

荣成天鹅湖大叶藻(*Zostera marina*)间 2 种小型腹足类的分类学研究*

刘 静^{1,2} 管洪在¹ 张素萍² 郭小芳¹ 杨学伶³ 王海艳²

(1. 青岛大学医学院 青岛 266021; 2. 中国科学院海洋研究所海洋生物分类与系统演化实验室
青岛 266071; 3. 天津市宝坻区畜牧水产局 天津 301800)

摘要 小型腹足类生物在我国种类繁多,但其相关研究在国内基本属于空白。本文对荣成天鹅湖大叶藻间的 2 种小型腹足类生物进行了形态学及分子生物学(16S 和 28S rRNA 基因片段)研究。结果表明,根据形态学所鉴定的短剑螺属未定种 *Machaeroplax* sp., 应为蛙螺属未定种 *Lirularia* sp.; 分子生物学研究结果支持形态学对刺绣翼螺 *Alaba picta* 的鉴定。同时,与 *A. picta* 有一定形态学差异的其它 4 种相近形态的小型腹足类,在基因序列及遗传距离上与刺绣翼螺非常接近,亦应为刺绣翼螺 *Alaba picta*。

关键词 天鹅湖, 大叶藻, 刺绣翼螺 *Alaba picta*, 蛙螺属未定种 *Lirularia* sp., 16S rRNA, 28S rRNA
中图分类号 Q959.212

荣成天鹅湖位于山东省荣成市成山镇,是荣成湾内由于泥沙淤积形成的一个天然纳潮泻湖,是世界著名的天鹅越冬栖息地,湖中有大量大叶藻(*Zostera marina* L.)分布。大叶藻为多年生常绿植物,隶属于单子叶植物纲(Monocotyledoneae)、眼子菜科(Potamogetonaceae)、大叶藻属(*Zostera*) (张壮志等, 2010), 常于浅海形成海草床(高亚平等, 2010)。大叶藻在海洋生态系统尤其是生态环境修复等方面以及医药卫生、水产养殖(张壮志等, 2010; 任国忠等, 1991; Zieman *et al.*, 1980; Thayer *et al.*, 1984)等方面具有重要的科研、社会及经济价值。其间生物多样性丰富,包括大量的小型腹足类生物(壳高<1cm), 它们共同参与构成大叶藻生态体系。因此,对大叶藻间小型腹足类生物的研究对于目前的腹足类研究及对大叶藻的生境修复等相关研究具有重要意义。

目前,我国对于小型腹足类的研究基本处于空白,国外已有相关报道。其中, Fukuda 等(2004, 2005, 2006)借助于形态学、解剖学及系统发育学的研究方法,报道了澳大利亚昆士兰州的 3 个拟沼螺科

(Assimineidae)的新属: *Cryptassiminea*、*Conassiminea* 及 *Rugapedia*。Okutani 等(2000)对日本沿海附近的海洋生物进行了报道,包括多种小型腹足类生物,最小的平均壳高不足 1mm。随着生物信息学及分子生物学的发展,借助于分子生物学手段分析物种的 DNA 序列,在海洋生物的物种鉴定及系统发育研究中的应用越来越多(Wang *et al.*, 2004, 2008)。Colgan 等(2007)基于 18S rRNA、28S rRNA、12S rRNA、COX1 基因及组蛋白 H3 基因、延长因子-1 α (EF-1 α)基因对新腹足总目(Caenogastropoda)的 29 个种的进化地位进行了研究。Frey 等(2008)对不同地理种群的蜃螺(*Nerita*)的 16S rRNA 基因、COX1 基因及 ATP5 α 基因进行分析,研究不同地理种群之间的先后进化关系。Akira 等(2007)基于 16S rRNA 基因序列研究了蛾螺科 *Buccinum* 属的系统发育关系,而董长永等(2008)利用 28S rRNA 基因对中国沿海的蛾螺科 10 个种间的系统发生关系及分类地位进行了研究。

小型腹足类生物的个体较小,因而给传统的形态学及解剖学研究带来一定的难度。本研究用分子生

* 海洋公益性行业科研专项经费项目, 200805069 号; 中国科学院海洋研究所“一三五”生物多样性项目, 2012.10; 国家自然科学基金项目, 40876084 号; 中国科学院海洋研究所知识创新前沿项目, 2007.12。刘 静, 硕士研究生, E-mail: liujing_qd2012@163.com

通讯作者: 管洪在, 副教授, E-mail: guanhongzai@163.com; 王海艳, 副研究员, E-mail: haiyanwang@qdio.ac.cn

收稿日期: 2012-05-10, 收修改稿日期: 2012-08-19

物学及系统发育学等研究手段对采自大叶藻间的小型腹足类: 蛙螺属未定种(*Lirularia* sp.)及刺绣翼螺 *Alaba picta* 和其它 4 种近似壳形的贝类的 16S 及 28S rRNA 基因片段进行测定分析, 并结合形态学特征, 对其分类地位进行进一步确定。

1 材料与方法

1.1 实验材料

所有实验样品均为 2010—2011 年采自荣成天鹅湖大叶藻间, 经形态学鉴定后, 保存于 95% 的乙醇中, 备用于分子生物学实验。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 提取 取 95% 乙醇固定的样品, 依据个体大小, 将去壳后的组织或完整个体置于 1.5ml 离心管中, 用眼科剪剪碎。DNA 提取使用 OMEGA 软体组织 DNA 提取试剂盒(E.Z.N.A Mollusc DNA Kit)。DNA 提取产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后, 保存于 -20℃。

1.2.2 PCR 扩增及测序 PCR 反应采用海洋生物

通用 16S 及 28S rRNA 基因扩增引物(Kessing *et al.*, 1989; Park *et al.*, 2000)。实验采用 25μl 反应体系, 组分包括 50mmol/L KCl, 10mmol/L Tris-HCl, 1.5mmol/L MgCl₂, 200μmol/L dNTP 混合物, 0.05U/μl *Taq* DNA 聚合酶, 模板 DNA 100ng。反应程序为: 94℃ 预变性 5min; 30 个循环, 每个循环包括 94℃ 1min, 56℃ 50s (16S)或 58—60℃ 50s (28S), 72℃ 1min; 循环完成后, 72℃ 延伸 10min。PCR 扩增产物由 1% 琼脂糖凝胶检测后, 16S rRNA 基因扩增产物委托华大基因科技完成纯化测序, 28S rRNA 基因扩增产物送北京三博远志生物技术有限公司完成测序。

1.2.3 数据处理分析 运用 Bioedit 软件结合 DNA 正反向序列图谱对测序结果进行校正。应用 MEGA4 软件进行序列分析, 并根据 Kimura-2-Parameter 模型计算遗传距离。通过 PAUP4.0 软件以最大简约法(Maximum Parsimony, MP)及邻接法(Neighbour-Joining, NJ)分别构建系统发育树, 重复 1000 次计算 Bootstrap 值。文中引用 GenBank 参考序列见表 1。

表 1 文中引用 DNA 序列 GenBank 登录号

Tab.1 DNA sequences cited from GenBank

分类地位	简写	GenBank 登录号	
		16S	28S
马蹄螺科 Trochidae			
<i>Trochus tiaratus</i>	<i>T. tia</i>	GQ249816	GQ249731
<i>Trochus viridis</i>	<i>T. vir</i>	GQ249808	GQ249733
<i>Diloma arida</i>	<i>D. ari</i>	AY855324	GQ249721
<i>Umbonium costatum</i>	<i>U. cos</i>	AM048895	HM048706
<i>Umbonium giganteum</i>	<i>U. gig</i>	AB505398	AB505269
<i>Monilea smithi</i>	<i>M. smi</i>	AB505354	AB505265
<i>Conotalopia mustelina</i>	<i>C. mus</i>	AB505345	AB505256
<i>Lirularia iridescens</i>	<i>L. iri</i>	GQ232301	GQ232397
<i>Lirularia pygmaea</i>	<i>L. pyg</i>	AB505351	AB505263
<i>Stomalella impertusa</i>	<i>S. imp</i>	GQ232304	GQ232401
<i>Thalotia conica</i>	<i>T. con</i>	GQ232309	EU530022
<i>Gibbula pennanti</i>	<i>G. pen</i>	GQ232295	GQ232393
滑螺科 Litiopidae			
<i>Alaba opinosa</i>	<i>A. opi</i>	AY010510	HM003657
麂眼螺科 Rissoidae			
<i>Rissoa labiosa</i>	<i>R. lab</i>	AY676117	—
<i>Rissoa lia</i>	<i>R. lia</i>	GU177934	—
<i>Setia turriculata</i>	<i>S. tur</i>	AY222652	—
<i>Zebina</i> sp.	<i>Z. sp.</i>	—	JF750973
外群: 笠贝科 Lottiidae			
<i>Lottia asmi</i>	<i>L. asm</i>	FJ977698	FJ977664

2 结果及分析

2.1 形态描述

2.1.1 短剑螺属未定种 (*Machaeroplax* sp.)(以下简称 DJL) 贝壳(图 1)呈扁圆锥形,壳高约 4mm,壳宽略大于壳高。壳质薄,表面呈棕褐色,壳表花纹多变,多见深棕色或棕黄色斑状花纹呈放射状排列。壳顶常褪色而具珍珠光泽。壳面有细密螺肋,肋的粗细及肋间隙可有变化。壳口方圆形,脐孔较深,厣角质,薄呈半透明状,具同心圆纹。

2.1.2 刺绣翼螺 *Alaba picta* (A. Adams, 1860)及其它 4 种形态相近的贝类 在本研究中,作者发现了刺绣翼螺(以下简称为 Api)及其它 4 种具有相近形态的贝类,在下文的论述中,分别以 CXY、JYL、SW 及 WZ 表示,其形态特征如下:

刺绣翼螺 (Api): 如图 2 (Api), 贝壳壳高 1cm 左右,呈长圆锥形,壳质薄。壳面光滑,壳表呈灰褐色或有红褐色连续螺旋雕刻线及与其相交呈网格状的纵向线纹。壳口近菱形,内壳可见壳表网格状花纹,无脐孔,厣角质。

CXY: 如图 2(CXY), 壳高约 6mm, 与 Api 相比,壳形稍低矮。壳表呈浅黄色,网格状线条仅隐约可见且不连续,体螺层有不明肩角形成。壳口卵圆形,无脐孔,厣角质。

JYL: 如图 2(JYL), 壳高约 7mm, 壳高与壳宽比例与 CXY 相似。壳质薄,壳表呈棕灰色或灰白色。壳口卵圆形,内壳可见壳表不明显的棕色线状或点状花纹,无脐孔,厣角质,半透明。

SW: 如图 2(SW), 贝壳呈锥形,壳高约 6mm。壳质薄,壳表被有一层浅黄色壳皮,表面有细螺纹及生长纹。壳口近菱形,无脐孔,厣角质,透明。

WZ: 如图 2(WZ), 贝壳壳形与 SW 相似,壳高约



图 1 短剑螺未定种 *Machaeroplax* sp. 的形态特征
Fig.1 Morphological characteristics of *Machaeroplax* sp.

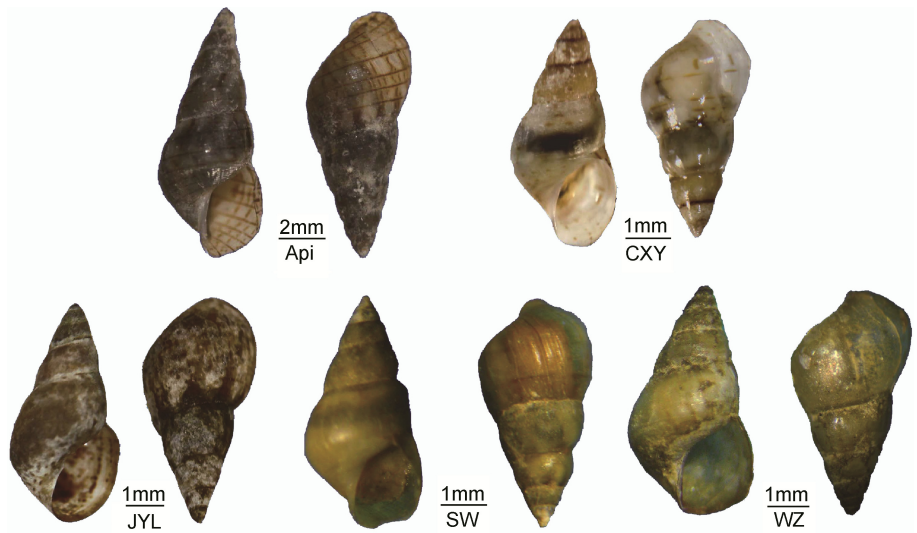


图 2 刺绣翼螺 *Alaba picta* (Api)及其它 4 种形态相近贝类(CXY/JYL/SW/WZ)的形态特征
Fig.2 Morphological characteristics of *Alaba picta* and other four similar gastropods

4mm。壳质薄,壳表呈浅黄色,体螺层有不及 SW 明显的细螺纹及生长纹。壳口近菱形,无脐孔,厣角质,透明。

2.2 基因序列分析及系统发育学研究

2.2.1 短剑螺属未定种 (*Machaeroplax* sp., DJL) 实验获得 DJL 11 个个体的 16S rRNA 和 8 个个体的 28S rRNA 基因序列。根据形态分类,短剑螺属于马蹄螺科,故将 DJL 序列与马蹄螺科贝类序列进行了分析比较。

2.2.1.1 16S 序列分析 将 11 条 16S rRNA 基因序列进行比对,获得长约 443bp 的基因片段,包含 3 个单

倍体型(HAP1DJL—HAP3DJL), 各单倍体型 GenBank 登录号及所包含个体数见表 2。3 个单倍体型之间仅包含两个碱基变异位点, 分别为 T-C 和 A-G 转换(表 2)。对各单倍体型序列分析, 得 DJL 16S rRNA 基因平均碱基组成为: T32.8%, C15.0%, A31.4%, G21.8%, A+T 明显大于 G+C, 符合无脊椎动物线粒体 DNA 的碱基组成特点(Spicer, 1995)。

2.2.1.2 28S 序列分析 实验获得的 8 条长约 1057bp 的 28S rRNA 基因片段序列, 经 Bioedit 软件比对后, 发现 3 个单倍体型(HAP1DJL—HAP3DJL), 各单倍体型序列的 GenBank 登录号及包含个体数见表 2。3 个单倍体型之间含有一个 A-G 和一个 C-T 转换位点(表 2)。DJL 28S rRNA 基因序列平均碱基组成为 T21.0%, C33.2%, A20.4%, G25.4%, 其中 A+T<G+C。

2.2.1.3 遗传距离及系统发育树的构建 运用 MEGA4 软件, 根据 Kimura-2-Parameter 模型, 在 DJL 及马蹄螺科的 16S 及 28S rRNA 基因序列的基础上, 以笠贝科 *Littia asmi* 作为外群, 计算遗传距离(D)(表

3)。在根据 16S rRNA 序列所计算得到的遗传距离中, 外群 *L. asmi* 及与马蹄螺科各贝类的距离在 0.4190—0.4849 之间; DJL 各单倍体型之间遗传距离在 0—0.0026 之间; DJL 与马蹄螺科各贝类之间的遗传距离在 0.0105—0.1529 之间, 其中与蛙螺属 *Lirularia* 的虹彩蛙螺 *L. iridescens* 的遗传距离最近, 为 0.0105—0.0131, 并小于 *L. iridescens* 与同属的小蛙螺 *L. pygmaea* 之间的距离($D=0.0185$)。基于 28S rRNA 序列所计算的遗传距离中, 与上述相对应的数据分别为 0.3674—0.3916; 0.0010—0.0020, 0—0.0432, 0—0.0010 ($D=0.0040$)。

以笠贝科 *L. asmi* 为外群, 在实验所获得的 16S 与 28S rRNA 单倍体型序列及 GenBank 序列(表 1)的基础上, 分别运用 PAUP 4.0 软件构建 MP 及 NJ 树(图 3, 图 4)。根据两种序列构建的系统发育树所反映出的马蹄螺科各种属贝类间的进化关系基本一致; 而 DJL 在各单倍体型聚在一起后, 首先与蛙螺属 *Lirularia* 贝类聚在一起, 然后再与其它马蹄螺科贝类聚类。

表 2 DJL 16S、28S rRNA 基因各单倍体型 GenBank 登录号、包含个体数及碱基变异
Tab.2 The information of the 16S and 28S rRNA gene haplotypes of DJL

16S 单倍体型	个体数	GenBank 登录号	碱基变异	28S 单倍体型	个体数	GenBank 登录号	碱基变异
HAP1DJL	9	JX409915	—	HAP1DJL	6	JX409903	—
HAP2DJL	1	JX409916	T-C	HAP2DJL	1	JX409904	A-G
HAP3DJL	1	JX409917	A-G	HAP3DJL	1	JX409905	C-T

表 3 马蹄螺科及外群各种间 16S 及 28S rRNA 基因序列的遗传距离(D)
Tab.3 Genetic distances (D) of 16S and 28S rRNA gene fragments among Trochidae and outgroups

种名	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
HAP1DJL	—	0.0000	0.0026	0.0105	0.0131	0.0948	0.0917	0.0541	0.0884	0.1125	0.1035	0.1399	0.1465	0.1340	0.1496	0.4190
HAP2DJL	0.0010	—	0.0026	0.0105	0.0131	0.0948	0.0917	0.0541	0.0884	0.1125	0.1035	0.1399	0.1465	0.1340	0.1496	0.4190
HAP3DJL	0.0010	0.0020	—	0.0131	0.0158	0.0948	0.0917	0.0541	0.0914	0.1125	0.1035	0.1431	0.1498	0.1372	0.1529	0.4190
<i>L. iri</i>	0.0000	0.0010	0.0010	—	0.0185	0.0947	0.0915	0.0542	0.0915	0.1126	0.1057	0.1368	0.1434	0.1307	0.1527	0.4233
<i>L. pyg</i>	0.0040	0.0050	0.0050	0.0040	—	0.1010	0.1008	0.0630	0.0856	0.1065	0.1007	0.1367	0.1371	0.1274	0.1461	0.4240
<i>U. cos</i>	0.0171	0.0181	0.0181	0.0171	0.0212	—	0.0131	0.0685	0.0972	0.1157	0.1039	0.1428	0.1306	0.0942	0.1366	0.4670
<i>U. gig</i>	0.0171	0.0181	0.0181	0.0171	0.0212	0.0020	—	0.0626	0.1003	0.1125	0.1007	0.1459	0.1244	0.0972	0.1397	0.4499
<i>C. mus</i>	0.0192	0.0202	0.0202	0.0192	0.0233	0.0161	0.0161	—	0.0975	0.1125	0.1068	0.1463	0.1400	0.1121	0.1461	0.4278
<i>M. smi</i>	0.0080	0.0090	0.0090	0.0080	0.0120	0.0131	0.0131	0.0151	—	0.1212	0.0999	0.1585	0.1398	0.1210	0.1364	0.4344
<i>T. vir</i>	0.0368	0.0379	0.0379	0.0368	0.0410	0.0379	0.0379	0.0358	0.0368	—	0.0319	0.1149	0.0765	0.0999	0.1240	0.4312
<i>T. tia</i>	0.0410	0.0421	0.0421	0.0410	0.0453	0.0422	0.0422	0.0400	0.0411	0.0050	—	0.1118	0.0823	0.0970	0.1240	0.4312
<i>T. con</i>	0.0421	0.0432	0.0432	0.0421	0.0463	0.0412	0.0412	0.0432	0.0443	0.0151	0.0203	—	0.1209	0.1030	0.1060	0.4700
<i>D. ari</i>	0.0357	0.0368	0.0368	0.0357	0.0399	0.0358	0.0337	0.0358	0.0347	0.0264	0.0305	0.0347	—	0.1089	0.1301	0.4644
<i>G. pen</i>	0.0337	0.0347	0.0347	0.0337	0.0378	0.0348	0.0348	0.0347	0.0316	0.0233	0.0274	0.0316	0.0090	—	0.0911	0.4754
<i>S. imp</i>	0.0358	0.0368	0.0368	0.0358	0.0400	0.0327	0.0306	0.0347	0.0316	0.0285	0.0327	0.0368	0.0131	0.0182	—	0.4849
<i>L. asm</i>	0.3674	0.3691	0.3691	0.3674	0.3740	0.3753	0.3771	0.3753	0.3689	0.3880	0.3916	0.3893	0.3774	0.3737	0.3777	—

注: 对角线左下方为 28S 基因序列遗传距离, 右上方为 16S 基因序列遗传距离

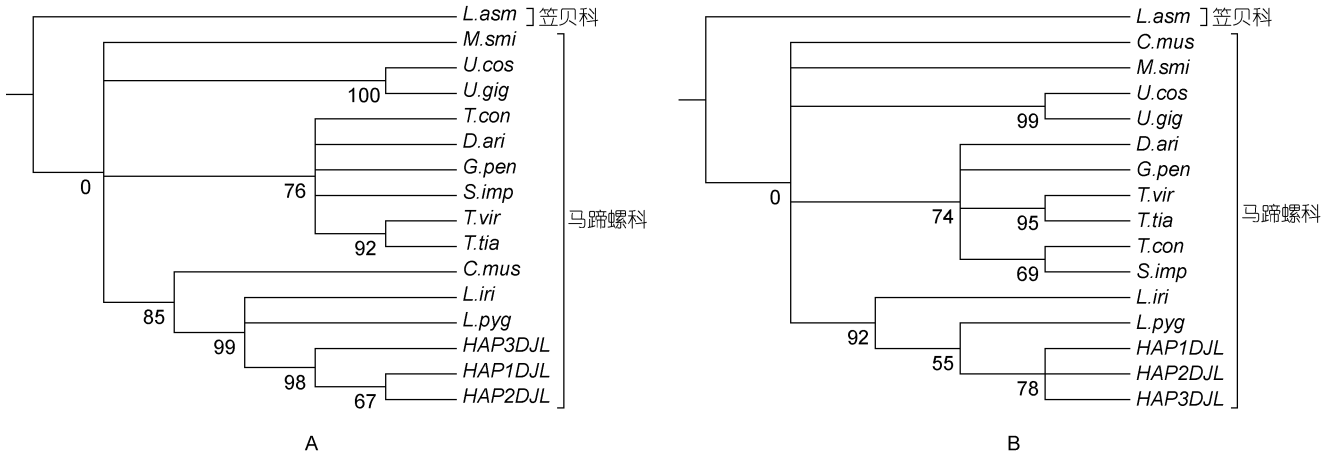


图3 基于马蹄螺科贝类 16S rRNA 基因序列片段构建的系统发育树
 Fig.3 NJ and MP tree based on the 16S rRNA gene sequences in Trochidae
 注: A 为 NJ 树, B 为 MP 树; 节点处数值为 Bootstrap1000 次重复抽样计算结果

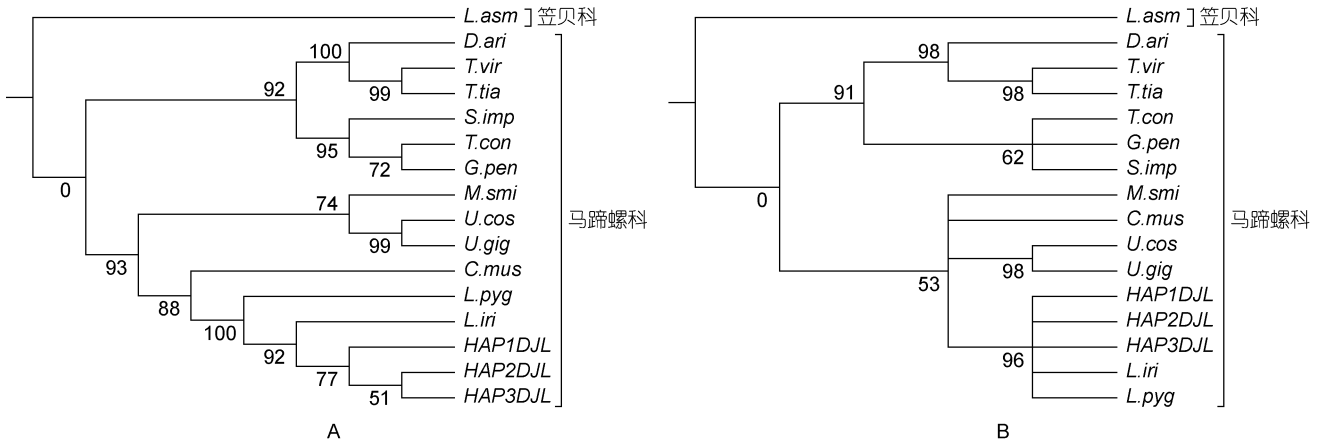


图4 基于马蹄螺科贝类 28S rRNA 基因序列片段构建的系统发育树
 Fig.4 NJ and MP tree based on the 28S rRNA gene sequences in Trochidae
 注: A 为 NJ 树, B 为 MP 树; 节点处数值为 Bootstrap1000 次重复抽样计算结果

2.2.2 刺绣翼螺及其它 4 种形态贝类的研究 分别对 Api、CXY、JYL、WZ 及 SW 五种不同形态的贝类进行 16S 及 28S rRNA 基因测序。经比对分析发现,这 5 种形态贝类的序列之间具有很高的相似性,故在此,对其进行统一分析。根据形态学鉴定结果,刺绣翼螺隶属于滑螺科 Litiopidae,而 JYL 与鹿眼螺科 Rissoidae 贝类形态上具有一定相似性,故在此将刺绣翼螺与鹿眼螺科及滑螺科贝类进行比较讨论。

2.2.2.1 16S 基因序列 实验共获得 5 种形态贝类的 37 条 16S 序列,长约为 443bp。经序列比对发现,不同形态的贝类其序列之间差异较小,甚至完全相同。获得的单倍体型以 HAP1—12 (*A. pic*)表示,各单倍体型的 GenBank 登录号、碱基变异等见表 4。其中,

HAP1 (*A. pic*)在除 CXY 外的其它 4 种形态的贝类中,均为最常见单倍体型。

经比较,5 种形态贝类的 16S rDNA 单倍体型序列的碱基组成基本相同,平均碱基组成为 T28.9%, C15.1%, A32.5%, G23.5%, A+T 明显大于 G+C。

2.2.2.2 28S 基因序列 实验获得了 5 种形态贝类的共 33 条 28S rRNA 基因序列,长约 1056bp。经比对后获得的 9 个单倍体型,其 GenBank 登录号及碱基变异等见表 5。其中, HAP1 (*A. pic*)为 5 种形态的贝类中出现频率最高的单倍体型。

经分析发现,5 种形态贝类的 28S 单倍体型的碱基组成几乎完全相同,其平均碱基组成为 T18.8%, C26.6%, A19.9%, G34.6%, A+T<G+C。

表 4 Api、CXY、JYL、WZ 及 SW 的 16S rRNA 基因单倍体型
Tab.4 Information of 16S rRNA haplotypes of Api, CXY, JYL, WZ and SW

16S 序列 单倍体型	GenBank 登录号	碱基变异	各单倍体型的分布**					总计
			Api	CXY	JYL	SW	WZ	
HAP1 (<i>A. pic</i>)	JX409918	—	3	0	7	9	5	24
HAP2 (<i>A. pic</i>)	JX409919	G-A	0	0	1	0	1	2
HAP3 (<i>A. pic</i>)	JX409920	G-A	0	0	0	1	1	2
HAP4 (<i>A. pic</i>)	JX409921	C-T	1	0	0	0	0	1
HAP5 (<i>A. pic</i>)	JX409922	A-G	1	0	0	0	0	1
HAP6 (<i>A. pic</i>)	JX409923	T-A	0	1	0	0	0	1
HAP7 (<i>A. pic</i>)	JX409924	A-T, T-A, T-C	0	1	0	0	0	1
HAP8 (<i>A. pic</i>)	JX409925	A-G	0	0	1	0	0	1
HAP9 (<i>A. pic</i>)	JX409926	G-A, A-G	0	0	1	0	0	1
HAP10 (<i>A. pic</i>)	JX409927	A-G	0	0	0	0	1	1
HAP11 (<i>A. pic</i>)	JX409928	A-G	0	0	0	0	1	1
HAP12 (<i>A. pic</i>)	JX409929	T-C	0	0	0	0	1	1
测序个体数	—	—	5	2	10	10	10	37

注: **以 5 种形态贝类的被测序个体中, 分别具有各单倍体型的贝类个体数表示

表 5 Api、CXY、JYL、WZ 及 SW 的 28S rRNA 基因单倍体型
Tab.5 Information of 28S rRNA gene haplotypes of Api, CXY, JYL, WZ and SW

28S 序列 单倍体型	GenBank 登录号	碱基变异	各单倍体型的分布**					总计
			Api	CXY	JYL	SW	WZ	
HAP1 (<i>A. pic</i>)	JX409906	—	2	2	9	5	6	24
HAP2 (<i>A. pic</i>)	JX409907	T-C	0	0	1	0	1	2
HAP3 (<i>A. pic</i>)	JX409908	T-C	1	0	0	0	0	1
HAP4 (<i>A. pic</i>)	JX409909	T-C, G-A	0	0	1	0	0	1
HAP5 (<i>A. pic</i>)	JX409910	-A-	0	0	1	0	0	1
HAP6 (<i>A. pic</i>)	JX409911	G-A	0	0	0	1	0	1
HAP7 (<i>A. pic</i>)	JX409912	A-G	0	0	0	1	0	1
HAP8 (<i>A. pic</i>)	JX409913	T-C	0	0	0	0	1	1
HAP9 (<i>A. pic</i>)	JX409914	G-A	0	0	0	0	1	1
测序个体数	—	—	3	2	12	7	9	33

注: **以 5 种形态贝类的被测序个体中, 分别具有各单倍体型的贝类个体数表示

2.2.2.3 遗传距离及系统进化分析 以笠贝科 *L. asmi* 为外群, 基于 GenBank 序列及实验所获得刺绣翼螺(Api)及其它 4 种形态贝类的 16S、28S rRNA 基因序列, 运用 MEGA4 软件计算遗传距离。鉴于 HAP1 (*A. pic*)(16S 及 28S)在所有单倍体型中出现频率最高, 所以在计算各单倍体型之间的平均遗传距离之后, 以 HAP1(*A. pic*)为代表计算与其它贝类间的遗传距离。

根据 16S 序列计算遗传距离(表 6), 5 种形态贝类与外群的距离为 0.4990; 而 5 种形态贝类所有单倍体型之间的距离为 0—0.0164, 平均距离为 0.0044; 与滑螺科的 *Alaba opinosa* 的遗传距离最近, 为 0.1235, 与鹿眼螺科各贝类间的平均距离为 0.3189。基于 28S

序列计算得到的遗传距离中, 上述相应的数值为 0.3714; 0—0.0080, 0.0019; 0.0183 及 0.1277。

以 HAP1—3(*A. pic*)(16S 及 28S)代表 5 种贝类进行系统发育分析, 运用 PAUP4.0 软件分别构建 MP 树及 NJ 树。所有得到的系统树(图 5, 图 6)均显示, 5 种形态贝类的单倍体型间首先聚在一起, 然后与滑螺科 *Alaba opinosa* 以非常高的自展值(99—100)聚为一支, 而与鹿眼螺科贝类间未有明显的聚类。

3 讨论

3.1 短剑螺属未定种(*Machaeroplax* sp.)的分类地位 根据获得的系统发育树, 短剑螺属未定种(DJL)

表 6 5 种形态的贝类与其它贝类的 16S 及 28S rRNA 基因序列的遗传距离(D)
Tab.6 Genetic distances (D) of 16S and 28S rRNA gene fragments among 5 similar gastropods and others

种名	1	2	3	4	5	6	7
HAP1 (Api)	—	0.1235	—	0.3079	0.3174	0.3276	0.4990
<i>A. opi</i>	0.0183	—	—	0.3255	0.3517	0.3111	0.5628
<i>Z. sp.</i>	0.1277	0.1302	—	—	—	—	—
<i>R. lab</i>	—	—	—	—	0.1015	0.1948	0.6069
<i>R. lia</i>	—	—	—	—	—	0.2121	0.6069
<i>S. tur</i>	—	—	—	—	—	—	0.6423
<i>L. asm</i>	0.3714	0.3816	0.3960	—	—	—	—

注: 对角线左下方为 28S 基因序列遗传距离, 右上方为 16S 基因序列遗传距离

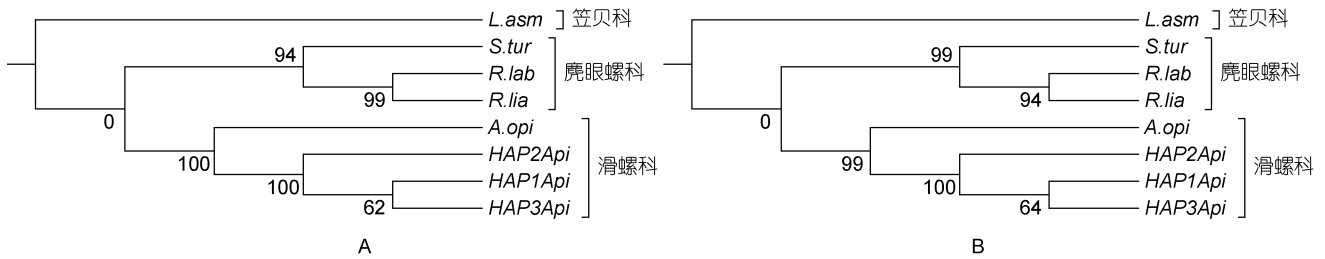


图 5 基于 5 种形态贝类的 16S rRNA 基因序列片段构建的系统发育树

Fig.5 NJ and MP tree based on the 16S rRNA gene fragments of the gastropods Api, CXY, JYL, WZ and SW
注: A 为 NJ 树, B 为 MP 树; 节点处数值为 Bootstrap1000 次重复抽样计算结果

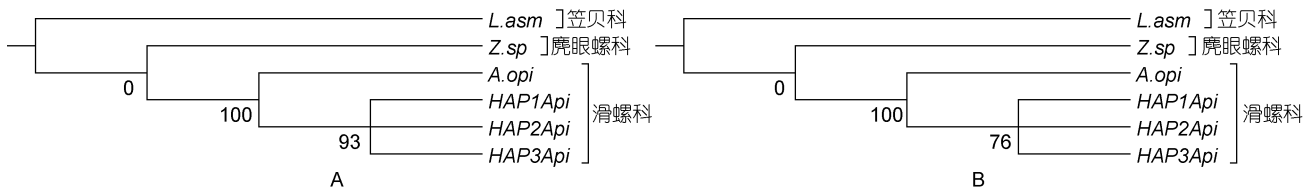


图 6 基于 5 种形态贝类的 28S rRNA 基因序列片段构建的系统发育树

Fig.6 NJ and MP based on the 28S rRNA gene fragments of the gastropods Api, CXY, JYL, WZ and SW
注: A 为 NJ 树, B 为 MP 树; 节点处数值为 Bootstrap1000 次重复抽样计算结果

种内聚在一起后, 首先与蛙螺属的虹彩蛙螺 *Lirularia iridescens* 及小蛙螺 *L. pygmaea* 聚在一起, 然后与同属于 Umboniinae 亚科 (Williams *et al.*, 2010) 的 *Conotalopia* 属、*Umbonium* 属、*Monilea* 属等逐渐聚类或形成姐妹支; 根据基于 16S 及 28S rRNA 基因序列计算的遗传距离, DJL 与虹彩蛙螺 *L. iridescens* 的遗传距离最近, 两种序列的遗传距离分别为 0.0105—0.0131、0—0.0010, 均小于 *L. iridescens* 与 *L. pygmaea* 间的遗传距离(分别为 0.0185、0.0040), 短剑螺属未定种(DJL)与 *L. iridescens* 之间的距离应该为属内水平。综上所述, 根据形态学鉴定的短剑螺属未定种 (*Machaeroplax* sp.) 应隶属于蛙螺属 *Lirularia*。

Okutani 等(2000)对 *L. iridescens* 的描述为: 壳高约 4mm, 螺旋部有约 10 条明显的红褐色螺旋肋, 肋

上有白色斑点分布, 肋间隙有彩虹光泽, 脐孔小; *L. pygmaea* 则与 *L. iridescens* 壳形相似, 但螺旋部及底部边缘有肩角形成, 且肋间隙更宽。Okutani 等(2000)所描述的 *L. iridescens* 及 *L. pygmaea* 螺旋肋更粗、更明显, 肋间隙也更宽, 二者均与本研究中所描述的短剑螺属未定种(DJL)的形态差距较大, 故作者不认为短剑螺属未定种(DJL)与 *L. iridescens* 或 *L. pygmaea* 为同种贝类。

结合分子学及形态学研究结果, 短剑螺未定种 (*Machaeroplax* sp., DJL) 应为蛙螺未定种 *Lirularia* sp., 且与 *L. iridescens* 亲缘关系比较近。在现有数据的基础上, 尚需进行更深入的研究以确定其种名。

3.2 刺绣翼螺(Api)与其它 4 种形态贝类的分类关系
基于形态学, 作者将 Api 鉴定为刺绣翼螺 *Alaba*

picta, 隶属于中腹足目 Mesogastropoda、滑螺科 Litiopidae、翼螺属 *Alaba*。根据分子生物学研究结果, Api 以及 JYL 与滑螺科贝类 *A. opinosa* 的遗传距离(16S 及 28S 序列)均明显小于其与鹿眼螺科贝类的遗传距离(表 6); 在构建的系统发育树中, 5 种形态贝类的不同单倍体型在聚类后首先与滑螺科聚为一支, 而与鹿眼螺科贝类间没有明显聚类。这些数据均支持作者对刺绣翼螺(Api)的鉴定结果, 同时说明 JYL 并非属于鹿眼螺科。而且, Okutani 等(2000)的相关报道也与作者的结论相符。

由图 2 可以看出, 刺绣翼螺(Api)与其它 4 种形态贝类(CXY、JYL、SW、WZ)除在壳质薄、无脐孔及厣为角质等方面较相似外, 还具有明显的差异。与 Api 相比, 其它 4 种形态的贝类稍显低矮, CXY 壳表的网格状线纹仅隐约可见或无线纹; JYL 偶尔可见近壳口处有不明显的褐色线纹, 但其壳表杂质较多, 表面雕刻不易分辨; SW、WZ 与 Api 差异较大, 前两者体表的螺旋肋及生长纹等比 Api 明显, 且壳表色泽相差较大。经序列分析发现, 不管是 16S 还是 28S rRNA 基因序列, Api 与其它 4 种形态的贝类之间具有完全相同或碱基变异很小的单倍体型序列; 根据 16S 及 28S 序列计算遗传距离, 所有单倍体型之间的平均遗传距离分别为 0.0044 及 0.0019, 属种内水平的差异, 并远远小于它们与同属的 *A. opinosa* 之间的遗传距离(0.1235/16S, 0.0183/28S); 而在系统发育研究中, 5 种不同形态贝类的单倍体型最先形成聚类。因此, 作者认为, 虽然其它 4 种形态的贝类(CXY、JYL、SW 及 WZ)与 Api 在形态上具有较大差异, 但实际上应为同一种贝类, 即为刺绣翼螺 *Alaba picta*。

由于我国目前对于小型贝类的研究较少, 基本处于空白。本研究填补了我国小型贝类研究的空白, 对进一步开展我国小型贝类的分类研究具有重要意义。

参 考 文 献

- 任国忠, 张起信, 王继成等, 1991. 移植大叶藻提高池养对虾产量的研究. 海洋科学, (1): 52—57
- 张壮志, 潘金华, 江 鑫等, 2010. 大叶藻特性、特征和利用. 特种经济动植物, (7): 33—34
- 高亚平, 方建光, 张继红等, 2010. 桑沟湾大叶藻附着生物的季节性变化. 渔业科学进展, 31(4): 59—64
- 董长永, 侯 林, 隋 娜等, 2008. 中国沿海蛾螺科 5 属 10 种 28S rRNA 基因的系统学分析. 动物学报, 54(5): 814—821
- Akira I, Ito H, Ueno M *et al*, 2007. Molecular phylogeny of the deep sea *Buccinum* species (Gastropoda: Buccinidae) around Japan: inter- and intraspecific relationships inferred from mitochondrial 16S rRNA sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution, 44: 1342—1345
- Colgan D J, Ponder W F, Beacham E *et al*, 2007. Molecular phylogenetics of Caenogastropoda (Gastropoda: Mollusca). Molecular Phylogenetics and Evolution, 42: 717—737
- Frey M A, Vermeij G J, 2008. Molecular phylogenies and historical biogeography of a circumtropical group of gastropods (Genus: *Nerita*): Implication for regional diversity patterns in the marine tropics. Molecular Phylogenetics and Evolution, 48: 1067—1086
- Fukuda H, Ponder W F, 2004. A protandric assimineid gastropoda: *Rugapedia androgyna* n. gen. and n. sp. (Mollusca: Caeno-gastropoda: Rissosoidea) from Queensland, Australia. Molluscan Research, 24: 75—88
- Fukuda H, Ponder W F, 2005. A revision of the Australian taxa previously attributed to *Assimineea buccinoides* (Quoy & Gaimard) and *Assimineea tasmanica* (Mollusca: Gastropoda: Caenogastropoda: Assimineidae). Invertebrate Systematics, 19: 325—360
- Fukuda H, Ponder W F, 2006. Conassimineea, a New Genus of the Assimineidae (Caenogastropoda: Rissosoidea) from Southeastern Australia. Journal of Molluscan Studies, 72: 39—52
- Kessing B, Croom H, Martin A *et al*, 1989. The simple fool's guide to PCR. Version 1. Honolulu, HI: 96822, Department of Zoology, University of Hawaii, 1—23
- Okutani H, Sasaki T, Tsuchiya K *et al*, 2000. Marine Mollusks in Japan. Tokai University Press, 54—199
- Park J K, Foighil D, 2000. Sphaeriid and Corbiculid clam represent separate heterodont bivalve radiations into freshwater environments. Mol Phylogenet Evol, 14(1): 75—88
- Spicer G B, 1995. Phylogenetic utility of the mitochondrial cytochrome oxidase gene: molecular evolution of the *Drosophila buzzatii* species complex. Mol Evol, 41: 749—759
- Thayer G W, Bjorndal K A, Ogden J C *et al*, 1984. Role of larger herbivores in seagrass communities. Estuaries and Coasts, 7(4): 351—376
- Wang H Y, Guo X M, Zhang G F *et al*, 2004. Classification of Jinjiang oysters *Crassostrea rivalaris* (Gould, 1861) from China, based on morphology and phylogenetic analysis. Aquaculture, 242: 137—155
- Wang H Y, Zhang G F, Liu X *et al*, 2008. Classification of common oysters from north China. Journal of Shellfish Research, 27(3): 495—503
- Williams S T, Donald K M, Spencer H G, 2010. Molecular systematics of the marine gastropoda families Trochidae and Calliostomatidae (Mollusca: Superfamily Trochidea). Molecular Phylogenetics and Evolution, 54: 783—809
- Zieman J C, Wetzel R G, 1980. Productivity in Seagrasses: Methods and Rates. In: Philips R C, McRoy C P ed. Handbook of Sea-grass Biology, An Ecosystem Perspective, 87—116

TAXONOMY OF 2 SMALL GASTROPODS AMONG *ZOSTERA MARINA* L. IN THE SWAN LAKE, RONGCHENG

LIU Jing^{1,2}, GUAN Hong-Zai¹, ZHANG Su-Ping², GUO Xiao-Fang¹,
YANG Xue-Ling³, WANG Hai-Yan²

(1. Medical College of Qingdao University, Qingdao, 266021; 2. Department of Marine Organism Taxonomy & Phylogeny, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071; 3. Bureau of Animal Husbandry and Fisheries, Baodi District, Tianjin, 301800)

Abstract There is a great diversity of small gastropods in China, however, the related researches are nearly vacant. We sampled 2 species of small gastropods habitating among the *Zostera marina* L. from the Swan Lake, Rongcheng Bay, China and the 16S and 28S rRNA were sequenced. Based on the molecular data, sequences alignment, genetic distances and phylogenetic studies were conducted. The results showed that *Machaeroplax* sp. identified according to the morphology should be *Lirularia* sp.; and that 4 gastropods with obvious morphological variances from *Alaba picta* had been classified as *Alaba picta* according to the molecular analysis.

Key words The Swan Lake, *Zostera marina* L., *Alaba picta*, *Lirularia* sp., 16S rRNA, 28S rRNA