

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190514001

http://www.yykxjz.cn/

赵强, 杨爽, 刘心田, 孙国华, 冯艳微, 王卫军, 杨建敏. 引入养殖俄罗斯红参线粒体全序列结构与分析. 渔业科学进展, 2020, 41(6): 125-139
Zhao Q, Yang S, Liu XT, Sun GH, Feng YW, Wang WJ, Yang JM. Structure and analysis of mitochondrial sequences of introduced Russian red sea cucumber. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(6): 125-139

引入养殖俄罗斯红参线粒体全序列结构与分析*

赵强^{1,2#} 杨爽^{2,4#} 刘心田³ 孙国华^{2①}
冯艳微² 王卫军² 杨建敏²

(1. 烟台市海洋经济研究院 烟台 264003; 2. 鲁东大学农学院 烟台 264025;
3. 威海市渔业技术推广站 威海 264200; 4. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 本研究通过高通量测序技术对引入养殖的俄罗斯红参(*Apostichopus japonicus*)线粒体全基因组进行随机测序并分析,结果显示,俄罗斯红参线粒体基因组全长为16111 bp,共含有37个基因,包括22个tRNA、2个rRNA(1-rRNA和s-rRNA)和13个蛋白编码基因。全序列共存在24处基因间隔和5处基因重叠区。蛋白编码基因与全序列的碱基使用均表现出A、T偏倚。13个蛋白编码基因的密码子完整,除ND1以GTG为起始密码子外,其他均以ATN为起始密码子;终止密码子都是完整密码子,除ND2与ND4的终止密码子分别为TTG与TAG外,其他终止密码子以TAA为主;氨基酸频率最高为丝氨酸Ser(S),其次为亮氨酸Leu(L)。22个tRNA长度范围为66~72 bp,2个基因存在重复,且21个基因能预测其三叶草结构。1-rRNA与s-rRNA的长度与位置不同,对碱基的使用相似。蛋白编码基因的基因排列与海参纲(Holothuroidea)、海胆纲(Echinoidea)排列顺序相同,并与海星纲(Asteroidea)及蛇尾纲(Ophiuroidea)共享基因模块。BLAST分析表明,俄罗斯红参与仿刺参(*Apostichopus japonicus*)同源性最高。不同海参遗传距离分析发现,俄罗斯红参与3个海域仿刺参最为接近。基于最大似然法分别根据氨基酸与核苷酸序列构建的系统发生树显示,基于核苷酸序列的建树结果更符合亲缘关系较近的海参种类间的分析。引入养殖俄罗斯红参线粒体全序列结构与分析可为后续俄罗斯红参的遗传研究及种质应用提供支持。

关键词 俄罗斯红参; 线粒体基因组; 系统发生

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)06-0125-15

近年来,随着市场需求的增加,刺参养殖业发展迅速,但养殖效率不高、良种匮乏、生长性状稳定性较差等一直影响刺参产业的发展(曲洪霞等,2016),因此,不同品种和品系的刺参逐步进入养殖和消费市

场。俄罗斯红参(*Apostichopus japonicus*)简称“红参”,原产于俄罗斯远东近海,是本地刺参的地理远缘种,由于环境及摄食等因素体表呈红棕色。海参崴附近纬度高,海水温度较低,食物较少,俄罗斯红参生长缓

* 山东省现代农业产业技术体系(SDAIT-22-02)、国家自然科学基金(31602144)、科技部重点研发计划(2018YFD0901602)和黄河三角洲学者岗位共同资助 [This work was supported by Shandong Province Agriculture Research System (SDAIT-22-02), National Natural Science Foundation of China (31602144), Ministry of Science and Technology Key Research and Development Plan (2018YFD0901602), and Yellow River Delta Scholars Post].

#共同第一作者: 赵强, E-mail: shell-zhao@163.com; 杨爽, E-mail: 18615356650@163.com

① 通讯作者: 孙国华, 副研究员, E-mail: sgh_smile@163.com

收稿日期: 2019-05-14, 收修改稿日期: 2019-11-09

慢,代谢及生命力较为旺盛,且体积略小,被认为其体内可以积蓄更多营养(关崇新等,2015)。目前,俄罗斯红参已引入我国养殖。

线粒体基因组(mtDNA)为闭合的环状双链结构,大部分动物的 mtDNA 由 37 个基因与 1 段长度可变的控制区组成,基因排列较为保守,结构相对紧凑。mtDNA 遗传方式为母性遗传方式,不存在双亲遗传的遗传差异,很少发生重组,无组织特异性,易于取材与测序分析(康立森,2018)。相比核基因组,mtDNA 的分子量相对较小,仅占细胞的 1%,易于分离纯化。具有选择压力更小、结构相对稳定、编码速率更快等特点(赵娜娜,2013)。线粒体 DNA 包含更全面的信息,利用其进行系统进化分析的可信度更高(Cui *et al.*, 2009)。目前,针对水产动物 mtDNA 已有大量研究,但海参 mtDNA 的研究较少。俄罗斯红参与普通养殖刺参在生长及营养含量方面稍有差异,为了解俄罗斯红参在遗传上的特点及其与其他海参间的差异,本研究对俄罗斯红参线粒体全基因组进行测序,分析其线粒体基因组的构成及其系统发育关系,为海参线粒体基因组的研究及后续俄罗斯红参的种质创新应用提供遗传数据基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集

实验所用俄罗斯红参取自山东华春渔业有限公司,2010年引入,养殖于黄河三角洲滩涂区刺参池塘,持续进行生长性状的养殖选育。2017年11月取样,数量为20个,参龄约为1年半,平均体质量为(48.96±7.56)g。清洗、解剖并取肌肉部分,将所取组织送至上海天昊生物公司进行测序。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取及质量检测 本实验取约 30 mg 肌肉组织,按常规酚-氯仿法获得俄罗斯红参总 DNA。使用 NanoDrop 检测样品的浓度和纯度;琼脂糖凝胶电泳检测样品的完整度。

1.2.2 随机文库构建及 PCR 扩增 DNA 文库 采用转座酶建库试剂盒构建随机测序文库。利用转座酶随机打断 DNA,同时在片段两端加接头,并使用高保真聚合酶扩增原始文库,利用 PCR(扩增循环数控制在 12~15 之间)在文库两端引入特异性标签(Index)和测序接头。

1.2.3 文库片段筛选及质量检测 使用 Agencourt SPRIselect 核酸片段筛选试剂盒纯化放大的文库,同时筛选片段的大小。采用两步法筛选(Double size

selection),先用 SPRI 磁珠去掉目标区域左侧小片段(Left-side sizes election),再除去位于目标片段区域右侧的大片段(Right-side size selection),最终筛选片段峰值在 300 bp 的测序文库。使用 Qubit 准确定量文库浓度,均匀混合样品,确保每个样本的数据量合适均衡。并用 Agilent 2100 Bioanalyzer 确定文库片段大小分布,评估是否适合上机。

1.2.4 混样并进行上机测序 将质检合格的样品稀释,以等摩尔数对多个样品混样并上机。使用 Illumina HiSeq 平台,以 2×150 原始双端测序策略来测序文库。

1.3 数据处理

所用序列经串联后,使用 BioEdit 7.0.9(Hall, 1999)软件中的 ClustalW 进行序列比对,利用软件 Gblocks 0.91b (Castresana 2000)去除不可信区间。利用 Mega 4.0 软件统计碱基组成、密码子使用等。使用 tRNAscanSE 在线网站(<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>)预测 tRNA 的二级结构。

1.4 系统发生分析

本研究使用俄罗斯红参、半索动物门及棘皮动物门共 28 个物种的线粒体序列构建系统发生树,线粒体序列为 13 个蛋白编码基因串联的氨基酸序列与核苷酸序列,线粒体序列均从 NCBI 获得(表 1)。以半索动物门的囊舌虫(*Saccoglossus kowalevskii*)与肉花柱头虫(*Balanoglossus carnosus*)为外类群,将处理后的核苷酸序列使用 jModelTest2.1.5 (2014)软件 AIC 标准选择出最佳替代模型为 GTR+F+R5,氨基酸序列使用 ProtTest 2.4 (Abascal *et al.*, 2005)软件 AIC 标准选择出最佳替代模型为 CpREV+I+G+F,根据最佳模型使用应用最大似然法 PhyML3.0 (http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/?tdsourcetag=s_pcqq_aiomsg)构建系统发生树。最大似然法节点的支持度通过 1000 次重抽样获得。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取结果

提取的俄罗斯红参 DNA 浓度 ≥ 20 ng/μl,总量 ≥ 100 ng, OD_{260 nm}/OD_{280 nm}=1.8~2.2;基因组 DNA 主带清晰可见,无明显降解弥散存在,可用于下一步实验。

2.2 测序质量

测序获得序列根据比对结果(表 2),Q20=94.42%,Q30=88.13%测序错误率在正常范围内,测序结果可进行后续分析。

表 1 构建系统发生树所用物种及其 GenBank 号
Tab.1 The GenBank number of the species used to construct the phylogenetic tree

物种 Species	拉丁学名 Latin name	GenBank 序列号 Accession No.	物种 Species	拉丁学名 Latin name	GenBank 序列号 Accession No.
多棘海盘车	<i>Asterias amurensis</i>	NC_006665.1	加州拟刺参	<i>Parastichopus californicus</i>	KP398509.1
多棘槭海星	<i>Astropecten polyacanthus</i>	NC_006666.1	具疣拟刺参	<i>Parastichopus parvimensis</i>	KU168761.1
棘冠海星	<i>Acanthaster brevispinus</i>	AB231476	大连仿刺参	<i>Apostichopus japonicus</i> Dalian	FJ986223.1
蓝海燕	<i>Patiria pectinifera</i>	NC_001627.1	青岛仿刺参	<i>Apostichopus japonicus</i> Qingdao	GU557148.1
砂海星	<i>Luidia quinaria</i>	NC_006664.1	威海仿刺参	<i>Apostichopus japonicus</i> Weihai	EU294194.1
长棘海星	<i>Acanthaster planci</i>	NC_007788.1	糙刺参	<i>Stichopus horrens</i>	HQ000092.1
地中海海洋齿	<i>Antedon mediterranea</i>	NC_010692.1	叶瓜参	<i>Cucumaria miniata</i>	AY182376
海百合	<i>Neogymnocrinus richeri</i>	DQ068951.1	白色真蛇尾	<i>Ophiura albida</i>	NC_010691.1
花形羽枝	<i>Florometra serratissima</i>	NC_001878.1	灰色真蛇尾	<i>Ophiura lutkeni</i>	AY184223.1
栉羽星	<i>Phanogenia gracilis</i>	DQ068952.1	紫蛇尾	<i>Ophiopholis aculeata</i>	AF314589.1
白棘球海胆	<i>Strongylocentrotus pallidus</i>	NC_009941.1	绿棘海胆	<i>Strongylocentrotus</i> <i>droebachiensis</i>	EU054306.1
黑海胆	<i>Arbacia lixula</i>	NC_001770.1	囊舌虫	<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	AY336131.1
拟球海胆	<i>Paracentrotus lividus</i>	NC_001572.1	肉花柱头虫	<i>Balanoglossus carnosus</i>	NC001887.1
紫棘球海胆	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	NC_001453.1			

表 2 比对结果统计
Tab.2 Statistics of comparison results

Raw reads	Choose reads	Choose bases	Clean reads(%)	Clean reads GC (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
28597308	60014	8933159	0.21	37.94	94.42	88.13

2.3 线粒体基因组结构组成

2.3.1 基因结构 本研究测得俄罗斯红参线粒体基因组全长为 16111 bp, 共含有 37 个基因(图 1), 为环状 DNA 结构, 与目前已知的棘皮动物相似。37 个基因(表 3)包括 13 个蛋白编码基因、22 个 tRNA 基因、2 个核糖体 RNA 基因。13 个蛋白编码基因由 11 个电子传递系统的基因(复合体 I、复合体 IV、Cytb 基因)与 2 个氧化磷酸化基因(ATP6、ATP8)组成, 其中包括 7 个还原酶复合体的亚单位复合体 I (ND4L、ND1、ND2、ND3、ND4、ND5 和 ND6)、3 个氧化酶的亚单位复合体 IV 基因(COX1、COX2 和 COX3)、1 个细胞色素 b 基因(Cytb)、2 个 ATP 合成酶基因(ATP6 和 ATP8)。除 tRNA-Gln、tRNA-Ala、tRNA-Val、tRNA-Asp 和 tRNA-Ser 与 ND6 位于 L 链外, 其他基因均位于 H 链上。

2.3.2 基因间隔区与重叠区 俄罗斯红参线粒体的基因间隔较多, 共存在 24 处基因间隔(表 3), tRNA-Thr 与 tRNA-Pro 间隔最大为 460 bp, 占全长序

列的 2.86%, 其次为 ND6 与 ND5 基因间隔, 为 189 bp, 以及 ND4 与 ND3 间隔为 181 bp。全序列共存在 5 处基因重叠区, 在 tRNA-Pro 与 tRNA-Gln 之间存在 4 bp 的重叠, 1-rRNA 与 COX1 之间存在 6 bp 的重叠, COX3 与 tRNA-Ser 存在 3 bp 的重叠。ND4 与 tRNA-His 间存在 10 bp 的重叠, tRNA-His 与 tRNA-Ser2 间存在 1 bp 的重叠。

2.3.3 碱基含量 线粒体基因全序列碱基组成中, A、G、C 和 T 分别为 31.79%、17.87%、20.17%和 30.17%。A+T 和 C+G 含量分别为 61.96%和 38.04%, A+G 含量高于 G+C, 表现为较强 A、T 偏倚。蛋白编码基因碱基组成中, A、T、C 和 G 含量分别为 30.03%、31.34%、20.89%和 17.74%, A+T 和 C+G 的含量分别为 61.37%和 38.63%, 蛋白编码基因的碱基使用与全序列相似, 均表现出 A、T 偏倚。

2.4 蛋白编码基因的密码子使用

13 个编码蛋白基因全长为 10868 bp, 占全序列的 67.5%, 共编码 3186 个氨基酸(除终止密码子外)。

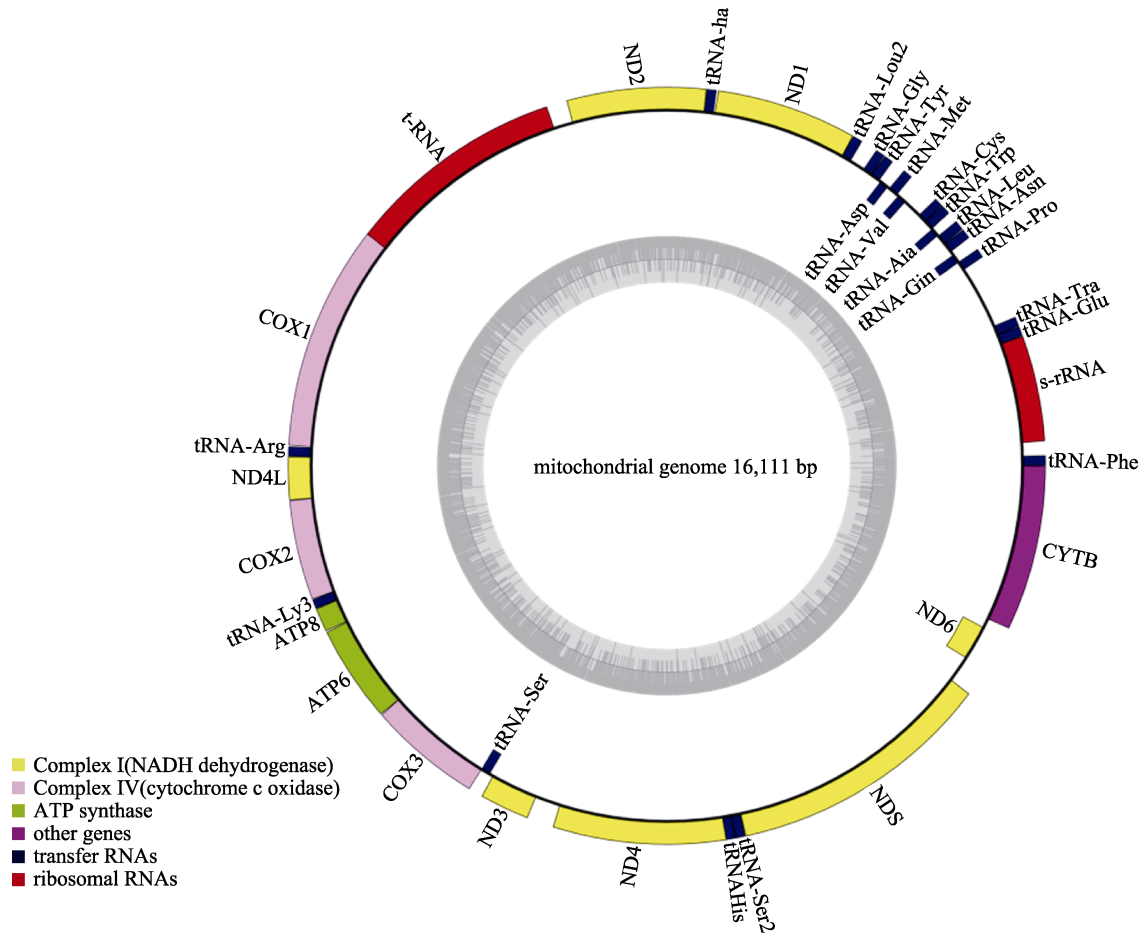


图1 俄罗斯红参线粒体基因组结构

Fig.1 Gene organization of Russian red sea cucumber mitochondrial genome

表3 俄罗斯红参线粒体基因组中基因位置及特征

Tab.3 Localization and features of genes in the mitochondrial genome of Russian red sea cucumber

基因名称 Gene name	位置 Position		长度 Size (bp)	密码子 Codon		编码链 Strand	基因间隔大小 Intergenic length (bp)
	From	To		起始 Initial	终止 Termination		
tRNA-Phe	1	71	71			H	95
s-rRNA	167	897	731			H	0
tRNA-Glu	898	966	69			H	0
tRNA-Thr	967	1036	70			H	460
tRNA-Pro	1497	1563	67			H	-4
tRNA-Gln	1560	1629	70			L	27
tRNA-Asn	1657	1727	71			H	2
tRNA-Leu	1730	1801	72			H	3
tRNA-Ala	1805	1870	66			L	1
tRNA-Trp	1872	1940	69			H	0
tRNA-Cys	1941	2006	66			H	136
tRNA-Val	2143	2212	70			L	12
tRNA-Met	2225	2294	70			H	14
tRNA-Asp	2309	2376	68			L	12
tRNA-Tyr	2389	2456	68			H	1

续表 3

基因名称 Gene name	位置 Position		长度 Size (bp)	密码子 Codon		编码链 Strand	基因间隔大小 Intergenic length (bp)
	From	To		起始 Initial	终止 Termination		
tRNA-Gly	2458	2526	69			H	111
tRNA-Leu2	2638	2708	71			H	0
ND1	2709	3680	972	GTG	TAA	H	9
tRNA-Ile	3690	3757	68			H	0
ND2	3758	4715	958	ATG	TTG	H	138
l-rRNA	4854	6369	1516			H	-6
COX1	6364	7917	1554	ATT	TAA	H	6
tRNA-Arg	7924	7991	68			H	1
ND4L	7993	8289	297	ATG	TAA	H	1
COX2	8291	8980	690	ATG	TAA	H	1
tRNA-Lys	8982	9048	67			H	0
ATP8	9049	9216	168	ATG	TAA	H	5
ATP6	9222	9893	672	ATT	TAA	H	2
COX3	9896	10678	783	ATG	TAA	H	-3
tRNA-Ser	10676	10747	72			L	26
ND3	10774	11118	345	ATG	TAA	H	181
ND4	11300	12493	1194	ATA	TAG	H	-10
tRNA-His	12484	12550	67			H	-1
tRNA-Ser2	12550	12619	70			H	0
ND5	12620	14455	1836	ATG	TAA	H	189
ND6	14645	14902	258	ATT	TAA	L	68
Cytb	14971	16111	1141	ATG	TAA	H	0

注: 基因间隔大小一栏中, 正数代表基因间隔碱基数, 负数代表基因重叠碱基数

Note: In the column of intergenic length, the positive number indicates interval base pairs between genes, while the negative number indicates overlapping base pairs between genes

表 4 俄罗斯红参线粒体全基因组编码蛋白基因密码子使用情况

Tab.4 Codon usage of the protein-coding genes in Russian red sea cucumber mitogenome

密码子 Codon	个数 N	比例 Percentage (%)	密码子 Codon	个数 N	比例 Percentage (%)	密码子 Codon	个数 N	比例 Percentage (%)	密码子 Codon	个数 N	比例 Percentage (%)
UUC(F)	76	0.58	UCC(S)	50	0.85	UAC(Y)	57	0.68	UGC(C)	27	0.95
UUA(L)	109	1.56	UCA(S)	58	0.99	UAA(*)	49	1.26	UGA(W)	55	1.28
UUG(L)	29	0.42	UCG(S)	19	0.32	UAG(*)	29	0.74	UGG(W)	31	0.72
CUU(L)	105	1.51	CCU(P)	55	1.28	CAU(H)	47	0.94	CGU(R)	19	0.90
CUC(L)	46	0.66	CCC(P)	45	1.05	CAC(H)	53	1.06	CGC(R)	15	0.71
CUA(L)	97	1.39	CCA(P)	54	1.26	CAA(Q)	50	1.39	CGA(R)	27	1.29
CUG(L)	32	0.46	CCG(P)	18	0.42	CAG(Q)	22	0.61	CGG(R)	23	1.10
AUU(I)	101	1.37	ACU(T)	67	1.15	AAU(N)	102	1.22	AGU(S)	50	0.85
AUC(I)	46	0.63	ACC(T)	58	1.00	AAC(N)	65	0.78	AGC(S)	69	1.17
AUA(M)	117	1.21	ACA(T)	80	1.37	AAA(K)	123	1.28	AGA(S)	68	1.15
AUG(M)	76	0.79	ACG(T)	28	0.48	AAG(K)	69	0.72	AGG(S)	61	1.04
GUU(V)	76	1.59	GCU(A)	58	1.43	GAU(D)	46	0.95	GGU(G)	34	0.75
GUC(V)	32	0.67	GCC(A)	46	1.14	GAC(D)	51	1.05	GGC(G)	36	0.80
GUA(V)	48	1.01	GCA(A)	43	1.06	GAA(E)	63	1.38	GGA(G)	76	1.68
GUG(V)	35	0.73	GCG(A)	15	0.37	GAG(E)	28	0.62	GGG(G)	35	0.77

注: 加粗为偏好密码子

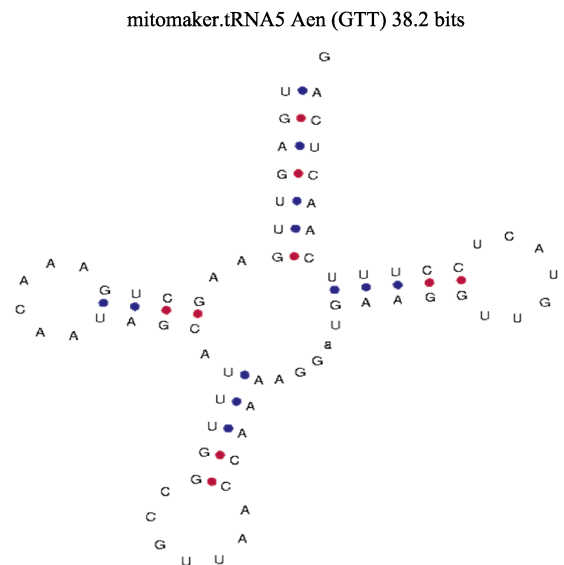
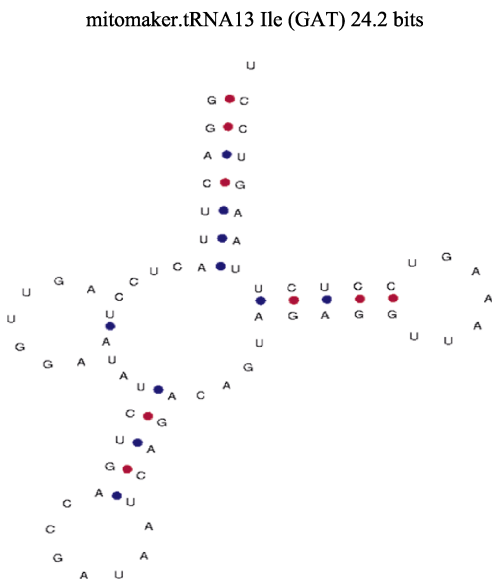
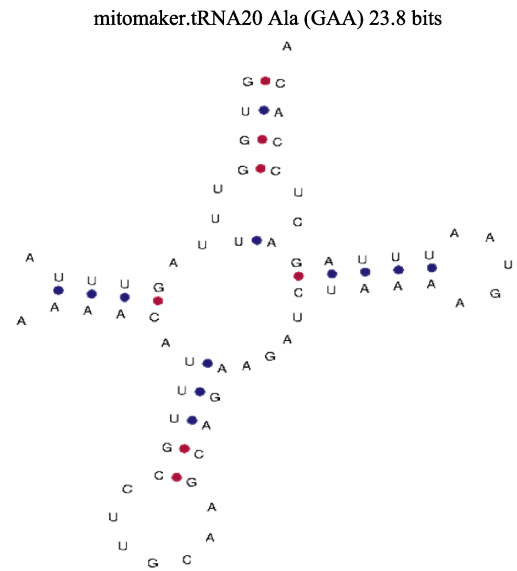
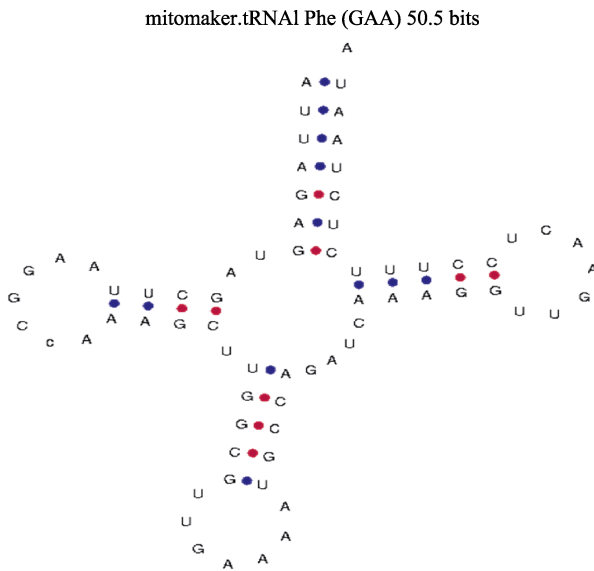
Note: Bold is preferred codon

氨基酸编码频率最高为丝氨酸 Ser(S), 其次为亮氨酸 Leu(L)。使用 Mega 软件统计密码子使用情况(表 4), 13 个编码蛋白基因的密码子完整, 且存在 30 个偏好密码子, 其中第 3 位点对 A 或 T(U)的使用频率较高。除 ND1 以 GTG 为起始密码子, 其他均以 ATN 为起始密码子。ND2、ND4L、COX2、ATP8、COX3、ND3、ND5 和 Cytb 起始密码子为 ATG, COX1、ATP6 和 ND6 以 ATT 为起始密码子, 而 ND4 以 ATA 为起始密码子。终止密码子都是完整密码子, 除 ND2 与 ND4 的终止密码子分别为 TTG 与 TAG 外, 其他终止密码子以 TAA 为主。

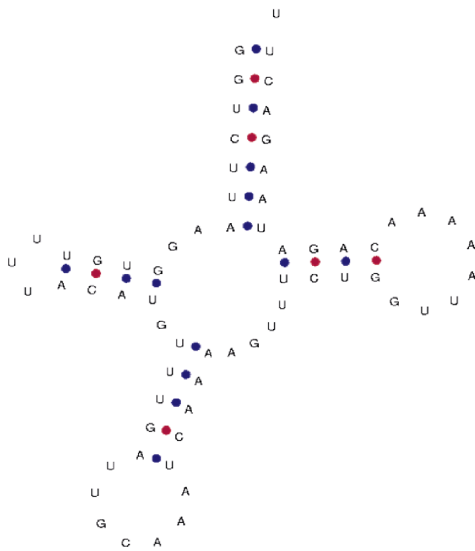
2.5 tRNA

俄罗斯红参 mtDNA 序列包含 22 个 tRNA, 长度范围为 66~72 bp, tRNA-Gln、tRNA-Ala、tRNA-Val、tRNA-Asp 和 tRNA-Ser 位于轻链, 其他 tRNA 位于重

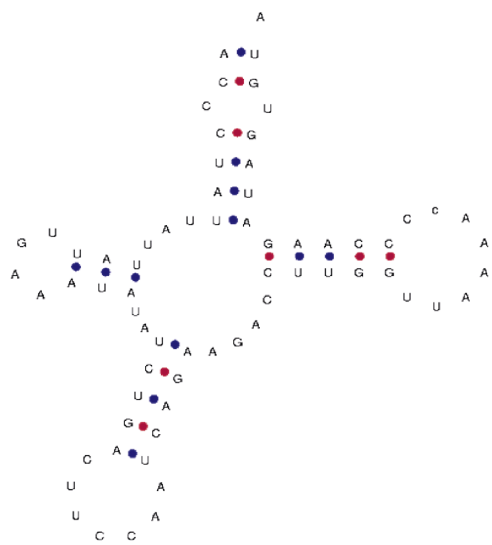
链。tRNA-Ser 与 tRNA-Leu 各重复 1 次, 最小的为 tRNA-Cys, 最大的为 tRNA-Leu 和 tRNA-Ser。除 1 个 tRNA-Ser2 缺少 D 环, 无法形成三叶草结构, 其他 tRNA 使用 tRNAscanSE 在线软件预测 tRNA 的二级结构均为三叶草结构(图 2), 包括受体臂、T Ψ C 臂、反密码子臂, D 臂。受体臂: tRNA-Met、tRNA-Gly 和 tRNA-Ala 发生 1 对碱基错配, tRNA-Tyr 插入 1 个碱基, tRNA-Arg 发生 2 对碱基错配。T Ψ C 臂碱基组成变化不大, tRNA-Cys、tRNA-His 在 T Ψ C 臂上存在 4 对碱基, 其他为 5 对。D 臂: tRNA-Ile 只有 1 对碱基, tRNA-Gly、tRNA-Leu、tRNA-Tyr、tRNA-Leu2、tRNA-Thr、tRNA-Gln 和 tRNA-Val 为 3 对碱基, 其他均为 4 对。反密码子臂: tRNA-Pro 存在 1 对碱基错配, tRNA-Lys、tRNA-Asp、tRNA-Ser、tRNA-Tyr 的反密码子臂存在 4 对碱基, 其他 tRNA 为 5 对。



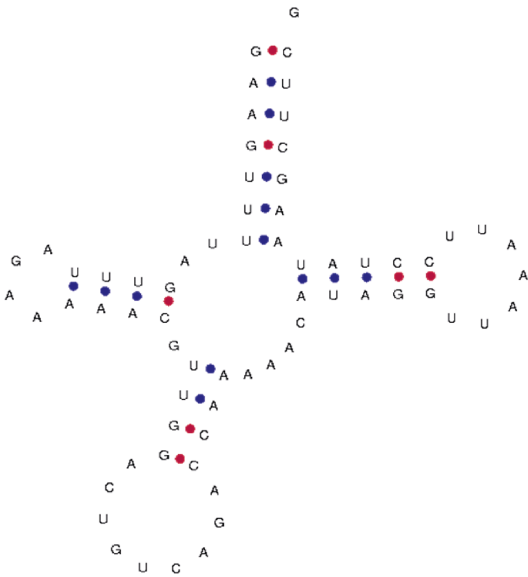
mitomaker.tRNA8 Cys (GCA) 16.7 bits



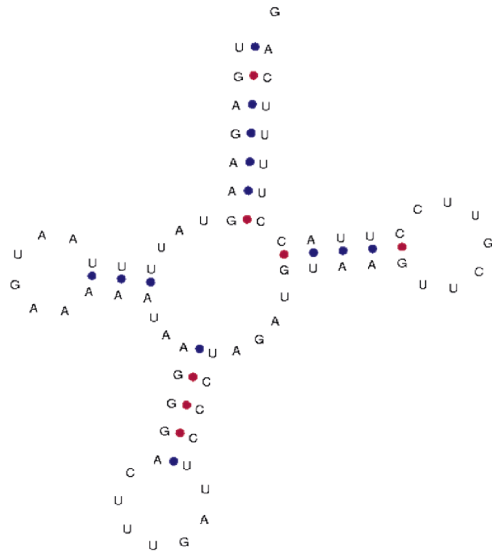
mitomaker.tRNA11 Cyl (TCC) 32.6 bits



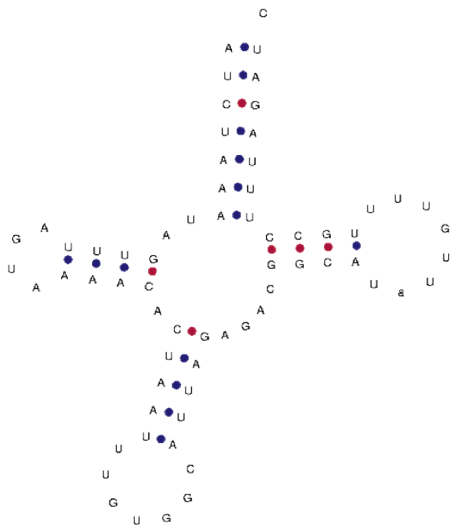
mitomaker.tRNA18 Asp (GTC) 51.1 bits



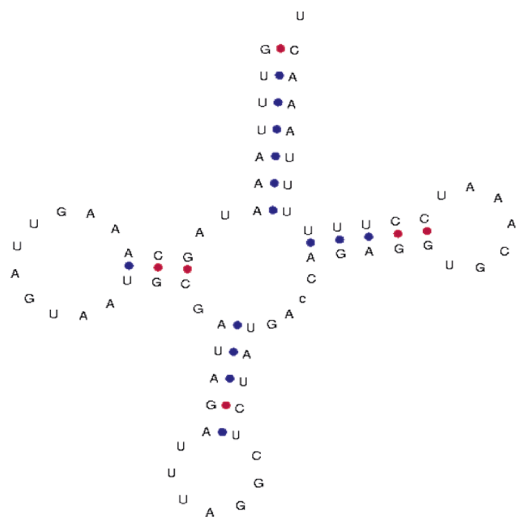
mitomaker.tRNA21 Gln (TTG) 44.9 bits



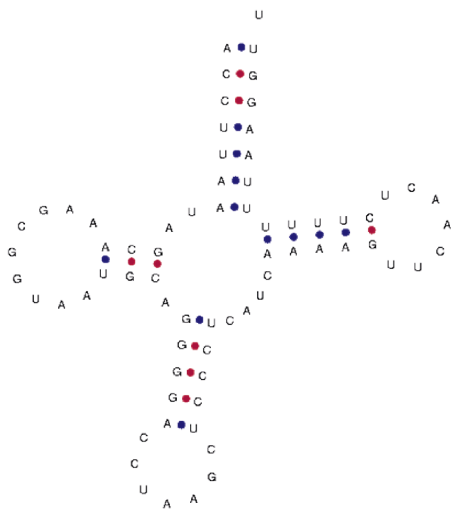
mitomaker.tRNA16 His (GTG) 28.8 bits



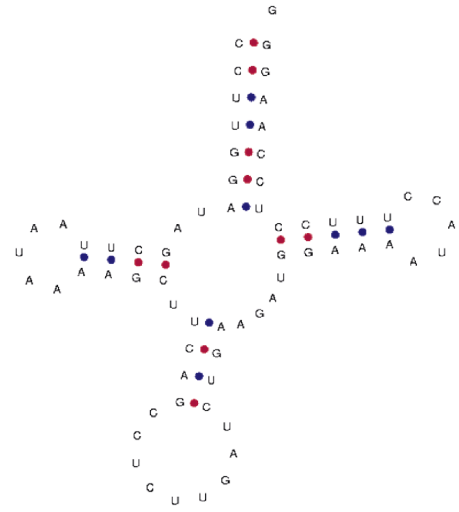
mitomaker.tRNA6 Leu (TAG) 55.4 bits



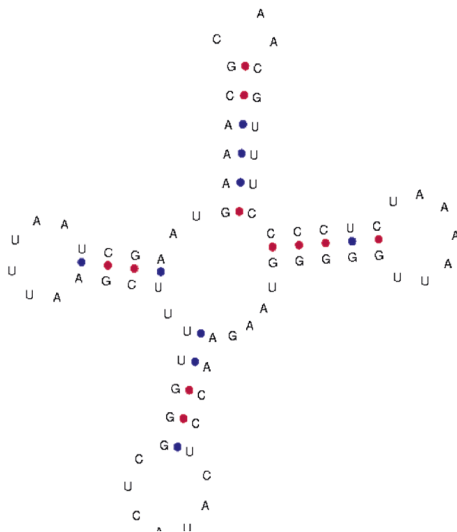
mitomaker.tRNA12 Leu (TAA) 53.3 bits



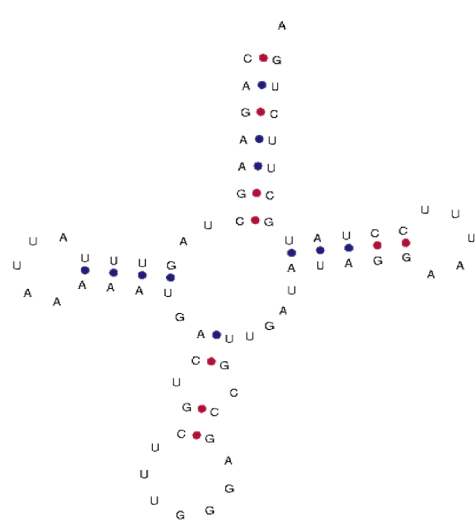
mitomaker.tRNA15 Lys (CTT) 25.6 bits



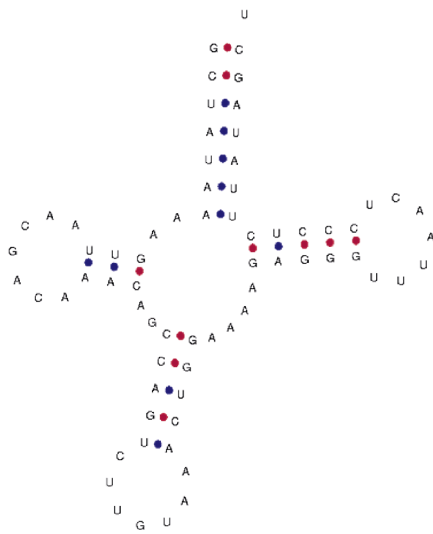
mitomaker.tRNA9 Met (GAT) 38.0 bits



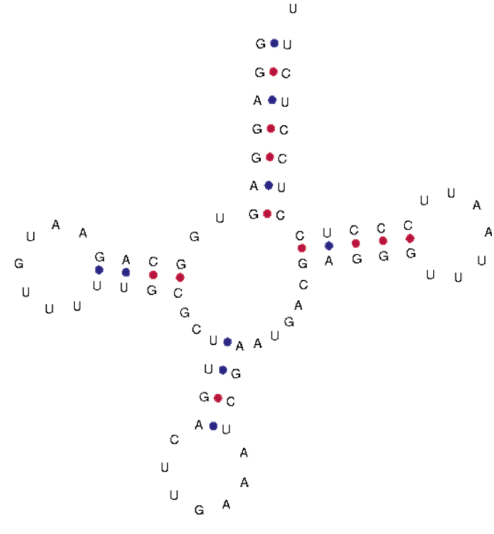
mitomaker.tRNA4 Pro (TGG) 20.2 bits



mitomaker.tRNA3 Thr (TGT) 43.5 bits



mitomaker.tRNA17 Ser (TGA) 52.5 bits



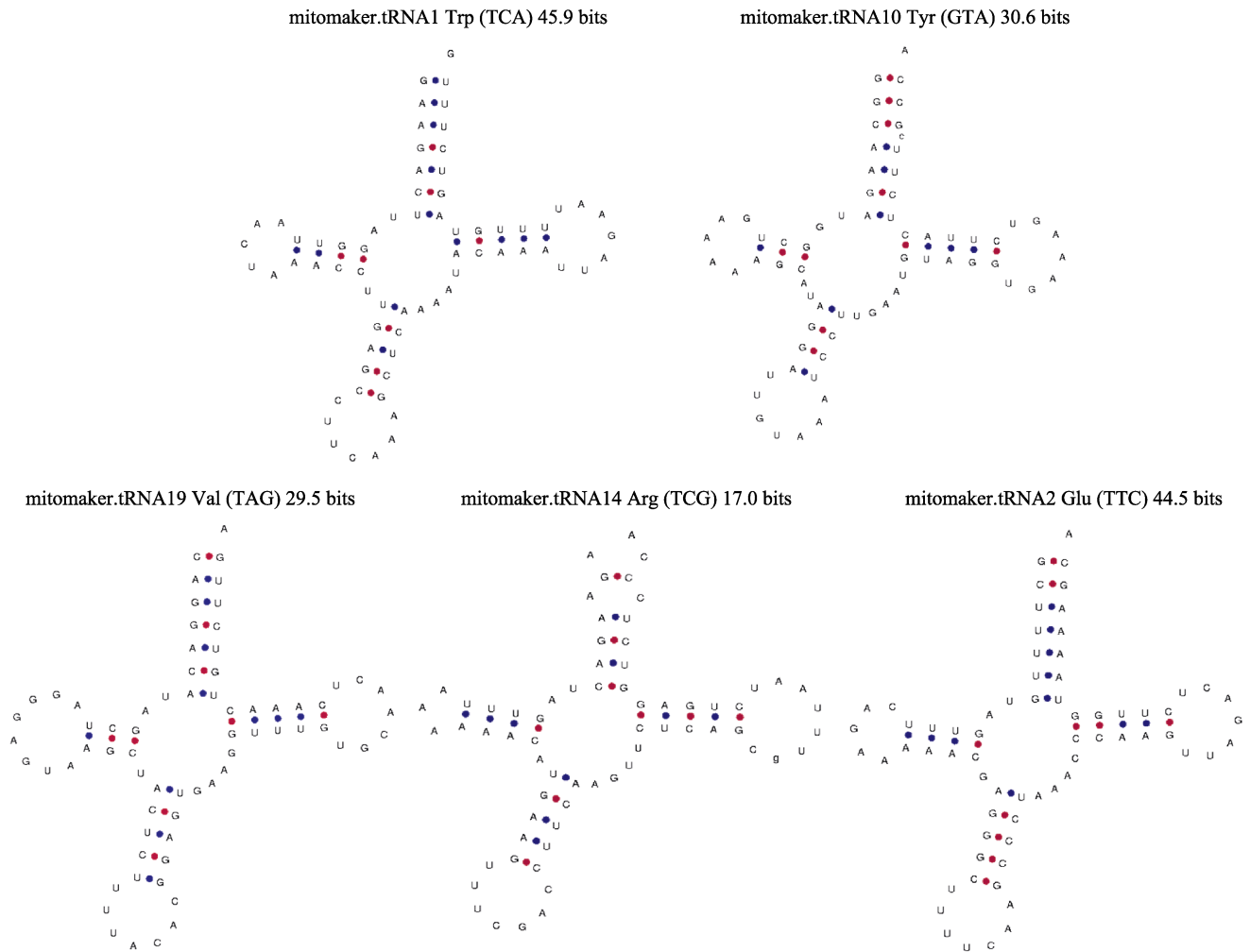


图 2 俄罗斯红参的 tRNA 的二级结构

Fig.2 The secondary structure of tRNA genes from Russian red sea cucumber

2.6 rRNA

俄罗斯红参线粒体全基因组中只存在 2 个 rRNA, 分别是位于 tRNA-Phe 与 tRNA-Glu 之间的 s-rRNA 和位于 tRNA-Ile 与 COX1 之间的 l-rRNA。s-rRNA 位于 H 链, 长度为 731 bp, 碱基 A、G、C 和 T 的含量分别为 37.76%、18.74%、18.74%和 23.12%, A+T 为 60.88%。l-rRNA 位于 H 链上, 长度为 1516 bp。碱基 A、G、C 和 T 的含量分别为 37.86%、19.92%、18.14%、24.08%, A+T 的含量为 61.94%。2 个基因的长度和位置不相同, 但对碱基的使用相似。

2.7 基因排列比较

从 NCBI 下载的动物线粒体编码蛋白基因顺序与所测俄罗斯红参序列对比(图 3), 发现这些物种间基因排列顺序有一定相似性。俄罗斯红参与海参纲(Holothuroidea)及海胆纲(Echinoidea)基因排列顺序相同, 海星纲(Asteroidea)与海百合纲(Crinoidea)中的

花形羽枝(*Florometra serratissima*)、栉羽星(*Phanogenia gracilis*)及蛇尾纲(Ophiuroidea)中的紫蛇尾(*Ophiopholis aculeata*)基因排列顺序相同, 白色真蛇尾(*Ophiura albida*)与灰色真蛇尾(*Ophiura lutkeni*)基因排列顺序相同。俄罗斯红参、海参纲、海胆纲与海星纲等相同基因排序的物种共享 COX1-ND4L-COX2-ATP8-ATP6-COX3-ND3-ND4-ND5-ND6-CYTB 基因模块, 与白色真蛇尾和灰色真蛇尾共享 COX1-ND4L-COX2-ATP8-ATP6-COX3-ND3-ND4-ND5-ND6 基因模块。几乎每个物种都与其他物种间共享某些特定模块, 最多为海百合(*Neogymnocrinus richeri*)与肉花柱头虫, 存在 ND1-COX1-COX2-ATP8-ATP6、COX3-ND3和 ND4-ND5共3个基因模块, 并与海星纲等相同基因排序物种共享 ND1-COX1、COX2-ATP8-ATP6、COX3-ND3-ND4-ND5-ND6-CYTB-ND2共3个基因模块, 剩余物种都同其他物种存在共享特定模块。

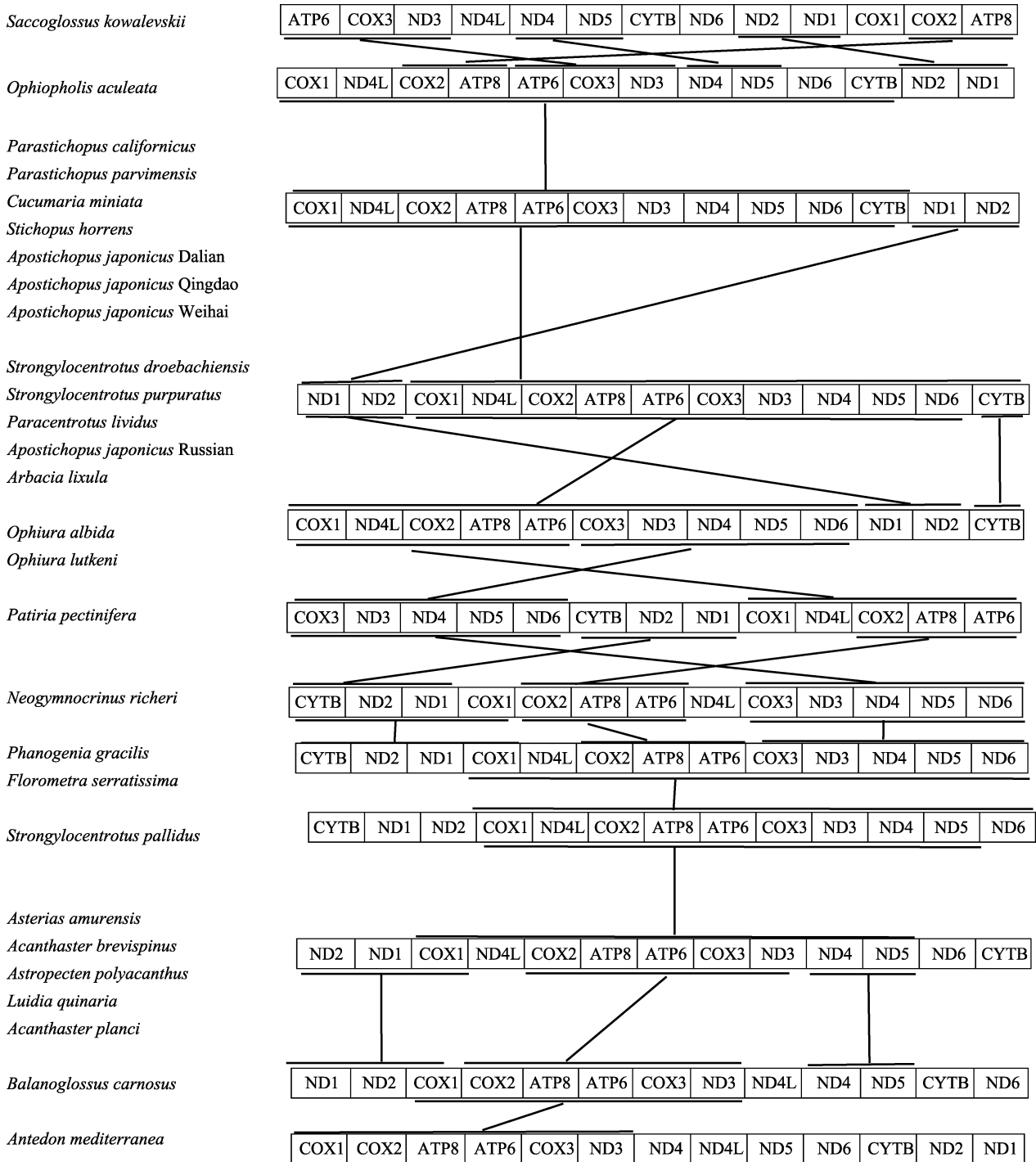


图 3 基因排列对比
Fig.3 Gene arrangement contrast

2.8 遗传距离

根据不同种类海参与不同地理分布刺参的线粒体核苷酸序列, 利用 Mega 软件计算遗传距离, 使用 Kimura-2-parameter 计算其遗传距离(表 5)。结果显示, 俄罗斯红参与所选海参的遗传距离范围为 0.017~0.385, 相较其他海参的遗传距离, 俄罗斯红参与青

岛仿刺参、威海仿刺参和大连仿刺参间的遗传距离更为接近, 分别为 0.017、0.019 和 0.021。

2.9 BLAST 分析

将俄罗斯红参线粒体全序列与 NCBI 上的物种比对(表 6), 结果显示, 其与同名物种的相似率达 98% 以上, 与同源性最高的仿刺参(GenBank 序列号:

表 5 不同海参核苷酸序列的遗传距离
Tab.5 Genetic distances of nucleotide sequences of different sea cucumbers

物种 Species	大连仿刺参 <i>A. japonicas</i> Dalian	具疣拟刺参 <i>P. parvimensis</i>	加州拟刺参 <i>P. californicus</i>	青岛仿刺参 <i>A. japonicas</i> Qingdao	叶瓜参 <i>C. miniata</i>	威海仿刺参 <i>A. japonicas</i> Weihai	糙刺参 <i>S. horrens</i>	俄罗斯红参 <i>A. japonicas</i> Russian
大连仿刺参 <i>A. japonicas</i> Dalian								
具疣拟刺参 <i>P. parvimensis</i>	0.117							
加州拟刺参 <i>P. californicus</i>	0.114	0.059						
青岛仿刺参 <i>A. japonicas</i> Qingdao	0.009	0.117	0.113					
叶瓜参 <i>C. miniata</i>	0.371	0.370	0.372	0.371				
威海仿刺参 <i>A. japonicas</i> Weihai	0.011	0.118	0.113	0.008	0.372			
糙刺参 <i>S. horrens</i>	0.377	0.378	0.382	0.375	0.393	0.376		
俄罗斯红参 <i>A. japonicas</i> Russian	0.021	0.128	0.124	0.017	0.385	0.019	0.385	

表 6 俄罗斯红参 BLAST 分析表
Tab.6 Analysis of on Russian red sea cucumber BLAST

GenBank 序列号 Accession No.	物种 Species	覆盖度 Query coverage (%)	相似度 Identity (%)	GenBank 序列号 Accession No.	物种 Species	覆盖度 Query coverage (%)	相似度 Identity (%)
AB525437.1	<i>Apostichopus japonicus</i>	100	99.59	EU294194.1	<i>Apostichopus japonicus</i>	100	99.34
FJ906623.1	<i>Apostichopus japonicus</i>	100	99.57	FJ594968.1	<i>Apostichopus japonicus</i>	100	99.29
MK216560.1	<i>Apostichopus japonicus</i>	100	99.56	FJ986223.1	<i>Apostichopus japonicus</i>	100	99.16
AB525760.1	<i>Apostichopus japonicus</i>	100	99.50	MK208925.1	<i>Apostichopus japonicus</i>	100	98.92
GU557148.1	<i>Apostichopus japonicus</i>	100	99.48	KP170618.1	<i>Apostichopus japonicus</i>	100	98.84
MK216561.1	<i>Apostichopus japonicus</i>	100	99.46	KP170617.1	<i>Apostichopus japonicus</i>	100	98.84
GU557147.1	<i>Apostichopus japonicus</i>	100	99.46	FJ594967.1	<i>Apostichopus japonicus</i>	100	98.56
KP170616.1	<i>Apostichopus japonicus</i>	100	99.45	AB525762.1	<i>Parastichopus nigripunctatus</i>	100	97.40
AB525761.1	<i>Apostichopus japonicus</i>	100	99.45	KP398509.1	<i>Parastichopus californicus</i>	99	90.12
FJ594963.1	<i>Apostichopus japonicus</i>	100	99.35	KU168761.1	<i>Parastichopus parvimensis</i>	99	89.76

AB525437.1)的相似性为 99.59%，存在 24 处碱基的插入与缺失(图 4)，突变的基因存在转换与颠换，其中，保守位点 16024 个，变异位点 81 个，变异位点约占分析位点的 0.5%。

2.10 系统发生分析

基于表 1 及俄罗斯红参的蛋白编码基因的氨基酸序列，利用最大似然法构建系统发生树(图 5)，结

果显示，海百合纲聚为一枝。俄罗斯红参与具疣拟刺参(*P.parvimensis*)聚为一枝，并与海参纲其他物种以及多棘槭海星(*Astropecten polyacanthus*)、蓝海燕(*Patiria pectinifera*)、灰色真蛇尾、紫蛇尾聚为一大枝。海星纲的长棘海星(*Acanthaster planci*)、棘冠海星(*Acanthaster brevispinus*)、砂海星(*Luidia quinaria*)、多棘海盘车(*Asterias amurensis*)与海胆科(*Temnopleuridae*)聚为一大枝。基于表 1 及俄罗斯红参的蛋白编码基因

```

Query 1086-1088 C-T 1055-1057 C-T 1392-1408 CTCCTTTATATAACT
      ||          ||          |||  |||  |||
Sbjct 10834-10836 CTT 10844-10846 CTT 11142-11158 C-CC---CT-TCATA-T
Query 1632-1635 T--T 1651-1653 C-T 1800-1804 C---T
      ||          ||          |  |
Sbjct 11374-11377 TTAT 11393-11395 CTT 11545-11549 CTATT
Query 2104-2107 TTTA 2117-2124 CAAGTATA 5160-5162 G-A
      ||          |  ||          ||
Sbjct 11852-11855 T--A 11865-11872 C---A-A 14901-14903 GAA
Query 5461-5163 CAA 6206-6208 G-A
      ||          ||
Sbjct 15203-15205 C-A 15947-15949 GAA
    
```

图 4 BLAST 比对碱基的缺失与插入

Fig.4 Deletion and insertion of alignment bases by BLAST

Query 为俄罗斯红参序列, Sbjct 为参考序列
 Query is Russian red sea cucumber sequence,
 and Sbjct is the reference sequence

核苷酸序列, 利用最大似然法构建系统发生树(图 6), 结果显示, 俄罗斯红参与 3 个海域的仿刺参聚为一枝, 这 4 种海参再与海参纲的其他物种聚为一大枝, 并与海百合纲 4 个物种构成姊妹群。海星纲与海胆纲构成姊妹群。蛇尾纲聚为一枝。

3 讨论

本研究通过高通量测序技术对俄罗斯红参的线粒体基因组进行随机测序并分析, 利用线粒体序列进行系统发生分析, 结果发现, 俄罗斯红参与棘皮动物门下的其他动物存在较高的相似性, 均存在 37 个基因(13 个蛋白编码基因、2 个 rRNA 以及 22 个 tRNA 基因), 31 个基因编码在 H 链上, 5 个 tRNA (RNA-Gln、

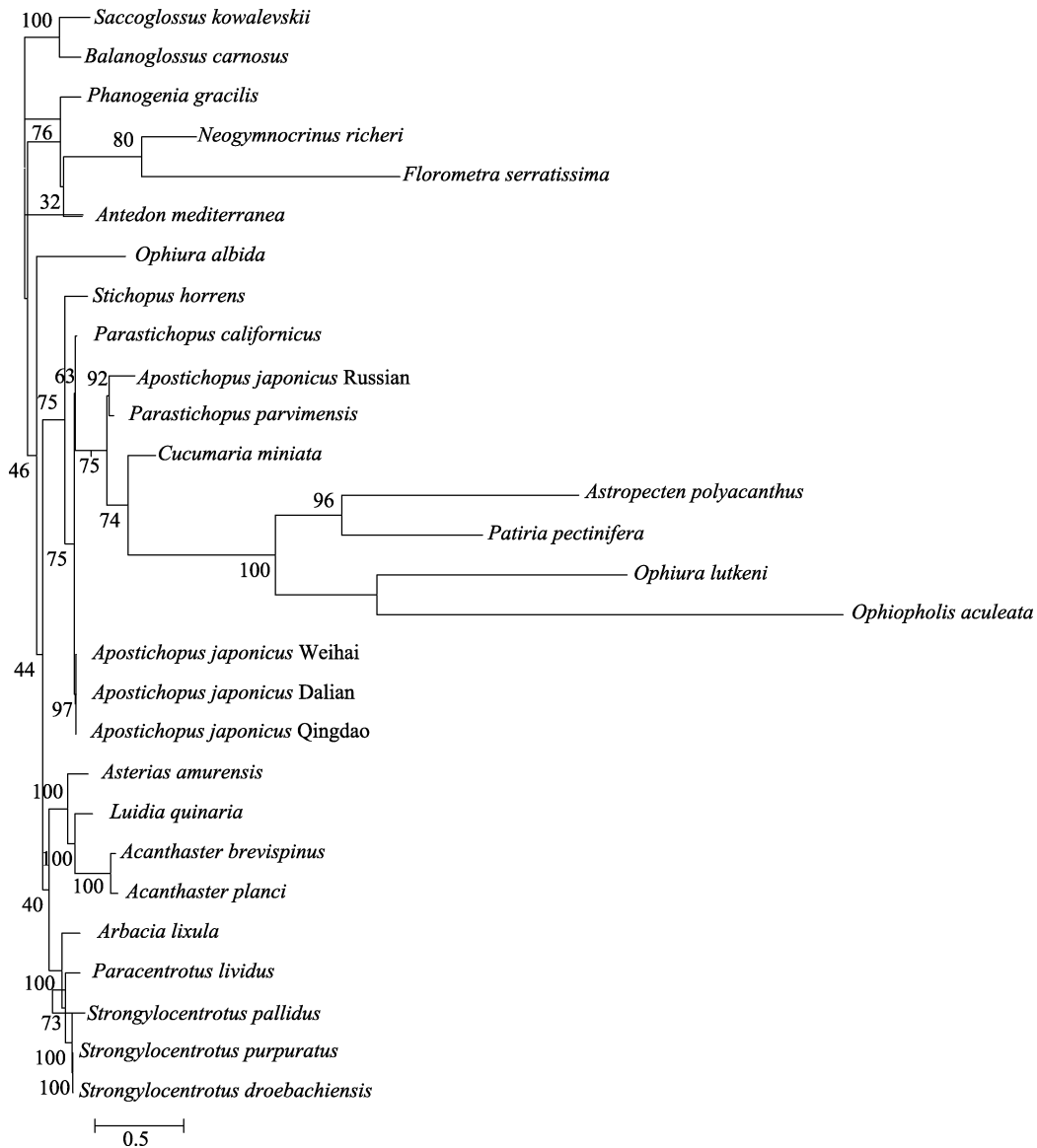


图 5 氨基酸序列基于最大似然法构建的系统发生树

Fig.5 Phylogenetic tree of amino acid sequences based on maximum likelihood method

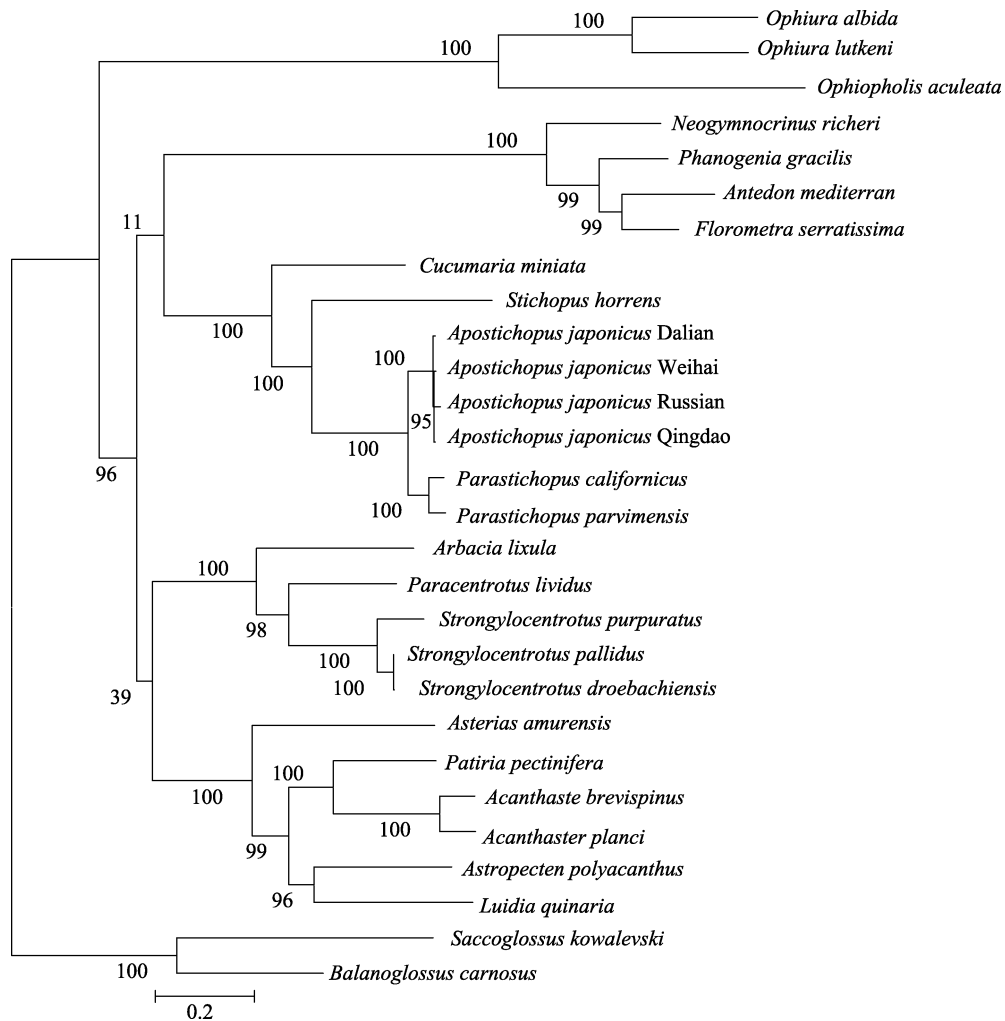


图 6 核苷酸序列基于最大似然法构建系统发生树

Fig.6 Phylogenetic tree of nucleotide sequences based on maximum likelihood method

tRNA-Ala、tRNA-Val、tRNA-Asp 和 tRNA-Ser) 和 1 个蛋白编码基因(ND6)编码在 L 链上。基因的组成与分布情况均与孙秀俊(2013)所研究的刺参完全相同。全序列与蛋白编码基因的 A、T 碱基含量同大部分后生动物一样存在 A、T 偏向性(付婉莹, 2015), 分别为 61.96%与 61.37%, 且同脊椎及无脊椎动物的 mtDNA 蛋白编码基因的第 3 位点也存在明显的 A、T 偏向性, 但碱基的含量存在差异, A、T 含量因物种的差异略有不同。

俄罗斯红参的 13 个蛋白编码基因的密码子使用分析表明, 除 ND1 以 GTG 为起始密码子外, 其他均以 ATN 为起始密码子。终止密码子与大连仿刺参(李云峰等, 2012)相同, 均为完整密码子, 大多以 TAA 为主。基因重叠区与基因间隔区同糙刺参(*Stichopus horrens*)(范嗣刚等, 2011)及某些水产动物线粒体相似(李亚莉, 2012; 袁亮等, 2015)。22 个 tRNA 中除 tRNA-Ser 外, 其余的 tRNA 均能预测其三叶草结构,

这同魏峦峦等(2011)研究的瘤背石磺(*Onchidium struma*) tRNA 一样, 都是由于缺少 D 臂而无法预测其结构, Cheng 等(2012)证明了缺失 D 臂并不会影响其进入核糖体及转运氨基酸等功能; 相比细胞质中 tRNA, 线粒体中的 tRNA 存在差异, 在受体臂与反密码子臂等部分均有碱基错配的情况。此外, 俄罗斯红参的 tRNA(tRNA-Cys、tRNA-Trp、tRNA-Ala、tRNA-Leu 和 tRNA-Asn)同某些后生动物一样, 均出现簇集现象, 即几个 tRNA 集中在一起的现象。tRNA 的重复与闫锦锦(2014)所研究的光唇鱼(*Acrossocheilus fasciatus*)相同, 皆存在 tRNA-Ser 与 tRNA-Leu 基因重复 1 次。俄罗斯红参的 2 个 rRNAs (s-rRNA 和 l-rRNA)及位置均与申欣等(2011)研究的威海仿刺参和范嗣刚等(2011)研究的糙刺参相同。线粒体基因组排列顺序在研究系统进化关系等方面起着重要作用(李石磊等, 2015), 俄罗斯红参线粒体编码基因的排列与大部分棘皮动物具有一定相似性, 且

与其他物种共享基因模块。

线粒体基因组数据广泛应用于系统进化生物学、保护生物学及种质鉴定等领域的研究,如利用线粒体基因组中的 CO I 及 16S rRNA 进行分子标记对海参品种及产品进行鉴别(Wen *et al.*, 2013)。An 等(2013)对韩国红海参野生种群与养殖种群进行微卫星位点多重分析,发现两种群间存在高水平的多态性及遗传异质性。本研究通过对所选海参的核苷酸序列进行遗传距离分析,发现俄罗斯红参与 3 个海域的仿刺参较为接近,与青岛仿刺参遗传距离最近,为 0.017。将俄罗斯红参的线粒体全序列进行 BLAST 分析,与仿刺参(GenBank 序列号: AB525437.1)的相似度为 99.59%。基于 28 个物种的编码蛋白基因的氨基酸及核苷酸序列,利用最大似然法分别构建系统发生树,结果发现,2 种方法所建的发生树有一定相似性,但在俄罗斯红参与其他海参聚簇上存在差异。在利用核苷酸构建的系统发生树中,俄罗斯刺参与 3 个海域的仿刺参聚支的节点的自展值(bootstrap 值)都在 95%以上,具有较高可信性;利用氨基酸构建系统发生树在较远距离的系统进化分析中更具有优势和可信性。通常考虑这 2 种序列的进化信息,才可能得到更自然的系统发生关系,本研究中核苷酸序列建树结果与传统分类学更为相似。

目前,利用物种线粒体全基因组序列的测定与分析已成为研究物种进化必不可少的手段,广泛应用于各个领域。通过对线粒体基因组的比对和分析,为种质鉴定、地理种群划分和亲缘关系鉴定等提供基础信息。本研究对引入养殖的俄罗斯红参线粒体全基因组进行随机测序,分析发现,其基因结构、碱基含量、密码子、tRNA、rRNA、基因间隔与重叠、组成排列等皆与棘皮动物相似;遗传距离及 BLAST 分析发现,俄罗斯红参与仿刺参较为接近。本研究中,俄罗斯红参为引入养殖,作为刺参的地理远缘种,其遗传特点、结构等方面与仿刺参差异较小,具有较高相似性。本研究可为引入养殖俄罗斯红参进一步的遗传系统进化和分类等研究提供资料,同时,对后续俄罗斯红参养殖的推广发展和种质创新与应用提供参考。

参 考 文 献

- Abascal F, Zardoya R, Posada D. ProfTest: Selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics*, 2005, 21(9): 2104–2105
- An HS, Lee JW, Hong SW, *et al.* Genetic differences between wild and hatchery populations of red sea cucumber (*Stichopus japonicus*) inferred from microsatellite markers: Implications for production and stocking programs design. *Genes and Genomics*, 2013, 35(6): 709–717
- Cheng Y, Wang R, Sun Y, *et al.* The complete mitochondrial genome of the small yellow croaker and partitioned Bayesian analysis of Sciaenidae fish phylogeny. *Genetics and Molecular Biology*, 2012, 35(1): 191–199
- Cui Z, Liu Y, Lic P, *et al.* The complete mitochondrial genome of the large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Perciformes, Sciaenidae): Unusual features of its control region and the phylogenetic position of the Sciaenidae. *Gene*, 2009, 432(1–2): 33–43
- Fan SG, Hu CQ, Wen J, *et al.* Mitochondrial genome of *Stichopus horrens* and a new genetic sequence. *Scientia Sinica (Vita)*, 2011, 41(4): 281–288 [范嗣刚, 胡超群, 文菁, 等. 糙刺参(*Stichopus horrens*)线粒体基因组及一种新的基因排列顺序. *中国科学: 生命科学*, 2011, 41(4): 281–288]
- Fu WY. The study on microstructure of spines from four sea urchins and phylogenetic based on complete mitochondrial genome. Master's Thesis of Ocean University of China, 2015 [付婉莹. 四种海胆棘的显微结构和基于线粒体基因组全序列的系统发育学研究. *中国海洋大学硕士研究生学位论文*, 2015]
- Guan CX, Diao QP, Hou DY, *et al.* Study on fatty acids in Russian sea cucumbers by GC-MS. *Journal of Anshan Normal University*, 2015, 17(4): 33–35 [关崇新, 刁全平, 侯冬岩, 等. 俄罗斯海参脂肪酸的气相色谱-质谱分析. *鞍山师范学院学报*, 2015, 17(4): 33–35]
- Hall TA. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999, 41: 95–98
- Kang LS. Phylogenetic analysis of the family Loliginidae based on complete mitochondrial sequences. Master's Thesis of Zhejiang Ocean University, 2018 [康立森. 基于 mtDNA 全基因组探究枪乌贼科的系统发生关系. *浙江海洋大学硕士研究生学位论文*, 2018]
- Li SL, Zhang M, Wang QZ, *et al.* Gene order, characteristics and phylogenetic analysis of mitochondrial genomes in sixteen members in Annelida. *Fisheries Science*, 2015, 34(2): 104–112 [李石磊, 张明, 王庆志, 等. 16 种环节动物线粒体基因排列、特征比较及系统发育分析. *水产科学*, 2015, 34(2): 104–112]
- Li YF, Li MY, Wang J, *et al.* Comparative structure of complete mitochondrial genome in sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fisheries Science*, 2012, 31(8): 454–462 [李云峰, 李梦遥, 王健, 等. 仿刺参线粒体全基因组序列结构及比较研究. *水产科学*, 2012, 31(8): 454–462]
- Li YL. Mitochondrial complete genome determination and molecular evolution analysis of three Schizothoracinae in Qinghai-Tibet Plateau. Doctoral Dissertation of Fudan University, 2012 [李亚莉. 青藏高原三种裂腹鱼线粒体全基因组的测定及分子进化分析. *复旦大学博士研究生学位论文*, 2012]
- Qu HX, Liu XT, Yang YN. Problems and countermeasures in the development of sea cucumber industry. *Agriculture and Technology*, 2016, 36(22): 138 [曲洪霞, 刘心田, 杨燕妮. 刺参产业发展存在的问题及应对措施. *农业与技术*, 2016,

- 36(22): 138]
- Shen X, Tian M, Cheng HL, *et al.* Characteristics and exploration of molecular markers in Holothuroidea mitochondrial genomes. *Fisheries Science*, 2011, 30(7): 400–404 [申欣, 田美, 程汉良, 等. 海参纲线粒体基因组特征分析及分子标记探讨. *水产科学*, 2011, 30(7): 400–404]
- Sun XJ. Studies on larval development and genetics and breeding in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2013 [孙秀俊. 刺参的幼体发育与遗传育种学研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2013]
- Wei LL, Shen HD, Zhang Y, *et al.* Analysis of complete mitochondrial genome of *Onchidium struma* (Mollusca: Gastropoda: Pulmonata: Onchidiidae). *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(4): 493–500 [魏峦峦, 沈和定, 张雨, 等. 瘤背石磺线粒体基因组全序列分析. *水产学报*, 2011, 35(4): 493–500]
- Wen J, Hu CQ, Zhang LP, *et al.* Corrigendum to “Genetic identification of global commercial sea cucumber species on the basis of mitochondrial DNA sequences”. *Food Control*, 2011, 22: 72–77
- Yan JJ. Sequence and organization of *Acrossocheilus fasciatus* and *Zacco platypus* complete mitochondrial genome. Master’s Thesis of Anhui Normal University, 2014 [闫锦锦. 光唇鱼和宽鳍鱲线粒体全序列测定及分析. 安徽师范大学硕士研究生学位论文, 2014]
- Yuan L, Li WY, Ye XF, *et al.* Analysis of population genetic diversity of *Ranodon sibiricus* in China inferred from mitochondrial DNA control region. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2015, 54(2): 194–198 [袁亮, 李伟业, 叶小芳, 等. 基于线粒体 DNA 控制区的新疆北鲎种群遗传多样性分析. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2015, 54(2): 194–198]
- Zhao NN. Cryptic species of China *Coelomactra antiqvata* based on complete mitochondrial genomic evidence. Master’s Thesis of Nanjing Agricultural University, 2013 [赵娜娜. 中国西施舌隐种的线粒体全基因组证据. 南京农业大学硕士研究生学位论文, 2013]

(编辑 冯小花)

Structure and Analysis of Mitochondrial Sequences of Introduced Russian Red Sea Cucumber

ZHAO Qiang^{1,2#}, YANG Shuang^{2,4#}, LIU Xintian³, SUN Guohua^{2①},
FENG Yanwei², WANG Weijun², YANG Jianmin²

(1. *Yantai Institute of Marine Economy, Yantai* 264003; 2. *College of Agriculture, Ludong University, Yantai* 264025;
3. *Weihai Fisheries Technology Extension Station, Weihai* 264200;
4. *College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai* 201306)

Abstract The whole genome of Russian red sea cucumber mitochondria introduced into culture was randomly sequenced and analyzed by high-throughput sequencing. The results show that the genome is 16,111 base pairs (bp) in length, and contains 37 genes, including 22 tRNA, 2 rRNA (1-rRNA, s-rRNA), and 13 protein-coding genes. There are 24 gene-spacing and 5 gene-overlap regions; both the protein-coding gene and the full-sequence pair base exhibit an A and T bias; the highest frequency of amino acid coding is Ser, followed by Leu; and the codon is complete, except ND1 with GTG as the starting codon and the others with ATN as the starting codon. Most termination codons are TAA, but the termination codons of ND2 and ND4 are TTG and TAG, respectively; The length of tRNA ranges from 66 to 72 bp, two genes are duplicated, and 21 genes predict their clover structure. The length and position of 1-rRNA and s-rRNA are different, and the use of bases is similar. The gene arrangement of the protein-coding gene is the same as that of Holothuroidea and Echinoidea, and gene models are shared with Asteroidea and Ophiuroidea. A genetic distance analysis shows that the Russian red sea cucumber is closest to *Apostichopus japonicus* from three habitats. A BLAST analysis shows that Russian red sea cucumbers have the highest homology with *A. japonicus*. A phylogenetic tree was constructed based on the maximum likelihood method and the amino acid and nucleotide sequences, which provides a theoretical basis for subsequent genetic research of Russian red sea cucumbers.

Key words Russian red sea cucumber; Mitochondrial genome; Phylogenetic

① Corresponding author: SUN Guohua, E-mail: sgh_smile@163.com