

## 日本蟳4个野生群体遗传多样性的微卫星分析

宋春妮<sup>1,2</sup>, 李健<sup>1\*</sup>, 刘萍<sup>1</sup>, 陈萍<sup>1</sup>, 高保全<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 大连海洋大学生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023)

**摘要:** 利用10对微卫星引物对我国大连黑石礁(DL)、莱州湾(LZ)、青岛鳌山湾(QD)、海州湾(HZ)4个日本蟳野生群体的遗传多样性进行了分析。结果表明,不同引物获得的等位基因数从11~17不等,10个位点其平均等位基因数为13.6000,平均有效等位基因数为8.5920;各位点的平均观测杂合度( $H_o$ )为0.3182~0.8584,平均期望杂合度( $H_e$ )为0.8466~0.9239;平均多态信息含量(PIC)为0.8280~0.9140,说明各位点在4个日本蟳野生群体内均表现出很高的遗传多样性水平。各群体间遗传分化较大,基因分化指数( $F_{ST}$ )为0.03274~0.08803。群体间遗传相似性系数、遗传距离及UPGMA聚类分析表明,鳌山湾与海州湾群体亲缘关系最近,而海州湾和莱州湾群体亲缘关系最远。

**关键词:** 日本蟳; 野生群体; 微卫星; 遗传多样性

**中图分类号:** Q958.1; S917

**文献标志码:** A

日本蟳(*Charybdis japonica*)属梭子蟹科(Portunidae)、梭子蟹亚科、蟳属(*Charybdis*),俗称赤甲红、石鲟仔、海红和石蟹等,是一种大型海产食用蟹类。它属于沿岸定居性种类,广泛分布于我国沿海及日本、朝鲜、东南亚等沿海岛礁区及浅海水域,肉质细嫩,味道鲜美,很受消费者青睐。目前,沿海地区已经开展了日本蟳的苗种生产和小规模化养殖等工作,但过度捕捞和环境污染等造成野生资源衰竭的趋势仍日益严重。因此,充分了解日本蟳的不同地理群体遗传多样性,对于野生日本蟳种质资源的保护和合理挖掘利用具有重要的意义。

微卫星(microsatellite)是广泛分布于真核生物基因组中的一种中度重复序列,具有多态性高<sup>[1]</sup>、共显性遗传、重复性高和易检测等优点,已广泛应用于动植物遗传多样性鉴定<sup>[2-4]</sup>、遗传图谱构建<sup>[5-6]</sup>、遗传育种计划<sup>[7]</sup>等研究领域,近年来也越来越多地应用到甲壳类的群体遗传分析、育种计划等研究中<sup>[8-9]</sup>。本研究采用微卫星分子标记技术对大连黑石礁、莱州湾、青岛鳌山湾和海州

湾4个日本蟳野生群体的遗传结构进行分析,为人工养殖及品种培育提供相关的遗传背景资料,同时也为日本蟳人工养殖种质资源持续利用提供相关的依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 样品来源与组织DNA提取

实验所采用的日本蟳野生个体来源于大连黑石礁、青岛鳌山湾、莱州湾和海州湾,取其大螯放入-80℃保存。

每个群体随机挑选31个个体采用常规的苯酚-氯仿法<sup>[10]</sup>提取大螯肌肉组织DNA,TE(pH 8.0)溶解后测定浓度和纯度,并用琼脂糖凝胶电泳检测基因组DNA质量。-20℃保存备用。

#### 1.2 微卫星扩增

实验所用微卫星引物见表1。PCR扩增体系为模板DNA 3 μL,10 mmol/L引物各1 μL,2.5 mmol/L dNTP 1.6 μL,10 × PCR Buffer(含Mg<sup>2+</sup>)2 μL,TaKaRa Taq(5 U/μL)0.2 μL,加ddH<sub>2</sub>O至20 μL。反应程序为95℃预变性5

收稿日期:2011-01-04 修回日期:2011-03-10

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划项目(2006AA10A406);国家自然科学基金项目(3087133,40806067);农业科技成果转化资金项目(2010GB23260589);青岛市科技计划项目(07-2-3-5-jch)

通讯作者:李健,E-mail:lijian@ysfri.ac.cn

min;95 °C变性 45 s,退火 45 s,72 °C延伸 45 s,30 2%的琼脂糖凝胶电泳检测,然后再用 8% 变性聚个循环;最后 72 °C再延伸 10 min。扩增产物先用 丙烯酰胺凝胶检测,硝酸银染色,拍照保存。

表 1 10 对微卫星引物的特征  
Tab. 1 Characteristics of 10 pairs of microsatellite primers

位点 locus	GenBank 登录号 accession no.	引物序列(5'-3') primer sequence	核心序列 repeat motif	产物/bp size range	退火温度/°C annealing temperature
RBX-01A	HQ222591	F:TTTCCCATAGCCATACAG R:GTCCGACTTTTCTTTCATTT	(GT) <sub>35</sub>	339	49
RBX-05I	HQ222594	F:CAATGAAGGAGGTAAACA R:AGACTCTGAAGACGGAAG	(AG) <sub>10</sub>	118	49
RBX-58	HQ222580	F:ATGAATGCTACTGTCCCTG R:CCTTCGCTGTGGTCTGT	(CA) <sub>14</sub>	327	45
RBX-89	HQ222589	F:TCTCACCTGGCAGTCAC R:CACCACCTTCAACACC	(AC) <sub>21</sub>	348	47
RBX-17	HQ222568	F:GATCAGTTTGTCCAGGTAT R:ATCGTGGGTGGTGTATTT	(AC) <sub>18</sub>	375	52
RBX-79	HQ222586	F:CGCAAGTAAGTTGGGTGA R:ATGGAACGGATTGAGTGA	(TG) <sub>20</sub>	255	55
RBX-85	HQ222587	F:ACGGCTGGTTGGTCACAT R:CCTCCCTAACTCACTTGCT	(AC) <sub>26</sub>	214	56
RBX-09	HQ222564	F:CGATGCTTCCAGGCTCTG R:CGGCGGATTATCCCACT	(GT) <sub>22</sub>	231	55
RBX-27	HQ222572	F:ACTCACTGTTTCATTGCTCCAT R:CTACTCGCCTCGCATTCC	(CT) <sub>13</sub>	393	58
RBX-19	HQ222569	F:GCGAGCTTTCCTGTCTG R:CACTTCCCTTCTTCTGT	(GT) <sub>22</sub>	271	58

注:F. 正向引物;R. 反向引物。

Notes:F. forward primer;R. reverse primer.

### 1.3 数据统计与分析

根据条带的不同位置确定基因型,利用 POPGENE 3.2 计算 4 个群体在 10 个微卫星位点上的平均等位基因数( $N_a$ )、平均有效等位基因数( $N_e$ )、平均观测杂合度( $H_o$ )、平均期望杂合度( $H_e$ )、平均 Hardy-Weinberg 平衡指数( $D$ )和平均多态信息含量( $PIC$ )。

多态性信息含量<sup>[11]</sup>:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^m P_i^2 - \sum_{i=1}^{m-1} \sum_{j=i+1}^m P_i^2 P_j^2$$

式中, $P_i$ 、 $P_j$  分别为群体中第  $i$  个和第  $j$  个等位基因频率, $m$  为等位基因数。

同时采用 NEI<sup>[12]</sup> 的方法计算群体间的遗传距离和遗传分化指数  $F_{ST}$ 。使用 MEGA 3.0 软件,采取 UPGMA 方法根据 4 个群体的遗传距离进行聚类。

## 2 结果

### 2.1 遗传多样性分析

10 对微卫星引物在 4 个日本鬲野生群体中

均得到较好的扩增,扩增条带如图 1。10 个位点在 4 个日本鬲野生群体中的平均等位基因数( $N_a$ )、平均有效等位基因数( $N_e$ )、平均观测杂合度( $H_o$ )、平均期望杂合度( $H_e$ )和平均多态信息含量( $PIC$ )等见表 2。由表 2 可知,10 个位点的等位基因数为 11 ~ 17,平均有效等位基因数为 8.592 0,其中位点 RBX-27 获得 17 个等位基因,等位基因数最多,位点 RBX-89 和 RBX-85 获得 11 个等位基因,数量最少。平均观测杂合度( $H_o$ )分别为 RBX-89 < RBX-27 < RBX-85 < RBX-05I < RBX-19 < RBX-79 < RBX-01A < RBX-58 < RBX-09 < RBX-17,各位点的平均期望杂合度( $H_e$ )为 0.846 6 ~ 0.923 9,平均多态信息含量( $PIC$ )介于 0.828 0 ~ 0.914 0,多态性很高,可有效进行后续分析。

### 2.2 Hardy-Weinberg 平衡分析

各个位点在 4 个野生群体中的平均遗传偏离指数  $D$  值均为负,说明 4 个野生群体均存在不同程度的杂合子缺失。利用 Hardy-Weinberg 定律对每个群体中每个位点的基因平衡状态进行检验

(表 3), 各群体至少有 4 个位点极显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡, 其中莱州湾群体有 5 个位点, 青岛鳌山湾群体有 7 个位点, 海州湾群体有 4 个位点, 大连黑石礁湾群体有 6 个位点。

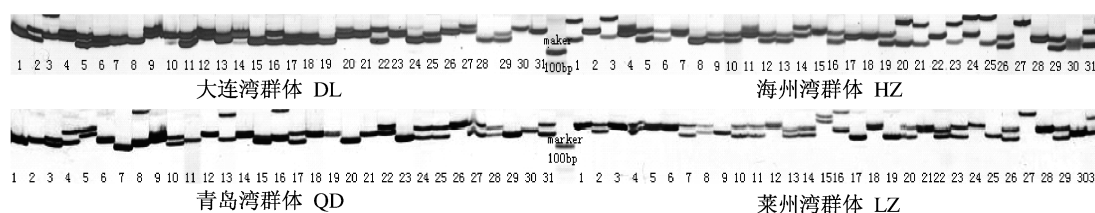


图 1 微卫星 RBX-05I 在 4 个野生日本蜆群体中的扩增图谱

Fig. 1 Amplified allele of microsatellite RBX-05I in 4 wild stocks of *C. japonica*

表 2 4 个群体在各位点的等位基因数、有效等位基因数、观测杂合度、期望杂合度、多态信息含量和 Shannon 多样性指数

Tab. 2 Number of alleles ( $N_a$ ), number of effective alleles ( $N_e$ ), observed heterozygosity ( $H_o$ ), expected heterozygosity ( $H_e$ ), PIC and Shannon's information index at the microsatellite loci in 4 wild stocks of *C. japonica*

位点 locus	等位基因数 $N_a$	有效等位基因数 $N_e$	期望杂合度 $H_e$	观测杂合度 $H_o$	多态信息含量 PIC	Shannon 多样性指数 $I$
RBX-01A	16	9.094 3	0.894 1	0.663 6	0.881 0	2.426 4
RBX-05I	14	7.243 5	0.865 6	0.588 2	0.849 0	2.225 0
RBX-58	13	9.431 8	0.899 1	0.666 7	0.885 0	2.365 2
RBX-89	11	7.012 5	0.861 3	0.318 2	0.841 0	2.096 8
RBX-17	13	10.955 8	0.912 8	0.858 4	0.902 0	2.476 8
RBX-79	13	8.319 5	0.883 9	0.620 4	0.868 0	2.280 3
RBX-85	11	7.787 2	0.875 3	0.554 6	0.858 0	2.171 2
RBX-09	13	7.296 4	0.866 5	0.699 2	0.848 0	2.186 6
RBX-27	17	12.407 9	0.923 9	0.509 8	0.914 0	2.647 2
RBX-19	15	6.371 1	0.846 6	0.593 2	0.828 0	2.189 0

表 3 4 个日本蜆野生群体各位点的平均遗传偏离指数 ( $D$ )、 $P$  值检验及基因流 ( $N_m$ )

Tab. 3 Hardy-Weinberg departure value ( $D$ ),  $P$  value inspection and gene flow  $N_m$  among 4 wild stocks in *C. japonica*

种群 stock	指数 index	位点 locus									
		RBX-01A	RBX-05I	RBX-58	RBX-89	RBX-17	RBX-79	RBX-85	RBX-09	RBX-27	RBX-19
DL		0.000 6	0.001 3	0.053 0	0.000 0	0.852 2	0.210 5	0.000 0	0.422 3	0.000 0	0.001 1
LZ	$P$ 值 $P$ value	0.000 3	0.007 8	0.028 8	0.000 0	0.494 1	0.048 8	0.821 6	0.486 1	0.000 0	0.000 9
QD		0.004 4	0.002 5	0.064 8	0.000 0	0.005 2	0.072 5	0.000 0	0.032 2	0.007 0	0.000 0
HZ		0.091 1	0.075 9	0.016 3	0.000 0	0.353 7	0.000 0	0.000 0	0.009 7	0.021 6	0.102 5
	$D$ 值 $D$ value	-0.257 8	-0.320 5	-0.258 5	-0.630 6	-0.059 6	-0.298 1	-0.366 4	-0.193 1	-0.448 2	-0.299 3
	基因流 $N_m$	9.321 4	3.082 3	6.048 9	1.399 8	9.016 4	4.969 8	4.280 6	3.111 4	5.099 1	3.829 3

注:  $P < 0.05$  为显著,  $P < 0.01$  为极显著。

Notes:  $P < 0.05$  is significant,  $P < 0.01$  is extremely significant.

### 2.3 遗传分化、遗传距离和聚类分析

4 个群体各个位点的基因分化指数和基因流见表 3 和表 4。两两群体比较发现, 海州湾群体和莱州湾群体之间的基因分化指数最高, 为 0.088 0; 而海州湾群体和青岛鳌山湾群体之间的

基因分化指数最低, 为 0.032 7。根据基因流的大小, 在群体间遗传分化较小 ( $N_m > 4$ ) 的位点有 RBX-01A、RBX-58、RBX-17、RBX-79、RBX-85、RBX-27; 其余 4 个位点在各群体之间存在一定程度的分化。

表 4 日本螭各野生群体的基因分化指数  
Tab. 4 Coefficient of gene differentiation  $F_{ST}$  in every wild stock in *C. japonica*

群体 stock	DL	LZ	QD	HZ
DL				
LZ	0.049 4			
QD	0.042 6	0.076 3		
HZ	0.051 5	0.088 0	0.032 7	

为了进一步分析各群体间的遗传分化程度,计算了遗传相似性与遗传距离(表 5)。从表中可知,群体间遗传距离变化范围为 0.353 5~0.789 7,遗传相似度的变化范围为 0.454 0~0.702 2。其中青岛鳌山湾与海州湾群体间的遗传相似系数最大,而遗传距离却最小。根据群体间的遗传距离,用 UPGMA 分析方法得到聚类分析图,能够更直观地体现出群体间(图 2)。

表 5 4 个日本螭野生群体间的遗传距离及遗传相似性系数  
Tab. 5 Nei's genetic identity ( $I$ ) and genetic distance ( $D$ ) in 4 wild stocks of *C. japonica*

群体 stock	DL	LZ	QD	HZ
DL		0.653 4	0.654 7	0.620 0
LZ	0.425 6		0.496 4	0.454 0
QD	0.423 6	0.700 4		0.702 2
HZ	0.478 0	0.789 7	0.353 5	

注:对角线以上是遗传相似性系数,对角线以下是遗传距离。  
Notes: Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal)

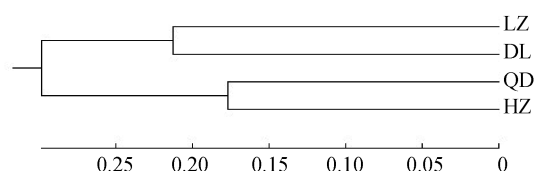


图 2 4 个野生日本螭群体的 UPGMA 聚类图  
Fig. 2 Cluster dendrogram of 4 wild stocks of *C. japonica*

### 3 讨论

遗传多样性(genetic diversity)是指生物所携带遗传信息的总和,它不仅指遗传变异高低,也包括遗传变异分布格局,即群体的遗传结构。它是物种适应多变的环境条件、维持长期生存和进化的基础,一个物种的遗传变异愈丰富,该物种对生存环境的适应能力便愈强,它的进化潜力也愈大<sup>[13-14]</sup>。

由于微卫星标记其较高的多态性,在检测种群异质性方面有明显优势,能更多地揭示群体的遗传变异水平。微卫星的多态性来源于核心序列重复数的变异,一般重复数越多,其变异就越大,该位点的等位基因数就越多,其多态性就越丰富<sup>[15]</sup>。但等位基因多样性用某个位点的实际等位基因数来衡量,该指标比平均杂合度更为敏感,更易受到外部环境因素的影响<sup>[16]</sup>,因此更适合评价群体近期的遗传变异水平。本实验所获得的平均等位基因数为 11~17,这说明 4 个日本螭野生群体遗传变异程度很高,具有丰富的微卫星遗传多样性。O'REILLY 等<sup>[17]</sup>认为对于具有较少等位位点的微卫星标记,比较适合用于群体遗传学研究,而对于多态性较高的微卫星标记,则可以用于构建遗传图谱和家系分析等。因此本研究所采用的 10 对微卫星引物均可用来构建遗传连锁图谱。有效等位基因数是基因一致度的倒数,反映了等位基因间的相互影响。本研究中的有效等位基因数为 6.371 1~12.407 9,说明 4 个日本螭野生群体在这 10 个微卫星位点上具有较高的有效等位基因数,在发生选择、突变或遗传漂变时,群体保持其等位基因的能力较强。

本研究所采用的 10 个微卫星位点平均多态信息含量( $PIC$ )介于 0.828 0~0.914 0,根据 BOTSTEIN 等<sup>[18]</sup>提出的标准,属于高度多态性( $PIC > 0.5$ ),因此这些标记用于遗传多样性分析效果更好。梁利群等<sup>[19]</sup>推算了乌苏里江哲罗鱼的  $PIC$  值范围为 0.28 01~0.635 1;谭杰等<sup>[20]</sup>应用 9 对引物对 3 个地理群体的仿刺参进行 PCR 扩增,计算出各个位点的  $PIC$  值从 0.512 9 到 0.879 4,均低于本研究结果。群体平均基因杂合度的高低反映了群体遗传一致性的程度。群体平均基因杂合度越低,反映该群体的遗传一致性越高,也就是说群体的遗传变异越少,群体的遗传多样性越差<sup>[21]</sup>。孟宪红等<sup>[22]</sup>报道了黄、渤海海域 7 个不同地理群体的中国对虾平均观测杂合度为 0.638~0.713,平均期望杂合度为 0.810~0.864;冯建彬等<sup>[23]</sup>检测出洪泽湖日本沼虾 9 个野生群体平均期望杂合度介于 0.982~0.804 4。本研究中 4 个日本螭野生群体的平均期望杂合度( $H_e$ )为 0.846 6~0.923 9,平均观测杂合度( $H_o$ )为 0.318 2~0.858 4,与以上两个报道的结果相近。因此,可以判断 4 个日本螭野生群体的杂合度相

对较高,群体内遗传变异较大,具有丰富的遗传多样性。

Hardy-Weinberg 平衡遗传偏离指数( $D$ )亦称  $F$  固定指数( $F$ ),反映了  $H_o$  和  $H_e$  两者间的平衡关系, $F$  越接近 0,基因型的分布越接近于平衡状态, $F$  为正时反映杂合子过剩, $F$  为负时则处于杂合子缺失状态。杂合子过剩现象一般出现在研究对象为相对小的群体或者封闭群体,如一个养殖群体里面的子代群体是由有限的亲本所产生,创造者效应和瓶颈效应会导致连锁不平衡现象<sup>[24]</sup>。而杂合子缺失除了与无效基因和研究样本范围大小有关外,还可能由种群退化、性别比例不均衡、亲缘近交和人为干扰程度大等导致稀有碱基的丢失所致<sup>[25]</sup>。本研究各位点在 4 个群体中均表现为杂合子缺失( $D < 0$ ),且每个群体中至少有 4 个位点偏离平衡,这与张庭等<sup>[26]</sup>报道的 4 个奥利亚罗非鱼群体的杂合子缺失结果一致。这也反映了在这些位点上发生了一定程度的遗传信息的丢失。结合多态信息含量等信息,表明我国这 4 个日本鳎野生地理群体的遗传多样性虽然较高,但已表现出一定程度的丧失,造成这种现象的主要原因可能是由于海区环境变化和人为捕捞过度等导致日本鳎野生群体数量大量减少,致使遗传结构改变。另外许多其它原因也可能导致 Hardy-Weinberg 平衡指数的偏离,比如人工选择(育)、零等位基因、迁移、突变与近交等<sup>[27]</sup>。

$F_{ST}$  是群体衡量群体间遗传分化程度的重要参数。当该参数在 0 ~ 0.05 时,群体间遗传分化较弱;0.05 ~ 0.15 时,遗传分化中等;0.15 ~ 0.25 时,遗传分化较大;当大于 0.25 时,表示群体间分化极大<sup>[28]</sup>。本研究中,群体之间的  $F_{ST}$  值介于 0.032 7 ~ 0.088 0,属于中等程度以下的分化。除了青岛鳌山湾与海州湾、大连黑石礁与莱州湾、大连黑石礁与青岛鳌山湾群体间的遗传分化较弱外,其余两两群体之间的  $F_{ST}$  值均大于 0.05,呈中等分化水平。这与胡雪松等<sup>[29]</sup>报道的 3 个德国镜鲤养殖群体间的遗传分化微弱相似。

CRAWFORD 等<sup>[30]</sup>指出由微卫星得出的遗传距离更能反映分化时间的长短,可客观反映群体间的遗传变异和分化。本研究用微卫星标记分析 4 个群体间的遗传距离,结果表明莱州湾和海州湾群体间的遗传距离最大,莱州湾和青岛鳌山湾群体间的遗传距离次之,青岛鳌山湾与海州湾

群体间的遗传距离最小。刘必谦等<sup>[31]</sup>在对 4 个不同地区的大连湾牡蛎进行研究时发现,相邻群体的遗传差异不明显,且遗传差异与地理位置有关,地理位置相距越远,遗传差异越明显。据测可能是山东半岛阻碍了莱州湾、大连黑石礁与其它两个群体之间的基因交流,因此聚类分析后莱州湾和海州湾群体间的亲缘关系较远是正常的。这个结果提示人们在人工繁育时,可进行杂交优势利用来培育出新优良品种。现代杂交优势理论认为杂交优势的大小在一定程度取决于亲本间遗传差异的大小,遗传距离愈大所产生的杂交优势愈大。所以,可选择遗传距离较大而又具有良好性状的日本鳎进行杂交实验,并评估最优杂交组合,培养优良新品种<sup>[32]</sup>。

本文研究揭示了这 4 个日本鳎野生群体内遗传变异较大,具有丰富的遗传多样性,群体间存在中等程度以下的分化。最大限度地维持日本鳎种内遗传多样性水平,是持续利用其种质资源的前提。本文对日本鳎不同地理群体遗传多样性的研究有助于人们更清楚地认识其多样性的起源和进化,为日本鳎的选择育种和遗传改良提供遗传背景信息。

#### 参考文献:

- [1] 何平. 真核生物中的微卫星及其应用[J]. 遗传, 1998, 20(4): 42-47.
- [2] 刘志毅, 相建海. 微卫星 DNA 分子标记在海洋动物遗传分析中的应用[J]. 海洋科学, 2001, 25(6): 11-13.
- [3] 谢丽, 陈国良, 叶富良, 等. 凡纳滨对虾 4 个选育群体遗传多样性的 SSR 分析[J]. 广东海洋大学学报, 2009, 29(4): 5-9.
- [4] 常玉梅, 孙效文, 梁利群. 中国鲤几个代表种群基因组 DNA 遗传多样性分析[J]. 水产学报, 2004, 28(5): 481-486.
- [5] 杜长斌, 楼允东, 沈俊宝, 等. 微卫星分子标记技术在鱼类遗传连锁图谱构建中的应用[J]. 上海水产大学学报, 2000, 9(3): 254-258.
- [6] 孙效文, 张晓锋, 赵莹莹, 等. 水产生物微卫星标记技术研究进展及其应用[J]. 中国水产科学, 2008, 15(4): 689-703.
- [7] 颌晓勇, 李思发, 蔡完其. 吉富品系尼罗罗非鱼选育过程中遗传变异的微卫星分析[J]. 水产学报, 2007, 31(3): 385-390.
- [8] 宋春妮, 李健, 刘萍, 等. 日本鳎微卫星富集文库的

- 建立与多态性标记的筛选[J]. 水产学报, 2011, 35(1): 35-42.
- [9] KANCEE C, SUPAWADEE P, UTHAIRAT N, *et al.* Genetic diversity of hatchery stocks of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) in Thailand[J]. Aquaculture, 2007, 271: 121-129.
- [10] SAMBROOK J, RUSSELL D W. Molecular Cloning: A laboratory manual [M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [11] BRENNER S, ELGAR G, SANDFORD R, *et al.* Characterization of the pufferfish (*Fugu*) genome as a compact model vertebrate genome [J]. Nature, 1993, 336: 256-259.
- [12] NEI M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. Genetics, 1978, 89: 583-590.
- [13] 张文静, 余育, 沈韞芬. 微卫星 DNA 遗传分析在原生动物学中的研究进展[J]. 水生生物学报, 2003, 27(2): 185-190.
- [14] O'CONNELL M. Microsatellite DNA in fishes [M]. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 1997: 331-363.
- [15] 钟金城, 赵素君, 陈智华, 等. 牦牛品种的遗传多样性及其分类研究[J]. 中国农业科学, 2006, 39(2): 389-97.
- [16] NEI M, MARUYAMA T, CHAKRABORTY R. The bottleneck effect and genetic variability in populations [J]. Evolution, 1975, 29: 1-10.
- [17] O'REILLY P, WRIGHT J M. The evolving technology of DNA fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture [J]. Journal of Fish Biology, 1995, 47(suppl): 29-35.
- [18] BOTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. American Journal of Human Genetics, 1980, 32: 314-331.
- [19] 梁利群, 常玉梅, 董崇智, 等. 微卫星 DNA 标记对乌苏里江哲罗鱼遗传多样性的分析[J]. 水产学报, 2004, 28(5): 481-486.
- [20] 谭杰, 孙慧玲, 刘萍, 等. 3 个仿刺参地理种群遗传变异的微卫星 DNA 分析[J]. 水产学报, 2007, 31(4): 437-442.
- [21] LEBERG P L. Estimating allelic richness: effects of sample size and bottlenecks [J]. Molecular Ecology, 2002, 11: 2445-2449.
- [22] 孟宪红, 孔杰, 王清印, 等. 微卫星标记技术对黄、渤海海域 7 个不同地理群体中国对虾的遗传结构和遗传分化研究[J]. 海洋水产研究, 2008, 29(5): 1-10.
- [23] 冯建彬, 马克异, 李家乐, 等. 日本沼虾微卫星引物筛选及群体遗传多样性分析[J]. 水产学报, 2010, 34(5): 688-695.
- [24] 刘云国, 陈松林, 李八方. 牙鲆养殖群体遗传变异的微卫星标记研究[J]. 海洋水产研究, 2005, 26(5): 28-32.
- [25] SUCI A, UTHAIRAT N N, WORAWUT K. Study of genetic diversity of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, from Thailand and Indonesia using microsatellite markers [J]. Marine Biotechnology, 2005: 1-10.
- [26] 张庭, 卢迈新, 叶星, 等. 四个奥利亚罗非鱼群体的微卫星分析[J]. 水生生物学报, 2009, 33(3): 498-508.
- [27] 廖小林, 俞小牧, 谭德清, 等. 长江水系草鱼遗传多样性的微卫星 DNA 分析[J]. 水生生物学报, 2005, 29(2): 13-119.
- [28] HART D L, CLARK A G. Principles of population genetics [M]. 3rd ed. Sunderland: Sinauer associates, Inc, 1997.
- [29] 胡雪松, 李池陶, 马波, 等. 3 个德国镜鲤养殖群体遗传变异的微卫星分析[J]. 水产学报, 2007, 31(5): 575-582.
- [30] CRAWFORD A M, LITTLEPOHN R P. The use of DNA marker in deciding conservation priorities in sheep and other livestock [J]. Animal Genetic Resources Information, 1998, 23: 21-26.
- [31] 刘必谦, 戴继勋, 喻子牛. RAPD 标记在大连湾牡蛎种群研究中的应用[J]. 青岛海洋大学学报, 1998, 8(1): 82-88.
- [32] 孙少华, 桑润滋, 师守玺. 肉牛杂交优势预测及其应用研究[J]. 遗传学报, 2000, 27(7): 580-589.

## Microsatellite analysis of genetic diversity in 4 wild populations of *Charybdis japonica*

SONG Chun-ni<sup>1,2</sup>, LI Jian<sup>1\*</sup>, LIU Ping<sup>1</sup>, CHEN Ping<sup>1</sup>, GAO Bao-quan<sup>1</sup>

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. College of Life Science and Technology, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

**Abstract:** Genetic diversity of 4 wild populations (Laizhou, Haizhou, Dalian, Qingdao) of *Charybdis japonica* was assessed by 10 microsatellite markers. Results showed that the number of averages allele of 10 loci was 13.600 0 and alleles obtained from different primers ranged from 11 to 17, the number of average effective alleles was 8.592 0; Observed heterozygosity value ( $H_o$ ) was 0.318 2 to 0.858 4 and expected heterozygosity value ( $H_e$ ) was 0.846 6 to 0.923 9; Average polymorphism information contents was 0.828 0 to 0.914 0, explained high level of genetic diversity in 4 wild stocks. Coefficient of gene differentiation  $F_{ST}$  ranged from 0.032 74 to 0.088 03, each group had larger genetic differentiation. Genetic identity ( $I$ ), genetic distance ( $D$ ) and cluster dendrogram between 4 stocks of *C. japonica* showed that Qingdao Bay was closest relative with Haizhou Bay stock, but Haizhou Bay was farthest relative with Laizhou Bay stock.

**Key words:** *Charybdis japonica*; wild populations; microsatellite; genetic diversity

**Corresponding author:** LI Jian. E-mail: lijian@ysfri.ac.cn