

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2012.00062

北部湾光裸星虫 3 个地理群体遗传多样性

郭昱嵩, 王庆恒, 黎幸连, 张立飞, 杜晓东

广东海洋大学 水产学院, 广东 湛江 524025

摘要: 利用微卫星 DNA 分子标记对广东湛江乌石(ZJ)、广西北海山口(BH)与越南锦普(JP)3 个光裸星虫(*Sipunculus nudus*)野生群体的遗传多样性进行分析。结果表明, 20 个微卫星座位中有 3 个位点(*Snu08*、*Snu10*、*Snu14*)呈现单态, 17 个多态微卫星座位中的等位基因数介于 2~9 之间, 多态信息含量(PIC)介于 0.097~0.797 之间。每个群体中有 5 个位点显著偏离了 Hardy-Weinberg 平衡, 在位点 *Snu18* 上 3 个群体均偏离 Hardy-Weinberg 平衡。3 个光裸星虫野生群体均表现出中等程度的遗传多样性水平, 锦普群体遗传多样性水平高于北海和湛江群体。群体间 *F*-统计量分析表明, 群体遗传分化处于低分化水平, 差异不显著($F_{st}=0.019 \sim 0.049$, $P>0.05$); 基于 D_A 遗传距离构建的 NJ 和 UPGMA 聚类树均显示, 地理位置相邻的群体聚在一起。研究表明, 3 个光裸星虫地理群体均具有中等的遗传多样性, 杂合度均偏低, 群体间存在较大的基因流, 杂合子明显缺失; 群体间已产生遗传分化, 但分化水平还较低。

关键词: 北部湾; 光裸星虫; 微卫星; 遗传多样性

中图分类号: S93

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2012)01-0062-08

光裸星虫(*Sipunculus nudus* Linnaeus, 1766)隶属于星虫纲(Sipunculidea), 星虫目(Sipunculiformes), 星虫科(Sipunculidae), 星虫属, 俗称“沙虫”, 在中国沿海均有分布, 尤以广西、广东沿海资源最为丰富, 是海洋渔业资源中具有重要经济意义的种类。近年来, 由于长期大量开采、海区污染、滩涂破坏等原因, 星虫资源已明显下降。光裸星虫繁殖生物学^[1-3]和人工增殖技术^[4-7]的研究与利用受到广泛重视, 并开始成为北海、湛江等北部湾沿岸地区新的海水养殖对象, 具有较好的经济效益。目前, 市售的星虫苗种一部分来源于北部湾沿岸(广东、广西省及越南等地)捕获的野生幼虫; 一部分是由北海、湛江一些生产单位人工繁育的幼虫, 其亲本来源包括当地野生群体和越南群体。苗种培育后, 主要贩卖到广西、广东和福建三省, 海南也有极少量养殖。

开展光裸星虫人工繁育和养殖, 对保护现有的光裸星虫资源及其可持续利用具有积极意义, 但也容易造成养殖群体对自然群体的遗传渐渗或遗传稀释, 尤其是生产单位与个体养殖户间自发的相互引种养殖。因此, 为了达到保护星虫遗传资源、保证资源可持续发展的目的, 应尽快对光裸星虫遗传多样性进行研究。目前, 国内外有关星虫动物遗传多样性的研究报道较少。王庆恒等^[8]采用 RAPD 技术研究了北海、厦门和三亚 3 个光裸星虫地理群体的遗传多样性; Du 等^[9-10]通过线粒体 DNA 16S rRNA 及 CO I 基因的部分序列分析了光裸星虫上述 3 个地理群体的遗传结构。

微卫星(microsatellite), 又称简单序列重复(SSR, simple sequence repeat), 是 1~6 个碱基串联重复序列。水产动物微卫星 DNA 标记的研制和使用较晚, 但发展速度较快。目前微卫星 DNA

收稿日期: 2011-06-17; 修订日期: 2011-08-13.

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2007BAD29B03); 广东省自然科学基金资助项目(06029125); 广东海洋大学面上项目(0812069).

作者简介: 郭昱嵩(1980-), 女, 博士, 副教授, 主要从事海洋生物分子遗传学研究. E-mail: gysrabbit@163.com

通信作者: 杜晓东, 教授. Tel: 0759-2382404; E-mail: zjdx@21cn.com

标记已被运用到军曹鱼(*Rachycentron canadus*)^[11]、太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)^[12]、仿刺参(*Apos-tichopus japonicus*)^[13]、中国明对虾(*Fenner-openaeus chinensis*)^[14]、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[15]、日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)^[16]等水产动物中进行地理种群的遗传结构和遗传多样性分析。本研究通过微卫星标记分析北部湾光裸星虫野生群体的遗传多样性, 探讨北部湾光裸星虫群体遗传结构及亲缘关系, 以期为北部湾光裸星虫种质资源保护、合理利用以及良种选育提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料的采集与 DNA 提取

野生光裸星虫成体, 体长 9.8~15.6 cm, 于

2010 年 4~7 月采自北部湾周边的广东省湛江市乌石镇、广西省北海市山口镇与越南广宁省锦普市的潮间带(表 1), 3 个采样点所在地均未开展光裸星虫的人工繁育及养殖。采样地点见图 1。取新鲜肌肉用于 DNA 的提取。总 DNA 的制备参照卢圣栋^[17]的方法。经 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳检测纯度, 4℃ 下保存备用。

1.2 PCR 扩增

本实验采用的光裸星虫微卫星引物为项目组自主开发的微卫星引物(表 2), 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。PCR 扩增反应体系为: 总体积 10 μL, 含 1 μL 10× PCR Buffers (Bio Basic Inc., 10 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0), 10 mmol/L KCl, 10 mmol/L (NH₄)₂SO₄, 2 mmol/L MgSO₄), dNTPs 0.2 mmol/L, 引物各 0.5 μmol/L, *Taq* 聚合酶 1 U, 总 DNA 约 10 ng。

表 1 光裸星虫样品的基本信息
Tab.1 Basic information of *Sipunculus nudus* samples

群体 population	取样时间 sampling date	采集地 sampling site	个体数 sample number
湛江群体(ZJ) Zhanjiang population	2010-04-12	广东省湛江市乌石镇	39
北海群体(BH) Beihai population	2010-06-20	广西壮族自治区北海市山口镇	39
锦普群体(JP) Jinpu population	2010-07-13	越南广宁省锦普市	39

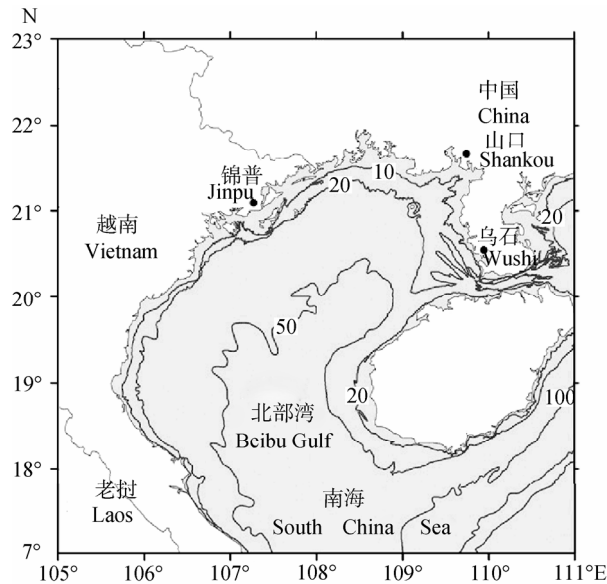


图 1 北部湾 3 个光裸星虫群体的采样位点
Fig. 1 Sampling sites of three *Sipunculus nudus* populations in Beibu Gulf

PCR 反应条件如下: 94℃ 热变性 80 s; 94℃ 变性 30 s、各引物最适退火温度下退火 30 s、72℃

延伸 45 s, 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 5 min。PCR 扩增产物采用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 3~4 h, 银染, 凝胶成像仪检测并拍照, 用 Gel-pro 软件包分析每个扩增条带的分子量。

1.3 数据统计与分析

根据条带的位置确定基因型, 利用 GENPOP 4.0^[18] 进行群体遗传分析, 计算等位基因数(*N*)、有效等位基因(*N_e*)、等位基因频率(*P_i*), 采用 Bonferroni 方法^[19]校正的显著性标准, 进行 Hardy-Weinberg 平衡检验的概率值(*P*)、观测杂合度 (observed heterozygosity, *H_o*) 和期望杂合度 (expected heterozygosity, *H_e*) 的计算。用 Botstein 等^[20] 的公式计算微卫星位点多态信息含量 (polymorphism information content, PIC)。利用 ARLEQUIN 3.1^[21] 计算群体内近交系数 (*F_{is}*)、群体遗传固定系数 (*F_{st}*) 及基因流 (*N_m*) 等。利用 DISPAN 计算群体间 Nei's 遗传距离 (Genetic distance, *D_A*)^[22], 基于 *D_A* 分别

构建 NJ 和 UPGMA 系统树。

2 结果与分析

2.1 遗传多样性分析

20 对微卫星引物在光裸星虫的 3 个地理群体中均能很好地扩增,但各个群体的最佳退火温度

略有不同。图 2~4 是 3 个地理群体在位点 *Snu17* 的扩增电泳图谱。各位点等位基因数及多态信息含量见表 3, 20 个微卫星座位中有 3 个位点 (*Snu08*、*Snu10*、*Snu14*)呈现单态, 17 个多态微卫星座位中有等位基因数介于 2~9 之间, 多态信息含量 PIC 介于 0.097~0.797 之间。

表 2 光裸星虫微卫星引物的序列
Tab. 2 Sequences of SSR primers of *Sipunculus nudus*

位点 locus	引物序列(5'-3') primer(5'-3')	重复单元 repeat motif	序列号 GenBank access. no.
<i>Snu01</i>	ACCACCAAGTAAGAGGCA TATTCCCAGGTTCATTCTG	(GT) ₇	HM241371
<i>Snu02</i>	TCGGCGTACCAATGTAGA GATTCCGTTCACGACTGC	(GT) ₅ N(TG) ₇	HM241351
<i>Snu03</i>	CGGGTAGGAACACCAAAG CGAAATGCCCTGAAAATC	(GT) ₈	HM241368
<i>Snu04</i>	ATTATTCGTATGTGGCTCC AATCCGTAGAAGATGCTG	(TG) ₅	HM241367
<i>Snu05</i>	GGAGGCTATGCTTTCATT TTTACTTATTCACCCGTA	(GT) ₆	HM241370
<i>Snu06</i>	GCACGAATTGACAGAAAT GACTAAAACGTAAACCGATG	(TG) ₅ N(TG) ₆	HM241378
<i>Snu07</i>	GTTCATCCCCGTTTCGTGA CGGTGTCCGTATTGTGGT	(GT) ₇	HM241376
<i>Snu08</i>	ATCCTCACATCACCGAGTC CCGAAACCTACCTTAGCG	(GT) ₅	HM241377
<i>Snu09</i>	TGGAAAATACACTCAAGAAA AGATAAGCTGGTAGAGGATG	(TG) ₅	HM241375
<i>Snu10</i>	ATTATAGAAAGTTACAGCAG TATTACGGGGTCAGGGT	(GT) ₅	HM241387
<i>Snu11</i>	CGTACAGGCGCTAAATAT GATGAATTGTATGCGTAC	(GT) ₁₀	HM241402
<i>Snu12</i>	GCGTTCATCCCCGTTTCGT CAAGCCTCCGCCCTGTAA	(GT) ₆	HM241389
<i>Snu13</i>	TTGGGCTTACCACCTACA ACGGGGTCAAGAACATCA	(AT) ₅	HM241389
<i>Snu14</i>	CATTATTGCCTCCACTTG ACCTTTTCTGGGATTGTC	(TG) ₅	HM241407
<i>Snu15</i>	CCGAAACTGACCTGTGAT GTAGCCTAATGGCGAAT	(TG) ₅	HM241384
<i>Snu16</i>	TCCGCTAGGAGGGTATGC AGACGGCGTTTCAGTTTG	(TG) ₆	HM241416
<i>Snu17</i>	TGTCCGATTGCCTACTGA ACACCAAATGCTAACAGAT	(GT) ₇	HM241383
<i>Snu18</i>	TGTCTCCGCTCTTCTCAT TCATAAATAAACCCCTGTAA	(CA) ₅	HM241415
<i>Snu19</i>	ACAAAGAAAGACGAAGGC CGTCCCAACTTTTGAGTA	(GT) ₅	HM241385
<i>Snu20</i>	GCCAGGAGGGTATGTGAT TGATGGATTCTTCTTTGGA	(TG) ₇	HM241405

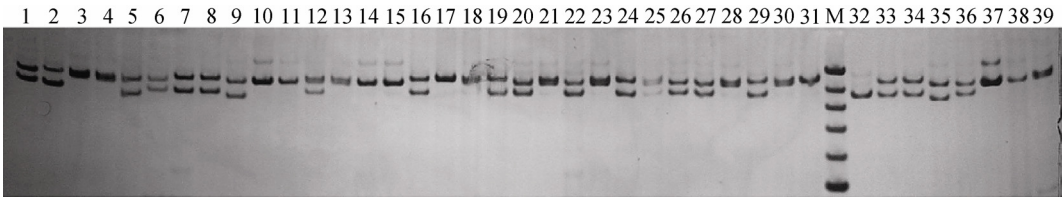


图 2 湛江群体在 *Snu17* 位点的电泳图谱
M:DNA ladder marker (200 bp, 180 bp, 160 bp, 140 bp, 120 bp, 100 bp).
Fig.2 Electrophoretic patterns of PCR products of Zhanjiang *Sipunculus nudus* population in locus *Snu17*
M: 20 bp DNA ladder marker (200 bp, 180 bp, 160 bp, 140 bp, 120 bp, 100 bp).

3 个野生群体的遗传多样性参数见表 4, 在 3 个群体中, 等位基因数差别很小, 最大的是北海群体(BH, $N=3.3$), 最小的是锦普群体(JP, $N=3.1$); JP 群体平均期望杂合度($H_e=0.442$)和观测杂合度($H_o=0.411$) 均最大, BH 群体最小 ($H_e=0.360$, $H_o=0.404$)。结果显示, 越南锦普群体的遗传多样性较高, 而北海群体相对较低。

利用 Hardy-Weinberg 定律对 3 个群体中每个位点基因平衡状态进行检验(表 4), 显著性标准经 Bonferroni 法校正($P<0.0025$)后, 各群体均有 5 个

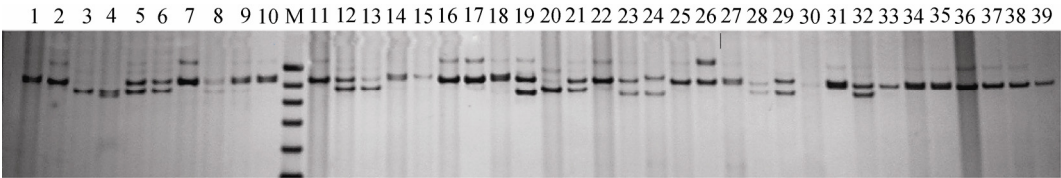


图 3 北海群体在 *Snu17* 位点的电泳图谱

M: 20 bp DNA ladder marker (200 bp, 180 bp, 160 bp, 140 bp, 120 bp, 100 bp).

Fig.3 Electrophoretic patterns of PCR products of Beihai *Sipunculus nudus* population in locus *Snu17*

M: 20 bp DNA ladder marker (200 bp, 180 bp, 160 bp, 140 bp, 120 bp, 100 bp).

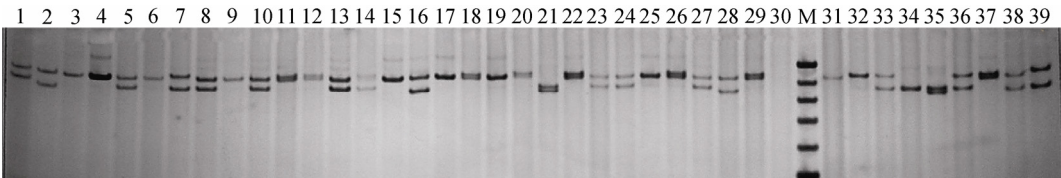


图 4 锦普群体在 *Snu17* 位点的电泳图谱

M: 20 bp DNA ladder marker (200 bp, 180 bp, 160 bp, 140 bp, 120 bp, 100 bp).

Fig.4 Electrophoretic patterns of PCR products of Jinpu *Sipunculus nudus* population in locus *Snu17*

M: 20 bp DNA ladder marker (200 bp, 180 bp, 160 bp, 140 bp, 120 bp, 100 bp).

表 3 光裸星虫 20 个微卫星位点有效等位基因数、杂合度及多态信息含量

Tab. 3 Effective alleles, expected and observed heterozygosity and polymorphism information content for 20 microsatellite loci of <i>Sipunculus nudus</i>					
位点 locus	等位基因数 number of alleles, N	有效等位基因数 number of effective alleles, N_e	期望杂合度 expected heterozygosity, H_e	观测杂合度 observed heterozygosity, H_o	多态信息含量 polymorphism information content, PIC
<i>Snu01</i>	3	1.74	0.424	0.548	0.372
<i>Snu02</i>	5	2.28	0.562	0.723	0.520
<i>Snu03</i>	3	1.99	0.497	0.795	0.377
<i>Snu04</i>	4	2.03	0.508	0.500	0.429
<i>Snu05</i>	5	3.26	0.693	0.417	0.656
<i>Snu06</i>	4	2.43	0.588	0.393	0.524
<i>Snu07</i>	3	1.52	0.343	0.416	0.290
<i>Snu08</i>	1	1.00	0.000	0.000	-
<i>Snu09</i>	5	1.71	0.416	0.402	0.381
<i>Snu10</i>	1	1.00	0.000	0.00	-
<i>Snu11</i>	9	5.56	0.820	0.616	0.797
<i>Snu12</i>	4	1.21	0.176	0.155	0.169
<i>Snu13</i>	3	1.26	0.207	0.226	0.198
<i>Snu14</i>	1	1.00	0.000	0.000	-
<i>Snu15</i>	3	1.11	0.099	0.103	0.097
<i>Snu16</i>	5	1.72	0.419	0.527	0.377
<i>Snu17</i>	6	3.03	0.670	0.678	0.628
<i>Snu18</i>	2	2.00	0.500	1.000	0.375
<i>Snu19</i>	7	2.16	0.537	0.302	0.494
<i>Snu20</i>	3	2.72	0.632	0.565	0.561

表 4 3 个光裸星虫群体微卫星遗传多样性参数
Tab. 4 Genetic diversity indices in three *Sipunculus nudus* populations

群体 popu- lation	指数 index	位点 locus																				合计 total
		Snu01	Snu02	Snu03	Snu04	Snu05	Snu06	Snu07	Snu08	Snu09	Snu10	Snu11	Snu12	Snu13	Snu14	Snu15	Snu16	Snu17	Snu18	Snu19	Snu20	
ZJ	N	3	4	2	4	4	4	2	1	3	1	7	1	3	1	3	5	6	2	6	2	3.2
	P	0.034	0.010	0.000*	0.000*	0.008	0.000*	0.156	-	0.245	-	0.000*	-	0.601	-	0.990	0.976	0.225	0.000*	1.000	0.107	
	H _e	0.483	0.564	0.500	0.476	0.623	0.623	0.307	0.000	0.429	0.000	0.771	0.000	0.310	0.000	0.098	0.387	0.699	0.500	0.375	0.326	0.374
	H _o	0.641	0.757	0.897	0.282	0.395	0.447	0.378	0.000	0.436	0.000	0.343	0.000	0.359	0.000	0.103	0.471	0.795	1.000	0.436	0.410	0.407
	N	3	5	3	4	3	3	2	1	5	1	9	1	3	1	3	4	5	2	6	2	3.3
BH	P	0.257	0.675	0.007	0.005	0.000*	0.000*	0.137	-	0.470	-	0.049	-	0.945	-	0.965	0.789	0.011	0.000*	0.000*	0.001*	
	H _e	0.388	0.493	0.469	0.538	0.509	0.462	0.311	0.000	0.402	0.000	0.832	0.000	0.167	0.000	0.145	0.375	0.605	0.500	0.549	0.458	0.360
	H _o	0.487	0.622	0.718	0.556	0.436	0.324	0.385	0.000	0.308	0.000	0.895	0.000	0.179	0.000	0.154	0.447	0.553	1.000	0.316	0.711	0.404
	N	3	5	2	3	5	4	3	1	3	1	6	4	3	1	2	3	5	2	4	2	3.1
JP	P	0.220	0.088	0.001*	0.143	0.000*	0.005	0.029	-	0.039	-	0.001*	0.553	0.979	-	0.868	0.028	0.788	0.000*	0.000*	0.012	
	H _e	0.388	0.602	0.497	0.498	0.729	0.621	0.408	0.000	0.406	0.000	0.790	0.454	0.127	0.000	0.051	0.471	0.671	0.500	0.594	0.411	0.411
	H _o	0.514	0.789	0.769	0.667	0.421	0.405	0.486	0.000	0.462	0.000	0.590	0.474	0.135	0.000	0.053	0.658	0.684	1.000	0.154	0.579	0.442

注: 等位基因数(N); 观测杂合度 (H_o); 期望杂合度 (H_e); Hardy-Weinberg 平衡检测概率值(P); *为经 Bonferroni 校正后仍显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡(P<0.002 9). 群体代码含义如表 1 所示.

Note: number of alleles(N); observed heterozygosity (H_o);expected heterozygosity (H_e); summary of Chi-Square Tests for Hardy-Weinberg Equilibrium(P); * donates extremely significant deviations of Hardy-Weinberg expections after Bonferroni correction(P<0.002 9). Code for each population is shown in table 1.

位点显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡, 其中 LS 群体显著偏离的位点有: *Snu03*、*Snu04*、*Snu06*、*Snu11* 和 *Snu18* 位点; BH 群体显著偏离的位点有: *Snu05*、*Snu06*、*Snu18*、*Snu19* 和 *Snu20* 位点; YN 群体显著偏离的位点有: *Snu03*、*Snu05*、*Snu11*、*Snu18* 和 *Snu19* 位点。在 3 个群体中均显著偏离的位点为 *Snu18*。

2.2 群体遗传分化

2.2.1 *F* 值与基因流 由表 5 可见, 本研究得出的 F_{is} 值在-1.000~0.404 之间, 平均值为-0.123。 F_{it} 值在-1.000~0.438 之间, 平均值为-0.065。各座位的遗传固定指数 F_{st} 在 0~0.371 之间, 平均值为 0.051。各座位的基因流较大, 在 0.424~39.126 之间, 除 *Snu20* 位点为 0.424, 其他 16 个位点 N_m 值均在 1 以上; 平均 N_m 值为 12.988。

表 5 各多态位点的 *F* 值和基因流(N_m)
Tab. 5 *F* value and gene flow (N_m) for all polymorphic loci

位点 locus	F_{is}	F_{it}	F_{st}	N_m
<i>Snu01</i>	-0.304	-0.293	0.008	31.193
<i>Snu02</i>	-0.307	-0.287	0.015	16.623
<i>Snu03</i>	-0.626	-0.601	0.016	15.558
<i>Snu04</i>	0.005	0.014	0.009	27.454
<i>Snu05</i>	0.327	0.399	0.106	2.104
<i>Snu06</i>	0.310	0.333	0.033	7.246
<i>Snu07</i>	-0.219	-0.211	0.006	39.126
<i>Snu09</i>	0.026	0.035	0.010	25.419
<i>Snu11</i>	0.236	0.257	0.027	9.157
<i>Snu12</i>	-0.043	0.119	0.155	1.367
<i>Snu13</i>	-0.113	-0.092	0.019	12.855
<i>Snu15</i>	-0.051	-0.044	0.006	38.283
<i>Snu16</i>	-0.279	-0.257	0.017	14.286
<i>Snu17</i>	-0.029	-0.011	0.017	14.499
<i>Snu18</i>	-1.000	-1.000	0.000	****
<i>Snu19</i>	0.404	0.438	0.057	4.164
<i>Snu20</i>	-0.422	0.105	0.371	0.424
平均值 mean	-0.123	-0.065	0.051	12.988

注: $N_m = [(1/F_{st}) - 1]/4$ 。

2.2.2 群体间遗传距离 基于等位基因频率计算光裸星虫各群体间的 Nei's 遗传距离如表 6 所示, 湛江与北海群体遗传距离最近($D_A=0.026$), 湛江与锦普群体的遗传距离最远($D_A=0.081$); 3 个野生

群体在 17 个微卫星座位上平均的遗传固定指数 (F_{st})如表 5 对角线下所示, 湛江与北海群体遗传固定指数最小($F_{st}=0.019$), 湛江与锦普群体之间遗传固定指数最大($F_{st}=0.049$), 遗传固定指数差异不显著($P>0.05$)。

基于 DA 遗传距离, 用 NJ 和 UPGMA 法构建的聚类图结果一致(图 5, 仅列 UPGMA 图), 地理位置相邻的群体聚在一起, 即湛江与北海种群聚在一起, 再与锦普种群聚为一支。

表 6 光裸星虫群体间 *F*-统计量(F_{st} , 对角线下)和遗传距离(D_A , 对角线上)

群体 population	ZJ	BH	JP
ZJ	—	0.026	0.081
BH	0.019	—	0.067
JP	0.049	0.042	—

注: 群体代码含义如表 1 所示。
Note: Code for each population is shown in table 1.

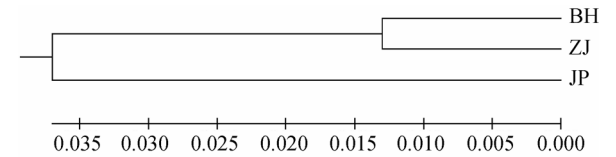


图 5 基于群体间遗传距离的 UPGMA 聚类树
群体代码含义如表 1 所示。
Fig. 5 UPGMA clustering tree based on genetic distance between populations
Code for each population is shown in table 1.

3 讨论

根据 Botstein 等^[19]提出的标准, $PIC>0.5$ 属于高度多态性位点, $0.25<PIC<0.5$ 为中度多态位点, $PIC<0.25$ 为低度多态位点。本研究中 17 个多态位点中, 有 6 个位点为高度多态位点, 8 个为中度多态位点, 3 个为低度多态位点。3 个群体的平均 PIC 为 0.426, 属于中度多态。遗传杂合度(H)是指微卫星座位为杂合子的比例, 能较好地反映群体中等位基因的丰富程度和均匀程度, 其大小可以反映群体遗传变异的高低, 普遍认为杂合度是度量群体遗传变异的一个最适参数^[23]。本研究中, 3 个

群体的平均 H_e 为 0.476, H_o 为 0.492。因星虫门动物没有微卫星标记的相关研究报道, 类比其他低等无脊椎动物的相关结果, 其杂合度均低于仿刺参 (0.582 4 ~ 0.659 5)^[13]、中国明对虾 (0.810 ~ 0.864)^[14]、日本沼虾 (0.698 ~ 0.804)^[16] 的野生群体, 略高于凡纳滨对虾的养殖群体 (0.36 ~ 0.43)^[15]。王庆恒等^[8]运用 RAPD 技术对光裸星虫北海、三亚和厦门 3 个地理群体进行遗传多样性分析, 得到遗传多样性指数为 0.245 ~ 0.296, 与其他物种相比较, 光裸星虫的遗传多样性高于中国明对虾、凡纳滨对虾、日本对虾、皱纹盘鲍等, 得出光裸星虫遗传变异程度处于较高水平的结论。研究结果的差异有可能是因为研究手段不同, 或者是样品采集地不同, 也有可能是由于光裸星虫在不到 10 年的时间里资源量和遗传多样性水平都已下降。

遗传固定指数 (F_{st}) 常用于评价亚群体遗传分化程度, 一般评判标准是 $F_{st} < 0.05$ 代表分化较小, $0.05 < F_{st} < 0.15$ 代表中等分化, $0.15 < F_{st} < 0.25$ 代表高度分化, $0.25 < F_{st} < 1.00$ 代表极高度分化^[24]。本研究 F_{st} 在 0.019 ~ 0.049, 表明光裸星虫的 3 个地理群体分化较小。光裸星虫虽然为穴居生活, 但海球幼体营浮游生活, 浮游期约为 2 周, 利于不同地理群体形成基因交流。同时, 光裸星虫的人工繁育也可能造成了人为的基因流。北海地区养殖户普遍反映越南光裸星虫生长速度优于本地群体, 本研究结果也表明, 越南锦普群体与北海、湛江群体的遗传分化程度较大, 继续深入开展各群体生长性状与微卫星标记的相关性分析将是一项非常有意义的工作。

当群体处于 Hardy-Weinberg 平衡时, 各等位基因在群体中分布频率应该是相对稳定的, 观测杂合度和期望杂合度之间没有显著的差异。群体处于 Hardy-Weinberg 平衡的基本条件应是群体足够大, 随机交配, 同时没有选择、突变、迁移和遗传漂变等现象, 而本研究的 Hardy-Weinberg 平衡偏离指数 (D) 大多数都小于 0, 表明杂合子缺失。

本研究的结果显示光裸星虫北海、湛江和越南 3 个野生群体的杂合度均偏低, 群体间存在较大的基因流, 杂合子明显缺失; 群体间已有遗传

分化, 但分化水平还较低。这一研究结果对于生产工作中的杂交育种有一定指导意义, 同时也揭示目前对光裸星虫长期无休止地乱捕滥挖已导致其遗传多样性水平已显著降低。需要及时采取措施, 对有限的资源加以珍惜和保护, 同时开展人工繁育以达到星虫资源的可持续利用。

参考文献:

- [1] 郭学武, 李复雪. 光裸星虫生殖周期的研究[J]. 热带海洋, 1993, 12 (2): 69-76.
- [2] 兰国宝, 阎冰. 方格星虫繁殖生物学研究[J]. 水产学报, 2002, 26(6): 503-509.
- [3] 王庆恒, 杜晓东, 黄洪艳, 等. 湛江地区光裸星虫的生殖细胞发育和生殖周期[J]. 湛江海洋大学学报, 2005, 25(1): 5-9.
- [4] 兰国宝, 廖思明, 阎冰. 水温对方格星虫幼体发育及变态的研究[J]. 水产学报, 2007, 31(5): 633-638.
- [5] 蒋艳, 蔡德建, 邹杰, 等. 方格星虫苗种池塘中间培育试验研究[J]. 广西科学, 2010, 17(2): 175-177.
- [6] 邹杰, 彭慧婧, 蒋艳, 等. 方格星虫亲体培育试验[J]. 渔业现代化, 2010, 37(3): 30-33.
- [7] 文雪, 蒋艳, 邹杰, 等. 方格星虫滩涂人工养殖试验[J]. 科学养鱼, 2011, (1): 38-39.
- [8] 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.
- [9] Du X, Chen Z, Deng Y, 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 J Aquaculture-Bamidgeh, 2008, 60(4): 237-242.
- [10] Du X, Chen Z, Deng Y, et al. Comparative analysis of genetic diversity and population structure of *Sipunculus nudus* as revealed by mitochondrial COI Sequences[J]. Biochem Genet, 2009, 47: 884-891.
- [11] 王中铎, 陈铁妹, 郭昱嵩, 等. 军曹鱼全人工繁殖群体遗传特征的 SSR 分析[J]. 广东海洋大学学报, 2010, 30(3): 16-21.
- [12] 陈曦, 黄勤, 江锦祥, 等. 福建太平洋牡蛎种群微卫星 DNA 分析[J]. 台湾海峡, 2007, 26(4): 548-554.
- [13] 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[J]. 水产学报, 2007, 31(4): 437-442.
- [14] 孟宪红, 孔杰, 王清印, 等. 微卫星技术对黄、渤海海域 7 个不同地理群体中国对虾的遗传结构和遗传分化研究[J].

- 海洋水产研究, 2008, 29(5): 1–10.
- [15] 童馨, 龚世圆, 喻达辉, 等. 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)不同世代养殖群体的遗传多样性分析[J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(2): 214–220.
- [16] 冯建彬, 吴春林, 丁怀宇, 等. 洪泽湖日本沼虾 9 个野生群体遗传多样性微卫星分析[J]. 中国水产科学, 2010, 17(2): 218–227.
- [17] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术 [M]. 第 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999.
- [18] Rousset F. GENEPOP'007: a complete e-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux [J]. Mol Ecol Res, 2008, 8: 103–106.
- [19] Bonferroni, C. E. "Il calcolo delle assicurazioni su gruppi di teste." [C] Studi in Onore del Professore Salvatore Ortu Carboni. Rome: Italy, 1935: 13–60.
- [20] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. Am J Hum Gen, 1980, 32(3): 31–34.
- [21] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis [J]. Evol Bioinform Online, 2005, 1: 47–50.
- [22] Nei M, Tajima F, Tateno Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data [J]. J Mol Evol, 1983, 19(3): 153–170.
- [23] 肖调义, 张学文, 章怀云, 等. 洞庭湖四种黄颡鱼基因组 DNA 遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24 (3): 85–89.
- [24] Balloux F, Lugon-Moulin, N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers [J]. Mol Ecol, 2002, 11: 155–165.

Genetic diversity in three wild stocks of *Sipunculus nudus* Linnaeus, 1766 in Beibu Gulf

GUO Yusong, WANG Qingheng, LI Xinglian, ZHANG Lifei, DU Xiaodong

Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China

Abstract: We evaluated the genetic diversity of three wild populations [Zhanjiang (ZJ), Beihai (BH), Jingpu (JP)] of *Sipunculus nudus* in the Beibu Gulf using 20 microsatellite DNA loci. We calculated the allele numbers, effective allele numbers, expected heterozygosity, observed heterozygosity and Hardy-Weinberg equilibrium. Three loci were monomorphic and 17 loci were polymorphic. Five loci in each population deviated significantly from Hardy-Weinberg equilibrium. The locus *Snu18* exhibited significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium in all 3 populations. Though diversity was higher in JP than in BH and ZJ, F_{st} analysis across the stocks and loci revealed a low level of divergence. We constructed NJ and UPGMA clustering trees based on D_A genetic distance. The populations from nearby geographical locations were clustered together in both trees.

Key words: Beibu Gulf; *Sipunculus nudus*; microsatellite; genetic diversity

Corresponding author: DU Xiaodong. Tel: 0759-2382404; E-mail: zjdx@21cn.com