

DOI: 10.1360/yc-007-0443

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

周遵春¹, 包振民², 董颖¹, 刘相全³, 宋伦¹, 赫崇波¹, 王丽梅¹

1. 辽宁省海洋水产科学研究院, 辽宁省海洋水产分子生物学重点实验室, 辽宁省应用海洋生物技术开放实验室, 大连 116023;
2. 中国海洋大学, 海洋生命学院, 青岛 266003;
3. 山东省海洋水产研究所, 烟台 264006

摘要: 应用AFLP技术对中间球海胆、光棘球海胆及杂交F₁代(中间球海胆 × 光棘球海胆)群体的遗传多样性进行了分析。结果表明, 4对引物共扩增得到272个位点, 其中269个多态位点, 总的多态位点比例为98.89%。3个群体的香农多样性指数分别为: 0.2331 ± 0.1273 、 0.2005 ± 0.1385 和 0.2625 ± 0.1067 。群体内遗传相似度分别为: 0.6876 ± 0.0523 、 0.6501 ± 0.0548 和 0.6552 ± 0.0553 。分子方差分析(AMOVA)结果表明, 变异来源有25.39%来自群体间, 有74.61%来自群体内, 群体内的遗传多样性比较丰富。尽管杂交海胆在表型上可以明显分成两种类型, 但是通过AFLP统计的遗传距离进行的个体聚类却随机聚在一起, 不能分成两个群体。

关键词: 光棘球海胆; 中间球海胆; 杂交; AFLP

AFLP analysis in populations of *Strongylocentrotus intermedius*, *S. nudus* and hybrids (*S. intermedius* × *S. nudus*)

ZHOU Zun-Chun¹, BAO Zhen-Min², DONG Ying¹, LIU Xiang-Quan³, SONG Lun¹, HE Chong-Bo¹, WANG Li-Mei¹

1. Liaoning Key Lab of Marine Fishery Molecular Biology, Liaoning Open Lab of Applied Marine Biotechnology, Dalian 116023, China;
2. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;
3. Shandong Fishery Institute, Yantai 264006, China

Abstract: AFLP analysis of genetic diversity in the three populations of sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* (IN), *S. nudus* (NU) and F₁ progeny (IN×NU) was carried out in this paper. In total, 272 loci were amplified with 4 primer pairs, of which 269 were polymorphic and the percentage of polymorphic loci was 98.89%. The Shannon diversity index for *S. intermedius*, *S. nudus*, and their hybrid populations was 0.2331 ± 0.1273 , 0.2005 ± 0.1385 , and 0.2625 ± 0.1067 , respectively. The genetic similarity within populations was 0.6876 ± 0.0523 , 0.6501 ± 0.0548 , and 0.6552 ± 0.0553 , respectively. AMOVA analysis indicated that 25.39% of variance was among populations and 74.61% of variance was within populations. This suggested the rich genetic diversity level within populations. Although the hybrids can be classified into two types by apparent characters, they were clustered each other by UPGMA method according to their genetic distances.

Keywords: *Strongylocentrotus nudus*; *S. intermedius*; hybrids; AFLP

收稿日期: 2006-08-01; 修回日期: 2006-11-06

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(国家863计划)(编号: 2006AA10A411), 辽宁省自然科学基金项目(编号: 20042127)和大连市优秀青年科技人才基金项目(编号: S2006J23JH029)资助[Supported by National Hi-Tech Research and Development Program of China (No. 2006AA10A411), Natural Science Foundation of Liaoning Province(No. 20042127) and Science and Technology Foundation of Young Elitist of Dalian City (No. S2006J23JH029)]

作者简介: 周遵春(1967—), 男, 研究员, 博士, 研究方向: 海洋生物技术。E-mail: zunchunz@hotmail.com

通讯作者: 包振民(1961—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 海洋动物遗传育种。E-mail: zmbao@ouc.edu.cn

中间球海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)和光棘球海胆(*Strongylocentrotus nudus*)都隶属于棘皮动物门(Echinodermata), 游在亚门(Eleutherozoa), 海胆纲(Echinoidea), 正形目(Cenyrchinoida), 球海胆科(Strongylocentrotidae)^[1]。中间球海胆自 1989 年由大连水产学院从日本引入中国, 目前已经具备一定的生产规模, 与光棘球海胆一起成为我国北方地区两个主要的海胆养殖品种。两种海胆的繁殖期在每年的 9 月具有一段重叠时间, 比较方便进行杂交实验和研究, 通过杂交产生的变异对研究海胆的生殖隔离状况以及利用杂交优势进行选择育种都具有重要的意义。早在 30 年前, Osanai^[2]就对中间球海胆 × 光棘球海胆的正反交受精率、幼虫发育状况进行了初步的研究。Masayoshi和Osanai等^[3]进一步对这两种海胆杂交的F₁代的表型性状进行了研究。国内常亚青等^[4]也对这两种海胆杂交的可行性及子代的早期发育情况进行了研究。此后, 王丽梅等^[5,6]对中间球海胆(♀)及光棘球海胆(♂)杂交F₁代进行培育获得成功, 其实验结果表明, F₁代表现出一定的生长优势和抗逆性。最近, Zhou等^[7]利用光棘球海胆与中间球海胆单对杂交F₁代初步构建了其AFLP遗传连锁图谱。

研究杂种及双亲的群体遗传多样性对分析杂种双亲的亲缘关系远近、有效亲本繁殖数量的确定、杂种与双亲的群体内和群体间的变异来源等具有重要的意义。本文通过AFLP分子标记技术对中间球海胆、光棘球海胆及其杂交F₁代(中间球海胆♀ × 光棘球海胆♂)群体的遗传多样性进行了研究。

1 材料和方法

1.1 实验材料

分别取 2002 年秋季两种海胆群体杂交(中间球海胆♀ × 光棘球海胆♂)的表型性状不同的F₁代(两种表型以HYb, HYc表示)个体 48 个, 及母本类型(IN)个体 48 个, 父本类型(NU)个体 24 个(野生)。父母本类型

的个体分别来自辽宁大连的旅顺和长海。用剪刀沿口器周围剪开, 取口器, 用解剖刀刮取肌肉, 70%酒精保存, 同时取部分生殖腺用液氮冷冻备用。

1.2 DNA 提取

基因组DNA的提取参照《分子克隆实验指南 第三版》^[8]。用常规酚-氯仿抽提法提取酒精固定的海胆肌肉组织的DNA。

1.3 AFLP 分析

参照Vos等^[9]的方法, AFLP操作流程中所用药品均购自上海生工生物工程技术有限公司。扩增用PCR仪型号为Eppendorf Mastercycler ep gradient S。所用内切酶为*EcoR* 和*Mse*, 预扩增引物含 1 个选择碱基, 即E00-A, M00-C, 选择性扩增引物含 3 个选择碱基(引物及接头序列见表 1), 扩增产物用 4.5%变性聚丙烯酰胺胶, 恒功率 60 W电泳 1.5 小时, 进行银染检测。标记由引物组合及阿拉伯数字按分子量逆序命名。

通过对 60 对引物组合进行筛选, 从扩增条带数目适中、清晰、多态性高的引物组合中随机选取了四对引物组合[E32M48(E00-AAC, M00-CAC)、E33M50 (E00-AAG, M00-CAT)、E38M61 (E00-ACT, M00-CTG)、E44M49 (E00-ATC, M00-CAG)]用于对光棘球海胆(NU)、中间球海胆(IN)及其种间杂交F₁代(IN♀ × NU♂)进行了AFLP分析。AFLP标记呈典型的孟德尔方式遗传, 为显性标记。对每一位点, 有带视为显性基因型(AA和Aa), 无带视为隐性纯和基因型(aa)。

1.4 数据的处理与分析

银染之后得到的带谱利用AFLP分析软件Cross Checker version 2.9^[10]进行分析, 有带记为 1, 无带记为 0, 获得 0、1 矩阵。参数的采用和计算如下:

$$(1) \text{多态位点比率} = (r-s)/s$$

其中: s 是群体内共享位点数, r 为群体扩增出的总位点数。

表 1 用于 AFLP 分析的接头和引物序列

Table 1 Adaptor and primer sequences used for AFLP analysis

内切酶 Endonuclease	接头序列 Adaptor sequence	引物序列(5' 3') Primer sequence (E00-NNN and M00-NNN)
<i>EcoR</i>	5-CTCGTAGACTGCGTACC-3	GACTGCGTACCAATTC NNN
	3-CTGACGCATGGTTAA-5	
<i>Mse</i>	5-GACGATGAGTCCTGAG-3	GATGAGTCCTGAGTAA NNN
	3-TACTCAGGACTCAT-5	

E00: 5'-GACTGCGTACCAATTC-3; M00: 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3, N: 选择性碱基 Selective base.

(2) 个体间遗传相似性指数: 按Nei等^[11]的公式计算

$$S = 2N_{xy}/(N_x + N_y); \quad D = 1 - S;$$

其中S是相似性指数, D是遗传距离, N_{xy} 两个个体所共享的条带数, N_x 和 N_y 是每个个体的总条带数。

并由此分别计算 3 个群体内及群体间的平均遗传相似度 S。

(3) 香农氏遗传多样性指数: 参考Wachira等^[12]公式计算

$$H_{pop} = H_{pop}/H_{sp}, \quad H_{sp} = (H_{sp} - H_{pop})/H_{sp}$$

$H_o = -\sum x_i \ln x_i$, 其中 x_i 为位点I在某一群体内的显性频率

$$H_{pop} = (\sum H_o)/N, \quad \text{其中} N \text{为群体数}$$

$H_{sp} = -\sum x \ln x$, 其中 x 为位点I在N个群体内的总显性频率

(4) 对群体中的遗传变异来源进行AMOVA分析(Arlequin3.01, Schneider)^[13]。

(5) 根据个体间遗传距离矩阵, 用PHYLIP

3.62^[14]的NEIGHBOR程序以UPGMA方法对所有个体聚类。

2 实验结果

2.1 光棘球海胆、中间球海胆及其杂交F₁代AFLP扩增谱带统计

应用 E32M48、E33M50、E38M61、E44M49 组引物组合从 3 个群体中共扩增得到 272 个位点, 其中 E32M48 得到 56 个, E33M50 得到 74 个, E38M61 得到 58 个, E44M49 得到 84 个, 总的多态位点 269 个, 多态位点比例达到 98.89%。E32M48-13 标记, E44M49-36 标记为中间球海胆特异标记, E33M50-49 标记为光棘球海胆特异标记, 通过母本特征标记和父本特征标记可以区分父母本和杂交种, 即同时拥有父母本特征标记的就是杂交种。图 1 是利用 E44M49 引物组合得到的 3 个群体的扩增谱带, 不难看出, 3 个群体都具有较高的多态性。

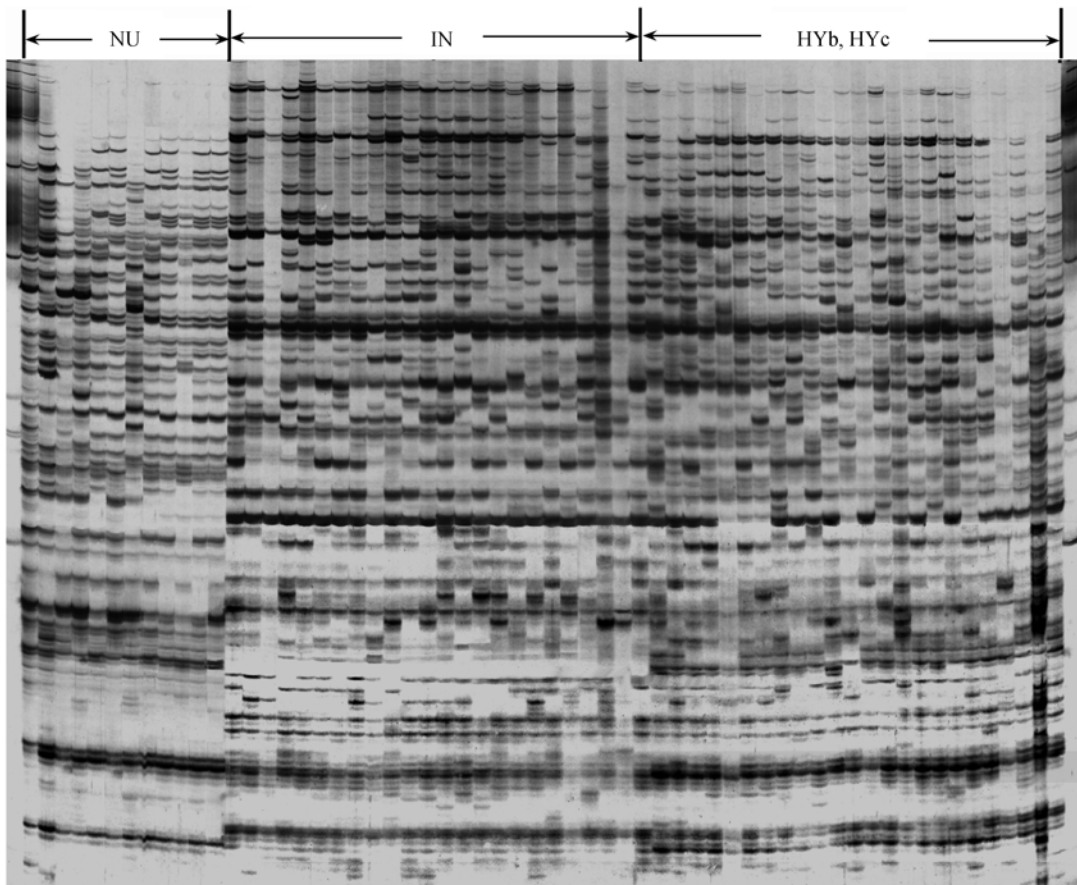


图 1 引物 E44M49 对 3 个群体 AFLP 扩增带谱

Fig. 1 AFLP fragments of the three tested sea urchin populations amplified by E44M49 primer combination

表 2 父母本及杂交F₁代群体遗传结构

Table 2 Genetic construction of parents and F₁ progeny

群体结构 Populations construction	父本 Paternal parent	母本 Maternal parent	F ₁
多态位点比例 Percent of polymorphic loci	0.8199	0.8051	0.9595
遗传相似度 Genetic similarity	0.6876 ± 0.0523	0.6501 ± 0.0548	0.6552 ± 0.0553
香农多样性指数 Shannon diversity indexes	0.2331 ± 0.1273	0.2005 ± 0.1385	0.2625 ± 0.1067

2.2 3 个群体的遗传结构及遗传多样性分析

群体内香农多样性指数与遗传相似度见表 2。3 个群体中, 父本群体内遗传相似度最高, 为 0.6876; 母本群体最低, 为 0.6501; 杂交F₁代群体介于父母本之间, 为 0.6552。香农多样性指数为杂交种F₁代最高, 为 0.2625; 母本最低, 为 0.2005。通常情况下, 群体的遗传相似度高, 多样性指数低, 但是本研究中的 3 个群体的多样性指数与群体内的遗传相似度并不完全一致。

群体内遗传相似度均高于群体间的遗传相似度(表 2, 表 3), 说明 3 个群体均可做为独立的群体。从群体间的遗传距离可以看出(表 3), 两个亲本(NU, IN)间的遗传距离为 0.6111, 杂交F₁代与父母本的遗传距离分别是 0.4575 和 0.4382。表明两个亲本间的遗传差异较大, 杂交F₁代与母本的遗传距离比与父本的遗传距离近, 是否表明子代从母本获得的遗传信息要高于从父本获得的遗传信息还有待进一步的研究和探讨。

应用分子方差分析(AMOVA)对 3 个群体的遗传多样性来源进行分析(表 4), 结果表明: 74.608%的变异存在于群体内, 群体间的变异占 25.392%, 说明群体内的遗传多样性比较丰富。

表 5 光棘球海胆、中间球海胆及杂交后代的表型特征

Table 5 Apparent characters of *Strongylocentrotus intermedius*, *S. nudus* and the hybrids

种类 Species	性状 Traits	壳色 Shell colour	棘色 Spine colour	棘长 Spine length
光棘球海胆 <i>S. nudus</i>		紫 Purple	紫 Purple	较长 Longer
中间球海胆 <i>S. intermedius</i>		黄褐 Yellow-brown	黄褐 Yellow-brown	较短 Shorter
中♀ × 光♂ <i>S. intermedius</i> × <i>S. nudus</i>	HYb	紫褐 Purple-brown	白、尖部略紫 White with purple tip	居中 In-between
	HYc	紫 Purple	紫 Purple	居中 In-between

表 3 群体间遗传相似度及遗传距离表

Table 3 Genetic comparability and distance between three populations

	NU	IN	F ₁
NU	****	0.3889	0.5425
IN	0.6111	****	0.5618
F ₁	0.4575	0.4382	****

注: 对角线以上是遗传相似度, 对角线以下是遗传距离。

Note: Genetic diversity is above the diagonal and Shannon diversity index is below the diagonal.

表 4 父母本及杂交F₁代群体的AMOVA分析

Table 4 AMOVA analysis between parents and F₁ progeny population

变异来源 Sources of variation	自由度 Degree of freedom	平方和 Square sum	变异组分 Variance components	百分比(%) Percentage
群体间 Among populations	2	355.450	15.013	25.392
群体内 Within populations	119	1632.100	44.111	74.608

2.3 聚类分析

从图 2 用UPGMA方法构建的 3 个群体的系统树可以更明了地看出, NU群体的个体单独聚到一起, IN群体的个体聚到一起, 杂交F₁代群体的所有个体聚到一起, 父母本及杂交种各自为一个单独的群体, 没有出现异常的个体。杂交F₁代中表型不同的HYb与HYc的个体随机聚到一起, 尽管外部形态特征有明显差异(壳色, 棘色), 但是个体间遗传距离很小, 说明我们将整个F₁代的两种表型的个体作为一个群体进行分析是合适的。个体聚类结果也表明F₁代与母本的遗传相似性更高一些。父母本及杂交F₁代的表型特征见表 5。

3 讨论

遗传多样性研究中通常采用的参数主要包括基

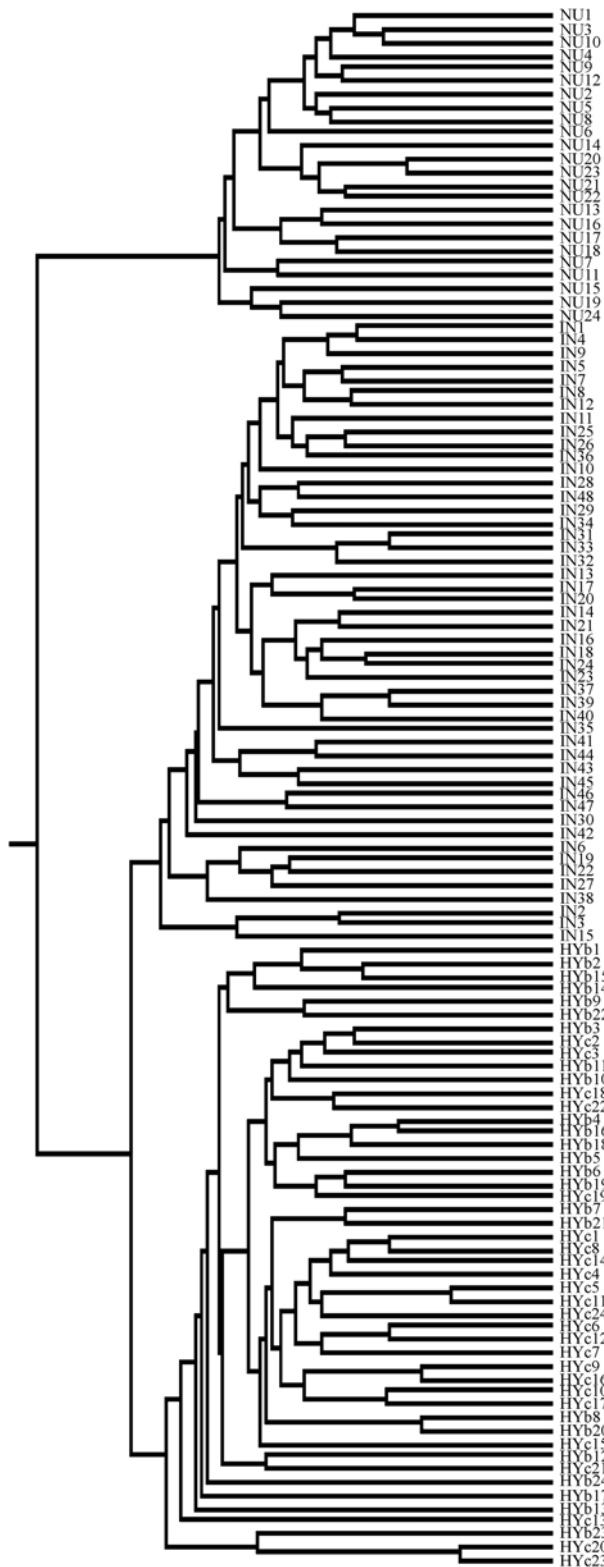


图 2 光棘球海胆与中间球海胆及 F₁ 代 120 个个体聚类图, PHILIP3.6 UPGMA
 Fig. 2 Individuals clustering of *Strongylocentrotus intermedius*, *S. nudus* and hybrids by UPGMA method according to their genetic distances

因频率、多态位点百分率、杂合度、遗传距离、遗传相似度、多样性指数、有效等位基因数等。这些参数的推导和计算依赖于所采用分子标记的类型, 显性标记由于无法区分杂合基因型和显性纯合基因型, 因此无法用常规的方法计算出显性或隐性基因频率, 理论上也就无法估算杂合度的大小。利用这些显性标记估算杂合度的前提是假定所研究群体为遗传平衡群体, 这种假定往往是不可靠的^[15], 特别对于海洋动物(如海胆)这些具有高繁殖率和死亡率的生物种类, 群体处于遗传平衡的这种假定下估算出的有关遗传参数必然是有偏的。AFLP技术属于显性标记, 在进行海胆遗传多样性分析时, 我们从多态位点百分率、遗传相似度、遗传距离以及香农多样性指数等角度对 3 个群体的遗传差异进行了分析, 将扩增片段的有无作为每个位点上的两种表型进行分析, 可以较客观的反应群体的多样性, 结果证明, AFLP不仅可以区分群体间的遗传差异, 还可以分辨群体内个体的遗传组成情况。本研究对基于基因频率计算的遗传参数进行回避, 得到的有关分析结果是比较客观和可靠的。

从中间球海胆(♀)与光棘球海胆(♂)杂交种的遗传变异情况可以看出, 杂交种介于父母本之间, 不很特殊地偏向于哪一方, 对进行遗传分析及育种的研究都很有价值。种间杂交的优良组合不仅可以产生双亲所没有的优良性状、出现可利用的杂交优势, 而且杂种一代在增加变异性、增加异质性方面往往比种内杂交组合表现得更为突出。可遗传的变异是进行选择的基础, 如果种间杂交后代可育, 就可以在杂种一代的基础上进行选择育种, 培育新品种。在海胆杂交研究方面, Rahman 等^[16]对海胆 *Echinomera* sp. A × *Echinometra mathaei* 的研究表明, 杂种表现出明显超过父母本的优势。尽管在幼虫和稚海胆时期, 杂种的性状略逊于父母本, 但在以后的生长发育中, 体重、生殖腺、生长速度等方面表现出明显的优势(经过 2 年的培育), 并且由于具有很好的遗传亲合力, 杂种完全可育。通过这些杂交优势的评价, 认为杂种具有养殖的潜力。分子标记技术的应用为研究杂交优势提供了有效的手段, 杂交群体的多态位点比例、遗传距离、多样性指数等经常被用来衡量群体的杂交优势。Boppenmeier 等^[17]认为在一定范围内, 亲本间的遗传距离越大, 杂交优势越明显。本研究中所进行的杂交是远缘种间杂交, 亲本间遗传距离比较大(0.6111), 杂交 F₁ 代群体

内的遗传距离的大小介于父母本之间, 多态位点比例和多样性指数均明显高于父母本。从遗传相似程度看, 海胆具有较低的相似度(父本 0.6501, 母本 0.6876, 杂种 0.6552), 说明其遗传多样性较丰富。

参考文献(References):

- [1] ZHANG Feng-Ying, LIAO Yu-Lin, WU Bao-Ling. Illustrations of Chinese Animals-Echinoderm Fascicule. Beijing: Science Press, 1964, 74—101.
张凤瀛, 廖玉麟, 吴宝铃. 中国动物图谱. 棘皮动物分册. 北京: 科学出版社, 1964. 74—101.
- [2] Osanai K. Interspecific hybridization of sea urchins, *Strongylocentrotus nudus* and *Strongylocentrotus intermedius*. *Bull Mar Biol Stn Asamushi*, 1974, 15: 37—45.
- [3] Masayoshi H, Osanai K. Phenotypic analyses of sea urchin species interspecifically hybridized between *Strongylocentrotus nudus* and *Strongylocentrotus intermedius*. *Bull Mar Biol Stn Asamushi*, 1994, 19: 65—78.
- [4] CHANG Ya-Qing, WANG Zi-Chen, SONG Jian, SU Yan-Ming, WANG Jun-Tao. Cross breeding between four species of sea urchin, feasibility and early development of F₁ offspring. *Journal of Fisheries of China*, 2000, 24(3): 211—216.
常亚青, 王子臣, 宋坚, 苏延明, 王君涛. 四种海胆杂交的可行性及子代的早期发育. *水产学报*, 2000, 24(3): 211—216.
- [5] WANG Li-Mei, HAN Jia-Bo, XU Wei-Ding, WANG Xiao-Yue, DONG Ying, ZHOU Zun-Chun. The species hybridization between sea urchin *Strongylocentrotus nudus* and *Strongylocentrotus intermedius* and the seeding production. *Fisheries Science*, 2003, 22: 9—11.
王丽梅, 韩家波, 许伟定, 王笑月, 董颖, 周遵春. 中间球海胆与光棘球海胆杂交及子一代人工育苗技术. *水产科学*, 2003, 22(2): 9—11.
- [6] WANG Li-Mei, HAN Jia-Bo, DONG Ying. Comparison of growth between sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* × *S. nudus* hybrids and their parents. *Fisheries Science*, 2004, 23(2): 1—3.
王丽梅, 韩家波, 董颖. 中间球海胆与光棘球海胆杂交子一代的生长比较研究. *水产科学*, 2004, 23(2): 1—3.
- [7] Zhou ZC, Bao ZM, Dong Y, Wang S, He CB, Liu WD, Wang LM, Zhu F. AFLP linkage map of sea urchin constructed using an interspecific cross between *Strongylocentrotus nudus* (♀) and *S. intermedius* (♂). *Aquaculture*, 2006, 259: 56—65.
- [8] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
Sambrook J, Russell DW. 黄培堂等译. 分子克隆实验指南. 第三版(上、下册). 北京: 科学出版社, 2002.
- [9] Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23(21): 4407—4414.
- [10] Buntjier JB. Cross Checker version 2.91, 1999. <http://www.spg.wau.nl/pv/pub/Cross>.
- [11] Nei M, Li WH. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci*, 1979, 76(10): 5269—5273.
- [12] Wachira FN, Waugh R, Hackett CA, Powell W. Detection of genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) using RAPD markers. *Genome*, 1995, 38(2): 201—210.
- [13] Schneider S, Roessli D, Excoffier L. Arlequin: A software for population genetics data analysis. Ver 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva, 2000.
- [14] Felsenstein J. PHYLIP Version 3.62, 2002. <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>.
- [15] Yan G, Romero-Severson J, Walton M, Chadee DD, Severson DW. Population genetics of the yellow fever mosquito in Trinidad: comparisons of amplified fragment length polymorphism (AFLP) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. *Mol Ecol*, 1999, 8(6): 951—963.
- [16] Rahman MA, Uehara T, John ML. Growth and heterosis of hybrids of two closely related species of Pacific sea urchins (Genus *Echinometra*) in Okinawa. *Aquaculture*, 2005, 245: 121—133.
- [17] Boppenmaier J, Melchinger AE, Seitz G, Geiger HH, Herrmann RG. Genetic diversity for RFLPs in European maize inbreds. III. Performance of crosses within versus between heterotic groups for grain traits. *Plant Breed*, 1993, 111: 217—226.