

三种壳口颜色脉红螺(*Rapana venosa*)形态学和 线粒体 16S rRNA 与 CO₁ 基因 片段差异比较分析*

班绍君^{1,2} 薛东秀^{1,2} 张涛¹ 潘洋^{1,2} 王海艳¹

(1. 中国科学院海洋研究所 青岛 266071; 2. 中国科学院研究生院 北京 100049)

摘要 脉红螺壳口通常有 3 种颜色: “黑白条纹螺”、“中间螺”和“橙色螺”。本论文对 3 种壳口颜色的脉红螺分别进行了形态学和 mt16S rRNA、CO₁ 基因片段序列比较分析。形态学分析结果表明, 除厖宽/壳高、厖高/壳高、厖高/体螺层、厖高/壳口长、厖高/壳口宽、厖高/厖宽的形态学特征指数和出肉率不具有显著性差异外, 其它形态特征和生物学相关变量具有显著差异, 且对湿重的影响效果不同。“黑白条纹螺”壳口长和壳口宽对湿重影响最大, 而“中间螺”和“橙色螺”各形态特征对湿重均无显著的直接影响。根据各形态特征均值建立的居群形态聚类图显示, “中间螺”和“橙色螺”形态差异较小, 二者与“黑白条纹螺”的形态差异较大。然而基于 mt16S rRNA 和 CO₁ 基因片段序列分析结果显示, 三种壳口颜色的脉红螺无遗传分化, 为同一种。

关键词 脉红螺, 形态性状, 相关分析, 回归分析, mt16S rRNA, CO₁

中图分类号 Q346

脉红螺 (*Rapana venosa*) 属软体动物门 (Mollusca)、腹足纲 (Gastropoda)、骨螺科 (Muricidae)、红螺属 (*Rapana*), 在我国主要分布于黄、渤海一带。其肉味道鲜美, 壳、肉、厖均具有一定的药用价值, 是一种重要的经济螺类。由于苗种繁育技术未实现产业化, 目前脉红螺的供应绝大部分依赖采捕野生资源。近年来, 随着价格的不断提高, 采捕量越来越大, 野生资源衰退严重。

由于栖息海区和底质环境不同以及生长阶段不同等多种因素影响, 脉红螺形态变异较大, 其在形态比较分类学上一直存在较大的分歧。脉红螺早期被记录为红螺的变异个体 (Reeve, 1847), 随后被鉴定为红螺的变种 (Yokoyama, 1922)、亚种 (Yen, 1933) 或直接归为红螺 (Hirase, 1907)。目前, 绝大多数学者认为脉红螺和红螺是两个不同的种 (杨建敏等, 2010)。不同

地理的脉红螺形态存在较大差别, 在分类上也有较多争议。由于渤海的脉红螺的棘强大, Grabau 等 (1928) 将其定名为强棘红螺, 李嘉泳 (1959) 也赞同此观点。而张福绥 (1980) 从生态、分布、外部形态等方面做了比较研究, 认为强棘红螺居群与其它居群的特征并没有显著性差异, 只是脉红螺的独立地方居群, 没有到亚种的水平, 强棘红螺并不存在。杨建敏等 (2006, 2008) 对我国沿海 8 个地理居群进行了形态变异和线粒体 16S rRNA 比较分析, 也赞成该观点。

脉红螺壳口颜色主要分为 3 种: 纯黑白条纹、橙红色以及中间类型。为探讨 3 种壳口颜色的脉红螺是否存在形态和遗传差异, 本文分析了不同壳口颜色脉红螺各形态指标之间及它们与湿重之间的关系, 并结合线粒体 16S rRNA 与 CO₁ 基因片段差异探讨 3 种表型脉红螺间的差异, 以期掌握更多的种内差异

* “十二五”国家科技支撑计划课题资助, 2011BAD13B01 号; 中国科学院院地合作项目资助, Y12319101L 号; 国家自然科学基金项目资助, 31200280 号; 国家科技支撑计划课题资助, 2010BAC68B01 号。班绍君, E-mail: yeiyixiuxue@163.com

通讯作者: 张涛, 博士, 研究员, E-mail: tzhang@qdio.ac.cn

收稿日期: 2012-01-28, 收修改稿日期: 2012-04-18

资料, 为脉红螺的分类和遗传育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验所用脉红螺(*Rapana venosa*)于 2011 年 3—9 月采自丹东和日照, 共采集 211 个样品。根据壳口颜色, 分为 3 种类型:“黑白条纹螺”(B), 壳口内部沿体螺层有黑白相间的平行条纹;“橙色螺”(O), 壳口内部呈橙红色, 无黑色条纹;“中间螺”(I)介于二者之间, 壳口内部呈橙红色, 黑色条纹不明显, 或在靠近壳口外唇处有平行的黑色条纹但不贯穿整个体螺层(图 1)。对 3 种类型的脉红螺均进行形态学和 DNA 序列比较分析(表 1), 用于形态特征分析和分子鉴定。

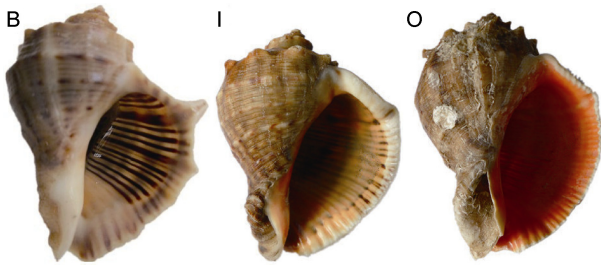


图 1 三种壳口颜色的脉红螺
Fig.1 Three color morphs of *R. venosa*

表 1 3 种壳口颜色脉红螺形态分析和分子鉴定数量
Tab.1 The number of samples of three color morphs of *R. venosa*

壳口颜色	形态分析	分子鉴定
B	110 个	25 个
I	36 个	11 个
O	65 个	22 个

注: B 为“黑白条纹螺”, I 为“中间螺”, O 为“橙色螺”

1.2 方法

1.2.1 形态指标测量及数据分析 用游标卡尺对脉红螺样品进行形态指标的测量, 精度为 0.01mm。每个脉红螺均测量壳高(SH)、体螺层(BWH)、螺旋部(SL)、壳口长(AL)、壳口宽(AW)、厣宽(OW)、厣高(OH)等 7 个形态指标, 各形态特征见图 2。用电子天平称取每个个体湿重(BW)后取出全部软体部并称量壳重(SW)。

为了消除脉红螺不同个体之间大小的差异所带来的影响, 以个体形态参数的相对比值作为脉红螺形态判别和分析指标, 共考察了 15 个形态学特征指数(BWH/SH、AL/SH、AW/SH、OW/SH、OH/SH、AL/BWH、AW/BWH、OW/BWH、OH/BWH、AW/AL、

OW/AL、OH/AL、OW/AW、OH/AW、OH/OW)以及 4 个生物学相关变量(BW/SH、BW/BWH、BW/AL、BW/AW)(杨建敏等, 2006)。出肉率(K) = (BW-SW)/BW。

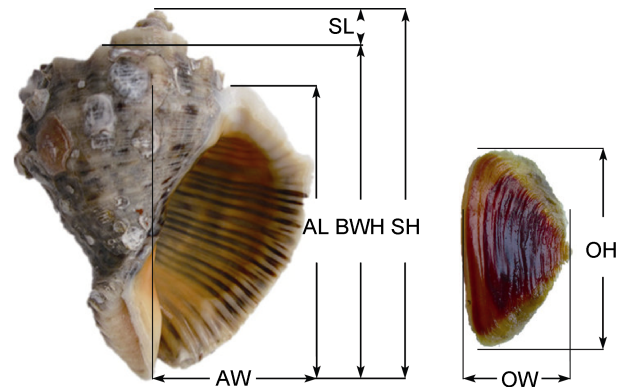


图 2 脉红螺壳和厣的形态测量
Fig.2 The morphologic measurements of the shell and operculum of *R. venosa*

采用 SPSS 软件对各形态指标、标准化数据以及出肉率进行方差分析和多重比较; 通过对各形态学指标之间及其与湿重的相关分析, 进行途径分析, 从而建立脉红螺形态指标对湿重的最优多元回归方程(吴彪等, 2010)。

采用 STATISTICA6.0 软件中的 UPGMA 法和 City-block 距离, 根据各形态特征均值对 3 种壳色脉红螺进行聚类分析(蔡立哲等, 2010)。

1.2.2 DNA 提取和 PCR 扩增 取脉红螺腹足肌肉 30mg, 使用康为世纪的海洋动物组织提取试剂盒提取基因组 DNA。以脉红螺基因组为模板, 分别用无脊椎动物 16S rRNA (Kessing *et al*, 1989)和 CO (Folmer *et al*, 1994)序列通用引物扩增(表 2)。16S 的 PCR 反应体系为: DNA 模板 100ng, 2×Es Taq MasterMix(康为世纪)12.5μl, 正反引物各 0.5μmol/L, 以灭菌去离子水补至总体积为 25μl。反应条件为 94℃ 预变性 5min, 之后 94℃/30s, 50℃/50s, 72℃/50s 30 个循环, 72℃后延伸 10min。CO 的 PCR 反应体系为: DNA 模板 100ng, PCR Mix(东盛生物)12.5μl, 正反引

表 2 所用引物序列
Tab.2 Sequences of used primers

引物	序列
D16sar	5'-CGCCTGTTTAHYAAAAACAT-3'
D16sbr	5'-CCGGTCTGAACTCAGMTCAYG T-3'
LOC1490	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'
HOC2198	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'

物各 0.5 μ mol/L, 以灭菌去离子水补至总体积为 25 μ l。扩增在 PCR 仪上进行, 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 95 $^{\circ}$ C/50s, 48 $^{\circ}$ C/50s, 72 $^{\circ}$ C/1min, 30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测后, 送至华大基因进行纯化回收, 双向测序。

1.2.3 DNA 序列分析和分子系统树构建 应用 Clustal X2 (Larkin *et al*, 2007) 软件进行 DNA 序列的对位排列分析, 应用 DnaSP5.10 (Librado *et al*, 2009) 分析单倍型。应用 MEGA 5.05 (Tamura *et al*, 2011) 软件分析序列的碱基组成, 计算两两序列间基于碱基替换+颠换率的遗传距离。然后应用 Modeltest 3.7 (Posada *et al*, 1998) 对 mt16S rRNA 和 CO 部分序列进行模型筛选, 得到基于 Akaike Information Criterion (AIC) 的核苷酸最佳替换模型: HKY+I(16S)/G(CO), 并估计相关参数。分别以红螺的 mt16S rRNA 和 CO 部分序列为外群, 使用 PAUP 4.0 (Swofford, 2002) 和 MrBayes3.0 (Ronquist *et al*, 2003) 软件构建邻接树 (Neighbor-joining, NJ) 和贝叶斯树 (Bayesian tree, BI)。NJ 法根据由 Modeltest3.7 计算得到的结果设置参数, 节点支持率使用 1000 次 bootstrap 检验。构建贝叶斯树时, 采用 Modeltest 3.7 选择的最佳分析模型, 替换模型参数设置为 nst=6, 位点间速率变异设置为 rates=gamma, 同时建立 4 条马尔可夫链, 3 条热链和 1 条冷链, 以随机树为起始树, 共运行 1000 万代, 每 1000 代抽样 1 次在舍弃老化样本后, 根据剩余的样本构建一致树。

2 结果

2.1 形态学分析

2.1.1 方差分析及多重比较 见表 3。各形态指标和出肉率的分析结果显示, 三种脉红螺在形态特征上具有显著性差异。其中, B 组、O 组在各项形态特征上均有极显著差异 ($P<0.01$); B 组、I 组的 OW 没有

显著差异 ($P>0.05$), OH、BW 具有显著差异 ($P<0.05$), 其它特征均具有极显著差异 ($P<0.01$); O 组和 I 组的 OW、SW 具有极显著差异 ($P<0.01$), BW 具有显著差异 ($P<0.05$), 其它特征均不具有显著性差异 ($P>0.05$), 即三种螺在形态上表现出了显著性的差异。但在 K 上, 三者之间不具有显著性差异 ($P>0.05$)。

对标准化数据进行的分析表明, 三种螺在 BWH/SH、AL/SH、AW/SH、AL/BWH、AW/BWH、OW/BWH、AW/AL、OW/AL、OW/AW 9 个形态特征指数上, 两两之间均未有显著差异 ($P>0.05$); 在 OH/SH、OH/AL 2 个形态特征指数上, B 组、O 组间具有极显著差异 ($P<0.01$), I 组与 B 组、O 组间无显著差异 ($P>0.05$); 在 OH/BWH、OH/AW 2 个形态特征指数上, B 组、O 组间具极显著差异 ($P<0.01$), B 组、I 组间具有显著差异 ($P<0.05$), O 组、I 组间不具有显著差异 ($P>0.05$); B 组、I 组的 OW/SH 具有极显著差异 ($P<0.01$), O 组与 B 组、I 组间的 OW/SH 不具有显著差异 ($P>0.05$); B 组与 I 组、O 组的 OH/OW 具有极显著差异 ($P<0.01$), I 组、O 组之间的 OH/OW 不具有差异性 ($P>0.05$), 即除涉及厣高的四个指标外, 其它指标均没有显著差异, 三种壳口颜色脉红螺的形态特征是相似的, 而厣的形状只在一定的范围内保持稳定。而在 BW/SH、BW/BWH、BW/AL、BW/AW 4 个生物学相关变量上, B 组与 I 组、O 组之间均具有极显著差异 ($P<0.01$); I 组与 O 组之间具有显著差异 ($P<0.05$), 表明三者的壳重具有显著差异, 但是三者之间的出肉率不具有显著差异, 即壳重和肉重的比例不具有显著差异。

2.1.2 形态指标对体质量的影响效果分析 对三种脉红螺的各形态指标之间及它们与湿重之间的相关关系进行分析, 结果如表 5 所示。三种脉红螺的所有形态指标均达到极显著相关水平 ($P<0.01$), 其中, 在 B 组, 厣高 OH 与湿重 BW 的相关系数最小, 为

表 3 3 种壳口颜色脉红螺性状表型的参数统计
Tab.3 The descriptive statistic of morphometric traits of three color morphs of *R. venosa*

参数	B	I	O	参数	B	I	O
SH	75.42 \pm 2.49 ^a	91.25 \pm 3.11 ^c	100.08 \pm 2.64 ^c	OH	22.88 \pm 0.79 ^a	20.01 \pm 1.17 ^{bc}	29.63 \pm 0.87 ^c
BWH	65.57 \pm 2.24 ^a	78.60 \pm 2.81 ^c	86.67 \pm 2.30 ^c	BW	88.33 \pm 6.33 ^a	122.88 \pm 8.50 ^b	156.78 \pm 8.69 ^c
AL	59.28 \pm 2.29 ^a	72.19 \pm 2.73 ^c	80.01 \pm 2.24 ^c	SW	49.70 \pm 31.60 ^a	73.71 \pm 5.06 ^c	98.78 \pm 5.37 ^c
AW	33.02 \pm 1.36 ^a	39.22 \pm 8.95 ^c	43.64 \pm 1.24 ^c	K	0.35 \pm 0.014 ^a	0.38 \pm 0.014 ^a	0.36 \pm 0.008 ^a
OW	36.90 \pm 1.24 ^a	39.71 \pm 1.52 ^a	40.23 \pm 1.21 ^c				

注: B 为“黑白条纹螺”, I 为“中间螺”, O 为“橙色螺”; 同一行数据右上角的相同字母表示差异不显著 ($P>0.05$); 相邻字母表示差异显著 ($P<0.05$); 相间字母表示差异极显著 ($P<0.01$)

表 4 3 种壳口颜色脉红螺标准化数据的参数统计
Tab.4 The descriptive statistic of standardized data of three color morphs of *R. venosa*

参数	B	I	O	参数	B	I	O
<i>BWH/SH</i>	0.87±0.003 ^a	0.86±0.005 ^a	0.80±0.002 ^a	<i>OW/AL</i>	0.60±0.004 ^a	0.55±0.005 ^a	0.56±0.005 ^a
<i>AL/SH</i>	0.79±0.006 ^a	0.79±0.008 ^a	0.80±0.006 ^a	<i>OH/AL</i>	0.35±0.003 ^a	0.36±0.004 ^{ac}	0.37±0.004 ^c
<i>AW/SH</i>	0.43±0.007 ^a	0.43±0.006 ^a	0.44±0.004 ^a	<i>OW/AW</i>	1.03±0.011 ^a	1.02±0.018 ^a	1.02±0.010 ^a
<i>OW/SH</i>	0.45±0.005 ^a	0.43±0.038 ^c	0.44±0.003 ^{ac}	<i>OH/AW</i>	0.63±0.007 ^a	0.67±0.012 ^{bc}	0.68±0.008 ^c
<i>OH/SH</i>	0.28±0.003 ^a	0.29±0.005 ^{ac}	0.29±0.003 ^c	<i>OH/OW</i>	0.62±0.006 ^a	0.67±0.022 ^c	0.67±0.009 ^c
<i>AL/BWH</i>	0.91±0.005 ^a	0.92±0.007 ^a	0.92±0.005 ^a	<i>BW/SH</i>	0.59±0.031 ^a	0.77±0.039 ^c	0.94±0.040 ^d
<i>AW/BWH</i>	0.50±0.007 ^a	0.50±0.006 ^a	0.50±0.004 ^a	<i>BW/BWH</i>	0.68±0.036 ^a	0.89±0.044 ^c	1.08±0.046 ^d
<i>OW/BWH</i>	0.52±0.005 ^a	0.50±0.007 ^a	0.51±0.003 ^a	<i>BW/AL</i>	0.71±0.038 ^a	0.96±0.049 ^c	1.16±0.048 ^d
<i>OH/BWH</i>	0.32±0.003 ^a	0.34±0.006 ^{bc}	0.34±0.003 ^c	<i>BW/AW</i>	1.35±0.067 ^a	1.79±0.088 ^c	2.14±0.087 ^d
<i>AW/AL</i>	0.54±0.008 ^a	0.54±0.006 ^a	0.54±0.003 ^a				

注: B 为“黑白条纹螺”, I 为“中间螺”, O 为“橙色螺”; 同一行数据右上角的相同字母表示差异不显著($P>0.05$); 相邻字母表示差异显著($P<0.05$); 相间字母表示差异极显著($P<0.01$)

表 5 3 种壳口颜色脉红螺性状间表型相关系数
Tab.5 The phenotype correlation coefficients between the traits of three color morphs of *R. venosa*

壳口颜色	性状	<i>SH</i>	<i>BWH</i>	<i>AL</i>	<i>AW</i>	<i>OW</i>	<i>OH</i>	<i>BW</i>
B	<i>SH</i>	1.000	0.997	0.990	0.926	0.971	0.967	0.940
	<i>BWH</i>		1.000	0.995	0.933	0.979	0.976	0.946
	<i>AL</i>			1.000	0.934	0.979	0.971	0.948
	<i>AW</i>				1.000	0.889	0.887	0.937
	<i>OW</i>					1.000	0.962	0.933
	<i>OH</i>						1.000	0.916
	<i>BW</i>							1.000
I	<i>SH</i>	1.000	0.989	0.972	0.924	0.923	0.919	0.917
	<i>BWH</i>		1.000	0.982	0.950	0.931	0.914	0.926
	<i>AL</i>			1.000	0.950	0.970	0.965	0.948
	<i>AW</i>				1.000	0.872	0.900	0.930
	<i>OW</i>					1.000	0.773	0.869
	<i>OH</i>						1.000	0.902
	<i>BW</i>							1.000
O	<i>SH</i>	1.000	0.994	0.965	0.947	0.950	0.953	0.865
	<i>BWH</i>		1.000	0.978	0.959	0.951	0.959	0.885
	<i>AL</i>			1.000	0.980	0.955	0.958	0.925
	<i>AW</i>				1.000	0.941	0.935	0.914
	<i>OW</i>					1.000	0.922	0.885
	<i>OH</i>						1.000	0.889
	<i>BW</i>							1.000

注: B 为“黑白条纹螺”, I 为“中间螺”, O 为“橙色螺”

0.916, 壳口长 *AL* 与湿重 *BW* 的相关系数最大, 为 0.948; 在 I 组, 厣宽 *OW* 与湿重 *BW* 的相关系数最小, 为 0.869, 壳口长 *AL* 与湿重 *BW* 相关系数最大, 为 0.948; 在 O 组, 体螺层 *BWH* 和厣宽 *OW* 与湿重 *BW* 的相关系数相等且最小, 为 0.885, 壳口长 *AL* 与湿重

BW 相关系数最大, 为 0.925。

相关系数反应了各形态指标之间及其与湿重间确实存在依存关系, 通径分析可以进一步将这种关系量化。“黑白条纹螺”的各形态指标相对于湿重的通径系数为壳长 $P_1=0.34$, 体螺层 $P_2=-0.123$, 壳口长

$P_3=0.377$, 壳口宽 $P_4=0.447$, 厣宽 $P_5=0.153$, 厣高 $P_6=0.46$, 对各途径系数的进行显著性分析发现, 只有 P_4 具有极显著差异($P<0.01$), 其余途径系数均不具有显著差异($P>0.05$), 表明壳口宽对“黑白条纹螺”的湿重的直接影响最大; “中间螺”的途径系数为 $P_1=0.061$, $P_2=-0.525$, $P_3=0.694$, $P_4=0.329$, $P_5=0.552$, $P_6=0.4$, 途径系数均不具有显著差异($P>0.05$), 表明壳口长对“中间螺”的湿重影响最大, 但影响不显著; “橙色螺”的途径系数为 $P_1=-0.822$, $P_2=-0.343$, $P_3=0.773$, $P_4=0.218$, $P_5=0.191$, $P_6=0.230$, 途径系数均不具有显著差异($P>0.05$), 表明壳长对“橙色螺”的湿重影响最大, 但不显著。

为进一步阐明各形态指标与湿重的关系, 将脉红螺的形态指标(X_i)与体重(Y)的相关系数(r_{ij})分为各性状的直接作用(途径系数 P_i)和某一性状通过其它形态性状的间接作用($r_{ij}P_j$)两个部分, 即 $r_{ij} = P_i + r_{ij}P_j$, 结果见表 6。从表 6 可以看出, 对“黑白条纹螺”来说, 壳高 SH 、壳口长 AL 和壳口宽 AW 的直接作用较大, 其它形态指标主要通过间接作用影响湿重, 各个形态指标对湿重的间接影响作用都较大, 最小的为壳口宽 AW ; 对“中间螺”而言, 壳口长 AL 的

间接作用最小且小于直接作用, 体螺层 BWH 、壳口长 AL 和壳口宽 AW 直接作用较大, 其它形态指标主要通过影响壳口长来间接影响湿重。“橙色螺”壳口长 AL 的间接作用同样较小, 壳高 SH 、体螺层 BWH 和壳口长 AL 直接影响较大, 其它形态指标主要通过间接作用影响湿重。

运用 Stepwise 法, 使用 SPSS 进行多元线性回归分析, 建立最优“黑白条纹螺”(1)、“中间螺”(2)和“橙色螺”(3)的回归方程:

$$Y = -87.508 + 1.703X_3 + 1.959X_4 \quad (1)$$

$$Y = -93.67 + 2.975X_3 \quad (2)$$

$$Y = -125.014 + 5.119X_3 - 1.28X_1 \quad (3)$$

式中, Y 为湿重(g), X_1 为壳长(mm), X_3 为壳口长(mm), X_4 为壳口宽(mm)。对模型的截距和偏回归系数进行显著性检验, 它们都达到极显著的水平($P<0.01$), 三种壳口颜色脉红螺入选的形态指标对体重的决定系数分别为 0.919、0.898、0.866, 对三个方程进行 ANOVA 方差分析表明, 三个方程均存在极显著差异($P<0.01$), 即这些形态指标对脉红螺的湿重具有较大的决定作用。其中, 壳口长对三种壳口颜色脉红螺的湿重均具有显著影响, 壳口宽对“黑白条纹螺”、壳

表 6 3 种壳口颜色的脉红螺形态性状对体质量的影响比较
Tab.6 The effects of traits on body weight of three color morphs of *R. venosa*

壳口颜色	性状	相关系数	直接作用	间接作用						总和
				<i>SH</i>	<i>BWH</i>	<i>AL</i>	<i>AW</i>	<i>OW</i>	<i>OH</i>	
B	<i>SH</i>	0.940	0.340	—	-0.122	0.373	0.414	0.149	-0.124	0.689
	<i>BWH</i>	0.946	-0.123	0.339	—	0.375	0.417	0.150	-0.125	1.155
	<i>AL</i>	0.948	0.377	0.336	-0.122	—	0.417	0.150	-0.125	0.657
	<i>AW</i>	0.937	0.447	0.315	-0.114	0.352	—	0.136	-0.114	0.575
	<i>OW</i>	0.933	0.153	0.330	-0.120	0.369	0.397	—	-0.124	0.853
	<i>OH</i>	0.916	-0.128	0.329	-0.120	0.366	0.396	0.147	—	1.119
I	<i>SH</i>	0.917	0.061	—	-0.519	0.675	0.304	0.134	0.267	0.861
	<i>BWH</i>	0.926	-0.525	0.060	—	0.681	0.313	0.135	0.265	1.455
	<i>AL</i>	0.948	0.694	0.059	-0.516	—	0.313	0.141	0.280	0.278
	<i>AW</i>	0.930	0.329	0.056	-0.499	0.659	—	0.127	0.261	0.605
	<i>OW</i>	0.869	0.145	0.056	-0.489	0.673	0.287	—	0.224	0.752
	<i>OH</i>	0.902	0.290	0.056	-0.480	0.670	0.296	0.112	—	0.654
O	<i>SH</i>	0.865	-0.822	—	0.341	0.746	0.206	0.181	0.220	1.694
	<i>BWH</i>	0.885	0.343	-0.817	—	0.756	0.209	0.182	0.221	0.550
	<i>AL</i>	0.925	0.773	-0.793	0.336	—	0.213	0.182	0.221	0.159
	<i>AW</i>	0.914	0.218	-0.778	0.329	0.757	—	0.180	0.215	0.703
	<i>OW</i>	0.885	0.191	-0.781	0.326	0.738	0.205	—	0.212	0.701
	<i>OH</i>	0.889	0.230	-0.783	0.329	0.740	0.204	0.176	—	0.666

注: B 为“黑白条纹螺”, I 为“中间螺”, O 为“橙色螺”

长对“橙色螺”分别具有显著影响,其它形态指标对湿重均不具有直接的显著影响。因此,在以后进行选择育种时,“黑白条纹螺”主要考虑壳口长和壳口宽;“中间螺”主要关注壳口长;“橙色螺”主要选择壳长和壳口长。

2.1.3 群体平均值的相似性 选用能代表不同壳口颜色脉红螺一般特征的每个变量的平均值进行聚类分析,结果如图 3 所示。“橙色螺”和“中间螺”相似程度较大,“黑白条纹螺”同两者相似性较小。这与形态指标、标准化数据的多重比较结果相吻合,同时也说明“黑白条纹螺”和“橙色螺”之间差异较大,而“中间螺”是过渡类型的螺,且“中间螺”与“橙色螺”的差异较其与“黑白条纹螺”的差异小。该结果显示,壳口颜色可以代表脉红螺某些生长指标性状。

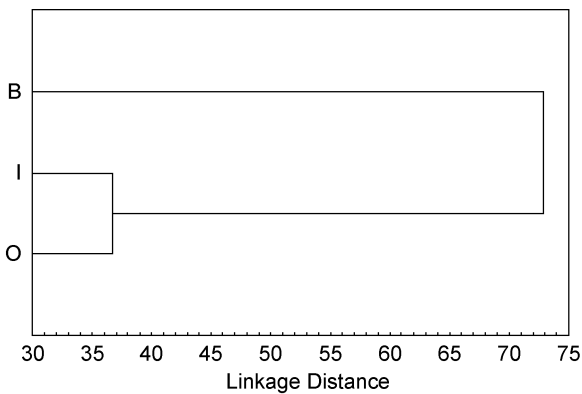


图 3 3 种壳口颜色的脉红螺形态特征均值聚类图
Fig.3 Tree diagram for three color morphs of *R. venosa* (City-block distances)

2.2 分子分析

2.2.1 DNA 序列变异和遗传距离 三种壳口颜色脉红螺 mt16S rRNA 基因总长为 506bp。在 506 个序

列位点中,共有 11 个位点存在变异,约占 2.17%;其中包含了 3 个简约信息位点;A、T、C 和 G 碱基的平均含量分别为 33.3%、31.5%、15.4%和 19.8%, A+T 含量 64.8%, 具有明显的 AT 含量偏倚。三种壳口颜色脉红螺共有 11 个单倍型,其中共享单倍型 2 个,一个为三种壳口颜色脉红螺共享,另一个为 O 组和 I 组共享单倍型。基于三种壳口颜色 16S rDNA 基因片段序列遗传距离分析结果见表 7(A): 三种壳口颜色脉红螺各类型内不同个体间的平均遗传距离在 0.03—0.04 之间变动,与各类型间的遗传距离(0.03—0.04)相似,明显小于与红螺的遗传距离(0.071—0.074),三种壳口颜色的脉红螺无遗传分化。3 种壳型脉红螺 mtCO 基因片段同源序列为 642bp。在 642bp 比对位点中有 25 个变异位点,约占 3.89%,其中有 12 个简约信息位点;A、T、C 和 G 的含量分别为 25.0%、39.0%、16.4%和 19.6%, A+T 含量 64%, 具有明显的 AT 偏倚。三种壳口颜色脉红螺共有 18 种单倍型,其中共有单倍型有 6 种,两个为三种壳口颜色脉红螺共享,另外 4 个为 O 组和 I 组共享单倍型。基于三种壳口颜色 CO 基因片段序列遗传距离分析结果见表 7(B): 三种壳口颜色脉红螺各类型内不同个体间的平均遗传距离在 0.03—0.06 之间变动,与各类型间的遗传距离(0.04—0.05)相似,明显小于与红螺的遗传距离(0.180—0.181),三种壳口颜色的脉红螺无遗传分化。
2.2.2 mt16S rRNA 和 CO 基因片段序列的系统学分析 基于所获得的三种类型的脉红螺 mt16S rRNA 和 CO 基因片段序列,以红螺(*R. bezona*)的 mt16S rRNA 和 CO 基因片段序列为外群构建邻接树(NJ 树)和贝叶斯树,如图 4、图 5。2 种方法所构建的系统树的拓扑结构基本一致,三种壳口颜色的脉红螺并未形成独立支系,而是相互交叉聚为一支,因

表 7 基于 3 种壳口颜色的脉红螺 mt16S rRNA 和 CO I 基因片段构建的距离矩阵

Tab.7 Distance matrix of mt16S rRNA (A) and CO (B) gene fragment of the three color morphs of *R. venosa*

基因	壳口颜色及外群	B	I	O	<i>R. bezona</i>
(A) 16S rRNA	B	0.003			
	I	0.004	0.004		
	O	0.004	0.003	0.004	
	<i>R. bezona</i>	0.071	0.073	0.074	—
(B) CO	B	0.006			
	I	0.005	0.003		
	O	0.005	0.004	0.004	
	<i>R. bezona</i>	0.180	0.180	0.181	—

注: B 为“黑白条纹螺”, I 为“中间螺”, O 为“橙色螺”; 对角线左下角为类型间的遗传距离, 对角线上(斜体)为类型内的遗传距离

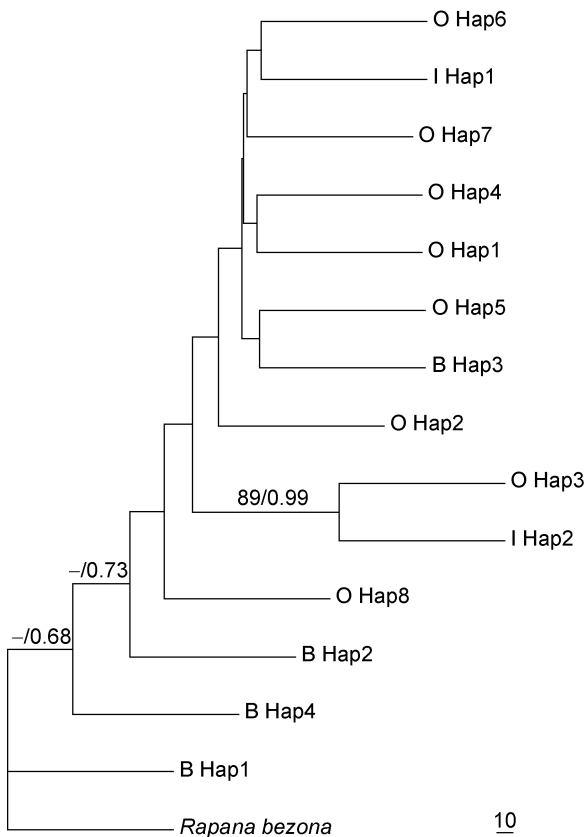


图 4 3 种壳口颜色脉红螺 mt16S rRNA 的邻接树(NJ)和贝叶斯树(BI)

Fig.4 The Neighbor-joining tree and Bayesian tree constructed with mt16S rRNA gene sequence of three color morphs of *R. venosa*

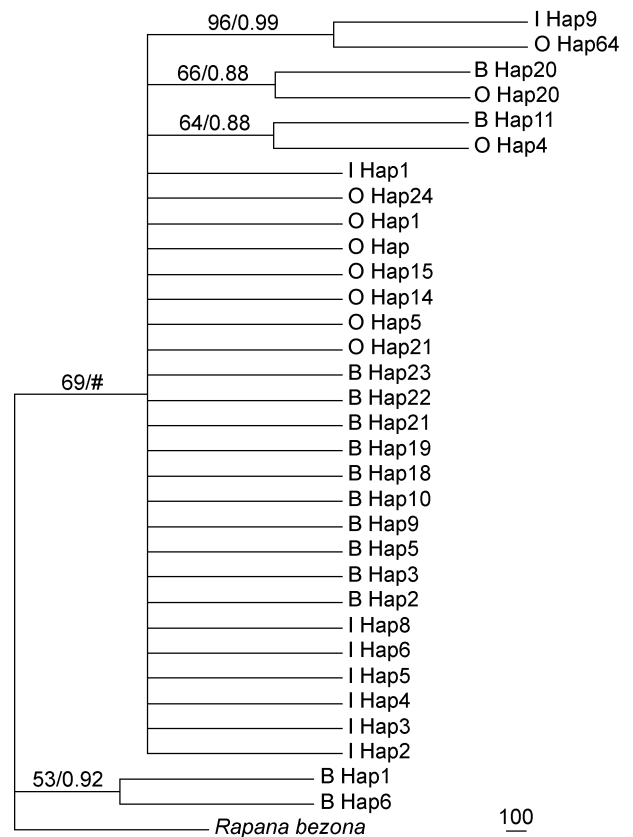


图 5 3 种壳口颜色脉红螺 CO₁ 的邻接树(NJ)和贝叶斯树(BI)

Fig.5 The Neighbor-joining tree and Bayesian tree constructed with CO₁ gene sequence of three color morphs of *R. venosa*

此三种类型脉红螺无显著的遗传分化。

3 讨论

腹足纲的贝壳形态(包括大小、形态和颜色等)是传统分类学的重要依据。其中最主要的分类依据是贝壳大小及其它受贝壳大小影响的形态特征,如螺层数目、外唇形态、螺口相对大小、脐等(Wilke *et al.*, 2001)。同时,受底质、水温、水流、盐度、温度、饵料、捕食者、种内种间竞争、寄生、外壳的钙化等生物因素和非生物因素的影响(Wilke *et al.*, 2001),贝壳形态也不尽完全相同。有研究表明,水温和捕食者会影响贝壳的重量、厚度和硬度(Trussell, 2000; Brookes *et al.*, 2007)。同时,个体差异、性别差异以及生长发育阶段等可能导致壳型、壳色等形态特征差异。

形态学研究结果显示,3种壳口颜色脉红螺不仅在壳口颜色上存在差异,在壳高、壳口长、壳口宽等形态特征与湿重的主要影响因子(壳长、壳口长和壳

口宽)等方面都存在显著差异。然而在分子学方面,基于 mt16S rRNA 和 CO₁ 序列片段的分析结果显示,三种壳口颜色的螺均属于同一物种,未出现遗传分化,因此三种壳口颜色脉红螺之间的差异并不是由物种的差异所造成的。

壳口颜色的差异可能是由年龄、性别、孵化及浮游时期的环境条件、底质等(Wilke *et al.*, 2001)造成的。齐钟彦(1987)认为,年龄较大的脉红螺的壳口颜色呈鲜艳的橙红色,但作者对壳长进行分析发现,虽然三种螺的壳长具有显著差异,且“橙色螺”壳长显著大于其它螺,但数据间大范围重叠,因此壳口颜色的差异并不是由脉红螺的年龄差异造成的。虽然有些生物存在性二型现象,但三种壳口颜色的脉红螺均有雌雄两种性别;将不同壳口颜色的螺分开养殖,均能够成功繁殖后代,因此,壳口颜色的差异也不是由性别不同引起的。很多腹足类是全年繁殖的,因此,不同季节产的螺,其外界的生物和非生物因子不同,也可

能导致壳形的差异(Wilke *et al*, 2001)。但对脉红螺进行观察后发现, 每年的 6—9 月是脉红螺繁殖的高峰, 在人工升温的条件下, 5 月中、下旬脉红螺开始繁殖, 10 月上旬其繁殖达到尾声, 未见其在 11 月至来年 4 月进行繁殖。因此, 壳口颜色的差异也不是由全年繁殖造成的, 可能引起差异的因素还包括底质等。本研究所取的螺是同域分布的, 但考虑到同一区域内的底质也可能呈斑块状分布, 因此, 底质是否是影响因素之一, 还需进一步研究。壳高的差异可能是由于不同壳口颜色脉红螺的生长速度、年龄结构上的不同所引起的。生长速度较快、多年生螺比例高的壳口颜色的脉红螺具有较大的平均壳高。但目前尚无相关数据, 具体原因仍需进一步调查。

参 考 文 献

- 齐钟彦, 1987. 黄渤海的软体动物. 北京: 农业出版社, 56
- 李嘉泳, 1959. 强棘红螺的生殖和胚胎发育. 山东海洋学院学报, 1: 92—130
- 杨建敏, 李 琪, 郑小东等, 2008. 中国沿海脉红螺(*Rapana venosa*)自然群体线粒体 DNA 16S rRNA 遗传特性研究. 海洋与湖沼, 39(3): 257—262
- 杨建敏, 郑小东, 李 琪等, 2010. 基于 mtDNA 16S rRNA 序列的脉红螺(*Rapana venosa*)与红螺(*R. bezoar*). 海洋与湖沼, 41(5): 748—755
- 杨建敏, 郑小东, 李 琪等, 2006. 中国沿海脉红螺(*Rapana venosa*)居群数量性状遗传多样性研究. 海洋与湖沼, 37(5): 385—392
- 吴 彪, 杨爱国, 刘志鸿等, 2010. 魁蚶两个不同群体形态性状对体质量的影响效果分析. 渔业科学进展, 31(6): 54—59
- 张福绥, 1980. 中国近海骨螺科的研究. 红螺属. 海洋科学集刊, 16: 13—123
- 蔡立哲, 王 雯, 2010. 节织纹螺(*Nassarius hepaticus*)贝壳差异的 CO 基因分析. 海洋与湖沼, 41(1): 47—53
- Brookes J I, Rochette R, 2007. Mechanism of a plastic phenotypic response: predator-induced shell thickening in the intertidal gastropod *Littorina obtusata*. Journal of Evolutionary Biology, 20(3): 1015—1027
- Folmer O, Black M, Hoeh W *et al*, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 3: 294—299
- Grabau A W, King S G, 1928. Shells of Peitaiho. Peking: Peking Leader Press, 1—279
- Hirase Y, 1907. On Japanese marine Molluscs (). The Conchological Magazine, 1(8): 239—296
- Kessing B, Croom H, Martin A *et al*, 1989. The simple fool's guide to PCR. Department of Zoology, University of Hawaii, Honolulu, Hawaii, 1—23
- Larkin M A, Blackshields G, Brown N P *et al*, 2007. Clustal W and clustal X version 2.0. Bioinformatics, 23: 2947—2948
- Librado P, Rozas J, 2009. DnaSP v5. A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics, 25: 1451—1452
- Posada D, Crandall K A, 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics, 14: 817—818
- Reeve L A, 1847. Monograph of the genus *Turbinella*. Conchologia Iconica, London: L. Reeve & Co, 4: 1—13
- Ronquist F, Huelsenbeck J P, 2003. Mrbayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics, 19: 1572—1574
- Swofford D L, 2002. Paup*. Phylogenetic analysis using parsimony (* and other Methods). Version 4.0b 10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 1—144
- Tamura K, Peterson D, Peterson N *et al*, 2011. MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Mol Biol and Evol, 28: 2731—2739
- Trussell G C, 2000. Phenotypic clines, plasticity, and morphological trade-offs in an intertidal snail. Evolution, 54(1): 151—166
- Wilke T, Falniowski A, 2001. The genus *Adriohydrobia* (Hydrobiidae: Gastropoda): polytypic species or polymorphic populations? J Zool Syst Evol Research, 39: 227—234
- Yen T C, 1933. The molluscan fauna of amoy and its vicinal regions. Mar Biol Assoc China 2nd Ann Rep, 1—120
- Yokoyama M, 1922. Fossils from the upper Musashino of Kazusa and Shimosa. Journal of the College of Science, Tokyo Imperial University, 44: 1—200

VARIANCE ANALYSIS OF THREE COLOR MORPHS OF *RAPANA VENOSA* BASED ON MORPHOLOGICAL TRAITS AND mt16S rRNA AND CO PARTIAL SEQUENCES

BAN Shao-Jun^{1,2}, XUE Dong-Xiu^{1,2}, ZHANG Tao¹, PAN Yang^{1,2}, WANG Hai-Yan¹

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071; 2. Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049)

Abstract In *Rapana venosa*, there are three color morphs of aperture: black and white stiped, orange, and intermediate type. In the present study, these three color morphs of *R. venosa* was compared based on morphological traits and partial sequences of the mitochondrial DNA 16S rRNA and cytochrome oxidase I gene. The results of morphological analysis showed that morphological traits were all significantly different in three color morphs. Correlation coefficient between each phenotypic traits and whole mass were all significantly different. Aperture length and aperture width had effects on whole mass for “black and white stiped”, while for “intermediate type” and “orange” there were no key factor that affecting whole mass. Using Stepwise method establish Multiple linear regression equation. Tree diagram constructed with morphological traits of the three color morphs demonstrated that “intermediate type” and “orange” were more closely related to each other than they are to “Black and white striped”. Results of phylogenetic analysis based on partial mtDNA 16S rRNA and CO gene fragments indicated that there was no genetic divergence among the three color morphs.

Key words *Rapana venosa*, Morphological traits, Correlation analysis, Regression analysis, mt16S rRNA, CO