

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20201204001

http://www.yykxjz.cn/

左闪, 温争争, 周红学, 倪乐海, 孙国华, 冯艳微, 王卫军, 杨建敏. 基于MSAP技术的刺参选育群体基因组表观与序列遗传多样性分析. 渔业科学进展, 2021, 42(3): 38-45

Zuo S, Wen ZZ, Zhou HX, Ni LH, Sun GH, Feng YW, Wang WJ, Yang JM. Evaluation of epigenetic and genome sequence diversity in sea cucumber *Apostichopus japonicus* selected population based on MSAP technology. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(3): 38-45

## 基于MSAP技术的刺参选育群体基因组 表观与序列遗传多样性分析\*

左 闪<sup>1,2,3</sup> 温争争<sup>1,2,3</sup> 周红学<sup>4</sup> 倪乐海<sup>5</sup> 孙国华<sup>3,6①</sup>  
冯艳微<sup>3</sup> 王卫军<sup>3</sup> 杨建敏<sup>3</sup>

(1. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306; 2. 上海海洋大学 上海水产养殖工程技术研究中心 上海 201306; 3. 鲁东大学农学院 烟台 264025; 4. 山东省农业农村厅 济南 250013; 5. 山东省渔业技术推广站 济南 250013; 6. 烟台海育海洋科技有限公司 烟台 264001)

**摘要** 抗逆选育引起的遗传变化不仅源于DNA序列的变化,也有来自于表观层面的修饰改变。为探究刺参(*Apostichopus japonicus*)耐高温新品系育种过程中的选育基础群体与选育群体的遗传多样性,运用MSAP技术分析了选育基础群体F、选育F<sub>1</sub>代和选育F<sub>4</sub>代的基因组遗传多样性。结果显示,10对引物获得的806个位点中,多态性位点为698个,多态性百分比达到86.60%;基于非甲基化位点的遗传分析,选育F<sub>4</sub>代香农多态性指数为0.3981, Nei基因多样性为0.2264;基于甲基化敏感位点分析,选育F<sub>4</sub>代香农多态性指数为0.5873, Nei基因多样性为0.2598,均高于基础群体;表观遗传多样性均大于非甲基化位点变异产生的序列遗传多样性,表明表观变异出现频率高于序列遗传变异。MSAP甲基化模式分析显示,选育F<sub>1</sub>和F<sub>4</sub>代经过选育后获得了一些甲基化水平和模式的改变,说明经温度胁迫选育,改变了刺参群体的基因组的甲基化状态。选育F<sub>4</sub>代获得的类型II的条带数最多,为161条,明显高于未选育刺参,为选育获得表观遗传特征。研究结果从遗传物质基础角度揭示了选育群体的遗传改变与进展,可为抗逆新品种选育中的表观遗传研究提供参考。

**关键词** 刺参; MSAP; DNA甲基化; 选育群体; 遗传多样性

**中图分类号** S968.9 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)03-0038-08

刺参(*Apostichopus japonicus*), 又称仿刺参, 生活在岩礁底的浅海中, 广泛分布于西太平洋沿岸浅海。随着刺参养殖规模的迅速扩大, 刺参产业发展面临的种质退化、病害频发、极端气候灾害等严峻问题

日益突出(高凯伦, 2018; 张春云等, 2004)。目前, 刺参苗种产业中亲参的来源主要是遗传背景不清楚的“野生”刺参以及累代繁育的人工养殖刺参, 由此构成的苗种繁育的种质基础群体, 其后代往往出现生长

\* 国家重点研发计划课题(2018YFD0901601; 2018YFD0901602)、山东省现代农业产业技术体系(SDAIT-22-02)和泰山产业领军人才(tscy20190114)共同资助 [This work was supported by Key Research and Development Project of Science and Technology Ministry (2018YFD0901601; 2018YFD0901602), Modern Agricultural Technology System of Shandong Province (SDAIT-22-02), and Taishan Industry Leading Talent (tscy20190114)]. 左 闪, E-mail: zs140608@163.com

① 通讯作者: 孙国华, 研究员, E-mail: sgh\_smile@163.com

收稿日期: 2020-12-04, 收修改稿日期: 2020-12-29

缓慢、个体差异大、应激性差、抗逆抗病性弱等现象, 严重影响了刺参养殖产业的健康发展(侯西坦, 2016; 曲洪霞等, 2016)。与此同时, 近年来气候变化带来的极端高温天气造成山东、辽宁等大面积养殖池塘刺参大量死亡, 对沿海刺参养殖产业带来沉重打击。因此, 培育刺参优良抗逆新品种是解决刺参优良种质匮乏和安全度夏瓶颈问题的重要出路, 刺参种业关乎刺参产业乃至整个水产养殖业的提质增效和稳定发展。针对目前对优良种质的需求, 全国多团队进行了不同表型特征刺参的新品种创制和研发, 本课题组经过连续4代多年的高温驯化和胁迫选育, 培育出一个高温耐受性能提高的刺参新品系, 在养殖生产试验中表现出度夏成活率高、产量提高等优势。

近20年以来, 表观遗传学研究取得了长足进展, 已有研究表明, 遗传表型改变不仅来源于DNA序列的改变, 也存在不依赖序列变化的表观遗传修饰。表观遗传变异研究主要有DNA的甲基化修饰、核小体中组蛋白翻译后修饰、非编码RNA调控、组蛋白变体及受催化的染色质重塑等方面(Wolffe *et al.*, 1999; 王淑妍等, 2016; 康静婷等, 2013)。DNA甲基化是表观遗传修饰的一个重要方式, 也是目前在机制方面研究相对最多、最深入的表观遗传过程(邱峥艳等, 2012)。环境条件变化能够诱导DNA甲基化发生变异, 并且环境条件变化能够诱导具有持续性和可遗传性的DNA甲基化和表观变异(李佳蓉等, 2018)。某些DNA甲基化在多种表观遗传机制中具有中心协调的作用, 可以在后代进行稳定传递, DNA甲基化的这些特性决定其在动植物育种中, 特别是抗逆性状的遗传改良方面具有非常大的应用潜力。在我们的刺参耐高温品系的选育过程中, 其抗逆耐高温性状是在胁迫环境条件下驯化和筛选获得, 这种优良性状是否具有表观遗传层面的遗传基础, 需要进行探究。

甲基化敏感扩增多态性(Methylation-sensitive amplification polymorphisms, MSAP)技术是DNA甲基化模式研究最有效且经济实用的应用技术(Angers *et al.*, 2010; Guarino *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2015), 由于采用的限制酶的位点特性, 可以同时进行甲基化敏感位点表观遗传多样性分析, 也可以进行非甲基化多态位点的遗传多样性分析(吴彪等, 2015; Zhao *et al.*, 2015)。本研究运用MSAP技术分析了刺参育种过程中的选育基础群体和2个选育群体(选育F<sub>1</sub>代和选育F<sub>4</sub>代)3个刺参群体的DNA甲基化多态性和模式, 揭示不同刺参群体的表观遗传多样性及其遗传结构, 就选育活动对基因组DNA甲基化的影响进行探讨, 以

期从表观遗传学角度来阐释选育过程中的遗传基础的变化。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验所用群体为刺参耐高温新品系选育过程中的选育基础群体F、选育F<sub>1</sub>代和选育F<sub>4</sub>代。其中, 基础群体为4个种质保护区野生刺参群体繁殖获得, 选育F<sub>1</sub>代和F<sub>4</sub>代为选育过程代表群体, 是采用群体选育技术经过浮游幼体期27℃热驯化120 min和16月龄期32℃高温胁迫72 h淘汰选择, 并辅以生长速度筛选获得。在选育生产过程中, 由于亲本较为珍贵, F<sub>2</sub>和F<sub>3</sub>亲本较少, 没有保留用作分析样本, F<sub>1</sub>和F<sub>4</sub>作为选育初和选育完成群体可以代表选育过程且能体现选育的遗传特征。3个刺参群体分别记作F、F<sub>1</sub>和F<sub>4</sub>。从3个群体中分别随机选取18月龄、体重为200 g左右的15头刺参保存待分析。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 基因组DNA的提取** 剖取待测刺参的肌肉附带内膜组织, 用于全基因组DNA提取, 采用改进的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法进行(全志星等, 2017)。取组织块约50 mg, 置于预冷的研钵中, 在液氮中充分碾磨后, 加入65℃预热的CTAB裂解液[2% CTAB (W/V), 0.2 mmol/L Tris-HCl (pH=8.0), 0.05 mmol/L EDTA(pH 8.0), 1.4 mmol/L NaCl, 2% β-巯基乙醇(V/V) 1 ml, 1% PVP-40(W/V)], 等体积氯仿抽提上清液后, 用3 mmol/L 醋酸钾和异丙醇沉淀DNA, 最后经无水乙醇漂洗, 加入1 mmol/L NaCl溶解DNA, 通过1.5%琼脂糖电泳检测DNA是否降解, 检测OD<sub>260 nm/280 nm</sub>以确定DNA的纯度, 存于-20℃中备用。

**1.2.2 MSAP实验流程** 参考郭婷婷等(2013)的方法并进行优化, 所用引物和接头序列见表1。

选用EcoR I、Msp I和Hpa II进行酶切反应, 分别以2种酶切组合进行样品DNA的酶切, 即EcoR I+Hpa II和EcoR I+Msp I。10 μmol/L的EcoR I-A和100 μmol/L的M-H-A单链等体积混合制备接头, 0.5 μl接头与上述酶切产物15 μl、175 U的T4连接酶在25 μl连接体系下, 16℃水浴过夜, 获得连接产物。以引物E00-A和MH00-T进行预扩增, PCR反应条件: 94℃预变性2 min, 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30个循环, 72℃延长5 min, 最后4℃保存。以选择性扩增引物的不同组合进行选择扩增,

表 1 MSAP 引物和接头序列  
Tab.1 MSAP primer and linker sequence

名称 Name	接头与引物 Linker and primer	接头及引物序列 Sequence of linker and primer
接头 Linker	<i>EcoR</i> I -A	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'
	M-H-A	5'-GACGATGAGTCTAGAA-3' 3'-CTACTCAGATCTTGC-5'
预扩增引物 Pre-amplification primer	E00-A	5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'
	MH00-A	5'-GATGAGTCTAGAACGGT-3'
选择性扩增引物 Selective amplification primer	<i>EcoR</i> I	E1 5'-GACTGCGTACCAATTCAAC-3'
		E2 5'-GACTGCGTACCAATTCAAG-3'
		E3 5'-GACTGCGTACCAATTCAACA-3'
		E4 5'-GACTGCGTACCAATTCAAGT-3'
		E5 5'-GACTGCGTACCAATTCAATC-3'
	M-H	M1 5'-FAMGATGAGTCTAGAACGGTAC-3'
		M2 5'-FAMGATGAGTCTAGAACGGTAG-3'
M3 5'-GATGAGTCTAGAACGGTTC-3'		

注：斜体表示选择性碱基，加粗为核心序列，下划线表示酶切位点

Note: Italic indicates selective bases, bold is core sequence, and underline indicates restriction site

PCR 反应条件: 94℃ 预变性 2 min, 94℃ 30 s, 65℃ (每个循环递减 1℃) 30 s, 72℃ 1 min, 共进行 10 个递减循环; 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min, 20 个循环, 72℃ 保温延长 5 min, 最后 4℃ 保存。

**1.2.3 MSAP 数据分析** 通过优化 MSAP 实验条件, 从不同引物组合中筛选多态性好、重复性高、条带清晰的 10 对引物组合进行实验分析。利用 Quantity One 软件标记出 5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱中 100~500 bp 区间扩增出来的条带。根据扩增产物在 2 个泳道内有无的情况, 可将条带类型分为 4 种, I 型 2 个泳道均有带; II 型 H 泳道有带, M 泳道无带, 代表半甲基化位点; III 型 H 泳道无带, M 泳道有带; IV 型 2 个泳道均没有带。根据 Cervera 等(2002)提出的方法, 把 MSAP 二维矩阵数据分为甲基化敏感位点 (Methylation-susceptible loci, MSL) 和非甲基化位点 (Non-methylated loci, NML) 两大类。MSL 指只能够被 *Hpa* II 或 *Msp* I 中的一种酶切开, 为 (1,0) 或 (0,1) 情况, 即甲基化模式 (II、III 型) 记为 1, 其余模式 (I、IV 型) 记为 0。NML 指同时能被 *Hpa* II 和 *Msp* I 酶切开, 为 (1,1) 情况, 即甲基化模式 I 型记为 1, 其余模式 (II、III、IV 型) 都记为 0。

利用 Popgene 软件对等位基因数、杂合度、香农多态性指数等种群遗传学参数进行分析和计算。通过 NTsys 软件将 0/1 矩阵转化成相应的 MSP (甲基化敏感位点) 和 MISP (甲基化不敏感位点) 聚类图谱, 基于甲基化敏感位点的表观遗传距离和基于非甲基化位点的遗传距离进行 Mantel 检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 刺参群体 MSAP 多态性及遗传多样性

刺参群体遗传多样性的各项指标显示 (表 2), 10 对引物获得的 806 个位点中, 多态性位点数量为 698 个, 多态性位点的百分比为 86.60%, 表明本研究所用引物组合适用于刺参群体表观遗传多样性的研究。10 对引物观察等位基因数 ( $N_a$ ) 平均值为 1.8767, 有效等位基因数 ( $N_e$ ) 平均值为 1.4809, 平均杂合度 ( $H$ ) 为 0.2897, 平均香农多态性指数 ( $I$ ) 为 0.4439。引物组合 E3M3 多态性位点百分比高达 95.51%, 产生的  $N_a$ 、 $N_e$ 、 $H$  和  $I$  高于其他所有引物组合, 是遗传多样性贡献率最大的引物对; 引物组合 E1M1 的  $N_e$ 、 $H$  和  $I$  均为最低值, 是遗传多样性贡献率最低的引物对。

### 2.2 MSL/NML 遗传多样性信息

分别对 3 个刺参群体进行甲基化敏感位点 (MSL) 和非甲基化位点 (NML) 的多态性统计与分析 (表 3), NML 百分比在 47.7%~50.1% 范围内; 香农多态性指数  $I$  为 0.3981~0.4662, Nei's 基因多样性  $H$  为 0.2264~0.2475, 选育基础群体 F 的种群多态性指数最高。MSL 百分比在 63%~65% 范围内;  $I$  为 0.5873~0.6030,  $H$  为 0.2598~0.2892。无论是以 MSL 还是 NML 计算的遗传多态性指数, 选育 F<sub>1</sub> 代和 F<sub>4</sub> 代均小于选育基础群体 F, 表明选育降低了群体的遗传多样性。选育 F<sub>1</sub> 代和 F<sub>4</sub> 代的 NML 百分比分别为 50.1% 和 47.7%;  $I$  分

别为 0.4337 和 0.3981;  $H$  分别为 0.2460 和 0.2264。选育  $F_1$  代和  $F_4$  代的 MSL 百分比分别为 66%和 65%;  $I$  分别为 0.5995 和 0.5873;  $H$  分别为 0.2654 和 0.2598。无论是以 MSL 还是 NML 计算的遗传多态性指数,

选育  $F_1$  代均高于  $F_4$  代, 说明随着群体选育代数的累加, 群体遗传多样性具有逐渐降低的趋势。同时, 基于 MSL 计算都大于基于 NML 得到的遗传多样性, 表明表观变异出现频率高于基因序列遗传变异。

表 2 引物组合的遗传多样性信息

Tab.2 Genetic diversity information of primer combinations

引物 Primer	等位基因数 Number of alleles ( $N_a$ )	有效等位基因数 Number of Effective alleles ( $N_e$ )	杂合度 Heterozygosity ( $H$ )	香农多态性指数 Shannon polymorphism Index ( $I$ )	多态位点数 Number of polymorphic sites	总位点数 Total number of sites	多态性位点百分比 Percentage of polymorphic sites
E1M1	1.7833±0.4155	1.4438±0.3418	0.2558±0.1814	0.4012±0.2537	47	60	78.33
E1M3	1.7273±0.4488	1.5096±0.3550	0.2927±0.1950	0.4276±0.2782	48	66	72.73
E2M2	1.9254±0.2648	1.5098±0.3069	0.3034±0.1531	0.4662±0.2019	62	67	92.54
E2M3	1.8955±0.3081	1.5194±0.3019	0.3124±0.1529	0.4707±0.2073	55	67	82.09
E3M1	1.8736±0.3343	1.4515±0.3052	0.2781±0.1608	0.4259±0.2199	76	87	87.36
E3M3	1.9551±0.2084	1.5256±0.2909	0.3188±0.1389	0.4842±0.1787	85	89	95.51
E4M2	1.8082±0.3964	1.4369±0.3260	0.2659±0.1730	0.4047±0.2415	59	73	80.82
E5M1	1.9381±0.2421	1.5278±0.3097	0.3162±0.1484	0.4784±0.1930	91	97	93.81
E5M2	1.9286±0.2589	1.4807±0.3123	0.2934±0.1520	0.4499±0.1988	85	98	86.93
E5M3	1.9314±0.2455	1.4044±0.2806	0.2600±0.1432	0.4303±0.1897	90	102	88.24
平均/总 Mean/Total	1.8767	1.4809	0.2897	0.4439	698	806	86.80

表 3 3 个刺参群体 MSAP 多态性及遗传多样性

Tab.3 MSAP polymorphism and genetic diversity of three *A. japonicus* populations

群体 Population	遗传参数 Genetic parameters	选育基础 F Control F	选育 $F_1$ Selected $F_1$	选育 $F_4$ Selected $F_4$
非甲基化位点 Non-methylated loci (NML)	总位点数 Total number of sites	418	390	391
	多态位点数 Number of polymorphic sites	201	195	187
	多态性位点百分比 Percentage of polymorphic sites (%)	48.2	50.1	47.7
	香农多态性指数 Shannon polymorphism index	0.4662	0.4337	0.3981
	Nei's 基因多样性 Nei's gene diversity	0.2475	0.2460	0.2264
	甲基化敏感位点 Methylation-susceptible loci (MSL)	总位点数 Total number of sites	399	411
多态位点数 Number of polymorphic sites		251	271	265
多态性位点百分比 Percentage of polymorphic sites (%)		63	66	65
香农多态性指数 Shannon Polymorphism Index		0.6030±0.0917	0.5995±0.0970	0.5873±0.0986
Nei's 基因多样性 Nei's gene diversity		0.2892	0.2654	0.2598

2.3 刺参群体的甲基化模式

根据 MSAP 获得的 4 种带型进行不同甲基化模

式的统计, 表 4 为 3 个刺参群体甲基化类型统计结果, 类型 I 条带数百分比为 48.39%~51.86%, 选育基础群

体获得的类型 I 条带数最多,为 418 条;类型 IV 条带数最少,占比 12.28%~13.03%。类型 II 条带数百分比为 15.76%~19.98%,选育 F<sub>1</sub> 和 F<sub>4</sub> 代获得的类型 II 条带数较选育基础群体有所增高,其中, F<sub>4</sub> 代最多,为 161 条。选育 F<sub>1</sub> 和 F<sub>4</sub> 代的类型 III 和类型 IV 条带数相近。

半甲基化和全甲基化总体称整体甲基化,将整体甲基化、半甲基化和全甲基化模式比较分析发现(图 1),选育基础群体半甲基化低于全甲基化,2 个选育群体半甲基化位点升高,整体甲基化水平高于选育基础群体,选育 F<sub>1</sub> 和 F<sub>4</sub> 代呈现相同的改变趋势。

表 4 3 个刺参群体 DNA 甲基化类型统计

Tab.4 Statistics of DNA methylation types of three *A. japonicus* populations

群体 Population	I 型条带 Type I strip		II 型条带 Type II strip		III 型条带 Type III strip		IV 型条带 Type IV strip	
	数量 Amount	百分比 Percentage	数量 Amount	百分比 Percentage	数量 Amount	百分比 Percentage	数量 Amount	百分比 Percentage
	选育基础 F Control F	418	51.86	127	15.76	162	20.10	99
选育 F <sub>1</sub> Selected F <sub>1</sub>	390	48.39	159	19.73	152	18.86	105	13.03
选育 F <sub>4</sub> Selected F <sub>4</sub>	391	48.51	161	19.98	150	18.61	104	12.90

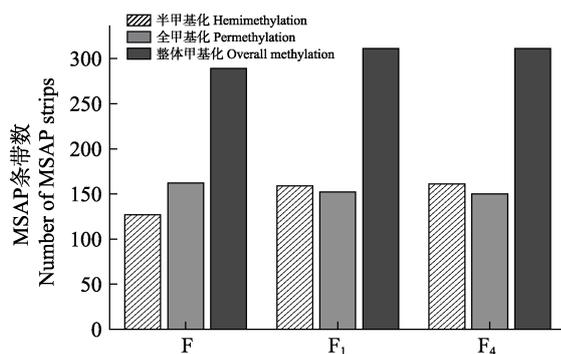


图 1 3 个刺参群体甲基化状态比较

Fig.1 Comparison of the methylation status of three *A. japonicus* populations

## 2.4 表观遗传距离与遗传距离的 Mantel 检验

对刺参 3 个群体基于甲基化敏感位点和非甲基化位点的遗传距离进行 Mantel 检验,结果显示,相关系数  $r$  值为 0.305~0.480,平均值为 0.373,种群的表观遗传距离与序列遗传距离的相关性均达到显著水平( $P < 0.01$ ),说明基于甲基化敏感位点计算的表观遗传变异一定程度上依赖于序列遗传变异(表 5)。

表 5 3 个刺参群体种群遗传距离与表观遗传距离的 Mantel 检测

Tab.5 Mantel detection of population genetic distance and epigenetic distance of three *A. japonicus* populations

群体 Population	$r$	$P$
选育基础 F Control F	0.333	<0.01
选育 F <sub>1</sub> Selected F <sub>1</sub>	0.305	<0.01
选育 F <sub>4</sub> Selected F <sub>4</sub>	0.480	<0.01
平均 Average	0.373	-

## 3 讨论

### 3.1 DNA 甲基化与遗传育种

生物体通过基因表达的改变来实现表型上的改变,借助表型上的变化来不断进行生理及行为上的调节,进而适应环境变化,在基因表达调控方式中,作为表观遗传重要内容的 DNA 甲基化是重要途径之一(王忠华等, 2013)。目前,很多研究已经证明环境胁迫刺激能够使生物体通过改变 DNA 甲基化状态从而调控基因的表达以适应新环境(甄艳等, 2018; 高凯伦, 2018)。生物外界生存环境条件的改变,不仅可通过 DNA 甲基化修饰对生物体本身产生表观遗传上的变异,有些 DNA 甲基化修饰还可以经遗传传递给后代(Kakutani *et al*, 1999),这些环境胁迫诱导的 DNA 甲基化修饰通常认为具有可逆或可丢失性,但越来越多的研究证明,有些 DNA 甲基化比较稳定并可以延续若干个世代(Kakutani, 2002),这种现象称为跨代遗传,这一特点为 DNA 甲基化等表观遗传变异在动植物育种上的应用提供了可能。DNA 甲基化在优良性状新品种的育种工作中,尤其是抗逆性状的遗传改良方面具有巨大的应用潜力(Richardson *et al*, 2006; Schmitz *et al*, 2013; Ruizgarcia *et al*, 2005)。

环境胁迫对生物体基因组 DNA 甲基化的影响是复杂多向的, DNA 甲基化的变化不仅可以产生有利的表型变异,也可能产生有害的表型变异,而目前进行有益性状表型的育种还不能通过有目的地改变 DNA 甲基化状态来实现。在本研究刺参的耐高温品

系的育种过程中,对选育群体进行了多次的高温胁迫淘汰,这种环境胁迫是否通过 DNA 甲基化的修饰改变获得了有利的表型,增强了刺参选育系的耐高温抗逆性状,需要探究。现阶段利用 DNA 甲基化的检测方法追踪检测刺参育种过程中表观遗传的改变,可以为后期更深入利用表观遗传修饰来进行抗逆品种的培育和遗传改良提供理论依据。

### 3.2 选育群体的遗传多样性

MSAP 检测到条带分为甲基化敏感位点和非甲基化位点。甲基化敏感位点的多态性是由 CCGG 位点的胞嘧啶甲基化变化引起,一般认为,甲基化变异易受环境的诱导(Richards *et al.*, 2010; Schmid *et al.*, 2018; 郭万里, 2006)。本研究中,基于甲基化敏感位点的 Shannon 指数,即能够表示表观遗传多样性的参数,在基础群体和选育群体中有所改变,可以推测选育群体在高温胁迫淘汰选育环境下发生了甲基化变异。非甲基化位点变异主要由基因组序列变异引起,可以利用这些序列变异评估群体遗传多样性。本研究结果显示,随着选育世代的增加,基于非甲基化位点的 Shannon 多样性指数逐渐降低,  $F > F_1 > F_4$ ,说明选育的筛选措施降低了种群的遗传多样性,种群的非甲基化位点变异出现随选育增强的渐变特征。另外,基于甲基化敏感位点计算得到的表观遗传多样性都大于基于非甲基化位点变异得到的遗传多样性,在3个选育相关种群中,表观变异出现频率高于传统遗传变异,表明在3个刺参群体中由 DNA 甲基化引起的表观变异更易受外界环境影响。

一般认为,表观变异比遗传变异更易受环境影响,环境诱导促进表型变异,从而适应环境(Angers *et al.*, 2010; Guarino *et al.*, 2019; Vaughn *et al.*, 2007),快速而直接,且体现一定的独立性,同时,表观遗传变异可促进遗传变异的产生,有助于生物对环境的适应及促进表型上的多样性(Lewis *et al.*, 2007; 燕雪飞, 2014)。本研究中,3个刺参群体基于甲基化敏感位点和基于非甲基化位点的遗传距离相关性分析显示,二者在3个种群相关性显著,说明在刺参优良品系的选育过程中,表观变异在一定程度上与遗传变异相互依赖和影响。

### 3.3 选育对甲基化状态和模式的影响

从刺参选育基础群体 F 和选育  $F_1$  代、 $F_4$  代甲基化模式分析结果来看,3个种群间甲基化模式有较大的不同,其中,  $F_1$  代与  $F_4$  代的半甲基化位点和整体甲基化位点比较相近,且二者都表现为半甲基化位点

高于各自全甲基化位点。张鹏远(2012)研究表明,不同的地域环境确实对烟草甲基化状态产生了影响;周艳华等(2015)研究也表明,茶树在抗寒响应中出现 DNA 甲基化现象,因此,不同刺参群体甲基化模式存在显著差异,推测是由于选育逆境胁迫适应所致。选育  $F_4$  代获得的类型 II 条带数最多为 161 条,明显高于未选育刺参,这种改变可认为是选育群体由于选育活动获得的表观遗传上的改变。本研究中,不同刺参群体在选育过程中经历不同的生存环境可能是导致甲基化模式差异的原因。

甲基化状态和模式数据说明,选育改变了 DNA 甲基化水平,并对模式产生了影响,刺参选育  $F_1$  与  $F_4$  代经过选育后获得一些甲基化位点的改变,甲基化状态变化趋势相近,说明温度胁迫选育改变了刺参群体的基因组的甲基化状态。这可能是由于基因组原来的甲基化水平、模式等甲基化状态受到选育压力的影响,开启某些功能基因的转录表达等生理代谢过程,致使选育对象产生了适应机制来应对环境胁迫的影响,并且在选育过程中将这种机制传递给了后代。在刺参的抗逆耐高温选育期间,选育材料在胁迫环境响应和适应中,表观遗传修饰可能起到很大作用。

## 4 结论与展望

本研究利用 10 对 MSAP 引物对 3 个刺参选育群体的遗传多样性及表观遗传多样性进行分析,从遗传物质基础的角度揭示选育群体的遗传改变与进展,为抗逆新品种选育中的表观遗传研究提供了参考。DNA 甲基化在水产动物遗传育种中的研究刚刚起步,但随着 DNA 甲基化分析技术的进步,尤其是随着新一代大规模测序技术的迅速发展, DNA 甲基化相关研究在群体遗传关系分析、分子育种、性状分析及分子标记辅助选择等方面将发挥重要作用。

## 参 考 文 献

- Angers B, Castonguay E, Massicotte R. Environmentally induced phenotypes and DNA methylation: How to deal with unpredictable conditions until the next generation and after. *Molecular Ecology*, 2010, 19(7): 1283–1295
- Cervera MT, Ruiz GL, Martinez ZJ. Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation-sensitive AFLP markers. *Molecular Genetics and Genomics*, 2002, 268(4): 543–552
- Gao KL. The expression of growth-related genes and transcriptome analysis of individual size differences in *Apostichopus japonicus*. Master's Thesis of Dalian Ocean University, 2018 [高凯伦. 刺参(*Apostichopus japonicus*)生长相关基因的表达及个体大小差异的转录组分析. 大连海洋大学硕士研究生学位论文, 2018]

- Guarino F, Cicutelli A, Brundu G, *et al.* The use of MSAP reveals epigenetic diversity of the invasive clonal populations of *Arundo donax* L. *PLoS One*, 2019, 14(4): e0215096
- Guo TT, Sun GH, Yang JM, *et al.* MSAP analysis of genome DNA methylation in different tissues of *Apostichopus japonicus*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(1): 77–82 [郭婷婷, 孙国华, 杨建敏, 等. 刺参(*Apostichopus japonicus*)不同组织基因组甲基化状态 MSAP 分析. *海洋与湖沼*, 2013, 44(1): 77–82]
- Guo WL. Molecular genetic and epigenetic diversity and genetic structure of wild barley (*Hordeum brevisubulatum* (Trin.) Link.) natural populations endemic to Songnen Plain, China. Doctoral Dissertation of Northeast Normal University, 2006, 22–26 [郭万里. 中国松嫩平原短芒野大麦天然种群分子遗传与表观遗传多样性及其种群遗传结构的研究. 东北师范大学博士研究生学位论文, 2006, 22–26]
- Hou XT. Assessment of important economic traits and genetic diversity of four selective strains of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Master's Thesis of Tianjin Normal University, 2016 [侯西坦. 刺参(*Apostichopus japonicus*)不同选育品系的重要经济性状评价及遗传差异分析. 天津师范大学硕士研究生学位论文, 2016]
- Kakutani T, Munakata K, Richards EJ, *et al.* Meiotically and mitotically stable inheritance of DNA hypomethylation induced by *ddm1* mutation of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 1999, 151(2): 831–838
- Kakutani T. Epi-alleles in plants: Inheritance of epigenetic information over generations. *Plant Cell Physiology*, 2002, 43(10): 1106–1111
- Kang JT, Liang QJ, Liang C, *et al.* Overview on epigenetics and its progress. *Science and Technology Review*, 2013(19): 66–74 [康静婷, 梁前进, 梁辰, 等. 表观遗传学研究进展. *科技导报*, 2013(19): 66–74]
- Lewis NL, Zhan S. The plant genome's methylation status and response to stress: Implications for plant improvement. *Current Opinion in Plant Biology*, 2007, 10: 317–322
- Li JR, Jiang HZ. Application of epigenetics for genetic breeding of domestic animals. *Journal of Economic Animal*, 2018(3): 132–138 [李佳蓉, 姜怀志. 表观遗传学在家养动物遗传育种中的应用. *经济动物学报*, 2018(3): 132–138]
- Qiu ZY, Guo J, Yang C, *et al.* Research progress of DNA methylation in animal genetics and breeding. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2012, 39(7): 173–178 [邱峥艳, 郭将, 杨春, 等. DNA 甲基化在动物遗传育种中的研究进展. *中国畜牧兽医*, 2012, 39(7): 173–178]
- Qu HX, Liu XT, Yang YN. Problems and countermeasures in the development of sea cucumber industry. *Agriculture and Technology*, 2016, 36(22): 138–138 [曲洪霞, 刘心田, 杨燕妮. 刺参产业发展存在的问题及应对措施. *农业与技术*, 2016, 36(22): 138–138]
- Quan ZX, Tian JY, Zhang SY, *et al.* Studies on epigenetic diversity variation characteristics of *Flaveria bidentis* genome DNA of four different geographical distributions. *Journal of Agro-Environment Science*, 2017 [全志星, 田佳源, 张思宇, 等. 不同入侵地区黄顶菊 DNA 表观遗传多样性变化特征. *农业环境科学学报*, 2017, 36(4): 625–634]
- Richards CL, Bossdorf O, Verhoeven KJ. Understanding natural epigenetic variation. *New Phytologist*, 2010, 187(3): 562–564
- Richardson DM, Pysek P. Plant invasions: Merging the concepts of species invasiveness and community invasibility. *Progress in Physical Geography*, 2006, 30(2): 409–431
- Ruizgarcia L, Cervera MT, Martinezzapater JM, *et al.* DNA methylation increases throughout *Arabidopsis* development. *Planta*, 2005, 222(2): 301–306
- Schmid MW, Heichinger C, Schmid DC, *et al.* Contribution of epigenetic variation to adaptation in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 4446
- Schmitz RJ, Schultz MD, Urich MA, *et al.* Patterns of population epigenomic diversity. *Nature*, 2013, 495(7440): 193–198
- Vaughn MW, Tanurdzic M, Lippman Z, *et al.* Epigenetic natural variation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biology*, 2007, 5: 1617–1629
- Wang SY, Guo JF, Liu XT, *et al.* Research progress of abiotic stress induced epigenetic variation in plants. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2016(3): 631–640 [王淑妍, 郭九峰, 刘晓婷, 等. 非生物胁迫下植物表观遗传变异的研究进展. *西北植物学报*, 2016(3): 631–640]
- Wang ZH, Wang D. Application of DNA methylation analysis in genetics and breeding of plants and animals. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2013, 25(4): 435–441 [王忠华, 王迪. DNA 甲基化分析技术在动植物遗传育种中的应用. *生命科学*, 2013, 25(4): 435–441]
- Wolffe AP, Matzke MA. Epigenetics: Regulation through repression. *Science*, 1999, 286(5439): 481–486
- Wu B, Yang AG, Dong YH, *et al.* MSAP analysis on genome-wide DNA methylation in selected and wild Japanese scallop *Patinopten yessoensis*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*. 2015, 46(4): 976–982 [吴彪, 杨爱国, 董迎辉, 等. 虾夷扇贝选育群体与野生群体基因组 DNA 甲基化的 MSAP 分析. *海洋与湖沼*, 2015, 46(4): 976–982]
- Yan XF. Genetic diversity and differentiation of the wild soybean (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.) in China. Doctoral Dissertation of Shenyang Agricultural University, 2014 [燕雪飞. 中国野生大豆遗传多样性及其分化研究. 沈阳农业大学博士研究生学位论文, 2014]
- Zhang CY, Wang YG, Rong XJ, *et al.* Natural resources culture and problems of sea cucumber worldwide. *Progress in Fishery Sciences*, 2004, 25(3): 89–97 [张春云, 王印庚, 荣小军, 等. 国内外仿刺参自然资源、养殖状况及存在问题. *渔业科学进展*, 2004, 25(3): 89–97]
- Zhang PY. The MSAP analysis for genomic methylation of tobacco planting in different environments of Dali in Yunnan Province. Master's Thesis of Yunnan University, 2012 [张鹏远. 云南大理地区不同地域环境下烟草基因组甲基化的 MSAP 分析. 云南大学硕士研究生学位论文, 2012]
- Zhao Y, Chen M, Storey KB, *et al.* DNA methylation levels analysis in four tissues of sea cucumber *Apostichopus japonicus*

based on fluorescence-labeled methylation-sensitive amplified polymorphism (F-MSAP) during aestivation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2015, 181: 26–32

Zhen Y, Zheng XH, Shi JS. Epigenetic mechanism of plant under stress. *Genomics and Applied Biology*, 2018, 37(2): 924–927 [甄艳, 郑秀化, 施季森. 表观遗传调控植物逆境胁迫的

适应机制. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37(2): 924–927] Zhou YH, Cao HL, Yue C, *et al.* Changes of DNA methylation levels and patterns in tea plant (*Camellia sinensis*) during cold acclimation. *Acta Agronomica Sinica*, 2015, 41(7): 1047–1055 [周艳华, 曹红利, 岳川, 等. 冷驯化不同阶段茶树 DNA 甲基化模式的变化. *作物学报*, 2015, 41(7): 1047–1055]

(编辑 冯小花)

## Evaluation of Epigenetic and Genome Sequence Diversity in Sea Cucumber *Apostichopus japonicus* Selected Population Based on MSAP Technology

ZUO Shan<sup>1,2,3</sup>, WEN Zhengzheng<sup>1,2,3</sup>, ZHOU Hongxue<sup>4</sup>, NI Lehai<sup>5</sup>, SUN Guohua<sup>3,6</sup>Ⓛ,  
FENG Yanwei<sup>3</sup>, WANG Weijun<sup>3</sup>, YANG Jianmin<sup>3</sup>

(1. Shanghai Ocean University, National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai 201306; 2. Shanghai Ocean University, Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai 201306; 3. Ludong University, College of Agriculture, Yantai 264025; 4. Department of Agriculture and Rural Affairs of Shandong Province, Jinan 250013; 5. Shandong Fishery Technology Extension Station, Jinan 250013; 6. Yantai Haiyu Ocean Technology Co., Ltd, Yantai 264001)

**Abstract** *Apostichopus japonicus* is a species of economic importance cultured in northern China. In the past 10 years, the scale of the *A. japonicus* culture has expanded due to increased market demand for products. However, several challenges, such as germplasm degradation and the lack of stress-resistant varieties, have emerged in *A. japonicus* culture. Breeding new varieties is one way to overcome these challenges. New strains (F<sub>1</sub> and F<sub>4</sub>) of *A. japonicus* with high temperature resistance were obtained by domestication and screening under environmental stress conditions. The genetic changes caused by breeding under environmental stress conditions not only originated from changes in the DNA sequence, but also from changes due to epigenetic modifications by bisulfite sequencing. To explore the genetic diversity of the selected populations (F<sub>1</sub> and F<sub>4</sub>) and the control population (F) which was not subjected to temperature stress of *A. japonicus*, the genetic diversity of control population, selected population F<sub>1</sub>, and selected population F<sub>4</sub> were analyzed using methylation-sensitive amplification polymorphisms (MSAP). The results showed that 698 loci were polymorphic among the 806 loci obtained by 10 pairs of primers, and the percentage of polymorphism was 86.60%. Based on the genetic analysis of non-methylated loci, the Shannon polymorphism index of the F<sub>4</sub> was 0.3981 and Nei gene diversity was 0.2264. Based on the analysis of methylation sensitive sites, the Shannon polymorphism index of the F<sub>4</sub> was 0.5873, and Nei gene diversity was 0.2598, both of which were higher than in the parent population. Moreover, the epigenetic diversity was higher than the sequence genetic diversity caused by variation in non-methylated loci, indicating that the frequency of epigenetic variation was higher than that of sequence genetic variation. Analysis of the MSAP methylation patterns revealed some changes in the methylation levels and patterns in the selected F<sub>1</sub> and F<sub>4</sub> after breeding, which indicated that the genome methylation status of the *A. japonicus* population was changed by breeding under temperature stress. The number of type II bands in the F<sub>4</sub> was 161, which was significantly higher than that of control population of *A. japonicus* and may have acquired epigenetic characteristics during breeding. Collectively, our results revealed the genetic changes and progress of the breeding population from the perspective of a genetic material basis and provide a reference for the study of epigenetics in the breeding of new stress resistant varieties.

**Key words** *Apostichopus japonicus*; MSAP; DNA methylation; Breeding population; Genetic diversity

Ⓛ Corresponding author: SUN Guohua, E-mail: sgh\_smile@163.com