

doi: 10.7541/2017.156

基于线粒体CO I 基因序列的东南沿海可口革囊星虫遗传多样性分析

金丹璐^{1,2} 娄剑锋¹ 高心明¹ 侯聪聪^{1,2} 竺俊全^{1,2} 王建平³

(1. 宁波大学教育部应用海洋生物技术重点实验室, 宁波 315211; 2. 浙江海洋高效健康养殖协同创新中心, 宁波 315211;
3. 宁波市海洋与渔业研究院, 宁波 315012)

摘要: 为了解我国东南沿海可口革囊星虫自然群体的遗传多样性及遗传结构, 以线粒体CO I 基因为分子标记, 对浙江象山(XS)与温岭(WL)、福建宁德(ND)、广东湛江(ZJ)4个可口革囊星虫自然群体的80个样本的CO I 基因片段进行PCR扩增、序列测定和分析。结果表明, 在815 bp长度的核苷酸片段中, A、T、C、G碱基的平均含量分别为29.8%、31.0%、22.6%和16.6%, A+T含量(60.8%)高于C+G含量(49.2%), 表现出较强的AT偏好性。共检测到29个核苷酸变异位点, 定义了29种单倍型, 总群体单倍型多样性指数(H_d)、核苷酸多样性指数(P_i)及平均核苷酸差异数(K)分别为0.932、0.0036及2.8902, 表现出高的 H_d 和低的 P_i 。单倍型邻接关系树的拓扑结构简单, 未呈现明显的地理谱系结构。群体内的遗传距离为0.0027—0.0040, 群体间的遗传距离为0.0032—0.0040。两两群体间的遗传分化系数(F_{st})和分子方差分析(AMOVA)表明, 可口革囊星虫的遗传变异主要来自于群体内, 而群体间无显著分化。中性检验和核苷酸不配对分布结果揭示, 可口革囊星虫经历了群体历史扩张事件, 大致发生在4.6万年前的更新世晚期。

关键词: 可口革囊星虫; CO I 基因; 遗传多样性; 遗传结构

中图分类号: Q346.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2017)06-1257-08

可口革囊星虫(*Phascolosoma esculenta*)是星虫动物门(Sipuncula)重要经济物种之一, 属革囊星虫纲(Phascolosomatidea)、革囊星虫科(Phascolosomatidae)、革囊星虫属(*Phascolosoma*), 广泛分布于东南沿海^[1], 栖息于潮间带营穴居生活, 以底栖硅藻及有机碎屑为食; 在夏季繁殖期, 一般在大潮流受潮流刺激下产卵^[2], 而且早期生活史经历了15d左右的浮游生活的幼虫阶段^[3], 浮游幼虫易随潮流而扩散, 从而有利于不同群体之间的基因交流。可口革囊星虫食用经济价值与药用价值较高, 被誉为“海洋冬虫夏草”。近年来, 由于环境污染、滩涂围垦、过度采捕等原因, 导致自然资源急剧衰退, 影响资源可持续利用。因此, 其资源保护、苗种繁育及增殖开发引起重视。目前, 可口革囊星虫的基础研究已涉及营养学^[4]、繁殖生物学^[2, 3, 5-9]、分子

生物学^[10, 11]、毒理学^[12]等方面, 但有关其种群遗传学方面的研究却鲜有报道。相比之下, 同为星虫门的裸体方格星虫(*Sipunculus nudus*)却已开展了遗传多样性及遗传结构方面的研究^[13-15]。为了保护及合理开发可口革囊星虫资源, 开展其自然群体遗传多样性研究十分必要。

线粒体基因(mtDNA)具有结构简单、母系遗传、演化速率比核基因快、不发生重组等特点, 非常适用于水生经济动物的种群遗传学和系统进化研究^[16]。其中, 线粒体细胞色素氧化酶亚基 I (CO I) 基因序列标记技术是最常用的分子标记技术之一, 已应用于缢蛏(*Sinonovacula constricta*)^[17]、紫贻贝(*Mytilus edulis* Linnaeus)^[18]、厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)^[19]、文蛤(*Meretrix meretrix*)^[20, 21]、双齿围沙蚕(*Perinereis aibuhitensis*)^[22]等海洋无脊椎动物的

收稿日期: 2016-10-13; 修订日期: 2017-01-05

基金项目: 宁波市科技计划项目(2016C10004); 浙江省重大科技专项重点农业项目(2011C12013); 宁波大学海洋学院高级别科技成果奖
培育计划资助 [Supported by the Ningbo Science and Technology Plan Projects (2016C10004); the Major Science and Technology
Projects in Zhejiang Province (2011C12013); the High-level Science and Technology Accomplishment Prize Cultivation Plan in
School of Marine Sciences of Ningbo University]

作者简介: 金丹璐(1995—), 女, 浙江宁波人; 本硕博连读生; 主要从事水产动物育种研究。E-mail: jindanlu1996@163.com

通信作者: 竺俊全(1964—), 教授; E-mail: zhujunquan@nbu.edu.cn; 王建平(1967—), 研究员; E-mail: wjping805@126.com

遗传多样性及遗传结构研究。本研究,利用 $CO I$ 基因序列标记技术分析了我东南沿海4个可口革囊星虫自然群体的遗传多样性及遗传结构,旨在了解可口革囊星虫的遗传背景,为其资源保护及合理开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集与保存

实验用可口革囊星虫样品采自浙江象山(XS)与温岭(WL)、福建宁德(ND)、广东湛江(ZJ)的潮间带滩涂,依据李凤鲁^[1]对可口革囊星虫分类特征的描述——“收吻肌大部融合,背腹两对相距较远,每对收吻肌的始点甚远”,鉴定样品。4个地理群体样品均为野生个体,每个群体采得样品100条以上,并活体带回实验室。每个群体样品随机取20条进行解剖,取体壁肌肉于95%酒精中固定、保存备用。

1.2 DNA的提取、扩增及测序

取体壁肌肉样品约100 mg,剪碎后加600 μ L STE裂解液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 100 mmol/L EDTA; 200 mmol/L NaCl及2% SDS)及5 μ L蛋白酶K (20 mg/mL), 56℃消化至澄清,用酚-氯仿法抽提基因组DNA,然后将经乙醇沉淀后的DNA样品溶解于50 μ L双蒸水中, -20℃保存备用。

可口革囊星虫线粒体 $CO I$ 序列正向和反向扩增引物分别为: LCO1490(5'-GGTCAACAAATCA TAAAGATATTGG-3')和HCOoutout (5'-GTAAA TATATGRTGDGCTC-3')^[23],均由上海英骏生物技术公司合成。PCR反应体系为50 μ L,其中,10 $\times$ PCR缓冲液5 μ L, dNTPs 4 μ L (2.5 mmol/L), 正反引物各1 μ L (浓度10 μ mol/L), *Taq*酶2 U, 模板DNA 1 μ L, 加灭菌双蒸水至50 μ L。PCR反应程序: 94℃预变性5min; 94℃变性30s, 55℃退火30s, 72℃延伸1min, 共35个循环; 最后72℃延伸10min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后送上海英骏生物技术公司进行纯化及双向测序, 测序引物与PCR反应引物一致。

1.3 数据处理

所得序列均由BioEdit 7.0软件进行序列比对并辅以人工校正。采用DnaSP 5.0软件计算核苷酸多样性指数(P_i)、单倍型多样性指数(H_d)、平均核苷酸差异数(K)等遗传多样性参数。采用MEGA 5.1软件计算遗传距离, 并选择基于Kimura双参数模型(本研究, 转换的概率75.86%明显高于颠换概率24.14%, 因此采用Kimura双参数模型)构建单倍型邻接树(1000次自展重复)。用Arlequin3.01软件中的AMOVA分析、Tajima's D和Fu's F_s 中性检验

评估可口革囊星虫的群体结构与历史动态。群体扩张时间(T)的估算参考宋忠魁等^[24]所用公式 $T = \frac{\tau}{4uk} \times \text{代时}$, 其中 τ 值利用Arlequin3.01软件中的核苷酸不配对分布(Mismatch distribution)计算, u 是核苷酸进化速率, k 是序列中核苷酸的数量, 代时取1(可口革囊星虫1年达到性成熟)。

2 结果

2.1 序列变异与遗传多样性

以可口革囊星虫的总DNA为模版进行PCR扩增、序列测定和比对, 获得80条长度为815 bp的 $CO I$ 基因同源序列。所得序列共检测到29个变异位点, 占分析位点总数的3.56%, 其中单突变位点(Singleton variable sites)13个, 简约信息位点(Parsimony informative sites)16个, 转换/颠换的平均值为3.14, 无插入或缺失现象。A、T、C、G碱基的平均含量分别为29.8%、31.0%、22.6%和16.6%, A+T含量(60.8%)明显高于C+G含量(39.2%), 表现出较强的AT偏好性, 符合可口革囊星虫线粒体基因组特点^[25]。80个样品共定义29种单倍型(表1), Hap1和Hap5为4群体共享单倍型, Hap4、Hap9和Hap11为3群体共享单倍型。两群体共享单倍型6种, 其余18种为单群体所特有。遗传参数统计表明, 各群体单倍型多样性指数和核苷酸多样性指数分别达0.889—0.953、0.0027—0.0040; 平均核苷酸差异数达2.2211—3.2842。将所有样品作为一个群体进行数据分析, 得出单倍型多样性指数为0.932, 核苷酸多样性指数为0.0036, 平均核苷酸差异数为2.8902(表2)。

2.2 群体遗传结构

从可口革囊星虫4个地理群体的遗传距离来看(表3), 群体内的遗传距离为0.0027—0.0040, 群体间的遗传距离为0.0032—0.0040, 表明群体内与群体间的遗传距离处于同一水平; 两两群体间的遗传分化系数 F_{st} 值为-0.0015—0.0409, 统计检验均差异不显著($P>0.05$), 表明可口革囊星虫不同群体间存在较高的遗传同质性。AMOVA分析结果显示(表4), 在整个遗传变异中有98.12%存在于群体内, 仅1.88%存在于群体间, 进一步证实群体内的分化为遗传变异的主要部分。

基于Kimura双参数模型, 构建单倍型邻接树(图1)。各群体的单倍型都广泛分布于单倍型邻接树上, 大部分节点分支支持率较低(<50%), 单倍型聚类没有展示出地域性特征。单倍型邻接关系树的拓扑结构简单, 未呈现明显的地理谱系结构。

表 1 可口革囊星虫CO I 基因序列单倍型及在4个群体中的分布
Tab. 1 Haplotypes of CO I gene and its distribution in four *P. esculenta* populations

单倍型Haplotype	变异位点Variable site																				群体Population				
	1	1	1	2	2	3	3	3	3	4	4	4	4	5	5	5	5	5	6	6	6	7	7	7	7
	3	3	8	0	6	6	1	8	2	4	6	8	0	2	4	6	0	3	5	8	1	3	6	0	0
	4	5	8	0	0	9	7	3	8	3	4	8	9	4	5	3	2	5	5	0	3	9	1	1	0
Hap1	A	C	A	A	C	A	C	C	T	A	C	G	A	T	T	T	A	C	T	A	G	A	A	G	A
Hap2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.
Hap3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.
Hap5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	A	.	.	.	.	.	T
Hap6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	A	.	.	.	.	T
Hap7	.	.	.	.	.	.	T	.	.	G	.	A	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
Hap8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	.	A	.	A	.	A	.	.
Hap9	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	A	.	A	.	G	.
Hap10	.	T	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
Hap11	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
Hap12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	G	.	A	G	.
Hap13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	A	.	.	.
Hap14	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	A	.	.	T
Hap15	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	A	.	.	T
Hap16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	A	.	G	T
Hap17	.	.	.	.	.	.	T	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	A	.	.	.
Hap18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	A	.	.	T
Hap19	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	A	.	T
Hap20	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	A	.	.	T
Hap21	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	A	.	T
Hap22	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	A	.	A	.
Hap23	.	.	.	.	.	.	.	T	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	A	.	.	.
Hap24	G	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	A	.	A	G
Hap25	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	A	.	A	.
Hap26	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	C	.	.	A	.	.	T
Hap27	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	A	.	.	T
Hap28	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	A	.	.	A
Hap29	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	A	.	.	T

表 2 基于CO I 序列得出的可口革囊星虫群体遗传多样性参数
Tab. 2 Genetic diversity of *P. esculenta* populations based on CO I sequences

群体 Population	样本数 Sample size	单倍型数No. of haplotype	单倍型多样性指数 H_d Haplotype diversity	核苷酸多样性指数 P_i Nucleotide diversity	平均核苷酸差异数 K Average nucleotide differences
XS	20	13	0.926±0.043	0.0036±0.00053	2.9368
WL	20	10	0.889±0.051	0.0027±0.00046	2.2211
ND	20	11	0.921±0.041	0.0040±0.00047	3.2842
ZJ	20	13	0.953±0.028	0.0037±0.00045	2.9726
Total	80	29	0.932±0.014	0.0036±0.00024	2.8902

2.3 群体历史动态

可口革囊星虫群体间不存在显著的遗传分化,故将其看做一个整体进行历史动态分析。中性检

验表明(表 5), Tajima’s D 和Fu’s F_s 值均为负值,且统计检验均显著($P<0.05$); 核苷酸不配对分布分析结果表明,可口革囊星虫CO I 单倍型核苷酸不配

对分布呈单峰状(图 2), 且观测值没有明显偏离模拟值($SSD=0.002$, $P=0.540$; $Raggedness=0.022$, $P=0.730$), 提示可口革囊星虫经历了群体历史扩张事件。在群体扩张假设下, 计算得到 τ 值为3.025 (95%可信区间: 1.467—4.279), 将多毛类线粒体 *CO I* 基因2%/Ma (百万年)的进化速率应用于本研究^[26], 估算出可口革囊星虫的群体扩张时间大约在4.6万年前。

3 讨论

物种遗传多样性水平的高低与其适应能力、生存能力和进化潜力密切相关, 遗传变异越丰富, 对环境变化的适应能力就越强, 反之, 则易受到环境变化的影响^[27, 28]。研究海洋动物遗传多样性, 可为其种质资源保护及开发利用提供理论依据。以往, 研究者已经利用线粒体 *CO I* 基因序列分析了软体动物^[17–20]、甲壳动物^[29–31]、环节动物^[22]等的遗传多样性及遗传结构, 揭示了这些海洋生物的遗传多样性水平, 并说明利用 *CO I* 基因序列分析海

洋经济动物遗传多样性及遗传结构的可行性。

可口革囊星虫是我国重要海洋无脊椎经济动物之一, 其遗传多样性方面的研究仅见同工酶水平的报道^[32, 33]。本研究, 利用 *CO I* 基因序列对我国东南沿海4个可口革囊星虫地理群体的遗传多样性进行了分析。结果表明, 可口革囊星虫 *CO I* 基因

表 3 基于 *CO I* 序列的可口革囊星虫群体间遗传分化系数 F_{st} (对角线下)和群体内(对角线)及群体间遗传距离(对角线上)

Tab. 3 Genetic fixation index (F_{st}) (below diagonal) and genetic distance within (diagonal) and between (above diagonal) *P. esculenta* populations based on *CO I* sequences

群体Population	XS	WL	ND	ZJ
XS	0.0036	0.0032	0.0040	0.0037
WL	-0.0015	0.0027	0.0035	0.0033
ND	0.0340	0.0409	0.0040	0.0034
ZJ	0.0201	0.0212	-0.0043	0.0036

表 4 基于 *CO I* 序列对可口革囊星虫群体的AMOVA分析

Tab. 4 AMOVA analysis of *P. esculenta* populations based on *CO I* sequences

变异来源 Source of variation	自由度 df	平方和 Sum of squares	变异组分 Variance components	变异百分数 Percentage of variation
群体间 Among populations	3	5.912	0.02732 Va	1.88
群体内 Within populations	76	108.250	1.42434 Vb	98.12
总计 Total	79	114.162	1.45167	100

表 5 可口革囊星虫群体的中性检验及核苷酸不配对分布

Tab. 5 Neutral test and mismatch distribution of nucleotide in *P. esculenta*

中性检验Neutral test				核苷酸不配对分布Mismatch distribution of nucleotide				
Tajima's D	P	Fu's F_s	P	τ (95%CI)	SSD	P	Raggedness	P
-1.577	0.028	-26.546	0.000	3.025(1.467—4.279)	0.002	0.540	0.022	0.730

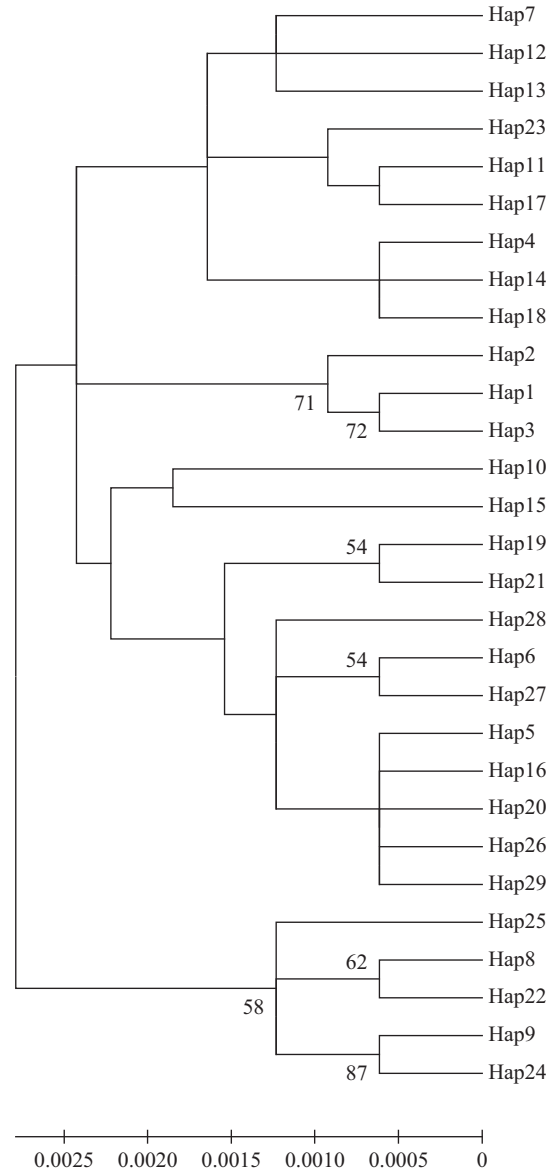


图 1 基于可口革囊星虫mtDNA *CO I* 基因序列构建的NJ系统树

Fig. 1 Neighbor-joining tree of *P. esculenta* based on mtDNA *CO I* gene

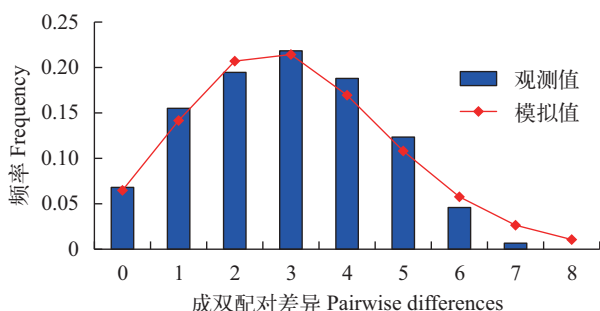


图2 可口革囊星虫CO I 基因的核苷酸不配对分布图

Fig. 2 Nucleotide mismatch distribution of CO I gene in *P. esculenta*

序列(815 bp)中A+T含量(60.8%)明显高于C+G含量(39.2%),表现出较强的AT偏好性,这与缢蛏^[17]、紫贻贝^[18]、文蛤^[20, 21]等双壳类软体动物mtDNA CO I 序列碱基组成特点相似。可口革囊星虫群体的单倍型多样性指数为0.932,呈现出较高的遗传多样性,而核苷酸多样性指数仅为0.0036,处于较低水平,类似现象在裸体方格星虫(*Sipunculus nudus*)^[15]、双齿围沙蚕(*Perinereis aibuhitensis*)^[34]、厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)^[19]等海洋无脊椎动物中被研究报道,这些无脊椎动物具有一些共性特征——较大的固定群体、极强的繁殖及浮游扩散能力等^[35],可口革囊星虫的生活史特征也如此^[3]。引入Grant和Bowen^[36]提出的假设,“高 H_d 、低 P_i ”的遗传多样性模式表明群体近期可能经历了扩张事件,即由一个较小的有效群体短时间内快速成长为一个群体时,常常伴随着单倍型多样性的提升,但同时又缺乏足够时间积累核苷酸变异。本研究结果核苷酸不配对分布呈单峰状、以及中性检验参数为负值且统计检验显著,支持这一推论。

F_{st} 值是群体间遗传分化的重要参数之一,其值大小能反映群体间分化程度, $F_{st}=0—0.05$ 时无分化,0.05—0.15为中度分化,0.15—0.25为高度分化^[37]。在本研究中,可口革囊星虫两两群体间的 F_{st} 值在-0.0015—0.0409之间。据此,可口革囊星虫4个群体间处无明显分化状态。AMOVA分析结果及单倍型邻接树均表明可口革囊星虫群体间的遗传差异不明显,不存在显著的系统地理格局。其原因分析如下:第一,海洋中缺少影响种群扩散与交流的环境障碍,致使可口革囊星虫地理群体间的基因交流频繁,遗传分化匮乏^[38];而且可口革囊星虫早期生活史阶段具有15d左右的浮游幼虫期^[3],且其繁殖高峰期7—8月份,正值夏季风盛行,浮性幼虫易在潮流及沿岸流的作用下长距离扩散^[28],丰富了地理群体间的基因交流,造成群体间遗传分化不明

显。第二,可口革囊星虫属广温广盐性物种,对环境的适应性强^[39],且自然资源多分布于近河口滩涂区,栖息地的地理构架相似,这些因素间接影响群体间的遗传趋异。第三,可口革囊星虫增殖养殖热潮的兴起,外来苗种的无序引入,加之“人工苗”的逃逸,也在一定程度上加剧了可口革囊星虫群体间的基因交流。

除了生活史特征、海洋洋流、人类活动干扰等因素影响外,古气候历史事件对其遗传结构的影响也不容忽视。更新世时期全球气候经历了一系列冰期-间冰期的变化^[40],冰盛期海平面下降约120—140 m,栖息地的剧缩导致营埋栖生活的可口革囊星虫群体大量灭绝,而间冰期气候回暖、海平面上升、适宜生境的形成可能又导致残存的可口革囊星虫发生群体扩张事件。本研究估算出可口革囊星虫种群的扩张时间大致发生在4.6万年前,这一时间正处于更新世晚期,提示更新世时期剧烈的气候变化对可口革囊星虫的影响巨大。而在经历了群体扩张事件后各群体单独进化时间太短又成为可口革囊星虫群体间遗传差异较小的原因之一^[41]。

综上,浙江象山(XS)与温岭(WL)、福建宁德(ND)、广东湛江(ZJ)4个可口革囊星虫地理群体的遗传多样性处于较高水平,群体内与群体间的遗传距离处于同一水平,遗传变异主要来自于群体内,而群体间无明显分化,4.6万年前经历了群体历史扩张事件。研究结果为可口革囊星虫自然资源的保护及合理开发利用提供了依据。

参考文献:

- [1] Li F L. Studies on the genus *Phascolosoma* (sipuncula) off the China coasts [J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 1988, **19**(3): 78—90 [李凤鲁. 中国沿海革囊星虫属(星虫动物门)的研究. 青岛海洋大学学报, 1988, **19**(3): 78—90]
- [2] Zhu J Q, Wang W, Xu S J, et al. Spermatogenesis and sperm morphology of *Phascolosoma esculenta* [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2007, **53**(4): 733—741 [竺俊全, 王武, 许式见, 等. 可口革囊星虫的精子发生及精子结构. 动物学报, 2007, **53**(4): 733—741]
- [3] Jin C H, Zhu J Q, Xu S J, et al. Study on the embryonic and larval development of *Phascolosoma esculenta* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2011, **42**(1): 94—100 [金春华, 竺俊全, 许式见, 等. 可口革囊星虫(*Phascolosoma esculenta*)胚胎及幼虫发育研究. 海洋与湖沼, 2011, **42**(1): 94—100]
- [4] Zhou Y S, Ding L F, Xu J L, et al. Analysis of main nutritional components in *Phascolosoma esculenta* [J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2007, **29**(4): 413—414 [周迎松, 丁理

- 发, 徐继林, 等. 可口革囊星虫主要营养要素的分析. 营养学报, 2007, **29**(4): 413—414]
- [5] Zhu J Q, Wang W, Ying X P, *et al.* Cytological changes of fertilization and early cleavage in *Phascolosoma esculenta* [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2008, **54**(2): 290—298 [竺俊全, 王武, 应雪萍, 等. 可口革囊星虫受精过程及早期卵裂的细胞学变化. 动物学报, 2008, **54**(2): 290—298]
 - [6] Zhu J Q, Wang W, Ding L F. Ultrastructural observation on oogenesis, vitellogenesis and vitelline membrane formation during yolk-synthesizing stage in *Phascolosoma esculenta* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, **43**(4): 870—876 [竺俊全, 王伟, 丁理法. 可口革囊星虫(*Phascolosoma esculenta*)卵黄合成期卵母细胞发育及卵黄发生与卵膜形成的超微结构. 海洋与湖沼, 2012, **43**(4): 870—876]
 - [7] Ying X P, Dahms H U, Liu X M, *et al.* Development of germ cells and reproductive biology in the sipunculid *Phascolosoma esculenta* [J]. *Aquaculture Research*, 2009, **40**(3): 305—314
 - [8] Long L L, Sheng Z, Xu S J, *et al.* The cytological changes of sperm and oocyte nuclei during fertilization in *Phascolosoma esculenta* (Sipuncula: Phascolosomatidea) [J]. *Italian Journal of Zoology*, 2015a, **82**(3): 327—337
 - [9] Long L L, Sheng Z, Zhu J Q. Ultrastructural observations on spermiogenesis in the peanut worm, *Phascolosoma esculenta* (Sipuncula: Phascolosomatidea) [J]. *Animal Cells and Systems*, 2015b, **19**(3): 221—229
 - [10] Wang M, Su X, Li Y, *et al.* Cloning and expression of the Mn-SOD gene from *Phascolosoma esculenta* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, **29**(5): 759—764
 - [11] Liu Y, Li C, Su X, *et al.* Cloning and characterization of hemerythrin gene from Sipuncula *Phascolosoma esculenta* [J]. *Genes & Genomics*, 2013, **35**(1): 95—100
 - [12] Wu H X, Gao Y T, Huang Z H, *et al.* Enrichment of Cd^{2+} and Hg^{2+} in *Phascolosoma esculenta* and their effects [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2015, **26**(6): 1871—1876 [吴洪喜, 高业田, 黄振华, 等. 可口革囊星虫对 Cd^{2+} 和 Hg^{2+} 的富集及其影响. 应用生态学报, 2015, **26**(6): 1871—1876]
 - [13] Zhou Y N, Peng Y H, Liu X J, *et al.* Genetic variation analysis on wild and cultured populations of *Sipunculus nudus* inferred from mtDNA control region sequences [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, **41**(2): 384—390 [周于娜, 彭银辉, 刘旭佳, 等. 光裸方格星虫野生与养殖群体线粒体控制区序列的遗传差异分析. 水生生物学报, 2017, **41**(2): 384—390]
 - [14] 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, **31**(12): 749—753 [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. 水产科学, 2011, **31**(12): 749—753]
 - [15] Du X D, Chen Z, Deng Y W, *et al.* Comparative analysis of genetic diversity and population structure of *Sipunculus nudus* as revealed by mitochondrial *CO I* sequences [J]. *Biochemical Genetics*, 2009, **47**(11—12): 884—891
 - [16] Xu M Y, Li J J, Guo B Y, *et al.* Genetic diversity of seven populations of *Octopus variabilis* in China's coastal waters based on the 12S rRNA and *COIII* gene analysis [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2011, **42**(3): 387—396 [徐梅英, 李继姬, 郭宝英, 等. 基于线粒体DNA 12S rRNA和 COIII 基因序列研究中国沿海7个长蛸(*Octopus variabilis*)野生群体的遗传多样性. 海洋与湖沼, 2011, **42**(3): 387—396]
 - [17] Niu D H, Liu D B, Chen H, *et al.* Genetic diversity of *Sinonovacula constricta* populations in one year [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2012, **1**: 168—171 [牛东红, 刘达博, 陈慧, 等. 缢蛏种群遗传多样性的周年变异分析. 生物技术通报, 2012, **1**: 168—171]
 - [18] Shen Y B, Zhang J B, Feng B B, *et al.* Genetic diversity of blue mussel *Mytilus galloprovincialis* in China based on sequence analyses of mitochondrial *CO I* gene [J]. *Marine Science Bulletin*, 2011, **30**(4): 435—440 [沈玉帮, 张俊彬, 冯冰冰, 等. 基于线粒体 CO I 序列分析对紫贻贝群体遗传多样性的研究分析. 海洋通报, 2011, **30**(4): 435—440]
 - [19] Li J J, Ye Y Y, Wu C W, *et al.* Genetic variation of *Mytilus coruscus* Gould (Bivalvia: Mytilidae) populations in the East China Sea inferred from mtDNA *CO I* gene Sequence [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2013, **50**(1): 30—38
 - [20] Cheng H L, Xia D Q, Wu T T, *et al.* Sequence analysis of mitochondrial *CO I* gene fragment of six *Veneridae* clams (Mollusca: Bivalvia) and four populations of *Meretrix meretrix* [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2007, **29**(5): 109—116 [程汉良, 夏德全, 吴婷婷, 等. 6种帘蛤科贝类及4个地理种群文蛤线粒体 CO I 基因片段序列分析. 海洋学报(中文版), 2007, **29**(5): 109—116]
 - [21] Li H J, Zhang J J, Yuan X T, *et al.* Genetic diversity and differentiation of seven geographical populations of hard clam (*Meretrix meretrix*) assessed by *CO I* and microsatellite markers [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2016, **36**(2): 499—507 [李宏俊, 张晶晶, 袁秀堂, 等. 利用线粒体 CO I 和微卫星标记分析文蛤7个地理群体的遗传变异. 生态学报, 2016, **36**(2): 499—507]
 - [22] Wang Y X, Ren H W, Zhu Y J, *et al.* Genetic diversity of different geographic populations in *Perinereis aibuhitensis* by ISSR and *CO I* markers [J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2014, **16**(1): 139—147 [王一泉, 任洪伟, 朱迎军, 等. 应用ISSR和线粒体 CO I 序列对不同地理种群双齿围沙蚕(*Perinereis aibuhitensis*)遗传多样性的分析. 中国农业科技导报, 2014, **16**(1): 139—147]
 - [23] Hurt C, Haddock S H D, Browne W E. Molecular phylogenetic evidence for the reorganization of the *Hyperiid amphipods*, a diverse group of pelagic crustaceans [J].

- Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2013, **67**(1): 28—37
- [24] Song Z K, Li M Y, Nie Z P, *et al.* Population genetic structure and expansion analysis of green mud crab (*Scylla paramamosain*) from beibu gulf [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, **43**(4): 828—836 [宋忠魁, 李梦芸, 聂振平, 等. 北部湾拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)群体遗传结构及其扩张分析. 海洋与湖沼, 2012, **43**(4): 828—836]
- [25] Shen X, Ma X, Ren J, *et al.* A close phylogenetic relationship between Sipuncula and Annelida evidenced from the complete mitochondrial genome sequence of *Phascolosoma esculenta* [J]. *BMC Genomics*, 2009, **10**(1): 1—11
- [26] Olson M A, Zajac R N, Russello M A. Estuarine-scale genetic variation in the polychaete *Hobsonia florida* (Ampharetidae; Annelida) in long island sound and relationships to Pleistocene glaciations [J]. *Biological Bulletin*, 2009, **217**(1): 86—94
- [27] Barrett R D H, Schluter D. Adaptation from standing genetic variation [J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 2008, **23**(1): 38—44
- [28] Deng Y, Song N, Liu M, *et al.* Population genetic analysis of *Perinereis aibuhitensis* based on the mitochondrial DNA Cyt b [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, **38**(3): 597—601 [邓园, 宋娜, 刘名, 等. 基于线粒体DNA Cyt b序列的双齿围沙蚕群体遗传多样性分析. 水生生物学报, 2014, **38**(3): 597—601]
- [29] 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 [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. 水生生物学报, 2015, **39**(3): 615—620]
- [30] Gopurenko D, Hughes J M. Regional patterns of genetic structure among Australian populations of the mud crab, *Scylla serrata* (Crustacea: Decapoda): evidence from mitochondrial DNA [J]. *Marine and Freshwater Research*, 2002, **53**(5): 849—857
- [31] Ding P W, Song N, Wang X M, *et al.* The morphological characters and genetic diversity of *Blepharipoda liberate* Shen and *Lophomastix japonica* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, **40**(6): 1208—1214 [丁鹏伟, 宋娜, 王雪梅, 等. 两种眉足蟹科蟹类的形态特征与遗传多样性研究. 水生生物学报, 2016, **40**(6): 1208—1214]
- [32] Huang F Y, Li M Y, Zhu J Q. Study on the expression of three isozymes in *Phascolosoma esculenta* [J]. *Journal of Ningbo University*, 2004, **17**(4): 410—413 [黄福勇, 李明云, 竺俊全. 可口革囊星虫三种同工酶表达初步分析. 宁波大学学报(理工版), 2004, **17**(4): 410—413]
- [33] Lei S Y, Ding L F, Huang F Y, *et al.* The comparison of isozymes in different tissues of *Phascolosoma esculenta* [J]. *Journal of Biology*, 2013, **30**(4): 11—14 [雷世勇, 丁理法, 黄福勇, 等. 可口革囊星虫不同组织同工酶的比较. 生物学杂志, 2013, **30**(4): 11—14]
- [34] Liu H J, Liu M, Ge S S, *et al.* Population structuring and historical demography of a common clam worm *Perinereis aibuhitensis* near the coasts of Shandong Peninsula [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2012, **44**(4): 70—78
- [35] Lavery S, Moritz C, Fielder D R. Indo-Pacific population structure and evolutionary history of the coconut crab *Birgus latro* [J]. *Molecular Ecology*, 1996, **5**(5): 557—570
- [36] Grant W 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
- [37] Wright S. Evolution and the genetics of populations [C]. Chicago: University of Chicago Press. 1978, 580
- [38] Liu J X, Gao T X, Wu S F, *et al.* Pleistocene isolation in the Northwestern Pacific marginal seas and limited dispersal in a marine fish, *Chelon haematocheilus* (Temminck & Schlegel, 1845) [J]. *Molecular Ecology*, 2007, **16**(2): 275—288
- [39] Zeng H X, Hong P, Ding L F, *et al.* Tolerance of *Phascolosoma esculenta* to water temperature and salinity [J]. *Fisheries Science*, 2006, **25**(8): 422—423 [曾海祥, 洪平, 丁理法, 等. 可口革囊星虫对温度、盐度的耐受性试验. 水产科学, 2006, **25**(8): 422—423]
- [40] Imbrie J, Boyle E A, Clemens S C, *et al.* On the structure and origin of major glaciation cycles 1. Linear responses to Milankovitch forcing [J]. *Paleoceanography*, 1979, **7**(7): 701—738
- [41] Zhang H. Molecular phylogeography of two marine ovoviviparous fishes in northwestern pacific [D]. Doctoral Dissertation. Ocean University of China, Qingdao. 2013 [张辉. 西北太平洋两种卵胎生鱼类(许氏平鲉和褐菖鲉)的分子系统地理学研究. 中国海洋大学. 2013]

THE GENETIC DIVERSITY OF *PHASCOLOSOMA ESCULENTA* IN THE COASTAL ZONE OF SOUTH-EASTERN CHINA BASED ON SEQUENCE ANALYSIS OF MITOCHONDRIAL *CO* GENE

JIN Dan-Lu^{1,2}, LOU Jian-Feng¹, GAO Xin-Ming¹, HOU Cong-Cong^{1,2}, ZHU Jun-Quan^{1,2} and WANG Jian-Pin³

(1. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology by the Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. The Collaborative Innovation Center for Zhejiang Marine High-efficiency and Healthy Aquaculture, Ningbo 315211, China;

3. Ningbo Academy of Oceanology and Fisheries, Ningbo 315012, China)

Abstract: To investigate the genetic diversity and structure of *Phascolosoma esculenta* wild populations in the coastal zone of South-Eastern China, the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (*CO I*) genes as molecular markers were amplified, sequenced and analyzed from 80 organisms sampled in four areas [Xiangshan (XS), Wenling (WL), Ningde (ND) and Zhanjiang (ZJ)]. The results showed that 815 base pair (bp) fragment was consisted of A, T, C and G base with 29.8%, 31.0%, 22.6% and 16.6%, respectively, indicating a greater preference for A and T base because the A+T content (60.8%) was higher than that of G+C (39.2%). Besides, twenty-nine polymorphic sites and haplotypes were identified in all the sequences. Total haplotype diversity (H_d), nucleotide diversity (P_i) and the average number of nucleotide differences (K) were 0.932, 0.0036 and 2.8902, respectively. A shallow topology of haplotype neighbor-joining (NJ) tree with simple topological structure showed no phylogeographic structure among four populations. Genetic distance within and between *P. esculenta* populations were 0.0027—0.0040 and 0.0032—0.0040, respectively. Genetic fixation index (F_{st}) and analysis of molecular variance (AMOVA) indicated that the genetic variance mainly came from individuals within populations, and no genetic differentiation was among populations. Neutral test and mismatch-distribution analysis revealed that the populations of *P. esculenta* had ever experienced population expansion that occurred in about 0.046 million years ago in the late pleistocene epoch.

Key words: *Phascolosoma esculenta*; *CO* gene; Genetic diversity; Genetic structure