

6种帘蛤科贝类 18S rRNA 基因全序列比较分析

程汉良, 彭永兴, 王芳, 孟学平, 阎斌伦, 董志国

(淮海工学院, 江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏 连云港 222005)

摘要: 对文蛤 (*Meretrix meretrix*)、青蛤 (*Cyclina sinensis*)、江户布目蛤 (*Protothaca jedomensis*)、薄片镜蛤 (*Dosinia corrugata*)、紫石房蛤 (*Saxidomus purpurus*) 和菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*) 6种帘蛤科 (Veneridae) 贝类的 18S rRNA 基因序列进行了 PCR 扩增并测序, 以期获得这一序列的基本特征, 评估其种间变异程度, 探讨这一序列在种类鉴定和分子系统发育等研究中的应用价值。测序结果表明, 文蛤、青蛤、江户布目蛤、薄片镜蛤、紫石房蛤和菲律宾蛤仔 18S rRNA 基因序列全长分别为 1 900 bp、1 838 bp、1 831 bp、1 831 bp、1 829 bp 和 1 833 bp。序列中 A、T、C 和 G 碱基的平均含量分别为 24.0%、24.0%、24.2% 和 27.8%。用 MEGA 软件对 6 种帘蛤 18S rRNA 基因全序列进行了分析, 对位排列后的总长度 1 906 bp, 其中变异位点 210 个, 简约信息位点 28 个, $si/sv=1.4$ (46/32)。从 GenBank 下载了 7 种帘蛤科贝类 18S rDNA 全序列, 与本研究实测的 6 种帘蛤一起用 MegAlign 软件对其 18S rDNA 序列进行了比对, 物种间序列相似百分比为 88.7%~99.7%。文蛤与其他 12 物种间序列差异较大, 序列差异百分比均超过了 10%, 其他各物种间序列差异百分比不超过 3%。以异韧带亚纲 (Anomalodesmata) 笋螂目 (Pholadomyoidea) 的 *Lyonsia floridana* 和 *Cardiomya costellata* 为外群, 采用相邻连接法 (NJ) 和最大简约法 (MP) 构建了帘蛤科贝类的系统发育树, 其拓扑结构显示雪蛤亚科 (Chioninae)、帘蛤亚科 (Venerinae) 和镜蛤亚科 (Dosiniinae) 的种类首先聚在一起, 形成一个聚类簇; 缀锦蛤亚科 (Tapetinae)、卵蛤亚科 (Pitarinae)、仙女蛤亚科 (Callistinae)、青蛤亚科 (Cyclininae) 和文蛤亚科 (Meretricinae) 的种类先后分别单独聚成一枝; 最后所有帘蛤科物种聚为一枝, 与外群相区别, 说明 18S rDNA 序列适合作为帘蛤科系统发育研究的分子标记。[中国水产科学, 2008, 15(4): 559-567]

关键词: 帘蛤科; 18S rRNA 基因; 分子系统发育

中图分类号: S917.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2008)04-0559-09

帘蛤科 (Veneridae Rafinesque, 1815) 动物在传统分类上隶属于软体动物门 (Mollusca)、双壳纲 (Bivalvia)、帘蛤目 (Venerioda)。帘蛤科是双壳贝类中物种最多的一个科, 约有 500 多种, 广泛分布于世界各海域, 是潮间带区系的优势种类, 很多具有重要的商业价值^[1]。1969 年 Keen^[2] 根据形态特征把帘蛤科分为 12 个亚科。尔后的学者虽然有所修改和补充, 但大都以此分类系统作为基础。帘蛤科种类多, 形态变异大, 过去主要依靠比较形态学进行分类, 世界各国学者对其分类系统的安排和系统演化问题所持观点不尽相同, 争议颇多, 这些争议由于缺乏遗传方面的研究而难以得到解决^[3]。近年来分子生物学技术的发展为探讨生物系统演化关系提供了一条新的途径。国内外学者对帘蛤

科的分子系统发育进行了一些研究。Kappner 等^[4] 采用 16S rDNA、COI 和核编码基因 H3 序列对帘蛤亚科 (Venerinae) 的系统发育进行了研究, 结果表明, 帘蛤亚科与雪蛤亚科 (Chioninae) 是不相关的类群, 但一些属的界限可能有误, 认为原雪蛤亚科的 *Chamelea* 和 *Clausinella* 2 个属应划入帘蛤亚科, 作为帘蛤属 (*Venus*) 的姊妹属。Canapa 等^[1] 使用 16S rDNA 序列对来自地中海的帘蛤科 6 个亚科 10 个属 14 个种的系统发育进行了研究, 结果表明, 有些属所划入的亚科是不合适的, 缀锦蛤亚科 (Tapetinae) 有 6 个种聚为一枝, 而传统分类把它们划入不同的属是不正确的。Kim 等^[5] 采用 COI 序列对 9 种韩国产帘蛤科贝类的系统演化进行了研究, 认为四方蛤亚科、镜蛤亚科 (Dosiniinae)、青蛤亚

收稿日期: 2007-11-06; 修订日期: 2007-11-26.

基金项目: 江苏省海洋生物技术重点实验室开放基金项目 (2006HS001); 江苏省“六大人才高峰”第四批资助项目 (07-G-015).

作者简介: 程汉良 (1964-), 男, 博士, 教授, 主要从事水产动物遗传育种方面的研究. E-mail: CHL3139@163.com

科 (Cyclininae)、文蛤亚科 (Meretricinae) 和雪蛤亚科是单系发生的, 而卵蛤亚科 (Pitarinae) 是并系发生的。李太武等^[6] 采用 ITS2 序列对不同花纹的文蛤进行了研究, 但没有发现明显的差异。本课题小组对帘蛤科 6 个代表种的 ITS 和 COI 序列进行了初步研究, 结果表明, ITS 序列适合属内种间及种下亲缘关系的探讨, COI 相对保守, 适合属间和属内系统关系分析^[7-8]。

在真核生物中, 18S rRNA、5.8S rRNA 和 28S rRNA 基因串联在一起形成 rRNA 基因簇, 转录后产生 1 个前体 RNA, 在不同的真核生物中含有几百到几千个拷贝。该基因簇由 rRNA 基因编码区和间隔区组成, rRNA 基因编码区由于维持其重要功能的需要, 受到了较强的选择压力, 在进化过程中一、二级结构比较保守。其中, 18S rRNA 基因 (18S rDNA) 是一类编码核糖体小亚基 rRNA、长约 1 800 bp 的 DNA 序列。由于在生物体内含量较大且在进化过程中具有保守性, 因此, 18S rDNA 适合不同层次系统发育的研究, 是研究生命起源和早期生物进化、高级分类阶元系统发育关系的主要分子标记, 已广泛应用动植物的种质鉴定和系统发育研究^[9-16]。在海洋贝类方面, 利用 18S rRNA 基因序列对异韧带亚纲 (Anomalodesmata) 的系统发育进行研究, 所得结论与形态学分类有很大不同^[17]。18S rDNA 序列还很好地证明了贻贝科 (Mytilidae) 的 2 个属是单系发生的^[18]。对异齿亚纲 (Heterodonta) 的研究清楚表明形态分类中海螂目 (Myoida) 的一个种实际上属于帘蛤科^[19]。利用 18S rDNA 片段序列对不同地理种群耳鲍 (*Haliotis asinina*) 的遗传关系进行研究, 证明遗传差异与地理隔离程度存在正相关^[20]。目前, 国内外还未见 18S rDNA 用于帘蛤科系统发育研究的报道。

本实验以文蛤 (*Meretrix meretrix*)、青蛤 (*Cyclina*

sinensis)、江户布目蛤 (*Protothaca jedoensis*)、薄片镜蛤 (*Dosinia corrugata*)、紫石房蛤 (*Saxidomus purpurus*) 和菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*) 为研究对象, 取后闭壳肌提取基因组 DNA, 采用 3 对特异性引物对其 18S rRNA 基因全序列进行 PCR 扩增和测序, 并对 18S rDNA 全序列进行生物信息学分析。以期获得这一序列的基本特征, 评估其种间变异程度, 为探讨帘蛤科的分类和系统演化问题提供有价值的信息, 为该科贝类的种类鉴定和分子系统发育等研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品收集和DNA提取

6 种帘蛤科贝类中, 文蛤、青蛤于 2006 年 5 月采自辽宁大连海区, 薄片镜蛤、江户布目蛤、菲律宾蛤仔和紫石房蛤于 2007 年 1 月采自江苏连云港海区, 均为 3 龄成体, 每物种采样约 5 kg, 经鉴定后取 20 个新鲜个体用于 DNA 提取, 其余样品用福尔马林固定后保存于淮海工学院海洋学院标本馆。取后闭壳肌 50 mg 左右, 以 CTAB/蛋白酶 K 为裂解液 (蛋白酶 K: 20 μg/mL, CTAB: 1%, 55 °C 裂解 8~12 h), 采用酚-氯仿抽提法提取基因总 DNA^[22], DNA 溶于 TE 中, -20 °C 保存备用。

1.2 PCR扩增及产物测序

根据 18S rRNA 基因的保守序列设计 3 对引物: 18S-F1 5' - CCTACCTGGTTGATCCTGCCAG 和 18S-R1 5' - CCGAGATCCAACACTACGAGCT; 18S-F2 5' - GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC 和 18S-R2 5' - GCATCACAGACCTGTTATTGCTC; 18S-F3 5' - AACTTAAAGGAATTGACGGAAG 和 18S-R3 5' - TAATGATCCTTCCGCAGGTTTAC。3 对引物在 18S rDNA 上的位置见图 1, 其中 18S-R3 参照 18S rDNA 与 ITS1 的界线设计^[7]。



图 1 3 对引物在 18S rDNA 上的位置

Fig. 1 Approximate locations of 3 pairs of primers used for 18S rDNA amplification

PCR 反应体系为 50 μL , 每个反应体系内含: 50 ng/ μL 的模板 DNA 2 μL , 含 20 mmol/L Mg^{2+} 的 10 \times buffer 5.0 μL , 10 mmol/L 的 dNTP 1.0 μL , 25 $\mu\text{mol/L}$ 的引物各 1.0 μL , 5 U/ μL 的 *Taq* 酶 (BBI) 0.4 μL , 加 ddH_2O 至 50 μL ; PCR 在 BIO-RAD 的热循环仪 (型号 iCycler) 上进行, 反应条件为 94 $^\circ\text{C}$ 变性 40 s, 52 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 60 s, 共 35 个循环。反应前 94 $^\circ\text{C}$ 预变性 4 min, 反应后 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 7 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 挑选效果较好的 PCR 产物送上海生工生物工程技术服务有限公司进行纯化回收, 然后采用扩增引物在 ABI 测序仪上直接进行正反双向测序。

1.3 序列分析

采用 DNASTAR Package (version 5.01) 中的 SeqMan 软件对正反序列进行组装, 当正反序列出现不配对情况时, 查阅荧光图谱进行校正, 得到 18S-1、18S-2 和 18S-3 3 段序列。由于 18S-1、18S-2 和 18S-3 3 段序列有部分重叠区 (图 1), 所以分别组装好 3 段序列后用 SeqMan 软件将它们组装成完整的 18S rDNA 全序列。用 EditSeq 对所得到的序列进行编辑和分析; 从 GenBank 下载了 7 种帘蛤科贝类的 18S rRNA 基因全序列, 其登录号见表 1, 与本研究的 6 种帘蛤科贝类一起, 用 MegAlign 对序列进行比对, 并计算差异百分比。用 MEGA version 3.1 统计变异位点 (Variable site) 数、替换 (transitions, *si*) 颠换 (transversions, *sv*) 位点数, 计算 *si*/*sv* 比率, 以及简约信息位点 (parsim-informative site) 数。采用 NJ 法 (参数: Kimura 2-parameter model, 10 000

replicates, bootstrap phylogeny test) 和 MP 法 (参数: 10 000 replicates, bootstrap phylogeny test) 进行系统发育分析并构建分子系统发育树^[24]。

2 结果与分析

2.1 18S rRNA 基因全序列分析

对 6 种帘蛤科贝类的 18S rRNA 基因全序列进行了扩增, 并采用扩增引物进行双向直接测序。正反序列经 SeqMan 组装后的一致序列见图 2, 上述序列已提交 GenBank 数据库, 登录号见表 1。序列测定结果表明, 青蛤、薄片镜蛤、文蛤、江户布目蛤、菲律宾蛤仔和紫石房蛤 18S rRNA 基因序列全长分别为 1 838 bp、1 831 bp、1 900 bp、1 831 bp、1 833 bp 和 1 829 bp (含 -20 调控区), A、T、C 和 G 碱基平均含量分别为 24.0%、24.0%、24.2% 和 27.8%, 碱基组成基本无偏差。用 MEGA 软件对 6 物种 18S rRNA 基因全序列进行分析, 对位排列后的总长度 1 906 bp, 其中变异位点 210 个, 简约信息位点 28 个, *si*/*sv*=46/32=1.4。从 GenBank 下载了 7 种帘蛤科贝类 18S rDNA 全序列, 与本研究实测的 6 种帘蛤科贝类一起, 用 MegAlign 软件对其 18S rDNA 序列进行了比对, 序列相似百分比和差异百分比见表 2。物种间序列相似百分比 88.7%~99.7%, 其中, 薄片镜蛤与帘蛤科蛤类 (*Venus verrucosa*) 最大为 99.7%; 文蛤与帘蛤科蛤类 (*Periglypta listeri*) 最小为 88.7%。文蛤与其他 12 物种间序列差异较大, 序列差异百分比均超过了 10%, 其他各物种间序列差异百分比不超过 3%。

表 1 本研究所用物种及 18S rRNA 基因全序列 GenBank 登录号

种名 Species	亚科名 Subfamilies ^[3]	GenBank accession number	研究者 Researcher
<i>Cyclina sinensis</i> G., 1791	青蛤亚科 Cycliniinae	EF426289	本研究
<i>Dosinia corrugata</i> R., 1850	镜蛤亚科 Dosiniinae	EF426290	本研究
<i>Meretrix meretrix</i> L., 1758	文蛤亚科 Meretricinae	EF426291	本研究
<i>Protothaca jodoensis</i> L., 1874	雪蛤亚科 Chioninae	EF426292	本研究
<i>Ruditapes philippinarum</i> A., 1850	缀锦蛤亚科 Tapetinae	EF426293	本研究
<i>Saxidomus purpuratus</i> S., 1855	仙女蛤亚科 Callistinae	EF426294	本研究
<i>Anomalocardia auberiana</i>	雪蛤亚科 Chioninae	AY553966	Bieler R, 2004
<i>Chamelea striatula</i>	雪蛤亚科 Chioninae	DQ279943	Giribet G, 2006
<i>Mercenaria mercenaria</i>	雪蛤亚科 Chioninae	AF106073	Frischer ME, 1998
<i>Chione elevata</i>	雪蛤亚科 Chioninae	AY553970	Bieler R, 2004
<i>Callista chione</i>	卵蛤亚科 Pitarinae	AJ007613	Canapa A, 1999
<i>Periglypta listeri</i>	帘蛤亚科 Venerinae	AY553972	Bieler R, 2004
<i>Venus verrucosa</i>	帘蛤亚科 Venerinae	AJ007614	Canapa A, 1999

1	10	20	30	40	50	60	70	80	
1	CCTACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTGTCTCAAAGATTAAAGCCATGCATGCTAAGTACAGCCCTTTACAC								<i>Cyclina sinensis</i>
1								<i>Dosinia corrugata</i>
1								<i>Meretrix meretrix</i>
1								<i>Protothaca jadoensis</i>
1								<i>Ruditapes philippinarum</i>
1								<i>Saxidomus purpuratus</i>
81	90	100	110	120	130	140	150	160	
81	GGCGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATGTTCTTAGATCGTACAATCCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCT								<i>Cyclina sinensis</i>
81								<i>Dosinia corrugata</i>
81								<i>Meretrix meretrix</i>
81								<i>Protothaca jadoensis</i>
81								<i>Ruditapes philippinarum</i>
81								<i>Saxidomus purpuratus</i>
161	170	180	190	200	210	220	230	240	
161	AGAGCTAATACATGCAACACAGCTCGGACCTTGGCGGGAAGAGCGCTTTTGTAGCCTAAAAACCAATGA								<i>Cyclina sinensis</i>
161								<i>Dosinia corrugata</i>
161								<i>Meretrix meretrix</i>
161								<i>Protothaca jadoensis</i>
161								<i>Ruditapes philippinarum</i>
161								<i>Saxidomus purpuratus</i>
161	250	260	270	280	290	300	310	320	
161	CCGGTCCGTCGCGCGCGGTCACATTGGTACTCTGAACAACCTTTGTGCCGA								<i>Cyclina sinensis</i>
227								<i>Dosinia corrugata</i>
241	ACGTCGCGCGCGGTCACATTGGTACTCTGAACAACCTTTGTGCCGA								<i>Meretrix meretrix</i>
227								<i>Protothaca jadoensis</i>
227								<i>Ruditapes philippinarum</i>
230								<i>Saxidomus purpuratus</i>
287	330	340	350	360	370	380	390	400	
287	TCGTATGCCCTAGCGCGACGACGTATCTTCAAATGTCTGCCCTATCAACTGTGATGGTATGGCGCTATGCCTACCAAT								<i>Cyclina sinensis</i>
279								<i>Dosinia corrugata</i>
319								<i>Meretrix meretrix</i>
279								<i>Protothaca jadoensis</i>
278								<i>Ruditapes philippinarum</i>
278								<i>Saxidomus purpuratus</i>
366	410	420	430	440	450	460	470	480	
366	GGTGATAACGGGTAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGGTACCACATCCAAGGAA GGCA								<i>Cyclina sinensis</i>
358								<i>Dosinia corrugata</i>
399								<i>Meretrix meretrix</i>
358								<i>Protothaca jadoensis</i>
357								<i>Ruditapes philippinarum</i>
357								<i>Saxidomus purpuratus</i>
446	490	500	510	520	530	540	550	560	
446	GCAGGCGCGCAAAATTACCCACTCCCGACACGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACAATACGGGACTCTTTCGAGGCCCGCT								<i>Cyclina sinensis</i>
438								<i>Dosinia corrugata</i>
479								<i>Meretrix meretrix</i>
438								<i>Protothaca jadoensis</i>
437								<i>Ruditapes philippinarum</i>
437								<i>Saxidomus purpuratus</i>
526	570	580	590	600	610	620	630	640	
526	AATTGGAATGAGTACACTTTAAATCCTTTA-ACGAGGATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTCCAGCAGCCCGGGTAATTC								<i>Cyclina sinensis</i>
518								<i>Dosinia corrugata</i>
559								<i>Meretrix meretrix</i>
518								<i>Protothaca jadoensis</i>
517								<i>Ruditapes philippinarum</i>
517								<i>Saxidomus purpuratus</i>
605	650	660	670	680	690	700	710	720	
605	CAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGCTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGTGCAGGCTTGGGGTCGGC								<i>Cyclina sinensis</i>
597								<i>Dosinia corrugata</i>
639								<i>Meretrix meretrix</i>
597								<i>Protothaca jadoensis</i>
596								<i>Ruditapes philippinarum</i>
596								<i>Saxidomus purpuratus</i>
684	730	740	750	760	770	780	790	800	
684	TCGGCGGGTCACTGCTGCTCCTGCCCTCCAGCCGGCGTACCGTCCCTGGTCTTGGACTGAGTGTCTCGGGCG								<i>Cyclina sinensis</i>
676								<i>Dosinia corrugata</i>
719								<i>Meretrix meretrix</i>
676								<i>Protothaca jadoensis</i>
675								<i>Ruditapes philippinarum</i>
675								<i>Saxidomus purpuratus</i>
761	810	820	830	840	850	860	870	880	
761	GCCGGAACGTTTACCTTGAAGAAATAGAGTGGTCAAAGCAGGCCCTTGGCCCTGCATAATGGTGCATGGAATAATGGA								<i>Cyclina sinensis</i>
753								<i>Dosinia corrugata</i>
799								<i>Meretrix meretrix</i>
753								<i>Protothaca jadoensis</i>
752								<i>Ruditapes philippinarum</i>
752								<i>Saxidomus purpuratus</i>
841	890	900	910	920	930	940	950	960	
841	ATAGGACCTCGGTTCTATTTTGTGGTTTTTGGAGCTCGAGGTAATGATTAATAGGACTGACGGGGCATTGCTATTGC								<i>Cyclina sinensis</i>
833								<i>Dosinia corrugata</i>
879								<i>Meretrix meretrix</i>
833								<i>Protothaca jadoensis</i>
832								<i>Ruditapes philippinarum</i>
832								<i>Saxidomus purpuratus</i>

图2(待续)

Fig.2 (Being continued)

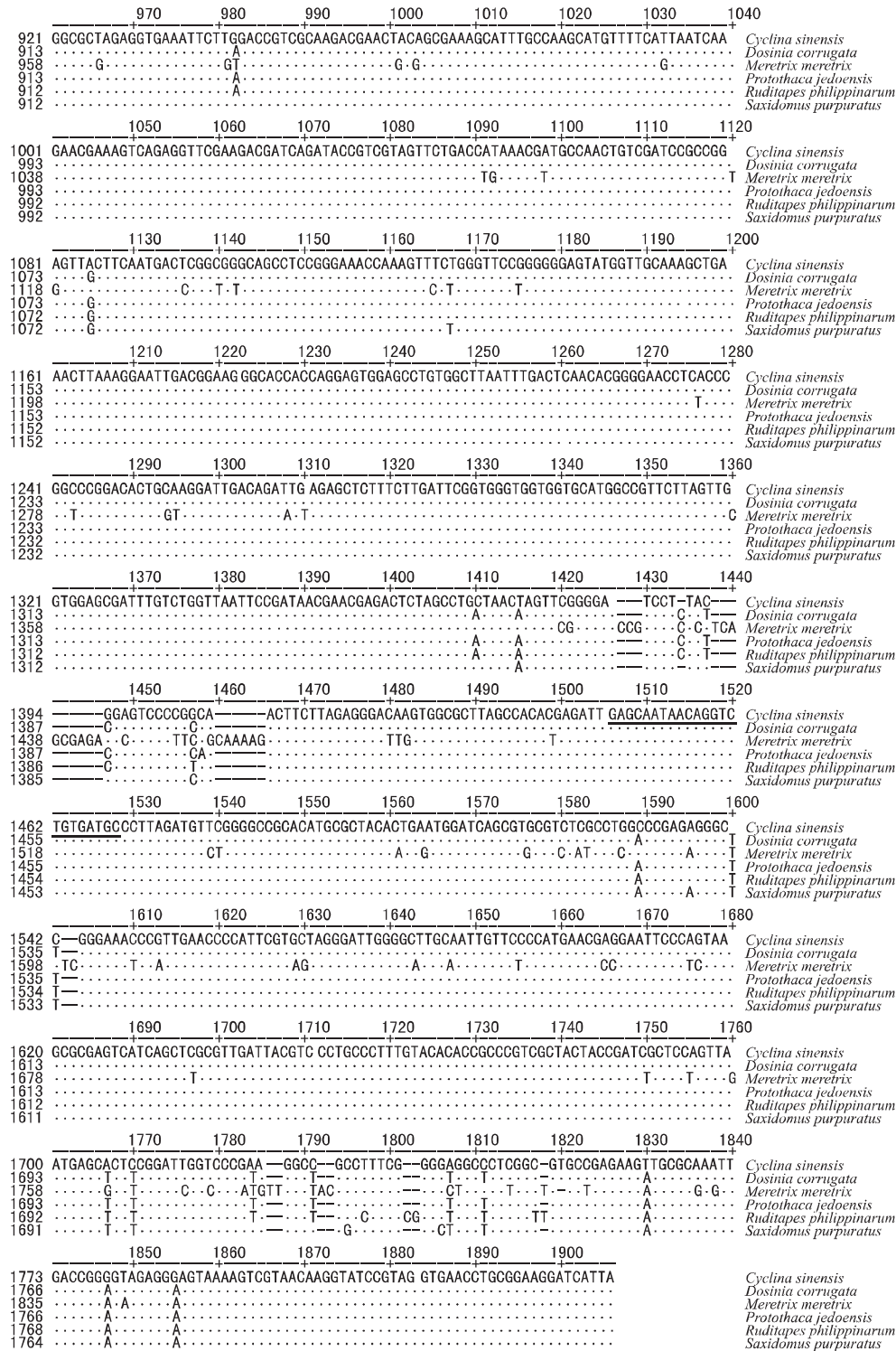


图 2 6种帘蛤科贝类 18S rRNA 基因全序列比对

阴影碱基为第 1 对引物; 下划线碱基为第 2 对引物; 加粗碱基为第 3 对引物

Fig. 2 Sequence alignment of 18S rRNA gene among 6 species in Veneridae

The grey bases indicate first primer pairs; the underlined bases indicate second primer pairs, and the bold bases indicate third primer pairs.

表 2 用 Clustal W 方法计算的帘蛤科 13 物种 18S rRNA 基因全序列相似百分比和差异百分比

种名 Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 <i>Cyclina sinensis</i>	***	97.9	89.8	97.8	97.4	98.2	97.4	97.8	96.2	96.9	96.1	97.9	98.0
2 <i>Dosinia corrugata</i>	2.2	***	90.4	99.6	99.5	98.3	99.3	98.6	98.1	98.9	97.8	99.7	99.6
3 <i>Meretrix meretrix</i>	11.1	10.7	***	90.9	90.6	90.7	90.0	90.5	89.4	89.8	88.7	90.5	90.6
4 <i>Protothaca jodoensis</i>	2.3	0.5	10.9	***	99.2	98.2	99.0	98.3	98.3	98.5	97.6	99.4	99.5
5 <i>Ruditapes philippinarum</i>	2.3	0.5	10.9	0.8	***	98.3	98.8	98.5	97.7	98.3	97.3	99.2	99.3
6 <i>Saxidomus purpuratus</i>	2.1	1.4	10.8	1.8	1.5	***	97.8	98.2	96.7	97.2	96.2	98.0	98.2
7 <i>Anomalocardia auberiana</i>	2.7	0.7	11.7	1.1	1.2	1.9	***	98.0	97.5	99.1	98.1	99.0	99.1
8 <i>Callista chione</i>	2.3	1.2	11.1	1.6	1.5	1.5	1.7	***	96.8	98.2	96.4	98.4	98.4
9 <i>Chamelea striatula</i>	2.8	1.0	11.4	0.6	1.3	2.4	1.6	2.0	***	98.1	96.9	98.1	98.1
10 <i>Mercenaria mercenaria</i>	2.4	0.3	11.2	0.8	0.8	1.7	0.9	1.4	1.2	***	97.8	99.5	99.4
11 <i>Periglypta listeri</i>	3.7	1.6	12.5	2.1	2.2	2.9	2.0	2.8	2.5	1.8	***	97.8	98.1
12 <i>Venus verrucosa</i>	2.2	0.2	11.0	0.6	0.7	1.6	0.8	1.3	1.0	0.4	1.6	***	99.6
13 <i>Chione elevata</i>	1.9	0.4	11.0	0.6	0.7	1.5	0.7	1.2	1.1	0.6	1.7	0.4	***

注: 对角线上序列为相似百分比, 对角线下为序列差异百分比。

Note: Percent identity of sequences are above diagonal; percent divergence of the sequences are below diagonal.

2.2 帘蛤科贝类18S rRNA基因全序列的聚类分析

以 18S rDNA 全序列为标记, 以异韧带亚纲 (Anomalodesmata) 笋螂目 (Pholadomyoidea) 的 *Lyonsia floridana* (AF120540) 和 *Cardiomya costellata* (AF120543) 为外群, 采用相邻连接法 (NJ) 和最大简约法 (MP) 构建了帘蛤科贝类的系统发育树 (图 3)。

由图 3 可见, 根据 18S rRNA 基因全序列构建的 MP 树和 NJ 树拓扑结构基本一致, 其拓扑结构显示: 帘蛤科 13 物种聚为一枝与外群分开; 在帘蛤科贝类中, 文蛤亚科 (Meretricinae) 的文蛤首先与其他帘蛤分开, 单独形成 1 枝。此后, 青蛤亚科 (Cyclininae) 的青蛤、仙女蛤亚科 (Callistinae) 的紫石房蛤、卵蛤亚科 (Pitarinae) 的 *Callista chione*、缀锦蛤亚科 (Tapetinae) 的菲律宾蛤仔先后分别形成独立 1 枝, 上述各枝的结点自展值 (bootstrap value, BPs) 均较高。而雪蛤亚科 (Chioninae) 的江户布目蛤、*Chione elevata*、*Chamelea striatula*、*Anomalocardia auberiana* 和硬壳蛤、帘蛤亚科 (Venerinae) 的 *Venus verrucosa* 和 *Periglypta listeri*、镜蛤亚科 (Dosiniinae) 的薄片镜蛤形成 1 个聚类簇。

3 讨论

3.1 帘蛤科18S rDNA序列

真核生物 18S rDNA 序列长度一般为

1 800 bp 左右, 如饰贝科 (Dreissenidae) 的沙筛贝 (*Mytilopsis sallei*) 为 1 860 bp^[21], 25 个糠虾科 (Mysidae) 物种为 1 788~1 811 bp^[22]。本研究中 6 种帘蛤 18S rDNA 序列全长 1 829~1 900 bp (含 -20 调控区), 基本在这一范围之内, 序列中 A、T、C 和 G 碱基的平均含量分别为 24.0%、24.0%、24.2% 和 27.8%, 表明碱基组成基本上无偏异, 这与帘蛤科线粒体 16S rRNA 和 COI 基因富含 A+T 的碱基组成明显不同^[1,8]。碱基组成偏异对系统发育的重建有很大影响, 由于 18S rDNA 的碱基组成无偏异, 因此认为, 本研究中系统发育的重建没有受到碱基组成偏异的影响或影响甚微。

18S rRNA 基因序列相对保守, 但本研究中文蛤与帘蛤科其他物种的序列差异百分比高达 10.8%~12.5%, 而除文蛤之外的其他物种之间一般不超过 3% (表 2), 表明帘蛤科中文蛤的分歧时间较早。此外, 文蛤 18S rRNA 基因全长 1 900 bp, 明显大于其他帘蛤科贝类, 18S rDNA 的长度多态性也可能对分析结果造成一定的影响, 因此进一步研究需要借助二级结构进行校正, 去除一些多变区, 得到基于二级结构的对位排列才能提供更有效的系统发育信息。

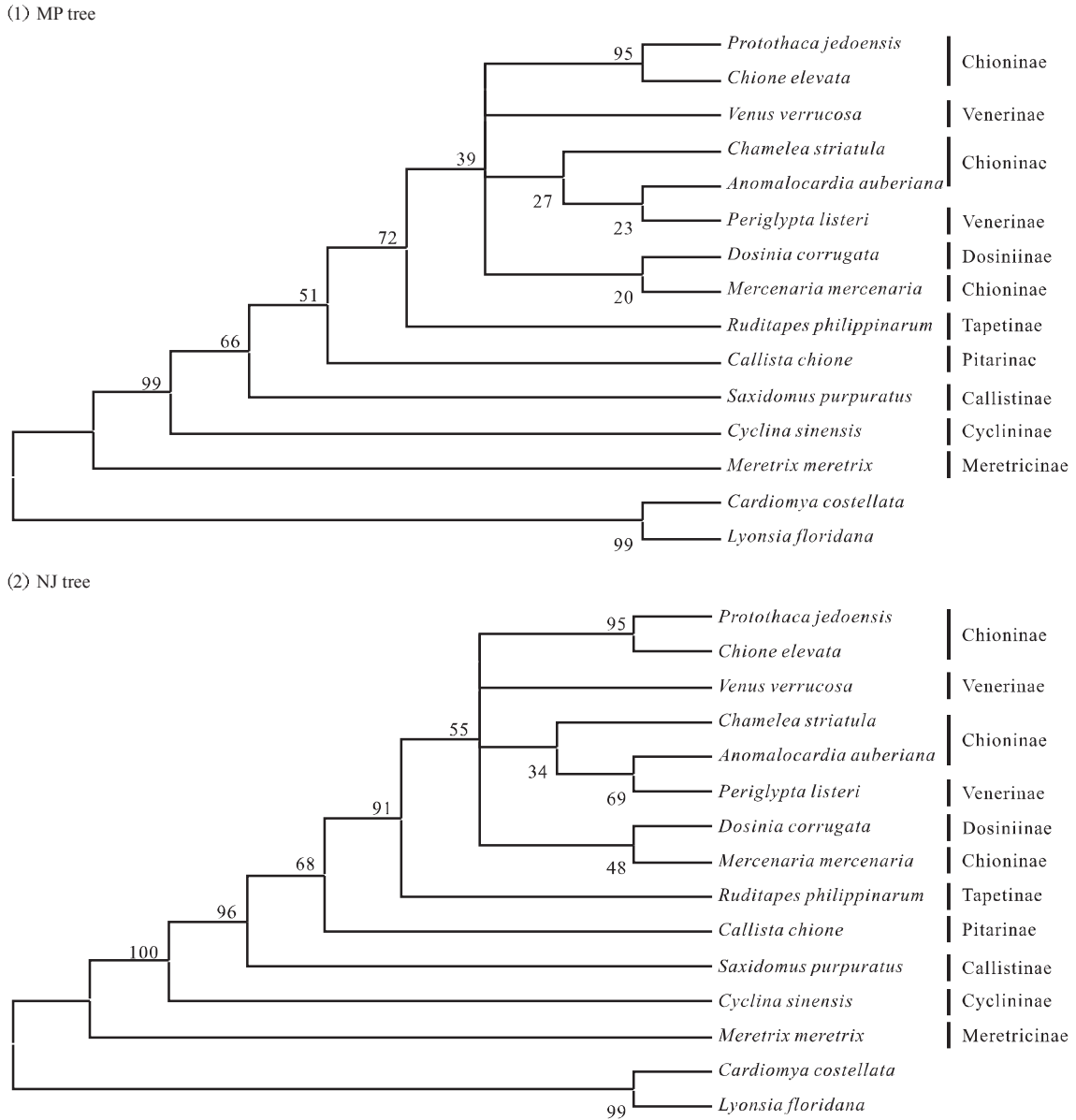


图 3 基于 18S rRNA 基因序列构建的帘蛤科贝类的系统发育树, 数字代表自展值, 参数: kimara' s 模型, 100 000 次重复. 以异韧带亚纲 (Anomalodesmata) 笋螂目 (Pholadomyoidea) 的 *Lyonsia floridana* 和 *Cardiomya costellata* 为外群

Fig. 3 Phylogenetic tree based on 18S rRNA gene sequences of Veneridae clams, with *Lyonsia floridana* and *Cardiomya costellata* as outgroup using (1) Maximum Parsimony (MP) method and (2) Neighbor-Joining (NJ) method

The distance matrix was calculated using the Kimara' s 2-parameter model, numbers represents bootstrap percentages. The topologies were tested using bootstrap analyses (10 000 replicates).

3.2 帘蛤科的系统发育及各亚科的进化关系

在帘蛤科中, 帘蛤亚科 (Venerinae) 与雪蛤亚科 (Chioninae) 的进化关系一直存在争议, Shimamoto 根据贝壳的显微结构把帘蛤科分为 3 种类型, 其中帘蛤亚科与雪蛤亚科由于具有相似的显微结构而

被划为第一种类型 (Type I)^[23]。Canapa 等^[1] 通过 16S rDNA 序列研究认为雪蛤亚科的 *Chamelea* 属可能划入帘蛤亚科更合适, 雪蛤亚科最近才从帘蛤亚科分化出来。由于 2 个亚科有相似的形态特征, 故最近有学者提出把它们合并在一起, 形成广泛

的 Venerinae 亚科, 由 41 个属组成 (包括 Keen 分类系统中的 Venerinae 亚科 10 个属和 Chioninae 亚科 31 个属), 总数超过 180 种^[24]。但 Kappner 等通过对 13 个帘蛤亚科、24 个雪蛤亚科和 18 个其他亚科的 55 种帘蛤科贝类的 COI、16S rDNA 和 H3 序列的分析, 认为帘蛤亚科与雪蛤亚科是 2 个分离的亚科, 但一些属的界限可能有误, 认为雪蛤亚科的 *Chamelea* 和 *Clausinella* 2 个属应划入帘蛤亚科, 作为帘蛤属 (*Venus*) 的姊妹属^[4]。本研究采用 18S rDNA 全序列对帘蛤科 8 个亚科 13 个属贝类的系统发育进行了研究, 结果显示, 帘蛤亚科与雪蛤亚科的亲缘关系较近, 分歧时间较晚 (图 3), MP 树和 NJ 树都表明 2 个亚科中一些属划定确实存在问题, 可能没有真正反应其进化关系。本研究结果也支持 Canapa 和 Kappner 等将 *Chamelea* 属划入帘蛤亚科的观点, 从图 3 中还可以看到, 硬壳蛤 (*M. mercenaria*) 尽管属于雪蛤亚科, 但却首先与镜蛤亚科的薄片镜蛤 (*D. corrugata*) 聚在一起, 表明其与雪蛤亚科的关系较远, 这与 Canapa 等^[1] 基于 16S rDNA 的研究结果完全相同。

综上所述, 本实验对 6 种帘蛤科贝类的 18S rDNA 全序列进行了分析, 并构建了帘蛤科贝类的系统发育树, 初步研究结果与传统分类既有相互印证的地方, 也存在一些分歧, 进一步的研究需要更多帘蛤科物种的 18S rDNA 序列数据, 同时应结合 rDNA 的二级结构对帘蛤科 18S rDNA 数据进行校正。

参考文献:

- [1] Canapa A, Schiaparelli S, Marota I, et al. Molecular data from the 16S rRNA gene for the phylogeny of Veneridae (Mollusca: Bivalvia) [J]. *Marine Biology*, 2003, 142 (6): 1125-1130.
- [2] Keen M. Veneridae. In: Moore RC (Ed) *Treatise on invertebrate paleontology* [M]. Lawrence, The Geological Society of America and University of Kansas Press, 1969: 617-688.
- [3] 庄启谦. 中国动物志 - 软体动物门: 双壳纲: 帘蛤科 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 1-10.
- [4] Kappner I, Bieler R. Phylogeny of venus clams (Bivalvia: Veneridae) as inferred from nuclear and mitochondrial gene sequences [J]. *Molecular Phylogenetic Evolution*, 2006, 40 (2): 317-331.
- [5] Kim JJ, Kim SC, Hong HC. Molecular phylogeny of veneridae (Bivalvia Heteroconchia) on the basis of partial sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I [J]. *Korean J Malacol*, 2004, 20 (2): 171-181.
- [6] 李太武, 张安国, 苏秀榕, 等. 不同花纹文蛤 (*Meretrix meretrix*) 的 ITS2 分析 [J]. *海洋与湖沼*, 2006, 37 (2): 132-137.
- [7] Cheng HL, Meng XP, Ji HJ, et al. Sequence analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacers and 5.8S ribosomal RNA gene in representatives of the clam family Veneridae (Mollusca: Bivalvia) [J]. *J Shellfish Res*, 2006, 25 (3): 833-840.
- [8] 程汉良, 夏德全, 吴婷婷, 等. 6 种帘蛤科贝类及 4 个地理种群文蛤线粒体 COI 基因片段序列分析 [J]. *海洋学报*, 2007, 29 (5): 109-116.
- [9] Remerie T, Bulckaen B, Calderon J, et al. Phylogenetic relationships within the Mysidae (Crustacea, Peracarida, Mysida) based on nuclear 18S ribosomal RNA sequences [J]. *Mol Phylog Evol*, 2004, 32: 770-777.
- [10] García-Varela M, Cummings MP, Pérez-Ponce de León G, et al. Phylogenetic analysis based on 18S ribosomal RNA gene sequences supports the existence of class polyacanthocephala (acanthocephala) [J]. *Mol Phylog Evol*, 2002, 23: 288-292.
- [11] Manylov O G, Vladychenskaya N S, Milyutina I A, et al. Analysis of 18S rRNA gene sequences suggests significant molecular differences between Macrotrichida and Chaetonotida (Gastrotricha) [J]. *Mol Phylog Evol*, 2004, 30: 850-854.
- [12] 鲁义善, 聂品. 淡水鱼类粘孢子虫的 18SrDNA 分子系统学研究 [J]. *水生生物学报*, 2004, 28 (6): 587-591.
- [13] 刘殿锋, 蒋国芳. 基于 18S rDNA 的蝗总科分子系统发育关系研究及分类系统探讨 [J]. *昆虫学报*, 2005, 48 (2): 232-241.
- [14] 沙忠利, 朱朝东, Murphy R W, 等. 基于 18S 基因序列的姬小蜂分子系统发育 [J]. *动物学报*, 2006, 52 (2): 288-301.
- [15] 门荣新, 杨官品, 刘永健, 等. 胶州湾浮游桡足类 18S 核糖体 RNA 基因 (18S rDNA) 扩增及序列变异初步研究 [J]. *海洋与湖沼*, 2005, 31 (1): 88-96.
- [16] Yu N, Zhao M Y, Chen L Q, et al. Phylogenetic relationship of Podocopida (Ostracoda: Podocopa) based on 18S ribosomal rDNA sequences [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2006, 25 (2): 99-108.
- [17] Dreyer H, Steiner G, Harper EM. Molecular phylogeny of Anomalodesmata (Mollusca: Bivalvia) inferred from 18S

- rRNA sequences [J]. *Zoolog J Linnean Soc*, 2003, 139: 229-246.
- [18] Masato O. Functional morphology and phylogeny of the rock-boring bivalves *Leiosolenus* and *Lithophaga* (Bivalvia: Mytilidae): a third functional clade [J]. *Mar Biology*, 2007, 150(5): 853-860.
- [19] Canapa A, Barucca M, Marinelli A, et al. A molecular phylogeny of Heterodonta (Bivalvia) based on small ribosomal subunit RNA sequences [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2001, 21(1): 156-161.
- [20] 黄勃, 方再光, 刘均玲, 等. 耳鲍 (*Haliotis asinina*) 核糖体小亚基 (18S rRNA) 编码基因的克隆与序列分析 [J]. *海洋与湖沼*, 2007, 38(3): 212-216.
- [21] 周细平, 杨丽, 蔡立哲, 等. 3个海域沙筛贝遗传差异的 DNA 分子标记研究 [J]. *台湾海峡*, 2006, 25(3): 336-342.
- [22] Remerie T, Bulckaen B, Calderon J, et al. Phylogenetic relationships within the Mysidae (Crustacea, Peracarida, Mysida) based on nuclear 18S ribosomal RNA sequences [J]. *Mol Phylog Evol*, 2004, 32: 770-777.
- [23] Shimamoto M. Phylogenetic implications of shell microstructures and amino acid compositions in the Veneridae (Bivalvia, Mollusca) [M]. *Bull Inst Oceanogr (Monaco) 14 [specissue]*, 1996: 263-270.
- [24] Coan E V, Valentich S P, Bernard F R. Bivalve seashells of Western North America: marine bivalve mollusks from Arctic Alaska to Baja California [M]. *Sta Barbara Mus Nat Hist Contrib Science 1*, 2000: 1-28.

Sequence analysis of 18S rRNA gene of six Veneridae clams (Mollusca: Bivalvia)

CHENG Han-liang, PENG Yong-xing, WANG Fang, MENG Xue-ping, YAN Bin-lun, DONG Zhi-guo

(Key Laboratory of Marine Biotechnology of Jiangsu Province, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China)

Abstract: A nucleotide sequence analysis of 18S rRNA gene was conducted among six species in Veneridae, *Meretrix meretrix* L. 1758, *Cyclina sinensis* G. 1791, *Protothaca jedoensis* L. 1874, *Dosinia corrugata* R. 1850, *Ruditapes philippinarum* A. 1850 and *Ruditapes philippinarum* A., 1850 to determine the utility of this sequence in identifying species and phylogenetic structure. The result showed that 18S rDNA of six species were 1 900 bp, 1 838 bp, 1 831 bp, 1 831 bp, 1 829 bp and 1 833 bp in length, respectively. The average contents of A, T, C and G in these 18S rRNA gene were 24.0%, 24.0%, 24.2% and 27.8%. Analysis of sequence variation across six species revealed 210 variable sites, among which 28 were parsim-informative sites; the transition to transversion substitution ratio (si/sv) was 1.4 (46/32). The 18S rDNA sequences of 6 Veneridae species in this study together with 7 Veneridae species downloaded from GenBank were aligned using program MegAlign of DNASTar package by Clustal W method. The percentage of sequence identity across 13 species were from 88.7% (*M. meretrix* and *Periglypta listeri*) to 99.7% (*D. corrugata* and *Venus verrucosa*). The percentage of sequence divergence between *M. meretrix* and other 12 species was more than 10%, meanwhile this value was not more than 3% between other 12 species. The phylogenetic tree of Veneridae clams was reconstructed using 18S rRNA gene complete sequences as markers, using MP and NJ method with *Lyonsia floridana* and *Cardiomya costellata* as outgroups. Tree topologies indicated that the species belonging to subfamilies of Chioninae, Venerinae and Dosiniinae formed a clade firstly, then the species belonging to Tapetinae, Pitarinae, Callistinae, Cyclininae and Meretricinae formed a monophyletic group respectively, all Veneridae species formed a clade finally. The results reveal that the 18S rRNA gene is an appropriate marker for studies of phylogeny of the Veneridae clams at subfamily level. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(4): 559-567]

Key words: Veneridae; 18S rRNA gene; phylogeny