

4 种海参 16S rRNA 和 COI 基因片段序列比较及系统学研究

陈丽梅, 李琪, 李赞

(中国海洋大学 水产学院, 山东 青岛 26603)

摘要: 采用 PCR 技术对来自山东荣成、长岛、俄罗斯和日本的刺参 (*Apostichopus japonicus*), 来自澳大利亚的黄乳海参 (*Holothuria fuscogilva*), 来自冰岛的北大西洋瓜参 (*Cucumaria frondosa*) 和来自福建的二色桌片参 (*Mensamaria intercedens*) 的 16S rRNA 和 COI 基因片段进行了扩增和测序, 分别得到了长度约为 500 bp 和 540 bp 的片段。通过统计变异位点、平均核苷酸差异数和核苷酸多样性指数进行基因序列变异分析。结果表明, 根据 16S rRNA、COI 基因片段进行刺参种内差异比较时, 长岛和荣成刺参序列差异最小, 和日本刺参序列差异最大; 刺参和其他科 3 种海参种间的序列差异远远高于刺参种内差异。从 GenBank 中选取 7 条海参序列与本研究所测序列一同构建了 NJ 和 ME 系统树。根据 2 种基因片段的系统学分析均表明, 刺参属和拟刺参属亲缘关系很近, 可能有共同的起源。而海参科未与同属于楯手目 (*Aspidochirolida*) 的刺参科聚类, 而与枝手目瓜参科和沙子鸡科聚为一支, 与形态学的分类不一致。[中国水产科学, 2008, 15(6): 935-942]

关键词: 海参; 16S rRNA 基因; COI 基因; 序列比较; 系统发育分析

中图分类号: Q959

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)06-0935-08

海参隶属于棘皮动物门 (Echinodermata)、海参纲 (Holothuroidea)。世界上已知海参种类大约有 1 400 种, 约 160 个属^[1]。根据 Pawson 等^[2]的分类, 海参纲包括 3 亚纲 6 目, 即枝手海参亚纲, 包括枝手目和指手目; 楯手海参亚纲, 包括楯手目和平足目; 无足海参亚纲, 包括无足目和芋参目。温带区海参资源呈单种性, 分布于太平洋东西两岸, 其中东岸以美国红海参 (*Parastichopus californicus*) 为主, 西岸以刺参 (*Apostichopus japonicus*) 为主; 热带区海参资源则呈多样性, 分布于太平洋热带区及印度洋^[3], 其中印度洋—西太平洋区是世界上海参种类最多、资源量最大的区域。

长期以来, 海参的分类是基于形态学上的特征, 而基于分子水平的研究并不多^[4-7]。线粒体 DNA 由于具有分子量小、结构简单、母系遗传、进化速度快等特点, 已成为动物群体遗传学和系统进化研究的重要对象。近年来已经越来越多的应用在水生动物的遗传学研究上^[8-11]。

本研究应用线粒体 16S rRNA 和 COI 2 个基因片段对分别来自中国、日本、俄罗斯等国的刺参、黄乳海参、北大西洋瓜参和二色桌片参进行遗传分

析。旨在: 1) 探讨来自不同地区刺参的 DNA 变异水平, 为分子标记技术应用于刺参鉴定提供依据; 2) 初步探讨刺参的系统分类地位, 为刺参的系统发育和遗传育种研究提供背景资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

选用 4 种海参, 共 7 个个体。其中鲜活刺参 2 只, 分别采自荣成和长岛, 其余均是经处理过的干参样本, 采集具体地点、时间见表 1。经中国水产科学研究院黄海水产研究所鉴定后运至本实验室。

1.2 实验方法

1.2.1 海参基因组 DNA 的提取 取大约 100 mg (湿重) 海参组织, 加入 500 μ L CTAB 裂解液 (2% CTAB, 100 mmol Tris-HCl, pH 8.0, 1.4 mol/L NaCl, 20 mmol EDTA, 0.2% β -巯基乙醇) 和 14 μ L 蛋白酶 K (20 mg/mL) 于 60 $^{\circ}$ C 水浴中消化至澄清, 等体积的饱和酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1) 抽提, 异丙醇沉淀, 双蒸水溶解, 干参样品提取的 DNA 充分溶解后用 PCR 产物纯化试剂盒纯化, 紫外分光光度计定量, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

收稿日期: 2008-01-24; 修订日期: 2008-04-07.

基金项目: 国家科技支撑计划 (2006BAD09A01).

作者简介: 陈丽梅 (1981-), 女, 博士研究生, 从事水生生物遗传育种学研究. E-mail: chenlimeicd@yahoo.com.cn

通讯作者: 李琪. Tel: 0532-82031622; E-mail: qili66@ouc.edu.cn

表 1 海参 DNA 数据和材料来源
Tab. 1 Resources of DNA data and samples of sea cucumber

分类地位 Texonomy	种 Species	缩写 Abbreviation	来源 Resource
楯手目 Aspidochirotida			
刺参科 / 仿刺参属 Stichopodidae/Apostichopus	刺参 <i>A. japonicus</i>	<i>A. ja1</i>	山东长岛 Changdao of Shandong
刺参科 / 仿刺参属 Stichopodidae/Apostichopus	刺参 <i>A. japonicus</i>	<i>A. ja2</i>	山东荣成 Rongcheng of Shandong
刺参科 / 仿刺参属 Stichopodidae/Apostichopus	刺参 <i>A. japonicus</i>	<i>A. ja3</i>	日本 Japan
刺参科 / 仿刺参属 Stichopodidae/Apostichopus	刺参 <i>A. japonicus</i>	<i>A. ja4</i>	俄罗斯 Russia
海参科 / 海参属 Holothuriidae/Holothuria	黄乳海参 <i>H. fuscogilva</i>	<i>H. fus</i>	澳大利亚 Australia GenBank (AY852278/16S)
刺参科 / 仿刺参属 Stichopodidae/Apostichopus	刺参 <i>A. japonicus</i>	<i>A. jaw</i>	(AY852281/COI)
刺参科 / 拟刺参属 Stichopodidae/Parastichopus	美国红海参 <i>P. californicus</i>	<i>P. cal</i>	GenBank (U32198)
刺参科 / 拟刺参属 Stichopodidae/Parastichopus	具疣拟刺参 <i>P. parvimensis</i>	<i>P. par</i>	GenBank (U32199)
海参科 / 海参属 Holothuriidae/Holothuria	黑乳海参 <i>H. nobilis</i>	<i>H. nob</i>	GenBank (AY509147/16S) (AY700232/COI)
海参科 / 海参属 Holothuriidae/Holothuria	红腹海参 <i>H. edulis</i>	<i>H. edu</i>	GenBank (EU220810/16S) (EU220830/COI)
枝手目 Dendrochirotida			
瓜参科 / 瓜参属 Cucumariidae/Cucumaria	北大西洋瓜参 <i>C. frondosa</i>	<i>C. fro</i>	冰岛 Iceland
瓜参科 / 桌片参属 Cucumariidae/Mensamaria	二色桌片参 <i>M. intercedens</i>	<i>M. int</i>	福建 Fujian
瓜参科 / 刺瓜参属 Cucumariidae/Pseudocnus	<i>P. astigmatus</i>	<i>A. ast</i>	GenBank (U32213)
沙子鸡科 / 中文属名不详	<i>P. lissoplaca</i>	<i>P. lis</i>	GenBank (U32219)
Phyllophoridae/Pentamera			

1.2.2 PCR 扩增 以海参基因组 DNA 为模板,用无脊椎动物 16S rRNA 基因片段的通用引物进行 PCR 扩增,引物序列为: 16Sar: 5'-CGCCTGTTTAT-CAAAAACAT-3'; 16Sbr: 5'-CCGGTCTGAACTCA-GATCACGT-3'。

COI 引物设计参照 Arndt 等^[4],引物序列为: COI ef: 5'-ATAATGATAGGAGGR (A/G) TTTGG-3'; COI er: 5'-GCTCGTGTRTCTACR (A/G) TCCAT-3'。

25 μL PCR 反应体系含有: 10× PCR buffer, 2 mmol MgCl₂, 0.2 mmol dNTP, 引物各 1 μmol, 0.25 U Taq 酶 (TaKaRa),模板 DNA 100 ng。PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 5 min; 然后 94 °C 1 min, 50 °C 30 s, 72 °C 1 min,循环 35 次; 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖电泳,EB 染色,凝胶成像系统观察,拍照。PCR 产物用 PCR 产物纯化试剂盒 (上海生工生物工程有限公司) 纯化,双向测序。

1.2.3 数据分析 测序后用 Bioedit 软件进行序列拼接和比对,结合人工校正。DNAsp 4.0 计算插入缺失位点数,平均核苷酸差异数和核苷酸多样性指数。应用 MEGA 3.1 软件采用 Kimura 双参数模型统

计序列的碱基组成,以紫球海胆 (*Strongylocentrotus purpuratus*) 作为外类群,分别采用邻接法 (Neighbor joining, NJ)、最小进化法 (Minimum evolution, ME) 构建系统树,对所得的系统树进行自展法检验 (1 000 次重复)。从 GenBank 中查找刺参科、海参科、瓜参科和沙子鸡科的 7 种海参序列作为参照 (表 1)。

2 结果与分析

2.1 4种海参16S rRNA 基因序列分析

对刺参、黄乳海参、北大西洋瓜参、二色桌片参 4 种海参的 16S rRNA 基因序列进行分析,得到 499 bp 的同源片段 (图 1)。共有多态位点 187 个,简约信息位点 81 个,来自长岛、荣成、俄罗斯和日本 4 个不同地理种群刺参的序列差异很小,共检测到 3 个变异位点。其中长岛刺参与荣成刺参间存在 1 个 C-T 转换,与俄罗斯刺参间存在 1 个 C/T 转换,与日本刺参间有 1 个 T-C 转换和 1 个 A-G 转换位点。长岛和荣成刺参个体间不存在插入 / 缺失,日本和俄罗斯刺参都存在 1 个插入 / 缺失位点。刺参和其他科 3 种海参的序列差异很大,分别存在 135、115、81 个变异位点和 17、12、33 个插入 / 缺失位点。

```

A. ja1 TGTGGGGTGC AGCCTGCCCA GTGGAATTTA TTCTAAACGG CCGCGGTATT TTGACCGTGC AAAGGTAGCA TAATCACTTG 80
A. ja2 .....
A. ja3 .....
A. ja4 .....
H. fus .AG. A... CA T..... --. AC. AA..... C .....
C. fro .AA..... AA C..... A. - --..... C .....
M. int .AA..... CA ..... T..... -..... T..... C C..... T...

A. ja1 TCTCTTAAAT GGGGACCTGT ATGAATGGCT TTACACICTT TCACTGTCTC TCTTCCCTCC CTCCTAATCT TCTAATCAG 160
A. ja2 ...T.....
A. ja3 .....
A. ja4 ...T.....
H. fus ...T..... A... TC... C... A AAA. CT. TCC CA..... C. C. A... T. .GTA... A... C... TCT. T.
C. fro ...T..... A ACA. T. T. C .A..... CT... TTC... T... AT... C. A. T.
M. int ...T..... T... A CCA. T. T. C .A..... CT... TT. T. .TT... A... C. A...

A. ja1 TGAAGAAGCG TGAACAAATA AGAAAGACGA GAAGACCCTG TCGAGCTTAA GCTAACCCCTG AATGTGTCGC TACCTTTTTT 240
A. ja2 .....
A. ja3 .....
A. ja4 .....
H. fus ..... A .AG. GC. CA. G..... T. .TCTCAA. GA G. TAA. A. AA A----CGCA
C. fro ..... A .T... T... A..... C. A. .TC. TAAA G... CA. AAGA C-----CC.
M. int ..... T... T... A..... -----

A. ja1 CTTAGAAAGA GGTAATTTT- ---CAGATAA AGTTTTGGTT GGGGCAACCG TGGAGAAAAA GAATCCTCCA G-TTAGTTAG 320
A. ja2 ..... - ---..... -.....
A. ja3 ..... C..... - ---. G..... -.....
A. ja4 ..... - ---..... -.....
H. fus GGA. A... CT. CACCCT. C. A ATC. C. .G... GAC..... A ..... G C..... TAA. AG. GA
C. fro T. A. A. G. A. AT. CCC. C. - ---TCA. AG. .... A C... T. T... A..... -AA. A... A
M. int T. C. AG... A. AA... CT. C. - ---. CT-... AC..... T... A C..... -A... AAA...

A. ja1 GAAGAAAACC TTTACCTAA AA-AATTTAG CGACCCAGTT -ACTCTGGTA AACGGAAAAA GTTACCGCAG GGATAACAGC 400
A. ja2 ..... -..... -.....
A. ja3 ..... -..... -.....
A. ja4 ..... -..... -.....
H. fus .... G. TAT .ACTC... C. C T. AC. AA. A A... AA ---A... C... A... T. ....
C. fro CCC... TTITT CA... A... G. C... ACA. A A... A... AA -C. C... A...
M. int .C... C. CTT AA... T. T. -CC... A ..... T. T... AC... G. A...

A. ja1 GTTATCTTCT CTAAGAGCCC ATATTGACGA GAAGGATTGC GACCTCGATG TTGGATTGGG GTAACCAAAG GGTGTAGCAG 480
A. ja2 .....
A. ja3 .....
A. ja4 .....
H. fus ..... G... T... T..... T..... A. C... TT... C... A...
C. fro ...A... C... T... TT... C... A... G..... CC... TT... C...
M. int ..... T... TT... C... A... A... AT..... C...

A. ja1 CTCTT-AAGG --TGGACTG 499
A. ja2 ..... -..... -.....
A. ja3 ..... -..... -.....
A. ja4 ..... -..... -.....
H. fus .... A-... GTG. ACG. T
C. fro .... A-... C... TTAC....
M. int ..... CT. A. GT--.....

```

图 1 4 种海参 16S rRNA 基因片段的核苷酸序列比较
缩写种名见表 1.

Fig.1 Aligned nucleotide sequence of 16S rRNA gene 4 species of sea cucumber
Abbreviations of species are shown in table 1.

刺参种内统计所得的平均核苷酸差异数 (1.667) 和核苷酸多样性 (0.003 42) 均非常低,而和刺参、黄乳海参、北大西洋瓜参、二色桌片参间的平均核苷酸差异数分别高达 54.300、46.900 和 33.300,核苷酸多样性指数分别为 0.113 36、0.097 91 和 0.072 71。显然,16S rRNA 基因片段表现出刺参种内无明显的差异,而在种间存在较大的差异。4

种海参的 16S rRNA 基因的碱基含量见表 2。来自 4 个不同地区刺参个体的各碱基含量基本一致,而黄乳海参和北大西洋瓜参 T 碱基含量要低于刺参, A 碱基含量高于刺参,而二色桌片参的 A、T 碱基的含量都较高。4 种海参的 A+T 含量都高于 G+C 含量,符合无脊椎动物线粒体 DNA 序列的特征。

表 2 4 种海参 16S rRNA 和 COI 基因片段的碱基组成
Tab.2 Base composition of 16S rRNA gene COI gene fragments in 4 species of sea cucumber %

种 Species	16S rRNA					COI				
	T	C	A	G	A+T	T	C	A	G	A+T
<i>A. ja1</i>	27.2	20.7	28.8	23.3	56.0	31.4	23.2	27.3	18.2	58.7
<i>A. ja2</i>	27.4	20.4	28.8	23.3	56.2	31.4	23.2	27.1	18.4	58.5
<i>A. ja3</i>	27.0	20.9	28.7	23.4	55.7	31.7	23.0	26.7	18.6	58.4
<i>A. ja4</i>	27.5	20.5	28.9	23.2	56.4	31.7	22.8	27.1	18.4	58.8
<i>H. fus</i>	22.1	22.3	32.4	23.2	54.5	25.4	27.1	29.3	18.2	54.7
<i>C. fro</i>	24.4	21.9	33.1	20.5	57.5	26.2	27.6	29.1	17.1	55.3
<i>M. int</i>	27.9	19.9	31.7	20.5	59.6	27.1	26.2	30.1	16.7	57.2

注: 缩写种名见表 1。
Note: Abbreviations of species are shown in table 1.

2.2 4种海参COI 基因序列分析

对刺参、黄乳海参、北大西洋瓜参和二色桌片参的 COI 基因序列进行分析,得到 539 bp 的同源片段 (图 2)。共有变异位点 172 个,简约信息位点 100 个,刺参的 4 条序列差异很小,共有 10 个变异位点。其中长岛和荣成刺参间有 1 个 A-G 转换;长岛和俄罗斯刺参间有 2 个 C-T 转换,1 个 A-G 转换;长岛和日本刺参间有 3 个 C-T 转换,1 个 A-C 转换,2 个 A-G 转换和 1 个 T-C 转换。6 只海参 COI 基因序列间不存在插入 / 缺失位点。刺参和其他科的 3 种海参序列差异很大。长岛刺参与黄乳海参、北大西洋瓜参和二色桌片参间分别存在 112、112 和 115 个变异位点。刺参种内统计所得的平均核苷酸差异数和核苷酸多样性均非常低,分别为 5.166 67 和 0.009 59;和其他科 3 种海参间的平均核苷酸差异数分别高达 47.700、48.200 和 49.300,核苷酸多样性指数分别为 0.088 50、0.089 42 和 0.091 47。同 16S rRNA 一样,COI 基因在刺参种内无明显差异,而在种间存在较大的差异。4 种海参 COI 基因的碱基含量见表 2。来自不同地区的刺参个体碱基含量基本一致,黄乳海

参、北大西洋瓜参和二色桌片参的 T 碱基含量要低于刺参, A、C 碱基含量高于刺参,总体来看,4 种海参 A+T 含量都高于 G+C 含量。

如图 3 所示,扩增的 COI 基因片段编码的肽链长度为 179 个氨基酸。碱基替换在氨基酸密码子 1、2、3 位置上都存在,但主要发生在第 3 位密码子上,占整个变异位点的 83.7%。这可能是由于密码子第 3 位点在进化中承担的压力较小,其替换多属于同义替换,较少引起氨基酸的取代。序列上共有 31 个氨基酸突变位点,简约信息位点 14 个,虽然刺参的 4 个体之间存在 10 个变异位点,但是并没有发生氨基酸水平上的变异。刺参和其他 3 个种类间分别存在 17、13 和 18 个氨基酸突变。

2.3 基于 16S rRNA和COI基因片段的系统树的构建

选取 GenBank 登录的刺参科、海参科、瓜参科以及沙子鸡科 7 种海参的序列,以紫球海胆 (*Strongylocentrotus purpuratus*) 为外群,基于 16S rRNA 和 COI 2 个基因片段构建 NJ 和 ME 系统树 (图 4、图 5)。在 2 个基因片段中,来自不同地区的刺参首先聚在一起,再和拟刺参属的 2 种海参聚

为一支。海参科海参属的 3 种海参聚为一支, 瓜参科瓜参属的 2 种海参聚为一支。基于 2 种基因片段构建的系统树稍有不同, 16S rRNA 基因片段构建的系统树中, 刺参科与枝手目的瓜参科以及沙子

鸡科的海参聚在一起, 再与海参科的海参聚类; 而 COI 基因片段构建的系统树中, 各个种类分为两大支: 海参科和瓜参科、沙子鸡科的海参聚为一支, 刺参科的海参聚为一支。

<i>A. ja1</i>	CCCACGAATG AAAAAAATGA GATTTTGACT AATACCTCCC TCCTTCATTC TTCTTCTTGC CTCTGCAGGA GTTGAAAGAG	80
<i>A. ja2</i>		
<i>A. ja3</i>		
<i>A. ja4</i>		
<i>H. fus</i>	..T.....C.....G...C..A...T...C...A...C...C...A.....	
<i>C. fro</i>	..T.....C.....C.....A...T...C...C...A...C...A.....	
<i>M. int</i>	C...T...G...T...A...A...C...C...A...C...C.....	
<i>A. ja1</i>	GGGCCGGAAC AGGGTGAACA ATTTACCCCC CACTCTCAAG CAATATTGCC CACGCAGGAG GATCTGTTGA CCTAGCTATT	160
<i>A. ja2</i>		
<i>A. ja3</i>	T..T...C.....G.....	
<i>A. ja4</i>	T.....G.....	
<i>H. fus</i>	..A..TA.....C.....T...A...T...G...C...A...A...A...T...G...T...A...A...G...C...C	
<i>C. fro</i>	A.....C...A.....C...C.....T...A.....A...A...C.....A.....T...T...G...C	
<i>M. int</i>	..A...T...T...T.....A.....T...C...AG...A...A...T...T...C...A...A...TT...C...A	
<i>A. ja1</i>	TTTTCACTAC ACTTGGCTGG TGCCTCCTCA ATTCTAGCTT CCATAAAATT CATAACCACA ATTATTAATA TGCGGACTCC	240
<i>A. ja2</i>	G.....	
<i>A. ja3</i>	C.....	
<i>A. ja4</i>		
<i>H. fus</i>	..C...C...C...A...A...G...T...C...T...C...A...C...C...C...A...C...C...A...C...	
<i>C. fro</i>	..C...C...T...C...A...A...A...T...A...T...T...A...T...T...A...A...A...GC...	
<i>M. int</i>	..C...CT...C...A...A...G...A...T...T...C...C...A...A...T...A...A...A...CT...A...	
<i>A. ja1</i>	GGGGATAACT TTTGATCGAC TTCCCTTATT CGTGTGATCC GTATTATATAA CTGCTATTCT TTTACTTCTG AGCCTTCCAG	320
<i>A. ja2</i>		
<i>A. ja3</i>		
<i>A. ja4</i>		
<i>H. fus</i>	..A...AG...C...C...A...TC...G...C...G...T...G...A...AT...C...AC...A...A...A...G...	
<i>C. fro</i>	..A...G...C...C...G...C...T...A...A...A...A...T...C...A...CT...C...C...C...T...T...C...	
<i>M. int</i>	..A...A...GC...C...CT...AT...C...C...A...C...C...T...A...AT...C...C...T...T...	
<i>A. ja1</i>	TACTAGCTGG AGCCATAACG ATGTTACTAA CGGACCGTAA AATTAAAAACA ACTTTTTTTTG ACCCAGCAGG TGGAGGAGAC	400
<i>A. ja2</i>	G.....	
<i>A. ja3</i>		
<i>A. ja4</i>	T.....	
<i>H. fus</i>	..C...A...A...T...C...C...C...C...A...C...T...C...A...C...C...A...A...A...	
<i>C. fro</i>	..C...A...A...A...C...C...C...A...A...C...C...T...T...A...C...C...C...A...A...T	
<i>M. int</i>	..T...G...C...A...A...A...C...C...A...A...A...A...A...A...A...A...A...	
<i>A. ja1</i>	CCAATATTGT TTCAACACTT GTTCTGATTC TTCGGACACC CAGAAGTTTA TATTTTAATA CTACCTGGAT TTGGTATGAT	480
<i>A. ja2</i>	T.....	
<i>A. ja3</i>		
<i>A. ja4</i>		
<i>H. fus</i>	..T...TC...C...G...T...A...T...T...T...T...A...C...AC...T...A...	
<i>C. fro</i>	..T...C...C...C...C...A...T...T...C...T...A...CC...T...C...C...A...	
<i>M. int</i>	C...A...C...C...C...C...C...C...A...C...CC...T...C...A...C...C...C...	
<i>A. ja1</i>	CTCTCACGTT ATAGCACATT ATAGAGGTAA GCAAGAACCC TTCGGTTATT TAGGTATGG	539
<i>A. ja2</i>		
<i>A. ja3</i>		
<i>A. ja4</i>		
<i>H. fus</i>	T.....A...C...C...C...A...A...A...A...CC...A...	
<i>C. fro</i>	A...A...A...C...C...A...G...A...T...G...CC...A...	
<i>M. int</i>	A...A...T...T...T...C...C...T...T...T...C...A...A	

图 2 海参个体 COI 基因片段的核苷酸序列比较

缩写种名见表 1.

Fig. 2 Aligned nucleotide sequence of the COI gene from 7 individuals of sea cucumber

Abbreviations of species are Shown in table 1.

<i>A. ja1</i>	PRMKKMSFWL MPPSFILLLA SAGVESGAGT GWTIYPLSS NIAHAGGSVD LAIFSLHLAG ASSILASMKF MTTIKMRT	80
<i>A. ja2</i>		
<i>A. ja3</i>		
<i>A. ja4</i>		
<i>H. fus</i>	...N... V... ..V... ..M... ..KM... ..N... ..M... ..N...	
<i>C. fro</i>	...N... ..K... ..L... ..K... ..I... ..Y... ..S...	
<i>M. int</i>	...V... ..M... ..A... ..K... ..S... ..M... ..I... ..MM... ..S...	
<i>A. ja1</i>	GMTEDRIPLF VWSVFMTAIL LLLSLPVLAG AMTMLLTDK IKTTFFDPAG GGDPMLEQHL FWFEGHPEVY ILMIPGFGMI	160
<i>A. ja2</i>		
<i>A. ja3</i>		
<i>A. ja4</i>		
<i>H. fus</i>	...V... ..F... ..N... ..N... ..I... ..M... ..I...	
<i>C. fro</i>	...V... ..I... ..F... ..N... ..S... ..M... ..I... ..M...	
<i>M. int</i>	...S... ..S... ..I... ..F... ..M... ..I... ..I... ..M...	
<i>A. ja1</i>	SHVMHHYSGK QEPFGYLG	179
<i>A. ja2</i>		
<i>A. ja3</i>		
<i>A. ja4</i>		
<i>H. fus</i>	...I... ..	
<i>C. fro</i>		
<i>M. int</i>	...I... ..	

图3 海参个体 COI 片段氨基酸序列比较
缩写种名见表1.

Fig. 3 Aligned amino acid sequences of the COI from 7 individuals of sea cucumber
Abbreviations of species are shown in table 1.

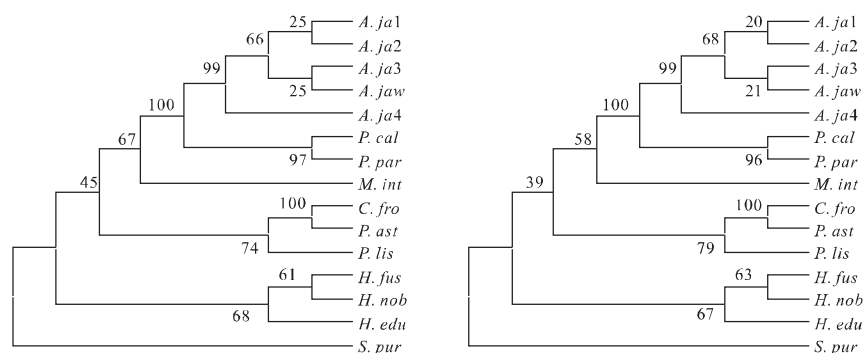


图4 基于海参 16S rRNA 基因片段的 NJ 和 ME 系统树
节点处数值表示 Bootstrap 1 000 次重复抽样检测结果; *S. pur*: 紫球海胆; 缩写种名见表1.

Fig. 4 NJ and ME trees based on the 16S rRNA gene fragments of sea cucumber
Numbers on the node represent percentage of 1 000 bootstrap replications; *S. pur*: *Strongylocentrotus purpuratus*; abbreviations of species are shown in table 1.

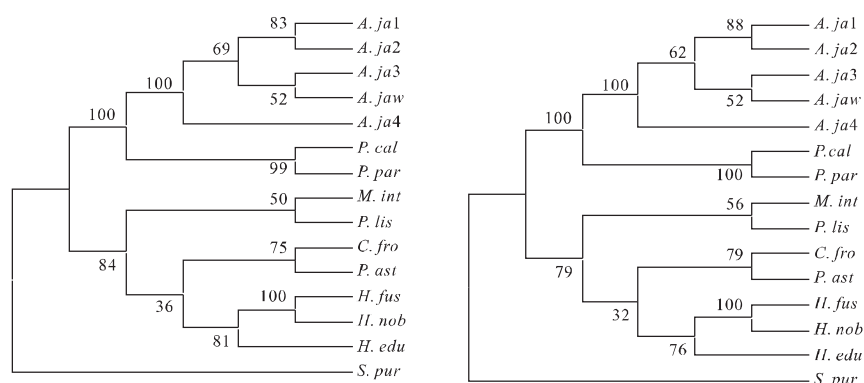


图5 基于4种海参 COI 基因片段的 NJ 和 ME 系统树
节点处数值表示 Bootstrap 1 000 次重复抽样检测结果; *S. pur*: 紫球海胆; 缩写种名见表1.

Fig. 5 NJ and ME trees based on COI gene fragments of 4 species of sea cucumber
Numbers on the node represent percentage of 1 000 bootstrap replications; *S. pur*: *Strongylocentrotus purpuratus*; abbreviations of species are shown in table 1.

3 讨论

3.1 4种海参16S rRNA、COI基因片段的序列比较

本研究的 COI 基因序列中,长岛和荣成、俄罗斯、日本刺参间分别存在 1、3 和 7 个转换位点。由于样品数量所限,不能对各个地区种群的差异做更进一步的分析,但从 2 种基因片段的比较中都可以看出,日本刺参与来自其他地区的刺参相比,差异更大一些。之后的系统发生分析结果也体现了这一点。2 种基因片段体现出的刺参和黄乳海参及枝手目的 2 种海参间的序列差异都远远大于种内差异。刺参种间平均核苷酸差异数在 16S rRNA 和 COI 基因片段中分别为 1.667 和 5.166 67,而和海参科及枝手目的海参序列相比,平均核苷酸差异数分别达到 33.300~54.300 和 47.700~49.300。7 只海参个体的 16S rRNA 基因片段有明显的插入和缺失,而 COI 基因片段无任何插入和缺失位点,获得的简约信息位点要比 16S rRNA 基因多。2 种基因片段的碱基组成相差不大, A+T 含量分别为 54.5%~59.6% 和 54.7%~58.8%,高于 G+C 含量。线粒体上不同基因具有不同的解析能力,同一基因在不同的物种间也具有不同的解析能力,很多研究表明,COI 序列变异大于 16S rRNA 基因,16S rRNA 基因相对来说要保守一些^[6-9]。

3.2 几种海参的系统学关系

由 16S rRNA 基因片段和 COI 基因片段构建的系统树可以看出,刺参和拟刺参属的美国红海参以极高的自展值 (bp=100) 聚在一起,体现了很近的亲缘关系。暗示分布于太平洋东西两岸的刺参和美国红海参、具疣拟刺参可能有相同的起源。总体来说,各科内的海参都首先都聚在一起,与传统形态学分类结果一致。但以往的形态学研究将刺参科和海参科归到楯手目中,瓜参科和沙子鸡科归到枝手目中,而本研究中刺参科并没有和海参科聚在一起,而是先与枝手目的瓜参科聚类。基于 16S rRNA 基因片段构建的系统树中,刺参科先与枝手目的沙子鸡科、瓜参科聚类,再与海参科聚类;基于 COI 基因片段构建的系统树中,海参科和枝手目的瓜参科、沙子鸡科聚为一支,刺参科的两个属聚为一支。基于 2 种基因片段构建的系统树都反映了同属于楯手目的刺参科和海参科之间亲缘关系较远,与传统的形态学分类不一致。Lacey 等^[6] 用 18S rRNA 基因分析了包括刺参、海参科和来自枝

手目瓜参科和沙子鸡科在内的十几种海参的系统发育关系。结果刺参也没有与同属于楯手目的海参科聚为一支,而是以较高的自展值 (bp=86) 和枝手目瓜参科以及沙子鸡科的几种海参聚在一起,与本研究中基于 16S rRNA 基因所构建系统树的趋势一致。李颖等^[7] 对刺参系统发育进行了研究,发现刺参和楯手目的种类聚在一起,符合传统形态学的分类,但其研究对象里未包括海参科的种类。另外,本研究出现的和传统分类不一致的现象,也可能是由于当选用的楯手目海参科的种类和刺参的亲缘关系较远时,分析结果容易受到内类群取样偏差的影响。关于内类群的数目,目前大多数分子系统学家认为,当所分析的序列长度一定时,尽量选择较多的分类群有助于获得更准确的结论^[12-13]。关于海参科与刺参科的亲缘关系还有待于更进一步研究,随着研究中所涉及的种类数目的增多,对海参系统进化关系的认识可能会更加接近真实的情况。

参考文献:

- [1] Smiley S. Holothuroidea [M]//Harrison F W, Chia F S. Microscopic anatomy of invertebrates, Echinodermata. New York: Wiley-Liss, 1994, 14: 401-471.
- [2] Pawson D L, Fell H B. A revised classification of the dendrochirote holothurians [J]. Breviora, 1965, 214: 1-7.
- [3] Conand C, Byrne M. A review of recent developments in the world sea cucumber fisheries [J]. Mar Fish Rev, 1993, 55(4): 1-131.
- [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] Kerr A M, Kim J. Phylogeny of Holothuroidea (Echinodermata) inferred from morphology [J]. Zool J Linn Soc, 2001, 133: 63-81.
- [6] Lacey K M J, McCormack G P, Keegan B F, et al. Phylogenetic relationships within the class Holothuroidea inferred from 18S rRNA gene data [J]. Mar Biol, 2005, 147: 1-149-1-154.
- [7] 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]. 海洋与湖泊, 2006, 37(2): 143-153.
- [8] Saavedra C, Peña J B. Phylogenetic relationships of commercial European and Australasian king scallops (*Pecten spp.*) based on partial 16S ribosomal RNA gene sequences [J]. Aquaculture, 2004, 235: 153-166.
- [9] Nguyen T T T, Ingram B, Sungan S, et al. Mitochondrial DNA

- diversity of broodstock of two indigenous mahseer species, *Tor tambroides* and *T. douronensis* (Cyprinidae) cultured in Sarawak, Malaysia [J]. *Aquaculture*, 2006, 253: 259–269.
- [10] 王鹭骁,柯才煊,王志勇,等. 中国沿岸几种鲍线粒体 16S rRNA 基因片段序列比较及鲍属系统发育 [J]. *中国水产科学*, 2006, 13(2): 167–173.
- [11] 周发林,江世贵,苏天凤,等. 6 种笛鲷属鱼类线粒体 16S rRNA 基因片段序列的比较 [J]. *中国水产科学*, 2004, 11(2): 99–103.
- [12] Pollock D D, Zwickl D J, McGuire J A, et al. Increased taxon sampling is advantageous for phylogenetic inference [J]. *Systematic Biol*, 2002, 51(4): 664–671.
- [13] Derrick J, Hillis D M. Increased taxon sampling greatly reduces phylogenetic error [J]. *Systematic Biol*, 2002, 51(4): 588–598.

Sequence analysis of mitochondrial 16S rRNA and COI gene and molecular phylogeny of four species of sea cucumber

CHEN Li-mei, LI Qi, LI Yun

(Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: 500 bp 16S rRNA and 540 bp COI fragment were obtained by PCR method from four species of sea cucumber, *Apostichopus japonicus*, *Holothuria fuscogilva*, *Cucumaria frondosa* and *Mensamaria intercedens*. Variable sites, nucleotide diversity, average number of nucleotide differences and average number of nucleotide substitutions per site were calculated to analyze sequence difference. Phylogenetic trees were constructed by NJ and ME methods. As a result, the biggest intra-species difference was found between individual *A. japonicus* from Changdao and Japan while the least between those from Changdao and Rongcheng. Differentiation between *A. japonicus* and other three species was higher than that within *A. japonicus*. NJ and ME phylogenetic trees based on 16S rRNA and COI gene both show that *Apostichopus* and *Parastichopus* were closely related, which indicates the two genera may have a common origin. *Holothuriidae* doesn't cluster with *Stichopodidae* but cluster with *Cucumariidae* and *Phyllophoridae*, which is different from the result of morphological taxon. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(6): 935–942]

Key words: sea cucumber; 16S rRNA gene; COI gene; sequence comparison; phylogenetic analysis

Corresponding author: LI Qi. E-mail: qili66@ouc.edu.cn