

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20191125001

http://www.yykxjz.cn/

廖梅杰, 王锦锦, 李彬, 王印庚, 荣小军, 张正, 范瑞用. 基于 SSR 标记的刺参不同地理群体的遗传结构分析及指纹图谱构建. 渔业科学进展, 2021, 42(1): 165-176

Liao MJ, Wang JJ, Li B, Wang YG, Rong XJ, Zhang Z, Fan RY. Genetic diversity analysis and fingerprint construction for different geographical populations of the sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) based on SSR markers. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(1): 165-176

基于 SSR 标记的刺参不同地理群体的遗传结构分析及指纹图谱构建*

廖梅杰¹ 王锦锦¹ 李彬¹ 王印庚^{1①}
荣小军¹ 张正¹ 范瑞用²

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 2. 青岛瑞滋集团有限公司 青岛 266400)

摘要 为分析中、韩、俄沿海刺参(*Apostichopus japonicus*)种质遗传结构,本研究采用 SSR 指纹图谱技术对中国青岛、烟台,韩国浦项、群山、木浦,俄罗斯符拉迪沃斯托克的不同刺参群体进行遗传多样性分析和指纹图谱构建。结果显示,13 个微卫星座位的平均观测杂合度(H_o)和平均期望杂合度(H_e)分别为 0.47 和 0.80。13 个位点的多态信息含量(PIC)为 0.465(AJ06)~0.909(AJ09),除 AJ06 为中度多态性($0.25 < PIC < 0.50$)外,其余 12 个位点均为高度多态性($PIC > 0.50$)。单个位点的等位基因数(A)为 10(AJ06)~34(AJ07),平均等位基因数为 19.4 个。各位点的有效等位基因共 83.8 个,各位点的有效等位基因数(N_e)为 1.7(AJ06)~11.8(AJ09),平均有效等位基因数为 6.5。各群体遗传多样性分析结果显示,8 个群体的 PIC 指数为 0.6392(韩国木浦)~0.7122(中国青岛),说明相应群体均具有较高的遗传多样性。构建的 DNA 指纹图谱可将所采集的 8 个群体区分开。遗传结构分析结果显示,8 个刺参群体分配到 3 个自由交配群中,与 UPGMA 聚类分析结果相一致。UPGMA 聚类分析结果显示,中国青岛、烟台群体与韩国木浦黑参群体聚为一支,俄罗斯刺参群体、韩国浦项黄参群体、韩国群山黑参群体和韩国浦项黑参群体聚为一支,而韩国浦项红参群体作为外群,单独聚为一支。刺参分群及聚类分析表明,不同群体的遗传结构及遗传分化情况不仅与地理位置相关,还与刺参体色有一定的相关性。本研究结果可为刺参种质资源保护及不同地理种群刺参的鉴别提供技术支撑。

关键词 刺参; SSR 标记; 遗传多样性; 指纹图谱

中图分类号 S932.8 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)01-0165-12

刺参又名仿刺参(*Apostichopus japonicus*),广泛分布于太平洋西部的中国、俄罗斯、韩国与日本沿海,

* 国家重点研发计划课题(2018YFD0901603)、中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2018GH10; 2019ZX0301)和山东省农业良种工程重大课题(2017LZGC010)共同资助 [This work was supported by National Key Research & Development Program of China (2018YFD0901603), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2018GH10; 2019ZX0301), and Agriculture Seed Improvement Project of Shandong Province (2017LZGC010)]. 廖梅杰, E-mail: liaomj@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 王印庚, 研究员, E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2019-11-25, 收修改稿日期: 2019-12-29

具有很高的药用和营养保健价值,是我国海水养殖中重要的经济品种(廖玉麟, 1997; FAO, 2012)。近年来,由于过度捕捞和环境污染的加剧,野生刺参自然资源趋于枯竭,刺参已被世界自然保护联盟收录到濒危物种红色名录的濒危(EN)等级(Purcell *et al*, 2013)。随着刺参养殖产业和海洋牧场的快速发展,不同地区人工繁育的苗种在各养殖主产区和养殖海域跨地域使用,在自然条件下与原种群相互交配也会造成种质渗透,因此,对刺参原地理种群的种质鉴别日益迫切。

近年来,同工酶(张涛等, 2017)、微卫星 DNA 标记(苗贵东等, 2011)、线粒体 DNA (Sun *et al*, 2010; 郝君等, 2013)等标记技术在水产种质研究领域被广泛应用。其中,微卫星 DNA 标记又称 SSR 标记,因具有多态性高、遵循孟德尔遗传规律、可重复性强、共显性、容易获得等特点,被广泛应用于遗传多样性研究中。另外,还可充分利用其高多态性的特点构建指纹图谱,用于品种之间乃至个体之间基因组序列差异解析,用于亲缘关系很近的品种或个体的准确辨别(McConnell *et al*, 1995; Scribner *et al*, 1996; Dewoody *et al*, 2000)。本研究利用 SSR 标记技术对采自中国、韩国和俄罗斯的 8 个不同地理种群刺参进行遗传结构分析及指纹图谱构建,以期对刺参种质资源现状评估和保护提供基础数据,同时,为后续种质资源鉴定、开发利用和良种选育提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所用野生刺参分别采集于中国青岛、烟台,俄罗斯符拉迪沃斯托克,韩国浦项、木浦和群山,共 6 个海域,其中,韩国刺参的获取是在中国水产科学研究院基本科研业务费“中韩渔业联合研究与合作交流”项目支持下,与韩国海参产业协会合作,完成不同地理群体刺参采集,并由韩方完成 DNA 提取;俄罗斯符拉迪沃斯托克地区刺参群体是通过海关相关手续引入。根据所采集刺参体色的差异,韩国浦项采集的刺参又分为红参、黄参和黑参,合计采集 6 个海域 8 个不同地理群体刺参 225 头。不同群体的采样地点及信息见图 1 和表 1。

1.2 实验方法

利用 OMEGA Mollusc DNA Kit 提取刺参基因组 DNA,利用 NanoDrop 1000 及 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 纯度及完整性后,稀释到 50 ng/ μ l,置于 -20°C 冰箱保存备用。利用刺参 13 个微卫星位点的引物进行 PCR 扩增,对 PCR 产物直接进行位点扫描。13 对引物序列见表 2,引物由本实验室设计并验证,由青岛擎科生物公司合成。PCR 反应总体积为 20 μ l,包含 2 \times TSINGKE Master Mix 10 μ l、10 μ mol/L 正反



图 1 刺参采样地点

Fig.1 Sampling sites for *A. japonicus* populations

表 1 刺参采样信息
Tab.1 Sampling information for *A. japonicus* populations

群体 Populations	采样时间 Collecting date	位置 Location	样本量 Sample number
青岛太平角海参(QD)	2017-05-26	36°02'N, 120°21'E	30
韩国浦项黑参(SK-PX-B)	2017-06-09	36°05'N, 129°27'E	30
韩国浦项红参(SK-PX-R)	2017-06-09	36°05'N, 129°27'E	30
韩国浦项黄参(SK-PX-Y)	2017-06-10	36°05'N, 129°27'E	30
韩国群山黑参(SK-QS-B)	2017-06-09	36°34'N, 126°23'E	36
韩国木浦黑参(SK-MP-B)	2017-06-09	34°07'N, 126°17'E	29
烟台长岛海参(YT)	2017-07-03	38°17'N, 120°49'E	30
俄罗斯海参(RU)	2018-04-19	43°05'N, 131°90'E	10

表 2 引物序列信息
Tab.2 Information of primer sequences

位点 Locus	引物序列 Primer sequence (5'~3')	T_m (°C)
AJ02	F: GGTTTTCTGTTGAGGCTGTGTGGAT R: AGTCCAAAGTTTTCTCCTGGGGTGA	62
AJ05	F: CGATAACCCACTTGCTGC R: CGTGTTGTCCACTTCCAT	58
AJ06	F: GTATCCACTACCCGTTTG R: AATTCCTCGCATATCAC	52
AJ07	F: GCGGAATCTAAGGGATA R: GTGGGCACCAGAAACAAT	54
AJ09	F: ACAAGCACGCAGGGTCCAC R: CAGGGGAGGGTTTCAGA	60
AJ11	F: TTTTCCGTACCATGACCG R: CCTAACCAATAGAGCCACA	54
AJ15	F: ACCGTACCAAACCTCTCTT R: CCTTCTACTAATACATCCCAG	53
AJ17	F: ATCCAAGTGGCATTTCTTC R: CTTTTGATTCCTTGCCTG	53
C34	F: AACAGGAAGTCTACTTGGGA R: CCTGAGGCAAGCCAACAT	58
C36	F: AACCAGAAAGCCAACAGGG R: TCCGACGGCAAGAGGACTA	58
C37	F: TGGTTCACCTATTTTAGTCAC R: GATGGCACCGTTCCGTCT	58
C51	F: AAGCAGGCTGGTAGAAGG R: ACAAGAAGTATGCAACGAGTAG	54
C61	F: ACTTGGTGTCTTTTCACTCCTTTC R: GGTTGGGAGAGTTCATTAAGTGG	60

向引物各 1 μ l、模板 DNA 1 μ l, 加 ddH₂O 补足至 20 μ l。PCR 反应扩增程序: 94°C 预变性 5 min、94°C 30 s、56°C 30 s、72°C 30 s, 经 30 个循环后, 72°C 延伸 15 min, 4°C 保存。PCR 产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测后, 送青岛擎科生物公司利用 ABI3130 进行扩增片段分型和等位基因分析。

1.3 数据处理

利用 Popgene 软件统计整个群体及各群体的等位基因数(A)、有效等位基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、Nei's 标准遗传距离(D_s)、群体间基因流(N_m), χ^2 检验估计群体 Hardy-Weinberg 平衡偏离 (Yeh *et al*, 1997)。利用 Cervus 软件计算各位点多态信息含量(PIC)(Jo *et al*, 2017), 利用 Arlequin 3.5 计算群体间遗传分化系数(F_{st})(Excoffie *et al*, 2010)。采用 Excel 绘制刺参 8 个地理群体的指纹模式图, 并根据位点特异性, 构建数字化指纹图谱。使用 Structure 2.3 中贝叶斯聚类法对所有个体进行聚类分析, K 值设为 10, 首先根据个体基因型计算各可能自由交配群数 K 的概率 $L(K)$, 再基于相邻 K 概率计算第一级概率变化 $L'(K)=L(K)-L(K-1)$ 和第二级概率变化 $L''(K)=L'(K+1)-L'(K)$, 获得 $L''(K)$ 绝对值, 最后用 $L''(K)$ 绝对值除以 $L(K)$ 标准差得到 ΔK (Evanno *et al*, 2005)。

2 结果与分析

2.1 不同地理种群刺参的遗传多样性分析

利用 13 对引物对采集的 8 个地理种群进行遗传多样性分析, 结果见表 3。13 对引物全部扩增稳定并具有多态性, 13 个位点在 8 个群体中共检测出 252 个等位基因, 单个位点的观测等位基因数(A)为 10(AJ06)~34(AJ07), 平均等位基因数为 19.4。各位点的有效等位基因共 83.8 个, 各位点的有效等位基因数的范围为 1.7(AJ06)~11.8(AJ09), 平均有效等位基因数为 6.5。多个位点上的等位基因分布不均匀, 表现为低频等位基因较多, 等位基因数和有效等位基因数的差别较大。样本总的观测杂合度和期望杂合度分别为 0.20(AJ05)~0.83(AJ09)和 0.42(AJ06)~0.92(AJ09), 平均值分别为 0.47 和 0.80。13 个位点的多态

表3 各刺参群体在13个SSR位点的多样性指数
Tab.3 The genetic diversity indices of 13 SSR markers for different populations of *A. japonicus*

群体 Population	微卫星位点 SSR locus													平均 Mean	
	AJ02	AJ05	AJ06	AJ07	AJ09	AJ11	AJ15	AJ17	C34	C36	C37	C51	C61		
青岛 QD	A	6	12	6	13	17	10	9	9	15	7	4	6	11	9.6
	N_e	3.8	4.3	1.7	5.5	9.3	5.1	4.6	4.3	8.8	4.3	2.2	3.2	5.1	4.8
	H_o	0.46	0.20	0.31	0.43	0.70	0.28	0.70	0.60	0.36	0.34	0.71	0.60	0.43	0.47
	H_e	0.75	0.78	0.41	0.83	0.91	0.82	0.80	0.78	0.90	0.78	0.55	0.71	0.82	0.76
	F_{is}	0.3681	0.7393	0.2357	0.4770	0.2159	0.6573	0.1076	0.2180	0.5971	0.5504	-0.3119	0.1360	0.4688	
	P	0.0045	0	0	0	0	0	0	0.0300	0	0	0.5800	0.2706	0	
	PIC	0.694	0.741	0.385	0.801	0.884	0.781	0.758	0.734	0.878	0.730	0.434	0.652	0.787	0.7122
I	1.5	1.8	0.9	2.0	2.5	1.9	1.8	1.7	2.4	1.6	0.9	1.4	2.0	1.7	
烟台 YT	A	8	10	6	13	13	8	11	8	13	9	3	8	10	9.2
	N_e	3.8	2.9	1.6	6.3	6.5	5.2	6.1	2.7	8.9	2.8	2.1	3.9	4.0	4.3
	H_o	0.53	0.17	0.30	0.38	0.77	0.44	0.48	0.43	0.33	0.31	0.69	0.57	0.30	0.44
	H_e	0.75	0.67	0.38	0.86	0.86	0.82	0.85	0.64	0.91	0.65	0.52	0.75	0.77	0.73
	F_{is}	0.2727	0.7460	0.2117	0.5537	0.0933	0.4554	0.4241	0.31128	0.6243	0.5191	-0.3410	0.2283	0.5987	
	P	0.0022	0	0	0	0.6210	0.0013	0	0	0	0	0.2524	0	0	
	PIC	0.695	0.650	0.332	0.829	0.821	0.759	0.831	0.564	0.868	0.601	0.420	0.698	0.726	0.6758
I	1.5402	1.5246	0.8040	2.1856	2.1254	1.7657	2.0345	1.3152	2.3294	1.3990	0.8251	1.6576	1.7796	1.6374	
韩国 木浦黑参 SK-MP-B	A	8	6	2	9	12	9	14	6	12	12	3	9	10	8.6
	N_e	3.6	2.5	1.2	3.2	7.0	5.0	7.0	2.2	7.3	6.0	2.1	3.2	2.7	4.1
	H_o	0.59	0.11	0.14	0.38	0.79	0.15	0.93	0.45	0.40	0.63	0.59	0.71	0.62	0.50
	H_e	0.74	0.61	0.14	0.70	0.87	0.81	0.87	0.57	0.88	0.85	0.53	0.70	0.65	0.68
	F_{is}	0.1925	0.8136	-0.0769	0.4384	0.0736	0.8074	-0.0852	0.1927	0.5362	0.2438	-0.1346	-0.0438	0.0314	
	P	0.2753	0	0.7267	0	0.2783	0	0.8730	0.0025	0	0.0088	0.7012	0	0.6423	
	PIC	0.689	0.536	0.124	0.644	0.841	0.771	0.845	0.524	0.850	0.816	0.400	0.657	0.614	0.6392
I	1.5487	1.1496	0.2573	1.5066	2.1482	1.8165	2.2414	1.1545	2.2231	2.0972	0.7681	1.5481	1.5037	1.5356	
韩国 群山黑参 SK-QS-B	A	8	9	4	16	15	12	12	11	11	9	5	9	12	10.2
	N_e	4.8	3.2	1.5	6.3	9.4	6.9	7.4	2.7	7.3	5.1	2.2	3.7	3.7	4.9
	H_o	0.42	0.19	0.36	0.51	0.97	0.29	0.69	0.53	0.51	0.56	0.42	0.58	0.28	0.49
	H_e	0.80	0.70	0.32	0.85	0.91	0.87	0.88	0.63	0.88	0.81	0.56	0.74	0.74	0.74
	F_{is}	0.4724	0.7172	-0.1613	0.3883	-0.0886	0.6657	0.1975	0.1566	0.4043	0.3074	0.2324	0.1979	0.6180	
	P	0	0	0.9529	0.0004	0.6453	0	0	0	0	0.0818	0.1654	0	0	
	PIC	0.757	0.649	0.287	0.825	0.884	0.839	0.852	0.593	0.850	0.774	0.499	0.695	0.709	0.7086
I	1.6828	1.4889	0.6149	2.1924	2.4059	2.1388	2.1971	1.4485	2.1591	1.7764	1.0428	1.6295	1.7983	1.7366	
韩国 浦项黄参 SK-PX-Y	A	8	8	6	18	13	9	7	7	15	6	5	6	12	9.2
	N_e	4.7	4.3	1.6	8.2	7.2	5.5	3.4	2.0	4.3	3.7	3.6	4.0	5.9	4.4
	H_o	0.23	0.07	0.30	0.63	0.83	0.17	0.60	0.53	0.63	0.55	0.38	0.77	0.46	0.47
	H_e	0.80	0.78	0.38	0.89	0.88	0.83	0.72	0.51	0.78	0.74	0.63	0.77	0.85	0.73
	F_{is}	0.7030	0.9099	0.1880	0.2828	0.0323	0.7966	0.1489	-0.0596	0.1763	0.2412	0.3877	-0.0192	0.4409	
	P	0	0	0.0029	0	0.0002	0	0.0029	0.9429	0.0008	0.0016	0.0224	0.3324	0	
	PIC	0.754	0.727	0.349	0.868	0.846	0.794	0.661	0.475	0.757	0.691	0.561	0.712	0.813	0.6930
I	1.7066	1.6374	0.7964	2.4731	2.1834	1.8264	1.4733	1.0772	2.0494	1.5128	1.1332	1.5046	2.0607	1.6488	
韩国 浦项黑参 SK-PX-B	A	10	8	5	17	9	7	9	5	11	7	5	8	10	8.5
	N_e	5.5	3.1	1.5	9.5	5.8	5.1	6.4	1.9	4.4	3.8	2.3	3.6	3.7	4.4
	H_o	0.40	0.13	0.33	0.70	0.83	0.23	0.77	0.40	0.62	0.55	0.63	0.83	0.55	0.54

续表 3

群体 Population	微卫星位点 SSR locus													平均 Mean	
	AJ02	AJ05	AJ06	AJ07	AJ09	AJ11	AJ15	AJ17	C34	C36	C37	C51	C61		
韩国 浦项黑参 SK-PX-B	H_e	0.83	0.69	0.32	0.91	0.84	0.82	0.86	0.49	0.79	0.75	0.58	0.73	0.74	0.72
	F_{is}	0.5112	0.8034	-0.0490	0.2132	-0.0074	0.7095	0.0921	0.1705	0.1957	0.2480	-0.1047	-0.1556	0.2455	
	P	0	0	0.9676	0.0729	0.0471	0	0.1020	0.2635	0	0.0325	0.8596	0.8780	0	
	PIC	0.795	0.630	0.297	0.887	0.806	0.776	0.826	0.434	0.750	0.690	0.484	0.682	0.707	0.6742
	I	1.9106	1.4237	0.6659	2.5385	1.9236	1.7542	1.9897	0.9230	1.8382	1.5015	0.9976	1.5257	1.7197	1.5932
	韩国 浦项红参 SK-PX-R	A	6	9	5	13	12	8	2	4	11	7	7	10	9
N_e		4.1	5.5	3.0	5.7	6.3	4.4	1.2	1.4	5.9	2.7	1.9	5.0	7.1	4.2
H_o		0.28	0.70	0.19	0.67	0.90	0.22	0.03	0.29	0.38	0.50	0.53	0.32	0.18	0.40
H_e		0.78	0.84	0.69	0.85	0.85	0.78	0.16	0.31	0.85	0.64	0.47	0.81	0.90	0.68
F_{is}		0.6334	0.1501	0.7153	0.1910	-0.0707	0.7115	0.7818	0.0725	0.5433	0.2077	-0.1388	0.5981	0.7885	
P		0	0.0038	0	0.0022	0.9574	0	0	0	0	0.0636	1.0000	0	0	
PIC		0.721	0.796	0.611	0.811	0.824	0.735	0.141	0.285	0.811	0.599	0.473	0.774	0.846	0.6482
I		1.5679	1.8932	1.2544	2.1421	2.1135	1.6417	0.2868	0.6124	2.0233	1.3327	1.0525	1.8607	2.0983	1.5295
俄罗斯 RU	A	3	4	4	8	8	3	7	3	8	5	3	6	9	5.5
	N_e	2.5	3.5	2.4	4.7	6.3	2.3	5.0	1.4	3.9	4.5	2.4	4.5	5.9	3.8
	H_o	0.60	0.10	0.20	0.40	0.70	0	0.40	0.30	0.50	0.40	0.70	0.60	0.30	0.40
	H_e	0.64	0.75	0.62	0.83	0.88	0.59	0.84	0.28	0.78	0.82	0.61	0.82	0.87	0.72
	F_{is}	0.0083	0.8601	0.6581	0.4904	0.1667	1.0000	0.5000	-0.1321	0.3289	0.4872	-0.2069	0.2308	0.6386	
	P	0.0959	0	0.0764	0	0.3834	0	0.0020	0.9778	0.0041	0.0005	0.9313	0.4888	0	
	PIC	0.657	0.661	0.501	0.772	0.820	0.499	0.773	0.247	0.722	0.745	0.492	0.746	0.811	0.6496
	I	0.9986	1.3055	1.0127	1.8174	1.9298	0.9503	1.7524	0.5182	1.7036	1.5571	0.9433	1.6138	1.9730	1.3904
所有群体 All populations	A	12	22	10	34	26	15	20	19	22	22	10	18	22	19.4
	N_e	5.4	4.5	1.7	8.6	11.8	7.8	8.5	3.5	9.8	9.4	3.2	4.8	4.8	6.5
	H_o	0.43	0.20	0.28	0.51	0.83	0.24	0.59	0.46	0.47	0.49	0.57	0.63	0.41	0.47
	H_e	0.82	0.78	0.42	0.89	0.92	0.87	0.88	0.72	0.90	0.89	0.69	0.79	0.79	0.80
	F_{is}	0.4714	0.7367	0.3337	0.4140	0.0969	0.7240	0.3262	0.3623	0.4750	0.4512	0.1731	0.2080	0.4751	
	PIC	0.809	0.769	0.465	0.886	0.909	0.872	0.874	0.697	0.900	0.893	0.679	0.781	0.812	0.7957
I	1.8525	1.9208	0.9376	2.6775	2.7048	2.2632	2.3882	1.7099	2.5653	2.5037	1.4058	1.9595	2.1568	2.0804	

注: A : 等位基因数; N_e : 有效等位基因数; H_o : 观测杂合度; H_e : 期望杂合度; F_{is} : 近交系数; P : 偏离哈德-温伯格平衡检验; PIC: 多态信息含量; I : 香农指数

Notes: A : Allele number; N_e : Effective allele number; H_o : Observed heterozygosity; H_e : Expected heterozygosity; F_{is} : Inbreeding coefficient; P : Value for Hardy-Weinberg Equilibrium test; PIC: polymorphic index content; I : Shannon's index

信息含量为 0.465(AJ06)~0.909(AJ09), 除 AJ06 为中度多态性位点(0.25<PIC<0.5)外, 其余 12 个位点均为高度多态性位点(PIC>0.5)。

不同地理群体分析结果显示, 各群体平均观测等位基因数为 5.5(RU)~10.2(SK-QS-B), 平均有效等位基因数为 3.8(RU)~4.9(SK-QS-B)。不同地理群体的观测杂合度为 0.40(RU 和 SK-PX-R)~0.54(SK-PX-B), 期望杂合度为 0.68(SK-PX-R 和 SK-MP-B)~0.76(QD), 8 个群体的多态信息含量(PIC)为 0.6392(SK-MP-B)~0.7122(QD), 各群体均显示为高度多态性(PIC>0.5), 说明这几个群体均具有较高的遗传多样性。对 8 个群

体共 104 个位点进行 Hardy-Weinberg 平衡检测, 结果显示, 有 73 个位点显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡 ($P<0.05$), 8 个群体中均有大量位点表现为杂合子缺失状态($F_{is}>0$)。

2.2 不同地理种群刺参的指纹图谱构建

利用 13 个微卫星位点在各群体中的扩增结果绘制相应群体的 DNA 指纹模式图。从图 2 可以看出, 13 个微卫星位点均具有较高的特异性, 每一位点都具有特异性等位基因, 相应特异等位基因可用于不同地理群体刺参的鉴别。将这些位点所含有的 228 个特

异性等位基因进行计算机数字化处理,以“1”和“0”分别表示相应等位基因“有”和“无”,将这13个微卫星标记产生的特异性多态位点依次排列构建成数字化指纹图谱(表4),可为不同地理种群刺参的种质鉴定提供参照。

2.3 不同地理种群刺参的遗传结构分析

利用 Structure 软件进行群体结构分析的集群 K 与统计量 ΔK 的关系中, ΔK 峰值出现在 $K=3$ (图3),表明8个刺参群体的预测自由交配组数为3,因此,后续分群选择 $K=3$ 。基于分子标记的个体分配模式显示(表5),中国青岛群体(95.1%)、烟台群体(96.9%)样本中90%以上个体被分配于3号自由交配群;韩国

的5个群体在1、2、3号自由交配群中皆有分布,其中,韩国木浦群体主要分布于3号自由群(67.2%),其次分布于1号自由群(31.7%);韩国群山群体则主要分布于1号自由群(76.6%),其次分布于3号自由群(22.1%);韩国浦项黄参群体(94.6%)和韩国浦项黑参群体(97.8%)几乎全部分布于1号自由群;韩国浦项红参群体(97.2%)几乎全部分布于2号自由群;俄罗斯群体在3个自由群中皆有分布,在1号自由群中含78.2%,2号自由群有4.8%,3号自由群有16.9%。当 $K=3$ 时,贝叶斯分析法的聚类结果见图4。从图4可以看出,3个不同颜色分别代表不同的自由群,红色代表1号自由群,绿色为2号自由群,蓝色为3号

表4 8个地理群体刺参的数字化DNA指纹
Tab.4 The numbered SSR DNA fingerprint of eight populations of *A. japonicus*

群体 Population	DNA 指纹 DNA fingerprint
青岛 QD	000111000-0001000110111011010-00101110-00100000010110110011100101000000-10100101011111111100001-0011111011010-0101100011001101000-110110001101010000-0011001111001111111-110000001011001010000-000001110-00100000011001100-00010101110010000
烟台 YT	001011011-10000011111001010000-01101100-00110000011110101001010001000100-001100111110111101000000-0101111100000-1110000011011101010-1001101011010000-0101010111110101010-010100001011001010110-000000110-0110001011100100-101001001010010000
韩国木浦黑参 SK-MP-B	000111011-01000010100000010000-00000000-00100100010110000001000001000000-001100001001110101101000-0001111100101-011000001111111110-000000001101001001-00010011111010101101-011000001111101111010-000000110-00110010101001001-100100000101000100
韩国群山黑参 SK-QS-B	100011110-00001000111100010001-00011000-00101000011110000101001110101100-000100011101111101100110-1001111111011-0110000111101110101-011001011100101011-01100001101111001100-011000001001100111010-000011110-0010010111110100-000111011110000010
韩国浦项黄参 SK-PX-Y	011111000-00100001001100011000-00011110-00101010110110110100101000111100-000100101101110100110010-0011111110000-0010000001100010101-010000011010001100-1101001111111001101-001010000100100001010-000111010-0010000001011100-001101101000111000
韩国浦项黑参 SK-PX-B	111011011-00100101010000010100-00010010-01100000011111010001101010001110-000100001101100100100000-0000111100001-0010010001101010101-01000001100000001-01011001100110101001-001000000000110101011-010101010-00110000011101010-000110011010000010
韩国浦项红参 SK-PX-R	100101000-00000101111101000000-00100011-10100100001111000000000110001001-010110011101000010100100-0000010010111-000000100000000000-0000001100100000-10000001011111101100-000011110101100000000-101001011-10101000111110010-010000110010000001
俄罗斯 RU	000010000-00000010000000010000-10100000-00011001011000000000000000100100-000100001001110100000000-0000100000000-0010000001101000101-000000011000000000-01000101010101000010-010000000001100011010-010001000-01000000010011100-000101100100001000

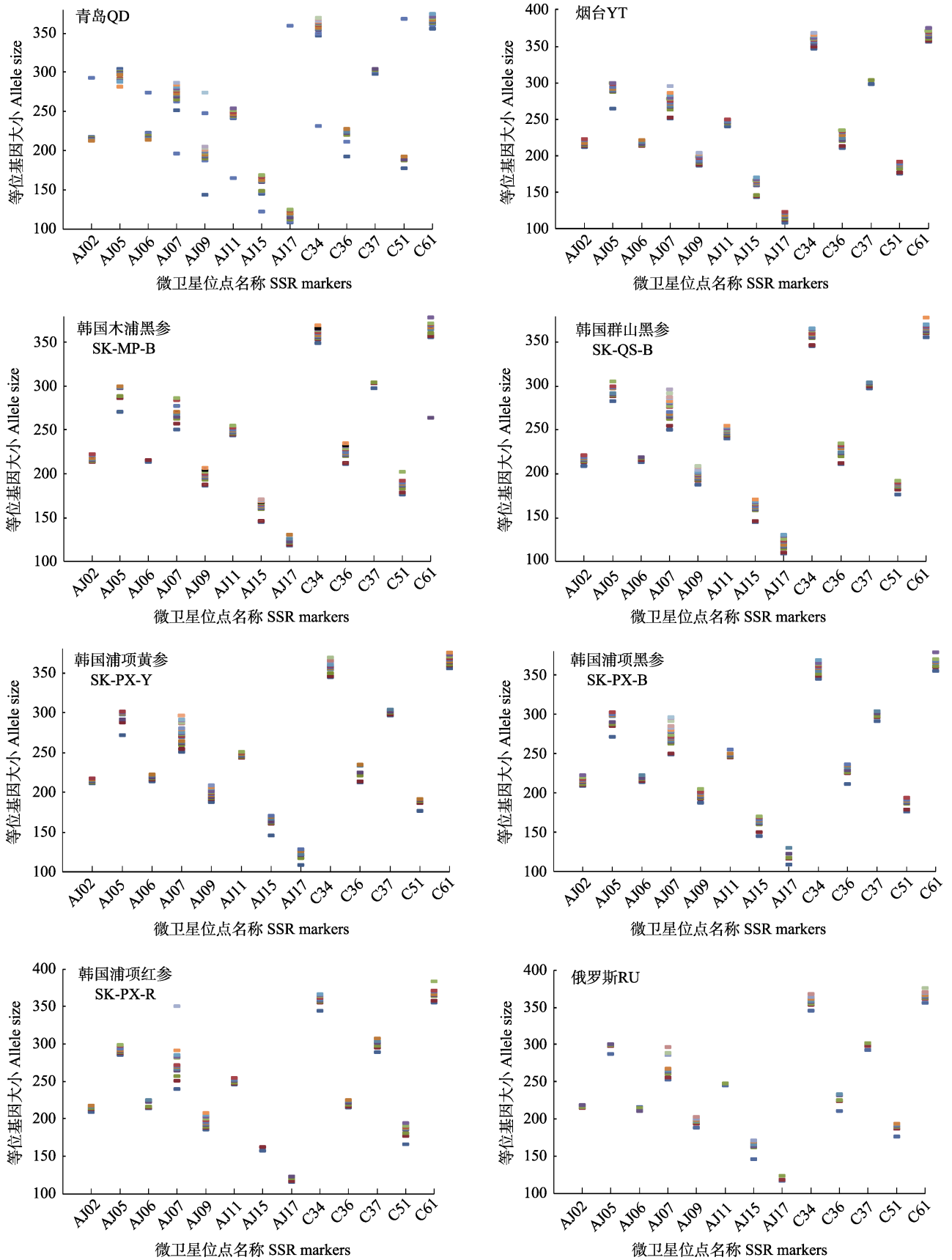


图 2 8 个群体刺参的微卫星 DNA 指纹模式
Fig2 DNA fingerprints of eight populations of *A. japonicus*

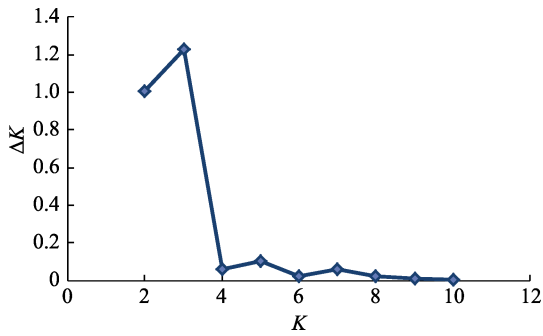


图 3 集群 K 与统计量 ΔK 的关系

Fig.3 Scatter plot of possible number of cluster

表 5 分配模式检验得到的 8 个地理群体刺参在 3 个自由交配群中的分布比例

Tab.5 Distribution proportion of eight geographical populations of *A. japonicus* in three inferred clusters tested by distribution pattern

群体 Population	推断遗传群 Inferred cluster			个体数 Number
	1	2	3	
青岛 QD	0.036	0.013	0.951	30
烟台 YT	0.015	0.016	0.969	30
韩国木浦黑参 SK-MP-B	0.317	0.011	0.672	29
韩国群山黑参 SK-QS-B	0.766	0.014	0.221	36
韩国浦项黄参 SK-PX-Y	0.946	0.019	0.036	30
韩国浦项黑参 SK-PX-B	0.978	0.014	0.008	30
韩国浦项红参 SK-PX-R	0.021	0.792	0.007	30
俄罗斯 RU	0.782	0.048	0.169	10

自由群。图 4 中不同颜色分布与表 5 中的分配比例相一致。自由分配模式表明，不同地理群体刺参遗传结构与其所在地理位置具有一定的相关性，但又受其他因素影响，导致这种分布模式与地理位置不完全一致。

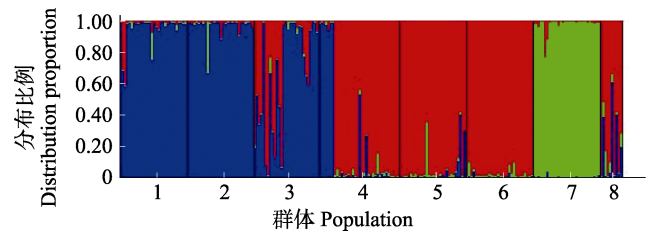


图 4 $K=3$ 时贝叶斯分析法的聚类结果

Fig.4 Histogram of the Bayesian analysis with $K=3$

- 1: 青岛; 2: 烟台; 3: 韩国木浦黑参; 4: 韩国群山黑参;
5: 韩国浦项黄参; 6: 韩国浦项黑参;
7: 韩国浦项红参; 8: 俄罗斯
1: QD; 2: YT; 3: SK-MP-B; 4: SK-QS-B; 5: SK-PX-Y;
6: SK-PX-B; 7: SK-PX-R; 8: RU

2.4 不同地理种群刺参的遗传进化分析

不同群体之间的遗传分化系数及基因流的统计结果见表 6。各群体之间存在不同程度的遗传分化，青岛群体与烟台群体、青岛群体与韩国木浦黑参群体、韩国木浦黑参群体与韩国群山黑参群体、韩国群山黑参群体与韩国浦项黄参及黑参群体、韩国浦项黄参与黑参群体的群体间遗传分化系数较小($0.05 > F_{st} > 0$)，说明以上群体间存在轻度遗传分化；韩国浦项红参群体与其他群体间的遗传分化系数较大($F_{st} > 0.15$)，说明韩国浦项红参群体与 7 个刺参群体间存在高度遗传分化；青岛群体与韩国群山黑参群体、韩国浦项黄参和黑参群体、俄罗斯群体，烟台群体与韩国群山群体等存在中度遗传分化($0.15 > F_{st} > 0.05$)。

不同群体间的遗传距离和遗传相似指数结果见表 7，韩国浦项黑参群体与韩国群山黑参群体的遗传相似指数最高($I_s=0.9279$)，遗传距离最近($D_s=0.0749$)，而韩国浦项红参和烟台群体间的遗传距离最远

表 6 不同群体间遗传分化系数值及基因流

Tab.6 Genetic differentiation and gene flow between different populations

群体 Population	青岛 QD	烟台 YT	韩国木浦黑参 SK-MP-B	韩国群山黑参 SK-QS-B	韩国浦项黄参 SK-PX-Y	韩国浦项黑参 SK-PX-B	韩国浦项红参 SK-PX-R	俄罗斯 RU
青岛 QD	****	10.0085	5.9443	3.2392	1.7037	1.7842	0.7088	1.8922
烟台 YT	0.0244	****	3.3368	1.8815	1.1088	1.1099	0.5831	1.0723
韩国木浦黑参 SK-MP-B	0.0404	0.0697	****	6.9754	2.6449	2.8410	0.6396	2.2740
韩国群山黑参 SK-QS-B	0.0717	0.1173	0.0346	****	5.5263	13.7713	0.7974	3.1789
韩国浦项黄参 SK-PX-Y	0.1280	0.1840	0.0864	0.0433	****	11.2021	0.6815	4.7123
韩国浦项黑参 SK-PX-B	0.1230	0.1838	0.0809	0.0178	0.0218	****	0.7211	4.1437
韩国浦项红参 SK-PX-R	0.2607	0.3009	0.2810	0.2387	0.2684	0.2575	****	0.6551
俄罗斯 RU	0.1167	0.1891	0.0991	0.0729	0.0504	0.0569	0.2762	****

注：对角线以下数据为遗传分化系数(F_{st})，以上数据为基因流(N_m)

Note: Data below the diagonal are the coefficient of genetic differentiation (F_{st}), and above are the gene flow (N_m)

表 7 不同群体间的遗传距离和相似性指数
Tab.7 Nei's genetic identity and genetic distance in different populations

群体 Population	青岛 QD	烟台 YT	韩国木浦黑参 SK-MP-B	韩国群山黑参 SK-QS-B	韩国浦项黄参 SK-PX-Y	韩国浦项黑参 SK-PX-B	韩国浦项红参 SK-PX-R	俄罗斯 RU
青岛 QD	****	0.9054	0.8920	0.7939	0.6782	0.6641	0.2934	0.5500
烟台 YT	0.0994	****	0.8503	0.7336	0.6140	0.6063	0.2574	0.5372
韩国木浦黑参 SK-MP-B	0.1143	0.1621	****	0.8700	0.7704	0.7431	0.2914	0.5896
韩国群山黑参 SK-QS-B	0.2308	0.3098	0.1393	****	0.9003	0.9279	0.3935	0.7188
韩国浦项黄参 SK-PX-Y	0.3883	0.4877	0.2608	0.1050	****	0.9235	0.3860	0.7686
韩国浦项黑参 SK-PX-B	0.4094	0.5003	0.2970	0.0749	0.0796	****	0.4146	0.7868
韩国浦项红参 SK-PX-R	1.2261	1.3573	1.2331	0.9327	0.9518	0.8804	****	0.4112
俄罗斯 RU	0.5978	0.6214	0.5283	0.3302	0.2631	0.2398	0.8886	****

注: 对角线以下数据为遗传距离(D_S), 对角线以上数据为相似性指数(I_S)

Note: Data below the diagonal are the genetic distance (D_S), and above the diagonal are the similarity index (I_S)

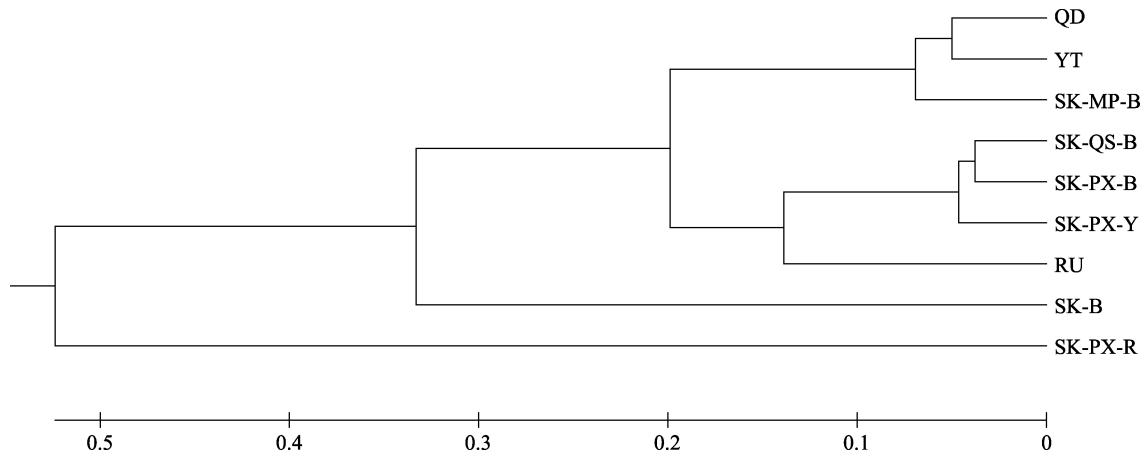


图 5 不同地理群体的聚类分析

Fig.5 UPGMA tree of the eight populations constructed by Nei's genetic distance

($D_S=1.3573$), 遗传相似度最小($I_S=0.2574$)。聚类分析显示(图 5), 烟台群体、青岛群体与韩国木浦黑参群体聚为一支, 韩国浦项黄参群体、韩国群山黑参群体和韩国浦项黑参群体聚为一支, 而韩国浦项红参群体作为外群, 单独聚为一支。

3 讨论

近年来, SSR 标记被广泛应用于水产动物养殖群体遗传变异的监测(赵哲霞等, 2014; 程珂等, 2018)、家系鉴别(李雪燕等, 2013)、地理种群遗传多样性(傅建军等, 2015)等研究中。谭杰等(2007)利用微卫星技术分析发现, 蓬莱养殖刺参群体遗传多样性低于烟台崆峒岛野生刺参群体。高悦勉等(2004)研究发现, 大连大孤山、旅顺塔河湾、长海县大长山、海洋岛及瓦房店复州湾海域地区野生刺参与大连金州杏树屯养殖群体遗传多样性基本无差别, 这可能与该研究采样样本的地理区域过于集中有关。本研究利用 13 个

微卫星位点对 8 个不同地理群体 225 个刺参个体的遗传多样性进行分析。结果显示, 13 个位点在 8 个群体中均具有较高的遗传多样性, 但不同位点又具有一定的差异性。对于不同位点, 等位基因数目不等, 其中, 位点 AJ07 在 8 个群体中的等位基因数最多, 有 34 个, 而位点 C37 的等位基因数最少, 有 10 个。不同位点样本的观测杂合度和期望杂合度也具有一定的差异性, 分别为 0.20~0.83 和 0.42~0.92。这种不同位点等位基因数、观测杂合度、期望杂合度存在较大差异的现象在刺参微卫星研究中广泛存在(Zhan *et al*, 2007; 卢超等, 2010)。13 个位点的多态信息含量为 0.465~0.909, 除 AJ06 为中度多态性($0.25 < PIC < 0.5$)外, 其余 12 个位点均为高度多态性($PIC > 0.5$), 说明本研究所使用的 13 个微卫星位点具有良好的多态性, 利用这些位点可更客观地检测出不同群体的遗传差异性。不同地理群体间的平均等位基因数也存在显著差异, 韩国群山黑参平均等位基因数目(10.2)最多,

俄罗斯群体最少(5.5),这可能与其采样个体较少有关。8个刺参群体观测杂合度(H_o)范围为0.40~0.54,期望杂合度范围为0.68~0.76,8个群体的多态信息含量范围为0.6392~0.7122,各群体均显示为高度多态性($PIC > 0.5$),说明几个群体均具有较高的遗传多样性。本研究使用的ABI 3730XL测序仪对等位基因进行分型分析,与以往电泳法读带相比,获得的等位基因大小更精确,因此,每个位点所检测到的等位基因数目更多,所测定出的群体的遗传多样性也更高。

DNA 指纹图谱技术以其高灵敏度常用于近缘物种鉴别。在水产领域,已应用于罗非鱼(*Oreochromis*)、剑尾鱼(*Xiphophorus hellerii*)、鳊鲂鱼(*Parabramis megalobrama*)、大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)的群体或品系的鉴定(宋红梅等,2009;全迎春等,2011;张倩倩等,2014;樊佳佳等,2012)。而在刺参遗传多样性研究方面,指纹图谱应用较少。本研究利用13个微卫星位点,构建了8个刺参群体的DNA指纹数据库,并根据其等位基因片段大小制成了微卫星DNA指纹模式图谱,显示这13个微卫星位点均具有特异性,可用于不同群体刺参的群体鉴定,可为杂交种和亲权鉴定提供参考。

对8个刺参群体进行遗传结构分析发现,韩国浦项黑参群体与韩国群山黑参群体的遗传相似指数最高(0.9279),遗传距离最近(0.0749),而韩国浦项红参和烟台群体间的遗传距离最远(1.3573),遗传相似度最小(0.2574)。聚类分析结果显示,烟台群体、青岛群体与韩国木浦黑参群体聚为一支,而韩国浦项黄参群体、韩国群山黑参群体和韩国浦项黑参群体聚为一支,而韩国浦项红参群体作为外群,单独聚为一支,聚类分析与分群结果相一致。Kim等(2008)利用9个微卫星位点研究了韩国5个地理种群的海参遗传进化关系,显示韩国南海海域2个群体聚为一支,然后与西海海域群体聚在一起,最外侧是韩国东海群体,与本研究结果一致。Chang等(2010)利用微卫星构建系统发育树发现,日本、韩国及中国大连刺参聚为一支,日本红参与俄罗斯海参聚为一支;潘传燕等(2012)研究发现,中国群体与韩国东海岸群体聚为一支,而韩国西海岸群体、俄罗斯群体和日本群体聚为另外一支。这些研究都表明,影响不同地理群体的刺参遗传分化的因素很多,除了地理位置外,还受海流、季风、气候、苗种逃逸等影响(谭杰等,2007a、b)。对韩国浦项地区3个不同颜色刺参的分析表明,韩国浦项红参群体的遗传分化及遗传结构与其他群体差异较大,说明体色与遗传关系具有相关性。Kanno等(2006)利用11个微卫星位点对日本3个颜色刺参种群进行物种

差异分析,结果显示,红色刺参与绿色、黑色刺参之间存在较大遗传差异,且在聚类分析中,红色刺参单独聚为一支,绿色和黑色刺参聚为一支,与本研究结果一致。

本研究利用13对微卫星引物对6个海域8个地理群体的研究发现,各群体均具有较高的遗传多样性,并且不同群体刺参遗传分化结果与其所处的地理位置及其体色具有一定的相关性,是生态环境、海流、地理阻隔相互作用的结果,构建微卫星指纹图谱可以将8个群体区分开,相关结果将为刺参种质资源鉴定和挖掘利用提供数据支撑。

参 考 文 献

- Chang YQ, Feng ZG, Yu JP, *et al.* Genetic variability analysis in five populations of the sea cucumber *Stichopus (Apostichopus japonicus)* from China, Russia, South Korea and Japan as revealed by microsatellite markers. *Marine Ecology*, 2010, 30(4): 455–461
- Cheng K, Chen C, Shi Y, *et al.* Genetic diversity monitoring of selected generations of Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*) based on microsatellites. *Genomics and Applied Biology*, 2018, 37(9): 3774–3781 [程珂, 陈辰, 史燕, 等. 基于微卫星的中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)选育世代遗传多样性监测. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37(9): 3774–3781]
- Dewoody JA, Fletcher DE, Wilkins SD, *et al.* Genetic monogamy and biparental care in an externally fertilizing fish, the largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2000, 267(1460): 2431–2437
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: A simulation study. *Molecular Ecology*, 2005, 14(8): 2611–2620.
- Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite Ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 2010, 10: 564–567
- Fan JJ, Bai JJ, Li SJ, *et al.* Establishment of DNA fingerprinting and analysis on genetic structure of largemouth bass with microsatellite. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, 36(4): 600–609 [樊佳佳, 白俊杰, 李胜杰, 等. 大口黑鲈微卫星DNA指纹图谱的构建和遗传结构分析. *水生生物学报*, 2012, 36(4): 600–609]
- FAO. Sea cucumbers: Commercially important sea cucumbers of the world. //FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper, Rome: FAO, 2012, 6: 1–150
- Fu JJ, Xu RW, Xue T, *et al.* Genetic analysis of three stocks of loach with microsatellite markers and D-Loop partial sequences. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(4): 465–474

- [傅建军, 徐如卫, 薛婷, 等. 3 种泥鳅微卫星标记和 D-Loop 部分序列遗传变异分析. 水产学报, 2015, 39(4): 465–474]
- Gao YM, Sun JB. The biochemical genetics of *Stichopus japonicus* Selenka population. Journal of Dalian Fisheries, 2004, 19(1): 30–34 [高悦勉, 孙静波. 刺参种群同工酶的生化遗传分析. 大连水产学院学报, 2004, 19(1): 30–34]
- Hao J, Yang Q, Bao D, et al. The sequence comparison of mtDNA D-loop and adjacent regions in six fish species. Journal of Dalian Ocean University, 2013, 28(2): 160–165 [郝君, 杨蕾, 鲍迪, 等. 6 种鱼 mtDNA D-loop 及其邻近区段的序列比较分析. 大连海洋大学学报, 2013, 28(2): 160–165]
- Jo J, Oh J, Lee H, et al. Draft genome of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* and genetic polymorphism among color variants. GigaScience, 2017, 6(1): 1–6
- Kanno M, Suyama Y, Li Q, et al. Microsatellite analysis of Japanese sea cucumber, *Stichopus (Apostichopus japonicus)*, supports reproductive isolation in color variants. Marine Biotechnology, 2006, 8(6): 672–685
- Kim M, Choi T, An HS. Population genetic structure of sea cucumber, *Stichopus japonicus* in Korea using microsatellite markers. Aquaculture Research, 2008, 39(10): 1038–1045
- Li XY, Sun GH, Yang JM, et al. Parentage identification using microsatellite DNA in artificial breeding of *Apostichopus japonicus*. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2013, 44(5): 1263–1269 [李雪燕, 孙国华, 杨建敏, 等. 微卫星标记在刺参(*Apostichopus japonicus*)人工繁育中亲本识别的应用. 海洋与湖沼, 2013, 44(5): 1263–1269]
- Liao YL. Fauna Sinica Echinodermata Holothuroidea. Beijing: Science Press, 1997, 148–150 [廖玉麟. 中国动物志 棘皮动物门海参纲. 北京: 科学出版社, 1997, 148–150]
- Lu C, Bao ZM, Peng W, et al. Isolation and characterization of microsatellite markers for sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) by screening the SSR-enriched library. Periodical of Ocean University of China, 2010, 40(S1): 137–141 [卢超, 包振民, 彭薇, 等. 富集文库-菌落原位杂交法筛选仿刺参微卫星标记. 中国海洋大学学报, 2010, 40(S1): 137–141]
- McConnell SK, O'Reilly P, Hamilton L, et al. Polymorphic microsatellite loci from Atlantic salmon (*Salmon salar*): Genetic differentiation of North American and European populations. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1995, 52(9): 1863–1872
- Miao GD, Du M, Yang JF, et al. Development of two microsatellite multiplex PCR systems for turbot (*Scophthalmus maximus*) and its application for family management. Periodical of Ocean University of China, 2011, 41(1): 97–106 [苗贵东, 杜民, 杨景峰, 等. 大菱鲆亲子鉴定微卫星多重 PCR 技术建立及应用. 中国海洋大学学报, 2011, 41(1): 97–106]
- Pan CY, Zang YP, Liao MJ, et al. Development of microsatellite DNA markers of sea cucumber *Apostichopus japonicus* and their application in population genetic variation and structure analysis. Progress in Fishery Sciences, 2012, 33(4): 72–82 [潘传燕, 臧云鹏, 廖梅杰, 等. 仿刺参微卫星标记的筛选及群体遗传结构分析. 渔业科学进展, 2012, 33(4): 72–82]
- Purcell S W, Mercier A, Conand C, et al. Sea cucumber fisheries: Global analysis of stocks, management measures and drivers of overfishing. Fish and Fisheries, 2013, 14(1): 34–59
- Quan YC, Liu YF, Bai JJ. DNA fingerprint structure of aquatic experimental animal Swroddtail, *Xiphophorus hellerii*. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2011, 21(6): 30–33 [全迎春, 刘宇飞, 白俊杰. 水生实验动物剑尾鱼的 DNA 指纹图谱构建. 中国比较医学杂志, 2011, 21(6): 30–33]
- Scribner KT, Gust JR, Fields RL. Isolation and characterization of novel salmon microsatellite loci: Cross-species amplification and population genetic applications. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1996, 53(4): 833–841
- Song HM, Bai JJ, Ye X, et al. Establishment of DNA fingerprinting of tilapia with microsatellite. Journal of Fisheries of China, 2009, 33(3): 357–363 [宋红梅, 白俊杰, 叶星, 等. 罗非鱼微卫星 DNA 指纹图谱的构建. 水产学报, 2009, 33(3): 357–363]
- Sun X, Li Q, Kong L. Comparative mitochondrial genomics within sea cucumber (*Apostichopus japonicus*): Provide new insights into relationships among color variants. Aquaculture, 2010, 309(1–4): 280–285
- Tan J, Sun HL, Liu P, et al. Genetic diversity of three geographical populations of *Apostichopus japonicus* revealed by microsatellite DNA. Journal of Fisheries of China, 2007a, 31(4): 437–442 [谭杰, 孙慧玲, 刘萍, 等. 3 个仿刺参地理种群遗传变异的微卫星 DNA 分析. 水产学报, 2007a, 31(4): 437–442]
- Tan J, Sun HL, Liu P, et al. Microsatellites analysis of genetic variation between natural and culture populations of *Apostichopus japonicus*. Marine fisheries research, 2007b, 28(3): 38–43 [谭杰, 孙慧玲, 刘萍, 等. 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, 2007b, 28(3): 38–43]
- Yeh FC, Boyle TJ. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. Belgian Journal of Botany, 1997, 129(2): 157
- Zhan AB, Bao ZM, Lu W, et al. Development and characterization of 45 novel microsatellite markers for sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). Molecular Ecology Notes, 2007, 7(6): 1345–1348
- Zhang QQ, Chen J, Jiang XY, et al. Establishment of DNA fingerprinting and analysis on genetic structure of different *Parabramis* and *Megalobrama* populations with microsatellite. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(1): 15–22 [张倩倩, 陈杰, 蒋霞云, 等. 不同鳊鲂鱼类群体微卫星 DNA 指纹图谱的构建和遗传结构分析. 水产学报, 2014, 38(1): 15–22]

Zhang T, Chen JW, Zhang L, *et al.* Morphological characteristics of *Squaliobarbus curriculus* and tissue specificity analysis for two isozymes. *Journal of Southern Agriculture*, 2017, 48(12): 2281–2287 [张涛, 陈建武, 张林, 等. 赤眼鲮形态特征及其两种同工酶的组织特异性分析. *南方农业学报*, 2017, 48(12): 2281–2287]

Zhao ZX, Jiang S, Wang BH, *et al.* Identification and genetic diversity analysis of *Pelteobagrus basedon* SSR molecular marker. *Journal of Nanchang University (Natural Science)*, 2014, 38(5): 498–501 [赵哲霞, 蒋珊, 王滨花, 等. 黄颡鱼属 SSR 分子鉴定及其遗传多样性. *南昌大学学报(理科版)*, 2014, 38(5): 498–501]

(编辑 冯小花)

Genetic Diversity Analysis and Fingerprint Construction for Different Geographical Populations of the Sea Cucumber (*Apostichopus japonicus*) Based on SSR Markers

LIAO Meijie¹, WANG Jinjin¹, LI Bin¹, WANG Yingeng¹①,
RONG Xiaojun¹, ZHANG Zheng¹, FAN Ruiyong²

(1. *Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao); Qingdao 266071;*
2. *Qingdao Ruizi Company, Qingdao 266400*)

Abstract To evaluate the genetic diversity of the sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) populations, thirteen simple sequence repeat (SSR) loci were used to amplify eight different geographical populations of sea cucumbers collected from China, Korea and Russia. The results showed that the average observed heterozygosity (H_o) and average expected heterozygosity (H_e) of 13 microsatellite loci were 0.47 and 0.80, respectively. The polymorphism index content (PIC) of the 13 loci ranged from 0.465 (AJ06) to 0.909 (AJ09). Except for AJ06, the loci were moderately polymorphic ($0.25 < \text{PIC} < 0.5$), and the other 12 loci were highly polymorphic ($\text{PIC} > 0.5$). The number of alleles (A) ranged from 10 (AJ06) to 34 (AJ07), with an average of 19.4. The total number of effective alleles was 83.8. The number of effective alleles (N_e) ranged from 1.7 (AJ06) to 11.8 (AJ09), and the average number was 6.5. The results of genetic diversity analysis showed that the PIC ranged from 0.6392 (SK-MP-B) to 0.7122 (QD), indicating that all populations had high genetic diversity. The construction of DNA fingerprints could distinguish all eight populations. The eight populations of sea cucumbers were allocated to three free-mating groups using Structure software, which were consistent with those generated using UPGMA cluster analysis. UPGMA cluster analysis showed that the Qingdao, Yantai, and Mokpo black populations were clustered into one group, whereas the Russian, Posco yellow, Kunsan black, and Posco black populations were clustered into another group. The Posco red population was located in the exception group and was located on a separate branch. Cluster analysis showed that the genetic structure and differentiation of the populations of sea cucumbers were not only related to the geographic location but was also related to body color. The results provided the foundation for the genetic identification and genetic resource conservation of the sea cucumber.

Key words *Apostichopus japonicus*; SSR markers; Genetic diversity; Fingerprint

① Corresponding author: WANG Yingeng, E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn