

广西文蛤(*Meretrix*)的 fAFLP 及 ITS 分析*

林志华^{1,2} 黄晓婷³ 董迎辉¹ 包振民³ 胡景杰³

(1. 浙江万里学院 宁波 315100; 2. 浙江省海洋水产养殖研究所 温州 325005;
3. 中国海洋大学 青岛 266003)

提要 利用 fAFLP 标记技术和 PCR-RFLP 技术, 对采集于广西的形态和壳色变异很大的 2 个文蛤群体(G、W)以及山东文蛤(S)群体进行了遗传结构和亲缘关系研究。fAFLP 分析显示: 在 457 个总扩增位点中存在 53 个 W 群体的特异性位点(其中 9 个为 100%显性)、21 个 G 群体的特异性位点、14 个 S 群体的特异性位点, 这些位点可作为群体鉴别的特征性标记; 通过计算群体间相对遗传距离和聚类分析, 发现 S 和 G 间的遗传距离最小(0.0424), 在系统树上首先聚在一起, 而 W 与 S、G 的相对遗传距离均很大(0.2308 和 0.2305), 单独分出一支。对文蛤核糖体 ITS 的 PCR-RFLP 结果显示: W 的三个不同壳色类群(WX、WC、WH)的酶切结果完全一致, 而与 G 和 S 群体差别较大; G 和 S 群体基本一致, 但也稍有差别。进一步的 ITS 序列分析显示: W 的 ITS 序列长度为 1266—1269bp, 而 G 和 S 分别为 1614bp 和 1520bp; W 群体内部序列比较保守, 而与 G 和 S 群体之间在 ITS1 和 ITS2 开始和结尾处均存在多处插入/缺失; 在依据序列构建的系统树上, WX、WC、WH 三个类群聚在一起, S 和 G 聚为另一支, 两支相距甚远。本研究结果表明, fAFLP 标记分析、PCR-RFLP 分析和 ITS 序列分析结果一致, W 群体和 G、S 群体的差异较大, 已超出种内群体间的遗传变异, S 和 G 尽管存在遗传分化, 但仍应同属 *Meretrix meretrix* 一个物种。

关键词 文蛤, fAFLP, ITS, PCR-RFLP, 遗传结构, 亲缘关系
中图分类号 S968.3

帘蛤科(Veneridae)的文蛤属(*Meretrix*)是我国重要的海产经济动物, 在我国南北沿海均有分布, 尤以辽宁辽河口海区、山东莱州湾海区、江苏吕泗海区、广西北海湾海区等一带资源最为丰富(庄启谦, 2001)。由于文蛤的贝壳形态和壳色花纹变化较大, 早期的分类学家曾将该属划分为许多不同的种, 但对文蛤属内种的分类问题一直存在着争议(Dautzenberg, 1906; Prasad, 1932; Fischer-Piette, 1941, 1976), 分类上的混乱给文蛤种质资源保护和遗传育种等相关研究带来严重困扰。

庄启谦(2001)认为: 文蛤属的种类很少, 我国大陆沿海仅有 3 种, 即文蛤 *M. meretrix*、丽文蛤 *M. lusoria* 和斧文蛤 *M. lamarckii*; 文蛤为广布种, 广泛

分布于我国南北 4 个海区, 北至辽宁庄河、南至海南三亚; 丽文蛤主要分布于我国南方诸省沿海, 其北界为江苏; 而斧文蛤则为暖水种, 主要分布在广东、海南等省沿海; 但对这 3 种文蛤形态特征描述除了壳长和壳高比值、前后缘长比值外, 没有其它明确的形态特征性指标。作者近年来从广西北海采集到壳色和形态差异很大的 2 个文蛤群体, 其中一个群体壳色、形态与黄、渤海和东海区分布的文蛤(*M. meretrix*)基本一致, 当地俗称车螺(下称广西文蛤); 而另一个群体, 当地俗称白蛤螺(下称白壳文蛤), 壳表白色, 其它壳形态特征指标也与其它各地采集的文蛤不同群体趋异程度较高, 表现为独立的群体, 查阅文献未发现有关该文蛤群体生物学特征和种属归类的报道。长期以

* 国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目, 2006AA10A410 号; 浙江省科技厅重大科技攻关计划资助项目, 2006C12013 号; 国家科技基础条件平台建设计划资助项目, 2007DKA30470-015 号。林志华, 博士, 研究员, E-mail: zhihua9988@126.com

通讯作者: 胡景杰, E-mail: hujingjie@ouc.edu.cn

收稿日期: 2008-09-17, 收修改稿日期: 2008-11-25

来对双壳贝类分类与鉴别都是根据壳型、贝壳铰合齿的形态、闭壳肌的发育程度等表型性状来进行的,由于贝类进化水平相对较低,种内变异广泛存在,依形态分类的结果在学术界一直存在很大争议,分子生物学技术的发展给解决这些矛盾与争议提供了更科学准确的方法。本研究中以山东文蛤为外群,利用 fAFLP (Fluorescent amplified fragment length polymorphism) 标记和 ITS (internal transcribed spacer) 的 PCR-RFLP 技术以及序列分析,对白壳文蛤和广西文蛤进行遗传结构和亲缘关系研究,以期对白壳文蛤分类归属问题的深入研究和阐明提供分子生物学证据。

1 材料与方法

1.1 样品采集和 DNA 提取

样品见图 1。广西文蛤(G)和白壳文蛤(W)(又根据贝壳花纹不同分为纯白、白底花纹和白底细纹三个不同类群,分别简称 WC、WH、WX)于 2006 年 5 月采集于广西北海,山东文蛤(S)采集于浙江温州养殖池塘。各群体随机选取 30 个个体解剖取闭壳肌保存于 -76°C 的超低温冰箱中,用于基因组 DNA 提取。

DNA 的提取参照 Sambrook 等(2001)的《分子克隆实验指南》第三版的方法。得到的 DNA 样品用 1% 的琼脂糖电泳和紫外分光光度仪(Varian Cary 50 型)进行定量,无菌超纯水稀释至 $100\text{ng}/\mu\text{l}$ 。

1.2 fAFLP 分析

1.2.1 fAFLP 扩增与检测 所用选择性引物 E32、

E33 和 M51、M55、M62 均带有三个选择性碱基,在 E32 和 E33 引物的 5' 端加 FAM 荧光标记。采用筛选出的 4 对引物组合 E32M51、E33M51、E33M55 和 E33M62 对 S、G 和 W 群体进行选择性的扩增,方法参照 Vos 等(1995)。扩增完成后,取 $5\ \mu\text{l}$ 预扩产物,用 1% 的琼脂糖凝胶检测扩增结果。选扩产物送北京华大基因公司,用 3730 XL 型测序仪(ABI 公司)进行检测。

1.2.2 fAFLP 标记数据处理 fAFLP 检测结果用 GeneMarker Version 1.6 软件进行分析,将 80—400bp 的扩增带谱转换成 0、1 数据矩阵(扩增阳性赋值为 1,阴性赋值为 0),并用此软件对所有个体进行聚类分析。根据数据矩阵和荧光图谱,找出各群体的特异性扩增位点,位点记录格式为“引物组合名称+扩增片段大小”。应用 PopGene Version 1.31 软件计算多态位点比例、群体间遗传相似度和相对遗传距离(Nei *et al.*, 1979),并根据遗传距离数据用 MEGA 3.1 软件(Kumar *et al.*, 2004)中的 NJ 作图法进行聚类分析。

1.3 PCR-RFLP 分析

1.3.1 ITS 片段的 PCR 扩增 PCR 扩增所用引物参考王师等(2006),引物 F: 5'-GTTTCTGTAGGTGAACCTG-3', 引物 R: 5'-CTCGTCTGATCTGAGGTCGGA-3', 由上海生工合成。PCR 扩增反应体系($20\ \mu\text{l}$)包括: DNA 模板(100ng), $0.2\ \mu\text{mol/L}$ F 引物、R 引物, 0.2mmol/L dNTP, 1.5mmol/L MgCl_2 , $1\times$ PCR Buffer 及 1U *Taq* 酶(Promega, 上海)。PCR 反应在 PCR 扩增仪(Bio-Rad, USA)中按如下程序进行: 94°C 5min ; 94°C



图1 白壳文蛤、广西文蛤和山东文蛤
Fig.1 Five group of *Meretrix clam*
白壳文蛤: a. WC; b. WH; c. WX;
广西文蛤: d. G; 山东文蛤: e.S

30s, 54 30s, 72 1min, 30 个循环; 72 10min。
取 1 μ l PCR 扩增产物在 1% 琼脂糖中电泳分离, EB 染色, 紫外检测并拍照。

1.3.2 序列测定、限制性内切酶的选择及 RFLP 分析
取 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体, 然后转化到 *E. coli* DH5 α 感受态菌株, 37 培养, 挑取克隆经检查插入片段大小及酶切鉴定后, 采用 ABI 3730 测序仪(上海博亚生物有限公司)进行测序。根据测序结果, 应用 BioEdit 软件(Hall, 1999)进行模拟酶切, 选择 *Hae*III、*Mse*I 及 *Taq*I 进行酶切。取 5 μ l PCR 产物加入 *Hae*III、*Mse*I、*Taq*I(NEB)各 5U 于 20 μ l 体系中, 酶切各 4h, 然后 80 20min 灭活内切酶。酶切产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中进行电泳(100V)分离, EB 染色, 紫外检测拍照。

1.3.3 ITS 序列分析 序列的编码区与间隔区的边界划分参照其它几种生物的序列信息(Insua *et al.*, 2003)。对 PCR 扩增的序列全长使用软件 Clustal X (Thompson *et al.*, 1997)进行比对, 应用江户布目蛤(*Protothaca jedoensis*)(下简称 Pje)作为序列分析的外群。序列比对后, 应用 MEGA 3.1 软件(Kumar *et al.*, 2004)分别用 ITS1、ITS2 以及 ITS1+ITS2 三组数据进行序列分析, 并构建系统树。

2 结果与分析

2.1 三个文蛤群体 fAFLP 的扩增带谱及特异性标记
利用筛选出的 4 对引物组合对三个文蛤群体进

行了 AFLP 扩增, 总计检出 80—400bp 的扩增位点 457 个, 其中多态位点 448 个, 多态位点比例高达 98.03%。从单个群体的扩增位点数来看, G 群体扩增位点数最多(385 个), S 群体次之(362 个), 而 W 群体最少(309 个)。三个群体的多态位点比例也由高到低依次是: G 群体(95.82%) > S 群体(92.06%) > W 群体(80.30%)。

从 3 群体的 fAFLP 扩增带谱(图 2)可以明显看出, S 和 G 的扩增带谱十分相似, 主要是位点出现频率的差异。W 与 S 和 G 群体的扩增位点差别很大, 许多位点如 E33M55-a、b、c 为 S 和 G 群体共享, 而在 W 群体中缺失; W 群体中也有很多 S 和 G 群体中不存在的特异性位点, 如 E33M55-d、e、f、g 位点。

在 W、G、S 群体中分别找出了 53 个、21 个、14 个特异性位点, W 群体的特异性位点数远多于 S 和 G 群体, 而且在 53 个特异性位点中有 9 个为 100% 显性(表 1), 这些位点可以作为区分其它 2 个群体的特征性标记。另外还发现 S-G 共有的特异性位点高达 112 个, 其中有 4 个 100% 显性的位点, 可作为 S-G 群体区别于 W 群体的特征性标记; 而 G-W、S-W 共享的特异性位点分别只有 24 个和 6 个。

2.2 三个文蛤群体个体间和群体间亲缘关系的聚类分析

对三个群体所有个体的 4 对引物组合的 fAFLP 扩增结果进行了个体间聚类分析, 发现不论哪对引物组合, S 和 G 群体总有少数个体出现交叉聚类现象

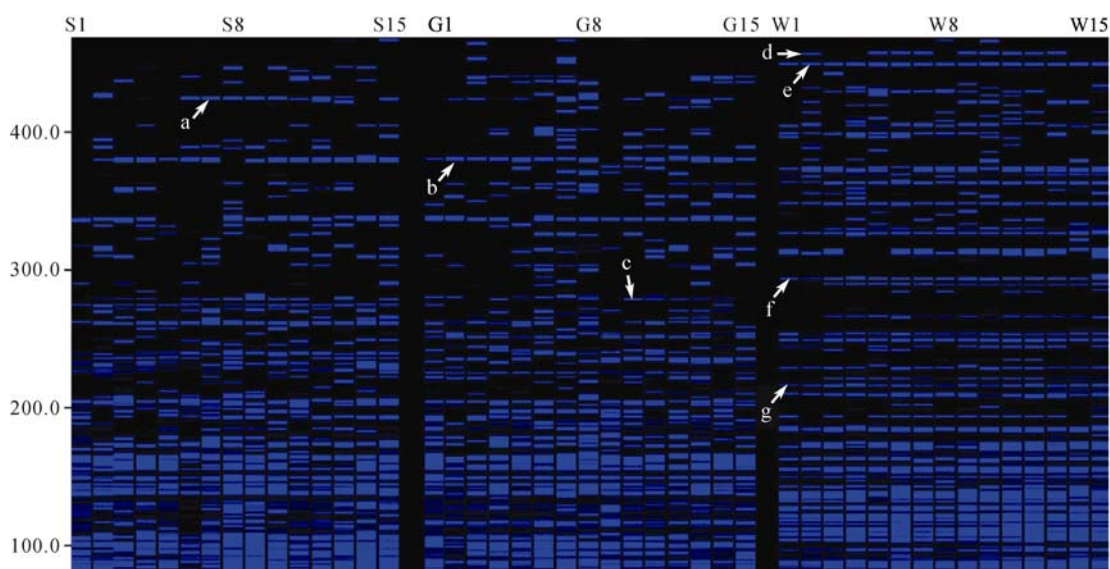


图 2 引物组合 E33M55 对三个文蛤群体部分个体的 fAFLP 扩增图谱

Fig.2 A portion of the fAFLP gel with primer E33M55

S1—15 为山东文蛤, G1—15 为广西文蛤, W1—15 为白壳文蛤; a、b、c 为 S 和 G 群体共有而 W 群体缺失的位点; d、e、f、g 为 W 群体的特异性位点。数值单位为 bp

表 1 三个文蛤群体的 **fAFLP** 特异性扩增位点
Tab.1 The unique loci in three groups of *Meretrix clam*

引物	S		G			W	
E32M51(E-AAC M-CCA)	E32M51-181		E32M51-102, E32M51-177, E32M51-303, E32M51-371	E32M51-168, E32M51-261, E32M51-329,	E32M51-124, E32M51-188 , E32M51-204 , E32M51-262 , E32M51-276, E32M51-288, E32M51-315, E32M51-325, E32M51-335,	E32M51-146, E32M51-162, E32M51-252 , E32M51-265, E32M51-278, E32M51-291 , E32M51-317, E32M51-332, E32M51-344	E32M51-158, E32M51-177, E32M51-253, E32M51-272, E32M51-284 , E32M51-313, E32M51-318, E32M51-334,
E33M51(E-AAG M-CCA)	E33M51-214, E33M51-232, E33M51-303, E33M51-352	E33M51-230, E33M51-240, E33M51-341,	E33M51-129, E33M51-222, E33M51-316, E33M51-398	E33M51-198, E33M51-258, E33M51-327,	E33M51-115, E33M51-172 , E33M51-225, E33M51-330	E33M51-136, E33M51-193 , E33M51-234,	E33M51-137, E33M51-215 , E33M51-323,
E33M55(E-AAG M-CGA)	E33M55-84, E33M55-278	E33M55-256,	E33M55-183, E33M55-260,	E33M55-207, E33M55-271	E33M55-123, E33M55-228, E33M55-253, E33M55-368	E33M55-201, E33M55-231, E33M55-262,	E33M55-202, E33M55-235, E33M55-285,
E33M62(E-AAG M-CTT)	E33M62-206, E33M62-301	E33M62-240,	E33M55-216, E33M55-335	E33M55-313,	E33M55-93, E33M55-197, E33M55-329	E33M55-146, E33M55-213,	E33M55-176, E33M55-283,
合计	14 个		21 个			53 个	

注：9 个 100%显性的特异性位点用黑体表示

(图 3), 但 W 群体的所有个体均单独聚类, 不与 S 或 G 群体中个体相互参杂, 这说明虽然地理上的长期隔离使文蛤 S 和 G 两个地理群体间遗传结构发生了一定变异, 但二者的亲缘关系仍比较近, 而 W 的遗传结构则与 S 和 G 群体明显不同。

群体间遗传距离和聚类分析表明, S 和 G 群体间的相对遗传距离很小, 在 NJ 法构建的亲缘关系树状图上首先聚在一起。而 W 与 S 和 G 群体的遗传相似性系数均较小, 遗传距离很大而且十分相近, 在亲缘关系树状图上单独分出一支, 说明 W 与 S 和 G 群体间的亲缘关系较远而且近等。

2.3 ITS 序列扩增和 PCR-RFLP 酶切电泳结果分析

从 ITS 序列扩增电泳图谱(图 5)来看, S 和 G 群体的电泳带较为相似, 片段较大(大于 1500bp), 但 S 比 G 群体长度略小; 而 WC、WH、WX 三个类群的电泳结果相似, 片段基本一致, 较 S、G 群体小, 大约 1200—1300bp。

PCR 产物酶切电泳结果同样显示: WC、WH、WX 三个类群的酶切结果一致, 而与 S 和 G 群体差异较大; S 和 G 群体的酶切结果除了在 *MseI* 的电泳图谱上小有差别外, 其它基本一致。

2.4 ITS 序列分析

2.4.1 ITS 序列组成 不同群体 ITS 序列的碱基组

成及 GC 含量见表 3。三个群体 ITS 长度差别较大, W 群体 ITS 长度最短, 分别为 1269bp、1268bp、1266bp; S 群体 ITS 长度居中, 为 1520bp; G 群体 ITS 长度最长, 为 1614bp。三个文蛤群体 ITS1 较 ITS2 长度均大一倍多, 而它们的 GC 含量比较接近, 均在 62%左右。

2.4.2 ITS 序列比对结果 用 Clustal X(1.83)软件进行了多重序列比对, 共产生 1663 个位点。结果显示: W 群体的 WX、WC、WH 序列几乎完全一致, 仅有 20 个转换/颠换位点, 其中转换位点 16 个, 颠换位点 4 个, 另有 5 个插入/缺失位点; 而 W 群体与 S 和 G 群体差别较大, 在 ITS1 和 ITS2 序列开始和结尾处存在多处 1—10bp 的插入缺失; G 群体较 S 群体在 ITS1 开始处有一段 94bp 长的、大的插入片段。

2.4.3 遗传距离和聚类分析 由表 4 可以看出, WX、WC 和 WH 间的遗传距离很小, 仅为 0.007—0.014; G 群体和 S 群体的遗传距离为 0.04; W 群体和 G、S 群体间的遗传距离较大为 0.129—0.138, 不仅远远大于 W 群体内遗传距离, 也显著大于 S 和 G 之间的遗传距离; 而这三个文蛤群体与外群江户布目蛤 *P. jedoensis* 之间的遗传距离均大于它们群体内部的距离。W 群体内部的转换/颠换率较高为 3.016—7.044, 而 W、G、S 群体间的转换/颠换率较低为 1.419—1.568。

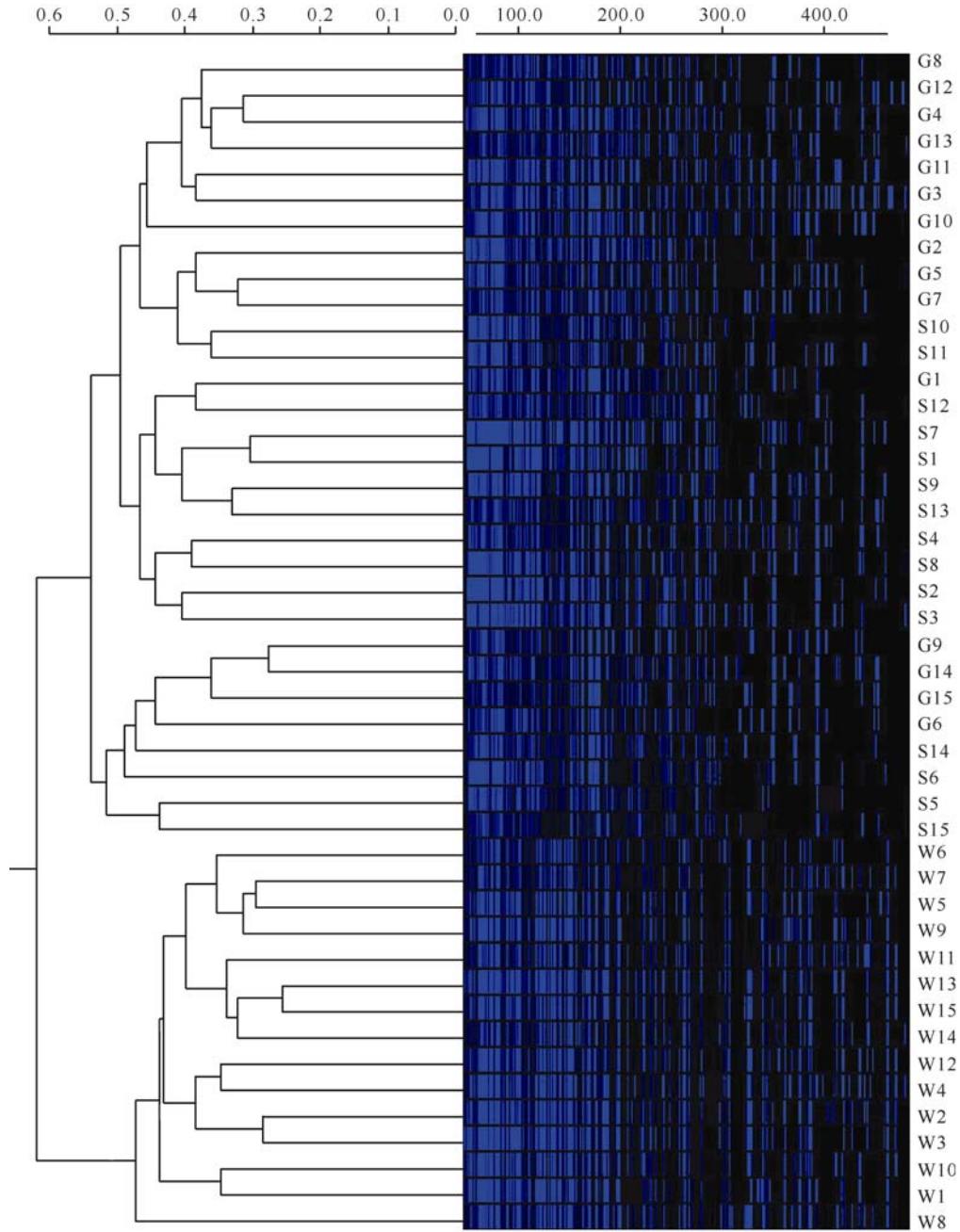


图 3 引物组合 E33M55 对三个群体部分个体的 fAFLP 扩增图谱及个体聚类图

Fig.3 The clustering dendrogram of the AFLP gel with primer E33M55
照片上方的数值单位为 bp; 分支上方的数值表示距离单位 Euclidian

表 2 三个文蛤群体间遗传相似性系数和相对遗传距离

Tab.2 The genetic distance and similarity among the three groups

Pop ID	S	G	W
S	—	0.9585	0.7939
G	0.0424	—	0.7941
W	0.2308	0.2305	—

注: 表中对角线以上数字表示群体间的遗传相似性系数, 对角线以下数字表示群体间的相对遗传距离

图 4 根据群体间遗传距离用 NJ 法构建的三个文蛤群体的聚类图

Fig.4 The dendrogram of three groups clustered by NJ based on Nei's distance

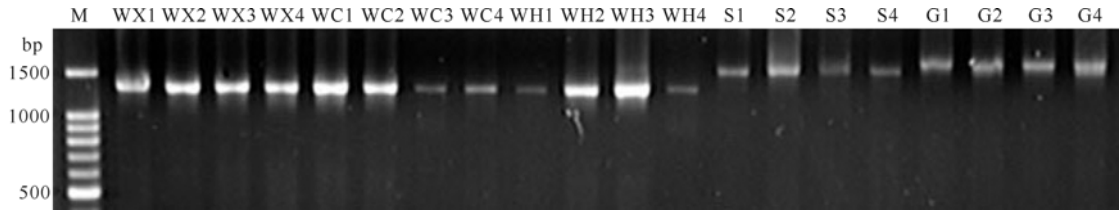


图 5 文蛤 ITS 的 PCR 扩增结果

Fig.5 The ITS amplified gel of five groups of *Meretrix* clam
注：M 为 100bp Ladder

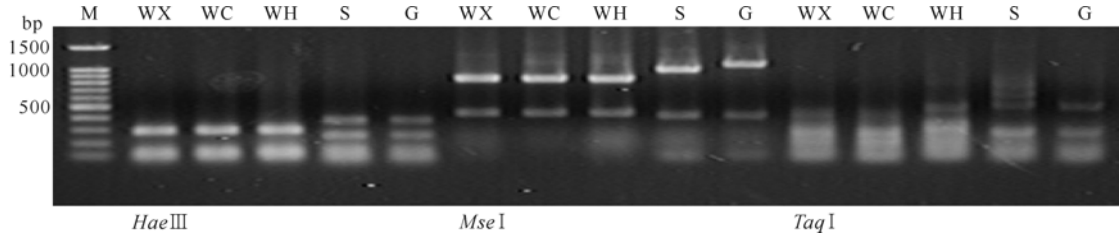


图 6 文蛤 PCR 扩增产物经 *HaeIII*、*MseI*、*TaqI* 酶切后的凝胶电泳图谱

Fig.6 Gel of the ITS amplified by PCR-RFLP using *HaeIII*, *MseI* and *TaqI* M 为 100bp Ladder

表 3 不同文蛤群体 ITS 序列碱基组成及 GC 含量

Tab.3 Characteristic nucleotide composition and accession numbers of ITS gene fragment among 5 groups of *Meretrix* clam

群体	A	C	G	T	G + C(%)	ITS1(bp)	ITS2(bp)	Total(bp)
S	308	446	500	266	62.24	895	414	1520
G	333	472	525	284	61.77	987	416	1614
WC	246	380	413	230	62.49	741	317	1269
WH	244	379	415	230	62.62	740	317	1268
WX	244	379	410	233	62.32	739	316	1266

表 4 不同文蛤群体的遗传距离

Tab.4 The genetic distance among 5 groups of *Meretrix* clam

群体	G	S	WC	WH	WX	Pje
G	—	1.504	1.450	1.548	1.419	1.547
S	0.004	—	1.513	1.568	1.480	1.547
WC	0.129	0.132	—	7.044	3.016	1.478
WH	0.137	0.138	0.007	—	4.384	1.445
WX	0.132	0.136	0.007	0.014	—	1.489
Pje	0.345	0.345	0.353	0.352	0.361	—

注：对角线以上为转换/颠换率，对角线以下为遗传距离

依据 ITS1、ITS2 和 ITS1+ITS2 序列分别构建了进化树，进化树的分支结构完全一致，明显的分成两大类，第一类包括白壳文蛤的 3 种壳色类群(WC、WH、WX)；另一类包括广西文蛤(G)和山东文蛤(S)，两者间的变异不大聚为另一支。两个群体趋异极显著。

3 讨论

3.1 AFLP、PCR-RFLP 技术以及 ITS 序列分析在贝类物种或亚种鉴别中的应用

近年来，随着分子生物技术的快速发展，各种分

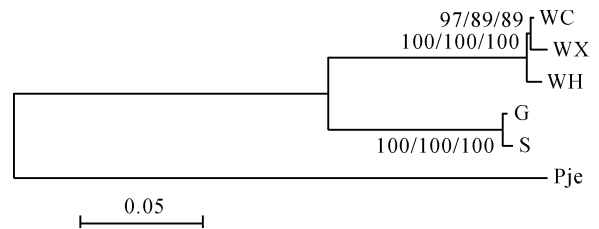


图 7 利用 MEGA-3.1 构建的文蛤的 NJ 聚类图

Fig.7 Phylogenetic trees by MEGA-3.1 of NJ method based on ITS1, ITS2 and ITS1+ITS2

注：分支处的数值分别代表以 ITS1、ITS2、ITS1+ITS2 构建进化树时 bootstrap 值为 1000 时的置信度

子标记技术为物种分类、鉴定、进化地位和亲缘关系分析等研究提供了有力手段。AFLP 技术, 以其简便高效、多态性丰富、灵敏度高、结果稳定可靠、遗传方式符合孟德尔定律等优点在诸多分子标记技术中脱颖而出, 已被广泛应用于动植物及微生物不同物种或亚种的分类、鉴定、亲缘关系分析等工作中; 在贝类物种区分和种质鉴定方面也开展了一些研究, 如陈省平等(2005)应用 AFLP 技术对我国四种主要养殖扇贝的群体遗传多样性和亲缘关系进行了分析, 并找到了 21 个种内特异性 AFLP 标记和种间共享标记, 可用于这四种扇贝的种质鉴定和分子辅助分类; 王志勇等(2004)用 AFLP 指纹技术结合标记基因序列分析, 澄清了我国四种养殖鲍的分类关系, 为鲍的种质鉴定和遗传多样性研究提供了有效手段。由于 AFLP 技术可以利用少量引物检测到大量可供分析的位点, 因此也非常适合于对遗传分化水平不高的生物种群进行分析(王志勇等, 2004), 目前也已见到不少用 AFLP 标记技术对不同地理群体贝类遗传变异研究的报道(潘洁等, 2002; 张雯等, 2005; LIU *et al.*, 2007; 周艺彪等, 2006)。近年发展起来的 fAFLP 技术是传统 AFLP 的巨大改进, 它用荧光物质(FAM、ROX、JOE 等)标记的选择性引物扩增, 产物在自动 DNA 测序仪上进行检测, 所得图像和数据可以自动采集, 并且由于荧光内参的使用使实验结果更具准确性和可比性(郭雄明等, 2007)。所以说, fAFLP 技术不仅秉承了传统 AFLP 的所有优点, 而且在高效性、稳定性、准确性和可重复性等方面表现得更加优越, 将是分子标记技术发展的主流和趋势。

核糖体 ITS 的 PCR-RFLP 技术和序列分析, 也是目前应用较广的物种鉴定手段。PCR-RFLP 技术因其简单快速、费用低廉, 而受到贝类分类学家和遗传学家的喜爱, 应用该技术, Toro(1998)鉴别了四种贻贝; Fernandez 等(2001)鉴别了三种蛤; L ó pez-Piñ ó n 等(2002)鉴别了欧洲沿海的四种扇贝; 王师等(2006)鉴定了中国沿海四种主要的养殖扇贝。ITS 是真核生物核糖体 DNA 位于 18S 与 5.8S (ITS1)以及 5.8S 与 28S(ITS2)之间的序列, 由于其变异大, 适合于物种水平尤其是近缘种的鉴定, 目前已有许多利用 ITS 序列分析进行物种分类及鉴定地报道, 如对扇贝(Pectinidae)、珠母贝属(*Pinctada*)、文蛤属(*Meretrix*)等进行的系统发生和种类鉴定的研究报道(L ó pez-Piñ ó n *et al.*, 2002; 喻达辉等, 2006; Kenchington *et al.*, 2002; Vidigal *et al.*, 2000; 何毛贤等, 2004; 潘宝

平等, 2006)。Vidigal 等(2000)、Insua 等(2003)还证明通过 ITS 序列分析得出的分类结果与用形态学特征得到的结论相一致。

本研究中利用 fAFLP 标记技术结合 ITS 的 PCR-RFLP 技术以及序列分析, 对三个文蛤群体的遗传结构和亲缘关系进行了分析, 得到了 88 个可以区分群体的 fAFLP 特征性标记, 也得到了用于群体区分的 ITS 的 PCR 产物酶切图谱和序列, 分别基于 fAFLP 标记和 ITS 序列构建的进化树反映了同样的亲缘关系, 为三个文蛤群体的分类关系提供可靠分子证据。

3.2 文蛤不同地理群体的遗传差异和白壳文蛤分类地位的分子生物学证据

文蛤广泛的分布区域和多变的壳色花纹, 导致其物种乃至亚种划分存在很大争议, 单靠表面的形态特征和壳色花纹进行分类十分困难, 分子生物学手段的引入为文蛤物种甚至地理群体区分提供了新的、准确的手段。近年来, RAPD(沈怀舜等, 2003; 杜晓东等, 2004)、ISSR(陈大鹏等, 2004)、ITS-2 序列分析(李太武等, 2006)等技术相继用于分析文蛤不同地理群体的遗传变异, 但目前有关文蛤和丽文蛤的区别、不同地理群体文蛤的鉴别等问题依然模糊不清。本文中采用 fAFLP、ITS 的 PCR-RFLP 和序列三种方法, 探讨不同地理群体文蛤的遗传变异以及与白壳文蛤的亲缘关系。从实验结果来看, 文蛤的山东群体和广西群体间已经出现了一定的遗传分化, 不仅能在 fAFLP 指纹图谱上找到各自的特征性标记, 而且在 ITS 的 PCR-RFLP(*MseI* 酶切)的电泳图谱和 ITS 序列分析中显示了较明显的差别。作者曾用常规 AFLP 技术对辽宁、山东、江苏和广西 4 个文蛤群体的遗传多样性和亲缘关系进行了分析, 结果表明辽宁、山东、江苏三个群体的相对遗传距离较小(0.0394—0.0578), 而广西群体与其它三个群体间的遗传距离均较大(0.1271—0.1586), 这说明长期的地理隔离已经造成广西群体遗传结构发生了一定程度变异(林志华等, 2008)。本实验设计以文蛤的山东群体为对照, 来研究广西采集的形态和壳色变异很大的 2 个文蛤群体, 尤其是文献资料中从未报道过的白壳文蛤。如果白壳文蛤属于文蛤种(*M. meretrix*), 其遗传结构应该与广西文蛤相似而与山东文蛤存在一定差别; 如果白壳文蛤是文蛤种以外的物种, 应与山东文蛤和广西文蛤均存在明显差异。从 fAFLP 标记的位点差异、ITS 序列的内切酶酶切图谱和 ITS 的 DNA 序列

进行分析,都得出相同的结论,即文蛤的山东群体和广西群体遗传差异较小,属于种内不同群体间的差别,而白壳文蛤则与它们的遗传结构存在明显差别。基于 fAFLP 标记和 ITS 序列的聚类分析图上也都能清晰地看出,白壳文蛤与广西、山东文蛤群体间的遗传距离近等且远大于广西文蛤与山东文蛤间的遗传距离,所以在亲缘关系的进化树上广西文蛤与山东文蛤首先聚为一支,而白壳文蛤单独分出一支。至于白壳文蛤的种属划分,目前仍较难确定,它与庄启谦(2001)描述的丽文蛤和斧文蛤的形态特征不同,也与潘宝平等(2006)报道的 4 种文蛤(*M. meretrix*、*M. lusoria*、*M. lamarckii*、*M. lyrata*)的 ITS1 序列片段大小相差较大。

对白壳文蛤群体内 3 种不同花纹群体的 ITS 进行了 PCR-RFLP 分析和 ITS 序列分析,结果显示三个群体的 PCR-RFLP 酶切图谱完全一致,ITS 的序列也差别很小,这说明这三个群体属于同一个物种。另外,作者从 fAFLP 指纹图谱中发现,白壳文蛤的多态率较低,群体内平均相似度明显大于广西文蛤和山东文蛤,这说明群体均一性较高;可能预示是由于分布范围较小、种群数量不大加上过度捕捞,导致其繁殖亲本数量变得很少而引起,而遗传多样性的缺失可导致群体适应性下降及生长速率降低等不良情况,因此,应该注意加强对野生白壳文蛤资源的保护。

参 考 文 献

- 王 师,包振民,张玲玲等,2006. 应用 PCR-RFLP 技术鉴别区分中国沿海四种主要养殖扇贝. 食品科学, 27(7): 210—214
- 王志勇,柯才焕,王艺磊等,2004. 从 AFLP 指纹和标记基因序列看我国养殖的四种鲍的亲缘关系. 高技术通讯, 12: 93—98
- 庄启谦,2001. 中国动物志. 软体动物门 双壳纲 帘蛤科. 北京: 科学出版社, 229—236
- 杜晓东,邓岳文,叶富良等,2004. 广东和广西地区野生文蛤的遗传多样性. 中国水产科学, 11(1): 41—46
- 李太武,张安国,苏秀榕等,2006. 不同花纹文蛤的 ITS2 分析. 海洋与湖沼, 37(2): 132—137
- 何毛贤,黄良民,2004. 长耳珠母贝核 rDNA 基因 ITS-2 序列分析. 热带海洋学报, 23(5): 81—84
- 沈怀舜,朱建一,丁亚平等,2003. 我国沿海三个文蛤地理群的 RAPD 分析. 海洋学报, 25(5): 97—102
- 张 雯,刘 晓,张国范,2005. 利用 AFLP 技术研究海湾扇贝不同养殖群体的遗传结构及其分化. 高技术通讯, 15(4): 84—88
- 陈大鹏,沈怀舜,丁亚平等,2004. 文蛤地理群体分子标记的初步研究. 南京师范大学学报, 27(3): 74—77
- 陈省平,包振民,潘 洁等,2005. 4 种养殖扇贝的群体遗传多样性及特异性 AFLP 标记研究. 海洋学报, 27(2): 160—164
- 林志华,董迎辉,李 宁等,2008. 基于形态参数和 AFLP 标记的文蛤(*Meretrix meretrix*)不同地理群体遗传变异分析. 海洋与湖沼, 39(3): 245—251
- 周艺彪,赵根明,韦建国等,2006. 湖北钉螺种群内 AFLP 分子标记遗传变异分析. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 24(1): 27—30
- 郭雄明,任文陟,张嘉保,2007. 免荧光扩增片段长度多态性分析体系的建立. 军医进修学院学报, 28(3): 199—200
- 喻达辉,朱嘉濠,贾晓平,2006. 我国珠母贝属(*Pinctada*)主要种类亲缘关系的初步分析. 海洋与湖沼, 37(3): 211—217
- 潘 洁,包振民,赵 洋等,2002. 栉孔扇贝不同地理群体的遗传多样性分析. 高技术通讯, 12: 78—82
- 潘宝平,吴 琪,张素萍等,2006. 文蛤属(*Meretrix*)16S rRNA 基因及 ITS1 序列的系统学分析. 海洋与湖沼, 37(4): 342—347
- Sambrook J, Russell D W 著,2001. 黄培堂译,2002. 分子克隆实验指南(第三版)(上、下册). 北京: 科学出版社, 463—471
- Dautzenberg P, 1906. Contribution a la faune malacologique de l'Indo-Chine. J Conchyliol, 54: 215—219
- Fernandez A, Garca T, Asensio L *et al*, 2001. PCR-RFLP analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region for identification of 3 clam species. Food Sci, 66(5): 657—661
- Fischer-Piette E, 1941. Revision des vivanuts de *Meretrix* s. s du museum national of histoiirenaturelle. J Conchyliol, 84: 315—344
- Fischer-Piette E, 1976. Les Veneridae indeterminées des collection de *Calcutta*. Rec Zool Surv India, 70: 235—257
- Hall T A, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor program for Windows 95/98NT. Nucl Acids Symp Ser, 41: 95—98
- Insua A, L ó pez-Piñ ó n M J, Freire R *et al*, 2003. Sequence analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer region in some scallop species (Mollusca: Bivalvia: Pectinidae). Genome, 46: 595
- Kenchington E, Bird C J, Osborn J *et al*, 2002. Novel repeat elements in the nuclear ribosomal RNA operon of the flat oyster *Ostrea edulis* Linnaeus and *O. anasi* Sowerby. J Shellfish Res, 21: 696—705
- Kumar S, Tamura K, Nei M, 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics, 5: 150—163
- L ó pez-Piñ ó n M J, Insua A, Mendez J, 2002. Identification of four scallop species using PCR and restriction analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer region. Mar Biotechnol, 4(5): 495—502
- LIU X Q, BAO Z M, HU J J *et al*, 2007. AFLP analysis revealed

- differences in genetic diversity of four natural populations of Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in China. *Acta Oceanologica Sinica*, 26(1): 150—158
- Nei M, Li W H, 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 76: 5273—5296
- Prashad B, 1932. The Lamellibranchia of the Siboga Expedition. *Systematic part. Siboga-Expedition*, 12: 212—264
- Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F *et al*, 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl Acids Res*, 24: 4876—4882
- Toro J E, 1998. Molecular identification of four species of mussels from southern Chile by PCR-based nuclear markers: the potential use in studies involving planktonic surveys. *J Shellfish Res*, 17: 1203—1205
- Vidigal T H, Kissinger J C, Caldeira R L *et al*, 2000. Phylogenetic relationships among Brazilian *Biomphalaria* species (Mollusca: Planorbidae) based upon analysis of ribosomal ITS2 sequences. *Parasitology*, 121(6): 611—620
- Vos P, Hogers R, Bleeker M *et al*, 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21): 4414—4490

ANALYSIS OF *MERETRIX* CLAMS FROM GUANGXI BASED ON fAFLP MARKERS AND ITS SEQUENCES

LIN Zhi-Hua^{1,2}, HUANG Xiao-Ting³, DONG Ying-Hui¹, BAO Zhen-Min³, HU Jing-Jie³

(1. Zhejiang Wanli University, Ningbo, 315100; 2. Zhejiang Mariculture Research Institute, Wenzhou, 325005;

3. Ocean University of China, Qingdao, 266003)

Abstract The taxonomy of genus *Meretrix* has been in argument over several discrepancies among scientists in the world for a long while. Two groups of *Meretrix* clam (G & W) existed much variance on shell shape, color and pattern were collected from Beihai, Guangxi Province. One kind of *Meretrix* clam (G) is similar in shell color and pattern to *Meretrix meretrix* widely distributed in China coastal region, another (W) is white color and convex in shell width. Genetic relationship between G and W was addressed by the fAFLP and PCR-RFLP compared with that of Shandong population of *M. meretrix*. The results of fAFLP analysis showed that each group had their own specific bands (loci) in which there were 53 unique loci in Group W, 21 unique loci in Group G, and 14 unique loci in S group. These unique loci could be taken for molecular markers to classify and distinguish other groups. The genetic distance matrix between Groups S and G was 0.0424, but the genetic distance matrix of W group between population S or G were 0.2308 or 0.2305 in respectively. The phylogenetic trees by the methods of Neighbour-Joining (NJ) indicated that Groups S and G were more closely related, but Group W was much independently clustered among groups. The result of PCR-RFLP suggested that W group was different from Groups G and S. The internal transcribed spacer (ITS) region was sequenced. The results show that the size of ITS ranged 1266—1269bp in W group, and 1614bp in Group G and 1520bp in S group. The sequences of W group were conserved, but obviously different from Groups G and S. Phylogenetic trees by NJ method showed that Group G was more closely related to Group S, but Group W was much independent cluster. The results fully reveal that Group G belongs to *M. meretrix*, and Group W is an independent species. But we still could not classify Group W to *M. lusoria* or *M. larmarckii*, even a new species of genus *Meretrix*. More researches shall be carried out in the future.

Key words *Meretrix*, fAFLP, ITS, PCR-RFLP, Genetic structure, Genetic relationship