

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2019.18139

中国 13 种海参系统发育和骨片演化分析

李晓萌¹, 肖宁², 曾晓起¹, 姚旺¹

1. 中国海洋大学生物多样性与进化研究所, 山东 青岛 266003;

2. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266003

摘要: 运用扫描电子显微镜观察了中国沿海 13 种代表性海参的骨片, 并获得了 8 种海参的线粒体 16S rDNA 基因序列, 通过整合网上序列联合分析以期了解 13 种海参的系统发育关系和骨片演化规律。结果表明, 13 种海参的骨片包括桌形体、假桌形体、扣状体、杆状体、穿孔板、花纹样体、颗粒体 7 种类型; 8 种海参的 16S rDNA 片段长度在 465 bp 左右, 富含 AT 碱基, A+T 的含量平均为 55.8%, 符合无脊椎动物线粒体 DNA 序列的特征。从 GenBank 中获取 11 种海参 16S rDNA 基因序列, 以杂色角孔海胆(*Salmacis sphaeroides*)为外群, 联合本研究中所测序列构建了 NJ 和 ME 系统树。结果表明, NJ、ME 系统发育树基本一致, 海参科(Holothuriidae)内, 柄体参属(*Labidodemas*)与海参属(*Holothuria*)亲缘关系极近且骨片形态均相似, 可划分为同一个属; 与传统形态学分类不同, 刺参科(Stichopodidae)同尻参科(Caudinidae)、沙鸡子科(Phyllophoridae)、硬瓜参科(Sclerodactylidae)、瓜参科(Cucumariidae)聚成一簇, 而与海参科亲缘关系较远, 符合最新分类系统。本研究根据 NJ 和 ME 系统发育树结果, 结合海参骨片的形态学资料, 对海参科内骨片的演化进行了分析, 认为虽然桌形体的进化史尚不清晰, 但在海参科内, 海参骨片由复杂的桌形体、扣状体向简单的花纹样体和颗粒体演化。

关键词: 海参纲; 骨片; 16S rDNA; 系统发育; 骨片演化

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2019)03-0416-11

海参纲(Holothuroidea)隶属于棘皮动物门(Echinodermata), 在海洋中分布广泛, 全世界约有 1400 种^[1], 中国共有 15 科 58 属 147 种^[2], 以印度-西太平洋区系种类为主。中国有 21 种可供食用^[3], 除仿刺参(*Apostichopus japonicus*)分布于北方黄渤海域, 其余 20 种可食用海参均分布于中国东海与南海。海参中含有丰富的氨基酸、胶原蛋白以及多种人体所需的微量元素, 具有多种生理药理活性^[4-5], 有很高的经济价值和开发潜力。

海参骨片是埋藏于海参真皮表层的内骨骼, 是海参的重要分类特征。廖玉麟^[6]记录描绘了中国 134 种海参的外形及骨片。赵世民^[7]描述了台湾沿岸潮间带 30 种海参及骨片的超显微结构。李赞等^[8]的研究结果表明仅通过比较海参背部真皮

层的骨片来鉴定海参是可行的。

随着研究的不断深入, 人们对海参纲分类系统的认识也在转变。基于形态学特征分为 6 个目: 平足目(Elasipodida)、楯手目(Aspidochirotida)、枝手目(Dendrochirotida)、指手目(Dactylochirotida)、芋参目(Molpadida)、无足目(Apodida)。近年来随着分子生物学的发展, 从分子水平研究物种分类及系统发育成为必要且有效的手段。Miller 等^[9]的研究结果表明传统分类系统中的楯手目并非单系, 提出了新的分类系统, 将海参纲重新划分为 7 个目: 枝手目、辛那参目(Synallactida)、芋参目、Persiculida(尚无中文名)、海参目(Holothuriida)、平足目、无足目, 停止使用楯手目和指手目。

线粒体 DNA 由于分子量小, 且广泛地分布于

收稿日期: 2018-04-25; 修订日期: 2018-05-27.

基金项目: 山东省自然科学基金项目(ZR2017MD033); 中央高校基本科研业务费专项(201762017).

作者简介: 李晓萌(1994-), 男, 硕士研究生, 从事海参纲的形态学和分子系统学研究. E-mail: lxmszy00@163.com

通信作者: 曾晓起, 教授. E-mail: zengxq@ouc.edu.cn

细胞中, 拷贝数量极大, 非常易于分离纯化, 可作为物种系统发育分析的有效分子标记。基于 16S rRNA 基因片段, 能有效区分海参的种类^[10], 并对海参的亲缘关系和骨片演化进行分析^[11-13]。本研究基于海参线粒体 16S rDNA 基因, 分析不同海参间的亲缘关系, 对基于形态学特征和分子水平的两套分类系统进行比较; 并应用扫描电子显微镜对其骨片进行观察, 探讨海参科内骨片的

演化过程。

1 材料与方法

1.1 实验材料

选用 13 种海参, 均为完整的海参个体, 用无水乙醇固定后带回实验室进行形态鉴定, 根据形态特征判定这 13 种海参分别属于海参科、刺参科和硬瓜参科, 基本信息见表 1。

表 1 13 种海参的分类及样品信息
Tab. 1 Basic information of 13 species of sea cucumbers in this study

分类地位 taxonomy	种 species	缩写 abbreviation	采集地 locality
海参科 Holothuriidae			
辐肛参属 <i>Actinopyga</i>	子安辐肛参 <i>Actinopyga lecanora</i>	Act.lec	西沙群岛 Xisha Islands
白尼参属 <i>Bohadschia</i>	蛇目白尼参 <i>Bohadschia argus</i>	B.arg	西沙群岛 Xisha Islands
柄体参属 <i>Labidodemas</i>	明柄体参 <i>Labidodemas pertinax</i>	L.per	永兴岛 Yongxing Island
海参属 <i>Holothuria</i>	红腹海参 <i>Holothuria edulis</i>	H.edu	西沙群岛 Xisha Islands
	棕环海参 <i>Holothuria fuscocinerea</i>	H.fus	西沙群岛 Xisha Islands
	玉足海参 <i>Holothuria leucospilota</i>	H.leu	永兴岛 Yongxing Island
	虎纹海参 <i>Holothuria pervicax</i>	H.per	西沙群岛 Xisha Islands
	黑赤星海参 <i>Holothuria cinerascens</i>	H.cin	西沙群岛 Xisha Islands
	沙海参 <i>Holothuria arenicola</i>	H.are	永兴岛 Yongxing Island
	黄疣海参 <i>Holothuria hilla</i>	H.hil	永兴岛 Yongxing Island
皮氏海参属 <i>Pearsonothuria</i>	格皮氏海参 <i>Pearsonothuria graeffei</i>	Pe.gra	西沙群岛 Xisha Islands
刺参科 Stichopodidae			
仿刺参属 <i>Apostichopus</i>	仿刺参 <i>Apostichopus japonicus</i>	Ap.jap	大连 Dalian
硬瓜参科 Sclerodactylidae			
硬瓜参属 <i>Sclerodactyla</i>	丛足硬瓜参 <i>Sclerodactyla multipes</i>	Sc.mul	胶州湾 Jiaozhou Bay

注: 种名缩写通用于本文。
Note: The abbreviations for species are identically used in the paper.

1.2 骨片制备与观察

骨片制备的通用方法: 从海参与体壁切取 1 cm²×1 mm 的体壁组织, 每个样品重复取样 3 次, 用蒸馏水洗净, 吸水纸吸干水分, 置于 1.5 mL 离心管中, 滴加 1 mL 10% NaClO 溶液消化 60 s 左右, 挑出未消化的组织块, 待骨片沉淀完全, 吸去上层溶液, 滴加蒸馏水重复漂洗 5 次。充分漂洗后, 待骨片沉淀完全, 吸去上层溶液, 滴加无水乙醇漂洗 2 次。

吸取骨片悬液, 小心滴加在胶膜上, 烘干至酒精完全挥发, 喷金后通过扫描电子显微镜进行观测拍照。

1.3 DNA 的提取、扩增、测序

在无菌条件下, 切取海参与本体壁组织

30 mg 左右, 用超纯水洗净, 无菌纸吸干水分, 使用组织 DNA 提取试剂盒提取样品 DNA, 试剂盒品牌为 OMEGA, 所得 DNA -20℃ 保存。

以基因组 DNA 模板, 参照无脊椎动物 16S rDNA 基因片段的通用引物^[12]16Sar: 5'-CGCCTGTTTAACAAAAACAT-3', 16Sbr: 5'-CCGGTCTGA ACTCAGATCATG-3'进行 PCR 扩增, 引物经北京擎科新业生物技术有限公司合成。

PCR 反应的总体积为 20 μL, 含 ddH₂O 8 μL, Mix 10 μL, 引物各 0.8 μL, 模板 DNA 0.4 μL, 所用 Mix 为北京擎科新业生物技术有限公司青岛分公司提供, 浓度为 2×。PCR 反应程序如下: 94℃ 预热 5 min; 94℃ 变性 30 s, 52℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 2 min, 经 42 个循环; 72℃ 延伸 10 min。反应结束

后, 制取 1.5%琼脂糖凝胶, 用 GelRed 进行染色, 取 3 μ L 产物进行凝胶电泳检测, 基于凝胶成像来检测 PCR 产物, 根据情况对 PCR 产物纯化。产物送至北京擎科新业生物技术有限公司进行双向测序。

1.4 数据处理

双向测序后用 DNASTAR 和 Clustal X 软件进行拼接和比对, 应用 DNAsp5 软件计算单态位点、多态位点和插入缺失位点等, MEGA 5.0 软件分析

碱基组成。为分析实验所用的 13 种海参与其他海参之间的同源性和系统发生关系, 从 GenBank 上选取了海参科、刺参科、瓜参科、沙鸡子科、尻参科的 11 种海参的 16S rDNA 序列作为参照(表 2), 比较遗传距离, 并以杂色角孔海胆作外群, 采用邻接法(NJ)和最小进化法(ME)构建系统树, 通过 MEGA 5.0、PAUP 4.0 软件处理, 对所得系统树进行自展法检验(1000 次重复)。

表 2 来自 GenBank 中的 11 种海参的基本信息
Tab. 2 List of 11 species of sea cucumbers from GenBank

分类地位 taxonomy	种 species	缩写 abbreviation	GenBank 序列号 GenBank accession no.
海参科 Holothuriidae			
白尼参属 <i>Bohadschia</i>	蛇目白尼参 <i>Bohadschia argus</i>	B.arg	JN543427
柄体参属 <i>Labiodemas</i>	明柄体参 <i>Labiodemas pertinax</i>	L.per	KX856784
海参属 <i>Holothuria</i>	棕环海参 <i>Holothuria fuscocinerea</i>	H.fus	JN207560
皮氏海参属 <i>Pearsonothuria</i>	格皮氏海参 <i>Pearsonothuria graeffei</i>	Pe.gra	KX856786
刺参科 Stichopodidae			
仿刺参属 <i>Apostichopus</i>	仿刺参 <i>Apostichopus japonicus</i>	Ap.jap	KU183662
等刺参属 <i>Isostichopus</i>	慢步等刺参 <i>Isostichopus badionotus</i>	I.bad	KX856756
刺参属 <i>Stichopus</i>	糙刺参 <i>Stichopus horrens</i>	St.hor	MF496206
梅花参属 <i>Thelenota</i>	巨梅花参 <i>Thelenota anax</i>	T.ana	KX856751
瓜参科 Cucumariidae			
翼手参属 <i>Colochirus</i>	强壮翼手参 <i>Colochirus robustus</i>	C.rob	KX856781
沙鸡子科 Phyllophoridae			
怀玉参属 <i>Phyrella</i>	莫氏怀玉参 <i>Phyrella mookiei</i>	Ph.moo	KX856777
尻参科 Caudinidae			
海地瓜属 <i>Acaudina</i>	海地瓜 <i>Acaudina molpadioides</i>	Aca.mol	KX856743

2 结果与分析

2.1 13 种海参骨片的种类

13 种海参体壁内骨片的主要样式包括桌形体(图 1 a-j)、假桌形体(图 1 k)、扣状体(图 2)、杆状体(图 3 a-c)、穿孔板(图 3 d-e)、花纹样体(见图 4 a-c)和颗粒体(图 4 d), 各海参骨片类型具体见表 3。

对 13 种海参骨片的观察发现, 同属的海参骨片有一定共性, 如海参属的 7 种海参均具有桌形体, 其中红腹海参(*Holothuria edulis*)、棕环海参(*Holothuria fuscocinerea*)、玉足海参(*Holothuria leucospilota*)、沙海参(*Holothuria arenicola*)、黄疣海参(*Holothuria hilla*)均具有扣状体, 而虎纹海参(*Holothuria pervicax*)和黑赤星海参(*Holothuria*

cinerascens)则均具有杆状体。同时, 不同种海参的同类型骨片亦有所差异, 棕环海参、虎纹海参、仿刺参成年个体的桌形体塔部退化, 仅残留基部, 而其余具桌形体的海参桌形体塔部均存在; 棕环海参扣状体穿孔数较少, 红腹海参扣状体边缘有突起。不同属的海参之间骨片有较大差异, 如格皮氏海参(*Pearsonothuria graeffei*)所特有的假桌形体。以上结果进一步证明了骨片可作为海参种类鉴定的有效鉴别特征。

观察中还发现, 仿刺参幼体中桌形体塔部较高(图 1i2), 而成年个体的桌形体塔部则退化变低或消失(图 1i1); 棕环海参、虎纹海参桌形体塔部退化, 多数只残留基部(图 1c 和图 1e); 棕环海参扣状体简单, 穿孔数少(图 2b); 虎纹海参杆状体

两侧有分支(图 3a)。子安辐肛参和蛇目白尼参花纹样体较为简单(图 4a, 图 4b), 而格皮氏海参花纹样体较为复杂(图 4c), 蛇目白尼参颗粒体为具有 2~3 个小穿孔的饼干型颗粒体(图 4d)。

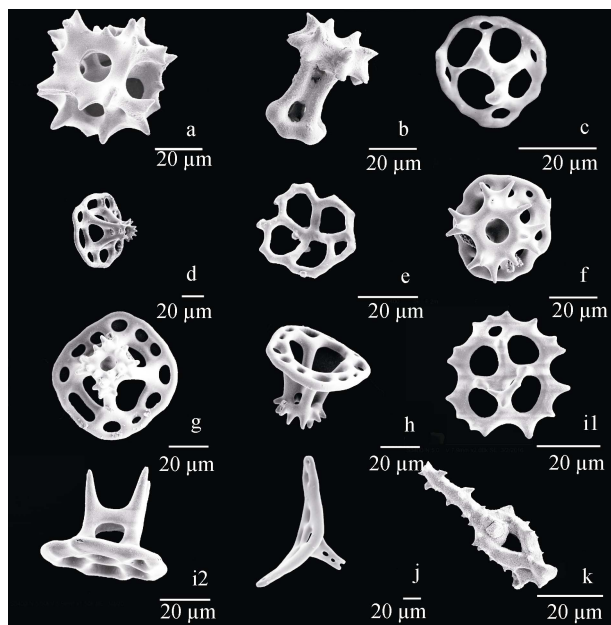


图 1 10 种海参桌形体(a-j)及格皮氏海参假桌形体(k)扫描电镜图

a: 明柄体参; b: 红腹海参; c: 棕环海参; d: 玉足海参;
e: 虎纹海参; f: 黑赤星海参; g: 沙海参; h: 黄疣海参;
i1-i2: 仿刺参; j: 丛足硬瓜参; k: 格皮氏海参。

Fig. 1 Type tables (a-j) of 10 sea cucumbers and pseudo table (k) of *Pearsonothuria graeffei* (SEM photographs)

a: *Labidodemas pertinax*; b: *Holothuria edulis*; c: *Holothuria fuscocinerea*; d: *Holothuria leucospilota*; e: *Holothuria pervicax*; f: *Holothuria cinerascens*; g: *Holothuria arenicola*; h: *Holothuria hilla*; i1-i2: *Apostichopus japonicus*; j: *Sclerodactyla multipes*; k: *Pearsonothuria graeffei*.

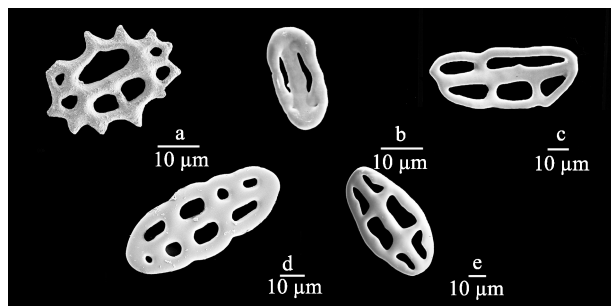


图 2 5 种海参扣状体扫描电镜图

a: 红腹海参; b: 棕环海参; c: 玉足海参;
d: 沙海参; e: 黄疣海参。

Fig. 2 Type buttons of 5 sea cucumbers (SEM photographs)
a: *Holothuria edulis*; b: *Holothuria fuscocinerea*; c: *Holothuria leucospilota*; d: *Holothuria arenicola*; e: *Holothuria hilla*.

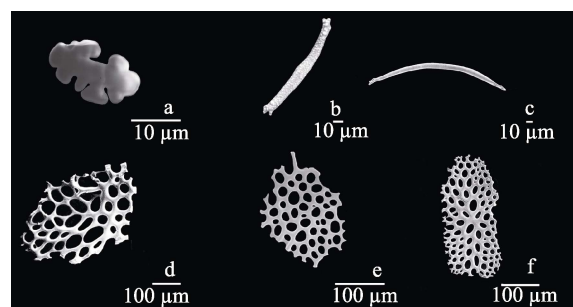


图 3 3 种海参杆状体(a-c)和 3 种海参穿孔板(d-f)扫描电镜图

a: 虎纹海参; b: 黑赤星海参; c: 仿刺参; d: 玉足海参;
e: 黑赤星海参; f: 仿刺参。

Fig. 3 Rods (a-c) of 3 sea cucumbers and plates (d-f) of 3 sea cucumbers (SEM photographs)

a: *Holothuria pervicax*; b: *Holothuria cinerascens*;
c: *Apostichopus japonicus*; d: *Holothuria leucospilota*;
e: *Holothuria cinerascens*; f: *Apostichopus japonicus*.

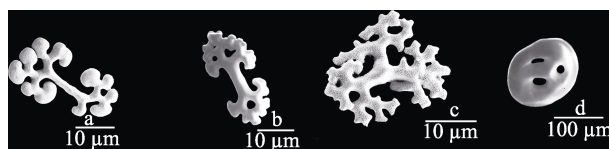


图 4 3 种海参花纹样体(a-c)和蛇目白尼参颗粒体(d)扫描电镜图

a: 子安辐肛参; b: 蛇目白尼参; c: 格皮氏海参; d: 蛇目白尼参。

Fig. 4 Type rosettes (a-c) of 3 sea cucumbers and oblate grain (d) of *Bohadschia argus* (SEM photographs)

a: *Actinopyga lecanora*; b: *Bohadschia argus*;
c: *Pearsonothuria graeffei*; d: *Bohadschia argus*.

2.2 测序结果与碱基组成

由于部分样品保存欠佳, 仅从 8 种海参中扩增出 16S rDNA 片段, 大小在 465 bp 左右, 其中玉足海参测定了 3 个样品, 存在 2 个变异位点, 定义了 3 个单倍型, 下文缩写为 H.leu1、H.leu2 和 H.leu3; 沙海参测定了 2 个样品, 存在 3 个变异位点, 定义了 2 个单倍型, 下文缩写为 H.are1 和 H.are2; 黄疣海参和丛足硬瓜参(*Sclerodactyla multipes*)测定了 2 个样品, 均只有一个单倍型; 其他 4 种海参测定了 1 个样品。序列递交到 GenBank 数据库, 序列号见表 4。8 种海参 16S rDNA 部分序列的比对结果表明, 在比对的 446 个位点中, 单态位点 253 个, 多态位点 163 个, 其中简约信息位点 105 个, 插入缺失位点 30 个。

表 3 13 种海参骨片类型
Tab. 3 Ossicles composition of 13 species of sea cucumber

种 species	骨片类型 composition of ossicles
明柄体参 <i>Labidodemas pertinax</i>	桌形体 table
丛足硬瓜参 <i>Sclerodactyla multiples</i>	桌形体 table
红腹海参 <i>Holothuria edulis</i>	桌形体, 扣状体 table, button
棕环海参 <i>Holothuria fuscocinerea</i>	桌形体, 扣状体 table, button
沙海参 <i>Holothuria arenicola</i>	桌形体, 扣状体 table, button
黄疣海参 <i>Holothuria hilla</i>	桌形体, 扣状体 table, button
玉足海参 <i>Holothuria leucospilota</i>	桌形体, 扣状体, 穿孔板 table, button, plate
虎纹海参 <i>Holothuria pervicax</i>	桌形体, 杆状体 table, rod
黑赤星海参 <i>Holothuria cinerascens</i>	桌形体, 杆状体, 穿孔板 table, rod, plate
仿刺参 <i>Apostichopus japonicas</i>	桌形体, 杆状体, 穿孔板 table, rod, plate
格皮氏海参 <i>Pearsonothuria graeffei</i>	假桌形体, 花纹样体 pseudo table, rosette
子安辐肛参 <i>Actinopyga lecanora</i>	花纹样体 rosette
蛇目白尼参 <i>Bohadschia argus</i>	花纹样体, 颗粒体 rosette, oblate grain

表 4 8 种海参 16S rDNA 基因 GenBank 序列号、片段长度和碱基组成
Tab. 4 Accession no., lengths and base contents of 16S rDNA gene fragments

种 species	GenBank 序列号 GenBank accession no.	碱基组成/% base content					碱基数/bp length
		T	C	A	G	A+T	
子安辐肛参 <i>Actinopyga lecanora</i>	MG586788	26.1	21.4	30.3	22.1	56.4	429
红腹海参 <i>Holothuria edulis</i>	MG586789	25.6	22.4	30.5	21.5	56.1	433
玉足海参 1 <i>Holothuria leucospilota</i> 1	MG586790	23.7	23.7	30.4	22.1	54.1	434
玉足海参 2 <i>Holothuria leucospilota</i> 2	MG586791	23.5	24.0	30.4	22.1	53.9	434
玉足海参 3 <i>Holothuria leucospilota</i> 3	MG586792	23.5	24.0	30.4	22.1	53.9	434
虎纹海参 <i>Holothuria pervicax</i>	MG586793	25.5	19.7	33.3	21.6	58.7	436
黑赤星海参 <i>Holothuria cinerascens</i>	MG586794	23.7	24.2	29.5	22.6	53.3	430
沙海参 1 <i>Holothuria arenicola</i> 1	MG586795	25.5	23.4	30.0	21.1	55.5	427
沙海参 2 <i>Holothuria arenicola</i> 2	MG586796	25.1	23.9	29.7	21.3	54.8	427
黄疣海参 <i>Holothuria hilla</i>	MG586797	22.8	23.7	31.6	21.9	54.4	434
丛足硬瓜参 <i>Sclerodactyla multiples</i>	MG586798	28.2	19.5	34.1	18.2	62.3	440
平均值 mean		24.8	22.7	30.9	21.5	55.8	432.5

碱基组成分析(表 4)表明, 8 种海参序列中, T 碱基和 A 碱基含量均较高, A+T 含量均高于 C+G 含量, 平均值为 55.8%, 符合无脊椎动物线粒体 DNA 序列的特征。其中, 硬瓜参科的丛足硬瓜参 A+T 含量为 62.3%, 远高于海参科的 7 种海参。

2.3 遗传距离

为分析实验所用海参与其他海参之间的同源性和系统发生关系, 从 GenBank 上选取了海参科、刺参科、瓜参科、沙鸡子科、尻参科的 11 种海参的 16S rDNA 序列作为参照(表 2), 与本实验

获得的 8 种海参的 16S rDNA 共同进行分析, 得到各序列间的遗传距离(表 5)。

遗传距离分析结果表明, 同一种海参之间的遗传距离最近, 为 0.000~0.005, 这一结果说明, 16S rDNA 的遗传稳定性相当高, 可有效区分不同种海参。不同种海参间遗传距离差别很大, 遗传距离在 0.075~0.346; 海参属内遗传距离为 0.075~0.179, 海参科内不同属之间遗传距离为 0.121~0.238; 海参科内遗传距离为 0.075~0.238, 海参科和刺参科之间的遗传距离为 0.226~0.312。

表 5 基于 16S rDNA 序列片段的 19 种海参种间遗传距离
Tab. 5 Genetic distances of 19 sea cucumber species based on sections of 16S rDNA

种名缩写 abbreviation of species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1 Act.lec		0.030	0.028	0.028	0.028	0.026	0.026	0.026	0.027	0.030	0.029	0.030	0.028	0.030	0.030	0.031	0.031	0.028	0.033	0.033	0.034	0.027
2 Barg	0.238		0.026	0.026	0.025	0.025	0.025	0.025	0.024	0.025	0.027	0.026	0.023	0.026	0.032	0.031	0.031	0.027	0.035	0.034	0.033	0.026
3 L.per	0.211	0.175		0.019	0.019	0.018	0.018	0.018	0.018	0.022	0.020	0.020	0.019	0.024	0.030	0.030	0.033	0.028	0.032	0.036	0.036	0.028
4 H.edu	0.217	0.202	0.131		0.017	0.022	0.022	0.022	0.020	0.015	0.014	0.014	0.022	0.026	0.029	0.031	0.033	0.030	0.033	0.035	0.037	0.029
5 H.fus	0.221	0.184	0.137	0.116		0.021	0.022	0.021	0.019	0.019	0.019	0.019	0.021	0.024	0.031	0.030	0.031	0.031	0.031	0.035	0.034	0.030
6 H.leu1	0.190	0.181	0.122	0.160	0.150		0.003	0.000	0.022	0.023	0.022	0.022	0.020	0.025	0.030	0.031	0.033	0.028	0.033	0.033	0.033	0.028
7 H.leu2	0.193	0.184	0.125	0.164	0.153	0.003		0.003	0.022	0.023	0.022	0.022	0.020	0.025	0.030	0.031	0.033	0.028	0.033	0.033	0.033	0.028
8 H.leu3	0.190	0.181	0.122	0.160	0.150	0.000	0.003		0.022	0.023	0.022	0.022	0.020	0.025	0.030	0.031	0.033	0.028	0.033	0.033	0.033	0.028
9 H.per	0.191	0.177	0.121	0.143	0.128	0.165	0.169	0.165		0.021	0.020	0.020	0.019	0.023	0.032	0.030	0.032	0.029	0.031	0.035	0.034	0.028
10 H.cin	0.233	0.182	0.160	0.095	0.143	0.175	0.179	0.175	0.165		0.017	0.017	0.020	0.025	0.032	0.032	0.032	0.034	0.035	0.036	0.038	0.031
11 H.arel	0.225	0.198	0.140	0.078	0.128	0.164	0.167	0.164	0.137	0.104		0.003	0.022	0.023	0.032	0.033	0.033	0.032	0.035	0.037	0.034	0.030
12 H.arel2	0.229	0.195	0.137	0.075	0.128	0.167	0.170	0.167	0.140	0.111	0.005		0.022	0.023	0.032	0.033	0.032	0.032	0.035	0.036	0.035	0.030
13 H.hil	0.210	0.159	0.140	0.171	0.152	0.133	0.136	0.133	0.142	0.149	0.161	0.161		0.023	0.031	0.031	0.031	0.030	0.032	0.033	0.034	0.029
14 Pe.gra	0.215	0.188	0.198	0.219	0.198	0.191	0.194	0.191	0.178	0.206	0.187	0.191	0.181		0.034	0.035	0.034	0.031	0.033	0.037	0.034	0.032
15 Ap.jap	0.240	0.297	0.259	0.244	0.270	0.265	0.269	0.265	0.273	0.285	0.274	0.274	0.283	0.303		0.025	0.027	0.022	0.035	0.032	0.028	0.023
16 L.bad	0.261	0.284	0.271	0.285	0.256	0.277	0.280	0.277	0.255	0.289	0.286	0.286	0.277	0.312	0.165		0.018	0.028	0.032	0.037	0.030	0.027
17 St.hor	0.259	0.272	0.298	0.301	0.278	0.299	0.303	0.299	0.282	0.281	0.293	0.289	0.300	0.300	0.188	0.121		0.025	0.035	0.038	0.033	0.029
18 T.ana	0.229	0.237	0.233	0.262	0.270	0.226	0.230	0.226	0.236	0.296	0.262	0.262	0.262	0.262	0.167	0.194	0.167		0.036	0.032	0.031	0.024
19 C.rob	0.287	0.314	0.291	0.291	0.265	0.302	0.305	0.302	0.269	0.315	0.318	0.318	0.294	0.295	0.280	0.297	0.331	0.308		0.030	0.031	0.032
20 Sc.mul	0.284	0.313	0.320	0.308	0.309	0.291	0.295	0.291	0.306	0.308	0.325	0.321	0.299	0.339	0.291	0.312	0.325	0.307	0.244		0.029	0.028
21 Ph.moo	0.299	0.303	0.323	0.336	0.291	0.291	0.295	0.291	0.303	0.346	0.308	0.313	0.306	0.314	0.241	0.223	0.270	0.284	0.251	0.270		0.027
22 Aca.mol	0.205	0.231	0.230	0.241	0.248	0.230	0.234	0.230	0.217	0.278	0.259	0.259	0.258	0.277	0.179	0.186	0.224	0.187	0.265	0.251	0.226	

注: 对角线左下角数据为遗传距离, 右上角数据为标准偏差. 缩写种名见表 1 和表 2.
Note: Distances in lower-left matrix, standard errors in upper-right matrix. Abbreviations of species are shown in table 1 and table 2.

2.4 分子系统发育树

根据从 GenBank 上获取的 11 种海参的 16S rDNA 序列, 与本研究获得的 8 种海参的 16S rDNA 序列片段, 以杂色角孔海胆为外群, 建立 NJ (图 5)、ME (图 6) 系统发育树。NJ、ME 系统发育树几乎完全一致, 沙海参和玉足海参各自不同的单倍型首先聚成一簇, 然后再与海参属的其余 5 种海参和柄体参属的 1 种海参聚成一簇。在科的水平上, 海参科的 11 种海参聚成一簇, 刺参科先与尻参科聚成一簇, 再与枝手目的沙鸡子科、硬瓜参科、瓜参科聚成一簇。

3 讨论

3.1 海参线粒体 16S rDNA 基因的比较

本研究扩增了 8 种海参的 16S rDNA 的部分序列, 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。

8 种海参序列中, T 碱基和 A 碱基含量均较高, A+T 含量均高于 C+G 含量, 平均值为 55.8%, 符合无脊椎动物线粒体 DNA 序列的特征。同种内个体序列完全相同或仅具极少变异位点, 远低于不同种之间的差异, 可作为区别不同种的有效手段。

从遗传距离看, 存在海参属内遗传距离大于海参科内不同属之间遗传距离, 海参科内遗传距离大于海参科和刺参科之间遗传距离的现象。海参属数目庞大, 约有 150 种, 而海参科又是海参纲内第二大科, 约有 185 种^[1]。因此, 如此庞大的类群中不同种之间存在较大的差异属于正常现象。

3.2 基于 16S rDNA 基因片段的海参分子系统发育

由 16S rDNA 基因片段构建的系统发育树可以看出, 同种海参的不同单倍型以极高的自展值

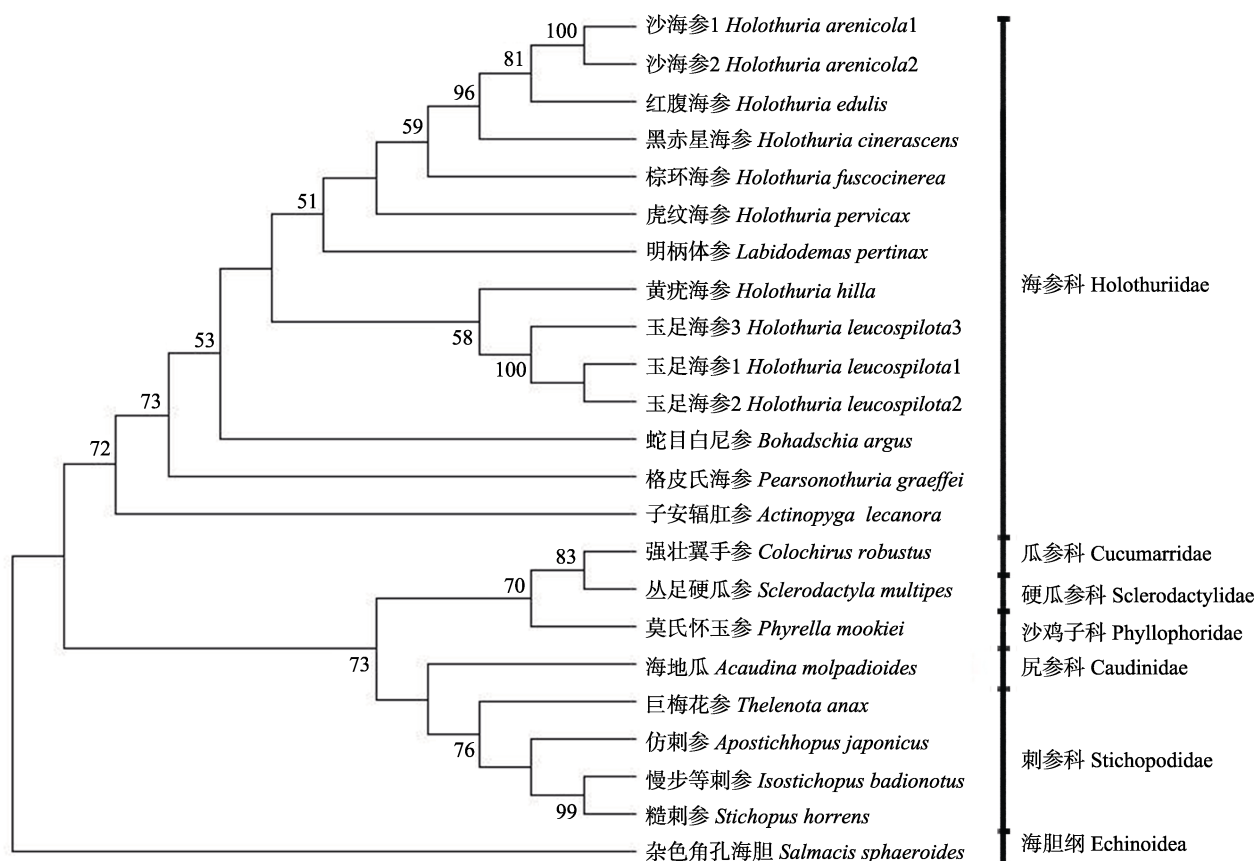


图 5 基于 16S rDNA 构建的 19 种海参 Neighbor-Joining 系统发育树

节点上的数字为 1000 次重复大于 50% 的自展值。

Fig. 5 Neighbor-Joining phylogenetic tree of 19 sea cucumbers reconstructed from 16S rDNA. Numbers on the node represent percentage of 1000 bootstrap replications above 50%.

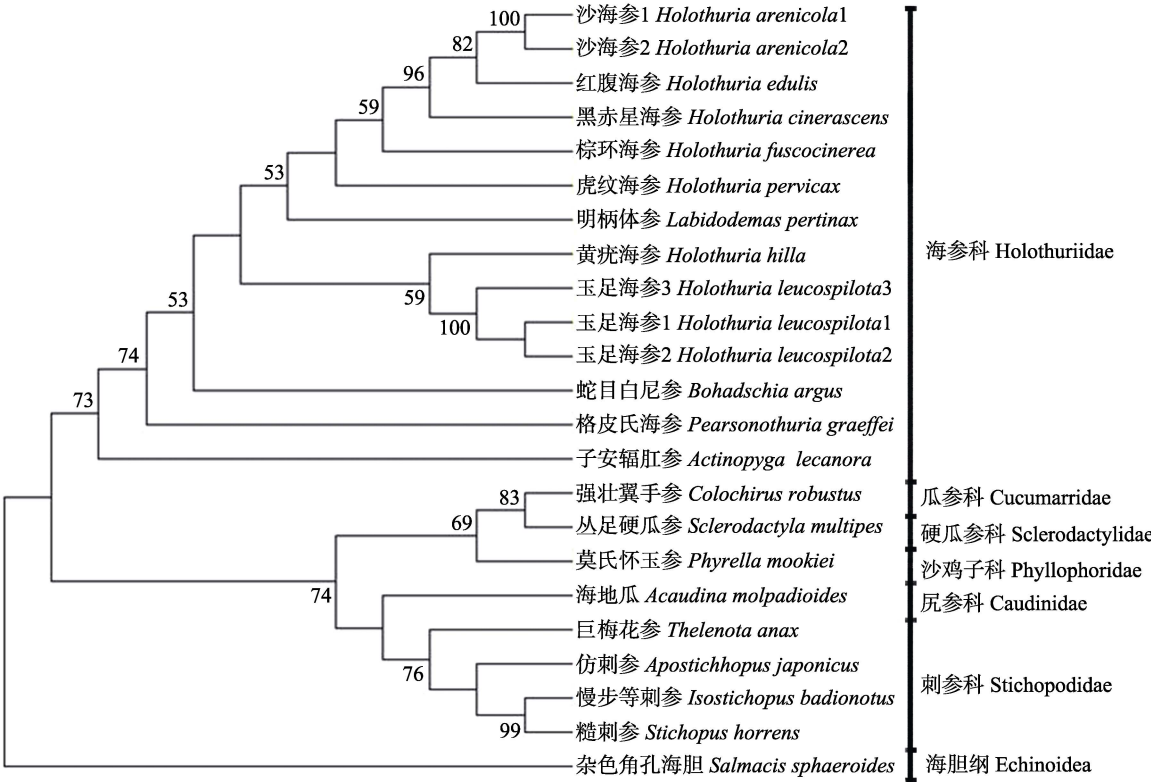


图 6 基于 16S rDNA 构建的 19 种海参 Minimum-Evolution 系统发育树
节点上的数字为 1000 次重复大于 50% 的自展值。
Fig. 6 Minimum-Evolution phylogenetic tree of 19 sea cucumbers reconstructed from 16S rDNA
Numbers on the node represent percentage of 1000 bootstrap replications above 50%.

聚在一起,体现了良好的种内保守性。传统形态学分类中,将玉足海参、虎纹海参和棕环海参同归为麦太参亚属(*Mertensiothuria*),本实验结果却表明,玉足海参与虎纹海参和棕环海参的亲缘关系较远,反而与传统形态学分类中全疣参亚属(*Thymiosycia*)的黄疣海参亲缘关系较近。严俊贤^[14]通过 16S rDNA 和 18S rDNA 分析了南海 6 种海参的系统发育,亦发现玉足海参与棕环海参亲缘关系较远,分子的分类结果与传统形态学亚属划分的不一致体现了形态学分类与分子系统分类的差异。

明柄体参(*Labidodemas pertinax*)与海参属的海参聚为一簇;明柄体参与玉足海参、黄疣海参都是蠕虫状的海参,与其他 3 个属的形态差别较大^[9];同时,明柄体参的骨片为桌形体和杆状体,与海参属差别不大,而其他 3 个属的海参以花纹样体为主,骨片类型差距很大。因此,海参科内柄体参属与海参属亲缘关系极近且骨片形态均相

似,与其他三个属明显不同,可划分为同一个属。刺参科先与尻参科聚成一簇,再与枝手目的沙鸡子科、硬瓜参科、瓜参科聚成一簇,相较刺参科,海参科与尻参科和枝手目的沙鸡子科、硬瓜参科、瓜参科亲缘关系较近。Kerr 等^[15]通过形态特征对海参进行了研究,其中,刺参科和海参科仅在是否具有发达的背疣足方面有显著差异,说明海参科和刺参科亲缘关系较近;费来华等^[12]通过分析 10 种海参 16S rDNA 序列多样性及亲缘关系认为,属于枝手目的瓜参科与刺参科的亲缘关系较近;陈丽梅等^[16]通过研究 4 种海参 16S rDNA 表明,刺参科先与枝手目的沙鸡子科、瓜参科聚类,再与海参科聚类;Miller 等^[9]提出了新的分类系统,认为刺参科属于辛那参目,与芋参目、*Persiculida*(尚无中文名)和枝手目亲缘关系较近,而与海参目海参科亲缘关系较远。海参科只具有 1 束生殖腺,而刺参科、芋参目、枝手目的种类均具有 2 束生殖腺^[6]。传统形态学分类中刺参科和

海参科均属于楯手目，而分子生物学研究表明刺参科和海参科遗传距离较远，分属不同的目。传统分类学根据形态将具有楯形触手的海参科和刺参科归为一日，与此相比较，结合分子系统发育的新型分类系统更能反映海参的分类地位和亲缘

关系。

3.3 基于 16S rDNA 基因片段的海参骨片演化分析

本研究基于 16S rDNA 基因，对海参科内骨片特征进行对比(图 7)，发现不同聚类间骨片类型逐渐不同。海参属与柄体参属聚为一簇，均具有

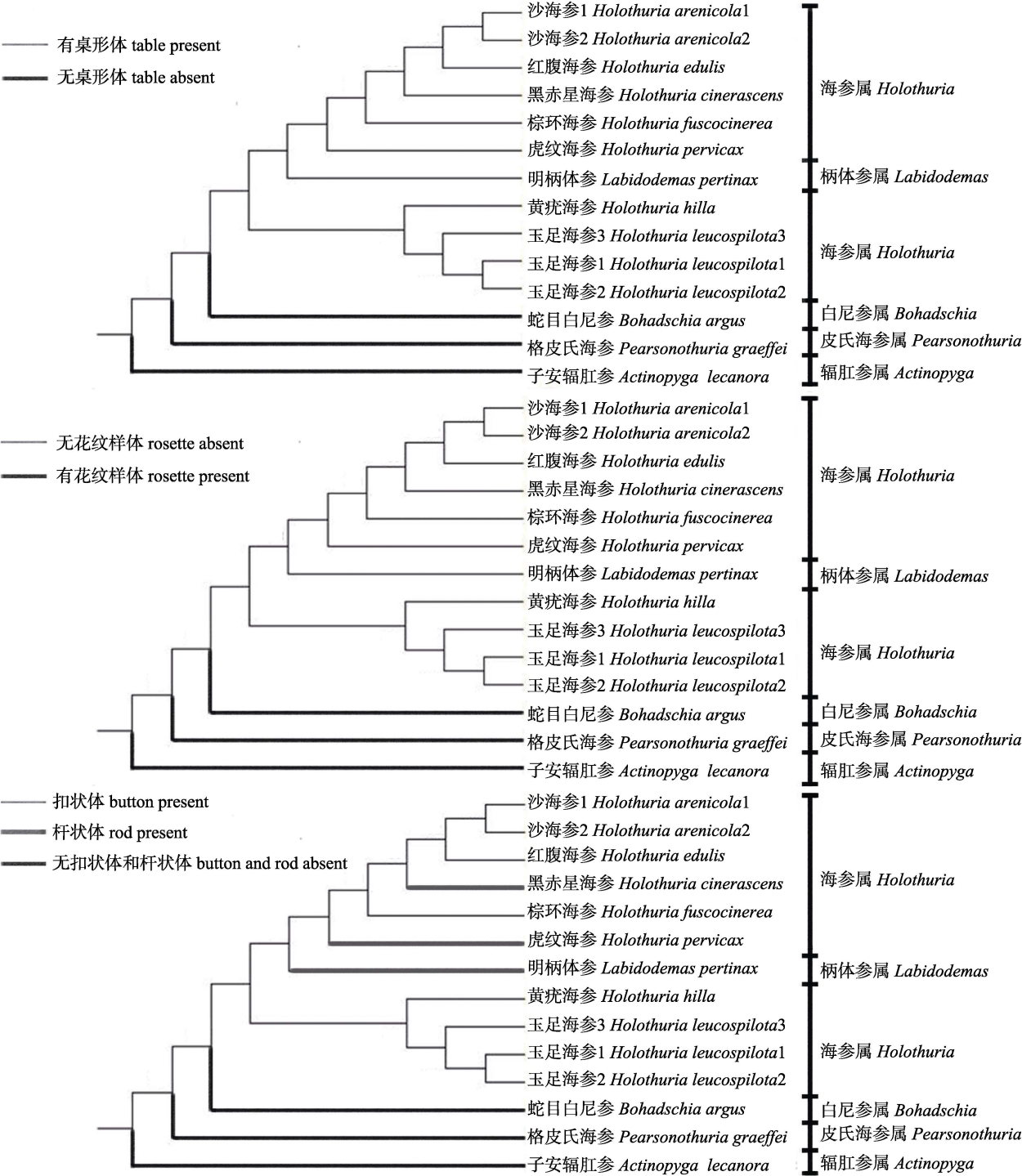


图 7 基于系统发育的海参科骨片特征对比
Fig. 7 Ossicle contrast of family Holothuriidae based on phylogenetic

桌形体, 白尼参属(*Bohadschia*)、辐肛参属(*Actinopyga*)、皮氏海参属(*Pearsonothuria*)分支出去, 无桌形体, 出现花纹样体。扣状体和杆状体只存在于海参属和柄体参属中。其中棕环海参扣状体简单, 穿孔数少, 这或许是扣状体和颗粒体之间的过渡阶段(图2 b)。海参属和柄体参属再与格皮氏海参和蛇目白尼参(*Bohadschia argus*)聚为一簇, 最后与子安辐肛参(*Actinopyga lecanora*)聚为一簇。其中, 格皮氏海参具有假桌形体(图1 k), 与桌形体比较没有明显的底盘, 蛇目白尼参具有较扣状体更为简单的颗粒体(图4 d), 子安辐肛参仅具花纹样体。

观察发现, 仿刺参小个体的桌形体塔部较高, 而成年个体的桌形体塔部则退化变低或消失。廖玉麟^[6]发现沙海参大个体较小个体桌形体塔部变低, 横梁变少, 扣状体穿孔数变少。Massin 等^[17]通过电镜研究了糙海参的骨片发育过程, 发现随着海参幼体的长大, 扣状体变短, 穿孔数变少。说明海参科内海参随着个体的长大, 骨片逐渐退化并变得简单, 经历了一个由繁到简的过程。因此, 尽管桌形体的演化仍存在争议, 它可能是起源于除平足目和无足目以外的其他海参, 并经历了多次独立的丢失和变化, 也有可能是在海参纲内经历了数次演化^[9]。由此可以推测, 仅在海参科内, 海参骨片是由繁到简, 从复杂的桌形体、扣状体, 向简单的花纹样体和颗粒体演化的。同时, 结合虎纹海参的杆状体和棕环海参的扣状体可以看出, 海参科内骨片的进化不是直接的, 而是逐渐地慢慢过渡。Kerr 等^[11]提出海参科种类至少经历了两轮从桌形体和扣状体到花纹样体的演化过程, 与本研究得出的结论一致。关于海参科内骨片的进化关系还有待进一步研究, 随着新技术的应用及研究中所涉及的种类数目的增多, 对海参骨片演化会有更清晰的认识。

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] Liao Y L, Xiao N. Species composition and faunal characteristics of echinoderms in China seas[J]. Biodiversity Science, 2011, 19(6): 729-736. [廖玉麟, 肖宁. 中国海棘皮动物的种类组成及区系特点[J]. 生物多样性, 2011, 19(6): 729-736.]
- [3] Cui G Y, Zhao L. Names and species identifying of edible sea cucumber in China[J]. Cuisine Journal of Yangzhou University, 2000, 17(3): 13-18. [崔桂友, 赵廉. 食用海参的名称与种类鉴别[J]. 扬州大学烹饪学报, 2000, 17(3): 13-18.]
- [4] Wang L, Lu H X, Chen Q. Analysis and evaluation of the nutritional components of sea cucumber (*Acaudina molpadioides*)[J]. Food and Fermentation Industries, 2014, 40(8): 215-218. [王磊, 陆海霞, 陈青. 东海海参(*Acaudina molpadioides*)营养成分分析及评价[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(8): 215-218.]
- [5] Guo Y Y, Ding Y, Xu F F, et al. Progress in research on main bioactive constituents of sea cucumber[J]. Food Science, 2014, 35(15): 335-344. [郭盈莹, 丁燕, 徐飞飞, 等. 海参中主要生物活性成分研究进展[J]. 食品科学, 2014, 35(15): 335-344.]
- [6] Liao Y L. Fauna Sinica: Phylum Echinodermata, Class Holothuroidea[M]. Beijing: Science Press, 1997. [廖玉麟. 中国动物志: 棘皮动物门, 海参纲[M]. 北京: 科学出版社, 1997.]
- [7] Zhao S M. Shallow-Water Sea Cucumber of Taiwan[M]. Taichung: Museum of Natural Science, 1998. [赵世民. 台湾礁岩海岸的海参[M]. 台中: 自然科学博物馆, 1998.]
- [8] Li Y, Fei L H, Chen J X. The morphology of ossicles of 15 commercial holothurians[J]. Periodical of Ocean University of China, 2008, 38(2): 211-216. [李赞, 费来华, 陈家鑫. 十五种海参骨片的形态学研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2008, 38(2): 211-216.]
- [9] Miller A K, Kerr A M, Paulay G, et al. Molecular phylogeny of extant Holothuroidea (Echinodermata)[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2017, 111: 110-131.
- [10] Wen J, Hu C Q, Zhang L P, et al. PCR-RFLP identification of 16 commercial sea cucumber species on the basis of 16S rRNA gene[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(2): 451-457. [文菁, 胡超群, 张吕平, 等. 16种商品海参16S rRNA的PCR-RFLP鉴定方法[J]. 中国水产科学, 2011, 18(2): 451-457.]
- [11] Kerr A M, Janies D A, Clouse R M, et al. Molecular phylogeny of coral-reef sea cucumbers (Holothuriidae: Aspidochirotida) based on 16S mitochondrial ribosomal DNA sequence[J]. Marine Biotechnology, 2005, 7(1): 53-60.
- [12] Fei L H, Li Y, Chen J X. 16S rDNA sequence diversity and phylogenetic relationship of ten sea cucumbers[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(5): 755-765. [费来华,

- 李赞, 陈家鑫. 10 种海参 16S rDNA 序列多样性及其亲缘关系分析[J]. 中国水产科学, 2008, 15(5): 755-765.]
- [13] Wen J, Hu C Q, Fan S G. Molecular phylogeny of 15 sea cucumbers and the inferences about the evolution of ossicles[J]. Marine Sciences, 2011, 35(5): 66-72. [文菁, 胡超群, 范嗣刚. 中国 15 种海参的分子系统发育和骨片演化的分析[J]. 海洋科学, 2011, 35(5): 66-72.]
- [14] Yan J X. The phylogeny of six species sea cucumbers in South China Sea and studies on embryonic and larval development of sea cucumber *Holothria scabra* and *Stichopus variegates*[D]. Haikou: Hainan University, 2012. [严俊贤. 六种南海海参的系统发育与糙海参和花刺参的胚胎与幼体发育研究[D]. 海口: 海南大学, 2012.]
- [15] Kerr A M, Kim J. Phylogeny of Holothuroidea (Echinodermata) inferred from morphology[J]. Zoological Journal of the Linnean Society, 2001, 133(1): 63-81.
- [16] Chen L M, Li Q, Li Y. Sequence analysis of mitochondrial 16S rRNA and COI gene and molecular phylogeny of four species of sea cucumber[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(6): 935-942. [陈丽梅, 李琪, 李赞. 4 种海参 16S rRNA 和 COI 基因片段序列比较及系统学研究[J]. 中国水产科学, 2008, 15(6): 935-942.]
- [17] Massin C, Mercier A, Hamel J F. Ossicle change in *Holothria scabra* with a discussion of ossicle evolution within the Holothuriidae (Echinodermata)[J]. Acta Zoologica (Stockholm), 2000, 81(1): 77-91..

Molecular phylogeny and ossicle evolution analysis for 13 species of sea cucumber in China

LI Xiaomeng¹, XIAO Ning², ZENG Xiaoqi¹, YAO Wang¹

1. Institute of Evolution and Marine Biodiversity, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266003, China

Abstract: To fully determine the phylogenetic relationship and ossicle evolution of holothurians, the ossicles of 13 representative sea cucumber species in the China Sea were observed by scanning electronic microscopy and the mitochondrial 16S rDNA gene from eight specimens were amplified and sequenced. The results demonstrated that ossicles of the 13 sea cucumbers could be classified into seven types, which were termed as table, pseudo-table, button, rod, plate, rosette, and oblate grain. The length of 16S rDNA fragments amplified from eight sea cucumbers was approximately 465 bp. These fragments were enriched in AT bases with an average A+T content of 55.8%, which is in accordance with the characteristics of mitochondrial DNA in invertebrates. 16S rDNA sequences of 11 sea cucumbers obtained from GenBank were combined with sequences from our study to construct a phylogenetic tree. *Salmacis sphaeroides* was regarded as a control group. Neighbor-joining (NJ) and minimum evolution (ME) methods provided almost identical results. Genetic relationships between *Labidodemas* and *Holothuria* in Holothuriidae were rather close and shapes of their ossicles were also similar, thus they could be divided into the same genus; Caudinidae, Phyllophoridae, Sclerodactylidae, and Cucumariidae were clustered with Stichopodidae, and separated from Holothuriidae. Contrary to traditional taxonomy, our study met the criteria of the newest taxonomy system, wherein Aspidochirotida was removed and Holothuroidea was redivided into seven orders, including Dendrochirotida, Synallactida, Molpadida, Persicalida, Holothuriida, Elasipodida, and Apodida. Based on molecular phylogenetic trees and morphological data of ossicles, we hypothesized that ossicles of sea cucumbers in Holothuriidae underwent slow evolution from a complex shape, such as table and button, to simple patterns, such as rosette and oblate grain. Furthermore, considering that the rod in *Holothuria pervicax* and the button in *Holothuria fuscocinerea*, we concluded that ossicles in Holothuriidae underwent slow transition rather than direct evolution.

Key words: Holothuroidea; ossicle; 16S rDNA; phylogeny; ossicle evolution

Corresponding author: ZENG Xiaoqi. E-mail: zengxq@ouc.edu.cn