中国鲎(*Tachypleus tridentatus*)微卫星标记筛选及种群遗传多样性和遗传结构分析*

翁朝红 谢仰杰① 肖志群 王志勇

(集美大学水产学院 农业农村部东海海水健康养殖重点实验室 厦门 361021)

摘要 采用 FIASCO 方法构建了中国鲎(*Tachypleus tridentatus*)$(CA)_n$微卫星富集文库, 对 214 个阳性克隆进行测序, 筛选获得 60 条含有微卫星的序列, 其中可设计引物的序列共 38 条。38 对微卫星引物在 37 个中国鲎个体中 PCR 检测发现, 只有 9 个位点具有多态性, 其等位基因数为 5—14 个, 每个位点平均具有 8.1 个等位基因。9 个位点之间不存在连锁。利用该 9 个具有多态性微卫星标记分析了中国沿海 9 个中国鲎地理群体的种群遗传多样性和遗传结构。结果表明: 中国沿海的中国鲎种群遗传多态性水平仍较高, 9 个地方群体间无遗传差异, 它们之间未见显著分化, 且有着较高的基因流; 推测人为的迁移是造成遗传无分化的主要原因。我们建议中国鲎已绝迹的海域可从其他海域引入中国鲎个体来恢复地方群体资源。

关键词 中国鲎; 微卫星标记; FIASCO; 遗传多样性; 遗传结构

中图分类号 Q958.2 doi: 10.11693/hyhz20191100204

中国鲎(*Tachypleus tridentatus*)隶属节肢动物门(Arthropoda)、螯肢亚门(Chelicerata)、肢口纲(Merostomata), 为现存仅有 4 种鲎之一。鲎具有重要的药用价值和食用价值, 由其血细胞溶解液制备的鲎试剂为目前用于检测内毒素的常规试剂, 应用广泛, 如应用于临床检验、医药行业和食品加工业等各个领域(颜明艳等, 2018); 鲎被沿海民众视为海鲜美食甚至滋补品或药用, 食鲎文化已有上千年历史记载(廖永岩等, 1998)。中国鲎为亚洲 3 种鲎中分布最广、经济价值最大的一种。30—40 年前, 中国鲎曾广泛分布于北至长江口、南到北部湾的中国沿海海域(Sekiguchi, 1988; 廖永岩等, 2006; 翁朝红等, 2012)。但近几十年来由于鲎试剂生产和海鲜美食的旺盛需求使中国鲎遭遇酷渔滥捕(翁朝红等, 2012), 而沿海经济的快速发展和人口剧增, 因填海造地、海洋工程发展以及旅游用地需要, 使潮间带幼鲎栖息地遭受严重破坏和环境污染, 导致中国鲎已在中国东南沿海许多海域销声匿迹, 分布范围在急速缩小, 分布区片段化。种群个体数量下降的同时, 往往引起遗传多样性下降, 也导致近交发生和有害等位基因固定, 这些因素引起物种适应力下降, 也将导致物种灭绝可能性增加(Bush *et al*, 2011)。因此中国鲎资源亟待保护。

微卫星标记(microsatellite, SSR)由于在基因组中数量大、多态性高、共显性、等位基因多、灵敏度高、在检测中操作简便、结果可靠、通用性好等多方面优点, 已广泛应用于海洋动物种群遗传多样性分析、遗传图谱构建(Yu *et al*, 2015; Cao *et al*, 2017; Zhao *et al*, 2019)。目前有关中国鲎微卫星标记的开发, Nishida 等 (2010) 通过采用 PIMA (PCR Isolation of Microsatellite Array)方法, 用载体通用引物和另一条为复合微卫星序列的引物 PCR 筛选含有复合微卫星的序列, 获得 8 个多态性 SSR 标记, 等位基因数为 2—4, 多态性不高; Li 等(2009)通过 FIASCO (Fast

* 国家水产种质资源平台项目, 2019DKA30470 号。翁朝红, 博士, 教授, E-mail: wengzhaohong@jmu.edu.cn

① 通信作者: 谢仰杰, 博士, 教授, E-mail: yjxie@jmu.edu.cn

收稿日期: 2019-11-06, 收修改稿日期: 2020-01-19

Isolation by AFLP Sequences Containing Repeats)法筛选了 8 个多态性微卫星位点。

种群遗传结构和遗传多样性信息是制定中国蛏保护和管理策略的基础和理论依据，因此有必要分析中国海域中国蛏的遗传结构和遗传多样性特点，掌握充分的中国蛏种群遗传信息，才能更科学合理地制定保护管理措施。

本研究采用 FIASCO 法构建中国蛏$(CA)_n$微卫星富集文库，通过克隆、测序、设计引物和 PCR 检验以获得多态性微卫星标记；利用这些 SSR 标记分析中国海域中国蛏的遗传多样性和遗传结构特点，以期了解中国海域的中国蛏是否存在亚居群(显著分化的群体)，确定是否存在进化显著单元(ESU)，这些信息将为科学合理地制定中国蛏的保护管理措施提供必要的理论参考资料。

1 材料与方法

1.1 材料

中国蛏样品分别从以下 9 个采样点的临近海域采集：浙江宁海(NH)、浙江温州(WZ)、福建连江(LJ)、福建平潭(PT)、福建湄洲岛(MZ)、福建漳浦(ZP)、广东湛江(ZJ)、广西北海(BH)、海南儋州(DZ)等(采样点信息见图 1 和表 1)。取附肢肌肉置于 95%乙醇中固定，于 4°C 冰箱中保存备用。

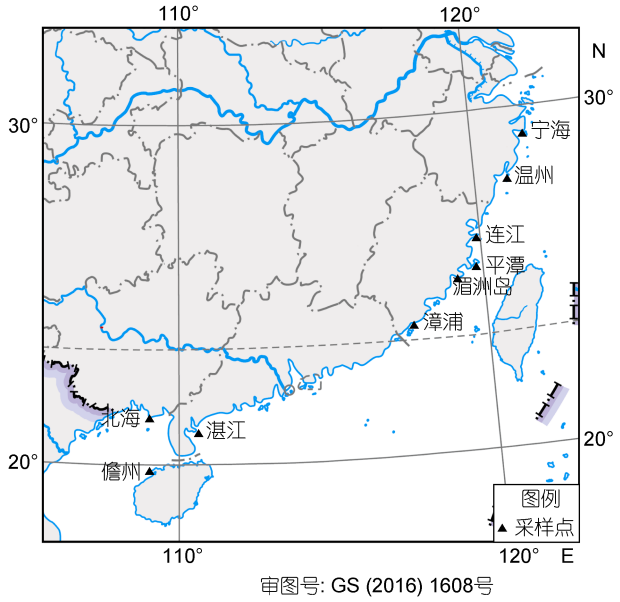


图 1 中国东南沿海中国蛏采样点示意图

Fig.1 The sampling sites of *T. tridentatus* from southeast coast of China

表 1 中国东南沿海中国蛏 9 个采样地信息

Tab.1 The information of nine sampling sites of *T. tridentatus* from southeast coast of China

采样点	缩写	纬度(N)	经度(E)	采样个体数
浙江宁海	NH	29°09′29″	121°42′54″	12
浙江温州	WZ	27°57′04″	121°07′00″	25
福建连江	LJ	26°13′56″	119°42′19″	36
福建平潭	PT	25°25′33″	119°46′07″	50
福建湄洲岛	MZ	25°03′40″	119°04′39″	50
福建漳浦	ZP	23°48′12″	117°33′53″	50
广东湛江	ZJ	20°55′17″	110°33′32″	50
广西北海	BH	21°21′27″	109°05′44″	50
海南儋州	DZ	19°51′33″	109°07′28″	48

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取及检测 所有样品的基因组 DNA 采用传统的苯酚-氯仿抽提方法提取。获得的基因组 DNA 通过 2%琼脂糖凝胶电泳检测其质量，紫外分光光度计 OD_{260} 测定其 DNA 浓度。

1.2.2 微卫星富集文库的构建 微卫星富集文库构建利用 FIASCO (Fast Isolation by AFLP Sequences Containing Repeats)方法(Bloor *et al*, 2001; Zane *et al*, 2002)。基因组 DNA 经限制性内切酶 *Taq*I 酶切后，使用 T4 DNA 连接酶进行接头连接，并使用 *Taq*I primers 对连接产物进行 PCR 扩增。扩增产物经变性后，与生物素标记的$(CA)_{15}$探针杂交，进行微卫星片段的捕获。以获得的含有微卫星片段的目的 DNA 片段为模板，进行 PCR 扩增。PCR 产物与 pMD18-T (TaKaRa)载体连接，纯化后的载体连接产物通过电转化到已制备好的感受态细胞，最终得到中国蛏微卫星文库。

1.2.3 克隆筛选、阳性克隆测序和引物设计 用

M-13 载体通用引物进行 PCR 扩增, 挑取阳性克隆送上海英骏生物技术有限公司测序。对测序结果进行人工分析, 去除载体和接头序列, 挑选含有微卫星的序列, 并用 Premier 5.0 软件设计引物, 并由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.2.4　微卫星多态性检测和序列特征分析　对微卫星引物 PCR 条件进行优化, 并在 37 个中国蛏个体中进行多态性检测。PCR 产物采用 6%的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

利用 Genepop 4.0.1.0 软件(Rousset, 2008)检测每个微卫星座位偏离 Hardy-Weinberg 平衡和 9 个微卫星座位两两之间连锁不平衡(LD)情况; 利用 Arliquin 3.1 计算每个位点等位基因数、观测杂合度(H_o)和期望杂合度(H_e)。哑等位基因(null alleles)及其频率通过 MICRO-CHECKER 2.2.3 软件检测和计算(Van Oosterhout *et al*, 2004)。利用 Cervus 2.0 软件(http://helios.bto.ed.ac.uk/evolgen)分析多态性信息含量(polymorphic information content, PIC)。

1.2.5　群体遗传结构分析

(1) PCR 扩增和变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

采用具有多态性微卫星引物对以上9个中国蛏群体进行扩增, PCR反应体系总体积为 20μL, 包括: 10×Buffer 2μL, dNTPs 1.6μL, Primer F (10mmol/L) 0.5μL, Primer R (10mmol/L) 0.5μL, *Taq* (TaKaRa) 0.2μL, DNA 1.0μL。PCR 程序为: 94°C预变性2min, 94°C变性20s, T_m(根据不同引物而定)退火20s, 72°C延伸30s, 共35个循环, 72°C延伸7min, 4°C保存。PCR产物采用6%的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

(2) 群体遗传结构分析

利用 Cervus 2.0 软件计算基因频率, 分析遗传多样性特点(包括杂合子数、观测杂合度、期望杂合度、多态性信息含量), 每个位点经适合度卡方检验确定是否符合 Hardy-Weinberg 平衡。根据 Summers 等(1997)计算法计算各个微卫星位点的哑等位基因(null allele)频率。利用 Popgene 1.31 软件分析中国蛏各群体遗传多样性系数, Nei 遗传相似度和遗传距离。利用 *Arlequin* 3.1 进行群体遗传分化和 AMOVA 分析, 并运用 Structure 2.2 软件进行聚类分析。

2　结果

2.1　微卫星标记筛选结果

通过 FIASCO 方法进行中国蛏微卫星富集文库构建, 共获得阳性克隆 2020 个, 从中随机挑取 300 个阳性克隆进行 PCR 检测, 对 214 个阳性克隆进行测序, 共获得 60 条含有微卫星的序列, 微卫星阳性比例为 28.04%。其中完美型的占 71.1%, 非完美型的为 10.5%, 复合型的占 18.4%。其中可设计引物的序列有 38 条。

2.2　具多态性的微卫星位点特征分析

38 对 SSR 引物在 37 个中国蛏个体中进行多态性检测。PCR 结果发现, 12 对引物无扩增产物, 17 对引物无多态性, 9 对引物多态性较高。

9 个具有多态性的微卫星位点的等位基因数为 5—14 个, 每个位点平均等位基因数为 8.1; 多态信息含量(PIC)为 0.287—0.885, 平均为 0.637, 除了位点 WTT9 外, 其他位点都高于 0.4, 可见这些多态性微卫星位点具有较高的多态性; 观测观杂合度为 0.189—0.784, 期望杂合度为 0.297—0.906 (表 2)。经检测只有 2 个位点(WTT1 和 WTT8)未偏离 Hardy-Weinberg 平衡(P>0.05), 而其他 7 个位点(WTT2, WTT3, WTT4, WTT5, WTT6, WTT7, WTT9)明显偏离 Hardy-Weinberg 平衡(P<0.05)。连锁不平衡检测结果表明这 9 个位点之间不存在连锁关系(P>0.05)。哑等位基因频率计算和检验结果表明, 除了位点 WTT1 和 WTT8 不存在哑等位基因外, 其他位点都存在哑等位基因(哑等位基因频率都大于 0.12), 且这些位点显示偏离 Hardy-Weinberg 平衡。哑等位基因的存在可能是这些位点偏离 Hardy-Weinberg 平衡的主要原因。MICRO-CHECKER 检验结果表明 9 个 SSR 位点都未有大的等位基因遗失现象(large allele dropout)。固定指数 F_{is} 除了位点 WTT8 为负数外, 其他位点都大于 0, 表明这些位点存在杂合体缺失, 这可能也是引起偏离 Hardy-Weinberg 平衡的另一重要原因。

2.3　中国蛏群体遗传多样性

中国蛏 9 个群体中, 每位点平均等位基因数(A)为 4.71—8.14, 每个位点平均有效等位基因数(N_e)为 2.63—3.56, 数值最高的群体均为广西北海群体; 香侬指数为 1.12—1.39, 群体观测杂合度为 0.46—0.57, 其中北海群体最低, 宁海群体最高; 群体期望杂合度为 0.58—0.64, 其中平潭群体最低, 儋州群体最高。整个中国蛏物种水平上, 平均每位点等位基因数为 11.57, 平均每个位点有效等位基因数为 3.49, 香侬指数为 1.39, 观测杂合度为 0.49, 期望杂合度为 0.62。总体上, 中国蛏种群多态性水平较高(表 3)。

表 2 9 个多态性微卫星位点特征

Tab.2 Characteristics of nine polymorphic microsatellite loci

微卫星位点	扩增产物大小范围(bp)	等位基因数 N_A	多态性信息含量 PIC	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	哑等位基因频率	固定指数 F_{is}	Hardy-Weinberg 平衡
WTT1	195—215	6	0.611	0.514	0.665	0.115*	0.217	NS
WTT2	157—187	14	0.885	0.514	0.906	0.270	0.425	
WTT3	162—192	11	0.845	0.379	0.871	0.388	0.559	
WTT4	154—180	5	0.406	0.351	0.454	0.132	0.214	
WTT5	79—83	5	0.545	0.351	0.590	0.263	0.396	
WTT6	64—110	8	0.609	0.432	0.656	0.225	0.331	
WTT7	180—194	8	0.800	0.568	0.832	0.184	0.308	
WTT8	173—189	8	0.749	0.784	0.789	–0.007*	–0.006	NS
WTT9	162—192	8	0.287	0.189	0.297	0.290	0.354	
平均		8.11	0.637		0.673			

注: *为不存在哑等位基因的位点; NS 指偏离 Hardy-Weinberg 平衡(HWE)不显著(P>0.05)

表 3 中国蛏 9 个群体遗传多样性特征

Tab.3 Polymorphic characteristics of nine groups of *T. tridentatus*

群体	平均等位基因数 A	平均有效等位基因数 N_e	香侬指数 SI	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e
浙江宁海	4.71±2.21	2.63±0.89	1.12±0.46	0.57±0.16	0.60±0.19
浙江温州	6.00±2.58	3.04±1.44	1.24±0.53	0.53±0.25	0.61±0.22
福建连江	6.00±2.31	3.08±1.44	1.24±0.47	0.50±0.18	0.63±0.18
福建平潭	7.57±2.99	3.11±1.86	1.25±0.58	0.47±0.27	0.58±0.24
福建湄洲岛	7.57±2.70	3.20±1.95	1.27±0.54	0.49±0.23	0.61±0.21
福建漳浦	7.29±2.98	3.41±2.22	1.31±0.60	0.47±0.21	0.60±0.24
广东湛江	7.00±2.52	3.19±1.83	1.24±0.57	0.49±0.23	0.59±0.24
海南儋州	7.14±2.27	3.52±1.76	1.37±0.54	0.55±0.23	0.64±0.22
广西北海	8.14±2.54	3.56±2.23	1.39±0.55	0.46±0.20	0.62±0.23
物种水平	11. 57±4.14	3.49±2.20	1.39±0.57	0.49±0.21	0.62±0.22

注: 表中数据为平均值±标准差

2.4 中国东南沿海中国蛏群体间遗传分化分析

对中国大陆沿海9个中国蛏地方群体间的遗传差异进行(AMOVA)分析表明(表4), 100.23%的变异来自群体内, 而群体间的遗传变异为–0.23%。因此, 遗传变异绝大部分来自群体内, 群体间遗传差异极小。9个多态性微卫星标记分析结果表明中国东南沿海中国蛏群体间无遗传差异。

中国蛏9个地方群体间遗传分化系数F_{st}介于–0.04084—0.02615之间, P值显著性检验结果显示, 9个群体两两比较, 均无显著分化(P>0.05)(表5), 支持以上AMOVA分析结果。群体间的基因流最小为13.907, 许多群体间基因流为无限交流状态(表5)。最远的地理距离为宁海与北海之间, 达1767km, 它们之间未见显著分化, 且有着较高的基因流(129.61)。

表 4 中国东南沿海中国蛏 9 个群体间遗传变异的分子变异等级分析**(AMOVA)**

Tab.4 AMOVA analysis of genetic variation among nine populations of *T. tridentatus* in Chinese sea waters

变异来源	变异系数	平方和	变异组分	变异比率(%)	遗传分化系数 F_{st}
群体间	8	10.967	–0.0038 Va	-0.23	–0.00228
群体内	741	1249.201	1.6858 Vb	100.23	
合计	749	1260.168	1.6820		

表 5　中国蛏各地理种群之间遗传分化系数(F_{st})(对角线以下)和基因流(N_m)(对角线以上)

Tab.5　Genetic difference (F_{st}) (below diagonal) and gene flow (N_m) (above diagonal) among nine populations of *T. tridentatus*

	NH	WZ	LJ	PT	MZ	ZP	ZJ	DZ	BH
NH	—	33.403	inf	18.620	inf	106.428	32.363	42.185	129.607
WZ	0.01475	—	58.426	inf	56.179	inf	133.290	76.552	inf
LJ	–0.00343	0.00849	—	13.907	inf	inf	35.427	135.098	inf
PT	0.02615	–0.01543	0.03470	—	inf	inf	inf	inf	inf
MZ	–0.00374	0.00882	–0.00209	–0.00833	—	127.142	28.767	48.092	531.204
ZP	0.00468	–0.00306	–0.01057	–0.04084	0.00392	—	128.654	126.615	163.018
ZJ	0.01521	0.00374	0.01392	–0.03106	0.01708	0.00387	—	65.595	79.114
DZ	0.01171	0.00649	0.00369	–0.02082	0.01029	0.00393	0.00756	—	inf
BH	0.00384	–0.00351	–0.00515	–0.03927	0.00094	0.00306	0.00628	–0.00890	—

注: inf 指无限交流状态

利用 Structure 2.2 对中国蛏种群进行基于个体归类的聚类分析。运行 MCMC 计算方法确定合适的 K 值(聚类分群数), 结果表明 K 从 1 到 10 对应的 ln$Pr(X/K)$(即 ln$P$(D)值)从 K 为 2 开始都是平缓的曲线, 因此 K 为 2 对中国蛏分群是合适的(图 2)。

贝叶斯基因型聚类分析(K=2)结果表明, 9 个中国蛏地理群体的个体较均匀分布于 2 个基因型类群(图 3), 未见任何一个个体独立分配于一个类群当中, 各采样点的个体分群图形相似, 无显著分化的地理群体, 当 K=3 时, 同样未见分化的类群(图 4)。

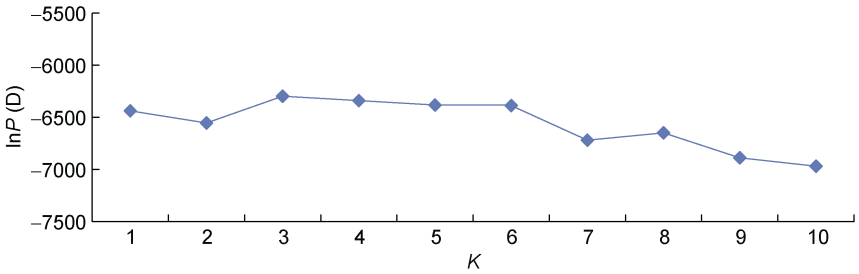


图 2　中国蛏多位点基因型聚类簇 K 从 1 到 10 对应的平均 ln$P$(D)值

Fig.2　The mean ln$P$(D) of 10 runs conducted for K (from 1 to10) for the multilocus genotype data generated for *T. tridentatus*

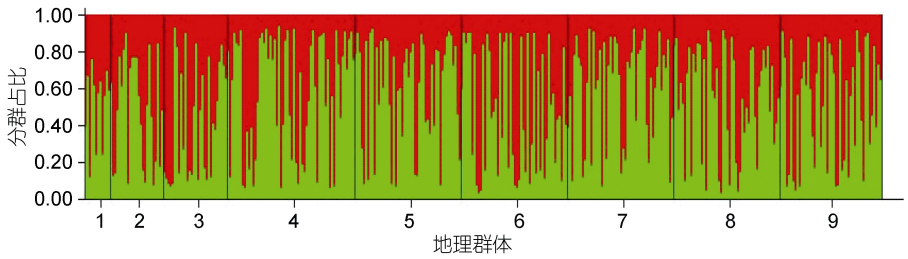


图 3　9 个中国蛏采样点贝叶斯基因型聚类分析(K=2)

Fig.3　Bayesian genotype clustering results for K=2 of nine sampling locations of *T. tridentatus*

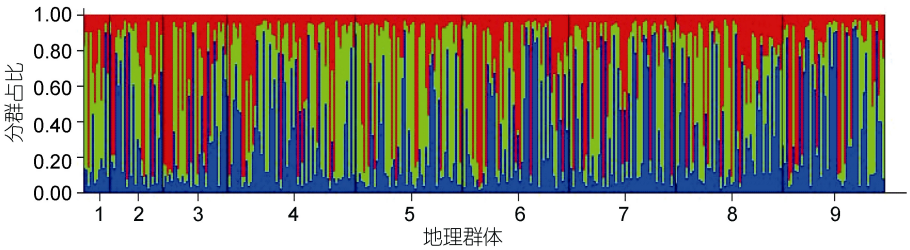


图 4　9 个中国蛏采样点贝叶斯基因型聚类分析(K=3)

Fig.4　Bayesian genotype clustering results for K = 3 of nine sampling locations of *T. tridentatus*

2.5 群体间遗传距离分析

群体间 Nei 遗传相似度和遗传距离分析结果表明(表 6), 9 个地理群体中, 地理位置相隔最近、同属于北部湾海域的北海与儋州群体间遗传相似度最大(0.9748), 遗传距离最小(0.0256), 说明这 2 个群体间亲缘关系最近; 而地理间隔最大的宁海与北海群体之间遗传相似度最小(0.9132), 遗传距离最大(0.0907)。

然而, 中国东南沿海中国蛏 9 个地方群体遗传距离与地理距离之间的相关性经 Mantel 分析结果表明, 遗传距离与地理距离之间无相关性(P=0.462), 未见因地理距离而分化的群体(见图 5)。

表 6 中国蛏 9 个群体间 Nei 遗传相似度(对角线以上)和遗传距离(对角线以下)

Tab.6 Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) of nine populations of *T. tridentatus*

	NH	WZ	LJ	PT	MZ	ZP	ZJ	DZ	BH
NH	—	0.9141	0.9388	0.9223	0.9374	0.9287	0.9329	0.9221	0.9132
WZ	0.0899	—	0.9478	0.9571	0.9649	0.9651	0.9675	0.9652	0.9531
LJ	0.0631	0.0536	—	0.9296	0.9676	0.9487	0.9426	0.9480	0.9289
PT	0.0809	0.0439	0.0730	—	0.9528	0.9600	0.9835	0.9665	0.9636
MZ	0.0647	0.0358	0.0330	0.0484	—	0.9669	0.9589	0.9666	0.9618
ZP	0.0739	0.0355	0.0527	0.0408	0.0337	—	0.9680	0.9696	0.9653
ZJ	0.0695	0.0330	0.0592	0.0166	0.0420	0.0325	—	0.9713	0.9686
DZ	0.0810	0.0354	0.0534	0.0341	0.0340	0.0309	0.0291	—	0.9748
BH	0.0907	0.0481	0.0737	0.0371	0.0389	0.0353	0.0319	0.0256	—

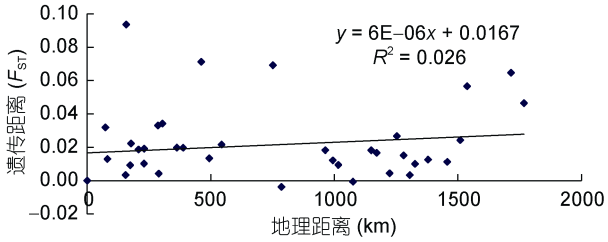


图 5 地理距离与 F_{st} 的相关性

Fig.5 Correlation of F_{st} and geographic distance

3 讨论

3.1 中国蛏微卫星多态性特点

本研究采用FIASCO方法建立中国蛏微卫星DNA富集文库, 并从文库中筛选获得60条含有微卫星的DNA序列, 其中38条可设计引物, 但有12对引物无扩增产物, 可能原因是微卫星侧翼序列(设计引物的位点)发生突变而无法扩增。而有扩增产物的26个位点中, 其中有17个座位无多态性, 占65.4%, 单态位点比例较高。

获得的9个多态性SSR位点中除了WTT1和WTT8两个位点外, 其余7个位点均偏离Hardy-Weinberg平衡, 且存在哑等位基因, 固定指数显示杂合体缺失。哑等位基因的存在和杂合体缺失可能是引起这些位点偏离Hardy-Weinberg平衡的主要原因。杂合体缺失的原因可能是中国蛏存在非随机交配现象, 或群体过小等引起。目前调查表明, 中国蛏资源急剧下降, 蛏数量已经极少, 因此存在近亲繁殖的可能, 瓶颈效应不可避免。King等(2004)筛选美洲蛏的微卫星标记, 22个座位平均等位基因数为13.9, 高于本研究从中国蛏上获得9个座位的平均等位基因数(8.11)。美洲蛏资源远较中国蛏丰富, 从这些位点高多态性特点上也反映了美洲蛏具有较高的遗传多态性; 但美洲蛏22个位点中仍有5个位点偏离Hardy-Weinberg平衡。美洲蛏和中国蛏微卫星座位偏离Hardy-Weinberg平衡有待于进一步分析原因。

3.2 微卫星筛选的策略

自从 Tautz 等(1984)报道了从多种生物上获得多种类型的微卫星序列以来, 微卫星标记已成为目前用途广泛的遗传标记之一, 在遗传图谱构建、亲子鉴定、种群遗传学和保护生物学等方面得到广泛的应用(Zhao *et al*, 2019)。本文采用 FIASCO 法富集 SSR 基因, 步骤简单、成本低, 磁珠-探针-DNA 复合物经过多次洗脱, 可去除非特异性序列, 可大大提高筛选效率, 因而能够高效地从基因组中分离微卫星序列。

随着高通量测序技术的快速发展, 通过测序方法来筛选微卫星标记已变得越来越容易, 且成本低, 这也促进微卫星标记的广泛应用。例如, 岳华梅等(2016)对兴国红鲤生殖相关组织进行转录组测序, 从中筛选获得大量多态性微卫星位点。Cai等(2015)则从中国蛏血细胞构建的RNA文库获得的转录组中挖掘

出12个微卫星标记, 同样可应用于中国鲎群体遗传多样性分析。

3.3　中国海域中国鲎的遗传多样性

中国鲎在中国海域的历史分布最北为长江口南部, 南到北部湾。本研究 9 个采样点覆盖了中国鲎在我国东南沿海的现有分布区。将中国海域的中国鲎作为整体分析的结果显示, 7 个位点平均等位基因数为 11.57, 平均有效等位基因数为 3.5, 期望杂合度为 0.62, 香侬指数为 1.39, 多态性信息含量为 0.58。说明整个种群遗传多样性仍较高。Schultz 等(2009)认为 PIC>0.5 为高多态性信息含量, 0.5>PIC>0.25 的信息含量为中等适度, 而 PIC<0.25 为低信息含量。中国鲎 7 个位点中, 除了位点 WTT9(PIC<0.25)为低信息含量的位点外, 其他微卫星座位的多态性信息含量(PIC)值都较高, 可为中国鲎遗传多样性分析提供高效的标记。这些多样性指标表明分布中国东南沿海的中国鲎种群的遗传多样性仍较高。

中国海域中国鲎遗传多样性高的原因可能源于历史上中国鲎曾经在中国东南沿海大量分布、种群资源丰富、个体数量多、基因库丰富的缘故。根据调查, 30 年前, 中国海域的中国鲎还是相当丰富的, 有些海滩夏季上岸产卵的亲鲎数量还是相当可观的。但随着中国海域中国鲎资源量的衰竭, 中国鲎的遗传多样性下降将成为必然, 所以必须要采取有效措施对鲎资源进行保护管理。

3.4　中国海域中国鲎种群遗传结构特点

中国鲎 9 个地方群体间遗传分化系数 F_{st} 两两比较显著性检验结果表明, 均无显著分化(P>0.05)。群体间的基因流为 13.9 以上, 表明中国东南沿海的中国鲎不同地理群体间基因交流频繁, 属于同一个遗传群体。AMOVA 分析结果显示遗传变异主要来自群体内, 群体间变异极小, 同样表明中国海域中国鲎简单的遗传结构, 无分化的亚居群。而且地理距离与遗传距离无相关性。

中国鲎在中国东南沿海的分布区从浙江宁海到北部湾绵延 1700km 以上, 路程涵盖了东海、南海, 绕过雷州半岛, 直至北部湾, 但是群体间遗传分化系数 F_{st} 显著性检验表明不同地理群体间无群体遗传分化, 同属一个繁殖群体, 不同地方群体间存在强烈的基因交流。宁海与北部湾相隔 1700km 远, 这 2 个地理群体间存在基因交流, 是否因为中国鲎确实能进行长达 1700km 的迁移？中国鲎是底栖物种, 幼鲎孵化和成长于潮间带, 而成鲎主要蛰居于浅海。从其生态特点分析, 似乎其游泳迁移能力不是很强, 1700km 长距离迁移可能性不大, 那么或是近海海流的运动在鲎的迁移中起推动作用？Antoro 等(2006)在分析斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 时, 同样发现相距 1144km 的群体间无遗传分化, 而相距 638km 的 2 个群体间却有显著分化, Antoro 等提出海流在其中起重要的作用。而海流对鲎遗传分化影响有待于进一步分析研究。

分布于中国东南沿海的中国鲎没有遗传分化的原因, 可能主要还是人为的迁移引起的。其一, 鲎做为海鲜美食而在全国各地走私贩卖, 人为运输严重。中国东南沿海特别是浙江省、福建省和广东省的民众喜欢食用鲎, 鲎作为海鲜食品的需求量极大, 因而中国鲎遭遇过度捕杀, 这也是鲎资源量剧减的一个重要原因。根据我们调查, 因目前北部湾的鲎资源量相对较多, 从北部湾走私到浙江省和福建省以及内陆各地的情况很严重, 而且一些人口稍少、鲎还尚存的海岛, 如本研究的采样点浙江洞头岛、福建湄洲岛以及漳浦, 都在向全国各地走私鲎。鲎具较强耐低氧能力方便长途运输。其二, 无序的人工放生活动促进地方群体间的基因交流。在 20 世纪 80—90 年代, 中国鲎就已被列入沿海各省省级重点保护动物名录, 执法部门经常收缴市场上贩卖的中国鲎, 然后就地放流, 一次放流量可达数百只鲎。我们调查还发现, 不少地方的宗教组织常年采购鲎, 然后进行放生活动。因此中国东南沿海中国鲎各地理群体间无遗传分化的原因是人为运输引起的。

3.5　中国鲎的保护管理建议

本研究结果表明中国海域的中国鲎未有显著遗传分化, 各产地原产种群已出现混杂, 未能分辨出进化显著单元。鉴于北部湾较其他海域存在较多中国鲎的状况, 可考虑迁地保护, 将北部湾鲎引入福建省、浙江省海域进行种群扩大, 将不会产生负面的遗传效应, 而且有利于中国鲎资源的恢复。特别是经济发达的浙江省海域, 鲎资源已极度匮乏, 非常有必要进行中国鲎的引入和种群复壮。

4　结论

中国鲎为珍稀物种, 其资源保护亟待保护, 其种群遗传结构和遗传多样性信息是制定中国鲎保护和管理策略的基础和理论依据。本研究结果表明: 分布中国东南沿海的中国鲎种群多态性水平仍较高, 但目前中国大陆沿海中国鲎地方群体间无显著遗传分

化，存在较高的基因流。推测人为的迁移是造成遗传无分化的主要原因。鉴于不少海域中国鲎资源已匮乏，可从其他地方引入，进行种群复壮。

参 考 文 献

岳华梅，翟 晴，宋明月等，2016. 基于转录组测序的兴国红鲤微卫星标记筛选. 淡水渔业，46(1): 24—28

翁朝红，谢仰杰，肖志群等，2012. 福建及中国其他沿岸海域中国鲎资源分布现状调查. 动物学杂志，47(3): 40—48

廖永岩，刘金霞，2006. 亚洲海域鲎的种类和分布. 热带海洋学报，25(6): 85—90

颜明艳，王 月，顾华鑫等，2018. 鲎试剂产业在中国的发展现状及相关建议. 生物学杂志，35(2): 88—91

Antoro S, Na-Nakorn U, Koedprang W, 2006. Study of genetic diversity of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, from Thailand and Indonesia using microsatellite markers. Marine Biotechnology, 8(1): 17—26

Bloor P A, Barker F S, Watts P C *et al*, 2001. Microsatellite libraries by enrichment. http://www.liv.ac.uk/~kempsj genomics.html

Bush K L, Dyte C K, Moynahan B J *et al*, 2011. Population structure and genetic diversity of greater sage-grouse (*Centrocercus urophasianus*) in fragmented landscapes at the northern edge of their range. Conservation Genetics, 12(2): 527—542

Cai L Z, Zhang J J, Rao Y Y *et al*, 2015. Characterization of twelve new microsatellite markers for the endangered Chinese horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*) through next-generation sequencing. Journal of Crustacean Biology, 35(4): 476—479

Cao Y Y, Shangguan J B, Li Z B, 2017. Population genetic analysis and conservation strategies for redtail shrimp *Fenneropenaeus penicillatus* using ten microsatellite markers. Genetics and Molecular Research, 16(1): gmr16019068

King T L, Eackles M S, 2004. Microsatellite DNA markers for the study of horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) population structure. Molecular Ecology Notes, 4(3): 394—396

Li Q Z, Li Q, Liu J *et al*, 2009. Isolation and characterization of microsatellite loci in the horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*). Conservation Genetics, 10(6): 1879—1881

Nishida S, Koike H, 2010. Isolation and characterization of compound microsatellite loci in the tri-spine horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*). Conservation Genetics Resources, 2: 31—33

Rousset F, 2008. Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. Molecular Ecology Resources, 8(1): 103—106

Schultz J K, Baker J D, Toonen R J *et al*, 2009. Extremely low genetic diversity in the endangered Hawaiian monk seal (*Monachus schauinslandi*). Journal of Heredity, 100(1): 25—33

Sekiguchi K, 1988. Biology of Horseshoe Crabs. Tokyo: Science House Co. Ltd.

Summers K, Amos W, 1997. Behavioral, ecological and molecular genetic analyses of reproductive strategies in the Amazonian dart-poison frog, *Dendrobates ventrimaculatus*. Behavioral Ecology, 8: 260—267

Tautz D, Renz M, 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. Nucleic Acids Research, 12(10): 4127—4138

Van Oosterhout C, Hutchinson W F, Wills D P M *et al*, 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Molecular Ecology Notes, 4(3): 535—538

Yu Y, Zhang X J, Yuan J B *et al*, 2015. Genome survey and high-density genetic map construction provide genomic and genetic resources for the Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. Scientific Reports, 5: 15612, doi:10.1038/srep15612

Zane L, Bargelloni L, Patarnello T, 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. Molecular Ecology, 11(1): 1—16

Zhao Y Y, Zhu X C, Li Z *et al*, 2019. Genetic diversity and structure of Chinese grass shrimp, *Palaemonetes sinensis*, inferred from transcriptome-derived microsatellite markers. BMC Genetics, 20: 75

ISOLATION OF MICROSATELLITE MARKERS IN *TACHYPLEUS TRIDENTATUS* AND ANALYSIS OF THEIR GENETIC POLYMORPHISM AND GENETIC STRUCTURE

WENG Zhao-Hong, XIE Yang-Jie, XIAO Zhi-Qun, WANG Zhi-Yong
(*Fisheries College*, *Jimei University*, *Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea*, *Ministry of Agriculture and Rural Affairs*, *Xiamen* 361021, *China*)

Abstract Microsatellite-enriched libraries of $(CA)_n$ in Chinese horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*) were constructed using FIASCO (Fast Isolation by AFLP of Sequences Containing repeats) method, from which 214 positive clones were selected to sequence. After screening, 60 sequences containing microsatellite loci were obtained, in which 38 sequences could be used to design primers. Thirty eight pairs of primers were used to PCR in 37 horseshoe crabs. Results show that only nine microsatellite loci were polymorphism with the allele number ranging from 5 to 14, in average of 8.1. There was no genetic linkage between the nine loci. The genetic diversity and structure were analyzed using these polymorphic microsatellite markers. The results indicate that the polymorphism of the nine Chinese horseshoe crab populations along the southeast coast of China remained high, and there was no genetic difference among nice local populations of Chinese horseshoe crab. Therefore, no significant differentiation was found in high gene flow among the populations. It was speculated that human migration was the main cause of non-genetic differentiation. To restore the local population resources, the horseshoe crabs should be introduced to those sea areas where the horseshoe crab has been extinct.

Key words Chinese horseshoe crab *Tachypleus tridentatus*; microsatellite markers; FIASCO; genetic polymorphism; genetic structure