

2022 年夏季胶州湾致灾物种多棘海盘车的分子解析*

王 静^{1,2,3} 段泽林^{1,2,3} 何子岩^{1,2,3,4} 陈楠生^{1,2,3,4}^①

(1. 中国科学院海洋研究所 海洋生态与环境科学重点实验室 山东青岛 266071; 2. 崂山实验室 海洋生态与环境科学功能实验室 山东青岛 266237; 3. 中国科学院海洋大科学研究中心 山东青岛 266071; 4. 中国科学院大学 北京 100049)

摘要 多棘海盘车(*Asterias amurensis*)是海星纲的一个致灾物种,广泛分布于包括我国黄海、渤海海域、韩国、日本和俄罗斯海域在内的北太平洋海域,并作为入侵种分布于澳大利亚的塔斯马尼亚海域。多棘海盘车在多个海域发生过爆发性增殖导致的高密度、大规模聚集,对海洋生态系统和水产养殖造成严重的负面影响。自 2006 年以来在我国山东青岛海域多次发生大规模多棘海盘车聚集,对贝类养殖造成重大经济损失。日本、俄罗斯、澳大利亚等海域的多棘海盘车遗传多样性研究取得了显著进展,然而,迄今为止鲜有针对我国海域致灾物种多棘海盘车的分子生物学分析,阻碍了我国海域种群与全球种群间遗传进化关系的比较分析。研究重点分析了于 2022 年 7 月在胶州湾发生多棘海盘车暴发时采集的 12 个样本,系统组装了其线粒体基因组、核糖体基因簇以及多种通用分子标记。基于线粒体基因组和核糖体基因簇的系统发育分析表明多棘海盘车具有较高的种内遗传多样性。基于线粒体基因组的蛋白编码基因进行分化时间估算,多棘海盘车的种内遗传分化可能发生在 1.7~4.2 Ma,表明多棘海盘车的扩布可能较早发生。与线粒体基因组相比,多棘海盘车核糖体基因簇序列在种内极为保守,基本没有表现出种内序列差异,表明线粒体基因组对多棘海盘车遗传多样性具有更高的分辨率。研究不仅首次构建了我国胶州湾海域致灾物种多棘海盘车的多种分子标记序列,开发的高分辨率分子标记也将为实时监控胶州湾以及其他海域多棘海盘车的多样性特征和变化提供支持。

关键词 多棘海盘车; 暴发; 遗传进化; 胶州湾; 线粒体; 核糖体基因簇

中图分类号 S917 doi: 10.11693/hyh20230300045

多棘海盘车(*Asterias amurensis*)是掠食性海洋底栖无脊椎动物,属于棘皮动物门(Echinodermata)、海星纲(Asterozoa)、钳棘目(Forcipulatida)、海盘车科(Asteriidae)、海盘车属(*Asterias*)。多棘海盘车是北太平洋的常见种,垂直分布于潮间带至 200 m 水深海域,在中国渤海、黄海、美国阿拉斯加和阿留申群岛、北冰洋、白令海峡、鄂霍茨克海、日本海、鞑靼海峡均有分布(徐思嘉等, 2018)。同时,在 1986 年多棘海盘车首次被记录为入侵种出现在澳大利亚塔斯马尼亚

(Tasmania)岛,并确定建立种群(Buttermore *et al.*, 1994; Ward *et al.*, 1995)。

多棘海盘车有“海底蝗虫”之称,在包括我国和日本在内的北太平洋海域,以及澳大利亚塔斯马尼亚海域等多个海域发生暴发事件,造成了重大的经济损失和生态灾害。1954 年日本东京湾仅因多棘海盘车摄食养殖贝类导致的经济损失高达 4 亿多日元(Kim, 1968); 1974 年日本鸟取县发生多棘海盘车爆发性聚集,导致增殖放养的东风螺几乎被捕食(孙光,

* 泰山学者特聘专家计划; 中国科学院战略性先导科技专项 B 类, XDB42030201 号; 泰山学者特聘专家计划; 中国科学院率先行动“百人计划”。王 静, 助理研究员, E-mail: wangjing2019@qdio.ac.cn

① 通信作者: 陈楠生, 博士生导师, 研究员, E-mail: chenn@qdio.ac.cn

收稿日期: 2023-03-02, 收修改稿日期: 2023-07-14

1983); 七年之后, 多棘海盘车再次在日本聚集, 对当地放流的魁蚶(*Scapharca broughtonii*)造成重大损失(孙光, 1983)。多棘海盘车在澳大利亚海域的首个记录发生在1986年10月的塔斯马尼亚岛的德温特河口, 自此便持续发生因其聚集危害当地贝类养殖的事件(Buttermore *et al.*, 1994; Ward *et al.*, 1995), 被认为是本地海洋生物的严重害虫。它与塔斯马尼亚极度濒危鱼类粗体澳洲躄鱼(*Brachionichthys hirsutus*)急剧减少有关(Stevens, 2022)。自2000年起, 随着我国北方养殖业的发展, 海星暴发问题日趋严重, 严重危害当地养殖业。2006年7月多棘海盘车暴发, 密度高达300个/m²(周书珩等, 2008)。2007年3月胶州湾的16万亩菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)中60%遭到多棘海盘车侵害(周书珩等, 2008)。2021~2022年连续两年在山东青岛胶州湾海域出现多棘海盘车聚集的现象, 相比2021年2月的多棘海盘车聚集事件, 2022年的多棘海盘车暴发呈现新的特点, 一方面2022年分别在2月和7月共暴发了两次大规模聚集, 另一方面2022年7月的聚集灾害系多棘海盘车与软体动物经氏壳蛞蝓(*Philine kinglipini*)同时暴发。对于多棘海盘车大规模暴发, 目前尚无有效的检测方法和有效的治理措施, 使用最多的治理办法仍是在暴发之后进行捕捞清理。

尽管多棘海盘车分布广泛、且暴发性增殖对生态环境和水产养殖能够产生严重的负面影响, 但针对多棘海盘车遗传多样性的分子生物学研究相对较少。食品营养和药物方面的研究发现多棘海盘车含有多糖、脂类、甾醇、皂苷等多种活性成分, 对食品药品的功能性开发具有重要的研究价值(李敏晶等, 2017)。同时, 还有大量的研究集中于多棘海盘车的生物学特性和对菲律宾蛤仔、魁蚶等贝类的捕食特性(张秀梅等, 2014; 周珊珊等, 2014; 李淑芸等, 2014; 张天文等, 2015)。此外, 研究报道称海星等棘皮动物会吸收海水中的碳, 以无机盐形式形成外骨骼, 死亡后体内大部分含碳物质留在海底, 从而减少海洋中的碳进入大气, 在海洋碳循环中起着重要作用(Lebrato *et al.*, 2010)。

迄今对于多棘海盘车的遗传多样性分析主要集中在日本海样本。采自日本岩手县的多棘海盘车样本的线粒体基因组最早得到解析(Matsubara *et al.*, 2005)。最近, 采集自日本东北部青森县、宫城县女川和岩手县的16个多棘海盘车样本和南部冈山县瀬户内市牛窓的10个多棘海盘车样本的线粒体基因组得

到比较分析, 结果显示东北部的样本和南部的样本分别聚类为两个支系(Inoue *et al.*, 2020)。针对我国多棘海盘车遗传多样性的研究较少, 对于我国胶州湾海域, 已有的研究中仅有三个多棘海盘车幼虫的 *cox1* 序列报道(王敏晓等, 2011)。

本研究重点分析了采集于2022年7月在胶州湾多棘海盘车暴发时的12个样本, 以及3个采集自连云港海域的样本, 系统构建了其线粒体基因组、核糖体基因簇以及多种通用分子标记, 并开展了比较分析, 尝试开发了针对多棘海盘车的高分辨率分子标记。本研究不仅首次测序组装了我国胶州湾海域致灾物种多棘海盘车的多种分子序列, 开发的高分辨率分子标记也将为实时监控胶州湾以及其他海域多棘海盘车的多样性特征和时空变化提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 样品采集与处理

2022年7月6日搭乘青岛胶州湾渔民的渔船采用680目底拖网在胶州湾海域(图1a)底拖获得海星样本, 挑选12个健康个体(表1)暂养于自然海水, 1小时内送达实验室。样品到达实验室后, 在灭菌海水中使用毛刷迅速清理, 使用灭菌手术剪剪取每个个体的一条腕足, 收集外壳于-80℃冰箱迅速冷冻。2022年8月5日搭乘科学3号科考船在黄海连云港海域底拖网采集了3个海星样本(表1), 现场海水冲洗, 使用灭菌手术剪剪取每个个体的一条腕足, 收集外壳于-80℃冰箱迅速冷冻。此外, 为了进行系统的比较研究, 本文下载了已发表的25个日本多棘海盘车样本二代基因组测序的数据(Inoue *et al.*, 2020)(表1)。

1.2 DNA文库制备与测序

样本基因组DNA采用传统的CTAB(Cetyltrimethylammonium Bromide)方法进行提取, 所提取的DNA经Covaris S220超声破碎仪(美国)进行片段化, 获得读长为350 bp的DNA序列; 经末端修复、加A尾、加测序接头、纯化、PCR及产物富集。文库质量分别采用NGS3K/Caliper和real-time PCR(Qubit 3.0 fluorometer, Invitrogen, 美国)进行文库大小分布评估和定量分析。质量合格的文库采用深圳华大DNBSEQ-T7进行测序。

1.3 线粒体基因组组装与注释

采用GetOrganelle软件(Jin *et al.*, 2020)从头组装获得线粒体基因组序列, 其中使用的组装软件为

表 1 本文比较分析的所有海星样本信息
Tab.1 Information of all starfish samples compared and analyzed in this article

编号	海域	经纬度	采样时间/(年.月.日)	参考文献
CNS01589	中国山东, 胶州湾	36°6.30' N, 120°12.017' E	2022.7.7	本文
CNS01590	中国山东, 胶州湾	36°6.30' N, 120°12.017' E	2022.7.7	本文
CNS01591	中国山东, 胶州湾	36°6.30' N, 120°12.017' E	2022.7.7	本文
CNS01908	中国山东, 胶州湾	36°6.30' N, 120°12.017' E	2022.7.7	本文
CNS01909	中国山东, 胶州湾	36°6.30' N, 120°12.017' E	2022.7.7	本文
CNS01910	中国山东, 胶州湾	36°6.30' N, 120°12.017' E	2022.7.7	本文
CNS01911	中国山东, 胶州湾	36°6.30' N, 120°12.017' E	2022.7.7	本文
CNS01912	中国山东, 胶州湾	36°6.30' N, 120°12.017' E	2022.7.7	本文
CNS01913	中国山东, 胶州湾	36°6.30' N, 120°12.017' E	2022.7.7	本文
CNS01914	中国山东, 胶州湾	36°6.30' N, 120°12.017' E	2022.7.7	本文
CNS01915	中国山东, 胶州湾	36°6.30' N, 120°12.017' E	2022.7.7	本文
CNS01916	中国山东, 胶州湾	36°6.30' N, 120°12.017' E	2022.7.7	本文
CNS01988	中国江苏, 连云港	35°0.26' N, 119°46.04' E	2022.8.5	本文
CNS01990	中国江苏, 连云港	35°0.26' N, 119°46.04' E	2022.8.5	本文
CNS01991	中国江苏, 连云港	35°0.26' N, 119°46.04' E	2022.8.5	本文
A1	日本, 青森县	40°89' N, 140°86' E	2017	Inoue <i>et al</i> , 2020
A2	日本, 青森县	40°89' N, 140°86' E	2017	Inoue <i>et al</i> , 2020
A3	日本, 青森县	40°89' N, 140°86' E	2017	Inoue <i>et al</i> , 2020
A4	日本, 青森县	40°89' N, 140°86' E	2017	Inoue <i>et al</i> , 2020
A5	日本, 青森县	40°89' N, 140°86' E	2017	Inoue <i>et al</i> , 2020
A6	日本, 青森县	40°89' N, 140°86' E	2017	Inoue <i>et al</i> , 2020
A7	日本, 青森县	40°89' N, 140°86' E	2017	Inoue <i>et al</i> , 2020
A8	日本, 青森县	40°89' N, 140°86' E	2017	Inoue <i>et al</i> , 2020
A9	日本, 青森县	40°89' N, 140°86' E	2017	Inoue <i>et al</i> , 2020
A10	日本, 青森县	40°89' N, 140°86' E	2017	Inoue <i>et al</i> , 2020
On1	日本, 宫城县女川	38°44' N, 141°46' E	2018	Inoue <i>et al</i> , 2020
On2	日本, 宫城县女川	38°44' N, 141°46' E	2018	Inoue <i>et al</i> , 2020
On3	日本, 宫城县女川	38°44' N, 141°46' E	2018	Inoue <i>et al</i> , 2020
On4	日本, 宫城县女川	38°44' N, 141°46' E	2018	Inoue <i>et al</i> , 2020
On5	日本, 宫城县女川	38°44' N, 141°46' E	2018	Inoue <i>et al</i> , 2020
U1	日本, 冈山县牛窓	34°60' N, 134°14' E	2017	Inoue <i>et al</i> , 2020
U2	日本, 冈山县牛窓	34°60' N, 134°14' E	2017	Inoue <i>et al</i> , 2020
U3	日本, 冈山县牛窓	34°60' N, 134°14' E	2017	Inoue <i>et al</i> , 2020
U4	日本, 冈山县牛窓	34°60' N, 134°14' E	2017	Inoue <i>et al</i> , 2020
U5	日本, 冈山县牛窓	34°60' N, 134°14' E	2017	Inoue <i>et al</i> , 2020
U6	日本, 冈山县牛窓	34°60' N, 134°14' E	2017	Inoue <i>et al</i> , 2020
U7	日本, 冈山县牛窓	34°60' N, 134°14' E	2017	Inoue <i>et al</i> , 2020
U8	日本, 冈山县牛窓	34°60' N, 134°14' E	2017	Inoue <i>et al</i> , 2020
U9	日本, 冈山县牛窓	34°60' N, 134°14' E	2017	Inoue <i>et al</i> , 2020
U10	日本, 冈山县牛窓	34°60' N, 134°14' E	2017	Inoue <i>et al</i> , 2020

SPAdes (3.10.1) (Bankevich *et al*, 2012), 组装过程中使用的 seed 参考序列为 NCBI 登录序列 *A. amurensis* AB183559.1 (Matsubara *et al*, 2005)。组装后的线粒体

基因组序列通过 BWA v0.7.17 软件的 MEM 运算法对所构建的线粒体基因组序列进行质检(Li, 2011), 并通过 IGV v2.8.12 进行可视化比对分析(Robinson *et al*,

2011)。本研究采用在线软件 MITOS (Bernt *et al*, 2013)、MFannot (<https://megasun.bch.umontreal.ca/RNAweasel/>)和 ORF finder (Rombel *et al*, 2002)对线粒体基因组进行注释。线粒体圈图采用在线软件 OGDRAW (Greiner *et al*, 2019)进行绘制。

1.4 核糖体基因簇组装与注释

核糖体基因簇的组装、质检方法同 1.3, 组装过程中使用的 seed 参考序列为 NCBI 登录序列蓝指海星 (*Linckia laevigata*) LC505033.1 (Hiruta *et al*, 2020)。核糖体基因簇的注释采用 Mega 7 将组装序列与 LC505033.1 进行序列比对。

1.5 系统发育分析

针对分析的序列采用在线 mafft 软件 (Madeira *et al*, 2022)进行比对, 然后在 Mega 7 (Valach *et al*, 2014)中进行手动裁剪, 使用最大似然法进行系统发育树构建, bootstrap 值=1 000。

1.6 基因组序列比较分析

采用 Dotter 软件 (Sonnhammer *et al*, 1995)对序列进行两两比对分析, 分析的对象是以样本编号为 CNS01590 的线粒体基因组为参照, 分别与日本个体 On1、U1 和胶州湾个体 CNS01589 进行比较分析, 所有参数为默认参数。

1.7 分化时间估算

以已发表线粒体基因组的所有海星纲物种以及棘皮动物其他纲物种(外类群)为对象, 采用 PhyloSuite v1.2.2 (Zhang *et al*, 2020)对其线粒体基因组的 13 个蛋白编码基因的核酸序列进行提取、mafft 比对、trimAL 裁剪、Concatenate 串联序列, 然后使用 IQ-tree 进行系统发育树构建并获得树形。分化时间估算采用 PAML v4.8a 的 MCMCTree 软件包 (Yang, 2007)。首先, “Branch lengths”、“gradient (g)”和 “Hessian (H)”的估算采用最大似然估算(maximum likelihood estimates, MLE)和 GTR + G substitution model (model=7), 同时采用 independent rates clock model (clock=1)。分化时间的估算设置三个估算时间点(calibration points), 包括棘皮动物门(Echinodermata)分化时间 [501~542 Million years ago (Ma)], 游移亚门(Elleutherozoa)分化时间(482~521 Ma)和海星亚门(Asterozoa)分化时间(>479 Ma)。系统发育树的每个节点通过 FigTree v1.4.3 采用 95% 的 HPD(highest posterior density interval)进行可视化展示。

1.8 基因组位点多样性分析

以编号为 CNS01590 的多棘海盘车个体的线粒体基因组序列为参考序列, 采用 BWA v0.7.17 分别将 25 个日本多棘海盘车样本的 DNBSEQ-T7 测序结果 clean reads 与其进行比对。然后使用 SAMtools 对对比结果进行分析获得每个样本的单核苷酸多样性位点(single-nucleotide variants, SNVs)信息(homozygous support >85%) (Koboldt *et al*, 2012)。所有样本的 SNV 位点通过内部 Python 脚本进行分析, 以 CNS01590 个体的线粒体基因组序列为参考, 以 400 bp 为滑移窗口尺寸进行连续计算。所有株系的每 400 bp 窗口的 SNV 密度和灵敏度通过 CIRCOS 进行可视化展示 (Krzywinski *et al*, 2009)。

2 结果

2.1 物种鉴定及生物地理分布

2.1.1 形态描述 于 2022 年 7 月在胶州湾多棘海盘车暴发时采集的 12 个多棘海盘车样本个体大小各异, 形态特征基本相同(图 1b)。样本颜色与日本海域采集到的多棘海盘车样本基本相同, 口面呈橙色, 反口面呈紫红色, 棘刺呈白色。本次胶州湾采集的多棘海盘车样本与以前在我国渤海、黄海海域采集到的样本的特征基本一致, 盘扁平, 具有 5 个腕, 基部宽, 腕扁平。背板结合紧密, 背板上有背棘, 具有小刺和不明显沟槽; 背棘基部具有交叉叉棘。腹侧板上有少量皮鳃和直形叉棘; 侧步带棘交替排列, 末端尖细无小刺。根据形态分析, 判定 12 个胶州湾海星样本均为多棘海盘车。

2.1.2 系统发育分析特征 通过对测序结果进行线粒体组装, 获得所有 12 个海星样本的 *cox1* 全长序列, 与已发表的序列 *A. amurensis* MZ435266.1、MZ435267.1 进行在线 Blastn 同源比对, 相似性达到 99.10%和 99.36% (Coverage 100%)。根据 Inoue 等 (2020)的研究, NCBI SRA 已公开了 25 个日本海域多棘海盘车样本的 Illumina 测序数据, 本研究采用同样的线粒体组装和注释方法获得所有样本的线粒体基因组和 *cox1* 序列。同时, 下载了 NCBI 现已发表的全球多棘海盘车 *cox1* 序列, 基于此 51 个样本的 *cox1* 序列构建系统发育树, 结果如图 1c 所示, 51 个样本在发育树中聚类为两个主要的分支, 包括 Clade I 和 Clade II。Clade I 的样本全部采集自日本海域, 包含日本东北部的青森县、宫城县女川和岩手县的 16 个样本。Clade II

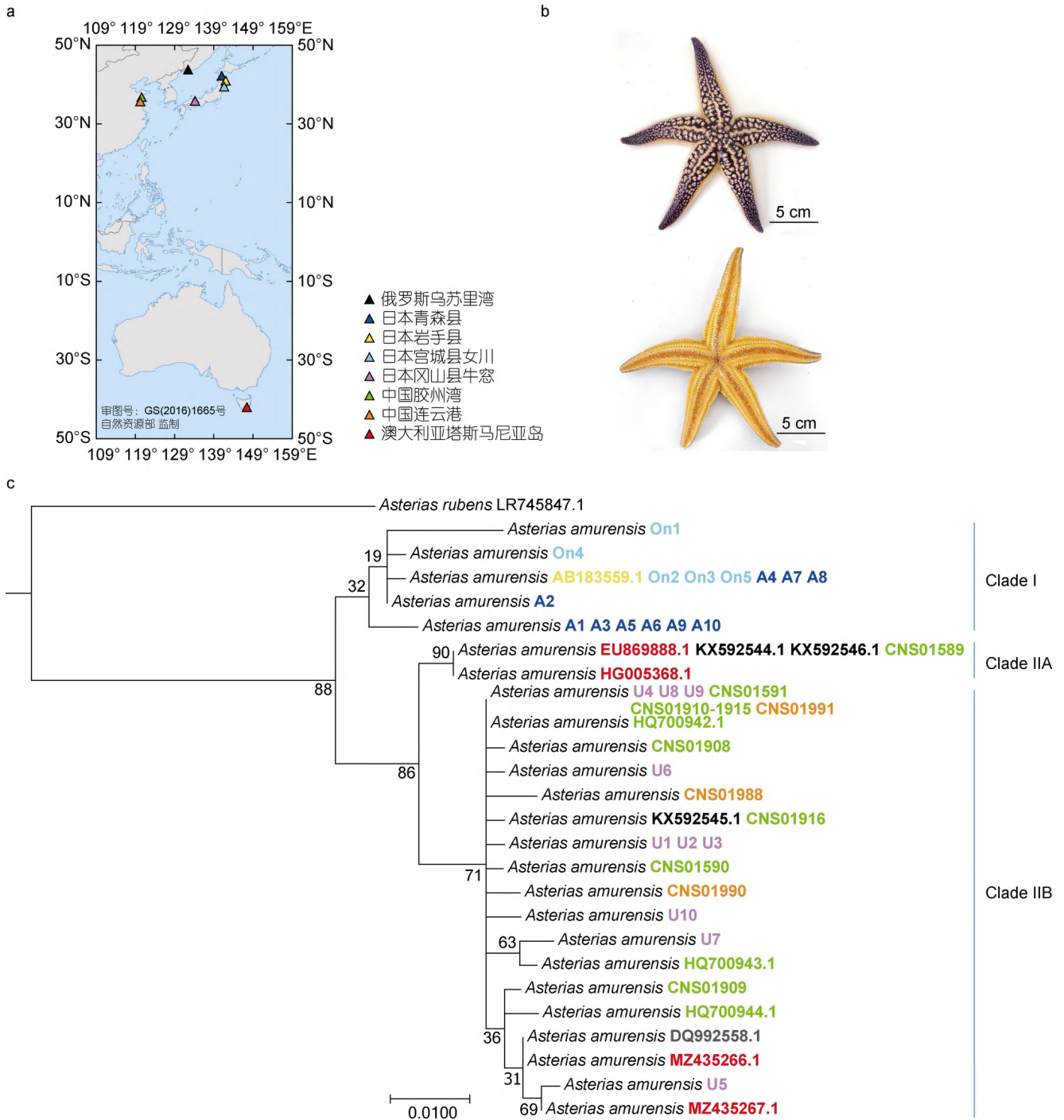


图 1 多棘海盘车采样及基于形态和 *cox1* 序列的鉴定

Fig.1 Sampling and species annotation based on morphological features and *cox1* sequences

注: a: 2022 年胶州湾海星采样位点及全球多棘海盘车地理分布信息; b: 多棘海盘车样本 CNS01590 的反口面和口面照片; c: 基于 *cox1* 序列的系统发育分析; 进化树序列编号的颜色代表样本地理信息, 同图 1a

包含了日本海乌苏里湾、日本南部冈山县濑户内海、我国青岛胶州湾(2006 年和 2022 年)、我国连云港、澳大利亚塔斯马尼亚岛的样本(图 1a)。Clade II 内部聚类形成两个分支, 包括 Clade IIA 和 Clade IIB, 这两个

分支的样本显示没有明显的地域偏好性(图 1c)。

基于形态特征和系统发育特征, 可以确定 2022 年夏季胶州湾海星暴发样本为多棘海盘车。比较分析发现多棘海盘车具有较高的种内遗传多样性。

2.2 多棘海盘车的遗传进化分析

为了解析中国胶州湾多棘海盘车与全球其他海域多级盘车之间的遗传进化关系, 本研究对其线粒体基因组和核糖体基因簇进行了组装、注释和比较分析。

2.2.1 基于线粒体基因组的多棘海盘车种内多样性分析 本研究测序组装了采集自胶州湾的 12 个和连云港的 3 个多棘海盘车样本的线粒体基因组, 共 15 个样本的线粒体基因组均完成环化。比较分析发现这

些线粒体结构基本一致, 无大片段结构差异。以 CNS01590 样本的线粒体图谱为例(图 2a, 表 2), 均包含 13 个蛋白编码基因、2 个 rRNA 和 22 个 tRNA, 长度为 16 419~16 421 bp。将 CNS01590 的线粒体基因组分别与图 1a 中三个分支中的代表样本 On1、CNS01589 和 U1 的线粒体基因组进行序列比对分析(图 2b~2d), 发现两两比较的样本之间序列相似度高, 没有结构差异和重复序列等。

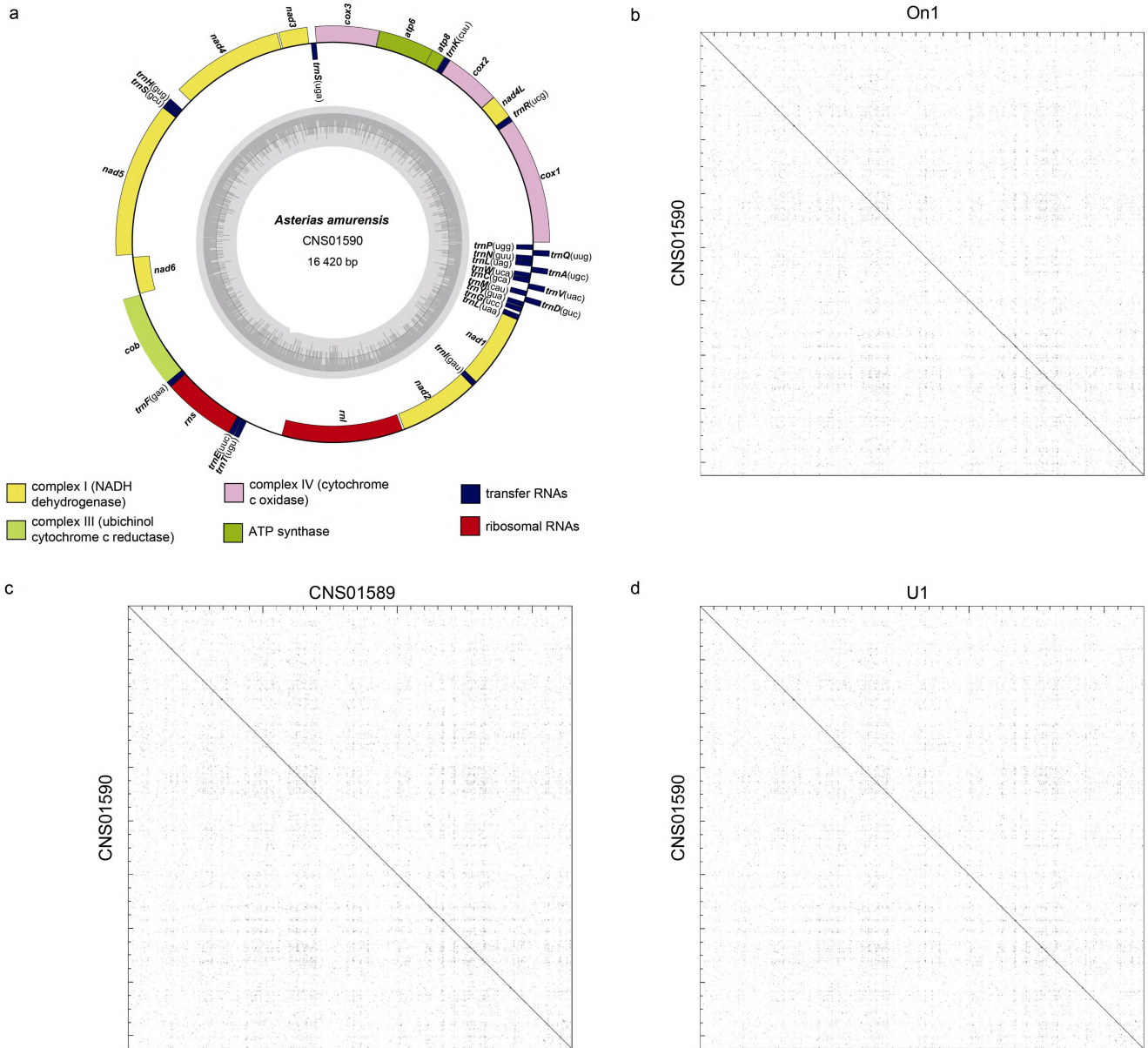


图 2 多棘海盘车 CNS01590 样本的线粒体基因组图谱及其与 On1、CNS01589 和 U1 样本间的线粒体基因组序列间的比较分析

Fig.2 Mitochondrial genome map of CNS01590 and comparative analysis of mitochondrial genome sequences of CNS01590 vs samples of On1, CNS01589, and U1

表 2 多棘海盘车 CNS01590 线粒体基因组组成
Tab. 2 Mitochondrial genome composition of CNS01590 in *Asterias amurensis*

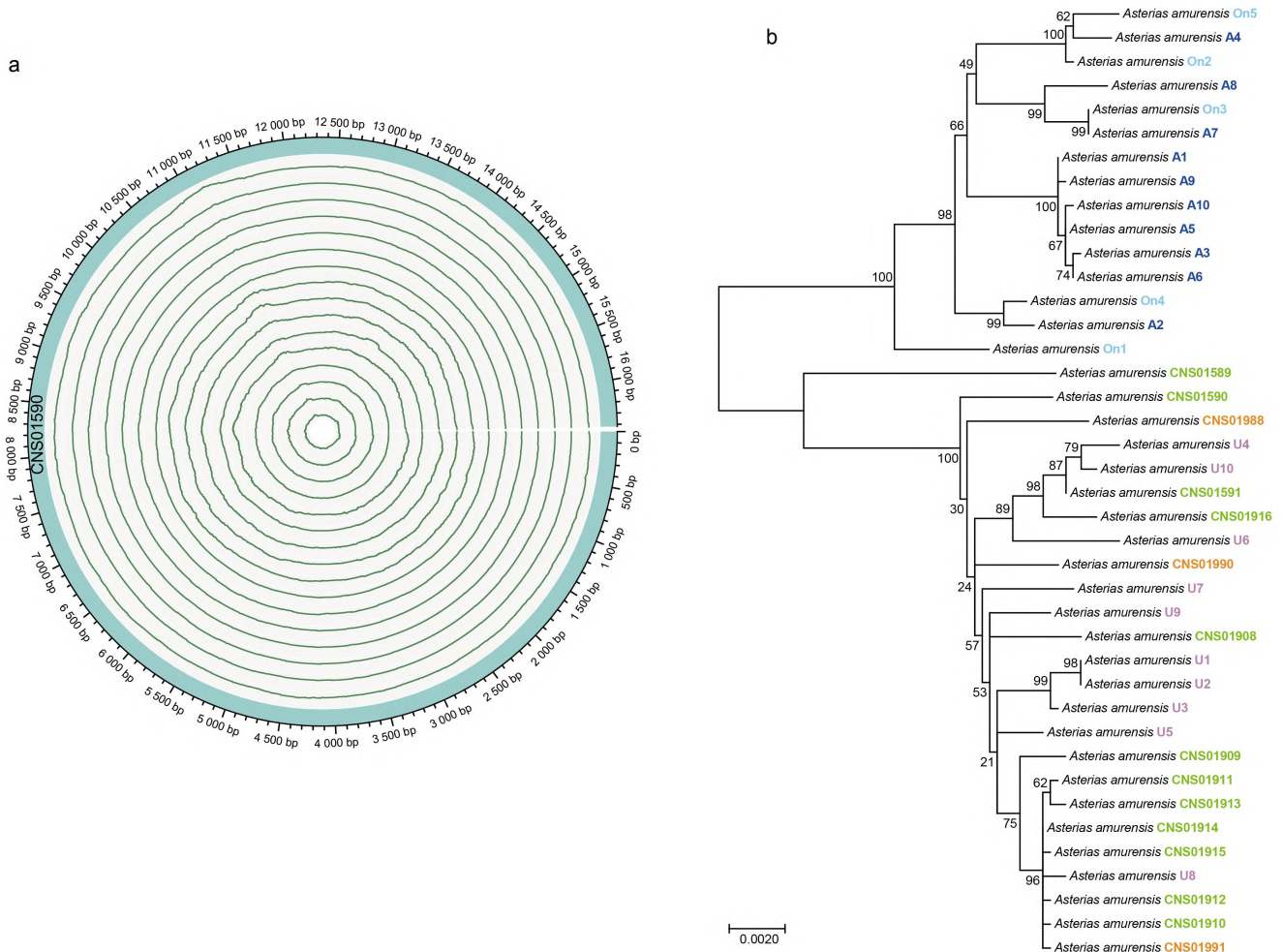
基因名称	类型	+/-链	起始碱基	终止碱基	长度/bp	密码子		
						起始密码子	终止密码子	反义密码子
<i>cox1</i>	CDS	+	1	1 554	1 554	ATG	TAA	
<i>trnR</i>	tRNA	+	1 553	1 622	70			TCG
<i>nad4L</i>	CDS	+	1 623	1 919	297	ATT	TAA	
<i>cox2</i>	CDS	+	1 920	2 609	690	ATG	TAA	
<i>trnK</i>	tRNA	+	2 611	2 685	75			CTT
<i>atp8</i>	CDS	+	2 689	2 856	168	ATG	TAA	
<i>atp6</i>	CDS	+	2 847	3 533	687	ATG	TAA	
<i>cox3</i>	CDS	+	3 537	4 319	783	ATG	TAA	
<i>trnS</i>	tRNA	-	4 318	4 388	71			TGA
<i>nad3</i>	CDS	+	4 414	4 764	351	ATG	TAA	
<i>nad4</i>	CDS	+	4 782	6 164	1 383	ATG	TAA	
<i>trnH</i>	tRNA	+	6 315	6 383	69			GTG
<i>trnS</i>	tRNA	+	6 385	6 452	68			GCT
<i>nad5</i>	CDS	+	6 453	8 369	1 917	ATG	TAA	
<i>nad6</i>	CDS	-	8 402	8 890	489	ATG	TAG	
<i>cob</i>	CDS	+	8 906	10 099	1 194	ATG	TAA	
<i>trnF</i>	tRNA	+	10 044	10 115	72			GAA
<i>rns</i>	rRNA	+	10 115	11 009	895			
<i>trnE</i>	tRNA	+	11 009	11 075	67			TTC
<i>trnT</i>	tRNA	+	11 078	11 147	70			TGT
<i>rnl</i>	rRNA	-	11 640	13 246	1 607			
<i>nad2</i>	CDS	-	13 270	14 331	1 062	GTG	TAA	
<i>trnI</i>	tRNA	-	14 332	14 403	72			GAT
<i>nad1</i>	CDS	-	14 404	15 381	978	GTG	TAA	
<i>trnL</i>	tRNA	-	15 382	15 454	73			TAA
<i>trnG</i>	tRNA	-	15 487	15 555	69			TCC
<i>trnY</i>	tRNA	-	15 560	15 630	71			GTA
<i>trnD</i>	tRNA	+	15 634	15 704	71			GTC
<i>trnM</i>	tRNA	-	15 707	15 779	73			CAT
<i>trnV</i>	tRNA	+	15 811	15 882	72			TAC
<i>trnC</i>	tRNA	-	15 882	15 950	69			GCA
<i>trnW</i>	tRNA	-	15 952	16 019	68			TCA
<i>trnA</i>	tRNA	+	16 030	16 101	72			TGC
<i>trnL</i>	tRNA	-	16 103	16 174	72			TAG
<i>trnN</i>	tRNA	-	16 175	16 246	72			GTT
<i>trnQ</i>	tRNA	+	16 250	16 321	72			TTG
<i>trnP</i>	tRNA	-	16 323	16 391	69			TGG

为进一步探究多棘海盘车线粒体基因组的种内变异, 本研究以 2022 年于胶州湾采集的样本 CNS01590 的线粒体基因组序列为参考, 计算了包括其他 11 个 2022 年于胶州湾采集的样本、3 个 2022 年于连云港采集的样本和 25 个于日本海域采集的样本的 39 个多棘海盘车样本(表 1)的单核苷酸变异位点的密度(图 3a), 结果显示主要存在两个高变异位点区, 第 8 000~8 600 bp 和第 10 900~11 300 bp, 分别位于 *nad5~nad6* 和 *rns* 与 *rnl* 之间的 tRNA 基因和非编码区。基于此, 本研究构建了一个长度为 3 700 bp 的分子标记。该分子标记可以将所有不同的个体充分区分开来, 具有很高的分辨率(图 3b~3d)。基于本研究构建的高分辨率分子标记的系统发育树(图 3b)显示, 除了 U1 与 U2 之间无法区分, 其他样本之间得以区分, 该分辨率与线粒体基因组全长序列的分辨率(图 3c)相当。对于常用的 *cox1* 分子标记, 尽管全长序列也不能区分多组样本(图 3d), 譬如 A3、A5、A9 与 A10 之间, 而本研究建立的高分辨率分子标记分辨能力远

高于 *cox1* 全长序列的分辨率。因此, 该高分辨率分子标记可用于多棘海盘车的种内遗传多样性分析。

2.2.2 多棘海盘车与海星纲物种线粒体基因组的种间多样性 为了探究多棘海盘车与其他海星纲物种间的进化特征, 本研究比较分析了海星纲物种间的线粒体结构组成和共线性(图 4), 结果发现海星纲物种的基因组成极为保守, 均包含 13 个蛋白编码基因、2 个 rRNA 和 22 个 tRNA, 并且基因的组成顺序和在基因组中的方向基本一致, 仅 *Antherca aspera* MT476596.1 的 *trnQ* 基因位于基因组的反义链(按照 *cox1* 基因位于正义链), 与其他物种相反。

基于线粒体基因组的 13 个蛋白编码基因, 进行了包括多个多棘海盘车样本在内的海星纲物种分化时间估算(图 5)。海星纲物种形成大约在 322.1 Ma, 海盘车科(Asteriidae)物种约在 161.3 Ma 分化形成, 海盘车属(*Asterias*)约在 36.6 Ma 分化, 多棘海盘车物种约在 8.0 Ma 分化形成。多棘海盘车种内的变异可能发生在 1.7~4.2 Ma。



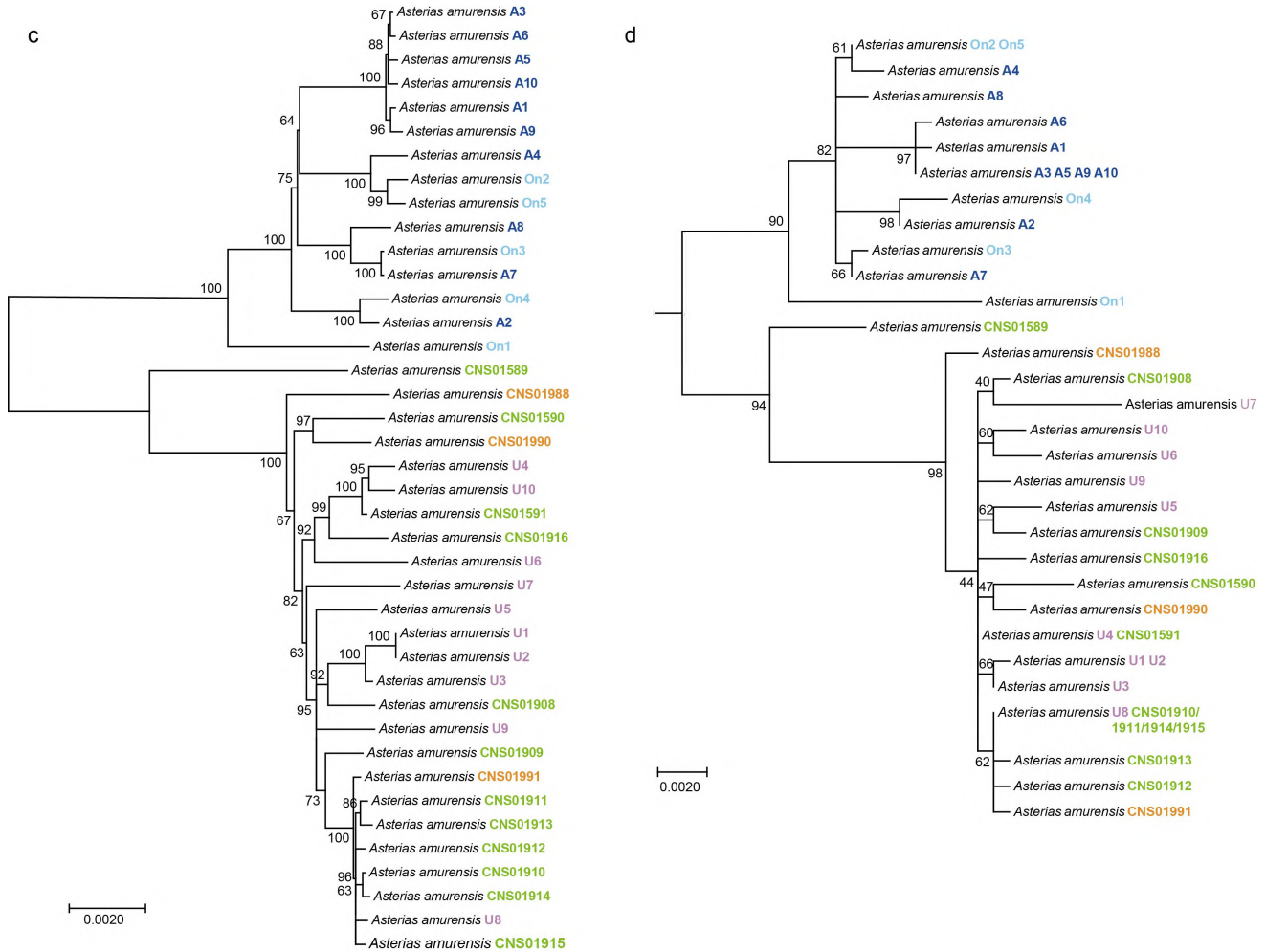


图 3 多棘海盘车线粒体基因组多样性图谱及不同分子标记的系统发育关系

Fig.3 Comparative analysis of mtDNAs and phylogenetic relationship of different molecular markers

注: a: 多棘海盘车线粒体基因组单核苷酸多样性位点图谱; b~d: 分别是基于本研究构建的高分辨率分子标记、线粒体基因组全长序列、*coxI* 全长序列的系统发育树; 进化树序列编号的颜色代表样本地理信息

2.2.3 基于核糖体基因簇的多棘海盘车种内多样性分析 为进一步揭示海星纲物种间与多棘海盘车种内的多样性特征, 本研究构建了 40 个多棘海盘车样本和 NCBI SRA 数据库中已提交测序数据的海星纲其他 21 个物种的核基因组基因核糖体基因簇。经统计, 海星纲物种的核糖体基因簇组成如表 3, 海星纲物种的 18S rDNA、ITS 和 28S rDNA 的长度范围分别为 1 815~1 832 bp、966~1 658 bp 和 4 039~5 062 bp。ITS 长度变化主要在于 ITS1 和 ITS2, 5.8S rDNA 的序列长度和序列组成较保守(165~168 bp)。对于多棘海盘车而言, 该物种种内的组成相当保守, 仅 CNS01591、A4 和 On1 三个样本与其他 37 个样本的 ITS2 存在 1~2 bp 的长度差异。

根据基于 18S rDNA、ITS、28S rDNA 以及

18S-ITS-28S rDNA 的系统发育树(图 6), 18S rDNA、ITS、28S rDNA 以及 18S-ITS-28S rDNA 均能够对海星纲物种种间的系统发育关系有效区分, 对于多棘海盘车种内多样性的分辨率极低, 换言之, 多棘海盘车核糖体基因簇进化保守, 变异率极低。

3 讨论

3.1 基于不同分子标记的多棘海盘车种内多样性比较分析

本研究通过构建线粒体基因组(包括单基因通用分子标记 *coxI*)和核糖体基因簇, 分别获得了中国胶州湾的多棘海盘车样本的细胞器和核相关基因的系统发育特征。根据 18S rDNA、ITS、28S rDNA 以及 18S-ITS-28S rDNA 的系统发育树, 多棘海盘车的核

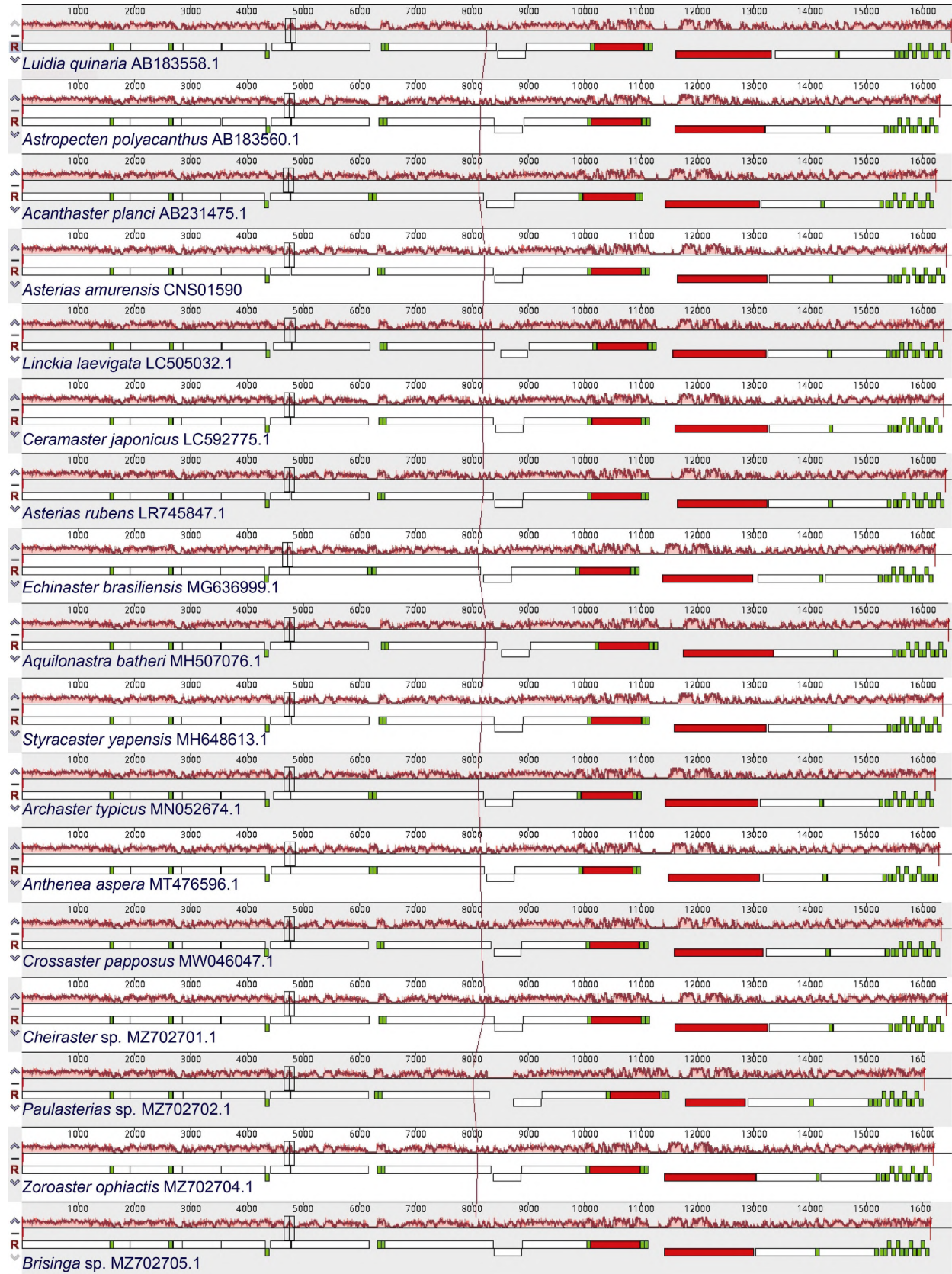


图 4 海星纲物种的线粒体基因组共线性分析
Fig.4 Synteny analysis of mtDNAs of starfish species

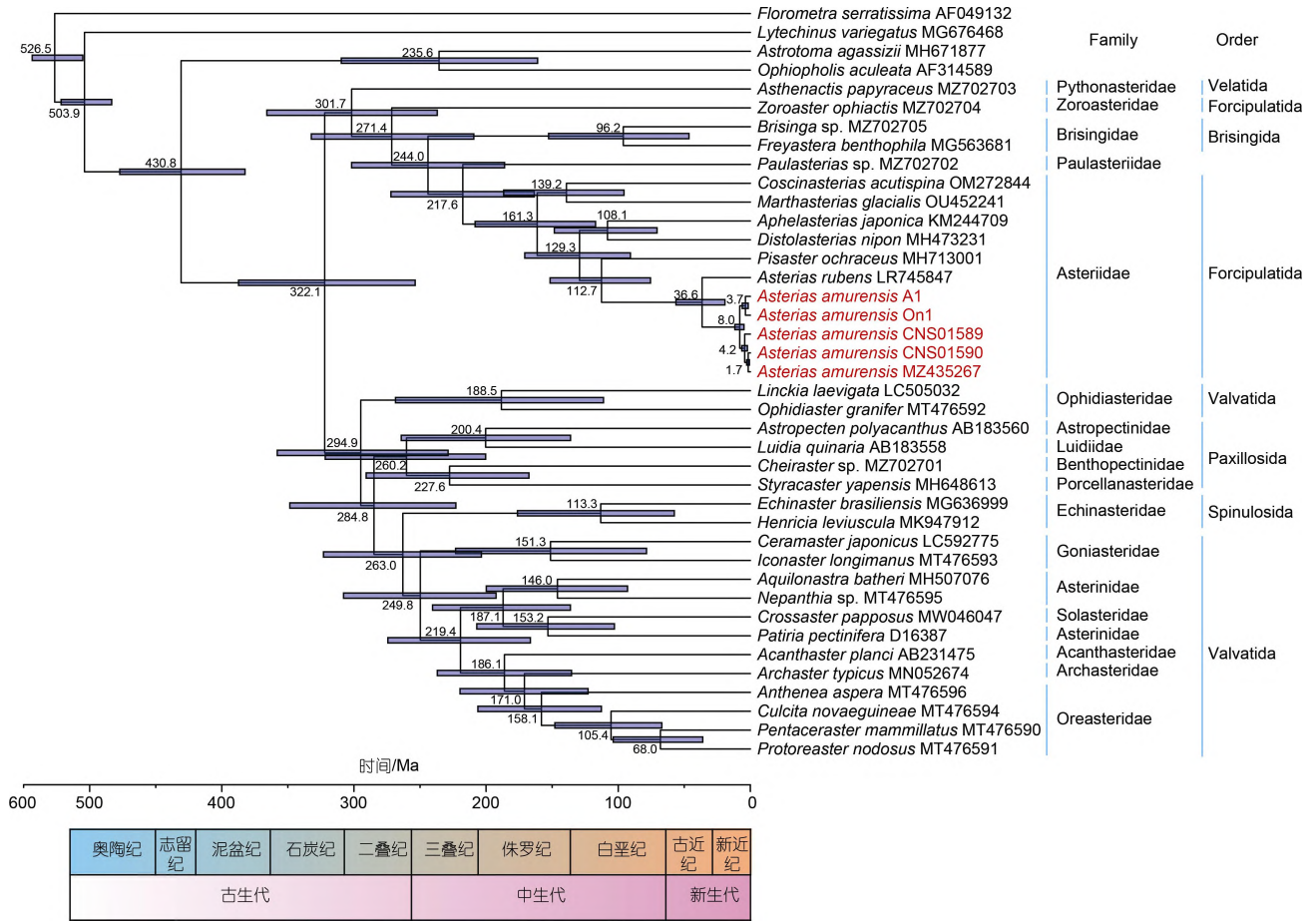


图 5 基于线粒体蛋白编码基因的海星纲物种的分化时间分析

Fig.5 Mitochondrial protein-coding genes-based analysis of speciation time of selected species in Asterozoa

注: 进化树中红色标识为突出显示多棘海盘车

糖体基因簇序列种内极为保守, 仅仅 CNS01591、A4 和 On1 三个样本与其他 37 个样本的 ITS2 存在 1~2 bp 的长度差异, 18S rDNA、ITS1、5.8S rDNA、28S rDNA 序列组成完全一致。Petrov 等(2016)在比较日本海彼得大帝湾三个多棘海盘车样本的 ITS 序列发现种内的变异位点仅在 ITS2 序列, 我们的结果与其一致。相比于核糖体基因簇, 多棘海盘车的 *cox1* 序列具有较高的种内多样性。对于 *cox1* 的全长序列, Clade I 与 Clade II 之间的序列相似度在 96.9%~98.7%内; 即使在每个分支内部仍显示了不同个体间的明显差异, Clade I 和 Clade II 内部序列相似度分别在 97.8%~100%和 98.4%~100%范围内。由于相比 *cox1* 全长序列, 线粒体基因组随着序列长度的增加, 具有更多的变异位点, 因此种内的分辨率更高, 基本上实现对本研究中的多棘海盘车样本的种内分辨(除了 U1 与 U2 之间的区分)。因此, 对于多棘海盘车而言, 线粒体基

因组相比核糖体基因簇具有明显的进化变异, 线粒体基因组适合于多棘海盘车的进化研究, 核糖体基因簇更适用于物种的种间鉴定。

此外, 本研究比较分析了 40 个多棘海盘车个体的线粒体基因组多样性, 并在此基础上构建了一个约 3 700 bp 的高分辨率分子标记, 该分子标记的分辨率水平能够达到线粒体基因组全长序列的分辨率, 可以后续应用于基于三代扩增子技术的宏条形码分析, 从而能够实现对环境样本 eDNA 中多棘海盘车遗传多样性的快速检测。

3.2 多棘海盘车的遗传进化特征

基于线粒体基因组的比较分析, 我们发现多棘海盘车种内线粒体基因组结构完全一致, 甚至海星纲的物种间几乎没有结构的变异, 除了 *Antherna aspera* MT476596.1 (Quek et al, 2021)的 *trnQ* 基因所在正负链的位置与其他物种相反。

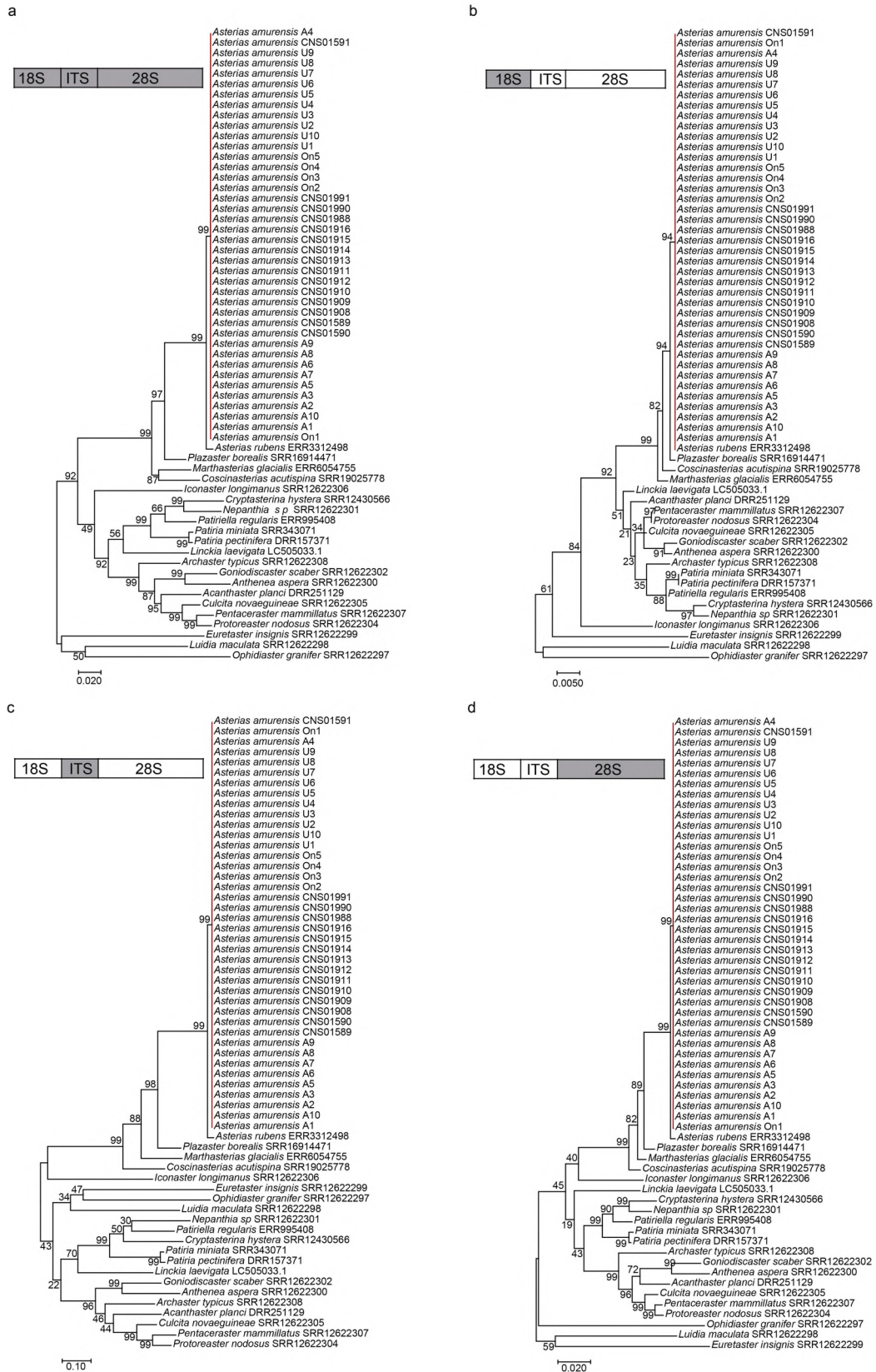


图 6 多棘海盘车及其他海星纲物种基于核糖体基因簇的系统发育关系

Fig.6 Phylogenetic relationships of *A. amurensis* and other starfish species based on ribosomal gene clusters

注: a-d 分别为基于 18S-ITS-28S rDNA、18S rDNA、ITS 和 28S rDNA 构建的系统发育树

表 3 海星纲物种核糖体基因簇长度组成特点
Tab.3 Composition characteristics of ribosomal gene cluster of starfish species

物种编号	18S rDNA	ITS1	5.8S rDNA	ITS2	ITS	28S rDNA	18S-ITS-28S	Accession No. in NCBI
<i>Acanthaster planci</i> DRR251129	1 816	398	166	655	1 219	4 089	7 124	
<i>Anthenea aspera</i> SRR12622300	1 818	386	166	591	1 143	4 230	7 191	
<i>Archaster typicus</i> SRR12622308	1 816	367	167	432	966	4 039	6 821	
<i>Asterias amurensis</i> A1	1 815	635	167	656	1 458	4 059	7 332	
<i>Asterias amurensis</i> A2	1 815	635	167	656	1 458	4 059	7 332	
<i>Asterias amurensis</i> A3	1 815	635	167	656	1 458	4 059	7 332	
<i>Asterias amurensis</i> A4	1 815	635	167	658	1 460	4 059	7 334	
<i>Asterias amurensis</i> A5	1 815	635	167	656	1 458	4 059	7 332	
<i>Asterias amurensis</i> A6	1 815	635	167	656	1 458	4 059	7 332	
<i>Asterias amurensis</i> A7	1 815	635	167	656	1 458	4 059	7 332	
<i>Asterias amurensis</i> A8	1 815	635	167	656	1 458	4 059	7 332	
<i>Asterias amurensis</i> A9	1 815	635	167	656	1 458	4 059	7 332	
<i>Asterias amurensis</i> A10	1 815	635	167	656	1 458	4 059	7 332	
<i>Asterias amurensis</i> CNS01589	1 815	635	167	656	1 458	4 059	7 332	OR630824
<i>Asterias amurensis</i> CNS01590	1 815	635	167	656	1 458	4 059	7 332	OR630825
<i>Asterias amurensis</i> CNS01591	1 815	635	167	657	1 459	4 059	7 333	OR630826
<i>Asterias amurensis</i> CNS01908	1 815	635	167	656	1 458	4 059	7 332	OR630827
<i>Asterias amurensis</i> CNS01909	1 815	635	167	656	1 458	4 059	7 332	OR630828
<i>Asterias amurensis</i> CNS01910	1 815	635	167	656	1 458	4 059	7 332	OR630829
<i>Asterias amurensis</i> CNS01911	1 815	635	167	656	1 458	4 059	7 332	OR630830
<i>Asterias amurensis</i> CNS01912	1 815	635	167	656	1 458	4 059	7 332	OR630831
<i>Asterias amurensis</i> CNS01913	1 815	635	167	656	1 458	4 059	7 332	OR630832
<i>Asterias amurensis</i> CNS01914	1 815	635	167	656	1 458	4 059	7 332	OR630833
<i>Asterias amurensis</i> CNS01915	1 815	635	167	656	1 458	4 059	7 332	OR630834
<i>Asterias amurensis</i> CNS01916	1 815	635	167	656	1 458	4 059	7 332	OR630835
<i>Asterias amurensis</i> CNS01988	1 815	635	167	656	1 458	4 059	7 332	OR630836
<i>Asterias amurensis</i> CNS01990	1 815	635	167	656	1 458	4 059	7332	OR630837
<i>Asterias amurensis</i> CNS01991	1 815	635	167	656	1 458	4 059	7 332	OR630838
<i>Asterias amurensis</i> On1	1 815	635	167	657	1 459	4 059	7 333	
<i>Asterias amurensis</i> On2	1 815	635	167	656	1 458	4 059	7 332	
<i>Asterias amurensis</i> On3	1 815	635	167	656	1 458	4 059	7 332	
<i>Asterias amurensis</i> On4	1 815	635	167	656	1 458	4 059	7 332	
<i>Asterias amurensis</i> On5	1 815	635	167	656	1 458	4 059	7 332	
<i>Asterias amurensis</i> U1	1 815	635	167	656	1 458	4 059	7 332	
<i>Asterias amurensis</i> U2	1 815	635	167	656	1 458	4 059	7 332	
<i>Asterias amurensis</i> U3	1 815	635	167	656	1 458	4 059	7 332	
<i>Asterias amurensis</i> U4	1 815	635	167	656	1 458	4 059	7 332	
<i>Asterias amurensis</i> U5	1 815	635	167	656	1 458	4 059	7 332	
<i>Asterias amurensis</i> U6	1 815	635	167	656	1 458	4 059	7 332	
<i>Asterias amurensis</i> U7	1 815	635	167	656	1 458	4 059	7 332	
<i>Asterias amurensis</i> U8	1 815	635	167	656	1 458	4 059	7 332	
<i>Asterias amurensis</i> U9	1 815	635	167	656	1 458	4 059	7 332	
<i>Asterias amurensis</i> U10	1 815	635	167	656	1 458	4 059	7 332	
<i>Asterias rubens</i> ERR3312498	1 815	605	167	653	1 425	4 063	7 303	
<i>Coscinasterias</i> <i>acutispina</i> SRR19025778	1 815	575	167	611	1 353	4 072	7 240	
<i>Cryptasterina hystera</i> SRR12430566	1 817	391	166	575	1 132	4 119	7 068	

续表

物种编号	18S rDNA	ITS1	5.8S rDNA	ITS2	ITS	28S rDNA	18S-ITS-28S	Accession No. in NCBI
<i>Culcita novaeguineae</i> SRR12622305	1 817	394	166	677	1 237	4 094	7 148	
<i>Euretaster insignis</i> SRR12622299	1 823	842	168	577	1 587	5 062	8 472	
<i>Goniodiscaster scaber</i> SRR12622302	1 817	425	166	541	1 132	4 268	7 217	
<i>Iconaster longimanus</i> SRR12622306	1 827	426	167	682	1 275	4 177	7 279	
<i>Linckia laevigata</i> LC505033.1	1 816	461	167	603	1 231	4 263	7 310	
<i>Luidia maculata</i> SRR12622298	1 832	508	166	657	1 331	4 602	7 765	
<i>Marthasterias glacialis</i> ERR6054755	1 815	685	167	676	1 528	4 071	7 414	
<i>Nepanthia sp</i> SRR12622301	1 818	408	166	563	1 137	4 079	7 034	
<i>Ophidiaster granifer</i> SRR12622297	1 828	686	166	806	1 658	4 560	8 046	
<i>Patiria miniata</i> SRR343071	1 816	467	165	588	1 220	4 041	7 077	
<i>Patiria pectinifera</i> DRR157371	1 816	448	165	575	1 188	4 047	7 051	
<i>Patiriella regularis</i> ERR995408	1 816	476	166	630	1 272	4 125	7 213	
<i>Pentaceraster mammillatus</i> SRR12622307	1 817	397	166	689	1 252	4 125	7 194	
<i>Plazaster borealis</i> SRR16914471	1 815	561	167	649	1 377	4 060	7 252	
<i>Protoreaster nodosus</i> SRR12622304	1 817	404	166	670	1 240	4 131	7 188	

然而,多棘海盘车线粒体基因组种内的变异十分显著。在本研究分析的 40 个样本中,仅有两个样本的线粒体基因组序列组成完全一致。我国胶州湾和连云港的多棘海盘车样本与日本牛窓海域的样本聚为一枝,说明我国胶州湾、连云港以及日本牛窓海域间多棘海盘车存在基因交流,这可能与多棘海盘车具有较强的适应能力有关。根据海星纲物种的分化时间估算,多棘海盘车物种的形成大约在 8.0 Ma,胶州湾样本的种内变异大约发生在 4.2 Ma。根据线粒体基因组的系统发育关系,澳大利亚样本(MZ435267)与胶州湾样本亲缘关系更近。20 世纪 80 年代初多棘海盘车可能通过船舶的压舱水从北太平洋跨越热带而引入澳大利亚塔斯马尼亚东南部,之后向北扩散,1995 年发现维多利亚州菲利普湾港已建立种群,现已在菲利普港外又发现了四个种群(Inverloch、San Remo、Tidal River 和 Gippsland Lakes; 均在维多利亚州境内),表明该物种目前正在扩大范围(Richardson *et al.*, 2015)。据报道,多棘海盘车已经成为入侵南北极的潜在物种(Byrne *et al.*, 2016)。适应是生命进化多样化的核心特征和主要解释,因其复杂性和超长的时间尺度而难以开展研究(Battlay *et al.*, 2023)。生物入侵是快

速进化的典型模型(Reznick *et al.*, 2001),遗传多样性常用于指示进化适应的潜力(Lee, 2002)。促使入侵物种适应新环境的遗传变化来自新突变还是遗传变异是进化生物学中的一个关键问题,这个问题的解答与理解入侵性的快速进化同样重要(Hermisson *et al.*, 2005)。Battlay 等(2023)追踪一种侵略性入侵的杂草 *Ambrosia artemisiifolia* 时发现,在富含平行适应特征的基因组区域中识别出具有多个特征的单倍型块,这些单倍型块赋予其对当地气候的平行适应的能力,与快速适应性状相关,并在空间和时间上表现出显著的频率变化。多棘海盘车显著的变异能力为研究进化适应提供了潜在的实验材料。

4 结论

本研究比较研究了全球多个海域多棘海盘车样本的单基因通用分子标记 *cox1*、线粒体基因组和核糖体基因簇的系统发育特征,不仅揭示了中国海域多棘海盘车的遗传多样性,同时也认识了全球多棘海盘车的遗传特点。多棘海盘车种内具有极高的遗传多样性,变异水平可能远超现有实验样本所体现的水平,这可能与其强大的适应能力有关。后续仍需要密

切跟踪多棘海盘车的遗传多样性特征, 下一步工作的重点是建立可用于多棘海盘车环境样本 eDNA 宏条形码分析的分析方法和数据平台。

致谢 感谢中国科学院海洋研究所海洋大数据中心的支持; 感谢在 2022 胶州湾样本采样过程中青岛市胶州市东营码头渔民胡大山在采样工作中给予的支持和便利。

参 考 文 献

- 王敏晓, 程方平, 李超伦, 等, 2011. 基于线粒体 *cox1* 片段序列的胶州湾浮游动物 DNA 条形码分析[J]. 海洋与湖沼, 42(5): 702-710.
- 孙光, 1983. 海星类的生态及其在贝类增殖中的危害和防除方法的研究[J]. 国外水产, 3(4): 16-20.
- 李敏晶, 孙蔷薇, 王旭莹, 等, 2017. 多棘海盘车多肽的抑菌活性研究[J]. 应用化工, 46(10): 2073-2076.
- 李淑芸, 张秀梅, 聂猛, 等, 2014. 不同温度下多棘海盘车对菲律宾蛤仔的摄食选择性研究[J]. 水产学报, 38(7): 981-991.
- 张天文, 刘广斌, 刘恩孚, 等, 2015. 多棘海盘车对魁蚶摄食量、选择性及昼夜摄食差异的初步研究[J]. 中国海洋大学学报自然科学版, 18(12): 24-29.
- 张秀梅, 李淑芸, 刘佳, 等, 2014. 青岛近海多棘海盘车繁殖生物学的初步研究[J]. 中国海洋大学学报自然科学版, 44(11), 16-24.
- 周书珩, 王印庚, 2008. 近海水域海星泛滥引起的反思[J]. 水产科学, 27(10): 555-556.
- 周珊珊, 张秀梅, 蔡星媛, 等, 2014. 温度对魁蚶稚贝潜沙能力及对多棘海盘车捕食魁蚶稚贝能力的影响. 水产学报, 38(9): 1439-1446.
- 徐思嘉, 肖宁, 曾晓起, 2018. 中国海域海盘车科(棘皮动物门, 海星纲)种类记述[J]. 海洋科学, 42(10): 53-63.
- BANKEVICH A, NURK S, ANTIPOV D, *et al*, 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing [J]. Journal of Computational Biology, 19(5): 455-477.
- BATTLAY P, WILSON J, BIEKER V C, *et al*, 2023. Large haploblocks underlie rapid adaptation in the invasive weed *Ambrosia artemisiifolia* [J]. Nature Communications, 14(1): 1717.
- BERNT M, DONATH A, JÜHLING F, *et al*, 2013. MITOS: Improved *de novo* metazoan mitochondrial genome annotation [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 69(2), 313-319.
- BUTTERMORE R E, TURNER E, MORRICE M G, 1994. The introduced northern Pacific seastar *Asterias amurensis* in Tasmania [J]. Memoirs of the Queensland Museum, 36: 21-25.
- BYRNE M, GALL M, WOLFE K, *et al*, 2016. From pole to pole: the potential for the Arctic seastar *Asterias amurensis* to invade a warming Southern Ocean [J]. Global Change Biology, 22(12): 3874-3887.
- GREINER S, LEHWARK P, BOCK R, 2019. Organellar Genome DRAW (OGDRAW) version 1.3.1: expanded toolkit for the graphical visualization of organellar genomes [J]. Nucleic Acids Research, 47(W1): W59-W64.
- HERMISSON J, PENNING S, 2005. Soft sweeps: molecular population genetics of adaptation from standing genetic variation [J]. Genetics, 169(4): 2335-2352.
- HIRUTA S F, ARAI M, CHAVANICH S, *et al*, 2020. Complete mitochondrial genome of a sea star, *Linckia laevigata* (Echinodermata, Asteroidea, Valvatida, Ophidiasteridae) [J]. Mitochondrial DNA Part B, 5(2): 1342-1343.
- INOUE J, HISATA K, YASUDA N, *et al*, 2020. An investigation into the genetic history of Japanese populations of three starfish, *Acanthaster planci*, *Linckia laevigata*, and *Asterias amurensis*, based on complete mitochondrial DNA sequences [J]. G3 Genes Genomes Genetics, 10(7): 2519-2528.
- JIN J J, YU W B, YANG J B, *et al*, 2020. GetOrganelle: a fast and versatile toolkit for accurate *de novo* assembly of organelle genomes [J]. Genome Biology, 21(1): 241.
- KIM Y S, 1968. Histological observations of the annual change in the gonad of the starfish, *Asterias amurensis* Lüken [J]. Bulletin of the Faculty of Fisheries Hokkaido University, 19(2): 97-108.
- KOBOLDT D C, ZHANG Q Y, LARSON D E, *et al*, 2012. VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing [J]. Genome Research, 22(3): 568-576.
- KRZYWINSKI M, SCHEIN J, BIROL I, *et al*, 2009. Circos: an information aesthetic for comparative genomics [J]. Genome Research, 19(9): 1639-1645.
- LEBRATO M, IGLESIAS-RODRIGUEZ D, FEELY R A, *et al*, 2010. Global contribution of echinoderms to the marine carbon cycle: CaCO₃ budget and benthic compartments [J]. Ecological Monographs, 80(3): 441-467.
- LEE C E, 2002. Evolutionary genetics of invasive species [J]. Trends in Ecology & Evolution, 17(8): 386-391.
- LI H, 2011. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data [J]. Bioinformatics, 27(21): 2987-2993.
- MADEIRA F, PEARCE M, TIVEY A R N, *et al*, 2022. Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022 [J]. Nucleic Acids Research. 50(W1): W276-W279.
- MATSUBARA M, KOMATSU M, ARAKI T, *et al*, 2005. The phylogenetic status of Paxillosoida (Asteroidea) based on complete mitochondrial DNA sequences [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 36(3): 598-605.
- PETROV N B, VLADYCHENSKAYA I P, DROZDOV A L, *et al*, 2016. Molecular genetic markers of intra- and interspecific divergence within starfish and sea urchins (Echinodermata) [J]. Biochemistry, 81(9): 972-980.
- QUEK Z B R, CHANG J J M, IP Y C A, *et al*, 2021. Mitogenomes reveal alternative initiation codons and lineage-specific gene order conservation in Echinoderms [J]. Molecular Biology and Evolution, 38(3): 981-985.
- REZNICK D N, GHALAMBOR C K, 2001. The population ecology of contemporary adaptations: what empirical studies reveal about the conditions that promote adaptive evolution

- [J]. *Genetica*, 112(1): 183-198.
- RICHARDSON M F, SHERMAN C D H, 2015. *De novo* assembly and characterization of the invasive Northern Pacific seastar transcriptome [J]. *PLoS One*, 10(11): e0142003.
- ROBINSON J T, THORVALDSDÓTTIR H, WINCKLER W, *et al*, 2011. Integrative genomics viewer [J]. *Nature Biotechnology*, 29(1): 24-26.
- ROMBEL I T, SYKES K F, RAYNER S, *et al*, 2002. ORF-FINDER: a vector for high-throughput gene identification [J]. *Gene*, 282(1/2): 33-41.
- SONNHAMMER E L L, DURBIN R, 1995. A dot-matrix program with dynamic threshold control suited for genomic DNA and protein sequence analysis [J]. *Gene*, 167(1/2): GC1-GC10.
- STEVENS C, 2022. *Asterias amurensis* (northern Pacific seastar). CABI Compendium [DB]. doi: 10.1079/cabicompendium.92632.
- VALACH M, BURGER G, GRAY M W, *et al*, 2014. Widespread occurrence of organelle genome-encoded 5S rRNAs including permuted molecules [J]. *Nucleic Acids Research*, 42(22): 13764-13777.
- WARD R D, ANDREW J, 1995. Population genetics of the northern Pacific seastar *Asterias amurensis* (Echinodermata: Asteroidea): allozyme differentiation among Japanese, Russian, and recently introduced Tasmanian populations [J]. *Marine Biology*, 124(1): 99-109.
- YANG Z H, 2007. PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8): 1586-1591.
- ZHANG D, GAO F L, JAKOVLIĆ I, *et al*, 2020. PhyloSuite: An integrated and scalable desktop platform for streamlined molecular sequence data management and evolutionary phylogenetics studies [J]. *Molecular Ecology Resources*, 20(1): 348-355.

MOLECULAR ANALYSIS OF *ASTERIAS AMURENSIS* FROM A STARFISH OUTBREAK IN JIAOZHOU BAY IN SUMMER 2022

WANG Jing^{1,2,3}, DUAN Ze-Lin^{1,2,3}, HE Zi-Yan^{1,2,3,4}, CHEN Nan-Sheng^{1,2,3,4}

(1. Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Laoshan Laboratory, Qingdao 266237, China; 3. Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 4. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract *Asterias amurensis* is a starfish species that can develop harmful outbreaks. This species belongs to the class Asteroidea and is widely distributed in the North Pacific Ocean, including the Yellow Sea and Bohai Sea of China, and Korea, Japan, and Russia. It has also been found in Tasmania, Australia likely as an invasive species. Large-scale *A. amurensis* outbreaks have been observed in many ocean regions with high density, causing negative impacts on local ecosystem and aquaculture. Since 2006, large-scale *A. amurensis* outbreaks have been observed in Jiaozhou Bay and adjacent ocean regions in Qingdao, Shandong Peninsula, China, causing big economic losses to shellfish farming. Genetic diversity of *A. amurensis* in Japan, Russia, and Australia has been studied. However, up to now, little research has been carried out on genetic analysis of *A. amurensis* samples collected in Jiaozhou Bay, impeding the comparative analysis of the genetic evolution relationship of Jiaozhou Bay population with other populations in the globe. Twelve live samples from the starfish outbreak in Jiaozhou Bay in July 2022 and three samples collected in Lianyungang were analyzed. Their mitochondrial genome, ribosomal gene cluster, and multiple universal molecular markers were assembled and analyzed. Phylogenetic analysis based on the mitochondrial genome showed that *A. amurensis* has high intraspecies genetic diversity. According to the estimation of differentiation time based on the protein-coding gene of mitochondrial genome, the intraspecific genetic differentiation of *A. amurensis* might occur in 1.7~4.2 Ma. Compared with the mitochondrial genomes, the sequences of the ribosomal gene clusters of *A. amurensis* show highly intra-species conservation and basically no intraspecific sequence difference was observed, indicating that the mitochondrial genome has a high resolution for *A. amurensis* genetic diversity. This study constructed a variety of molecular markers of the disaster-causing species of *A. amurensis* in Jiaozhou Bay for the first time, and in addition, developed high-resolution molecular markers that may facilitate accurate monitoring of the genetic diversity of *A. amurensis* in Jiaozhou Bay and other sea areas.

Key words *Asterias amurensis*; outbreak; genetic evolution; Jiaozhou Bay; mitochondrion; ribosomal gene cluster