

doi: 10.3969/j.issn.0253-4193.2013.05.015

申欣,田美,孟学平,等. 棘皮动物线粒体基因组的基因重排、分子标记及系统发生分析[J]. 海洋学报, 2013, 35(5): 137—146.

Shen Xin, Tian Mei, Meng Xueping, et al. Gene rearrangement, molecular markers and phylogenetic analyses of echinoderms mitochondrial genomes[J]. Acta Oceanologica Sinica(in Chinese), 2013, 35(5): 137—146.

棘皮动物线粒体基因组的基因重排、 分子标记及系统发生分析

申欣^{1,2}, 田美¹, 孟学平¹, 程汉良¹, 阎斌伦¹

(1. 淮海工学院 海洋学院, 江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏 连云港 222005; 2. 中国科学院 北京生命科学研究院, 北京 100101)

摘要: 棘皮动物(echinoderms)是海洋生境中所特有的无脊椎动物重要类群, 本文全面比较分析了棘皮动物 29 个物种的线粒体全基因组。线粒体基因组主编码基因的分析结果显示, 海胆纲 Echinoidea 和海参纲 Holothuroidea 物种的基因排列完全相同; 海星纲 Asteroidea 物种之间的基因排列也完全相同, 然而与海胆纲、海参纲相比, 存在一个长片段的倒位。海百合纲 Crinoidea 的栉羽星 *Phanogenia gracilis* 和花形羽枝 *Florometra serratissima* 主编码基因的基因排列完全相同, 地中海海羊齿和海百合 *Neogymnocrinus richeri* 与此相比, 均存在一个蛋白质编码基因(*nad4L*)的易位。蛇尾纲 Ophiuroidea 真蛇尾目 Ophiurida 的 3 个科(阳遂足科 Amphiuridae、辐蛇尾科 Ophiactidae 和栉蛇尾科 Ophiocomidae)主编码基因的基因排列完全相同, 而同属于真蛇尾目, 另外一个科(真蛇尾科 Ophiuridae)的白色真蛇尾 *Ophiura albida* 和灰色真蛇尾 *Ophiura lutkeni*, 与同目的前 3 个科相比, 存在 3 个蛋白质编码基因(*nad1*、*nad2* 和 *cob*)的倒位。蛇尾纲蔓蛇尾目 Euryalida 的海盘 *Astrospartus mediterraneus*, 与真蛇尾目 5 个线粒体基因组相比, 存在主编码基因的重排。棘皮动物线粒体单基因的变异位点特征显示, *nad5*、*nad4* 和 *nad2* 基因是理想的分子标记基因。基于 29 个线粒体基因组的氨基酸序列, 通过两种方法(邻接法和最大似然法)所构建系统发生树的拓扑结构完全一致。支持其下分的 5 个纲(蛇尾纲、海参纲、海胆纲、海星纲和海百合纲)均为单系群。线粒体基因组的数据支持棘皮动物动物在纲层次的亲缘关系为:(((海胆纲+海星纲)+海参纲)+蛇尾纲)+海百合纲, 海百合纲作为棘皮动物中最为古老的类群, 位于系统发生树的根部。基于线粒体基因组构建的系统发生树, 支持所有的科均为单系群; 综合系统发生树及主编码基因的基因重排分析, 均支持真蛇尾目并非单系发生, 真蛇尾目的有效性还值得今后深入研究。

关键词: 线粒体基因组; 蛋白质编码基因; 基因重排; 分子标记; 系统发生; 棘皮动物

中图分类号: Q915.821

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2013)05-0137-10

收稿日期: 2012-12-05; 修订日期: 2013-05-17。

基金项目: 国家自然科学基金(40906067); 香江学者计划(XJ2012056); 中国博士后科学基金(2012M510054, 2012T50218); 中央财政支持地方高校发展专项资金(CXTD04, CXTD01); 江苏省海洋生物技术重点实验室资助项目(2009HS13, 2011HS009); 江苏省“青蓝工程”人才基金资助项目(苏教师[2010]27号); 江苏高校优势学科建设工程资助项目。

作者简介: 申欣(1981—), 男, 山东省成武县人, 副教授, 博士, 研究方向: 基因组学和分子系统学。E-mail: shenthin@163.com

1 引言

棘皮动物(echinoderms)是海洋生境中所特有的无脊椎动物重要类群,通常下分 5 个纲:海星纲 Asterozoidea、蛇尾纲 Ophiurozoidea、海胆纲 Echinozoidea、海参纲 Holothurozoidea 和海百合纲 Crinozoidea^[1-2]。棘皮动物的化石记录可以追溯至五亿多年前的寒武纪,其化石种类接近 13 000 种。棘皮动物现存种类数目繁多,全球约 7 000 余种,其内部各类群之间的系统发生关系也是动物分类学中的一个经典难题^[1,3];与此同时,棘皮动物的分布范围非常广泛,从潮间带到数千米的深海,从赤道到极地均有分布,在海洋生态系统中占据重要位置;另外,棘皮动物中还包含众多的经济物种,在渔业资源、活性物质开发和水产养殖中占据一定的地位。后生动物基因组包括核基因组和线粒体基因组,线粒体基因组具有进化速率稳定和基因排列紧凑等优点,被广泛应用到后生动物种群遗传、生物地理及系统发生的研究中。本文系统分析比较了棘皮动物现有的 29 个物种线粒体基因组,为这一海洋特有的重要生物类群资源保护和利用提供宝贵的基础资料。

2 材料和方法

2.1 数据检索与获取

登陆 GenBank 基因组数据库,通过关键词“echinoderms”检索获得所有棘皮动物线粒体基因组。包括蛇尾纲的海盘 *Astrospartus mediterraneus*、白色真蛇尾 *Ophiura albida*、灰色真蛇尾 *Ophiura lutkeni*、小双鳞蛇尾 *Amphipholis squamata*、尖棘紫蛇尾 *Ophiopholis aculeata* 和黑仿栉蛇尾 *Ophiocomina nigra*;海星纲的砂海星 *Luidia quinalia*、多棘槭海星 *Astropecten polyacanthus*、赭色豆海星 *Pisaster ochraceus*、多棘海盘车 *Asterias amurensis*、海燕 *Patiria pectinifera*、棘冠海星 *Acanthaster planci* 和长棘海星 *Acanthaster brevispinus*;海胆纲的拟球海胆 *Paracentrotus lividus*、绿棘球海胆 *Strongylocentrotus droebachiensis*、白棘球海胆 *Strongylocentrotus pallidus*、紫棘球海胆 *Strongylocentrotus purpuratus*、阿巴海胆 *Arbacia lixula* 和心形海胆 *Echinocardium cordatum*;海参纲的福氏海参 *Holothuria forskali*、仿刺参 *Apostichopus japonicus*、拟刺参 *Parastichopus nigripunctatus*、糙刺参 *Stichopus horrens*、刺参 *Stichopus* sp. SF-2010 和瓜参 *Cucumaria miniata*;以及海百合纲的栉羽星 *Phanogenia gracilis*、地中海海羊齿 *Antedon mediterranea*、花形羽枝 *Florometra serratissima* 和海百合 *Neogymnocrinus richeri*^[3-17]。

nea、花形羽枝 *Florometra serratissima* 和海百合 *Neogymnocrinus richeri*^[3-17]。

2.2 基因排列分析

由于转运 RNA(tRNA)基因发生易位或丢失的频率较高,因此,在较高阶元基因组的基因排列比较中,针对主编码基因(蛋白质编码基因和核糖体 RNA 基因)的基因排列所进行的比较分析,就显得更加有价值。本文针对 29 个棘皮动物线粒体基因组主编码基因的基因排列进行了系统的分析比较。

2.3 变异位点与分子标记基因分析

综合分析 29 种棘皮动物线粒体基因组,计算棘皮动物门内单基因的变异位点;并且基于蛇尾纲和海百合纲线粒体基因组数据,分别计算两个纲内部的单基因变异位点。结合海星纲、海胆纲和海参纲的基因变异位点分析结果,全面揭示棘皮动物线粒体基因组的变异位点特征,以此确定合适的分子标记基因。借助于 Clustal X 2.0^[18]对所有蛋白质编码基因(*atp6*、*atp8*、*cob*、*cox1-3*、*nad1-6* 和 *nad4L*)的核苷酸序列,分别做多重序列比对。借助于 DnaSP 5.10.01^[19]分析棘皮动物门内,以及蛇尾纲、海百合纲内部单基因的变异位点。

2.4 系统发生分析

所有蛋白质编码基因(*cox1-3*、*cob*、*nad1-4*、*nad4L*、*nad5*、*nad6*、*atp6* 和 *atp8*)的氨基酸序列首尾相连后,借助于 Clustal X 2.0^[18]做多重序列比对。对于多重序列比对结果,分别借助于邻接法(Neighbour Joining, NJ)与最大似然法(Maximum Likelihood, ML)进行系统发生关系重建。邻接法使用的软件为 MEGA 5.1^[20],最大似然法使用的软件为 PhyML 3.0^[21]。在系统发生树构建时,使用自展值(Bootstrap=100)检验法,来评估系统发生树中每个分支的可靠性。

3 结果和讨论

3.1 基因重排

所有海胆纲物种和海参纲物种线粒体基因组主编码基因的基因排列均完全相同,为:*cox1-nad4L-cox2-atp8-atp6-cox3-nad3-nad4-nad5-nad6-cob-srRNA-nad1-nad2-lrRNA*(下划线标示的基因在负链上编码,下同)。海星纲 7 个物种线粒体基因组主编码基因的基因排列完全相同,为:*cox1-nad4L-cox2-atp8-atp6-cox3-nad3-nad4-nad5-nad6-cob-srRNA-lrRNA-nad2-nad1*。与海胆纲、海参纲线粒体基因组的基因排列相比,海星纲物种线粒体基因组中存在一

个长片段的倒位(包括2个蛋白质编码基因和1个核糖体RNA基因:*lrRNA-nad2-nad1*)(图1)。

蛇尾纲真蛇尾目的三个科(阳遂足科、辐蛇尾科和栉蛇尾科)主编码基因的基因排列完全相同:*cox1-nad4L-cox2-atp8-atp6-cox3-nad3-nad4-nad5-nad6-lrRNA-srRNA-cob-nad2-nad1*。而同属于真蛇尾目,另外一个科(真蛇尾科)的白色真蛇尾和灰色真蛇尾,与同目前3个科相比,存在3个蛋白质编码基因(*nad1*、*nad2*和*cob*)的倒位。蔓蛇尾目的海盘,与真蛇尾目5个线粒体基因组相比,存在多个主编码基

因的重排。蛇尾纲6个物种线粒体基因组共享的基因排列为:*cox1-nad4L-cox2-atp8-atp6-cox3-nad3-nad4-nad5-nad6*(图1)。

海百合纲海羊齿目的栉羽星和花形羽枝主编码基因的基因排列完全相同,为:*cox1-nad4L-cox2-atp8-atp6-cox3-nad3-nad4-nad5-nad6-cob-srRNA-lrRNA-nad2-nad1*。地中海海羊齿和海百合 *Neogymnocrinus richeri* 与此相比,分别存在一个蛋白质编码基因(*nad4L*)的易位(图1)。

多棘海盘车 *Asterias amurensis*、多棘槭海星 *Astropecten polyacanthus*、赭色豆海星 *Pisaster ochraceus*、砂海星 *Luidia quinaria*、长棘海星 *Acanthaster brevispinus*、棘冠海星 *Acanthaster planci*、海燕 *Patiria pectinifera*(海星纲):

<i>cox1</i>	<i>nad4L</i>	<i>cox2</i>	<i>atp8</i>	<i>atp6</i>	<i>cox3</i>	<i>nad3</i>	<i>nad4</i>	<i>nad5</i>	<i>nad6</i>	<i>cob</i>	<i>srRNA</i>	<i>lrRNA</i>	<i>nad2</i>	<i>nad1</i>
-------------	--------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	------------	--------------	--------------	-------------	-------------

小双鳞蛇尾 *Amphipholis squamata*(蛇尾纲:真蛇尾目:阳遂足科)、尖棘紫蛇尾 *Ophiopholis aculeata*(蛇尾纲:真蛇尾目:辐蛇尾科)、黑仿栉蛇尾 *Ophiocoma nigra*(蛇尾纲:真蛇尾目:栉蛇尾科):

<i>cox1</i>	<i>nad4L</i>	<i>cox2</i>	<i>atp8</i>	<i>atp6</i>	<i>cox3</i>	<i>nad3</i>	<i>nad4</i>	<i>nad5</i>	<i>nad6</i>	<i>lrRNA</i>	<i>srRNA</i>	<i>cob</i>	<i>nad2</i>	<i>nad1</i>
-------------	--------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	--------------	--------------	------------	-------------	-------------

白色真蛇尾 *Ophiura albida*、灰色真蛇尾 *Ophiura lutkeni*(蛇尾纲:真蛇尾目:真蛇尾科):

<i>cox1</i>	<i>nad4L</i>	<i>cox2</i>	<i>atp8</i>	<i>atp6</i>	<i>cox3</i>	<i>nad3</i>	<i>nad4</i>	<i>nad5</i>	<i>nad6</i>	<i>lrRNA</i>	<i>srRNA</i>	<i>nad1</i>	<i>nad2</i>	<i>cob</i>
-------------	--------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	--------------	--------------	-------------	-------------	------------

海盘 *Astrospartus mediterraneus*(蛇尾纲:蔓蛇尾目):

<i>cox1</i>	<i>nad4L</i>	<i>cox2</i>	<i>atp8</i>	<i>atp6</i>	<i>cox3</i>	<i>nad3</i>	<i>nad4</i>	<i>nad5</i>	<i>nad6</i>	<i>srRNA</i>	<i>lrRNA</i>	<i>cob</i>	<i>nad2</i>	<i>nad1</i>
-------------	--------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	--------------	--------------	------------	-------------	-------------

心形海胆 *Echinocardium cordatum*、阿巴海胆 *Arbacia lixula*、拟球海胆 *Paracentrotus lividus*、绿棘球海胆 *Strongylocentrotus droebachiensis*、白棘球海胆 *Strongylocentrotus pallidus*、紫棘球海胆 *Strongylocentrotus purpuratus*(海胆纲);福氏海参 *Holothuria forskali*、仿刺参 *Apostichopus japonicus*、拟刺参 *Parastichopus nigri punctatus*、糙刺参 *Stichopus horrens*、刺参 *Stichopus sp.* SF-2010、瓜参 *Cucumaria miniata*(海参纲):

<i>cox1</i>	<i>nad4L</i>	<i>cox2</i>	<i>atp8</i>	<i>atp6</i>	<i>cox3</i>	<i>nad3</i>	<i>nad4</i>	<i>nad5</i>	<i>nad6</i>	<i>cob</i>	<i>srRNA</i>	<i>nad1</i>	<i>nad2</i>	<i>lrRNA</i>
-------------	--------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	------------	--------------	-------------	-------------	--------------

栉羽星 *Phanogenia gracilis*、花形羽枝 *Florometra serratissima*(海百合纲):

<i>cox1</i>	<i>nad4L</i>	<i>cox2</i>	<i>atp8</i>	<i>atp6</i>	<i>cox3</i>	<i>nad3</i>	<i>nad4</i>	<i>nad5</i>	<i>nad6</i>	<i>cob</i>	<i>srRNA</i>	<i>lrRNA</i>	<i>nad2</i>	<i>nad1</i>
-------------	--------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	------------	--------------	--------------	-------------	-------------

地中海海羊齿 *Antedon mediterranea*(海百合纲):

<i>cox1</i>	<i>cox2</i>	<i>atp8</i>	<i>atp6</i>	<i>cox3</i>	<i>nad3</i>	<i>nad4</i>	<i>nad4L</i>	<i>nad5</i>	<i>nad6</i>	<i>cob</i>	<i>srRNA</i>	<i>lrRNA</i>	<i>nad2</i>	<i>nad1</i>
-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	--------------	-------------	-------------	------------	--------------	--------------	-------------	-------------

海百合 *Neogymnocrinus richeri*(海百合纲):

<i>cox1</i>	<i>cox2</i>	<i>atp8</i>	<i>atp6</i>	<i>nad4L</i>	<i>cox3</i>	<i>nad3</i>	<i>nad4</i>	<i>nad5</i>	<i>nad6</i>	<i>cob</i>	<i>srRNA</i>	<i>lrRNA</i>	<i>nad2</i>	<i>nad1</i>
-------------	-------------	-------------	-------------	--------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	------------	--------------	--------------	-------------	-------------

图1 棘皮动物29个物种线粒体基因组的基因排列比较(不包含转运RNA基因)

负链上编码的基因以下划线标示;各纲内部发生重排的基因以阴影标示

当前的数据资料显示,在蛇尾纲与海百合纲内部,基因排列顺序并不保守;海胆纲与海参纲物种主编码基因的基因排列完全一致,海星纲物种线粒体基因组与此相比,存在一个长片段的倒位。棘皮动物门现存7000多个物种,当前本类群线粒体基因组的信息仍然较为有限,还无法提供较深层次的系统发生信息。但可以预测,当越来越多棘皮动物线粒体基因组被完成时,基因重排可能会成为探讨棘皮动物内部系统发生关系的重要信息来源。

3.2 蛋白质编码基因

在13个蛋白质编码基因中,有7个基因(*cox1*—

3、*cob*、*nad3*、*nad4*和*nad6*)使用“ATN”作为起始密码子;其余6个基因(*nad1*、*nad2*、*nad4L*、*nad5*、*atp6*和*atp8*)存在“ATN”之外的起始密码子(如“GTG”等)。6个基因(*cox3*、*nad3*、*nad4L*、*nad6*、*atp6*和*atp8*)在所有棘皮动物中,均使用完全终止密码子(“TAA”或“TAG”);除此之外,其余7个基因(*cox1*、*cox2*、*cob*、*nad1*、*nad2*、*nad4*和*nad5*),在部分物种中存在不完全终止密码子(“TA—”或“T—”)的现象(见表1)。虽然在近缘类群之间,同一蛋白质编码基因所编码的氨基酸数目较为保守,然而,在棘皮动物门的层次上,所有13个蛋白质编码基因的氨基酸数目均存在一定差

表 1 棘皮动物线粒体基因组 13 个蛋白质编码基因的基本特征

物种名称	接收号	cox1	cox2	cox3	cob	nad1	nad2	nad3	nad4	nad4L	nad5	nad6	atp6	atp8
<i>Asterias amurensis</i> 多棘海盘车	NO.	516	229	259	379	325	353	116	460	95	638	162	230	55
	I codon	ATG	ATG	ATG	ATG	GTG	GTG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
	T codon	TAA	TAA	TAA	T-	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA
<i>Pisaster ochraceus</i> 赭色豆海星	NO.	517	229	260	379	324	353	116	460	98	639	162	228	55
	I codon	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATT	ATG	ATG	ATG	ATG
	T codon	TAA	TAA	TAA	T-	TAA	TAG	TAG	TAA	TAA	TAG	TAA	TAA	TAA
<i>Astropecten polyacanthus</i> 多棘刺海星	NO.	517	229	260	379	325	355	116	459	98	634	163	230	55
	I codon	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	GTG	ATT	ATG	ATT	ATG	ATG	ATG	ATG
	T codon	TAA	T-	TAA	T-	T-	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA
<i>Luidia quinaria</i> 砂海星	NO.	517	230	260	379	325	355	116	459	98	636	163	230	55
	I codon	ATG	ATG	ATG	ATG	GTG	GTG	ATT	ATG	ATT	ATG	ATG	ATG	ATG
	T codon	TAA	TAG	TAA	T-	TAG	TAA	TAG	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA
<i>Acanthaster brevispinus</i> 长棘海星	NO.	517	229	260	379	326	354	116	460	98	633	162	230	54
	I codon	ATG	ATG	ATG	ATG	GTG	ATG	ATT	ATG	ATT	ATG	ATG	ATG	ATG
	T codon	TA-	T-	TAA	T-	TAG	TAG	TAA	TAG	TAA	TAA	TAG	TAA	TAA
<i>Acanthaster planci</i> 棘冠海星	NO.	517	229	260	379	326	354	116	460	98	633	162	230	54
	I codon	ATG	ATG	ATG	ATG	GTG	ATG	ATT	ATG	ATT	ATG	ATG	ATG	ATG
	T codon	TA-	T-	TAA	T-	TAG	TAG	TAA	TAA	TAA	TAA	TAG	TAA	TAA
<i>Patiria pectinifera</i> 海燕	NO.	517	229	260	379	326	354	110	460	98	643	162	230	54
	I codon	ATG	ATG	ATG	ATG	GTG	ATG	ATT	ATG	ATT	GTG	ATG	ATG	ATG
	T codon	TAA	T-	TAA	T-	TAG	TAA	TAG	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA
<i>Astrospartus mediterraneus</i> 海盘	NO.	532	229	264	381	330	354	117	457	98	589	159	230	53
	I codon	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
	T codon	TAG	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA	TAG	TAA	TAA	TAG	TAA	TAA
<i>Ophiura albida</i> 白色真蛇尾	NO.	534	230	265	380	333	351	117	453	98	595	158	233	53
	I codon	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
	T codon	TAA	TAA	TAA	TAG	TAA	TAG	TAA	TAG	TAA	TAA	TAG	TAA	TAA
<i>Ophiura lütkeni</i> 灰色真蛇尾	NO.	534	237	265	380	333	351	117	453	98	597	159	235	55
	I codon	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
	T codon	TAA	T-	TAA	T-	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA	TAG	TAA	TAA

(续表)

续表 1

物种名称	接收号	cox1	cox2	cox3	cob	nad1	nad2	nad3	nad4	nad4L	nad5	nad6	atp6	atp8		
<i>Amphipholis squamata</i> 小双鳞蛇尾	NC_013876	NO.	533	229	265	391	330	346	119	448	98	596	161	227	41	
		I codon	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	TTG	GTA
		T codon	TAA	TA-	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA	TAG	TAA	TAA	TAA
<i>Ophiopholis aculeate</i> 尖棘紫蛇尾	NC_005334	NO.	528	231	264	381	332	352	114	452	96	593	159	227	57	
		I codon	ATC	ATG	ATG	ATG	ATT	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
		T codon	T-	TAA	TAA	T-	T-	TAG	TAA	TAA	TAA	TAG	TAA	TAA	TAA	TAA
<i>Ophiocoma nigra</i> 黑仿栉蛇尾	NC_013874	NO.	529	229	265	398	330	347	117	456	98	596	152	230	54	
		I codon	ATG	ATG	ATG	ATG	GTG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
		T codon	T-	TAA	TAA	TAA	TAG	TAG	TAA	TAG	TAA	TAA	TAA	TAA	TAG	TAA
<i>Echinocardium cordatum</i> 心形海胆	NC_013881	NO.	517	229	260	380	323	352	116	470	97	640	162	231	55	
		I codon	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATC	ATG	ATG	ATG	GTG
		T codon	TAG	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA	TAG	TAG	TAA	TAG	TAG	TAA	TAA
<i>Arbacia lixula</i> 阿巴海胆	NC_001770	NO.	516	229	260	380	323	351	116	461	97	638	162	231	54	
		I codon	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATT	ATG	ATG	ATG	GTG
		T codon	TAA	TAG	TAA	TAA	TAG	TAA	TAA	TAG	TAG	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA
<i>Paracentrotus lividus</i> 拟球海胆	NC_001572	NO.	517	229	260	380	323	352	116	463	97	638	160	232	54	
		I codon	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATC	ATG	ATG	ATG	GTG
		T codon	TAA	TAA	TAA	T-	TAA	TAG	TAG	TAG	TAA	TAG	TAG	TAG	TAA	TAA
<i>Strongylocentrotus droe-</i> <i>bachiensis</i> 绿棘球海胆	NC_009940	NO.	517	229	260	380	323	352	116	462	97	639	165	227	54	
		I codon	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATC	ATG	ATG	ATA	GTG
		T codon	TAA	TAA	TAA	TAG	TAA	TAG	TAG	TAG	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA
<i>Strongylocentrotus palli-</i> <i>dus</i> 白棘球海胆	NC_009941	NO.	517	229	260	380	323	352	116	462	97	639	165	229	54	
		I codon	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATC	ATG	ATG	ATG	GTG
		T codon	TAA	TAA	TAA	TAG	TAA	TAG	TAG	TAG	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA
<i>Strongylocentrotus pur-</i> <i>puratus</i> 紫棘球海胆	NC_001453	NO.	517	229	260	380	322	352	116	462	97	637	165	231	55	
		I codon	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATC	ATG	ATG	ATG	GTG
		T codon	TAA	TAA	TAA	TA-	TAA	TAG	TAG	TAG	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA
<i>Holothuria forskali</i> 福氏海参	NC_013884	NO.	518	229	260	380	323	347	114	454	98	610	162	227	54	
		I codon	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
		T codon	TAA	T-	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA	TAG	TAG	TAA	TAA	TAG	TAA	TAA

(续表)

续表 I

物种名称	接收号	cox1	cox2	cox3	cob	nad1	nad2	nad3	nad4	nad4L	nad5	nad6	atp6	atp8		
<i>Apostichopus japonicus</i> 仿刺参	NC_012616	NO.	517	229	260	381	323	347	114	456	98	611	162	227	55	
		I codon	ATG	ATG	ATG	ATG	GTG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
		T codon	TAA	TAA	TAA	TAG	TAA	TAA	TAA	TAA	TAG	TAA	TAA	TAG	TAA	TAA
<i>Parastichopus nigripunctatus</i> 拟刺参	NC_013432	NO.	517	229	260	381	323	347	114	456	98	611	162	227	55	
		I codon	ATG	ATG	ATG	ATG	GTG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
		T codon	TAA	TAA	TAA	TAG	TAA	TAA	TAA	TAG	TAA	T-	TAG	TAA	TAA	
<i>Stichopus horrens</i> 糙刺参	NC_014454	NO.	517	229	260	380	323	348	114	456	98	614	162	227	58	
		I codon	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
		T codon	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA	TAG	TAG	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA
<i>Stichopus sp. SF-2010</i> 刺参	NC_014452	NO.	517	229	260	380	323	344	114	456	98	614	162	227	58	
		I codon	ATG	ATG	ATG	ATG	GTG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
		T codon	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA	TAG	TAG	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA
<i>Cucumaria miniata</i> 瓜参	NC_005929	NO.	516	229	260	380	323	347	114	451	98	607	161	227	55	
		I codon	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	GTG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
		T codon	TAG	TAA	TAG	T-	TAA	TAA	TAA	T-	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA
<i>Phanogenia gracilis</i> 栉羽星	NC_007690	NO.	517	229	260	381	324	348	117	460	98	628	163	229	56	
		I codon	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	GTG	GTG	ATG	ATG	ATG
		T codon	TAA	TAA	TAA	T-	TAA	TAA	TAA	TAA	TAG	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA
<i>Antedon mediterranea</i> 地中海海羊齿	NC_010692	NO.	517	229	260	380	324	345	117	458	98	625	163	229	54	
		I codon	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	GTG	ATG	ATG	GTG
		T codon	TAG	TAA	TAA	TAA	T-	T-	TAA	TAA	TAA	TAA	TAG	TAA	TAG	TAA
<i>Florumetra serratissima</i> 花形羽枝	NC_001878	NO.	517	229	260	380	325	345	117	457	98	627	164	230	55	
		I codon	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
		T codon	T-	TAA	TAA	TAA	T-	T-	TAG	TAA	TAA	TAA	TAA	TAA	TAG	TAA
<i>Neogymnocrinus richeri</i> 海百合	NC_007689	NO.	517	228	260	380	325	346	117	460	98	627	164	228	57	
		I codon	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	GTG	ATG	ATG	ATG
		T codon	TAG	TAG	TAG	T-	T-	TAA	TAA	TAG	TAG	TAA	TAA	TAA	TAG	TAA

异,氨基酸数目差异在10个以内的基因包括 *cox2*、*cox3*、*nad3*、*nad4L* 和 *atp6* 等5个基因(见表1)。

3.3 棘皮动物线粒体基因组的变异位点及分子标记分析

从29种棘皮动物单基因的变异位点分析结果来看,在13个蛋白质编码基因中,变异位点数最多的基因为 *nad5* 基因,达到1201个,随后是 *nad4*、*nad2* 和 *cox1* 基因,分别达到963、798和755个(表2)。因此, *nad5*、*nad4* 和 *nad2* 基因可以作为 *cox1* 基因辅助的分子标记,用于棘皮动物物种或群体遗传的研究。在

蛇尾纲中,变异位点数最多的基因为 *nad5* 基因,达到650个,随后是 *nad4*、*nad2* 和 *cox1* 基因,分别达到529、475和390个(见表3)。在海百合纲中, *cox1* 基因最为保守,其次为 *cox2*、*cox3* 和 *cob* 基因。变异位点数最多的为 *nad5* 基因,达到143个,随后是 *nad4* 和 *nad2* 基因,分别达到118和99个(见表4)。综合海参纲、海胆纲及海星纲的分析结果^[22-24],可以看出,在棘皮动物现有的各个类群中, *nad5*、*nad4* 和 *nad2* 均是较为理想的分子标记基因。

表2 棘皮动物线粒体单基因的变异位点分析

基因名称	<i>atp6</i>	<i>atp8</i>	<i>cob</i>	<i>cox1</i>	<i>cox2</i>	<i>cox3</i>	<i>nad1</i>	<i>nad2</i>	<i>nad3</i>	<i>nad4</i>	<i>nad4L</i>	<i>nad5</i>	<i>nad6</i>
总位点数*	658	101	1124	1533	678	767	939	959	309	1277	271	1629	399
不变位点数	138	13	398	725	222	266	277	112	82	253	42	359	60
变异位点数	520	88	726	808	456	501	662	847	227	1024	229	1270	339
单现突变数	34	6	82	53	42	46	58	49	16	61	8	69	18
简约位点数	486	82	644	755	414	455	604	798	211	963	221	1201	321
变异位点百分比	79.03	87.13	64.59	52.71	67.26	65.32	70.50	88.32	73.46	80.19	84.50	77.96	84.96

注: * 总位点数不包含插入和缺失位点,下同。

表3 蛇尾纲线粒体单基因的变异位点分析

基因名称	<i>atp6</i>	<i>atp8</i>	<i>cob</i>	<i>cox1</i>	<i>cox2</i>	<i>cox3</i>	<i>nad1</i>	<i>nad2</i>	<i>nad3</i>	<i>nad4</i>	<i>nad4L</i>	<i>nad5</i>	<i>nad6</i>
总位点数	664	121	1134	1565	687	788	964	1016	344	1344	288	1713	447
不变位点数	244	32	556	917	335	395	407	227	125	459	82	592	118
变异位点数	420	89	578	648	352	393	557	789	219	885	206	1121	329
单现突变数	167	34	242	258	152	173	214	314	81	356	88	471	154
简约位点数	253	55	336	390	200	220	343	475	138	529	118	650	175
变异位点百分比	63.25	73.55	50.97	41.41	51.24	49.87	57.78	77.66	63.66	65.85	71.53	65.44	73.60

表4 海百合纲线粒体单基因的变异位点分析

基因名称	<i>atp6</i>	<i>atp8</i>	<i>cob</i>	<i>cox1</i>	<i>cox2</i>	<i>cox3</i>	<i>nad1</i>	<i>nad2</i>	<i>nad3</i>	<i>nad4</i>	<i>nad4L</i>	<i>nad5</i>	<i>nad6</i>
总位点数	687	163	1141	1553	687	783	970	1025	354	1373	295	1878	485
不变位点数	435	81	743	1189	482	538	624	561	214	804	172	1062	233
变异位点数	252	82	398	364	205	245	346	464	140	569	123	816	252
单现突变数	207	66	310	285	167	198	282	373	114	451	103	673	190
简约位点数	45	16	88	79	38	47	64	91	26	118	20	143	62
变异位点百分比	36.68	50.31	34.88	23.44	29.84	31.29	35.67	45.27	39.55	41.44	41.69	43.45	51.96

3.4 系统发生关系分析

当前在全球范围内,基于线粒体基因组基因排列和蛋白质编码基因信息探讨棘皮动物内部的系统发生关系才刚刚兴起^[3,5,7-9,14-17]。基于29个线粒体基因

组,对棘皮动物门进行系统、全面的进化关系分析尚未见报道。本文基于所有棘皮动物线粒体基因组的氨基酸序列,借助于邻接法与最大似然法所构建系统发育树,不仅拓扑结构完全一致,而且绝大多数分支的自展

值均非常高(图 2)。从而表明,线粒体基因组应用于深入探讨棘皮动物内部的系统发生关系具有稳定、可靠的优点。从系统发生树的结果可以看出,棘皮动物下分的 5 个纲(蛇尾纲、海参纲、海胆纲、海星纲和海百合纲)均为单系群。线粒体基因组的数据支持棘皮动物在纲层次的亲缘关系为:(((海胆纲+海星纲)+海参纲)+蛇尾纲)+海百合纲,海百合纲作为棘皮动物中最为古老的类群,位于系统发生树的根部。

29 个棘皮动物分属于 20 个科,基于线粒体基因组构建的系统发生树,支持所有的 20 个科均为单系群;同时,在目的层次上,共有 12 个目,除了真蛇尾目外,其余 11 个目均为单系群。真蛇尾目的 5 个物种

(小双鳞蛇尾、尖棘紫蛇尾、黑仿栉蛇尾、白色真蛇尾和灰色真蛇尾)分属于 4 个科。其中阳遂足科、辐蛇尾科和栉蛇尾科聚为一支,白色真蛇尾和灰色真蛇尾组成的真蛇尾科却与蔓蛇尾目筐蛇尾科的海盘聚为一支(BPN=100,BPM=91)(图 2)。从主编码基因的基因排列情况来看,阳遂足科、辐蛇尾科和栉蛇尾科物种线粒体基因组主编码基因的基因排列完全相同,而真蛇尾科的白色真蛇尾和灰色真蛇尾,与同目的前 3 个科相比,存在 3 个蛋白质编码基因(*nad1*、*nad2* 和 *cob*)的倒位(见图 1)。综合系统发生树及主编码基因的基因排列分析结果,均支持真蛇尾目并非单系发生(图 1,图 2)。

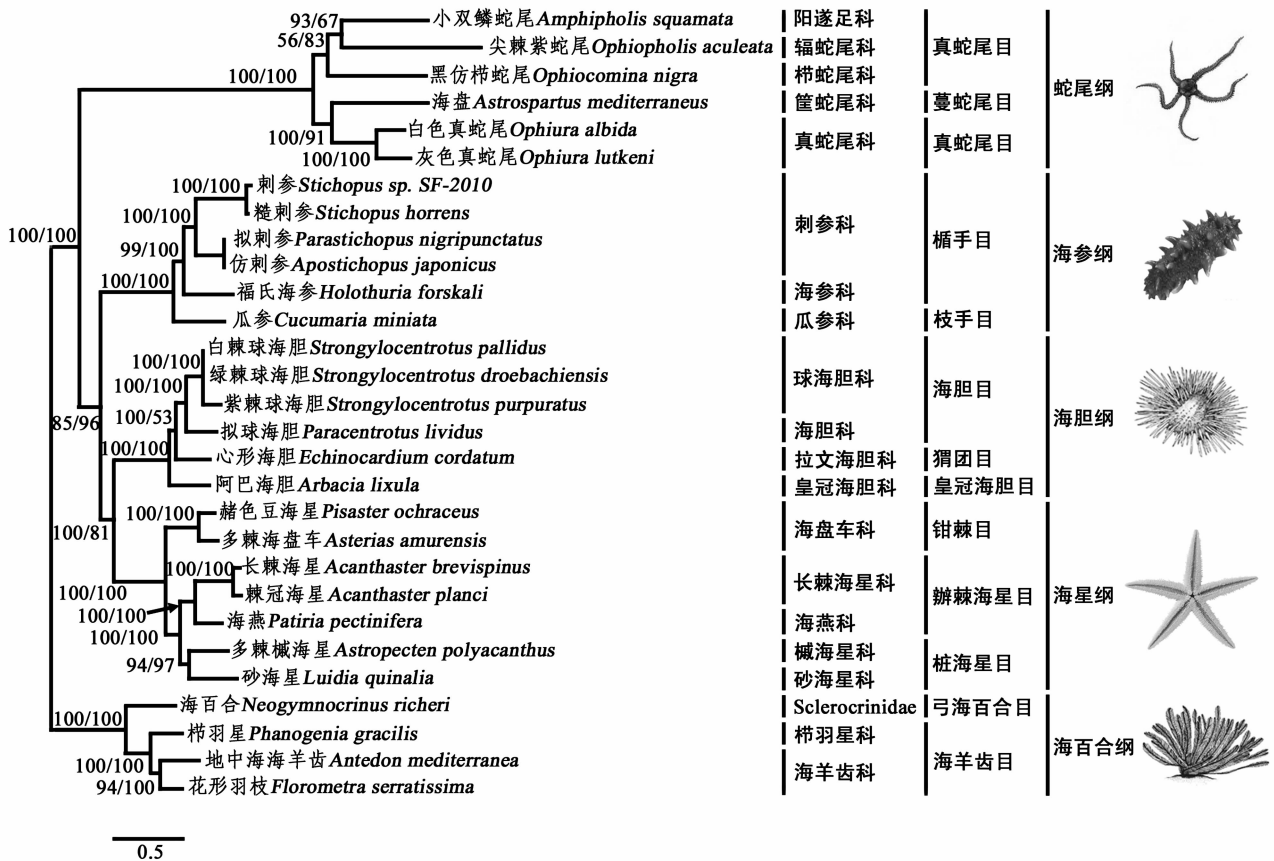


图 2 基于邻接法与最大似然法构建的系统发生树
第一、第二位数分别表示邻接法和最大似然法的自展值(Bootstrap=100)

4 讨论

线粒体基因组主编码基因的分析结果显示,在蛇尾纲和海百合纲内部,基因排列顺序并不保守;海胆纲和海参纲物种主编码基因的基因排列完全一致,海星纲物种线粒体基因组与此相比,存在一个长片段的

倒位。蛇尾纲真蛇尾目的 3 个科(阳遂足科、辐蛇尾科和栉蛇尾科)主编码基因的基因排列完全相同,而同属于真蛇尾目,另外一个科(真蛇尾科)的白色真蛇尾和灰色真蛇尾,与同目的前 3 个科相比,存在 3 个蛋白质编码基因(*nad1*、*nad2* 和 *cob*)的倒位。蛇尾纲蔓蛇尾目的海盘,与真蛇尾目 5 个线粒体基因组相

比,存在主编码基因的重排。海百合纲的栉羽星和花形羽枝主编码基因的基因排列完全相同,地中海海羊齿和海百合与此相比,分别存在一个蛋白质编码基因(*nad4L*)的易位。在13个蛋白质编码基因中,有7个基因(*cox1-3*、*cob*、*nad3*、*nad4*和*nad6*)使用“ATN”作为起始密码子;其余6个基因存在“ATN”之外的起始密码子。6个基因(*cox3*、*nad3*、*nad4L*、*nad6*、*atp6*和*atp8*)在所有棘皮动物中,均使用完全终止密码子(“TAA”或“TAG”);除此之外,其余7个基因,在部分物种中存在不完全终止密码子(“TA-”或“-”)的现象。虽然在近缘类群之间,同一蛋白质编码基因所编码的氨基酸数目较为保守,然而,在棘皮动物门的层次上,所有13个蛋白质编码基因的氨基酸数目均存在一定差异。综合分析29种棘皮动物线粒体基因组,计算棘皮动物门内单基因的变异位点;并且基于蛇尾纲和海百合纲线粒体基因组数据,计算两个纲内部的单基因变异位点。结合海星纲、海胆纲和海参

纲的基因变异位点分析结果表明,在棘皮动物群体遗传和生物地理的研究中,*nad5*、*nad4*和*nad2*均是较为理想的分子标记基因,为棘皮动物内部各类群生物资源的保护及合理利用提供珍贵的基础资料。基于29个线粒体基因组的氨基酸序列,通过两种方法(邻接法和最大似然法)所构建系统发生树的拓扑结构完全一致。棘皮动物下分的5个纲(蛇尾纲、海参纲、海胆纲、海星纲和海百合纲)均为单系群。线粒体基因组的数据支持棘皮动物在纲层次的亲缘关系为:(((海胆纲+海星纲)+海参纲)+蛇尾纲)+海百合纲,海百合纲作为棘皮动物中最为古老的类群,位于系统发生树的根部。线粒体基因组构建的系统发生树,支持所有的科均为单系群,然而,综合蛋白质编码基因的系统发生树及主编码基因的基因排列分析结果,均支持真蛇尾目并非单系发生,真蛇尾目的有效性还值得今后深入研究。

参考文献:

- [1] Brusca R C, Brusca G J. Invertebrates[M]. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2003.
- [2] 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] Matsubara M, Komatsu M, Araki T, et al. The phylogenetic status of Paxillosoida (Asterozoa) based on complete mitochondrial DNA sequences[J]. Mol Phylogenet Evol, 2005, 36(3): 598—605.
- [4] Smith M J, Banfield D K, Doteval K, et al. Nucleotide sequence of nine protein-coding genes and 22 tRNAs in the mitochondrial DNA of the sea star *Pisaster ochraceus*[J]. J Mol Evol, 1990, 31(3): 195—204.
- [5] Yasuda N, Hamaguchi M, Sasaki M, et al. Complete mitochondrial genome sequences for Crown-of-thorns starfish *Acanthaster planci* and *Acanthaster brevispinus*[J]. BMC Genomics, 2006, 7(1): 17—26.
- [6] Asakawa S, Himeno H, Miura K, et al. Nucleotide sequence and gene organization of the starfish *Asterina pectinifera* mitochondrial genome[J]. Genetics, 1995, 140(3): 1047—1060.
- [7] Perseke M, Bernhard D, Fritzsche G, et al. Mitochondrial genome evolution in Ophiurozoa, Echinozoa, and Holothurozoa: insights in phylogenetic relationships of Echinodermata[J]. Mol Phylogenet Evol, 2010, 56(1): 201—211.
- [8] Perseke M, Fritzsche G, Ramsch K, et al. Evolution of mitochondrial gene orders in echinoderms[J]. Mol Phylogenet Evol, 2008, 47(2): 855—864.
- [9] Scouras A, Beckenbach K, Arndt A, et al. Complete mitochondrial genome DNA sequence for two ophiuroids and a holothuroid: the utility of protein gene sequence and gene maps in the analyses of deep deuterostome phylogeny[J]. Mol Phylogenet Evol, 2004, 31(1): 50—65.
- [10] Smith M J, Arndt A, Gorski S, et al. The phylogeny of echinoderm classes based on mitochondrial gene arrangements[J]. J Mol Evol, 1993, 36(6): 545—554.
- [11] De-Giorgi C, Martiradonna A, Lanave C, et al. Complete sequence of the mitochondrial DNA in the sea urchin *Arbacia lixula*: conserved features of the echinoid mitochondrial genome[J]. Mol Phylogenet Evol, 1996, 5(2): 323—332.
- [12] Cantatore P, Roberti M, Rainaldi G, et al. The complete nucleotide sequence, gene organization, and genetic code of the mitochondrial genome of *Paracentrotus lividus*[J]. J Biol Chem, 1989, 264(19): 10965—10975.
- [13] Valverde J R, Marco R, Garesse R. A conserved heptamer motif for ribosomal RNA transcription termination in animal mitochondria[J]. PNAS, 1994, 91(12): 5368—5371.
- [14] Sun X, Li Q, Kong L. Comparative mitochondrial genomics within sea cucumber (*Apostichopus japonicus*): Provide new insights into relationships among color variants[J]. Aquaculture, 2010, 309(1/4): 280—285.
- [15] Shen X, Tian M, Liu Z, et al. Complete mitochondrial genome of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Echinodermata: Holothurozoa): the first representative from the subclass Aspidochirozoa with the echinoderm ground pattern[J]. Gene, 2009, 439(1—2): 79—86.
- [16] Fan S, Hu C, Wen J, et al. Characterization of mitochondrial genome of sea cucumber *Stichopus horrens*: a novel gene arrangement in Holothu-

- roidea[J]. *Sci China*, 2011, 54 (5): 434—441.
- [17] Scouras A, Smith M J. The complete mitochondrial genomes of the sea lily *Gymnocrinus richeri* and the feather star *Phanogenia gracilis*: signature nucleotide bias and unique nad4L gene rearrangement within crinoids[J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2006, 39 (2): 323—334.
- [18] Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0[J]. *Bioinformatics*, 2007, 23 (21): 2947—2948.
- [19] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25 (11): 1451—1452.
- [20] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Mol Biol Evol*, 2011, 28 (10): 2731—2739.
- [21] Guindon S, Dufayard J F, Lefort V, et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0[J]. *Syst Biol*, 2010, 59 (3): 307—321.
- [22] 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[J]. *水产科学*, 2011, 30 (7): 400—404.
- [23] 田美, 申欣, 孟学平, 等. 海胆纲线粒体基因组特征及基因差异位点分析[J]. *水产科学*, 2011, 30 (3): 174—176.
- [24] 田美, 申欣, 孟学平, 等. 7 个海星动物线粒体基因组比较及基因变异位点分析[J]. *台湾海峡*, 2012, 31 (2): 189—194.

Gene rearrangement, molecular markers and phylogenetic analyses of echinoderms mitochondrial genomes

SHEN Xin^{1,2}, TIAN Mei¹, MENG Xueping¹, CHENG Hanliang¹, YAN Binlun¹

(1. *College of Marine Science Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China*; 2. *Beijing Institutes of Life Science, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*)

Abstract: Echinoderms are important group of invertebrates, which only found in marine habitats. Twenty-nine echinoderms mitochondrial genomes were fully analyzed in this article. The major coding gene arrangements of sea urchins and sea cucumbers are identical. The major coding gene arrangements within starfishes are also identical, and there is a long fragment inversion compared with these of sea urchins and sea cucumbers. The major coding gene arrangements of *Phanogenia gracilis* and *Florometra serratissima* (Crinoidea) are identical, compared with which there are a protein-coding genes (*nad4L*) translocation in *Antedon mediterranea* and *Neogymnocrinus richeri* mitochondrial genomes, respectively. The major coding gene arrangements of three families Amphiuroidae, Ophiactidae and Ophiocomidae (Ophiuroidea; Ophiurida) are identical. However, there are three protein-coding genes (*nad1*, *nad2* and *cob*) inversions in the mitochondrial genomes of *Ophiura albida* and *Ophiura lutkeni*, which belong to another family in the same order Ophiurida. Compared with five mitochondrial genomes from Ophiurida, there are major coding gene rearrangements in *Astrospartus mediterraneus* (Ophiuroidea; Euryalida) mitochondrial genome. The genetic variation analyses of main genes (13 protein coding genes) within 29 echinoderms mitochondrial genomes shown that *nad5*, *nad4* and *nad2* gene are ideal molecular markers. Tree topologies based on amino acid sequences of the protein-coding genes in 29 echinoderms mitochondrial genomes by two methods (neighbor-joining and maximum likelihood method) are identical. Phylogenetic trees based on mitochondrial genome data support that five classes (Ophiuroidea, Holothuroidea, Echinoidea, Asteroidea and Crinoidea) are monophyletic groups, and the relationship within them are (((Echinoidea + Asteroidea) + Holothuroidea) + Ophiuroidea) + Crinoidea. The class Crinoidea is the most ancient group in echinoderms, which located in the root of phylogenetic trees. Phylogenetic results support all families are monophyletic groups. Comprehensive analyses of phylogenetic trees based on the protein coding genes and major genes rearrangements support that Ophiurida is not monophyletic. The validity of the family Ophiurida is also worth further studies.

Key words: mitochondrial genome; protein-coding gene; gene rearrangement; molecular marker; phylogeny; echinoderms