

DOI: 10.12264/JFSC2024-0017

## 刺参养殖池塘一种小头虫的分类鉴定及遗传多样性分析

赵宏晶<sup>1,2</sup>, 王印庚<sup>2</sup>, 葛建龙<sup>2</sup>, 廖梅杰<sup>2</sup>, 李彬<sup>2</sup>, 荣小军<sup>2</sup>, 王锦锦<sup>2</sup>, 袁春营<sup>1</sup>,  
崔青曼<sup>1</sup>, 常玉松<sup>3</sup>, 施国军<sup>4</sup>

1. 天津科技大学海洋与环境学院, 天津 300457;
2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室, 山东 青岛 266071;
3. 东营万德海水养殖装备有限公司, 山东 东营 257100;
4. 东营市河口区科学技术局, 山东 东营 257200

**摘要:** 为明确刺参养殖池塘大量出现的一种潜在敌害生物种类以及不同养殖区域的遗传关系, 本研究采用形态学和分子生物学方法确定了小头虫的种类, 并基于 18S rDNA、CO I 和 ITS 基因序列, 对山东东营和青岛两个地理群体的遗传多样性及遗传结构进行解析, 结果显示, 虫体外观呈红色, 长 7.94~25.27 mm, 宽 0.65~0.94 mm, 头部呈圆锥状或钝圆形; 胸部九个胸节, 前七胸节具毛状刚毛; 雄体在第八、九胸节具有钩状生殖棘; 雌体在腹部具成对的卵巢; 身体背部圆形, 腹部较扁平, 后腹部无鳃; 尾部末端具肛门。基于线粒体 CO I 基因系统发育树和序列比对, 发现其与 *Capitella teleta* 聚为一支且序列相似性为 99.11%。结合形态学特征及 CO I 基因分析结果, 确定山东刺参养殖池塘的小头虫为 *C. teleta*。不同地区小头虫的遗传进化分析结果显示, 中国山东 *C. teleta* 和韩国 *C. teleta* 以及日本 *C. teleta* 的亲缘关系最近, 进一步说明刺参养殖池塘中的小头虫为 *C. teleta*。东营和青岛小头虫群体的遗传多样性和 AMOVA 分析结果显示, 东营群体遗传多样性高于青岛群体, 两个地理群体的亲缘关系较远, 两个群体存在一定程度的遗传分化。研究结果明确了刺参养殖池塘中小头虫的种类以及不同养殖区域小头虫群体的遗传关系, 为构建刺参健康养殖技术提供了科学依据。

**关键词:** 海参; 小头虫; 形态学; CO I 基因; 18S rDNA; ITS 基因

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)04-0476-12

仿刺参(*Apostichopus japonicus*)又名刺参, 是棘皮动物门中经济价值较高的种类之一, 具有极高的营养价值和药用价值<sup>[1]</sup>。近年来, 山东、辽宁、河北及福建等地的刺参养殖业发展迅速。随着养殖模式的发展和养殖区域的扩展, 刺参的养殖总产量和面积一直处于持续增长的趋势。建立了池塘养殖、底播养殖、工厂化养殖、浅海网箱养殖、浮筏吊笼养殖、多物种混养等多元化养殖模式<sup>[2]</sup>。然而, 随着刺参养殖规模和养殖密度的不断扩大, 病害问题也日益凸显, 严重制约了刺参养殖业的

健康发展。刺参疾病主要包括细菌性疾病、寄生性疾病和敌害生物。池塘养殖作为刺参养成的最主要模式之一, 养殖面积占全国的 40%以上。前期刺参池塘养殖病害以腐皮综合征为主<sup>[3-6]</sup>, 然而, 随着池塘累年养殖和不规范养殖操作, 池塘中发现的敌害生物也越来越多, 已研究的敌害生物包括桡足类<sup>[7-8]</sup>、海鞘(*Ciona intestinalis*)<sup>[9-10]</sup>、海绵动物<sup>[11-12]</sup>、长颈麦秆虫(*Caprella equilibra*)<sup>[13]</sup>、澳洲异尾涡虫(*Heterochaerus australis*)<sup>[14]</sup>、鹰钩拟海牛(*Melanochlamys* sp.)<sup>[15]</sup>、海星<sup>[16]</sup>等, 敌害生物已成

收稿日期: 2024-01-15; 修订日期: 2024-02-24.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2023YFD2400705); 山东省重点研发计划项目(2023CXGC010410); 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2023TD29).

作者简介: 赵宏晶(1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向为海洋生物学. E-mail: 1426856479@qq.com

通信作者: 王印庚, 研究员, 研究方向为水产病害防控. E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn

为限制产业发展的重要影响因素。

2022 年夏秋以来,通过对北方沿海池塘养殖刺参进行调查发现,青岛、威海、东营、唐山、凌海等多家养殖池塘的刺参在春、秋季出现活力下降、厌食和生长停滞等现象,严重时可导致养殖刺参产量下降 20%~50%。经观察发现养殖池塘底泥表面有大量的凸起状黑点,黑点下方穴居一种小头虫,黑点集中的地方具明显臭味,没有刺参栖息,对海参养殖效益造成巨大损失。小头虫被认为是海洋有机污染的指示生物,也是海洋底栖生态系统中的高度机会主义物种,分布于各种各样的栖息地<sup>[17]</sup>。小头虫在刺参养殖池塘中大量出现,提示池底存在底质恶化问题,这可能是养殖刺参减产的主要原因。但是,调查发现池塘泼洒杀虫药物后,小头虫大量消减死亡,刺参摄食活动等行为有所恢复,推测小头虫大量出现也对刺参有一定不良影响。因此,本研究以山东沿海刺参养殖池塘中的小头虫为研究对象,通过形态学观察、分子鉴定及系统发育分析,确定其种类,并分析不同地理群体的遗传多样性和遗传结构,以期丰富该物种的生物学基础资料,为刺参养殖病害防控提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实地调查及样品采集

2022 年 12 月至 2023 年 11 月对山东、河北、辽宁等地刺参养殖区进行实地调查,内容主要包括:刺参养殖池塘的池底情况、的分布密度、穴居巢穴的形态与结构、刺参活动摄食和发病情况等。其间,从山东东营和青岛刺参养殖池塘采集含有大量小头虫的底泥,带回实验室后加入适量的海水,并进行微量充气暂养,利用 40 目筛网从底泥分离出实验所需的小头虫。

### 1.2 形态学特征观察

**1.2.1 体视显微观察** 随机选取 30 条虫体,放置于培养皿中,每次取 1 条放置于载玻片上,用 Nikon SMZ1500 体视显微镜观察其外观形态并拍照,测量其体长和体宽(胸区最宽处)。

**1.2.2 扫描电镜观察** 解剖镜下将虫体表面附着物清理干净后放入 2.5%的戊二醛固定液中固定保

存,经磷酸缓冲液漂洗后,进行无水乙醇梯度脱水、乙酸异戊酯置换、二氧化碳临界点干燥、镀金操作,使用 TESCAN VEGA3 扫描电子显微镜观察虫体的超微结构并拍照。

### 1.3 石蜡切片观察

分离的虫体在 Davidson's 固定液中固定 24 h,然后转入 70%无水乙醇中保存。固定好的样品经酒精梯度脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋、切片、HE 染色及中性树胶封片,用 Panoramic MIDI II-3DHISTECH 数字切片扫描仪扫描,并用 SlideViewer 软件观察拍照。

### 1.4 分子鉴定和系统发育分析

用 E.Z.N.A. TM Mollusc DNA KIT (Omega, GA, USA)试剂盒提取虫体基因组 DNA,使用超微量分光光度计 NanoDrop 1000 检测浓度,并于 -20 °C 保存备用。以基因组 DNA 为模版扩增 18S rDNA 和线粒体 CO I 基因序列,所用的引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表 1)。PCR 扩增总体积为 50  $\mu$ L,包括 Green Taq Mix 25  $\mu$ L,上游引物 1  $\mu$ L,下游引物 1  $\mu$ L, DNA 模版 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 21  $\mu$ L。PCR 反应程序为:95 °C 预变性 5 min,35 个循环(95 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 1 min),72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测合格后送生工生物工程(上海)股份有限公司进行双向测序,利用 Contig Express 软件进行序列拼接。

获得的 CO I 基因序列在 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中进行 Blast 比对,从中选取相近物种的 CO I 基因序列,用 MEGA 11.0 软件进行多序列比对,以邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统发育树,并基于 NCBI 数据库中已有的同属物种 CO I 基因序列(表 2)进行遗传进化分析,Bootstrap 值设置为 1000。

### 1.5 遗传多样性及遗传结构分析

从东营和青岛刺参养殖池塘各取 30 条虫体,提取每个个体的基因组 DNA,PCR 扩增 18S rDNA、CO I 和 ITS 等 3 个基因片段,引物序列见表 1, DNA 提取方法和 PCR 扩增程序同上。获得的序列用 MEGA11.0 软件进行比对、计算遗传距离、统计碱基组成、变异位点数、简约信息位点数、

表 1 物种鉴定及系统进化分析用 PCR 引物  
Tab. 1 PCR primer for species identification and phylogenetic analysis

引物名称 primers	序列 sequence	参考文献 references	用途 purpose
CY18S (F)	5'-GCGAATGGCTCATTAAATCAG-3'	[18]	系统发育分析
CY18S (R)	5'-CTTGTTACGACTTTTACTTCC-3'	[18]	phylogenetic analysis
LCO1490 (F)	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'	[19]	
HCO2198 (R)	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'	[19]	
18S rDNA (F)	5'-CGGATGGCTCATTAGAACAG-3'	/	遗传多样性和遗传结构分析
18S rDNA (R)	5'-GTGTGTACAAAAGGCGAGG-3'	/	analysis of genetic diversity and genetic structure
CO I (F)	5'-ATAGGAATTTGAGGTGGACTTG-3'	/	
CO I (R)	5'-GGCCGAAAAATCAGAATAAGTG-3'	/	
ITS (F)	5'-CACACTGAACATCGACAGCTTG-3'	/	
ITS (R)	5'-GTTTCTTTTCTCCGCTTACTG-3'	/	

表 2 用于遗传进化分析的相关物种序列来源及信息  
Tab. 2 Sequence information for phylogenetic analysis

物种名称 specie name	NCBI 登录号 NCBI accession number	国家 country	参考文献 references
<i>Capitella teleta</i>	OR660131-OR660133	China	this study
<i>Capitella</i> sp.	LC120651-LC120653	Japan	[20]
<i>Capitella</i> aff. <i>teleta</i>	LC120641-LC120650	Japan	[20]
<i>Capitella teleta</i>	LC120627-LC120640	Japan	[20]
<i>Capitella</i> cf. <i>capitata</i>	KX961418	USA	[21]
<i>Capitella</i> cf. <i>aciculata</i>	KX961404	USA	[21]
<i>Capitella teleta</i>	KX298243-KX298247、KX286328-KX286329	Korea	[22]
<i>Capitella capitata</i>	GU672406-GU672407、HQ023469-HQ023474	Canada	[23]

突变位点数和颠换转换比率等。用 DnaSP 5.0 软件确定单倍型, 计算两个地理群体的核苷酸多样性指数(nucleotide diversity,  $P_i$ )、单倍型数目(number of haplotypes,  $H$ )、单倍型多样性(Haplotype diversity,  $H_d$ )、平均核苷酸差异数(average number of nucleotide differences,  $K$ )和多态位点数(number of polymorphismsites,  $S$ )。使用 Network 4.6 软件构建单倍型网络关系图。利用 Alrequin 3.5 软件中的 AMOVA 方差分析法估算两个地理群体的分化系数( $F$ -statistics,  $F_{ST}$ )和基因流( $N_m$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 实地调查结果

小头虫在刺参养殖池塘池底呈斑块分布, 多存在于水草腐败、发黑发臭、有机质丰富的浮性淤泥或黏质粉砂土中, 其在刺参养殖池塘中全年都存在, 春、秋两季丰度较大(密度可达 30 个/dm<sup>2</sup>以上)。它们营穴居生活, 摄食时一半身体在穴内, 一

半身体探出洞穴, 通过左右摇摆取食池底表层沉积物和刺参的粉末饵料。虫体也可完全爬出巢穴采食, 再钻入巢穴。巢穴口大小为 1~3 mm, 深度 30~50 mm; 巢穴洞口呈现为小黑点, 由虫体蠕动将其排泄物和分泌物推出巢穴洞口而形成(图 1)。巢穴周围有臭味、异味, 刺参对该虫体分布丰度高的区域有明显躲避行为, 导致刺参厌食、生长缓慢、严重时会出现吐肠现象, 形成巢穴周围没有刺参栖息和摄食的局面。

### 2.2 形态与生物学特征分析

对采自东营和青岛两家刺参养殖池塘的虫体进行形态结构比较分析, 发现它们形态结构相同。虫体整体呈弯曲状、体色为红色(图 2b), 体长 7.94~25.27 mm, 体宽 0.65~0.94 mm (表 3)。身体分为头部、胸部、腹部、尾部四部分。虫体细长, 有时外部包裹一层囊膜(图 2g); 头部呈圆锥状或钝圆形, 由口前叶和围口节组成(图 2c), 具吻无颚(图 2a、f); 胸部分为九个胸节且每个胸

节之间都有一层隔膜(图 3a、b), 第一胸节到第七胸节具成束的毛状刚毛, 基部稍粗, 顶部较细, 且每束 6~19 条不等(图 2d、e, 图 3e), 虫体的第五胸节通常为最宽和最短的胸段; 成熟的雄性个体在身体背部的第八、九胸节具有钩状生殖棘(图 2c、d、h、i、j, 图 3b), 第九胸节的生殖棘比第八胸节的生殖棘更大更粗壮, 且第八胸节的棘朝向向后, 第九胸节的棘朝向向前, 形成“钳状”结构; 雄虫的第七、八胸节之间具有椭圆状的生殖管(图 2a); 另外虫体的胸腔具有消化道器官(图 2d); 多数个体胸节比腹节宽且向后逐渐变窄, 通常胸部的刚毛比腹部的刚毛较多且较长, 身体背部圆形, 腹部较扁平, 后腹部无鳃, 腹沟从第五胸节一直延伸到腹部前端(图 2f), 整个腹部有更深的侧沟(图 2h), 成熟的雌性个体在腹部具成对的卵巢(图 3c); 尾部末端具肛门(图 2a、k、图 3f)。

### 2.3 分子鉴定及遗传进化分析

用 18S rDNA 引物 CY18SF 和 CY18SR 扩增获得长度为 1619 bp 的有效基因序列, 通过 Blast 检索发现其归类于小头虫科(Capitellidae)。在此基础上, 基于无脊椎动物通用 CO I 引物 LCO1490F 和 HCO2198R 扩增获得长度为 701 bp 的有效基因序列(编号为 C), 通过 Blast 检索发现其与 *C. teleta* 序列同源性最高, 相似性为 99.11%。从 NCBI 数据库

中选取了相近物种的 CO I 基因序列构建系统发育树, 结果显示其与 *C. teleta* 聚为一支(图 4)。结合其形态学特征及分子鉴定结果, 确定刺参养殖池塘采集的小头虫为 *C. teleta*, 隶属于环节动物门(Annelida)、多毛纲(Polychaeta)、头节虫目(Scolecida)、小头虫科(Capitellidae)、小头虫属(*Capitella*)。

通过与 NCBI 中下载的相关小头虫属 CO I 序列的遗传进化分析结果显示, 不同地区小头虫的遗传距离在 0.003~0.327 之间, 其中韩国 *C. teleta* 和日本 *C. teleta* 的遗传距离最小为 0.003; 中国 *C. teleta* 与韩国 *C. teleta* 及日本 *C. teleta* 的遗传距离较小, 分别为 0.009 和 0.010, 其次是日本 *C. aff. teleta*, 遗传距离为 0.042 (表 4)。遗传分化系数显示, 中国 *C. teleta* 和韩国 *C. teleta* 之间的基因频率差异较小, 日本 *C. teleta* 次之(表 4)。上述结果表明中国 *C. teleta* 和韩国 *C. teleta*、日本 *C. teleta* 亲缘关系较近, 这进一步确证了刺参养殖池塘中的小头虫为 *C. teleta*。

### 2.4 东营和青岛刺参养殖池塘中小头虫群体的遗传多样性及遗传结构分析

**2.4.1 基因序列特征分析** 东营(DY)和青岛(QD)两个地理群体共有的 18S rDNA 序列长度为 1482 bp, 序列碱基组成比例比较稳定, 4 种核苷酸



图 1 刺参养殖池塘底部小头虫及其巢穴

a-b 小头虫栖息的池塘底部实景图, 箭头所指黑点为小头虫巢穴口, 圆圈指示爬出巢穴的小头虫。

Fig. 1 *Capitella teleta* and its nest on the bottom of sea cucumber culture pond

a-b. Actual view of the bottom of the pond inhabited by the *Capitella teleta*, the black dots indicated by the arrows are *Capitella teleta* nests, the *Capitella teleta* crawling out of the nests are in the circles.



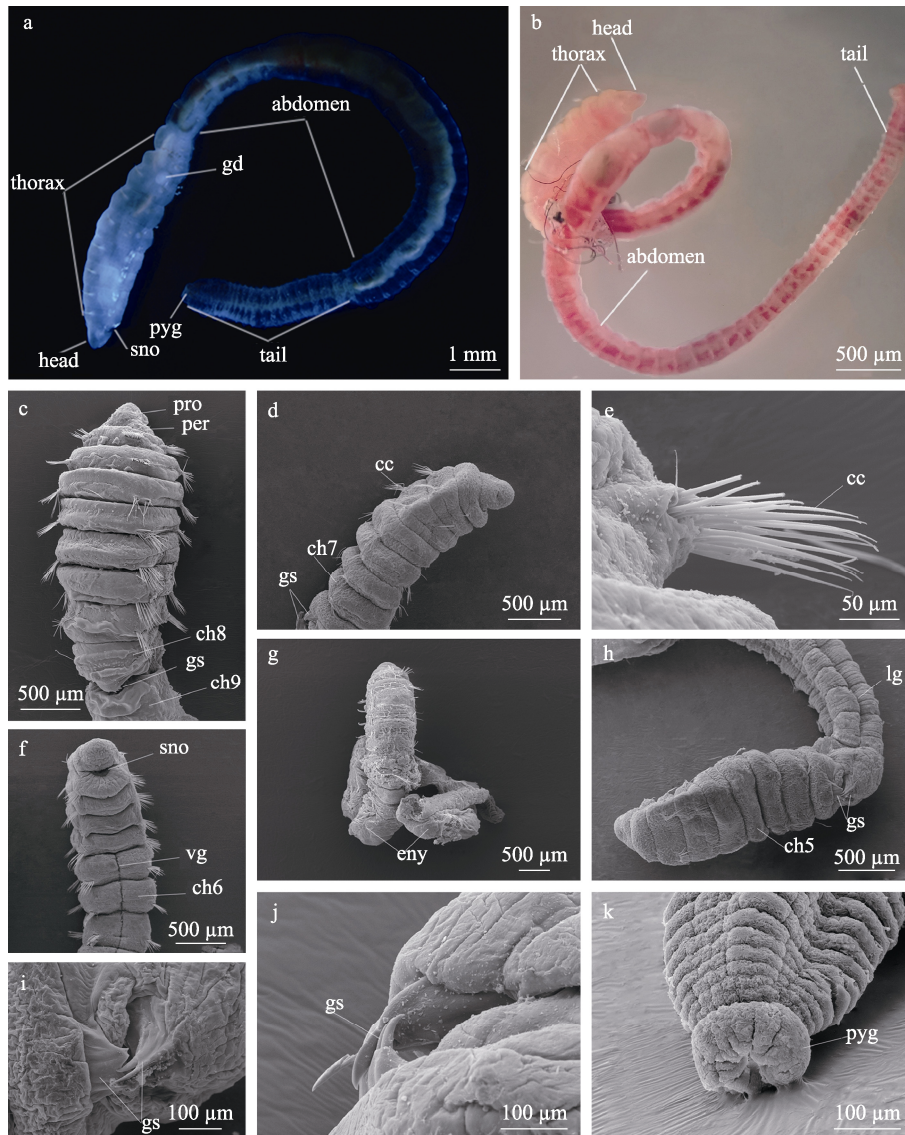


图 2 小头虫外观结构观察

a-b. 体视显微观察(a. 因透光原因虫体呈蓝色), c-k. 扫描电镜观察. pro: 口前叶; per: 围口节; gd: 生殖管; gs: 生殖棘; dt: 消化道; ch: 胸节; cc: 毛状刚毛; sno: 吻; vg: 腹沟; env: 囊膜; lg: 侧沟; pyg: 尾节; head: 头部; thorax: 胸部; abdomen: 腹部; tail: 尾部.

Fig. 2 Observation on the appearance structure of *Capitella teleta*

a-b. Microscopic observation of stereomicroscope (a. the worm appear blue because of light transmission); c-k. Scanning electron microscope observation. pro: prostomium; per: peristomium; gd: genital duct; gs: genital spines, dt: digestive tract; ch: chaetiger; cc: capillary chaeta; sno: snout; vg: ventral groove; env: envelope; lg: lateral groove; pyg: pygidium.

表 3 小头虫形态特征统计结果  
Tab. 3 Statistical results of morphological characteristics of *Capitella teleta*

指标 index	数量/条 number	最大值 max	最小值 min	平均值±标准差 mean±SD	变异系数/% CV
体长/mm body length	30	25.27	7.94	13.87±4.31	31.07
体宽/mm body width	30	0.94	0.65	0.79±0.08	18.25

A、T、C、G 的平均含量依次为 24.5%、22.4%、23.6%、29.5%，C+G 含量为 53.1%，略高于 A+T 含量(表 5)。CO I 的序列长度为 638 bp，其中 A 的平均含量为 31.6%，T 的平均含量为 30.5%，C 的平均含量为 19.3%，G 的平均含量为 18.6%，A+T 含量为 62.1%，明显高于 C+G 含量，表现出明显的 AT 碱基偏向性(表 5)。ITS 序列长度为 302 bp，A、

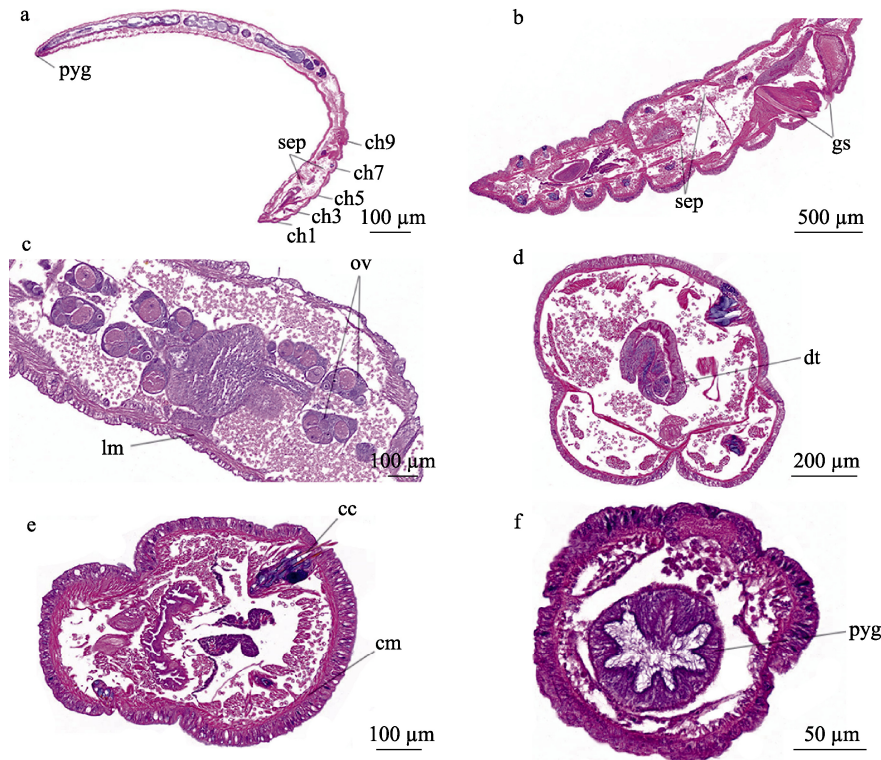


图 3 小头虫组织结构观察

a-d. 石蜡纵切显微观察, e-f. 石蜡横切显微观察. pyg: 尾节; gs: 生殖棘; sep: 隔膜; ch: 胸节; ov: 卵巢; lm: 纵肌; dt: 消化道; cc: 毛状刚毛; cm: 环肌.

Fig. 3 Observation of the histological microstructure of *Capitella teleta*

a-d. Microscopic observation of Paraffin longitudinal section, e-f. Microscopic observation of paraffin horizontal section. pyg: pygidium; gs: genital spines; sep: septum; ch: chaetiger; ov: ovaries; lm: longitudinal muscle; dt: digestive tract; cc: capillary chaeta; cm: circular muscle.

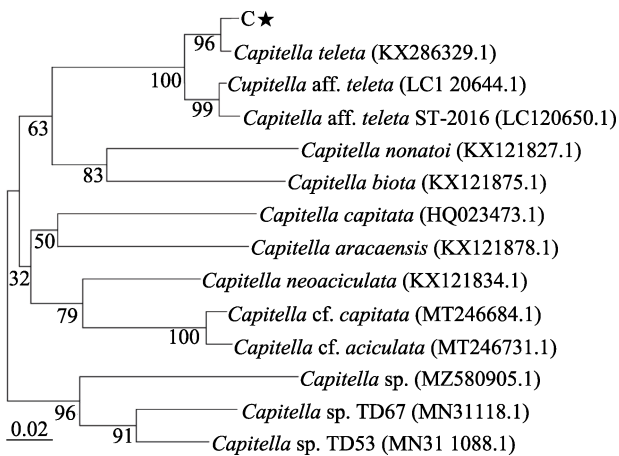


图 4 基于 CO I 基因构建的小头虫属系统发育树 每个节点代笔一个分类单元, 分支旁边的数字为自展值, 物种名旁边为 NCBI 登录号, 星号代表本研究中的小头虫.

Fig. 4 Phylogenetic tree of genus *Capitella* constructed based on CO I gene

Each node represents a taxonomic, the number next to the branch is the bootstrap value, the accession numbers of NCBI are given next to the species name, asterisks represent *Capitella teleta* in this study.

T、C、G 的平均含量分别为 20.6%、25.0%、26.3%、28.1%, C+G 含量为 54.3%, 略高于 A+T 含量(表 5)。

在 18S rDNA 基因的 1482 个位点中, 保守位点有 1446 个, 约占全序列的 97.6%; 简约信息位点有 8 个, 约占 0.5%; 单突变位点有 24 个, 约占 1.6%; 变异位点有 35 个, 约占 2.3% (图 5), 总体转换/颠换偏倚率(R 值)为 0.6。CO I 基因的 638 个位点中, 保守位点约占整个序列的 40.0%; 简约信息位点约占 56.4%; 单突变位点约占 3.1%; 变异位点 380 个, 约占总位点数的 59.6%, R 值为 0.8。ITS 序列的 302 个位点中, 保守位点 144 个, 简约信息位点 157 个, 单突变位点 1 个, 变异位点 158 个, 约占总位点数的 52.3%, R 值为 0.8。

2.4.2 遗传多样性及 AMOVA 分析 DY、QD 两个群体间的核苷酸遗传多样性参数见表 6。基于 18S rDNA 基因序列共检测到 3 个单倍型(H)和 29 个多态位点(S), 单倍型多样性(H<sub>d</sub>)为 0.066, 核苷

酸多样性指数( $P_i$ )为 0.0008, 平均核苷酸差异数( $K$ )为 1.193, 其中 DY 群体  $H$ 、 $H_d$ 、 $P_i$ 、 $K$ 、 $S$  数值均高于 QD 群体。基于 CO I 基因序列共检测到 28 个单倍型和 342 个多态位点, 单倍型多样性为 0.949, 核苷酸多样性指数为 0.2957, 平均核苷酸差异数为 165.885, DY 群体除  $S$  数值略低于 QD 群体外, 其余均高于 QD 群体。基于 ITS 基因序列共检测到 7 个单倍型和 155 个多态位点, 单倍型多样性为 0.644, 核苷酸多样性指数为 0.0383, 平均核苷酸差异数为 10.806, DY 群体  $H$ 、 $H_d$ 、 $P_i$ 、

$K$ 、 $S$  数值均高于 QD 群体。通过对比 3 个基因序列的遗传多样性参数, 两个群体 CO I 基因的  $H$ 、 $H_d$ 、 $P_i$ 、 $K$ 、 $S$  数值均明显高于 18S rDNA 和 ITS。

AMOVA 分析结果如表 7 所示, 基于 18S rDNA 基因群体间变异为整体变异的 1.25%, 遗传分化系数( $F_{ST}$ )为 0.012, 基因流( $N_m$ )为 39.654; 基于 CO I 基因群体间遗传变异占 84.66%, 遗传分化系数为 0.847, 基因流为 0.091; 基于 ITS 基因群体间变异为整体变异的 5.58%, 遗传分化系数为 0.056, 基因流为 8.456。

表 4 基于 CO I 基因不同地区小头虫的遗传距离(对角线下方)和遗传分化系数(对角线上方)

Tab. 4 Mean genetic distance (below diagonal) and fixation index (above diagonal) based on CO I gene in different areas with *Capitella teleta*

物种名称 specie name	1	2	3	4	5	6	7	8
1. <i>C. teleta</i> (China)		0.972	0.721	0.955	0.984	0.707	0.992	0.992
2. <i>C. capitata</i> (Canada)	0.206		0.729	0.687	0.469	0.635	0.447	0.450
3. <i>C. teleta</i> (Japan)	0.010	0.209		0.916	0.980	-0.021	0.980	0.980
4. <i>C. aff. teleta</i> (Japan)	0.042	0.207	0.033		0.986	0.920	0.988	0.988
5. <i>C. sp.</i> (Japan)	0.222	0.174	0.231	0.217		0.979	0.979	0.978
6. <i>C. teleta</i> (Korea)	0.009	0.209	0.003	0.327	0.231		0.979	0.979
7. <i>C. cf. capitata</i> (USA)	0.228	0.277	0.228	0.229	0.269	0.227		1.000
8. <i>C. cf. aciculata</i> (USA)	0.226	0.279	0.225	0.227	0.261	0.226	0.203	

表 5 东营和青岛小头虫群体 18S rDNA、CO I 和 ITS 序列的碱基组成

Tab. 5 Base compositions of 18S rDNA, CO I and ITS sequences of Dongying and Qingdao *Capitella teleta* populations

群体 population	18S rDNA					CO I					ITS				
	T	C	A	G	C+G	T	C	A	G	C+G	T	C	A	G	C+G
DY	22.5	23.6	24.4	29.5	53.1	40.3	18.2	21.9	19.6	37.8	24.9	26.4	20.7	28.0	54.3
QD	22.4	23.7	24.5	29.4	53.1	20.6	20.4	41.4	17.5	37.9	25.1	26.2	20.5	28.2	54.4
平均值 average	22.4	23.6	24.5	29.5	53.1	30.5	19.3	31.6	18.6	37.9	25.0	26.3	20.6	28.1	54.3

表 6 东营和青岛小头虫群体遗传多样性参数

Tab. 6 Genetic diversity parameter of Dongying and Qingdao *Capitella teleta* populations

基因 gene	群体 population	样本数量 sample number	单倍型数目 $H$	单倍型多样性 $H_d$	核苷酸多样性指数 $P_i$	平均核苷酸差异数 $K$	多态位点数 $S$	%
18S rDNA	DY	30	3	0.131	0.0017	2.434	29	
	QD	30	1	0.000	0.0000	0.000	0	
	overall	60	3	0.066	0.0008	1.193	29	
CO I	DY	30	20	0.956	0.1121	62.874	339	
	QD	30	16	0.938	0.0442	26.044	345	
	overall	60	28	0.949	0.2957	165.885	342	
ITS	DY	30	6	0.545	0.0726	20.775	158	
	QD	30	5	0.446	0.0020	0.593	4	
	overall	60	7	0.644	0.0383	10.806	155	



表 7 东营和青岛小头虫群体分子方差分析  
Tab. 7 AMOVA of Dongying and Qingdao *Capitella teleta* populations

基因 gene	变异来源 source of variation	自由度 df	平方和 sum of squares	变异组分 variance components	变异百分比/% percentage of variation	遗传分化系数 fixation Index	基因流 $N_m$
18S rDNA	群体间 among population	1	0.817	0.00747	1.25	0.012*	39.654
	群体内 within population	58	34.367	0.59253	98.75		
	总数 total	59	35.183	0.60000			
CO I	群体间 among population	1	3629.733	120.26475	84.66	0.847*	0.091
	群体内 within population	58	1263.867	21.79080	15.34		
	总数 total	59	4893.600	142.05556			
ITS	群体间 among population	1	14.55	0.31015	5.58	0.056*	8.456
	群体内 within population	58	304.233	5.24540	94.42		
	总数 total	59	318.783	5.55556			

注: \*代表  $P < 0.05$ .

Note: \* stands for  $P < 0.05$ .

2.4.3 单倍型网络图 基于 CO I 基因序列 DY、QD 两个地理群体共获得 28 个单倍型, 记录为 H<sub>1</sub>~H<sub>28</sub>, 构成以 H<sub>3</sub> 为中心向外辐射的单倍型网络图(图 5)。其中, H<sub>1</sub>、H<sub>2</sub>、H<sub>5</sub>、H<sub>6</sub>、

H<sub>8</sub>、H<sub>9</sub>、H<sub>10</sub>、H<sub>17</sub>、H<sub>19</sub>、H<sub>20</sub>、H<sub>22</sub>、H<sub>26</sub>、H<sub>27</sub> 和 H<sub>28</sub> 作为网络图外部端点而独立存在, 其余单倍型则以外部辐射的网络节点而存在。不同地理群体的单倍型分布较为集中, 28 个单倍型中存在 3 个共享单倍型(H<sub>3</sub>、H<sub>13</sub> 和 H<sub>18</sub>), 占总单倍型的 10.7%, 其余 25 个单倍型为 DY 或 QD 群体所特有。

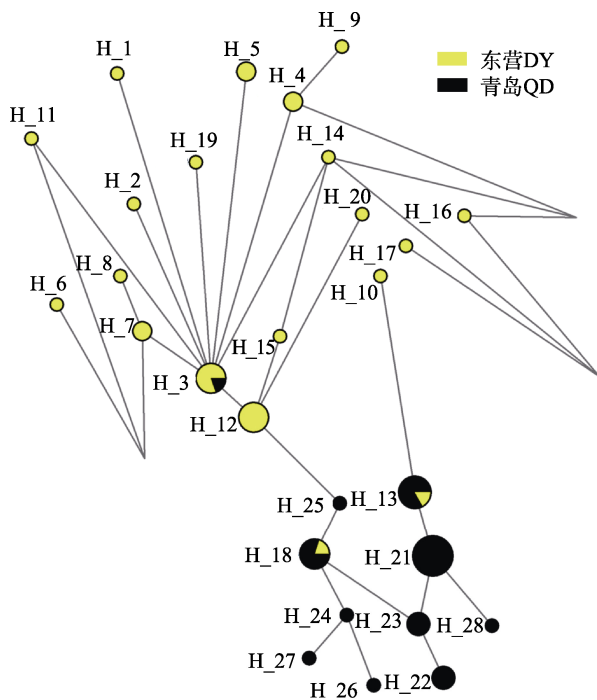


图 5 东营和青岛小头虫群体基于 CO I 基因的单倍型网络图  
圆的大小表示单倍型出现的频率, 扇形面积表示该单倍型中某群体所占比例.

Fig. 5 The haplotype network based on CO I gene of Dongying and Qingdao *Capitella teleta* populations  
The size of the circle indicates the frequency of occurrence of the haplotype, the area of the sector indicates the proportion of a group in this haplotype.

### 3 讨论

#### 3.1 小头虫的形态及分子鉴定

形态学鉴定是物种鉴定的基本方法, 但仅靠形态特征难以准确鉴定小头虫的种类。CO I 基因作为动物线粒体基因组(mtDNA)中的蛋白编码基因之一, 进化速度快, 其高度变异性和在物种内的保守性使其成为一种理想的 DNA 标记<sup>[24]</sup>。本研究在形态学观察的基础上, 对小头虫的线粒体 CO I 基因进行了特异性扩增, 鉴定刺参养殖池塘中的小头虫为 *C. teleta*。该虫与韩国 *C. teleta* 和日本 *C. teleta* 的遗传距离和遗传分化系数较小, 具有较近的亲缘关系, 其形态特征与 Jeong 等<sup>[22]</sup>描述的韩国海域 *C. teleta* 和 Li 等<sup>[25]</sup>描述的山东海域 *C. teleta* 的特征一致, 与日本和美国小头虫有所差异, 其每束刚毛的数量多于日本<sup>[20]</sup>和美国<sup>[21]</sup>。本研究的 *C. teleta* 与巴西海岸的 4 种小头虫新物种 (*C. aracaensis* sp. n.、*C. biota* sp. n.、*C. neoaciculata* sp. n.、*C. nonatoi* sp. n.) 的头部形态差异较明显<sup>[26]</sup>, 如 *C. biota* sp.n. 的口前叶较本研



究中 *C. teleta* 的口前叶略尖; *C. neoaciculata* sp. n. 和 *C. nonatoi* sp. n. 的口前叶背侧相较于 *C. teleta* 有明显凹陷。

### 3.2 东营和青岛刺参养殖池塘小头虫群体的遗传多样性

亲缘关系越近的分类阶元之间,核苷酸替换以转换为主要形式;反之,则更倾向于发生颠换<sup>[27-28]</sup>。本研究中,基于 18S rDNA、CO I 和 ITS 3 个基因,小头虫序列总体偏倚率 R 值均小于 1,即核苷酸替换以颠换为主,说明东营和青岛小头虫群体之间的亲缘关系较为疏远。根据 Grant 等<sup>[29]</sup>学者的研究,将  $H_d$  值设定为 0.5,  $P_i$  值设定为 0.005 作为临界标准,数值越大表示生物群体的遗传多样性越高。本研究结果显示,3 个基因片段中,18S rDNA 序列表现最为保守,遗传多样性较低( $H_d < 0.5$ ,  $P_i < 0.005$ ),而 CO I 和 ITS 序列表现出较高的遗传多样性( $H_d > 0.5$ ,  $P_i > 0.005$ )。此外,东营群体的遗传多样性水平高于青岛群体,可能是由于黄河口流水冲击产生大面积滩涂的变迁,致使小头虫种群长距离迁徙,产生了较为活跃的基因交流,从而提升了遗传多样性水平。

### 3.3 东营和青岛刺参养殖池塘小头虫群体的遗传分化

$F_{ST}$  取值范围为 0~0.05,表示群体间遗传分化很小;0.05~0.15 表示中等程度的遗传分化;0.15~0.25 表示遗传分化较大;超过 0.25 则意味群体间有很大的遗传分化<sup>[30]</sup>。基因流( $N_m$ )表明基因在群体间的交换程度, $N_m$  越大说明群体间的基因交流频率越高<sup>[31-33]</sup>。 $N_m$  小于 1 时,意味群体间基因交流受限; $N_m$  大于 4 时,各群体处于随机交配状态,基因流成为影响群体遗传分化的主要因素<sup>[34-35]</sup>。本研究中,基于 18S rDNA 序列东营和青岛两个小头虫群体遗传分化很小,基因流较大;基于 CO I 序列两群体产生很大程度的遗传分化,基因交流频率较弱;基于 ITS 序列群体间存在中等程度的遗传分化,基因交流较频繁。遗传变异结果显示,基于 18S rDNA 和 ITS 基因序列遗传变异来源于群体内,而基于 CO I 基因序列遗传变异主要来自于群体间,表明线粒体 CO I 基因群体内结构相对保守,群体间差异较大,可作为小头虫

种类鉴定和种群遗传结构分析的理想分子标记<sup>[36]</sup>。单倍型网络图可以反映出各单倍型在各个地理群体中的分布情况及单倍型之间的演化关系。本研究中,两个群体共享的 CO I 基因单倍型仅占 10.7%,每个地理群体的单倍型分布较为集中,形成明显的系统地理结构。综上,东营和青岛小头虫群体间存在一定程度的遗传分化,且东营群体的遗传多样性较高,两个群体的亲缘关系较为疏远,这有助于我们预测小头虫对药物抗性的发展,对后续开展药物防控工作具有一定的指导意义。

## 4 结论与展望

本研究以形态学特征和分子生物学分析结果为依据,确定山东刺参养殖池塘中出现的小头虫为 *C. teleta*,通过对东营和青岛小头虫群体的遗传关系解析发现,东营群体的遗传多样性较高,两个群体的亲缘关系较疏远,相关结果为该物种防控提供了科学数据。今后将继续对该物种进行深入研究,查清小头虫进入养殖系统的途径,解析小头虫在水产养殖系统内的繁殖过程与特征,探究小头虫的分泌物和排泄物对刺参是否有毒害作用,为保障刺参高效养殖提供理论依据和技术支撑。

### 参考文献:

- [1] Wang J Y, Li B, Wang Y G, et al. Screening and characteristic analysis of *Bacillus velezensis* from sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) ponds[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2018, 25(3): 567-575. [王金燕,李彬,王印庚,等.刺参养殖池塘一株贝莱斯芽孢杆菌的分离及其生理特性[J].中国水产科学,2018,25(3):567-575.]
- [2] Liao M J, Wang Y G, Li B, et al. Present status and existing problem for sea cucumber culture industry in China and discussion on its countermeasures (continued)[J]. Scientific Fish Farming, 2021(2): 24-25. [廖梅杰,王印庚,李彬,等.我国海参养殖产业现状、存在问题及对策探讨(上)[J].科学养鱼,2021(2):24-25.]
- [3] Wang L L, Yang Q H, Li H Y, et al. Isolation and identification of *Photobacterium damsela* causing disease in cultured *Apostichopus japonicus* in Southern China[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2022, 29(12): 1800-1811. [王丽莉,杨求华,李慧耀,等.南移仿刺参美人鱼发光杆菌病原分离鉴定与药敏分析[J].中国水产科学,2022,

- 29(12): 1800-1811.]
- [4] Wang Y G, Xie J J, Rong X J, et al. Rapid detection of 2 pathogens of skin ulcer syndrome in cultured *Apostichopus japonicus* by indirect fluorescence antibody technique[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(2): 329-336. [王印庚, 谢建军, 荣小军, 等. 养殖刺参腐皮综合征 2 种致病菌间接荧光抗体快速检测方法[J]. 中国水产科学, 2010, 17(2): 329-336.]
- [5] Wang Y G, Fang B, Zhang C Y, et al. Etiology of skin ulcer syndrome in cultured juveniles of *Apostichopus japonicus* and analysis of reservoir of the pathogens[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(4): 610-616. [王印庚, 方波, 张春云, 等. 养殖刺参育苗期重大疾病“腐皮综合征”病原及其感染源分析[J]. 中国水产科学, 2006, 13(4): 610-616.]
- [6] Zhang C Y, Wang Y G, Rong X J, et al. Isolation and identification of causative pathogen for skin ulcerative syndrome in *Apostichopus japonicus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2006, 30(1): 118-123. [张春云, 王印庚, 荣小军. 养殖刺参腐皮综合征病原菌的分离与鉴定[J]. 水产学报, 2006, 30(1): 118-123.]
- [7] Chen S L. Control of copepods in seedling culture of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*)[J]. Shandong Fisheries, 2006, 23(6): 47. [陈淑玲. 桡足类在刺参育苗苗中的防治[J]. 齐鲁渔业, 2006, 23(6): 47.]
- [8] Chen W B, Liu T, Song X Y, et al. Study on the application of bio-ecological methods in net cages of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*)[J]. Journal of Aquaculture, 2015, 36(3): 13-14. [陈文博, 刘彤, 宋晓阳, 等. 刺参网箱育苗中生物生态方法应用研究[J]. 水产养殖, 2015, 36(3): 13-14.]
- [9] Wang Y G, Chen Z Y, Liao M J, et al. Killing effect of a herbal compound on glassy sea squirt *Ciona intestinalis* in the seedling stage of the sea cucumber (*Apostichopus japonicus*)[J]. Fisheries Science and Technology Information, 2013, 40(5): 245-249. [王印庚, 陈宗阳, 廖梅杰, 等. 一种中草药复方对刺参苗期玻璃海鞘的杀除效果[J]. 水产科技情报, 2013, 40(5): 245-249.]
- [10] Han S, Li C L, Hu W, et al. Lethal effects of tea saponin on sea squirt *Ciona intestinalis* in the sea cucumber hatchery[J]. Fisheries Science and Technology Information, 2021, 48(2): 99-102. [韩莎, 李成林, 胡炜, 等. 茶皂素在刺参苗期对玻璃海鞘杀除效果的研究[J]. 水产科技情报, 2021, 48(2): 99-102.]
- [11] Rong X J, Liao M J, Li B, et al. A new harmful organism found in *Apostichopus japonicus* indoor breeding seedling-*Grantia nipponica*[J]. Marine Sciences, 2014, 38(5): 60-65. [荣小军, 廖梅杰, 李彬, 等. 室内刺参育苗池中新发现的一种敌害生物——日本毛壶[J]. 海洋科学, 2014, 38(5): 60-65.]
- [12] Shan H Y, He C B, Li X D, et al. Sponge *Haliclona subarmifera*-a harmful organism for sea cucumber culture[J]. Fisheries Science, 2008, 27(12): 645-647. [单红云, 赫崇波, 李晓冬, 等. 一种海绵动物对室内养殖海参危害的初步研究[J]. 水产科学, 2008, 27(12): 645-647.]
- [13] Wang Y G, Rong X J, Zhang C Y, et al. Main diseases of cultured *Apostichopus japonicus*: Prevention and treatment [J]. Marine Sciences, 2005, 29(3): 1-7. [王印庚, 荣小军, 张春云, 等. 养殖海参主要疾病及防治技术[J]. 海洋科学, 2005, 29(3): 1-7.]
- [14] Kong M. A preliminary study on identification and control of new enemy organisms in the cultured ponds of *Apostichopus japonicus*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020. [孔森. 刺参池塘养殖中新型敌害生物的种类鉴定及防控初步研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.]
- [15] Miao K, Liao M J, Li B, et al. Complete mitochondrial genome sequences of sea slug *Melanochlamys* sp. (Cephalaspidae: Aglajidae)[J]. Mitochondrial DNA Part B, 2020, 5(3): 2382-2383.
- [16] Jiang H T, Liu Y X, Xin X D, et al. A sea cucumber enemy-*Asteroidea* (*Asterinidae*)[J]. Shandong Fisheries, 2008, 25(9): 22-23. [姜洪涛, 刘雨新, 辛晓东, 等. 海参敌害——海星(海燕)[J]. 齐鲁渔业, 2008, 25(9): 22-23.]
- [17] Blake J A, Grassle J P, Eckelbarger K J. *Capitella teleta*, a new species designation for the opportunistic and experimental *Capitella* sp. I, with a review of the literature for confirmed records[J]. Zoosymposia, 2009, 2(1): 25-53.
- [18] Wu J S, Lu Z, Yang Q H, et al. Identification and pathological analysis of parasite *Haliotrema bilobatus* associated with haliotremasis in gill of twin-spot puffer *Takifugu bimaculatus*[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2022, 37(1): 10-18. [吴建绍, 陆振, 杨求华, 等. 双斑东方鲀海盘虫病原鉴定和鳃组织病理观察[J]. 大连海洋大学学报, 2022, 37(1): 10-18.]
- [19] Meyer C P. Molecular systematics of cowries (Gastropoda: Cypraeidae) and diversification patterns in the tropics[J]. Biological Journal of the Linnean Society, 2003, 79(3): 401-459.
- [20] Tomioka S, Kondoh T, Sato-Okoshi W, et al. Cosmopolitan or cryptic species? A case study of *Capitella teleta* (Annelida: Capitellidae)[J]. Zoological Science, 2016, 33(5): 545-554.
- [21] Hilliard J, Hajduk M, Schulze A. Species delineation in the *Capitella* species complex (Annelida: Capitellidae): Geographic and genetic variation in the northern Gulf of Mexico[J].

- Invertebrate Biology, 2016, 135(4): 415-422.
- [22] Jeong M K, Wi J H, Suh H L. A reassessment of *Capitella* species (Polychaeta: Capitellidae) from Korean coastal waters, with morphological and molecular evidence[J]. Marine Biodiversity, 2018, 48(4): 1969-1978.
- [23] Carr C M, Hardy S M, Brown T M, et al. A tri-oceanic perspective: DNA barcoding reveals geographic structure and cryptic diversity in Canadian polychaetes[J]. PLoS One, 2011, 6(7): e22232.
- [24] Wang W. Population genetic diversity and phylogenetic analyses of *Capitella capetata* complex based on COI and ITS genes[D]. Beijing: Beijing Normal University, 2007. [王巍. 基于 COI 和 ITS 基因的小头虫(*Capitella capetata*)复合种的种群遗传分化及系统发生关系的研究[D]. 北京: 北京师范大学, 2007.]
- [25] Li Q, Li Y N, Wang Y, et al. Taxonomy and regeneration of a newly recorded Polychaete *Capitella teleta* (Annelida, Capitellidae) in the coastal water of Shandong, China[J]. Journal of Oceanology and Limnology, 2022, 40(1): 309-321.
- [26] Silva C F, Seixas V C, Barroso R, et al. Demystifying the *Capitella capetata* complex (Annelida, Capitellidae) diversity by morphological and molecular data along the Brazilian coast[J]. PLoS One, 2017, 12(5): e0177760.
- [27] Simon C, Frati F, Beckenbach A, et al. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers[J]. Annals of the Entomological Society of America, 1994, 87(6): 651-701.
- [28] Frati F, Simon C, Sullivan J, et al. Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene in Collembola[J]. Journal of Molecular Evolution, 1997, 44(2): 145-158.
- [29] Grant W, 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.
- [30] Wright S. Evolution in Mendelian populations[J]. Genetics, 1931, 16(2): 97-159.
- [31] Xie T H, Zhao H H, Yang H R, et al. Morphology and genetic diversity analysis of *Pelteobagrus fulvidraco* populations in Zhujiang River[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2015, 54(4): 112-120. [谢堂晖, 赵会宏, 杨慧荣, 等. 珠江流域黄颡鱼群体的形态度量学与遗传多样性分析[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2015, 54(4): 112-120.]
- [32] Slatkin M. Estimating levels of gene flow in natural populations[J]. Genetics, 1981, 99(2): 323-335.
- [33] Zheng Y T, Jiang J Y, Zhou H N, et al. Analysis of *Aedes aegypti* population genetic characteristics in key areas of dengue fever in Yunnan Province by ssr markers[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2021, 37(2): 176-182. [郑宇婷, 姜进勇, 周红宁, 等. 利用 ssr 标记浅析云南登革热重点地区埃及伊蚊种群遗传特征[J]. 中国人兽共患病学报, 2021, 37(2): 176-182.]
- [34] Slatkin M. Gene flow and the geographic structure of natural populations[J]. Science, 1987, 236(4803): 787-792.
- [35] Cui G Y. Genetic diversity of *Bosmina* in East China based on the mitochondrial gene sequences of 16S rRNA and COI[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2017. [崔光艳. 基于线粒体 16S rRNA 和 COI 基因评估华东地区象鼻溞群体遗传多样性[D]. 扬州: 扬州大学, 2017.]
- [36] Chen Z, Gao T X. Differences in the identification of marine fish by mitochondrial 12S and COI barcodes[J]. Journal of Hainan Tropical Ocean University, 2023, 30(2): 10-16. [陈治, 高天翔. 线粒体 12S 与 COI 条形码对海洋鱼类的鉴定差异[J]. 海南热带海洋学院学报, 2023, 30(2): 10-16.]

## Species identification of *Capitella* in sea cucumber culture ponds and its genetic diversity analysis

ZHAO Hongjing<sup>1,2</sup>, WANG Yingeng<sup>2</sup>, GE Jianlong<sup>2</sup>, LIAO Meijie<sup>2</sup>, LI Bin<sup>2</sup>, RONG Xiaojun<sup>2</sup>, WANG Jinjin<sup>2</sup>, YUAN Chunying<sup>1</sup>, CUI Qingman<sup>1</sup>, CHANG Yusong<sup>3</sup>, SHI Guojun<sup>4</sup>

1. College of Marine Science and Environment, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China;
2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; State Key Laboratory of Mariculture Biobreeding and Sustainable Goods, Qingdao 266071, China;
3. Wande Mariculture Equipment Company, Dongying 257100, China;
4. Bureau of Science and Technology of Hekou district, Dongying, 257200, China

**Abstract:** This study aimed to identify a potentially harmful species occurring in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) culture ponds and investigate their genetic relationships in different sea cucumber culture areas. The worms were identified using both morphological and molecular biological methods. The genetic diversity and genetic structure of two geographic populations in Dongying and Qingdao, Shandong, were analyzed based on 18S rDNA, CO I, and ITS gene sequences. The results indicate that the worm is red in appearance, measuring between 7.94–25.27 mm in length, and 0.65–0.94 mm in width. Its head was either conical or obtuse-rounded. The thorax was divided into nine segments, with the first to seventh segments containing bundles of hairy bristles. Mature males possess hook-like reproductive spines on the dorsal side of the body at the eighth and ninth thoracic segments, along with an elliptical reproductive tube between the seventh and eighth thoracic segments. Mature females have paired ovaries on their abdominal sides. The body was rounded on the dorsal side and flatter on the abdominal side, with no gills behind the abdomen. The tail end was anal. Based on the phylogenetic tree and sequence comparison of the mitochondrial CO I gene, it was found to be clustered into a clade with *Capitella teleta* with 99.11% sequence similarity. Eventually, based on the morphological characteristics and CO I gene analysis, the worms were identified as *C. teleta*. Genetic evolutionary analyses of the CO I gene sequences of *Capitella* from different areas revealed that *C. teleta* from Dongying, in China, was more closely related to *C. teleta* from Korea and *C. teleta* from Japan, re-confirming that the red worms in sea cucumber culture ponds were *C. teleta*. The genetic diversity and AMOVA analysis results of *C. teleta* populations from Dongying and Qingdao showed that the genetic diversity of the Dongying group was higher than that of the Qingdao group; the two geographic populations of *C. teleta* were distantly related, and there was a degree of genetic differentiation between the two groups. This study clarified the specific species of *Capitella* in sea cucumber cultures and the genetic relationships between *C. teleta* populations in different sea cucumber culture areas. These results provide a scientific basis for the development of healthy aquaculture technologies for sea cucumber culture.

**Key words:** *Apostichopus japonicus*; *Capitella teleta*; morphology; CO I gene; 18S rDNA; ITS gene

**Corresponding author:** WANG Yingeng. E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn