都在 Arlequin 3.5 中完成。由于缺乏明确的化石记录, 且不同类群和标记的分子钟进化速率不一, 本研究参考其他贝类的线粒体 *COI* 进化速率, 采用 2% 每百万年至 2.4% 每百万年的演化速率, 估算一个保守的扩张时间范围。

2 结果与分析

2.1 *COI* 序列的多样性分析

5 个群体共 183 个葡萄牙牡蛎个体线粒体 *COI* 片段长度为 654 bp。共检测到 44 个多态性位点, 其中转换位点 33 个, 颠换位点 10 个, 无插入或缺失现象, 共定义了 39 个单倍型(图 2)。群体间具 10 个共享单倍型, H.2、H.3、H.4 和 H.10 分布于所有群体中, 以 H.2 的数目最多(52/183), H.10 次之。此外, H.5 和 H.9 也以较多的数目为 4 个群体所共有。在 29 个私有单倍型中, 除 H.39

外, 其余均为某个群体中的一个个体所特有。

样本的遗传多样性指数见表 2。每个群体的多态位点数为 10 到 22 个, 各群体所拥有的单倍型数目为 8 到 18 个。所分析的 5 个群体均享有较高的单倍型多样性($\bar{h}=0.8524$)和中等水平的核苷酸多样性($\bar{\pi}=0.00406$)。平均核苷酸差异在不同群体

体内差别较小, 最高在 ND 群体($k=3.188619$), 最低在 YQ 群体($k=2.2806100$)。

2.2 葡萄牙牡蛎群体的遗传结构特征

AMOVA 分析结果(表 3)显示, 葡萄牙牡蛎群体间无显著的遗传分化, 绝大多数的遗传变异都来自于群体内个体间, 且统计值显著(为 91.94%, $P=$

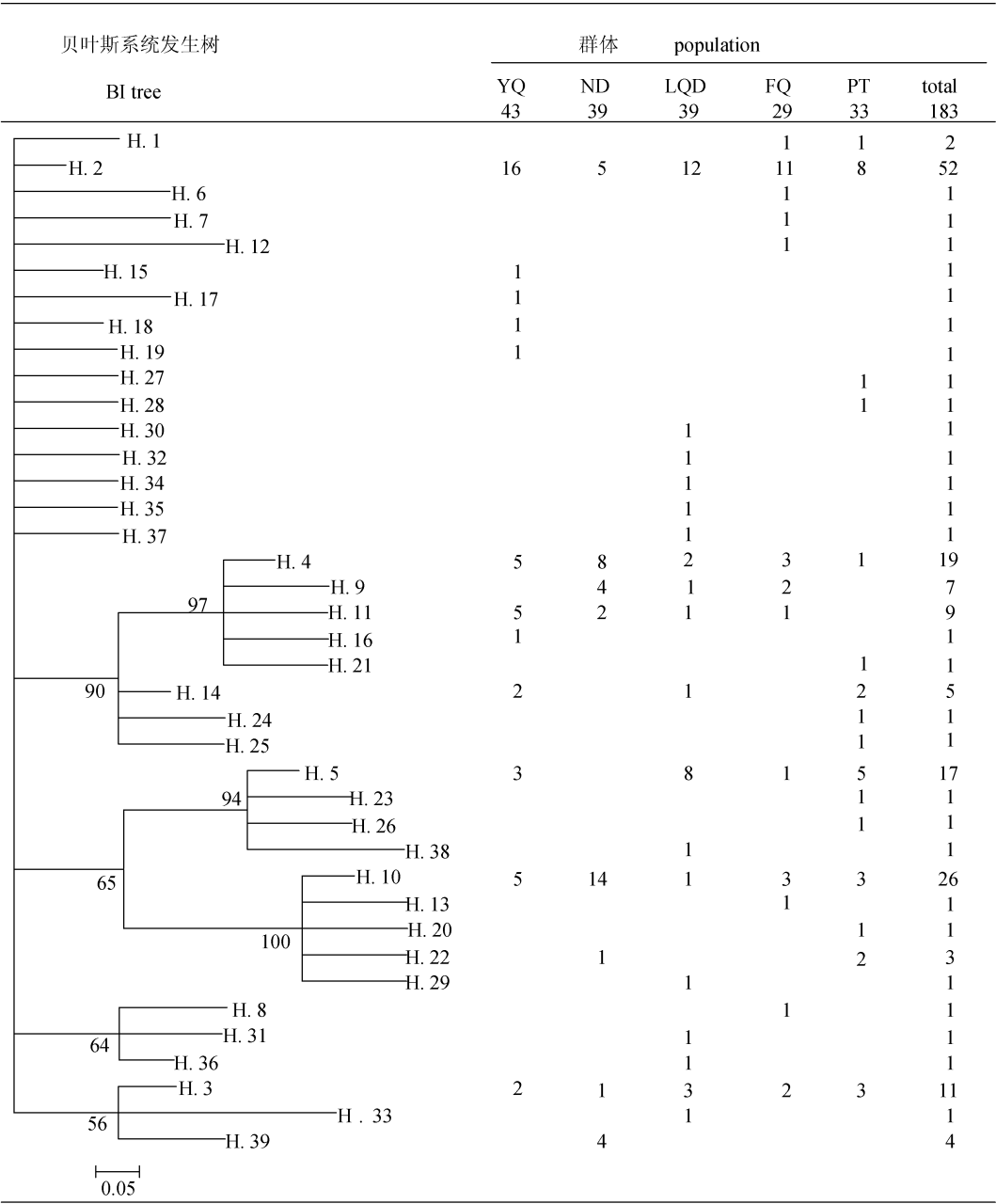


图 2 葡萄牙牡蛎 39 种单倍型在 5 个群体中的分布及其分子系统树

节点数字表示大于 50% 的 bootstrap 支持率。

Fig. 2 Distribution of 39 haplotypes among 5 *Crassostrea angulata* populations and its BI molecular tree

Numbers at nodes indicate bootstrap values greater than 50% with 1000 replications.

表 2 葡萄牙牡蛎各群体 COI 基因的遗传多样性参数和中性检验值

Tab. 2 Genetic diversity indices and the values of neutral tests for each *Crassostrea angulata* population inferred from mt COI

群体 population	s	H	h	π	k	Tajima's D	Fu's F_s
YQ	14	12	0.8283±0.0450	0.003487±0.002167	2.280600±1.276427	-0.93365	-3.46237
ND	10	8	0.8084±0.0406	0.004876±0.002861	3.188619±1.684291	1.00794	0.78940
LQD	22	18	0.8677±0.0406	0.003707±0.002282	2.424381±1.343549	-1.80542*	-11.33926*
FQ	20	13	0.8448±0.0595	0.004054±0.002478	2.651374±1.456007	-1.69571*	-5.21342*
PT	17	16	0.9129±0.0314	0.004170±0.002525	2.727299±1.484878	-1.18699	-8.31958*

注: s 为多态位点数; H 为单倍型数目; h 为单倍型多样性; π 为核苷酸多样性; k 为两两序列核苷酸差异数; Tajima's D 和 Fu's F_s 均为中性检验值; “*”代表显著偏离中性($P<0.05$).

Note: s denotes number of polymorphism sites per locality; H denotes number of haplotype per locality; h denotes haplotype diversity; π denotes nucleotide diversity; k denotes mean number of pairwise differences. Tajima's D and Fu's F_s denote two values of neutral tests. “*” indicates significant Tajima's D and Fu's F_s values ($P<0.05$).

表 3 葡萄牙牡蛎 5 个群体的 COI 序列 AMOVA 分析

Tab. 3 AMOVA analysis of sequences from all five *Crassostrea angulata* populations of mt COI fragment

分组 group	变异来源 source of variation	自由度 df	方差组分 variance component	变异百分比/% variation percentage	Φ	P
(宁德) & (乐清, 福州, 福清, 莆田) (ND) & (YQ, FZ, FQ, PT)	组间					
	among groups	1	0.09940 V_a	6.91	$\Phi_{CT}=0.06913$	0.20188
	组内群体间					
	among populations within groups	3	0.01651 V_b	1.15	$\Phi_{SC}=0.01234$	0.06891
	群体内个体间					
	within groups	178	1.32189 V_c	91.94	$\Phi_{ST}=0.08062$	0.00030*

注: Φ_{CT} 为组间遗传分化指数; Φ_{SC} 为组内群体间遗传分化指数; Φ_{ST} 为群体内遗传分化指数; “*”表示统计值显著($P<0.05$).

Note: Φ_{CT} denotes fixation index among groups; Φ_{SC} denotes fixation index among populations within groups; Φ_{ST} denotes fixation index within groups; “*” indicates statistically significant ($P<0.05$).

0.0003), 少部分来自于组间(6.91%, $P = 0.20188$), 组内群体间的变异只占 1.15% ($P = 0.06891$)。两两群体间的 Φ_{ST} 值为-0.01193~0.11486 (表 4), ND 群体与其他群体间存在显著的低程度遗传分化 ($P<0.05$), YQ 和 PT 的比较值也存在显著差异。群体的 IBD 分析(图 3)未发现显著的距离遗传模式 ($r = -0.137$, $P = 0.627$)。

葡萄牙牡蛎的单倍型网络关系大体上呈“星状”拓扑结构(图 4)。H.2 拷贝数最多, 位于单倍

型网络图的中间, 被外围的低频单倍型连接, 它们之间的碱基差异数少于 5 个。不同群体的单倍型无明显的地理分支, 呈交错分布, 没有表现出显著的地理系谱结构。单倍型的贝叶斯系统发生树(图 2)也没有表现出明显的分化谱系, 4 个小分支也并没有与地理分布相对应, 表明葡萄牙牡蛎群体并未分化成明显的地理谱系。

2.3 群体历史动态分析

中性检验中, 至少有一个检验值显著偏离中

表 4 基于 mt COI 的葡萄牙牡蛎群体成对 Φ_{ST} 值

Tab. 4 Pairwise Φ_{ST} among five populations of *Crassostrea angulata* based-on mt COI

群体 population	YQ	ND	FZ	FQ
ND	0.05829*			
FZ	0.02653	0.11486*		
FQ	-0.01193	0.05004*	0.00178	
PT	0.03524*	0.06311*	0.00175	0.01796

注: “*”表示统计值显著($P<0.05$).

Note: “*” indicates statistically significant ($P<0.05$).

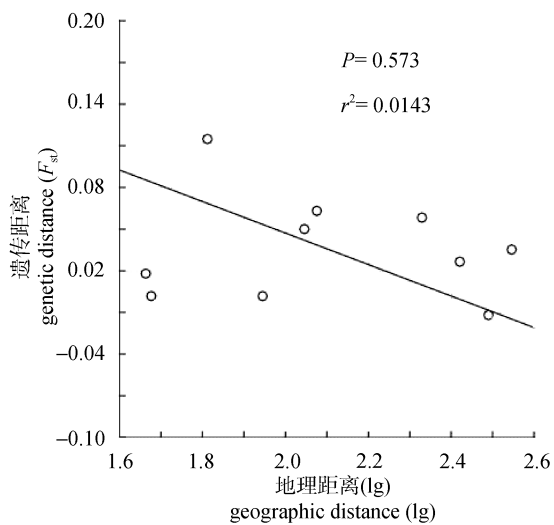


图 3 葡萄牙牡蛎的 IBD 分析

Fig. 3 Isolation by distance plots for *Crassostrea angulata*

性(为负值, 且 $P<0.05$)则表明群体在中性条件下经历了扩张事件。结果表明, 除 YQ 和 ND 群体外, 其他 3 个群体都经历了历史扩张(表 2)。核苷

酸不配对分布分析的观测值呈单峰分布(图 5), 与突然扩张模型的预期分布相吻合。利用突然扩张模型下的参数 τ 值($\tau = 3.299$), 估算葡萄牙牡蛎群体的扩张时间为 25 万到 21 万年前。

3 讨论

3.1 遗传多样性

遗传多样性是评价、合理开发和利用自然生物资源的一个重要依据。同时, 了解物种的遗传多样性可为遗传资源的保存、遗传育种和改良实践提供理论参考。遗传多样性的降低, 暗示了物种对不良环境的适应力在下降, 这将会对野外复杂环境下群体的生存构成极大威胁^[23]。

葡萄牙牡蛎自然群体的 *COI* 分析在国内尚未见报道, 本实验利用线粒体 *COI* 序列分析了中国福建和浙江沿海 5 个地理群体的遗传多样性, 在一定程度上揭示了葡萄牙牡蛎野生群体在东海海域的种质资源状况。多种海洋无脊椎动物常表现出“高

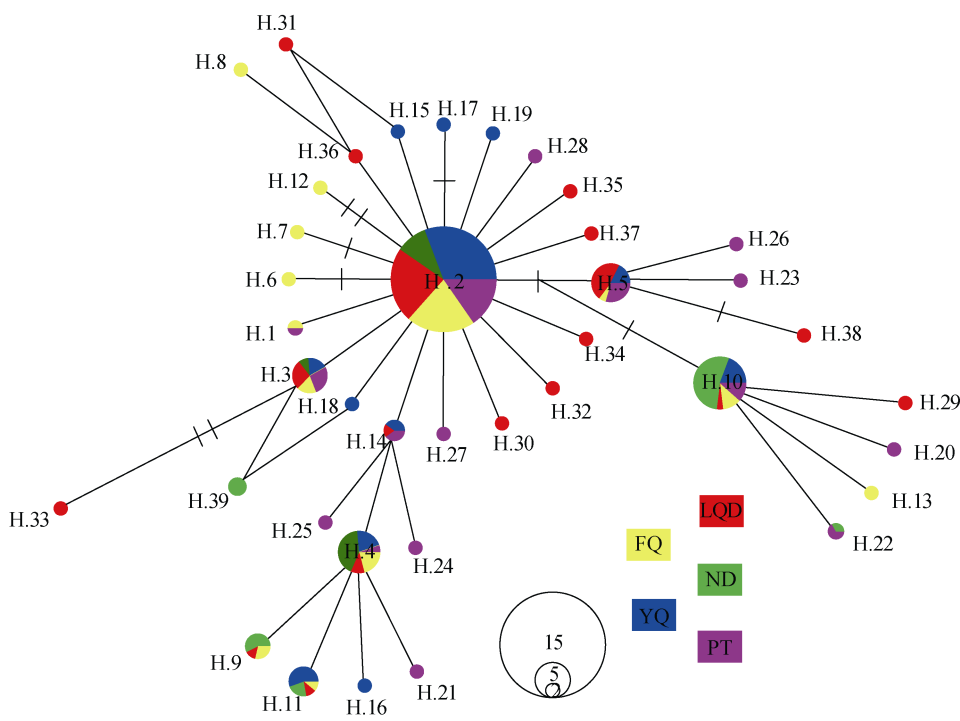


图 4 葡萄牙牡蛎 39 个单倍型的网络关系图

不同的颜色代表不同的群体, 圆圈的大小代表单倍型的频率, 连接线上的短竖线表示单倍型间的碱基差异数。

Fig. 4 Haplotype network for the 46 haplotypes of *Crassostrea angulata*

Different populations were marked by distinctive colors. Each circle corresponds to a unique haplotype sized in proportion to its frequency. The number of substitutions separating two haplotypes were indicated by the vertical bars on the line.

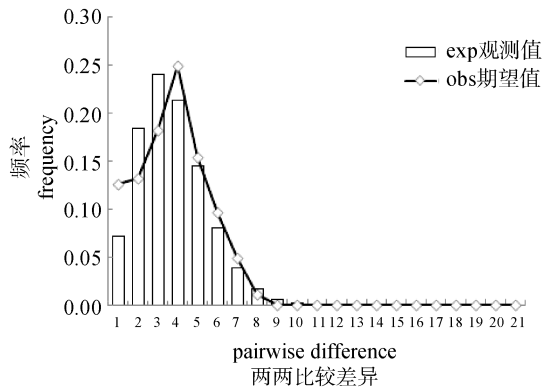


图 5 5 个葡萄牙牡蛎群体的 *CO I* 基因核苷酸错配分布
Fig. 5 Observed pairwise sequence differences and the expected mismatch distributions under the model of population expansion on the *CO I* gene haplotypes for the five *Crassostrea angulata* populations

h , 低 π ”的遗传多样性模式, 如剑明虾(*Parapenaeopsis hardwickii*)^[24]、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)^[25]、拟穴青蟹(*Scylla paramamosian*)^[26]和香港巨牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)^[27]等, 这一模式可能源于该类生物具有较大的母系有效种群^[28], 本研究中葡萄牙牡蛎的遗传多样性模式在一定程度上与该模式相吻合。但在所研究的巨砾属牡蛎中, 就 *CO I* 数据表现出的平均单倍型多样性($\bar{h}$)和平均核苷酸多样性($\bar{\pi}$)而言, 香港巨牡蛎($\bar{h}=0.814$, $\bar{\pi}=0.00236$)^[27]和长牡蛎(*Crassostrea gigas*)($\bar{h}=0.457$, $\bar{\pi}=0.00097$)(待发表)的这两个指标均低于葡萄牙牡蛎的($\bar{h}=0.8524$, $\bar{\pi}=0.00406$)。尽管采样的时间跨度相差近 10 年, 各群体的分子多样性指标均无明显差异, 表明人工养殖对葡萄牙牡蛎遗传多样性的影响并不十分显著, 东海的 5 个葡萄牙牡蛎群体的遗传多样性仍处于较高水平。

3.2 种群遗传结构

由 AMOVA 分析结果可知, 葡萄牙牡蛎群体间并没有形成显著的遗传结构。两两群体间的 Φ_{ST} 值较低, 仅 ND 群体与其他群体具有低程度的遗传分化。从单倍型网络关系图和贝叶斯系统树也可看出, 5 个地理群体的个体杂居分布, 没有形成明显的地理分支, 这也暗示了群体间遗传分化水平低, 各群体间仍保持较频繁的基因交流。

3.2.1 幼体自然扩散和海流作用 许多海洋无脊椎动物种群数量大且具有一段浮游生活阶段, 浮

游幼虫经过海流的被动扩散, 在不同地理群体间产生基因交流, 通常认为该类型的物种即使在较大空间尺度上也不易形成显著的遗传结构^[29], 该观点在中国东海和黄海种群中得到了很好的验证^[30-32]。在浙闽沿海葡萄牙牡蛎每年多个繁殖高峰, 具有 2 到 3 周不等的浮游生活期, 这样的生活史特征大大的增加了海区间卵和幼体交流的机会。此外, 浙闽沿海存在终年北上的中国台湾暖流(黑潮的支流)和季节性的中国沿岸流以及中国长江冲淡水^[5], 海流推动卵和幼体的扩散, 从而保持群体间的基因交流。对于成体固着生活的葡萄牙牡蛎来说, 较长的浮游期以及幼体在海流作用下的自然扩散很可能是该群体没有显著遗传结构的原因。

3.2.2 海湾岛屿对种群分化的影响 本研究中的葡萄牙牡蛎整体上并未表现出显著的遗传结构, 但 ND 群体与其他群体间出现了显著的低程度分化。考虑到 ND 所处的地理位置特点, 推测这可能是造成 ND 群体与其他群体产生遗传差异的原因。福建沿海多港湾、半岛和岛礁, 海岸线曲折, 而宁德地处福建东北沿岸, 为众多港湾和岛屿所环绕(图 1), 与其他采样地相比, 更具“半封闭”性。这些独特的港湾和岛屿可能在局部范围内阻碍了葡萄牙牡蛎卵和幼虫的扩散, 从而在一定程度上抑制了该地理种群与其他种群之间的基因交流。海湾和岛屿阻碍幼虫扩散从而导致显著遗传分化的研究在渤海湾和黄海海域的双壳贝类中已有报道^[33-34]。当然, 阐明该海区的海湾和岛屿对分布于其中的物种的遗传结构的影响机制, 还需要研究更多同域分布的物种。

3.3 种群动态

到目前为止, 没有关于中国沿海葡萄牙牡蛎群体历史动态的报道。Tajima's D 和 $F_u F_s$ 中性检验的结果显示葡萄牙牡蛎群体经历了群体扩张事件, 核苷酸不配对分析呈单峰分布也支持这个结论。本研究结果揭示葡萄牙牡蛎群体扩张事件发生在 25 万到 21 万年前, 与第四纪晚期的第 3 次间冰期相对应。东海是西北太平洋的一个边缘海, 深受第四纪晚期冰期-间冰期的影响。大量的遗传证据表明, 在冰期海平面下降时, 东海子遗的物

种集中到了冲绳海槽,从而形成了均匀、随机交配的祖先群体。葡萄牙牡蛎的单倍型网络关系图大体上为“星状”连接,序列差异小,系统发生树没有分化显著的谱系,符合同一祖先起源的假说。因此,本研究中的葡萄牙牡蛎可能起源于东海避难所的祖先群体,并在冰后期发生了种群的扩张。

综上所述,通过对 5 个葡萄牙牡蛎自然群体的线粒体 *COI* 片段的分析,查明浙江和福建沿海葡萄牙牡蛎仍保持较高的遗传多样性水平;葡萄牙牡蛎在该区域内没有形成明显的种群遗传结构,但宁德群体出现了低程度的遗传分化;葡萄牙牡蛎在更新世末期经历了种群扩张,时间与第 3 次间冰期开始的时间吻合,推测所研究的牡蛎均起源于东海避难所的同时祖先群体。

参考文献:

- [1] Near T J, Page L M, Mayden R L. Intraspecific phylogeography of *Percina evides* (Percidae: Etheostominae): an additional test of the Central Highlands pre-Pleistocene vicariance hypothesis[J]. *Mol Ecol*, 2001, 10(9): 2235–2240.
- [2] Wang P X. Response of Western Pacific marginal seas to glacial cycles: paleoceanographic and sedimentological features[J]. *Mar Geol*, 1999, 156(1–4): 5–39.
- [3] Avise J C. Phylogeography: the History and Formation of Species[M]. Cambridge: Harvard University Press, 2000.
- [4] Hewitt G. The genetic legacy of the Quaternary ice ages[J]. *Nature*, 2000, 405: 907–913.
- [5] Su J L, Yuan Y L. Coastal Hydrology in China[M]. Beijing: China Ocean Press, 2005: 367. [苏纪兰, 袁业立. 中国近海水文[M]. 北京: 海洋出版社, 2005: 367.]
- [6] Sponaugle S, Cowen R K, Shanks A, et al. Predicting self-recruitment in marine populations: Biophysical correlates and mechanisms[J]. *Bull Mar Sci*, 2002, 70(Supplement 1): 341–375.
- [7] Lee H J E, Boulding E G. Spatial and temporal population genetic structure of four northeastern Pacific littorinid gastropods: the effect of mode of larval development on variation at one mitochondrial and two nuclear DNA markers[J]. *Mol Ecol*, 2009, 18(10): 2165–2184.
- [8] Du X, Guo X M, Qian L M. Distribution of *Crassostrea* oysters in coastal sea of Fujian[J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2009(3): 399–404. [杜玄, 郭希明, 钱鲁闽. 福建沿海巨蚶属牡蛎的主要种类及其分布[J]. 台湾海峡, 2009(3): 399–404.]
- [9] Li Q, Park C, Kijima A. Isolation and characterization of microsatellite loci in the Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*[J]. *J Shellfish Res*, 2002, 21(2): 811–815.
- [10] Wang H Y, Guo X M. Identification of *Crassostrea ariakensis* and related oysters by multiplex species-specific PCR[J]. *J Shellfish Res*, 2008, 27(3): 481–487.
- [11] Folmer O, Black M, Hoeh W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates[J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1994, 3(5): 294–299.
- [12] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Mol Biol Evol*, 2011, 28(10): 2731–2739.
- [13] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1451–1452.
- [14] Excoffier L, Lischer H E L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows[J]. *Mol Ecol Resour*, 2010, 10(3): 564–567.
- [15] Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging[J]. *Mol Biol Evol*, 2008, 25(7): 1253–1256.
- [16] Excoffier L, Smouse P E, Quattro J M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data[J]. *Genetics*, 1992, 131(2): 479–491.
- [17] Rice W R. Analyzing tables of statistical tests[J]. *Evolution*, 1989, 43(1): 223–225.
- [18] Jensen J L, Bohonak A J, Kelley S T. Isolation by distance, web service[J]. *BMC Genet*, 2005, 6: 13.
- [19] Ronquist F, Huelsenbeck J P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models[J]. *Bioinformatics*, 2003, 19(12): 1572–1574.
- [20] Clement M, Posada D, Crandall K A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies[J]. *Mol Ecol*, 2000, 9(10): 1657–1659.
- [21] Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism[J]. *Genetics*, 1989, 123(3): 585–595.
- [22] Fu Y X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection[J]. *Genetics*, 1997, 147(2): 915–925.
- [23] Frankham R. Conservation genetics[J]. *Annu Rev Genet*, 1995, 29: 305–327.

- [24] Tzeng T D. Population structure of the sword prawn (*Parapenaeopsis hardwickii*) (Decapoda: *Penaeidae*) in the East China Sea and waters adjacent to Taiwan inferred from the mitochondrial control region[J]. *Zool Stud*, 2007, 46(5): 561–568.
- [25] Liu Y, Liu R L, Ye L C, et al. Genetic differentiation between populations of swimming crab *Portunus trituberculatus* along the coastal waters of the East China Sea[J]. *Hydrobiologia*, 2009, 618(1): 125–137.
- [26] Lu X P, Ma L B, Qiao Z G, et al. Population genetic structure of *Scylla paramamosain* from the coast of the South-eastern China based on mtDNA CO I sequences[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2009, 33(1): 15–23. [路心平, 马凌波, 乔振国, 等. 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[J]. *水产学报*, 2009, 33(1): 15–23.]
- [27] Li L, Wu X Y, Yu Z N. Genetic diversity and substantial population differentiation in *Crassostrea hongkongensis* revealed by mitochondrial DNA[J]. *Mar Genom*, 2013, 11: 31–37.
- [28] Lavery S, Moritz C, Fielder D. Indo-Pacific population structure and evolutionary history of the coconut crab *Birgus latro*[J]. *Mol Ecol*, 1996, 5(4): 557–570.
- [29] Palumbi S R. Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation[J]. *Annu Rev Ecol Syst*, 1994(25): 547–572.
- [30] Yang J M, Li Q, Zheng X D, et al. Genetic diversity in populations of *Rapana venosa* in coastal waters of China[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2008, 39(3): 257–262. [杨建敏, 李琪, 郑小东, 等. 中国沿海脉红螺(*Rapana venosa*)自然群体线粒体 DNA 16S rRNA 遗传特性研究[J]. *海洋与湖沼*, 2008, 39(3): 257–262.]
- [31] Li Y L, Kong X Y, Yu Z N, et al. Genetic diversity and historical demography of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* in Yellow Sea and Bohai Sea based on mitochondrial DNA analysis[J]. *Afr J Biotechnol*, 2009, 8(7): 1193–1202.
- [32] Xue D X, Wang H Y, Zhang T, et al. Population genetic structure and demographic history of *Atrina pectinata* based on mitochondrial DNA and microsatellite markers[J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(5): e95436.
- [33] Zhan A B, Hu J J, Hu X L, et al. Fine-scale population genetic structure of Zhikong scallop (*Chlamys farreri*): do local marine currents drive geographical differentiation?[J]. *Mar Biotechnol*, 2009, 11(2): 223–235.
- [34] Ni L H, Li Q, Kong L F. Microsatellites reveal fine-scale genetic structure of the Chinese surf clam *Macrura chinensis* (Mollusca, Bivalvia, Mactridae) in Northern China[J]. *Mar Ecol*, 2011, 32(4): 488–497.

Genetic structure and population history of *Crassostrea angulata* from the coast of Zhejiang and Fujian Provinces

LI Shuang, LI Qi, YU Hong, KONG Lingfeng

Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education; Ocean University of China, Qingdao 266003, China

Abstract: The Portuguese oyster, *Crassostrea angulata*, is one of the most important shellfish species in China and occurs mainly in the intertidal zone of the south Yangtze River. It is widely cultured in Zhejiang and Fujian provinces and many of its seeds are collected from natural areas. Molecular genetic data can provide valuable insights into *C. angulata* management and conservation. In the present study, we investigated the population genetic structure and demographic history of *C. angulata* from the coast of Zhejiang (Yueqing) and Fujian (including Ningde, Langqiao, Fuqing, and Putian) provinces by analyzing the partial mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 (CO I) sequences in 183 samples. All populations were characterized by high genetic diversity. Forty-four polymorphic sites were identified, and 39 haplotypes were found. The mean genetic and mean nucleotide diversity values were 0.8524 and 0.00406, respectively. Despite high levels of genetic diversity within the populations sampled, no significant genealogical branches corresponded to the sampling locality. Analysis of molecular variance indicated that most of the genetic variation was attributed to within-group variation (91.94%, $P=0.0003$). Population pairwise Φ_{ST} values were low ($\Phi_{ST} = -0.01193 \sim 0.11486$), suggesting frequent gene flow among the populations in this area. However, low but significant genetic differentiation was observed between the Ningde samples and the other four samples from four sites, which was presumably due to the relatively closed geophysical location of Ningde. Ningde is surrounded by many bays, islands, and gyres, which act as natural barriers that may have hindered dispersal of oyster larvae. The haplotype network of CO I sequences with stellate radiation structure suggests no clear geographical differentiation. A Bayesian phylogenetic tree was characterized by a staggered distribution of haplotypes and some small branches supported with moderately high bootstrap values. Significant expansion of *C. angulata* populations is suggested based on results from neutral tests and the mismatched distribution; the actual time that expansion likely started in $2.5 \times 10^5 \sim 2.1 \times 10^5$ years ago. Historical recolonization (though population range and demographic expansion during the late Pleistocene) and the current gene flow (larval dispersal interacting with oceanographic processes, such as ocean currents) of adult sedentary *C. angulata* may be responsible for the poor genetic differentiation. Our results will help in understanding the historical processes of intertidal species and help disentangle the complex interactions among various factors that generate the phylogeographical patterns and genetic diversity of *C. angulata* in the East China Sea.

Key words: *Crassostrea angulata*; mitochondrial CO I; genetic diversity; population structure; demography history

Corresponding author: LI Qi. E-mail: qili66@ouc.edu.cn