

# 仿刺参微卫星标记的筛选及群体遗传结构分析

潘传燕<sup>1,2</sup> 臧云鹏<sup>2,3</sup> 廖梅杰<sup>2</sup> 王印庚<sup>2</sup>  
荣小军<sup>2\*</sup> 张正<sup>2</sup> 李彬<sup>2</sup> 陈贵平<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 中国海洋大学, 青岛 266003)

(<sup>2</sup> 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室,  
中国水产科学研究院黄海水产研究所, 266071)

(<sup>3</sup> 上海海洋大学水产与生命学院, 201306)

**摘要** 采用 FIASCO (Fast Isolation by AFLP Sequences Containing Repeats) 方法构建了仿刺参基因组富集 CA 微卫星序列的基因组短片段文库, 筛选得到 118 条微卫星 DNA 序列。根据重复单元的排列特点, 完美型共 83 个, 占 70.4%; 非完美型共 30 个, 占 25.4%; 复合型标记 5 个, 占 4.2%。选取其中 20 条微卫星序列设计引物进行多态性检测, 并利用这 20 对引物对来自中国、韩国(西海岸及东海岸)、俄罗斯和日本沿海的野生仿刺参以及美国沿海的具疣拟刺参进行遗传多样性和遗传结构分析。结果表明, 所设计的 20 对引物的扩增产物均具有多态性, 其中 16 个位点为高度多态 ( $PIC > 0.5$ )。遗传多样性分析结果显示, 20 个微卫星座位的平均观察杂合度 ( $H_o$ ) 和平均期望杂合度 ( $H_e$ ) 分别为 0.39 和 0.69, 共检测到 231 个等位基因 (102 个有效等位基因), 在每个座位上获得 3~20 个等位基因, 平均等位基因数为 11.6 个, 20 个位点在 6 个群体中不同程度偏离遗传平衡 ( $P < 0.05$ ), 所有群体在整体上均表现为杂合子缺失 ( $F_{is} > 0$ ); 5 个仿刺参群体间的遗传相似系数在 0.71 以上, 相似性较高, 而仿刺参群体与具疣拟刺参的相似性则较低。聚类分析结果表明, 中国群体与韩国西海岸群体聚类成一支, 而俄罗斯群体、韩国东海岸群体和日本群体聚类成另外一支, 聚类的先后与它们在地理分布上的海域位置有一定的相关性。

**关键词** 刺参 微卫星标记 FIASCO 遗传多样性 遗传结构

**中图分类号** Q959.26 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2012)04-0072-11

## Development of microsatellite DNA markers of sea cucumber *Apostichopus japonicus* and their application in population genetic variation and structure analysis

PAN Chuan-yan<sup>1,2</sup> ZANG Yun-peng<sup>2,3</sup> LIAO Mei-jie<sup>2</sup> WANG Yin-geng<sup>2</sup>  
RONG Xiao-jun<sup>2\*</sup> ZHANG Zheng<sup>2</sup> LI Bin<sup>2</sup> CHEN Gui-ping<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Ocean University of China, Qingdao 266003)

(<sup>2</sup> Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, 266071)

(<sup>3</sup> Shanghai Ocean University, 201306)

国家自然科学基金项目(刺参弧菌抗性相关基因筛选与表达研究)、国家高技术研究发展计划项目(2012AA10A412)、山东省农业良种工程重大课题“速生、抗病、耐高温刺参良种选育”、科研院所技术开发研究专项(2011EG34219)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(20603022012006)共同资助

\* 通讯作者。E-mail: rongxj@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85817991

收稿日期: 2011-04-14; 接受日期: 2011-05-24

作者简介: 潘传燕(1988-), 女, 硕士研究生, 主要从事水产养殖研究。E-mail: yanzipan888@163.com

**ABSTRACT** In order to evaluate the genetic diversity of sea cucumber *Apostichopus japonicus* and breed eugenic varieties, a CA microsatellite containing short fragment genomic DNA library of sea cucumber was constructed using the FIASCO(Fast Isolation by AFLP Sequences Containing Repeats) method. In 140 randomly selected and sequenced clones, 118 contained a CA repeat motif. According to Weber(1990) classification rules, the sequences were divided into three categories: 83 perfect repeat sequences without interruptions in the runs of CA or GT dinucleotides (70.4% of total), 30 imperfect repeat sequences with one or more interruptions in the run of repeats (25.4%), and 5 compound repeat sequences with adjacent tandem simple repeats of a different sequence (4.2%). Twenty pairs of primers were designed and used to investigate the polymorphism and genetic structure of wild *A. japonicus* collected from China(CH), Korea(KW, KE), Japan(JA) and Russia(RU). Cross amplification of twenty loci were also tested in *Parastichopus parvimensis* which were collected in USA(AM). The results demonstrated that all the markers were polymorphic and 16 loci had high polymorphism ( $PIC > 0.5$ ). The average observed and expected heterozygosities of the 20 loci were 0.39 and 0.69, respectively. In addition, a total of 231 alleles (102 effective alleles) were detected at 20 loci in the total samples and the alleles number of each locus ranges from 3 to 20 with average of 11.6. The Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) analysis showed that all the loci deviated from genetic equilibrium in the six populations and heterozygote deficiency occurred to different extent in total samples ( $F_{is} > 0$ ). Genetic identity of the five *A. japonicus* populations was 0.71, while the genetic identity between *A. japonicus* and *P. parvimensis* were quiet low. In the UPMGA tree, CH and KW populations formed a cluster, RU, JA and KE populations formed another cluster, while AM fell into a separate cluster. The result of cluster analysis indicated that the clustering order had significant correlation with geographic distance.

**KEY WORDS** *Apostichopus japonicus* Microsatellite DNA markers FIASCO  
Genetic diversity Genetic structure

仿刺参 *Apostichopus japonicus* Liao, 又称刺参, 属棘皮动物门 Echinodermata、海参纲 Holothuroidea、楯手目 Aspidochirotida、刺参科 Stichopodidae、仿刺参属 *Apostichopus*, 它主要分布于中国黄、渤海、俄罗斯东部、日本和韩国沿岸(廖玉麟 1997; 隋锡林 2003)。仿刺参具有很高的食用和药用价值, 是中国传统的名贵海产品。自 20 世纪 80 年代人工繁殖技术取得突破以来, 仿刺参养殖业迅猛发展, 2009 年全国海参苗种年生产能力达 518 亿头, 增养殖面积约 155 288  $\text{hm}^2$ , 产量达到 102 159 t(农业部渔业局 2010), 产值近 200 亿元, 是我国海水养殖单品种产值最高的种类之一, 在沿海渔业经济中的地位举足轻重, 已成为继海带、对虾、扇贝、海水鱼 4 次养殖浪潮后第 5 次海水养殖浪潮的主体。近年来, 由于对仿刺参野生种质资源保护重视不够, 仿刺参苗种出现生长减慢、抗逆性减弱等种质退化现象。因此, 开展仿刺参种质资源评价与保护、良种选育工作, 培育速生、抗逆性能强的良种, 成为仿刺参养殖业亟需解决的问题, 而种质资源遗传多样性是良种选育工作的基础。

近年来, 国内外学者利用同工酶(Kan-no *et al.* 2002, 2003)、微卫星 DNA 标记(Kan-no *et al.* 2005, 2006)、线粒体 DNA(Sun *et al.* 2010)、SNP(Sun *et al.* 2010)等分析了仿刺参的遗传多样性, 其中微卫星 DNA 标记因其具有多态性高、遵循孟德尔遗传规律、可重复性强、共显性、容易获得等特点, 被广泛应用于仿刺参的遗传多样性研究中。Kanno 等(2006)用 11 个微卫星 DNA 标记研究了日本沿海仿刺参群体的遗传多样性, 谭杰等(2007a, b)利用 9 个微卫星 DNA 标记研究了烟台、威海和大连 3 个仿刺参野生群体以及烟台野生群体和养殖群体间的遗传多样性, Kim 等(2008)利用 9 个微卫星标记完成了韩国刺参遗传多样性分析,

Chang 等(2009)利用 10 个微卫星位点完成了中国、日本、韩国、苏联等多个地理种群刺参的遗传多样性分析。这些研究所用的微卫星标记均来自于 Kan-no 等(2005)、Zhan 等 7(2007)、丁君等(2006)的 20 余个微卫星位点。本研究采用磁珠富集法从仿刺参基因组中筛选多态性微卫星标记,以期对仿刺参遗传评估分析提供更多分子标记。此外,利用这些标记对来自中国青岛、韩国木浦和江陵、日本名古屋、俄罗斯海参崴的野生仿刺参群体进行遗传多样性分析,并以同属刺参科的具疣拟刺参 *Parastichopus parvimensis* 为外群进行遗传结构分析,为仿刺参遗传结构特征及遗传资源的保护利用提供相关信息和依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集及基因组 DNA 的提取

用于微卫星 DNA 分离的仿刺参采自青岛胶南某养殖场,实验所用仿刺参 5 个群体(图 1)分别取自中国青岛(CH, 36°20'N, 120°21'E, 30 只),韩国木浦(KW, 34°50'N, 125°51'E, 30 只),韩国江陵(KE, 37°45'N, 128°28'E, 28 只),日本新潟(JA, 38°02'N, 138°49'E, 27 只),俄罗斯海参崴(RU, 43°05'N, 132°04'E, 28 只),将刺参的纵肌保存于无水乙醇中,用于基因组 DNA 提取。实验用具疣拟刺参(AM, 18 只)为进口商品干参,发制后取其纵肌保存于无水乙醇中,用于基因组 DNA 提取。DNA 提取使用 OMEGA 公司生产的软体动物基因组 DNA 提取试剂盒,用紫外分光光度计检测 DNA 浓度并定量至 50 ng/ $\mu$ l。

### 1.2 微卫星 DNA 标记的筛选

用磁珠富集法从 AFLP 片段中分离富含微卫星的 DNA 片段(Vos *et al.* 1995; Zane *et al.* 2002)。将 1 个仿刺参的基因组 DNA 用 *Mse* I 单酶切,并与接头序列相连,用 AFLP 体系扩增获得短片段 DNA 文库;与生物素标记的 Bio-(CA)<sub>12</sub> 探针杂交,再通过生物素与包被在磁珠上的链亲和素结合;分离磁珠,洗脱,获得富含微卫星 DNA 的单链短基因组 DNA 片段;经过 PCR 循环获得含微卫星 DNA 的双链短基因组 DNA 片段;将这些片段与 Peasy-T1 Cloning Vector (TIANGEN)载体连接,转入 Trans1-T1 (TIANGEN)感受态细胞中,构建富含 (AC)<sub>n</sub> 的仿刺参微卫星 DNA 富集文库。

为确定微卫星 DNA 序列是否位于插入序列的中间位置,采用 3 次 PCR 反应检测所挑取的克隆。用载体通用引物 M13(-47)、M13(-48)和探针对应的引物两两组合配成 3 对,对每一个菌落进行 3 次 PCR 反应,引物序列如下: M13(-47): 5'-CGCCAGGGTTTCCAGT-CACGAC-3'; M13(-48): 5'-AGCGGATAACAATTTCACACAGGA-3'; (CA)<sub>12</sub>: 5'-CACACACACACACACACACA(A/G/T)(A/T/G/C)-3'。当用载体通用引物获得的 PCR 产物与另外两个反应之一的产物长度明显不同时,表明微卫星 DNA 的核心序列位于插入片段的中间位置,将这些克隆用 ABI 3730 型测序仪进行测序。用 Chromas V2.33 软件(<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>)分析测序结果,去掉载体序列和接头序列;用 SSRHunter 软件(<http://en.bio-software.net/dna/SSRHunter.html>)对插入序列进行分析,找出其中的微卫星 DNA 区域;根据微卫星区域的特征,按照 Weber(1990)提出的标准对该序列进行分型;用 Primer Premier 5.0 软件(<http://www.premierbiosoft.com/primerdesign/>)为微卫星序列设计 PCR 扩增引物。

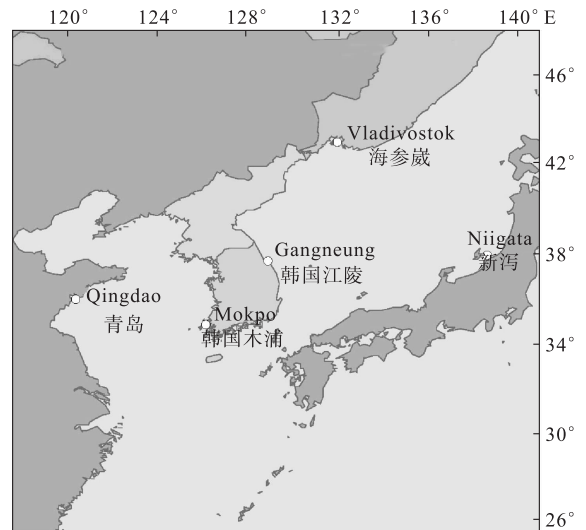


图 1 5 个野生刺参群体的采样地点

Fig. 1 Sampling sites for sea cucumber populations

按照 Weber(1990)提出的标准对该序列进行分型;用 Primer Premier 5.0 软件(<http://www.premierbiosoft.com/primerdesign/>)为微卫星序列设计 PCR 扩增引物。

### 1.3 多态性检测及不同地理种群仿刺参的遗传多样性分析

对引物进行 PCR 扩增,摸索退火温度条件。引物经 PCR 扩增条件摸索后,随机选择 30 只中国青岛仿刺参、30 只韩国木浦仿刺参、28 只韩国江陵仿刺参、27 只日本新泻仿刺参以及 28 只俄罗斯海明威仿刺参样品进行 PCR 扩增。微卫星 DNA 的 PCR 扩增体系为 25  $\mu$ l,包括 1 $\times$ 缓冲液,1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,200  $\mu$ mol/L dNTP,200  $\mu$ mol/L 的正、反向引物和 50 ng DNA 模板。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min,94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,复性温度下复性 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,循环 30 次,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物通过 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳、银染的方法进行检测,对条带进行手工计数,条带根据迁移速度依次编号,迁移最快的等位基因记为 1。

### 1.4 数据处理及分析

利用 Popgene V 1.32 软件(<http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene.html>)统计整个群体及各群体检测到的等位基因数( $A$ )、有效等位基因数( $N_e$ ),计算观测杂合度( $H_o$ )、期望杂合度( $H_e$ )。参照 Botstein 等(1980)的方法计算各位点多态信息含量(Polymorphism information content, PIC), $\chi^2$  检验估计群体 Hardy-Weinberg 平衡偏离。用 Genepop 软件(<http://genepop.curtin.edu.au/>)进行连锁不平衡检验。群体间遗传分化指数( $F_{st}$ )、基因流( $N_m$ )和 Nei's 标准遗传距离( $D_s$ )等遗传分化指标由 Popgene 软件给出。所有多重检验的显著性标准用连续 Bonferroni 修正法(Rice 1989)进行校正。

## 2 结果与分析

### 2.1 仿刺参的微卫星标记

从所构建的仿刺参微卫星富集文库中随机挑取了 252 个单菌落,经重组子筛选后得到 142 个阳性克隆,阳性克隆率为 56.3%,将所得的 142 个阳性克隆进行测序,共获得 118 条含有微卫星核心区的测序结果(占测序序列数的 83.1%),比对后去掉 8 条重复序列,共得到 110 条含微卫星核心区的单一序列,占测序数的 77.5%。对所获得的单一序列进行分析,结果见表 1。所获得的 110 条单一序列中有 118 个微卫星核心区,根据 Weber(1990)提出的标准,完美型、非完美型及复合型序列分别为 83、30、5 条,它们所占的比例分别为 70.4%、25.4% 和 4.2%。此外,按照重复单元的类型分类,则两碱基重复的微卫星序列共有 117 条(98.3%),其中重复次数在 5~9 次之间的有 88 个(73.5%),重复次数在 10 次以上的有 29 个(24.8%);四碱基重复的微卫星序列有 2 条(1.7%)。

表 1 本研究所得微卫星 DNA 序列的分类情况

Table 1 Classification of microsatellite DNA sequences obtained in this study

分类标准 Criterion for classification	类别 Category	序列数目 No. of sequence	百分比 Percentage(%)
Weber(1990)	完美型 Perfect	83	70.4
	非完美型 Imperfect	30	25.4
	复合型 Compound	5	4.2
重复单元 Repeat motif	两碱基 Two bases $5 \leq n \leq 9$	88	73.5
	两碱基 Two bases $n \geq 10$	29	24.8
	四碱基 Four bases	2	1.7

### 2.2 引物设计及 PCR 扩增条件

根据测序所得序列,选取 30 条序列进行引物的设计,经过 PCR 扩增条件的摸索,得到了 20 对有良好扩增产物的引物组合,这些微卫星 DNA 标记的名称、引物序列组成、最适复性温度及预期扩增产物长度等见表 2。

表2 仿刺参各微卫星DNA标记的核心序列、引物序列和扩增的复性温度

Table 2 Motif, primer sequences and primer annealing temperatures for microsatellite DNA markers of sea cucumber developed in this study

位点 Locus	序列获取号 Accession No.	重复单元 Repeat motif	引物序列(5'→3') Primer sequence	复性温度(℃) T <sub>m</sub>	期望长度(bp) Expected size
AJ01	JF289179	(CA) <sub>5</sub>	F: TACGTCGTGAATGAATGT R: TCAGTTTGTGAGACCCTTA	50	265
AJ02	JF289180	(AC) <sub>5</sub>	F: GGTTTTCTGTTGAGGCTGTGTGGAT R: AGTCCAAAGTTTCTCTCTGGGGTGA	62	218
AJ03	JF289181	(AC) <sub>6</sub>	F: TTCACAACGCATTCCAGT R: CATGTCATAAAGGCCAAA	52	147
AJ04	JF289182	(AC) <sub>3</sub> AT(AC) <sub>6</sub> T(CA) <sub>3</sub>	F: TGTCTTGGAAGAGAAAAG R: GCATAGCCGTTACTTACC	54	206
AJ05	JF289183	(AC) <sub>3</sub> AG(AC) <sub>6</sub>	F: CGATAACCCACTTGCTGC R: CGTGTGTCCACTTCCAT	58	303
AJ06	JF289184	(AC) <sub>6</sub>	F: GTATCCACTACCCGTTTG R: AATTTCTCGCATATCAC	52	216
AJ07	JF289185	(GT) <sub>5</sub> ATGTAT(GT) <sub>13</sub>	F: GCGGGAATCTAAGGGATA R: GTGGGCACCAGAAAACAAT	54	270
AJ08	JF289186	(CA) <sub>7</sub> TG(CA) <sub>5</sub>	F: ACCAAATATGAAAGCCAAGT R: CACGATGTCTGTTATGTAGCG	52	297
AJ09	JF289187	(CA) <sub>4</sub> GACAG(AC) <sub>6</sub>	F: ACAAGCACGCAGGGTCAC R: CAGGGGAGGGGTTTCAGA	60	194
AJ10	JF289188	(CA) <sub>7</sub>	F: TCCTTTACAAGCCGTTAT R: TTGTTTGAGGTTCCGGAT	50	198
AJ11	JF289189	C <sub>11</sub> (CA) <sub>7</sub>	F: TTTTCCGTACCATGACCG R: CCTAACCAAATAGAGCCACA	54	246
AJ12	JF289190	(CA) <sub>8</sub>	F: AGCACGAATCTTTACCT R: CAATGGAAAATACAATGGG	50	170
AJ13	JF289191	(AC) <sub>6</sub>	F: GCTGCCTTTTAATTTCTG R: CAATGTGGTGGCTTCCTC	50	150
AJ14	JF289192	(AC) <sub>8</sub>	F: TTTTCGAGGACGTGGTGAT R: GTCCCTCAGGTCTGTTATTG	56	179
AJ15	JF289193	(AC) <sub>10</sub>	F: ACCGTACCAAACCTCTCTT R: CCTTCTACTAATACATCCCAG	53	168
AJ16	JF289194	(CA) <sub>3</sub> CG(CA) <sub>5</sub>	F: GCCACTATTCATGTCTTCG R: GCAACCATTTACAACCCT	52	292
AJ17	JF289195	(AC) <sub>5</sub> GC(AC) <sub>4</sub>	F: ATCCAACCTTGCCATTCTTC R: CTTTTGATTCTTGCCTG	53	123
AJ18	JF289196	(CA) <sub>5</sub>	F: CCAGATTTCTCTAGTCCTTTTG R: GTATGCGGATGGGTTTCA	52	172

续表 2

位点 Locus	序列获取号 Accession No.	重复单元 Repeat motif	引物序列(5'→3') Primer sequence	复性温度(°C) T <sub>m</sub>	期望长度(bp) Expected size
AJ19	JF289197	(CA) <sub>5</sub> ...(CA) <sub>5</sub>	F: TTATGTTCTAGAGCCTGT R: TGGGATGTACCCTAGAGT	51	263
AJ20	JF289198	C <sub>12</sub> (CA) <sub>6</sub>	F: TCCGAAAAAAGGTATTTGCTG R: ACTGGGCGAGATGATTGGT	55	322

### 2.3 不同地理种群海参的遗传多样性分析

用 20 对引物对所采集的 5 个地理种群的仿刺参和具疣拟刺参群体进行多态性筛选,图 2 所示为位点 AJ07 在韩国西群体和中国群体的电泳图。结果表明(表 3),20 对引物全部扩增稳定并具有多态性。20 个位点在 6 个群体中共检测出 231 个等位基因,单个位点的观测等位基因数( $A$ )从 3(AJ08)到 20(AJ07 和 AJ13),平均等位基因数位为 11.6 个。各位点的有效等位基因数( $N_e$ )的范围为 1(AJ08)~10.5(AJ07),平均有效等位基因数为 5.1。多个位点上的等位基因分布不均匀,表现为低频等位基因较多,等位基因数( $N_a$ )和有效等位基因数( $N_e$ )的差别较大。样本总的观察杂合度( $H_o$ )和期望杂合度( $H_e$ )范围分别为 0.02(AJ08)~0.71(AJ03)和 0.02(AJ08)~0.91(AJ07),平均值为 0.39 和 0.69。20 个位点的多态信息含量( $PIC$ )范围为 0.02(AJ08)~0.9(AJ07),除 AJ08 和 AJ19 为低多态性位点( $PIC < 0.25$ ),AJ04 和 LJ06 为中度多态( $0.25 < PIC < 0.5$ )外,其余 16 个位点均为高度多态( $PIC > 0.5$ )。在核心序列重复次数与多态性相关性方面,核心单元重复次数在 10 次以上的微卫星 DNA 有 8 条,扩增出的等位基因数范围为 3~20,平均值为 10.6;核心重复次数在 10 次以下的有 12 条,扩增出的等位基因数范围为 6~20,平均值为 12.2。

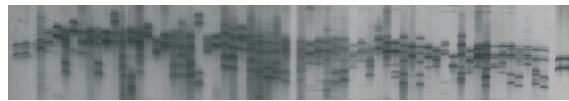


图 2 位点 AJ07 在韩国西群体和中国群体的电泳

Fig. 2 Electrophoresis of microsatellite locus amplified by AJ07 in the KW stock and CH stock

不同地理群体的平均观测等位基因数为 3.4(AM)~7(CH),平均有效等位基因数为 2.8(AM)~3.8(CH,KW)。有 4 个位点(AJ01、AJ06、AJ08、AJ11、AJ19)在单一群体中表现为单态,而在其他群体中表现出多态性。跨物种扩增结果显示,在 AM 群体中,AJ05、AJ08、AJ19 和 AJ20 无扩增产物。不同地理群体的观测杂合度范围为 0.31(JA)~0.46(KE),但其观测杂合度无显著差异( $P > 0.05$ ),说明几个群体均具有较高的遗传多样性。对 6 个群体共 120 个位点进行 Hardy-Weinberg (HW)平衡检测的结果表明,有 83 个位点显著偏离了 HW 平衡( $P < 0.05$ )。6 个群体中均有大量位点表现为杂合子缺失状态( $F_{is} > 0$ )。

### 2.4 不同地理群体间的遗传结构分析

6 个海参群体在上述 20 个微卫星位点上所表现的遗传分化情况见表 3,不同群体之间的遗传分化系数( $F_{st}$ )见表 4。结果表明,各群体之间存在不同程度的遗传分化,CH 群体与 KW 群体间、RU 群体与 KW 群体间的遗传分化系数较小( $0 < F_{st} < 0.05$ ),说明以上两对群体间存在轻度遗传分化;AM 群体与其他群体间的遗传分化系数较大( $0.15 < F_{st} < 0.25$ ),说明 AM 群体与 5 个仿刺参群体间存在高度遗传分化;其他相应群体间则存在中度遗传分化( $0.05 < F_{st} < 0.15$ )。5 个不同地理种群仿刺参的平均  $F_{st}$  值为 0.100。

由不同群体间的遗传距离和遗传相似指数(表 5)可以看出,CH 群体与 KW 群体的遗传相似指数最高(0.935),遗传距离最近(0.067),而 RU 和 AM 群体间的遗传距离最远(1.201),遗传相似度最小(0.301)。UPGMA 聚类分析图(图 3)显示,CH 群体与 KW 海岸群体聚为一支,而 RU 群体与 KE 群体和 JA 群体聚为一支,而 AM 群体作为外群,单独聚为一支。







表 4 不同群体间  $F_{st}$  值及  $N_m$  值Table 4  $F_{st}$  and  $N_m$  between different populations

群体	Population	中国 CH	韩国西 KW	韩国东 KE	俄罗斯 RU	日本 JA
中国	CH		10.558 2	3.239 4	2.826 0	2.833 8
韩国西	KW	0.023 1		3.321 9	2.774 7	2.971 4
韩国东	KE	0.071 6	0.070 0		5.890 0	3.956 0
俄罗斯	RU	0.081 3	0.082 7	0.040 7		4.132 3
日本	JA	0.081 1	0.077 6	0.059 4	0.057 0	

注: 对角线以下数据为  $F_{st}$  值, 对角线以上数据为  $N_m$  值

Note: Data below diagonal is the  $F_{st}$ ; data above diagonal is the  $N_m$

表 5 不同群体间的遗传距离和相似性指数

Table 5 Nei's genetic identity and genetic distance in different populations

群体	Population	中国 CH	韩国西 KW	韩国东 KE	俄罗斯 RU	日本 JA
中国	CH		0.935 3	0.766 9	0.724 7	0.753 9
韩国西	KW	0.066 9		0.766 6	0.711 4	0.758 6
韩国东	KE	0.265 4	0.265 8		0.886 3	0.841 1
俄罗斯	RU	0.322 1	0.340 5	0.120 7		0.852 7
日本	JA	0.282 5	0.276 3	0.173	0.159 4	

注: 对角线以下数据为遗传距离, 对角线以上数据为相似性指数

Note: Data below diagonal is the genetic distance; data above diagonal is the genetic identity

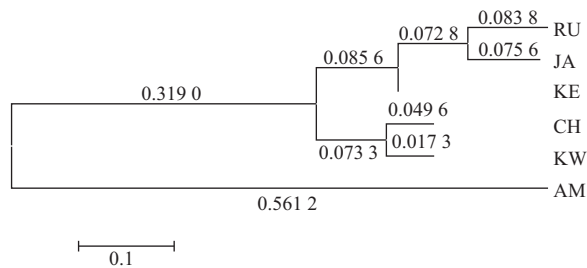


图 3 不同地理群体的聚类分析

Fig. 3 UPGMA tree for the six populations constructed by Nei's genetic distance

### 3 讨论

微卫星 DNA 分子标记因其具有多态性高、遵循孟德尔遗传规律、容易获得、可重复性强、共显性等特点, 已被广泛应用于动、植物遗传育种的各个领域。在本研究之前, Kanno 等(2005、2006)从仿刺参基因组中筛选出 20 个仿刺参微卫星分子标记并应用于日本沿海不同颜色仿刺参群体的遗传结构分析; Hu 等(2007)也利用膜杂交的方法建立了仿刺参微卫星 DNA 标记的分离方法; 丁君等(2006)利用磁珠富集法筛选到 7 个多态性微卫星标记; 卢超等(2010)利用微卫星富集文库-菌落原位杂交的方法筛选得到了 33 个仿刺参的微卫星标记; Zhan 等(2009)、Peng 等(2009)和孙国华等(2010)也分别建立了从 EST 文库中筛选出仿刺参微卫星 DNA 标记的方法。这些研究为开展刺参遗传相关研究提供了多个刺参微卫星 DNA 标记, 然而刺参遗传连锁图谱构建、遗传评价和分子辅助育种等相关研究需要大量的微卫星 DNA 标记, 与其他方法相比, FIASCO 方法具有简单、快速、高效、成本低等特点, 结合了 AFLP 技术, 使得一般的分子生态实验室能用此技术来筛选微

卫星 DNA,因此被广泛地应用于微卫星位点的筛选。所以,本研究采用了 FIASCO 方法来筛选仿刺参微卫星 DNA 标记。

所得微卫星中,完美型占 70.4%,为绝大部分,这与孙国华等(2010)的研究结果相符。所得 118 条微卫星 DNA 序列中,含有 5 次及 5 次以上(AC/GT)重复单元的有 117 条,占 97.5%,即探针 Bio-(AC)<sub>12</sub> 的杂合效率为 97.5%。郑劲松等(2008)用探针 Bio-(GT)<sub>13</sub> 对长江江豚基因组 DNA 进行杂交筛选得到 44 条微卫星序列,杂交效率为 90.9%。本研究得到的微卫星序列中,单元重复次数在 5~9 次之间的占 73.5%,为绝大部分,这可能与刺参的基因组组成特性有关。

对于微卫星重复次数的多少与多态性之间的关系,许多专家与学者的说法不一致。郑劲松等(2008)认为,在进行微卫星引物设计时不能一味地选择重复次数非常高的序列,否则会错失一些多态性位点。曲妮妮等(2010)则认为,微卫星的核心序列越长、重复次数越多则其等位基因也就越多,即多态性越高。本研究所筛选的 20 对多态性引物的扩增结果表明,核心单元重复次数与其位点的多态性无相关性,所以进行微卫星位点的筛选不应将核心序列重复次数的多少作为标准,否则可能会错失一些多态性的位点。

最大限度地维持种内遗传多样性水平,是持续利用种质资源的前提和基础, $H_o$ 、 $H_e$ 、 $PIC$  都是反映群体多样性的度量,其数值越大,说明基因丰富度越高。本研究结果表明,不同群体之间的遗传多样性差异不大,均处于较高水平,具有丰富的种质资源和良好的育种以及遗传改良潜力。

遗传结构分析结果表明,5 个不同地理仿刺参群体的平均  $F_{st}$  为 0.100,表明不同地理的仿刺参群体间存在中度的遗传分化。从图 3 聚类分析图比较可以看出,中国群体与韩国东海岸群体聚为一支,而韩国西、俄罗斯和日本群体聚为另外一支。Kim 等(2008)对韩国东海岸、南海岸和西海岸各地理种群仿刺参的遗传分析结果表明,韩国东、西海岸仿刺参的遗传距离较远。Chang 等(2009)对采自中国大连、韩国丽水、日本北海道和俄罗斯海明崴的不同地理种群的遗传分析结果表明,俄罗斯种群与其他 3 个种群的遗传距离较远。尽管相关研究的采样地点不尽相同,但综合对比其采样地点分布图和聚类分析图的结果可以推测,不同地理种群刺参遗传分化与其所处的海域分布位置相关,是海流促进基因交流与地理阻隔相互作用的结果。这些因素目前为止也仅仅是推测,还需要进一步的研究来证实。

本研究所筛选的多态性微卫星分子标记将为刺参遗传连锁图谱构建和分子标记辅助育种研究提供基础。此外,不同群体刺参遗传结构的解析结果也为刺参良种选育相关研究提供基础数据。

## 参 考 文 献

- 丁 君,曹 洁,李润玲,孙效文,常亚青. 2006. 刺参微卫星 DNA 分子标记的分离及筛选. 大连水产学院学报,21(2):95~99
- 农业部渔业局. 2010. 中国渔业年鉴. 北京:中国农业出版社,1~143
- 曲妮妮,龚世园,黄桂菊,童金苟,喻达辉. 2010. 基于 FIASCO 技术的合浦珠母贝微卫星标记分离与筛选研究. 热带海洋学报,29(3):47~54
- 孙国华,杨建敏,宋志乐,孙孝德,王卫军,张 宇. 2010. 刺参(*Apostichopus japonicus*) EST 序列中微卫星分布分析及其标记的筛选. 海洋与湖沼,41(1):133~139
- 郑劲松,廖小林,童金苟,王 丁. 2008. 长江江豚微卫星 DNA 分离的初步研究. 水生生物学报,32(1):19~25
- 战爱斌,包振民,陆 维,汪小龙,胡景杰. 2006. 仿刺参的微卫星标记. 水产学报,30(2):192~196
- 隋锡林. 2003. 刺参人工育苗及增养殖技术. 水产科学,22(5):52
- 廖玉麟. 1997. 中国动物志 棘皮动物门 海参纲. 北京:科学出版社,148~149
- 谭 杰,孙慧玲,刘 萍,杨爱国,燕敬平,刘志鸿,周丽青. 2007a. 3 个仿刺参地理种群遗传变异的微卫星 DNA 分析. 水产学报,31(4):437~442
- 谭 杰,孙慧玲,刘 萍,杨爱国,燕敬平,刘志鸿,周丽青. 2007b. 仿刺参自然群体和养殖群体间遗传变异的微卫星标记研究. 海洋水产研究,28(3):38~43
- Addison, J. A., and Hart, M. W. 2004. Analysis of population genetic structure of the green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*) using microsatellites. Marine Biology, 144(2):243~251
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., and Davis, R. W. 1980. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Hum. Genet. 32(3):314~331
- Chang, Y. Q., Feng, Z. G., Yu, J. P., and Ding, J. 2009. Genetic variability analysis in five populations of the sea cucumber *Stichopus (Apostichopus) japonicus* from China, Russia, South Korea and Japan as revealed by microsatellite markers. Marine Ecology, 30(4):455~461

- Chen, L. M., and Li, Q. 2007. Identification and characterization of microsatellite markers derived from expressed sequence tags of the sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Molecular Ecology Notes*, 7(6): 1 057~1 059
- Foltz, D. W. 1986. Null alleles as a possible cause of heterozygote deficiencies in the oyster *Crassostrea virginica* and other bivalves. *Evolution*, 40(4): 869~870
- Hu, J., Zhan, A., Lu, W., Hu, X. L., and Bao, Z. M. 2007. An efficient procedure for isolating microsatellite DNAs from sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *J. Ocean. Univ. China*, 6(1): 12~15
- Kan-no, M., and Kijima, A. 2002. High genetic variability of isozymes in Japanese sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Fish Genet. Breed Sci.* 31: 7~12
- Kan-no, M., and Kijima, A. 2003. Genetic differentiation among three color variants of Japanese sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Fisheries Science*, 69(4): 806~812
- Kan-no, M., Li, Q., and Kijima, A. 2005. Isolation and characterization of twenty microsatellite loci in Japanese sea cucumber (*Stichopus japonicus*). *Mar. Biotechnol.* 7(3): 179~183
- Kan-no, M., Suyama, Y., Li, Q., and Kijima, A. 2006. Microsatellite analysis of Japanese sea cucumber, *Stichopus (Apostichopus) japonicus*, supports reproductive isolation in color variants. *Mar. Biotechnol.* 8(6): 672~685
- Kim, M. J., Choi, T. J., and An, H. S. 2008. Population genetic structure of sea cucumber, *Stichopus japonicus* in Korea using microsatellite markers. *Aquaculture Research*, 39(10): 1 038~1 045
- Lewontin, R. C. 1972. The apportionment of human diversity. *Evol. Biol.* 6: 381~398
- Peng, W., Bao, Z. M., Du, H. X., Dong, Y., Lv, Y., Zhou, Z. C., and Hu, J. J. 2009. Development and characterization of 38 novel EST-SSRs for the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Conservation Genetics Resources*, 1(1): 447~450
- Pérez de Rosas, A. R., Segura, E. L., and García, B. A. 2007. Microsatellite analysis of genetic structure in natural *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) populations from Argentina: its implication in assessing the effectiveness of Chagas' disease vector control programmes. *Molecular Ecology*, 16: 1 401~1 412
- Rice, W. R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43(1): 223~225
- Sun, W. J., Li, Q., and Kong, L. F. 2010. Characterization of thirteen single nucleotide polymorphism markers in the sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Conservation Genet. Resour.* 2: 141~144
- Sun, X. J., Li, Q., and Kong, L. F. 2010. Comparative mitochondrial genomics within sea cucumber (*Apostichopus japonicus*): Provide new insights into relationships among color variants. *Aquaculture*, 309(1-4): 280~285
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T. V., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23(21): 4 407~4 414
- Weber, J. L. 1990. Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub>, (dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. *Genomics*, 7(4): 524~530
- Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19(3): 395~420
- Zane, L., Bargelloni, L., and Patarnello, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology Notes*, 11(1): 1~16
- Zhan, A. B., Bao, Z. M., Lu, W., Hu, X. L., Peng, W., Wang, M. L., and Hu, J. J. 2007. Development and characterization of 45 novel microsatellite markers for sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Mol. Ecol. Notes*, 7(6): 1 345~1 348
- Zhan, A. B., Hu, J. J., Hu, X. L., Zhou, Z. C., Hui, M., Wang, S., Wang, M. L., and Bao, Z. M. 2009. Fine-scale population genetic structure of Zhikong scallop (*Chlamys farreri*): Do local marine currents drive geographical differentiation. *Mar. Biotechnol.* 11(2): 223~235