

中国沿海光裸方格星虫6个地理群体遗传多样性分析

宋素霞¹, 丁少雄², 鄢庆彬¹, 覃映雪^{1*}

(1. 集美大学水产学院, 农业部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021;

2. 厦门大学海洋环境科学国家重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 为科学保护和开发我国光裸方格星虫自然资源, 本研究以*cytb*基因全长为分子标记分析了山东烟台、福建古雷、香港、海南儋州、海南陵水、广西东兴6个光裸方格星虫群体的遗传多样性。结果显示, 203个个体共检出128个单倍型, 299个多态位点, 核苷酸多样性和单倍型多样性分别为0.0488和0.9773, 且变异主要来自群体间(88.4%)。6个光裸方格星虫群体间遗传分化指数(F_{st})分析结果显示, 南方5个群体间 $F_{st}<0.15$, 基本无分化或呈低度分化; 而烟台与南方5个群体间的固定指数都很大, $F_{st}>0.15$, 群体间呈高度分化。中性检验(*Fu's Fs*、*Tajima's D*)结果为负值, 北方群体和南方群体的核苷酸错配分布图为单峰, 单倍型网络分布图为以主单倍型为中心的放射状结构。用203条*cytb*序列构建的系统发育树显示, 烟台群体聚为一个进化支, 南方群体聚为一个进化支。研究表明, 中国沿海的光裸方格星虫群体在历史上经历过大规模群体扩张, 但目前遗传多样性较低, 说明光裸方格星虫对环境变化的适应能力较差, 应加强野生资源的保护, 在进化关系上, 烟台群体与其他5个群体之间存在较大的遗传分化, 但是否已经形成隐种仍需进一步的研究。

关键词: 光裸方格星虫; *cytb*; 遗传多样性; 群体结构; 系统发育

中图分类号: Q 347; S 917.4

文献标志码: A

光裸方格星虫(*Sipunculus nudus*), 隶属于方格星虫纲(Sipunculidea), 方格星虫目(Sipunculiformes), 方格星虫科(Sipunculidae), 方格星虫属(*Sipunculus*)^[1], 主要分布于热带和亚热带海域, 俗称沙虫、花生蠕虫、沙肠子, 是一类大型海洋底栖动物^[2-3]。它味道鲜美、营养价值高, 是东南亚沿海居民的佳肴; 在国内外鱼饵市场上也倍受青睐, 是渔业经济的重要组成部分; 此外, 光裸方格星虫在科学研究中占有重要地位, 是科学研究的模式生物之一, 又因其对生存环境的变化十分敏感, 素有“环境标志生物”之称^[4-6]。

据早期文献记载, 光裸方格星虫在我国山东(青岛、烟台)、福建(平潭、厦门集美、小嶝岛)、海南(海口、白马井、清澜港)、广东湛江、

广西(北海、涠洲岛)等海域均有分布^[1]。但近年来, 光裸方格星虫自然资源遭到过度开发, 人类活动对其生境的污染和破坏也导致其野生群体数量急剧衰竭^[7], 很多光裸方格星虫原有的自然栖息海域现在已经找不到它的踪影。因此, 研究和保护光裸方格星虫自然资源迫在眉睫。

近年也有学者对中国沿海光裸方格星虫的群体结构和遗传多样性进行研究, 如Hsu等^[2]对福建晋江、长乐、古雷, 广东湛江及台湾等海域的光裸方格星虫群体进行系统发育和遗传多样性分析, 发现这些群体存在4个分化类型。但是已有研究中所采集的光裸方格星虫样本基本都来自于我国东南部海域, 目前尚未见中国北部沿海光裸方格星虫群体遗传结构和多样性的研究报道。星虫自主运动能力差, 群体扩散主

收稿日期: 2016-03-10 修回日期: 2016-06-17

资助项目: 国家自然科学基金(31502194); 海洋公益性行业科研专项(201205024-2); 海洋经济创新发展区域示范项目(14PYY050SF03)

通信作者: 覃映雪, E-mail: yxqin@jmu.edu.cn

要依靠海流,我国漫长的海岸线存在着多个潜在的地理障碍,极有可能还存在不同的分化类型。本研究采集了福建古雷、广西东兴、海南儋州和陵水、香港、山东烟台沿海滩涂的6个光裸方格星虫群体样本,以更为全面深入地分析我国沿海光裸方格星虫的遗传多样性,为保护和开发我国光裸方格星虫自然资源提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

本研究所用的光裸方格星虫样品于2012年7月—2013年6月采集自福建古雷、广西东兴、海南儋州、海南陵水、香港、山东烟台沿海滩涂(图1)。活体运输至实验室进行形态学鉴定后解剖,取肌肉组织浸泡至95%乙醇中,置于-20℃冰箱保存。

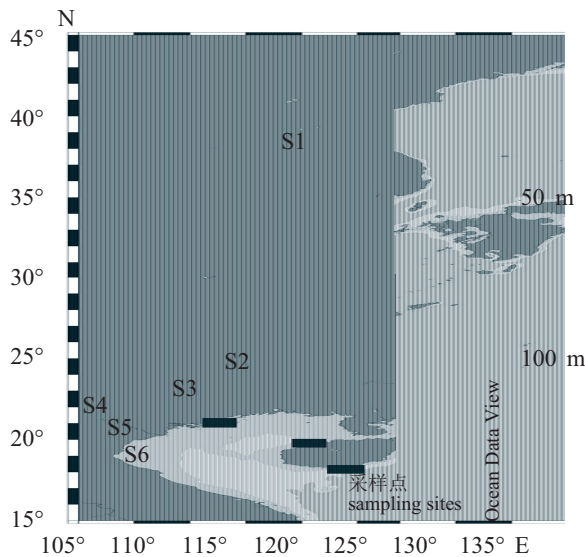


图1 光裸方格星虫采样地点

S1. 烟台; S2. 古雷; S3. 香港; S4. 东兴; S5. 儋州; S6. 陵水

Fig. 1 Sampling sites of *S. nudus*

S1. Yantai; S2. Gulei; S3. Hongkong; S4. Dongxing; S5. Danzhou; S6. Lingshui

1.2 异硫氢酸胍法提取基因组DNA

取少量样品在含600 μL无菌水的EP管中剪碎,12 000 r/min离心10 min,弃上清液,加入600 μL DNA抽提液(10 mmol/L Tris-HCL、0.1 mol/L EDTA、0.5% SDS),蛋白酶K 4 μL,55℃水浴

2~3 h,直至组织完全降解。然后向EP管内加入200 μL异硫氢酸胍溶液(4 mol/L异硫氢酸胍+0.1 mol/L Tris-HCL),轻轻摇晃10 min后于12 000 r/min离心10 min,取上清液再次离心5 min。随后取出600 μL上清液,加入600 μL异丙醇,于冰箱中静置30 min。然后4℃、12 000 r/min离心10 min,弃上清液,静置干燥后加入50 μL无菌双蒸水溶解DNA,-20℃保存备用^[8]。

1.3 PCR扩增

根据获得的古雷光裸方格星虫线粒体基因组全序列(FJ422961)设计扩增细胞色素*b*基因(*cytb*)全长的一对引物CYTBR(CGACTTTCAAATCGTGTT)、CYTBF(AGGAAATGTTTATTGGCAC)。PCR反应体系:2.5 μL 10×Buffer(Mg²⁺ plus)、2.0 μL dNTP(2.5 mmol/L)、0.5 μL模板、Primer(F,R)(100 μmol/L)各0.5 μL、0.2 μL Taq(5 U/μL)(Dream-Taq,Thermo Scientific;rTaq,TaKaRa)和18.8 μL双蒸水。PCR反应条件:94℃预变性5 min,30个循环(94℃40 s、51℃45 s、72℃1.5 min),最后72℃延伸10 min,PCR扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后测序。

以上所有引物均由北京六合华大基因科技股份有限公司合成,测序均由上海美吉生物医药科技有限公司完成。

1.4 数据处理

测序结果用Chromas和EditSeq读取数据,SeqMan^[9]拼接序列,以ClustalX 1.83^[10]软件对拼接完成的序列进行多重比对,并进行核对校正。采用DNASPv5^[11]计算突变位点数(total number of mutations)、多态位点数(number of polymorphic sites)、单倍型数目(number of haplotypes)、核苷酸多样性(nucleotide diversity)、单倍型多样性(haplotype diversity),检测单倍型在各群体中的分布。Arlequin 3.1^[12]软件用于进行分子方差分析(AMOVA)、中性检验(*Tajima's D*、*Fu's Fs*)及错配分布检验,计算群体间的遗传分化指数(*F_{st}*)及对应*P*值,并进行错配分布检验,并结合Microsoft Excel绘制群体错配分布图。Network 4.6^[13]用于获得单倍型网络分布图。以环节动物(Annelida)、蠕虫动物(Echiura)作为外群,采用MEGA6^[14]软件中邻接法*p*-distance核苷酸替换模型构建系统关系树,节点支持率通过快速Bootstrap法计算,重复1000次。

2 结果

2.1 遗传多样性

本团队前期曾检测了光裸方格星虫不同地理群体中COI、ND6、*cytb* 3种线粒体基因的多态位点, 其中*cytb*在群体中的多态性更丰富, 因此本研究选取*cytb*为中国沿海光裸方格星虫遗传多样性分析的分子标记^[15]。PCR扩增获得203条*cytb*序列, 全长1138 bp, 序列已上传至GenBank, 登录号为KP751701~KP751903。计算发现203个*cytb*序列中G+C含量为42.9%, A+T的含量57.1%。

203个*cytb*序列中共有299个多态位点, 331个突变位点, 总体平均核苷酸差异(average number of nucleotide differences)为55.51, 核苷酸多样性为0.0488, 单倍型多样性为0.977(表1)。6个地理群体的核苷酸多样性为0.0024~0.0267, 烟台群体的核苷酸多样性最高, 其他5个群体的遗传多样性均较低, 总体上6个群体的核苷酸多样性指数均较低。单倍型多样性则介于0.93~0.97, 香港群体的单倍型多样性最低, 儋州群体的单倍型多样性指数最高, 6个群体的单倍型多样性指数均较高。而烟台群体的平均核苷酸差异数(30.33)显著高于其他5个群体(2.79~4.05)。

表1 光裸方格星虫不同群体遗传多样性分析

Tab. 1 Genetic diversity of different populations of *S. nudus*

群体 population	类群 group	<i>n</i>	<i>N</i> _{bp}	遗传多样性 genetic diversity			中性检验 neutrality tests		错配分布 mismatch distribution	
				<i>k</i>	<i>h</i>	π	<i>Tajima's D</i>	<i>Fu's Fs</i>	SSD	HRI
古雷 Gulei	A	35	23	2.79	0.930	0.0024	-2.484	-21.134	0.001 00	0.0279
东兴 Dongxing	A	38	29	3.14	0.937	0.0028	-2.437	-26.238	0.007 96	0.0557
儋州 Danzhou	A	28	22	4.05	0.968	0.0036	-2.174	-17.299	0.006 17	0.0327
陵水 Lingshui	A	39	25	3.25	0.957	0.0029	-2.381	-20.736	0.001 04	0.0235
香港 Hongkong	A	33	23	3.32	0.925	0.0029	-2.523	-19.675	0.001 28	0.0193
烟台 Yantai	B	30	22	30.33	0.958	0.0267	-1.827	0.419	0.006 62	0.0092
总计 total		203	128	55.51	0.977	0.0488				

注: *n*. 个体数; *N*_{bp}. 单倍型数; *k*. 平均核苷酸差异数; *h*. 基因多样性; π . 核苷酸多样性; *Tajima's D*、*Fu's Fs*. 中性检验; SSD、HRI. 错配分布分析

Notes: *n*. number of sequences; *N*_{bp}. number of Haplotypes; *k*. average number of nucleotide differences; *h*. haplotypes diversity; π . nucleotide diversity; *Tajima's D*, *Fu's Fs*. neutrality tests; SSD, HRI. mismatch distribution

2.2 群体结构

光裸方格星虫群体内和群体间变异的AMOVA分析结果显示群体间的变异占总变异的88.4%, 显著高于群体内变异(11.6%)(表2), 说明变异的主要来源是群体间变异。

使用Arlequin软件分析光裸方格星虫群体的遗传分化, 发现6个群体间总的遗传分化系数 $F_{st}=0.884$, 表明群体间呈高度分化。对光裸方格星虫6个群体间的固定指数进行计算, 结果如表3所示。南方5个群体间的固定指数相近, 为0.0844~(-0.0062), 陵水群体与东兴群体之间的固定指数最小, 为负值, 说明无遗传分化。古雷—东兴、古雷—陵水、古雷—香港、东兴—陵水、东兴—香港、陵水—香港群体间固定

指数 $F_{st}<0.05$, 说明这些群体间基本没有分化。古雷—儋州、东兴—儋州、儋州—香港、儋州

表2 光裸方格星虫mtDNA *cytb*群体内和群体间变异的分子方差分析

Tab. 2 The AMOVA analysis of *S. nudus* within and between populations based on *cytb* of mtDNA

变异来源 source of variation	自由度 df	方差总和 sum of squares	变异组分 variance components	变异贡献率/% percentage of variation
群体间 among populations	5	4864.473	28.715	88.4
群体内 within populations	197	742.054	3.767	11.6
总计 total	202	5606.572	32.482	100.0

表 3 光裸方格星虫线粒体 *cytb* 群间的遗传分化(对角线上)和对应的 *P* 值(对角线下方)

Tab. 3 Population pairwise F_{st} (above diagonal) and related P values (below diagonal) based on *S. nudus cytb* of mtDNA

群体	Population	古雷 Gulei	东兴 Dongxing	儋州 Danzhou	陵水 Lingshui	香港 Hongkong	烟台 Yantai
古雷	Gulei		0.0183	0.0689	0.0215	0.0160	0.918
东兴	Dongxing	0***		0.0762	-0.0062	0.0349	0.920
儋州	Danzhou	0***	0***		0.0844	0.0637	0.908
陵水	Lingshui	0.0180±0.0121*	0.829±0.0184NS	0***		0.0445	0.921
香港	Hongkong	0***	0***	0***	0***		0.914
烟台	Yantai	0***	0***	0***	0***	0***	-

注: *表示 $0.01 < P \leq 0.05$; **表示 $0.001 \leq P \leq 0.01$; ***表示 $P \leq 0.001$
 Notes: * $0.01 < P \leq 0.05$; ** $0.001 \leq P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$

—陵水群体间固定指数 $0.05 < F_{st} < 0.15$, 说明这些群体间呈低度分化。而烟台与其他5个群体间的固定指数都很大, 为 $0.908 \sim 0.921$, 远远超过了其他5个群体间的固定系数且 $F_{st} > 0.15$, 说明群体间呈高度分化。东兴—陵水群体间 F_{st} 对应 $P \geq 0.05$, 差异不显著, 古雷—陵水群体间 F_{st} 对应 $0.05 \leq P \leq 0.01$, 差异显著, 其他群体间 F_{st} 对应*P*值均小于 0.001 , 表现为差异极显著。

6个地理群体中, 共检出128个单倍型, 只有单倍型Hap66为6个地理群体所共享, 出现频数为25, 推断次单倍型可能是光裸方格星虫较原

始的单倍型, 多数单倍型为单个地理群体独有。用DNASP生成203个*cytb*序列的单倍型文件, 然后使用Network 4.6获得单倍型网络分布图(图2)。17个黑色圆圈表示缺失的单倍型, 6个群体的单倍型网络分布图呈现一种以6个群体共享的主单倍型(Hap66在25个个体中出现)为中心的放射状结构; 烟台群体的单倍型与来自其他地方的单倍型基本上完全分割开来, 显示烟台群体和南方的各个群体之间可能存在较大的遗传距离。

由于单倍型网络图显示烟台群体与其他5个

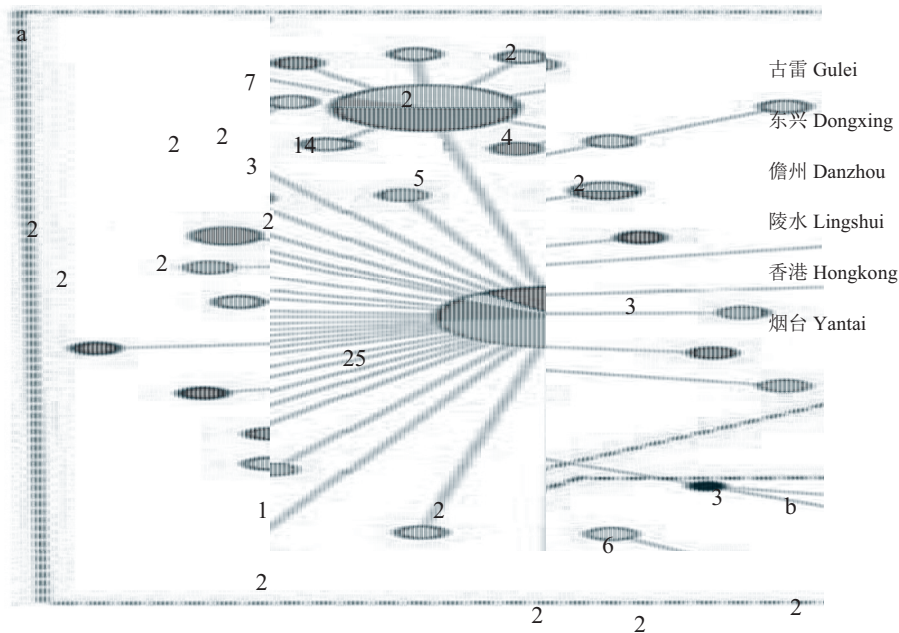


图 2 光裸方格星虫 mtDNA *cytb* 单倍型网络结构图

注: 图中数字为每种单倍型个体数

Fig. 2 Haplotype network of *S. nudus* based on the *cytb* of mtDNA

Notes: number in this picture means number of each haplotype

群体间遗传距离较远, 因此在绘制核苷酸错配分布图时将5个南方群体放在一起绘制(图3-a), 烟台群体则单独绘制一个错配分布图(图3-b)。图中柱形表示核苷酸成对差异观测值, 线条表示群体突然扩张的模拟值。烟台群体和南方群体的核苷酸不配对分布曲线均呈现单峰状。

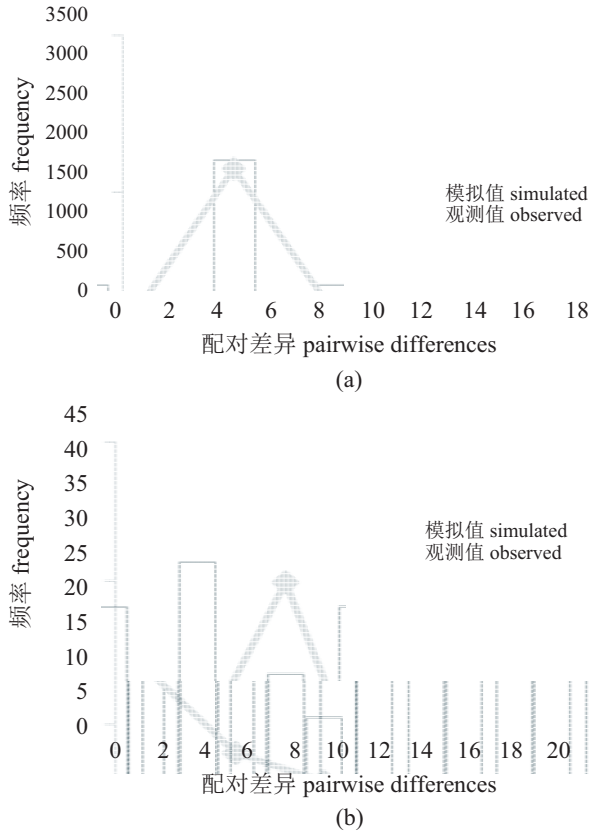


图3 中国沿海光裸方格星虫clade A和clade B的核苷酸错配分布图

(a)古雷、东兴、香港、儋州、陵水5个南方群体核苷酸错配分布图; (b)烟台群体核苷酸错配分布图

Fig. 3 Mismatch distribution for the two clades of *S. nudus* collected from the coastal waters of China

(a) mismatch distribution of five south populations; (b) mismatch distribution of Yantai population

2.3 系统发育分析

采用邻接法对203条光裸方格星虫*cytb*序列中的*p-distance*模型构建系统发育树, 从GenBank下载环节动物锥头虫(*Orbinia latreillii*, NC_007933)和蠕虫动物美洲刺蠕(*Urechis caupo*, NC_006379)的*cytb*序列作为外群(outgroup), 另外下载数据库中星虫动物门的2个可口革囊星虫(*Phascolosoma esculenta*-EF583817和EF521178)、

P. gouldii-AF374337及湛江的光裸方格星虫(EF521186)的*cytb*序列参与了系统发育树的构建。南方群体的173个个体聚为一支, 烟台群体的30个个体单独聚为一支(图4), 且具有很高的支持率(bootstrap: 100), 这一结果与遗传多样性分析结果一致, 烟台群体与南方群体间存在较大的遗传分化。另外以蠕虫动物和环节动物作为外群, 光裸方格星虫与革囊星虫属聚在一起, 与传统形态学分类关系一致。

3 讨论

3.1 光裸方格星虫的遗传多样性分析

遗传多样性是生物多样性的重要组成部分, 物种或居群遗传多样性大小是长期进化的产物, 是其生存适应和发展进化的前提。一个居群或物种的遗传多样性越高或遗传变异越丰富对环境变化的适应能力越强, 容易扩展其分布范围和开拓新环境。因此, 群体遗传多样性研究可以揭示物种或居群的进化历史, 也能为进一步分析其进化潜力和未来的命运提供重要的资料^[16]。

研究物种遗传多样性的分子标记有很多, 其中线粒体基因由于其进化速率快、母系遗传、种群间的遗传差异易被检出等优势, 被认为是评估群体遗传变异以及区别不同自然种群的有效遗传标记, 并在多个物种的研究中得到广泛应用。*cytb*编码位于线粒体内膜上的细胞色素b氧化酶的一个亚基, 它的结构和功能已经非常清楚, 是一种常见的mtDNA分子标记, 进化速率适中, 序列变异率较高, 种间差异大, 较短的一个DNA片段就能包含从种下水平到属水平乃至纲水平的系统发育信息, 被认为是解决分类及系统进化问题可信的分子标记之一^[17-18]。

本研究中, 光裸方格星虫6个地理群体核苷酸多样性为0.0489, 单倍型多样性为0.977, 核苷酸多样性较低, 而单倍型多样性较高, 核苷酸多样性的积累时间比单倍型多样性的积累时间要漫长的多, 在一定程度上核苷酸多样性比单倍型多样性更能反映群体遗传多样性^[19]。从这个角度而言, 中国沿海光裸方格星虫群体的遗传多样性较低, 说明光裸方格星虫对环境变化的适应能力较差, 加强对光裸方格星虫野生资源的保护势在必行。另外, “高*h*低*π*”的遗传多样性

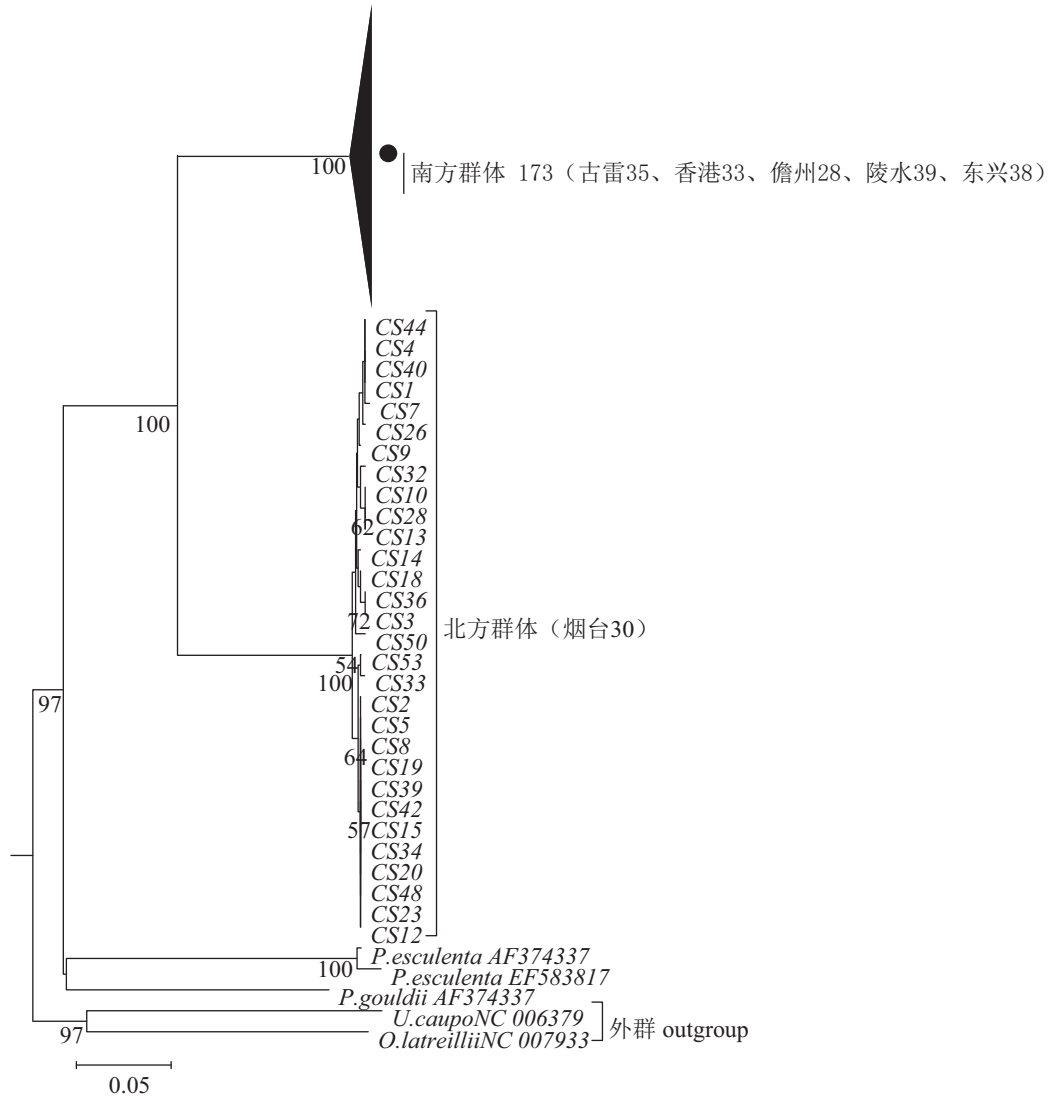


图 4 基于光裸方格星虫mtDNA *cytb*序列构建NJ系统发育树

地名后的数字为样品数量

Fig. 4 NJ phylogenetic tree of *S. nudus* based on the *cytb* sequences of mtDNA

After the toponymy is the number of samples

类型也说明光裸方格星虫群体在历史上可能由于某种因素急剧减少后又迅速扩张。

Du等^[20]以COI为分子标记研究北海、三亚、厦门的光裸方格星虫核苷酸多样性亦较低(0.0035±0.0018),单倍型多样性丰富(0.935±0.062),与本研究结果一致;而Du等^[21]以16S rRNA为分子标记,研究结果显示核苷酸多样性较高(0.37%),单倍型多样性丰富(0.814%),然而每个地理群体仅10个个体,数量少,易导致较大误差。Hsu^[2]等基于COI(612 bp)序列分析了中国南部沿海8个地理位置的光裸方格星虫遗传多样性,核苷酸多样性除了台湾群体(0.013)和厦门群体

(0.082)较低外,其他群体均较高,为0.171~1.325,与本研究有分歧,而单倍型多样性较高,与本研究一致。核苷酸多样性研究存在分歧可能是研究方法和样品来源地不同导致的。Hsu^[2]等采用612 bp的部分COI基因作为分子标记,序列相对较短,而本研究以*cytb*(1138 bp)全长作为分子标记,序列更长,信息更为丰富;另一方面Hsu^[2]等研究的8个地理群体间个体数目差异很大,从4到48个不等,厦门、北海、三亚3个群体个体数不足10个,易形成较大误差,而本研究中6个群体的个体数均在30个左右。综上所述,认为本研究的结果具有更高的可靠性。

3.2 光裸方格星虫群体结构分析

AMOVA分析结果显示,光裸方格星虫6个地理群体变异的主要来源是群体间变异(88.4%),而群体内变异仅占11.6%。Du等^[21]基于线粒体基因16S *rRNA*对北海、三亚、厦门3个群体的遗传结构分析结果显示,变异主要来自群体内(93.81%);而Meyer等^[17]采用COI基因的研究结果显示变异亦主要来自群体内(92.04%),与本研究结果不一致。究其原因可能是厦门、三亚、北海三地距离较近,星虫幼虫的担轮生活阶段、海水流动等因素加大了群体间的基因流,从而减少了群体间的变异,而本研究采集样品范围更广,涉及到中国北部和南部沿海的群体,南北群体地理位置相距较远,地理上的一些屏障可能阻碍了群体间的基因流,久而久之逐渐加大群体间的变异,且本研究的遗传分化结果显示烟台群体与其他5个群体间存在较大的遗传分化,也印证了这一推断,而烟台群体与其他群体间的变异可能增大了整体群体间变异。

光裸方格星虫遗传分化结果显示,烟台群体与其他5个群体间成高度分化($F_{st} > 0.15$, $P < 0.001$),5个南方群体间呈低度分化或基本无分化,而群体单倍型网络分布图和系统发育分析结果也支持这一结论。很显然以烟台群体为代表的北方群体与南方群体已经产生了较大遗传分化,是否已经形成隐种仍需进一步的研究。

3.3 群体历史动态分析

错配分布分析结果 θ_0 值均较低,而 θ_1 值均较高,SSD、HRI不显著,中性检验Tajima's *D*、Fu's *F_s*的结果均说明光裸方格星虫在群体动态历史中经历了群体扩张。烟台群体和南方群体的核苷酸不配对分布曲线均呈单峰,也显示星虫群体在历史上经历过大规模群体扩张,光裸方格星虫群体单倍型网络分布图呈现一种以6个群体共享的主单倍型(Hap66)为中心的放射状结构,也显示星虫群体在历史上经历过大规模扩张的过程。星虫对生存环境很敏感,生存环境的污染和破坏都会导致野生星虫的数量急剧下降,历史上星虫可能因为生存环境的破坏导致数量急剧下降,而后群体又迅速扩张。近期的一些研究表明,由于过度捕捞和对环境的破坏,星虫的数量目前正快速下降^[12],对星虫种质资源的保护迫在眉睫。

参考文献:

- [1] 李凤鲁,周红,王玮. 中国沿海星虫动物门名录[J]. 青岛海洋大学学报, 1992, 22(2): 72-88.
Li F L, Zhou H, Wang W. A checklist of Sipuncula from the China coasts[J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 1992, 22(2): 72-88(in Chinese).
- [2] Hsu T H, Ning Y, Gwo J C, *et al.* DNA barcoding reveals cryptic diversity in the peanut worm *Sipunculus nudus*[J]. Molecular Ecology Resources, 2013, 13(4): 596-606.
- [3] Maxmen A B, King B F, Cutler E B, *et al.* Evolutionary relationships within the protostome phylum Sipuncula: A molecular analysis of ribosomal genes and histone H3 sequence data[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2003, 27(3): 489-503.
- [4] Pancucci-Papadopoulou M A, Murina G V V, Zenetos A. The Phylum Sipuncula in the Mediterranean Sea[M]. Athens: National Center for Marine Research, 1999.
- [5] 张桂和,李理,赵谋明,等. 方格星虫营养成分分析及抗疲劳作用研究[J]. 营养学报, 2008, 30(3): 318-320.
Zhang G H, Li L, Zhao M M, *et al.* Study on the nutritional components of *Sipunculus nudus* and its anti-fatigue effects in mice[J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2008, 30(3): 318-320(in Chinese).
- [6] 黄岛平,刘永强,林葵,等. 北部湾革囊星虫和方格星虫主要营养成分比较分析[J]. 大众科技, 2012, 14(8): 172-173, 169.
Huang D P, Liu Y Q, Lin K, *et al.* Comparative analysis of main nutritive components on *Phascolosoma esulenta* and *Sipunculus nudus* in Beibu gulf[J]. Popular Science & Technology, 2012, 14(8): 172-173, 169(in Chinese).
- [7] Kawauchi G Y, Giribet G. *Sipunculus nudus* Linnaeus, 1766 (Sipuncula): cosmopolitan or a group of pseudo-cryptic species? An integrated molecular and morphological approach[J]. Marine Ecology, 2014, 35(4): 478-491.
- [8] 徐伟丽,杜明,李启明,等. 动物肌肉组织基因组DNA两种提取方法的比较[J]. 食品工业科技, 2011, 32(12): 81-84.
Xu W L, Du M, Li Q M, *et al.* Comparison of the effects of two methods for four animal muscular tissue DNA extraction[J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(12): 81-84(in Chinese).
- [9] Burland T G. DNASTAR's lasergene sequence analysis

- software[M]//Misener S, Krawetz S. Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology™. Totowa N J: Humana Press, 1999: 71-91.
- [10] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [11] Rozas J, Sánchez-DelBarrio J C, Messeguer X, *et al.* DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods[J]. *Bioinformatics*, 2003, 19(18): 2496-2497.
- [12] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis[J]. *Evolutionary Bioinformatics*, 2005, 1: 47-50.
- [13] Bandelt H J, Forster P, Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1999, 16(1): 37-48.
- [14] Tamura K, Stecher G, Peterson D, *et al.* MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [15] 宋素霞. 中国沿海光裸方格星虫线粒体基因组分析及遗传多样性研究[D]. 厦门: 集美大学, 2015.
Song S X. Study on mitochondrial genome and genetic diversity of *Sipunculus nudus* in the coasts of China[D]. Xiamen: Jimei University, 2015 (in Chinese).
- [16] 中国科学院生物多样性委员会. 生物多样性研究的原理与方法[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994: 141-165.
Biodiversity Committee of Chinese Sciences Academy. Principles and Methods of Biodiversity Research[M]. Beijing: China Science and Technology Publishing House, 1994:141-165 (in Chinese).
- [17] Meyer A, Wilson A C. Origin of tetrapods inferred from their mitochondrial DNA affiliation to lungfish[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1990, 31(5): 359-364.
- [18] Meyer A, Kocher T D, Basasibwaki P, *et al.* Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences[J]. *Nature*, 1990, 347(6293): 550-553.
- [19] Grant W A S, Bowen B W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation[J]. *Journal of Heredity*, 1998, 89(5): 415-426.
- [20] Du X D, Chen Z A, Deng Y W, *et al.* Comparative analysis of genetic diversity and population structure of *Sipunculus nudus* as revealed by mitochondrial *COI* sequences[J]. *Biochemical Genetics*, 2009, 47(11-12): 884-891.
- [21] Du X D, Chen Z A, Deng Y W, *et al.* Genetic diversity and population structure of the peanut worm (*Sipunculus nudus*) in Southern China as inferred from mitochondrial 16S rRNA sequences[J]. *Israeli Journal of Aquaculture-BAMIDGEH*, 2008, 60(4): 237-242.

Genetic diversity of *Sipunculus nudus* along the coasts of China

SONG Suxia¹, DING Shaoxiong², YAN Qingpi¹, QIN Yingxue^{1*}

(1. Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture, Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: *Sipunculus nudus* resources have been seriously damaged in the recent years due to overfishing and habitat destruction. Protecting natural resources of *S. nudus* has become more and more urgent. In this paper, genetic structure and population differentiation of *S. nudus* from 6 localities along the coasts of China were analyzed based on sequences of mitochondrial cytochrome b gene. Complete mitochondrial *cytb* sequences from 203 individuals of *S. nudus* were analyzed, 299 polymorphic sites and 128 haplotypes were identified and the nucleotide diversity and haplotypes diversity were 0.0488 and 0.9773, respectively. The variation among populations (accounting for 88.4%) was the main source of variation. According to differentiation index (F_{st}) in populations of *S. nudus*, the 5 populations in the south of Yantai showed no significant differences or low differences, with $F_{st} < 0.15$. There were high differences between Yantai and other 5 populations, with $F_{st} > 0.15$. Fu's F_s and Tajima's D were negative. Figures of mismatch distribution were unimodal. Haplotype network was radial structure centering on main haplotype. NJ phylogenetic tree of *S. nudus* based on 203 sequences of *cytb* of mtDNA revealed that these 6 populations were divided into 2 clades, one clade was Yantai population and the other clade included the rest 5 populations in the south of Yantai. All these results revealed that *S. nudus* population had experienced a large-scale population expansion in history, and the relatively low genetic diversity of *S. nudus* now suggested that the ability of *S. nudus* to adapt to environmental changes was poor and some measures should be taken to protect *S. nudus* resources. Phylogenetic tree suggested Yantai population was distinct from the other 5 populations, but whether Yantai population has become a cryptic species still needs further research.

Key words: *Sipunculus nudus*; *cytb*; genetic diversity; population structure; phylogenetic analysis

Corresponding author: QIN Yingxue. E-mail: yxqin@jmu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31502194); Public Science and Technology Research Funds Projects of Ocean (201205024-2); Regional Demonstration of Marine Economy Innovative Development Project(14PYY050SF03)