

用 16S rDNA 序列初步探讨部分真虾类的系统发育关系

徐 琰^{1,2}, 宋林生¹, 李新正¹

(1. 中国科学院 海洋研究所 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100039)

摘要:利用 DNA 序列测定技术测定了真虾下目 7 科 8 个种的线粒体 16S rDNA 部分序列, 与从 GenBank 检索得到的 12 个相关种的 16S rDNA 部分序列进行同源性比对, 探讨其系统发育关系及 16S rDNA 在真虾类系统发育研究中的应用。比对序列长 353bp, 其中变异位点 221 个、简约信息位点 180 个。碱基转换替代速度比颠换替代速度慢。以螯虾下目的 *Austropotamobius pallipes* 为外群构建了这 20 种真虾的系统发育关系分支图, 结果展示: (1) 长臂虾科隐虾亚科的 *Anchistus custos* 远离长臂虾亚科分支。而且它的 16S rDNA 序列在 Genbank 中, 首先与六足纲(Hexapoda)的昆虫比对上。(2) 长臂虾科长臂虾亚科的两个近缘属 *Palaemon* 和 *Palaemonetes* 间的 4 个种混合相聚, 说明传统形态分类中以大颚有无触须作为这两个属的属级形态鉴定特征尚需进一步审定。(3) 鼓虾总科藻虾科的 *Exhippolytina ensirostris* 与褐虾总科褐虾科的 *Crangon affinis* 处在同一分支, 而未与鼓虾科的种类形成姐妹群。研究表明, 16S rDNA 片段的序列很适合研究真虾类的属间系统发育关系, 而在研究属上高级阶元或种下阶元间的系统发生关系时较不敏感, 因其变异对于种级水平显得过于保守, 而对于科级以上阶元又显得太快。

关键词:真虾下目 (Caridea Dana, 1852); 16S rDNA 序列; 系统发育**中图分类号:** Q111 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2005)09-0036-06

真虾下目隶属于甲壳动物亚门(Crustacea), 在最近的《现生甲壳动物亚门最新分类系统》中被分为 16 个总科, 36 个科, 共约 2500 多种^[1]。真虾下目自 Dana 1852 年提出以来, 其科级阶元(总科、科、亚科)的划分经历了数次变化, 20 世纪 50 年代以来才逐渐形成了较为一致的意见, Martin 和 Davis 2001 年在此基础上提出了 16 总科 36 科的分类系统^[2,3]。由于真虾类的形态变异大, 生活环境复杂, 生活方式(自由生活、共栖生活)丰富多样。根据形态学特征特别是步足、口器等方面的特征来划分总科和科在分类学研究中十分方便, 但是否可以反映出科间的系统发育学关系, 亦即这些总科和科是否是贴近自然的单系类群尚存在一定疑问^[4]。而一些科或者亚科也由于所依据的分类学特征不同而在历史上有变动甚至多次变动, 如叶颚虾科(Gnathophyllidae)甚至被归入过 5 个总科中。藻虾科(Hippolytidae)由于各属间有较大的形态差异而曾经分属于 3 个总科, 现在作为一个科隶属于鼓虾总科, 但该科很可能是多系发生的类群。这种状态可能是由于真虾类目前正处于高分化时期, 其形态、生理受复杂环境的影响而处于较快的变异中, 出现了一些异源同形现象而使仅靠形态学特征(主要是口器、步足等)进行科级阶元的划分有

一定困难甚至混淆。目前的真虾下目科级阶元分类系统在分类学上十分方便, 但是否也代表了真虾下目各个类群的系统发育学关系, 亦即现有的总科、科是否是自然的类群, 仍然是一个值得研究的课题。

利用分子生物学技术检测生物大分子所包含的遗传信息, 并定量描述、分析这些信息旨在分子水平上解释生物的多样性、系统发育和进化的意义。对特定的 DNA 序列进行分析, 研究 DNA 分子间的差异, 进而比较不同生物间的系统演化是目前分子系统学的重要任务。目前已有应用 16S rDNA 等序列分析甲壳类及长臂虾科等的分子系统学关系的报道^[5]。但对于真虾类科级阶元的分子系统学研究在国内外尚未见报道。作者将通过分析真虾下目部分常见代表种的 16S rDNA 序列, 为该下目的分子系统学研究提供了一些数据。

收稿日期: 2005-04-06; 修回日期: 2005-05-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(30370186)

作者简介: 徐琰(1979-), 女, 天津人, 硕士, 研究方向为虾类的分子系统发育研究, E-mail: xuyan@ms.qdio.ac.cn.com; 李新正(1963-), 通讯作者, 博士生导师, 责任研究员, 从事甲壳动物分类系统学研究, E-mail: lixzh@ms.qdio.ac.cn.com

由于在不同分类单元中, rDNA 基因进化的速率和方式可能会有很大的不同, 所以关于哪个特定的基因适用于哪个特定的分类阶元, 尚不能做出适用于全体类群的结论。作者通过测定 16S rDNA 基因的部分序列, 分析研究 20 种真虾的亲缘关系, 并评价该序列片断在分析真虾系统发育中的适用性。将根据分子生物学技术对真虾下目中的一些种类特定 DNA 序列测序获得的分子数据, 通过利用支序分类学理论与方法对这些数据的分析, 从各种遗传物质的变化探讨各种间的系统学关系, 进而预测各科间

的系统学关系, 从而验证和修正当前分类系统的正确性, 使之带有更贴近自然的系统发育信息。

1 材料和方法

1.1 材料

本实验用的 7 个科, 8 个种, 9 个个体的真虾来自中国科学院海洋生物标本馆收藏的标本(采集于 20 个世纪 50~90 年代)。部分标本用福尔马林固定后, 改为 75% 酒精保存。标本记录见表 1。

表 1 标本记录

Tab. 1 The record of specimens

种名	数量 (个)	采集地点	采集时间 (年-月-日)	标本号
<i>Plesionika izumiae</i> Omori	1	不详	1976-07-22	V512B-1
<i>Anchistus custos</i> (Forsk? L)	1	海南邻昌礁	1992-04-09	92C-1109
<i>Leptochela gracilis</i> Stimpson	1	青岛沙子口	1956-11-19	07806
<i>Crangon affinis</i> de Haan	2	南黄海	1976-04-27	OP72-2
<i>Palaemon gravieri</i> (Yu)	1	南黄海	1976-09-18	V53313-25
<i>Alpheus japonicus</i> Miers	1	南黄海	1976-09-18	V53313
<i>Alpheus distinguendus</i> de Man	1	海南三亚湾	1990-11-18	BE12-B8
<i>Ezhippolysmata ensirostris</i> (Kemp)	1	海南三亚湾	1991-11-08	BE5-B2

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取

从虾腹部取肌肉组织 0.2~0.5 g。用 75% 酒精浸泡 2h 后, 分别用 80%, 90%, 100% 的酒精浸泡 20 min 以置换出残留在组织中的福尔马林, 然后弃去酒精凉干。将组织在匀浆缓冲液 (pH=8.0; Tris-HCl, 10 mmol/L 和 EDTA, 50 mmol/L) 中剪碎, 加入 10 μ L 蛋白酶 K (20 mg/10 μ L), 在 55 $^{\circ}$ C 水浴中消化至澄清。用传统酚仿法提取 DNA, 并溶解于灭过菌的超纯水中。

1.2.2 16S rDNA 的引物、PCR 扩增和测序

引物序列: 正向 16S ar (L2510): 5' - CGCCT-GTTTATCAAAAACAT - 3' 和反向 16S br: 5' - AGATTACGCTGTTATCCCTA - 3'^[6]。其中反向引物 16S br 是作者通过比对 GenBank 中十足目 16S rDNA 片段, 并在其下游的保守区中用 Primer premier 5.0 软件设计的真虾类特异引物。由这对引物可

以得到约 400 bp 的扩增产物。

PCR 反应体系 (25 μ L): 2.5 μ L 的 10 \times PCR buffer; 12.5 mmol/L MgCl₂ (1.5 μ L); 10 mmol/L dNTP (2 μ L); 各 10 μ mol/L (1 μ L) 的正反向引物; 约 50 ng 模板 DNA; 1U 的 TaKaRa Taq; 加灭菌蒸馏水至 25 μ L。

PCR 反应程序: 预变性 94 $^{\circ}$ C/5 min; 变性 94 $^{\circ}$ C/40 s, 复性 53 $^{\circ}$ C/40 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C/50 s, 35 次循环; 最后一次延伸 72 $^{\circ}$ C/10 min。

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检验纯化后进行双向测序。

1.2.3 数据的分析处理

从 GenBank 中检索到了 12 种相关真虾和 1 种外群螯虾 *Austropotamobius pallipes* 的 16S rDNA 基因同源序列 (表 2), 结合本文的序列结果一起分析。用 CLUSTAL X 1.81 程序对序列进行比对, 并辅以人工校对^[7]。

表 2 来自 GenBank 的其他真虾和外群

Tab. 2 The other caridean shrimps and outgroup researched from GenBank

种名	登录号
<i>Alpheus cylindricus</i>	AF230272
<i>Palaemon serenus</i>	AF374465
<i>Synalpheus longicarpus</i>	AF230265
<i>Synalpheus gambarelloides</i>	AY344751
<i>Synalpheus goodei</i>	AY344753
<i>Automate galatineri</i>	AF501649
<i>Austropotamobius pallipes</i>	AF237605
<i>Palaemonetes atrinubes</i>	AF439520
<i>Palaemonetes australis</i>	AF439517
<i>Macrobrachium novaehollandiae</i>	AY282772
<i>Macrobrachium bullatum</i>	AY282778
<i>Macrobrachium handschini</i>	AY282781
<i>Macrobrachium mammillodactylus</i>	AY282776

用系统发生软件包 MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, 3.0) 计算变异位点数 (variable sites) 和简约信息位点数 (parsimony information sites), 以及平均碱基含量^[8]。

在 MEGA3.0 和 PHYLIP 软件中, 用基于 Kimura-双参数距离模型的邻接法 (NJ 法) 和 MP 法构建各类群的系统发生关系。用自展法检验, 1 000 次重复抽样得到结点的置信值。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果

利用 16S rDNA 的通用引物 L2510: 5'-CGC CTG TTT AAC AAA AAC AT-3' 和 H3059: 5'-CCG GTC TAG ACT CAG ATC ATG T-3', 对从标本中提取的 DNA 进行 PCR 扩增。扩增产物的电泳检测结果常常是弥散带或大片的拖尾带。而对于同样的 DNA 模板, 用 L2510 作为正向引物和我们设计的反向引物扩增却可以得到狭窄的单一目的片段。这一结果说明了我们设计的反向引物 16S br 比

L2510 与模板匹配得更好, 更有利于真虾类 DNA 的 PCR 扩增。PCR 扩增产物电泳检测结果见图 1。



图 1 16S rDNA 基因片段 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 1 16S rDNA fragment PCR amplifying products electrophoresis pattern

泳道 1: Mark (TaKaRa 的 DGL2000); 泳道 2~10: 以 L2510 和 16S br 为引物的 PCR 产物; 泳道 11~19: 以 L2510 和 H3059 为引物的 PCR 产物 (Lane 1: Mark (TaKaRa's DGL2000); Lane 2~10: the PCR product amplified by the primers of L2510 and 16S br; Lane 11~19: the PCR product amplified by the primers of L2510 and H3059)

2.2 16S rDNA 基因片段的组成

所测 9 个真虾个体的 16S rDNA 基因片段均约 400bp 左右。结合 12 个从 GenBank 中引用的真虾 16S rDNA 序列, 用 CLUSTALX1.8 软件进行比对, 在所得的 353 个比对位点中, 变异位点 221 个、简约信息位点 180 个、单个突变位点 39 个。所有片段中 A, T, C, G 的平均含量为 31.3%, 35.0%, 11.0%, 22.1%, A+T 的含量高, 平均为 66.3%。

2.3 20 种真虾的系统发生树

以螯虾 *Austropotamobius pallipes* 为外群, 用 NJ 法、MP 法、ME 法构建系统发生树。MP 法产生 1 个最简约树 (图 2)。将通过 3 种方法构建的系统发生树中结构位置不一致的结点用星号标出。在构建系统发生树时, 用 Bootstrap 法检验, 1 000 次重复抽样得到结点的置信度以自引导值估计。

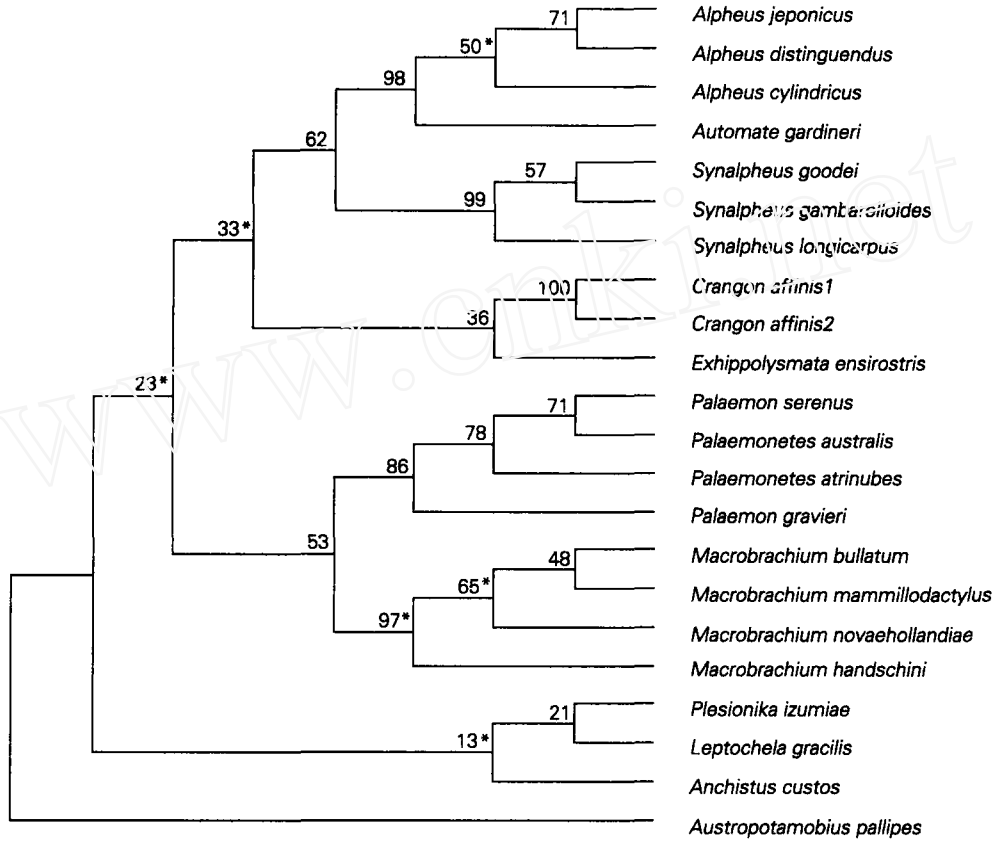


图 2 基于 16S rDNA 序列构建的 20 种真虾的 MP 树

Fig. 2 MP phylogenetic tree of 20 caridean species based on 16S rDNA sequences

以 *Austropotamobius pallipes* 为外群, 1 000 次重复抽样检验得到节点自展值。分支上是节点的置信值, 打星号的节点是指在 3 种系统发生树中结构位置有变化的节点

Austropotamobius pallipes is the outgroup. The percentage levels of support on the branch are based on 1000 bootstrap replicates. The nodes with the asterisk indicate where the topologies of the 3 trees are changeable and the nodes have relatively low bootstrap value

3 讨论

3.1 从福尔马林标本中提取 DNA

世界各国生物学家在过去采集了大量生物标本并保存于福尔马林中, 这些标本在研究物种起源、系统进化、特定物种基因资源保护以及生物多样性等方面具有很高的学术价值。如不能正常提取基因组总 DNA, 就会从分子水平上比较研究这些生物带来阻碍。但目前从福尔马林浸泡的动物标本中提取并纯化 DNA 的方法远远不能满足现代分子生物学研究的需要。因为从福尔马林中提取 DNA, 特别是提取高质量 DNA 非常困难, 原因在于: (1) 甲醛可以使

DNA 与蛋白质之间产生交联, 所以在提取时大量 DNA 会随着杂蛋白质被除去, 这大大降低了 DNA 的提取得率。(2) 标本在采集时没有被福尔马林固定液及时彻底地浸泡, 所以组织没有固定好, DNA 在内源性水解 (endogenous hydrolytic processes) 作用下很快降解。(3) 从福尔马林保存的标本中提取基因组 DNA 的破坏程度与时间没有直接关系, 主要与保存液是否被暴露在空气中发生氧化有直接的关系。甲醛在空气中易氧化成甲酸, 而甲酸对 DNA 有较强的降解作用。所以从福尔马林保存的标本中提取的基因组 DNA 在电泳检测时, 始终表现为弥散带。

本实验对福尔马林固定过的真虾类标本进行 DNA 提取, 利用渐高的梯度酒精浸泡标本组织以除

去阻碍下一步实验的甲醛。从提取的 DNA 中成功地扩增得到 16S rDNA 片段的 PCR 产物,并测序得到良好的序列结果。说明对福尔马林固定的特殊材料是可以得到 Mt DNA 片段的 PCR 扩增产物的。

3.2 16S rDNA 基因片段组成分析

本文所分析的 20 种真虾的 A+T 平均含量高达 66.3%,这与果蝇、蜘蛛、虾类、蟹类等节肢动物的 16S rDNA 片段研究结果一致^[9]。由于 A+T 的含量高,可能在真虾中一些核酸替代发生更为频繁,例如颠换中大部分是由 A、T 之间的颠换引起的。

碱基转换 (TS)/颠换 (TV) 可以作为多重替换 (multiple substitutions) 程度的一个指标,也可以衡量两序列之间自分歧进化以来各位点发生替换的饱和程度。本文中各种真虾间的平均 TS/TV 为 0.7,说明真虾各分类单元之间,16S rDNA 基因序列可能受到多重替换和序列饱和的影响。但由于受序列中 A+T 碱基丰富的影响,并不能完全说明序列中转换已饱和^[10]。

3.3 系统发生关系分析

从系统发生树中我们可以看出除了 *Anchistus custos*,同一科中的真虾(鼓虾科中的鼓虾属 (*Alpheus*)、合鼓虾属 (*Synalpheus*)、澳托虾属 (*Automate*);长臂虾科中的长臂虾属 (*Palaemon*)、小长臂虾属 (*Palaemonetes*)、沼虾属 (*Macrobrachium*)) 都聚在了一个置信值相对较高结构位置稳定的结点内。*Anchistus custos* 从形态特点上看,是一种典型的长臂虾科隐虾亚科的种,在我们的分支图中游离在长臂虾科分支之外应是令人费解的现象。所以我们将它的 16S rDNA 序列在 Genbank 中进行了比对,结果发现它首先与六足纲 (Hexapoda) 中 *Trichobrotica sexplagiata* 等昆虫相似性较高,而不像其他的 19 种真虾都是和同一下目虾的 16S rDNA 享有最高的相似性。这一结果在一定程度上支持泛甲壳动物学说。泛甲壳动物学说是 Zrzavy 和 Stys 1997 年提出的,他们利用形态学、生理学、发育生物学和生态学等 300 多个特征的全数据,分析构建了系统树,从中得到包含一个“六足动物+甲壳动物”的分支单元,定名为泛甲壳动物。近 10 年来,分子系统学对节肢动物亲缘关系的研究结果也支持了六足动物是从甲壳动物进化而来的观点^[11]。但在本文研究的 20 种真虾中只有 *Anchistus custos* 出现这种现象,对更多相近种进行测序和进一步的分析对研究真虾类的系统演化是十分必要的。

鼓虾科分支中澳托虾属和鼓虾属中的虾先聚在了一起,再和合鼓虾属相聚。长臂虾科分支中长臂虾属和小长臂虾属先聚在了一起,再和沼虾相聚。该结

果形态学观点完全一致。从以上的分析当中可以看出在该下目的属级水平上,基于 16S rDNA 序列数据分析所得到的分子系统发生树可以较好地反映出传统形态分类单元之间的关系。

长臂虾科长臂虾亚科的 *Palaemon* 和 *Palaemonetes* 形成有稳定的结构位置和较高的置信度的分支,说明二者关系较近。但同属的不同种没有先各自聚成一个分支后,然后两个近缘属再相聚。这种属间种混合相聚的现象说明传统形态分类中近缘属 *Palaemon* 和 *Palaemonete* 间以大顎有无触须作为属级形态鉴定的特征尚需进一步审定。

藻虾科中的 *Exhippolysmata ensirostris* 没有按传统分类观点和鼓虾科分支聚在一起形成鼓虾总科,而是和褐虾科中的 *Crangon affinis* 聚在一起形成了置信度为 36 的分支。这与 Chritoffersen 1987 年根据形态学特点做的支序分析观点一致,即 *Exhippolysmata ensirostris* 与鼓虾科的亲缘关系要远于它和褐虾科中 *Crangon affinis* 间的关系^[12]。

3.4 16S rDNA 基因在研究真虾不同分类单元间系统发育关系的适用性

在 MP 树中,展现了内群的 20 种真虾的系统发生关系。我们按结点所连接的分单元之间最高阶元差异将该树中 19 个结点分为 4 类,个体间结点 1 个,种级结点 7 个,属级结点 6 个,科级结点 5 个。其中在 3 种系统发生树中结构位置发生变化不稳定的结点有 6 个,种级结点有 3 个,科级结点有 3 个。由于 3/7 的种级结点和 3/5 的科级结点结构位置不确定,这说明对于真虾这一类群来说 16S rDNA 序列数据并不是很适合解决高级或低级阶元间的系统发生关系。对于种级水平可能显得太保守,对于科级以上阶元又显得太快。而所有属级结点结构位置稳定是推断属间系统关系很有效的遗传标记。对于解决科间及更高阶元间的系统学关系应使用比 16S rDNA 基因进化速率更慢的核基因组中基因作为遗传标记,如 18S、28S rDNA 基因。反之,对于解决近缘种间的系统关系应选用更快些的基因作为遗传标记如 mtDNA 中的 12S rDNA, D-loop 或 Control region 等片段。分析整个真虾下目这样一个较高阶元类群的系统进化关系单凭 16S rDNA 序列有一定局限性的,如果结合进化更快或更慢的基因序列数据将更有利于揭示真虾下目的系统发育关系。

致谢:刘瑞玉院士的悉心指导;王永良教授、王洪发高工在标本的采集、鉴定中给予指导和帮助;实验室中范宇、倪多娇、苏建国、王玲玲、邹慧斌、李成华、高强等同学给予实验方面无私的支持和帮助,在此一并致以诚挚谢意。

参考文献:

- [1] Martin J W, Davis G E. An updated classification of the recent Crustacea[M]. The United States of America; Science Series 39 Natural history Museum of Los Angeles County, 2001. 44-46; 72-73; 109-110.
- [2] Holthuis L B. The recent genera of the Caridean and Stenopodidean shrimps (Crustacea, Decapoda) [M]. Leiden; Nationaal natuurhistorisch Museum, 1993. 6-303.
- [3] Chace F A. On the classification of the Caridea (Decapoda)[J]. *Crustaceana*, 1982, 63(1): 71-80.
- [4] Felgenhauer B E, Abele I. G. Phylogenetic relationships among shrimp-like decapods[J]. *Crustacean Issues*, 1983, 1: 291-311.
- [5] Murphy N P, Austin C M. Molecular taxonomy and phylogenetics of some species of Australian palaemonid shrimps[J]. *J Crust Biol*, 2003, 3(1): 169-177.
- [6] Palumbi S. Nucleic acids II: The polymerase chain reaction[J]. *Molecular Systematics*, 1996, 205-247.
- [7] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, Jeanmougin F, et al. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 24: 4 876-4 882.
- [8] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment[J]. *Bioinformatics*, 2004, 5: 2.
- [9] 郭天彪, 孙晓瑜. 三疣梭子蟹线粒体 DNA 16S rDNA 和 COI 基因片段序列的比较研究[J]. 中国海洋大学学报, 2004, 34(1): 022-028.
- [10] 吴琛, 宋大祥, 朱明生. 从 12S DNA 基因第三结构域序列分析探讨蜘蛛若干重要类群的亲缘关系[J]. 蛛形学报, 2002, 11(2): 65-73.
- [11] 尹文英. 从泛甲壳动物新假说评述节肢动物系统进化的研究进展[J]. 动物学研究, 2003, 24(1): 11-16.
- [12] Christoffersen M L. Phylogenetic relationships of Hippolytid Genera, with an assignment of new families for the Crangonoidea and Alpheoidea (Crustacea, Decapoda, Caridea)[J]. *Cladistics*, 1987, 3(4): 348-362.

The molecular phylogeny of infraorder caridea based on 16S rDNA sequences

XU Yan^{1,2}, SONG Lin-sheng, LI Xin-zheng

(1. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Received: Apr., 6, 2005

Key words: caridea dana 1852; 16S rDNA phylogenetic relationship

Abstract: The molecular phylogeny of infraorder caridea was revealed by partial 16S rDNA sequences amplified from 8 species (belonging to 7 families) in our study, and other 12 species sequences were cited from Genbank. Alignment of the sequences showed a considerable variation in 221 nucleotide sites and 180 parsimony informative sites. The variation rate of transversion was higher than transition. A dendrogram of the 20 caridean shrimps was reconstructed based on the 16S rDNA sequences with *Austropotamobius pallipes* as outgroup. The results were as follow: (1) *Anchistus custos* of Pontoniinae, Palaemonidae located far away from the branch of Palaemonidae. Its 16S rDNA sequences, blasted in Genbank, was firstly aligned with insects in Hexapoda. (2) The four species in the two close genera *Palaemon* and *Palaemonetes* were clustered in one composite branch, but the species in the two different genera were not separated correspondingly. (3) *Exhippolysmata ensirostris* of Hippolytidae, Alpheoidea were not the sister group of Alpheidae in the dendrogram, but located with *Crangon affinis* of crangonidae, crangonoidea. The study revealed that the fragment of 16S rDNA was very suitable to analyze the relationship among genera in the caridea. But for family or higher level taxa and for species or lower taxa, the sequence was not very applicable. The sequence variation was over-conservative for species or lower taxa, and it was too fast for family or higher level taxa.

(本文编辑: 刘珊珊)