

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.17392

中国沿海紫蛤属的系统发育

蒋丽莎, 李琪, 孔令锋

中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003

摘要: 紫蛤属(*Sanguinolaria*)贝类具有很高的经济价值, 长期以来却存在着物种鉴定错误、种名使用混乱、同物异名等一系列问题, 关于其系统分类和演化问题的研究较少。为探究中国沿海紫蛤属的系统发育关系, 本研究利用两个线粒体基因(COI 和 16S rRNA), 以及两个核基因(H3 和 28S rRNA)的部分序列, 对来自中国沿海紫蛤属 3 亚属 9 种紫蛤 61 个个体进行系统发育分析。基于 4 个基因片段联合数据集 T12(剔除 COI 第三位密码子位置)构建系统发育树。结果表明, 两个线粒体基因片段 GC 含量明显低于 AT 含量, 表现出对 AT 偏斜, 两个核基因表现出对 GC 的偏斜。4 个基因片段(COI、16S rRNA、H3 和 28S rRNA)的颠换与转换比值分别为 5.073、3.042、1.564 和 1.480, 均远高于系统分析的临界值 0.4, 能够提供有效的系统发育信息。基于 4 个基因片段的遗传多样性分析表明, 9 种紫蛤均具有较高的核苷酸多样性($Pi < 0.05$)与单倍型多态性($Hd < 0.5$)。基于 COI 基因片段的紫蛤属种内遗传距离为 0~0.016, 种间的平均遗传距离为 0.087~0.331, 其中卵紫蛤(*Sanguinolaria ovalis*)与中国紫蛤(*Sanguinolaria chinensis*)遗传距离最小, 仅为 0.087。利用最大似然法(maximum likelihood, ML)和贝叶斯法(Bayesian inference, BI)构建的系统发生树拓扑结构一致, 分化为 3 大支, 与形态学分类的三个亚属分别对应。中国紫蛤和卵紫蛤在系统树上首先聚为一支, 表明其亲缘关系最近。本研究结果阐明了中国沿海紫蛤属贝类的遗传多样性及其系统演化关系, 为紫蛤属贝类种质资源的保护及可持续利用提供了科学依据。

关键词: 紫蛤属; COI; 16S rRNA; H3; 28S rRNA; 系统发育

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)05-0936-13

紫蛤属(*Sanguinolaria*)贝类隶属于软体动物门(Mollusca)、双壳纲(Bivalvia)、帘蛤目(Venerioida)、樱蛤总科(Tellinacea)、紫云蛤科(Psammodiidae)。我国已报道紫蛤属贝类 15 种^[1-2], 该属贝类全部为海产, 肉质鲜美, 具有很高的经济价值^[3-4]。目前, 国内外学者对紫蛤的生态生理、增养殖及药用价值开展了研究^[5-7]。

长期以来, 我国一些紫蛤属物种存在物种鉴定错误、种名使用混乱、分类不明确等一系列问题。徐凤山等^[1]描述了紫蛤属 3 个亚属共 14 种, 其中沙蛤亚属(*Psammotaea*)12 种, 圆滨蛤亚属(*Nutallia*)仅 1 种为紫彩血蛤(*Sanguinolaria olivacea*), 以及海南血蛤亚属(*Hainania*)1 种为张玺圆滨蛤(*Sanguinolaria tchangsi*)。刘瑞玉^[2]报道了 10

种紫蛤属贝类, 且将紫彩血蛤和张玺圆滨蛤定为圆滨蛤属(*Nutallia*)。由于传统分类主要依靠形态特征, 而量化紫蛤属贝类某些形态学特征极其困难(如壳色等), 且目前还没有形成统一的标准^[8-9], 因而造成鉴定困难或不准确。而系统分类和演化问题由于缺乏遗传方面的研究至今尚未得到解决。

近年来, 分子系统发生学的发展为解决紫蛤属贝类系统分类和演化等问题提供了新的方法。线粒体基因广泛分布于细胞中, 具有无重组、母系遗传、进化速度快等特点, 因而被广泛应用于群体遗传学、物种鉴定、系统发生学等领域的研究^[10], 其中 COI 和 16S rRNA 基因已应用于紫蛤属的种质量鉴定中^[11], 而核基因分子标记 H3 和 28S rRNA 也被成功应用于异齿亚纲的系统学研究

收稿日期: 2017-11-07; 修订日期: 2017-12-28。

基金项目: 山东省重点研发计划项目(2016ZDJS06A06); 中央高校基本科研业务费专项(201762014)。

作者简介: 蒋丽莎(1991-), 女, 硕士研究生, 主要从事贝类遗传育种研究。E-mail: 957924763@qq.com

通信作者: 李琪, 教授, 主要从事贝类遗传育种研究。E-mail: qili66@ouc.edu.cn

利用形态学特征进行种类鉴定, 样品保存于 95 % 酒精中。

1.2 DNA 提取

根据改良的苯酚-氯仿法^[16], 每个样品切取 10 mg 闭壳肌组织, 进行 DNA 提取。DNA 提取完成后, 加入 1×TE 缓冲液 50 μL 溶解配成母液备用。采用浓度为 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量; 使用 nanodrop 检测 DNA 浓度, 并取母液稀释配制浓度为 100 ng/μL 的工作液。

1.3 引物设计、PCR 扩增与 DNA 测序

由于无脊椎动物线粒体 DNA 通用引物不能扩增所有紫蛤属贝类, 本研究开发了引物 1031F/1031R 用于张玺圆滨蛤、卵紫蛤和中国紫蛤 COI 序列的扩增, 引物 O-F/O-R 和 D-F/D-R 分别用于紫彩血蛤和双线紫蛤 COI 序列的扩增, 引物 PEF/PER 用于小紫蛤 16S rRNA 序列的扩增 (表 2)。PCR 反应采用 50 μL 体系: 5 μL 10×PCR buffer, 8 μL dNTP(10mmol/L), 1 μL 正向引物 (10 μmol/L), 1 μL 反向引物(10 μmol/L), 1 μL 模板 DNA(100 ng/μL), 0.5 μL Taq 酶(5 U/μL, TaKaRa), 使用灭菌蒸馏水将 PCR 体系补充为 50 μL。PCR 反应条件为: 首先 94℃预变性 3 min, 随后 32 个

循环包括: 94℃变性 30 s, 50℃退火 (引物 LCO1490/HCO2198 退火温度为 48℃) 45 s, 72℃延伸 45 s, 最后 72℃延伸 7 min。PCR 结束后取 2 μL 扩增产物于 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。为保证测序准确性, 样品均进行双向测序。

1.4 数据处理及系统发育树构建

将测得的序列用 DNASTAR 5.01 软件包中的 SeqMan 软件(<http://www.DNASTAR.com>)进行正反向拼接, 参数设为默认值, 并人工检查核对、修正错误拼接。获得的序列通过 BLAST(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)比较, 然后采用 BioEdit v7.0 软件^[21]中的 CLUSTAL W^[22]程序对序列进行多重比对。使用 MEGA 5.0 软件^[23]计算 4 个基因片段的碱基含量与种间和种内 kimura2-paramter 遗传距离。紫蛤属 9 个物种的遗传多样性参数使用 DnaSp 5.0 软件^[24]计算。

各分子标记突变的饱和度使用 DAMBE 软件^[25]检测。将 COI、16S rRNA、H3 和 28S rRNA 序列片段在 SequenceMatrix1.7.8 软件^[26]中合并与检查。使用 PAUP 4.0b10 软件^[27]对 4 个基因片段进行同质性检验。核苷酸序列的最佳碱基替换模型使用 jMODELTEST^[28]进行计算。选择同属于帘

表 2 PCR 扩增引物序列
Tab. 2 The sequences of the PCR primers used in this study

位点 locus	引物 primer	序列(5'-3') sequence(5'-3')	退火温度/℃ annealing temperature	参考文献 reference
COI	1031F	AGGATGATAATGCGAACTGA	50	本研究 this study
	1031R	GCGTGCGAAATAATACCAA	50	本研究 this study
	O-F	GATTATTACCTCCTGCTATTGC	50	本研究 this study
	O-R	CCTCTTACGAACTACACCTC	50	本研究 this study
	LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	48	Folmer 等 ^[17]
	HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	48	Folmer 等 ^[17]
	D-F	TCACAAGGATATTGGTAGGT	50	本研究 this study
	D-R	ATGTAGTTCGTTGGGGAG	50	本研究 this study
16S rRNA	PEF	CTAAGGTAGCATAATAGTTCGTCCC	50	本研究 this study
	PER	GCAAACCCTAGCCTCAAATAAG	50	本研究 this study
	ar	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	50	Palumbi ^[18]
	br	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT	50	Palumbi ^[18]
28S rRNA	28sC1	ACCCGCTGAATTTAAGCAT	50	Hassouna 等 ^[19]
	28sD2	TCCGTGTTTCAAGACGG	50	Hassouna 等 ^[19]
H3	H3F	ATGGCTCGTACCAAGCAGACVGC	50	Colgan 等 ^[20]
	H3R	ATATCCTTRGGCATRATRGRGAC	50	Colgan 等 ^[20]

蛤目并且与紫蛤属亲缘关系最近的菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)作为外群。用贝叶斯法(Bayesian inference, BI)和最大似然法(maximum likelihood, ML)构建系统进化树, BI 法通过软件 MrBayes 3.1.2^[29]进行运算, ML 法使用软件 PHYML version 2.4.3^[30]分析。

2 结果与分析

2.1 紫蛤 4 种分子标记的碱基组成

经过 PCR 扩增, 得到 COI、16S rRNA、H3

和 28S rRNA 的清晰扩增条带各 61 条共 244 条。经双向直接测序, 获得 COI、16S rRNA、H3 和 28S rRNA 的序列长度分别为 557~1482 bp、323~521 bp、272 bp 和 666 bp(表 3)。经过 CLUSTAL W 程序对序列进行多重比对后, 最终得到长度为 387 bp 的 COI, 272 bp 的 H3 序列, 和包含空位(gap)的 16S rRNA 序列 336 bp 以及 28S rRNA 序列 690 bp。

紫蛤属 9 个物种 COI、16S rRNA、H3 和 28S rRNA 序列的碱基组成分析结果表明, 紫蛤属 9 个

表 3 本研究中获得的序列
Tab. 3 List of sequences obtained for this study with GenBank accession numbers

属名 genus	种名 species	样品 ID ID of specimen	GenBank 注册号 GenBank accession no.			
			COI	16S rRNA	H3	28S rRNA
紫蛤属 <i>Sanguinolaria</i>	尖紫蛤 <i>acuta</i>	acuta.bh1	MG517136	MG517014	MG517197	MG517075
		acuta.bh2	MG517137	MG517015	MG517198	MG517076
		acuta.bh3	MG517138	MG517016	MG517199	MG517077
		acuta.bh4	MG517139	MG517017	MG517200	MG517078
		acuta.bhbt1	MG517130	MG517008	MG517191	MG517069
		acuta.bhbt2	MG517131	MG517009	MG517192	MG517070
		acuta.bhbt3	MG517132	MG517010	MG517193	MG517071
		acuta.zj1	MG517133	MG517011	MG517194	MG517072
		acuta.zj2	MG517134	MG517012	MG517195	MG517073
		acuta.zj3	MG517135	MG517013	MG517196	MG517074
紫蛤属 <i>Sanguinolaria</i>	中国紫蛤 <i>chinensis</i>	chinensis.cl1	MG517140	MG517018	MG517201	MG517079
紫蛤属 <i>Sanguinolaria</i>	双线紫蛤 <i>diphos</i>	diphos.pt1	MG517141	MG517019	MG517202	MG517080
		diphos.pt2	MG517143	MG517021	MG517204	MG517082
		diphos.pt3	MG517144	MG517022	MG517205	MG517083
		diphos.sy1	MG517142	MG517020	MG517203	MG517081
紫蛤属 <i>Sanguinolaria</i>	长紫蛤 <i>elongata</i>	elongata.bh1	MG517154	MG517032	MG517215	MG517093
		elongata.bh2	MG517155	MG517033	MG517216	MG517094
		elongata.bh3	MG517156	MG517034	MG517217	MG517095
		elongata.bh4	MG517157	MG517035	MG517218	MG517096
		elongata.hkdm1	MG517145	MG517023	MG517206	MG517084
		elongata.hkdm2	MG517146	MG517024	MG517207	MG517085
		elongata.hkdm3	MG517147	MG517025	MG517208	MG517086
		elongata.hkdm4	MG517148	MG517026	MG517209	MG517087
		elongata.hn1	MG517149	MG517027	MG517210	MG517088
		elongata.hn2	MG517150	MG517028	MG517211	MG517089
		elongata.hnsy1	MG517151	MG517029	MG517212	MG517090
		elongata.hnsy2	MG517152	MG517030	MG517213	MG517091
		elongata.hnsy3	MG517153	MG517031	MG517214	MG517092

(待续 to be continued)

(续表 3 Tab. 3 continued)

属名 genus	种名 species	样品 ID ID of specimen	GenBank 注册号 GenBank accession no.			
			COI	16S rRNA	H3	28S rRNA
紫蛤属 <i>Sanguinolaria</i>	小紫蛤 <i>minor</i>	minor.bh1	MG517159	MG517037	MG517220	MG517098
		minor.ls1	MG517158	MG517036	MG517219	MG517097
		minor.ls2	MG517160	MG517038	MG517221	MG517099
		minor.ls3	MG517161	MG517039	MG517222	MG517100
		minor.ls4	MG517162	MG517040	MG517223	MG517101
		minor.ls5	MG517163	MG517041	MG517224	MG517102
紫蛤属 <i>Sanguinolaria</i>	紫彩血蛤 <i>olivacea</i>	minor.ls6	MG517164	MG517042	MG517225	MG517103
		olivacea.jm1	MG517165	MG517043	MG517226	MG517104
		olivacea.lyg1	MG517168	MG517046	MG517229	MG517107
		olivacea.lyg2	MG517169	MG517047	MG517230	MG517108
		olivacea.lyg3	MG517170	MG517048	MG517231	MG517109
		olivacea.lyg4	MG517171	MG517049	MG517232	MG517110
		olivacea.lyg5	MG517172	MG517050	MG517233	MG517111
		olivacea.rz1	MG517166	MG517044	MG517227	MG517105
紫蛤属 <i>Sanguinolaria</i>	卵紫蛤 <i>ovalis</i>	olivacea.rz2	MG517167	MG517045	MG517228	MG517106
		ovalis.cl1	MG517173	MG517051	MG517234	MG517112
		ovalis.cl2	MG517174	MG517052	MG517235	MG517113
		ovalis.cl3	MG517175	MG517053	MG517236	MG517114
		ovalis.cl4	MG517176	MG517054	MG517237	MG517115
紫蛤属 <i>Sanguinolaria</i>	张玺圆滨蛤 <i>tchangsii</i>	ovalis.cl5	MG517177	MG517055	MG517238	MG517116
		tchangsii.bhbt1	MG517178	MG517056	MG517239	MG517117
		tchangsii.bhbt2	MG517179	MG517057	MG517240	MG517118
		tchangsii.bhbt3	MG517180	MG517058	MG517241	MG517119
		tchangsii.bhbt4	MG517181	MG517059	MG517242	MG517120
紫蛤属 <i>Sanguinolaria</i>	绿紫蛤 <i>virescens</i>	tchangsii.bhbt5	MG517182	MG517060	MG517243	MG517121
		virescens.bh1	MG517183	MG517061	MG517244	MG517122
		virescens.bh2	MG517184	MG517062	MG517245	MG517123
		virescens.bh3	MG517185	MG517063	MG517246	MG517124
		virescens.ls1	MG517188	MG517066	MG517249	MG517127
		virescens.ls2	MG517189	MG517067	MG517250	MG517128
		virescens.ls3	MG517190	MG517068	MG517251	MG517129
		virescens.wc1	MG517186	MG517064	MG517247	MG517125
		virescens.wc2	MG517187	MG517065	MG517248	MG517126

物种的 2 个线粒体基因 COI 和 16S rRNA 序列的 GC 含量分别为 41.17%和 41.01%, 明显低于 AT 含量, 其中紫彩血蛤的 GC 含量最低, 分别为 38.95%和 38.64%。2 个核基因 H3 和 28S rRNA 序列的 GC 含量分别为 59.37%和 63.96%, 明显高于 AT 含量, H3 基因片段中长紫蛤 GC 含量最高, 为 62.92%, 28S rRNA 基因片段中绿紫蛤 GC 含量最高, 为 65.47%, 长紫蛤 64.98%次之。4 种分子标

记序列的碱基分布频率如表 4 所示, 2 个线粒体基因序列胸腺嘧啶(T)含量明显高于 2 个核基因, 胞嘧啶(C)含量明显低于核基因, 28S rRNA 序列拥有最高的 GC 含量, 其腺嘌呤(A)含量明显低于其他 3 个基因序列, 而鸟嘌呤(G)含量明显高于其他 3 个基因序列。

2.2 遗传多样性分析

4 种分子标记序列的遗传多样性参数见表 5。

表 4 COI、16S rRNA、H3 和 28S rRNA
基因片段碱基分布频率
Tab. 4 Nucleotide frequencies of COI、16S rRNA、
H3 and 28S rRNA gene fragments

基因 gene	碱基组成/% base composition				GC 含量/% GC content
	胸腺嘧啶 (T)	胞嘧啶 (C)	腺嘌呤 (A)	鸟嘌呤 (G)	
COI	38.82	17.98	20.01	23.19	41.17
16S rRNA	30.02	13.94	28.98	27.07	41.01
H3	17.21	31.20	23.41	28.17	59.37
28S rRNA	16.95	28.24		35.72	63.96

表 5 COI、16S rRNA、H3 和 28S rRNA
基因片段的遗传多样性参数
Tab. 5 Genetic diversity parameters of COI, 16S rRNA,
H3 and 28S rRNA gene fragments

基因 gene	单倍型 number of haplotypes	单倍型 多态性 haplotype diversity	平均核苷酸 差异 average nu- cleotide dif- ference	核苷酸多样 性指数 nucleotide diversity
16S rRNA	20	1.0000	52.5842	0.4045
28S rRNA	14	0.9130	37.7546	0.0569
COI	23	0.9399	63.7721	0.4141
H3	22	0.9388	18.3620	0.0673

在 16S rRNA 序列中共检测到 130 个多态位点, 包括 129 个简约信息位点和 1 个单一信息位点, 插入/缺失位点 26 个, 碱基转换与颠换的平均比值 $R=3.042$ 。在 28S rRNA 基因片段中共检测到 154 个多态位点, 包括 128 个简约信息位点和 26 个单一信息位点, 插入/缺失位点 21 个, 碱基转换与颠换的平均比值 $R=1.480$ 。对两个蛋白质编码基因序列的分析结果中, COI 基因序列共检测到 154 个多态位点, 包括 153 个简约信息位点和 1 个单一信息位点, 无插入/缺失位点, 碱基转换与颠换的平均比值 $R=5.073$; H3 基因片段共检测到 56 个多态位点, 包括 52 个简约信息位点和 4 个单一信息位点, 无插入/缺失位点, 碱基转换与颠换的平均比值 $R=1.564$ 。在 COI 和 H3 两个蛋白质编码基因片段中, 检测到的突变主要为同义突变, 核苷酸替代主要发生在密码子第 3 位上的转换。

基于 COI 序列的紫蛤属 9 个物种种内和种间平均遗传距离分析结果显示, 种内遗传距离介于 0~0.016, 种间的平均遗传距离为 0.087~0.331, 其

中卵紫蛤与中国紫蛤遗传距离最小, 为 0.087; 紫彩血蛤与其他 8 种紫蛤相比, 与尖紫蛤之间的遗传距离最小, 为 0.258; 张玺圆滨蛤与其他 8 种紫蛤相比, 与长紫蛤的遗传距离最小, 为 0.219(表 6)。基于 16S rRNA 基因片段的种内平均遗传距离介于 0.001~0.011, 种间平均遗传距离介于 0.008~0.393, 卵紫蛤与中国紫蛤距离最小, 为 0.008; 紫彩血蛤与其他 8 种紫蛤相比, 与尖紫蛤之间的遗传距离最小, 为 0.318; 张玺圆滨蛤与其他 8 种紫蛤相比, 与中国紫蛤的遗传距离最小, 为 0.245(表 7)。基于 H3 基因片段计算的种内平均遗传距离介于 0~0.009, 种间平均遗传距离为 0.004~0.140, 卵紫蛤与中国紫蛤遗传距离最小, 为 0.004; 紫彩血蛤与其他 8 种紫蛤相比, 与长紫蛤之间的遗传距离最小, 为 0.129; 张玺圆滨蛤与其他 8 种紫蛤相比, 与绿紫蛤的遗传距离最小, 为 0.091(表 8)。基于 28S rRNA 基因片段计算得出种内平均遗传距离介于 0~0.019, 种间平均遗传距离为 0.006~0.191, 紫彩血蛤与其他 8 种紫蛤相比, 与卵紫蛤和绿紫蛤之间的遗传距离均为 0.136; 张玺圆滨蛤与其他 8 种紫蛤相比, 与绿紫蛤的遗传距离最小, 为 0.064(表 9)。

4 种分子标记的碱基替换饱和性分析结果如图 1 所示, COI 序列的密码子第三位点的变异率为 90.70%, 转换和颠换与 GTR 遗传距离的线性相关关系显示这些位点已达到饱和^[21], COI 密码子第一、二位点的变异率为 14.06%, H3 序列密码子第三位点的变异率为 53.85%, 第一、二位点的变异率为 3.89%, 转换和颠换与 GTR 遗传距离的线性相关关系显示这些位点没有突变饱和, 16S rRNA 和 28S rRNA 序列的转换和颠换也没有突变饱和。因此, 系统进化分析建树时将碱基替代饱和的 COI 第三位密码子位置的数据剔除^[22]。

使用 SequenceMatrix 软件将 COI 第一、二位密码子位置的数据以及 16S rRNA、H3 和 28S rRNA 的序列合并, 得到含 gap 的总长度为 1555 bp 的联合数据集, 记为数据集 T12(data T12), 并用 PAUP 4.0b10 软件对数据集 T12 的 4 个片段进行同质性检验, $P=0.096$, 表明数据集 T12 可以用于研究紫蛤属的系统发育关系^[23]。

表 6 基于 COI 基因片段的紫蛤属 9 个物种的平均遗传距离

Tab. 6 Average genetic distances based on COI gene fragments of nine *Sanguinolaria* species

物种 species	1	2	3	4	5	6	7	8	种内遗传距离 intraspecies genetic distance
1 尖紫蛤 <i>S. acuta</i>									0.000
2 中国紫蛤 <i>S. chinensis</i>	0.193								n/c
3 双线紫蛤 <i>S. diphos</i>	0.226	0.176							0.001
4 长紫蛤 <i>S. elongata</i>	0.192	0.175	0.224						0.004
5 小紫蛤 <i>S. minor</i>	0.170	0.191	0.225	0.169					0.004
6 紫彩血蛤 <i>S. olivacea</i>	0.258	0.269	0.331	0.278	0.284				0.001
7 卵紫蛤 <i>S. ovalis</i>	0.216	0.087	0.164	0.196	0.216	0.314			0.005
8 张玺圆滨蛤 <i>S. tchangsii</i>	0.245	0.236	0.244	0.219	0.249	0.274	0.261		0.000
9 绿紫蛤 <i>S. virescens</i>	0.206	0.209	0.235	0.178	0.189	0.265	0.196	0.275	0.016

表 7 基于 16S rRNA 基因片段的紫蛤属 9 个物种的平均遗传距离

Tab. 7 Average genetic distances based on 16S rRNA gene fragments of nine *Sanguinolaria* species

物种 species	1	2	3	4	5	6	7	8	种内遗传距离 intraspecies genetic distance
1 尖紫蛤 <i>S. acuta</i>									0.004
2 中国紫蛤 <i>S. chinensis</i>	0.119								n/c
3 双线紫蛤 <i>S. diphos</i>	0.127	0.101							0.003
4 长紫蛤 <i>S. elongata</i>	0.218	0.199	0.188						0.000
5 小紫蛤 <i>S. minor</i>	0.186	0.208	0.190	0.248					0.011
6 紫彩血蛤 <i>S. olivacea</i>	0.318	0.383	0.377	0.393	0.363				0.002
7 卵紫蛤 <i>S. ovalis</i>	0.138	0.088	0.090	0.181	0.201	0.387			0.001
8 张玺圆滨蛤 <i>S. tchangsii</i>	0.256	0.245	0.257	0.290	0.294	0.325	0.252		0.007
9 绿紫蛤 <i>S. virescens</i>	0.169	0.192	0.186	0.157	0.208	0.368	0.165	0.251	0.005

表 8 基于 H3 基因片段的紫蛤属 9 个物种的平均遗传距离

Tab. 8 Genetic average distances based on H3 gene fragments of nine *Sanguinolaria* species

物种 species	1	2	3	4	5	6	7	8	种内遗传距离 intraspecies genetic distance
1 尖紫蛤 <i>S. acuta</i>									0.002
2 中国紫蛤 <i>S. chinensis</i>	0.020								n/c
3 双线紫蛤 <i>S. diphos</i>	0.016	0.011							0.000
4 长紫蛤 <i>S. elongata</i>	0.069	0.082	0.069						0.013
5 小紫蛤 <i>S. minor</i>	0.051	0.062	0.050	0.062					0.009
6 紫彩血蛤 <i>S. olivacea</i>	0.137	0.146	0.137	0.129	0.138				0.002
7 卵紫蛤 <i>S. ovalis</i>	0.024	0.004	0.015	0.077	0.058	0.141			0.000
8 张玺圆滨蛤 <i>S. tchangsii</i>	0.100	0.104	0.096	0.109	0.102	0.135	0.100		0.000
9 绿紫蛤 <i>S. virescens</i>	0.031	0.034	0.030	0.082	0.049	0.141	0.038	0.091	0.000

2.3 系统发育分析

采用 ML 和 BI 法分别构建基于数据集 T12 的系统发育关系，系统发生分析使用的核苷酸替换最佳模型为 GTR+I+G。利用 ML 法和 BI 法构

建的系统发育树拥有完全一致的拓扑结构。如图 2 所示，系统树显示紫蛤属 9 个物种聚为一支与外群分开，并分化为三大支，第一支由紫蛤属沙蛤亚属 7 个物种首先聚为一个单元，第二支由

表 9 基于 28S rRNA 基因片段的紫蛤属 9 个物种的平均遗传距离
Tab. 9 Genetic average distances based on 28S rRNA gene fragments of nine *Sanguinolaria* species

物种 species	1	2	3	4	5	6	7	8	种内遗传距离 intraspecies genetic distance
1 尖紫蛤 <i>S. acuta</i>									0.000
2 中国紫蛤 <i>S. chinensis</i>	0.067								n/c
3 双线紫蛤 <i>S. diphos</i>	0.015	0.064							0.000
4 长紫蛤 <i>S. elongata</i>	0.048	0.095	0.043						0.002
5 小紫蛤 <i>S. minor</i>	0.053	0.102	0.048	0.048					0.019
6 紫彩血蛤 <i>S. olivacea</i>	0.144	0.191	0.140	0.146	0.144				0.000
7 卵紫蛤 <i>S. ovalis</i>	0.009	0.057	0.006	0.039	0.046	0.136			0.000
8 张玺圆滨蛤 <i>S. tchangsii</i>	0.065	0.120	0.067	0.080	0.082	0.144	0.067		0.001
9 绿紫蛤 <i>S. virescens</i>	0.018	0.067	0.015	0.037	0.046	0.136	0.009	0.064	0.000

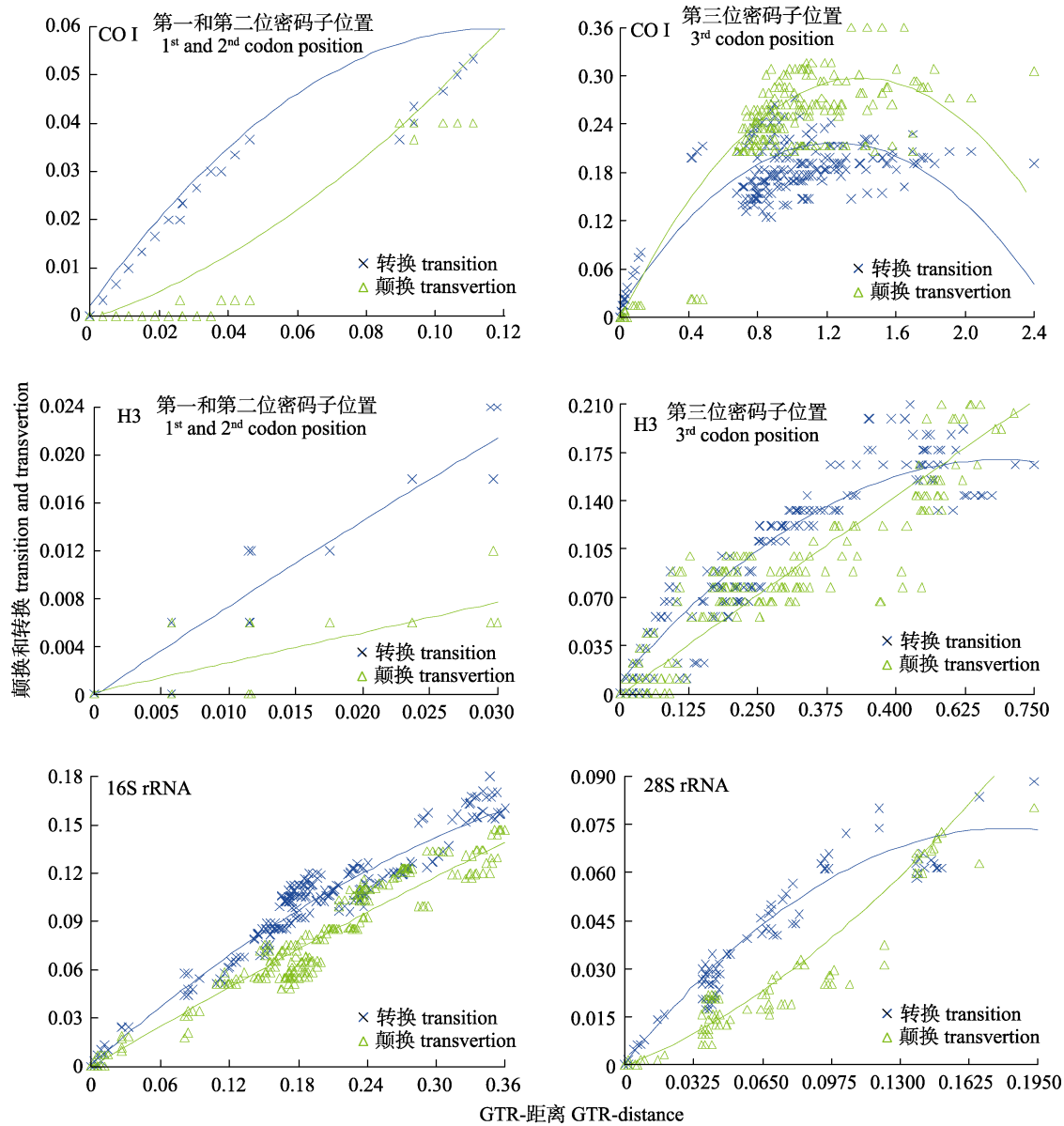


图 1 COI、16S rRNA、H3 和 28S rRNA 基因片段的碱基替换饱和性分析
Fig. 1 Saturation analysis plot for the COI, 16S rRNA, H3 and 28S rRNA transition and transversion substitutions of genus *Sanguinolaria*

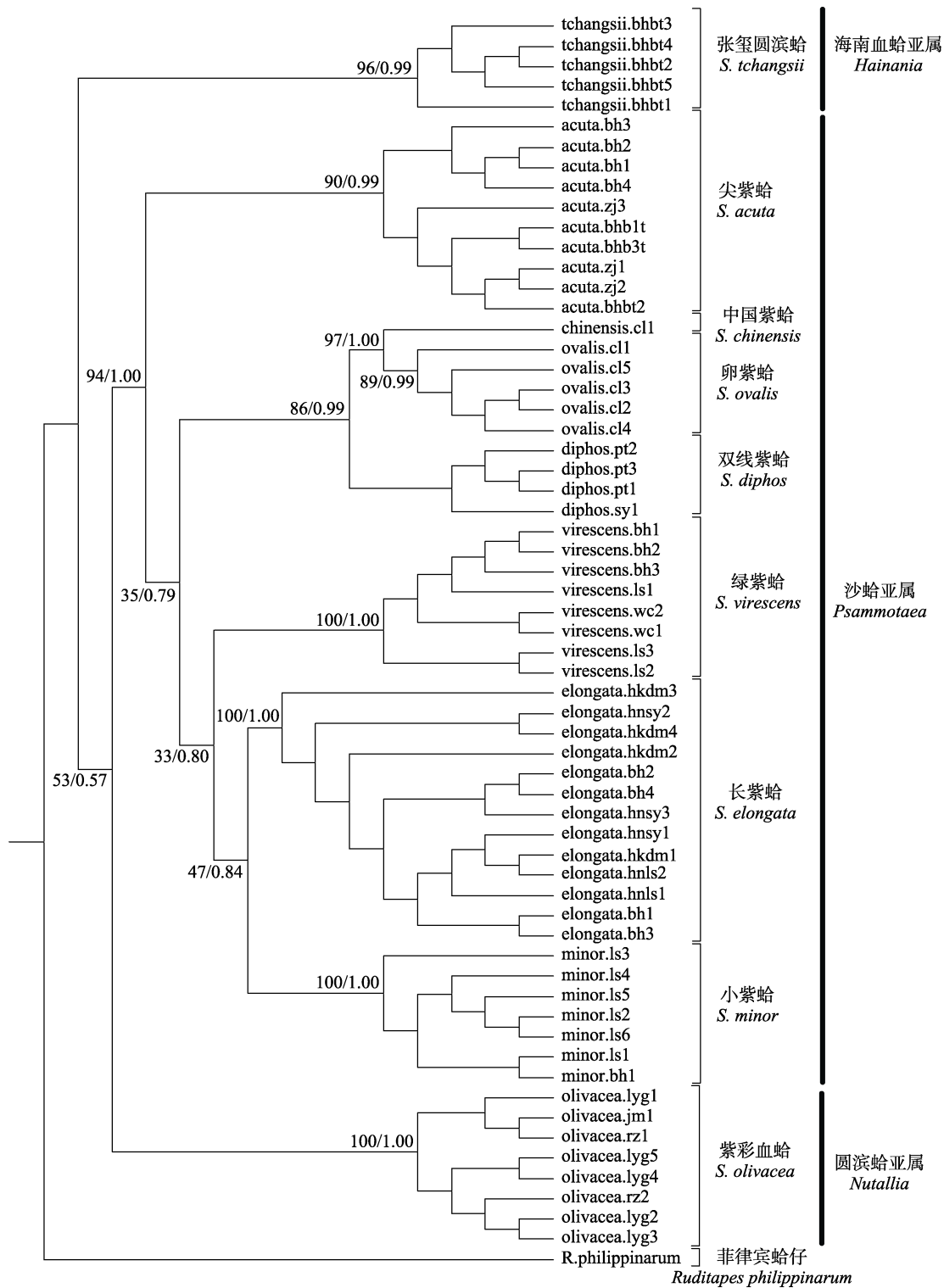


图 2 基于 T12 数据集的 9 种紫蛤间系统发育树
支持率和后验概率标注在分支上.

Fig. 2 Phylogenetic trees of nine *Sanguinolaria* species based on data T12
Numbers on the trees represent the values of supporting values and posterior probability values.

紫彩血蛤组成, 第三支由张玺圆滨蛤组成, 位于系统树基部的位 置。在第一支中, 尖紫蛤首先分化出来, 中国紫蛤和卵紫蛤亲缘关系最近, 并与双线紫蛤聚为一支, 同时长紫蛤和小紫蛤亲缘关

系近,与绿紫蛤聚成一支,即在沙蛤亚属内支持{[双线紫蛤+(中国紫蛤+卵紫蛤)]+[绿紫蛤+(长紫蛤+小紫蛤)]+尖紫蛤}的进化关系。

3 讨论

本研究紫蛤属 9 个物种线粒体基因 COI 和 16S rRNA 序列的 GC 含量明显低于 AT 含量,表现出对 AT 含量的偏斜,说明该序列碱基存在明显的偏向性,符合无脊椎动物线粒体 DNA 中普遍存在的现象^[24]。碱基替换是 DNA 序列最重要的进化方式, R 值(TS/TV)是序列进化的重要指标^[25]。Desalle 等^[26]认为,随着进化时间的延伸,允许转换和颠换的多重发生,并随时间的延长、遗传距离的增加,转换首先趋于饱和, R 值开始降低;时间继续延续,颠换发生数积累到临界值,序列差异最大, R 值达到最小。Holmquist^[27]提出系统学分析的临界值约为 0.4, 本研究中 4 个基因的 R 值均远高于此值,能够提供系统发育信息。造成这种高转换的结果的原因可能是在两个蛋白编码基因上,检测到的大部分突变是同义突变,核苷酸替代最普遍的情况是发生在密码子第三位上的转换^[28]。

通过对紫蛤属线粒体 DNA 序列变异分析发现,在亚属之间 16S rRNA 基因序列变异性比 COI 基因序列高,而在更低级的分类单元内正相反。如紫彩血蛤与其他 8 种紫蛤 COI 序列的遗传距离都小于 16S rRNA 序列;而由尖紫蛤、长紫蛤、中国紫蛤、双线紫蛤、卵紫蛤、绿紫蛤、小紫蛤这 7 个物种间的平均遗传距离可以看出,基于 COI 序列的种间平均遗传距离均大于基于 16S rRNA 序列的种间平均遗传距离。这表明 COI 基因序列更适分析种、亚种以及地理种群这些亲缘关系较近的物种之间的鉴定,而 16S rRNA 基因序列更适用于亚属间、属间及以上水平的系统发生关系的分析。潘鹤婷等^[29]在缀锦蛤亚科贝类的分析结果与本研究不同,该研究认为 16S rRNA 适合小的分类单元之间进行鉴定,而 COI 更适合属级和科级水平以上的物种鉴定,这可能与物种差异、序列太短或碱基替代饱和的影响有关。

本研究通过对 4 个基因碱基替代饱和分析,

得到 COI 第三位密码子位置碱基替代达到饱和的结果。系统发育信息受碱基替代饱和影响,当序列达到完全替代饱和,序列之间的相似性将完全取决于核苷酸频率的相似性,这种极端的情况下,序列通常不能反映真实的关系^[30-31]。肖家光^[32]在鳢属鱼类系统发育研究中将碱基替换饱和的密码子剔除之后,系统发育关系的稳定性得到了明显提高。因此本研究将 COI 密码子第三位的数据剔除,使用碱基替代未达饱和的位点构建系统发育关系^[22]。

Yu 等^[11]基于 COI 和 16S rRNA 序列分别构建了樱蛤总科的贝叶斯树,但 2 个系统树的拓扑结构存在较大差异,可能与涉及分子标记较少、序列片段较短等原因有关。Rokas 等^[33]提出,建树的过程中加入更多基因将得到更接近真实的物种树, Wolf 等^[34]认为扩大基因的规模可以得到准确性更高的系统发育树, Giribet 等^[15]和 Grandjean 等^[35]也认为在进行系统分析时多基因联合能够提供更多有效的系统发育信息。因此,本研究构建系统发生树使用联合 4 个片段序列的数据集 T12,包括了 COI 第一、二位密码子位置、16S rRNA 基因、H3 基因和 28S rRNA 基因序列。

本研究利用 ML 法和 BI 法构建的系统发育树的拓扑结构完全一致,紫蛤属 9 个物种聚为一支与外群分开,且分化为三大支,与紫蛤属形态学分类的 3 个亚属分别对应。沙蛤亚属的 7 个物种首先聚为一个单元,第二支由圆滨蛤亚属的紫彩血蛤组成,第三支由海南血蛤亚属的张玺圆滨蛤组成位于系统树基部的位置。紫蛤属 9 个物种各自聚为一支,沙蛤亚属 7 个物种的一支中,中国紫蛤和卵紫蛤亲缘关系最近,首先聚在一起,然后与双线紫蛤形成姐妹群;同时长紫蛤和小紫蛤亲缘关系近,与绿紫蛤形成姐妹群;再与首先分化出来的尖紫蛤聚在一起,支持{[双线紫蛤+(中国紫蛤+卵紫蛤)]+[绿紫蛤+(长紫蛤+小紫蛤)]+尖紫蛤}的进化关系。系统树的拓扑结构显示紫彩血蛤和张玺圆滨蛤没有聚在一起,而且二者之间基于 4 种分子标记的遗传距离均不是最小的,说明紫彩血蛤和张玺圆滨蛤亲缘关系较远,因此,此结果不支持刘瑞玉^[2]将紫彩血蛤和张玺圆滨蛤划

归圆滨蛤属的结论。此外,本研究在福建沿海发现了卵紫蛤的分布。由于中国紫蛤与卵紫蛤贝壳大小、形态细节相似^[1,8],两者常常被混淆。卵紫蛤壳卵圆形,前端圆,后端斜截形,外韧带突出,同心生长线无弯曲。然而,中国紫蛤的同心生长线在贝壳后方弯曲,这是利用形态学特征进行中国紫蛤和卵紫蛤鉴定时的依据。在系统发育树上,中国紫蛤和卵紫蛤在系统树上首先聚为一支,表明其亲缘关系最近。由于二者之间的 COI 平均遗传距离在紫蛤属物种间最小(0.087),且大于种内平均遗传距离的 10 倍,因此中国紫蛤和卵紫蛤应作为两个独立的种存在^[36]。

本研究基于两个线粒体基因(COI 和 16S rRNA)和两个核基因(H3 和 28S rRNA)标记的联合数据对中国沿海紫蛤属 9 种 61 个个体进行系统发育分析,发现 9 种紫蛤均具有较高的核苷酸多样性($P_i < 0.05$)与单倍型多态性($H_d < 0.5$);基于 COI 基因片段的紫蛤属种内遗传距离介于 0~0.016 之间,种间的平均遗传距离为 0.087~0.331;利用最大似然法和贝叶斯法构建的系统发生树拓扑结构均分化为 3 大支,与形态学分类的三个亚属分别对应。本研究补充了紫蛤属的分子数据信息,阐明了中国沿海紫蛤属传统分类和演化问题,为该属贝类遗传多样性的保护与可持续利用提供了基础资料。

参考文献:

- [1] Xu F S, Zhang S P. An Illustrated Bivalvia Mollusca Fauna of China Seas[M]. Beijing: Science Press, 2008: 202-207. [徐凤山, 张素萍. 中国海产双壳类图志[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 202-207.]
- [2] Liu R Y. Checklist of Marine Biota of China Seas[M]. Beijing: Science Press, 2008: 581-582. [刘瑞玉. 中国海洋生物名录[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 581-582.]
- [3] Yuan Y, Li Q, Yu H, et al. The complete mitochondrial genomes of six heterodont bivalves (Tellinoidea and Sole-noidea): variable gene arrangements and phylogenetic implications[J]. PLoS ONE, 2012, 7(2): e32353.
- [4] Chen L X, Chen S W, Mai Y S, et al. An introduction of research on biology and proliferation of Psammobiidae in China[J]. South China Fisheries Science, 2005, 1(2): 73-76. [陈利雄, 陈素文, 麦扬珊, 等. 我国紫云蛤科经济贝类的生物学及增殖研究概况[J]. 南方水产科学, 2005, 1(2): 73-76.]
- [5] Chen Z. Combined effects of temperature, salinity and pH on the growth rate of *Sanguinolaria diphos* juveniles[J]. Journal of Fisheries Research, 2017, 39(4): 264-271. [陈志. 温度、盐度和 pH 对双线紫蛤幼贝生长率的联合效应[J]. 渔业研究, 2017, 39(4): 264-271.]
- [6] Wu J F, Chen S W, Chen L X, et al. Artificial breeding of Chinese sanguine (*Hiatula chinensis*)[J]. South China Fisheries Science, 2009, 5(4): 22-25. [吴进锋, 陈素文, 陈利雄, 等. 中国紫蛤的人工育苗[J]. 南方水产科学, 2009, 5(4): 22-25.]
- [7] Wafar M V M. Biochemical composition of the lamelli-branches *Meretrix casta* (Chemnitz) and *Sanguinolaria diphos* (Gmelin)[J]. Indian Journal of Fisheries, 1974, 21(1): 289-292.
- [8] Coan E V. Recent eastern Pacific species of *Sanguinolaria* and *Psammotella* (Bivalvia: Psammobiidae)[J]. The Nautilus, 2002, 116(1): 1-12.
- [9] Lin Z H, Huang X T, Dong Y H, et al. Analysis of *Meretrix* clams from Guangxi based on fAFLP markers and ITS sequences[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2009, 40(1): 33-41. [林志华, 黄晓婷, 董迎辉, 等. 广西文蛤 (*Meretrix*) 的 fAFLP 及 ITS 分析[J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(1): 33-41.]
- [10] Boore J L. Animal mitochondrial genomes[J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27(8): 1767-1780.
- [11] Yu Z Z, Li Q, Kong L F, et al. Utility of DNA barcoding for Tellinoidea: a comparison of distance, coalescent and character-based methods on multiple genes[J]. Marine Biotechnology, 2015, 17(1): 55-65.
- [12] Feng Y W. DNA Barcoding and molecular phylogeny of the Pteriina and Arcoida[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012. [冯艳微. 珍珠贝亚目和蚌目 DNA 条形码与系统发生学研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.]
- [13] Taylor J D, Williams S T, Glover E A, et al. A molecular phylogeny of heterodont bivalves (Mollusca: Bivalvia: Heterodonta): new analyses of 18S and 28S rRNA genes[J]. Zoologica Scripta, 2007, 36(6): 587-606.
- [14] Chen J, Li Q, Kong L, et al. Molecular phylogeny of venus clams (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) with emphasis on the systematic position of taxa along the coast of mainland China[J]. Zoologica Scripta, 2011, 40(3): 260-271.
- [15] Giribet G, Edgecombe G D, Wheeler W C. Arthropod phylogeny based on eight molecular loci and morphology[J]. Nature, 2001, 413(6852): 157-161.
- [16] Li Q, Park C, Kijima A. Isolation and characterization of microsatellite loci in the Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*[J]. Journal of Shellfish Research, 2002, 21(2): 811-815.

- [17] Folmer O, Black M, Hoeh W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates[J]. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 1994, 3(5): 294-299.
- [18] Palumbi S R. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction[J]. Molecular Systematics, 1996: 205-247.
- [19] Hassouna N, Michot B, Bachellerie J P. The complete nucleotide sequence of mouse 28S rRNA gene. Implications for the process of size increase of the large subunit rRNA in higher eukaryotes[J]. Nucleic Acids Research, 1984, 12(8): 3563-3583.
- [20] Colgan D J, McLauchlan A, Wilson G D F, et al. Molecular phylogenetics of the Arthropoda: relationships based on histone H3 and U2 snRNA DNA sequences[J]. Australian Journal of Zoology, 1998, 46(5): 419-437.
- [21] Negrisola E, Minelli A, Valle G. Extensive gene order rearrangement in the mitochondrial genome of the centipede *Scutigera coleoptrata*[J]. Journal of Molecular Evolution, 2004, 58(4): 413-423.
- [22] Johnson S B, Vrijenhoek R C, Rouse G W. A remarkable diversity of bone-eating worms (*Osedax*; Siboglinidae; Annelida)[J]. BMC Biology, 2009, 7(1): 74.
- [23] Fernández M V, Heras S, Maltagliati F, et al. Genetic structure in the blue and red shrimp *Aristeus antennatus* and the role played by hydrographical and oceanographical barriers[J]. Marine Ecology Progress, 2011, 421: 163-171.
- [24] Zhang A J, You Z J. Molecular phylogenetic relationships of some species of *Nassarius* (Gastropoda, Prosobranchia, Neogastropoda, Nassariidae) based on 16S rDNA fragment sequence[J]. Zoological Systematics, 2008, 33(3): 549-552. [张爱菊, 尤仲杰. 基于 16S rDNA 序列片段探讨织纹螺的系统发生关系[J]. 动物分类学报, 2008, 33(3): 549-552.]
- [25] Wang Q, Wang X H. Phylogenetic analysis on several genera of the subfamily Orthocladini[J]. Journal of Inner Mongolia University (Natural Science Edition), 2017(3): 284-290. [王茜, 王新华. 直突摇蚊亚科(双翅目: 摇蚊科)部分属基于 16S rDNA 序列的系统发育研究[J]. 内蒙古大学学报(自然版), 2017(3): 284-290.]
- [26] Desalle R, Freedman T, Prager E M, et al. Tempo and mode of sequence evolution in mitochondrial DNA of Hawaiian *Drosophila*[J]. Journal of Molecular Evolution, 1987, 26(1-2): 157-164.
- [27] Holmquist R. Transitions and transversions in evolutionary descent: An approach to understanding[J]. Journal of Molecular Evolution, 1983, 19(2): 134-144.
- [28] Li Y, Sun D R, Li W T, et al. Phylogenetic relationship in five *Zosteraceae* species based on matK, rbcL and ITS partial sequences[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(2): 183-191. [李渊, 孙典荣, 李文涛, 等. 基于 matK、rbcL 和 ITS 序列的 5 种大叶藻系统发育研究[J]. 水产学报, 2011, 35(2): 183-191.]
- [29] Pan H T, Yuan Y, Wu Q, et al. Molecular phylogeny of *Tapetinae* (Mollusca, Bivalvia) based on mtDNA sequence[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2008, 39(3): 284-290. [潘鹤婷, 袁媛, 吴琪, 等. 缀锦蛤亚科(Tapetinae)贝类线粒体 DNA 序列的系统学分析[J]. 海洋与湖沼, 2008, 39(3): 284-290.]
- [30] Li Q, Ji L, Xie S L. Phylogenetic analysis of *Batrachospermales* (Florideophyceae, Rhodophyta) based on chloroplast RbcL sequences[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2010, 34(1): 20-28. [李强, 吉莉, 谢树莲. 串珠藻目植物的系统发育-基于 rbcL 序列的证据[J]. 水生生物学报, 2010, 34(1): 20-28.]
- [31] Zhang X M, Lin Y, Bin S Y, et al. Phylogeny of *Macrobrachium* species using mitochondrial, 16S Ribosomal DNA[J]. Journal of Guangxi Normal University (Natural Science Edition), 2017, 35(3): 133-140. [张小敏, 林勇, 宾石玉, 等. 基于线粒体 16S rDNA 基因序列沼虾属的系统发育研究[J]. 广西师范大学学报(自然科学版), 2017, 35(3): 133-140.]
- [32] Xiao J G. The complete mitochondrial genomes and phylogenetic analysis of *Sillago* species[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2015. [肖家光. 基于线粒体基因组全序列的鳮属鱼类系统发育研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015.]
- [33] Rokas A, Williams B L, King N, et al. Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies[J]. Nature, 2003, 425(6960): 798-804.
- [34] Wolf Y I, Rogozin I B, Grishin N V, et al. Genome trees constructed using five different approaches suggest new major bacterial clades[J]. BMC Evolutionary Biology, 2001, 1(1): 1-22.
- [35] Grandjean F, Tan M H, Gan H M, et al. Rapid recovery of nuclear and mitochondrial genes by genome skimming from Northern Hemisphere freshwater crayfish[J]. Zoologica Scripta, 2017, 46(6): 718-728.
- [36] Hickerson M J, Meyer C P, Moritz C. DNA barcoding will often fail to discover new animal species over broad parameter space[J]. Systematic Biology, 2006, 55(5): 729-739.

Phylogenetic relationships among *Sanguinolaria* species in the coastal waters of China

JIANG Lisha, LI Qi, KONG Lingfeng

Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education; Ocean University of China, Qingdao 266003, China

Abstract: Fragments of the mitochondrial gene (COI and 16S rRNA) and the nuclear marker (H3 and 28S rRNA) regions are suitable for phylogenetic relationship analysis. The phylogenetic relationships among nine *Sanguinolaria* species (*Sanguinolaria acuta*, *S. chinensis*, *S. diphos*, *S. ovalis*, *S. virescens*, *S. elongata*, *S. minor*, *S. olivacea*, and *S. tchangsii*) collected from the coastal areas of China was analyzed through the sequencing of COI, H3, 16S rRNA, and 28S rRNA genes. The two mitochondrial genes, COI and 16S rRNA, had an obvious AT-skewness, and their GC content were 41.17% and 41.01%, respectively, showing a certain degree of base preference. The overall transition/transversion bias of the four fragments (COI 5.073, 16S rRNA 3.042, H3 1.564, and 28S rRNA 1.480) were much higher than the critical value (0.4), which could offer effective phylogenetic information. As the genetic diversity parameters of all four markers in nine *Sanguinolaria* species had higher values ($P_i < 0.05$, $H_d < 0.5$) than most bivalve species, it is suggested that the *Sanguinolaria* species may have long history in the localities, and sufficient phylogenetic information. Among the nine *Sanguinolaria* species, the genetic average distances based on the COI gene were 0.087–0.331, and the genetic distances within species were 0–0.016. The minimum genetic distance was between *S. ovalis* and *S. chinensis*, which was much higher than the average value (0.005) between most species of bivalves. The saturation of the nucleotide substitution process in the four markers was calculated as well. The third codon positions of the COI gene's transition and transversion substitutions reached the point of saturation, which means that the third codon positions of the COI gene could not provide effective information. The combined data set T12, including the four molecular markers without the third codon positions of COI, totaled 1555 bp in length. Phylogenetic trees constructed by the Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI) methods were consistent, and cluster analysis based on the data set T12 showed three separate lineages, corresponding to three morphologically defined subgenera: *Hainania*, *Nutallia*, and *Psammotaea*. Combining morphological and molecular evidence, the results support that *S. ovalis* and *S. chinensis* has the closest phylogenetic relationship. The study sheds light on the genetic diversity and phylogenetic relationship of *Sanguinolaria* species occurring along the coast of China, which may be useful in genetic resource protection and sustainable use.

Key words: *Sanguinolaria*; COI; 16S rRNA; H3; 28S rRNA; phylogenetic relationship

Corresponding author: LI Qi. E-mail: qili66@ouc.edu.cn