

10种海参16S rDNA序列多样性及其亲缘关系分析

费来华¹, 李赞¹, 陈家鑫²

(1. 中国海洋大学, 山东 青岛 266003; 2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘要: 运用PCR扩增10种海参的16S rDNA部分序列,并测序。获得大小为566 bp的序列,利用DNAStar 4.0软件分析比较10种海参的碱基组成、各碱基变异位点数、插入或缺失位点数,并采用MEGA 4.0软件分析彼此间的遗传距离。结果发现,10种海参富含AT碱基,A+T的含量平均为57.0%,不同种海参间发生碱基转换、颠换及发生插入或缺失变异的位点数差异很大,10种海参彼此间的遗传距离在0.007~0.316之间。所得结果与GenBank中10种海参的相应序列进行比对分析,同时用MEGA 4.0和PAUP*4.0软件构建进化树,分析其亲缘关系。结果表明,利用16S rDNA序列的差异可以将分属于海参科(Holothuriidae)与刺参科(Stichopodidae)的海参完全分开,瓜参科(Cucumariidae)的2个种与刺参科的亲缘关系较近。对不同海参种间亲缘关系的分析结果还表明,同属于刺参科的仿刺参(*Apostichopus japonicus*)与加州拟刺参(*Parastichopus californicus*)和疣拟刺参(*Parastichopus parvimensis*)亲缘关系最近,同属于海参科的格皮氏海参(*Pearsonothuria graeffei*)与白尼参属的蛇目白尼参(*Bohadschia argus*)和图纹白尼参(*B. marmorata*)亲缘关系最近,而同样为海参科的墨西哥海参(*Holothuria mexicana*)则与红腹海参(*Holothuria edulis*)关系最近。这些资料为海参的种质资源管理、新种引进和种质改良提供了基础的分子生物学依据。[中国水产科学,2008,15(5):755-765]

关键词: 海参; 16S rDNA; 系统发生

中图分类号: S917; Q959.269

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)05-0755-11

海参隶属棘皮动物门(Echinodermata),游在亚门(Eleutherozoa),海参纲(Holothuroidea),是海洋中一大类无脊椎动物的总称,种类在1400种以上,分属于160个属^[1],分布在潮间带及大洋海底的广大海域,其中热带海域种类丰富。在中国已鉴定的海参有134种,主要分布于海南岛以南的热带海域,温带分布的种类不多,但经济价值最高的海参——仿刺参(*Apostichopus japonicus*),除了在俄罗斯、日本和朝鲜半岛的北太平洋沿岸有分布外,只分布于中国的江苏连云港以北海域,自20世纪90年代以来已成为中国海水养殖业中最受青睐的养殖对象。为了深入开发海参资源,改良品质,丰富海参种质资源库,有必要对国外具有经济价值的海参资源进行研究,了解这些海参的遗传背景、生化组分以及生理生态特点,为中国海参养殖业的持续稳定发展提供依据。

关于海参遗传多样性的研究,国内学者已对分

布在中国不同海域的仿刺参等海参的同工酶、线粒体16S rDNA序列多样性进行过研究^[2-3],国外也曾对部分海参的核糖体18S rDNA和线粒体COI及16S rDNA部分序列多样性进行过研究^[4-5]。针对国外重要海参资源陆续引入中国的现状,本研究采集了10种国内外具有重要经济价值的海参,PCR扩增其线粒体16S rDNA的部分序列,根据序列多样性对其亲缘关系进行分析,同时结合GenBank中相关海参资源的相应序列对这些海参间的进化关系进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究采集的10种海参分属于刺参科、海参科和瓜参科,其中刺参科和海参科分别有4个种,瓜参科有2个种,所用海参均为海参干品,10种海参基本信息见表1。

收稿日期: 2008 01 16; 修订日期: 2008 04 20.

基金项目: 中国海洋大学教育部海水养殖重点实验室开放课题.

作者简介: 费来华(1980-),男,硕士在读,研究方向为水产遗传育种学. E-mail: feilaihua@163.com

通讯作者: 李赞,教授. Tel: 0532-82032649; E-mail: sxsdlwl@ouc.edu.cn

表 1 本实验 10 种海参基本信息
Tab.1 List of 10 sea cucumbers for 16S rDNA amplification in this study

名称及分类 Name & Taxon	缩写 Abbreviation	采集地 Locality	体长 × 体高 Body length × body height
刺参科 Stichopodidae			
仿刺参 <i>Apostichopus japonicus</i>	Ap.jap	中国大连 Dalian in China	6.0 cm × 1.5 cm
加州拟刺参 <i>Parastichopus californicus</i>	Pa.cal	加拿大 Canada	7.0 cm × 1.0 cm
挪威拟刺参 <i>Parastichopus tremulus</i>	Pa.tre	挪威 Norway	7.5 cm × 1.3 cm
具疣拟刺参 <i>Parastichopus parvimensis</i>	Pa.par	美国 USA	5.5 cm × 1.6 cm
海参科 Holothuriidae			
墨西哥海参 <i>Holothuria mexicana</i>	H.mexi	墨西哥 Mexico	11.3 cm × 2.0 cm
黑乳海参 <i>Holothuria nobilis</i>	H.nobi	澳大利亚 Australia	11.5 cm × 2.2 cm
黄乳海参 <i>Holothuria fuscogilva</i>	H.fusc	澳大利亚 Australia	11.6 cm × 1.8 cm
糙海参 <i>Holothuria scabra</i>	H.scab	澳大利亚 Australia	14.0 cm × 2.6 cm
瓜参科 Cucumariidae			
智利瓜参 <i>Athyonidium chilensis</i>	At.chi	智利 Chile	6.5 cm × 1.5 cm
大西洋瓜参 <i>Cucumaria frondosa</i>	C.fron	冰岛 Iceland	5.5 cm × 1.4 cm

注: 种名缩写通用于本文。

Note: the abbreviations for species are identically used in the full paper.

1.2 线粒体DNA的提取、扩增、测序

参照单懿等^[3]和 Arndt 等^[4]的方法提取海参线粒体 DNA(mt DNA)。具体操作为: 称取 0.1 g 海参内层体壁, 洗净吸干后放入 600 μL 裂解液 (50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5; 50 mmol/L EDTA pH 8.0; 0.4% SDS; 20 mg/mL 蛋白酶 K 6 μL) 50 °C 恒温箱过夜。随后加入等体积 Tris 饱和酚混合 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上层水相。Tris 饱和酚多次抽提至有机相和水相交界面清晰, 收集水相, 加入等体积氯仿-异戊醇 (氯仿:异戊醇=24:1), 轻摇 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 上清液加入等体积的 CTAB 缓冲液 (1 mmol/L NaCl, 2% CTAB), 65 °C 水浴 45 min, 氯仿-异戊醇抽提至有机相和水相交界面清晰。收集上层水相, 加等体积异丙醇混匀, 12 000 r/min 离心 20 min, 弃上清, 沉淀用 70% 乙醇清洗 2 次, 空气干燥, 100 μL TE 缓冲液溶解, -20 °C 保存备用。

用于海参线粒体 16S rDNA PCR 扩增的引物为无脊椎动物通用引物^[6], 即: 16Sar 5'-CGCCT GTTTAACAAAAACAT-3', 16Sbr 5'-CCGGTCT-GAACTCAGATCATG-3', 经上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

PCR 反应体系总体积为 25 μL, 含 100 ng 模板 DNA, 0.1 μmol/L 引物, 0.2 mmol/L dNTPs, 1 × PCR 反应缓冲液, 1 U *Taq* DNA 聚合酶, Milli-Q H₂O 补足体积。PCR 反应条件为: 预变性 94 °C 3 min; 然后 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 1 min, 进

行 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 经回收试剂盒纯化后送上海生工生物工程技术服务有限公司用扩增引物进行双向测序。

1.3 数据分析

测序序列用 DNASTAR 和 Clustal X 软件进行序列拼接和比对, 人工校正之后用 DNASP 4.0 软件计算多态位点、单态位点和插入缺失等位点数, MEGA 4.0 软件分析碱基组成和遗传距离。

为了分析实验所用 10 种海参和其他楯手目、枝手目海参的同源性和系统发生关系, 本研究从 GenBank 选取了海参科 (Holothuriidae)、刺参科 (Stichopodidae)、瓜参科 (Cucumariidae) 中的 15 种海参的 16S rDNA 序列, 用于构建系统进化树, 以光棘球海胆 (*Strongylocentrotus nudus*) 作为外类群 (表 2)。进化树的构建采用 MEGA 4.0、PAUP* 4.0 软件进行, 自展检验 1 000 次。

2 结果与分析

从 10 种海参扩增的 DNA 片段大小在 600 bp 左右, 经比对及剪切, 10 种海参联配序列的碱基长度在 520~561 bp 之间, 平均长度为 544 bp。本研究扩增了 10 个海参种的 16S rDNA 序列, 其中仿刺参、加州拟刺参、黑乳海参、糙海参、大西洋瓜参 5 个种在 GenBank 已有记录, 相似性比较发现, 本研究扩增的这 5 个海参种的 16S rDNA 部分序列与 GenBank 中的相应序列相似性均在 99% 以上。

表 2 源自 GenBank 中的 16 种海参和海胆的基本信息
Tab.2 List of sea cucumbers and sea urchin from GenBank

名称及分类 Name & Taxon	缩写 Abbreviation	登陆号 Access No	作者 Author
海参纲 Holothuroidea			
刺参科 Stichopodidae			
仿刺参 <i>Apostichopus japonicus</i>	Ap.jap1	AY852279	李颖, 2005
加州拟刺参 <i>Parastichopus californicus</i>	Pa.cal1	DQ777096	Janies D A, 2007
绿刺参 <i>Stichopus chloronotus</i>	Sti.ch	AY338422	Kerr A M, 2006
<i>Isostichopus macroparentheses</i>	I.macr	AY338415	Kerr A M, 2006
海参科 Holothuriidae			
白底辐肛参 <i>Actinopyga mauritiana</i>	Ac.mau	AY338414	Kerr A M, 2006
蛇目白尼参 <i>Bohadschia argus</i>	B.argu	AY338416	Kerr A M, 2006
图纹白尼参 <i>Bohadschia marmorata</i>	B.marm	AY338417	Kerr A M, 2006
黑乳海参 <i>Holothuria nobilis</i>	H.nobi1	AY509147	Uthicke S, 2004
糙海参 <i>Holothuria scabra</i>	H.scab1	AY509136	Uthicke S, 2004
糙海参 <i>Holothuria scabra</i>	H.scab2	AY509138	Uthicke S, 2004
红腹海参 <i>Holothuria edulis</i>	H.edul	EU220810	O'Loughlin M, 2007
黑海参 <i>Holothuria atra</i>	H.atra	EU220799	O Loughlin M, 2007
玉足海参 <i>Holothuria leucospilota</i>	H.leuc	AY338419	Kerr A M, 2006
格皮氏海参 <i>Pearsonothuria graeffei</i>	Pe.gra	AY338421	Kerr A M, 2006
<i>Holothuria excellens</i>	H.exce	AY338418	Kerr A M, 2006
瓜参科 Cucumariidae			
大西洋瓜参 <i>Cucumaria frondosa</i>	C.fron1	U15598	Medeiros Bergen D, 2002
海胆纲 Echinoidea			
球海胆科 Strongylocentrotidae			
光棘球海胆 <i>Strongylocentrotus nudus</i>	Str.nu	AB154277	Oohara I, 2004

注: 种名缩写通用于本文; 缩写后的数字表示不同的单倍型。

Note: the abbreviations for species are identically used in the full paper; numbers following the abbreviations indicate different haplotypes.

2.1 海参16S rDNA部分序列的碱基组成比较

碱基组成分析 (图 1) 表明, 10 种海参扩增序列中 A 碱基均最为丰富, T 碱基含量在有些海参中较高, 有些则与 GC 碱基的含量相似, GC 碱基在 10 种海参的含量基本一致, 均较低。10 种海参 AT 含量均高于 GC。其中 AT 含量最高为智利瓜参, 达 62.5%; 最低为墨西哥海参, 为 53.0%。10 种海参

AT 含量平均为 57%。

从图 1 中可以看到, 不同科之间, 刺参科的 4 个种 AT 碱基均丰富, 而海参科的 4 个种只有 A 碱基最为丰富, T 碱基的含量则与 GC 碱基的含量相似。刺参科 AT 含量平均为 57.3%, 海参科 AT 含量平均为 54.7%, 而瓜参科 2 个种的 AT 含量平均值则在 60% 以上。

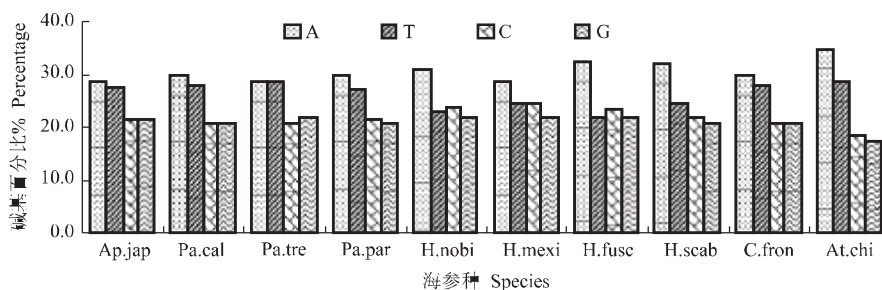


图 1 本实验 10 种海参 16S rDNA 部分序列碱基组成的比较分析
缩写种名见表 1。

Fig.1 Comparison on nucleotide composition of 16S rDNA from 10 sea cucumbers amplified in this study
Abbreviations of species are shown in table 1.

2.2 海参16S rDNA 碱基序列多样性分析

10 种海参的 16S rDNA 部分序列的比对结果表明 (图 2), 在比对的 566 个位点中, 单单位点

303 个, 插入或缺失位点 64 个, 多态位点 199 个, 其中简约信息位点 146 个。

Ap. jap	CAAAACATA	GCCCCACGAA	CTTCATATGT	GGGGTGCAGC	CTGCCAGTGG	GAATT-TATT	CTAAACGGCC	GCGGTATTIT	[80]
Pa. cal									[80]
Pa. tre									[80]
Pa. par									[80]
H. mexi									[80]
H. nobi									[80]
H. fusc									[80]
H. scab									[80]
At. chi									[80]
C. fron									[80]
Ap. jap	GACCGTGCAA	AGGTAGCATA	ATCACTTGTC	TCTTAATGG	GGACCTGTAT	GAATGGCTTT	TCACCTCTTC	ACTGCTCTC	[160]
Pa. cal									[160]
Pa. tre									[160]
Pa. par									[160]
H. mexi									[160]
H. nobi									[160]
H. fusc									[160]
H. scab									[160]
At. chi									[160]
C. fron									[160]
Ap. jap	TTCCCTCC-	TCCTAATCTT	CTAATCAGT	GAAGAAGCGT	GACCAATAA	GAMGACGAG	AMGACCTGT	CGAGCTTAA	[240]
Pa. cal									[240]
Pa. tre									[240]
Pa. par									[240]
H. mexi									[240]
H. nobi									[240]
H. fusc									[240]
H. scab									[240]
At. chi									[240]
C. fron									[240]
Ap. jap	G-TAAACCTG	AAATGTGTC	TACCTTTT-	TTCTTAGAAA	GAGGTAA-	TTTCAGAT	AAAGTTTGG	TTGGGCAAC	[320]
Pa. cal									[320]
Pa. tre									[320]
Pa. par									[320]
H. mexi									[320]
H. nobi									[320]
H. fusc									[320]
H. scab									[320]
At. chi									[320]
C. fron									[320]
Ap. jap	CGTGGAGAA	AAGATCCTC	CAGTT-AGTT	AGGAAGAAA	CCT-IT	CACTGAAAA	A-TTACGGA	CCGAGTACT	[400]
Pa. cal									[400]
Pa. tre									[400]
Pa. par									[400]
H. mexi									[400]
H. nobi									[400]
H. fusc									[400]
H. scab									[400]
At. chi									[400]
C. fron									[400]
Ap. jap	CTGGTAAACG	GAATAAGTAA	CCGACGGGAT	AACAGGGTAA	TCTTCTCTAA	GAGCCATAT	TGAGAGAG	GATTGCGACC	[480]
Pa. cal									[480]
Pa. tre									[480]
Pa. par									[480]
H. mexi									[480]
H. nobi									[480]
H. fusc									[480]
H. scab									[480]
At. chi									[480]
C. fron									[480]
Ap. jap	TCGATGTGG	ATGGGGTAA	CCAAAGGGTG	TAGCAGCTCT	TTAAGGTTGG	ACTGTGCTC	CATTAACTCC	CTACATGATC	[560]
Pa. cal									[560]
Pa. tre									[560]
Pa. par									[560]
H. mexi									[560]
H. nobi									[560]
H. fusc									[560]
H. scab									[560]
At. chi									[560]
C. fron									[560]
Ap. jap	TGATTTC	[566]							[566]
Pa. cal		[566]							[566]
Pa. tre		[566]							[566]
Pa. par		[566]							[566]
H. mexi		[566]							[566]
H. nobi		[566]							[566]
H. fusc		[566]							[566]
H. scab		[566]							[566]
At. chi		[566]							[566]
C. fron		[566]							[566]

图2 本实验 10 种海参 16S rDNA 部分序列的比对分析

注: “-”表示插入或缺失; “.”表示相同的碱基. 缩写种名见表 1.

Fig.2 Comparison of partial sequence of 16S rDNA from 10 sea cucumber species amplified in this study

Note: “-” represents in/del nucleotide; “.” represents identical nucleotide. Abbreviations of species are shown in table 1.

从 10 种海参扩增序列碱基比对结果可以看出 (表 3), 不同海参种间发生碱基转换和颠换的位点数明显不同。在黑乳海参和智利海参之间发生碱基转换变异位点数目最高, 为 69 个, 最低的是加州拟刺参和具疣拟刺参之间, 仅有 3 个。碱基颠换变异位点数最高的在加州拟刺参和黄乳海参之间, 达 79 次, 最低的也是在加州拟刺参和具疣拟刺参之间, 仅有 1 个。10 种海参发生碱基转换和颠换的位点数平均为 50.7 和 56.8 个, 两类碱基变异发生的频率相似。

刺参科内发生碱基转换和颠换的位点数平均为 21.8 个和 23.3 个; 海参科内平均为 48.3 个和 34.8 个; 瓜参科 2 个种间发生转换和颠换的位点数

分别是 51 个和 62 个。结果显示, 海参科 4 个种发生碱基转换变异的位点数远高于颠换变异。

对 10 种海参 16S rDNA 部分序列发生插入或缺失变异位点数进行类似的比对分析。结果表明 (表 4), 10 种海参发生插入或缺失变异的位点数最高的是墨西哥海参和智利瓜参间, 有 49 个, 而加州拟刺参和具疣拟刺参 2 个海参种间未发生插入或缺失变异。10 种海参彼此间发生插入或缺失的位点数平均为 22.8 个。科内种间发生插入或缺失的位点数, 刺参科平均为 5.3 个, 海参科为 26 个, 瓜参科 2 个种间发生插入或缺失的位点数是 6 个。海参科内发生插入或缺失的位点数远高于刺参科。

表 3 本实验 10 种海参 16S rDNA 部分序列碱基转换及颠换位点数比较

Tab.3 Comparison of transition/transversion sites in 16S rDNA of 10 sea cucumbers amplified in this study

种名 Species	Ap.jap	Pa.cal	Pa.tre	Pa.par	H.mexi	H.nobi	H.fusc	H.scab	At.chi	C.fron
Ap.jap		5	43	4	70	74	77	70	65	67
Pa.cal	8		44	1	76	73	79	73	68	72
Pa.tre	41	35		43	64	64	71	67	63	68
Pa.par	7	3	37		75	72	78	72	67	71
H.mexi	58	56	59	56		29	45	24	60	49
H.nobi	59	55	63	55	46		43	27	67	54
H.fusc	61	60	58	59	55	46		38	66	52
H.scab	44	42	46	42	42	47	54		56	48
At.chi	66	62	62	62	67	69	68	61		62
C.fron	53	51	47	51	54	54	58	53	51	

注: 对角线以下为转换位点; 对角线以上为颠换位点; 缩写种名见表 1。

Note: Number of transition sites under the diagonal line; number of transversion sites above the diagonal line; abbreviations of species are shown in table 1.

表 4 本实验 10 种海参 16S rDNA 部分序列有效位点数及插入 / 缺失位点数比较

Tab.4 Comparison of valid sites and in/del sites in 16S rDNA of 10 sea cucumbers amplified in this study

种名 Species	Ap.jap	Pa.cal	Pa.tre	Pa.par	H.mexi	H.nobi	H.fusc	H.scab	At.chi	C.fron
Ap.jap		2	8	2	32	16	18	36	19	21
Pa.cal	550		10	0	30	14	16	38	17	19
Pa.tre	543	543		10	36	22	24	38	23	27
P.par	550	552	543		30	14	16	38	17	19
H.mexi	525	527	520	527		38	36	26	49	33
H.nobi	540	542	534	542	527		10	34	21	25
H.fusc	539	541	533	541	528	541		6	41	19
H.scab	517	517	513	517	520	516	517		45	27
At.chi	546	548	541	548	529	543	542	518		6
C.fron	534	536	528	536	526	530	532	516	536	

注: 对角线以下为有效位点数, 对角线以上为插入 / 缺失位点数; 缩写种名见表 1。

Note: Number of valid sites under the diagonal line; number of in/del sites above the diagonal line; abbreviations of species are shown in table 1.

2.3 不同海参种间的遗传距离比较

为比较本研究 10 种海参与其他海参间的遗传距离及进化关系,从 GenBank 中检索到 16 个海参的 16S rDNA 部分序列共 26 个海参材料,其中刺参科有 6 个种、海参科有 12 个种、瓜参科有 2 个种共 20 个种。

从遗传距离分析结果可以看到,有 2 条以上登录序列的海参,其序列间遗传距离最近,如糙海参的 3 条序列、加州拟刺参的 2 条序列、大西洋瓜参的 2 条序列遗传距离均为 0。仿刺参和黑乳海参的 2 条序列遗传距离也仅为 0.002 和 0.046,远低于不同种间的遗传距离。这一结果说明,16S rDNA 的遗传稳定性相当高。

对 20 个海参种间遗传距离的比较发现,不同海参种间遗传距离差别很大(表 5)。遗传距离最小的如加州拟刺参和具疣拟刺参,仅 0.005,与 2 个仿刺参科个体间(0.002)的差异相当。仿刺参与加州拟刺参和具疣拟刺参的遗传距离,均不大于 0.025。海参科内蛇目白尼参和图纹白尼参间的遗传距离也只有 0.075。其余不同种间的遗传距离均在 0.1 以上,如仿刺参与图纹白尼参和格皮氏海参间的遗传距离分别为 0.407 和 0.405,智利瓜参与图纹白尼参的遗传距离也达 0.403。

刺参科与海参科间不同海参种的遗传距离比较表明,不同科的海参种间的遗传距离虽然普遍高于科内海参种间的遗传距离,但是也同时存在科内不同种间的遗传距离高于不同科种间遗传距离的现象。如海参科的图纹白尼参、蛇目白尼参、白底辐肛参、格皮氏海参与海参科内其他海参的遗传距离最大的为 0.298;而海参科与刺参科间不同海参种间的遗传距离最小的仅为 0.244。

2.4 不同海参种间的进化关系分析

以海胆纲光棘球海胆为外类群,采用 MEGA4.0 和 PAUP*4.0 软件分别构建 20 种海参的系统进化树。结果表明,采用 4 种不同方法构建的系统树的拓扑结构基本一致(图 3-6)。海参科的 12 个种聚为一个分支,刺参科的 6 个种则聚为一支;瓜参科的 2 个种聚为一独立的分支,与刺参科优先聚为一群,再与海参科相聚,结果显示,瓜参科的 2 个种与刺参科亲缘关系较近。

在科内,4 种方法构建的系统树比较一致地表明:(1)拟刺参属的加州拟刺参和具疣拟刺参优先聚支,再与仿刺参属的仿刺参相聚,随后再与拟刺

参属的挪威拟刺参并支,刺参属和等刺参属与仿刺参属和拟刺参属的亲缘关系远近相仿。(2)海参科单支中,海参属的墨西哥海参与红腹海参亲缘关系最近,黑海参与之;白尼参属的图纹白尼参和蛇目白尼参亲缘关系最近,随后与格皮氏海参相聚,海参科其他种的亲缘关系则基本相近。

从 4 个进化树中还可以看到,有关海参科墨西哥海参、红腹海参和黑海参与海参科其他的海参亲缘关系在不同进化树中则有所不同。如在 MEGA 4.0 构建的 MP 树中,玉足海参与这 3 种海参的亲缘关系最近,优先聚为一群,其他海参种的亲缘关系则基本相近;NJ 树的结果与此相似;而 UPMGA 树中 3 种海参优先与糙海参聚为一群。PAUP*4.0 软件构建的 ML 树中,3 种海参与其他海参种的亲缘关系均相似。

3 讨论

mt DNA 结构简单,在细胞中含量丰富,包含蛋白质、核糖体 RNA、转移 RNA 等编码基因以及非编码控制区,具有一定的遗传自主性,表现为母性遗传特征,这些功能区段是开展遗传进化研究的重要标记^[7-8]。其中,核糖体 RNA 基因进化速度最慢,常用于种或种以上水平的检测,16S rDNA 序列常被用于水产动物如扇贝^[9]、鲍^[10]、对虾^[11]等的遗传进化研究。如 Arndt 等^[4]采用 mtDNA 的 16S rDNA 和 CO I 片段对瓜参科的科、属系统水平发生的研究表明,16S rDNA 片段相较 COI 更为适用。Kerr 等^[12]同样选用了 16S rDNA 来对海参科内 5 个属之间的亲缘关系进行研究。本研究扩增了 10 个海参种的 16S rDNA 部分序列(其中挪威拟刺参、具疣拟刺参、墨西哥海参、黄乳海参和智利瓜参 5 个种尚未见相关报道)。结果表明,本研究扩增的线粒体 16S rDNA 序列在不同科属间具有明显的差异,是研究科属间亲缘关系的适宜序列。

Kerr 等^[12]分析了海参科 8 个种及刺参科 2 个种的 16S rDNA 部分序列。Arndt 等^[4]对瓜参科 6 个种及刺参科 3 个种的 16S rDNA 部分序列进行过分析,还对东太平洋的 15 种海参线粒体的 COI 和核糖体大亚单位部分序列进行过比较。李颖等^[6]同时比较了仿刺参 3 个地理种群线粒体 16S rDNA、CO I 和 IrDNA-CO I 3 个基因部分序列的碱基组成。这些研究结果一致表明,像其他无脊椎动物 mt-DNA 碱基组成一样,海参 mt DNA 富含 AT 碱基。

表 5 基于 Kimura 双参数模型的 20 种海参遗传距离
Tab.5 Genetic distance between 20 sea cucumbers based on Kimura-2 model

种名缩写 Abbreviation	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)	(18)	(19)	(20)	(21)	(22)	(23)	(24)	(25)	(26)
(1) Ap.jap																										
(2) Ap.jal	0.002																									
(3) Pa.cal	0.025	0.022																								
(4) Pa.call	0.025	0.022	0.000																							
(5) Pa.tre	0.203	0.200	0.187	0.187																						
(6) Pa.par	0.025	0.022	0.005	0.005	0.193																					
(7) Lmaer	0.239	0.235	0.228	0.228	0.207	0.235																				
(8) Sti.ch	0.249	0.249	0.237	0.237	0.207	0.241	0.219																			
(9) Hmexi	0.340	0.335	0.337	0.337	0.323	0.337	0.347	0.361																		
(10) Hnobi	0.350	0.350	0.343	0.343	0.362	0.343	0.353	0.331	0.187																	
(11) Hnobi1	0.367	0.367	0.372	0.372	0.384	0.372	0.353	0.335	0.189	0.046																
(12) Hfuse	0.386	0.381	0.379	0.379	0.338	0.379	0.354	0.341	0.238	0.190	0.214															
(13) Hscab	0.281	0.277	0.279	0.279	0.264	0.279	0.314	0.244	0.173	0.188	0.191	0.215														
(14) Hscab1	0.284	0.280	0.282	0.282	0.267	0.282	0.317	0.247	0.176	0.191	0.194	0.218	0.000													
(15) Hscab2	0.284	0.280	0.282	0.282	0.267	0.282	0.317	0.247	0.176	0.191	0.194	0.218	0.000	0.000												
(16) Hleuc	0.331	0.326	0.332	0.332	0.303	0.332	0.320	0.311	0.185	0.199	0.217	0.261	0.217	0.220	0.220											
(17) Hedul	0.318	0.313	0.326	0.326	0.313	0.326	0.314	0.335	0.125	0.183	0.181	0.241	0.163	0.162	0.198											
(18) Hatra	0.371	0.366	0.363	0.363	0.322	0.363	0.357	0.311	0.154	0.177	0.175	0.231	0.167	0.166	0.185	0.145										
(19) Hexee	0.368	0.364	0.353	0.353	0.337	0.353	0.381	0.374	0.274	0.246	0.274	0.249	0.274	0.273	0.305	0.258	0.286									
(20) Ac.mau	0.346	0.342	0.354	0.354	0.332	0.354	0.368	0.353	0.278	0.264	0.266	0.287	0.248	0.248	0.272	0.250	0.294	0.316								
(21) B.argu	0.407	0.407	0.399	0.399	0.397	0.399	0.348	0.385	0.277	0.243	0.262	0.248	0.257	0.260	0.270	0.298	0.255	0.266	0.269							
(22) B.mar	0.367	0.367	0.381	0.381	0.390	0.381	0.351	0.371	0.249	0.245	0.236	0.250	0.236	0.239	0.260	0.277	0.257	0.292	0.255	0.075						
(23) Pe.gra	0.405	0.400	0.398	0.398	0.356	0.398	0.371	0.379	0.275	0.299	0.305	0.310	0.259	0.258	0.262	0.286	0.274	0.287	0.302	0.238						
(24) C.fron	0.297	0.293	0.310	0.310	0.321	0.306	0.276	0.310	0.328	0.351	0.339	0.347	0.272	0.275	0.294	0.311	0.322	0.360	0.335	0.396	0.377	0.378				
(25) C.fron1	0.297	0.293	0.310	0.310	0.321	0.306	0.276	0.310	0.328	0.351	0.339	0.347	0.272	0.275	0.294	0.311	0.322	0.360	0.335	0.396	0.377	0.378	0.000			
(26) At.chi	0.265	0.268	0.266	0.266	0.294	0.262	0.271	0.248	0.349	0.369	0.378	0.380	0.310	0.313	0.330	0.356	0.319	0.390	0.361	0.403	0.398	0.381	0.208	0.208		

注: 对角线以下为 20 种海参的遗传距离; 缩写种名见表 1.2.

Note: Genetic distance between 20 sea cucumbers under the diagonal line; abbreviations of species are shown in table 1 and 2.

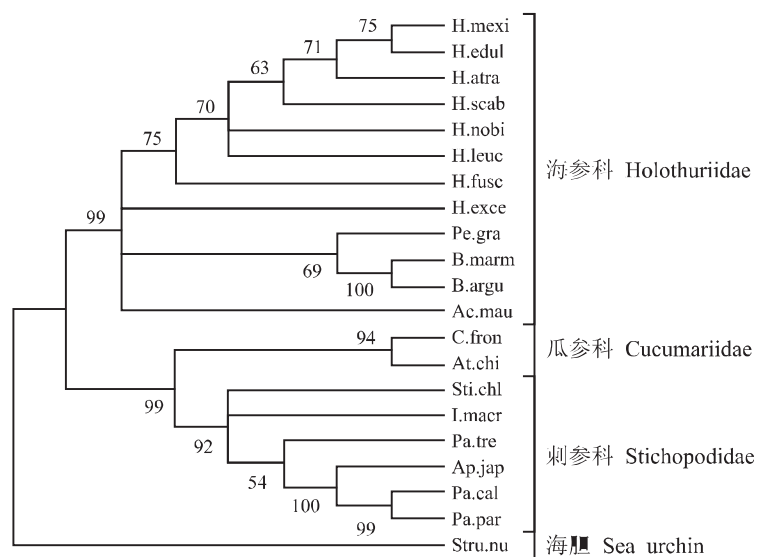


图3 利用UPMGA法建立的聚类图

节点上的数字为1 000次重复大于50%的自展值. 缩写种名见表1、2.

Fig.3 Cluster dendrogram based on UPMGA method

Numbers on the nodes represent percentage of 1 000 bootstrap replications above 50%. Abbreviations of species are shown in table 1 and 2.

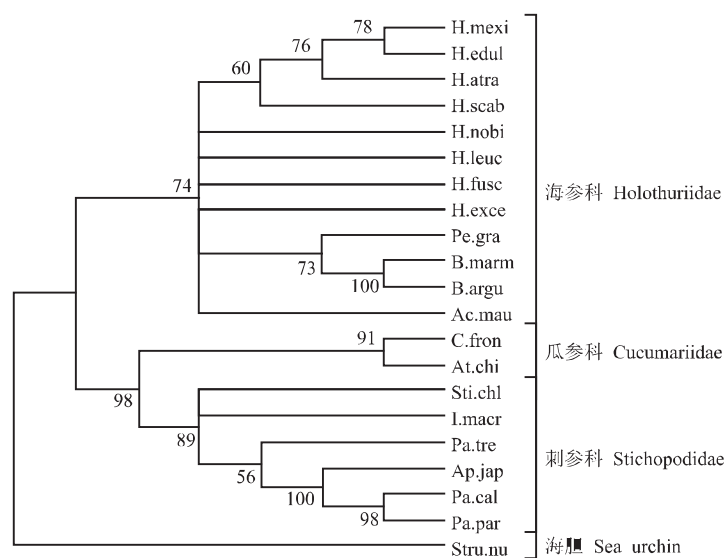


图4 利用NJ法建立的聚类图

节点上的数字为1 000次重复大于50%的自展值. 缩写种名见表1、2.

Fig.4 Cluster dendrogram based on N-J method

Numbers on the node represent percentage of 1 000 bootstrap replications above 50%. Abbreviations of species are shown in table 1 and 2.

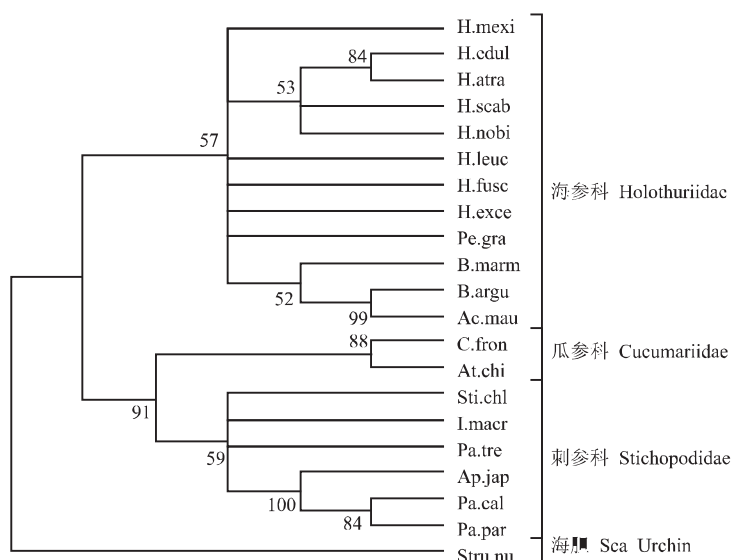


图5 利用 MP 法建立的聚类图

节点上的数字为 1 000 次重复大于 50% 的自展值. 缩写种名见表 1、2.

Fig.5 Cluster dendrogram based on MP method

Numbers on the node represent percentage of 1 000 bootstrap replications above 50%. Abbreviations of species are shown in table 1 and 2.

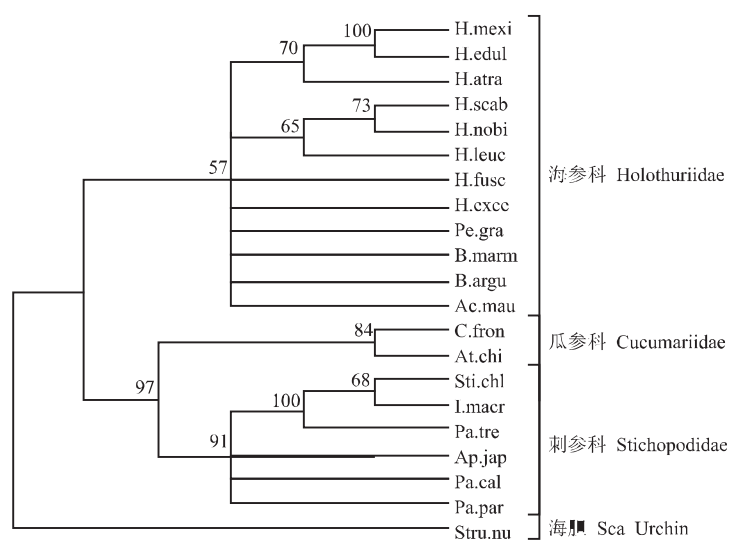


图6 利用 ML 法建立的聚类图

节点上的数字为 1 000 次重复大于 50% 的自展值. 缩写种名见表 1、2.

Fig.6 Cluster dendrogram based on ML method

Numbers on the node represent percentage of 1 000 bootstrap replications above 50%. Abbreviations of species are shown in table 1 and 2.

本研究的结果与此相似,10种海参A+T含量平均为57.0%。同时本研究还发现,不同科间海参线粒体16S rDNA碱基组成稍有不同,如海参科A碱基最为丰富,T碱基则与GC碱基相差不大,而刺参科AT碱基均为丰度最高的碱基。

对10种海参16S rDNA部分序列进行比对发现,海参科内,变异位点总数及不同变异类型的位点数明显不同,如刺参科发生碱基转换和颠换的位点数分别是21.8个和23.3个,发生插入或缺失变异的位点数仅有5.3个;海参科发生碱基转换和颠换的位点数则分别为48.3个和34.8个,插入或缺失位点数则高达26个,海参科发生变异的频率远高于刺参科。

比较10种海参与其他海参间的遗传距离及亲缘关系发现,仿刺参属的仿刺参与拟刺参属的加州拟刺参和具疣拟刺参亲缘关系较近,这与李颖等^[6]利用线粒体CO I序列和16S rDNA序列所获得结果相一致。但是本研究同时还发现,拟刺参属的挪威拟刺参却与同样属于拟刺参属的加州拟刺参和具疣拟刺参亲缘关系较远。有关挪威拟刺参与其他海参亲缘关系的研究目前还不多。Lacey等^[5]利用18S rDNA序列研究发现红腹海参与黑海参的亲缘关系较近,但未涉及墨西哥海参。本研究结果表明,墨西哥海参与红腹海参亲缘关系最近,与黑海参的亲缘关系次之。

Kerr等^[13]通过将外部形态、石灰环、骨片、水管系统等47个形态特征作为数值分类的目标值对海参25个科的代表种进行了研究。结果表明,在47个形态特征中,刺参科与海参科仅有1处形态特征差异,即是否具有发达的背疣足。瓜参科与海参科和刺参科分别有16和17处形态特征差异,说明刺参科与海参科亲缘关系较近。Pawson等^[14]利用形态学所做的研究结果与此相似。Lacey等^[5]对16种海参18S rDNA进行分析所获得结论却与此不同^[5]。本研究对分别属于刺参科、海参科和瓜参科的20种海参间的遗传距离和系统树的分析发现,3个科分别聚为独立的一支,其中同属于枝手目的瓜参科似乎与刺参科的亲缘关系较近。由于本研究用于分析的瓜参科海参种的数目太少,还有待收集更多的瓜参科海参16S rDNA序列信息做进一步的研究。

在本研究所扩增的10个海参中,已有研究对其中的5个海参进行过类似的扩增分析。本研究

所获得的序列与前人研究结果相似,同时首次对这5个海参种的16S rDNA进行了比对,并对这5种海参与其他海参的亲缘关系进行了分析。值得注意的是,中国北方具有重要经济价值的仿刺参与加州拟刺参和具疣拟刺参亲缘关系较近,而后2种海参,尤其是加州拟刺参,为北美洲美国及加拿大的地方种,如能将这2种海参引入中国,有可能对丰富中国养殖海参种类起到积极的作用。

参考文献:

- [1] Smiley S, Harrison F W, Chia F S. Microscopic anatomy of invertebrates: Echinodermata [M]. New York: Wiley-Liss Press, 1994: 401-471.
- [2] 高悦勉,孙静波. 刺参种群同工酶的生化遗传分析 [J]. 大连水产学院学报, 2004, 19(1): 30-34.
- [3] 单懿,薛长湖,李兆杰. 干海参线粒体的提取与纯化研究 [J]. 食品科学, 2005, 26(10): 111-112.
- [4] Arndt A, Marquez C, Lambert P, et al. Molecular phylogeny of eastern pacific sea cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea) based on mitochondrial DNA sequence [J]. Mol Phylogen Evol, 1996, 6(3): 425-437.
- [5] Lacey K M J, McCormack G P, Powell R, et al. Phylogenetic relationships within the class Holothuroidea inferred from 18S rRNA gene data [J]. Mar Biol, 2005, 147: 1 149-1 154.
- [6] 李颖,刘萍,孙慧玲,等. 仿刺参 (*Apostichopus japonicus*) mtDNA 三个基因片段的序列分析 [J]. 海洋与湖沼, 2006, 37(2): 143-153.
- [7] 牛屹东,李明,魏辅文,等. 线粒体DNA用作分子标记的可靠性和研究前景 [J]. 遗传, 2001, 23(6): 593-598.
- [8] Saccone S, Giorgi C D, Gissi C, et al. Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system [J]. Gene, 1999, 238: 195-209.
- [9] 孔晓瑜,刘亚军,喻子牛,等. 栉孔扇贝和海湾扇贝线粒体DNA 16S rRNA 基因片段序列研究 [C]// 贝类学论文集. 北京: 海洋出版社, 2001: 59-63.
- [10] 杨建敏,郑小东,王如才,等. 3种鲍16S rRNA 基因片段序列的初步研究 [J]. 青岛海洋大学学报, 2003, 33(1): 36-40.
- [11] 高天翔,李健,王清印,等. 中国对虾线粒体16S rRNA 基因序列分析 [J]. 中国水产科学, 2003, 10(5): 359-364.
- [12] Kerr A M, Janies D A, Clouse R M, et al. Molecular phylogeny of coral-reef sea cucumbers (Holothuriidae: Aspidochirotrida) based on 16S mitochondrial ribosomal DNA sequence [J]. Mar

- Biotechnol, 2005, 7: 53–56.
- [13] Kerr A M, Kim J. Phylogeny of Holothuroidea (Echinodermata) inferred from morphology[J]. Zool J Linn Soc, 2001, 133: 63–81.
- [14] Pawson D L, Fell H B. A revised classification of the dendrochirote holothurians[J]. Breviora, 1965, 214: 1–7.

16S rDNA sequence diversity and phylogenetic relationship of ten sea cucumbers

FEI Lai-hua¹, LI Yun¹, CHEN Jia-xin²

(1. Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: Holothurian is one kind of invertebrates in the sea, which includes more than 1 400 species, distributing from shallow water to ocean benthal. One hundred and thirty four species of sea cucumbers from China were identified, which mainly distribute in tropic sea areas south of Hainan Island. The sea cucumber species from temperate sea area are few, among which *A. japonicus* is the one with the highest economic value. *A. japonicus* distributes in sea areas north of Lianyungang in Jiangsu province, China and has become increasingly popular from 1990s because of its medicinal effect to cancer and unique trophic value. In order to effectively enrich resources of cultured sea cucumber and improve domestic sea cucumber quality, it is essential that Holothurian resource abroad should be introduced, and that the attributes of the exotic sea cucumbers including genetic background, biochemical components, physiological and ecological characteristics should be analyzed.

As to the genetic diversity of Holothurian, the sequences including mitochondrial 16S rDNA and COI and eukaryotic ribosomal 18S rDNA were amplified and the sequence diversity was analyzed by many researchers, which indicated that the rDNA sequence diversity exists among different Holothurian species. In allusion to a mass of introduction of important Holothurian resources from abroad, 10 species of domestic and overseas sea cucumbers were collected and 16S mitochondrial rDNA sequences from them were amplified and sequenced, and the molecular phylogeny of the 10 species of sea cucumbers were presented. Consequently, the aligned sequences with length of over 566 bp were obtained. the nucleotide composition, invariable/variable sites, insert/deletion (in/del) sites were calculated by DNAsp 4.0 package. The kimura-two-parameter genetic distance was calculated by MEGA 4.0 package. The results indicate that AT content is rich in the 10 species of sea cucumbers, and the mean content of A+T was 57.0%, which is similar to that of other invertebrates. A great diversity of the number of transition/transversion and in/del sites among the 10 species of sea cucumbers were observed, and their genetic distance ranges from 0.007 to 0.316. The cluster dendrograms of the 10 collected sea cucumbers and 10 sea cucumbers from GenBank data based on 16s rDNA analyses by means of four methods using MEGA4.0 package and PAUP*4.0 package reveal the evolutionary relationships: Stichopodidae was separated from Holothuriidae entirely, but two species from Cucumariidae are adjacent to the members of Stichopodidae. This analysis also strongly indicated that in Stichopodidae *A. japonicus* from china has close affinity with *Parastichopus californicus* and *P. parvimensis* from North America. On the other hand, *Pearsonothuria graeffei*, *Bohadschia argus* and *B. marmorata* belonging to family of Holothuriidae have close affinity, but the relationship between *Holothuria edulis* and *H. mexicana* is much closer. These findings of the study can be used for the management of sea cucumber resources, introduction of exotic species and genetic improvement of commercial species. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (5): 755–765]

Key words: sea cucumber ; 16S rDNA ; phylogeny

Corresponding author: LI Yun. E-mail: sxsdlwl@ouc.edu.cn