

文章编号: 1000-0615(2007)04-0437-06

3 个仿刺参地理种群遗传变异的微卫星 DNA 分析

谭 杰^{1,2}, 孙慧玲¹, 刘 萍¹, 杨爱国¹, 燕敬平¹, 刘志鸿¹, 周丽青¹

(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:运用微卫星 DNA 技术对仿刺参烟台群体、威海群体、大连群体的 3 个野生群各 20 个个体进行了遗传分析。对 9 个基因位点进行了扩增, 共获得了 59 个等位基因。评估了 9 对微卫星引物的多态信息含量 (PIC), 范围在 0.5129~0.8794 之间。结果表明: 3 个野生群体的平均杂合度观测值分别为 0.6416、0.6595、0.5824, 平均杂合度期望值分别为 0.7641、0.7161、0.7364; 在 Hardy-Weinberg 平衡条件下, 进行了 P 检验, 发现 3 个群体均有位点发生了显著偏离; 对 3 个群体进行了配对 F_{st} 值计算, 发现 3 个群体之间遗传分化较弱。从变异贡献率来看, 95.68% 的变异来自个体之间, 4.32% 的变异来自群体之间。经过聚类分析, 发现威海群体和大连群体之间亲缘关系较近, 烟台群体与前两群体亲缘关系较远。

关键词:仿刺参; 地理群体; 遗传变异; 微卫星 DNA

中图分类号: Q 347; S 917.4 **文献标识码:** A

Genetic diversity of three geographical populations of *Apostichopus japonicus* revealed by microsatellite DNA

TAN Jie^{1,2}, SUN Hui-ling¹, LIU Ping¹, YANG Ai-guo¹, YAN Jing-ping¹, LIU Zhi-hong¹, ZHOU Li-qing¹

(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: The microsatellite DNA technique was applied to assess genetic diversity and genetic differentiation in three wild populations of *Apostichopus japonicus* from Yantai, Weihai and Dalian. 9 polymorphic loci were screened electrophoretically for genetic variation of the three wild populations. The following parameters were calculated: heterozygosity, polymorphism information content (PIC), effective allele number, allele frequency, genetic distance, genetic identity coefficient, Hardy-Weinberg balance deflection index and so on. Results showed that the number of total alleles of these 9 microsatellite loci was 59. The average of allele number in each microsatellite locus of the Yantai, Weihai and Dalian populations was 6.5556, 5.8889 and 6.0000, respectively; the average effective allele number was 4.6033, 4.0466 and 4.1367, respectively; The PIC of polymorphic loci varied between 0.5129-0.8794. The average observed heterozygosity (H_o) of three populations was 0.6416, 0.6595 and 0.5824 respectively, and the average expected heterozygosity (H_e) was 0.7641, 0.7161 and 0.7364, respectively. Cluster analysis of the three wild populations performed with UPGMA (unweighted pair group

收稿日期: 2006-11-08

资助项目: 山东省科技攻关项目 (022110114, 2005GG3205070); 农业结构调整重大技术研究专项 (06-05-04B)

作者简介: 谭 杰 (1980-), 男, 山东乳山人, 硕士研究生, 主要从事水产动物遗传育种研究

通讯作者: 孙慧玲, Tel: 0532-85848631, 13708992117, E-mail: sunhl@ysfri.ac.cn

method with arithmetic mean) confirmed the closer linkage between Weihai and Dalian than their individual distances to Yantai.

Key words: *Apostichopus japonicus*; geographic populations; genetic diversity; microsatellite DNA

仿刺参 (*Apostichopus japonicus*) 属棘皮动物门 (Echinodermata)、游移亚门 (Eleutherozoa)、海参纲 (Holothuroidea)、楯手目 (Aspidochirota)、刺参科 (Stichopodidae)、仿刺参属 (*Apostichopus*), 是食用海参中最名贵的一种。仿刺参在我国大连、北戴河、山东半岛、江苏连云港及平山岛等沿岸均有分布^[1]。近十余年来, 随着全球海参自然资源遭到严重破坏和国内海参消费持续增长, 我国仿刺参养殖呈现迅猛发展态势。对自然资源的过度捕捞, 国外仿刺参品系的引进, 人工底播增殖等人工实践活动可能对仿刺参自然群体的种质资源造成一定程度的破坏。因此, 有必要对仿刺参的遗传多样性, 群体间的遗传变异进行研究, 以指导仿刺参养殖业的持续健康发展。近几年来, 国内外一些学者应用同工酶、微卫星 DNA、mtDNA 技术分析了仿刺参的遗传多样性。如 Kanno 和 Kijima^[2-3]应用仿刺参 10 种同工酶标记阐述了 3 种不同颜色仿刺参之间的遗传差异。Kanno 等^[4]开发了仿刺参 20 个微卫星标记, 并利用这些标记对日本近海的仿刺参进行了遗传多样性的分析。高悦勉等^[5]运用同工酶技术对我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^[6]运用 mtDNA 技术对中国烟台、威海和莱州 3 个地点仿刺参自然和养殖群体遗传多样性进行了研究。

近几年来, 微卫星 DNA 技术被广泛地应用于水产动物养殖群体遗传变异的监测^[7]、数量性状定位^[8]、家系鉴别^[9]、地理种群遗传多样性^[10]的研究中。本研究应用微卫星 DNA 技术对仿刺参 3 个不同地理种群的遗传结构与群体分化进行分析, 为仿刺参种质资源的研究和保护提供相关的遗传背景资料。

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验所用仿刺参 3 个群体各 20 个分别取自烟台 (37°33'33"N; 121°30'33"E)、威海 (37°32'03.0" ~ 37°32'44.5"N; 122°02'30.9" ~ 122°03'01.1"E)、大连 (39°03'40"N; 122°46'00"E) 等海参自然保护

区, 活体运回实验室于 -80 °C 保存。

1.2 方 法

基因组 DNA 的提取参照战爱斌等^[11]的方法, 取仿刺参肌肉组织提取 DNA。提取 DNA 用 TE 溶解, 于 -20 °C 保存。微卫星引物序列参照 Kanno 等^[4]和战爱斌等^[11]的引物 (表 1)。

每个 PCR 反应体系总体积为 10 μL, 含 100 ng 模板 DNA, 1 μmol·L⁻¹ 引物, 0.25 mmol·L⁻¹ dNTPs, 2.5 mmol·L⁻¹ Mg²⁺, 1 × PCR 反应 Buffer, 0.25 U *Taq* DNA 聚合酶。PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 1 min, 按每对引物的退火温度反应 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 7 个循环; 90 °C 变性 30 s, 按每对引物的退火温度反应 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 33 个循环; 72 °C 延伸 5 min。

PCR 产物在 8% 的变性聚丙烯酰胺凝胶中分离, 硝酸银染色。统计各群体样本基因型, 用 Popgen32 计算各微卫星位点在 3 个群体中的多态信息含量 (PIC)^[12]、观测杂合度、期望杂合度^[13]、等位基因数 (a)、有效等位基因数 (a_e)^[14] 以及 F_{is} 、 F_{st} 值的 F -分析进行遗传多样性分析, F_{st} 值在 0 ~ 0.05 之间, 群体遗传分化较弱; 0.05 ~ 0.15 之间, 群体遗传分化中等; 0.15 ~ 0.25 之间, 表示群体遗传分化较大; 当 F_{st} 值大于 0.125 时, 表示分化极大。

有效等位基因数: $a_e = 1 / \sum p_i^2$, 其中 p_i 为第 i 个等位基因的频率。

$$\text{多态信息含量: } PIC = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 - \sum_{i=j=i+1}^{k-1} \sum_{i+1}^k 2p_i^2 p_j^2 = 2 \sum_{i=j=i+1}^{k-1} \sum_{i+1}^k p_i p_j (1 - p_i p_j)$$

其中: k 为等位基因数目; p_i 和 p_j 分别为第 i 和第 j 个等位基因的频率。

平均杂合度观测值: $H_o = \text{观察到的杂合个体总数} / \text{观察到的个体总数}$;

期望杂合度: $H_e = 1 - \sum p_i^2$

固定指数 (F_{is}): $F_{is} = 1 - (H_o / H_e)$

F -统计量 (F_{st}): $F_{st} = \sigma^2 P / P(1 - P)$, P 为某等位基因在整个群体中的平均频率; $\sigma^2 P$ 为该等位基因在分群体之间的方差。

Nei 群体间的相似性系数: $I = \sum (X_i Y_i) / \{ \sum (X_i)^2 \sum (Y_i)^2 \}^{1/2}$

其中, X_i 、 Y_i 分别为 X 和 Y 群体第 i 个位点的等位基因频率^[15]。

Nei 群体间遗传距离: $D_A = -\ln I$, 加上偏差

矫正后为:

$$I = (2n - 1) \sum (X_i Y_i) / \{ \sum [2n (X_i)^2 - 1] \sum [2n (Y_i)^2 - 1] \}^{1/2}$$

其中, X_i 、 Y_i 分别为 X 和 Y 群体第 i 个位点的等位基因频率^[16]。

表 1 仿刺参和红海参微卫星标记

Tab.1 Microsatellite loci in *Apostichopus japonicus* and *Parastichopus californicus*

	位点 lous	Genebank 索引号 genebank accession	核心区序列 core sequence	引物序列 primer sequence	退火温度(℃) annealing temperature
仿刺参 <i>A. japonicus</i>	Psj1828	AB106628	(CA) ₈	F: CAAACGCATACAATTACACA R: CGATCGATAGTCCTCAATC	59
	Psj2022	AB106630	(CA) ₁₃	F: TAAGAGACTTGAGCGGACAC R: AAAGTTGCATATTGGGTTCA	61
	Psj2031	AB106631	(CA) ₁₅	F: ACTAAAAAGTCATGGACACCC R: AATCATAGCCCATTTTTCTGT	61
	Psj2409	AB106637	(CA) ₁₁ .(AT) ₆	F: GCAGGAGGATCTAAAATACAT R: ATCGAACACAAACACACTTATC	61
	Psj2463	AB106638	(CA) ₈	F: GCTGAAGGCAAAAGGAATCT R: GTAGCAAATGTGGCAAGGAT	57
	Psj2642	AB106641	(CA) ₁₃	F: ATAGTCCTGATTTTTGGTTTC R: GAGATACCGTGTTTACAAGC	57
	Psj2889	AB106644	(CA) ₈	F: CGAGACGTTTACTTCCACTG R: AGAGGTTGCTGGCTTTACTC	59
	Psj2969	AB106645	(CA) ₈	F: TTCCTGCCCTTACAAAATAG R: GCAGCAGAATGATGAGTGTG	57
红海参 <i>P. californicus</i>	Psc 2	AF455030	(ACGG) ₂ ... (ACGG) ₄	F: TCTAGGCTAGCCAAACCAAAA R: GATCAAAATTGCATCCACCA	50

2 结果

2.1 PCR 扩增结果及各位点遗传多样性

应用 9 对微卫星引物对仿刺参 3 个地理群体各 20 个个体进行了 PCR 扩增(Psj1828 位点的扩增图谱见图 1)。9 对引物在 3 个群体都表现出较高的多态性,共获得 59 个等位基因,每个位点获得的等位基因数从 4 到 12 不等,每个位点平均获得 6.5556 个等位基因。各个位点 PIC 值从 0.5129 到 0.8794。3 个群体中,烟台群体平均杂合度最高为 0.7641,次之是大连群体为 0.7364,威海群体最低为 0.7161。通过计算基因型的 P 值检验,仿刺参的 3 个群体的 Hardy-Weinberg 平衡偏离常数均发生了不同程度的偏离,结果见表 2。其中,烟台群体在位点 Psj1828、Psj2022、Psj2463 发生显著偏离,在位点 Psj2642 发生极显著偏离;威海群体在位点 Psj2889 发生极显著偏离;大连群体在位点 Psj1828、Psj2022、Psj2409、Psj2889、Psj2969 发生极显著偏离。

2.2 遗传相似性指数、遗传距离及聚类分析

根据 9 个微卫星位点 PCR 扩增结果,运用 TFPGA 软件计算出仿刺参 3 个群体间的遗传相似性指数和遗传距离(表 3),结果表明烟台群体

与威海群体之间的遗传距离最大,遗传相似性最低,威海群体和大连群体之间遗传距离最小,遗传相似性最高。根据群体之间的遗传距离,用 UPGMA 法分析 3 群体之间的亲缘关系(图 2)。根据图 2 结果,威海群体和大连群体遗传距离最小,亲缘关系最近,首先聚在一起;然后两者再与烟台群体聚合。

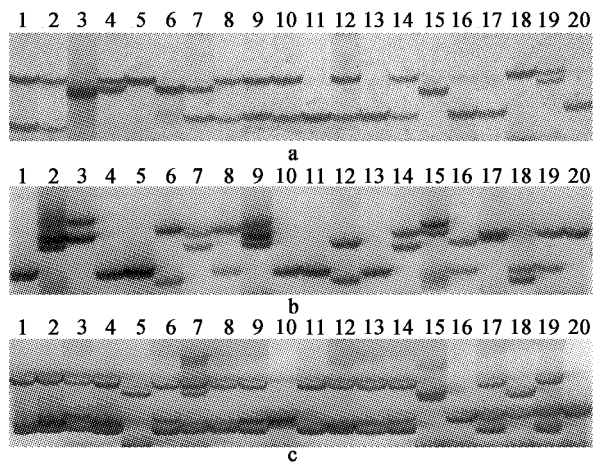


图 1 仿刺参 3 个群体 Psj1828 位点的扩增图谱

Fig.1 Demonstration of microsatellite locus amplified by Psj1828 primer pairs in the three populations of *Apostichopus japonicus*
a. 烟台群体; b. 威海群体; c. 大连群体
a. YT population; b. WH population; c. DL population

表 2 仿刺参微卫星座位的分析检测值

Tab.2 Genetic diversity parameters at the 9 microsatellite loci of *Apostichopus japonicus*

基因座位 locus	群体 populations	等位基因数 a	有效等位基因数 a_e	多态信息含量 PIC	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	P 检验值 P -values
Psj1828	烟台(YT)	5	3.3755	0.6961	0.5500	0.7037	0.0212
	威海(WH)	5	3.6530	0.7123	0.6000	0.7262	0.1320
	大连(DL)	5	3.8278	0.7282	0.8000	0.7388	0.0011
Psj2022	烟台(YT)	8	5.3115	0.7972	0.5556	0.8117	0.0115
	威海(WH)	7	5.0633	0.7912	0.7500	0.8025	0.3219
	大连(DL)	7	4.6512	0.7688	0.5000	0.7850	0.0062
Psj2031	烟台(YT)	7	3.9239	0.7232	0.7895	0.7452	0.5133
	威海(WH)	7	5.1942	0.7931	0.6842	0.8075	0.7104
	大连(DL)	6	4.4693	0.7605	0.5500	0.7762	0.3835
Psj2409	烟台(YT)	4	2.9641	0.6318	0.5882	0.6626	0.1144
	威海(WH)	4	3.2655	0.6544	0.4118	0.7148	0.0564
	大连(DL)	4	3.1008	0.6325	0.2500	0.6775	0.0003
Psj2463	烟台(YT)	5	4.3758	0.7568	0.6316	0.7715	0.0389
	威海(WH)	4	2.2633	0.5578	0.7368	0.5582	0.5611
	大连(DL)	5	2.6316	0.5988	0.5000	0.6200	0.4431
Psj2642	烟台(YT)	6	4.6512	0.7709	0.5000	0.7850	0.0000
	威海(WH)	6	3.4335	0.6767	0.7000	0.7087	0.5549
	大连(DL)	6	4.2078	0.7392	0.4444	0.7632	0.0801
Psj2889	烟台(YT)	6	4.7500	0.7707	0.6842	0.7895	0.5014
	威海(WH)	6	3.4879	0.6776	0.5263	0.7133	0.0000
	大连(DL)	5	3.5242	0.6782	0.6500	0.7162	0.0000
Psj2969	烟台(YT)	6	3.6571	0.7122	0.6250	0.7266	0.2448
	威海(WH)	4	2.2921	0.5129	0.5263	0.5637	0.9392
	大连(DL)	5	3.1373	0.6316	0.6000	0.6812	0.0000
Psc 2	烟台(YT)	12	8.4211	0.8794	0.8500	0.8812	0.0713
	威海(WH)	10	7.7670	0.8683	1.0000	0.8712	0.2372
	大连(DL)	11	7.6809	0.8660	0.9474	0.8698	0.7783
平均值 mean	烟台(YT)	6.5556	4.6033	0.7487	0.6416	0.7641	
	威海(WH)	5.8889	4.0466	0.6938	0.6595	0.7161	
	大连(DL)	6.0000	4.1367	0.7115	0.5824	0.7364	

表 3 仿刺参 3 个野生群体的遗传距离和相似性指数

Tab.3 Genetic identity and genetic distance
in three wild *Apostichopus japonicus* populations

群体 population	烟台 YT	威海 WH	大连 DL
烟台 YT		0.8155	0.8211
威海 WH	0.2039		0.8849
大连 DL	0.1971	0.1223	

注: 对角线以下数据为遗传距离, 对角线以上数据为相似性指数

Notes: data below diagonal are genetic distance; data above diagonal are genetic identity

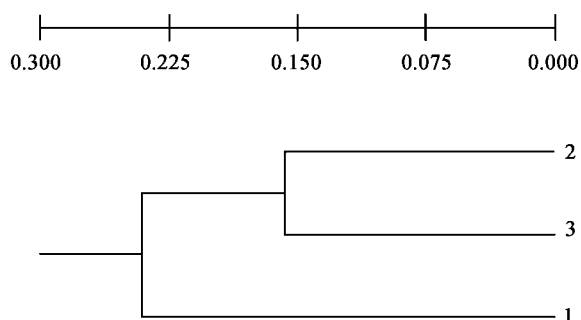


图 2 仿刺参 3 个群体的聚类分析图

Fig.2 UPGMA dendrogram among three wild *Apostichopus japonicus* populations

1. 烟台群体; 2. 威海群体; 3. 大连群体

1. YT population; 2. WH population; 3. DL population

2.3 群体变异分析

从 F -检验的数据来看(表 4),配对比较 F_{st} 值($F_{st} < 0.05$),烟台群体与威海群体之间 F_{st} 值为 0.0370,烟台群体与大连群体之间 F_{st} 值为 0.0342,威海群体与大连群体之间 F_{st} 值为 0.0268,表明 3 个群体间遗传分化程度较弱,而 3 个群体内有 2 个位点遗传分化中等。通过 9 个微卫星座位计算群体间总的遗传分化系数为 0.0432(表 4),表明只有 4.32% 的遗传变异来自于群体间;95.68% 的遗传变异来自于群体内。另外,对 F_{is} 值的计算表明,有 5 个群体位点杂合子处于过剩状态,对整个群体而言,3 个群体均表现为一定程度的杂合子缺失。

表 4 仿刺参 3 个群体 9 个微卫星位点的 F -检验

Tab.4 F -statistics for three populations of *Apostichopus japonicus* at nine microsatellite loci

位点 locus	F_{is}			F_{st}
	烟台 YH	威海 WH	大连 DL	
Psj1828	0.2185	0.1738	-0.0829	0.0390
Psj2022	0.3156	0.0654	0.3631	0.0255
Psj2031	-0.0595	0.1527	0.2915	0.0289
Psj2409	0.1123	0.4065	0.6310	0.0477
Psj2463	0.1813	-0.3201	0.1935	0.0724
Psj2642	0.3631	0.0123	0.4170	0.0375
Psj2889	0.1333	0.2621	0.0925	0.0131
Psj2969	0.1398	0.0663	0.1193	0.1078
Psc 2	0.0355	-0.1478	-0.0892	0.0267
平均值 mean	0.1604	0.0791	0.2090	0.0432

3 讨论

3.1 群体遗传杂合度及杂合度的缺失

遗传杂合度是衡量群体遗传多样性的一个重要参数。本研究中仿刺参 3 个群体平均观测杂合度为 0.5824 ~ 0.6595, Kanno 等运用微卫星技术研究日本群体仿刺参观测杂合度为 0.244 ~ 0.878^[17],与本文结果相似,说明我国仿刺参的群体遗传多样性仍处于较高水平,具有较丰富的育种和遗传改良潜力,应采取相应措施予以保护。

3 个群体都观察到了极显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡的现象,对 F_{is} 值的计算表明,3 个群体均表现为一定程度的杂合度缺失。Kanno 等^[4]运用微卫星技术对日本近海仿刺参进行遗传分析时也发现了杂合度的缺失,而对同样的样本运用同工酶技术进行遗传分析时却未发现偏离

Hardy-Weinberg 平衡的现象,他们认为是微卫星技术本身导致杂合度计算值偏低。例如实验中所测样本含量过小,无效等位基因的存在,均能导致观测杂合度计算值偏小。

无效等位基因在微卫星座位上经常会有较高的出现频率, Ardren 等^[18]在虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 中发现所检测的座位 16% 出现了无效等位基因,李莉等^[19]用微卫星遗传标记对长牡蛎进行遗传作图时发现分析的 15 个微卫星座位中有 7 个出现了无效等位基因,占 46.7%。

3.2 仿刺参群体的遗传变异

国外研究发现,某些海洋动物在幼虫时期,由于长时间处于浮游状态,种群之间能形成显著的基因流,从而造成地理距离较远的不同地理种群之间遗传分化较弱。Sekino 等^[20]应用 11 对微卫星引物对日本沿海牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 7 个地理种群的遗传结构进行了分析,研究发现日本沿海牙鲆 7 个地理种群可分为 3 组,3 个组之间遗传分化较为显著,组内各种群之间尽管地理距离较远遗传分化却较弱。日本沿海牙鲆在成体阶段,活动范围限制在一定海域。他们认为,日本沿海牙鲆部分地理种群之间遗传分化较弱是因为在这些种群之间发生了基因交流。牙鲆幼体在 25 ~ 50 d 的浮游生活期间,在洋流的作用下移动了 600 km 甚至更远的距离,从而在一些地理种群之间形成了基因流。Uthicke 等^[21]应用同工酶技术对新额里多尼亚岛沿岸的糙海参进行遗传分析时发现,由于糙海参幼体浮游生活持续 10 ~ 14 d,并且在饵料缺乏的情况下仍能生存较长时间,糙海参的幼体可在浮游阶段借助洋流或者风力游动,从而使相距 150 km 的地理种群之间形成基因流,遗传分化不显著^[21]。仿刺参幼体发育到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^[22]。在本研究中,3 个仿刺参地理种群之间配对比较 F_{st} 值均小于 0.05,表明 3 个群体之间遗传分化较弱。在地理上,3 个群体之间最远距离仅为 190 km 左右,各种群的仿刺参幼体可能在浮游期间借助风力迁移到其他种群,在 3 个种群之间形成基因流,导致种群之间遗传距离较近,遗传分化不显著。本研究用 UPGMA 法得到三个群体的聚类分析图与三群体的地理分布不一致,这可能与黄、渤海的气候条件有关,在仿刺参自然

繁殖季节,黄、渤海域季风主要是南风,造成仿刺参威海群体、烟台群体与大连群体之间的基因交流较强,而烟台群体与威海群体之间基因交流较弱。此外,各地之间的种质活动交流,养殖仿刺参的逃逸也会对仿刺参的遗传变异造成影响。

参考文献:

- [1] 王秉和,李文波.世界海参渔业[J].齐鲁渔业,1998,15(4):45-46.
- [2] Kanno M, Kijima A. High genetic variability of isozymes in Japanese sea cucumber *Stichopus japonicus* [J]. Fish Genet Breed Sci, 2002, 31: 7-12.
- [3] Kanno M, Kijima A. Genetic differentiation among three color variants of Japanese sea cucumber *Stichopus japonicus* [J]. Fish Sci, 2003, 69: 806-812.
- [4] Kanno M, Li Q, Kijima A. Isolation and characterization of twenty microsatellite loci in Japanese sea cucumber (*Stichopus japonicus*) [J]. Mar Biotechnol, 2005, 7(3), 179-183.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Li Q, Park C, Endo T, et al. Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery strains of the Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*) [J]. Aquaculture, 2004, 235:207-222.
- [8] Sakamoto T, Danzmann R G, Okamoto N, et al. Linkage analysis of quantitative trait loci associated with spawning time in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 1999, 173:33-43.
- [9] 王鸿霞,吴长功,张留所,等.微卫星标记应用于凡纳滨对虾家系鉴别的研究[J].遗传,2006,28(2):179-183.
- [10] 刘萍,孟宪红,何玉英,等.中国对虾黄、渤海3个野生地理群遗传多样性的微卫星 DNA 分析[J].海洋与湖沼,2004,35(3):252.
- [11] 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.
- [12] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism [J]. Am J Hum Genetic, 1980, 32(3):314-331.
- [13] Nei M. Genetic distance between populations [J]. Am Nat, 1972, 106:283-292.
- [14] Crow A J, Kimura M. Evolution in sexual and asexual population [J]. Am Nat, 1965, 99:439-450.
- [15] Nei M. Genetic distance between populations [J]. Am Nat, 1972, 106, 283-292.
- [16] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. Genetics, 1978, 89:583-590.
- [17] Kanno M, Suyama Y, Li Q, et al. Microsatellite analysis of Japanese sea cucumber, *Stichopus (Apostichopus) japonicus*, supports reproductive isolation in color variants [J]. Mar Biotechnol (NY), 2006, 8(6):672-85.
- [18] Ardren W R, Borer S. Inheritance of 12 microsatellite loci in *Oncorhynchus mykiss* [J]. J Hered, 1999, 90(5):529
- [19] 李莉.长牡蛎分子标记的筛选和遗传图谱的构建[D].中国科学院海洋研究所博士学位论文,2003.
- [20] Sekino M, Hara M. Application of microsatellite markers to population genetics studies of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. Marine Biotechnology, 2001, 3:572-589.
- [21] Uthicke S, Purcell S. Preservation of genetic diversity in restocking of the sea cucumber *Holothuria scabra* investigated by allozyme electrophoresis [J]. Can J Fish Aquat Sci, 2004, 61:519-528.
- [22] 于东祥,孙慧玲,陈四清,等.海参健康养殖技术[M].北京:海洋出版社,2005.