

节肢动物软甲纲18S rRNA 基因序列变异*

Variability of 18S rRNA Gene Sequences of Malacostraca in Arthropoda

张代臻, 唐伯平, 张华彬

ZHANG Dai-zhen, TANG Bo-ping, ZHANG Hua-bin

(江苏省滩涂生物资源与环境保护重点建设实验室, 江苏盐城 224002)

(Jiangsu Provincial Key Laboratory of Coastal Wetland Bioresources and Environmental Protection Yancheng, Jiangsu, 224002, China)

摘要:用节肢动物软甲纲(Malacostraca)9个目53个物种的18S rRNA 基因序列,分析节肢动物软甲纲18S rRNA 基因序列变异特点,并通过邻接法构建系统发生树,初步探讨软甲纲9个目的亲缘关系,为弄清节肢动物尤其软甲纲的系统发生关系提供一定的理论依据。

关键词:节肢动物 软甲纲 18S rRNA

中图法分类号:Q959 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2007)04-0415-04

Abstract:By analysis of fifty-three 18S rRNA sequences of 9 Orders in Malacostraca, we realized the variable level of 18S rRNA sequence. And phylogenetic relationship of Malacostraca was also discussed by a Neighbour-Joining (NJ) phylogenetic tree. The study will provide a certain theoretic base for clarifying the phylogenetic relationship of Arthropoda.

Key words: Arthropoda, Malacostraca, 18S rRNA

节肢动物主要包括甲壳类(Crustacea)、螯肢类(Chelicerata)、六足类(Hexapoda)和多足类(Myriapoda)4个类群,目前国际上新的分类系统将4类分列为4个亚门,即甲壳亚门、螯肢亚门、六足亚门、多足亚门^[1,2]。但是,节肢动物系统发育依然是各国学家争论的焦点。rRNA 构成核糖体的主要成分,在细胞内含量很高,大亚基主要由28S、5.8S和5S rRNA组成,小亚基为18S rRNA。18S rRNA 在蛋白质合成中具有重要的功能,由于其基因序列及二级结构高度保守,核苷酸替换率较低,比较适合于研究高阶元的系统发育,被认为是最有希望解决早期动物进化型式的工具,并已经应用于动物分子系统学的研究^[3~8]。

本文通过对2494位点的18S rRNA 的同源序列比对、碱基组成、序列变异情况的分析,初步探讨18S rRNA 在节肢动物尤其软甲纲系统发生研究中的应

用价值,为进一步搞清甲壳亚门中软甲纲的系统发生关系积累一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 序列获得

本研究共用软甲纲(Malacostraca)9个目53个物种的18S rRNA 序列,另取鳃足纲(Branchiopoda)的4个物种作为外群探讨软甲纲的系统发生关系。所用57条18S rRNA 序列下载于美国生物信息中心(NCBI)基因库(GenBank),其对应的目、种名及登录号如表1所示。

1.2 研究方法

同源序列比对采用Clustal X 1.8软件,比对参数选用默认值,比对后的序列删除部分大片断的插入、缺失及模糊位点后进行后续分析。DNA 碱基组成、序列变异等分析采用MEGA 2.0软件,并分别计算软甲纲9个目之间及与外群间的遗传距离。基于53条18S rRNA 序列,以鳃足纲作为外群和双参数模型(Kimura 2-parameter)、自检值1000、邻接法构建软甲纲的系统发生树。

收稿日期:2006-12-22

修回日期:2007-01-12

作者简介:张代臻(1979-),男,助教,主要从事甲壳类分子系统学研究。

* 国家自然科学基金项目(No. 30570218),盐城师范学院高层次人才引进启动基金项目资助。

表1 本研究所用的18S rRNA 序列

Table 1 Sequences of 18S rRNA in study

| 内/外群 Ingroup/outgroup | 种名 Species | 登录号 Accession number | |
|-------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|----------|
| 十足目 Decapoda | <i>Austropotamobius torrentium</i> | AF235960 | |
| | <i>Pacifastacus leniusculus</i> | AF235961 | |
| | <i>Cambarellus shufeldtii</i> | AF235962 | |
| | <i>Cambaroides japonicus</i> | AF235963 | |
| | <i>Cambarus maculatus</i> | AF235964 | |
| | <i>Orconectes virilis</i> | AF235965 | |
| | <i>Astacus astacus</i> | AF235959 | |
| | <i>Panulirus argus</i> | AY743955 | |
| | <i>Jasus edwardsii</i> | AF235972 | |
| | <i>Virilastacus araucanius</i> | AF235970 | |
| | <i>Parastacus pugnax</i> | AF235969 | |
| | <i>Geocharax gracilis</i> | AF235968 | |
| | <i>Euastacus bispinosus</i> | AF235967 | |
| | <i>Emerita talpoida</i> | AY743949 | |
| | <i>Libinia emarginata</i> | AY743953 | |
| | <i>Gaetice depressus</i> | AY859577 | |
| | <i>Ocypode quadrata</i> | AY743942 | |
| | <i>Homarus americanus</i> | AY743945 | |
| | <i>Homarus americanus</i> | AF235971 | |
| | <i>Cherax quadricarinatus</i> | AF235966 | |
| <i>Stenopus hispidus</i> | AY743957 | | |
| 糠虾目 Mysidacea | <i>Heteromysis</i> sp. JM-2004 | AY859580 | |
| | <i>Heteromysis</i> sp. CCB-2004 | AY743946 | |
| 山虾目 Anaspidacea | <i>Anaspides tasmaniae</i> | L81948 | |
| | <i>Gonodactylus</i> sp. | L81947 | |
| 口足目 Stomatopoda | <i>Squilla empusa</i> | L81946 | |
| | <i>Gonodactylus viridus</i> | AY743947 | |
| | <i>Paranebalia belizensis</i> | AY743952 | |
| 狭甲目 Leptostraca | <i>Nebalia</i> sp. | L81945 | |
| | <i>Bactrurus brachycaudus</i> | AF202979 | |
| 端足目 Amphipoda | <i>Bactrurus mucronatus</i> | AF202978 | |
| | <i>Bactrurus pseudomucronatus</i> | AF202985 | |
| | <i>Bactrurus brachycaudus</i> | AF202984 | |
| | <i>Niphargus fontanus</i> | AF202981 | |
| | <i>Crangonyx forbesi</i> | AF202980 | |
| | <i>Gammarus troglophilus</i> | AF202983 | |
| | <i>Gammarus pulex</i> | AF202982 | |
| | <i>Caprella equilibra</i> | AY743950 | |
| | <i>Hyalella azteca</i> | AY743944 | |
| | 原足目 Tanaidacea | <i>Leptocheilia</i> sp. WW-2002 | AF496660 |
| | | <i>Cymodoce tattersalli</i> | AF255695 |
| | 等足目 Isopoda | <i>Aega antarctica</i> | AF255689 |
| | | <i>Excorallana quadricornis</i> | AF255688 |
| | | <i>Natantolana albinota</i> | AF255691 |
| | | <i>Typhlocirolana moraguesi</i> | AF255692 |
| <i>Oniscus asellus</i> | | AF255699 | |
| <i>Asellus aquaticus</i> | | AF255701 | |
| <i>Colubotelson thomsoni</i> | | AF255703 | |
| <i>Erichsonella attenuata</i> | | AY743948 | |
| <i>Stenasellus racovitzai</i> | | AF496663 | |
| <i>Lirceus fontinalis</i> | | AF255702 | |
| <i>Proasellus slavus</i> | | AF496662 | |
| 温泉虾目 Thermosbaenacea | | <i>Tethysbaena scabra</i> | AF496664 |
| 鳃足纲 Branchiopoda | <i>Simocephalus serrulatus</i> | AF144216 | |
| | <i>Streptocephalus texanus</i> | AF144217 | |
| | <i>Thamnocephalus platyurus</i> | AF144218 | |
| | <i>Triops longicaudatus</i> | AF144219 | |

2 结果

2.1 碱基组成及序列变异

软甲纲53条18S rRNA 序列经比对并删除部分插入缺失及模糊位点后,用于分析的位点共2494个,其中变异位点1586个,简约信息位点1118个,单变异位点430个。若不包括插入、缺失则共存在变异位点302个,53条序列的平均碱基组成分别为23.8% A, 24.2% T, 27.9% G, 24.1% C。AT与GC百分含量基本相当。

基于 Kimura 2-parameter 模型、自检值1000计算出内群之间平均遗传距离为0.15,而软甲纲的9个目及外群共10个组两两之间的遗传距离见表2。依据不同的目将软甲纲53个物种的18S rRNA 序列分类成9个组,外群鳃足纲的4个物种单独分为1组,从这10个组两两之间的遗传距离(表2)可以看出,口足目与山虾目之间最小为0.043,然后为糠虾目与口足目间0.046,糠虾目与山虾目间0.055,也就是说糠虾目、口足目与山虾目三个目之间遗传分化相对较小;而内群中的端足目、原足目这两个目与其它目之间遗传距离相对较大(0.216~0.323),说明它们之间较深的遗传分化程度;而外群鳃足纲与内群间遗传距离相对不大(0.124~0.273)。

2.2 系统发生关系

从基于 Kimura 2-parameter 模型构建的 NJ 系统发生树(图1)可以看出,软甲纲9个目共53个物种聚成2个较大的分支:第一支首先由十足目、口足目、糠虾目、山虾目和等足目聚集(置信度83%),而后与狭甲目聚成一支(置信度94%);第二支由温泉虾目、原足目和端足目聚成另一支(置信度86%),且各分支的置信度均较高。

NJ 树(图1)及辐射状分布(图2)显示,不包括外群在内的软甲纲9个目分成了两个大支,而各目的所有物种均各自聚在一起形成单独支;口足目、糠虾目和山虾目间的遗传分化较小首先聚集在一起,然后与等足目聚集形成一支(置信度85%);十足目的所有物种聚集在一起形成一支(置信度99%),然后与口足目、糠虾目、山虾目构成的一支聚在一起,两姐妹支形成一大支(置信度83%);此大支与狭甲目的一支再聚在一起构成系统发生树中的第一大支(置信度94%);另一大支中,端足目10个物种聚成一支(置信度100%),然后与原足目和温泉虾目聚在一起构成第二大支(置信度86%),两大支聚在一起与外群一起构成整个系统发生树(置信度100%)。

表2 软甲纲9个目及外群两两之间的遗传距离(对角线下)与标准误差(对角线上)

Table 2 Pairwise genetic distance (below diagonal) and standard error (above diagonal) among orders

| 内群/外群组 Ingroup/Outgroup | 遗传距离/标准误差 Genetic distance/Standard error | | | | | | | | | |
|----------------------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 1 等足目 Isopoda | | 0.011 | 0.011 | 0.010 | 0.012 | 0.015 | 0.021 | 0.018 | 0.021 | 0.016 |
| 2 糠虾目 Mysidacea | 0.091 | | 0.009 | 0.010 | 0.012 | 0.016 | 0.022 | 0.021 | 0.024 | 0.016 |
| 3 口足目 Stomatopoda | 0.096 | 0.046 | | 0.008 | 0.010 | 0.015 | 0.022 | 0.020 | 0.023 | 0.016 |
| 4 山虾目 Anaspidacea | 0.090 | 0.055 | 0.043 | | 0.011 | 0.016 | 0.023 | 0.020 | 0.024 | 0.016 |
| 5 十足目 Decapoda | 0.119 | 0.082 | 0.070 | 0.077 | | 0.013 | 0.022 | 0.017 | 0.021 | 0.014 |
| 6 狭甲目 Leptostraca | 0.161 | 0.135 | 0.132 | 0.135 | 0.120 | | 0.021 | 0.019 | 0.023 | 0.015 |
| 7 端足目 Amphipoda | 0.271 | 0.262 | 0.260 | 0.268 | 0.260 | 0.270 | | 0.025 | 0.026 | 0.022 |
| 8 温泉虾目 Thermosbaenacea | 0.185 | 0.197 | 0.190 | 0.188 | 0.164 | 0.201 | 0.312 | | 0.026 | 0.021 |
| 9 原足目 Tanaidacea | 0.234 | 0.234 | 0.228 | 0.241 | 0.216 | 0.254 | 0.323 | 0.273 | | 0.024 |
| 10 外群 Outgroup | 0.159 | 0.135 | 0.132 | 0.136 | 0.124 | 0.141 | 0.273 | 0.212 | 0.258 | |

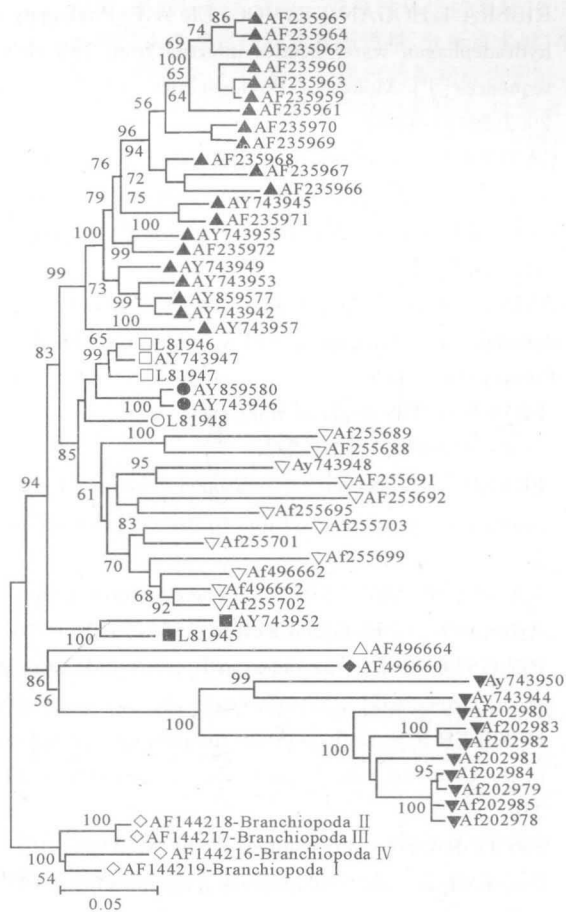


图1 基于 Kimura 2-parameter 构建 NJ 系统发生树

Fig.1 The NJ phylogenetic tree on Kimura 2-parameter

▲:十足目;□:口足目;●:糠虾目;○:山虾目;▽:等足目;■:狭甲目;△:温泉虾目;◆:原足目;▼:端足目;◇:外群。
▲:Decapoda;□:Stomatopoda;●:Mysidacea;○:Anaspidacea;▽:Isopoda;■:Leptostraca;△:Thermosbaenacea;◆:Tanaidacea;▼:Amphipoda;◇:Outgroup.

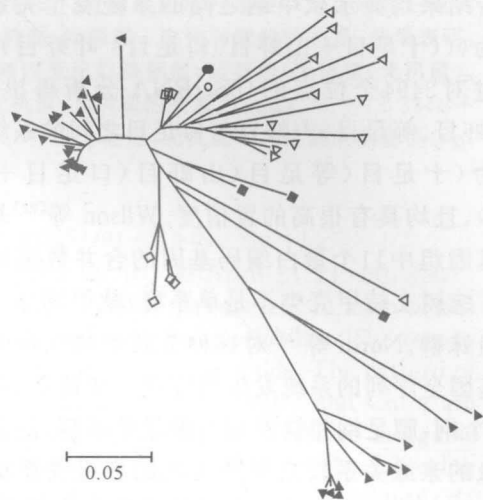


图2 基于 Kimura 2-parameter 构建辐射状系统树

Fig.2 The radiation phylogenetic tree on Kimura 2-parameter

▲:十足目;□:口足目;●:糠虾目;○:山虾目;▽:等足目;■:狭甲目;△:温泉虾目;◆:原足目;▼:端足目;◇:外群。
▲:Decapoda;□:Stomatopoda;●:Mysidacea;○:Anaspidacea;▽:Isopoda;■:Leptostraca;△:Thermosbaenacea;◆:Tanaidacea;▼:Amphipoda;◇:Outgroup.

3 讨论

从软甲纲9个目53个物种的2494位点的变异情况来看,十足目18S rRNA 序列在第54~55位点基本都有固定的碱基 GT,而其它或 AG 或 GA,第100~101也是固定的碱基 GT,而其它基本都是碱基 AT;尤为明显是第1013~1016位点,十足目的 DNA 序列连续4个碱基均表现为 CAGG,端足目 DNA 基本表现为

CAGT,而其它一般表现为TGTC;端足目18S rDNA的固定变异位点更为明显,表现在诸多区域,所有这些变异位点可能为软甲纲的进化问题提供一定的理论基础。

以前提出节肢动物系统发育有4种假说:复系(Polyphyletic)假说^[9~11];二系(Diphyletic)假说^[12~14];有颚(Mandibulate)假说^[15,16];APT假说^[17]。而最近一些学者又提出节肢动物系统发育体系的泛甲壳纲假说及六足类应融合到甲壳类中的观点^[18~21]。吴平等^[3]通过节肢动物18S rRNA序列不同的对位排列、不同的排列方法构建的系统发生树得出节肢动物是一个单系群;而软甲纲中的十足目、山虾目、口足目和叶虾目4个目在选用18S rRNA不同区段进行系统发生分析时出现差异,通过节肢动物18S rRNA不同区段序列分析结果:软甲纲的十足目、山虾目、口足目和叶虾目4个目之间,除环区的最大似然法分析外,所有的分析结果均显示软甲纲之间的系统发生关系完全一致为(((十足目+山虾目)口足目)叶虾目)。而我们对2494个位点的18S rRNA分析得出:十足目、糠虾目、等足目、山虾目与口足目之间的系统发生关系为(十足目(等足目(山虾目(口足目+糠虾目))))),且均具有很高的置信度。Wilson等^[22]基于线粒体基因组中11个蛋白编码基因的合并数据构建的分子系统树支持甲壳类不是单系群,软甲纲是六足动物的姐妹群。Nardi等^[23]对16种节肢动物线粒体蛋白编码基因全序列的系统发生研究进一步证实,甲壳亚门的2个纲:腮足纲和软甲纲不聚成单系群,后者与有翅昆虫的亲缘关系较之于腮足类的亲缘关系更为密切。今后工作有待于对节肢动物甲壳亚门的浆足纲(Remipedia)、头虾纲(Cephalocarida)、鳃足纲、软甲纲、颚足纲(Maxillopoda)5个纲之间的系统发生关系作进一步研究,弄清5个纲的前后进化关系。

节肢动物高级阶元的系统发生关系一直以来是学术界争议的话题,学者们对颚肢亚门的高级阶元的总纲、纲、目是否为单系,以及它们之间的亲缘关系各持不同的观点;甲壳动物到底是不是单系群、软甲纲是不是六足动物的姐妹群以及腮足纲和软甲纲是不是单系群,所有这些问题都有待于进一步的研究。本研究旨在初步研究软甲纲18S rRNA序列变异及探讨软甲纲系统发生关系,为今后进一步弄清软甲纲乃至节肢动物的系统发生关系提供一定的理论依据。

参考文献:

[1] BRUSCA R C, BRUSCA G J. Invertebrates 2thed[M]. Sinauer Associates, Inc Sunderland, 2002: 936.

- [2] MILLER S A, HARLEY J P. Zoology 6 thed [M]. Boston: McGrawHill, 2005: 556.
- [3] 吴平, 张克云, 杨群. 18S rRNA 基因在节肢动物系统进化研究中的意义[J]. 现代地质, 2000, 14(3): 355-362.
- [4] BOURGOIN T, STEFFEN-CAMPBELL J D, CAMPBELL B C. Molecular phylogeny of Fulgoromorpha (Insecta, Hemiptera, Archaeorrhyncha) The enigmatic ettigometridae: Evolutionary affiliations and historical biogeography[J]. Cladistics, 1997, 13: 207-224.
- [5] FLOOK P K, ROWELL C H F. Inferences about orthopteroid phylogeny and molecular evolution from small subunit nuclear ribosomal DNA sequences [J]. Insect Molecular Biology, 1998, 7(2): 163-178.
- [6] MARVALDI A E, SEQUEIRA A S, O'BRIEN C W, et al. Molecular and morphological phylogenetics of weevils (Coleoptera, Curculionidea): do niche shifts accompany diversification [J]. Syst Biol, 2002, 51(5): 761-851.
- [7] RIBERA I, HOGAN J E, VOGLER A P. Phylogeny of hydradephagan water beetles inferred from 18S rRNA sequences [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2002, 23(1): 43-62.
- [8] CATERINO M S, CHO S, SPERLING F A H. The current state of insect molecular systematics: a thriving tower of bated [J]. Annu Rev Entomol, 2000, 45: 531-541.
- [9] ANDERSON D T. Embryology and Phylogeny in Annelids and Arthropods [M]. New York: Pergamon Press, 1973.
- [10] FRYER G. The origin of the Crustacea [J]. Acta Zoologica, 1992, 73: 273-286.
- [11] FRYER G. Reflections on arthropod evolution [J]. Biological Journal of the Linnean Society, 1996, 58: 51-55.
- [12] TIEGS O W, MANTON S M. The evolution of the Arthropoda [J]. Biological Review, 1958, 33: 255-337.
- [13] BERGSTROBM J. The oldest arthropods and the origin of the Crustacea [J]. Acta Zoologica, 1992, 73: 287-291.
- [14] HESSLER R R. Reflections on the phylogenetic position of the Cephalocarida [J]. Acta Zoologica, 1992, 73: 315-316.
- [15] SNODGRASS R M. Evolution of the Annelida, Onychophora and Arthropoda [J]. Smithsonian Misc Collect, 1938, 97: 151-159.
- [16] BRUSCA R C, BRUSCA G J. Invertebrates [M]. Massachusetts: Sinauer, 1990.
- [17] SCHRAM F R, EMERSON M J. Arthropod pattern theory: a new approach to arthropod phylogeny [J]. Memoirs of Queensland Museum, 1991, 31: 1-18.

(下转第422页 Continue on page 422)

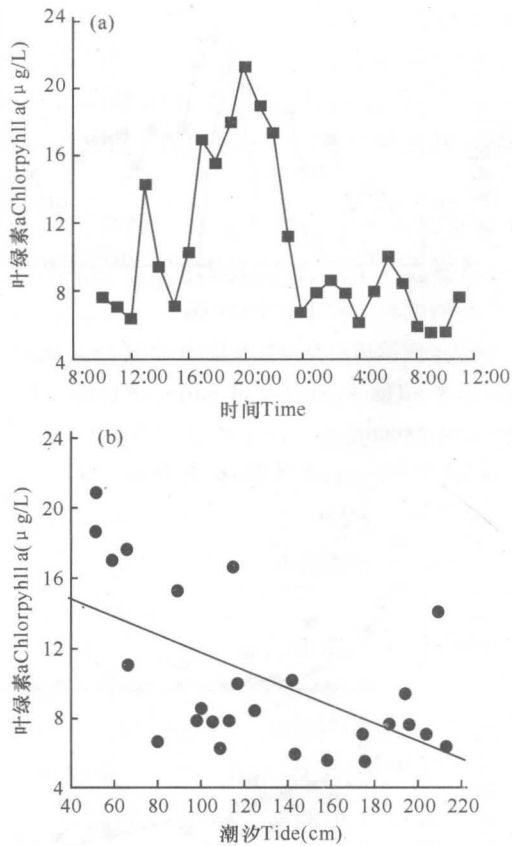


图5 叶绿素 a 的变化(a)及其与潮汐的关系(b)

Fig. 5 (a) Variability of chlorophyll a (Chl a), and (b) the relationship of Chl a and the tide height at the sampling site. 潮汐变化曲相反。无机磷与潮汐相关性 ($r = -0.586, P = 0.00168, n = 26$) 不如无机氮与潮汐相关性显著 ($r = -0.843, P < 0.001, n = 26$), 叶绿素与潮汐相关关系为 ($r = -0.25, P < 0.05$)。

(3) 在涨潮期间, 三亚入海口海水质量达到 I 类

水质标准, 在落潮时段, 三亚河入海口无机氮在 II 水质标准内围内, 无机磷在 III 类水质标准范围内。

(4) 三亚河入海口叶绿素 a 受两种条件影响: 一是受到潮汐作用引起营养盐浓度变化的影响, 从而引起高营养盐, 叶绿素浓度高, 低营养盐, 叶绿素浓度低的现象; 二是受到三亚内河感潮河段高叶绿素 a 的影响, 两者共同影响三亚河口叶绿素 a 的变化。

参考文献:

- [1] 曹振锐, 黄邦钦, 刘媛, 等. 厦门海域分粒级叶绿素 a 含量的分布特征[J]. 台湾海峡, 2005, 24(4): 493.
- [2] 国家海洋局海口海洋环境监测中心站. 三亚湾海滩“泥化”和海岸侵蚀原因及治理对策研究报告[R]. 海口: 国家海洋局海口海洋环境监测中心站, 2005.
- [3] 何雪琴, 温伟英, 何清溪. 海南三亚湾海域水质状况评价[J]. 台湾海峡, 2001, 20(2): 165-170.
- [4] 毛龙江, 张永战, 魏灵, 等. 海南岛三亚湾海滩研究[J]. 第四纪研究, 2006, 26(3): 477-484.
- [5] 国家海洋局海口海洋环境监测中心站. 三亚半岛龙湾海景工程项目海域使用论证报告[R]. 海口: 国家海洋局海口海洋环境监测中心站, 2007.
- [6] 蔡清泉, 马育红. 三亚河: 得天独厚的生态河[N]. 三亚晨报, 2004-08-27.
- [7] 熊辉, 于志刚, 陈洪涛, 等. 鸭绿江口溶解态 P, Si 的地球化学研究[J]. 海洋环境科学, 1999, 18(2): 3.
- [8] 唐永奎. 珠江海域污染物迁移扩散和转化基本规律的探讨[J]. 海洋环境科学, 1983, 2(1): 1-10.

(责任编辑: 邓大玉)

(上接第 418 页 Continue from page 418)

- [18] FRIEDRICH M, TAUTZ D. Ribosomal DNA phylogeny of the major extant arthropod classes and the evolution of myriapods[J]. Nature, 1995, 376(13): 165-167.
- [19] 尹文英, 梁爱萍. 有关节肢动物分类的几个问题[J]. 动物分类学报, 1998, 23(4): 11-16.
- [20] 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.
- [21] GIRIBET G, CARRANZA S, BAGUNA J, et al. First molecular evidence for the existence of a Tardigrada + Arthropoda clade[J]. Mol Biol Evol, 1996, 13: 76-84.
- [22] WILSON K, CAHILL V, BALLMENT E, et al. The

- complete sequence of the mitochondrial genome of the crustacean *Penaeus monodon*: are malacostracan crustaceans more closely related to insects than to branchiopods[J]. Mol Biol Evol, 2000, 17(6): 863-874.
- [23] NARDI F, CARAPELLI A, FANCIULLI P P, et al. The complete mitochondrial DNA sequence of the basal hexapod *Tetradontophora bielensis*: Evidence for heteroplasmy and tRNA translocations [J]. Mol Biol Evol, 2001, 18(7): 1293-1304.

(责任编辑: 邓大玉)