

我国重要帘蛤科(Veneridae)贝类的 16S rRNA 序列系统学分析*

赵婷¹ 吴琪² 潘宝平¹

(1. 天津师范大学生命科学学院 天津市动植物抗性重点实验室 天津 300387;

2. 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 本文对我国隶属于帘蛤科(Veneridae)10个亚科、17个属、20种贝类的16S rRNA基因片段进行了系统学分析,上述动物的16S rRNA片段长度在438—648bp之间,利用PAUP软件包在对序列比对基础上构建了邻接系统树(NJ)和最大拟然系统树(ML)。16S rRNA数据显示,我国帘蛤科贝类由三个主要分支组成,美女蛤亚科中的加夫蛤属(*Gafrarium*)可能是一个单型属,该属与美女蛤属合并为加夫蛤属比较恰当。帘蛤亚科与雪蛤亚科应属于不连续的分类单元。另外,青蛤亚科与仙女蛤亚科均应作为独立的亚科存在。本文的研究结论与修订后的帘蛤科形态分类观点一致。

关键词 双壳类;帘蛤科;16S rRNA基因;分子系统学
中图分类号 Q789

帘蛤科(Veneridae)动物种类繁多,仅在亚洲就有100多种,世界范围内超过500多种以上。它们分布在世界各个海域,并且多数为重要的海产经济贝类。Keen(1951)根据经典的形态分类将帘蛤科划分为12个亚科,其中包括50个现存属和55个绝灭属。有关该科动物的系统发生过程中的亲缘关系、分类阶元设置问题,各国学者始终没有统一的看法。Keen(1969)甚至认为,帘蛤科的分类仅是为了便捷,没有必要反映动物间的亲缘关系。尽管如此,该分类系统仍然被学者们广泛接受。长期以来,有关该科动物亚科与属的设置及其相互亲缘关系是该科分类的争论要点(Fischer-Piette, 1976; Habe, 1977),如Harte(1998)认为帘蛤科的亚科应该分为两组:贝壳弱花纹型,包括和平蛤亚科、镜蛤亚科、文蛤亚科、卵蛤亚科及楔形蛤亚科,上述动物的壳面雕刻纹浅、壳缘光滑、外套囊发达、具有明显的前侧齿。贝壳强花纹型,包括雪蛤亚科、芽蛤亚科、四方蛤亚科和帘蛤亚科等,上述动物的壳面雕刻纹强大、壳缘具细齿、外套囊小或缺失、前侧齿小或退化。Taylor等(1969)和Shimamoto

(1996)分别利用贝壳的矿物质结构及超微结构探索帘蛤科各亚科之间的系统演化亲缘关系,虽然这些分类没有被学者们广泛接受,但是为帘蛤科的亚科分类提供了新的方法。近年来,分子系统学分析为研究帘蛤科的系统发生提供了强有力的工具,但是多数研究集中在单一类型或某属的分析(Dillon *et al.*, 1989a, b; Passamonti *et al.*, 1997, 1999; 潘宝平等, 2006)。Canapa等(1996, 2003)、Kappner等(2006)、Mikkelsen等(2006)分别利用线粒体及核基因序列对帘蛤科中的亚科、属间进行了有益的系统演化探索。但上述研究所涉及的对象多为大西洋及印度洋区系种类。为了弥补我国帘蛤科贝类系统发生理论,本研究对分布于我国南、北海域的10个亚科、17个属的重要帘蛤科贝类16S rRNA基因片段进行了分析,以期帘蛤科贝类的分类提供分子系统学数据(潘鹤婷等, 2008)。

1 材料与方法

1.1 样品采集

样品采自我国东部南、北海区,20种动物隶属于

* 天津市科委应用基础与前沿技术重点项目资助,12JCZDJC22800号,09JCZDJC19300号。赵婷, E-mail: zhaoting_tjnu@163.com

通讯作者: 潘宝平, 博士, 教授, E-mail: p.baoping@gmail.com

收稿日期: 2012-05-20, 收修改稿日期: 2012-09-16

17 属 10 亚科。分析外群利用蛤蜊科的中国蛤蜊 *Maetra chinensis*。所有样品的学名、命名人、所属亚科、采集地点及其序列在 GenBank 上的注册号见表 1。上述活体动物经解剖后取闭壳肌组织, 置于 70%酒精中固定。

1.2 DNA 提取

基因组 DNA 提取采用 Grewe 等(1993)的 CTAB 法。每个体取 0.1g 闭壳肌组织研碎, 置入 700 μ L Buffer 匀浆液(25mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 0.3mol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 0.5% CTAB, 0.1% 巯基乙醇, 100 μ g/mL proteinase K)中, 于 60 $^{\circ}$ C 水浴中消化 2.5h。先后用等体积的酚、酚 氯仿 异戊醇(25 24 1)提取 2 次。加 0.2 体积的 10mol/L 乙酸钠和 2 倍体积预冷的无水乙醇沉淀, 经 70%乙醇洗涤两遍后干燥, 50 μ L ddH₂O 溶解, 置于-70 $^{\circ}$ C 低温柜保存。DNA 纯度、浓度及分子量用(Beckman DU-600, USA)紫外分光光度仪及 0.8%琼脂糖电泳检测。

1.3 PCR 扩增、连接与测序

反应体系为 25 μ L, 25ng 基因组 DNA, 1 \times PCR

buffer, 各 100 μ mol/L dNTP, 1.5mmol/L MgCl₂, 0.2 μ mol/L 两种引物, 1 Unit of *Taq* DNA 聚合酶(TaKaRa)。通用引物参考 Geller 等(1997)设计, 其序列为 16Sar5'-CGCC-TGTTTAHYAAAAACAT-3', 16Sbr5'-CCGGTCTGAA-CTCAGMTCAYG-3'。扩增反应在 PTC-100(M J Research USA)PCR 仪上进行, 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 退火温度在 47—54 $^{\circ}$ C 之间 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 共 35 个循环, 最终 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。PCR 扩增产物用 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测, 经 E.B 染色后在紫外投射仪下进行检测。PCR 产物用 UNIQ-10 柱式 Kit (Sangon, Shanghai)纯化后, 连接载体 pMD18-T(Takara), 转入感受态细胞 *E. coli* (Top10), 阳性转化子经筛选后培养并纯化。测序反应在 DNA 测序仪(ABI PRISM 3730, Applied Biosystems)上进行, 全部采用双向测序。所得序列已经在 GenBank 上注册, 注册号见表 1。

1.4 系统学分析

多重比对使用 ClustalX 1.83 软件, 参数设置为 gap open=10; gap extension=0.05; gap distance=8; 利

表 1 帘蛤科 20 种动物的学名、命名人、所属亚科、采集地点及在 GenBank 注册号

Tab.1 The scientific names, authors, subfamilies, localities and the GenBank accession numbers of 20 species of Veneridae

学名	命名人	所属亚科	采集地点	GenBank 注册号
<i>Periglypta puerpera</i>	Linnaeus, 1771	Venerinae	三亚(南海)	DQ356376
<i>Clausinella isabellina</i>	Philippi, 1849	Chioninae	惠东(南海)	DQ356375
<i>Protothaca jedoensis</i>	Lischke, 1874	Chioninae	烟台(黄海)	DQ356377
<i>Circe scripta</i>	Linnaeus, 1758	Circinae	三亚(南海)	DQ356378
<i>Gafrarium dispar</i>	Dillwyn, 1817	Circinae	三亚(南海)	DQ356372
<i>Pitar japonicum</i>	Kuroda et Kawamoto, 1956	Pitarinae	三亚(南海)	DQ356370
<i>Dosinia japonica</i>	Reeve, 1850	Dosininae	青岛(黄海)	DQ356384
<i>Tapes dorsatus</i>	Lamarck, 1818	Tapetinae	三亚(南海)	DQ356371
<i>Ruditapes philippinarum</i>	Adams et Reeve, 1850	Tapetinae	青岛(黄海)	DQ356383
<i>Ruditapes variegata</i>	Sowerby, 1852	Tapetinae	惠东(南海)	DQ356381
<i>Paphia exarata</i>	Philippi, 1847	Tapetinae	惠东(南海)	DQ356380
<i>Marcia japonica</i>	Gmelin, 1792	Tapetinae	三亚(南海)	DQ356367
<i>Gomphina aequilatera</i>	Sowerby, 1825	Tapetinae	惠东(南海)	DQ356368
<i>Callista erycina</i>	Linnaeus, 1767	Callistinae	三亚(南海)	DQ356382
<i>Saxidomus purpuratus</i>	Sowerby, 1852	Callistinae	烟台(黄海)	DQ356385
<i>Meretrix meretrix</i>	Linnaeus, 1758	Meretricinae	青岛(黄海)	DQ356373
<i>Meretrix lusoria</i>	Roeding, 1798	Meretricinae	惠东(南海)	DQ356374
<i>Meretrix lamarckii</i>	Deshayes, 1853	Meretricinae	三亚(南海)	DQ389105
<i>Cyclina sinensis</i>	Gmelin, 1791	Cyclininae	莱州(渤海)	DQ356379
<i>Clementia papyracea</i>	Gray, 1825	Clementinae	黄岩(东海)	DQ356369
# <i>Maetra chinensis</i>	Philippi, 1846	(outgroups)	烟台(黄海)	DQ356386

中国蛤蜊为外群

用 PAUP4.10 beta 软件包计算出碱基转换/颠换频率、碱基多态频率, 构成相对遗传距离矩阵。采用邻接法 Neighbor-joining (NJ) 和最大拟然法 Maximum-likelihood (ML) 分别构建分子系统树, ML 系统树采用启发式搜索, 节点的置信度检验采用 Bootstrap 分析(1000 个循环)。

2 结果

上述贝类的 16S rRNA 序列大小在 438bp(青蛤)到 648bp(斧文蛤)之间(除去引物序列), 经 Clustal X 建立了 620bp 长的多重比对序列, 其中得到 269 个简约位点和 245 个保守位点。有一个位于 230—384bp 的超变异区, 在不同种间差别很大(分析过程中删除)。种类间的序列碱基转换/颠换比及遗传距离矩阵见表 2。

NJ 树和 ML 系统树分别如图 1、图 2 所示。帘蛤科贝类分为三个主要分支: 第一分支由独立的美女蛤亚科组成, 包括美女蛤 *Circe scripta* 和颗粒加夫蛤 *Gafrarium dispar*(置信度为 100%), 该分支可以看作帘蛤科的一个独特类型。第二分支由缀锦蛤亚科、雪蛤亚科和帘蛤亚科组成, 其中缀锦蛤亚科分支包括钝缀锦蛤 *Tapes dorsatus*、菲律宾蛤仔 *Ruditapes philippinarum*、杂色蛤仔 *Ruditapes variegata*、沟纹巴非蛤 *Paphia exarata*、日本格特蛤 *Marcia japonica* 和等边浅蛤 *Gomphina aequilatera*(置信度分别为 96% NJ 及 87% ML); 另一个亚支由雪蛤亚科和帘蛤亚科组成, 包括伊萨伯雪蛤 *Clausinella isabellina*、皱纹蛤 *Periglypta puerpera* 和江户布目蛤 *Protothaca jedoensis*, 尽管其支持率仅为 76% NJ 和 52% ML, 但是两个重建系统树显示雪蛤亚科和帘蛤亚科为明显的同源群。第三分支由 6 个亚科组成, 在 NJ 系统树被划分为两组贝类: 文蛤亚科(文蛤 *Meretrix meretrix*, 丽文蛤 *Meretrix lusoria* 和斧文蛤 *Meretrix lamarckii*)、镜蛤亚科(日本镜蛤 *Dosinia japonica*)和卵蛤亚科(日本卵蛤 *Pitar japonicum*)组, 仙女蛤亚科(棕带仙女蛤 *Callista erycina*, 紫石房蛤 *Saxidomus purpuratus*)、和平蛤亚科(和平蛤 *Clementia papyracea*)及青蛤亚科(青蛤 *Cyclina sinensis*)组, 其中每一个分支为一个遗传支序(置信度为 68%—100%), 尽管该分支的 ML 系统树没有得到很好解析。

3 讨论

有关帘蛤科贝类的系统发生问题, 相关学者一

直持有不同观点。Keen(1969)根据区系研究推测, 帘蛤科可能是多起源的分类群; Harte(1992)的研究报道显示, 帘蛤科贝类应该是同源群; Canapa 等(2003)利用线粒体 16S rRNA 基因序列对该科部分动物进行了系统学分析, 结果认为帘蛤科是同源群(以 *Pharidae* 为外群)。本研究分析了帘蛤科 10 个亚科贝类的系统关系认为, 帘蛤科应该是同源类群(以蛤蜊科 *Macridae* 为外群)。鉴于本研究所涉及样品的亚科数目较多, 得到的支序间的分化程度明显高于其它相关研究。另外, 本实验结果还显示, 帘蛤科内群种类间的 16S rRNA 序列间遗传距离在 0.08—0.50 之间, 分歧程度呈连续分布。但该科与外群蛤蜊科的遗传距离在 0.34—0.60 之间, 亦呈连续分布, 说明帘蛤科的系统发生相当复杂。

Coan 等(1997)对帘蛤科各亚科间的贝壳形态差别分析后, 提出了帘蛤亚科和雪蛤亚科可能是不连续分类单元的假说。该研究还结合形态学和分子系统学方法对帘蛤亚科及相关分类阶元进行了讨论, 结果认为, 帘蛤亚科和雪蛤亚科的确为不连续的类群, 并且发现了一些属间界定错误。本研究结果显示, 在 NJ 系统树中雪蛤亚科的伊萨伯雪蛤 *Clausinella isabellina* 及江户布目蛤 *Protothaca jedoensis* 与帘蛤亚科的皱纹蛤 *Periglypta puerpera* 的聚类位置与亚科关系交错(置信度 76%), 尽管 ML 系统树没有解析两个亚科的相互关系, 但两个亚科应属于不连续的遗传群组, 本研究结果支持上述说法。

Harte(1998)使用形态学的支序分类方法对青蛤亚科的两个属(*Cyclina* 和 *Cyclinella*)分析后提出, 青蛤亚科不应该作为独立的亚科存在的假说。Harte 认为应将其两个现存的属 *Cyclina* 与 *Cyclinella* 分别归入雪蛤亚科与和平蛤亚科或缀锦蛤亚科。经本研究对帘蛤科亚科间的系统分析认为, 青蛤亚科与上述亚科间的序列差别显著, 本研究结论不支持 Harte(1998)的推测。另外, 鉴于本实验中仙女蛤亚科的棕带仙女蛤 *Callista erycina*、紫石房蛤 *Saxidomus purpuratus* 与卵蛤亚科的聚类关系较远, 分析结果支持 Habe(1977)将仙女蛤属从卵蛤亚科中独立为仙女蛤亚科分类方案。

Canapa 等(2003)利用分子系统学方法, 发现帘蛤科的亚科主要包括两个分支: 一个分支由镜蛤亚科、雪蛤亚科、帘蛤亚科和缀锦蛤亚科组成, 另一个则由文蛤亚科、卵蛤亚科组成。本研究结果显示, 帘蛤科的亚科有三个主要分支: 一个基本的分支由帘蛤亚

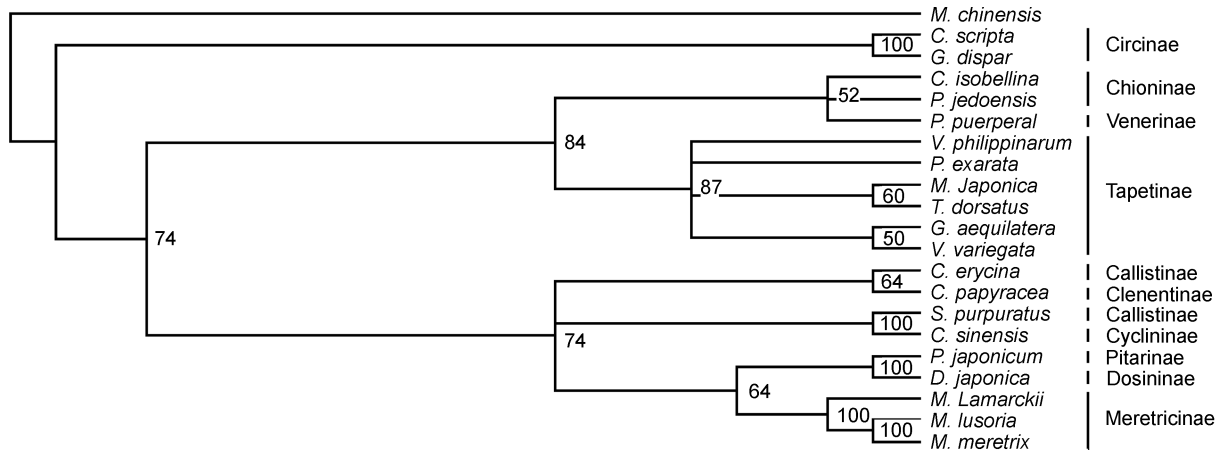


图1 利用邻接法(NJ)建立的 21 种贝类的 16S rRNA 序列系统关系树

Fig.1 Phylogenetic relationships among 21 species of molluscs based on NJ analysis of 16S rRNA sequence

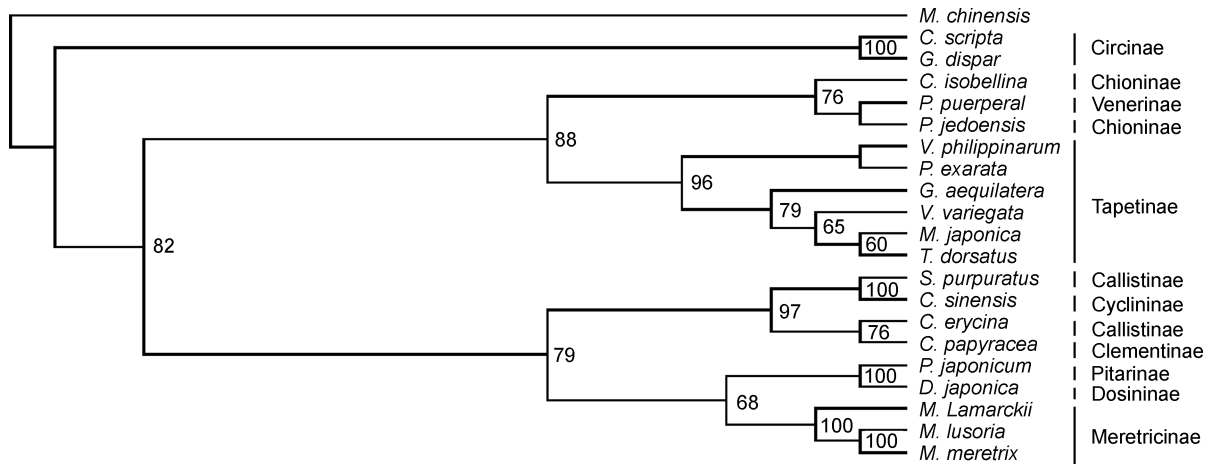


图2 利用最大拟然法(ML)建立的 21 种贝类的 16S rRNA 序列系统关系树

Fig.2 Phylogenetic relationships among 21 species of molluscs based on ML analysis of 16S rRNA sequence
节点上显示 Bootstrap 1000 个循环的置信度(只显示>50%以上)

科、雪蛤亚科和缀锦蛤亚科组成。另一个分支由文蛤亚科、镜蛤亚科、卵蛤亚科、和平蛤亚科、青蛤亚科和仙女蛤亚科组成。最后一个特殊的分支由美女蛤亚科组成,该亚科可以被认为是帘蛤科中独特的遗传组群。在历史上有关该亚科的属间分类问题,长期以来许多学者始终持有不同的看法。Prashad(1932)将美女蛤属(*Circe*)和加夫蛤属(*Gafrarium*)列为该亚科中并列属,其分类方案曾被多数学者们所接受。Fischer-Piette 等(1975)重新整理了历史上使用过的各个属,提出了该亚科仅有加夫蛤属(即加夫蛤属为单型属)的推测。本研究中的美女蛤和颗粒加夫蛤间的遗传距离仅为 0.08,置信度为 100,本研究结果支持 Fischer-Piette 等(1975)的分类方案,即:将美女蛤属和加夫蛤属合并为加夫蛤属比较恰当。

庄启谦(2001)研究指出,缀锦蛤亚科分支是明显

的同源群,但有关该亚科的种属间分类还需要进一步结合形态学及其它方法进行研究。这里需要特别指出;我国南、北海区蛤仔属的菲律宾蛤仔 *Ruditapes philippinarum* 和杂色蛤仔 *Ruditapes variegata* 在地理分布上有大面积重叠,并且很难从形态学的壳形及花色上加以区分。本研究中的 16S rRNA 序列分析表明这两种贝类在分子水平上存在明显差异(遗传距离为 0.24),二者的系统学关系应归于不同的属,其 16S rRNA 序列可以作为区分两个物种的重要分子标记。

参 考 文 献

- 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
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

- 潘鹤婷, 袁 媛, 吴 琪等, 2008. 缀锦蛤亚科(Tapetinae)贝类线粒体 DNA 序列的系统学分析. 海洋与湖沼, 39(3): 284—290
- Canapa A, Marota I, Rollo F *et al*, 1996. Phylogenetic analysis of Veneridae (Bivalvia): Comparison of molecular and palaeontological data. *Journal of Molecular Evolution*, 43: 517—522
- Canapa A, Schiaparelli S, Marota I *et al*, 2003. Molecular data from the 16S rRNA gene for the phylogeny of Veneridae (Mollusca: Bivalvia). *Marine Biology*, 142: 1125—1130
- Coan E V, Scott P H, 1997. Checklist of the marine bivalves of the northeastern Pacific Ocean. Santa Barbara Museum of Natural History, Contributions to Science, 1
- Dillon R T, Manzzi J J, 1989a. Genetics and shell morphology in a hybrid zone between the hard clams *Mercenaria mercenaria* and *M. campechiensis*. *Marine Biology*, 100(2): 217—222
- Dillon R T, Manzzi J J, 1989b. Genetics and shell morphology of hard clams (genus *Mercenaria*) from Laguna Madre, Texas. *Nautilus*, 103(2): 73—77
- Fischer-Piette E, 1976. Les Veneridae indeterminées de la collection de Calcutta. *Rec Zool Surv India*, 70: 235—257
- Fischer-Piette E, Vukadinovic D, 1975. Revision des Circinae (*Moll lamellibranches*). *Du Museum National d'Histoire Naturelle. Journal Conchylol*, C (1—2): 3—74
- Geller J B, Walton E, Grosholz E *et al*, 1997. Cryptic invasions of the crab *Carcinus* detected by molecular phylogeography. *Mol Ecol*, 6: 252—262
- Grewe P M, Krueger C C, Aquadro C F *et al*, 1993. Mitochondrial DNA variation among lake trout (*Salvelinus namaycush*) strains stocked into Lake Ontario. *Can J Fish Aqua Sci*, 5: 2397—2403
- Habe T, 1977. Systematics of Mollusca in Japan. Bivalvia and Scaphopoda (in Japanese). *Hokuryokan*, Tokyo, 147—270
- Harte M, 1992. A new approach to the study of bivalve evolution. *Am Malac Bull*, 9: 199—206
- Harte M, 1998. Is Cycliniinae a monophyletic subfamily of Veneridae (Bivalvia)? *Malacologia*, 40(1—2): 297—304
- Kappner I, Bieler R, 2006. Phylogeny of venus clams (Bivalvia: Venerinae) as inferred from nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40(2): 317—331
- Keen A M, 1951. Outline of a proposed classification of the pelecypod family Veneridae. *Min Conch Club S Calif*, 113: 1—10
- Keen A M, 1969. Veneridae. In: Moore R C ed. *Treatise of Invertebrate Paleontology*. Geological Society of America and University of Kansas Press, USA: 671—688
- Mikkelsen P M, Bieler R, Kappner I *et al*, 2006. Phylogeny of Veneroidea (Mollusca: Bivalvia) based on morphology and molecules. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 148(3): 439—521
- Passamonti M, Mantovani B, Scali V, 1997. Allozymic characterization and genetic relationships among four species of Tapetinae (Bivalvia, Veneridae). *Italian Journal of Zoology*, 64(2): 117—124
- Passamonti M, Mantovani B, Scali V, 1999. Allozymic analysis of some Mediterranean Veneridae (Mollusca: Bivalvia): preliminary notes on taxonomy and systematics of the family. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 79(5): 899—906
- Prashad B, 1932. The Lamellibranchia of the Siboga Expedition. *Systmatic part. Siboga Expenditie*, LIIIc: 212—264
- Shimamoto M, 1996. Phylogenetic implications of shell microstructures and amino acid compositions in the Veneridae (Bivalvia, Mollusca). *Bull Inst Oceanogr (Monaco)*, 14: 263—270
- Taylor J D, Kennedy W J, Hall A, 1969. The shell structure and mineralogy of the Bivalvia. *Introduction Nuculaca-Trigonacea. Bulletin of the British Museum (Natural History) Zoology*, (Suppl.3): 1—125

MOLECULAR PHYLOGENY OF VENERIDAE (MOLLUSCA, BIVALVIA) BASED ON 16S rRNA SEQUENCES

ZHAO Ting¹, WU Qi², PAN Bao-Ping¹

(1. College of Life Sciences, Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance, Tianjin Normal University, Tianjin, 300387; 2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Abstract We conducted a phylogeny analysis on partial 16S rRNA genes among 20 species in Veneridae under 17 genera and 10 subfamilies. The fragments of 16S the rRNA were between 438bp to 648bp. The trees of Neighbor-joining (NJ) and Maximum-likelihood (ML) were established with PAUP beta based on sequence alignment. The 16S rRNA data present three major clades. *Gafrarium* is a monotype grouping of Circinae and *Circe* and *Gafrarium* should be combined into genus *Gafrarium*. Subfamilies of Chioninae and Venerinae should be discrete taxa. Moreover, Callistinae and Cycliniinae should be distinct subfamilies from other taxon. Results of this study showed that there were consistencies with the modified morphologic classification of Veneridae.

Key words Bivalvia; Veneridae; 16S rRNA gene; molecular phylogeny