

中间球海胆生长分化相关的 AFLP 标记

初冠因, 秦艳杰, 李霞, 罗耀明

(大连水产学院, 农业部海水增养殖与生物技术重点开放实验室, 辽宁 大连 116023)

摘要: 从同一遗传背景、同环境下培养的1龄中间球海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)中, 分别选择大个体50只、小个体30只, 分别组成大小2组海胆, 两组之间壳径、壳高2个指标均存在显著差异。共选用6对 AFLP引物组合对2组海胆进行PCR扩增, 发现43个标记在大小2组海胆间存在显著的频率差异($P < 0.05$), 其中29个位点差异极显著($P < 0.01$)。所有存在显著频率差异的位点中, 2个位点在大海胆组中缺失, 4个位点在小海胆组中缺失, 14个位点在大海胆组中出现的频率显著高于小海胆组($P < 0.05$), 而23个位点在小海胆组中出现的频率高于大海胆组($P < 0.05$)。这一系列谱带可能与中间球海胆生长性状之间存在一定的相关关系。遗传多样性分析结果表明, 大海胆组的平均Shannon氏指数、Nei氏杂合度2个指标均显著高于小海胆组($P < 0.05$), 提示杂种优势可能与中间球海胆的快速生长存在一定联系。[中国水产科学, 2010, 17(3): 448–455]

关键词: 中间球海胆; 生长分化; AFLP

中图分类号: Q959.215

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)03-0448-08

海胆属棘皮动物门、游在亚门、海胆纲, 是一类比较常见的海洋无脊椎动物。其中, 中间球海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)经济价值较高, 是中国北方主要的养殖海胆种类。近年来, 在中国辽宁、山东等地形成了较大的养殖规模。对中间球海胆的研究主要集中于人工杂交^[1-4]、组织结构^[5]及生理生态学^[6]等方面。分子生物学研究则刚刚起步, 主要涉及遗传多样性研究^[7-9]、数量性状的分子标记研究^[10]等方面。

作为经济海胆种类, 中间球海胆的育种工作正在逐步开展。中间球海胆在育苗生产中, 经常会出现大小分化明显, 生长参差不齐的现象, 给生产企业造成困扰。利用现代育种学方法, 培育生长速度快, 大小均一的海胆, 是现代育种学的需要。目前普遍认为生长性状是一个典型的数量性状, 决定这一性状的位点比较多, 而且可能分布在基因组的不同位

置。因此对这一性状的研究需要大量的分子标记, 方能更全面地找出与生长相关的位点及其连锁标记。AFLP标记具有带型稳定、重复性好、内切酶和引物组合多样性丰富的特点, 使其多态性比其他分子标记更为丰富, 本研究针对中间球海胆常常出现的生长分化现象, 利用AFLP标记, 筛选可能与中间球海胆生长性状相关的分子标记, 并对中间球海胆生长分化的遗传背景加以分析研究, 以便为研究中

中间球海胆的生长机制提供参考资料, 也为海胆生长性状的QTL定位和标记辅助选择奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

于2007年12月, 在大连碧龙海珍品有限公司约1 000只来源于同批次苗种、同一养殖环境下的1龄中间球海胆中, 分别挑选大个体及小个体海胆, 其中

收稿日期: 2009-08-10; 修订日期: 2009-12-02.

基金项目: 国家自然科学基金项目(30800849); 大连市科学技术基金项目(2007J23JH024).

作者简介: 初冠因(1983-), 女, 硕士研究生. E-mail: xiaonan8177@163.com

通讯作者: 秦艳杰(1977-), 女, 副教授, 博士, 从事海洋生物学研究. E-mail: qinyanjie@dlfu.edu.cn

挑选大个体海胆 50 只(约占总群体数的 5.0%), 组成大海胆组。挑选小个体海胆 30 只(约占总群体数的 3.0%), 组成小海胆组。游标卡尺测量所有海胆壳径、壳高 2 项指标, 并对所有海胆进行解剖和酒精固定。

1.2 AFLP 分析

1.2.1 基因组 DNA 的提取和检测 常规酚-氯仿抽提法提取海胆基因组 DNA, 紫外分光光度计测定其浓度和纯度, 并用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 之后将 DNA 稀释至 50 ng/ μ L, -20°C 保存备用。

1.2.2 基因组 DNA 的酶切和接头连接 用限制性内切酶 *Eco*RI 和 *Mse*I 双酶切海胆基因组 DNA, 酶切反应体系如下: DNA 模板 (50 ng/ μ L) 5.0 μ L, 100 $\times$ BSA (10 mg/mL) 0.2 μ L, *Mse*I 接头 (MA) 1.0 μ L, *Eco*RI 接头 (EA) 1.0 μ L, 10 $\times$ T4 DNA 连接酶缓冲液 (T4 buffer) 1.5 μ L, *Eco*RI 内切酶 (12 U/ μ L) 0.25 μ L, *Mse*I 内切酶 (10 U/ μ L) 0.6 μ L, T4 DNA 连接酶 (5 U/ μ L) 0.8 μ L, 超纯水补足至 25 μ L。PCR 仪中 37°C 温育 8 h, -20°C 保存。

1.2.3 PCR 扩增 预扩增引物为 E01 (GACTGCGTAC CAATTC-A) 和 M02 (GATGAGTCCTGAGTAA-C), 建立 20 μ L 反应体系, 其中包括酶切连接产物 4.0 μ L, E01 (10 μ mol/L) 0.6 μ L, M02 (10 μ mol/L) 0.6 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 1.8 μ L, 10 $\times$ buffer 2.0 μ L, Mg^{2+} (25 mmol/L) 1.2 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.12 μ L, 无菌超纯水补足至 20 μ L。反应程序为: 94°C 预变性 2 min; 94°C 40 s, 56°C 40 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 延伸 5 min, 4°C 保存。预扩增产物稀释 20 倍备用。

选用带有 3 个选择性碱基的引物作为选择性扩增的引物, 建立 20 μ L 反应体系, 其中含有 4.0 μ L 预扩增稀释液, 引物 E (10 μ mol/L) 0.8 μ L, 引物 M (10 μ mol/L) 0.8 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 1.8 μ L, 10 $\times$ buffer 2.0 μ L, Mg^{2+} (25 mmol/L) 1.2 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.12 μ L, 无菌超纯水补足至 20 μ L。反应程序为: 94°C 预变性 2 min; 94°C 40 s, $65 \sim 56^{\circ}\text{C}$ 40 s (每循环下降 0.7°C), 72°C 1 min, 12 个循环; 94°C 40 s, 56°C 40 s, 72°C 1 min, 30 个循环, 4°C 保存。

1.2.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳 选择性扩增产物经 95°C 变性 5 min 后, 用 6% 变性聚丙烯酰胺 (丙烯酰胺与甲叉双丙烯酰胺体积比为 19:1) 凝胶电泳, 50 W 恒功率电泳约 2 h 后银染, 自然晾干。

1.3 数据统计与分析

根据分子量标准, 对照反应产物在凝胶上的相应位置, 估计扩增产物的分子量大小。有清晰条带的记为“1”, 无带的记为“0”, 不清晰的记为“.”, 统计形成 0/1 矩阵。利用 Popgen32 软件计算多态位点比例、Nei's 杂合度和 Shannon's 指数。统计每个位点出现条带的个体数, 得出该位点在每组中出现的频率, 利用 χ^2 检验, 分析每个位点在 2 组海胆中出现的频率是否存在显著差异。

数值的单因素方差分析、 χ^2 检验均使用 SPSS 11.5 软件处理。

2 结果与分析

2.1 形态学指标分析结果

由 50 只个体所构成的大个体海胆组, 壳径为 (2.962 ± 0.286) cm, 壳高为 (1.561 ± 0.168) cm。由 30 只个体构成的小个体海胆组壳径和壳高分别为 (1.480 ± 0.255) cm、 (0.821 ± 0.213) cm。单因素方差分析表明, 大小 2 个海胆组间, 壳径、壳高这 2 个生长指标均存在极显著差异 ($P < 0.01$)。对每组海胆的壳径和壳高做相关性分析, 结果表明, 各组海胆这 2 个指标之间均存在极显著的正相关关系 ($P < 0.01$)。

2.2 AFLP 选择性扩增带型结果

本研究从 88 个由 *Eco*RI 和 *Mse*I 引物构成的引物组合中筛选了 E32-M49、E33-M48、E33-M49、E33-M50、E35-M62、E38-M61 这 6 对引物组合对大小 2 组海胆进行 PCR 扩增, 扩增片段长度在 100 ~ 1 600 bp 之间。其中引物组合 E33-M50 对大小 2 组海胆部分个体的扩增结果如图 1 所示。

6 对引物在大海胆组和小海胆组中分别产生 243 和 212 个清晰的标记。每对引物产生的标记数量为 30 ~ 52 个, 6 对引物对大小 2 组海胆扩增所获得的多态位点数和多态位点比例如表 1 所示。

表1 大小2个海胆组的多态性位点
Tab. 1 Polymorphic loci in large and small size *Strongylocentrotus intermedius* groups

分组 Group	位点总数 Number of loci	多态性位点数 Number of polymorphic loci	多态性位点比率/% Percentage of polymorphic loci
小海胆组 Small-size	212	185	87.26
大海胆组 Large-size	243	234	92.86

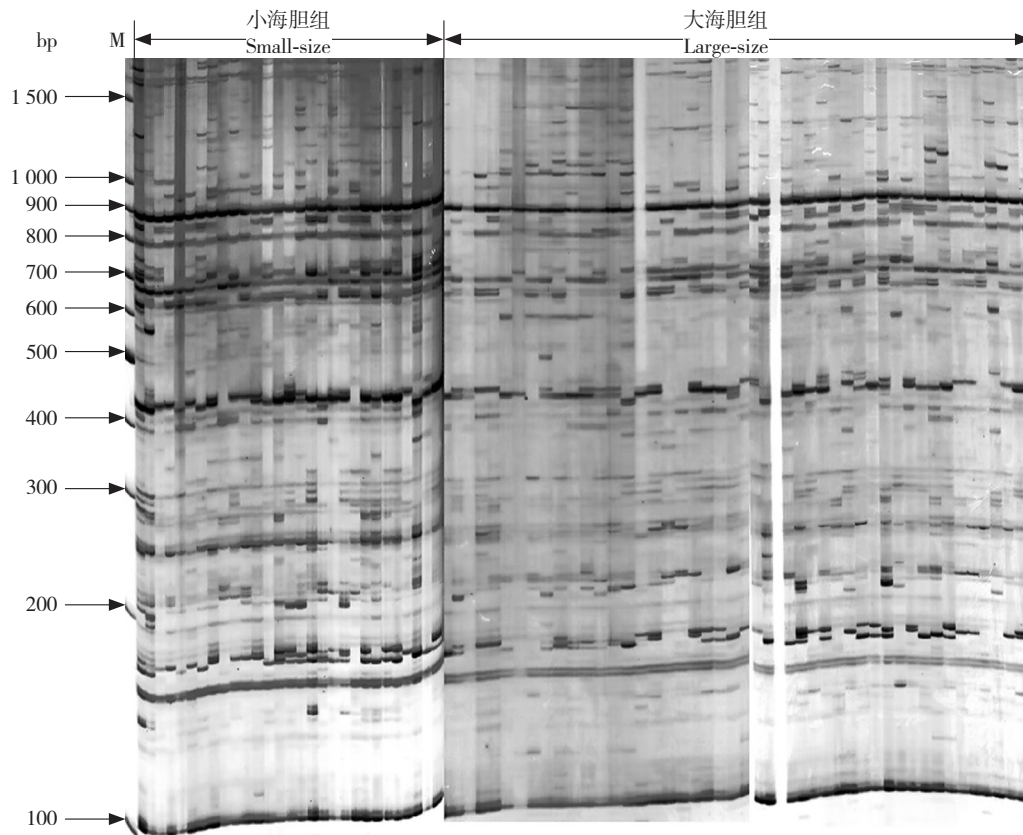


图1 E33-M50 引物在大小2组海胆部分个体的扩增结果

Fig. 1 AFLP fingerprinting of partial individuals of large and small size *Strongylocentrotus intermedius* groups with E33-M50

2.3 大小2组海胆的遗传多样性比较

6对引物的扩增片段统计成0/1矩阵,用Popgen32软件分别计算平均Shannon's指数、Nei's杂合度

2个指标(表2)。方差分析表明,大海胆组的平均Shannon氏指数和Nei氏杂合度均显著高于小海胆组($P<0.05$),大小2组海胆间遗传多样性存在显著差异。

表2 大小2个海胆组的遗传学指标
Tab. 2 Genetic indices of large and small size *Strongylocentrotus intermedius* groups

遗传学指标 Genetic index, <i>I</i>	小海胆组 Small-size	大海胆组 Large-size	<i>P</i>
Shannon's 指数 Shannon's index	0.2860±0.2449	0.3423±0.2213	0.008
Nei's 指数 Nei's gene diversity, <i>H</i>	0.1802±0.1723	0.2137±0.1654	0.029

2.4 与生长分化相关的 AFLP 标记分析

在所有的标记中,经 χ^2 检验,43个标记在大小2组海胆间表现出明显的频率差异,差异位点分布情况见表3,其中有29个位点出现极显著差异($P<0.01$),有14个位点出现显著差异($P<0.05$)。

在出现显著差异的位点中,位点 *BXf212*、*EVf198* 在小海胆组中出现(频率分别为0.2414和

0.1667),而在大海胆组中缺失;*AXf1497*, *AXf290*, *BYf880*, *BXf916* 4个位点在大海胆组中出现(频率分别为0.5306、0.2041、0.1667和0.1837),而在小海胆组中缺失。其余位点中,14个位点在大海胆组中出现的频率显著高于小海胆组($P<0.05$),而23个位点在小海胆组中出现的频率大于大海胆组中的频率($P<0.05$)(表4)。

表3 大小2组海胆间出现频率差异的 AFLP 位点数及比例

Tab. 3 Number and percentage of AFLP loci showing significant differences in frequency between large and small size *Strongylocentrotus intermedius* groups

引物组合 Primer combination	位点总数 Number of observed loci	频率差异显著的位点数 Number of loci with significantly different frequency	比例/% Percentage
E32-M49	40	11	27.5
E33-M48	41	6	14.6
E33-M49	51	5	9.8
E33-M50	52	6	11.5
E35-M62	30	9	30.0
E38-M61	38	6	15.8

3 讨论

在海洋生物经济性状的研究中,分子标记手段显示了极大的优势并得到了很好的应用。对海洋生物性状相关的分子标记研究,可以直接将目标性状与标记频率进行关联分析,也可以通过标记回归法对相关性状与标记位点进行连锁分析。前者可以在分离群体中进行,就是根据经济性状的指标,在大群体中筛选出极端表现型的个体组成分离群体,利用分子标记手段,筛选分离群体之间存在频率差异的位点。使用这种方法可以快速地找到与目标性状连锁的分子标记,目前在中国对虾(*Penaeus chinensis*)^[11-12]、褐牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[13]、大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)^[14]中均有成功报道。当然,这种标记关联分析也可以在随机群体中进行,准确性和精确度都较高,只是需检测的标记量较大,如邹林林等^[10]利用cDNA-AFLP技术,在光棘球海胆(*S. nudus*) (♀)×中间球海胆(♂)的杂交F1群体中对海胆壳径、体质量和生殖腺质量等主要经济性状相关的分子标记进行了筛选,并对这些数量性状与分子标记进行相关性分析。共筛选出了与壳径、体质量、生殖腺质

量显著相关的cDNA-AFLP标记数分别为43、48和42个,极显著相关的cDNA-AFLP标记数分别为38、38和23个。另外,罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*×*O. aureus*)体质量和抗寒性状^[15]、牙鲆(*P. olivaceus*)抗病性状^[16]以及凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)生长性状^[17]的分子标记研究也采用了这种方法。通过标记回归法找出与经济性状连锁的分子标记,如鲤(*Cyprinus pellegrini* Tcham×*C. carpio wuyuanensis*)的与生长性状相关的分子标记研究^[18],也可以在建立遗传连锁图谱的基础上,利用复合区间作图法进行经济性状的QTL定位^[19-21],从而可以找出与性状QTL连锁的分子标记,该方法工作量较大,但是可以同时多个经济性状进行标记筛选和定位,这对于研究经济性状的遗传效应和标记辅助育种来说更为有效。

针对该种海胆家系建立和标记开发滞后的现状,本研究采用不需预先了解基因组信息的AFLP标记,结合分离群体的标记关联方法筛选可能与该海胆生长相关的分子标记位点,探讨中间球海胆育苗及养殖过程中常常出现的生长分化现象的遗传学本质。通过目标性状与标记位点频率的关联分析,

表4 在2组海胆间出现显著频率差异的位点特征
 Tab. 4 Characters of loci showing significant differences in frequency between large and small size *Strongylocentrotus intermedius* groups

引物组合 Primer combination	位点名称 Locus name	分组 Group		P
		小海胆组 Small-size	大海胆组 Large-size	
E32-M49	AXf1600	0.2000	0.5102	0.015
	AXf1497	0.0000	0.5306	0.000
	AXf1470	0.5000	0.8776	0.000
	AXf1466	0.0667	0.3878	0.002
	AXf1300	0.4000	0.8776	0.000
	AXf1100	0.0333	0.6122	0.000
	AXf950	0.0667	0.4490	0.000
	AXf900	0.0667	0.4694	0.000
	AXf320	0.3333	0.6735	0.003
	AXf290	0.0000	0.2041	0.022
	AXf220	0.6333	0.3265	0.008
E33-M48	BYf880	0.0000	0.1667	0.048
	BYf705	0.4000	0.1042	0.002
	BYf520	0.1667	0.4583	0.008
	BYf252	0.0667	0.3958	0.001
	BYf240	0.4000	0.1458	0.011
	BYf167	0.2333	0.8750	0.000
E33-M49	BXf980	0.4828	0.8367	0.001
	BXf916	0.0000	0.1837	0.037
	BXf212	0.2414	0.0000	0.001
	BXf192	0.5172	0.1224	0.000
	BXf190	0.3793	0.7143	0.004
E33-M50	BZf722	0.4000	0.1875	0.040
	BZf331	0.2667	0.0417	0.011
	BZf312	1.0000	0.7708	0.013
	BZf258	0.9667	0.5417	0.000
	BZf227	0.4333	0.0417	0.000
	BZf189	0.3667	0.1667	0.045
E35-M62	CWf1250	0.8667	0.0800	0.000
	CWf799	0.9000	0.2600	0.000
	CWf790	1.0000	0.7800	0.015
	CWf716	1.0000	0.8000	0.023
	CWf696	1.0000	0.8000	0.023
	CWf456	0.9333	0.0800	0.000
	CWf422	0.5333	0.2200	0.004
	CWf217	0.8000	0.0000	0.000
	CWf180	0.5000	0.0400	0.000
E38-M61	EVf801	0.8000	0.5800	0.044
	EVf381	0.5000	0.0400	0.000
	EVf375	0.5000	0.2000	0.005
	EVf198	0.1667	0.0000	0.012
	EVf160	0.0333	0.2600	0.009
	EVf120	0.4000	0.1200	0.004

找到了在遗传背景相近的大个体和小个体海胆组间存在显著频率差异的43个AFLP位点,其中14个位点在大海胆组中出现的频率显著高于小海胆组($P < 0.05$),而23个位点在小海胆组中出现的频率高于大海胆组($P < 0.05$),2个位点在大海胆组中缺失,4个位点在小海胆组中缺失。初步认为大海胆组中出现频率较高的位点以及小海胆组缺失的位点可能与海胆快速生长有关,而小海胆组中频率较高的位点以及大海胆组缺失的位点可能与海胆的负向生长有关。当然,标记位点的缺失或频率差异也可能与取样个体数等随机因素有关,下一步工作将要在随机群体中验证这些显著相关标记的有效性,并对有效标记进行转化,探讨将其应用于中间球海胆标记辅助育种工作的可行性,用以缩小海胆养殖过程中的生长分化现象,有效提高产量并集中上市,增加海胆养殖业的经济效益。

在水生生物中,已有一些研究结果表明,部分鱼类^[22-23]、甲壳类^[24]、贝类^[25-26]的杂合度与存活率、生长速率等生产性状存在明显的相关性。本研究中遗传多样性指标比较发现,大个体海胆组遗传多样性指标均显著高于小个体海胆组,预示着杂合度等遗传学指标可能与生长性状之间存在着某种正相关关系,这方面的研究结果将为海胆生长性状的早期评估、杂种优势机理及预测研究提供思路。

相对于陆生植物和动物来说,分子标记与经济性状的关联研究在海洋生物中报道较少,而且一般来说都处于初级研究阶段。在所有海洋生物中,又以鱼类的研究相对较多,而在棘皮动物中的研究非常少,这与如今棘皮动物极高的经济价值与广泛的养殖状况很不相称。本实验针对这一现状,筛选出了一系列可能与海胆生长相关的分子标记,并对杂合度等遗传学指标与生长的相关关系进行了预测。随着育种工作的不断开展,微卫星等共显性标记的大规模开发、应用,对中间球海胆生长分化现象的遗传学探讨将更加深入,进而将逐步确定决定海胆生长性状的一系列基因位点,并对其进行系统的图谱定位,从而实现中间球海胆的标记辅助选择育种。

参考文献:

- [1] 王丽梅,韩家波,许伟定,等. 中间球海胆与光棘球海胆杂交及子一代人工育苗技术[J]. 水产科学,2003,22(2): 9-11.
- [2] 王丽梅,韩家波,董颖,等. 中间球海胆与光棘球海胆杂交子一代的生长比较研究[J]. 水产科学,2004,23(2): 1-3.
- [3] Osanai K. Interspecific hybridization of sea urchins *Strongylocentrotus nudus* and *Strongylocentrotus intermedius* [J]. Bull Mar Biol Station Asam, 1974, 15(1): 37-47.
- [4] 常亚青,王子臣,宋坚,等. 四种海胆杂交的可行性及子代的早期发育[J]. 水产学报,2000,24(3): 211-216.
- [5] 李霞,张晓明,岳昊. 海刺猬和中间球海胆性腺的组织学和组织化学[J]. 大连水产学院学报,2004,19(1): 1-5.
- [6] 李霞,秦艳杰,李颖逾. 中间球海胆饥饿代谢研究[J]. 中国水产科学,2004,11(4): 302-306.
- [7] 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.
- [8] 常亚青,丁君,邢荣莲,等. 用RAPD技术对5种经济海胆基因组DNA多态性的研究[J]. 中国水产科学,2004,11(3): 129-134.
- [9] 周遵春,包振民,董颖,等. 中间球海胆、光棘球海胆及杂交F1代(中间球海胆♀×光棘球海胆♂)群体遗传多样性AFLP分析[J]. 遗传,2007,29(4): 443-448.
- [10] 邹林林,周遵春,董颖,等. 利用cDNA-AFLP技术筛选与海胆数量性状相关显著的分子标记[J]. 水产科学,2008,27(11): 561-565.
- [11] 张天时,刘萍,李健,等. 中国对虾与生长性状相关微卫星DNA分子标记的初步研究[J]. 海洋水产研究,2006,27(5): 201-209.
- [12] 刘萍,何玉英,孙昭宁,等. 中国对虾生长性状相关遗传标记的筛选与克隆[J]. 海洋水产研究,2007,28(2): 1-6.
- [13] Kang J H, Lee S J, Park S R, et al. DNA polymorphism in the growth hormone gene and its association with weight in olive flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. Fish Sci, 2002, 68(3): 494-498.
- [14] 樊佳佳,白俊杰,李小慧,等. 大口黑鲈生长性状的微卫星DNA标记筛选[J]. 遗传,2009,31(5): 515-522.
- [15] Cnaani A, Hallerman E M, Ron M, et al. Detection of a chromosomal region with two quantitative trait loci, affecting cold tolerance and fish size, in an F2 tilapia hybrid [J]. Aquaculture, 2003, 223(1-4): 117-128.
- [16] Fuji K, Kobayashi K, Hasegawa O, et al. Identification of a single major genetic locus controlling the resistance to lymphocystis disease in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Aquaculture, 2005, 254(1-4): 203-210.

- [17] 陈晓汉, 曾地刚, 李咏梅, 等. 凡纳滨对虾生长性状的微卫星DNA标记分析[J]. 武汉大学学报: 理学版, 2006, 52(4): 498–502.
- [18] 顾颖, 曹顶臣, 张研, 等. 鲤与生长性状相关的EST-SSRs标记筛选[J]. 中国水产科学, 2009, 16(1): 15–22.
- [19] 张研, 梁利群, 常玉梅, 等. 鲤鱼体长性状的QTL定位及其遗传效应分析[J]. 遗传, 2007, 29(10): 1243–1248.
- [20] Lyons R E, Dierens L, Preston N P, et al. Identification and characterization of QTL markers for growth traits in Kuruma shrimp *P. japonicus* [J]. Aquaculture, 2007, 272, Suppl 1: 284–285.
- [21] Qin Y J, Liu X, Zhang H B, et al. Genetic mapping of size-related quantitative trait loci (QTL) in the bay scallop (*Argopecten irradians*) using AFLP and microsatellite markers [J]. Aquaculture, 2007, 272(1–4): 281–290.
- [22] Shikano T, Chiokubo T, Nakadate M, et al. The relationship between allozyme heterozygosity and salinity tolerance in wild and domestic populations of guppy (*Poecilia reticulata*) [J]. Aquaculture, 2000, 184: 233–245.
- [23] 董在杰, 夏德全. RAPD技术在鱼类杂种优势研究中的应用[J]. 中国水产科学, 1999, 6(1): 37–40.
- [24] Bierne N, Beuzart I, Vonau V, et al. Microsatellite-associated heterosis in hatchery-propagated stocks of the shrimp *Penaeus stylirostris* [J]. Aquaculture, 2000, 184: 203–219.
- [25] Pogson G H, Zouros E. Allozyme and RFLP heterozygosities as correlates of growth rate in the scallop *Placopecten magellanicus*: A test of the associative overdominance hypothesis [J]. Genetics, 1994, 137: 221–231.
- [26] Bierne N, Launey S, Naciri-Graven Y, et al. Early effect of inbreeding as revealed by microsatellite analyses on *Ostrea edulis* larvae [J]. Genetics, 1998, 148(4): 1893–1906.

AFLP markers associated with growth differentiation in sea urchin, *Strongylocentrotus intermedius*

CHU Guannan, QIN Yanjie, LI Xia, LUO Yaoming

(Key Laboratory of Mariculture and Biotechnology, Agriculture Ministry, Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China)

Abstract: Sea urchin (*Strongylocentrotus intermedius*) is one of the most economically important echinoderm, whose genetic improvement in economic traits such as growth, disease resistance and reproductive potential can help increase its output. While in most cases, growth of farmed sea urchin is irregular and uneven, which is called growth differentiation. This fact restricts large-scale production of sea urchin and increase the cost of farmers. Early selection on growth traits would solve this problem. It is difficult to detect the genetic essences because the economical traits are mostly quantitatively controlled by polygene. AFLP markers was used in this study in order to screen the genes and markers which control the quantitative traits in sea urchin. 50 large and 30 small size sea urchins were selected from a huge population with the same genetic background and curing environment. Shell diameter and height were (2.962 ± 0.286) cm and (1.561 ± 0.168) cm in large-size group and (1.480 ± 0.255) cm, (0.821 ± 0.213) cm in small-size one. These two indices were significantly correlated with each other, and there were significant differences between two groups on these two indicators. Sea urchins from two groups were all subjected to AFLP analysis with primer combinations of E32-M49, E33-M48, E33-M49, E33-M50, E35-M62 and E38-M61. 243 and 212 loci were respectively detected in large and small-size groups, with polymorphic percentage of 87.26% and 92.86%. χ^2 test showed that 43 loci showed significant differences in frequency between two groups ($P < 0.05$), among which 29 had extremely significant differences ($P < 0.01$). Locus *BXf212* and *EVf198* found in small-size group, with frequency of 0.241 4 and 0.166 7, were lost in large-size group. And four loci of *AXf1497*, *AXf290*, *BYf880* and *BXf916* detected in large-size group with frequency of 0.530 6, 0.204 1, 0.166 7 and 0.183 7, were absent in small-size group. 14 loci had significantly higher frequencies in large-size group than those in small-size one, while 23 loci had reverse frequencies ($P < 0.05$). These results suggested that these loci would have positive or negative effects on growth traits in sea urchins. The loci with higher frequencies in large-size group may be preferred in urchin molecular marker assistant breeding and those with higher frequencies in small-size group may be eliminated through selection. However, these markers would also be related with random factors and the next work would be concerned on extending the scope of molecular markers and verifying the correlation of growth trait and markers in sea urchin. Shannon's index and Nei's gene diversity in the large-size group were $0.342\ 3 \pm 0.221\ 3$ and $0.213\ 7 \pm 0.165\ 4$, which were significantly higher than those in small-size group which were $0.286\ 0 \pm 0.244\ 9$ and $0.180\ 2 \pm 0.172\ 3$, respectively. These results showed that growth traits in sea urchin would be positively associated with heterosis to some extent. [Journal of Fishery Sciences of China, 17(3): 448–455]

Key words: *Strongylocentrotus intermedius*; growth differentiation; AFLP

Corresponding author: QIN Yanjie. E-mail: qinyanjie@dlfu.edu.cn