

中国沿海拟穴青蟹群体遗传多样性的微卫星分析

舒妙安^{1*}, 周宇芳¹, 朱晓宇¹, 赵晓枫², 郭晓令¹

(1. 浙江大学动物科学学院, 浙江 杭州 310029;

2. 杭州师范大学生命与环境科学学院, 浙江 杭州 310036)

摘要: 利用 17 对微卫星引物对我国沿海 7 个拟穴青蟹野生群体(杭州湾、三门湾、闽江口、东山湾、珠江口、北部湾、清澜港)进行了遗传多样性分析。结果表明,17 个位点在所有青蟹群体中均为高度多态($PIC > 0.5$),共检测到 253 个等位基因;7 群体的平均等位基因数(A)为 9.41~10.94,平均有效等位基因数(N_e)为 5.42~6.87,平均杂合度(H)为 0.511~0.563,群体遗传多样性水平较高。分子方差分析(AMOVA)结果显示,94.13%的遗传变异存在于群体内,5.87%的遗传变异存在于群体间,两两群体间 F_{ST} 值为 0.035 5~0.081 7($P < 0.01$),表明群体间遗传分化水平中等偏低。Hardy-Weinberg 平衡检测表明,7 群体普遍存在杂合子缺失现象。青蟹群体间遗传距离为 0.253 0~0.571 9,UPGMA 聚类分析表明,杭州湾与三门湾群体首先聚在一起,再与闽江口群体、东山湾群体聚为一支;珠江口群体与清澜港群体聚为另一支;两分支最后与北部湾群体聚类在一起。

关键词: 拟穴青蟹; 野生群体; 微卫星; 遗传多样性

中图分类号: Q 958.1; S 917

文献标志码: A

青蟹隶属于甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、梭子蟹科(Portunidae)、青蟹属(*Scylla*),在我国主要分布于浙江、福建、广东、广西、海南以及台湾等沿海水域,是我国重要的海洋经济蟹类之一。研究表明分布于中国沿海海域的青蟹主要为拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)^[1-3]。近年来,由于生态环境变化及过度捕捞,青蟹资源遭到了一定程度的破坏,野生资源量日趋减少。因此,研究我国沿海青蟹野生群体的遗传多样性水平,对于我国青蟹种质资源的合理开发利用具有重要的意义。

微卫星分子标记(microsatellite)具有多态性丰富、重复性好、共显性等优势,近年来已被广泛应用于大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)^[4]、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)^[5]、中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)^[6]、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)^[7]等多种水产动物的遗传多样性研究。目前,有关我国沿海青蟹遗传多样性

的研究较少,LI等^[8]利用等位酶研究了我国6个青蟹野生群体的遗传多样性,指出我国青蟹群体间遗传分化水平低;林琪^[9]利用RAPD与AFLP分子标记技术研究了我国拟穴青蟹的遗传多样性,结果显示我国青蟹遗传多样性水平较低;路心平等^[10]利用线粒体DNA标记分析了我国东南沿海拟穴青蟹种群遗传结构,认为我国青蟹具有较高的单倍型多样性和有限的核苷酸多样性水平。迄今为止,尚未见利用微卫星分子标记系统地研究我国沿海青蟹遗传多样性的报道。

本研究利用 17 对拟穴青蟹微卫星引物,对采自我国沿海的 7 个青蟹野生群体进行遗传多样性及遗传分化水平的分析,以期为我国青蟹种质资源的保护、利用以及优良品种培育提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

研究所用的 7 个青蟹野生群体于 2009 年 11

收稿日期:2010-09-07 修回日期:2011-03-24

资助项目:浙江省重大科技专项项目(2008C12008)

通讯作者:舒妙安,E-mail:shuma@zju.edu.cn

月至 12 月,分别采自浙江杭州湾(HZ,33 只),浙江三门湾(SM,36 只),福建闽江口(MJ,38 只),福建东山湾(DS,29 只),广东珠江口(GD,36 只),广西北部湾(GX,35 只)以及海南清澜港(HN,36 只),共 243 只青蟹成体。鲜活青蟹运到实验室后,取其螯足肌肉,立即置于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱冷冻保存备用。

1.2 基因组 DNA 制备

利用常规苯酚/氯仿法抽提青蟹肌肉的基因

组 DNA,用超微量分光光度计(NANODROP 1000)确定 DNA 的纯度、浓度,用灭菌水将 DNA 稀释至 $50\text{ ng}/\mu\text{L}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 微卫星引物

本研究共采用 17 对多态性微卫星引物,其中 7 对编号“X”系列为本实验室自主开发,另外 10 对编号“A”系列的为引用 XU 等^[11]已发表的拟穴青蟹微卫星引物(表 1)。引物均由上海英骏生物技术有限公司合成。

表 1 拟穴青蟹 17 对微卫星引物信息
Tab.1 Characteristics of 17 microsatellite loci in *S. paramamosain*

位点 locus	GenBank 登录号 accession no.	核心重 复序列 repeat motif	引物序列(5'-3') primer sequence	产物/bp size range	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ annealing temperature
X17	FJ439609	(CCT) ₆	F:GCCAAGCTTTTAATCCTGC R:AGTGAGTGAGTAGCCGTG	265 ~ 337	56.7
X20	FJ439611	(AC) ₁₃	F:GAATTAACCTGCACATCT R:CTGTGGTATCATCGCCTT	142 ~ 172	55.3
X36-2	FJ439615	(TGC) ₇	F:CATAGGGTAGCTTTGTGT R:TCAGGAGTGTGTCAGGAGTG	109 ~ 157	58.2
X47	FJ439619	(GT) ₁₇	F:ATGTTTAGGCGCACTTCGG R:GGTGATCAAGGGGTGCTG	152 ~ 220	59.6
X67	FJ439629	(CA) ₁₃	F:CCTGGCGAGTCGAGACCT R:GCCGCTGATCACTGTTTCC	154 ~ 192	59.6
X80	FJ439633	(TG) ₁₆	F:TCCTGGCGGTTA AACATC R:CTACTACCGGACCCCAAC	142 ~ 246	58.2
X85	FJ439636	(AAG) ₆ G(AGG) ₇	F:AGGAGAGCAGCCATAGAAG R:TCGCTTTACTCCACTCTTGTT	111 ~ 149	56.7
A5	FJ600508	(AGT) ₁₂	F:CCAGTGGTCAGTGGTAGGAGTAGTG R:TGTTACGGTGCCTTACTTTTTTCAG	86 ~ 140	60
A6	FJ600509	(GT) ₁₀	F:GCATTACAGGAAGCCAGACTCAAGC R:CGCACAGGTACCACAAACAAACAC	224 ~ 284	60
A14	FJ600510	(CAA) ₂₀	F:TGAAAGGACCATCACCAGAAGAAGC R:TATCGCTTGCCGTGTTCTCAT	286 ~ 360	62
A23	FJ600511	(GT) ₁₉	F:CGACTCACGACCAACCACTCCG R:AGACTTCACCGCCACCAACACG	200 ~ 270	62
A29	FJ600512	(GT) ₁₇	F:TAGTGTGAACCTCCCAACCGTG R:CTTATGTGCCGCTCAGAGACCC	356 ~ 520	60
A42	FJ600513	(CTA) ₁₀	F:TATGTTTCTATTATGACTACTGCCG R:ATTTTCTCGTATCTGTATTCTTCCT	165 ~ 206	55
A43	FJ600514	(AC) ₁₂	F:GCGGCTCGGCAAACCTCATTACT R:GACACCACGCTGAACCTTCGCTATT	204 ~ 262	62
A62	FJ600515	(AG) ₁₅ AA(AG) ₆	F:GTGTGACAAGGGGAAGACCACAAT R:CGTAATACTGGCGAGGGTGAAGC	183 ~ 260	61
A78	FJ600516	(AC) ₁₀	F:AGCGAATTTCTCGTATCGTTGGCG R:GTGTGTTGGGGGAGATGAGTGGATG	243 ~ 314	62
A81	FJ600517	(CA) ₁₂	F:ATGGCTATAACAACGCTCAAATGC R:TTAGGTCCTGGGGTGAAGTACGGTG	232 ~ 312	60

1.4 PCR 扩增及产物检测

PCR 反应体系为 20 μL , 内含 2 μL 10 \times PCR buffer (含 Mg^{2+}), 0.2 mmol/L dNTP, 0.15 mmol/L primer, 1 U *Taq* 酶, 50 ng 模板 DNA。PCR 反应试剂购自北京鼎国生物公司。7 对“X”系列微卫星引物的 PCR (Thermocycler, Germany) 扩增程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min 后进入循环, 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 退火温度(表 1), 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 30 s, 共 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。另 10 对“A”系列引物的反应程序参见 XU 等^[11] 的文献报道。PCR 产物经 3% 琼脂糖凝胶电泳初检后, 再利用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 银染法染色检测。

1.5 数据分析

根据每个个体产生的条带位置确定其基因型。用 PopGene 3.2 软件分析等位基因数(A)、有效等位基因数(N_e)、平均杂合度(H)、Nei 氏遗传距离^[12]、Hardy-Weinberg 平衡检验 P 值及遗传偏离指数(D) 等; 多态信息含量(PIC) 参照 BOSTEIN 等^[13] 的公式计算: $PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i P_j$, 式中 P_i 、 P_j 分

别为群体中第 i 和第 j 个等位基因频率, n 为某一基因座上等位基因数。用 Arlequin 3.1 软件^[14] 计算群体间遗传分化系数 (F_{ST} 值) 及分子方差分析 (AMOVA)。根据遗传距离, 用 PHYLIP 3.5 软件的 UPGMA 算法进行聚类分析, 并通过 MEGA 4.0 软件^[15] 显示该聚类图。

2 结果

2.1 微卫星引物扩增

17 对微卫星引物在中国沿海的 7 个青蟹野生群体中共检测出 253 个等位基因。位点 X85 在各群体部分个体中的检测结果见图 1。每个微卫星位点产生的等位基因数从 10 到 22 不等, 其中, 位点 A78 获得 22 个等位基因, 等位基因数最多; 平均每个位点获得的等位基因数为 14.88。本研究所采用的 17 个微卫星位点在 7 个群体中的多态信息含量 PIC 介于 0.527 ~ 0.916, 均呈现高度多态, 可有效应用于青蟹的遗传多样性分析。各位点的多态信息含量见表 2。

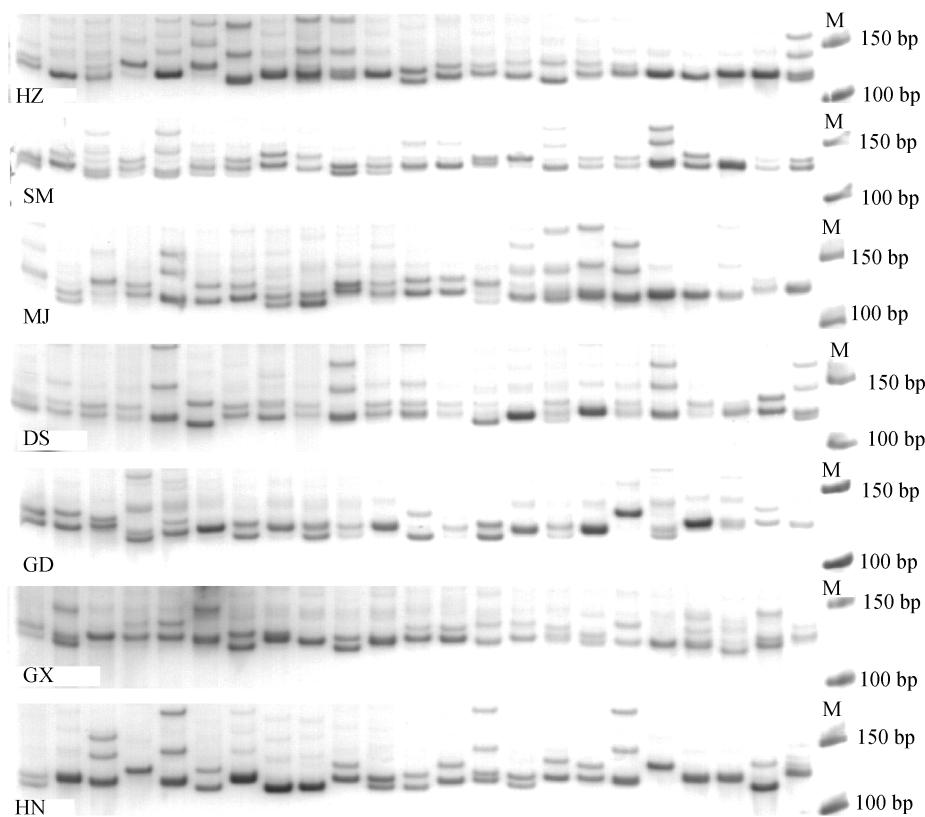


图 1 微卫星位点 X85 在 7 个青蟹群体部分个体的电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis patterns of microsatellite locus X85 amplified in some samples of seven populations of *S. paramamosain*

表 2 7 个青蟹群体在 17 个微卫星位点上的遗传多样性
 Tab. 2 The polymorphic information at 17 microsatellite loci of seven *S. paramamosain* populations

pop	A5	A6	A14	A23	A29	A42	A43	A62	A78	A81	X17	X20	X36-2	X47	X67	X80	X85	mean	
H Z	A	12	5	8	9	12	8	11	11	21	14	5	11	8	13	13	15	10	10.94
	N_e	8.28	3.57	3.62	6.07	6.07	3.73	7.89	7.09	12.74	9.08	3.50	8.10	4.06	9.51	8.41	8.64	6.37	6.87
	H	0.644	0.366	0.504	0.621	0.500	0.448	0.716	0.679	0.802	0.694	0.363	0.460	0.459	0.576	0.539	0.646	0.565	0.563
	PIC	0.867	0.674	0.697	0.815	0.816	0.696	0.860	0.844	0.916	0.880	0.670	0.864	0.727	0.886	0.870	0.874	0.825	
	D	-0.559**	-1.000**	-0.629**	-0.535**	-0.821**	-0.795**	-0.386*	-0.444*	-0.287	-0.463	-1.000**	-0.966**	-0.802**	-0.734**	-0.797**	-0.561	-0.681**	
S M	A	14	5	9	10	11	7	10	12	17	13	6	9	7	16	10	10	8	10.24
	N_e	10.13	3.12	5.99	7.28	10.62	4.70	5.76	7.58	11.73	6.38	3.90	4.99	4.06	9.32	5.88	4.33	5.82	6.56
	H	0.610	0.345	0.506	0.674	0.460	0.455	0.572	0.662	0.770	0.608	0.377	0.447	0.396	0.647	0.560	0.460	0.545	0.535
	PIC	0.893	0.622	0.813	0.848	0.898	0.758	0.804	0.855	0.909	0.826	0.703	0.775	0.719	0.883	0.810	0.744	0.806	
	D	-0.665**	-1.000**	-0.802**	-0.461**	-1.000**	-0.861**	-0.635**	-0.495**	-0.342	-0.578**	-1.000**	-0.898**	-0.963**	-0.570**	-0.670	-0.822**	-0.702**	
M J	A	11	7	9	8	9	6	8	17	12	8	6	11	10	17	10	14	9	10.12
	N_e	6.83	4.28	5.18	3.82	5.94	2.31	4.41	8.37	7.26	4.41	3.76	8.35	3.56	10.58	7.18	7.13	6.43	5.87
	H	0.512	0.415	0.580	0.466	0.488	0.340	0.498	0.644	0.661	0.484	0.372	0.552	0.535	0.749	0.528	0.594	0.612	0.531
	PIC	0.839	0.733	0.784	0.705	0.81	0.527	0.742	0.872	0.847	0.747	0.692	0.868	0.687	0.898	0.846	0.845	0.826	
	D	-0.817**	-0.932**	-0.582**	-0.754**	-0.843**	-0.817**	-0.731**	-0.557	-0.489**	-0.765**	-1.000**	-0.763**	-0.530*	-0.369	-0.789**	-0.637*	-0.570**	
D S	A	11	5	8	7	7	10	11	13	10	10	5	9	7	15	9	11	12	9.41
	N_e	6.76	3.40	4.23	4.51	3.46	5.10	6.40	7.93	6.98	5.84	3.46	4.67	3.43	10.38	5.68	4.21	5.68	5.42
	H	0.606	0.360	0.527	0.482	0.431	0.564	0.602	0.669	0.643	0.577	0.362	0.435	0.378	0.684	0.540	0.526	0.505	0.523
	PIC	0.838	0.659	0.728	0.746	0.677	0.777	0.823	0.862	0.841	0.807	0.659	0.760	0.668	0.896	0.806	0.731	0.808	
	D	-0.602**	-1.000**	-0.645**	-0.783**	-0.809**	-0.621**	-0.598**	-0.496	-0.525**	-0.632**	-1.000**	-0.914**	-0.953**	-0.513	-0.712**	-0.644*	-0.795**	
G D	A	11	6	9	11	9	7	7	14	14	10	9	11	8	15	14	11	12	10.47
	N_e	5.17	3.05	6.13	8.18	6.38	3.49	5.10	8.47	8.07	5.30	5.59	6.51	5.07	7.43	7.95	4.74	6.53	6.07
	H	0.590	0.355	0.466	0.612	0.469	0.390	0.561	0.628	0.528	0.509	0.445	0.485	0.477	0.661	0.569	0.484	0.541	0.516
	PIC	0.787	0.630	0.817	0.866	0.824	0.676	0.776	0.871	0.865	0.786	0.798	0.830	0.776	0.853	0.863	0.768	0.833	
	D	-0.559**	-0.959**	-0.902**	-0.626**	-0.903**	-0.923**	-0.625**	-0.596*	-0.812**	-0.764**	-0.933**	-0.871**	-0.829**	-0.494	-0.718**	-0.791**	-0.742**	
G X	A	13	7	8	10	8	4	11	12	9	10	8	12	8	14	8	15	9	9.76
	N_e	5.51	4.02	3.01	6.84	5.10	3.63	7.06	6.45	4.99	5.76	5.65	8.94	5.47	9.57	4.63	10.00	5.05	5.98
	H	0.587	0.381	0.382	0.605	0.437	0.411	0.579	0.543	0.463	0.477	0.418	0.479	0.458	0.740	0.512	0.600	0.622	0.511
	PIC	0.800	0.713	0.637	0.838	0.777	0.675	0.842	0.827	0.779	0.805	0.801	0.878	0.793	0.887	0.761	0.892	0.777	
	D	-0.587	-1.000**	-0.873**	-0.604**	-0.930**	-0.883**	-0.672**	-0.733*	-0.859**	-0.864**	-1.000**	-0.937**	-0.896**	-0.371	-0.712**	-0.687*	-0.473**	
H N	A	12	9	6	11	10	8	8	13	9	15	5	11	9	16	12	11	11	10.35
	N_e	6.10	5.01	4.73	5.71	5.49	4.18	5.54	6.72	4.02	9.49	3.25	7.32	6.91	10.05	9.13	5.84	7.20	6.28
	H	0.521	0.420	0.442	0.502	0.484	0.553	0.582	0.682	0.451	0.565	0.365	0.535	0.475	0.651	0.591	0.517	0.562	0.523
	PIC	0.818	0.776	0.759	0.805	0.796	0.727	0.794	0.838	0.722	0.885	0.639	0.849	0.838	0.892	0.880	0.811	0.846	
	D	-0.771**	-0.966**	-0.896**	-0.800**	-0.832**	-0.569**	-0.599**	-0.421	-0.818**	-0.755**	-0.960**	-0.779**	-0.904**	-0.574	-0.692**	-0.769**	-0.714**	

注: * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$ 。

Notes: * means $P < 0.05$, ** means $P < 0.01$.

2.2 遗传多样性分析

7 个青蟹野生群体的遗传多样性参数如表 2 所示。每个群体的平均等位基因数为 9.41 ~ 10.94, 平均有效等位基因数为 5.42 ~ 6.87。其中, 杭州湾群体平均等位基因数最多 ($A = 10.94$), 广西北部湾 ($A = 9.76$) 及福建东山湾群

体 ($A = 9.41$) 相对较少。各群体的平均杂合度为 0.511 ~ 0.563, 其中杭州湾群体平均杂合度 ($H = 0.563$) 最高, 广西北部湾群体最低 ($H = 0.511$)。由此可知, 杭州湾群体遗传多样性最高, 而福建东山湾群体与广西北部湾群体遗传多样性相对较低。

经 Hardy-Weinberg 平衡检验发现,119 个群体位点组合中(7 群体 × 17 位点),符合 Hardy-Weinberg 平衡($P > 0.05$)的群体位点有 14 个,占 11.77%,其余 105 个群体位点组合为显著偏离($P < 0.05$),占总数的 88.24%。119 个群体位点组合均表现为杂合子缺失($D < 0$)(表 2)。

2.3 群体间遗传分化分析

7 个青蟹群体间遗传变异的 AMOVA 分析如表 3 所示,94.13% 的遗传变异存在于群体内,5.87% 的遗传变异存在于群体间,群体间遗传分化达到极显著水平($P < 0.01$)。

表 3 7 个青蟹群体分子方差分析
Tab. 3 AMOVA analysis among seven populations of *S. paramamosain*

变异来源 source of variation	自由度 d_f	平方和 sum of squares	方差组分 variance components	方差比例 percentage of variation
群体间 among populations	6	225.141	0.439 39 Va	5.87 **
群体内 within populations	479	3 376.101	7.048 23 Vb	94.13 **
总变异 total variation	485	3 601.243	7.487 62	

注: ** 为经过 1 023 次模拟检验后极显著($P < 0.01$)。

Notes: ** means extreme significance($P < 0.01$) after 1 023 permutation tests.

7 个群体间成对 F_{ST} 值为 0.035 5 ~ 0.081 7 (表 4), 平均 F_{ST} 值为 0.058 7。杭州湾与三门湾群体间遗传分化最小($F_{ST} = 0.035 5$), 福建东山湾与海南清澜港群体间遗传分化最大($F_{ST} = 0.081 7$), 广东、广西、海南 3 个群体间的 F_{ST} 值均大于 0.05(0.052 7 ~ 0.072 6), 7 个群体间的 F_{ST} 值均达到极显著水平($P < 0.01$)。

表 4 7 个青蟹群体的 Nei 氏遗传距离和遗传分化指数
Tab. 4 Genetic distance and F_{ST} in seven populations of *S. paramamosain*

	HZ	SM	MJ	DS	GD	GX	HN
HZ		0.035 5	0.043 7	0.046 8	0.053 8	0.053 0	0.051 5
SM	0.253 0		0.042 1	0.052 4	0.067 1	0.060 9	0.053 9
MJ	0.279 7	0.263 1		0.059 4	0.072 1	0.064 5	0.062 3
DS	0.301 4	0.333 3	0.351 8		0.073 8	0.075 8	0.081 7
GD	0.379 3	0.433 7	0.418 3	0.509 9		0.058 0	0.072 6
GX	0.375 6	0.475 6	0.469 5	0.481 0	0.392 2		0.052 7
HN	0.374 1	0.382 8	0.407 5	0.571 9	0.366 6	0.525 8	

注: 对角线以下为 Nei 氏遗传距离, 对角线以上为遗传分化指数 F_{ST} 。

Notes: Nei's genetic distance (below diagonal) and population differentiation F_{ST} (above diagonal).

2.4 遗传距离与聚类分析

中国沿海 7 个青蟹野生群体间的遗传距离如表 4 所示。群体间遗传距离为 0.253 0 ~ 0.571 9。其中, 杭州湾与三门湾群体遗传距离最近(0.253 0); 福建东山湾与海南清澜港群体遗传距离最远(0.571 9)。广西北部湾群体与其余 6 个群体间的遗传距离为 0.375 6 ~ 0.525 8, 相距均较远。

图 2 为基于遗传距离构建的 UPGMA 聚类图。从图中可以看出, 杭州湾群体与三门湾群体遗传距离最近, 首先聚在一起, 再与福建闽江口群体、福建东山湾群体聚为一支; 广东珠江口群体与海南清澜港群体聚为另一支; 以上两分支最后与广西北部湾群体聚类在一起。

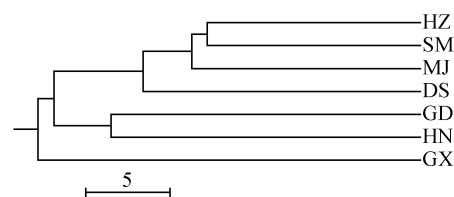


图 2 7 个青蟹群体的 UPGMA 聚类图
Fig. 2 UPGMA dendrogram of seven populations of *S. paramamosain*

3 讨论

3.1 群体遗传多样性

遗传多样性是评价物种资源状况的重要依据, 丰富的遗传多样性意味着物种具有较高的适应生存能力及丰富的育种和遗传改良潜力。本研究中 7 个群体的多态信息含量为 0.527 ~ 0.916, 平均等位基因数为 9.41 ~ 10.94, 平均杂合度为 0.511 ~ 0.563, 由此说明, 我国沿海拟穴青蟹野生群体的遗传多样性较为丰富。其中, 浙江杭州湾群体遗传多样性最高; 浙江三门湾、海南清澜港、广东珠江口、福建闽江口 4 个群体次之; 福建东山湾与广西北部湾群体多样性水平则相对较低。除浙江两个群体外, 其余群体的遗传多样

性水平基本呈现随纬度升高而降低的趋势。LI等^[8]利用等位酶研究我国青蟹遗传多样性时,发现青蟹比其它十足目甲壳动物的多态性高;路心平等^[10]利用线粒体DNA标记分析我国东南沿海10个拟穴青蟹群体(北至浙江温州)的遗传结构,结果表明,各群体单倍型多样性水平中等偏高,我国东南沿海拟穴青蟹遗传多样性水平基本呈现由南到北逐渐降低的趋势,本研究与上述研究结果基本一致。我国东南沿海青蟹野生群体的遗传多样性水平较高,这与目前青蟹人工繁育尚未规模化,各地海区人工放流较少等有关。

3.2 Hardy-Weinberg 平衡

本研究中,88.24%的青蟹群体位点表现为显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡。同时,所有群体位点的遗传偏离指数 D 均小于 0(表 2),说明群体中纯合子个体所占的比例较大,普遍存在杂合子缺失现象,这可能是造成群体偏离 Hardy-Weinberg 平衡的主要原因。在其他物种的相关研究中也出现过类似情况,CHANG 等^[7]利用微卫星标记研究中华绒螯蟹遗传多样性时发现大部分位点存在杂合子缺失,且各群体在这些位点上均表现为偏离 Hardy-Weinberg 平衡。傅洪拓等^[16]研究长江不同江段日本沼虾时发现,日本沼虾 82.5%的群体位点组合表现为显著偏离平衡,其推断引起偏离的主要原因正是杂合子缺失。而本研究中各群体出现杂合子缺失的可能原因之一是无效等位基因(null alleles)的存在。在太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)的微卫星研究中曾发现存在 51% 的无效等位基因^[17],在中国明对虾^[18]、青石斑鱼(*Epinephelus awoara*)^[19]、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)^[20]等动物的微卫星标记应用中也存在由于无效等位基因导致杂合子缺失的现象。此外,也可能是由于过度捕捞等人为干扰使青蟹的群体结构受到影响,群体规模缩小,存在近交现象。黎中宝等^[21]利用等位酶进行青蟹杂合性研究时,指出我国东南沿海青蟹野生资源状况良好的同时,也发现我国浙江宁海、福建连江、厦门、广东深圳、广西北海、海南三亚等群体在大部分位点上均偏离 Hardy-Weinberg 平衡,提出应防止过度捕捞和环境污染对青蟹种质资源的影响。

3.3 群体间遗传分化

遗传分化指数 F_{ST} 是群体间遗传分化程度的

一个重要参数, F_{ST} 值在 0~0.05 时,群体遗传分化较弱;0.05~0.15 时,群体遗传分化中等^[22]。在本研究中,杭州湾、三门湾、福建闽江口三个群体间 F_{ST} 值均小于 0.05,3 个群体间遗传分化低;福建东山湾、广东珠江口、广西北部湾、海南清澜港 4 个群体的 F_{ST} 值均大于 0.05,群体间遗传分化水平中等,各群体之间遗传差异显著。路心平等^[10]利用线粒体 CO I 序列也得出广西北海、广东、海南群体之间遗传差异均显著。7 个青蟹群体间的平均 F_{ST} 值为 0.058 7,这与林琪^[9]应用 RAPD、AFLP 两种标记研究拟穴青蟹群体得到的遗传分化最大值(0.051 2、0.066 9)接近,与路心平等^[10]获得的 10 个拟穴青蟹群体的平均 F_{ST} 值 0.055 85 基本一致。AMOVA 分析表明 94.13% 的变异来自于群体内,与 F_{ST} 分析结果相吻合,与林琪^[9]得到的 95% 的遗传变异来自于群体内结果一致。

由遗传距离构建的 UPGMA 聚类图表明,中国沿海 7 个青蟹群体间亲缘关系的远近与其地理分布大致相符。同属东海海域的浙江杭州湾、三门湾与福建闽江口、福建东山湾群体聚为一支;同属南海海域的广东、海南、广西群体中,广东珠江口与海南清澜港群体聚为一支,而广西北部湾群体独自聚为一支。其中,广西北部湾群体与中国沿海其余 6 个群体的遗传距离普遍较远,独自聚为一支的主要原因可能是北部湾海域与我国其他海域相比处于一个较封闭的环境。在琼州海峡形成前,北部湾的青蟹由于受北部湾环流的影响,大部分在北部湾内漂流,加上拟穴青蟹沿岸活动的习性,容易造成一定的地理隔离;琼州海峡形成后才加大了青蟹群体间的基因交流^[9]。7 个青蟹野生群体中,浙江杭州湾与三门湾两个群体间遗传距离最近(0.253 0),可能是由于杭州湾与三门湾地理位置相距较近的缘故。而杭州湾、三门湾两个群体与广东、海南群体之间遗传距离较大(0.379 3,0.433 7;0.374 1,0.382 8),群体间遗传分化程度相对较高,同 RAPD 与 AFLP 研究结果^[9]接近。这就提示了在遗传育种工作中,在考虑青蟹个体大小、肌肉品质以及是否适应当地水域环境等因素的基础上,利用遗传距离较大的群体进行杂交,有望培育出生长性能好、抗逆性强的优良品种。

参考文献:

- [1] 马凌波,张凤英,乔振国,等. 中国东南沿海青蟹线
http://www.scxuebao.cn

- 粒体 *CO I* 基因部分序列分析[J]. 水产学报, 2006,30(4):463-468.
- [2] 林琪,李少菁,黎中宝,等. 中国东南沿海青蟹属 (*Scylla*) 的种类组成[J]. 水产学报,2007,31(2): 211-219.
- [3] 林琪,李少菁,黎中宝,等. 中国东南沿海青蟹属不同种类的 mtDNA *CO I* 基因序列分析及其系统发育[J]. 厦门大学学报:自然科学版,2008,47(2): 268-273.
- [4] NIELSEN E E, NIELSEN P H, MELDRUP D, *et al.* Genetic population structure of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) supports the presence of multiple hybrid zones for marine fishes in the transition zone between the Baltic Sea and the North Sea [J]. *Molecular Ecology*, 2004,13(3):585-595.
- [5] ZHAN A B, HU X L, ZHOU Z C, *et al.* Fine-scale population genetic structure of Zhikong scallop (*Chlamys farreri*): do local marine currents drive geographical differentiation [J]. *Marine Biotechnology (New York)*, 2009, 11(2): 223-235.
- [6] MENG X H, WANG Q X, JIANG I K, *et al.* Genetic differentiation in seven geographic populations of the fleshy shrimp *Penaeus (Fenneropenaeus) chinensis* based on microsatellite DNA[J]. *Aquaculture*, 2009, 287(1-2):46-51.
- [7] CHANG Y M, LIANG L Q, MA H T, *et al.* Microsatellite analysis of genetic diversity and population structure of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2008,35(3):171-176.
- [8] LI Z B, LI S J, WANG G H. Genetic diversity and differentiation of mud crab *Scylla serrata* populations from southeastern China [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2004,23(2):309-316.
- [9] 林琪. 中国青蟹属种类组成和拟穴青蟹群体遗传多样性的研究[D]. 厦门:厦门大学,2008:68-94.
- [10] 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.
- [11] XU X J, WANG G Z, WANG K J, *et al.* Isolation and characterization of ten new polymorphic microsatellite loci in the mud crab, *Scylla paramamosain* [J]. *Conservation Genetics*, 2009,10: 1877-1878.
- [12] NEI M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. *Genetics*, 1978,8:583-590.
- [13] BOSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism [J]. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32: 314-331.
- [14] EXCOFFIER, LAVAL L G, SCHNEIDER S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis [J]. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 2005,1:47-50.
- [15] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, *et al.* MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software 4.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007,24(8):1596-1599.
- [16] 傅洪拓,乔慧,李法君,等. 长江不同江段青虾的遗传多样性[J]. 水产学报,2010,34(2):204-211.
- [17] HEDGECOCK D, LI G, HUBERT S, *et al.* Widespread null alleles and poor cross-species amplification of microsatellite DNA loci cloned from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* [J]. *Journal of Shellfish Research*, 2004,23(2):379-385.
- [18] 张天时,刘萍,李健,等. 用微卫星 DNA 技术对中国对虾人工选育群体遗传多样性的研究[J]. 水产学报,2005,29(1):5-12.
- [19] 董秋芬,刘楚吾,郭昱嵩,等. 青石斑鱼微卫星标记的筛选机群体多态性分析[J]. 水产学报,2007,31(6):841-847.
- [20] 常玉梅,王文文,徐万土,等. 人工繁育大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 群体 F_2 及 F_3 遗传差异分析[J]. 海洋与湖沼,2009,40(4):414-422.
- [21] 黎中宝,李少菁,王桂忠. 锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) 不同种群的杂合性研究[J]. 海洋与湖沼,2004,35(4):358-363.
- [22] WRIGHT S. *Evolution and the genetics of populations* [M]. Chicago: The University of Chicago Press, 1978:1-30.

Microsatellite analysis on genetic diversity of seven wild populations of *Scylla paramamosain* in China

SHU Miao-an^{1*}, ZHOU Yu-fang¹, ZHU Xiao-yu¹, ZHAO Xiao-feng², GUO Xiao-ling¹

(1. College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

2. Institute of Development and Regeneration Biology, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China)

Abstract: The genetic diversity of seven wild *Scylla paramamosain* populations, collected from Hangzhou Bay (HZ), Sanmen Bay (SM), Minjiang Estuary (MJ), Dongshan Bay (DS), Zhujiang Estuary (GD), Beibu Bay (GX), Qinglan Estuary (HN) in China were investigated using seventeen microsatellite markers. The number of alleles (A), number of effective alleles (N_e), polymorphism information content (PIC) and heterozygosity (H) were all determined. The Hardy-Weinberg Equilibrium was checked by χ^2 Test. The genetic distance was computed based on the allele frequency. A dendrogram was built on the unweighted pair-group method with arithmetic means (UPGMA) results using PHYLIP software package (Ver 3.5). F -statistics analysis and the degree of population differentiation between the seven wild populations using analysis of molecular variance model (AMOVA) were computed by ARLEQUIN (Ver 3.1). A total of 253 alleles were obtained at the seventeen microsatellite markers in seven populations. Polymorphic information content (PIC) value per locus was greater than 0.5, indicating the seventeen loci were highly polymorphic. The mean number of alleles and effective alleles ranged from 9.41 to 10.94, 5.42 to 6.87 respectively. The heterozygosity (H) ranged from 0.511 to 0.563. The data suggested that all the seven wild populations of *Scylla paramamosain* had little high genetic diversities. Analysis of molecular variance (AMOVA) revealed that the variation within populations was 94.13%, whereas the variation among populations explained 5.87% of the total variation. F -statistics analysis detected significant genetic differentiation among the seven wild populations, with the F_{ST} value ranged from 0.0355 to 0.0817. Genetic differentiation among populations was statistically significant. 88.24% of the population loci showed significant deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium. There was heterozygote deficiency at all loci. The genetic distances among populations ranged from 0.2530 to 0.5719. Cluster analysis indicated that HZ and SM populations, joining together for the closest relationship, were clustered with MJ and DS as one cluster. GD and HN populations were clustered together, while GX was an independent cluster.

Key words: *Scylla paramamosain*; wild populations; microsatellite; genetic diversity

Corresponding author: SHU Miao-an. E-mail: shuma@zju.edu.cn