



基于 SSR-seq 技术评估中间球海胆多代选育群体和普通养殖群体的遗传多样性

刘雷¹, 张伟杰¹, 刘岩松¹, 冷晓飞², 欧凡江¹,
臧晓宁¹, 李旭光², 丁君^{1*}, 常亚青^{1*}

(1. 大连海洋大学, 农业农村部北方海水增养殖重点实验室, 辽宁大连 116023;

2. 大连海宝渔业有限公司, 辽宁大连 116045)

摘要: 为明确不同选育群体中间球海胆的遗传多样性和遗传结构, 利用 SSR-seq 技术和 15 个微卫星位点, 对 1 个家系选育群体 (FP)、1 个群体选育群体 (IP) 和 1 个未经选育的普通养殖群体 (CP) 的遗传多样性及遗传结构进行了分析。结果显示, 15 个微卫星位点共检测出 112 个等位基因, FP、IP、CP 3 个群体的平均观测等位基因数 (N_a) 分别为 5.077、5.133 和 6.133 个, 平均有效等位基因 (N_e) 分别为 2.816、2.873 和 3.638 个, 平均观测杂合度 (H_o) 分别为 0.522、0.441 和 0.501, 平均期望杂合度 (H_e) 分别为 0.595、0.599 和 0.667, 平均多态性信息含量 (PIC) 分别为 0.546、0.543 和 0.623。家系选育群体 (FP) H_e 与 H_o 的差值 (0.073) 低于 IP (0.158) 和 CP (0.166), 平均固定指数 (F) (0.115) 低于 IP (0.248) 和 CP (0.246)。3 个群体间遗传分化系数 (F_{st}) 介于 0.018~0.176, 为中低等程度的遗传分化。分子方差分析 (AMOVA) 结果显示, 3 个群体的遗传变异主要源于个体间。主成分分析 (PCoA) 和聚类进化树结果均显示, 3 个群体之间的亲缘关系较近, 其中 IP 群体遗传分化程度最高。研究表明, 3 个中间球海胆群体均具有较高的遗传多样性, 多代家系选育和群体选育均未明显降低群体的遗传多样性, 家系选育更有利于保持群体的杂合度和控制群体的近交水平, 群体选育则会提升群体的遗传分化程度。

关键词: 中间球海胆; 选育群体; 遗传多样性; 遗传结构; 微卫星

中图分类号: Q 347; S 968.9

文献标志码: A

中间球海胆 (*Strongylocentrotus intermedius*) 又称虾夷马粪海胆, 隶属于棘皮动物门 (Echinodermata) 游走亚门 (Eleutherozoa) 海胆纲 (Echinoidea) 正形目 (Centrochinoidea) 球海胆科 (Strongylocentrotidae) 球海胆属 (*Strongylocentrotus*), 原产于俄罗斯远东沿海、朝鲜半岛东岸及日本北海道以北沿海, 1989 年由大连海洋大学引入我国。由于

生长速率较快、性腺品质好、棘刺较短易于养殖等优点, 中间球海胆逐渐成为我国最主要的养殖海胆种类^[1]。受水温、饵料等养殖条件的限制, 中间球海胆的增养殖区主要分布于大连、烟台和威海等冷水海域, 又由于养殖用工成本相对较高, 中间球海胆的养殖规模一直较小, 养殖成品也主要出口日本。最近几年, 国内市场对海胆的消费

收稿日期: 2021-12-01 修回日期: 2022-04-07

资助项目: 国家重点研发计划 (2018YFD0901601); 农业农村部农业科研杰出人才及创新团队项目; 大连市高层次人才创新支持计划 (2019RQ122); 辽宁省教育厅面上项目 (LJKZ0702)

第一作者: 刘雷 (照片), 从事海胆遗传育种研究, E-mail: llei566@163.com

通信作者: 丁君, 从事棘皮动物遗传育种与健康养殖研究, E-mail: dingjun1119@dlou.edu.cn;

常亚青, 从事棘皮动物遗传育种与健康养殖研究, E-mail: yqchang@dlou.edu.cn



需求日益增加, 使海胆价格大幅上涨, 进而刺激了海胆养殖规模的迅速增加。近期, 福建沿海也开展了中间球海胆的试养^[2]。养殖产业的健康快速发展离不开良种的有力支撑。目前, 我国仅有2个海胆新品种(中间球海胆“大金”、“丰宝1号”), 远远不能满足海胆养殖产业日益增长的良好需求。因此, 继续开展中间球海胆的选育十分必要。由于中间球海胆是引进种, 且引种规模有限, 要明确多代选育是否会降低其遗传多样性, 或者采取何种选择方法更有利于保持其遗传多样性, 避免由于连续选择导致的遗传多样性大幅下降, 以及环境适应能力减弱等问题。

微卫星标记(SSR)是分析动植物群体遗传多样性最常用的分子标记之一, 具有多态性高、稳定性好、易获得、呈共显性遗传以及遵循孟德尔遗传规律等优点。微卫星技术一直是水产动物群体遗传多样性分析的主要技术。近年来, 研究人员利用微卫星标记对鱼类、贝类、甲壳类等多个物种的普通养殖群体或野生群体^[3-15]的遗传多样性进行了评估, 为水产动物种质资源的保护和利用提供了重要参考, 也有少部分研究利用微卫星技术评估了选育新品种(系)^[16-18]的遗传多样性, 探讨了这些群体进一步选育的潜力。在海胆中, 微卫星同样主要用于分析养殖或野生群体的遗传多样性和遗传结构, 如丁君等^[19]开发了12个微卫星位点, 并对3个养殖群体进行了遗传多样性分析, 区分出不同群体遗传关系的远近。耿慧君等^[20]利用微卫星技术, 分析认为大连凌水养殖群体的遗传多态性水平与日本北海道海域的野生群体间无明显差异, 未发生明显的种质退化。孙博林等^[21]则发现大连旅顺的1个养殖群体各遗传多样性指标均低于海域放流群体。对于选育群体, 仅见杨芸菲等^[22]对经过1代选育的中间球海胆家系群体进行了遗传多样性分析, 认为该群体属中度多样性水平。目前尚未见关于海胆的多代群体选育是否会降低群体的遗传多样性的相关报道。

本研究利用SSR-seq技术^[23]对中间球海胆1个多代家系选育群体、1个多代群体选育群体和1个未经选育的普通养殖群体的遗传多样性进行了分析, 评估不同群体间的遗传分化程度, 明确不同选育方式对遗传多样性的影响, 以期对中间球海胆的种质资源评估、管理和良种培育提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 样品的采集与DNA提取

实验中的3个中间球海胆群体分别取自大连海洋大学农业农村部北方海水增养殖重点实验室培育的选育家系群体(第8代选育家系)(编号为FP)、大连海宝渔业有限公司和大连海洋大学共同培育的群体选育群体(第5代选育群体)(编号为IP)、大连旅顺口区双岛镇某企业繁育的未经选育的普通养殖群体(编号为CP)。于3个群体中分别取32、31和32只个体, 剪取管足, 置于-80℃保存, 用于DNA的提取。

DNA的提取采用天根生化科技(北京)有限公司的海洋动物组织基因组DNA提取试剂盒, 之后用1%的琼脂糖凝胶电泳检测DNA完整性, 并用核酸蛋白测定仪(Biochrom)检测DNA的浓度和纯度。DNA样品置于-20℃冰箱保存。

1.2 微卫星位点的筛选

从已有的文献中^[19, 21-22, 24-25]选取75个微卫星位点, 获取引物信息, 交由上海生工生物工程股份有限公司合成引物。采用混池法对各微卫星位点的多态性进行初步检测, 对多态性良好的位点, 用20只单一个体进行多态性确认。另外, 从中间球海胆转录组数据库^[26-27]中查找41个微卫星位点, 设计合成相对应的引物。将确认多态性良好的微卫星位点信息交由上海天昊生物科技有限公司验证分型可行性。

采用退火温度梯度PCR反应对各引物进行筛选。PCR反应体系为25 μL, 包括2 × Accurate Taq预混液 12.5 μL(艾科瑞生物工程有限公司)、模板 1 μL, 正反向引物各 1 μL, ddH₂O 10.5 μL。扩增程序: 94℃预变性 5 min, 98℃变性 10 s, 梯度退火(退火温度为正反向引物平均退火温度前后分别-2、-1、±0、+1、+2、+3, 共6个温度)30 s, 72℃延伸 40 s, 每个退火温度 5个循环, 共计 30个循环, 之后 72℃延伸 10 min, 4℃保存。PCR产物经8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测筛选。

1.3 SSR-seq 过程

以每个 panel 15对引物为标准, 将优化后的引物混合作为多重PCR panel。以标准基因组为模板进行扩增, 优化完善多重PCR panel体系。以此对实验个体基因组进行扩增, 并将同一个体基

因组的产物进行混合, 且确保每个位点引物扩增产物的量相当。利用带有 Index 序列的引物, 通过 PCR 扩增向文库末端引入和 illumina 平台兼容的特异性标签序列。将所有样品 Index PCR 扩增产物等量混合, 并经割胶回收获得最终的 Fast-Target™ 测序文库, 文库的片段长度分布经 Agilent 2100 Bioanalyzer 验证。文库摩尔浓度精确定量后, 最终于 Illumina HiSeq 平台, 以 2×150/2×250 bp 的双端测序模式进行高通量测序。

1.4 数据分析

遗传多样性 利用 Popgene 3.4 软件计算平均等位基因数 (N_a)、有效等位基因数 (N_e)、观测杂合度 (H_o)、预期杂合度 (H_e)、多态性信息含量 (PIC) 和基因流 (N_m)。使用 R 包 pegas 对 SSR 位点进行 Hardy-Weinberg 平衡检验。

遗传分化与遗传结构 利用 FSTAT 和 Arlequin 软件计算每个基因座 F 统计量 (群体近交系数 F_{is} 、总群体近交系数 F_{it} 、群体间的遗传分化系数 F_{st}) 以及每个群体的 F_{is} 值。使用 R 包 polysat 计算样本两两之间的遗传距离 (Bruvo's distance), 基于亚种群间遗传距离 (Nei 氏) 和样本间遗传距离, 进行主坐标分析 (PCoA), 使用 NJ 方法构建亚种群和样本进化树, 使用 R 包 ape 计算外展值, 用 R 包 ggtree 绘制亚种群和所有个体进化树图。使用 R 包 poppr 进行分子方差分析 (AMOVA)。

2 结果

2.1 SSR-seq 引物的筛选

文献中获得的 75 个 SSR 位点经聚丙烯酰胺凝胶电泳筛选后, 获得 21 个多态性位点, 其中 SSR2 位点电泳结果图如图 1 所示。

将文献中筛选后获得的 21 个多态性位点以及转录组中获得的 41 个位点 (共计 62 个位点) 经测序公司筛选验证后, 共获得条带清晰、多样性良好的位点 25 个。挑选其中等位基因数大于等于 4 个^[28] 的位点共计 15 个用于 SSR 分型工作。15 个位点引物信息见表 1。

2.2 3 个群体的遗传多样性分析

15 个 SSR 位点在 3 个中间球海胆群体的多态性信息数据统计结果见表 2。15 个 SSR 位点共检测到 112 个等位基因, 每个位点的等位基因数为 4~13 个, 所有位点的平均 N_a 为 7.462 个, 平

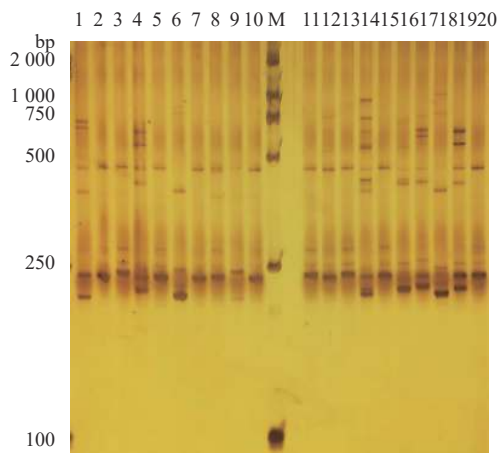


图 1 SSR2 号位点在 20 只中间球海胆个体中的检测结果

M. 标准物质 2 000, 1~20. 20 个个体。

Fig. 1 Detection results of SSR2 locus in 20 individuals of *S. intermedius*

M. marker 2 000, 1-20. 20 individuals.

均 N_e 为 3.375 个, 其中 SSR17、SSR18、SSR19 和 SSR20 的 N_a 数最少, 仅有 4 个; 位点 SSR1 的 N_a 最多, 共有 13 个。 H_o 为 0.213~0.870, 平均值为 0.493; H_e 为 0.416~0.872, 平均值为 0.660; 固定指数 (F) 为 -0.113~0.672, 平均值为 0.248; PIC 为 0.375~0.860, 平均值为 0.613。 SSR18、SSR19 和 SSA22 的 PIC 为 0.25~0.50, 为中度多态性位点, 其余 12 个位点均大于 0.5, 为高度多态性位点^[29]。位点 SSR19 的 N_e 最小 (1.713), H_e 最低 (0.416), PIC 最低 (0.375), 遗传多样性水平最低, 位点 SSR1 遗传多样性水平最高, N_e 最大 (7.808), H_e 最高 (0.872), PIC 最高 (0.860)。

中间球海胆 3 个养殖群体在 15 个 SSR 位点上的遗传多样性参数见表 3。FP、IP 和 CP 三个种群的平均 N_a 分别为 5.077、5.133 和 6.133 个; 平均 N_e 分别为 2.816、2.873 和 3.638 个; 平均 H_o 分别为 0.522、0.441 和 0.501, 均小于平均 H_e 0.595、0.599 和 0.667。3 个群体的平均 F 从大到小依次为 IP (0.248)>CP (0.246)>FP (0.115), IP 群体中, 平均 F 为负数的位点有 2 个, 占比 13.33%; CP 群体中有 3 个, 占比 20%; FP 群体中有 8 个, 占比 53.33%; 3 群体的平均 PIC 分别为 0.546、0.543 和 0.623, 均为高度多态性。Hardy-Weinberg 平衡检测的 45 个数据 (3 个群体×15 个位点) 中有 14 个偏离 Hardy-Weinberg 平衡, 占比 31.11%, 其中位点 SSR2 在 3 个群体中均显著偏离平衡, 位点 SSR7、SSR16 和 SSR18 在 2 个群体中偏离平衡。

表 1 15 对 SSR-seq 引物信息
Tab. 1 15 pairs of SSR-seq primer information

序号 no.	位点 locus	重复序列 repeat motif	产物长度/bp amplified fragment size	引物序列(5'-3') primer sequence(5'-3')
1	SSR1	(CT) ₁₂	196~226	F: TCGTCATGAGATGGTTCGCT R: CATTTCACCGTGGTGGGGTC
2	SSR2	(AG) ₁₃	179~187	F: CGCAGGATGCAGTGATACC R: ATTCCACCAGTATCCCAGCT
3	SSR3	(CT) ₁₈	136~180	F: GCGCTTAATCTTTGGATAATTG R: CTGTAGTCGCTCCGCATGT
4	SSR4	(AG) ₁₂	181~219	F: GGGAAAGTTTTCCCCACTGAC R: TGTCCATAACGCCACATTCG
5	SSR7	(AC) ₁₀	199~213	F: TCCCATATGATTGCTCGTGC R: AGCATTCACCGCGAAACTG
6	SSR14	(AG) ₁₀	165~179	F: ATCCCAAACACTACGTTCAACC R: GGCTGCCTAGTTGCATAAAT
7	SSR16	(CT) ₁₆	146~246	F: CCTTGAATGAGAACTTGT R: ACCGATTTACTTGACCTG
8	SSR17	(AT) ₆	231~237	F: CTGTTGGATGAGTGAAT R: TTTGAACGAGCTTGCCCTT
9	SSR18	(TTGACT) ₄	112~130	F: GTCAGGTAGCTATATGTTTC R: TGGTGATAAACATGTCAGAA
10	SSR19	(GCA) ₈	93~102	F: AGCTCCTAGGGTCTTACC R: ACATGGGTGGAGAGGTG
11	SSR20	(GAA) ₅	147~156	F: CTAATAGCCCTATGCCGCGT R: ATACACCACACGATTTCGCAC
12	SSRA6	(TGA) ₆	179~194	F: AAGCAGCCATTAAGGAAATG R: CAAGCAGTTATCCGTTTCA
13	SSRA9	(TC) ₉	185~211	F: AAGCGAGCTTATGTCTAGTA R: CTAGAACCCTTCACAACTCT
14	SSRA10	(AC) ₆	148~168	F: CACGTATTTCCGGATGGTGAC R: CTTATTATTAGCGCACGTCAT
15	SSRA22	(TCTG) ₆	186~202	F: GAAGAACCATGGACTTACTACA R: TGTTGTGAGAAAGGTAGCG

注: (X)_n代表核心序列X重复次数n。

Notes: (X)_n represents the number of repetitions of the core sequence X is n.

表 2 15 个微卫星位点的遗传多样性指数
Tab. 2 Genetic diversity indices at 15 microsatellite loci

位点名称 locus	观测等位基因数 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	固定指数 F	多态性信息含量 PIC
SSR1	13	7.808	0.870	0.872	0.003	0.860
SSR2	6	3.257	0.324	0.693	0.533	0.639
SSR3	10	3.234	0.526	0.691	0.238	0.640
SSR4	11	4.623	0.337	0.784	0.570	0.751
SSR7	9	3.341	0.653	0.701	0.069	0.653
SSR14	6	3.324	0.674	0.699	0.036	0.667
SSR16	10	2.898	0.474	0.655	0.277	0.602
SSR17	4	2.489	0.602	0.598	-0.007	0.532
SSR18	4	1.970	0.277	0.492	0.438	0.424
SSR19	4	1.713	0.351	0.416	0.156	0.375
SSR20	4	2.514	0.670	0.602	-0.113	0.520
SSRA6	6	4.037	0.247	0.752	0.672	0.714
SSRA9	10	2.667	0.407	0.625	0.349	0.592
SSRA10	10	3.846	0.660	0.740	0.109	0.704
SSRA22	5	2.246	0.213	0.555	0.617	0.475
平均值 mean	7.462	3.375	0.493	0.660	0.248	0.613

表3 中间球海胆3个群体在15个微卫星位点上的遗传多样性

Tab. 3 Genetic diversity of three populations of *S. intermedius* at 15 microsatellite loci

群体 population	位点 名称 locus	等位基因 总数 K	观测等位 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	固定 指数 F	多态性 信息含量 PIC	Hardy-Weinberg 平衡 HWE
FP	SSR1	24	7	4.966	0.917	0.799	-0.148	0.770	*
	SSR2	44	4	2.426	0.545	0.588	0.072	0.517	ns
	SSR3	64	5	3.061	0.656	0.673	0.025	0.622	ns
	SSR4	64	8	4.223	0.344	0.763	0.550	0.726	ns
	SSR7	64	8	3.977	0.750	0.749	-0.002	0.712	*
	SSR14	64	6	3.606	0.781	0.723	-0.081	0.681	ns
	SSR16	64	4	1.750	0.469	0.429	-0.093	0.394	ns
	SSR17	64	4	2.181	0.656	0.542	-0.212	0.487	ns
	SSR18	62	3	2.217	0.258	0.549	0.530	0.463	ns
	SSR19	64	3	1.724	0.344	0.420	0.181	0.354	ns
	SSR20	64	4	2.325	0.594	0.570	-0.042	0.496	**
	SSRA6	62	5	2.711	0.161	0.631	0.744	0.588	ns
	SSRA9	64	5	1.438	0.313	0.305	-0.026	0.292	ns
	SSRA10	64	4	2.131	0.625	0.531	-0.178	0.481	ns
	SSRA22	54	3	2.186	0.296	0.543	0.454	0.478	**
平均值 mean		59	5.077	2.816	0.522	0.595	0.115	0.546	
IP	SSR1	42	10	6.582	0.905	0.848	-0.067	0.833	ns
	SSR2	46	5	2.310	0.217	0.567	0.617	0.519	*
	SSR3	62	7	2.253	0.355	0.556	0.362	0.517	ns
	SSR4	62	7	2.957	0.290	0.662	0.561	0.615	ns
	SSR7	62	6	2.509	0.548	0.601	0.088	0.520	ns
	SSR14	62	4	1.727	0.548	0.421	-0.303	0.366	ns
	SSR16	62	5	2.002	0.419	0.501	0.162	0.446	**
	SSR17	62	4	2.421	0.548	0.587	0.066	0.499	ns
	SSR18	62	3	1.936	0.194	0.483	0.600	0.413	**
	SSR19	62	3	1.707	0.355	0.414	0.143	0.375	ns
	SSR20	62	3	2.021	0.742	0.505	-0.469	0.406	**
	SSRA6	58	5	4.462	0.207	0.776	0.733	0.738	ns
	SSRA9	60	6	3.846	0.600	0.740	0.189	0.705	**
	SSRA10	62	5	3.963	0.581	0.748	0.223	0.707	ns
	SSRA22	54	4	2.394	0.111	0.582	0.809	0.493	ns
平均值 mean		59	5.133	2.873	0.441	0.599	0.248	0.543	
CP	SSR1	26	12	9.135	0.769	0.891	0.136	0.881	ns
	SSR2	46	4	2.713	0.217	0.631	0.656	0.574	**
	SSR3	64	7	3.587	0.563	0.721	0.220	0.677	ns
	SSR4	64	8	5.007	0.375	0.800	0.531	0.773	ns
	SSR7	64	6	3.519	0.656	0.716	0.083	0.672	*
	SSR14	64	5	4.072	0.688	0.754	0.089	0.713	ns
	SSR16	64	7	3.235	0.531	0.691	0.231	0.653	*
	SSR17	60	3	2.476	0.600	0.596	-0.007	0.530	ns
	SSR18	64	4	1.715	0.375	0.417	0.101	0.370	*
	SSR19	62	4	1.643	0.355	0.391	0.093	0.352	ns
	SSR20	62	4	2.925	0.677	0.658	-0.029	0.592	ns
	SSRA6	50	5	4.252	0.400	0.765	0.477	0.725	**
	SSRA9	58	9	3.337	0.310	0.700	0.557	0.658	ns
	SSRA10	62	10	5.045	0.774	0.802	0.034	0.776	ns
	SSRA22	52	4	1.912	0.231	0.477	0.516	0.395	ns
平均值 mean		57	6.133	3.638	0.501	0.667	0.246	0.623	

注: ns.符合Hardy-Weinberg平衡, $P>0.05$; *.显著偏离Hardy-Weinberg平衡, $P<0.05$; **.极显著偏离Hardy-Weinberg平衡, $P<0.01$ 。

Notes: ns. in accordance with Hardy-Weinberg equilibrium; *. significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium ($P<0.05$); **. highly significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium ($P<0.01$).

2.3 遗传分化与遗传结构

15 个位点在 3 个群体的 F 统计量如表 4 所示, 就 F_{is} 而言, 4 个位点 (SSR1、SSR14、SSR17、SSR20) 出现负值, 位点 SSRA6 的值最大 (0.646); 就 F_{it} 而言, 2 个位点 (SSR17、SSR20) 出现负值, 位点 SSRA6 的值最大 (0.661); F_{st} 的值为 0.018~0.176, 平均值仅为 0.061, 除位点 SSR16 外, 其余 14 个位点均低于 0.15; 15 个位点的 N_m 范围为 1.170~15.261, 平均为 6.202。

表 4 中间球海胆 3 个群体 15 个微卫星位点的 F 统计量

Tab. 4 F -statistics at 15 microsatellite loci in three populations of *S. intermedium*

位点名称 locus	群体内近交 系数 F_{is}	总群体近交 系数 F_{it}	群体间遗传 分化系数 F_{st}	基因流 N_m
SSR1	-0.021	0.011	0.031	7.719
SSR2	0.451	0.529	0.142	1.510
SSR3	0.193	0.240	0.058	4.079
SSR4	0.547	0.571	0.053	4.479
SSR7	0.054	0.069	0.016	15.261
SSR14	-0.063	0.036	0.093	2.452
SSR16	0.124	0.278	0.176	1.170
SSR17	-0.046	-0.005	0.040	5.986
SSR18	0.430	0.441	0.020	12.158
SSR19	0.140	0.156	0.018	13.502
SSR20	-0.161	-0.114	0.041	5.884
SSRA6	0.646	0.661	0.042	5.640
SSRA9	0.299	0.354	0.079	2.925
SSRA10	0.048	0.110	0.065	3.605
SSRA22	0.602	0.616	0.036	6.663
平均值 mean	0.216	0.264	0.061	6.202

注: N_m , 基因流, 根据 $F_{st}=0.25(1-F_{st})/F_{st}$ 估算的基因流量。
Notes: N_m , gene flow, which is estimated from $F_{st}=0.25(1-F_{st})/F_{st}$.

分子方差分析 (AMOVA) 结果表明, 7.326% 的遗传变异存在于群体间, 14.718% 的遗传变异来自群体内个体间, 77.956% 的遗传变异来自所

有个体间 (表 5)。遗传变异的方差组分割中, 个体变异占比较大, 表明遗传变异主要存在于个体间, 个体间的遗传变异程度远大于群体间。

主成分分析 (PCoA) 结果如图 2 所示, 家系选育群体 FP 和普通养殖群体 CP 内的个体的分布范围基本重合, 而 IP 群体大部分个体与 FP 和 CP 群体未重合, 但添加置信椭圆后, 发现 3 个群体仍为同一亚群。个体进化树构建结果如图 3, FP 和 CP 群体呈镶嵌式排列, 虽然 IP 群体大部分个体位于同一主分支上, 但仍未出现明显的地理群体分支, 结果与 PCoA 结果一致。3 个群体的聚类树如图 4 所示, 3 个群体同时汇聚于同一结点, 说明 3 个群体是并列存在的, 为同一亚群。

3 讨论

3.1 3 个中间球海胆群体的遗传多样性

遗传多样性是评价一个群体种质资源状况的重要指标, 通过比较群体遗传多样性水平, 可以为选育优良品种提供理论参考。为更好地反映群体的遗传信息, 所选用的位点的等位基因数需不少于 4 个^[28], 本研究最终选用的 15 个位点共检出 112 个等位基因, 单个位点所检测到的等位基因数为 4~13 个, 可以较好地反映 3 个选育群体的遗传信息。此外, 等位基因杂合度 (H) 值可以反映群体遗传结构的变异程度, H 值越大, 表明该群体的遗传潜力越大, 当 H 值为 0.5~0.8 时, 即可认为该群体遗传多样性较高^[11, 30]。本研究选用的 15 个位点的 H_e 介于 0.416~0.872, 平均为 0.660, H_o 介于 0.213~0.870, 平均为 0.493。由上述结果, 可认为本研究所选用的位点符合遗传多样性分析的要求, 并且较好地反映了 3 个群体的遗传多样性。本研究中 15 个位点的平均 H_e 均高于丁君等^[19]所选用的 12 个位点的 H_e (0.449 4~0.507 9) 以及杨芸菲等^[22]所用的 28 个位点的平均 H_e (0.530 4), 平均 H_o 也高于丁君等^[19]的报道结果 (0.434 0~0.461 8),

表 5 基于 15 个微卫星标记的分子方差分析结果

Tab. 5 Result of AMOVA based on 15 microsatellite markers

变异来源 source of variation	自由度 df	变异分量 variance components	变异百分比/% percentage of variation	P 值 P-value
群体间 interpopulation	2	0.533 3	7.326	0.01
群体内个体间 between individuals within population	92	1.071 5	14.718	0.01
样本内 within individual	95	5.675 2	77.956	0.01
总计 total	189	7.28	100	

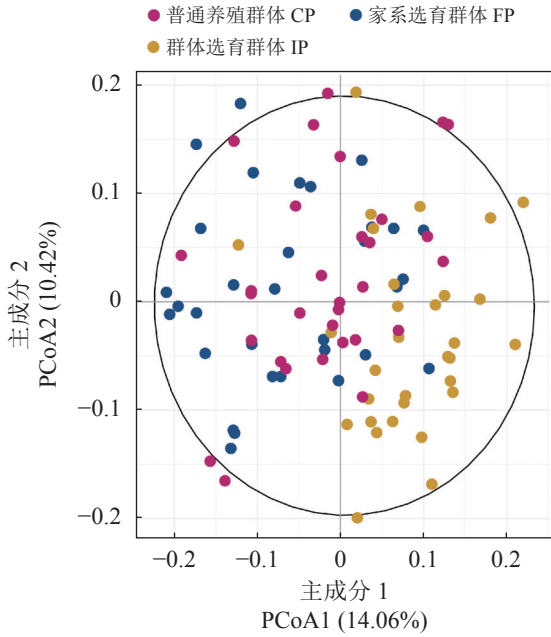


图2 中间球海胆3个群体所有个体的主成分分析图
CP.普通养殖群体, FP.家系选育群体, IP.群体选育群体, 下同。

Fig. 2 Principal component analysis (PcoA) results of all individuals in three populations of *S. intermedius*

CP. common culture population, FP. family selection population, IP. individual selection population, the same below.

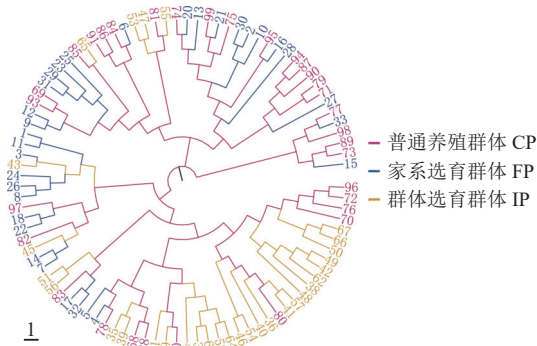


图3 中间球海胆3个群体所有个体进化树
Fig. 3 Phylogenetic tree of all individuals in three populations of *S. intermedius*

原因一方面是由于所选微卫星位点不同, 以及选择的实验群体存在差异, 另一方面也与采用的实验技术不同有关, 本研究使用结合了第二代测序技术的SSR-seq技术, 不仅可以准确获得SSR位点的片段大小, 还可以准确获取各位点的序列信息和比例信息, 分析到的等位基因数可能会更多, 因此H值也会更高。

本研究选择的FP、IP和CP中间球海胆3个群体与其他学者研究的日本本土的中间球海胆群

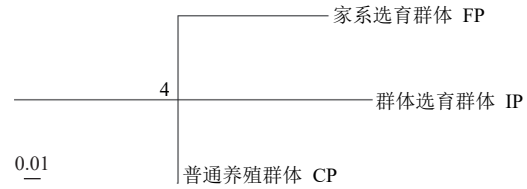


图4 中间球海胆3个群体的UPGMA聚类进化树
Fig. 4 UPGMA clustering evolutionary tree of three populations of *S. intermedius*

体相比, 其遗传多样性并没有产生明显的降低现象。本研究的平均 H_e (0.595、0.599、0.667)和 H_o (0.522、0.441、0.501)与耿慧君等^[20]报道的日本野生群体的H值(0.523 4、0.486 8)相近, 高于Manchenko等^[31]报道的日本地区的中间球海胆的H值(0.237±0.067、0.230±0.065)。中间球海胆3个群体的PIC同样表明, 3个群体的遗传多样性处于中等偏上水平, 未出现明显的种质退化^[20]。

中间球海胆3个群体的 H_o 均小于 H_e , 说明这3个群体均存在杂合子缺失现象。3个群体的 H_o 与 H_e 的差值从高到低依次为CP群体>IP群体>FP群体, 即CP群体杂合子缺失最严重, IP群体次之, FP群体杂合子缺失现象最轻, 这说明家系选育有利于保持群体杂合度。3个群体的F值证实了这一结论: 3个群体15个位点组合中, FP群体中有8个位点F值为负值, 说明杂合子较丰富, 而IP群体和CP群体分别仅有3个和2个位点的F值为负值, 说明杂合子较少。3个群体的平均F值均为正值, 说明3个群体中均存在一定程度的近亲交配现象, 这种现象在其他引进品种如凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[14]、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[13]中也有报道。IP群体的平均F值(0.248)虽然最高, 但与CP群体(0.246)相差较小, 说明多代群体选育并未显著增加群体的近交水平。FP群体的平均F值(0.115)最低, 表明家系选育有利于控制群体的近交水平。本研究选用的FP群体为第8代选育群体, 与第1代家系的平均H值(0.515 0、0.530 4)和平均PIC(0.402 6)结果相近, 说明多代家系选育并没有造成遗传多样性的大幅度降低, 同时表明该选育群体仍具有较大的选择潜力。

本研究的中间球海胆3个群体均出现了偏离Hardy-Weinberg平衡的现象, 在丁君等^[19]、耿慧君等^[20]对中间球海胆的研究中均存在偏离的情况, 同样在水产经济虾类^[14]、鱼类^[4, 6-7, 12-13, 15]等物种中普遍存在。符合Hardy-Weinberg平衡的种群一般

是一个理想状态的种群, 满足种群较大、随机交配、无迁移、无选择、无基因突变等条件。现实中养殖群体规模小, 养殖过程中存在定向选育、近亲繁殖等现象, 导致杂合子缺失及基因频率改变, 这是很多位点偏离 Hardy-Weinberg 平衡的主要原因。

3.2 遗传分化与遗传结构

F -统计量中的 F_{st} 是反映群体间遗传分化的重要指标, 依据 Balloux 等^[32] 的标准, 0~0.05、0.05~0.15、0.15~0.25 分别是低、中、高等遗传分化的界定范围。本研究的中间球海胆 3 个群体之间为低等程度的遗传分化, 结合耿慧君等^[20] 的研究结果 (0.110 5), 发现中间球海胆在引进并经过多代选育后, 与日本本土的海胆形成了中等程度遗传分化, 但是引进的中间球海胆之间遗传分化程度较低, 原因可能与中间球海胆引种数量少, 基因流动范围有限有关。 N_m 是指一些个体从一个群体迁移至另一个群体过程中将某些基因带入新群体, 它对新群体的变异产生影响。不同群体之间 N_m 值越大, 遗传相似性越高, 本研究中 3 个群体的 N_m 值均高于 1, 说明群体之间有可能存在较大的基因交流, 基因交流足以抵御遗传漂变, 发生均质化作用, 抑制种群分化, 最终导致了 3 个种群之间遗传相似性较大^[12, 33-34]。平均 F_{is} 值为 0.216、平均 F_{it} 值为 0.264, 说明群体内部的遗传结构变化可能性较低^[15]。AMOVA 结果进一步解释了中间球海胆 3 个群体的遗传变异主要来源于不同的个体, 群体之间的差异较小。

本研究通过主成分分析 (图 2), 发现 FP 群体和 CP 群体之间亲缘关系较近, 遗传分化程度较小, IP 群体较 FP 群体和 CP 群体有了明显遗传分化。个体间的遗传进化树 (图 3) 更清晰地反映出这些个体间的亲缘关系较近, 以及 IP 群体的分化程度, 说明群体选育较家系选育能更快地促进群体遗传分化。个体间的进化树和群体进化树均表明 3 个群体是并列存在的 (图 4), 说明 IP 群体遗传分化仍处于分化初期, 尚未形成独立的中间球海胆群体, 与 FP、CP 群体仍为同一亚群。

本研究利用 15 个微卫星位点结合 SSR-seq 技术, 对 2 个选育群体和 1 个养殖群体进行了遗传多样性和群体结构分析, 发现 3 个群体均具有较高的遗传多样性, 相对于日本本土群体的遗传多样性没有降低。3 个群体的遗传分化程度并不高,

仍为同一亚群。多代家系选育很好地保持了群体的遗传多样性, 多代群体选育更快地促进了群体之间的遗传分化。本研究可为中间球海胆的种质资源评估和开发利用奠定基础, 为中间球海胆的遗传育种提供理论参考。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 常亚青, 丁君, 宋坚, 等. 海参、海胆生物学研究与养殖 [M]. 北京: 海洋出版社, 2004.
Chang Y Q, Ding J, Song J, et al. Biological research and culture of sea cucumber and sea urchin [M]. Beijing: China Ocean Press, 2004 (in Chinese).
- [2] 常亚青, 赵冲, 胡方圆, 等. 福建沿海试养中间球海胆的初步研究 [J]. 南方水产科学, 2020, 16(3): 1-9.
Chang Y Q, Zhao C, Hu F Y, et al. Aquaculture of *Strongylocentrotus intermedius* in Fujian coastal areas [J]. South China Fisheries Science, 2020, 16(3): 1-9 (in Chinese).
- [3] 高红梅, 马海涛, 喻子牛, 等. 基于新开发微卫星标记评价番红砗磲两个野生群体的遗传多样性及近缘种通用性检测 [J]. 水产学报, 2020, 44(2): 187-194.
Gao H M, Ma H T, Yu Z N, et al. Microsatellite markers based on new development for evaluation of the genetic diversity of two wild populations of *Tridacna crocea* and transferability to related species [J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(2): 187-194 (in Chinese).
- [4] 季晓芬, 段辛斌, 刘绍平, 等. 基于微卫星评估草鱼放流亲本对野生群体遗传多样性的影响 [J]. 水产学报, 2018, 42(1): 10-17.
Ji X F, Duan X B, Liu S P, et al. Genetic effect of released brood grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) on wild population in the Yangtze River inferred from microsatellite markers [J]. Journal of Fisheries of China, 2018, 42(1): 10-17 (in Chinese).
- [5] 黄飘逸, 马海涛, 喻子牛, 等. 利用高通量测序开发的熊本牡蛎微卫星标记评价野生和养殖群体的遗传多样性及通用性 [J]. 水产学报, 2020, 44(3): 368-377.
Huang P Y, Ma H T, Yu Z N, et al. Evaluation of genetic diversity and versatility of wild and cultured populations based on high-throughput sequencing of *Crassostrea sikamea* microsatellite markers [J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(3): 368-377 (in Chinese).

- [6] 宋炜, 孟永永, 蒋科技, 等. 棘头梅童鱼七个野生群体遗传多样性的微卫星分析[J]. 水产学报, 2017, 41(1): 31-39.
Song W, Meng Y Y, Jiang K J, *et al.* Analysis of genetic diversity among seven wild *Collichthys lucidus* populations by using microsatellite marker[J]. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(1): 31-39 (in Chinese).
- [7] 丁海燕, 朱明, 彭冲, 等. 我国泥鳅微卫星遗传多样性初步分析[J]. 水产学报, 2015, 39(10): 1433-1442.
Ding H Y, Zhu M, Peng C, *et al.* Preliminary analysis of the microsatellite diversity of Chinese loach (*Misgurnus anguillicaudatus*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(10): 1433-1442 (in Chinese).
- [8] Kong L F, Bai J, Li Q. Comparative assessment of genomic SSR, EST-SSR and EST-SNP markers for evaluation of the genetic diversity of wild and cultured pacific oyster, *Crassostrea gigas* thunberg[J]. *Aquaculture*, 2014, 420-421: S85-S91.
- [9] Liu F L, Yao J T, Wang X L, *et al.* Genetic diversity and structure within and between wild and cultivated *Saccharina japonica* (Laminariales, Phaeophyta) revealed by SSR markers[J]. *Aquaculture*, 2012, 358-359: 139-145.
- [10] Rezaee S, Farahmand H, Nematollahi M A. Genetic diversity status of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) using SSR markers in Iran[J]. *Aquaculture International*, 2016, 24(2): 479-489.
- [11] 侯宁, 张研, 鲁翠云, 等. 微卫星DNA标记分析德国镜鲤的遗传潜力[J]. 遗传, 2007, 29(12): 1509-1518.
Hou N, Zhang Y, Lu C Y, *et al.* Genetic potential analysis of Germany mirror carp (*Cyprinus carpio* L.) using microsatellite markers[J]. *Hereditas*, 2007, 29(12): 1509-1518 (in Chinese).
- [12] 李大宇, 殷倩茜, 侯宁, 等. 黄颡鱼(*Pelteobagrus eupogon*)不同生态地理分布群体遗传多样性的微卫星分析[J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(4): 460-469.
Li D Y, Yin Q Q, Hou N, *et al.* Genetic diversity of different ecologo-geographical populations of yellow catfish *Pelteobagrus eupogon*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2009, 40(4): 460-469 (in Chinese).
- [13] 徐浩, 鲁翠云, 郭薇, 等. 4个虹鳟养殖品系的分子鉴定和遗传多样性分析[J]. 中国水产科学, 2013, 20(4): 713-721.
Xu H, Lu C Y, Guo W, *et al.* Identification and genetic diversity analysis of four rainbow trout strains using microsatellites[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(4): 713-721 (in Chinese).
- [14] 陈锦豪, 郑锦滨, 王攀攀, 等. 凡纳滨对虾养殖亲本群体遗传多样性分析[J]. 渔业研究, 2019, 41(1): 1-10.
Chen J H, Zheng J B, Wang P P, *et al.* Analysis for genetic diversity of broodstock populations of breeding *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of Fisheries Research*, 2019, 41(1): 1-10 (in Chinese).
- [15] 苏钰玲, 李敏, 杨永春, 等. 南方拟鲈微卫星标记筛选及遗传多样性分析[J]. 水产科学, 2020, 39(2): 224-233.
Su Y L, Li M, Yang Y C, *et al.* Microsatellite screening and genetic diversity analysis of gudgeon *Pseudohemiculter dispar* in Pearl River Basin[J]. *Fisheries Science*, 2020, 39(2): 224-233 (in Chinese).
- [16] 徐湛宁, 李福贵, 郑国栋, 等. 团头鲂耐低氧新品系雌核发育群体遗传结构的微卫星分析[J]. 水产学报, 2017, 41(3): 330-338.
Xu Z N, Li F G, Zheng G D, *et al.* Analysis of genetic structure of gynogenetic population in new strain of hypoxia-tolerant *Megalobrama amblycephala* using microsatellite markers[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(3): 330-338 (in Chinese).
- [17] 邢德, 李琪, 张景晓. 利用微卫星荧光多重PCR技术分析壳白长牡蛎3代人工选育群体的遗传多样性[J]. 水产学报, 2017, 41(12): 1838-1846.
Xing D, Li Q, Zhang J X. Analysis of genetic diversity in mass selection lines of white-shell Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) using microsatellite fluorescent multiplex PCR technique[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(12): 1838-1846 (in Chinese).
- [18] 吴新燕, 梁宏伟, 罗相忠, 等. 长丰鲢生长性状相关微卫星标记的初步筛选[J]. 水产学报, 2022, 46(1): 20-30.
Wu X Y, Liang H W, Luo X Z, *et al.* Preliminary screening of microsatellite DNA markers associated with growth traits in Changfeng silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2022, 46(1): 20-30 (in Chinese).
- [19] 丁君, 李润玲, 常亚青, 等. 虾夷马粪海胆微卫星标记制备及对3个养殖群体的遗传多样性分析[J]. 分子科学学报, 2008, 24(3): 173-179.
Ding J, Li R L, Chang Y Q, *et al.* Isolation of microsatellite markers and Genetic diversity analysis in 3 cultured populations of sea urchin (*Strongylocentrotus interme-*

- dius*[J]. *Journal of Molecular Science*, 2008, 24(3): 173-179 (in Chinese).
- [20] 耿慧君, 周遵春, 董颖, 等. 中间球海胆野生和养殖群体遗传结构的微卫星分析[J]. *水产学报*, 2009, 33(4): 549-556.
- Geng H J, Zhou Z C, Dong Y, *et al.* Genetic structure analysis of wild and cultured populations of the Japanese sea urchin (*Strongylocentrotus intermedius*) using microsatellites[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2009, 33(4): 549-556 (in Chinese).
- [21] 孙博林, 张慧敏, 王霞, 等. 中间球海胆放流群体和养殖群体的遗传学比较[J]. *中国农学通报*, 2011, 27(17): 67-71.
- Sun B L, Zhang H M, Wang X, *et al.* Genetic analysis of released and artificial cultured *Strongylocentrotus intermedius*[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2011, 27(17): 67-71 (in Chinese).
- [22] 杨芸菲, 常亚青, 丁君. 虾夷马粪海胆群体的遗传多样性及微卫星标记与生长性状的相关性分析[J]. *中国农业科技导报*, 2011, 13(4): 120-127.
- Yang Y F, Chang Y Q, Ding J. Genetic diversity of urchin population and correlation analysis of microsatellite DNA markers with growth traits[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2011, 13(4): 120-127 (in Chinese).
- [23] Šarhanová P, Pfanzelt S, Brandt R, *et al.* SSR-seq: genotyping of microsatellites using next-generation sequencing reveals higher level of polymorphism as compared to traditional fragment size scoring[J]. *Ecology and Evolution*, 2018, 8(22): 10817-10833.
- [24] Miller K M, Kaukinen K H, Laberee K, *et al.* Microsatellite loci from red sea urchins (*Strongylocentrotus franciscanus*)[J]. *Molecular Ecology Notes*, 2004, 4(4): 722-724.
- [25] Cameron R A, Leahy P S, Britten R J, *et al.* Microsatellite loci in Wild-Type and inbred *Strongylocentrotus purpuratus*[J]. *Developmental Biology*, 1999, 208(2): 255-264.
- [26] Zhang W J, Lv Z M, Li C H, *et al.* Transcriptome profiling reveals key roles of phagosome and NOD-like receptor pathway in spotting diseased *Strongylocentrotus intermedius*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 84: 521-531.
- [27] Zhang W J, Wang Z, Leng X F, *et al.* Transcriptome sequencing reveals phagocytosis as the main immune response in the pathogen-challenged sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 94: 780-791.
- [28] Barker J S F. Sequential gel electrophoretic analysis of esterase-2 in two populations of *Drosophila buzzatii*[J]. *Genetica*, 1994, 92(3): 165-175.
- [29] Botstein D, White R L, Skolnick M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32(3): 314-331.
- [30] Takezaki N, Nei M. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA[J]. *Genetics*, 1996, 144(1): 389-399.
- [31] Manchenko G P, Yakovlev S N. Genetic divergence between three sea urchin species of the genus *Strongylocentrotus* from the Sea of Japan[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2001, 29(1): 31-44.
- [32] Balloux F, Lugon-Moulin N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers[J]. *Molecular Ecology*, 2002, 11(2): 155-165.
- [33] Slatkin M, Barton N H. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow[J]. *Evolution*, 1989, 43(7): 1349-1368.
- [34] Plotsky Y, Cahaner A, Haberfeld A, *et al.* DNA fingerprint bands applied to linkage analysis with quantitative trait loci in chickens[J]. *Animal Genetics*, 1993, 24(2): 105-110.

Evaluation of the genetic diversity and genetic structure of multiple generation selection populations and unselected common population of sea urchin (*Strongylocentrotus intermedius*) using SSR-seq

LIU Lei¹, ZHANG Weijie¹, LIU Yansong¹, LENG Xiaofei², OU Fanjiang¹,
ZANG Xiaoning¹, LI Xuguang², DING Jun^{1*}, CHANG Yaqing^{1*}

(1. Key Laboratory of Mariculture & Stock Enhancement in North China's Sea,
Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

2. Dalian Haibao Fisheries Co., Ltd., Dalian 116041, China)

Abstract: The sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* was originally found off the coast from Hokkaido, Japan and Far East Russia and was introduced from Japan to China in 1989. Now, is one of the most commercially important cultured sea urchin species in China. Family selection and individual selection have been used to genetically improve its economic traits. In order to clarify the genetic diversity and genetic structure of different breeding populations of *S. intermedius*, the genetic diversity and genetic structure of a family selection population (FP), an individual selection population, and a unselected common population (CP) were analyzed using SSR-seq technology and 15 microsatellite loci. The results showed that a total of 112 alleles were detected at 15 microsatellite loci, and the average number of alleles (N_a) observed in FP, IP and CP were 5.077, 5.133 and 6.133, respectively, with mean effective alleles (N_e) of 2.816, 2.873 and 3.638, respectively. The mean observed heterozygosities (H_o) in FP, IP and CP were 0.522, 0.441 and 0.501, respectively, and the mean expected heterozygosities (H_e) were 0.595, 0.599 and 0.667, respectively. The mean polymorphic information contents (PIC) in FP, IP and CP were 0.546, 0.543 and 0.623, respectively. The difference between H_e and H_o in FP (0.073) was lower than that in IP (0.158) or CP (0.166). The mean fixation index (F) in FP (0.115) was also lower than that in IP (0.248) or CP (0.246). The coefficients of genetic differentiation (F_{st}) among the three populations ranged between 0.018 and 0.176, indicating a low-to-medium degree of genetic differentiation. The analysis of molecular variance (AMOVA) results showed that the genetic variation of the three populations mainly come from individuals. Both principal component analysis (PCoA) and clustering phylogenetic tree showed that the three populations were closely related, and the IP population had the highest degree of genetic differentiation. In summary, our results suggest that the three sea urchin populations have high genetic diversity, and multiple generations of family selection and individual selection did not reduce genetic diversity dramatically. Family selection is more beneficial in maintaining population heterozygosity and controlling inbreeding levels. This research can lay a foundation for the evaluation and development of germplasm resources of the sea urchin *S. intermedius*.

Key words: *Strongylocentrotus intermedius*; breeding population; genetic diversity; genetic structure; microsatellite

Corresponding authors: DING Jun. E-mail: dingjun1119@dlou.edu.cn;

CHANG Yaqing. E-mail: yqchang@dlou.edu.cn

Funding projects: National Key R & D Program (2018YFD0901601); Chinese Outstanding Talents in Agricultural Research; Dalian High Level Talent Innovation Support Program (2019RQ122); General Program of Liaoning Provincial Department of Education (LJKZ0702)