

单环刺螠(*Urechis unicinctus*)微卫星标记 开发及 5 个地理种群遗传结构分析*

常 城^{1,2} 韩慧宗² 王腾腾^{1,2} 马海涛³ 刘 阳^{1,2}
王 斐² 张明亮² 王力勇⁴ 姜海滨²

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 山东省海洋资源与环境研究院山东省海洋生态修复重点实验室
烟台 264006; 3. 中国科学院南海海洋研究所 广州 510301; 4. 烟台市水产研究所 烟台 264003)

摘要 采用高通量测序法从单环刺螠基因组中开发微卫星标记, 并通过一个秦皇岛单环刺螠野生群体对其进行多态性评价, 利用获得的多态性引物对秦皇岛、烟台、潍坊、青岛、大连 5 个不同海区的野生单环刺螠群体进行了遗传多样性及遗传结构分析。结果表明: 本实验设计的 50 个微卫星标记能稳定扩增的有 38 个, 其中 22 个微卫星位点在 5 个群体中均表现为高多态性, 等位基因数(N_a)介于 24—44 之间, 多态信息含量(PIC)介于 0.921—0.967 之间。5 个群体总的平均有效等位基因数(N_e)范围为 6.629—8.850, 平均观测杂合度(H_o)和平均期望杂合度(H_e)范围分别为 0.790—0.912、0.851—0.896, 大连群体的杂合度最大($H_e=0.8962$), 潍坊群体的最小($H_e=0.8510$), 其中有 12 个微卫星位点在不同群体中出现显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡的现象。平均遗传分化指数(F_{ST})表明, 群体分化水平处于中等分化水平(F_{ST} 值为 0.0880—0.1136); 聚类分析显示烟台群体先与青岛群体聚为一支, 再与秦皇岛群体聚类, 然后跟潍坊群体聚为一支, 大连群体单独聚为一支; 遗传距离模式(IBD)显示单环刺螠群体的地理距离与遗传距离间不存在显著的线性关系。本研究开发的 22 对微卫星标记可以用于单环刺螠遗传结构分析研究, 为下一步单环刺螠种质资源保护和人工繁育提供参考依据。

关键词 单环刺螠; 微卫星标记; 地理种群; 遗传结构; 聚类分析

中图分类号 Q346; S917 doi: 10.11693/hyhz20161100238

单环刺螠, 俗称“海肠子”, 隶属于螠虫动物门(Echiurida)、螠纲(Echiurida)、无管螠目(Xenopneusta)、刺螠科(Urichidae), 主要分布于中国、俄罗斯、日本及朝鲜半岛的沿海潮间带下区及潮下带浅水区域, 是无管螠目在我国沿海分布的唯一种类。单环刺螠味道鲜美、营养丰富、食药价值高(Jo *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010), 而且具改良底质能力(Kang *et al.*, 2010), 是一种有较大养殖开发前景的海洋生物。近年来单环刺螠野生资源已无法满足市场需求的增加, 商品价格不断攀升, 其种质也呈现出一定程度的退化。因此,

单环刺螠人工繁育技术研究引起国内外学者的普遍关注, 亲本来源主要是在当地沿海滩涂捕获, 这种方式极易导致群体遗传多样性降低(Miller *et al.*, 2015), 因此积极开展单环刺螠遗传多样性相关研究和调查, 避免种质衰退, 成为当前面临的迫切任务。

微卫星标记, 又称简单重复序列(simple sequence repeats, SSR), 因其具有多态性高、共显性遗传、易于检测且等位条带易于识别等特点, 被广泛应用于水产经济动物的群体遗传多样性分析、系谱认证、遗传连锁图谱构建及数量性状连锁定位等工作(Feng *et*

* 山东省良种工程项目“优质抗病速生鱼类良种选育”, 2014—2017; 国家现代农业产业技术体系项目, CARS-50-Z09 号。常城, 硕士研究生, E-mail: chengchang333@163.com

通讯作者: 姜海滨, 研究员, E-mail: haibinjiang326@163.com

收稿日期: 2016-11-02, 收修改稿日期: 2017-01-12

al, 2014; Mohanty *et al*, 2014)。迄今为止, 对于单环刺螠的研究大多集中于人工养殖与繁育、营养组分分析等方面(王雷等, 2011), 有关微卫星标记开发及群体多样性的研究仍未见报道。本研究利用高通量测序的方法从单环刺螠基因组中开发了 22 对多态性高的微卫星标记, 并对采自我国不同海域的 5 个地理群体进行遗传多样性分析, 旨在摸索筛选单环刺螠微卫星的方法, 开发更多的单环刺螠微卫星标记, 为单环刺螠种质资源保护、良种培育及增殖放流提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

单环刺螠群体分别采自烟台、秦皇岛、潍坊、青岛和大连等附近海域(见表 1), 每个地点各取 30 头。活体解剖取其体壁, 立即提取基因组 DNA。

表 1 5 个单环刺螠地理群体采集地点
Tab.1 The sites of sampling for 5 *Urechis unicinctus* populations

群体	代码	采集地点(经纬度)
烟台	YT	37°27'48"N, 121°47'41"E
潍坊	WF	37°07'16"N, 119°27'37"E
青岛	QD	35°56'08"N, 120°08'17"E
大连	DL	38°51'52"N, 121°33'02"E
秦皇岛	QHD	39°57'40"N, 119°47'04"E

1.2 基因组 DNA 提取和建库

采用酚/氯仿抽提方法提取基因组 DNA(孙孝德, 2011), 1%琼脂糖电泳检测其完整性, NanoDrop2000 紫外分光光度计测 DNA 纯度和浓度, 选取一个 DNA 浓度适合、完整度好和纯度高的秦皇岛样本送至北京诺禾致源生物公司进行测序并构建 RAD 文库; 剩余的 DNA 模板稀释至 30ng/ μ L, 4°C 保存备用。

1.3 微卫星引物设计和筛选

在 RAD 文库中, 选取微卫星核心序列大小在 24bp 以上的合适序列用 Primer 5.0 软件设计引物。引物长度控制在 20—25bp 之间, 产物长度控制在 90—300bp 之间, T_m 值控制在 40—60°C, 正反引物相差不超过 10°C, GC 含量控制在 40%—60%, 正反引物相差不超过 10%。引物送由上海生工生物工程有限公司合成。

首先选用 6 个个体 DNA 模板对合成引物进行初步筛选, 选出能稳定扩增出目的条带的微卫星标记, 并通过温度梯度 PCR 优化引物退火温度。其次用 30

个秦皇岛群体模板对初选引物进行 PCR 扩增, 筛选出多态性的微卫星引物。然后用筛选出的引物在剩余 4 个群体中 PCR 扩增, 并对单环刺螠 5 个地理群体的遗传多样性进行评价。PCR 反应体系如下: 2 μ L DNA 模板(30ng/ μ L), 2.5 μ L 10 \times buffer(Mg²⁺Plus), 引物各 1 μ L(50 μ mol/L), 0.5 μ L dNTP(10mmol/L), 0.3 μ L Taq DNA 聚合酶(5U/ μ L), 17.7 μ L 灭菌水, 共计 25 μ L 的 PCR 反应体系。反应程序为: 94°C 预变性 5min, 94°C 变性 45s, 退火反应 45s, 72°C 延伸 1min, 35 个循环, 最后 72°C 延伸 10min。

1.4 数据统计与处理

Gel-Por Analyzer 软件统计各微卫星 DNA 条带分子量大小; PopGene32 软件计算每个位点的等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e); Cervus 软件计算多态信息含量(PIC); GenePop 软件检验 Hardy-Weinberg 平衡, 并经 Bonferroni 校正; FSTAT 2.9.3 软件以 Nei(1972)参数计算两两群体间遗传分化指数(F_{ST}); 运用 TFGA 软件根据 Nei(1972)参数进行群间遗传距离(D_S)的计算, 并进行 UPGMA 聚类分析; 利用 IBDWS 软件中的 Mantel 检验评估单环刺螠群体间遗传距离和地理距离的相关性。

2 结果

2.1 DNA 提取结果

提取的单环刺螠组织 DNA 的整体浓度在 400—700ng/ μ L, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值在 1.9—2.1 之间, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 个别样本有拖带及胶孔蛋白残留现象, 但不影响 PCR 扩增。

2.2 微卫星标记筛选与评价

Primer 5.0 软件设计引物 200 对, 挑选 50 对引物进行合成, 利用 30 个秦皇岛野生群体 DNA 样本对其进行筛选和多态性分析, 共筛选出了 22 对能稳定扩增且具多态性的微卫星标记, 其余 28 对引物扩增产物呈单态或无产物, 结果见表 2。根据 Weber(1990)提出的微卫星分类标准, 22 个微卫星序列全部为完美型。其中二核苷酸微卫星 5 个(22.73%), 三核苷酸微卫星 14 个(63.64%), 四核苷酸微卫星 2 个(9.09%), 五核苷酸微卫星 1 个(4.55%)。每个微卫星位点的平均等位基因数(N_a)为 10.6364, 平均期望杂合度(H_e)为 0.8826, 平均多态信息含量(PIC)为 0.8535。其中一个微卫星引物 UuS27 在群体中扩增的电泳图如图 1。

表 2 单环刺螭多态性微卫星引物序列信息
Tab.2 Information of polymorphic microsatellite markers isolated from *U. uncinatus*

位点	序列号	重复单元	引物序列(5'—3')	产物长度(bp)	退火温度(°C)
UuS7	KX832133	(CCAA) ₈	F:GGGTGTGGTACTAGGATGTACGA R:GAAAAAGAAGTGGAGGAAGAGGA	154	62
UuS8	KX832134	(CA) ₁₆	F:AGTGACCACCTCAGAGTTACAC R:TATAGCTACGCTAAGAGGGCTCA	146	64.5
UuS9	KX832135	(AC) ₁₆	F:TTCAAATGCTTCTGCTATCTTCA R:ATCACATGAGGTCAGACAGGTTT	129	61
UuS11	KX832136	(CA) ₁₆	F:GTGAGAGAGGATCGAGGAAG R:CTTACAGTTCGACGGCATCTAAT	128	62
UuS14	KX832137	(ATC) ₁₀	F:CGTTGGCATAACAATATTTGTGG R:GATGGTGATGTTGTTGTGACG	158	63
UuS17	KX832138	(ATC) ₁₀	F:TTATCAGCATCAATGCCATCAT R:AATGATGACGACAATTTTGAAGG	134	62
UuS19	KX832139	(TCA) ₁₀	F:AAAGGCTAATCGAAGATATGGC R:GGGAATGGTTGATGATGATAATG	148	62
UuS20	KX832140	(CAT) ₁₀	F:CTGTACTGCTCGTGGTGAGTG R:TAGTCATTTTGTGCAAATGCTG	146	62
UuS21	KX832141	(CAT) ₁₀	F:TGTTACTGATAAAGCACTGGCA R:AACAAAAACGATGGAATCATCAC	131	62
UuS22	KX832142	(CAT) ₁₀	F:TTATTGCAGTAACGTGTCGTCGTC R:TTCAGCAGTCTCTGTGCAATA	139	61
UuS23	KX832143	(CCTTA) ₆	F:CATTGTATCACTCGTGTGGTG R:CGTAAGGTAAGGCAAGAAAAGGT	126	60
UuS24	KX832144	(TCA) ₁₀	F:CAGAATACTGCTACTGCTGCTGA R:GTTGGTGCATTCCAGAACAAAT	148	63
UuS26	KX832145	(GAT) ₁₀	F:GATCATGCGCTATATTGGTTAGC R:AGCTCAGACTTATGAAGAGTCAC	147	63
UuS27	KX832146	(TCA) ₁₀	F:ACTTCCATCATAACTGTCGTCGT R:AGAATGATGATGGGGTGATAGTG	97	62
UuS29	KX832147	(CT) ₁₄	F:ATCACCAACCCATATCGATTAAC R:GAAATCCTTGTTTCAGGAGGTT	154	62
UuS31	KX832148	(ATC) ₉	F:CATTATCGCAATACAAGTTGTGCG R:AGTCTTGTTGTATGCGTCCATT	139	64
UuS32	KX832149	(CAA) ₉	F:ACGGCATTATCTAACGCACTA R:ATGAGGACTGAGGTGTTATTGGA	136	64
UuS34	KX832150	(ATC) ₉	F:GCTTAGAAAAGAAACCGAGTCACC R:ATGCATCATTTGATAACCAGGAG	125	62
UuS35	KX832151	(TGA) ₉	F:ATGACGGAAGTGATGATGAAAGT R:GTCATCGAGCTTTTCGGTTATC	142	61
UuS37	KX832152	(TGA) ₉	F:CAAGGACATAGACAATGATGGTG R:TGACTTATTCCACGTTATGGTTG	160	61
UuS48	KX832153	(TA) ₁₂	F:TCTTCGACCGAACCTATACTTCA R:TTCTGATTTCAGCATGGTATTCCT	95	60
UuS49	KX832154	(ACTC) ₆	F:TACGCGATTAATGTACTCACACG R:CATTTCAGAGCGTTATAACTGGG	126	56

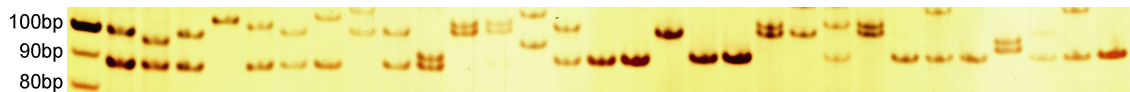


图 1 微卫星引物 UuS27 在单环刺螭中扩增的电泳图谱
Fig.1 Electrophoretic patterns of PCR products amplified by primer UuS27 in *U. uncinatus*

2.3 群体多样性分析

从 5 个群体整体来看, 22 对微卫星位点的遗传统

计指标见表 3, 共检测到 719 个, 等位基因数(N_a)介于 24—44, 有效等位基因数(N_e)介于 2.95—14.40, 观测

杂合度(H_o)和期望杂合度(H_e)范围分别是 0.537—0.959 和 0.929—0.971, 每个位点的多态信息含量(PIC)介于 0.921—0.967 之间。

22 个微卫星位点在 5 个单环刺螭地理群体中的遗传多样性信息见表 4, 从表 4 可以看出, 平均等位基因数差别很小, 由高到低依次为 QHD 群体(10.64)、DL 群体(10.41)、YT 群体(9.73)、QD 群体(9.59)、WF 群体(9.18); 平均多态信息含量的顺序与平均等位基因数排序一致。DL 群体的平均观测杂合度($H_o=0.9118$)、期望杂合度($H_e=0.8962$)及多态信息含量(PIC=0.8692)均最大, WF 群体的平均期望杂合度($H_e=0.8510$)、多态信息含量(PIC=0.8200)及等位基因数均最小。以上结果表明, 5 个单环刺螭群体的遗传

多样性较为丰富, 其中 DL 群体的遗传多样性在 5 个群体中最高, 而 WF 群体最低。

基于 Hardy-Weinberg 平衡定律对 5 个地理群体中的每个位点基因平衡状态进行检测(表 4), 经 Bonferroni 校正($P<0.0023$)后, 在 QHD 群体中, 有 3 个位点显著 Hardy-Weinberg 平衡, 分别为 UuS11、UuS19、UuS22; 在 YT 群体中, 有 2 个位点显著偏离, 分别为 UuS23、UuS26; 在 WF 群体中, 有 4 个位点显著偏离平衡, 分别为 UuS17、UuS20、UuS22、UuS29; 在 QD 群体中, 有 2 个位点显著偏离, 分别为 UuS23、UuS29; 在 DL 群体中, 除 UuS7 位点外, 其余位点等位基因频率均符合。连锁不平衡检测表明, 各位点间无连锁不平衡现象。

表 3 单环刺螭 22 个微卫星位点的遗传统计指标
Tab.3 The genetic statistics of 22 SSR markers in *U. unicinctus* populations

位点	样本数(n)	等位基因数 N_a	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	多态信息含量 PIC
UuS7	149	33	0.852	0.942	0.936
UuS8	142	29	0.908	0.956	0.951
UuS9	147	44	0.912	0.969	0.965
UuS11	150	27	0.900	0.946	0.939
UuS14	149	37	0.940	0.962	0.958
UuS17	132	28	0.621	0.959	0.953
UuS19	148	30	0.703	0.958	0.953
UuS20	149	35	0.906	0.967	0.963
UuS21	149	30	0.839	0.950	0.944
UuS22	132	32	0.667	0.964	0.959
UuS23	136	30	0.537	0.929	0.921
UuS24	148	40	0.865	0.965	0.960
UuS26	150	30	0.913	0.959	0.954
UuS27	150	31	0.880	0.952	0.946
UuS29	147	44	0.959	0.971	0.967
UuS31	149	35	0.826	0.958	0.953
UuS32	150	31	0.947	0.950	0.944
UuS34	146	25	0.788	0.932	0.924
UuS35	150	38	0.933	0.965	0.960
UuS37	150	31	0.873	0.951	0.946
UuS48	138	35	0.819	0.945	0.938
UuS49	147	24	0.762	0.945	0.939
平均值	145.82	32.68	0.834	0.954	0.949

表 4 5 个单环刺螠地理群体的微卫星遗传多样性参数
 Tab.4 The polymorphic indicators in 17 SSR loci of 5 *U. uncinatus* populations

位点	指数	群体				
		QHD	YT	WF	QD	DL
UuS7	N_a	12	8	8	9	11
	N_e	9.5238	6.5693	4.9724	6.0504	8.9109
	H_o	1.0000	1.0000	0.8667	0.6207	0.7667
	H_e	0.9102	0.8621	0.8124	0.8494	0.9028
	PIC	0.8860	0.8300	0.7770	0.8160	0.8770
	P	0.0200	0.0568	0.5979	0.0030	0.0000*
UuS8	N_a	11	7	10	6	10
	N_e	7.8603	4.7451	6.6176	5.5556	8.4906
	H_o	0.9667	0.7727	0.9667	0.9667	0.8333
	H_e	0.8876	0.8076	0.8633	0.8339	0.8972
	PIC	0.8600	0.7610	0.8330	0.7950	0.8700
	P	0.0653	0.0026	0.0526	0.6286	0.0220
UuS9	N_a	16	8	14	13	11
	N_e	13.5338	7.2581	11.1391	10.4533	8.4112
	H_o	0.9000	0.9000	0.8966	0.8571	1.0000
	H_e	0.9418	0.8768	0.9262	0.9208	0.8960
	PIC	0.9210	0.8460	0.9070	0.8960	0.8700
	P	0.0024	0.2086	0.0036	0.0133	0.0359
UuS11	N_a	9	9	14	8	14
	N_e	7.4074	5.8632	10.4046	6.4748	12.1622
	H_o	0.5333	0.9667	1.0000	1.0000	1.0000
	H_e	0.8797	0.8435	0.9192	0.8599	0.9333
	PIC	0.8500	0.8140	0.8960	0.8260	0.9050
	P	0.0004*	0.7702	0.0644	0.0613	0.0270
UuS14	N_a	10	11	8	14	13
	N_e	6.7550	8.1081	6.0201	9.5745	10.7784
	H_o	0.8621	0.9333	0.9667	1.0000	0.9333
	H_e	0.8669	0.8915	0.8480	0.9107	0.9226
	PIC	0.8360	0.8640	0.8160	0.8870	0.9000
	P	0.2917	0.3150	0.4903	0.3588	0.0434
UuS17	N_a	9	9	8	12	10
	N_e	7.4286	6.5381	6.5455	8.3893	8.5308
	H_o	0.5385	0.5556	0.5000	0.6400	0.8333
	H_e	0.8824	0.8630	0.8652	0.8988	0.8977
	PIC	0.8500	0.8280	0.8330	0.8690	0.8710
	P	0.0028	0.0207	0.0000*	0.0065	0.0057
UuS19	N_a	8	9	9	8	10
	N_e	7.0377	6.7669	7.1713	6.4286	8.2451
	H_o	0.4828	0.7333	0.6667	0.6333	1.0000
	H_e	0.8730	0.8667	0.8751	0.8588	0.8941
	PIC	0.8410	0.8350	0.8450	0.8250	0.8670
	P	0.0000*	0.0048	0.0239	0.0032	0.2976

续表

位点	指数	群体				
		QHD	YT	WF	QD	DL
UuS20	N_a	13	14	9	9	10
	N_e	9.6774	11.1801	6.1164	8.1081	8.5714
	H_o	0.9333	0.9667	0.8966	0.7333	0.9667
	H_e	0.9119	0.9260	0.8512	0.8915	0.8983
	PIC	0.8880	0.9040	0.8260	0.8640	0.8720
	P	0.5178	0.3399	0.0000*	0.0120	0.0686
UuS21	N_a	12	9	7	11	8
	N_e	8.8235	7.2581	5.9406	8.1448	7.1880
	H_o	0.7667	0.9000	0.8333	0.8667	0.8276
	H_e	0.9017	0.8768	0.8458	0.8921	0.8760
	PIC	0.8760	0.8470	0.8220	0.8650	0.8450
	P	0.0909	0.1359	0.0454	0.1039	0.7604
UuS22	N_a	7	9	8	11	12
	N_e	4.5057	6.8372	6.6590	10.3827	9.4241
	H_o	0.4286	0.6190	0.4583	0.8621	0.9000
	H_e	0.7922	0.8746	0.8679	0.9195	0.9090
	PIC	0.7490	0.8370	0.8320	0.8950	0.8840
	P	0.0000*	0.0090	0.0000*	0.6159	0.9520
UuS23	N_a	10	9	9	7	6
	N_e	8.7111	5.7889	5.5406	5.4967	4.2882
	H_o	0.7500	0.2500	0.5714	0.3103	0.7778
	H_e	0.9013	0.8449	0.8344	0.8324	0.7813
	PIC	0.8740	0.8060	0.7980	0.7950	0.7370
	P	0.0884	0.0000*	0.0042	0.0000*	0.1518
UuS24	N_a	13	10	10	13	8
	N_e	10.1124	7.7253	5.9858	9.5745	6.8097
	H_o	0.7333	0.8667	0.7931	1.0000	0.9310
	H_e	0.9164	0.8853	0.8475	0.9107	0.8681
	PIC	0.8930	0.8580	0.8150	0.8860	0.8360
	P	0.0028	0.2098	0.1627	0.0116	0.0355
UuS26	N_a	11	14	10	11	10
	N_e	7.7253	10.5882	7.8947	9.1837	8.4906
	H_o	0.8000	0.9333	0.9667	0.8667	1.0000
	H_e	0.8853	0.9209	0.8881	0.9062	0.8972
	PIC	0.8580	0.8980	0.8610	0.8810	0.8710
	P	0.1200	0.0018*	0.0445	0.0250	0.2019
UuS27	N_a	11	11	11	12	13
	N_e	8.9552	8.4906	7.0866	10.4046	10.0000
	H_o	0.9000	0.9333	0.7000	0.9333	0.9333
	H_e	0.9034	0.8972	0.8734	0.9192	0.9153
	PIC	0.8780	0.8710	0.8470	0.8960	0.8920
	P	0.1003	0.7165	0.0264	0.6580	0.1779
UuS29	N_a	14	18	11	14	11
	N_e	11.2500	14.4000	8.2841	10.3448	9.4737
	H_o	1.0000	0.9667	0.8889	0.9667	0.9667
	H_e	0.9266	0.9463	0.8959	0.9186	0.9096
	PIC	0.9060	0.9260	0.8680	0.8950	0.8850
	P	0.1226	0.0145	0.0000*	0.0000*	0.1497

续表

位点	指数	群体				
		QHD	YT	WF	QD	DL
UuS31	N_a	10	10	12	12	9
	N_e	7.3469	7.3171	7.4756	8.0000	8.4507
	H_o	0.8333	0.7667	0.7586	0.8000	0.9333
	H_e	0.8785	0.8780	0.8814	0.8898	0.8966
	PIC	0.8490	0.8510	0.8520	0.8620	0.8700
	P	0.0245	0.0907	0.0029	0.0374	0.9442
UuS32	N_a	12	10	8	5	12
	N_e	8.4507	6.6176	5.7878	4.2959	9.9448
	H_o	0.9667	1.0000	0.9000	0.9000	0.9667
	H_e	0.8966	0.8633	0.8412	0.7802	0.9147
	PIC	0.8700	0.8380	0.8050	0.7310	0.8910
	P	0.0463	0.2670	0.0472	0.0069	0.9638
UuS34	N_a	7	9	7	6	9
	N_e	4.3689	6.5333	4.4776	4.8545	8.0000
	H_o	0.5333	0.7500	0.8000	0.9643	0.9000
	H_e	0.7842	0.8623	0.7898	0.8084	0.8898
	PIC	0.7360	0.8390	0.7830	0.7620	0.8620
	P	0.0059	0.0138	0.0088	0.1736	0.6827
UuS35	N_a	10	9	10	9	12
	N_e	7.5314	6.7925	7.1713	7.2581	10.7784
	H_o	0.9333	0.9667	0.9667	0.8333	0.9667
	H_e	0.8819	0.8672	0.8751	0.8768	0.9226
	PIC	0.8530	0.8410	0.8450	0.8470	0.9000
	P	0.2764	0.0915	0.4935	0.1289	0.9118
UuS37	N_a	10	8	8	7	9
	N_e	7.2581	4.9724	7.5630	3.9560	8.0357
	H_o	0.8667	0.7667	0.9333	0.8000	1.0000
	H_e	0.8768	0.8124	0.8825	0.7599	0.8904
	PIC	0.8510	0.7750	0.8530	0.7100	0.8620
	P	0.0122	0.0049	0.4827	0.7890	0.7718
UuS48	N_a	7	4	5	6	14
	N_e	5.0847	3.6528	2.9455	2.9460	13.0435
	H_o	0.9333	0.6364	0.6538	0.8667	0.9333
	H_e	0.8169	0.7431	0.6735	0.6718	0.9390
	PIC	0.7760	0.6750	0.6120	0.6380	0.9240
	P	0.1553	0.5603	0.6489	0.0549	0.2660
UuS49	N_a	12	9	6	8	7
	N_e	8.7604	6.6220	4.0268	6.0000	6.6746
	H_o	0.7241	0.7931	0.6333	0.9667	0.6897
	H_e	0.9014	0.8639	0.7644	0.8475	0.8651
	PIC	0.8750	0.8310	0.7140	0.8120	0.8320
	P	0.0027	0.0735	0.0059	0.0034	0.1635
平均值	N_a	10.6364	9.7273	9.1818	9.5909	10.4091
	N_e	8.0958	7.3011	6.6285	7.3580	8.8501
	H_o	0.7903	0.8171	0.8008	0.8358	0.9118
	H_e	0.8826	0.8670	0.8510	0.8617	0.8962
	PIC	0.8535	0.8352	0.8200	0.8297	0.8692

注: *经 Bonferroni 校正后显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡($P < 0.0023$)

2.4 群体遗传结构分析

5 个单环刺螭群体间的平均遗传分化指数(F_{ST})和遗传距离(D_S)如表 5 所示。不同群体间的遗传分化指数 F_{ST} 值范围为 0.0880—0.1136, 各群体间 F_{ST} 值差异不显著($P > 0.05$); 从 Nei's 标准遗传距离来看, YT 和 DL 群体遗传距离最远($D_S=0.3217$), 说明两群体间亲缘关系最远; YT 和 QD 群体遗传距离最近($D_S=0.2170$), 说明两群体间亲缘关系较近; DL 群体与其他群体均有较远的遗传距离。基于 Nei 遗传距离采用 UPGMA 方法构建系统发育树(图 2), YT 与 QD 群体首先聚为一起, 再与 QHD 群体聚为一支, 然后跟 WF 群体聚为一支, DL 群体为外围群(outgroup), 再聚为一支。IBD 分析结果显示单环刺螭群体之间遗传距离和地理距离不存在显著相关(见图 3, $R^2=0.1600$, $P=0.876 > 0.05$), 表明基因流动不符合地理距离隔离模式。

表 5 单环刺螭 5 个群体间的遗传分化指数(F_{ST})和遗传距离(D_S)

Tab.5 Pairwise genetic differentiation (F_{ST}) and genetic distance (D_S) in pair of the 5 populations in *U. unicinctus*

群体	QHD	YT	WF	QD	DL
QHD	—	0.1055	0.1136	0.1125	0.0939
YT	0.2406	—	0.1110	0.0880	0.1002
WF	0.2887	0.2691	—	0.1078	0.0992
QD	0.2784	0.2170	0.2769	—	0.1020
DL	0.2665	0.3217	0.3042	0.3068	—

注: 对角线下方为群体间的遗传距离, 上方为遗传分化指数

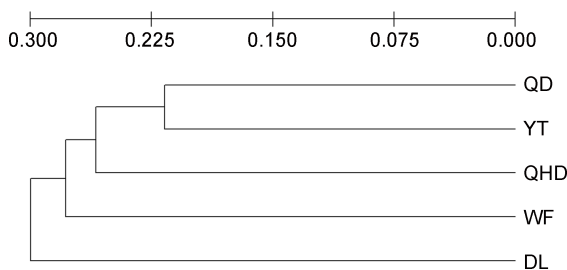


图 2 单环刺螭 5 个群体的 UPGMA 聚类图

Fig.2 UPGMA dendrogram of 5 *U. unicinctus* populations

3 讨论

微卫星标记在水产动物遗传分析和育种实践中被广泛使用, 但有关单环刺螭微卫星标记的开发及应用尚未见报道。本研究采用 RAD 测序法获得微卫星标记, 这种方法与传统的磁珠富集法相比, 不仅节约实验成本, 而且可以快速精确的定位出大量微卫

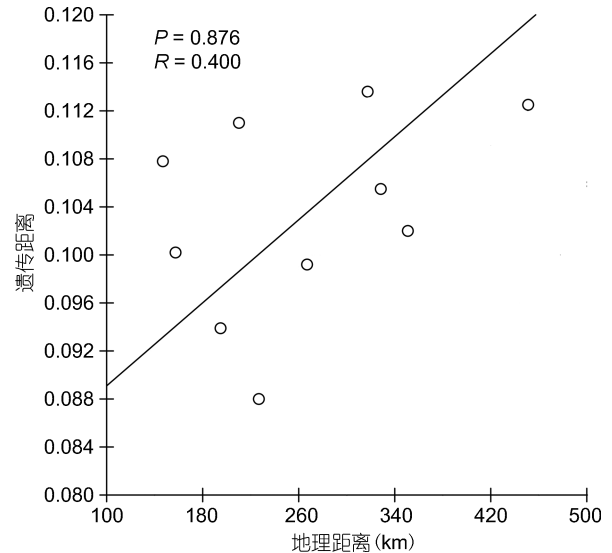


图 3 单环刺螭群体间遗传距离和地理距离的相关性

$$(y=0.0805+8.647 \times 10^{-4}x, R^2=0.160, P=0.876)$$

Fig.3 Relationship between geographical and genetic distances in *U. unicinctus* populations by IBD analysis

星序列。本研究中得到 1287 个微卫星序列, 并从中挑选了重复单元、重复次数都较多的微卫星序列进行引物设计。选用此类微卫星核心序列, 能避免筛选出过多低多态性微卫星位点(韩承慧等, 2016)。本研究获得的微卫星位点均为完美型(Perfect), 而未得到非完美型(Imperfect)和复合型(Compound)微卫星片段, 原因可能是 RAD 测序法进行酶切时破坏了后两种微卫星片段, 此现象在菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)的微卫星开发中也有报道(闫路路等, 2015)。而在长臀鲉(*Cranoglanis boudierius*)(孔杰等, 2016)、虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)(赵莹莹等, 2006)的磁珠富集法微卫星开发中则得到了更丰富的微卫星类型。主要原因可能是获取微卫星位点的方法存在明显差异。

多态信息含量(PIC)是衡量基因座位在群体多态性的指标, 当 $PIC > 0.50$ 时, 为高度多态(Ortí *et al*, 1997), 本研究中 22 个多态位点(平均 PIC 为 0.921—0.967)全部表现为高多态性。群体的等位基因数(N)及遗传杂合度(H)是评估和度量群体遗传多样性程度的重要参数。依据微卫星选择标准(Barker, 1994), 当等位基因数(N_a) > 4 个时能较好的反映群体遗传变异水平, 本研究中 5 个群体中检测的平均 N_a 为 9.18—10.64, 平均 N_e 为 6.63—8.85, 分析其等位基因保存较好的原因, 主要是单环刺螭生存环境适宜且受到的人为破坏较少。Leberg(2002)研究发现期望杂合度(H_e)比观测杂合度(H_o)更能准确衡量群体多样性大小, 本

研究中5个地理群体的平均 H_o 为0.7903—0.9118,平均 H_e 为0.8510—0.8962,与王蕾等(2010)调查的渤海牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)群体多样性($H_o=0.532—0.895$; $H_e=0.635—0.902$)相比, H_e 值相对更大,表明黄渤海单环刺螠在自然海区仍保持较高的遗传多样性。在所筛选出的22个微卫星标记中,有12个位点在不同群体中出现了偏离Hardy-Weinberg平衡的现象,可能原因是单环刺螠活动能力不强,营定居式生活,可能存在近亲交配,导致群体内杂合子过剩或缺失;也可能是实验选用样本数较少,对位点平衡有一定的影响,对长牡蛎(*Crassostrea gigas*) (Yan *et al.*, 2015)、美洲帘蛤(*Mercenaria mercenaria*) (Yu *et al.*, 2010)等固着型和埋栖型贝类利用微卫星标记进行遗传分析时也存在微偏离Hardy-Weinberg平衡的现象。

本研究利用基因遗传分化指数 F_{ST} 来评价群体遗传分化程度。按照Balloux等(2002)的评判标准, F_{ST} 在0.00—0.05时代表群体间分化程度弱;0.05—0.15代表分化程度中等;0.15—0.25代表分化程度较大;0.25—1.00代表分化程度极大。本研究5个地理群体间的遗传分化指数水平为0.0880—0.1136,说明群体分化水平并不高,遗传变异主要来自群体内的个体之间,与杨智鹏等(2015)报道的我国沿海脉红螺(*Rapana venosa*)9个群体间遗传分化特性(F_{ST} 为0.0122—0.0936)得到类似的结果。本研究结果表明,YT和DL群体遗传距离最大(0.3217),YT和QD遗传距离最小(0.2170),IBD检验结果显示单环刺螠群体不符合距离隔离模式,即群体间的遗传分化未随地理距离的增加而增加,说明群体间可能存在较强的基因流,原因可能是黄、渤海海区海流增加了地理群体间基因流的机会性,此结果与倪乐海(2011)对我国北方中国蛤蜊9个地理群体的遗传多样性与遗传结构分析一致。对其他海洋生物如多鳞鱚(*Sillago sihama*) (郭昱嵩等, 2013)、近江牡蛎(*Crassostrea ariakensis*) (Xiao *et al.*, 2010)等也有过IBD模式的报道。同时Melchinger等(1990)认为在遗传距离小于0.54时,亲本间的遗传距离越大,杂交子代的基因杂合度越高,杂种优势越强。本研究遗传距离范围在0.2170—0.3217,均满足以上条件。在未来进行单环刺螠人工选育时选取遗传距离较远且性状优良的群体间进行杂交,可能选育出优良单环刺螠新品种。

4 结论

本研究开发的22对高多态性微卫星标记可以用

于单环刺螠微卫星多态性、群体多样性、遗传学分析和种群进化等研究,从分子标记水平表明秦皇岛、烟台、潍坊、青岛和大连5个野生地理群体的杂合度较高,遗传多样性丰富,种群遗传结构相对稳定。单环刺螠种群在黄、渤海海区多样性水平虽然较高,但应及时采取措施加强单环刺螠种质资源保护与管理,以缓解或避免由于过度滥捕造成自然单环刺螠种群遗传多样性的丢失。同时本研究也为下一步良种人工选育工作提供指导。

参 考 文 献

- 王雷, 刘海梅, 彭 鸽等, 2011. 单环刺螠营养成分及体内活性物质的研究进展. 鲁东大学学报(自然科学版), 27(4): 342—345
- 王蕾, 张立冬, 万玉美等, 2010. 牙鲆微卫星标记的筛选及群体遗传结构分析. 遗传, 32(10): 1057—1064
- 孔杰, 蒋晓红, 周 洲等, 2016. 磁珠富集法开发长臀鲩微卫星分子标记. 贵州农业科学, 44(7): 14—17
- 闫路路, 秦艳杰, 闫喜武等, 2015. 基于转录组平台的蛤仔微卫星标记筛选. 生态学报, 35(5): 1573—1580
- 孙孝德, 2011. 刺参(*Apostichopus japonicus*)微卫星标记的筛选及群体分析. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 21—28
- 杨智鹏, 于 红, 于瑞海等, 2015. 中国沿海脉红螺群体遗传多样性及其遗传结构. 水产学报, 39(10): 1443—1449
- 赵莹莹, 朱晓琛, 孙效文等, 2006. 磁珠富集法筛选虾夷扇贝微卫星序列. 中国水产科学, 13(5): 749—755
- 倪乐海, 2011. 中国蛤蜊群体遗传结构与蛤蜊科贝类系统发育研究. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 42—52
- 郭昱嵩, 颜程钟, 张宇岚等, 2013. 多鳞鱚(*Sillago sihama*)4个野生地理群体的微卫星标记分析. 海洋与湖沼, 44(2): 267—276
- 韩承慧, 马海涛, 姜海滨等, 2016. 许氏平鲷(*Sebastes schlegelii*)微卫星标记开发及野生、养殖群体遗传多样性分析. 海洋与湖沼, 47(1): 213—220
- Balloux F, Lugon-Moulin N, 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. Molecular Ecology, 11(2): 155—165
- Barker J S F, 1994. Sequential gel electrophoretic analysis of esterase—2 in two populations of *Drosophila buzzatii*. Genetica, 92(3): 165—175
- Feng L Y, Hu L P, Fu X T *et al.*, 2014. An integrated genetic and cytogenetic map for Zhikong scallop, *Chlamys farreri*, based on microsatellite markers. PLoS One, 9(4): e92567
- Jo H Y, Jung W K, Kim S K, 2008. Purification and characterization of a novel anticoagulant peptide from marine echiuroid worm, *Urechis unicinctus*. Process Biochemistry, 43(2): 179—184
- Kang K H, Zhang Z F, Min K J *et al.*, 2010. Effects of *Urechis unicinctus* juveniles on chemical characteristics of organically contaminated coastal sediment. Journal of Ocean University of China, 9(1): 48—52

- Leberg P L, 2002. Estimating allelic richness: effects of sample size and bottlenecks. *Molecular Ecology*, 11(11): 2445—2449
- Melchinger A E, Lee M, Lamkey K R *et al.* 1990. Genetic diversity for restriction fragment length polymorphisms: relation to estimated genetic effects in maize inbreds. *Crop Science*, 30(5): 1033—1040
- Miller P A, Elliott N G, Koutoulis A *et al.*, 2015. Genetic diversity of cultured, naturalized, and native pacific oysters, *Crassostrea gigas*, determined from multiplexed microsatellite markers. *Journal of Shellfish Research*, 31(3): 611—617
- Mohanty P, Sahoo L, Pillai B R *et al.*, 2014. Genetic divergence in Indian populations of *M. rosenbergii* using microsatellite markers. *Aquaculture Research*, 47(2): 472—481
- Orti G, Pearse D E, Avise J C, 1997. Phylogenetic assessment of length variation at a microsatellite locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(20): 10745—10749
- Wang D L, Jiang H Z, Wang R L *et al.*, 2010. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from a marine animal, *Urechis unicinctus*. *China Biotechnology*, 30(8): 42—51
- Weber J L, 1990. Informativeness of human (dC—dA)_n(dG—dT)_n polymorphisms. *Genomics*, 7(4): 524—530
- Xiao J, Cordes J F, Wang H Y *et al.*, 2010. Population genetics of *Crassostrea ariakensis* in Asia inferred from microsatellite markers. *Marine Biology*, 157(8): 1767—1781
- Yan W, Wang A M, Guo X M, 2015. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers for the northern quahog *Mercenaria mercenaria* (Linnaeus, 1758). *Journal of Shellfish Research*, 29(1): 77—82
- Yu Z N, Wang Y H, Fu D K, 2010. Development of fifty-one novel EST-SSR loci in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* by data mining from the public EST database. *Conservation Genetics Resources*, 2(S1): 13—18

MICROSATELLITE MARKER ISOLATION AND GENETIC STRUCTURE ANALYSIS FOR FIVE POPULATIONS OF *URECHIS UNICINCTUS*

CHANG Cheng^{1,2}, HAN Hui-Zong², WANG Teng-Teng^{1,2}, MA Hai-Tao³, LIU Yang^{1,2},
WANG Fei², ZHANG Ming-Liang², WANG Li-Yong⁴, JIANG Hai-Bin²

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shandong Provincial Key Laboratory of Restoration for Marine Ecology, Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai 264006, China; 3. South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China; 4. Yantai Fisheries Research Institute, Yantai 264003, China)

Abstract *Urechis unicinctus* is an economically important marine benthos distributed widely in intertidal zone of Yellow Sea and Bohai Sea. To sustain the resources that have been reduced dramatically in recent years, understanding the genetic diversity and population structure of wild stocks for breeding, we isolated the microsatellite markers by high-throughput sequencing for the species sampled from 5 natural populations in Qinhuangdao (QHD), Yantai (YT), Weifang (WF), Qingdao (QD), and Dalian (DL). Among 50 pairs of microsatellite primers we designed, 38 presented obvious bands. Moreover, 22 loci showed high polymorphism, the allele number (N_a) of these loci ranged 24—44, the polymorphism information content (PIC) 0.921—0.967, and the effective allele number (N_e) 6.629—8.850. The average observed (H_o) and expected heterozygosity (H_e) were 0.790—0.912 and 0.851—0.896, respectively. The maximum H_e (0.8962) was found in DL population and the minimum (0.8510) in WF population. Nine out of the 22 loci showed deviations from Hardy-Weinberg equilibrium in different population. The average genetic differentiation (F_{ST}) ranged 0.0880 to 0.1136, suggesting that the population differentiation was at the middle level. In UPGMA phylogenetic tree, YT and QD populations clustered first, then QHD population jointed, and lastly WF and DL populations. As shown in IBD analysis, no significant linear relationship was revealed between geographical and genetic distances in these populations. These microsatellite markers can help us to analyze the population genetic structure and provide reference for artificial breeding and germplasm resources protection for *U. unicinctus* in the future.

Key words *Urechis unicinctus*; microsatellite DNA; geographical population; genetic structure; UPGMA