

# 自然科学与 博物馆研究

(第四卷)

NATURAL SCIENCES AND MUSEUMS  
Vol.4

■ 主编 周光召

■ 副主编 程利伟 李承森 刘随臣 孟庆金 王渝生 徐延豪 朱进



高等教育出版社  
Higher Education Press

# 自然科学与 博物馆研究

(第四卷)

NATURAL SCIENCES AND MUSEUMS



高等教育出版社  
Higher Education Press

## 内容简介

本书收录了动物学、植物学、地质学、天文学、博物馆学等领域的原创性研究论文、综述、学科研究进展,以及探索性短文、科学简报等共 23 篇文章。其内容既包括科研院所、大专院校及科普教育等领域的最新科研成果,也有青年科技工作者的创新性、探索性作品,可供国内外自然科学博物馆的研究人员、相关领域的大专院校师生、科研院所的研究人员等参考。

## 图书在版编目(CIP)数据

自然科学与博物馆研究,第4卷/周光召主编. —北京:高等教育出版社,2008.12

ISBN 978-7-04-025347-4

I. 自… II. 周… III. ①自然科学-文集 ②自然历史博物馆-文集 IV. N53 C268.3-53

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 063159 号

策划编辑 高新景 责任编辑 高新景 刘思涵 封面设计 杨立新 责任印制 毛斯路

出版发行	高等教育出版社	购书热线	010-58581118
社 址	北京市西城区德外大街 4 号	免费咨询	800-810-0598
邮政编码	100120	网 址	<a href="http://www.hep.edu.cn">http://www.hep.edu.cn</a>
总 机	010-58581000		<a href="http://www.hep.com.cn">http://www.hep.com.cn</a>
经 销	北京蓝色畅想图书发行有限公司	网上订购	<a href="http://www.landaco.com">http://www.landaco.com</a>
印 刷	北京市联华印刷厂		<a href="http://www.landaco.com.cn">http://www.landaco.com.cn</a>
		畅想教育	<a href="http://www.widedu.com">http://www.widedu.com</a>
开 本	889×1194 1/16	版 次	2008 年 12 月第 1 版
印 张	14	印 次	2008 年 12 月第 1 次印刷
字 数	380 000	定 价	40.00 元
插 页	1		

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

物料号 25347-00

# 目 录

## 动物学

- 甲壳动物分子系统发生学研究概述 ..... 唐伯平 陈立侨(1)
- 中国半尾科复殖吸虫分类学研究进展 ..... 刘 巍 郭 旗 邱兆社 李庆奎(21)
- 四川省九寨沟、白河、黄龙、喇叭河和察青松多自然保护区蝶类资源调查  
..... 李树恒 谢朝光(31)
- 结核疫苗研究进展和未来展望 ..... 贾 浩 张昌盛 徐广贤 张 艳 王玉炳(43)

## 植物学

- 天津大黄堡湿地自然保护区的植被、植物区系和植物资源 ..... [刘家宜](49)
- 中国华北地区黄丝藻属的新记录 ..... 王志学(67)
- 北京奥林匹克公园空气花粉散布规律与气象因素的关系 ..... 徐景光 张德山 张小玲(71)
- 小聚属(小聚科)研究进展 ..... 李业亮 马清温 刘海明 王宇飞(85)
- 藏云山薹草(莎草科)后选模式的指定 ..... 毕海燕 张树仁 赵以民(99)

## 地质学

- 初论我国洞穴资源的开发利用及保护 ..... 许 林(103)
- 关于观赏石分类方案的研究 ..... 高蕊蕊(109)
- 祖母绿、海蓝宝石及绿柱石宝石的特征及加工技法 ..... 吕林素 章西斌 豆沪增(119)

## 天文学

- Radio and X-ray Observation of the Flare on June 13, 2003 ..... 张长森 景海荣(127)
- 南海 ODP1144 孔微玻璃陨石及坑源指示意义 ..... 张 番(137)
- 宇宙学数值模拟在天文馆的可视化研究 ..... 陈冬妮 宋宇莹(143)

## 博物馆学

- 自然博物馆标本信息数字化研究进展 ..... 辨贵松 李迎化(157)
- 最近 15 年日本新建自然史博物馆的展示 ..... 王卫东(165)
- 试论电子杂志与博物馆营销的关系 ..... 李 莹(177)
- 浅谈地方性地质博物馆的建设 ..... 于廷相 海树林 李 萍(183)
- 建设黑龙江省博物馆鱼类展厅的构想 ..... 徐俐力(189)
- 台中科博馆科学传播活动初探 ..... 郑 钰(193)

北京天文馆光学气象台设备选型初探 .....	卢 瑜(203)
充分利用自然博物馆资源的课外活动设计——以探究螺壳的结构与功能为例 .....	刘 菁 董 璐(209)

## 封面说明

### 猎户座大星云

猎户座大星云位于猎户腰带三颗星的南侧,距离地球约 1270 光年,横向跨约 24 光年。它是夜空最亮的星云之一,肉眼可直接看到,用小望远镜能观察其美丽的姿态。在猎户座星云中有许多恒星正在形成,因此该星云被称为恒星的“产房”。

## 甲壳动物分子系统发生学研究概述\*

唐伯平<sup>1</sup> 陈立桥<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 江苏省滩涂生物资源与环境保护重点建设实验室,盐城师范学院,江苏盐城 224002,中国

<sup>2</sup> 华东师范大学生命科学学院,上海 200062,中国

**摘要** 甲壳动物亚门是节肢动物门的一个亚门,呈现生物类群的形态多样性是地球上其他任何动物类群所无法比拟的。然而,其各纲后之间的系统发育关系尚未得到很好的解决。在诸多研究手段中,分子系统发生学正受到日益广泛的关注。本文概述了甲壳动物广义分子系统发生学的研究历史、研究方法、研究成果及其存在的问题,并就甲壳动物分子系统发生学研究的发展方向进行了讨论。

**关键词** 甲壳动物;分子系统发生学;节肢动物

### Summary of Molecular Phylogeny in Crustacea

Tang Boping<sup>1</sup> Chen Liqiao<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Jiangsu Provincial Key Laboratory of Coastal Wetland Bioresources and Environmental Protection, Yancheng Teachers University, Yancheng 224002, China

<sup>2</sup> College of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200062, China

**Abstract** Crustacea is a subphylum of Arthropoda. No group of other animals on the planet exhibits the range of morphological diversity seen among the extent Crustacea. But the phylogeny of the classes or orders of crustacean has not been deciphered completely. In recent years there has been an increasing focus on the molecular phylogenetic means seen as an effective method. Research history, analysis method and existing question as well as the progress and findings in general molecular phylogeny of the creature are briefly reviewed. The discussion of development trends in recent research of molecular phylogeny is also given.

**Key words** Crustacea; molecular phylogeny; Arthropoda

甲壳动物亚门是节肢动物门一个亚门,大多数为水生,以鳃或特化的表皮呼吸;少数种类陆栖,营自由、共栖或寄生生活,分布广泛,栖息于海洋、湖泊、江河、池塘和陆地阴湿的环境,全世界已发现约6.7万余种(Brusca & Brusca, 2002)。常见的甲壳动物有虾、蟹、寄居蟹、虾蛄、肉虫、丰年虫、哲水蚤、海萤、藤壶、涟虫、鼠妇、麦杆虫和磷虾等。关于甲壳动物的分类地位一直存在争议,这些年

第一作者简介 唐伯平,男,1964年生,教授,理学博士,主要从事甲壳动物分类学及其分子系统发生学研究。

\* 江苏省高校“青蓝工程”培养基金,江苏省高校自然科学基金(05KJ1180145; 07KJ118017),国家自然科学基金(30510218)资助。

收稿日期:2007年8月1日,改回日期:2008年7月24日。

对这一问题的研究正日益受到更多的关注。在甲壳动物系统学研究中,分子生物学手段的应用日益普及,并极大提高了研究精度与效率。

甲壳动物分子系统发生学,主要利用甲壳动物不同物种的分子生物学特征,来定量描述和解释甲壳动物的多样性、系统发育及其进化关系。它通常利用分子生物学信息来探讨,构建甲壳动物各生物类群的谱系发生,是一门交叉性很强的学科。分子生物学是从分子水平研究生命本质的一门科学,以生物大分子的结构及其在遗传信息和细胞信息传递中的作用为研究对象。根据分子标记的选择和研究方法的不同,甲壳动物分子系统发生学大概可以分为广义分子系统发生学和狭义分子系统发生学。前者的研究包括3个层次,即染色体层次、蛋白质层次和核酸层次。在染色体水平上对动物进行系统发生学研究,主要是通过染色体的核型和带型特征的数据来研究物种的系统关系,由于染色体的最重要成分和主要成分都是DNA,可把它划到广义的分子系统发生学研究范围中。狭义分子系统发生学主要以核酸为研究对象,目前以DNA层次的研究最为热门,也最为有效。

## 1 染色体层次

染色体主要由DNA、组蛋白和非组蛋白构成,是遗传信息的载体,因此它的多少及其组成变化也就反映了该物种在进化信息上的变化。这种变化主要体现在核型和带型上。与DNA序列相比其带有很强的宏观性,所以用染色体的遗传信息可以进行较大分类阶元的系统学研究。

从Carnoy(1885)首次报道褐虾(*Crangon cutapraotn*)和普通滨蟹(*Carcinus manus*)的染色体以来,甲壳动物染色体的研究已有一个多世纪。已报道的种类大多为十足类虾、蟹的染色体,并且主要集中在一些有较高经济价值的种类上。由于甲壳动物染色体数目较多,二倍体的染色体数目在64~376条之间,有时染色体的体积小,一般不超过4 $\mu$ m。其中有些种类的染色体数目变化又大,如欧洲螯虾(*Homarus gammarus*)染色体数的变化数可以达到44条之多(Hughes, 1982)。有时,同一物种的染色体数在不同的实验室会出现不同的结果,如日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*),驹形伸之(1989)的结果是114条,而邱高峰等(1994)的结果为104条;美洲螯龙虾(*Homarus americanus*),Roberts(1969)的结果是138条,但是Hughes(1982)却得出了110条染色体的结论。关于性染色体,由于正常染色体本身就很很小,即使存在有异型性染色体,如果在方法学上没有大的改进突破,也几乎不可能发现它。当然,Niyama(1934)报道过方蟹科Grapsidae 7种,铠甲虾科Galatheidae 1种和异尾类Anomura 1种中的性染色体。

Coluccia等(2004)研究了挪威海螯虾(*Nephrops norvegicus*)、美洲螯龙虾(*Homarus americanus*)和两种欧龙虾(*Palinurus elephas*和*P. mauritanicus*)的B染色体,发现它们在减数分裂时不遵守孟德尔遗传规律。绝大多数种类的B染色体都非常小,但在挪威海螯虾中却发现了非常大的B染色体。Coluccia等(2006)还通过荧光原位杂交和色素染色和银染技术,研究了大象欧龙虾(*Palinurus elephas*)的核仁组织器的特点。

宓亿斌(1987)依据7科22种虾类染色体的资料,提出了虾类染色体倍数性进化的理论,认为染色体数目越少的核型在演化上越原始。根据这一理论,虾类被划分为3组:(1)2n组,二倍体染色体数为70~90;(2)4n组,二倍体染色体数为140~180;(3)8n组,二倍体染色体数为280~360。他们认为染色体数目少的核型为较原始的核型。当然,由于核型的资料尚不丰富以及技术上的一些原因,这一理论还需要进一步研究和证实。

可以预见,如果染色体技术有了进一步的突破,如染色体的核型和带型研究,以及B染色体的研究更加方便和精确,那么其研究成果将会为甲壳动物系统发生学的研究增添令人鼓舞的新材料。

## 2 蛋白质层次

在蛋白质层次对甲壳动物的系统发生学研究,主要指利用同工酶(isozyme)和等位酶(allozyme)等技术,对不同甲壳动物类群的系统发生学进行研究。酶是基因编码的产物,它在电场中迁移率的改变,反映了酶蛋白的大小构型和肽链氨基酸的序列变化,即DNA编码顺序上的变化,所以可通过分析酶谱的变化来获得我们所需要的遗传信息。在酶谱分析中,等位酶是常用的分析工具。等位酶是“等位基因酶”的简称,是从同工酶中派生出来的,它与同工酶既有区别又有联系。同工酶是催化同一生化反应、但在电场中的运动性质有所不同的同种酶的不同表现形式,这是由于构成蛋白质亚基的氨基酸组成和顺序有所不同而造成的。这一概念是广义的,它包括不同基因座位和同一基因座位的不同等位基因所编码的同一种酶,以及转录后酶变体的所有电泳后的表现型,有时同工酶的含义仅指由不同基因座位所编码的同一种酶的不同形式。由于多数酶的不同形式是共显性的,一个基因座位上一个或多个等位基因是能表达的,它们所编码的多肽链在凝胶上作为酶基因的表现型都能显示出谱带而可见,因此可将它们作为遗传学研究对象。

酶电泳方法可以在相对短的时间内检测出大量样本中许多座位上的遗传变异,在种群水平上检测遗传变异快速有效、方便节省。但它的缺点是需要新鲜的实验材料或较低温度保存(至少 $-25^{\circ}\text{C}$ )的材料;同时可利用的遗传位点数量较少,只能检测编码酶蛋白的基因位点,对非编码基因的变异则无能为力;同时,密码子同义突变的广泛存在使之无法检测全部的DNA变异,因而低估遗传变异水平,而且等位基因位点易受选择压力的影响,进一步降低了它用于估计遗传变异的精确性,因而用等位酶数据实现系统发育重建的说服力相对较弱。

同工酶一般都具有组织特异性,如余红卫等(2005)研究了三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)雌性成体心脏、鳃、肌肉、眼睛、肝胰腺和卵巢6种组织中的10种同工酶(ADH、MDH、ME、LDH、 $\alpha$ -AMY、GDH、SOD、DH、EST和GOT)的分化表达模式,并对各种酶的同工酶位点表达及酶谱表现进行了分析,结果显示三疣梭子蟹的同工酶系统具有明显的组织特异性。高天翔等(2005)利用水平电泳方法对方蟹亚科的粗腿厚纹蟹(*Pachygrapsus crassipes*)、弓蟹亚科的日本绒螯蟹(*Eriochier japonica*)、中华绒螯蟹(*E. japonica sinensis*)、肉球近方蟹(*Hemigrapsus sanguineus*)、绒螯近方蟹(*H. penicillatus*)、平背蜞(*Gaeticus depressus*)及斜纹蟹亚科的齿突斜纹蟹(*Plagusia dentipes*)的9种同工酶、12个位点进行了检测,并进行遗传分析,发现弓蟹亚科与方蟹亚科的遗传关系较近,而斜纹蟹亚科与其较远。Burton等(1979,1981)以同工酶对美国加州沿岸的猛水蚤属(*Tigriopus californicus*)的遗传结构和遗传分化进行了研究。随后,Bucklin和Marcus等(1985)以4个酶5个位点分析了美国西海岸夏蝉角水蚤(*Labidocera aestiva*)的种群遗传分化,证明其存在高的遗传变异水平和遗传分化,认为地理隔离、生活史差异和所受选择的不同,可能是遗传分化产生的原因。Kamii和Wishner(1996)对缅因湾飞马哲水蚤(*Calanus finmarchicus*)的种群结构进行了研究,以等位酶分析其遗传相似性,其结果同mtDNA的16S rRNA、Cytb的RFLP结果基本一致。Horii等(2001)研究了日本大眼蟹属(*Macrophthalmus*)7个种(8个种群)以及凹指招潮蟹(*Uca vocans*)和角眼沙蟹(*Ocyropsis ceratophthalma*)14个等位酶的17个位点。发现大眼蟹属的种之间的遗传关系完全不同于由形态特征得到的遗传关系,通过UPGMA树可以看出大眼蟹亚属为多系类群(图1)。



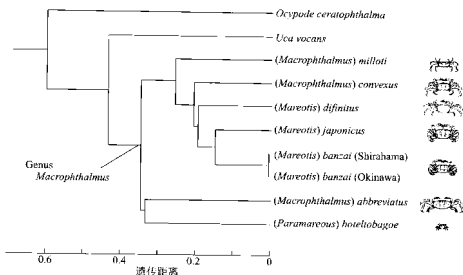


图1 基于等位酶 Nei 遗传距离的日本 7 种大眼蟹与 1 种沙蟹及 1 种招潮蟹的 UPGMA 系统关系图 (仿 Horii 等, 2001)

Fig. 1 UPGMA dendrogram of seven species of Japanese sentinel crabs and two ocyropodine species based on Nei's genetic distance. (from Horii *et al.*, 2001)

### 3 核酸层次

根据核酸 (DNA 和 RNA) 结构进行分子系统发生学研究开始于 20 世纪 70 年代, 最早是测定基因组大小 [(G + C) % 含量] 和基因组 DNA - DNA (RNA) 杂交等。1979 年 RFLP 开始应用于分子系统发生学研究, 成为 80 年代研究的热点。1985 年 PCR 技术的出现扩展了分子系统发生学的研究方法和对象。90 年代以来形成的 RAPD、AFLP、微卫星和小卫星 DNA 的 DNA 指纹及 DNA 序列分析技术等, 已成为目前分子系统发生学的主要研究方法。

#### 3.1 限制片段长度多态

限制片段长度多态技术 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 是 20 世纪 80 年代发展起来的一种 DNA 多态分析技术。DNA 经限制性内切酶 (restriction enzyme) 酶解后, 产生若干不同长度的小片段, 其数目和每一片段长度反映了 DNA 限制性位点 (restriction site) 的分布。由于不同来源的 DNA 具有不同的限制性酶切位点的分布, 每一种 DNA 限制性酶组合所产生的片段是特异的, 从而产生多态性, 所以它能作为某一 DNA 的特有指纹。这些不同的片段经琼脂糖电泳分离, 印迹转移 (southern transfer) 至硝酸纤维素滤膜或尼龙膜上, 然后用一放射性同位素标记的特定 DNA 克隆探针 (probe) 杂交; 放射自显影后, 杂交带便能在 X 光胶片上清晰地显示出来。当然也可直接用电泳方法把相关的 DNA 片段检测出来。若样品间 DNA 有差异, 则可产生不同长度的酶切片段, 显示出不同的杂交带型, 这种差异就是 RFLP。用 RFLP 构建出多态性图谱, 进行系统进化和亲缘关系的分析。

RFLP 分析数据多态性信息量大, 结果稳定可靠、重复性好, 不受环境及物种发育阶段影响, 呈孟德尔遗传, 可以有效区分纯合子和杂合子, 而且非等位的 RFLP 标记不存在上位效应, 只要有探针就可检测出不同物种或个体的同源 DNA 分子的 RFLP, 对于物种间亲缘关系的研究特别有用。

但 RFLP 技术对样品纯度要求较高,当样品很少时,要结合应用 PCR 扩增。探针的制备很费功夫,标准方法必须先构建 cDNA 文库并筛选出可用作探针的 DNA 序列,技术路线复杂,而且杂交中存在放射性安全问题。另外,它无法检测靶序列中的重复序列区,多态性检测水平过分依赖于所选用的限制性酶的种类和数目,由于不同的酶切识别位点的进化速率不同,因而对于不同的进化靶序列,如果选择不当就会导致分析结果出现偏差。

目前在分子系统发生学中用于 RFLP 分析的靶序列,主要是基因组 DNA 和线粒体 DNA (mtDNA)。它们的 DNA 的 RFLP 分析,主要是通过 PCR 技术与 PCR 技术相结合 (PCR-RFLP) 对某一段具有进化意义的基因进行系统发生学研究。如李锋等 (2005) 运用 PCR-RFLP 技术分析凡纳对虾 (*Litopenaeus vannamei*) (又称南美白对虾) 两个引进亲本群体及其各自子一代的遗传变异情况;用一对引物对这四个群体进行 mtDNA 细胞色素氧化酶 I 部分片段的 PCR 扩增,扩增结果为一条约 1.25 kb 的条带;用 19 种限制性内切酶对该扩增条带进行酶切分析,其中 *Hinf*I, *Sty*I, *Taq*I 这 3 种酶有酶切位点;用这 3 种酶进行限制性片段长度多态性分析,共获得 2 种限制性类型 (基因型);而且内切酶 *Sty*I 在两个不同的引进亲本群体及其各自的子一代的扩增产物的酶切中,表现出明显的差异。

### 3.2 卫星 DNA 指纹图谱技术

在真核生物的染色体基因组中,普遍分布着一些高度重复序列。这种区域复性速度快,主要由各种重复序列所组成。它们在氯化铯密度梯度离心中,会以小峰的形式出现在主峰的旁边,而被称为卫星 DNA。而原核生物 DNA 在同样的实验条件下,则不出现这样的卫星条带 (吴乃虎, 2001; 杨岐生, 2004)。这些卫星 DNA 是由一系列串联重复序列构成。同一家族的卫星 DNA 的核心序列是相似的,用这种核心序列制成的 DNA 探针,与被限制性内切酶消化的基因组 DNA 在适当的条件下杂交,便可探测出卫星位点由于重复单位数目差异而产生的多态性,所获得的分子杂交图便是 DNA 指纹图谱。通过对图谱的统计分析,就可明确动物个体间和群体间的遗传关系。

高度重复序列可以分为卫星 DNA, 也称简单重复序列, 小卫星 DNA 和微卫星 DNA。小卫星和微卫星 DNA 一般分布在常染色体中, 而卫星 DNA 一般分布在异染色体中。在甲壳动物分子系统发生学中用得最多的是小卫星和微卫星 DNA。

一般微卫星序列是指由 1~6 bp (也有认为是 2~5 bp) 重复单位组成的重复序列, 小卫星 DNA 是指由 7~100 bp 左右的重复单位组成的重复序列。其中小卫星序列, 由于其串联重复单位的数目在不同个体基因组的的不同位点上都不相同, 被称为同向重复序列可变数 (variable number tandem repeats, VNTRs) (Nakamura *et al.*, 1987)。这些小卫星序列不仅大量散在分布于真核生物的基因组中, 也大量存在于许多原核生物的基因组中 (杨岐生, 2004; Klevytska *et al.*, 2001; van Belkum *et al.*, 1997; van Belkum *et al.*, 1998)。关于微卫星 DNA, Tautz 和 Renz 发现这种短重复序列是真核生物独有的, 并称为“简单重复序列” (simple sequence repeat, SSR)。后来, Litt 等在心肌肌动蛋白的基因内扩增了一种二核苷酸重复序列, 首先使用了“微卫星” (microsatellite, MS) 这个名称, 它有时又被称为短小串联重复序列 (short tandem repeats, STRs)。它是一种可遗传的、不稳定的, 并且具有高度多态性的短核苷酸重复序列, 其核苷酸串联重复的拷贝数随着世代的传递而不断扩大 (expansion) 和扩增 (amplification)。微卫星 DNA 具有种类多、分布广和高度多态性等特点, 并按孟德尔共显性方式在生物中世代相传。Skinner 等 (1984) 在寄居蟹中识别的卫星 DNA 重复序列是 (TAGG)<sub>n</sub> / (ATCC)<sub>n</sub>, 即微卫星 DNA。在甲壳动物分子系统发生学研究中, 大多数都采用微卫星 DNA 的方法。如运用微卫星 DNA 技术, 以中国明对虾 (*Penaeus chinensis*) 渤海湾群体 (BH)、辽东湾群体 (LD) 和海州湾群体 (HZ) 的 3 个野生群共计 60 个个体为实验材料, 进行了 7 个基因位点的遗传参数分析, 经过 UPGMA 聚类, 发现渤海湾群体 (BH) 和辽东湾群体 (LD) 的亲缘关

系较近,而海州湾群体(HZ)与前两者亲缘关系较远(图2)。以此探讨中国明对虾的种质资源状况,可为该种质资源的可持续利用和群体划分提供理论参考(刘萍等,2004)。

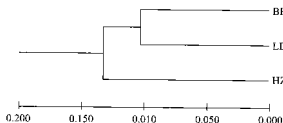


图2 3个中国明对虾野生群体的UPGMA图(仿刘萍等,2004)

Fig.2 UPGMA dendrogram among three wild *Fenneropenaeus chinensis* populations (from Liu *et al.*, 2004)

高煥和孔杰(2005)通过对中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)基因组随机DNA片段的测序,获得了总长度为64 1000个碱基的基因组DNA序列,从中共找到1 720个重复序列。其中,小卫星序列的数目为398个,占重复序列总数目的23.14%。基因组中的小卫星序列整体上是富含A+T的重复序列。

### 3.3 随机扩增多态性DNA

Williams等(1990)在PCR的基础之上,分别提出了另一种DNA多态性检测技术,命名为随机扩增多态性DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)。RAPD技术是20世纪90年代发展起来的,建立在PCR技术基础上的一种分子标记手段。它利用一系列不同随机排列的10个碱基组成的寡核苷酸单链为引物,以生物的基因组DNA为模板进行PCR(与常规PCR相比,退火温度较低,一般为36℃)扩增。当模板上有引物的结合位点,并且一定范围内有与引物互补的反向重复序列时,此范围内的DNA片段就可以被扩增出来,RAPD带的多态性是由引物与模板的结合位点数及可扩增区域片段的长度决定的,基因组的遗传变异通过琼脂糖凝胶电泳检测RAPD产物的多态性获得。RAPD分析可在所有生物的基因组中进行,所需模板量少,由于是低温退火,在一定程度上提高了检出分辨率,能够方便、快速地检出不同个体间的遗传差异。增加引物种类数还可以增加遗传变异检出率。它能检出RFLP技术所不能检出的重复顺序区;事先未知研究对象任何遗传背景,亦可提供大量位点上的非细节信息。另外,实验程序简单灵敏,安全快速,花费不高,具有良好的可操作性和实用性。但是,RAPD标记为显性标记,不能有效地鉴定出杂合了,结果导致分析中的序列同源假设(长度相等的扩增片段视为同源性片段)可能会高估不同样本间的亲缘关系。此外,RAPD还极易受反应条件的影响,不同实验室和不同实验条件下的结果不一致,而且RAPD的单带有可能是多个分子的混合物。这是目前RAPD技术在应用上存在争议的原因。

高志千和周开亚(1998)用31个可重复性好的随机引物对中华绒螯蟹(*Eriocheir japonica sinensis*)的辽河、瓯江和长江种群进行了RAPD分析,121个扩增片段中有27个多态片段。遗传距离指数(*D*)表明,中华绒螯蟹种内遗传变异较低( $D = 0.004 - 0.063$ );并给出了不同种群的关系图,在各种种群间的UPGMA树和NJ树中,瓯江种群和辽河种群先聚在一起,然后再与长江种群聚类,但瓯江种群和辽河种群位置有所不同(图3)。在UPGMA树(图3A)中,瓯江种群与长江种群关系较近,而在NJ树(图3B)中,辽河种群与长江种群关系较近,这提示人类经济活动可能已使这2个种群发生了基因交流。周开亚和高志千(1999)用200个随机引物对中华绒螯蟹辽河种群、长

江种群和瓯江种群进行了 RAPD 遗传标记鉴别研究,发现引物 HX01 和 HX02 检测到瓯江种群和辽河种群所有样品共有的 HX01-0.4 和 HX02-0.7 扩增片段,从而可作为长江种群的鉴别标记。用上述标记检查一些人工养殖的河蟹后,发现一些苗种场的蟹苗种质严重混杂。

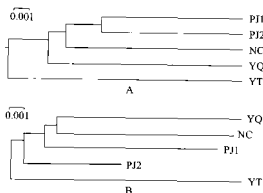


图3 根据遗传距离得到的中华绒螯蟹 (*E. japonica sinensis*) 种群间聚类图: A. UPGMA 树; B. NJ 树 (YQ、NC 分别为乐清、宁城的瓯江种群; PJ1、PJ2 为辽河种群; YT 为长江种群) (仿高志丁和周开亚, 1998)

Fig. 3 Dendrograms of the populations of *Eriocheir japonica sinensis* based on the genetic distance matrix with UPGMA (A) and NJ (B) method (from Gao and Zhou, 1998)

马春艳等 (2004) 采用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术对取自辽东湾、渤海湾、海州湾、乳山湾及海洋岛的中国明对虾 5 个群体共 95 个个体的遗传多样性进行分析。14 个随机引物共检测到 103 个位点 (200~2 500 bp), 各群体的多态位点比例在 31.07%~34.95% 之间。遗传距离显示中国明对虾群体间有一定遗传分化, 其中辽东湾和乳山湾群体间的遗传距离最大 (0.0742), 辽东湾和渤海湾群体间的遗传距离最小 (0.0243)。此结果表明, 由于地理位置和生活海区的营养和物理状况等原因, 5 个中国明对虾群体之间有不同程度的遗传分化。Garcia 等 (1994) 采用同工酶电泳和 RAPD 技术检测美洲白对虾 (*Penaeus vannamei*) 的一个野生种群的多态位点, 研究了斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 的遗传变异, 并讨论了此技术在对虾选育中的应用前景。Wilson 等 (1997) 以 RAPD 技术检查了端足目中的 *Corophtheirus salmonis* 在海洋环境中的遗传隔离情况, 发现环境选择压力的变化对该种群的遗传分化起重要的作用。

### 3.4 扩增片段长度多态

扩增片段长度多态 (amplified fragment length polymorphism, AFLP) 技术于 1993 年获得欧洲专利局专利 (Zabeau 等, 1992), 并被首先运用到植物分子生物学研究中。因其快速、高效、简便, 且实验结果稳定可靠、易于标准化, 已被推广到遗传多样性和系统发生等诸多生物学研究领域。AFLP 是建立在 RFLP 基础上的选择性 PCR, 其原理是将 DNA 进行限制性酶切, 再将特定的接头连接在酶切片段的末端, 形成一个带接头的特异性片段, 以此为模板, 以接头序列和限制性内切酶的切点序列为基础设计引物, 进行 PCR 扩增。AFLP 分析主要包括三个步骤: (1) DNA 酶切及人工接头的联接; (2) 预扩增和选择性扩增; (3) 产物聚丙烯酰胺变性凝胶电泳检测。AFLP 引物包括与人工接头互补的核心序列、限制性内切酶识别序列和 3' 端选择性碱基三部分。一般用不带或带 1 个选择性碱基的引物进行预扩增, 然后用带 2~3 个选择性碱基的引物进行再扩增。所用引物可用放射性或荧光标记。

AFLP 技术既有 RAPD 技术的多态性,又有 RFLP 技术的稳定性和可靠性,灵敏度高。它所检测的多态性,是酶切位点的变化或酶切片段间 DNA 序列的变异,本质上与 RFLP 一致。不过,它可以通过控制引物随机核苷酸的种类和数目,来控制选择不同的 DNA 片段及扩增片段的数目。AFLP 能检测到大量的基因位点,选用不同的引物组合能够检出亲缘关系很近的品种的 DNA 样品间极细微的差别;PAGE 胶的应用加强了它的灵敏性。AFLP 标记,在后代的遗传和分离中,遵守孟德尔定律;种群中的 AFLP 标记位点,遵循 Hardy-Weinberg 平衡。对于较复杂的基因组,还可以通过两步扩增法,来提高指纹图谱的特异性和清晰度。但是,基因组的不完全酶切会影响实验结果,所以对内切酶的质量要求较高;同时由于 AFLP 标记是显性标记,其多态的统计是基于酶切片段的有或无,因而没有足够的信息能将纯合显性个体与杂合个体相分离;又由于它的显性性质,使其对等位基因的频数信息分析难以得到准确的估计,这就妨碍了该方法对某些种群遗传分析的应用。

Moore 等(1999)利用蚌类全同胞家系 246 个多态性的 AFLP 标记,构建了具有 44 个连锁群的日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*) AFLP 图谱,这是甲壳动物中首次报道的连锁图谱。该遗传连锁图谱的构建工作在 2003 年又有了新的进展,Li 等(2003)分别构建了 43 个连锁群的日本囊对虾父本和 31 个连锁群的母本 AFLP 分子标记遗传连锁图谱。尤其值得一提的是,首次将性别相关的分子标记定位到雌性日本囊对虾的遗传连锁图谱。阮肖对虾(*Penaeus monodon*)连锁图谱包括了 116 个 AFLP 标记,包含了 20 个连锁群,覆盖了 1412 cM 的遗传距离(Wilson et al., 2002)。作为我国北方重要海水养殖品种的中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*),其 AFLP 分子标记遗传连锁图谱构建最近也取得了进展,岳志萍等(2004;2005)获得了中国明对虾低密度的遗传连锁图谱,其中父本 74 个分子标记,25 个连锁群;母本 66 个分子标记,22 个连锁群。利用 AFLP 技术对选育的中国明对虾抗白斑病毒群体进行的遗传分析实验表明,AFLP 技术灵敏度高、信息量大,适用于分析亲缘关系较近的个体,或品系的系统发生学特征。

### 3.5 核酸序列

核酸的序列是指通过测定核酸序列来比较同源分子之间相互关系的方法。比较不同类群个体的同源核苷酸序列,据此建立分子系统发育树,并推断类群间的演化关系,是目前分子进化和系统发育研究的热点。核酸序列分析可以保证某一区段每个核苷酸位置上出现的变异都被发现。现有研究结果表明,由于各种基因的选择压力不同,每个基因均能以其自身特有的平均进化速率进行演化。不同基因间的进化速率不同,同一基因不同区段的核苷酸的保守程度也不一样,这种保守性与编码蛋白质或核酸的二级结构有关。这样,不同基因便可用于不同水平的系统发育研究;快速进化的基因或核苷酸区段适合于种内或近缘种的系统发育分析;慢速进化的基因适合于远缘种类或高级阶元的系统发育。

基于核酸序列信息进行的甲壳动物分子系统发生学研究中,一般可以分为两个层面:基于核酸一级结构信息的分子系统发生学研究,以及基于核酸二级结构信息的分子系统发生学研究。

#### 3.5.1 基于核酸一级结构信息的甲壳动物分子系统发生学研究

在甲壳动物分子系统发生学研究中,核酸(主要是 DNA)的一级结构的信息是目前使用频数最多的。它一般分为两大类,即核 DNA 信息和线粒体 DNA 信息。

##### 3.5.1.1 基于核基因信息的甲壳动物分子系统发生学研究

最早使用 DNA 序列信息进行甲壳动物系统发生学研究的是 L. C. Abele 和 T. Spears 实验室。他们早期工作中较为突出的是,1992 年利用短尾类核 18S rRNA 和 DNA 的信息,构建了短尾类的系统关系图(图 4),结果表明:(1) 蛄蟹科是短尾类的下类;(2) 缩蟹应该从短尾类中移走;(3) 绵

蟹科和尖口蟹派可能不是单系类群；(4) 18S 的序列变化(平均每 5 万年的取代率为 1%) 不足以解决在后白垩纪发生分歧的短尾类内部的亲缘关系；(5) 基于 18S 核糖体的碱基序列得出的短尾类系统关系, 和精子的超微结构结果和幼体发育的研究结果相一致, 但是不同于成体形态学的研究结果。Spears 和 Aeble 于 1997 年通过 13 类 23 个种甲壳动物的 18S rDNA 序列构建了它们的系统关系, 这是非常有意义的工作。

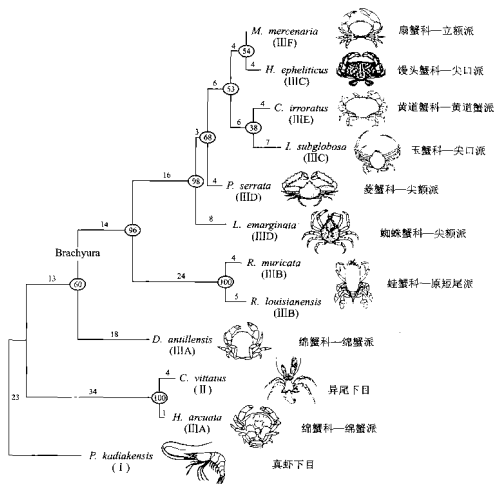


图 4 据 18S rDNA 信息得到的虾蟹类 12 个分类单元的系统关系图(仿 Spears 等, 1992)

Fig. 4 The inferred relationships of the podotrematous Brachyurans (12 units) based on analysis of 18S rDNA (from Spears et al., 1992)

表 1 列出了甲壳动物的分子系统发生学研究中常用的基因。一般说来, 核基因中常用的有 18S rDNA、28S rDNA、EF-1 (eEF-1)、EF-2 (eEF-2)、组蛋白 H3、ITS1、ITS2、ITS、RNA 聚合酶 II (Pol II)、U2 snRNA 等; 在线粒体中常用的有 COI、COII、COIII、NADH、12S rDNA、16S rDNA 和线粒体的全序列。实际研究中, 根据每次的研究对象和研究目标的不同, 一次可以用一个基因, 也可以同时用几个基因; 一次可单独使用一类(如线粒体)基因, 也可同时使用两类(如线粒体和核)基因。

表1 甲壳动物系统学研究中常用基因及部分已研究类群

Table 1 List of genes applied frequently to study of crustacean systematics

目标基因	研究类群	年份	作者	
18S rDNA	Decapoda	1996	Kim & Abele	
	Decapoda	2005	Porter <i>et al.</i>	
	Brachyura	1992	Spears <i>et al.</i>	
	Most crustacean groups	1997	Spears & Abele	
	Most crustacean groups	1999	Spears & Abele	
	Branchiopoda	2000	Harris <i>et al.</i>	
	Isopoda	2001	Mattern & Schlegel	
	Branchiopoda	2000	Spears & Abele	
	Asacidea	2000	Crandall <i>et al.</i>	
	Decapoda	2004	Ahyong & O' Meally	
	Decapoda	2005	Porter <i>et al.</i>	
	Maxillopoda	1992	Abele <i>et al.</i>	
	Brachyura	1992	Spears <i>et al.</i>	
	Crustacea	1993	Wheeler <i>et al.</i>	
	Thecostraca	1994	Spears <i>et al.</i>	
	Thecostraca	2000	Perl - Treves <i>et al.</i>	
	28S rDNA	Anostraca Branchiopoda	2000	Remigio & Hebert
		Decapoda	2005	Porter <i>et al.</i>
		Decapoda	2004	Ahyong & Q' Meally
Decapoda		2005	Porter <i>et al.</i>	
Malacostraca		2000	Jarman <i>et al.</i>	
Isopods		2001	Mattern & Schlegel	
Copepoda		1999	Brage <i>et al.</i>	
Asacidea		2000	Crandall <i>et al.</i>	
EF-1		Many crustacean groups	2001	Giribet <i>et al.</i>
		Maxillopoda	2004	Sotka <i>et al.</i>
	Malacostraca	2000	Shultz & Regier	
EF-2	Branchiopoda	1991	Zamboni	
	Many crustacean groups	2001	Regier & Schultz	
Histone H3	Many crustacean groups	2000	Edgecomb <i>et al.</i>	
	Decapoda	2005	Porter <i>et al.</i>	
	Many crustacean groups	2001	Giribet <i>et al.</i>	
ITS1	Decapoda	2000	Harris & Crandall	
	Brachyura	2003	Tang <i>et al.</i>	
	Ostracoda	2001	Gandolfi <i>et al.</i>	
ITS2	Isopoda	1999	Rigaud	
	Decapoda	2000	Harris & Crandall	
	Copepoda	2001	Rocha-Olivares <i>et al.</i>	
ITS	Malacostraca	2003	Weinberg <i>et al.</i>	
	Brachyura	2003	Tang <i>et al.</i>	
Pol II	Actinopods	2000	Shultz & Regier	
	U2 snRNA	Many crustacean groups	1998	Colgan <i>et al.</i>
Many crustacean groups		2000	Edgecombe <i>et al.</i>	

		续表		
目标基因	研究类群	年份	作者	
线粒体 DNA	Mitochondrial genome	Decapoda	2006	Miller & Austin
		Malacostraca	2000	Wilson <i>et al.</i>
	Mitochondrial gene rearrangements	Anomura	1999	Morrison & Cunningham
		Brachyura	2003	Yang <i>et al.</i>
	COI	Penaeoidea	2004	Quan <i>et al.</i>
		Pinnotheridae	2004	Harrison
		Astacoidea	2005	Trontelja <i>et al.</i>
		Isopoda	2002	Wetzer
	COII	Amphigoda	2005	Davolos & Maclean
		Anomura	2004	Perez-Losada <i>et al.</i>
	COIII	Decapoda	1999	Lavrov
	NADH	Cephalocarida Branchiara	2004	Lavrov
		Remipedia		
	12S rDNA	Branchiopoda	1994	Weider & Hoback
		Ocypodidae	1998	Kitaura <i>et al.</i>
		Branchiopoda	1997	Hanner & Fugate
		Isopoda	2002	Wetzer
		Cladocera	2001	Richer <i>et al.</i>
		Cladocera	1998	Schwenk <i>et al.</i>
	16S rDNA	Copepoda	1999	Bragu <i>et al.</i>
Anostraca Branchiopoda		2000	Remigio & Hebert	
Astaeidea		2000	Crandall <i>et al.</i>	
Crustaceans		2000	Schubart <i>et al.</i>	
Ocypodidae		1998	Kitaura <i>et al.</i>	
Nephtyidae		1998	Tan & Kornfeld	
Isopoda		2002	Wetzer	
Reptantia		2004	Ahyong & O' Meally	
Decapoda		2005	Porter <i>et al.</i>	
Decapoda		2005	Porter <i>et al.</i>	
Decapoda		2002	Kitaura <i>et al.</i>	

较为保守的序列多用在较高分类单元的系统发生学研究中,如 Crandall 等(2000)通过 18S rDNA 和 28S rDNA 以及 16S rDNA 研究了淡水螯虾的起源问题,最终认为淡水螯虾是单系起源;螯虾总科(Astacoidea)和拟螯虾总科(Parastacoidea)也是单系起源(图 5)。Jarman 等(2000)研究了软甲亚纲(Eumalacostraca)的 28S rRNA 基因的进化并以该基因建立了软甲亚纲内新的进化系统,表明磷虾目(Euphausiacea)与糠虾目(Mysida)关系最近,而不是通常认为的与十足目(Decapoda)最近,疣背糠虾目(Lophogastrida)与疣背糠虾目不为姊妹目,而真虾总目(Eucarida)、糠虾目和囊虾总目亦不为单系分类单元。

在核 DNA 中也有变异速度较快的基因,如核糖体内转录间隔区(ITS),真核生物的 rRNA 基因以串联重复方式存在,其中 18S、5.8S 和 28S rRNA 基因组成一个转录元,产生一个前体 RNA。在形成成熟 rRNA 时,有些 RNA 片段要被剪切。被剪切的第一段是位于 5.8S 和 18S rRNA 之间的片段,称之为 ITS1(internal transcribed spacer1),即核糖体 RNA 第一内转录间隔区;第二段是位于



5.8S和28S rRNA之间,被称为核糖体RNA第二内转录间隔区,即ITS2(internal transcribed spacer2)。ITS区包括ITS1和ITS2,有时将ITS1、5.8S rDNA和ITS2统称为ITS区。Tang等(2003)利用核糖体ITS和mtCOI序列信息,成功地研究了绒螯蟹*Eriocheir*的系统发生学问题,对国际上有关争议的日本绒螯蟹、中华绒螯蟹、狭额绒螯蟹、直额绒螯蟹以及台湾绒螯蟹和合浦绒螯蟹的分类地位及其属间关系进行了详尽的探讨,在蟹类系统发生学研究中首次使用内转录间隔区(ITS)DNA(含5.8S核糖体DNA)序列,并结合线粒体基因序列作为分析手段,构建蟹类的进化谱系。该研究提出了日本绒螯蟹、中华绒螯蟹和合浦绒螯蟹为同一个种即日本绒螯蟹(结果如图6所示),它们分别为日本绒螯蟹指名亚种、中华亚种和合浦亚种的新观点;用分子生物学的方法肯定了新绒螯蟹属的有效性,并对平绒螯蟹属的有效性持明确的否定态度。一百多年来,中国大陆是否有直额绒螯蟹及其种名的有效性都是悬而未决的问题。对在广东获得标本的形态学和分子生物学的研究,明确提出了该种种名有效的观点。这样,绒螯蟹分为两个属,即绒螯蟹属(*Eriocheir*)和新绒螯蟹属(*Neoeriocheir*),它们所包含的分类单元分别是日本绒螯蟹(*E. japonica japonica*)、中华绒螯蟹(*E. japonica sinensis*)、合浦绒螯蟹(*E. japonica hepuensis*)、直额绒螯蟹(*E. recta*)和狭额新绒螯蟹(*Neoeriocheir leptognatha*)。

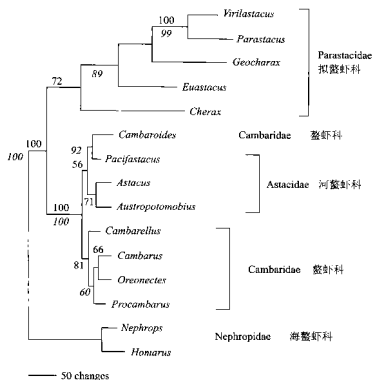


图5 基于18S rDNA、28S rDNA以及16S rDNA序列构建的淡水蟹科ML拓扑图(仿Crundall等,2000)

Fig. 5 A maximum-likelihood topology of the 18S, 28S and 16S rDNA sequences from freshwater crayfish and other crustaceans. (from Crundall et al., 2000)

真核生物的组蛋白一般有5种,即H1、H2A、H2B、H3和H4,它们高度保守,是核糖体装配的必需蛋白。小分子核RNA(snRNA)目前已经发现有20多种,其中13种富含U,被称之为U微snRNA,而U1、U2和U3大多为真核生物RNA聚合酶II转录产物加工所必需。EF为参与翻译过