

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2010.00737

中国龙虾微卫星标记的筛选及遗传多样性分析

刘楚吾, 黎锦明, 刘丽, 郭昱嵩

广东海洋大学水产学院, 南海水产经济动物增养殖广东普通高校重点实验室, 湛江 524025

摘要: 文章以 M_{13} 通用引物和重复序列 $(CT)_{15}$ 、 $(AT)_{15}$ 引物, 利用 PCR 法对中国龙虾(*Panulirus stimpsoni* Hoehuis) 部分基因组 DNA 文库进行筛选。共获得 78 个微卫星序列, 分别分布于 55 个阳性重组克隆中, 其中完美型(perfect)共 50 个, 占 64%; 非完美型(imperfect)3 个, 占 3.8%; 混合完美型(compound perfect)6 个, 占 7.7%; 混合非完美型(compound imperfect)19 个, 占 24.5%。根据微卫星序列, 设计并筛选出 15 对微卫星多态性引物, 对中国龙虾的群体进行了遗传多样性分析。获得 3~12 个等位基因, 等位基因大小在 78~425 bp 之间, 基本符合引物设计的理论长度。期望杂合度范围为 0.48~0.87, 平均值为 0.71, 表明中国龙虾基因组微卫星具有较高的杂合度与遗传多样性。15 个微卫星位点的 PIC 值从 0.44 到 0.84, 平均值为 0.60, 说明这些微卫星位点在中国龙虾基因组中包含丰富的遗传信息, 合适用于中国龙虾的各种分子标记及遗传学分析和应用。

关键词: 中国龙虾; 基因组文库; 微卫星标记; 遗传多样性; 引物筛选

Screening and genetic diversity analysis of microsatellite markers in Chinese lobster(*Panulirus stimpsoni*)

LIU Chu-Wu, LI Jin-Ming, LIU Li, GUO Yu-Song

Fisheries College, Key Laboratory of Aquaculture in South China Sea for Aquatic Economic Animal of Guangdong Higher Education Institutes, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China

Abstract: With the construction of a library of partial fractionated genomic DNA of *Panulirus stimpsoni* Hoehuis, the microsatellite sequences of *P. stimpsoni* were screened by PCR technique. Then, the genetic diversity was analyzed with the microsatellite markers. Seventy-eight microsatellite sequences in 55 positive recombinant clones were obtained by PCR technique with primers of $M_{13}+/-$ and $(CT)_{15}$, and $(AT)_{15}$. Among these microsatellite sequences, the numbers of perfect, imperfect, compound perfect, and compound imperfect sequences were 50 (64%), 3 (3.8%), 5 (7.7%), and 19 (24.5%), respectively. To analyze genomic DNA diversity of *P. stimpsoni*, 15 pairs of primers were designed from the microsatellite flanking sequences. In these microsatellite loci, the alleles numbers ranged from 3 to 12; and the sizes of these alleles ranged from 78 to 425 bp, which are in accordance with their predicted size range. The expected heterozygosity (H_e) and the polymorphism information content (PIC) ranged from 0.48 to 0.87 and 0.44 to 0.84 with the average values of 0.71 and 0.60, respectively. These results showed that these microsatellite loci were suitable for *P. stimpsoni* molecule markers and genetic analysis because of their richness in genetic information.

Keywords: *Panulirus stimpsoni*; genomic library; microsatellite markers; genetic diversity; primer screen

微卫星 (Microsatellite), 又称简单序列重复 tandem repeat, STR), 是以少数几个核苷酸(一般 (Simple sequence repeat, SSR)、短串联重复(Short 2~4 个)为重复单位的串联重复 DNA 序列^[1]。微卫

收稿日期: 2009-10-11; 修回日期: 2010-02-07

基金项目: 国家科技支撑计划项目(编号: 2007BAD29B03)资助

作者简介: 刘楚吾(1952-), 男, 教授, 湖南师范大学博士生导师, 研究方向: 发育生物学。Tel: 0759-2382044; E-mail: liucw@gdou.edu.cn

星位点广泛分布于真核生物的基因组中, 具有高度多态性和丰富的信息含量, 且符合孟德尔遗传和具有共显性^[2]。微卫星标记的这些特点使它能够用于研究等位基因, 区分二倍体(或多倍体)的纯合体或杂合体。另外, 微卫星的特异性引物扩增具有良好的重复性和保真性, 方便各实验室间的交流。目前, 微卫星标记已被广泛应用到基因连锁与遗传图谱构建^[3]、遗传多样性研究^[4~6]、谱系和发育研究^[7, 8]、疾病检测^[9]以及品种鉴定、亲本分析与个体、纯系检验上^[10, 11]。

中国龙虾(*Panulirus stimpsoni* Hoehuis)隶属甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、爬行亚目(Reptantia)、龙虾科(Palinuridae)、龙虾属(*Panulirus*)^[12]。我国龙虾资源丰富, 在温带、亚热带、热带海区都有分布, 是十分重要的渔业资源之一。我国对中国海域龙虾类的研究早在上世纪的 60 年代就已经开始^[13], 主要的研究对象为我国海域产量最大的中国龙虾, 70 年代纪成林等^[12]对其作了形态学和生态学上的初步研究。到目前为止, 虽然对我国海域龙虾类的研究已经逐步展开, 在个体发生及亲虾培育、人工繁殖、早期叶状幼体的培育、盐度对中国龙虾的存活及生长的影响等方面都有研究, 但对我国海域龙虾类分子生物学方面的研究尚未见报道。

国外学者对龙虾类的配子发生^[14, 15]、胚胎发育^[16]、幼虫形态和生态^[17~20]、实验室繁殖^[21]等方面进行了大量研究, 但对龙虾类分子生物学方面的研究不多。Garcia 等^[22]运用 mtDNA 的 RFLP 技术研究了美国加利福尼亚东部沿海的断沟龙虾(*Panulirus interruptus* Randall)的遗传多样性。Chow 等^[23]则用 *Alu* I 和 *Taq* I 两种限制性内切酶对太平洋西北部的日本海域龙虾种类叶状幼虫进行了 RFLP 分析。Diniz 等^[24]建立了美国加利福尼亚北部沿海眼斑龙虾(*Panulirus argus* Latreille)的部分基因组文库, 并从中筛选到了 9 对可用于眼斑龙虾群体分子标记的微卫星引物。Hodgins 等^[25]分析了 8 个来自美国龙虾(*Homarus americanus* Milne-Edwards)的微卫星序列, 并把其中的 4 个用于挪威龙虾的研究。Groth 等^[26]则用两种不同的方法获得了 9 个西方岩龙虾(*Panulirus cygnus* George)的微卫星序列, 用以研究其种群结构和交配系统。

本文建立了中国龙虾部分基因组文库, 采用

PCR 法筛选其微卫星序列, 并利用这些微卫星标记对中国龙虾种群资源进行遗传多样性分析, 为今后中国龙虾的种质资源保护和鉴定及中国龙虾资源进一步开发利用等提供理论依据和指导。

1 材料和方法

1.1 实验材料

中国龙虾从广东湛江市霞山水产批发市场购得。

1.2 方法

1.2.1 中国龙虾基因组 DNA 的提取

参照卢圣栋等^[27]的方法, 从中国龙虾尾部肌肉中提取基因组 DNA, 溶解于 TE 溶液中, 利用紫外分光光度计检测浓度及纯度, 4℃保存。

1.2.2 中国龙虾基因组 DNA 的酶切

使用限制性内切酶 *Sau* 3A I 酶切中国龙虾基因组 DNA, 1%琼脂糖凝胶电泳分离酶切产物, 选取片段大小在 200~1500 bp 之间的酶切产物进行回收、纯化, 用于克隆连接。

1.2.3 中国龙虾部分基因组文库的构建

将经限制性内切酶 *Sau* 3A I 酶切后的中国龙虾基因组 DNA 片段与经 *Bam*H I 酶切并去磷酸化的 pUC118 质粒载体进行重组, 重组体转入大肠杆菌 DH5 α 后利用菌落的蓝白斑指示筛选阳性克隆, 从而构建中国龙虾小片段部分基因组 DNA 文库。

1.2.4 用 PCR 法筛选含有微卫星的阳性克隆

以 M13 通用引物和自行设计合成的重复序列 (CT)₁₅、(AT)₁₅ 探针引物分别对阳性克隆菌进行 PCR 扩增, PCR 反应总体积 25 μ L, 含 1 \times PCR Buffer 2 μ L, MgCl₂(1.5 mmol/L)2 μ L, dNTPs(0.2 mmol/L)2 μ L, 引物各 1 μ mol/L, *Taq* 聚合酶 2 U, 基因组 DNA 约 30 ng, 加无菌水至总体积 25 μ L。1%琼脂糖电泳分离产物, 将 M13+/(CT)₁₅、M13-/(CT)₁₅、M13+/(AT)₁₅ 或 M13-/(AT)₁₅ 具条带且条带比 M13+/-扩增产物小的阳性克隆, 进行二次筛选, 若再次出现同样大小的条带, 可认为阳性克隆中可能含有微卫星序列。

1.2.5 阳性克隆的序列测定及结果分析

对 PCR 结果为阳性的克隆委托上海生物工程技

术有限公司测序, 利用 SSR Hunter 软件进行 SSR 重复序列的寻找, 确定重复次数以及两端侧翼序列。

1.2.6 微卫星引物的设计

根据中国龙虾微卫星核心序列的侧翼序列, 选取符合引物设计的微卫星核心序列, 应用引物设计软件 Primer 5.0 进行微卫星引物的设计。引物长度为 20 bp 左右, (G+C)% 为 40%~60%, T_m 值为 55~60, 产物长度 100~400 bp, 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2.7 PCR 扩增与电泳检测

利用合成的微卫星引物对 3 个中国龙虾个体的基因组 DNA 混合样品进行 PCR 扩增分析。PCR 反应体积为 15 μ L, 其中含 10 \times Buffer 1.5 μ L, dNTPs (2 mmol/L) 1.5 μ L, Mg^{2+} (25 mmol/L) 0.6 μ L, 30 μ mol/L 的 5 和 3 端引物各 1.5 μ L, *Taq* 酶 0.2 μ L, 模板 DNA 0.8 μ L, 无菌双蒸水 7.4 μ L。扩增程序: 94 预变性 5 min; 94 变性 42 s, 45~60 复性 50 s, 72 延伸 45 s, 30 个循环; 最后再 72 延伸 5 min。用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳银染检测。

1.2.8 数据统计分析

根据每个个体产生的条带位置确定基因型, 利用 GENEPOP Version 3.4^[28] 计算等位基因数、观测杂合度 (Observed heterozygosity, H_o) 和期望杂合度 (Expected heterozygosity, H_e), 并进行多态性信息含量 (Polymorphism information content, PIC) 的计算和哈代-温伯格平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE) 检测。

$$H_o = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (1 - \sum_{j=1}^{l_i} P_{ij}) = \frac{1}{n} \sum hoi; \quad H_e = 1 - \sum_{i=1}^m p_i^2$$

式中: $hoi = 1 - \sum_{j=1}^{l_i} P_{ij}$ 为第 i 个位点上实际杂合体比率; P_{ij} 为第 i 个位点上第 j 个纯合体的频率; P_i 为该座位第 i 等位基因频率。

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^m p_i^2 - \sum_{i=1}^{m-1} \sum_{j=i+1}^m p_i^2 p_j^2; \quad \overline{PIC} = \frac{1}{L} \sum_{i=1}^m PIC$$

\overline{PIC} : 位点平均多态信息含量; L 为微卫星位点数; P_i 和 P_j 分别为第 i 和第 j 个等位基因在群体中的频率; m 为等位基因数。

2 结果与分析

2.1 PCR 法筛选微卫星阳性克隆

用 M13+/- 通用引物对阳性克隆菌进行 PCR 检测, 结果显示, 插入片段的大小集中在 100~1 000 bp 之间。

以 M13+/- 通用引物和自行设计合成的重复序列 (CT)₁₅、(AT)₁₅ 探针引物分别对阳性克隆菌进行 PCR 扩增, 筛选微卫星序列。以 M13+/(CT)₁₅ 为引物的 PCR 产物的电泳结果 (图 1) 为例, 第 5 泳道的阳性克隆菌可能含有 (CT) 类型的微卫星序列。

2.2 筛选后阳性克隆的测序结果

对经过 PCR 初步筛选得到的 57 个可能含有微卫星的重组阳性克隆进行 DNA 测序, 证实在 57 个重组克隆中有 55 个克隆含有微卫星序列, 共含有 78 个微卫星序列, 用来设计引物的序列见表 1。

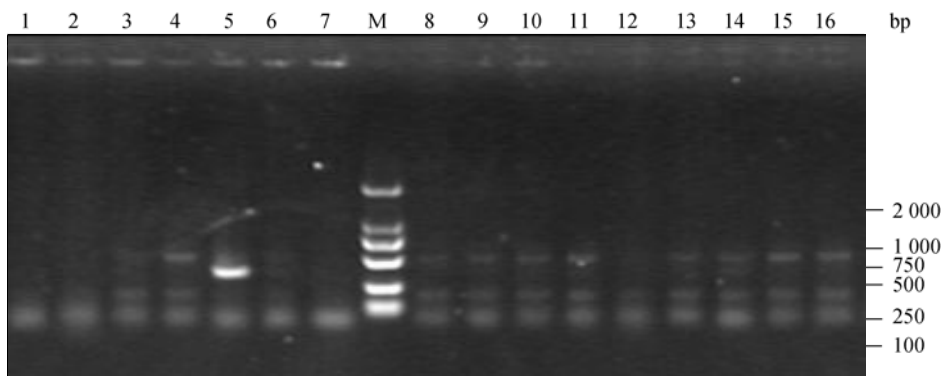


图 1 引物 M13+/(CT)₁₅ 对阳性克隆菌的 PCR 产物电泳图

M: DL2000 Markers; 1~16: 以 M13+/(CT)₁₅ 为引物对阳性克隆进行 PCR 扩增, 其中 5 泳道对应的阳性克隆可能含有 (CT) 类型微卫星序列, 其他则无该类型微卫星序列。

表 1 中国龙虾部分微卫星核心序列及其 5'端与 3'端保守序列

克隆编号	5'旁侧序列	核心序列	3'旁侧序列	类别	GenBank 登录号
Clone2	TGTTGGGGAT	(GA) ₄ (GTT)GG(GA) ₂ T(GA)(GT)(CA) ₃ (GTT) ₃	CGCTGATGAT	混合非完美型	EU557281
Clone3	ATCATCAGCG	(AAC) ₃ (TG)(ACTC) ₂ (CCA)(A)(CT) ₃	CATCCCCAAC	混合非完美型	EU557282
Clone6	AATGATGATA	(TAA) ₄	TCGTACTGCT	完美型	EU557283
Clone6	AAGCAGTACG	(ATT) ₄ (AT) ₂ (CAT) ₂	TGATCTGGAC	非完美型	
Clone9	GTGTAGCAAG	(CT)(TG) ₂ (CT)(GGA) ₃ (TG) ₂ (AGG) ₂ (AC)(CT)(GT)(AGG) ₃	TATGGGCCAG	混合非完美型	EU557286
Clone9	GATGGTATCG	(GT) ₅ (GA) ₂ (GT) ₁₄ (TTG) ₂	AGTGACCGGG	混合完美型	EU557287
Clone9	CGACCACTCA	(AC) ₁₆ (CT)(CA) ₅	CCGATACCAT	非完美型	EU557288
Clone10	GCGGCATTAA	(CG) ₃ GG(TG) ₅	TTACGTAGGA	混合非完美型	EU557289
Clone11	GCATTCATCG	(CA) ₄ (TA)(TG) ₃	TCGTAAAGG	混合非完美型	EU557290
Clone18	ACGTGGCTTG	(CAT) ₂ (CG)(CA) ₄	TATGTGTCGT	混合非完美型	EU557291
Clone22	GCAAAGTGAA	(ATT) ₃ A(AG) ₄	AACTAAAAGA	混合非完美型	EU557292
Clone27	CCACTAACGC	(TA) ₄ (TG) ₃ (TA) ₃	TTCTATGAG	混合完美型	EU557293
Clone27	TGTCCAAAAA	(TG) ₃ (TA) ₁₇	TGCCAGGTAC	混合完美型	EU557294
Clone27	GGGCTAGGTC	(AT) ₂₃ G(TA) ₅ G(AT) ₈	CTCTTCTATG	非完美型	EU557295
Clone27	ACTCATAGGA	(AT) ₃ (AC) ₂ (AT) ₅	CGTTAGTGGG	混合完美型	EU557296
Clone30	AAGCGCGGCG	(GGT) ₄	TACGCGCAGC	完美型	EU557297
Clone44	GCAAAGTGAA	(ATT) ₃ A ₃ (AG) ₄	AACTAAAAGA	混合非完美型	EU557298
Clone47	GAACCCCTCA	(TC)C(TC)(CT) ₃ (AC)(CT)(AC) (TA)(AC) ₃	ATGCCTCGCA	混合非完美型	EU557299
Clone47	ATATGAGGCA	(TG) ₂ (TA)(TG) ₃ G(GA)(AG) ₃	GGGAGTGGTT	混合非完美型	EU557300
Clone48	TTTGCATTAT	(TG) ₃ (TA) ₇₃	TGTCCGATAT	混合完美型	EU595408
Clone52		(GGA) ₃ (TG) ₂ (AGG) ₂ (AC) ₂ (CT)(GC)(AGG) ₃	TATGGGCCAG	混合非完美型	EU557301
Clone53	CCAGCTCAAT	(GAT) ₂ A(TAA) ₄	CCGAGTATCA	混合非完美型	EU557302
Clone54	GTAATGAGTA	(TC) ₃ (AGAT)TT(AGAT)(AC)(TG) ₄	CCTCATTCCC	混合非完美型	EU557303
Clone67	CCCAACCTGC	(GT) ₃ (GC)(GAA)(AC) ₄	TCGTAAAGG	混合非完美型	EU557304
Clone68	GCATTCATCG	(CA) ₄ (TA)(TG) ₃	AGTTAACACA	混合非完美型	EU595409

根据 Weber^[29]提出的微卫星评价标准,对 78 个微卫星进行划分,其中完美型(perfect)共 50 个,占 64%;非完美型(imperfect)3 个,占 3.8%;混合完美型(compound perfect)6 个,占 7.7%;混合非完美型(compound imperfect)19 个,占 24.5%。其中完美型的微卫星占大多数。

2.3 多态性微卫星引物的设计及筛选结果

选取 24 个微卫星 DNA 序列设计引物。经过初

步筛选,有 20 对能够扩增出产物,但只有 15 对适合微卫星多态性分析。其中,引物 3 对 20 个中国龙虾个体微卫星位点检测的聚丙烯酰胺凝胶电泳见图 2。

2.4 微卫星位点的多态性分析

利用所获得微卫星引物对中国龙虾的一个群体(20 个个体)进行遗传分析。对每一个微卫星位点的等位基因数目(其中纯合个体的等位基因以出现两次计算)进行统计。根据各个微卫星位点的等位基因

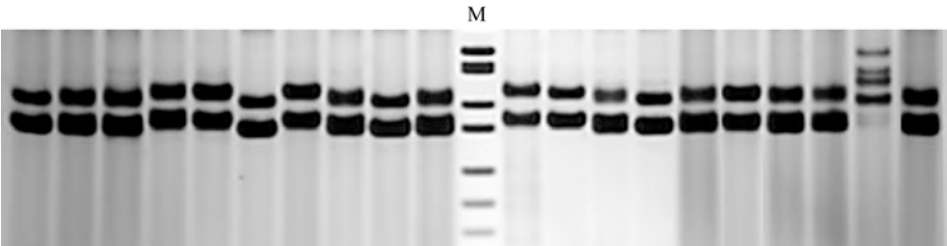


图 2 引物 3 在 20 个中国龙虾个体中的扩增结果
M: pBR322/*Msp* I DNA Markers。

频率, 分别计算它们的期望杂合度(H_e)、观测杂合度(H_o)、多态信息含量(PIC)和 Hardy-Weinberg 平衡指数(HWE P)(表 2)。

从表 2 中可以看到, 在中国龙虾 20 个样本的 15 个微卫星位点上, 等位基因的数目从 3 到 12 不等, 等位基因的大小分布在 78~425 bp 之间, 基本符合引物设计时的理论产物长度。这些微卫星位点的期望杂合度的范围从 0.48 到 0.87 之间, 平均值为 0.71, 表明它们都有较高的杂合度。15 个微卫星位点的 PIC 值从 0.44 到 0.84, 平均值为 0.64, 表明筛选到的这些微卫星标记位点在中国龙虾中均具有较高的信息含量, 可以应用于中国龙虾的分子遗传标记分析和遗传图谱的构建。Hardy-Weinberg 平衡指数从 0.0000 到 0.6257, 除位点 2 和 3 外的 13 个微卫星位点均偏离 Hardy-Weinberg 平衡($P<0.05$)。

3 讨 论

3.1 引物设计时微卫星序列的选取

在微卫星标记的筛选过程中, 微卫星序列的筛选是非常重要的和关键的。根据 Weber 提出的分类标准^[29], 微卫星的核心序列有各种各样的类型: 完美型(perfect), 非完美型(imperfect)和混合型(compound), 又可以分为混合完美型(compound perfect)和混合非完美型(compound imperfect)。但关于使用哪种类型核心序列的微卫星来设计微卫星引物才能获得具有较高多态性的微卫星标记, 一直以来众说纷纭。在本研究中, 主要选取了两碱基和三碱基为基本重复单位的微卫星序列进行微卫星引物的设计, 且多为 compound imperfect 类型。最终结果表明, 使用自行设计的微卫星引物进行 PCR 扩增, 最后的产物

表 2 中国龙虾 15 个微卫星位点的等位基因数、观测杂合度、期望杂合度、多态信息含量及 Hardy-Weinberg 平衡指数

微卫星标记	引物序列 (5' 3')	复性 温度 ()	样本数	等位基因个数 (bp)	期望杂合度 (H_e)	观测杂合度 (H_o)	多态信息含量 (PIC)	Hardy-Weinberg 平衡指数(P)
引物 1	L: TTTATGGATGGGGCTGTT R: CCTTGCTCTTATTACATTAC	52	20	3(228~425)	0.5949	1.0000	0.4918	0.0000
引物 2	L: ACATGAATCAGCCACCAG R: GGAAAGAGGGGCAAGTAT	52	20	3(91~168)	0.5603	0.9500	0.4422	0.6257
引物 3	L: GAAGGAACGGATGTTAGA R: AAAGGCATTCAATTAGGC	54	20	12(104~145)	0.8692	1.0000	0.8400	0.0539
引物 5	L: TGGCAAGCTGGTGTCATG R: TAGCCTCTGTATAACATTTGG	52	20	4(101~128)	0.6769	1.0000	0.5958	0.0001
引物 6	L: CACGGGATGATGGTATCGG R: GGAGGAAGACCACGGAAA	52	20	6(118~152)	0.8385	1.0000	0.7914	0.0315
引物 7	L: GGGAGGAAGACCACGGAAAC R: GCGGCTCTGCTATTATGATTGT	53	20	6(272~421)	0.8487	1.0000	0.8033	0.0356
引物 8	L: GCTGCCAGATGTTTCCAT R: CAGGCTTTACACTTTATGCTTC	54	20	4(78~125)	0.6513	1.0000	0.5729	0.0000
引物 11	L: TGGTCGATAGAATGGGTAC R: TCACATCATCACGGGAGA	54	20	4(98~126)	0.7667	1.0000	0.7003	0.0061
引物 14	L: CCGCATACGTCAAAGCAA R: CGAGAAAGGAAGGGAAGAAA	53	20	3(290~405)	0.4810	1.0000	0.5478	0.0002
引物 16	L: TTCTTGGTGTCAATGGGAGG R: GTTGAGCCCAAACCTCCC	52	20	4(155~185)	0.7282	1.0000	0.6569	0.0016
引物 18	L: TGTGCTGGAGGAGGATGT R: CACCTTACCTTAGCCTCTGT	52	20	4(105~123)	0.7283	1.0000	0.6569	0.0012
引物 19	L: ACGGGATGATGGTATCGG R: GGAGGAAGACCACGGAAA	52	20	4(322~370)	0.7462	1.0000	0.6774	0.0028
引物 20	L: GAAGAACGGATGTTAGA R: AAAGGCATTCAATTAGGC	53	20	3(125~180)	0.6295	1.0000	0.5392	0.0000
引物 22	L: AGATACCAGGCGTTTCCC R: CAGAATGAATCTACGGTGACTA	52	20	4(273~318)	0.7462	1.0000	0.6774	0.0023
引物 23	L: GCTGCCAGATGTTTCCAT R: CAGGCTTTACACTTTATGCTTC	52	20	4(186~224)	0.7052	1.0000	0.6298	0.0002

大部分能显示中国龙虾基因组 DNA 微卫星序列的多态性, 多态性比例较高(约为 67%)。

3.2 中国龙虾的遗传多样性

遗传杂合度(H)又称基因多样性, 可反映各群体在多个位点上的遗传变异。群体 H 低, 表明该群体的遗传一致性高, 群体的遗传变异少, 群体遗传多样性低。在本研究中有些位点在中国龙虾中的杂合度为 0, 是因为这些引物没有表现出多态性, 在 PCR 扩增产物中只有一条带(也就是纯合子, 示单态性)。引物间的杂合度差异比较大, 杂合度最高为 0.87(位点 3), 最低为 0.48(位点 14), 这说明用少量的遗传标记进行群体杂合度的检测结果不一定能够代表群体的真实情况。本研究中运用了 15 个微卫星标记进行检测, 可以在一定的程度上反映中国龙虾群体的情况。这些微卫星位点的期望杂合度范围为 0.48 到 0.87, 平均值为 0.71, 表明中国龙虾基因组微卫星具有较高的杂合度, 中国龙虾具有较高的遗传多样性。

多态信息含量(PIC)是指一个后代所获得的某个等位基因标记来自于它亲代的同一个等位标记的可能性大小, 平均 PIC 是衡量等位基因片段多态性的理想指标。当 PIC 大于 0.5 时, 为高度多态位点; $0.25 < PIC < 0.5$ 时为中度多态位点; PIC 小于 0.25 时为低度多态位点^[30]。在本研究中, 15 个微卫星位点的 PIC 值从 0.44 到 0.84, 平均值为 0.60, 说明这些微卫星位点在中国龙虾基因组中包含丰富的遗传信息, 为高度多态位点, 适宜用于中国龙虾的各种分子标记及遗传学分析和应用, 也表明了中国龙虾具有较高的遗传多样性, 与遗传杂合度(H)的分析结果相符合。

对中国龙虾 20 个样本的 15 个微卫星位点的 HWE 分析发现, 只有位点 2 和 3 处于平衡状态($P > 0.05$), 其余 13 个微卫星位点均偏离 Hardy-Weinberg 平衡($P < 0.05$), 可能是现阶段中国龙虾资源已经受到人为干扰等因素使其种群结构受到影响而产生。

一个群体内只有遗传多样性高或遗传变异丰富时, 对环境变化的适应能力才较强, 才能比较容易扩展其分布范围和拓展新的环境。虽然本研究表明中国龙虾具有较高的遗传多样性, 但目前我国的龙虾资源现状不容乐观。随着我国对海洋资源的进一步开发和利用, 特别是近年来海水养殖行业的兴起, 我国的海洋环境正在不断的恶化, 我国的龙虾资源也面临着严重的威胁。这些都提示我们要采取科学的

措施最大限度地来保护和维持我国龙虾的自然资源和遗传多样性, 以保证可持续开发利用海洋渔业资源。

参考文献(References):

- [1] 曾庆国, 陈艺燕. 微卫星位点筛选方法综述. 西北植物学报, 2005, 24(4): 368–372.
- [2] Wang Z, Weber JL, Zhong G, Tanksley SD. Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theor Appl Genet*, 1994, 88(1): 1–6.
- [3] Miyao A, Zhong HS, Monna L, Yano M, Yamamoto K, Havukkala I, Minobe Y, Sasaki T. Characterization and genetic mapping of simple sequence repeats in the rice genome. *DNA Res*, 1996, 3(4): 233–238.
- [4] Norris AT, Bradley DG, Cunningham EP. Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations. *Aquaculture*, 1999, 180(3–4): 247–264.
- [5] 刘丽, 刘楚吾, 郭昱嵩, 董秋芬, 徐田军. 青石斑鱼微卫星 DNA 标记的筛选及群体遗传多样性分析. 中国水产科学, 2008(1): 22–29.
- [6] 郭昱嵩, 王中锋, 刘楚吾, 刘筠. 勒氏笛鲷微卫星位点的筛选及特征分析. 遗传, 2007, 29(3): 355–359.
- [7] Bierre N, Launey S, Naciri-Graven Y, Bonhomme F. Early effect of inbreeding as revealed by microsatellite analyses on *Ostrea edulis* larvae. *Genetics*, 1998, 148(4): 1893–1906.
- [8] 董秋芬, 刘楚吾, 郭昱嵩, 刘丽, 吴勇. 9 种石斑鱼遗传多样性和系统发生关系的微卫星分析. 遗传, 2007, 29(7): 837–843.
- [9] Kim HS, Lee BL, Woo DK, Bae SI, Kim WH. Assessment of markers for the identification of microsatellite instability phenotype in gastric neoplasms. *Cancer letters*, 2001, 164(1): 61–68.
- [10] Bessert ML, Orti G. Microsatellite loci for paternity analysis in the fathead minnow, *Pimephales promelas* (Teleostei: Cyprinidae). *Mol Ecol Notes*, 2003, 3(4): 532–534.
- [11] Stockburger EM, Green RD, Wood WO, Holm T, Macneil MD, Schafer DW. Determination of the stringency of DNA microsatellite marker genotypes for use in individual animal identification. *Anim Genet*, 2000, 53: 345–348.
- [12] 纪成林. 我国沿海经济甲壳动物之一——福建沿海的中国龙虾. 水产科技情报, 1976, (1): 13–14.
- [13] 刘瑞玉. 我国黄、东海虾类动物地理学研究. 海洋与湖泊, 1963, 5(3): 230–244.
- [14] Talbot P, Summers RG. The structure of sperm from *Panulirus*, the spiny lobster, with special regard to the acrosome. *J Ultrastruct Res*, 1978, 64(3): 341–351.

- [15] 姜永华, 颜素芬. 中国龙虾卵子发生及卵黄发生的超微结构观察. 中国水产科学, 2009, 16(5): 697–704.
- [16] 椎野季雄. 水产无脊椎动物学. 东京: 培风馆, 1969: 335.
- [17] Phillips BF, Brown PA, Rimmer DW, Reid DD. Distribution and dispersal of the phyllosoma larvae of the western rock lobster, *Panulirus cygnus*, in the south-eastern Indian Ocean. *Aust J Mar Freshwat Res*, 1979, 30(6): 773–783.
- [18] Rimmer DW, Phillips BF. Diurnal migration and vertical distribution of phyllosoma larvae of the western rock lobster *Panulirus cygnus*. *Mar Biol*, 1979, 54(2): 109–124.
- [19] Rimmer DW. Spatial and temporal distribution of early stage phyllosoma of western rock lobster *Panulirus cygnus*. *Aust J Mar Freshwat Res*, 1980, 31(4): 485–497.
- [20] 姜永华, 颜素芬. pH 值对中国龙虾消化酶活力的影响. 动物学报, 2008, 54(002): 317–322.
- [21] Inoue M, Nonaka M. Notes on the cultured larvae of the Japanese spiny lobster, *Panulirus japonicus* (V. Siebold). *Bull Jap Soc Sci Fish*, 1963, 29(3): 211–218.
- [22] Garcia-Rodriguez FJ, Perez-Enriquez R. Genetic differentiation of the California spiny lobster *Panulirus interruptus* (Randall, 1840) along the west coast of the Baja California Peninsula, Mexico. *Mar Biol*, 2006, 148(3): 621–629.
- [23] Chow S, Suzuki N, Imai H, Yoshimura T. Molecular species identification of spiny lobster phyllosoma larvae of the genus *Panulirus* from the northwestern Pacific. *Mar Biotechnol*, 2006, 8(3): 260–267.
- [24] Diniz FM, Maclean N, Ogawa M, Paterson I G, Bentzen P. Microsatellites in the overexploited spiny lobster, *Panulirus argus*: Isolation, characterization of loci and potential for intraspecific variability studies. *Conserv Genet*, 2005, 6(4): 637–641.
- [25] Hodgins-Davis A, Roberts S, Cowan DF. Characterization of SSRs from the American lobster, *Homarus americanus*. *Mol Ecol Notes*, 2007, 7(2): 330–332.
- [26] Groth DM, Lim F, de Lestang SN, Beale N, Melville-Smith R. Characterization of polymorphic microsatellite loci in the western rock lobster (*Panulirus cygnus*). *Conserv Genet Resour*, 2009, 1(1): 163–166.
- [27] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 第二版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999, 61–69.
- [28] Raymond M, Rousset F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenism. *J Hered*, 1995, 86: 248–249.
- [29] Weber JL. Informativeness of human (dC-dA) n.(dG-dT) n polymorphisms. *Genomics*, 1990, 7(4): 524–530.
- [30] Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*, 1980, 32(3): 314–331.