

拟穴青蟹群体遗传多样性的 ISSR 分析 Genetic Diversity of Geographic Populations of *Scylla Paramamosain* Based on ISSR Markers

蔡小辉,彭银辉,宋忠魁,阎冰,杨家林

CAI Xiao-hui, PENG Yin-hui, SONG Zhong-kui, YAN Bing, YANG Jia-lin

(广西海洋研究所广西海洋生物技术重点实验室,广西北海 536000)

(Guangxi Key Laboratory of Marine Biotechnology, Guangxi Institute of Oceanology, Beihai, Guangxi, 536000, China)

摘要:采用 ISSR 技术对拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 3 个地理群体:福建群体(FJ)、广西防城港群体(FC)和北海群体(BH)的遗传多样性进行检测。用 10 对 ISSR 引物对 90 个个体进行 PCR 扩增,用 POPGENE32 计算遗传参数,并用 ARLEQUIN 软件进行 AMOVA 分子变异分析。结果共检测到 63 个位点,多态位点数为 56。福建、防城港和北海群体 Nei's 基因多样性指数 (H_e) 分别为 0.2670、0.1819 和 0.2257, Shannon's 信息指数 (I) 分别为 0.3945、0.2708 和 0.3371,遗传多样性水平从高到低依次为 FJ>FC>BH。 H_e 和 I 在群体水平上分别为 0.2248 和 0.3341,在物种水平上分别为 0.3186 和 0.4337。拟穴青蟹 32.34% 的变异发生在群体间,67.66% 的变异发生在群体内,3 个群体间的遗传分化系数为 0.1542,产生了一定的遗传分化。

关键词:拟穴青蟹 遗传多样性 ISSR

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2011)04-0376-04

Abstract: The molecular marker technique of inter-simple sequence repeat (ISSR) was used to analyze the genetic diversity in three geographic populations of *Scylla paramamosain*, which were taken from Zhangzhou in Fujian, Fangchenggang and Beihai in Guangxi. A total of 63 loci from 60 individuals were amplified by polymerase-chain-reaction (PCR) with 10 primers. The Number of polymorphic loci were 56. The Nei's gene diversity of Fujian, Beihai and Fangchenggang populations was 0.2670, 0.1819 and 0.2257, respectively. The Shannon's information index was 0.3945, 0.2708 and 0.3371, respectively, showing that the abundance of genetic diversity in the three populations arranged in a decent order was FJ>FC>BH. The Nei's gene diversity and Shannon's information index of *Scylla paramamosain* was 0.2248 and 0.3341 at species, 0.3186 and 0.4337 at population level, respectively, showing that the genetic diversity of *S. paramamosain* was relatively high. An analysis of the molecular variance (AMOVA) demonstrated that the among-population component accounted for 32.34% of the total variation, while the within-population component accounted for 67.66%. The within-population genetic variation was apparently larger than the among-population. The genetic differentiation coefficient (G_{st}) among the three populations was 0.1542. There was genetic differentiation between Fujian and the other two populations.

Key words: *Scylla paramamosain*, genetic diversity, ISSR

拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 隶属于甲壳

纲、十足目、短尾亚目、梭子蟹科、青蟹属,广泛分布于印度—西太平洋沿岸水域的红树林地区以及河口内湾区,为我国大陆东南沿海青蟹属的优势种^[1],是我国东南沿海海水经济蟹类重要的养殖品种之一。

随着捕捞强度的加大以及近海海域环境的污染,

收稿日期:2011-01-07

作者简介:蔡小辉(1982-),女,助理研究员,主要从事水产生物技术研究。

拟穴青蟹野生资源呈现衰退迹象。多年来科研工作者致力于拟穴青蟹的繁育及人工养殖研究^[2,3],而对我国东南沿海拟穴青蟹的种群遗传学背景的研究较少。本文利用 ISSR(inter-simple sequence repeat)技术,对福建和广西拟穴青蟹群体的遗传多样性进行分析,以揭示其遗传结构、遗传多样性水平及其差异,为拟穴青蟹的种质资源评价和保护策略的制定及其养殖、育种等提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用拟穴青蟹采集于福建漳州东山湾、广西防城港红树林区和北海红树林区,分别命名为福建群体(FJ)、防城港群体(FC)和北海群体(BH)。每群体取样30个,取蟹足肌肉,-20℃保存备用。

1.2 基因组 DNA 的提取

采用常规的 SDS/蛋白酶 K 裂解、酚/氯仿法提取基因组 DNA,空气晾干,用适量无菌双蒸水溶解。以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳(缓冲液为 0.5×TBE)检测其质量,使用 Eppendorf 公司的 Bio Photometer 核酸检测仪检测基因组 DNA 溶液的浓度与纯度,并用灭菌水将其稀释至 50ng/μl,-20℃保存备用。

1.3 ISSR-PCR 扩增及产物检测

于上海生工生物工程技术有限公司合成由加拿大 British Columbia 大学公布的 100 套 ISSR 引物(<http://www.Michaelsmith.Ubc.Ca/services/NAPS/Prime-Sets/Primers>)。通过改变退火温度、镁离子浓度和 DNA 模板浓度等优化 ISSR-PCR 反应条件,最终选取扩增产物稳定、多态性高且清晰的 10 条引物用于本实验扩增。

ISSR-PCR 扩增反应体系:12.5μl 反应体系中含有 Mg²⁺ 2.5 mmol/L、dNTP 0.2 mmol/L、引物 0.25 mmol/L、Taq 酶 0.5 U、模板 DNA 50ng。PCR 反应程序:94℃ 预变性 5min,94℃ 变性 45 s,52℃ 退火 45s,72℃ 延伸 90s,40 个循环后,72℃ 延伸 10min。实验所用 MgCl₂、dNTP 及 Taq DNA 聚合酶等试剂由上海申能博彩生物技术有限公司提供。

扩增产物的检测:以用 EB 染色的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离,100V 电压,电泳 2h,用自动凝胶成像仪(Alpha innotech, USA)观察、拍照并存储图像。

1.4 数据统计与分析

由相同引物扩增的、电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性。将 ISSR 电泳图谱按照凝胶同一位置上 DNA 条带的有无进行人工读带,有条带的记为“1”,无条带以及条带模糊的记为“0”,获得 0、1 原始

数据矩阵。利用 POPGENE32 计算拟穴青蟹不同地理群体间和群体内的遗传参数,包括多态位点百分率(P)、有效等位基因数(Ne)、Nei's 基因多样性指数(He)、Shannon's 信息指数(I)、居群间的遗传分化系数(Gst)、基因流(Nm)和遗传距离(D)。利用 ARLEQUIN(V2.0)软件对群体间和群体内的遗传变异进行 AMOVA 分子变异分析(analysis of molecular variance)。

2 结果与分析

2.1 ISSR-PCR 扩增

本实验利用筛选出的 10 条多态性好、扩增条带稳定的 ISSR 引物,对拟穴青蟹 3 个地理群体共 90 个个体进行 PCR 扩增。结果共得到 63 个位点,多态位点数为 56,平均多态位点百分率达 88.9%(表 1)。由电泳图谱可见,所扩增条带大小为 100~1000bp,主要集中在 250~700bp(图 1)。

表 1 10 条引物对拟穴青蟹扩增结果

Table 1 Amplification results of *Scylla paramamosain* with 10 ISSR primers

引物编号 Primer code	序列 Sequence	扩增位点 No. of amplified loci	多态位点数 No. of polymorphic loci	P (%)
825	(AC) ₈ T	8	7	87.5
835	(AG) ₈ YA	5	4	80.0
836	(CT) ₈ RG	6	6	100.0
845	(CA) ₈ RC	5	4	80.0
847	(CA) ₈ RC	6	5	83.3
850	(GT) ₈ YC	6	5	83.3
854	(TC) ₈ RG	6	4	66.7
855	(AC) ₈ YT	6	3	50.0
876	(GATA) ₂ (GA-CA) ₂	6	5	83.3
881	(GGGTG) ₃	9	6	66.7

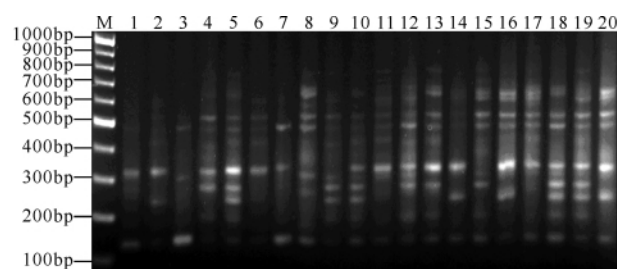


图 1 引物 876 对拟穴青蟹北海群体中 20 个个体的 ISSR 扩增结果

Fig. 1 ISSR amplification result of primer 876 in the population of *S. paramamosain* from Beihai

M:100 bp DNA Ladder Plus Marker;1~20:个体序号。

M:100 bp DNA Ladder Plus Marker;1~20:The individuals of *S. paramamosain*.

2.2 拟穴青蟹群体的遗传多样性

结果显示,3个地理群体遗传多样性差异较显著,其中福建群体遗传多样性最高,防城港群体次之,北海群体最低; H_e 和 I 在群体水平上分别为 0.2248 和 0.3341,在物种水平上分别为 0.3186 和 0.4337 (表 2)。说明拟穴青蟹群体具有较高的遗传多样性水平,物种水平的遗传多样性高于群体水平。

表 2 拟穴青蟹 3 个地理群体的遗传多样性

Table 2 Genetic diversity in the three populations of *S. paramamosain*

群体 Population	$P(\%)$	N_e	H_e	I
FJ	69.84	1.4605± 0.3705	0.2670± 0.1964	0.3945± 0.2793
FC	63.49	1.3902± 0.3646	0.2257± 0.1998	0.3371± 0.2849
BH	49.21	1.3851± 0.3704	0.1819± 0.2006	0.2708± 0.2904
平均 Mean	60.85	1.4119	0.2248	0.3341
物种水平 At species level	88.89	1.5565± 0.3616	0.3186± 0.1730	0.4737± 0.2290

2.3 拟穴青蟹群体间的遗传结构

由 POPGENE32 计算出 3 个群体间总的遗传分化系数为 0.1542,说明 3 个群体间产生了一定程度的遗传分化。利用 AMOVA 分析得出,拟穴青蟹 32.34% 的变异发生在群体间,67.66% 的变异发生在群体内(表 3),群体内遗传变异大于群体间。3 个群体间的遗传距离与遗传相似系数见表 4,由遗传分化系数估算的基因流 [$Nm = 0.5(1 - G_{st}) / G_{st}$] 为 2.7425。

表 3 拟穴青蟹群体的分子方差分析

Table 3 Analysis of molecular variance for *S. paramamosain*

变异来源 Source of variation	自由度 d. f.	离差 平方和 SSD	变异成分 Variance components	变异百分率 The percentage of variance (%)
群体间 Among population	2	191.8667	2.9892	32.34
群体内 Within population	87	544.1667	6.5478	67.66

表 4 拟穴青蟹 3 个地理群体间遗传距离和遗传相似系数

Table 4 Genetic distance and genetic similarity coefficient matrix among 3 populations of *S. paramamosain*

群体 Population	BH	FC	FJ
BH		0.9120	0.8522
FC	0.0921		0.8700
FJ	0.1504	0.1344	

根据 3 个群体间的遗传距离和遗传相似系数,用 UPGMA 法构建聚类图(图 2),发现北海群体与防城

港群体首先聚在一起,然后与福建群体聚在一起。

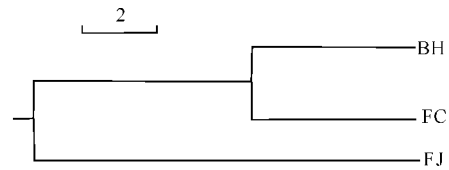


图 2 拟穴青蟹 3 个地理群体的 UPGMA 聚类图

Fig. 2 UPGMA clustering among the three geographic populations of *S. paramamosain*

3 讨论

3.1 ISSR 检测拟穴青蟹遗传多样性的可行性

ISSR 是近年来在微卫星技术上发展起来的一种新型标记技术。它具有模板 DNA 用量少、多态性丰富、稳定性好等特点,可以快速、高效和灵敏地检测出大样本基因组 DNA 的多态性,在种群遗传学、种质资源、分类学与种系发生学等方面已经得到广泛的应用^[4-6]。ISSR 技术已经被用于研究虾蟹等海洋经济动物^[7,8]。本研究的结果显示,用 ISSR 标记的拟穴青蟹群体遗传结构呈现的多态性较高,可以将 ISSR 标记用于拟穴青蟹种群遗传学研究。

3.2 拟穴青蟹的遗传多样性

本研究发现拟穴青蟹在物种水平上的多态位点百分率达 88.89%,高于用 RAPD 标记的青蟹属的其它 3 个种(*S. tranquebarica*, *S. olivacea*, *S. serrata*) 的多态位点百分率(47.92%~77.59%)^[9]。原因是 ISSR 标记比 RAPD 呈现更高的多态性,而且拟穴青蟹的遗传多样性水平高于其它 3 种青蟹,可能与拟穴青蟹是青蟹属中的最优势种有关^[1]。本研究得出的拟穴青蟹多态位点百分率也高于中国大陆 7 水系绒螯蟹种群的多态位点百分率(66.3%)^[8]和三疣梭子蟹的多态位点百分率(82.2%)^[10]。 H_e 和 I 在拟穴青蟹群体水平上分别为 0.2248 和 0.3341,显示拟穴青蟹的遗传多样性水平较高。路心平等^[11]利用 CO I 标记分析了中国东南沿海拟穴青蟹种群遗传结构,也发现其遗传多样性水平属于中等偏高。

拟穴青蟹自然群体的遗传多样性比较高,这为其遗传选育提供了丰富的物质基础。而遗传多样性降低会导致其适应能力降低、有害隐性基因表达增加以及经济性状衰退,最终导致物种退化。Ling 等^[12]采用 RAPD 和 AFLP 标记显示,养殖的拟穴青蟹群体的遗传多样性低于野生群体,且当前野生拟穴青蟹资源越来越少,在这种情况下实施保护和选育是非常重要的。

3.3 拟穴青蟹地理群体间的遗传分化

遗传分化系数是群体间遗传分化程度的一个重

要参数^[13]。本研究得出拟穴青蟹 3 个群体的总的遗传分化系数为 0.1542, 变异主要来自群体内(占 67.66%)。V C 利用 SSR 标记印度—西太平洋拟穴青蟹, 也发现其群体分化较低, 主要的变异来自群体内^[14]。本研究中北海、防城港与福建群体间的遗传距离分别为 0.1504、0.1344, 表明福建群体与广西两个群体的产生了一定的分化。路心平等^[11]研究也发现广西北海种群与其它地理种群的遗传分化显著。可能是因为广西群体地处北部湾海域, 与福建海域相比较, 处于一个较封闭的环境, 北部湾的拟穴青蟹与其它海域的种群个体基因交流较少, 出现一定程度的群体遗传分化。

分子标记可以直接反映某物种基因组中广泛发生的遗传变异, 是研究种群遗传多样性的有力手段。本研究的样本取样地点较少, 应多采集沿海各地理群体的拟穴青蟹, 结合其它分子标记技术和形态学特征等进行分析, 以便更全面、客观的反映我国东南沿海拟穴青蟹的遗传结构。同时应加强对拟穴青蟹遗传多样性的监测和评估, 通过选择育种防止种质退化和优良性状的丧失, 保证其优良种质得以可持续利用和健康发展。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 李少菁, 王桂忠. 锯缘青蟹繁殖生物学及人工育苗和养成技术的研究[J]. 厦门大学学报, 2001, 40(2): 552-565.
- [3] 彭慧婧, 蒋艳, 杨家林, 等. 两种补充营养在锯缘青蟹育苗中后期的效果分析[J]. 广西科学, 2008, 15(4): 449-451.
- [4] Mattionai C, Casasoli M, Gonzalez M, et al. Comparison of ISSR and RAPD markers to characterize three Chilean *Nothofagus* species[J]. Theor Appl Genet, 2002, 104(6-7): 1064-1070.
- [5] Adams R P, Schw Arzbach A E, Pandey R N. The concordance of tetraploid, ISSR and RAPD markers, and ITS sequence data sets among genotypes: an example from *Juniperus* [J]. Biochem Systematics and Ecol, 2003, 31(4): 375-387.
- [6] 朴红梅, 李万良, 穆楠. ISSR 标记的研究与应用[J]. 吉林农业科学, 2007, 32(5): 28-30.
- [7] 王伟继, 孔杰. ISSR-PCR 技术在对虾中的应用初步研究[J]. 海洋水产研究, 2002, 23(1): 1-4.
- [8] 郑芳. 用 ISSR 分子标记检测中国大陆绒螯蟹种群遗传多样性[D]. 南京: 南京师范大学, 2006.
- [9] Klinbunga S, Boonyapakdee A, Pratoomchat B. Genetic diversity and species-diagnostic markers of Mud Crabs (Genus *Scylla*) in Eastern Thailand determined by RAPD analysis[J]. Marine Biotechnology, 1999, 2(2): 180-187.
- [10] 迟大利. 三疣梭子蟹两种体色相关分析标记研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2009.
- [11] 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): 16-23.
- [12] Ling Q, Li S J, Li Z B. Genetic structure of the Hatchery and wild *Scylla Paramamosain* populations using RAPD and AFLP techniques[J]. Environmental Science and Information Application Technology, 2009, 3(6): 43-46.
- [13] Buso G S C, Rangel P H, Ferreira M E. Analysis of genetic variability in South American wild rice populations (*Oryza glumaepatula*) with isozymes and RAPD markers[J]. Molecular Ecology, 1998, 7(1): 107-117.
- [14] V C Le. Genetic resources in wild and cultured stocks of the Asian mud crab, *Scylla paramamosain* [D]. Brisbane: Queensland University of Technology, 2010.

(责任编辑: 陈小玲)