

文章编号: 1000-0615(2017)10-1542-10

DOI: 10.11964/jfc.20160410337

## 基于线粒体控制区序列的光裸方格星虫群体遗传多样性分析

彭银辉<sup>1</sup>, 周于娜<sup>2</sup>, 刘旭佳<sup>1</sup>, 黄国强<sup>1,3</sup>,  
蔡小辉<sup>3\*</sup>, 潘英<sup>2\*</sup>

(1. 广西海洋研究所, 广西海洋生物技术重点实验室, 广西北海 536000;

2. 广西大学动物科学技术学院, 广西南宁 530004;

3. 钦州学院海洋学院, 海洋生命科学与技术研究中心, 广西钦州 535011)

**摘要:** 为了解光裸方格星虫的群体遗传结构和种质资源状况, 对北部湾海域光裸方格星虫6个地理野生群体(广西北海、湛江、钦州、防城港、海南儋州, 以及越南海防)共93个个体的线粒体DNA (mtDNA)控制区序列进行分析。共检测到107个变异位点, 定义了85个单倍型, 序列对AT有明显的偏倚性, 群体总的单倍型多样性( $H_d$ )和核苷酸多样性( $P_i$ )分别为0.998和0.018 89。单倍型邻接聚类树分析6个群体无明显分支, 各单倍型分布于单倍型网络中介图中亦没有明显的地理分支。各群体间的遗传分化系数 $F_{st}$ 值为-0.018 13~0.028 05, 遗传分化极不明显, AMOVA分析显示光裸方格星虫的遗传差异主要来自群体内(99.74%)。中性检验Tajima's  $D$ 和Fu's  $F_s$ 值均为负值, 核苷酸不配对分布图呈明显的单峰形, 提示光裸方格星虫群体在历史上曾出现群体扩张, 推算出扩张时间为距今171万年前。目前光裸方格星虫仍具有较高的遗传多样性, 6个地理群体间无明显遗传分化, 存在频繁的基因交流, 推测种群在早更新世曾出现群体扩张。

**关键词:** 光裸方格星虫; 遗传结构; 线粒体控制区; 北部湾

**中图分类号:** Q 347; S 917.4

**文献标志码:** A

光裸方格星虫(*Sipunculus nudus*)属方格星虫目(Sipunculiformes), 方格星虫科(Sipunculidae), 方格星虫属(*Sipunculus*), 为世界性暖水种<sup>[1]</sup>。主要分布于我国东南沿海及北部湾沿海, 尤其以广西沿海资源最为丰富<sup>[2]</sup>, 因喜栖于泥沙质或砂质海滩, 俗称“沙虫”。在欧洲, 人们通常用其作为鱼饵; 在中国和越南, 因其极佳的鲜味和营养价值而备受青睐<sup>[3]</sup>。光裸方格星虫经济价值高, 滩涂人工增养殖市场前景诱人, 已然成为北部湾滩涂养殖新热点。由于多年来的过度滥采挖、填海造地、新建沿海工业、码头等, 光裸方格星虫的优质种质资源日益衰竭, 因此, 光裸方格星虫的遗传多样性研究以及保育等工作迫在眉睫。

线粒体DNA (mtDNA)因分子量小<sup>[4]</sup>、高突变

率和严格母性遗传<sup>[5-6]</sup>而被广泛应用到分子遗传学研究中。其控制区是线粒体基因组中重要的非编码区<sup>[7]</sup>, 具有较高的核苷酸替换率和核苷酸插入、缺失等突变率, 是整个mtDNA基因组序列和长度变异最大的区域, 进化速率是其他序列的5~10倍, 在近缘种群或同一群体不同个体间具有显著的差异, 特别适合种群遗传多样性分析<sup>[8-11]</sup>。

目前, 国内外对于光裸方格星虫遗传多样性的研究<sup>[12-17]</sup>已有报道, 但对光裸方格星虫资源丰富的广西沿海取样点少, 尚未有基于mtDNA控制区序列的光裸方格星虫群体遗传结构分析, 本研究基于光裸方格星虫群体mtDNA控制区序列, 探讨北部湾6个不同光裸方格星虫地理群体的遗传结构, 为其资源状况和保育等工作提供理论依据。

收稿日期: 2016-04-03 修回日期: 2016-06-20

资助项目: 国家自然科学基金(31160532); 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻14121006-2-1); 广西自然科学基金(2015GXNSFBA139081); 广西科学院基本科研业务费(15YJ22HYS13)

通信作者: 蔡小辉, E-mail: caixiaohui66@163.com; 潘英: E-mail: yingpan@gxu.edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验所用光裸方格星虫于2010年10月至2015

年5月, 分别采自中国湛江(ZJ)、防城港(FC)、钦州(QZ)、北海大冠沙(BH)、儋州(DZ)和越南海防(YN)的6个自然群体(表1)。样本活体运回实验室, 取体壁肌肉于95%酒精中固定,  $-20^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

表1 实验用方格星虫样品采集数量、地点、时间

Tab. 1 Sample information of *S. nudus* including sample quantity, sampling site, date of collection

群体 population	样品量/只 quantity	样品采集地 sampling site	采集时间 sampling date	经度/E longitude	纬度/N latitude
YN	35	越南海防	2015-05	107°18'35.87"	20°54'23.63"
DG	33	广西北海	2014-06	109°14'13.65"	21°26'31.34"
DZ	30	海南儋州	2013-07	109°13'26.04"	19°43'20.44"
FC	32	广西防城港	2010-10	108°20'48.49"	21°33'33.14"
QZ	32	广西钦州	2011-10	108°40'6.67"	21°38'43.04"
ZJ	35	广东湛江	2014-09	109°46'38.04"	21°16'17.19"

### 1.2 DNA的提取与PCR的扩增

剪取30 mg组织, 采用TIANamp Marine Animals DNA Kit(北京天根)海洋动物组织基因组DNA试剂盒进行基因组DNA提取, 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,  $4^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

从GenBank数据库下载光裸方格星虫线粒体基因组全长序列(*S. nudus*, FJ422961.1; KJ754934.1), 同源比对这两个序列的控制区及其上下游序列, 设计控制区扩增简并引物: D-Loop142上: 5'-CACGCTCCCATTTTCYCTCCGATT-3'; D-Loop1180下: 5'-CCTGYKGTGCGKGTATTAA RACAAG-3'。引物由南宁市天地杨生物科技有限公司合成。PCR反应体系为25  $\mu\text{L}$ , 包含2.5  $\mu\text{L}$  10 $\times$  PCR Buffer、2  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  (25 mmol/L)、1  $\mu\text{L}$  dNTPs (10 mmol/L)、0.2  $\mu\text{L}$  *Taq*聚合酶(2.5 U/ $\mu\text{L}$ )、上下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各1  $\mu\text{L}$ 、DNA模板1.5  $\mu\text{L}$ , 补充无菌水至25  $\mu\text{L}$ 。所用试剂均购自天根生化科技(北京)有限公司。PCR反应程序:  $94^{\circ}\text{C}$  预变性5 min;  $94^{\circ}\text{C}$  变性50 s、 $55^{\circ}\text{C}$  退火40 s、 $72^{\circ}\text{C}$  延伸60 s, 共运行32个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  终延伸10 min。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测后, 送至上海立菲生物技术有限公司双向测序和拼接。

### 1.3 数据分析

对所有拼接所得样品序列用DNASTAR和MEGA 6.0 (molecular evolutionary genetics analysis) 软件进行比对, 并辅以人工校正, 确定序列比对长度; 然后用该软件<sup>[18]</sup>分析各群体以及群体间的核

苷酸组成, 基于单倍型构建NJ (Neighbor Joining) 系统聚类树。利用DnaSP 5.0<sup>[19]</sup>分析各个群体的遗传多样性水平。使用Network 4.6<sup>[20]</sup>软件构建单倍型的简约中介(Reduced-Median, MJ)网络图。运用Arlequin 3.5<sup>[21]</sup>软件进行分子差异分析(AMOVA), 计算分遗传分化系数 $F_{st}$  ( $F$ -statistics), 按照Wright的 $F_{st}$ 法计算反映基因流强度的类群每代迁移数:  $N_m=1-F_{st}/4F_{st}$ <sup>[22]</sup>。

结合中性检验和核苷酸不配对分布(mismatch distribution analysis)来进行群体动态分析, 利用群体扩增参数 $\tau$ , 由公式 $\tau=2ut$ 估算群体扩张时间<sup>[21]</sup>, 其中 $u$ 是整个序列的突变率(%)( $u=\mu k$ ,  $k$ 为序列大小、 $\mu$ 为控制区进化速率),  $t$ 表示扩张发生至今的时间。

## 2 结果

### 2.1 序列特征及群体遗传多样性

实验所得测序和拼接成功的光裸方格星虫mtDNA控制区序列共93条, 长度1030 bp, 包含控制区上游和下游部分序列。将所得的93条序列与国内方格星虫线粒体基因组全序列(GenBank: KJ754934.1)同源比对, 并手工校正, 最终得到用于比对分析序列的平均长度为468 bp。使用MEGA 6.0 软件分析所有群体的核苷酸组成, 结果显示各群体的碱基含量基本一致, 且所有群体的A+T (73.06%)的含量均显著高于G+C (26.94%)。

分析6个不同地理群体的光裸方格星虫, 共

检测到107个变异位点(表2)。共定义了85个单倍型,其中共享单倍型有6个(Hap9、Hap20、Hap33、Hap36、Hap48、Hap66),每个群体都有各自独享的单倍型。表2为6个光裸方格星虫群体的遗传多样性参数,结果显示,总体的单倍体多样性( $H_d$ )、核苷酸多样性( $P_i$ )和平均核苷酸差异数

( $K$ )分别为0.998、0.018 89和8.4836。其中越南、北海、防城港、湛江群体 $H_d$ 最高,均为1.000,最低为钦州群体(0.9820);从 $P_i$ 和 $K$ 来看,其最高值均出现在儋州群体( $P_i$ : 0.025 02、 $K$ : 11.5088),最低值均出现在钦州群体( $P_i$ : 0.015 07、 $K$ : 6.9636)。

表 2 光裸方格星虫群体的遗传多样性参数

Tab. 2 Parameters of genetic diversity for 6 populations of *S. nudus*

群体 population	样品量/只 sample size	多态位点(S) number of polymorphic site	单倍型数(H) haplotypes	单倍型多样性( $H_d$ ) haplotype diversity	核苷酸多样性( $P_i$ ) nucleotide diversity	平均核苷酸差异数(K) average number of nucleotide differences
YN	15	35	15	1.0000	0.018 06	8.3619
DG	13	35	13	1.0000	0.017 95	8.3462
DZ	19	63	18	0.9940	0.025 02	11.5088
FC	16	42	16	1.0000	0.018 46	8.5667
QZ	11	23	10	0.9820	0.015 07	6.9636
ZJ	19	50	19	1.0000	0.020 66	9.5439
合计 total	93	107	85	0.9980	0.018 89	8.4836

2.2 群体遗传距离和单倍型NJ聚类分析

基于Kimura双参数模型(Kimura 2-parameter)计算6个群体内与群体间的平均遗传距离(表3),各群体内的平均遗传距离最大值为儋州群体(0.024),最小值为钦州群体(0.015),6个群体的群体内平均遗传距离大小为DZ>ZJ>FC>YN>BH>QZ。6个光裸方格星虫群体间的遗传距离(0.016~0.022)差异不大,其中以儋州与防城港和湛江的值最大(0.022),钦州与越南、北海的值最小(0.016)。

基于85个单倍型来构建系统NJ树,6个光裸

方格星虫群体无明显分支(图1)。

2.3 群体遗传结构

对6个光裸方格星虫群体两两之间的 $F_{st}$ 值分析结果如表4所示,各群体之间的 $F_{st}$ 值为-0.018 13~0.028 05,统计检验均不显著( $P>0.05$ ),显示群体间分化较小。基因流结果表明群体间存在明显的基因交流,防城港与钦州群体基因交流最大(162.09),与湛江群体基因交流最小(8.66)。

根据AMOVA分析(表5)可知6个群体间的遗传分化指数 $F_{st}$ 为0.002 60( $P>0.05$ )。光裸方格星虫的遗传差异主要来自群体内(99.74%),群体间的

表 3 6个光裸方格星虫群体内和群体间的遗传距离

Tab. 3 Genetic distance within and between six *S. nudus* populations

群体 population	YN	BH	DZ	FC	QZ	ZJ
YN	0.018*					
BH	0.018	0.017*				
DZ	0.021	0.020	0.024*			
FC	0.019	0.018	0.022	0.019*		
QZ	0.016	0.016	0.020	0.017	0.015*	
ZJ	0.018	0.019	0.022	0.020	0.017	0.020*

注: \*表示群体内的遗传距离(对角线),下三角数据表示群体间的遗传距离

Notes: \* indicates the genetic distance within a population (diagonal), the numbers below diagonal express the genetic distance between six populations

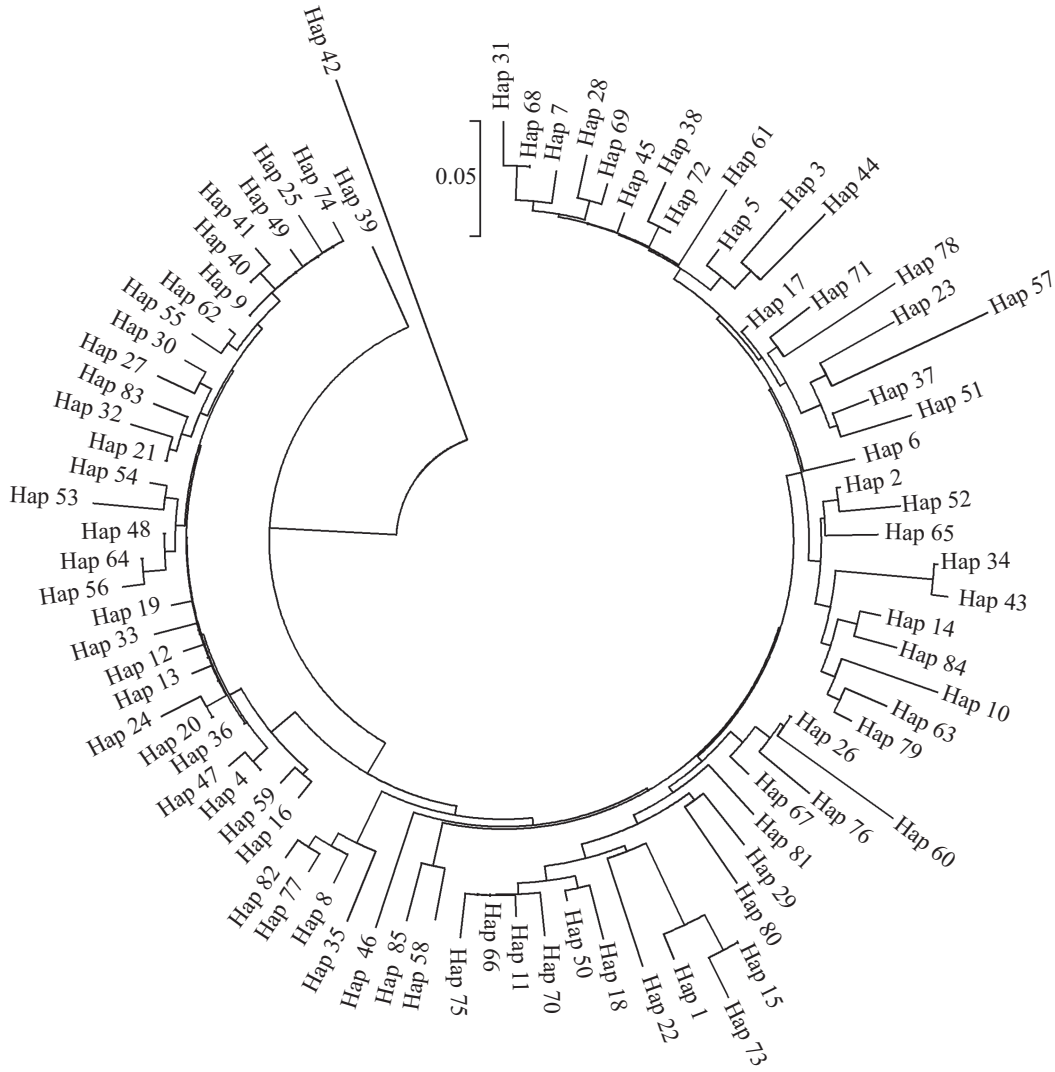


图 1 基于光裸方格星虫单倍型构建的邻接关系树

Fig. 1 NJ tree based on haplotype of populations of *S. nudus*

表 4 光裸方格星虫两两群体间的分化指数  $F_{st}$ /P值(下三角)和基因流  $N_m$ (上三角)

Tab. 4 Pairwise  $F_{st}$  (below diagonal) and  $P$  values (above diagonal) among populations of *S. nudus*

群体 population	YN	BH	DZ	FC	QZ	ZJ
YN		12.28	26.6	8.9	-20.2	-13.54
BH	0.019 95/0.153 15	0	-22.33	-20.9	21.7	9.89
DZ	0.009 31/0.180 18	-0.011 07/0.639 64	0	15.93	15.61	11.33
FC	0.027 31/0.153 15	-0.011 82/0.684 68	0.015 45/0.216 22	0	162.09	8.66
QZ	-0.012 22/0.6036	0.011 39/0.270 27	0.015 76/0.198 20	0.001 54/0.387 39	0	-37.34
ZJ	-0.018 13/0.864 86	0.024 65/0.144 14	0.021 59/0.108 11	0.028 05/0.099 10	-0.006 65/0.639 64	0

注:  $P$ 检验的差异显著水平为0.05 ( $P<0.05$ )

Notes: means significant difference at 0.05 level ( $P<0.05$ )

差异则比较小(0.26%)。由单倍型中介网络图可知, 各地理群体的单倍型并没有明显的分支(图2,

圆圈大小表示单倍型的频率, 圆圈面积与单倍型频率成正比)。

表 5 光裸方格星虫群体间遗传差异的分子方差分析(AMOVA)

Tab. 5 Analysis of molecular variance (AMOVA) among population of *S. nudus* populations

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	5	2.589	0.001 30Va	0.26
群体内 within population	87	43.304	0.497 75Vb	99.74
总计 total	92	45.892	0.499 04	

注: Va. 群体内变异; Vb. 群体间变异

Notes: Va. variation within population; Vb. variation between populations

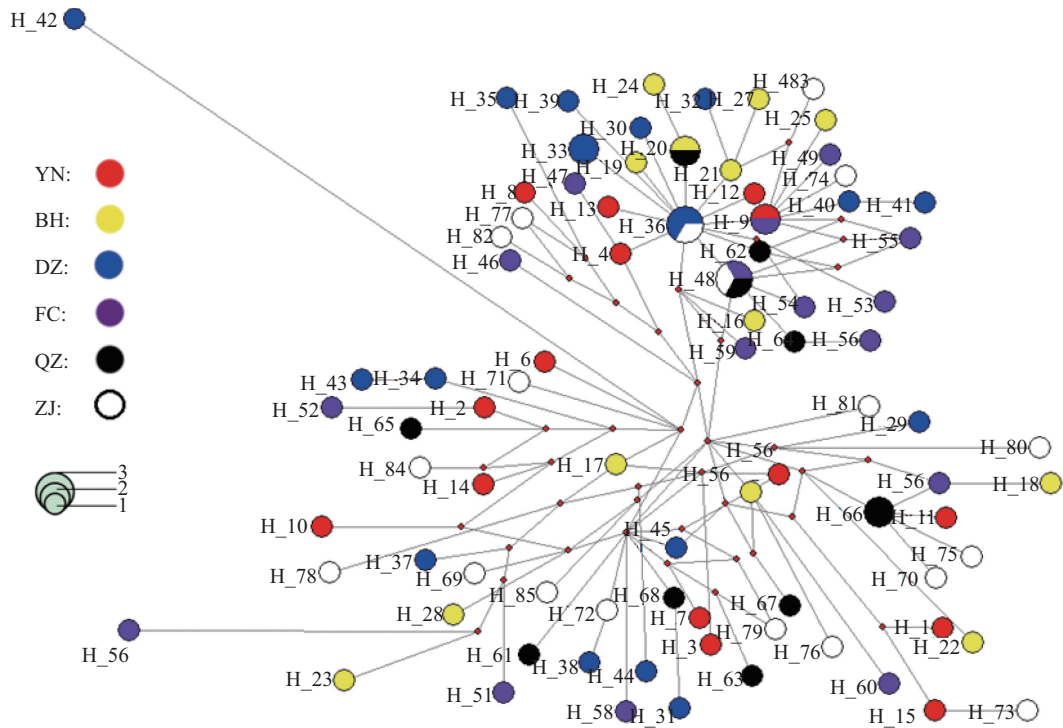


图 2 光裸方格星虫群体mtDNA控制区基因单倍型中介网络图

Fig. 2 Median-joining network of populations of *S. nudus* based on control region sequences

2.4 群体动态分析

因各地理群体间的遗传分化程度较低, 所以将6个地理群体作为一个整体进行群体动态分析。由中性检验可知Tajima's *D*和Fu's *F<sub>s</sub>*值均为负值且差异显著(表6)。群体核苷酸不配对分布图明显的单峰分布(图3)。综合中性检验与核

苷酸不配对分布可推测出光裸方格星虫群体在历史上曾出现群体扩张。

参考Kawauchi等<sup>[23]</sup>研究显示星虫动物门(Sipuncula)的COI序列进化率为0.3%/百万年, COI是线粒体基因中进化速率最慢的<sup>[24]</sup>, 而控制区却是最快的, 且其进化速率约为线粒体其他

表 6 光裸方格星虫群体中性检验和错配分布参数

Tab. 6 Neutral test and mismatch distribution of nucleotide of populations of *S. nudus*

中性检验 neutral test	错配分布 mismatch distribution of nucleotide
<i>D</i>	<i>F<sub>s</sub></i>
$\tau$ (95%置信区间)	$\theta_0$
$\theta_1$	$\theta_1$
-1.978 32**	-24.692 49**
12.072 32	3.600 00
	3574.984 61

注: \*\*表示差异极显著( $P < 0.01$ );  $\theta_0 = 2uN_0$ ,  $\theta_1 = 2uN_1$ ;  $N_0$  0代群体大小,  $N_1$  1代群体大小

Notes: \*\* means extremely significant difference ( $P < 0.01$ );  $\theta_0 = 2uN_0$ ,  $\theta_1 = 2uN_1$ ;  $N_0$ . population size of generation 0,  $N_1$ . population size of generation 1

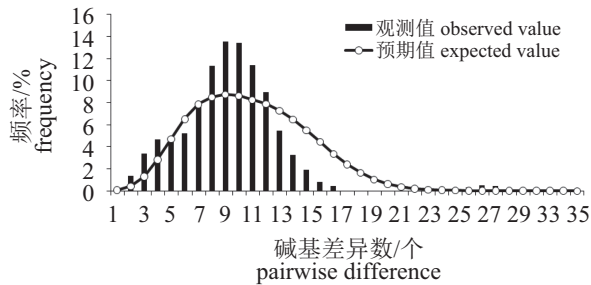


图3 光裸方格星虫群体核苷酸不配对分布图

Fig. 3 Nucleotide mismatch distribution of populations of *S. nudus*

区段序列的2~5倍<sup>[25]</sup>, 由此可估算出本研究中控制区的突变率 $u$ 约为7.02/百万年。结合表6的 $\tau$  (95%CI) 值, 代时取2(光裸方格星虫通常在2龄达到性成熟), 根据公式 $\tau=2ut$ 可推算群体扩张时间约为距今171万年前(1.7197百万年)。

### 3 讨论

#### 3.1 单倍体多样性和核苷酸多样性

基于线粒体控制区的分析是研究种群遗传多样性和遗传变异的有效手段之一。本研究对光裸方格星虫线粒体控制区碱基组成进行分析, 发现其富含AT。Mwinyi等<sup>[13]</sup>在对光裸方格星虫线粒体基因的研究中提出, 光裸方格星虫的mtDNA与大多数后生动物一样, 为共价闭合环状双分子双链DNA(约155 502 bp), 非编码区高度富集AT, 本研究结果与其相符, 这一结果也与其他无脊椎动物控制区序列的研究一致<sup>[26-27]</sup>。

单倍型多样性( $H_d$ )和核苷酸多样性( $P_i$ )是衡量遗传多样性的重要指标。本实验所得总群体的单倍型多样性( $H_d$ )和核苷酸多样性( $P_i$ )分别为0.998和0.018 89。Du等<sup>[17]</sup>利用COI研究北海、厦门和三亚等地方格星虫遗传多样性, 得出其平均 $H_d$ 和 $P_i$ 分别为0.9754和0.0035。本研究结论较其他海水动物线粒体基因同区段的研究而言, 高于乌鳢<sup>[10]</sup>(*Ophiocephalus argus*) ( $H_d$ : 0.875;  $P_i$ : 0.003 27)和鳊(*Therapon theraps*) ( $H_d$ : 0.986;  $P_i$ : 0.009)<sup>[28]</sup>, 稍高于中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) ( $H_d$ : 0.958;  $P_i$ : 0.017)<sup>[29]</sup>, 低于仿刺参(*Apostichopus japonicus*) ( $H_d$ : 0.975;  $P_i$ : 0.037 67)<sup>[29]</sup>。物种具有适应种群快速增长的生活史且个体数目较多, 可能是其具有较高的单倍型多样性和核苷酸多样性的原因<sup>[30-32]</sup>。群体内的遗传

距离表示了群体内个体间的遗传差异, 亦可作为评价该群体遗传多样性的指标<sup>[33]</sup>。根据遗传多样性参数(核苷酸多样性和平均核苷酸差异数)和群体内遗传距离, 各群体遗传多样性大小为DZ>ZJ>FC>YN>BH>QZ。

本研究显示, 目前光裸方格星虫群体的遗传多样性仍处于较高水平, 这与许多学者研究结果相类似。以往学者对光裸方格星虫遗传多样性的研究一致认为光裸方格星虫群体有着较高水平的遗传多样性<sup>[14-17]</sup>。而郭显嵩等<sup>[12]</sup>的研究则认为光裸方格星虫群体的遗传多样性水平处于中等程度。上述研究结果表明, 目前北部湾沿海光裸方格星虫种质资源仍处于良好状况。

#### 3.2 群体变异和动态分析

本研究中, 各群体间的遗传距离差异不大, 且群体间的遗传分化程度较小。本研究中各群体之间的遗传分化系数 $F_{st}$ 值为-0.018 13~0.028 05 ( $P>0.05$ ), 遗传分化不明显。各群体间存在较频繁的基因交流( $N_m$ 为8.66~162.09)。AMOVA分析佐证, 遗传差异主要来自群体内(99.74%), 群体间的差异则比较小(0.26%)。单倍型NJ聚类可知, 6个光裸方格星虫地理群体无明显地理聚类分支。综合单倍型中介网络图显示无明显的谱系分支、群体间变异和遗传分化极小等结果, 本研究支持将北部湾光裸方格星虫归为一个管理单元。

物种的生物学特性<sup>[34]</sup>和进化史<sup>[35]</sup>对其种群的遗传结构也有一定的影响。海洋动物浮游幼体的扩散为群体间基因交流提供了时机, 种群扩散和基因交流还受海洋物理因素如海流、温度和季风等影响<sup>[37-38]</sup>。光裸方格星虫浮游幼体时期长(水温21.5~34.0 °C以下为7.5~27 d)<sup>[39]</sup>, 其海球幼体时期有长期漂浮于海水中的生存能力, 可以令其广泛分布<sup>[17]</sup>。其他无脊椎动物中, 也存在由于其浮游幼虫阶段的生活史引起群体间频繁基因交流的现象, 如美洲巨牡蛎(*Crassostrea virginica*)<sup>[39]</sup>、栉孔扇贝(*Chlamys farrei*)<sup>[40]</sup>等。本研究中, 群体遗传分化的结论与其他学者对光裸方格星虫遗传分化的研究结果<sup>[14-17]</sup>迥异, 这可能因采集地、采集时间点和检测所用分子标记方法等因素的不同所导致。如Du等<sup>[17]</sup>利用线粒体基因CO I分析北海、三亚和厦门3地光裸方格星虫遗传结构得出群体间分化明显, 与本研究结

果有差别。而郭昱嵩等<sup>[12]</sup>利用SSR标记研究广东湛江、广西北海及越南锦普3个光裸方格星虫地理群体遗传多样性,发现其杂合度均偏低,群体间存在较大的基因流,群体间已产生遗传分化,但分化水平还较低,与本研究结果相类似。本研究中,单倍型中介网络图显示无明显的谱系分支,其原因可能是北部湾湾内不存在明显阻碍种群扩散的地理屏障。此外,近年来北部湾区域光裸方格星虫的苗种相互售卖至各地,进行滩涂底播养殖现象日渐增加,这也很可能引起该区域群体间频繁的基因交流<sup>[12, 41]</sup>。

群体动态分析推测,光裸方格星虫经历过群体扩张事件<sup>[42]</sup>,估算光裸方格星虫种群扩张时间约为171万年前,处于早更新世<sup>[43]</sup>。早更新世距今约为0.73~2.43百万年,伴随着强烈的全球气候变化,早更新世是全球气候和环境变化的一个重要时期,当时气候周期转型,全球冰量增加,海平面下降,剧烈的环境变化对物种形成、地理分布和遗传变化有着深远的意义<sup>[44-45]</sup>。

### 3.3 多样性保护与可持续利用

本研究基于mtDNA控制区序列分析,研究结果显示光裸方格星虫目前仍具有较高水平的遗传多样性,具有进一步进行保育选育的潜能。但由于当前人工非法采挖过度,尤其是无序、大范围的使用高压水枪采挖贝类和光裸方格星虫,对光裸方格星虫滩涂资源造成巨大破坏,同时导致光裸方格星虫幼体和成体的死亡。因此需要加大光裸方格星虫资源保护力度,科学规范地划分天然保育区加以保护,实时监测种质资源状况。本研究中显示6个群体间遗传分化很小,可能因其浮游幼体期的分散能力,或是近几年人工增殖养殖进行的各地苗种侵入等因素造成种质混杂,加剧了群体间的基因交流。种质混杂容易造成对其遗传背景的模糊和不确定性,因此需要对外来苗种圈定养殖区域并进行科学评估,防止光裸方格星虫优质资源退化和优良性状的丢失,使其种质得到保护,使资源得以可持续利用。

#### 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] 梁广耀. 广西沿海方格星虫资源的初步调查[J]. 广西农业科学, 1990(1): 46-48.  
Liang G Y. Preliminary investigation on the resources of *Sipunculus nudus* in Guangxi[J]. Guangxi Agricultural Sciences, 1990(1): 46-48(in Chinese).
- [3] Ha N T T, Nhuan M T, Ngoc N T, *et al.* The distribution of peanut-worm (*Sipunculus nudus*) in relation with geo-environmental characteristics[J]. VNU Journal of Sciences, Earth Sciences, 2007, 23(2): 110-115.
- [4] Brown W M, George J M, Wilson A C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979, 76(4): 1967-1971.
- [5] Harrison R G. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology[J]. Trends in Ecology & Evolution, 1989, 4(1): 6-11.
- [6] Tabata K, Taniguchi N. Differences between *Pagrus major* and *Pagrus auratus* through mainly mtDNA control region analysis[J]. Fisheries Science, 2000, 66(1): 9-18.
- [7] Shadel G S, Clayton D A. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates[J]. Annual Review of Biochemistry, 1997, 66(1): 409-435.
- [8] Chen M, Yao R, Su J F, *et al.* Length polymorphism and structural organization of the A+T-rich region of mitochondrial DNA in *Antheraea pernyi* (Lepidoptera: Saturniidae)[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2012, 43: 169-177.
- [9] 宋娜, 都基隆, 王志勇, 等. 香鱼野生群体和养殖群体遗传多样性比较[J]. 水产学报, 2014, 38(1): 41-46.  
Song N, Du J L, Wang Z Y, *et al.* Comparative study on the populations genetic diversity between hatchery and wild populations of *Plecoglossus altivelis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(1): 41-46(in Chinese).
- [10] 董新培, 穆淑梅, 周楠, 等. 不同地理群体乌鳢线粒体DNA控制区结构分析及遗传多样性[J]. 水产学报, 2014, 38(9): 1277-1285.  
Dong X P, Mu S M, Zhou N, *et al.* Structure analysis of mtDNA D-Loop region and the genetic diversity of *Channa argus* in different populations[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(9): 1277-1285(in Chinese).
- [11] Zhang J B, Cai Z P, Huang L M. Population genetic structure of crimson snapper *Lutjanus erythropterus* in

- East Asia, revealed by analysis of the mitochondrial control region[J]. *ICES Journal of Marine Science*, 2006, 63(4): 693-704.
- [12] 宋素霞, 丁少雄, 鄢庆枇, 等. 中国沿海光裸方格星虫 6 个地理群体遗传多样性分析[J]. *水产学报*, 2017, 41(8): 1183-1191.  
Song S X, Ding S X, Yan Q P, *et al.* Genetic diversity of *Sipunculus nudus* along the coasts of China [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(8): 1183-1191(in Chinese).
- [13] Mwinyi A, Meyer A, Bleidorn C, *et al.* Mitochondrial genome sequence and gene order of *Sipunculus nudus* give additional support for an inclusion of Sipuncula into Annelida[J]. *BMC Genomics*, 2009, 10(1): 27.
- [14] 宋忠魁, 刘婷, 杨家林, 等. 广西沿海裸体方格星虫群体遗传多样性及遗传分化[J]. *水产科学*, 2011, 30(12): 749-753.  
Song Z K, Liu T, Yang J L, *et al.* Genetic diversity and genetic structure of *Sipunculus nudus* in coastal Guangxi area[J]. *Fisheries Science*, 2011, 30(12): 749-753(in Chinese).
- [15] 宁岳, 巫旗生, 徐德华, 等. 不同地理群体裸体方格星虫遗传结构及种群分化研究[J]. *福建水产*, 2012, 34(2): 91-98.  
Ning Y, Wu Q S, Xu D H, *et al.* Genetic structure and population differentiation of *Sipunculus nudus* in China based on sequence analyses of mitochondrial COI gene[J]. *Journal of Fujian Fisheries*, 2012, 34(2): 91-98(in Chinese).
- [16] 王庆恒, 杜晓东, 李康. 光裸星虫遗传多样性的 RAPD 分析[J]. *海洋水产研究*, 2006, 27(3): 57-61.  
Wang Q H, Du X D, Li K. Genetic diversity of *Sipunculus nudus* as revealed by RAPD[J]. *Marine Fisheries Research*, 2006, 27(3): 57-61(in Chinese).
- [17] 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.
- [18] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers[J]. *Computer Applications in the Biosciences*, 1994, 10(2): 189-191.
- [19] Rozas J, Sánchez-Del Barrio J C, Messeguer X, *et al.* DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods[J]. *Bioinformatics*, 2003, 19(18): 2496-2597.
- [20] Network 4.6.1.1 user guide[OL]. [2014-10-29]. <http://www.fluxus-engineering.com>.
- [21] 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.
- [22] Hudson R R, Slatkin M, Maddison W P. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data[J]. *Genetics*, 1992, 132(2): 583-589.
- [23] Kawachi 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.
- [24] 刘萍. DNA 标记技术在海洋生物种质资源开发和保护中的应用[J]. *中国水产科学*, 2000, 7(2): 86-89.  
Liu P. Application of DNA-marking on exploitation and conservation of germplasm resource of marine life[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2000, 7(2): 86-89(in Chinese).
- [25] 夏铭. 遗传多样性研究进展[J]. *生态学杂志*, 1999, 18(3): 59-65.  
Xia M. Research progress of genetic diversity[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 1999, 18(3): 59-65(in Chinese).
- [26] 傅建军, 徐如卫, 薛婷, 等. 3 种泥鳅微卫星标记和 D-Loop 部分序列遗传变异分析[J]. *水产学报*, 2015, 39(4): 465-474.  
Fu J J, Xu R W, Xue T, *et al.* Genetic analysis of three stocks of loach with microsatellite markers and D-Loop partial sequences[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(4): 465-474(in Chinese).
- [27] 闫龙, 宋娜, 王俊, 等. 基于线粒体控制区的中华绒螯蟹群体遗传多样性分析[J]. *水生生物学报*, 2015, 39(3): 615-620.  
Yan L, Song N, Wang J, *et al.* Studies on genetic diversity of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* based on mitochondrial DNA control region[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(3): 615-620(in Chinese).
- [28] 薛丹, 章群, 郜星辰, 等. 基于线粒体控制区序列的南海北部近岸鳊的遗传多样性[J]. *中国水产科学*, 2015, 22(4): 749-756.



- Xue D, Zhang Q, Gao X C, *et al.* Genetic variation of *Therapon theraps* in coastal waters of Northern South China Sea based on mtDNA control region sequences[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(4): 749-756(in Chinese).
- [29] 姬南京, 常亚青, 赵冲, 等. 3个地理群体仿刺参D-loop序列的变异及系统发生分析[J]. 水产学报, 2014, 38(4): 477-482.
- Ji N J, Chang Y Q, Zhao C, *et al.* D-loop sequences variation and phylogenetic analysis in three geographical populations of the sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(4): 477-482(in Chinese).
- [30] 沈静轶, 薛良义, 沈伟良, 等. 3个养殖大黄鱼群体线粒体DNA控制区遗传多样性分析[J]. 生物学杂志, 2015, 32(6): 30-33, 59.
- Shen J Y, Xue L Y, Shen W L, *et al.* Genetic diversity of *Larimichthys crocea* based on mitochondrial DNA control region sequences in three cultured populations[J]. Journal of Biology, 2015, 32(6): 30-33, 59(in Chinese).
- [31] Nei M. Molecular Evolutionary Genetics[M]. New York: Columbia University Press, 1987: 287-326.
- [32] 杨博, 陈小勇, 杨君兴. 鳊白鱼线粒体DNA控制区结构和种群遗传多样性分析[J]. 动物学研究, 2008, 29(4): 379-385.
- Yang B, Chen X Y, Yang J X. Structure of the mitochondrial DNA control region and population genetic diversity analysis of *Anabarilius grahami* (Regan)[J]. Zoological Research, 2008, 29(4): 379-385(in Chinese).
- [33] Balloux F, Lugon-Moulin N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers[J]. Molecular Ecology, 2002, 11(2): 155-165.
- [34] Bauert M R, Kälın M, Baltisberger M, *et al.* No genetic variation detected within isolated relict populations of *Saxifraga cernua* in the Alps using RAPD markers[J]. Molecular Ecology, 1998, 7(11): 1519-1527.
- [35] 何维明, 钟章成. 攀援植物绞股蓝幼苗对光照强度的形态和生长反应[J]. 植物生态学报, 2000, 24(3): 375-378.
- He W M, Zhong Z C. Morphological and growth responses of the climbing plant, *Gynostemma pentaphyllum* seedlings to varying light intensity[J]. Acta Phytoecologica Sinica, 2000, 24(3): 375-378(in Chinese).
- [36] Cassone B J, Boulding E G. Genetic structure and phylogeography of the lined shore crab, *Pachygrapsus crassipes*, along the northeastern and western Pacific Coasts[J]. Marine Biology, 2006, 149(2): 213-226.
- [37] Kyle C J, Boulding E G. Comparative population genetic structure of marine gastropods (*Littorina* spp.) with and without pelagic larval dispersal[J]. Marine Biology, 2000, 137(5-6): 835-845.
- [38] 兰国宝, 廖思明, 阎冰. 水温对方格星虫幼体发育及变态的影响[J]. 水产学报, 2007, 31(5): 633-638.
- Lan G B, Liao S M, Yan B. Effect of water temperature on larval development and metamorphosis of *Sipunculus nudus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2007, 31(5): 633-638(in Chinese).
- [39] Hare M P, Avise J C. Molecular genetic analysis of a stepped multilocus cline in the American oyster (*Crassostrea virginica*)[J]. Evolution, 1996, 50(6): 2305-2315.
- [40] Yu Z N, Wei X H, Kong X Y, *et al.* Application of the first internal transcribed spacer (ITS-1) of ribosomal DNA as a molecular marker to population analysis in farrer's scallop *Chlamys farreri*[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2007, 26(1): 93-100.
- [41] 彭银辉, 黄国强, 刘旭佳, 等. 方格星虫种质资源及人工增殖研究进展[J]. 广西科学院学报, 2015, 31(1): 9-15.
- Peng Y H, Huang G Q, Liu X J, *et al.* Advances in Germplasm research and artificial culture of *Sipunculus nudus*[J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 2015, 31(1): 9-15(in Chinese).
- [42] Rogers A R, Harpending H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences[J]. Molecular Biology and Evolution, 1992, 9(3): 552-569.
- [43] Ceballos S G, Lessa E P, Victorio M F, *et al.* Phylogeography of the sub-Antarctic notothenioid fish *Eleginops maclovinus*: evidence of population expansion[J]. Marine Biology, 2012, 159(3): 499-505.
- [44] Avise J C, Walker D E. Pleistocene phylogeographic effects on avian populations and the speciation process[J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological sciences, 1998, 265(1395): 457-463.
- [45] Lambeck K, Esat T M, Potter E K. Links between climate and sea levels for the past three million years[J]. Nature, 2002, 419(6903): 199-206.

## Population genetic diversity analysis of *Sipunculus nudus* based on mtDNA control region sequences

PENG Yinhui<sup>1</sup>, ZHOU Yuna<sup>2</sup>, LIU Xujia<sup>1</sup>, HUANG Guoqiang<sup>1,3</sup>,  
CAI Xiaohui<sup>3\*</sup>, PAN Ying<sup>2\*</sup>

(1. Guangxi Key Laboratory of Marine Biotechnology, Guangxi Institute of Oceanology, Beihai 536000, China;

2. College of Animal Science and Technology of Guangxi University, Nanning 530004, China;

3. Centre for Marine Life Science and Technology, Ocean College, Qinzhou University, Qinzhou 535011, China)

**Abstract:** In order to study the population genetic structure and germplasm resources of the *Sipunculus nudus*. mtDNA control region sequences of *S. nudus* of six geographic populations along the coast of Beibu Gulf (Beihai, Zhanjiang, Qinzhou, Fangchenggang, Danzhou of China and Haiphong of Vietnam) were analyzed. Results showed that a total of 93 control region sequences with 107 variable sites and 85 haplotypes were obtained, and an evident AT-skew was found in mtDNA control region sequences of *S. nudus*; the haplotype diversity ( $H_d$ ) and nucleotide diversity ( $P_i$ ) were 0.998 and 0.018 89 respectively. The NJ (Neighbor Joining) tree base on haplotype showed that the six populations presented no obvious branches, and all haplotypes were randomly distributed in the haplotype network. The range of fixation index ( $F_{st}$ ) of different populations was -0.018 13–0.028 05, and the genetic differentiation among populations was not obvious. The results of AMOVA revealed that the genetic variance mainly occurred within populations (99.74%). In terms of the negatively selective neutrality test and mismatch distribution of pairwise, we could suggest that a population expansion occurred in *S. nudus*, and the estimated time was about 1 710 000 years ago. The results indicated that there was high genetic diversity in *S. nudus* and existed gene exchange among populations, and the estimated population expansion could occur during the Early Pleistocene.

**Key words:** *Sipunculus nudus*; genetic structure; control region of mtDNA; Beibu Gulf

**Corresponding author:** CAI Xiaohui. E-mail: caixiaohui66@163.com; PAN Ying. E-mail: yingpan@gxu.edu.cn

**Funding projects:** National Natural Foundation of China(31160532); Research Program of Science Technology Department of Guangxi Province (Gui S&T Tackle 14121006-2-1); Natural Science Foundation of Guangxi Province of China (2015GXNSFBA139081); Basic Scientific Research Service Fee of Guangxi Academy of Sciences (15YJ22HYS13)