

文章编号:1000-0615(2009)04-0549-08

中间球海胆野生和养殖群体遗传结构的微卫星分析

耿慧君^{1,2}, 周遵春¹, 董颖¹, 赫崇波¹, 邹林林³

(1. 辽宁省海洋水产科学研究院, 辽宁省海洋水产分子生物学重点实验室, 辽宁 大连 116023;

2. 辽宁师范大学生命科学学院, 辽宁 大连 116029; 3. 大连水产学院生命与技术学院, 辽宁 大连 116023)

摘要:利用 28 对微卫星 DNA 分子标记对中间球海胆的 1 个野生和 1 个养殖群体进行了遗传多样性分析。结果表明:在 28 个基因座中,共检测到 91 个等位基因,每个基因座位检测到的等位基因数为 2~6 个,2 个群体的平均等位基因数均为 3.071 4,平均有效等位基因数分别为 2.231 9、2.227 1,平均观察杂合度分别为 0.523 4、0.536 5,平均期望杂合度为 0.486 8、0.499 3,平均多态信息含量为 0.447 7、0.439 6,群体间的多态性差异不显著。2 个群体间的遗传相似系数为 0.758 7,遗传距离为 0.276 2。经 Hardy-Weinberg 平衡的卡方检验,有 50% 的位点显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡。通过 F 检验发现,两个群体均处于不同程度的杂合子过剩状态。群体间发生分化程度很弱,遗传变异主要来自群体内个体之间。

关键词:中间球海胆;微卫星;遗传多样性

中图分类号:S 917

文献标识码:A

中间球海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)隶属于棘皮动物门(Echinodermata)、海胆亚门(Eleutherozoa)、海胆纲(Echinodea)^[1],原产于日本东北部、朝鲜半岛东岸及俄罗斯远东沿海,以其味道鲜美、营养价值高而著名^[2]。自 1989 年引入我国后,经过几年的驯化,其人工育苗及增养殖已初具生产规模^[3]。目前,该种已在山东、辽宁沿岸开展了规模化养殖,并取得了较好的经济效益。如何避免由于连续多代的人工繁殖及养殖规模扩大而引起的群体内近交现象,并且最大限度地保持养殖群体的遗传多样性,已经引起广泛关注。

微卫星 DNA 标记,亦称做简单序列重复(simple sequence repeats, SSR)。同其他遗传分子标记相比,微卫星 DNA 标记不仅具有极高的个体特异性,可重复性,而且能够提供丰富的多态位点及基因座位杂合度和纯合度等遗传信息。在遗传图谱构建、亲缘关系划分、种质结构分析和系统学研究方面有广泛的应用^[4]。采用微卫星 DNA 标记,对海胆遗传多样性进行分析的研究,

国外已有相关的报道^[5-6],而对于中间球海胆野生和养殖群体的微卫星 DNA 分析,国内尚鲜见报道。本实验利用相近种紫球海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)的 EST 序列筛选中间球海胆微卫星 DNA 分子标记,取其中扩增清晰稳定且多态性明显的引物对中间球海胆的 1 个日本野生群体及 1 个国内养殖群体进行检测,在分子水平上分析了 2 个群体在基因频率、等位基因数、杂合度等方面的差异,从而比较 2 个群体间的遗传变异及遗传相似性。

1 材料与方法

1.1 样品的采集与 DNA 提取

实验所用中间球海胆(*S. intermedius*)养殖群体(pop1)的 30 个个体取自大连市凌水养殖厂,野生群体(pop2)的 30 个个体来自日本北海道自然海区。

采用常规酚-氯仿抽提法提取基因组 DNA^[7]。

收稿日期:2008-06-25 修回日期:2008-12-03

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA10A411);大连市优秀青年科技人才基金项目(S2006J23JH029);辽宁省“百万人才工程”培养经费资助

通讯作者:周遵春, E-mail: zunchunz@hotmail.com

1.2 微卫星筛选

从 GenBank 中下载了 141 836 条紫球海胆的 EST 序列,用 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html>),利用 Repeat Reporter (version 1.5) 软件及 Vector NTI suite 8.0 软件进行分析,得微卫星标记 7 165 (5%) 个 (2 碱基重复数 ≥ 7 , 3 碱基重复数 ≥ 5)。采用 Primer Premier 5.0 软件 (www.PremierBiosoft.com/faq.html),设计出 104 对微卫星引物序列。引物由上海生物工程技术有限公司合成,引物名称及 GenBank 登录号见表 1。

采用退火温度梯度 PCR 反应 (Eppendorf Mastercycler ep gradient S) 对各引物进行筛选。PCR 反应体系为 20 μL ,包括 200 ng DNA 混合样 (5 个不同个体),dNTPs 各 200 $\mu\text{mol/L}$ 、上下游引物 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 、10 \times buffer 2 μL 、Taq DNA 聚合酶 1 U (TaKaRa),加 ddH₂O 至反应体积为 20 μL 。扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min、95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s、梯度退火 (50 ~ 70 $^{\circ}\text{C}$) 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 35 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。PCR 产物经 10% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测筛选。筛选得 35 对 (33.7%) 可稳定扩增的引物。

1.3 多态性引物群体扩增

选择多态性良好引物 (28 对) 对两群体进行 PCR 扩增。反应体系为 20 μL ,包括模板 100 ng, dNTP (每种) 各 200 $\mu\text{mol/L}$ 、上下游引物 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 、10 \times Buffer 2 μL 、Taq DNA 聚合酶 1 U (TaKaRa),加 ddH₂O 至反应体积为 20 μL 。扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min、95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s、 T_m (表 1) 退火 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s、35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 下延伸 5 min。

采用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离和检测选择性扩增反应产物。待凝胶干燥后将图像扫描保存。用凝胶成像系统进行图像分析处理。

1.4 数据统计与分析

POPGENE (VERSION 1.32) 软件包处理数据,分析群体的等位基因数 (number of allele, A)、有效等位基因数 (effective number of alleles, a_e)、观测杂合度 (observed heterozygosity, H_o)、期望杂合度 (expected heterozygosity, H_e)。并用 GENEPOP (VERSION 3.4) 软件进行群体的 Hardy-Weinberg 平衡检验^[8]。根据 Botstein 等^[9]报道的方法计算多态信息含量 (polymorphism

information content, PIC) 值。

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^k P_i^2 - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2P_i P_j$$

式中, P_j 和 P_i 分别为第 j 和第 i 个等位基因的频率, k 为等位基因数。

2 结果与分析

2.1 微卫星筛选结果

经检测,在所设计的 104 对引物中,有 35 对 (33.7%) 有清晰稳定的扩增结果。其中,明显有多态性的引物为 28 对 (表 1),占有效引物比例为 80% (28/35),用于群体遗传多样性分析。

2.2 遗传多态性分析

应用 POPGENE 数据处理软件对中间球海胆群体进行遗传多态性分析,28 个 EST-SSRs 位点在 2 个群体中扩增出的等位基因数 (A)、有效等位基因数 (a_e)、观测杂合度 (H_o)、期望杂合度 (H_e) 以及多态信息含量 (PIC) 和 H-W 平衡指数 (P) (表 2)。

如表所示,28 个基因位点共获得了 91 个等位基因,不同的引物获得的等位基因数为 2 ~ 6 个不等,平均等位基因数为 3.25 个。其中,引物 INTS16 和 INTS09 的多态性较高,分别检测到 6 个和 5 个等位基因。

两群体中 PIC 值,以中度多态位点多主,占总体 60.71%,高度多态位点为 32.14%,低度多态位点为 7.14%。两群体的平均 PIC 值分别为 0.447 7 和 0.439 6,处于中度多态,基本满足研究需要。从群体有效等位基因数、观测杂合度和期望杂合度可以看出,两个群体相似性较高,无明显差异。

应用 GENEPOP 数据分析软件,基于马可夫链模型 (Markov chain method) 对各群体每个位点的 Hardy-Weinberg P 值进行无偏离估计,有 50% 的位点偏离了 Hardy-Weinberg 平衡 ($P < 0.05$)。

2.3 群体变异分析

根据 Nei 氏的方法,计算群体间的无偏遗传相似性指数和遗传距离,得群体间遗传距离为 0.276 2,遗传相似度为 0.758 7。

应用 POPGENE 数据分析软件进行 F 检验 (表 3)。 $F_{is} > 0$ 表示杂合子缺失状态,相反, $F_{is} < 0$ 表示杂合子过剩状态。由表 3 可知, pop1 群体有 18 个位点处于杂合子过剩状态, pop2 群体则为 16 个;两个群体平均 F_{is} 分别为 -0.162 1、-0.065 3,

表 1 中间球海胆微卫星引物及扩增条件
 Tab.1 Microsatellite primers and PCR amplification in *S. intermedius*

位点 locus	引物序列 primer sequence (5'-3')	退火温度(°C) Tm	重复序列 core sequence	等位基因片段大小(bp) product size	注册号 GenBank accession number
INTS01	F: TTGGGGTGGATCCTGTCGTG R: TCACAATTCGTCAGGGCTC	57	(AG) ₁₀	163 ~ 183	EC439591
INTS02	F: TGTATGGTCTGTCGGAAAGC R: GATGCAACAATTGACGGAGC	53	(TA) ₁₉	293 ~ 305	EC438789
INTS03	F: TTTCCAAAGGGTCGGGTGT R: TATGCCACACAATGGCGA	55	(TA) ₁₀	304 ~ 330	CX697849
INTS04	F: GCGATTTGTAAACCTGGGGA R: AGGTAGGAGTCATGTCGTCG	57	(TGT) ₁₃	164 ~ 173	CD320652
INTS05	F: AAGTTGGTTGGCAGGTGCTC R: ACACGTACTGGCTGGAATGC	53	(ATA) ₁₇	176 ~ 185	CX687827
INTS06	F: TGTAGATGCTGTGCAGGTGT R: TCGACTAGCTGACTGTGCA	55	(ATC) ₉	761 ~ 1004	CX552920
INTS07	F: ATGACAGCTGTGCGAAAGC R: GATCTGGAGTGGCAATGTGG	53	(TAA) ₉	228 ~ 255	CX552589
INTS08	F: CAATGTGCTTGGCGTGGTAG R: GCAGCTTACTTCTGGAGGCA	56	(TCA) ₂₀	215 ~ 266	CD291460
INTS09	F: GGTGATCATACTGCCTGTGC R: GACCATGTCACACATGGCTG	54	(TG) ₁₄	116 ~ 132	CD338402
INTS10	F: TGATGGTTTGGGGCATGA R: TGGTATGTCGGGAGTGTGA	57	(CT) ₁₂	193 ~ 199	CD341401
INTS11	F: ATTACTGGGGCATGCGTGT R: TAGATGAGGGAGCTGTGCT	57	(AG) ₁₈	177 ~ 249	CD340974
INTS12	F: TCTAGCGTGTGTCAAGCAGC R: TCGGAGTTGAAGCCGTTGTC	53	(ATA) ₇	195 ~ 228	CD336118
INTS13	F: GAGTGTGTTTGCATGAGCCA R: AGAAAAGAGAGTGGGGAACG	55.5	(TC) ₁₀	202 ~ 232	CD334278
INTS14	F: GGGAAAGTTTCCCACTGAC R: TGTCCATAACGCCACATTCG	58	(AG) ₁₂	291 ~ 301	DN808464
INTS15	F: ACATCACATGCCAACCCA R: GATGAAGGATGTGCACCTGG	59	(CCA) ₈	206 ~ 278	CX555808
INTS16	F: TCGTCATGAGATGGTCCGT R: CATTTTACCGTGGTGGGGTC	57	(CT) ₁₂	231 ~ 283	DN785343
INTS18	F: TCTGAGCCCAAATGCCTGC R: TTGATCTGGCGCTGCTCAGT	54	(AAT) ₁₂	286 ~ 310	DN788257
INTS19	F: TCCATAGCAACCATGCAGC R: CCCTCGATAACAGCATCAGC	57	(TCA) ₉	232 ~ 247	DN580000
INTS20	F: GGTCACAGACATCCAGTGC R: GCAAATGTTCCAGGCTTGTGG	58	(AAC) ₈	197 ~ 302	CX682646
INTS22	F: TCCCATATGATTGCTCGTGC R: AGCATTACCCGGAACCTG	54	(AC) ₁₀	164 ~ 172	EC438212
INTS23	F: TGGTGGATACAGTCGTGGAG R: TTGTCATACCCATCGCGACC	63	(GGC) ₆	215 ~ 221	EC439442
INTS24	F: TCAGGTGGTAGTTCACGCT R: ACAGTCACAATTCGTCAGG	52	(AG) ₈	244 ~ 260	EC439480
INTS25	F: GAAAGTTTGCCTCGCTGGTC R: CCTATCTTGAATCGGCCAC	52	(AAG) ₅	543 ~ 546	CX689232
INTS26	F: AAGAGAGGAAAAGCTGGCAC R: GGAGAGAAAACACCTCCTGG	54	(TAG) ₈	404 ~ 521	CD341745
INTS27	F: CACTGGAACAAGTACGCTGG R: CATAACCATGGCTGCTCAG	57	(CTT) ₅	200 ~ 209	CD341523
INTS28	F: GCATGCTAGTCACAACGGGA R: AATGACGCACTGACTCGACG	59	(ACA) ₅	207 ~ 225	CD341295
INTS29	F: AGACCAAATGCAGAGCTGC R: TGATTGAGAGCCAAGGGAGC	54	(ATT) ₆	235 ~ 277	CD340211
INTS30	F: CTAATAGCCCTATGCCGCGT R: ATACACCACACGATTTCGCAC	55	(AAG) ₆	144 ~ 162	CD335578

注: F. 正向引物; R. 反向引物

Notes: F. forward primer; R. reverse primer

表 2 中间球海胆的遗传多态性检测结果
Tab.2 Genetic diversity of *S. intermedius*

座位 locus	A	a_e	H_o	H_e	P	PIC
INTS01	3	2.008 1	0.491 8	0.560 2	0.001 378 **	0.404 7
INTS02	2	1.991 7	0.548 4	0.502 0	0.462 854	0.373 8
INTS03	2	1.997 9	0.541 0	0.503 6	0.558 708	0.332 6
INTS04	2	1.963 9	0.559 3	0.495 0	0.313 948	0.366 2
INTS05	3	1.955 2	0.322 6	0.492 5	0.005 829 **	0.397 5
INTS06	3	2.129 8	0.569 0	0.535 1	0.604 121	0.515 0
INTS07	3	2.442 2	0.677 4	0.595 3	0.351 966	0.533 5
INTS08	3	2.499 0	0.819 7	0.604 8	0.001 837 **	0.413 6
INTS09	5	4.180 6	0.666 7	0.767 9	0.514 323	0.717 1
INTS10	2	1.994 5	0.947 4	0.505 3	0.000 000 **	0.374 7
INTS11	4	3.654 6	0.576 3	0.732 6	0.004 674 **	0.627 0
INTS12	3	2.910 0	0.929 8	0.662 2	0.000 270 **	0.539 0
INTS13	4	3.470 6	1.000 0	0.717 9	0.000 000 **	0.541 2
INTS14	4	3.063 3	0.490 9	0.679 7	0.000 020 **	0.513 5
INTS15	4	3.238 9	0.733 3	0.697 1	0.432 081	0.640 4
INTS16	6	5.188 7	0.727 3	0.814 7	0.249 863	0.736 8
INTS18	3	2.232 4	0.446 8	0.558 0	0.091 118	0.373 3
INTS19	4	3.014 4	0.563 6	0.674 4	0.000 042 **	0.413 1
INTS20	3	2.949 6	0.719 3	0.666 8	0.000 001 **	0.387 8
INTS22	4	3.418 5	0.491 8	0.713 3	0.000 061 **	0.459 2
INTS23	2	1.071 3	0.069 0	0.067 2	0.814 549	0.064 4
INTS24	3	2.032 1	0.542 4	0.512 2	0.000 097 **	0.395 4
INTS25	3	1.485 0	0.254 5	0.329 6	0.207 362	0.285 9
INTS26	4	2.149 5	0.241 4	0.539 4	0.000 000 **	0.478 1
INTS27	2	1.112 8	0.107 1	0.102 3	0.700 215	0.096 4
INTS28	3	2.278 6	0.623 0	0.565 8	0.210 265	0.474 2
INTS29	3	2.727 2	0.275 9	0.638 8	0.000 000 **	0.333 5
INTS30	4	3.009 7	0.771 9	0.673 7	0.624594	0.608 1
Pop 1	3.071 4	2.231 9	0.523 4	0.486 8		0.447 7
Pop 2	3.071 4	2.227 1	0.536 5	0.499 3		0.439 6
平均值 average	3.071 4	2.229 4	0.530 0	0.493 1		0.443 7

注: * 平衡显著偏离 ($P < 0.05$), ** 平衡极显著偏离 ($P < 0.01$)
Notes: * significant deviation from equilibrium, ** terribly significant deviation from equilibrium

表 3 中间球海胆 2 个群体 28 个微卫星位点的 F-检验
Tab.3 F-statistics for two populations of *S. intermedius* on 28 microsatellite loci

		INTS01	INTS02	INTS03	INTS04	INTS05	INTS06	INTS07	INTS08	INTS09	INTS10
F_{is}	Pop1	-0.111 6	-0.071 9	-0.476 2	-0.188 7	0.362 5	-0.106 6	-0.408 6	-0.735 6	0.168 1	-0.900 0
	Pop2	0.113 3	-0.134 6	-0.067 0	-0.111 8	0.315 1	-0.059 8	-0.093 0	-0.450 0	0.028 0	-0.636 4
	F_{st}	0.029 3	0.000 9	0.155 5	0.013 3	0.000 1	0.011 4	0.079 2	0.158 1	0.031 0	0.000 7
F_{is}		INTS11	INTS12	INTS13	INTS14	INTS15	INTS16	INTS18	INTS19	INTS20	INTS22
	Pop1	0.020 1	-0.573 6	-0.843 4	0.107 3	-0.199 1	0.111 3	-0.438 2	-0.085 2	-0.806 5	-0.006 4
	Pop2	0.176 0	-0.574 8	-0.477 2	0.200 5	0.072 2	0.011 9	0.516 5	-0.422 2	-0.267 8	0.079 4
F_{st}	0.123 1	0.100 2	0.151 2	0.137 5	0.009 4	0.035 2	0.227 6	0.320 7	0.297 5	0.296 6	
F_{is}		INTS23	INTS24	INTS25	INTS26	INTS27	INTS28	INTS29	INTS30	平均值 mean	
	Pop1	-0.034 5	0.023 4	0.085 0	0.567 6	-0.054 5	0.038 9	0.243 1	-0.224 4	-0.162 1	
	Pop2	-0.037 0	-0.301 5	0.304 2	0.493 0	-0.058 8	-0.301 3	0.223 9	-0.104 3	-0.065 3	
F_{st}	0.000 0	0.043 1	0.013 9	0.022 4	0.000 1	0.011 8	0.434 3	0.014 1	0.110 5		

均表现出一定程度的杂合子过剩。如所有群体间 F_{ST} 值所示,28 个位点中有 16 个位点低于 0.05,表明 2 个群体间分化程度较弱;两群体间遗传分化指数 F_{ST} 值为 0.110 5,未超过 0.5,说明遗传变异主要来自群体内个体之间。

3 讨论

3.1 海胆 EST-SSRs 引物设计

作为基因的一部分,EST-SSRs 标记是一种有功能的分子标记,这类标记的开发可以使无功能的分子标记向可揭示基因转录功能的分子标记转化,具有更大的应用价值。EST-SSRs 标记侧翼序列在物种之间高度保守,故其引物在相近物种之间具有较好的通用性,很多学者曾据此进行模式生物的微卫星引物设计,从而在目标生物中得以扩增。如忻雅等^[10]根据白菜 EST 设计了 15 对 SSR 引物,对白菜、油菜、玉米、高粱、水稻和茶树等进行了 PCR,有 11 对在各物种中都有扩增产物。也有研究者将依据小麦 ESTs 设计的 597 对 EST-SSRs 引物在小麦、玉米、水稻和大豆中进行扩增,在 4 种作物中均得到 255 对或以上有效引物^[11-14]。相对于传统的通过构建和筛选基因组文库来获得微卫星序列的方法,该方式简捷而有效,大大缩短了实验周期,降低了标记成本。本实验中,我们选择采用 GenBank 中已有存储的紫球海胆的 EST 序列来设计引物,对相近物种中间球海胆进行 PCR 扩增筛选,取得了较好的效果。

在进行 EST-SSR 引物设计时,部分引物无法进行有效扩增可能是因为:(1)引物序列落在两个外显子上或者两个引物间有一长的内含子;(2)引物序列上存在突变(插入或缺失);(3)两物种间存在的核苷酸差异等。本实验中,多态性引物占有有效引物比例为 80% (28/35),表明海胆基因组具有较高的多态性,与其它以 SSRs 标记对海胆不同群体所做种质状况的分析基本一致^[15-16]。如 Kong 等^[15]对马粪海胆 (*Hemicentrotus pulcherrimus*) 的微卫星研究中多态性引物占有有效引物的比例为 60% (15/25)。

3.2 群体遗传多态性

多态信息含量 (PIC) 是等位基因频率和数目变化的函数,是衡量片段多态性的较好指标。Botstein 等^[9]首先提出了衡量基因变异程度高低的的多态信息含量指标:当 $PIC > 0.5$ 时,该位点

为高度多态位点; $0.25 < PIC < 0.5$ 时为中度多态性位点; $PIC < 0.25$ 时为低度多态位点。本实验中,两个群体平均多态信息含量分别为 0.447 7 和 0.439 6,相差无几且接近于 0.5,这说明中间球海胆的遗传多样性处于中等偏上水平,表明该养殖群体未出现明显的种质退化。

基因杂合度一般认为是度量群体遗传变异的一个最适函数。杂合度越高,群体的遗传结构越复杂。实验中,位点 INTS23、INTS27、INTS26、INTS25、INTS29 上的观测杂合度 (H_o) 为 0.069 0 ~ 0.275 9,遗传多样性水平较低。但在其他 23 个位点上则表现出丰富的遗传多态性, H_o 为 0.322 6 ~ 1.00 0。这说明中间球海胆的遗传多态性在所分析的 28 个基因位点上呈现分化状态,在部分位点上遗传多样性较低,而大多数其他位点 (82%) 则表现出极为丰富的遗传变异。两群体 H_o 平均值分为 0.523 4 和 0.536 5,养殖群体略低于野生群体,这说明两群体间遗传结构的复杂程度差别不大,野生群体遗传多态性稍高。

有效等位基因数,也可以作为群体遗传变异的一个测度,它反映了基因座等位基因间的相互影响。由表 2 看出,观察得到的等位基因数往往要大于计算得到的有效等位基因数,只有那些等位基因出现频率相同的基因座才能真实地反映群体的遗传多样性,因此,应采用有效等位基因数来衡量物种的遗传多样性。本实验中,养殖群体的平均等位基因数为 2.231 9,而野生群体为 2.227 1;两群体的平均等位基因均为 3.071 4。两群体间差异不显著,这与基因杂合度的检测结果基本一致。检测到的平均等位基因数为 3.071 4,平均有效等位基因数为 2.229 4,二者差距较小,这说明本实验所取样本数 (30) 基本满足研究需求。

3.3 群体变异分析

实验中,50% 的位点显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡。与其它的研究相似,在海洋经济鱼类、贝类、棘皮类的养殖群体中,被检测位点偏离 Hardy-Weinberg 平衡现象普遍存在^[17-18]。

两群体间遗传距离为 0.276 2,遗传相似度为 0.758 7。表明野生与养殖群体遗传距离较近,并无明显的种质退化。经 F 检验,两个群体平均 F_{IS} 值分别为 -0.162 1、-0.065 3,均表现出一定程度的杂合子过剩,表明群体内并无明显的近交现

象。同时,28 个位点的 F_{ST} 值中,有 16 个低于 0.05,表明两群体间分化程度较弱。两群体间遗传分化指数 F_{ST} 值为 0.110 5, ($P < 0.5$),说明遗传变异主要来自群体内个体之间。

中间球海胆在我国本没有自然分布。本文中的养殖群体(pop1)是 20 世纪 80 年代末由大连水产学院从日本引入我国并人工繁殖的后代群体,最早引进的群体至今已繁殖了 6 代以上。一般认为,由于养殖群体繁殖亲本数太少,经数代繁育之后,会引起遗传漂变,导致个体间近交频率提高,造成建群者效应(founder effect),最终致使遗传多样性水平下降^[19-20]。因此,很多的相关类研究发现,养殖群体遗传多样性水平较低。如李莉等^[19]在对皱纹盘鲍野生和养殖群体微卫星分析中发现,野生群体的遗传多样性高于养殖群体。张志伟等^[20]在草鱼野生和养殖群体的微卫星实验中得出,相对于野生群体的杂合子过剩,养殖群体呈现明显杂合子缺失,即养殖群体杂合度及遗传多样性低于野生群体。

然而本实验中,养殖群体虽然经过几次传代,但遗传多态性水平与野生群体并无明显差异。可能是因为中间球海胆引入我国后,传代尚短,同时,近些年也不时有少量的同种海胆引入,本研究所取的养殖群体是最早引进的群体和后引进的部分群体的杂交后代,结果冲淡了近交引起的基因漂变,养殖群体的遗传多态性水平并无明显的降低,使种质资源得以保存。另外,实验样本的数量及个体质量,多态性检测参数的选择,物种本身所具有的特异性等都可能对该实验结果有一定的影响作用。

随着养殖传代的增加,以及外界条件的变化,不排除由于基因缺失而导致的杂合度降低,使养殖群体整体种质下降,甚至引发大规模的病变和死亡的状况发生。所以即使现在遗传多样性水平没有明显降低,我们也应当采取有效措施保护种质资源。

参考文献:

- [1] 高绪生,常亚青. 中国经济海胆及其增养殖[M]. 北京:中国农业出版社,1999.
- [2] Takahashi N. The annual reproductive cycle of the sea urchin (*Strongylocentrotus intermedius*) at Rishiri Island, Hokkaido[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1980, 46(9): 1189.
- [3] 王子臣,常亚青. 虾夷马粪海胆人工育苗的研究[J]. 中国水产科学,1997,4(1):60-67.
- [4] Michael O, Jonathan M. Microsatellite DNA in fishes[J]. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 1997, 7: 331-363.
- [5] Michael A M, Kathryn B, Don R L. Polymorphic microsatellite loci from the red urchin, *Strongylocentrotus franciscanus* with comments on heterozygote deficit[J]. Molecular Ecology Notes, 2004, 4: 226-228.
- [6] Addison J A, Hart M W. Characterization of microsatellite loci in sea urchins (*Strongylocentrotus* spp)[J]. Molecular Ecology Notes,2002, 2: 493-494.
- [7] 黄培堂. 分子克隆实验指南[M]. 第三版(上、下册). 北京:科学出版社,2002.
- [8] Raymond M, Rousset F. Genepop (version 1.2): a population genetics software for exact tests and ecumenicism[J]. Journal of Heredity,1995,86:248-249.
- [9] Botstein D, White R L. Construction of genetic linkage map in mall using restriction fragment length polymorphisms [J]. American Journal of Animal Genetics, 1980, 32: 314-331.
- [10] 忻雅,崔海瑞,张明龙,等. 白菜 EST-SSR 标记的通用性[J]. 细胞生物学杂志,2006,28(2): 248-252.
- [11] 李永强,李宏伟,高丽锋,等. 基于表达序列标签的微卫星标记(EST-SSRs)研究进展[J]. 植物遗传资源学报,2004,5(1):91-95.
- [12] David L, Rajasekaran P, Fang J, et al. Polymorphism in ornamental and common carp strains (*Cyprinus carpio* L.) as revealed by AFLP analysis and a new set of microsatellite markers [J]. Mol Genet Genomics, 2001, 266: 353-362.
- [13] 汪桂玲,袁一鸣,李家乐. 中国五大湖三角帆蚌群体遗传多样性及亲缘关系的 SSR 分析[J]. 水产学报,2007,31(2):152-158.
- [14] 李宏伟,刘曙东,高丽锋,等. 小麦 EST-SSRs 的通用性研究[J]. 植物遗传资源学报,2003,4(3):70-73.
- [15] Kong L F, Li Q. Development of expressed sequence tag-derived microsatellite markers for the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus* [J]. Molecular Ecology Notes, 2007:1-3.
- [16] Cameron R, Leahy P S, Britten R J, et al. Microsatellite loci in wild-type and inbred *Strongylocentrotus purpuratus* [J]. Developmental

- Biology, 1999, 208: 255 - 264.
- [17] Zhan A B, Hu J J, Wang X L, *et al.* A panel of polymorphic EST-derived microsatellite loci for the bay scallop (*Argopecten irradians*) [J]. *Journal of Molluscan Studies*, 2006, 72(4): 436 - 438.
- [18] 战爱斌, 胡景杰, 胡晓丽, 等. 富集文库-菌落原位杂交法筛选栉孔扇贝的微卫星标记[J]. *水产学报*, 2008, 32(3): 353 - 361.
- [19] 李莉, 孙振兴, 杨树德, 等. 用微卫星标记分析皱纹盘鲍群体的遗传变异[J]. *遗传*, 2006, 28(12): 1549 - 1554.
- [20] 张志伟, 曹哲明, 杨弘, 等. 草鱼野生和养殖群体间遗传变异的微卫星分析[J]. *动物学研究*, 2006, 27(2): 189 - 196.

《水产学报》获中国科协精品科技期刊项目资助

2009 年度中国科协精品科技期刊示范项目和英文版期刊国际推广项目评审工作于 5 月在北京结束。根据评审结果, 全国共有 45 个期刊获精品科技期刊示范项目资助, 其中 A 类项目(培育国际知名期刊)5 个, B 类项目(培育国内领衔期刊)40 个; 英文版期刊国际推广项目 7 个。

中国水产学会主办的《水产学报》《Journal of Fisheries of China》(简称《JFC》)在此次评选中, 从全国众多期刊中脱颖而出, 获得 2009 年度中国科协精品科技期刊示范项目(B 类)资助。

中国科协从 2006 年开始启动精品科技期刊工程资助项目, 目的是促进中国科协及全国学会主办科技期刊的改革与发展, 强化学术交流和学术积累功能, 增强科技期刊核心竞争力, 推进学术交流和学术建设, 合理配置和有效利用资源, 不断打造精品期刊, 全面提升科协系统科技期刊的整体质量和水平, 为科技自主创新和建设创新型国家做出贡献。

《水产学报》是中国科协主管、中国水产学会主办的中国水产科学领域的顶级学术期刊, 并连续 5 年被评为“百种中国杰出学术期刊”, 根据《中国科协科技期刊发展报告》(2009), 在全国 6631 种学术期刊中, 总被引频次和影响因子在本学科均名列前茅。

此次评选, 农业类期刊仅有三本入选, 另外两本是《作物学报》和《林业学报》。

Genetic structure analysis of wild and cultured populations of the Japanese sea urchin (*Strongylocentrotus intermedius*) using microsatellites

GENG Hui-jun^{1,2}, ZHOU Zun-chun², DONG Ying², HE Chong-bo², ZOU Lin-lin³

(1. Liaoning Ocean and Fisheries Science Research Institute, Liaoning Key Laboratory of Marine Fishery Molecular Biology, Dalian 116023, China;

2. College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China;

3. College of Life Science and Technology, Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China)

Abstract: In this research, we have analyzed the genetic diversity of wild and cultured populations of 28 polymorphic microsatellite markers for Japanese sea urchin (*Strongylocentrotus intermedius*) via mining EST database of relative species (*S. purpuratus*). *S. intermedius* belongs to Echinodermata, Eleutherozoa and Echinodea, which is distributed in the northeastern Japan, the Korean Peninsula and the Far East coast of Russia. It was introduced into China by Dalian Fisheries University in 1989 and has been breeding for more than 6 generations. EST-SSRs recently have been commonly used in genetic investigations. The flanking sequence of EST-SSRs is so highly conserved that the primers can be transferred between similar species. Therefore, in this experiment, the primers were designed with the EST sequence of *S. purpuratus* from the database in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html>), then polymerase chain reaction (PCR) was used to identify the effective primers that matched with the *S. intermedius* which was related to *S. purpuratus*. Results showed: A total of 91 different alleles were found and the number of alleles in each locus ranged from 2 to 6. In the 2 populations, the average number of alleles was both 3.071 4; the number of mean valid alleles was 2.231 9 and 2.227 1 respectively; the value of average observed and expected heterozygosity were 0.523 4, 0.536 5 and 0.486 8, 0.499 3 respectively; the mean PIC was 0.447 7 and 0.439 6. The difference in genetic diversity among the 2 populations was not significant. The genetic similarity coefficient of the 2 populations was 0.758 7, and the genetic distance of the populations was 0.276 2. Chi-square test was used to analyze the genotypes based on Hardy-Weinberg equilibrium, the P value showing that 50% loci departed from Hardy-Weinberg equilibrium. The results of the F-test suggested that both the two populations have surplus heterozygous, and there is no obvious inbreeding phenomenon in the two populations. The results also displayed low genetic differentiations between the 2 populations, and the variance was mainly due to individual difference among the populations. Although the cultured population has been breeding for several generations, there is no significant difference on genetic polymorphism with the wild population.

Key words: *Strongylocentrotus intermedius*; microsatellites; genetic diversity