

学校编码: 10384
学 号: 200126054

分类号_____密级_____
UDC _____

厦 门 大 学
硕 士 学 位 论 文

海洋底栖多毛类和近江牡蛎的分子
系统发育学研究

Molecular Phylogentic Analysis of Marine
Polychaeta and *Crassostrea rivularis*

罗 巍

指导教师姓名: 郑天凌 教 授

林荣澄 研究员

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2004 年 7 月 20 日

论文答辩时间: 2004 年 8 月 5 日

学位授予日期: 年 月

答辩委员会主席: 刘月英 教 授

评 阅 人: 蔡立哲 教 授

曾润颖 副研究员

2004 年 8 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已注明引用的内容外，本论文不含其他个人或集体已经发表或者撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确的方式表明。本人完全意识到本声明的法律结果将由本人独立承担。

声明人（签名）：
年 月 日

目 录

摘要.....	I
Abstract	II
1. 前言	
1.1 底栖生物分类学概述	1
1.1.1 多毛类 (polychaete) 概述	1
1.1.2 深海极端环境下的底栖生物研究	2
1.2 牡蛎的分类现状	4
1.3 分子系统发育学的发展	7
1.3.1 传统的系统发育学与“分子系统学”的比较	7
1.3.2 为什么 18S rDNA 是真核生物系统发育的良好的分子标记 ...	10
1.3.3 分子系统发育学的进展.....	12
1.3.4 “分子树”的构建	14
1.4 研究内容	15
2. 材料和方法	17
2.1 材料	17
2.1.1 药品、试剂	17
2.1.2 主要仪器、设备	18
2.1.3 酶类	18
2.1.4 菌株质粒载体	18
2.1.5 引物	18
2.1.6 主要软件	19
2.1.7 各种培养基的配制	19
2.2 实验方法	19
2.2.1 样品采集.....	19
2.2.2 染色体DNA的提取.....	20

2.2.3 18S rDNA 序列的 PCR 扩增.....	21
2.2.4 近江牡蛎 ITS 片断的扩增.....	23
2.2.5 扩增产物的切胶纯化.....	24
2.2.6 纯化 PCR 产物的连接和转化.....	25
2.2.7 重组质粒的筛选.....	29
2.2.8 质粒 DNA 的提取.....	30
2.3 分子树的构建.....	31
3. 结果.....	32
3.1 样品测序结果.....	32
3.2 多毛类实验结果.....	44
3.3 近江牡蛎实验结果.....	47
4. 讨论.....	55
4.1 实验方法.....	55
4.2 多毛类的系统发育.....	59
4.3 近江牡蛎的系统发育.....	63
5. 小结.....	64
6. 研究展望.....	65
参考文献.....	66

Contents

Abstract (Chinese)	I
Abstract	III
2. Preface	
1.1 Brief summary of benthos	1
1.1.1 Taxonomy of polychaete	1
1.1.2 Research about benthic benthos	2
1.2 Current status of the taxonomy of Ostreidae	4
1.3 Development of molecular phylogeny	7
1.3.1 Comparison between traditional and “molecular” phylogeny	7
1.3.2 Why is 18S rDNA an ideal molecular marker for eukaryotic phylogeny	10
1.3.3 Development of molecular phylogeny	12
1.3.4 Construction of “molecular tree”	14
1.4 Our research	15
2. Material and Methods	17
2.1 Material	17
2.1.1 Medicine, reagent	17
2.1.2 Main instruments, equipments	18
2.1.3 Enzymes	18
2.1.4 Vectors	18
2.1.5 Primers	18
2.1.6 Softwares	19
2.1.7 Culture mediums	19
2.2 Methods	19
2.2.1 Sample collection	19

2.2.2	Extraction of rDNA.....	20
2.2.3	PCR amplification of 18S rDNA.....	21
2.2.4	Amplification of ITS of <i>Crassostrea rivularis</i>	23
2.2.5	Purification of product of PCR.....	24
2.2.6	Cloning.....	25
2.2.7	Selection of recombined plasmid.....	29
2.2.8	Extraction of plasmid DNA.....	30
2.3	Construction of molecular pylogentic tree.....	31
3.	Results.....	32
3.1	Sequencing results of samples.....	32
3.2	Results of polychaeta.....	44
3.3	Results of <i>Crassostrea rivularis</i>.....	47
4.	Discussion.....	55
4.1	Methods.....	55
4.2	Phylogeny of polychaeta.....	59
4.3	Phylogeny of <i>Crassostrea rivularis</i>.....	63
5.	Summary.....	64
6.	Research prospect.....	65
	References.....	66
	Acknowledgement	74

摘 要

底栖生物在海洋生态系统中起着极其重要的作用,部分底栖生物也是重要的海洋经济物种。同时因为海洋底栖动物活动性小、地区性强,可以较好地反映水质和地质的污染状况,在海洋污染生物学指标中具有特别重要的意义。因此对底栖生物进行正确的分类和系统发育学研究是十分必要的。过去对底栖生物的分类主要根据形态来划分,但是随着科学的发展传统形态学越来越遇到一些难以克服的障碍,如趋同进化的问题。另外用形态特征定义一个分类阶元,就必须对标本的完整性、性别、生长阶段有严格的要求,因此对于一些特殊条件下取得的很难保持完整的形态的标本来说,进行形态学的鉴定尤其困难。现代分子生物学的发展。使我们可以利用核酸、蛋白质等生物大分子的差异研究生物之间的进化关系,为分类学和系统发育研究提供了新的手段。在此基础上建立起的分子系统学克服了许多传统分类学的缺点。本研究对 2001 年 11 月我国“大洋一号”远洋科学考察船 DY105-11 航次采集的东太平洋多金属结核中国合同区与西太平洋暖池区、2002 年 11 月“海洋四号”DY105-13 航次采集的西太平洋暖池区的小型底栖生物,和 2003 年 6 月采集于厦门近海海域的大型底栖多毛类标本,以及 2003 年 8 月采集于龙海的近江牡蛎标本进行了初步形态学鉴定,并且成功扩增了厦门近海海域七种底栖多毛类的 18S rDNA 序列,和红蚝与白蚝的 18S rDNA 序列。随后对这些序列进行了比对,利用软件 DNAMAN (version 5.01) 采用 Neighbor-joining 法和 PHYLIP 软件包 (3.62.1a 版) 中的最大简约法 (maximum-parsimony) 和最大似然法 (maximum-likelihood) 对它们进行了系统发育分析,取得了以下一些成果:

第一 经过实验摸索出了一套能够从乙醇固定的微小多毛类标本中提取 DNA 用于 PCR 扩增的方法。由于条件限制,许多底栖生物样品往往是用 70%乙醇固定,尤其是深海样品。另外在底栖生物中包括大量的个体十分微小的类群,底栖自由生活线虫,有孔虫等。对于这类样品的 DNA 提

取十分困难。我们总结出了一套用液氮冻融结合蛋白酶裂解的方法，对微小生物组织的 DNA 提取被证明十分有效。

第二 扩增，并测序得到了七种厦门近海海域底栖多毛类的近乎完整的 18S rDNA 序列，和红蚝、白蚝 18S rDNA，和 ITS 片断。自行设计的扩增多毛类 18S rDNA 片断的特异引物。

第三 搜索得到了目前GenBank中所有的 1500bp以上的多毛类 18S rDNA片断，结合本研究测定的七种厦门海域的多毛类序列，构建了多毛类的 18S rDNA分子系统发育树。并根据该系统树推论出多毛类并不是单系起源(monophyletic)的，同时豆维虫科 (Dorvilleidae) 和好转虫科 (Dinophilidae) 显示出是单系起源。沙蚕科显示系统发育关系比较复杂，应该是复系起源 (polyphyletic)。矾沙蚕目 (Eunicida) 矾沙蚕科 (Eunicidae) 与欧努菲虫科 (Onuphidae) 显示非常密切的进化关系并且应该是同一单系起源的，它们的自展值也达到了极其显著水平，其内部单元关系也不是很清楚，自展值也仅在 50%左右，统计学上不显著。另外在这个分析中，多毛类除豆维虫科外的所有科、目的系统发生都显示出与 *Stygocapitella subtetrranea* 有关，但是其自展值仅有 43%。

第四 比对了扩增所得的红蚝和白蚝的 18S rDNA 序列，发现它们的同源性达到了 99%以上，并且结合目前 GenBank 中的其他牡蛎 18S rDNA 序列建立的分子系统发育树也显示，红蚝和白蚝在系统发育上的地位一致。因此我们推论出它们很可能是都属于近江牡蛎。

关键词：底栖生物； 18S rDNA； 分子系统发育

Abstract

Marine benthos play a very important role in the ecology of marine environment. Lots of the animals are also important economic marine species. Meanwhile, because they are characterized as narrow active and special territory distribution, they can be used to indicate the quality of water and the polluted condition of sediments, which is an important part of the biologic indication of marine pollution. So it is necessary to make the accurate taxonomy and phylogeny of marine benthos. In the past, their taxonomy only referred to morphological features, but with the development of science the traditional method encountered some obstacles such as the convergent evolution. Besides that, to make a correct classification there are some strict requirement about the integrity, gender and age of the sample, so that it is very difficult for those samples collected from some special environment to do the morphological study. Modern molecular biology makes it is possible for us to analyze the evolution relation of animals with the difference of some big biology molecules like proteins and nucleic acids, and provides a new methods for the research of taxonomy and phylogeny. Based on that, the modern molecular phylogeny was set up and conquered some traditional shortcomings. We briefly morphologically studied marine benthos samples collected by “Da Yang Yi Hao” scientific investigation ship on the DY105-11 voyage to the

Chinese polymetallic nodule mining area in eastern Pacific, “Hai Yang Si Hao” scientific investigation ship on the DY105-13 voyage to the warm pool of western Pacific, some Xiamen coastal samples collected in June 2003 and “white” oysters and “red” oysters collected from Longhai in August 2003. We successfully amplified 7 species of Xiamen coastal benthos’ 18S rDNA sequences and the 18S rDNA sequences of “white” oysters and “red” oysters. Then aligned those sequences, and made phylogentic analysis of them by using program DNAMAN (version 5.01) with the method of Neighbor-joining and Phylip Software Package (version 3.62.1a) with the methods of maximum-parsimony and maximum-likelihood. Briefly said, the research got the following results:

1. We initially developed an efficient method to attract DNA for PCR from weeny polychaete samples fixed by 70% ethanol. Restricted by conditions, many benthos samples have to be fix by 70% ethanol, especially benthic samples. What’ s more, lots of benthos samples are very small like benthic free living nematode and foraminifera. It used to be very difficult to attract DNA for PCR from those samples. We developed a method combining liquid nitrogen freezing and melting with proteinase digestion, which was approved to be very efficient.
2. Amplifying and sequencing 18S rDNA partial sequences of seven species of Xiamen coastal polychaete, and “white” oysters and “red” oysters. Designed a pair of specific 18S rDNA primers for polychaete.
3. Based on all of the available 18S rDNA sequences longer than

1500bp of polychaete, together with seven sequences obtained in this research, we built the molecular phylogenetic tree of polychaete. According to the tree we found there were no evidences to support that polychaete is monophyletic, while Dorvilleidae and Dinophilidae are monophyletic. Nereidae is doubtless polyphyletic and the phylogenetic relationships between the ingroup species of the clade is very complex. Eunicidae and Onuphidae should have a common ancestor and showed closely evolutionary relationship. However, the relation among those ingroup species of this clade are also no clear, the bootstraps are all around 50%. Another interesting finding is that except for Dorvilleidae, all the other families of polychaete seemed to have a common ancestor with *Stygocapitella subterranea*.

4. The alignment of the 18S rDNA sequences of “white” oysters and “red” oysters showed that they have an over 99% identity. The molecular phylogenetic tree also approved that they shared a very similar evolutionary status. So they might be included into one species *Crassostrea Rivulaisr*.

Key words: Benthos; 18S rDNA; Molecular phylogeny

1.3. 前言

1.1 底栖生物分类学概述

1.1.1 多毛类 (polychaeta)

海洋底栖动物在海洋生态系统中起着极其重要的作用^[1,2]。多毛纲 (Polychaeta) 是环节动物门 (Annelida) 最大的纲。包括八十多科, 一千六百多个属, 一万多个已描述的种, 也是底栖生物中的重要组成部分。在福建潮间底栖大型生物群落组成中多毛类大概占到总数量的 20%^[3]。在海洋生态系中, 多毛类是食物链的一个重要环节, 是水媳、扁虫、其他多毛类、软体动物和棘皮动物的捕获物, 也是经济甲壳类和鱼类的饵料。据统计, 在 34 种鱼的消化道中, 有多毛类的就占 14 种之多。另外多毛类幼虫在浮游生物中亦占一定数量, 是经济动物幼体的滤食对象, 其它轮幼虫也是对虾幼虫的极好食料。沙蚕、齿吻沙蚕、吻沙蚕、矾沙蚕的许多种类, 在繁殖季节, 在月光刺激下都会大量群浮于海面, 这一习性会引起鱼类的集群。可见多毛类对渔场的分布、渔业资源的状况、鱼类产卵场的选择都有密切的关系。多毛类的人工迁移繁殖以促进鱼类的加快育肥, 以及沙蚕的人工养殖等都说明多毛类是补充动物性蛋白不足的一个新途径。多毛类种类多, 分布广, 在任何一个主要的动物地理区几乎都能见到 68—70 个科的多毛类。另外, 很多多毛类可作为海洋生态环境的指标种, 如小头虫 (*Capitella capitata*), 一种沿岸受淡水影响的底栖多毛类, 对有机物有很强的耐受力。底栖动物作为环境改变的指示生物也在国际上多有报道^[4-6]。此外日本科学家还发现沙蚕毒素是一种含硫毒素, 通过对其研究发现了一种对鳞翅目幼虫具有强烈杀伤力的杀虫剂, 已经在农业上获得广泛应用^[7]。由此可见, 多毛类的系统发育研究对于整个的海洋生态研究和多毛类的经济养殖都有重要意义。

过去多毛类的分类主要根据形态来划分, 比较重要的形态特征有

1. 头部：由口前叶，围口节，咽和吻组成。口前叶就是口前的一个体节；围口节通常指口前叶后的 1 至若干个形态特殊的前体节的统称，围口节腹面具口；咽和吻是消化道的前端，根据翻吻的结构及其附属物的有或无以及形态，是科和属的水平上的重要划分依据。2. 躯干部：头后的数个或数百个体节组成，（1）疣足，每个体节两侧肉质扁平状突起物，有运动和呼吸的功能，疣足是否与腮相连，腮的起止节数，结构特征是划分种属的依据之一。（2）刚毛：位于疣足内部和外部的几丁质刺毛，是由刚毛囊分泌的，具有辅助运动、捕食甚至建管的功能。在每个疣足叶上，刚毛的基本种类是科的重要特征。（3）尾部：位于身体的最后一节或数节，又称肛部，在一些科中是鉴定到属和种的重要依据。

1.1.2 深海极端环境下的底栖生物研究

深海极端环境蕴藏了独特的地质和生物资源，有关深海底栖生物的研究目前正受到越来越多的关注。

1.1.2.1 多金属结核区底栖生物的研究

深海底部沉积层被认为是一个很主要的生物多样性保藏库，一些学者们估计它包含有约一千万到一亿种以上的各种蠕虫、甲壳类、和软体动物。这还不包括数量更为庞大的微生物。而且以上这些仍然是非常保守的估计，因为绝大部分的深海区域至今还没有被人类探索过。因此，对上述生物进行分类，对生物多样性研究和海洋资源的开发有重要意义。深海底部同时蕴藏了数量可观的有潜在商业和战略意义的矿藏，这些矿藏包括锰、铁、钴、铜、镍等，它们往往成结核状聚集在海底。目前发现的富集量最大的结核区位于东太平洋的公海区域的 4000 米以下的海底。这一区域大概超过三百万平方公里。目前已经有包括我国在内的六个国家或地区与国际海底管理局签订了开发合同，我国已于 2001 年取得 7.5 万平方公里的区域的开发权。根据合同要求，在最终开采之前签约国必须对合同区的生态环境作详细的评估，包括生物多样性、物种范围和基因流的调查。对中国合同区的深海底栖小型和大型生物的分

类学研究，是中国履行合同的一个环节。

1.1.2.2 973 项目《地球圈层相互作用中的深海过程和深海记录》中的深海底栖生物的研究

近年来研究表明，“西太平洋暖池”在全球气候系统中起着举足轻重的作用。该区多年平均表层水温超过 28 摄氏度，是世界大洋海水加热最强、因而向大气输送辐射热和通过蒸发输送潜热最强的海区。由此区上升辐散的气流所形成的三大环流圈，通过季风和厄尔尼诺控制着地球上大片面积的气候（图 1）。因此，“西太平洋暖池”被认为是全球气候系统的“引擎”，一旦暖池区海水上层结构和表层水温变化，就会影响全球的气候系统。“深海生物圈在物质循环中的作用”是深海 973 项目的子项目之一。深海底栖生物在海洋生物地球化学循环中扮演重要角色，它们是碳、氮、硫等生源要素的重要吸收者和转化者。深海生物的种类、丰度和分布的研究，是全球碳循环的估算及海洋生产力等资源与环境相关问题的重要环节。

课题研究组已在 2001 年 11 月我国“大洋一号”远洋科学考察船 DY105-11 航次和 2002 年 5 月“海洋四号”DY105-13 航次采集了东太平洋多金属结核中国合同区与西太平洋暖池区的底栖生物部分样品（如图 2-3）。并且计划对这些底栖小型生物进行分子系统研究。

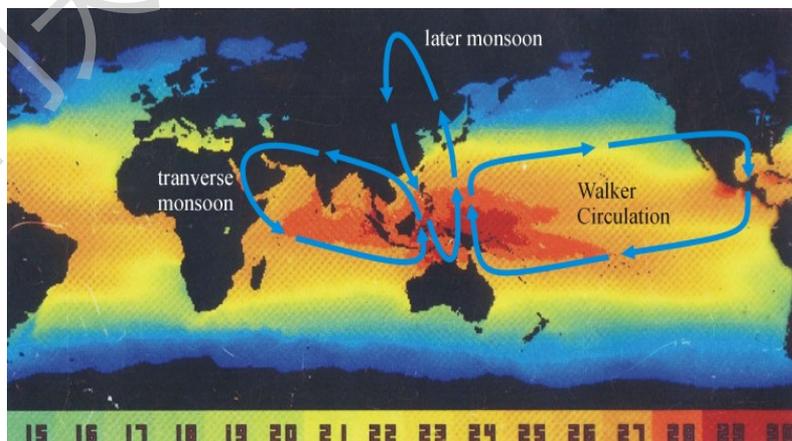


图 1 西太平洋暖池区示意图



图 2 深海小型底栖生物—多毛类



图 3 深海小型底栖生物—线虫

但是对于深海小型底栖生物（体长约 32—1000 μm ）的分类学研究有着特殊的限制条件。深海小型底栖生物标本具有如下几个特点：1. 获得极其困难并且有偶然性，绝大多数个体仅有单只标本；2. 个体极其微小；3. 没有新鲜样品可供实验，标本全部需要固定并且染色处理；4. 不可培养性。因此对于分子系统研究来说，研究的第一步：从生物标本中提取可供 PCR 扩增的 DNA 就是一个极大的困难。

1.23.2 牡蛎的分类现状

牡蛎（Ostreidae）属软体动物门、双壳纲、珍珠贝目，为世界性广布种。牡蛎的肉味鲜美，营养丰富，是海水养殖业的重要养殖对象，也是目前我国乃至世界产量最大的经济贝类。除了实用价值牡蛎还有很多其他方面的利用价值，牡蛎珠可治眼疾，贝壳是制石灰、水泥、电石或做贝壳粉的原料。同时牡蛎还可以作为海洋重金属 G_0 、 P_0 、 As 污染的检测生物^[8, 9, 10, 11]。由于牡蛎的巨大经济价值，牡蛎的分类学研究对于搞清楚养殖牡蛎的种质资源是十分有必要的。因为目前发生在自然界的牡蛎天然品种杂交现象十分普遍，这种天然的杂交对于养殖品性的影响还不得而知。但是应该可以预见到这种现象可能造成种质退化的危险，还有目前海洋环境的污染也在愈演愈烈。所有这些要求我们在现阶段就必须充分了解和掌握我国养殖牡蛎的种质资源，如果可能要尽快建立种质库，包括品种的形态学和分子信息，以便将来能够准确掌握种质的变

化情况。同时要注意的则是过度捕捞和天然病害有可能极大地威胁到牡蛎养殖的安全。发生在美国的例子可以引以为鉴。美国切萨皮克湾的牡蛎年产量从一个世纪前的 7000 万吨下降到 1998 年的不足 200 万吨。原来生机勃勃的牡蛎养殖业锐减了 90% 以上。这对于当地的经济和环境都造成了极大的影响。因为牡蛎有清洁海水的功能，以前切萨皮克湾的活体牡蛎每四天就可以将整个海湾的海水清洁一遍。但是现在要大概一年时间才能清洁一次。而且以前大量存在的可以作为其他生物生存的牡蛎礁也逐渐消失了。造成这一现象的原因很多，根据美国弗吉尼亚海洋研究所 Mark Luckenbach 博士的研究，主要有以下几点：1. 过度捕捞；2. 名为 MAX 和 Dermo 的病害的侵袭^[12]；3. 水质变化；4. 污染和毒素。这一切造成了原来切萨皮克湾的东部牡蛎 Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*) 数量的急剧下降。从 1995 年起，美国科学家就开始寻找一个合适的牡蛎外来品种以改善切萨皮克湾牡蛎数量巨减的状况。他们首先考虑的是太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*)，但是经过实验证实其生长情况、抗病性和口感并不理想^[13]。目前正在积极研究将近江牡蛎引种到美国切萨皮克湾的可能性^[14]。初步的研究表明它生长速度快于东部牡蛎，抗病性更强，并且口感很好^[15, 16, 17, 18]。这充分说明了我们目前的资源优势，同时也为我们敲响了保护种质资源的警钟。应该看到，目前在我国针对养殖性牡蛎的发育系统的研究还很不完善。

由于牡蛎的分布极广，截止到二十世纪七十年代，已知的牡蛎品种就超过了 100 种以上^[19]。其外部形态常随着其生活环境的不同而发生极大的变化。因此牡蛎中多数种类单纯依靠贝壳的外部形态是很难区分的，这一直是困扰贝类分类学者的一个难题^[20]。有鉴于此，研究者正在积极寻找其他分类依据，但是除个别报道外^[21]，大部分学者认为牡蛎软体部的结构差异很小，可提供的分类证据少。绝大多数的牡蛎具有恒定的染色体数目($2n=20$)，无法为区别牡蛎物种提供证据^[21]。沈亦平等对近江牡蛎牡蛎染色体核型和多样性进行了研究^[22,23]，但是这方面的差

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

廈門大學博碩士論文摘要庫