

# 刺参(*Apostichopus japonicus*)野生及两代选育群体间遗传变异的微卫星标记研究\*

孙孝德<sup>1,2</sup> 孙国华<sup>1</sup> 袁廷柱<sup>3</sup> 杨建敏<sup>1</sup> 王卫军<sup>1</sup>  
吉成龙<sup>1,2</sup> 宋志乐<sup>4</sup>

(1. 山东省海洋水产研究所 烟台 264006; 2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306;  
3. 山东省青岛县水产研究所 烟台 265800; 4. 烟台市芝罘区渔业技术推广站 烟台 264000)

**摘要** 应用微卫星 DNA 技术对野生刺参和两代选育刺参群体遗传多样性进行了研究。9 对微卫星引物在三个刺参群体中共扩增获得 43 个等位基因, 每个微卫星座位检测到的等位基因数为 2—7 个。三个群体的观测杂合度的平均值分别为 0.6556、0.6704 和 0.6148, 多态信息含量平均值分别为 0.6654、0.5929 和 0.5275。结果表明, 与野生群体相比, 选育刺参两代群体存在杂合度降低, 遗传多样性下降的现象。Hardy-Weinberg 平衡的卡方检验及  $F$ -检验数据显示 3 个群体在某些位点都出现了杂合子缺失, 偏离平衡的位点逐代增加, 相邻世代之间遗传分化系数逐代减小, 人工累代选育已经使群体的遗传结构发生了变化。 $F_{ST}$  平均值 0.0443 提示出选育群体处在较弱的分化水平, 说明遗传变异主要来自于群体内个体间。遗传距离及遗传相似性结果显示随着选育世代的增加, 世代之间遗传距离越来越小, 遗传相似性越来越大, 但与理论值仍有差距, 选育群体刺参仍具有育种潜力。

**关键词** 刺参, 微卫星, 遗传结构, 野生群体, 选育群体, 遗传分化, 遗传距离

**中图分类号** Q346

刺参(*Apostichopus japonicus*)主要分布于我国山东、河北、辽宁等省的浅海沿岸。随着养殖规模的不断扩大, 刺参养殖过程中出现了生长速度缓慢、个体差异大、抗病能力差等一系列与种质退化相关的问题。

微卫星标记(Microsatellite Markers)是近年来快速发展的分子标记主流技术之一, 因具有重复性好、较易操作和共显性等特点(徐晋麟等, 2003), 被广泛用于亲缘关系鉴定、个体的遗传特性、群体遗传结构与多样性以及遗传连锁作图构建等研究领域(胡则辉等, 2006)。近年来, 国外一些学者应用同工酶、微卫星技术分析了仿刺参的遗传多样性, Kanno 等(2005)

开发了仿刺参 20 个微卫星标记, 并利用这些标记对日本近海的仿刺参进行了遗传多样性的分析(李颖等, 2006; 谭杰等, 2007)。

本研究应用微卫星 DNA 技术对研究组自 2000 年起进行的快速生长性状新品系的选育工作中的选育群体进行分析, 跟踪选育自繁群系遗传结构和遗传变异变化趋势, 辅助选育工作。以野生及两代刺参选育群体的自繁群系作为研究对象, 分析它们之间的遗传变异参数, 探讨人工选育活动对刺参选育群体遗传多样性的影响, 旨在为该物种的选育工作提供科学指导, 进一步为具有优势性状刺参的选育提供分子支持与辅助。

\* 山东省良种工程项目“速生抗病耐高温刺参良种选育”, 2008—2011; 山东省优秀中青年科学家奖励基金(博士基金)项目, 2008BS06004 号; 山东省自然科学基金项目, ZR2011CM036 号; 山东省科技攻关项目“海参新品系选育及构建”, 2008GG10005023 号。孙孝德, E-mail: sunxiaode007@163.com

通讯作者: 杨建敏, 博士, 研究员, E-mail: ladderup@126.com

收稿日期: 2010-08-21, 收修改稿日期: 2010-10-28

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

实验选取未经过选育的群体即崆峒岛附近海域野生刺参群体(YS)、选育速生品系  $F_1$  代和速生  $F_4$  代三个群体为代表进行分析, 从三个群体中随机选取 30 头刺参作为实验样品。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 基因组 DNA 的提取** 将三个群体的刺参各取 30 个个体, 剖取获得纵肌 100mg, 液氮研磨, 加入 700ml CTAB 提取缓冲液(100mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 20mmol/L EDTA- $Na_2$ , 1.4mol/L NaCl, 2% CTAB, 0.1%  $\beta$ -巯基乙醇)和终浓度为 100 $\mu$ g/ml 蛋白酶 K, 55 $^{\circ}$ C 消化 3h 或 37 $^{\circ}$ C 过夜, 等体积酚氯仿( $V:V=1:1$ )、氯仿抽提, 二倍体积乙醇沉淀, TE 溶解, 紫外分光光度计定量, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

**1.2.2 微卫星引物的设计及筛选** 本实验所用微卫星引物序列来自刺参基因组磁珠法富集及 GenBank 刺参 EST 序列筛选所得微卫星位点设计(孙国华等, 2010), 引物在上海生工生物技术公司合成, 筛选出 9 对多态性较高的引物用于后续研究(表 1)。

**1.2.3 微卫星 DNA 的扩增** 以三个刺参群体基因组 DNA 为模板, 每个 PCR 反应体系总体积为 25 $\mu$ l,

约 100ng 的基因组 DNA, 10pmol 的引物, 2.5 $\mu$ mol MgCl<sub>2</sub>, 0.2 $\mu$ mol dNTP, *Taq* DNA 聚合酶 1U。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4min; 94 $^{\circ}$ C 变性 40s, 按每对引物的退火温度反应 40s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40s, 30 个循环; 之后 72 $^{\circ}$ C 10min, 4 $^{\circ}$ C 保温。PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳, 对明确有扩增产物的引物通过 8%(W/V) 聚丙烯酰胺凝胶电泳和硝酸银染色检测其多态性。

**1.2.4 数据统计与分析** 将电泳谱带中的每一条 DNA 片段作为该座位的一个等位基因来处理, 每个座位扩增的等位基因按其迁移率的不同, 从小到大依次定义为: A、B、C、...Z。统计各群体样本基因型, 用 Popgen32 计算各位点在三个群体中的等位基因数( $a$ )、有效等位基因数( $a_e$ )、多态信息含量(PIC)、观测杂合度( $H_o$ )、期望杂合度( $H_e$ )、Hardy-Weinberg 遗传偏离指数( $d$ )、Nei 群体间的相似性系数和群体间遗传距离以及  $F$ -统计量进行遗传多样性的分析,  $F_{ST}$  在 0—0.05 之间, 群体遗传分化较弱; 0.05—0.15 之间, 表示群体遗传分化中等; 0.15—0.25 之间, 表示群体遗传分化较大; 当  $F_{ST}$  值大于 0.25 时, 表示分化极大。

有效等位基因数(Crow *et al.*, 1965):

$$a_e = 1/\sum p_i^2, \text{ 其中, } p_i \text{ 为第 } i \text{ 个等位基因的频率。}$$

多态信息含量的计算方法(Botstein *et al.*, 1980):

表 1 所选微卫星引物的名称、序列及 PCR 反应条件  
Tab.1 Microsatellite loci, primer sequence and conditions of PCR

位点	GenBank 索引号	中心重复序列	扩增片段长度(bp)	引物序列(5'—3')	退火温度( $^{\circ}$ C)
AjSSR01	AB106631	(ca) <sub>15</sub>	286	ACTAAAAAGTCATGGACACCC AATCATAGCCCATTTTTCTGT	53
AjSSR02	AB106637	(ca) <sub>11</sub> ...(at) <sub>6</sub>	305	GCAGGAGGATCTAAAATACAT ATCGAACACAACACACTTATC	53
AjSSR03	AB106628	(ca) <sub>9</sub>	398	CAAACGCATACAATTACACA CGATCGATAGTCCTCAATC	54
AjSSR04	AB106638	(ca) <sub>8</sub>	322	GCTGAAGGCAAAAAGGAATCT GTAGCAAATGTGGCAAGGAT	52
AjSSR05	GH550573	(gat) <sub>8</sub>	305	GTTGTAGGGTTGTTTGAC AACCACTGCCACAAATCG	55
AjSSR06	GH550563	(gtat) <sub>13</sub>	315	CCAGCCTGTCATGTACTGC TGGTCTGACCTTCCCTTCT	55
AjSSR07	GO270691	(tat) <sub>9</sub>	279	TTGGTGCCCTGCGGACATA TCGCTCCGTGCCACAAACA	55
AjSSR08	FJ863049	(gat) <sub>14</sub>	231	CTGAGGCACGGTGTCTTT ACTCCTGTCCTGGGCAAT	53
AjSSR09	FJ863087	(ta) <sub>19</sub> ...(ta) <sub>14</sub>	340	AGTTTCAAGTAGAGGCAATG GTTCCGACTGACATTTGG	53

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2p_i^2 p_j^2 = 2 \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k p_i p_j (1 - p_i p_j)$$

其中,  $k$  为等位基因数目,  $p_i$  和  $p_j$  分别为第  $i$  和第  $j$  个等位基因的频率。

平均杂合度观测值:  $H_o =$  观察到的杂合个体总数 / 观察到的个体总数;

期望杂合度(Nei, 1978):  $H_e = 1 - \sum p_i^2$

固定指数( $F_{IS}$ ):  $F_{IS} = 1 - (H_o/H_e)$

$F$ -统计量( $F_{ST}$ ):  $F_{ST} = \sigma_p^2 / P(1-P)$ , 其中,  $P$  为某等位基因在整个群体中的平均频率,  $\sigma_p^2$  为该等位基因在分群体之间的方差。

Nei 群体间的相似性系数:  $I = (X_i Y_i) / \{ (X_i)^2 \cdot (Y_i)^2 \}^{1/2}$ , 其中,  $X_i$ ,  $Y_i$  分别为  $X$  和  $Y$  群体第  $i$  个位点的等位基因频率。

Nei 群体间遗传距离:  $D_A = -\ln I$ , 加上偏差矫正后为:

$$I = (2n-1) (X_i Y_i) / \{ [2n(X_i)^2 - 1] [2n(Y_i)^2 - 1] \}^{1/2}$$

其中,  $X_i$ ,  $Y_i$  分别为  $X$  和  $Y$  群体第  $i$  个位点的等位基因频率。

Hardy-Weinberg 遗传偏离指数( $d$ ):  $d = (H_o - H_e) / H_e$

根据各世代间的 Nei's 遗传距离, 用 MEGA5.0 软件包构建 3 个群体的 UPGMA 聚类图。

## 2 结果与分析

### 2.1 刺参 DNA 的提取

基因组 DNA 电泳结果显示(图 1), 基因组条带清晰无拖尾降解情况,  $OD_{260}/OD_{280}$  的比值均在 1.6—1.9 之间, 基本上没有蛋白质和 RNA 污染, 提取的基因组 DNA 质量较好, 适于 PCR 反应。

### 2.2 PCR 扩增结果及各位点的遗传多样性

运用 9 对微卫星引物对刺参三个群体各 30 个个体进行了 PCR 扩增(图 2)。9 对引物在三个群体中都

表现出较高的多态性, 共获得了 43 个等位基因, 每个位点获得的等位基因从 2—7 不等, 每个位点平均获得 4.7778 个等位基因。实验中发现个别位点出现了无效等位基因(Null allele)现象, 这种情况在本实验统计分析中按照纯合个体来计算杂合度的观测值。

### 2.3 遗传变异分析

微卫星分析结果(表 2)表明, 野生刺参和两代选育刺参的多态信息含量平均数分别为 0.6654、0.5929 和 0.5275, 野生群体的多态信息含量高于选育群体, 同时野生群体的有效等位基因平均数为 3.7079, 也高于两个选育群体的有效等位基因数, 分别为 3.1062 和 2.6046。这说明和选育群体相比, 野生群体的多态性要高。3 个群体每个座位的等位基因数、有效等位基因数、多态信息含量、多态座位的观测杂合度、期望杂合度和 Hardy-Weinberg 遗传偏离指数均列于表 2 中。

由表 3 可以看出, 群体的  $F_{ST}$  平均值为 0.0443, 说明群体处于较弱的遗传分化水平, 群体间的大部分遗传变异来自于群体内。 $F_{IS}$  值(近交系数,  $F_{IS} > 0$  表示观测杂合子缺失,  $F_{IS} < 0$  表明杂合子过剩,  $F_{IS} = 1$  时表示杂合体完全缺失)的计算结果表明, 3 个群体都表现为一定程度的杂合子缺失,  $F_1$  群体中有 6 个位点,  $F_2$  中有 5 个位点,  $F_4$  群体中有 4 个位点。

根据 9 个微卫星位点的 PCR 扩增结果, 计算出刺参 3 个群体间的遗传相似性指数和遗传距离(表 4), 由表 4 可以看出  $F_1$  与  $F_4$  间距离最小, 为 0.0681;  $F_1$  与  $F_2$  间的遗传距离最大, 为 0.1945。利用遗传距离数值对 3 个群体进行聚类分析, 发现  $F_1$  先与  $F_4$  聚为一支后再与  $F_2$  聚合(图 3)。

## 3 讨论

### 3.1 野生与选育群体的遗传杂合度、遗传多样性及遗传分化

本研究中, 野生群体的平均等位基因数、期望杂合度、多态信息含量平均值均高于两代选育群体。在其他物种的研究中也发现了类似的现象: 张志伟等

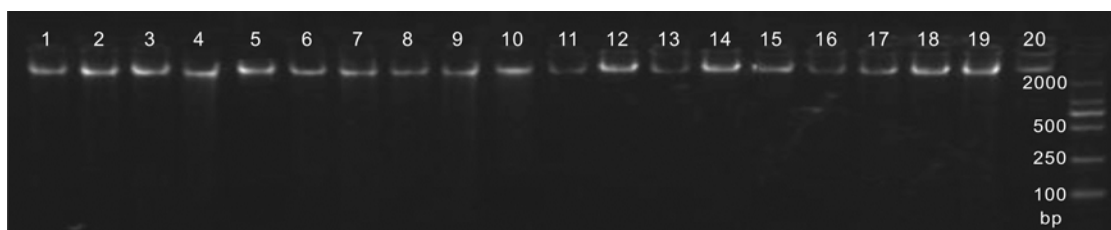


图 1 刺参基因组 DNA

Fig.1 Genome DNA of *A. japonicus*

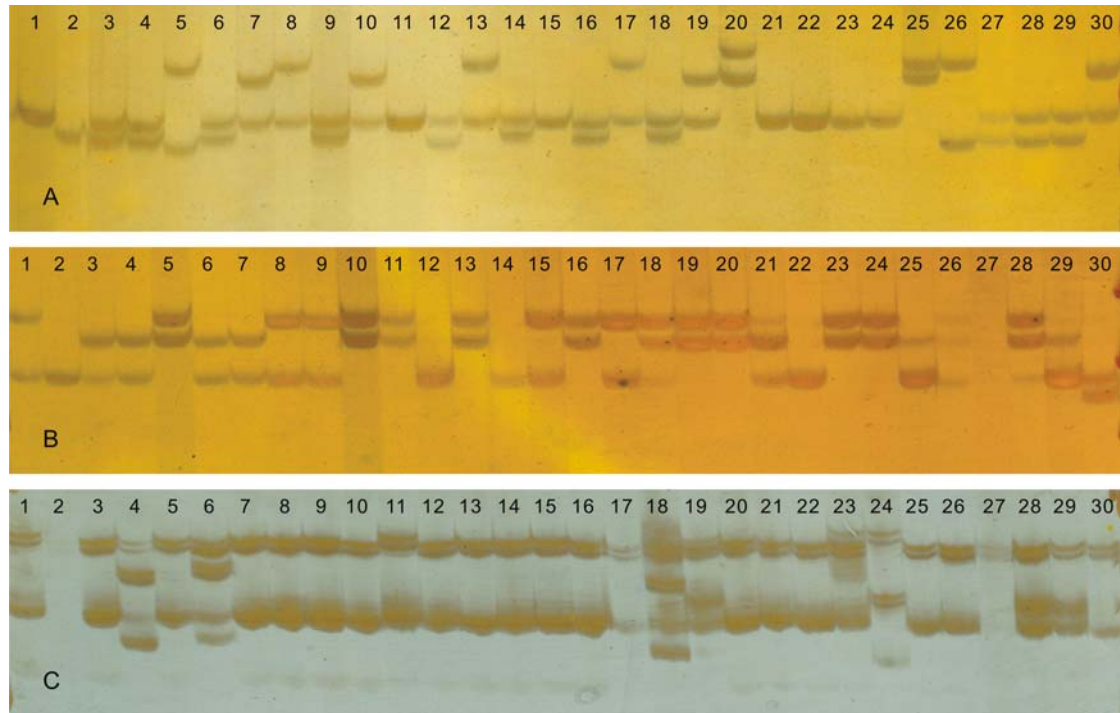


图 2 刺参 3 个群体 AjSSR06 位点的微卫星检测图谱

Fig.2 Demonstration of microsatellite locus AjSSR06 in three populations of *A. japonicus*

注: A. 野生群体; B. 选育子一代  $F_1$ ; C. 选育子四代  $F_4$

(2006)用微卫星标记技术对草鱼一个自然群体和两个养殖群体进行研究,发现草鱼养殖群体平均有 40% 的等位基因丢失,期望杂合度平均值也显著低于野生群体。李颖等(2004)采用聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳技术,对威海和烟台的两个野生刺参群体和莱州的一个养殖刺参群体各 48 个个体的遗传变异进行了同工酶的比较分析,得出威海和烟台刺参虽然都是野生群体,但是威海群体的多态位点比例等各项数据已经接近甚至低于养殖群体,而烟台的野生群体却高于其他两个群体。另外需要说明的一点是,研究中野生群体的观测杂合度平均值比子一代群体略低,分析其原因可能是来源于微卫星技术本身。例如实验中所测样本容量过小,无效等位基因的存在,均能导致观测杂合度计算值偏小。选育群体平均有效等位基因数低于野生群体,其主要原因可能在于所选育群体繁殖亲本数太少,从而导致遗传漂变加剧;再就是有效群体过少所导致近交几率增加而引起的近交衰退和瓶颈效应。

遗传杂合度是衡量群体遗传多样性的一个非常重要的参数。杂合度是指在群体随机交配的情况下,一个个体的两个等位基因处于杂合状态的概率。本研究发现,无论是野生刺参,还是两代选育刺参群体在

多个位点都出现了杂合度缺失现象。三个群体中均观察到了极显著的偏离 Hardy-Weinberg 平衡的现象,对  $F_{IS}$  值的计算表明,3 个群体在 9 个位点上表现了一定程度的杂合度缺失,可能有哑等位基因的存在,这与张天时等(2005)在中国对虾上的研究有相似之处。人们把这种情况当作纯合子而不是杂合子, Ball 等(1998)发现哑等位基因可作为解释杂合子缺失不可缺少的因素之一。Kanno 等(2005)运用微卫星技术对日本近海的仿刺参进行遗传分析时也发现了杂合度缺失的现象, Callen 等(1993)认为微卫星座位中经常出现的无效等位基因是造成杂合度缺失的主要原因。此外,在聚合酶链式反应中聚合酶连续进行重复拷贝模板中的某种核苷酸的现象即所谓的口吃现象引起的两个等位基因重叠,应为杂合基因型但被误认为纯合基因型的现象,是引起基因型对 Hardy-Weinberg 平衡的偏离的另一个因素(Nei, 1978)。在本研究中,3 个群体在 9 个微卫星座位中都表现了很高的多态性,但野生群体的平均等位基因数、平均有效等位基因数、平均期望杂合度和多态信息含量均高于两代选育群体,表明野生群体的遗传多样性要高于选育群体。一个群体的遗传多样性的高低是与其适应能力、生存能力和进化潜力密切相关的。遗传多样性的降低可导

表 2 3 个刺参群体中 9 个微卫星位点的遗传参数  
Tab.2 Genetic diversity parameters of 9 microsatellite loci in the 3 populations of *A. japonicus*

位点	群体	等位基因数( <i>a</i> )	有效等位基因数( <i>a<sub>e</sub></i> )	多态含量( <i>PI C</i> )	观测杂合度( <i>H<sub>o</sub></i> )	期望杂合度( <i>H<sub>e</sub></i> )	遗传偏离指数( <i>d</i> )
AjSSR01	YS	6.0000	4.9724	0.7860	0.7333	0.8124	-0.0974
	F <sub>1</sub>	6.0000	4.1096	0.7372	0.6667	0.7695	-0.1336
	F <sub>4</sub>	5.0000	3.7736	0.7196	0.9333	0.7475	0.2486
AjSSR02	YS	5.0000	4.1667	0.7396	0.5667	0.7729	-0.2668
	F <sub>1</sub>	5.0000	2.8257	0.6210	0.6333	0.6571	-0.0362
	F <sub>4</sub>	4.0000	2.1739	0.4937	0.4000	0.5492	-0.2717
AjSSR03	YS	5.0000	3.3333	0.6619	0.8000	0.7119	0.1238
	F <sub>1</sub>	5.0000	3.2907	0.6625	0.8000	0.7079	0.1301
	F <sub>4</sub>	4.0000	3.0928	0.6274	0.9000	0.6881	0.3079
AjSSR04	YS	4.0000	2.8939	0.6310	0.6333	0.6655	-0.0484
	F <sub>1</sub>	4.0000	1.6187	0.3482	0.4000	0.3887	0.0291
	F <sub>4</sub>	2.0000	1.7241	0.3318	0.4667	0.4271	0.0927
AjSSR05	YS	4.0000	3.0151	0.6146	0.5333	0.6797	-0.2154
	F <sub>1</sub>	4.0000	2.6201	0.5603	0.5000	0.6288	-0.2048
	F <sub>4</sub>	3.0000	2.2277	0.4576	0.4667	0.5605	-0.1674
AjSSR06	YS	7.0000	6.1433	0.8318	0.3333	0.8514	-0.6085
	F <sub>1</sub>	7.0000	4.4776	0.7640	0.3667	0.7898	-0.5357
	F <sub>4</sub>	6.0000	2.7950	0.6208	0.3000	0.6531	-0.5407
AjSSR07	YS	5.0000	4.0268	0.7245	0.5333	0.7644	-0.3023
	F <sub>1</sub>	5.0000	4.6753	0.7763	0.6667	0.7994	-0.1660
	F <sub>4</sub>	4.0000	3.6511	0.7069	0.6667	0.7384	-0.0971
AjSSR08	YS	3.0000	2.3968	0.4970	0.8000	0.5927	0.3498
	F <sub>1</sub>	3.0000	2.1352	0.4221	1.0000	0.5407	0.8495
	F <sub>4</sub>	2.0000	1.8000	0.3457	0.4000	0.4520	-0.1150
AjSSR09	YS	4.0000	2.4226	0.5023	0.9667	0.5972	0.6187
	F <sub>1</sub>	4.0000	2.2032	0.4442	1.0000	0.5554	0.8005
	F <sub>4</sub>	4.0000	2.2032	0.4442	1.0000	0.5554	0.8005
平均值	YS	4.7778	3.7079	0.6654	0.6556	0.7164	-0.0849
	F <sub>1</sub>	4.7778	3.1062	0.5929	0.6704	0.6486	0.0336
	F <sub>4</sub>	3.7778	2.6046	0.5275	0.6148	0.5968	0.0302

表 3 刺参 3 个群体 9 个位点的  $F_{ST}$  及  $F_{IS}$  值比较  
Tab.3  $F_{ST}$  and  $F_{IS}$  values of the pairwise comparison among the 9 loci in the 3 populations of *A. japonicus*

<i>F</i> -统计量	AjSSR01	AjSSR02	AjSSR03	AjSSR04	AjSSR05	AjSSR06	AjSSR07	AjSSR08	AjSSR09	平均值
$F_{IS}(YS)$	0.0821	0.2544	-0.1429	0.0323	0.2020	0.6019	0.2905	-0.3727	-0.6462	0.0335
$F_{IS}(F_1)$	0.1189	0.0198	-0.1492	-0.0465	0.1914	0.5279	0.1519	-0.8809	-0.8311	-0.0997
$F_{IS}(F_4)$	0.1215	-0.0224	-0.1492	-0.0465	0.0278	0.5329	0.0819	-0.8809	-0.8311	-0.1296
$F_{ST}$	0.0480	0.0635	0.0016	0.0576	0.0762	0.0832	0.0445	0.0036	0.0015	0.0443

表 4 刺参 3 个群体的遗传距离和相似性指数  
Tab.4 Genetic identity and genetic distance in the three populations of *A. japonicus*

群体	YS	F <sub>1</sub>	F <sub>4</sub>
YS	—	0.8703	0.8232
F <sub>1</sub>	0.1389	—	0.9341
F <sub>4</sub>	0.1945	0.0681	—

注: 对角线以下数据为遗传距离, 对角线以上数据为遗传相似性指数

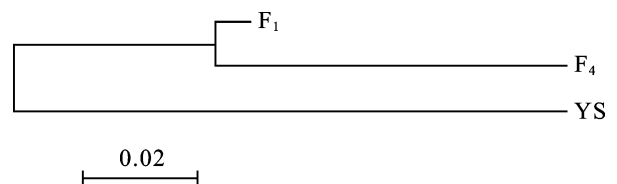


图 3 刺参 3 个群体间的 UPGMA 聚类图  
Fig.3 UPGMA cluster graph of the 3 populations of *A. japonicus*

致其适应能力降低和有害隐性基因表达增加及经济性状衰退, 最终导致物种退化。因此, 应该采取适当的措施, 让刺参在人工养殖条件下, 其优势生长性状得到有效的发展。同时, 应用其他相关分子技术将这些影响刺参生长发育的优势生长性状筛选出来, 为刺参养殖业的发展提供技术指导。

遗传分化系数是反映群体间遗传分化程度的重要的参数。在人工控制条件下, 人工选择、人工诱变、杂交等一些手段均可破坏遗传平衡, 从而使基因和基因型发生改变, 因此群体内的遗传特性也会随之发生改变。本研究中刺参选育群体其群体内的遗传结构已经发生了改变, 主要表现在微卫星某些位点的基因频率和基因型频率在三个群体中存在差异。野生群体与选育群体已经有了一定程度的遗传分化, 遗传变异来源分析表明经过人工选育群体间遗传分化较小, 分化主要来源于群体内个体间。

### 3.2 人工选育对选育群体世代遗传特性的影响

人工选育是一个复杂的过程, 在人工选育过程中, 人工选择压力常常导致有效群体数不断减少, 近交几率增加, 在群体中主要表现为遗传多样性指数减少和遗传变异程度的降低。尽可能维持种内的遗传多样性, 是持续利用种质资源的前提和基础, 人工选育更是要设法保证选育群体的遗传多样性, 以保证选育工作顺利进行和获得高质量的选育新品种(池喜峰等, 2010)。良种选育是水产养殖业增产的有效途径, 一般也成为养殖物种遗传多样性降低的重要原因(Kanece et al, 2007)。在尼罗罗非鱼(*Tilapia nilotica*) (Brummett et al, 2004)、日本对虾(*Penaeus japonicus*) (Xu et al, 2001)、大黄鱼(黎中宝等, 2009; 常玉梅等, 2009)、大口黑鲈(李镛等, 2010)等水产动物的相关研究中曾发现, 多代人工选育过程中常常伴随着遗传多样性指数的降低。要保证选育工作的顺利进行必须保持群体有足够的遗传变异水平, 水产科学研究院黄海水产研究所在对中国对虾的定向选育时为避免类似情况发生采取了一定措施保证足够大的有效亲本数量, 利用微卫星检测基础群体至第六代的杂合度只下降了 3.5%, 从而有效防止了近交(张天时等, 2005)。在本研究刺参快速生长品系的选育中采用的是大规模群体继代选育的方法, 从实验的数据来看, 随着选育世代的增加, 群体的遗传多样性已有所下降, 这提示人工选育的压力已经对选育群体的多样性造成了影响。但两个选育群体中平均多态信息含量为 0.5929—0.5275, 均大于 Botstein 等(1980)提出衡

量基因变异程度高低的的多态信息含量指标值 0.5, 属于高度多态性, 表明两个世代选育群体多样性处于较高的水平, 选育群体刺参仍有一定的选育潜力。

两代选育群体与亲本  $F_{ST}$  值比较后发现随着选育世代的增加, 相邻世代之间的遗传分化系数呈明显的减小趋势, 说明经过累代选育, 选育群体的遗传结构已趋于稳定, 体现出了人工定向选育的效应。 $F_{ST}$  平均值 0.0443 提示出选育群体处在较弱的分化水平, 说明变异主要来自群体内个体间, 而非群体间, 表明遗传结构的改变主要来自于人工选择的压力, 这与选育的世代较短有关, 也与选育过程中采取的措施有关。另外, 经过 UPGMA 聚类的结果也可以清楚地看到刺参群体的聚类情况: 随着选育世代的增加, 刺参的遗传多样性已出现了明显的差别, 并且随着选育世代的增加, 选育群体与野生群体之间的分化越来越明显, 选育群体各世代与野生群体之间的遗传距离逐渐加大, 这也充分体现出人工定向选育的作用, 进一步证明选育的结果是富有成效的。因此, 在对该选育群体进行进一步选育时, 仍可继续保持一定的选择育种压力, 使选育群体的优良生长性状及抗逆性/抗病性继续得到提高; 同时应考虑适当增加每代繁育亲本的数量, 以减少近交繁殖可能带来的负面影响, 并逐步进行扩繁, 使选育品种得到更大面积的推广应用, 让育种工作真正起到促进生产发展的实际作用。

### 参 考 文 献

- 池喜峰, 贾智英, 李池陶等, 2010. 鲤易捕性状选育群体不同世代微卫星分析. 上海海洋大学学报, 19(3): 308—313
- 孙国华, 杨建敏, 宋志乐等, 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
- 李 镛, 白俊杰, 李胜杰等, 2010. 大口黑鲈选育群体遗传结构的微卫星分析. 广东海洋大学学报, 30(3): 11—15
- 李 颖, 刘 萍, 孙慧玲等, 2006. 仿刺参(*Apostichopus japonicus*)mt DNA 3 个基因片段的序列分析. 海洋与湖沼, 37(2): 143—153
- 张天时, 王清印, 刘 萍等, 2005. 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)人工选育群体不同世代的微卫星分析. 海洋与湖沼, 36(1): 72—80
- 张志伟, 曹哲明, 杨 弘等, 2006. 草鱼野生和养殖群体间遗传变异的微卫星分析. 动物学研究, 27(2): 189—196
- 胡则辉, 周志刚, 2006. 微卫星 DNA 标记技术及其在海洋生物遗传学中的应用. 海洋湖沼通报, 1(4): 37—45
- 徐晋麟, 徐 沁, 陈 淳等, 2003. 现代遗传学原理. 北京: 科学出版社, 224—225

- 常玉梅, 王文文, 徐万土等, 2009. 人工繁育大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 群体  $F_2$  及  $F_3$  遗传差异分析. 海洋与湖沼, 40(4): 414—422
- 谭杰, 孙慧玲, 刘萍等, 2007. 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
- 黎中宝, 方秀, 陈锦等, 2009. 大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 养殖群体遗传多样性的降低. 海洋与湖沼, 40(4): 446—450
- Ball A O, Leonard S, Chapman R W, 1998. Characterization of  $(GT)_n$  from native white shrimp (*Penaeus setiferus*). Mol Ecol, 7: 1251—1253
- Botstein D, White R L, Skolnick M *et al*, 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. Am J Hum Genetic, 32(3): 314—331
- Brummett R E, Angoni D E, Pouomogne V, 2004. On-farm and on-station comparisons of wild and domesticated Cameroonian populations of *Oreochromis niloticus*. Aquaculture, 242: 157—164
- Callen D F, Thompson A D, Shen Y *et al*, 1993. Incidence and origin of null alleles in the  $(AC)_n$  microsatellite markers. Am J Hum Genetic, 52: 922—927
- Crow A J, Kimura M, 1965. Evolution in sexual and asexual population. Am Nat, 99: 439—450
- Kanecee C, Supawadee P, Uthairat N *et al*, 2007. Genetic diversity of hatchery stocks of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) in Thailand. Aquaculture, 271: 121—129
- Kanno M, Li Q, Kijima A *et al*, 2005. Isolation and characterization of twenty microsatellite loci in Japanese Sea cucumber (*Stichopus japonicus*). Mar Biotechnol, 7(3): 179—183
- Nei M, 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89: 583—590
- Xu Z, Primavera J H, Pena L D *et al*, 2001. Genetic diversity of wild and cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites. Aquaculture, 199: 13—40

## GENETIC VARIATIONS OF WILD AND SELECTIVELY BRED POPULATIONS OF A SEA CUCUMBER *APOSTICHOPUS JAPONICUS*

SUN Xiao-De<sup>1,2</sup>, SUN Guo-Hua<sup>1</sup>, YUAN Ting-Zhu<sup>3</sup>, YANG Jian-Min<sup>1</sup>,  
WANG Wei-Jun<sup>1</sup>, JI Chong-Long<sup>1,2</sup>, SONG Zhi-Le<sup>4</sup>

(1. Marine Fisheries Research Institute of Shandong Province, Yantai, 264006; 2. College of Fisheries and Life Science of Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306; 3. Changdao Aquaculture Research Institute, Yantai, 265800; 4. Fisheries Technical Extension Station of the Zhifu District of Yantai City, Yantai, 264000)

**Abstract** Genetic diversities of a wild and two generations of selectively bred populations of the sea cucumber, *Apostichopus japonicus*, were examined using the microsatellite DNA techniques. 43 bands of alleles amplified using 9 primers were obtained from these three populations and 2—7 alleles were detected from each microsatellite locus. Average observed heterozygosities ( $H_o$ ) of these populations were 0.7164, 0.6486 and 0.5968, respectively; and the average values of polymorphism information content were 0.6654, 0.5929 and 0.5275, respectively. The results showed that the heterozygosities of two generations of selectively bred *A. japonicus* were reduced, compared with the wild population, and genetic diversity declined as the breeding generations increased. Hardy-Weinberg equilibrium chi-square test and  $F$ -test data showed that selective breeding had changed the genetic structure of the populations, including decreased heterozygous sites, increased loci deviated from the equilibrium, and decreased coefficient of genetic differentiation between the adjacent generations.  $F_{ST}$  value (0.0443) suggested the breeding population had weak genetic differentiation and illustrated that the main genetic variation existed among individuals within population rather than between populations. Genetic distance and genetic identity indicated that divergence became smaller with increasing breeding generations and the genetic similarity between the adjacent generations became greater, even though they had not reached the theoretical value, thus it was still suitable for further selective breeding.

**Key words** *Apostichopus japonicus*, Microsatellite, Genetic structure, Wild population, Selection-breeding population, Genetic differentiation, Genetic distance