

## 仿刺参遗传多样性的 RAPD 分析

谭杰<sup>1,2</sup>, 孙慧玲<sup>1</sup>, 刘萍<sup>1</sup>, 杨爱国<sup>1</sup>, 燕敬平<sup>1</sup>, 刘志鸿<sup>1</sup>, 周丽青<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 2. 上海水产大学 生命科学与技术学院, 上海 200090)

**摘要:**采用 RAPD 技术对威海(WH)、烟台(YT)和大连(DL)沿海自然群体和蓬莱养殖群体(PL)仿刺参(*Apostichopus japonicus*)的遗传多样性进行了分析。实验使用了 20 条随机引物,对来自于 4 个群体的 80 个个体进行了遗传多样性分析。结果表明,YT、PL、DL、WH 4 群体多态位点比例分别为 65.71%、62.96%、65.51%、57.57%,遗传多态度分别为 0.195 4、0.184 1、0.189 7、0.173 8。养殖群体与野生群体相比,遗传参数上都有不同程度的降低。4 个群体之间的遗传分化指数  $G_{st}$  在 0.025 7~0.055 4 之间,其中蓬莱养殖群体与其他 3 个自然群体之间发生了中等程度或接近中等程度的分化,而 3 个自然群体之间遗传分化较低。经过 UPGMA 聚类分析,威海群体与大连群体之间亲缘关系最近,蓬莱养殖群体与 3 个自然群体之间亲缘关系均较远。[中国水产科学,2007,14(7):12-16]

**关键词:**仿刺参;RAPD;遗传多样性

中图分类号:Q346

文献标识码:A

文章编号:1005-8737-(2007)07-012-05

仿刺参具有很高的营养与药用价值。近年来,随着仿刺参需求量的增加,对野生种群的采捕强度增加,养殖规模也迅速扩大。但现阶段中国仿刺参养殖生产普遍缺乏科学的指导,用于人工育苗的亲本数量较小,增加了近交机会。长期近亲繁殖育苗、累代养殖可能引起养殖群体的遗传多样性的下降,而许多研究表明,遗传多样性降低会导致物种的适应能力下降、有害隐性基因增加、性状衰退甚至种质的退化。养殖群体遗传多样性的下降也将限制养殖群体用于人工选择育种的潜力。此外,养殖的仿刺参逃逸到天然海区,也可能对仿刺参自然群体的种质资源造成一定程度的破坏。所以有必要对仿刺参的遗传多样性进行监测,以防止仿刺参遗传多样性的丢失。近几年来,国内外一些学者应用同工酶、微卫星 DNA、线粒体 DNA 技术分析了刺参的遗传多样性。如 Kanno 等<sup>[1-2]</sup>应用 10 种同工酶标记分析了 3 种不同颜色仿刺参之间的遗传差异。Kanno 等<sup>[3]</sup>开发了 20 个仿刺参微卫星标记,并利用这些标记对日本近海的仿刺参进行了遗传多样性分析。高悦勉等<sup>[4]</sup>运用同工酶技术对中国北方沿海天然及养殖仿刺参进行了群体生化遗传学分析,李颖等<sup>[5]</sup>

运用线粒体 DNA 技术对中国烟台、威海和莱州 3 个地区的仿刺参自然和养殖群体遗传多样性进行了研究。

RAPD 标记技术具有灵敏、方便、多态性高等优点,在种群遗传学研究中被广泛应用。本研究运用 RAPD 技术研究了仿刺参 4 个群体的遗传结构,并对其遗传多样性水平进行评价,以便为最大限度地维持仿刺参种内的遗传多样性水平,维持物种和种群的自然繁殖能力、进化潜能和确保种质资源的可持续利用提供技术支撑。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

仿刺参的取样地点及详细资料见表 1,其中蓬莱群体为养殖群体,其余均为自然群体,每个群体各取 20 个个体。实验所用随机引物购自上海生工公司,从 40 条随机引物中筛选出扩增结果稳定、条带清晰的 20 条引物用于遗传多样性分析(表 2)。PCR 仪为 eppendorf5331 型,其他生化试剂购自 promega 公司。

收稿日期:2007-04-10; 修订日期:2007-05-23.

基金项目:山东省科技攻关项目(022110114 和 2005GG3205070);农业结构调整重大技术研究专项(06-05-04B);中国水产科学研究院黄海水产研究所条件业务费(2060302/2).

作者简介:谭杰(1980-),男,硕士研究生,主要从事水产动物遗传育种研究.E-mail: tanhouzi@163.com

通讯作者:孙慧玲.Tel:0532-85848631;E-mail: sunhl@ysfri.ac.cn

表 1 用于遗传分析的仿刺参不同群体样品相关料

Tab.1 Sample information of *Apostichopus japonicus* used in the experiment

| 群体<br>Group        | 采样地点<br>Sampling site                            | 采样时间<br>Sampling time | 样本数量<br>Sample size |
|--------------------|--------------------------------------------------|-----------------------|---------------------|
| 烟台群体 YT population | 崆峒岛 Kongtong island 37°33'N, 121°30'E            | 2004-6                | 20                  |
| 威海群体 WH population | 威海外海 Off-sea waters of Weihai 37°32' N, 122°02'E | 2006-6                | 20                  |
| 大连群体 DL population | 大连外海 Off-sea waters of Dalian 39°03' N, 122°46'E | 2006-5                | 20                  |
| 蓬莱群体 PL population | 蓬莱养殖场 Culture farm of Penglai                    | 2006-5                | 20                  |

表 2 随机引物及其序列

Tab.2 Primers used and their sequences

| 引物 Primer | 碱基序列 (5'-3')<br>Sequence (5'-3') | 引物 Primer | 碱基序列 (5'-3')<br>Sequence (5'-3') |
|-----------|----------------------------------|-----------|----------------------------------|
| S101      | GGTCGGAGAA                       | S122      | GAGGATCCCT                       |
| S102      | TCGGACGTGA                       | S126      | GGGAATTCGG                       |
| S103      | AGACGTCCAC                       | S129      | CCAAGCTTCC                       |
| S106      | ACGCATCGCA                       | S130      | GGAAGCTTGG                       |
| S108      | GAAACACCCC                       | S132      | ACGGTACCAG                       |
| S109      | TGTAGCTGGG                       | S133      | GGCTGCAGAA                       |
| S113      | GACGCCACAC                       | S134      | TGCTGCAGGT                       |
| S114      | ACCAGGTTGG                       | S135      | CCAGTACTCC                       |
| S118      | GAATCGGCCA                       | S136      | GGAGTACTGG                       |
| S119      | CTGACCAGCC                       | S139      | CCTCTAGACC                       |

1.2 实验方法

基因组 DNA 的提取参照战爱斌等<sup>[6]</sup>的方法, 取仿刺参肌肉组织提取 DNA, 提取 DNA 用 TE 溶解, 于-20 ℃ 保存。

RAPD 反应: 反应总体积 25 μL, 其中含 1 × PCR Buffer, 2.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1.2 μmol/L dNTP, 0.5 μmol/L 引物, 1.0 U Taq 酶, 20 ng DNA 模板。基础反应循环参数为: 94 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 0.5 min, 36 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 进行 45 个循环, 最后 72 ℃ 延伸 10 min。扩增反应产物于 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳, EB 染色, UVP 凝胶成像系统下观察记录。

1.3 数据统计分析

记录下电泳后清晰的扩增条带, 每一个体的扩增条带按有或无记录。出现扩增带记录为 1, 无扩增带记录为 0, 将这些片段作为基因位点进行分析。应用 Popgene Version1.31 和 TFPGA 软件对群体的遗传学参数按下式进行计算:

多态位点比例  $P$  = 多态扩增片段数 / 扩增片段总数

Shannon 多样性信息指数  $H_o = - \sum p_i \ln P_i$ ,

$P_i$  为位点  $i$  在某一群体中的出现频率

种群内遗传多态度  $H_{pop} = (\sum H_o) / N$ ,  $N$  为研究的群体数。

总群体遗传多态度  $H_{sp} = - \sum p \ln p$ ,  $p$  为  $i$  位点在  $N$  个群体内的总表型频率。

$H_{pop} / H_{sp}$  为种群内遗传变异比例,  $(H_{sp} - H_{pop}) / H_{sp}$  为种群间遗传变异比例;

遗传分化指数  $G_{st} = (\sum J_i / s - J_i) / (1 - J_i)$ ,  $s$  为种群的数目,  $J_i$  是第  $i$  个种群内的基因一致性;

遗传相似性指数  $F = 2N_{XY} / (N_X + N_Y)$ , 遗传距离  $D = 1 - F$ , 其中  $N_{XY}$  代表  $X, Y$  两个个体共有的扩增带,  $N_X, N_Y$  表示  $X$  与  $Y$  个体各自所有的扩增带。根据遗传距离值, 采用 UPGMA 方法对群体进行聚类分析。

2 结果与分析

从 40 个随机引物中筛选出 20 个引物, 这些引物在每个种群的 20 个随机个体中均扩增出清晰可分辨的 RAPD 图谱 (图 1), 共扩增出 103 个位点, 扩增产物的分子量在 300~3 000 bp 之间。

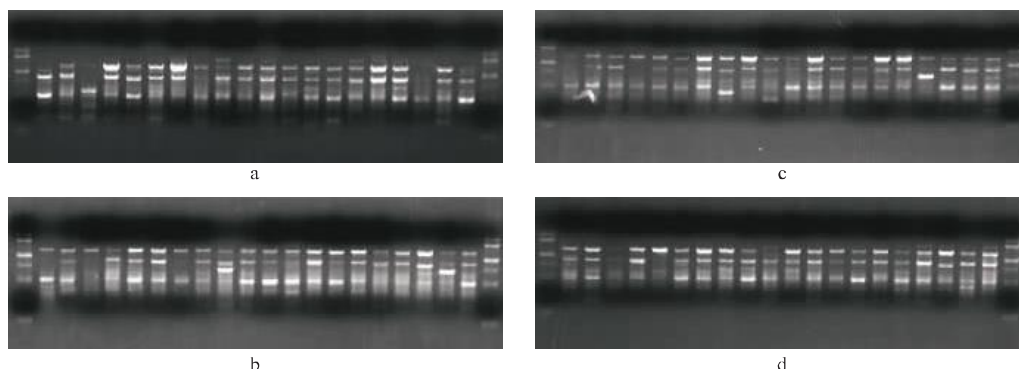


图 1 引物 S109 对刺参 4 群体的扩增电泳图谱

a: 烟台群体; b: 蓬莱群体; c: 威海群体; d: 大连群体.

Fig.1 Electrophorogram of amplification of *Apostichopus japonicus* from four populations using primer S109

a: YT population; b: PL population; c: WH population; d: DL population.

Shannon's 多样性指数统计结果 (表 3) 显示, YT、PL、WH、DL 4 群体的群体遗传多态度分别为 0.195 4、0.173 8、0.184 1、0.189 7。仿刺参种内遗传

多态度  $H_{sp}$  为 0.212 2, 种群内遗传多态度  $H_{pop}$  为 0.185 8。仿刺参发生的遗传变异有 87.02% 存在于群体内, 12.98% 存在于群体间。

表 3 仿刺参 4 个群体内和群体间 Shannon's 多样性指数的分布

Tab.3 Distribution of Shannon's indices within and among four *A. japonicus* populations

| 引物<br>Primer | 各群体遗传多态度 Genetic diversity |         |         |         | $H_{pop}$ | $H_{sp}$ | $H_{pop}/H_{sp}$ | $(H_{sp} - H_{pop})/H_{sp}$ |
|--------------|----------------------------|---------|---------|---------|-----------|----------|------------------|-----------------------------|
|              | 烟台 YT                      | 蓬莱 PL   | 威海 WH   | 大连 DL   |           |          |                  |                             |
| S101         | 0.227 4                    | 0.237 5 | 0.224 2 | 0.258 4 | 0.236 8   | 0.267 9  | 0.884 2          | 0.115 8                     |
| S102         | 0.248 8                    | 0.226 2 | 0.253 2 | 0.237 9 | 0.241 5   | 0.251 3  | 0.961 1          | 0.038 9                     |
| S103         | 0.119 1                    | 0.117 2 | 0.171 8 | 0.154 4 | 0.140 6   | 0.150 6  | 0.933 7          | 0.066 2                     |
| S106         | 0.233 4                    | 0.198 7 | 0.235 8 | 0.189 6 | 0.214 3   | 0.252 4  | 0.849 3          | 0.150 6                     |
| S108         | 0.191 2                    | 0.180 0 | 0.204 7 | 0.230 5 | 0.201 6   | 0.220 3  | 0.915 1          | 0.084 9                     |
| S109         | 0.150 7                    | 0.112 6 | 0.091 7 | 0.112 1 | 0.116 7   | 0.170 0  | 0.686 9          | 0.313 1                     |
| S113         | 0.169 8                    | 0.084 0 | 0.071 9 | 0.096 2 | 0.105 5   | 0.121 0  | 0.871 7          | 0.128 3                     |
| S114         | 0.238 1                    | 0.231 8 | 0.238 7 | 0.248 1 | 0.239 2   | 0.259 6  | 0.921 3          | 0.078 7                     |
| S118         | 0.173 2                    | 0.177 4 | 0.189 1 | 0.194 8 | 0.183 6   | 0.209 2  | 0.877 7          | 0.122 3                     |
| S119         | 0.230 4                    | 0.218 1 | 0.228 0 | 0.234 1 | 0.227 6   | 0.259 6  | 0.876 9          | 0.123 1                     |
| S122         | 0.209 3                    | 0.208 7 | 0.212 4 | 0.245 4 | 0.219 0   | 0.244 1  | 0.897 0          | 0.103 0                     |
| S126         | 0.189 1                    | 0.175 1 | 0.157 9 | 0.173 7 | 0.173 9   | 0.218 9  | 0.794 6          | 0.205 4                     |
| S129         | 0.198 6                    | 0.160 7 | 0.147 0 | 0.167 8 | 0.168 5   | 0.194 4  | 0.866 9          | 0.133 1                     |
| S130         | 0.183 9                    | 0.171 7 | 0.202 5 | 0.204 5 | 0.190 6   | 0.201 0  | 0.948 5          | 0.051 5                     |
| S132         | 0.241 1                    | 0.212 4 | 0.244 5 | 0.213 8 | 0.228 0   | 0.251 8  | 0.905 3          | 0.094 7                     |
| S133         | 0.219 5                    | 0.203 1 | 0.228 9 | 0.234 2 | 0.221 4   | 0.235 8  | 0.939 0          | 0.061 0                     |
| S134         | 0.199 8                    | 0.169 4 | 0.172 5 | 0.164 5 | 0.176 6   | 0.210 7  | 0.837 9          | 0.162 1                     |
| S135         | 0.160 2                    | 0.098 3 | 0.080 8 | 0.084 2 | 0.105 9   | 0.145 5  | 0.727 6          | 0.272 4                     |
| S136         | 0.170 9                    | 0.146 3 | 0.148 2 | 0.160 8 | 0.156 6   | 0.195 2  | 0.802 0          | 0.198 0                     |
| S139         | 0.155 1                    | 0.148 6 | 0.178 2 | 0.190 8 | 0.168 2   | 0.185 5  | 0.906 6          | 0.093 4                     |
| Mean         | 0.195 4                    | 0.173 8 | 0.184 1 | 0.189 7 | 0.185 8   | 0.212 2  | 0.870 2          | 0.129 8                     |

分别统计 4 个地理种群扩增结果, 烟台、蓬莱、威海、大连 4 群体多态位点比例分别为 65.71%、57.57%、62.96%、65.51%, 蓬莱养殖群体的多态位

点比例低于 3 个野生种群。由表 4 可见, 仿刺参 4 个群体之间的遗传分化指数  $G_{st}$  在 0.025 7~0.055 4 之间, 其中蓬莱群体与威海、大连、烟台群体之间遗传

分化指数分别为 0.055 4、0.052 5、0.048 2, 说明蓬莱养殖群体与威海、大连和烟台 3 个自然群体之间已经发生了中等程度或接近中等程度的分化。而烟台、威海、大连 3 个自然群体之间遗传分化指数在 0.025 7~0.034 5 之间, 说明 3 个自然群体之间遗传分化很低。利用 TFPGA 软件, 得到各种群间的遗传距离和遗传相似指数 (表 5); 最后, 根据遗传距离统计结果, 得到基于 UGPMA 算法的 4 个种群的系统发生树 (图 2)。

表 4 仿刺参 4 个群体之间的遗传分化指数  $G_{st}$  值  
Tab.4  $G_{st}$  values of pairwise comparison among different *Apostichopus japonicus* populations

|    | 烟台 YT   | 蓬莱 PL   | 威海 WH   | 大连 DL   |
|----|---------|---------|---------|---------|
| YT | 0.000 0 |         |         |         |
| PL | 0.048 2 | 0.000 0 |         |         |
| WH | 0.034 5 | 0.055 4 | 0.000 0 |         |
| DL | 0.032 6 | 0.052 5 | 0.025 7 | 0.000 0 |

表 5 仿刺参 4 个群体的遗传距离和遗传相似性指数  
Tab.5 Genetic identity and genetic distance among four *Apostichopus japonicus* populations

| Populations | 烟台 YT   | 蓬莱 PL   | 威海 WH   | 大连 DL   |
|-------------|---------|---------|---------|---------|
| YT          |         | 0.887 9 | 0.961 1 | 0.915 3 |
| PL          | 0.118 9 |         | 0.925 9 | 0.895 8 |
| WH          | 0.039 7 | 0.077 0 |         | 0.973 5 |
| DL          | 0.088 5 | 0.110 0 | 0.0269  |         |

注: 对角线上方数据表示遗传相似性指数, 对角线下方数据表示遗传距离。

Note: Data above diagonal are genetic identity. Data below diagonal are genetic distance.

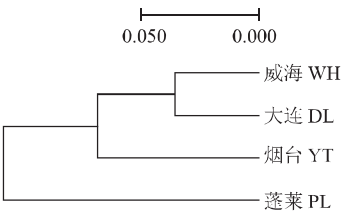


图 2 仿刺参 4 个群体的系统发生树  
Fig.2 UPGMA dendrogram among four *Apostichopus japonicus* populations

3 讨论

3.1 各群体遗传多样性

多态位点比例是种群遗传多样性的一个重要指

标。本研究得到仿刺参多态位点比例为 57.57%~65.71%, 高于其他海洋无脊椎动物如贝类<sup>[7]</sup>、中国明对虾<sup>[8]</sup>等, 说明仿刺参具有较高的遗传多样性。但本研究也发现, 与烟台、威海、大连的自然群体相比, 蓬莱养殖群体的仿刺参的多态座位比例较低。这是由于在仿刺参人工育苗生产过程中, 较少的亲本数量引起了群体遗传的瓶颈效应、遗传漂变和近亲杂交等, 使养殖群体基因库不可避免地丧失某些特定的等位基因, 因此造成养殖群体的遗传变异度及遗传多样性水平均低于野生群体的状况。本研究中, 烟台群体的样本采于 2004 年, 而其他 3 个群体的样本采于 2006 年。研究发现, 威海群体与大连群体的多态位点比例和平均杂合度也低于烟台群体, 可能与采样时间有关。在以前对仿刺参遗传多样性研究中, 李颖等采用聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳技术, 对仿刺参的 2 个野生群体 (威海和烟台群体) 和 1 个养殖群体 (莱州群体) 各 48 个个体的遗传变异进行了同工酶的比较分析, 发现威海和烟台群体虽然都是野生群体, 但是威海群体的各项数据已经接近甚至低于养殖群体, 而烟台野生群体却高于其他两个群体<sup>[5]</sup>。天然海域增殖是中国仿刺参传统的养殖方式, 底播养殖技术已有 20 多年的应用历史<sup>[9]</sup>。底播养殖的仿刺参极易逃逸到天然海区, 从而影响到野生种群的遗传结构和遗传多样性。由此推测, 仿刺参威海与大连自然群体遗传多样性出现衰退趋势, 与养殖群体向自然群体的逃逸有关。烟台自然群体由于没有历史数据, 尚不能确认是否已出现衰退。由此可见, 仿刺参自然资源的保护已刻不容缓。

3.2 群体间遗传变异

某些海洋无脊椎动物在其幼虫阶段营较长时间的浮游生活, 这为其不同地理群体之间基因流的形成提供了有利条件<sup>[10-11]</sup>。许多棘皮动物不同地理种群之间尽管相距很远, 有时甚至超过 1 000 km, 但它们之间的遗传分化程度却很低<sup>[12-13]</sup>。本研究中, 3 个自然群体之间遗传分化指数  $G_{st}$  为 0.025 7~0.034 5, 说明 3 个群体之间遗传分化程度很低, 它们之间可能存在着基因流。仿刺参幼体自囊胚后期即开始脱膜上浮, 整个耳状幼体期间都营浮游生活, 至樽形幼体末期开始附着, 浮游生活持续 10 d 左右。在此期间, 仿刺参幼体可漂流到其他地理群体, 在地理群体之间形成基因交流。而蓬莱养殖的仿刺参则是来自人工育苗, 与 3 个自然群体之间缺乏基因交流, 从而与 3 个地理群体之间产生了中等程度或接近中等

程度的遗传分化。

根据 Nei's 遗传距离构建的 UPGMA 树, 威海群体与大连群体首先聚在一起, 然后与烟台群体相聚, 蓬莱群体单独形成一支。这与 4 个群体的地理分布不一致, 笔者认为, 可能是由于以下两个原因: 第一, 在仿刺参自然繁殖季节, 黄、渤海域季风主要是南风, 从而导致威海群体、烟台群体与大连群体之间最易形成基因流, 而威海群体与烟台群体之间基因流较弱; 第二, 威海群体与大连群体的采样时间晚于烟台群体两年, 仿刺参养殖群体对自然群体形成了遗传渗透, 并且各地之间苗种交流活动频繁, 使得威海群体与大连群体之间亲缘关系较近。

参考文献:

- [1] Kanno M, Kijima A. High genetic variability of isozymes in Japanese sea cucumber *Stichopus japonicus* [J]. Fish Genet Breed Sci, 2002, 31: 7–12.
- [2] Kanno M, Kijima A. Genetic differentiation among three color variants of Japanese sea cucumber *Stichopus japonicus* [J]. Fish Sci, 2003, 69: 806–812.
- [3] Kanno M, Li Q, Kijima A. Isolation and characterization of twen-

ty microsatellite loci in Japanese sea cucumber (*Stichopus japonicus*) [J]. Mar Biotechnol, 2005, 7 (3): 179–183.

- [4] 高悦勉, 孙静波. 刺参种群同工酶的生化遗传分析 [J]. 大连水产学院学报, 2004, 19 (1): 30–34.
- [5] 李颖, 刘萍, 孙慧玲, 等. 仿刺参 (*Apostichopus japonicus*) mtDNA 三个基因片段的序列分析 [J]. 海洋与湖沼, 2006, 37 (2): 143–153.
- [6] 战爱斌, 包振民, 陆维, 等. 仿刺参的微卫星标记 [J]. 水产学报, 2006, 30 (2): 192–196.
- [7] 相建海. 海洋生物细胞和种群水平遗传研究 [M]. 济南: 山东科技出版社, 1999, 112–123.
- [8] 石拓, 庄志猛, 孔杰, 等. 中国对虾遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 自然科学进展, 2001, 11 (4): 360–364.
- [9] 杜佳垠. 刺参增殖现状与发展 [J]. 北京水产, 2005, 3: 4–5.
- [10] Avise J C. Molecular markers, natural history and evolution [M]. New York: Chapman and Hall, 1994.
- [11] Palumbi S R. Molecular biography of the Pacific [J]. Coral Reefs, 1997, 16 (Suppl.): 47–52.
- [12] Benzie J A H. Genetic structure of coral reef organisms: ghosts of dispersal past [J]. Am Zool, 1999, 39: 131–145.
- [13] Williams S T, Benzie J A H. Evidence of a biogeographic break between populations of a high dispersal starfish: congruent regions within the Indo-West Pacific defined by colour morphs, mtDNA, and allozyme data [J]. Evolution, 1998, 52: 87–99.

## Genetic diversity of *Apostichopus japonicus* as revealed by RAPD

TAN Jie<sup>1,2</sup>, SUN Hui-ling<sup>1</sup>, LIU Ping<sup>1</sup>, YANG Ai-guo<sup>1</sup>, YAN Jing-ping<sup>1</sup>, LIU Zhi-hong<sup>1</sup>, ZHOU Li-qing<sup>1</sup>

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

**Abstract:** Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) was applied to investigate the genetic diversity among four populations of *Apostichopus japonicus*, which were collected from Yantai (YT), Penglai (PL), Weihai (WH) and Dalian (DL). Twenty random primers were employed to scan the genomic DNA in 80 individuals of these four populations. The results showed that the percentages of polymorphic loci of YT, PL, WH and DL populations were 65.71%, 57.57%, 62.96%, 65.51%, respectively. And the Shannon's information indice ( $H_o$ ) of four populations were 0.195 4, 0.173 8, 0.184 1 and 0.189 7, respectively. Compared with natural populations, cultured population showed lower genetic diversity parameters. Genetic difference value ( $G_{st}$ ) among four populations ranged from 0.025 7 to 0.055 4. The differentiation between PL population and three natural populations was moderate or near to moderate, and the differentiation among three natural populations was low. UPGMA cluster analysis demonstrated that WH population was the most close to DL population and PL population was far from three natural populations. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (7): 12–16]

**Key words:** *Apostichopus japonicus*; RAPD; genetic diversity