

### 3个地理群体仿刺参 D-loop 序列的变异及系统发生分析

姬南京, 常亚青\*, 赵冲, 宋坚, 高银雪

(大连海洋大学农业部北方海水增殖重点实验室, 辽宁 大连 116023)

**摘要:** 为研究中国大连(CD)、朝鲜罗津(KN)和俄罗斯海参崴(RV)3个仿刺参群体的遗传结构,实验采用PCR扩增和测序技术,对3个群体共计71头仿刺参的线粒体D-loop序列进行了分析。结果显示,D-loop序列长度为447~465 bp,平均A+T含量(59.2%)显著高于G+C含量;共检测到119个变异位点,多态位点比例为24.24%,其中简约信息位点为53个,共有40种基因型,群体共享基因型7个。遗传多样性参数分析显示,3个群体均显示出较丰富的遗传多样性;分子方差(AMOVA)分析表明,3个群体间遗传分化较弱或只有中度分化,且93.04%的变异来自群体内。CD群体与RV群体之间遗传距离最远,为0.042,KN群体与RV群体之间遗传距离最近,为0.0374。将本研究所得序列结合GenBank中青岛(QD)和威海(WH)仿刺参的D-loop序列构建系统发育树,QD与WH仿刺参首先聚为一小支,然后与CD群体聚为一大支,KN群体与RV群体聚为独立一支,这一聚类方式符合地理隔离模式。

**关键词:** 仿刺参; D-loop序列; 遗传多样性; 遗传分化

**中图分类号:** Q 785; S 968.9

**文献标志码:** A

仿刺参 [*Apostichopus japonicus* (Selenka)] 又名刺参,广泛分布于太平洋西部的中国、俄罗斯、韩国与日本沿海,在我国主要分布于辽宁、山东、河北等北方沿海<sup>[1]</sup>。由于其具有较高的营养和药用价值,市场需求量大,自然资源无法满足市场需求。尽管人工养殖技术显著提高了仿刺参产量,但长期近亲繁殖导致养殖个体出现生长缓慢等问题,影响了仿刺参养殖业的持续健康发展<sup>[2]</sup>。为保持仿刺参产业的持续发展,开展仿刺参种群遗传多样性评价,是进行种质资源管理和对养殖种类进行遗传改良的基础。近年来,国内外一些学者已应用同工酶<sup>[3]</sup>、ISSR<sup>[4]</sup>、微卫星<sup>[5]</sup>等技术分析了不同群体仿刺参的遗传多样性。

线粒体DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 是细胞核外具有自主复制、转录和翻译能力的遗传因子,与核DNA相比,具有分子小、结构简单、演化速度快和母系遗传等优点。mtDNA中的D-loop区,为非编码区,受到的选择压力小,积累了

较多的突变,如碱基的替换、插入、缺失,以及众多的串联重复序列等<sup>[6]</sup>。因此,D-loop序列常被作为有效的分子遗传标记,在水产动物的群体遗传学研究中得到了广泛应用<sup>[7-8]</sup>。本实验利用D-loop序列的多态性对3个不同地理群体仿刺参的遗传结构进行了分析,以期从线粒体水平上了解仿刺参资源的遗传背景,为仿刺参遗传改良和种质资源评价与管理提供理论参考。

#### 1 材料与方法

##### 1.1 实验材料

野生仿刺参样品分别采自中国大连(CD)、朝鲜罗津(KN)、俄罗斯海参崴(RV)(图1)。基于D-loop标记的样本量为每个群体23~24头个体(表1)。此外,从GenBank中下载了青岛(QD, *A. japonicus*, FJ906623)和威海(WH, *A. japonicus*, EU294194)仿刺参线粒体序列用于聚类分析。

收稿日期:2013-06-17 修回日期:2014-02-11

资助项目:辽宁省科技攻关重大项目(2011203003);国家自然科学基金(31072230);国家“八六三”高技术研究发展计划(2012AA10A412)

通信作者:常亚青,E-mail:yqchang@dlou.edu.cn

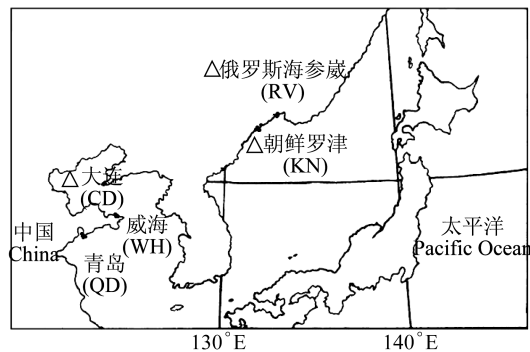


图 1 仿刺参样品分布示意图

带有△的位点为本研究采样位点

Fig. 1 Locality of *A. japonicus* sampling

Sampling sites in this study were marked with △

表 1 仿刺参 3 个群体 D-loop 序列的遗传多样性参数  
Tab. 1 Genetic diversity parameters of D-loop sequences in 3 populations of *A. japonicus*

群体 populations	样本量 <i>N</i>	单倍型 多态性 <i>H<sub>d</sub></i>	平均核苷酸 差异数 <i>K</i>	核苷酸 多样性指数 <i>P<sub>i</sub></i>
CD	24	0.986	15.862	0.037 95
KN	23	0.952	15.419	0.036 89
RV	24	0.917	13.837	0.033 10
总计 total	71	0.975	15.748	0.037 67

## 1.2 基因组 DNA 的提取

取活体仿刺参的管足 6 ~ 7 根,采用 TIANamp Marine Animals DNA Kit(北京天根)试剂盒,按试剂盒推荐方法提取仿刺参基因组总 DNA,1% 琼脂糖凝胶电泳检测,稀释至 50 ng/μL 后作为 PCR 模板。

## 1.3 D-loop 区 PCR 扩增和序列测定

从 GenBank 下载仿刺参 (*A. japonicus*, EU294194) 线粒体基因全长序列,设计 D-loop 区 PCR 扩增引物: D-loop-F: 5'-CAAGCCCTAAA-CCCAAGT-3' 和 D-loop-R: 5'-ATTCCCTAGATG-TAAGTTCG-3',目的片段大小为 660 bp。PCR 体系为 50 μL,含有模板 DNA 约 100 ng,1 μL 上游引物(25 μmol/L)、5 μL 10 × Buffer、4 μL Mg<sup>2+</sup>(25 mmol/L)、4 μL dNTP(2.5 mmol/L)、5 U/μL 的 *Taq* 酶(TaKaRa)0.6 μL,补充去离子水至 50 μL。PCR 反应条件为:94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 40 s,58 °C 退火 40 s,72 °C 延伸 50 s,35 个循环;最后 72 °C 彻底延伸 10 min。1% 的琼脂糖凝胶电泳检测验证条带大小后,PCR 产物送上

海英潍捷基生物技术有限公司进行纯化和测序。

## 1.4 数据处理

利用 DNASTar 中的 EditSeq 软件结合测序峰图进行序列校正和编辑,将拼接好的序列进行 Blastn 同源性检测,确定序列的边界及长度,ClustalX 1.83 软件进行多重比对分析。用 DnaSp 5.0 软件计算各个群体的单倍型,单倍型多态性,平均核苷酸差异数,核苷酸多样性指数。采用 Arlequin 3.5 软件<sup>[9]</sup>进行分子方差分析(AMOVA)。用 MEGA 4.0 软件<sup>[10]</sup>进行核苷酸组成分析,统计变异位点数、转换/颠换,采用 Kitmura 双参数模型计算各单倍型及群体间遗传距离,并用邻接法( Neighbour-Joining, NJ)构建系统树。

## 2 结果

### 2.1 D-loop 区序列特征分析

对得到的序列进行 Blastn 比对分析,去除序列两端的 tRNA<sup>thr</sup> 和 tRNA<sup>pro</sup> 序列,得到的 D-loop 区全长为 447 ~ 465 bp,序列平均长度为 457.2 bp,序列长度存在多态性。MEGA 4.0 软件分析显示,该序列的 A、T、C 和 G 碱基平均含量分别为 24.2%、35.0%、27.4% 和 13.4%,A + T 含量(59.2%)显著高于 G + C(40.8%)含量。在 491 个比对位点中,共检测到 119 个变异位点,包括 53 个简约信息位点,变异位点比例为 24.24%,其中转换/颠换为 4.12。71 条序列中共检测到 40 种单倍型,种群共享单倍型 7 个,单倍型简约信息位点及在群体中的分布见表 2。利用 DnaSp 5.0 计算群体遗传多样性参数(表 1),CD 群体单倍型多态性、平均核苷酸差异数和核苷酸多样性指数最高,其次为 KN 群体,RV 群体最低。

### 2.2 群体遗传变异分析

利用 Arlequin 3.5 软件进行 AMOVA 分析,估算 3 个群体间的遗传变异结构及变异来源(表 3)。AMOVA 分析结果表明,群体间的分子变异显著( $F_{ST} = 0.069 63, P < 0.05$ ),种群间的变异占总变异的 6.96%,群体内部变异为 93.04%。3 个仿刺参群体的遗传分化系数最高为 CD 群体与 RV 群体(0.134 76),其次为 KN 群体与 RV 群体(0.032 00),CD 群体与 KN 群体之间的遗传分化系数最低(0.029 91)(表 4)。

### 2.3 群体间遗传距离与聚类分析

利用 MEGA 4.0 软件计算单倍型及群体之

间的遗传距离,40 个单倍型之间的遗传距离为 0.002 4~0.120 7,平均遗传距离为 0.039 6;3 个群体之间遗传距离为 0.037 4~0.042,KN 群体与

RV 群体之间遗传距离最小,CD 群体与 RV 群体之间的遗传距离最大(表 4)。

表 2 D-loop 序列简约信息位点及各单倍型在群体中的分布

Tab. 2 D-loop sequences parsimony-informative sites and haplotype distribution in population

核苷酸多态位点 nucleotide polymorphism	1111111111 224788999 0125566679 0125669901 2526803569 7545173590	2222222233 3333333333 3456666777 7341468267	3334444444 444 7880001122 9082342612 411	群体单倍型数分布 distribution of haplotypes					
				CD	KN	RV			
Hap_1	AGAAAATGTT	TCTCTCTTAC	TTCTGTCCTT	CTTAATAATT	CATAACCTCC	GCT	0	2	1
Hap_2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	2	0	0
Hap_3	.....	.....	.....	.....	.....	.....T	0	1	5
Hap_4	.....A	.....C	.....	.....	.....	.....	0	1	0
Hap_5	.....	.....A	.....	.....	.....	.....	1	0	0
Hap_6	.....	.....T	.....	.....	.....	.....	0	1	2
Hap_7	.....	.....T	.....	.....	.....	.....	0	0	1
Hap_8	G..G	.....	A..C	.....	T	.....	0	2	2
Hap_9	G	.....	A..C	.....	.....	.....	0	1	2
Hap_10	G	.....	A..CA	.....	.....T	.....	1	0	0
Hap_11	G..G.C.A	..TC	.....	AC.C	.....	.....G..T	1	0	0
Hap_12	G..G.C.A	..TC	.....	AC.CA	.....	.....G..T	1	0	0
Hap_13	G..G.C.A	..TC	.....	AC.CA	.....	.....G..T	0	1	0
Hap_14	G..G.C	.....	TC	.....	AC.CA	.....	0	1	0
Hap_15	G..G.C	.....	TC	.....	AC.CA	.....	0	1	4
Hap_16	G..G.C.A	..TC	.....	AC.CA	.....	.....G..C	0	0	2
Hap_17	G..G.C.A	..TC	.....	AC.CA	.....	.....G..T	1	0	0
Hap_18	G.GG	.....	AAC	.....	TC	.....	3	0	0
Hap_19	G.GG	.....	AAC	.....	TC	.....	1	0	0
Hap_20	G.GG	.....	AAC	.....	TC	.....	1	0	0
Hap_21	G.GG	.....	AC	.....	TC	.....	0	1	0
Hap_22	G.GG	.....	AC	.....	TC	.....	0	2	0
Hap_23	G.GG	.....	AC	.....	TC	.....	0	1	0
Hap_24	G.GG	.....	T.A	.....	TC	.....	1	0	0
Hap_25	G.GG	.....	A	.....	CTC	.....	1	0	0
Hap_26	GAGGTG	.....	A	.....	TC	.....	1	0	0
Hap_27	G.GGTG	.....	A	.....	TC	.....	1	0	0
Hap_28	G..GTG	.....	A	.....	TC	.....	1	0	0
Hap_29	G.GGTG	.....	A	.....	TC	.....	0	1	0
Hap_30	GAG	.....	A	.....	TC	.....	1	0	0
Hap_31	G.GG	.....	C.AA	.....	TC	.....	0	3	0
Hap_32	G.GG	.....	C.AA	.....	TC	.....	0	0	1
Hap_33	G.GG	.....	C.AA	.....	TC	.....	1	0	0
Hap_34	G.GG	.....	C.A	.....	TC	.....	1	0	0
Hap_35	G..G.C	.....	AC	.....	TCTCT	.....	0	0	3
Hap_36	G...C	.....	AC	.....	TCTCT	.....	1	0	0
Hap_37	G..G.C	.....	A	.....	TC	.....	1	0	0
Hap_38	.....CC	.....	A	.....	TC	.....	0	4	1
Hap_39	G.GG	.....	CC.A	.....	TC	.....	1	0	0
Hap_40	G..G	.....	AAC	.....	CT	.....	1	0	0

采用 MEGA 4.0 软件中的 NJ 法,结合 GenBank 中青岛与威海仿刺参全线粒体序列中的 D-loop 序列构建群体之间的聚类树(图 2),威海

与青岛仿刺参关系最近,首先聚为一小支,然后与 CD 群体聚在一起,KN 群体与 RV 群体关系较近,聚为独立一支。

表 3 仿刺参群体遗传变异的分子方差分析(AMOVA)

Tab. 3 AMOVA analysis of genetic variation in populations of *A. japonicus*

变异来源 source of variation	自由度 df	平方和 sum of squares	遗传变异元素 variance components	占总变异的百分比/% percentage of variation
群体间 among population	2	73.234	0.989 00 Va	6.96
群体内 within population	68	898.639	13.215 29 Vb	93.04
总计 total	70	971.873	14.204 28	

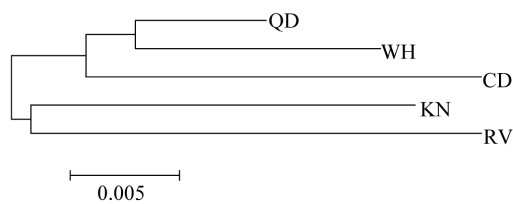


图 2 基于 D-loop 序列遗传距离构建的 NJ 树  
Fig. 2 NJ tree from genetic distance based on D-loop sequences

表 4 群体间的相对遗传距离(右上)和遗传分化系数(左下)

Tab. 4 Genetic distance of each population(upper right) and  $F_{ST}$  among populations(lower left)

群体 populations	中国大连 CD	朝鲜罗津 KN	俄罗斯海参崴 RV
CD		0.041 0	0.042 0
KN	0.029 91		0.037 4
RV	0.134 76	0.032 00	

### 3 讨论

#### 3.1 D-loop 序列特征分析

遗传多样性为物种的适应能力、生存能力和进化潜力提供潜在的遗传基础和储备<sup>[11]</sup>。D-loop 序列属于线粒体上非编码区,没有自然选择压力,具较大的变异,有研究表明,线粒体 D-loop 区的进化速率是其他区段的 5 倍,是研究种群遗传多样性的有效分子标记<sup>[12]</sup>。

本实验分析了 3 个仿刺参群体的线粒体 D-loop 序列,共检出 119 个变异位点,占比对位点的 24.24%,变异程度远比仿刺参 CO I 基因检测到的 28 个变异位点(5.2%)的结果高<sup>[13]</sup>,因此认为 D-loop 序列更适合作为仿刺参种内遗传分析的标记。碱基组成分析表明,平均 A + T 含量(59.2%)明显高于 G + C 含量(40.8%),表现出 AT 偏好性。这与在仿刺参<sup>[14-15]</sup>、海胆<sup>[16]</sup>等线粒体基因中观察到的结果一致。

#### 3.2 遗传多样性分析

采用 mtDNA 研究物种遗传多样性时,核苷酸多样性指数( $P_i$ )和单倍型间的平均遗传距离( $P$ )是衡量群体遗传多样性的 2 个重要指标。 $P_i$  值比平均遗传距离更可靠,主要是因为  $P_i$  值考虑了各种单倍型在群体中的比例<sup>[17]</sup>。本研究中,仿刺参 D-loop 序列核苷酸多样指数(0.037 67)比

小黄鱼(*Larimichthys polyactis*)(0.012 33)<sup>[18]</sup>、波纹唇鱼(*Cheilinus undulatus*)(0.006 06)<sup>[19]</sup>核苷酸多样性指数都高;另外,本研究中的仿刺参单倍型多态性(0.975)也处于较高水平,说明仿刺参 3 个群体有较高的遗传多样性,种质资源较丰富。

#### 3.3 群体遗传分化和系统发育分析

群体遗传学研究认为, $F_{ST}$  值可以表示群体间的分化程度,一般  $F_{ST}$  值在 0.00 ~ 0.05 之间表示分化较弱,在 0.25 以上表示遗传分化极大<sup>[20]</sup>。从表 4 可见,KN 群体与 RV 群体( $F_{ST} = 0.032 00$ )、CD 群体与 KN 群体之间分化较弱( $F_{ST} = 0.029 91$ ),CD 群体与 RV 群体之间中度分化( $F_{ST} = 0.134 76$ )。有研究者提出鱼类在属、种和种群三级水平上的遗传距离分别是 0.9、0.3 及 0.05 的分类依据<sup>[21]</sup>。本结果表明,3 个群体间的遗传距离为 0.037 4 ~ 0.042 0,说明 3 个群体间的遗传分化还未达到种群的分化标准。

某些鱼类的群体行为及固定产卵地点是鱼类形成固定种群的主要原因,而在藤壶、海胆以及扇贝的研究中没有发现固定种群形成的现象<sup>[22]</sup>,形成这一现象的主要原因是海洋无脊椎动物在幼虫时期长时间处于浮游状态,种群之间形成显著的基因流,造成地理距离较远的不同地理种群之间遗传分化较弱<sup>[23]</sup>。Kim 等<sup>[22]</sup>利用微卫星技术对韩国沿海 5 个不同刺参地理群体进行遗传分析( $F_{ST} = 0.005 \sim 0.061$ ),群体间遗传分化较弱或只有中度分化。本研究得到的序列结合 GenBank 中威海与青岛仿刺参 D-loop 序列构建 NJ 分子进化树发现,青岛与威海仿刺参聚为一小支后再与 CD 群体聚在一起,RV 与 KN 群体聚为独立一支,这一聚类方式与仿刺参地理分布一致。2009 年 Chang 等<sup>[24]</sup>采用微卫星技术研究的 5 个地理群体仿刺参中包括 CD 群体和 RV 群体,UPGMA 树显示,CD 群体与 RV 群体分别位于两大支,与本实验结果一致。

综上所述,本实验中的 3 个仿刺参群体均具有较高的遗传多样性,群体间遗传分化较弱或只有中度遗传分化,其中 RV 群体与 CD 群体之间亲缘关系较远。杂种优势理论认为,杂交亲本间遗传距离越远,杂交优势就越明显。

#### 参考文献:

- [1] Chang Y Q, Ding J, Song J, et al. Biological research and culture for trepan and sea urchin[M]. Beijing:

- China Ocean Press, 2004; 3 - 4. [常亚青, 丁君, 宋坚, 等. 海参, 海胆生物学研究与养殖. 北京: 海洋出版社, 2004; 3 - 4.]
- [ 2 ] Tan J, Sun H L, Liu P, *et al.* Microsatellites analysis of genetic variation between natural and culture populations of *Apostichopus japonicus* [ J ]. Marine Fisheries Research, 2007, 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, 2007, 28 ( 3 ): 38 - 43.]
- [ 3 ] Gao Y M, Sun J B. The biochemical genetics of *Stichopus japonicus* Selenka population [ J ]. Journal of Dalian Fisheries University, 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.]
- [ 4 ] Yao B, Hu X L, Bao Z M, *et al.* Genetic variation in two sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) stocks revealed by ISSR markers [ J ]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2007, 25 ( 1 ): 91 - 96.
- [ 5 ] Soliman T, Kanno M, Kijima A, *et al.* Population genetic structure and gene flow in the Japanese sea cucumber *Apostichopus japonicus* across Toyama Bay, Japan [ J ]. Fisheries Science, 2012, 78 ( 4 ): 775 - 783.
- [ 6 ] Li N, Chen S B, Xie Q L, *et al.* Polymorphisms of mitochondrial *Cytb* gene and D-loop region in sweetfish (*Plecoglossus altivelis Temminck et Schlegel*) from Zhejiang and Fujian Provinces [ J ]. Hereditas, 2008, 30 ( 7 ): 919 - 925. [李娜, 陈少波, 谢起浪, 等. 闽浙地区香鱼线粒体 *Cytb* 基因和 D-loop 区序列多态性分析. 遗传, 2008, 30 ( 7 ): 919 - 925.]
- [ 7 ] Yao Q, Yang P, Chen L Q, *et al.* Interspecific DNA sequence polymorphism in the mitochondrial D-loop gene from three populations of *Macrobrachium rosenbergii* [ J ]. Journal of Fisheries of China, 2007, 31 ( suppl. ): 18 - 22. [姚茜, 杨频, 陈立侨, 等. 罗氏沼虾三群体线粒体 D-loop 基因序列差异的初步研究. 水产学报, 2007, 31 ( 1 ): 18 - 22.]
- [ 8 ] Zhao L J, He G X, Zhou X Y, *et al.* Morphology and D-loop sequence analysis of *Sinibrama macrops* from Qiandaohu Lake [ J ]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37 ( 3 ): 351 - 358. [赵良杰, 何光喜, 周小玉, 等. 千岛湖大眼华鳊形态度量学和 D-loop 序列分析. 水产学报, 2013, 37 ( 3 ): 351 - 358.]
- [ 9 ] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ( ver 3.0 ): An integrated software package for population genetics data analysis [ J ]. Evolutionary Bioinformatics Online, 2005, 1 : 47 - 50.
- [ 10 ] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis ( MEGA ) software version 4. 0 [ J ]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24 ( 8 ): 1596 - 1599.
- [ 11 ] Jiang Y Y, Kong X Y, Yu Z N, *et al.* Genetic diversity of *Scomberomorus niphonius* in the Yellow Sea revealed by mtDNA D-loop sequence [ J ]. Journal of Fishery Sciences of China, 2003, 10 ( 3 ): 177 - 183. [姜艳艳, 孔晓瑜, 喻子牛, 等. 黄海蓝点马鲛 mtDNA D-loop 序列变异分析. 中国水产科学, 2003, 10 ( 3 ): 177 - 183.]
- [ 12 ] Rosel P E, Dizon A E, Haygood M G. Variability of the mitochondrial control region in populations of the harbour porpoise *Phocoena phocoena* on interoceanic and regional scales [ J ]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1995, 52 ( 6 ): 1210 - 1219.
- [ 13 ] Tao C H. Analysis on genetic diversity in the wild population of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) in Weihai [ D ]. Jinan: Shandong University, 2009. [陶翠花. 威海仿刺参野生种群遗传多样性分析. 济南: 山东大学, 2009.]
- [ 14 ] Shen X, Tian M, Liu Z H, *et al.* Complete mitochondrial genome of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* ( Echinodermata: Holothuroidea ): The first representative from the subclass Aspidochirota with the echinoderm ground pattern [ J ]. Gene, 2009, 439 ( 1/ 2 ): 79 - 86.
- [ 15 ] Li Y, Liu P, Sun H L, *et al.* Sequence analysis of three mitochondrial genes of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) [ J ]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2006, 37 ( 2 ): 143 - 153. [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. 海洋与湖沼, 2006, 37 ( 2 ): 143 - 153.]
- [ 16 ] Cantatore P, Roberti M, Rainaldi G, *et al.* The complete nucleotide sequence, gene organization, and genetic code of the mitochondrial genome of *Paracentrotus lividus* [ J ]. The Journal of Biological Chemistry, 1989, 264 ( 19 ): 10965 - 10975.
- [ 17 ] Zhou H, Li D Q, Zhang Y G, *et al.* Study on mitochondrial DNA genetic diversity of *Tibetan antelope* [ J ]. Hereditas, 2006, 28 ( 3 ): 299 - 305. [周慧, 李迪强, 张于光, 等. 藏羚羊 mtDNA D-loop 区遗传多样性研究. 遗传, 2006, 28 ( 3 ): 299 - 305.]
- [ 18 ] Zheng W J, Lai Y H, You X Y, *et al.* Genetic diversity of *Pseudosciaena polyactis* in Zhoushan based on mitochondrial DNA D-loop region

- sequences [J]. Zoological Research, 2012, 33 (3): 329 - 336. [郑文娟, 来育洪, 尤昕煜, 等. 舟山小黄鱼线粒体 DNA D-loop 区序列变异的遗传多样性分析. 动物学研究, 2012, 33(3): 329 - 336.]
- [19] Hu J, Qi X Z, Yin S W, *et al.* The variation analysis of mtDNA D-loop sequence of *Cheilinus undulates* [J]. Marine Sciences, 2012, 36(4): 50 - 56. [胡静, 齐兴柱, 尹绍武, 等. 波纹唇鱼 mtDNA D-loop 序列变异分析. 海洋科学, 2012, 36(4): 50 - 56.]
- [20] Yuan Y, Gao W W, Wu Q, *et al.* Genetic variation and structure of *Cyclina sinensis* population in the Yellowand Bohai sea of China [J]. Ocnologia et Limnologia Sinica, 2008, 39(6): 665 - 670. [袁媛, 高玮玮, 吴琪, 等. 黄、渤海地区青蛤 (*Cyclina sinensis*) 种群的 ITS 序列遗传变异与遗传结构分析. 海洋与湖沼, 2008, 39(6): 665 - 670.]
- [21] Shaklee J B, Tamaru C S, Waples R S. Speciation and evolution of marine fishes studied by the electrophoretic analysis of proteins [J]. Specific Science, 1982, 36(2): 141 - 157.
- [22] Kim M J, Choi T J, An H S. Population genetic structure of sea cucumber, *Stichopus japonicus* in Korea using microsatellite markers [J]. Aquaculture Research, 2008, 39(10): 1038 - 1045.
- [23] Tan J, Sun H L, Liu P, *et al.* Genetic diversity of three geographical populations of *Apostichopus japonicus* revealed by microsatellite DNA [J]. Journal of Fisheries of China, 2007, 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, 2007, 31(4): 437 - 442.]
- [24] Chang Y Q, Feng Z G, Yu J P, *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 [J]. Marine Ecology, 2009, 30(4): 455 - 461.

## D-loop sequences variation and phylogenetic analysis in three geographical populations of the sea cucumber *Apostichopus japonicus*

JI Nanjing, CHANG Yaqing\*, ZHAO Chong, SONG Jian, GAO Yinxue

(Dalian Ocean University, Key Laboratory of Mariculture & Stock Enhancement in North China's Sea, Ministry of Agriculture, Dalian 116023, China)

**Abstract:** Mitochondrial D-loop sequences were analyzed to study the genetic structure of the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. In this study, 71 individuals from three natural populations were collected from Dalian, China (CD), Rajin, North Korea (KN) and Vladivostok, Russia (RV). 447 – 465 bp D-loop sequences were obtained using PCR amplification. The mean content of A + T (59.2%) was higher than G + C. The proportion of polymorphic sites was 24.24%, in which parsimony informative sites were 53. Forty haplotypes were identified from 71 samples, among which 7 haplotypes were shared by three populations. Genetic diversity parameters showed high genetic diversity among populations. The fixation indices ( $F_{ST}$ ) of analysis of molecular variance (AMOVA) within populations was 93.04%, which indicated that the genetic differentiation of the three populations was weak or only moderately differentiated. The genetic distances among populations were 0.0374 (KN and RV) and 0.042 (CD and RV). The molecular phylogenetic tree was constructed with the D-loop sequences of Qingdao (QD) and Weihai (WH) from GenBank with NJ method using software MEGA 4.0. Populations of QD and WH clustered into a small branch, then with CD, while KN and RV clustered into the other branch. The results were consistent with their geographical isolation mode.

**Key words:** *Apostichopus japonicus*; D-loop sequences; genetic diversity; genetic differentiation

**Corresponding author:** CHANG Yaqing. E-mail: yqchang@dlou.edu.cn