

DOI: 10.12264/JFSC2021-0238

龙虾科物种线粒体基因组特征和系统发育分析

朱雷宇^{1, 2, 3}, 朱志煌^{2, 3}, 朱陇强^{2, 3}, 林琪^{2, 3}

1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;
2. 福建省水产研究所, 福建 厦门 361013;
3. 福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室, 福建 厦门 361013

摘要: 综合分析了龙虾科(Palinuridae) 13个物种线粒体基因组的全序列, 发现其线粒体基因组的长度为15470~16105 bp, A+T含量为62.63%~67.11%。 K_a/K_s 分析表明, 龙虾科中的10个龙虾属(*Panulirus*)物种线粒体13个蛋白质编码基因(protein-coding genes, PCGs)的 $K_a/K_s < 1$, 显示出很强的纯化选择; 在差异位点的分析中, 发现 $nd5$ 、 $nd4$ 、 $rmlL$ 基因的差异位点比例较高, 是理想的分子标记, 可用于分析龙虾类不同群体之间的遗传多样性; 密码子偏好性分析表明, 被编码的氨基酸偏好性是相似的。同时, 本研究采用ML (maximum likelihood)和BI (Bayesian inference)方法构建系统发育树, 结果显示, 塔斯马尼亚龙虾属(*Sagmariasus*)物种最先开始分化, 而龙虾属单独聚为一支, 且与脊龙虾属(*Linuparus*)、游龙虾属(*Puerulus*)互为姊妹关系。贝叶斯分子钟估算结果显示, 龙虾科物种可能起源于三叠纪, 随后进一步分化为具有现代表征的龙虾种类。本研究旨在为快速鉴定龙虾科生物提供可靠的分子标记, 并为分析龙虾科物种遗传多样性提供理论依据。

关键词: 龙虾科; 线粒体基因组; 结构特征; 系统发育

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)04-0525-10

甲壳类动物在全球陆地和水生生境中发挥着重要的生态作用, 在全球渔业和水产养殖物种中占很大比例^[1]。龙虾科(Palinuridae)属于节肢动物门(Arthropoda)、软甲纲(Malacostraca)、十足目(Decapoda)、龙虾下目(Palinura)。目前该科包括11个属, 分别为龙虾属(*Panulirus*)、脊龙虾属(*Linuparus*)、游龙虾属(*Puerulus*)、岩龙虾属(*Jasus*)、真龙虾属(*Palinurus*)、长须龙虾属(*Justitia*)、钝龙虾属(*Palinustus*)、塔斯马尼亚龙虾属(*Sagmariasus*)、毛龙虾属(*Palinurellus*)、鳞龙虾属(*Nupalirus*)、原龙虾属(*Projasus*)^[2]。

龙虾科种类繁多, 形态多样, 在我国东南沿海均有分布^[2]。其肉味鲜美, 营养价值高, 是沿海经济价值较高的水产品之一^[3]。近年来, 针对龙虾

的养殖和生化特性的研究较为广泛^[4-8], 但在龙虾内部亲缘关系鉴定方面的研究仍存在分歧。随着基因组学的发展, 越来越多科研工作者开始进行线粒体基因组学(mitochondrial DNA, mtDNA)分析。mtDNA是核外遗传物质, 其结构简单, 具有母系遗传和进化速度快等特性^[9]。除了少数例外, 动物线粒体基因组编码的基因类型和数量都很保守^[10]。多细胞动物的mtDNA通常由一个闭合的环状双链组成, 分子长度在15~20 kb^[11]。mtDNA已被广泛用于研究不同分类水平的种群结构和系统发育关系^[12]。当前, 在GenBank数据库中检索到13种龙虾科物种的线粒体全基因组序, 而前人的分析多基于龙虾科物种的部分基因片段^[11-15], 本研究则较为系统地已有的13种龙虾科物种

收稿日期: 2021-05-18; 修订日期: 2021-06-23.

基金项目: 福建省海洋与渔业结构调整专项(2020HYJG01, 2020HYJG08).

作者简介: 朱雷宇(1998-), 男, 硕士研究生, 研究方向为虾类分子系统学. E-mail: zhuleiyu1998@163.com

通信作者: 林琪, 研究员, 研究方向为水产养殖. E-mail: xmqlin@sina.com

线粒体全基因组进行分析。

在本研究中,开展了对龙虾科基因的选择压力、分子标记和系统发育等的研究,构建了系统发育树探讨龙虾科各物种之间的系统发育关系,旨在为确定其属间系统发育关系提供依据。

1 材料与方法

1.1 数据的获取

从 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) 公共数据库中检索并获取 13 种龙虾科线粒体基

因组全序列,分别为绿色驮马龙虾(*Sagmariasus verreaux*)、眼斑龙虾(*Panulirus argus*)、日本龙虾(*Panulirus japonicus*)、天鹅龙虾(*Panulirus cygnus*)、杂色龙虾(*Panulirus versicolor*)、波纹龙虾(*Panulirus homarus*)、中国龙虾(*Panulirus stimpsoni*)、三角脊龙虾(*Linuparus trigonus*)、脊腹游龙虾(*Puerulus angulatus*)、密毛龙虾(*Panulirus penicillatus*)、长足龙虾(*Panulirus longipes*)、黄斑龙虾(*Panulirus polyphagus*)、锦绣龙虾(*Panulirus ornatus*), 基本信息见表 1。

表 1 龙虾科线粒体基因组的基本特征
Tab.1 Basic characteristics of mitogenome of Palinuridae

| 分类地位 classification status | 种名 species | GenBank 登录号 GenBank accession no. | 长度/bp length | AT 含量/% AT content |
|-------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|--------------|-----------------------|
| 塔斯马尼亚龙虾属 <i>Sagmariasus</i> | 绿色驮马龙虾 <i>Sagmariasus verreaux</i> | NC_022736 | 15 470 | 63.98 |
| 龙虾属 <i>Panulirus</i> | 眼斑龙虾 <i>Panulirus argus</i> | NC_039671 | 15 739 | 62.63 |
| | 日本龙虾 <i>Panulirus japonicus</i> | NC_004251 | 15 717 | 64.54 |
| | 天鹅龙虾 <i>Panulirus cygnus</i> | NC_028024 | 15 724 | 63.53 |
| | 杂色龙虾 <i>Panulirus versicolor</i> | NC_028627 | 15 767 | 66.83 |
| | 波纹龙虾 <i>Panulirus homarus</i> | NC_016015 | 15 665 | 67.11 |
| | 中国龙虾 <i>Panulirus stimpsoni</i> | NC_014339 | 15 677 | 65.64 |
| | 密毛龙虾 <i>Panulirus penicillatus</i> | NC_052750 | 15 671 | 65.93 |
| | 锦绣龙虾 <i>Panulirus ornatus</i> | NC_014854 | 16 105 | 66.71 |
| | 长足龙虾 <i>Panulirus longipes</i> | NC_052749 | 15 739 | 64.48 |
| | 黄斑龙虾 <i>Panulirus polyphagus</i> | MK503959 | 15 707 | 65.68 |
| | 脊龙虾属 <i>Linuparus</i> | 三角脊龙虾 <i>Linuparus trigonus</i> | NC_049031 | 15 949 |
| 游龙虾属 <i>Puerulus</i> | 脊腹游龙虾 <i>Puerulus angulatus</i> | NC_041155 | 15 688 | 65.79 |

1.2 选择压力分析

为了检验选择压力对于龙虾科(以龙虾属为代表)线粒体基因组的影响,采用 MEGA 5.0 软件^[16]将 13 个龙虾科物种进行单基因比对,然后采用 $K_aK_s_calculator$ 2.0^[17]软件计算其 13 PCGs 的非同义替换率(K_a)和同义替换率(K_s)。计算方法选择近似法中的 Yang-Nielsen 法(γ -MYN)^[18],遗传密码子选择无脊椎动物线粒体密码子。

1.3 差异位点分析

将龙虾科 13 个物种线粒体基因组基因进行差异位点分析。采用 MEGA 5.0 软件^[16]对 15 个基因(13 PCGs 和 2rRNAs)进行多重序列比对,然后通过 DnaSP 6^[19]分析了龙虾科线粒体基因组的基因差异位点。

1.4 遗传距离分析

将龙虾科 13 个物种的线粒体基因组 13 PCGs 的核苷酸序列分别串联,运用 MEGA 5.0 软件^[16]进行多重序列比对,并计算遗传距离(模型为 Kimura 双参数法)。

1.5 密码子使用模式分析

通过 MEGA 5.0 软件^[16]将龙虾科 13 个物种线粒体基因组的 13 PCGs 进行序列比对(剔除终止密码子)并计算密码子的偏好性。最后将其计算的结果统计绘制成柱状图。

1.6 系统发育分析

采用 MUSCLE 软件^[20]对龙虾科 13 个物种线粒体基因组 13 PCGs 序列进行串联比对,外类群加州美对虾(*Farfantepenaeus californiensis*)的线

粒体基因组 13 PCGs 序列也参与系统进化分析。比对后的序列通过 Gblocks^[21]在线系统进行校正。系统发育分析中, 根据 jModelTest 软件^[22]的评估结果, 选择 GTR+I+G 模型, 采用最大似然法(maximum likelihood, ML)和贝叶斯法(Bayesian inference, BI)来构建系统发育树。ML 进化树使用 PhyML 3.1 软件^[23]构建, 自展值(bootstraps)分析采用 1000 次重复抽样检验其分枝的可靠性(bootstrap probability, BP)。贝叶斯进化树使用 MrBayes v3.2.6 软件^[24]进行构建, 蒙特卡洛马尔科夫链(Markov Chain Monte Carlo, MCMC)运行世代数为 10000000, 4 条马尔科夫链(3 条热链和 1 条冷链)每 500 世代取样 1 次, 其中, 运算开始的前 25% 取样“burn in”去掉后, 剩下的取样将用于测算贝叶斯后验概率(posterior probability, PP)。

1.7 分歧时间估计

运用 BEAST v. 2.6.3 软件^[25]对 13 个龙虾科物种的 13 PCGs 串联序列进行分歧时间估算。通过选择 GTR+I+G 模型和 Yule 模型先验信息进行分析, 选择宽松分子钟模型(relaxed clock log normal)进行计算。校准节点选择脊龙虾属和游龙虾属的分化时间^[26-27]。进行马尔可夫分析的运行链长为

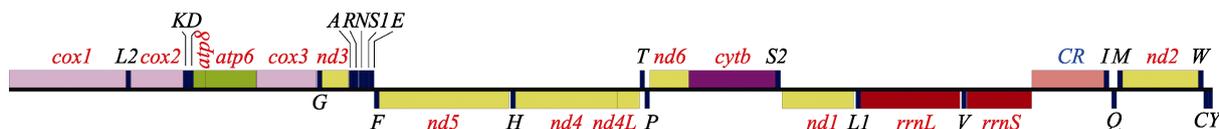


图 1 龙虾科线粒体基因组排列顺序

Fig. 1 Mitochondrial gene arrangement of Palinuridae

2.2 选择压力分析

在分析的龙虾属 10 个物种中, 13 PCGs 的 K_a/K_s 最低为 *cox1* 基因(平均值为 0.007), 其次是 *cytb*、*cox2*、*cox3*、*nd5* (平均值分别为 0.012、0.013、0.014、0.029)。说明在龙虾属中, 这些基因所承受的选择压力较高, 而 K_a/K_s 值最高的为 *atp8* 基因(平均值为 0.180), 其次为 *nd6*、*nd4l*、*nd2*、*nd1* (平均值分别为 0.096、0.085、0.071、0.055)。说明在龙虾属中, 这些基因所承受的选择压力比较小(图 2)。

同时, 在 13 PCGs 中, *atp8* 的 K_a/K_s 标准差最高(0.048), 其次是 *nd1*、*nd6*、*nd4l*、*nd2* (分别为

0.034、0.027、0.019、0.017)。说明龙虾属中, 这些基因有较大的种间选择压力差异。*nd5* 的 K_a/K_s 标准差最低(0.001), 其次是 *cytb*、*cox1*、*cox2*、*cox3* (分别为 0.002、0.002、0.003、0.003)。说明龙虾属中, 这些基因种间选择压力差异较小。

2 结果与分析

2.1 龙虾科线粒体基因组的基本特征

由表 1 可知, 用于分析的 13 种龙虾科物种线粒体全基因组序列, 全长为 15470~16105 bp, 其中最长的为龙虾属中的锦绣龙虾, 最短的为塔斯马尼亚属中的绿色驮马龙虾。13 个物种的线粒体基因组 α 链的 A+T 含量最高为 67.11% (波纹龙虾), 最低为 62.63% (眼斑龙虾), 平均值为 65.26%。

在基因排列顺序方面, 13 个龙虾科物种的全基因组序列的基因组成与大部分无脊椎动物一致, 共 37 个编码基因和一个非编码控制区(control region, CR)。和十足目动物线粒体基因组的原始排列顺序一样, 它们遵循 *cox1*、*trnL2*、*cox2*、*trnK*、*trnD*、*atp8*、*atp6*、*cox3*、*trnG*、*nd3*、*trnA*、*trnR*、*trnN*、*trnS1*、*trnE*、*trnF*、*nd5*、*trnH*、*nd4*、*nd4l*、*trnT*、*trnP*、*nd6*、*cytb*、*trnS2*、*nd1*、*trnL1*、*rrnL*、*trnV*、*rrns*、*trnI*、*trnQ*、*trnM*、*nd2*、*trnW*、*trnC*、*trnY* 的排列顺序, 如图 1 所示。

0.034、0.027、0.019、0.017)。说明龙虾属中, 这些基因有较大的种间选择压力差异。*nd5* 的 K_a/K_s 标准差最低(0.001), 其次是 *cytb*、*cox1*、*cox2*、*cox3* (分别为 0.002、0.002、0.003、0.003)。说明龙虾属中, 这些基因种间选择压力差异较小。

2.3 差异位点特征

由表 2 可知, 龙虾科物种线粒体基因组基因中, *cox1* (42.02%)、*cox3* (42.86%)和 *cox2* (46.95%) 基因的差异位点比例较低, 具有较高的保守性。*rrnL* (68.20%)、*rrnS* (67.77%)和 *nd6* (65.68%) 基因的差异位点比例较高。差异位点数最多的为 *nd5*

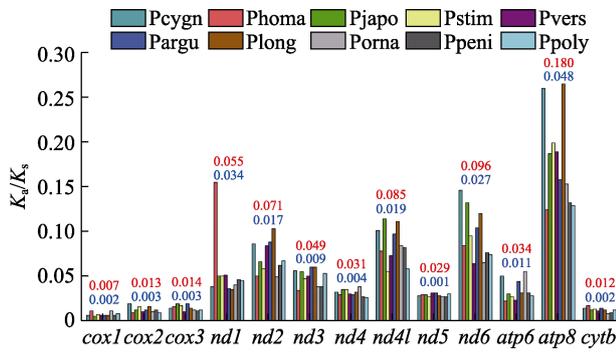


图 2 龙虾属物种线粒体基因选择压力分析

Pcygn: 天鹅龙虾; Phoma: 波纹龙虾; Pjapo: 日本龙虾; Pstim: 中国龙虾; Pvers: 杂色龙虾; Pargu: 眼斑龙虾; Plong: 长足龙虾; Porna: 锦绣龙虾; Ppeni: 密毛龙虾; Ppoly: 黄斑龙虾.

Fig. 2 Selection pressure analysis of mitogenomes in the genus *Panulirus*

Pcygn: *Panulirus cygnus*; Phoma: *Panulirus homarus*; Pjapo: *Panulirus japonicas*; Pstim: *Panulirus stimpsoni*; Pvers: *Panulirus versicolor*; Pargu: *Panulirus argus*; Plong: *Panulirus longipes*; Porna: *Panulirus ornatus*; Ppeni: *Panulirus penicillatus*; Ppoly: *Panulirus polyphagus*.

基因(998 个), 其次是 *nd4* 基因(732 个)和 *rrnL* 基因(699 个)。因此, 在龙虾群体遗传学的研究中, *nd5*、*nd4*、*rrnL* 基因是较为理想的分子标记。

表 2 龙虾科线粒体基因组的基因变异位点分析

Tab. 2 Analysis of gene variation sites in the mitogenome of Palinuridae

| 参数 parameter | <i>atp6</i> | <i>atp8</i> | <i>cob</i> | <i>cox1</i> | <i>cox2</i> | <i>cox3</i> | <i>nd1</i> | <i>nd2</i> | <i>nd3</i> | <i>nd4</i> | <i>nd4L</i> | <i>nd5</i> | <i>nd6</i> | <i>rrnL</i> | <i>rrnS</i> |
|--------------------------------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|-------------|-------------|
| 总位点数* total number of sites* | 671 | 149 | 1123 | 1528 | 688 | 791 | 907 | 987 | 343 | 1333 | 303 | 1726 | 507 | 1025 | 636 |
| 保守位点数 invariable sites | 315 | 58 | 578 | 886 | 365 | 452 | 453 | 344 | 147 | 601 | 135 | 728 | 174 | 326 | 205 |
| 变异位点数 variable sites | 356 | 91 | 545 | 642 | 323 | 339 | 454 | 643 | 196 | 732 | 168 | 998 | 333 | 699 | 431 |
| 简约突变数 parsimony informative sites | 297 | 68 | 457 | 564 | 288 | 284 | 379 | 542 | 163 | 593 | 143 | 827 | 272 | 344 | 229 |
| 单现突变数 singleton variable sites | 59 | 23 | 88 | 78 | 35 | 55 | 75 | 101 | 33 | 139 | 25 | 171 | 61 | 355 | 202 |
| 变异位点比例/% ratio of variable sites | 53.06 | 61.07 | 48.53 | 42.02 | 46.95 | 42.86 | 50.06 | 65.15 | 57.14 | 54.91 | 55.45 | 57.82 | 65.68 | 68.20 | 67.77 |

注: “*” 表示总位点数不包含缺失位点.

Note: “*” means total number of sites does not include missing sites.

2.6 系统发育关系

在本研究中, 用于构建进化树的线粒体基因组包括了 13 个龙虾科物种和 1 个外类群(加州美对虾(*Farfantepenaeus californiensis*)). 系统发育树结果显示, 塔斯马尼亚龙虾属最先开始分化, 龙虾属聚为一支, 且与脊龙虾属、游龙虾属互为姊妹关系(图 5, 图 6)。在 ML 进化树中(图 5), 龙虾

2.4 遗传距离分析

在 10 个龙虾属物种中, 遗传距离最大的是天鹅龙虾和波纹龙虾(0.3363) (图 3)。在整个龙虾科内, 遗传距离最小的是长足龙虾和天鹅龙虾(0.1403), 遗传距离最大的是天鹅龙虾和三角脊龙虾(0.4134)。同时, 用 BI 方法所构建的系统发育结果也完全支持遗传距离分析结果(图 3)。

2.5 密码子的使用

在龙虾科内, 10 个龙虾属物种蛋白质编码基因序列编码异亮氨酸(Ile)、苯丙氨酸(Phe)、丝氨酸(Ser2)、缬氨酸(Val)、亮氨酸(Leu1, Leu2)、甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala)的密码子数较多(>200), 编码精氨酸(Arg)、半胱氨酸(Cys)、色氨酸(Trp)、天冬氨酸(Asp)、谷氨酰胺(Gln)、谷氨酸(Glu)、组氨酸(His)、赖氨酸(Lys)的密码子较少(<100), 塔斯马尼亚龙虾属、脊龙虾属和游龙虾属物种蛋白质编码基因序列也遵循和龙虾属相同的规律, 说明在龙虾科中, 被编码的氨基酸偏好性是相似的(图 4)。

属内部的密毛龙虾和黄斑龙虾组成一个姊妹群, 遗传关系最近(BP=18), 该进化树自展值在 18~100。而在 BI 进化树中(图 6), 中国龙虾和密毛龙虾组成一个姊妹群, 遗传关系最近(PP=0.92), 该进化树的后验概率在 0.92~1.00。相比之下, BI 进化树的后验概率较高, 所展现的结果也具有较高的可信度。

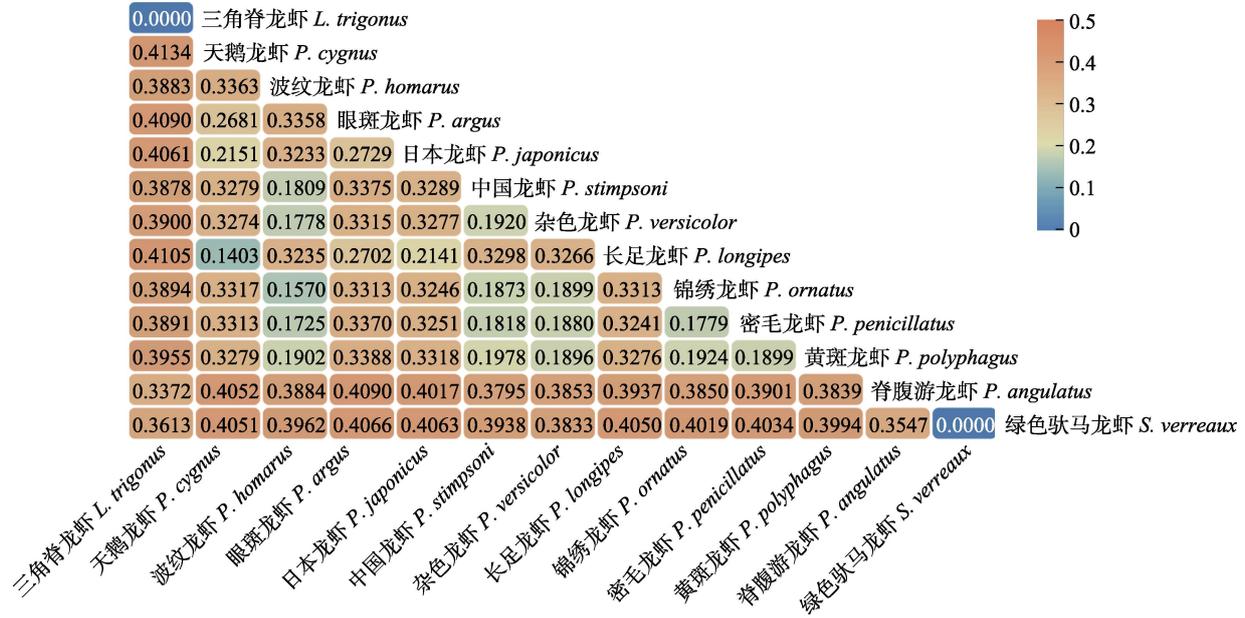


图 3 龙虾科物种线粒体基因组 13 PCGs 遗传距离
Fig. 3 Genetic distance of 13 protein-coding genes in the mitogenome of Palinuridae species

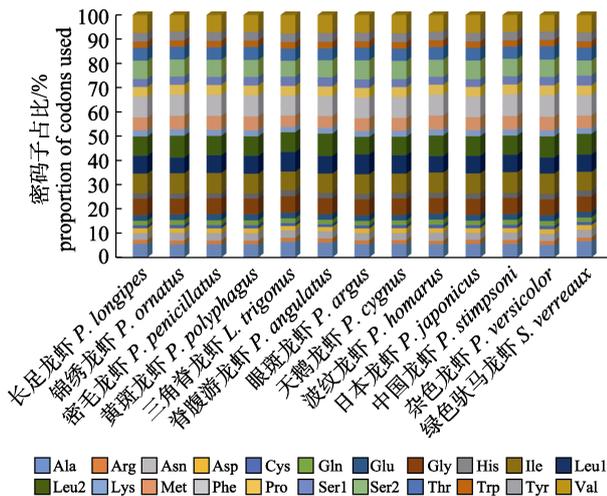


图 4 龙虾科物种线粒体基因组密码子的使用模式
Fig. 4 Codon usage pattern in mitochondrial genome of Palinuridae species

2.7 龙虾科物种分歧时间估计

龙虾科物种分化时间详见图 7, 其物种起源大约在三叠纪(Triassic, 约 205.13 Ma), 塔斯马尼亚龙虾属最先在侏罗纪时代(Jurassic, 约 181.03 Ma) 开始分化。而脊龙虾属和游龙虾属的分化时间稍晚, 也大约在侏罗纪(约 154.85 Ma)。在所分析的 13 个物种中, 龙虾属物种的分化频率较高, 第一次分化大约在白垩纪(Cretaceous, 约 118.09 Ma), 随后在早第三纪(Paleogene, 约 74.00 Ma)和晚第三纪

(Neogene, 约 44.54 Ma)均开始分化, 是龙虾科物种中分化最多的一个属。

3 讨论

3.1 龙虾科线粒体基因组特征

龙虾科物种线粒体基因组为共价闭环环状分子, 包含 37 个基因: 13 个蛋白编码基因(*atp6*, *atp8*, *cox1-3*, *cytb*, *nad1-6* 和 *nad4L*), 2 个核糖体 RNA 基因(*rrnS* 和 *rrnL*), 22 个 tRNAs^[15]。本研究对数据库中现有的 13 个龙虾科物种线粒体基因组数据进行分析发现, 其线粒体基因组长度在 15470 bp [绿色驮马龙虾(*Sagmariasus verreaux*)]~16 105 bp [锦绣龙虾(*Panulirus ornatus*)], A+T 含量为 62.63%~67.11% (表 1), 符合十足目动物线粒体基因组的基本特征^[12,14-15,28-31]。同时, 与十足动物线粒体基因组的原始排列相比, 龙虾科的线粒体基因组排列顺序均未发生变化, 说明龙虾科物种在进化中相当保守。

3.2 选择压力和差异位点

在遗传学中, K_a/K_s 值被广泛应用于不同物种间序列水平上的选择压力指标。 $K_a > K_s$ 、 $K_a = K_s$ 、 $K_a < K_s$ 一般分别表示正向选择、中性进化、纯化选择^[32]。在本研究中, 龙虾属 10 个物种 13 PCGs

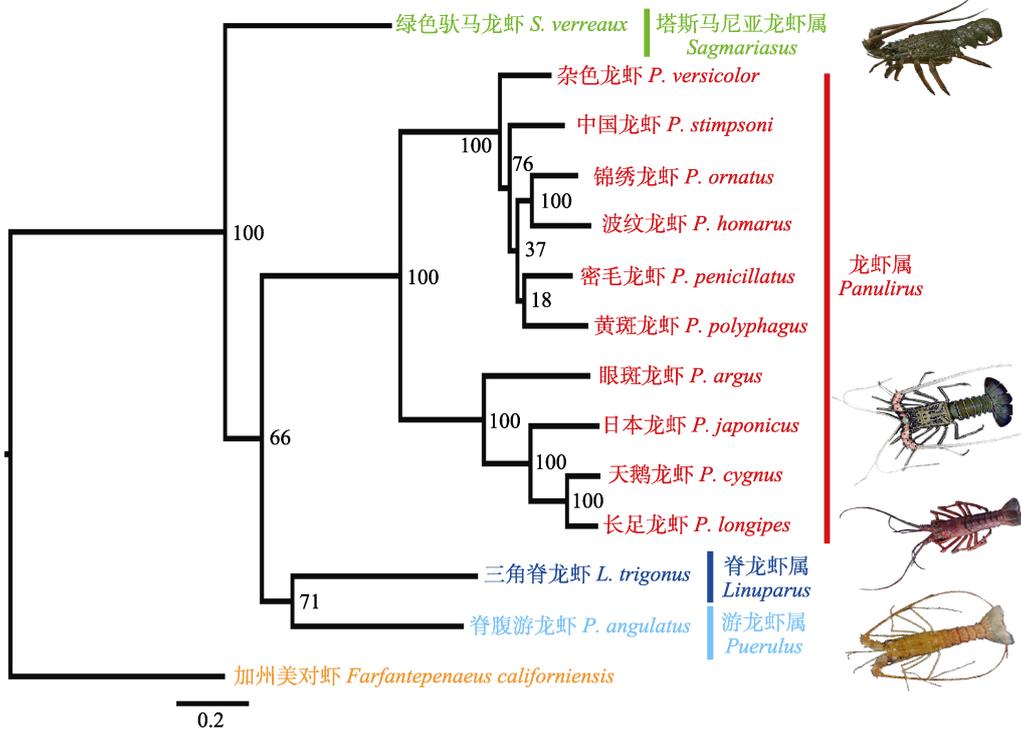


图 5 利用 ML 方法从线粒体基因组 13 个蛋白质编码基因的核苷酸序列构建的系统发育树
分支上的数值为自展值(BP, 1000 次重复).

Fig. 5 Phylogenetic tree constructed from the nucleotide sequence of 13 PCGs in the mitogenome using ML methods
The values on branches are bootstrap probability (BP, 1000 repts).

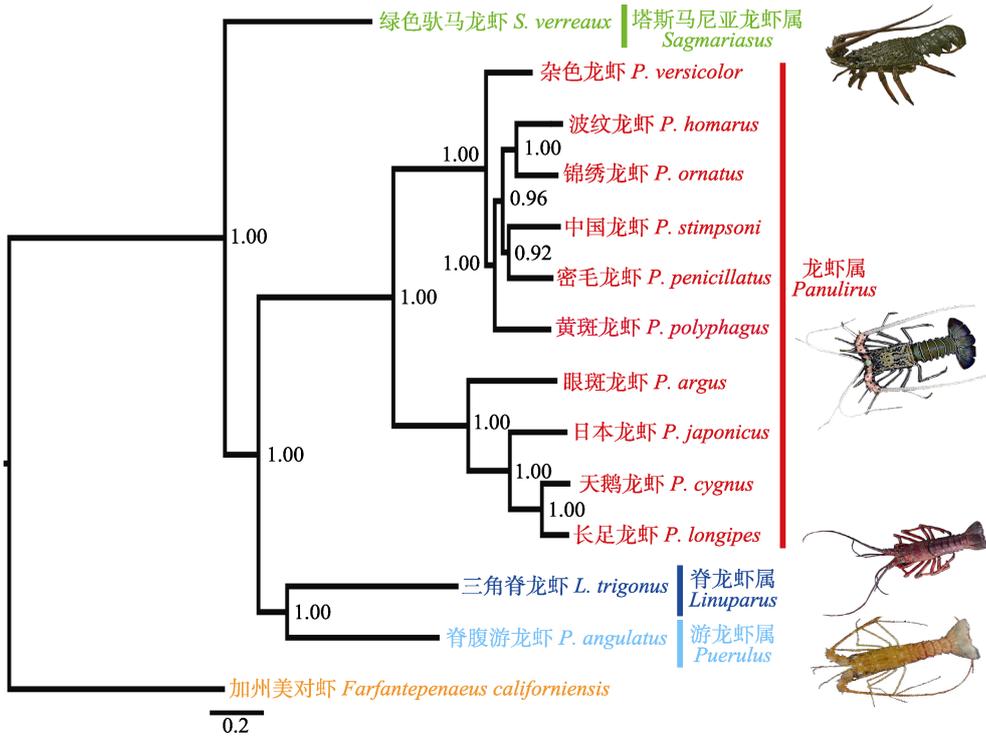


图 6 利用 BI 方法从线粒体基因组 13 个蛋白质编码基因的核苷酸序列构建的系统发育树
分支上的数值为后验概率(PP).

Fig. 6 Phylogenetic tree constructed from the nucleotide sequence of 13 PCGs in the mitogenome using BI methods
The values on branches are posterior probability (PP).

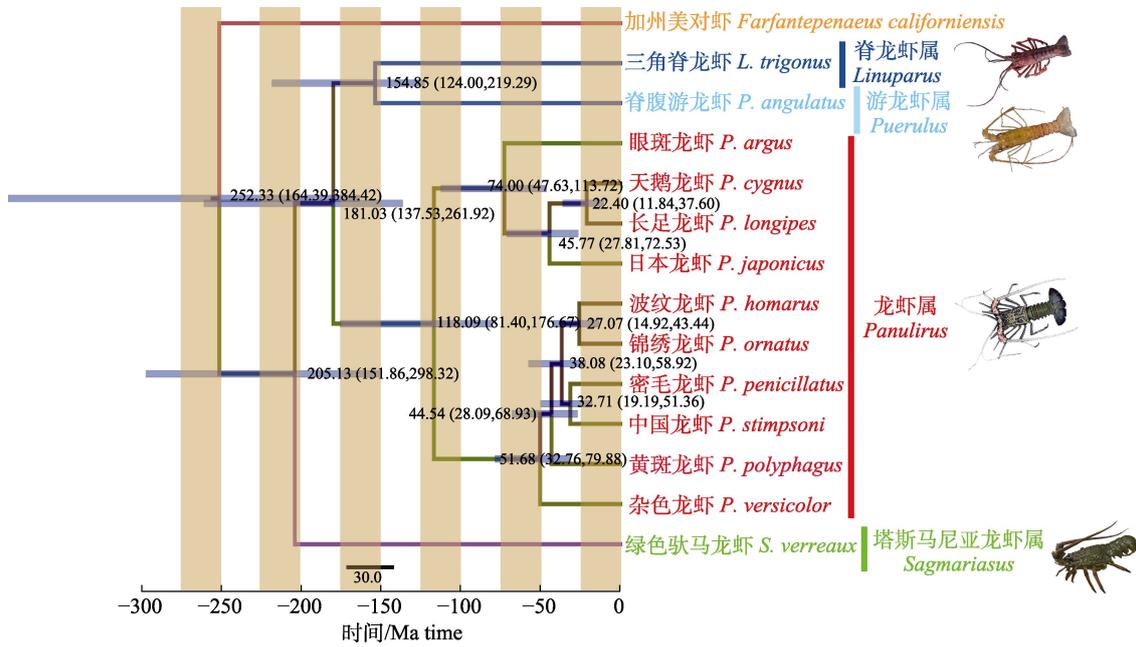


图 7 龙虾科物种分歧时间估算

数字代表节点的中间值及 95% 的置信区间。

Fig. 7 Estimation of divergence time of Paluinuridae species

The numbers represent posterior medians and 95% posterior interval value.

的 K_a/K_s 均小于 1, 表明这 13 个基因具有很强的纯化选择作用。基于龙虾属物种 13PCGs 选择压力分析显示, *cox1* 基因的 K_a/K_s 值最低, 这和其他后生动物线粒体基因的研究中所呈现的规律相似, K_a/K_s 值最小的一般都为 *cox1* 基因^[30,33-35], 而 K_a/K_s 值最高的为 *atp8* 基因, 所承受的选择压力较小, 这与朱陇强等^[35]针对长臂虾科(Palaemonidae)线粒体基因组的研究结果相似, 大多后生动物线粒体基因组的 *atp8* 基因可能存在缺失^[26,35-38]。

分子标记在分类学、群体遗传学、生物学、地理学等研究方面起到至关重要的作用^[38]。通常, *cox1* 基因被较多运用于近缘物种的鉴别^[26,38]。在本研究中, 分析的 13 个龙虾科物种 15 个主编码基因中, *cox1* 基因的差异位点比例最低, 相比其他基因, 不适宜用做龙虾群体遗传学的研究。而较为理想的分子标记有 *nd5*、*nd4*、*rrnL* 基因, 这对分析龙虾科物种系统发育、分歧时间等的研究至关重要。

3.3 系统发育和分歧时间

在本研究中, 选择 13 个龙虾科物种和 1 个外类群的线粒体基因组用于系统发育树的构建, 其中, 采用 ML 方法的进化树显示, 龙虾属内部的

密毛龙虾和黄斑龙虾(组成一个姊妹群, 遗传关系最近, 但其分枝的可靠性程度却较低(BP=18)。而采用 BI 方法构建的进化树中, 单一马尔可夫链运行达到收敛, 在稳定期的抽样能够代表目标分布, 其进化结果显示, 中国龙虾和密毛龙虾组成一个姊妹群, 遗传关系最近, 后验概率也较高(PP=0.92), 具有较高的可信度。在传统的形态学分类中, 根据陈天任等^[13]的分类指标, 黄斑龙虾和锦绣龙虾聚为一支, 杂色龙虾和中国龙虾可聚为一支; 而根据黄宗强等^[39]的分类指标, 密毛龙虾与黄斑龙虾、中国龙虾之间的遗传关系则更为复杂。显然, 传统的形态学分类有时会因为指标的不同而导致分类关系出现分歧。在分子水平的研究中, 刘丽等^[13]运用 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 技术, 采用邻近结合法(neighbor-joining)构建的分子进化树显示, 密毛龙虾、日本龙虾、波纹龙虾、黄斑龙虾聚为一支, 杂色龙虾、锦绣龙虾、中国龙虾聚为一支。

了解龙虾内部的系统发育关系对于揭示它们进化成功的关键因素至关重要。本研究的分歧时间结果显示, 龙虾科物种起源大约在三叠纪(95%的 HPD 为 151.86~298.32 Ma), 这与生命进化时间

信息公共知识库(<http://www.timetree.org/>)记录的 210 Ma 基本接近。龙虾属内部开始分化大约在白垩纪(95%的 HPD 为 81.40~176.67 Ma), 这与前人根据 6 个基因(线粒体和核基因)和 190 个形态学特征方法所估算的 118.40 Ma 基本接近^[27]。波纹龙虾和锦绣龙虾的分化时间在 27.07 Ma (95%的 HPD 为 14.92~43.44 Ma), 这与前人估算的 24.6 Ma 基本接近^[40]。本研究所采用的贝叶斯分子钟估算结果与前人的分析结果基本接近, 并且分歧时间的 95%置信区间与前人的分析结果有重叠的部分, 这说明本研究的估算结果具有一定的可信度。

参考文献:

- [1] Stentiford G D, Neil D M, Peeler E J, et al. Disease will limit future food supply from the global crustacean fishery and aquaculture sectors[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2012, 110(2): 141-157.
- [2] Zhang Z. Taxonomic study and zoogeographic characteristics of Palinuridae (Crustacea: Decapoda) of the China seas[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2005: 30-63. [张昭. 中国海龙虾下目 Infraorder Palinuridea 分类和动物地理学特点[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2005: 30-63.]
- [3] Huang Z G, Lin J M. Dictionary of Marine Biology[M]. Beijing: China Ocean Press, 2002. [黄宗国, 林金美. 海洋生物学辞典[M]. 北京: 海洋出版社, 2002.]
- [4] Luo J J, Cheng J R, Wang C F, et al. Adaptation of five ecological factors in embryo of *Panulirus homarus*[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2021, 41(2): 94-102. [罗嘉俊, 程家荣, 王晨芳, 等. 波纹龙虾胚胎对五种生态因子的适应性[J]. *广东海洋大学学报*, 2021, 41(2): 94-102.]
- [5] Hong J N. Breeding experiment of *Panulirus homarus*[J]. *Scientific Fish Farming*, 2020(10): 35-36. [洪婧妮. 波纹龙虾养殖试验[J]. *科学养鱼*, 2020(10): 35-36.]
- [6] Cox S L, Davis M. The effect of feeding frequency and ration on growth of juvenile spiny lobster, *Panulirus argus* (Palinuridae)[J]. *Journal of Applied Aquaculture*, 2006, 18(4): 33-43.
- [7] Wang S Y, Carter C G, Fitzgibbon Q P, et al. The use of stoichiometric bioenergetics to elucidate metabolic energy substrate use and specific dynamic action in cultured juvenile spiny lobsters (*Sagmariasus verreauxi*) of different nutritional status[J]. *Aquaculture*, 2021, 532: 736021.
- [8] Perera E, Moyano F J, Diaz M, et al. Polymorphism and partial characterization of digestive enzymes in the spiny lobster *Panulirus argus*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 150(3): 247-254.
- [9] Li D L. Maternal inheritance of mitochondrial diseases[J]. *Journal of Weifang University*, 2006, 6(4): 85-87. [李冬玲. 线粒体病的母系遗传[J]. *潍坊学院学报*, 2006, 6(4): 85-87.]
- [10] Boore J L. Animal mitochondrial genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 1999, 27(8): 1767-1780.
- [11] Baeza J A. Yes, we can use it: A formal test on the accuracy of low-pass nanopore long-read sequencing for mitophylogenomics and barcoding research using the Caribbean spiny lobster *Panulirus argus*[J]. *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 882.
- [12] Yamauchi M M, Miya M U, Nishida M. Complete mitochondrial DNA sequence of the Japanese spiny lobster, *Panulirus japonicus* (Crustacea: Decapoda)[J]. *Gene*, 2002, 295(1): 89-96.
- [13] Liu L, Yang X L, Liu C W, et al. Genetic diversity of common spiny lobsters in South China Sea[J]. *Fisheries Science*, 2012, 31(3): 160-164. [刘丽, 杨新龙, 刘楚吾, 等. 南海海域常见龙虾的遗传多样性分析[J]. *水产科学*, 2012, 31(3): 160-164.]
- [14] Liu H, Yao W, Liu H Q, et al. Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome of *Panulirus versicolor*[J]. *Marine Sciences*, 2014, 38(11): 16-23. [刘皓, 姚维, 刘海情, 等. 杂色龙虾线粒体基因组全序列的测定与分析[J]. *海洋科学*, 2014, 38(11): 16-23.]
- [15] Liu Y, Cui Z X. Complete mitochondrial genome of the Chinese spiny lobster *Panulirus stimpsoni* (Crustacea: Decapoda): Genome characterization and phylogenetic considerations[J]. *Molecular Biology Reports*, 2011, 38(1): 403-410.
- [16] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [17] Zhang Z, Li J, Zhao X Q, et al. K_aK_s Calculator: calculating K_a and K_s through model selection and model averaging[J]. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 2006, 4(4): 259-263.
- [18] Wang D P, Wan H L, Zhang S, et al. Gamma-MYN: a new algorithm for estimating K_a and K_s with consideration of variable substitution rates[J]. *Biology Direct*, 2009, 4: 20.
- [19] Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio J C, et al. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2017, 34(12):

- 3299-3302.
- [20] Edgar R C. MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity[J]. BMC Bioinformatics, 2004, 5: 113.
- [21] Castresana J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis[J]. Molecular Biology and Evolution, 2000, 17(4): 540-552.
- [22] Darriba D, Taboada G L, Doallo R, et al. jModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing[J]. Nature Methods, 2012, 9(8): 772.
- [23] Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood[J]. Systematic Biology, 2003, 52(5): 696-704.
- [24] Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, et al. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space[J]. Systematic Biology, 2012, 61(3): 539-542.
- [25] Drummond A J, Suchard M A, Xie D, et al. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7[J]. Molecular Biology and Evolution, 2012, 29(8): 1969-1973.
- [26] Palero F, Crandall K A, Abelló P, et al. Phylogenetic relationships between spiny, slipper and coral lobsters (Crustacea, Decapoda, Achelata)[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2009, 50(1): 152-162.
- [27] Bracken-Grissom H D, Ahyong S T, Wilkinson R D, et al. The emergence of lobsters: Phylogenetic relationships, morphological evolution and divergence time comparisons of an ancient group (Decapoda: Achelata, Astacidea, Glypheidea, Polychelida)[J]. Systematic Biology, 2014, 63(4): 457-479.
- [28] Baeza J A. The complete mitochondrial genome of the Caribbean spiny lobster *Panulirus argus*[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 17690.
- [29] Shen X, Wang H Q, Wang M X, et al. Comparison of the characteristics and gene order in mitochondrial genomes of krills[J]. Progress in Fishery Sciences, 2012, 33(2): 49-55. [申欣, 王海青, 王敏晓, 等. 磷虾类线粒体基因组的特征和基因排列比较[J]. 渔业科学进展, 2012, 33(2): 49-55.]
- [30] Shen X, Li X, Xu Q H. Comparison and analysis of *Alpheus japonicus* and *A. distinguendus* complete mitochondrial genome sequences[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2012, 34(5): 147-153. [申欣, 李晓, 徐启华. 日本鼓虾与鲜明鼓虾线粒体基因组全序列的分析比较[J]. 海洋学报, 2012, 34(5): 147-153.]
- [31] Shen X. Analysis of mitochondrial genome characteristics and differences in genetic loci in Penaeidae[J]. Fisheries Science, 2010, 29(12): 711-717. [申欣. 对虾科线粒体基因组特征及基因差异位点分析[J]. 水产科学, 2010, 29(12): 711-717.]
- [32] Yang Z. Computational Molecular Evolution[M]. New York: Oxford University Press, 2006.
- [33] Tian M, Shen X, Meng X P, et al. Analysis of mitochondrial genome characteristics and genetic different loci in Brachyuran[J]. Fisheries Science, 2011, 30(1): 31-37. [田美, 申欣, 孟学平, 等. 短尾派线粒体基因组特征及基因差异位点分析[J]. 水产科学, 2011, 30(1): 31-37.]
- [34] Shen X, Ren J F, Cui Z X, et al. The complete mitochondrial genomes of two common shrimps (*Litopenaeus vannamei* and *Fenneropenaeus chinensis*) and their phylogenomic considerations[J]. Gene, 2007, 403(1-2): 98-109.
- [35] Zhu L Q, Zhu Z H, Lin Q, et al. Characteristics and phylogenetic analysis of the mitochondrial genome in Palaeomonidae[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2021, 28(7): 852-862. [朱陇强, 朱志煌, 林琪, 等. 长臂虾科线粒体基因组结构与系统进化分析[J]. 中国水产科学, 2021, 28(7): 852-862.]
- [36] Boore J L, Medina M, Rosenberg L A. Complete sequences of the highly rearranged molluscan mitochondrial genomes of the scaphopod *Graptacme eborea* and the bivalve *Mytilus edulis*[J]. Molecular Biology and Evolution, 2004, 21(8): 1492-1503.
- [37] Dellaporta S L, Xu A, Sagasser S, et al. Mitochondrial genome of *Trichoplax adhaerens* supports Placozoa as the basal lower metazoan phylum[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(23): 8751-8756.
- [38] Shen X, Wang H Q, Ren J F, et al. The mitochondrial genome of *Euphausia superba* (Prydz Bay) (Crustacea: Malacostraca: Euphausiacea) reveals a novel gene arrangement and potential molecular markers[J]. Molecular Biology Reports, 2010, 37(2): 771-784.
- [39] Huang Z Q, Chen S J, Li Y F, et al. Primary Color Atlas of Shrimp in the Taiwan Strait[M]. Fuzhou: Fujian Science & Technology Publishing House, 1993. [黄宗强, 陈世杰, 李玉发, 等. 台湾海峡虾类原色图册[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1993.]
- [40] Yang J S, Lu B, Chen D F, et al. When did decapods invade hydrothermal vents? Clues from the Western Pacific and Indian Oceans[J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(2): 305-309.

Characteristics and phylogenetic analysis of the mitochondrial genome in Palinuridae

ZHU Leiyu^{1,2,3}, ZHU Zhihuang^{2,3}, ZHU Longqiang^{2,3}, LIN Qi^{2,3}

1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Fisheries Research Institute of Fujian Province, Xiamen 361013, China;

3. Key Laboratory of Cultivation and High-Value Utilization of Marine Organisms in Fujian Province, Xiamen 361013, China

Abstract: This study comprehensively analyzed the complete sequence of the mitochondrial genomes of 13 species in Palinuridae. The results showed that the length of the mitochondrial genome is 15470 to 16105 bp, and the A+T content is 62.63% to 67.11%. Analysis of the ratio of the number of non-synonymous substitutions per non-synonymous site (K_a) to the number of synonymous substitutions per synonymous site (K_s) showed that the K_a/K_s ratio of 13 protein-coding genes (PCGs) in the mitochondria of ten *Panulirus* species in Palinuridae were much lower than one; this demonstrated strong purification options. In the analysis of different sites, we found that the *nd5*, *nd4*, and *rrnL* genes were ideal molecular markers. Codon usage analysis showed that the encoded amino acid preferences were similar. This study also adopted more systematic and comprehensive maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) methods to construct a phylogenetic tree. The results showed that the *Sagmariasus* first began to differentiate, and *Panulirus* clustered into one branch joining the *Linuparus/Puerulus* as sisters. The Bayesian molecular clock estimation results showed that species in Palinuridae may have originated in the Triassic, and then further differentiated into lobster species with modern characteristics. This study provides reliable molecular markers for the rapid identification of lobsters, and provides a theoretical basis to analyze the genetic diversity of lobsters.

Key words: Palinuridae; mitogenome; structure characteristic; phylogeny

Corresponding author: LIN Qi. E-mail: xmqlin@sina.com