

## 浙江和广西两种文蛤的分子鉴定及形态特征分析

董迎辉<sup>1</sup>, 姚定余<sup>1</sup>, 林志华<sup>1\*</sup>, 姚韩韩<sup>1</sup>, 陆荣茂<sup>2</sup>

(1. 浙江万里学院生物与环境学院, 浙江 宁波 315100;

2. 浙江省海洋水产养殖研究所, 浙江 温州 325005)

**摘要:**以文蛤如东群体(RD)和北海群体(BH)为对照群,利用线粒体CO I 基因序列分析技术对苍南文蛤(CN)和北海白壳文蛤(BW)进行了分子鉴定。结果表明,苍南文蛤和斧文蛤的碱基组成非常相似,通过文蛤属贝类基因序列同源性比对和分子系统聚类分析发现,苍南文蛤CN1、CN2与斧文蛤的同源性分别达到100.0%、99.2%,在依据遗传距离构建的系统进化树上,2个苍南文蛤也与斧文蛤单独聚为一支,据此将苍南文蛤确定为斧文蛤,此结果将斧文蛤的分布区域向北扩展到了浙江南部沿海,修正了现有文献中记载的仅在我国南海诸省分布的说法;而白壳文蛤与其它6种文蛤的基因序列同源性都不高(79.6%~85.3%),在系统进化树上单独分出一支,明显是独立于这些文蛤之外的新种。斧文蛤、白壳文蛤与文蛤群体CO I 基因的遗传多样性分析显示,文蛤BH群体的变异位点数、单倍型数和核苷酸多样性指数均最大,斧文蛤其次,而白壳文蛤10条基因序列完全相同,未发生任何核苷酸位点变异,说明其遗传多样性很低。应用方差分析和Tukey多重比较,分析了斧文蛤、白壳文蛤与文蛤群体的形态差异,发现斧文蛤的壳长明显大于壳高,且SMW/TW、IW/TW 2个参数与文蛤、白壳文蛤群体差异显著( $P < 0.05$ );而白壳文蛤的壳宽指数大、壳型相对膨胀,SW/SL和SW/SH值均最大,与文蛤和斧文蛤群体差异显著( $P < 0.05$ )。本研究结果可为文蛤属贝类种间鉴别、种质资源保护及系统进化研究提供基础资料。

**关键词:**文蛤属;斧文蛤;CO I 基因;分子鉴定;形态特征

**中图分类号:**Q 178.1; S 917.4

**文献标志码:**A

文蛤属(*Meretrix*)贝类是我国沿海常见的经济种类,也是我国滩涂养殖的重要对象。然而,由于该属物种的贝壳形态、壳色花纹变异很大,长期以来国内外学者在其系统分类问题上一直存在很大争议,20世纪虽经多位分类学家修订<sup>[1-4]</sup>,但仍无统一的说法和确切的分类依据。我国学者对文蛤属种类的认定也存在较大分歧,如王如才<sup>[5]</sup>、庄启谦<sup>[6]</sup>将我国分布的文蛤属分为文蛤(*M. meretrix*)、丽文蛤(*M. lusoria*)、斧文蛤(*M. lamarckii*)和琴文蛤(*M. lyrata*)4种;张素萍<sup>[7]</sup>又从文蛤中划分出了短文蛤(*M. pethechialis*);徐凤山等<sup>[8]</sup>认为我国还存在小文蛤(*M. planisulcata*)

和紫文蛤(*M. casta*);而潘宝平等<sup>[9]</sup>、CHEN等<sup>[10]</sup>基于线粒体基因片段及核糖体ITS序列分析认为,文蛤和丽文蛤的亲缘关系很近,应划归为同一物种;林志华等<sup>[11]</sup>通过fAFLP和ITS分析发现,广西白壳文蛤与其它现有记载文蛤的表型和遗传结构均存在较大差异,推测可能是文蛤属又一新种。总之,文蛤属内种间划分比较混乱,制约了其种质资源保护、遗传育种及相关基础研究工作的开展。

CO I (cytochrome oxidase subunit I)基因是位于线粒体基因组中重要的蛋白编码基因,因其变异较大且易于扩增,而适用于种内、种间甚至属

收稿日期:2011-03-23

修回日期:2011-06-28

资助项目:国家自然科学基金项目(30972255);浙江省自然科学基金(Y3110080);宁波市科技局农业择优委托项目(2010C10011)

通讯作者:林志华,E-mail:zhihua9988@126.com

以上分类阶元的遗传结构解析<sup>[12]</sup>。目前, *CO I* 基因序列分析已成为新的系统分类法—DNA 条形码编码(DNA Barcoding)技术的主流分析手段, 倍受贝类分类和进化遗传学研究者的推崇。YU 等<sup>[13]</sup>根据 16S rRNA 和 *CO I* 基因序列变异探讨了我国沿海 4 种牡蛎的归属类别; THERRIault 等<sup>[14]</sup>用 16S rRNA 基因和 *CO I* 基因序列对黑海饰贝科(Dreissenidae)贝类进行了分子鉴定, 分清了同物异名的两个物种; 苏天凤等<sup>[15]</sup>、CHO 等<sup>[16]</sup>利用 *CO I* 基因序列评价了东风螺(*Babylonia*)、魁蚶(*Scapharca broughtonii*)的遗传多样性及遗传变异情况。

本研究以文蛤如东群体和北海群体为对照群, 首先利用 *CO I* 基因序列分析技术对浙江苍南文蛤和广西北海白壳文蛤进行分子鉴定, 通过

序列相似性比较和聚类分析确定其归属问题及其在属中的系统进化关系, 然后通过遗传多样性分析和表型变异分析, 科学评价其形态特征和种质资源状况。不仅为解决文蛤系统分类中的一些争议提供分子依据, 而且对其种质资源保护、遗传育种研究等具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品来源与采集

实验用文蛤于 2009 年 7 月至 2010 年 6 月来自江苏如东、浙江苍南、广西北海自然海区, 样品采集地、采样时间、样本量等信息列于表 1。所有样品均活体运回实验室, 先测量形态性状数据, 再解剖取闭壳肌, 闭壳肌保存于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱中, 用于 DNA 提取。

表 1 不同文蛤群体的名称及来源  
Tab.1 The groups' names of *Meretrix* and their sources

群体名称 populations name	代码 group code	样本量 sample size	采集地(经纬度) collection locality(longitude and latitude)	采集时间 collection time
如东群体 Rudong group	RD	50	江苏如东海区(32°30'N, 121°11'E)	2009 年 10 月
苍南群体 Cangnan group	CN	50	浙江苍南海区(27°33'N, 120°36'E)	2009 年 7 月
北海群体 Beihai group	BH	50	广西北海营盘海区(21°27'N, 109°26'E)	2010 年 6 月
白壳群体 White shell group	BW	50	广西北海营盘海区(21°27'N, 109°26'E)	2010 年 6 月

### 1.2 形态数据测量

用数显电子游标卡尺(精度为 0.01 mm)常规测量文蛤的壳长(SL, 壳前端至后端的最大长度)、壳高(SH, 壳顶至腹缘的最大长度)、壳宽(SW, 贝壳左右两侧的最大厚度)、前缘长(UA, 壳顶至前缘水平处的间距)、后缘长(UP, 壳顶至后缘水平处的间距)、外韧带长(ELL)。用电子天平(精度为 0.01 g)称总重(TW), 打开贝壳, 吸干贝壳和软体部表面水分, 称量壳湿重(SMW)、软体部重(IW)。

为消除文蛤个体大小的影响, 以各体尺性状的相对比值作为形态分析的指标, 考查了 SH/SL、SW/SL、ELL/SL、SW/SH、UA/UP、SMW/TW、IW/TW 7 个形态特征指标。采用 SPSS 16.0 统计软件对各群体间形态特征指标的差异进行单因子方差分析(ANOVA)和 Tukey 多重比较测验。

### 1.3 DNA 提取和线粒体 *CO I* 基因分析

基因组 DNA 的提取 自 RD、CN、BH、BW 4 个文蛤群体中各随机取样 10 个, 采用酚/氯仿/异戊醇法从闭壳肌中提取基因组 DNA, 并用 1%

的琼脂糖电泳和紫外分光光度仪(Varian Cary 50 型)检测质量, 无菌超纯水稀释至 50 ng/ $\mu\text{L}$ ,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

PCR 扩增和序列测定 选用引物 H7956 (5'-GGGTCCGAGTATCGTCG-3') 和 L66 (5'-CCTCTATAAAAAGGCTCA CAGCC-3'), 引物由上海生工合成。PCR 扩增反应体系(50  $\mu\text{L}$ )包括: 10  $\times$  Buffer 5  $\mu\text{L}$ , 25 mmol/L  $\text{MgCl}_2$  5  $\mu\text{L}$ , 2 mmol/L dNTP 5  $\mu\text{L}$ , 2.5 U *Taq* 酶 0.5  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{mol/L}$  引物 2  $\mu\text{L}$ , DNA 模板约 50 ng。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min, 52  $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 2 min, 进行 36 个循环, 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 8 min, 在 Bio-Rad 公司的 PCR 扩增仪中进行。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 挑选扩增效果好的产物送北京华大基因公司进行纯化回收, 纯化后的产物用 ABI 3730 测序仪进行正反双向测序。

数据分析 将所测个体的正反向序列用的 BioEdit 软件进行拼接, 结合人工校正。使用 Bankit 在 GenBank 中注册基因序列, 获得注册号。

用 MEGA 4.0 软件对 4 个文蛤群体及 GenBank 中文蛤属的丽文蛤、斧文蛤、帘文蛤、短文蛤、*M. sp. Tudumari* 的 *CO I* 基因序列(注册号见表 2)进行 Clustal 多重比对,并分析各序列的碱基组成。用 DNAsp 4.10 软件计算变异位点数、单倍型数、单倍型多样性指数( $H$ )和核苷酸多样性指数( $P_i$ )等遗传变异参数。

## 2 结果

### 2.1 文蛤属 *CO I* 基因序列特征与碱基组成比较

对 4 个文蛤群体的 *CO I* 基因进行了 PCR 扩

增和双向测序,经软件拼接共获得 40 条序列,各序列长度在 602 ~ 652 bp,不存在任何插入/缺失位点。用 MEGA 4.0 软件分析了 *CO I* 基因序列长度和碱基组成,并与 GenBank 中 BLAST 所得的丽文蛤、斧文蛤、帘文蛤、短文蛤、*M. sp. Tudumari* 5 种文蛤属贝类的 *CO I* 基因序列进行比较。从碱基组成偏向性来看,文蛤属贝类 A + T 含量(62.9% ~ 67.0%)都明显高于 G + C(33.0% ~ 37.1%)含量,且 T 碱基含量(43.5% ~ 45.6%)明显高于其他 3 种碱基,C 碱基含量(13.2% ~ 15.3%)最低。从各序列间的碱基组成差异来看,文蛤 RD、BH 群体和丽文蛤的碱基组成比较相似,CN 和斧文蛤的碱基组成非常相似,而 BW 与其他文蛤的碱基组成各不相同。

表 2 不同文蛤 *CO I* 基因片段的碱基组成  
Tab. 2 The base composition of *CO I* gene fragment of *Meretrix*

群体代号 group code	T	C	A	G	A + T	总长/bp total length	注册号 accession no.
RD	45.6	13.2	21.0	20.2	66.6	652	JF809799
CN	44.6	14.1	18.3	23.0	62.9	614	JF809802
BH	45.0	13.3	21.1	20.6	66.1	626	JF809807
BW	43.7	14.6	19.6	22.1	63.3	614	JF809797
丽文蛤 <i>M. lusoria</i>	45.0	13.8	22.0	19.2	67.0	574	FJ434681
斧文蛤 <i>M. lamarckii</i>	44.8	15.0	18.4	21.8	63.2	665	EU118001
帘文蛤 <i>M. lyrata</i>	44.4	14.1	21.4	20.1	65.8	645	EU118002
短文蛤 <i>M. petechialis</i>	44.6	13.7	22.3	19.4	66.9	583	AY874530
<i>M. sp. Tudumari</i>	43.5	15.3	20.8	20.4	64.3	504	AB503384

### 2.2 苍南文蛤和白壳文蛤的分子鉴定和亲缘关系分析

利用 Megalign 软件计算了 4 个文蛤群体(各 2 个)及文蛤属 5 种文蛤的同源性,并以青蛤为外群用 UPGMA 和 NJ 作图法构建了系统进化树。结果发现,文蛤 RD1、RD2、BH1 之间的同源性很高(99.6% ~ 100.0%),在系统进化树首先聚在一起;丽文蛤、短文蛤与文蛤的同源性也很高(93.7% ~ 100.0%),可见三者的亲缘关系非常近,而且丽文蛤与短文蛤的序列同源性可以达到 100.0%。苍南文蛤 CN1、CN2 与斧文蛤的同源性分别为 100.0% 和 99.2%,在系统进化树上单独聚为一支,因此可以将苍南文蛤确定为斧文蛤。白壳文蛤 BW1、BW2 与其它文蛤的同源性都不高(79.6% ~ 85.3%),在系统树上单独分出一

支,明显是独立于这 5 种文蛤之外的新种。

### 2.3 斧文蛤、白壳文蛤与文蛤群体 *CO I* 基因的遗传变异

用 DNAsp 4.10 软件计算了斧文蛤、白壳文蛤及文蛤 RD、BH 群体 *CO I* 基因的遗传变异参数,结果见表 3。通过比较发现,文蛤 BH 群体的变异位点数高达 40 个,而 RD 群体的变异位点数仅有 2 个,单倍型多样性指数和核苷酸多样性指数也明显较 RD 群体高,说明 BH 群体的遗传多样性比 RD 群体丰富得多。斧文蛤的变异位点数也较多(7 个),单倍型多样性指数和核苷酸多样性指数也较高。而白壳文蛤 10 个个体的 *CO I* 基因序列完全相同,没有发生任何核苷酸位点变异。

		sequence similarity														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
genetic distance	1	■	99.6	83.3	83.5	100.0	93.9	83.0	83.0	99.5	82.0	84.7	99.0	81.9	1	RD1
	2	0.4	■	83.3	83.5	99.7	93.6	83.2	83.2	99.1	81.7	84.8	98.6	82.1	2	RD2
	3	16.6	16.6	■	99.2	83.3	81.5	82.5	82.5	80.4	100.0	84.3	81.0	75.6	3	CN1
	4	16.1	16.1	0.8	■	83.5	81.3	82.1	82.1	80.6	99.2	84.3	81.2	76.4	4	CN2
	5	0.0	0.3	16.6	16.1	■	93.9	83.0	83.0	99.5	83.9	84.5	99.0	81.9	5	BH1
	6	6.5	6.8	17.7	17.7	6.5	■	82.5	82.5	94.3	82.9	83.9	93.7	82.7	6	BH2
	7	17.8	17.6	18.6	18.9	17.9	17.6	■	100.0	79.8	82.3	84.5	79.6	85.3	7	BW1
	8	17.8	17.6	18.6	18.9	17.9	17.6	0.0	■	79.8	82.3	84.5	79.6	85.3	8	BW2
	9	0.5	0.9	15.4	14.9	0.5	6.1	17.8	17.8	■	84.0	84.7	100.0	81.9	9	<i>M.lusoria</i>
	10	16.1	16.5	0.0	0.8	16.2	16.6	19.0	19.0	15.9	■	83.6	83.2	80.2	10	<i>M.lamarckii</i>
	11	15.7	15.5	16.0	15.7	15.9	16.1	16.2	16.2	15.5	16.3	■	83.7	88.5	11	<i>M.lyrata</i>
	12	1.0	1.4	16.4	15.8	1.0	6.7	18.2	18.2	0.0	16.7	16.6	■	81.9	12	<i>M.petechialis</i>
	13	17.8	17.5	20.0	19.1	17.8	16.8	15.0	15.0	18.1	20.4	11.7	18.1	■	13	<i>M.sp.Tudwnari</i>
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		

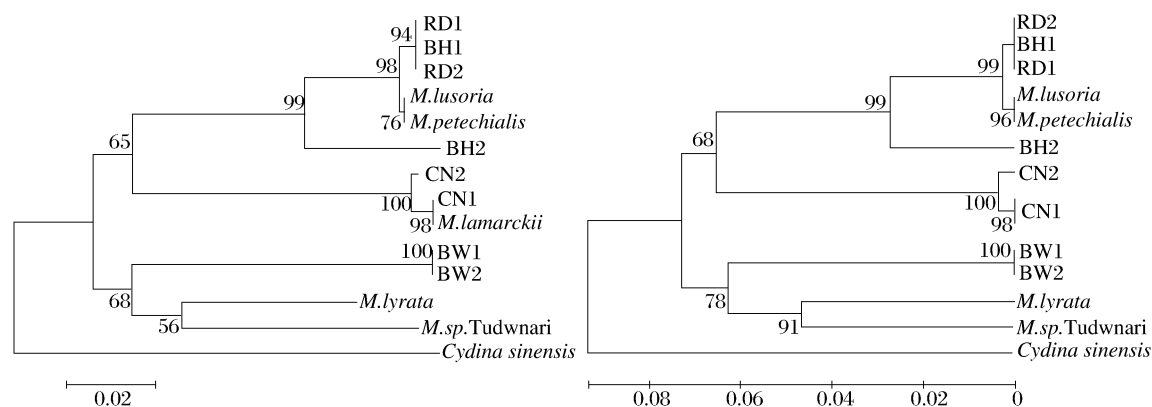
图1 各种文蛤 *CO I* 基因序列相似性(右上部)与遗传距离(左下部)Fig. 1 Sequence similarity(upper right) and genetic distance(bottom left) of *CO I* gene of *Meretrix*

图2 用 NJ 法和 UPGMA 法构建的文蛤属贝类的系统树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *Meretrix* by using NJ method and UPGMA method表3 斧文蛤、白壳文蛤与文蛤群体 *CO I* 基因的遗传变异参数Tab. 3 Genetic variation parameters of *CO I* gene sequence of *M. lamarckii*, BW and *M. meretrix*

变异参数	RD	斧文蛤 <i>M. lamarckii</i>	BH	BW
分析个体数 number of sequences	10	10	10	10
变异位点数 number of polymorphic sites	2	7	40	0
简约信息位点数 parsimony informative sites	0	3	40	0
单倍型数 number of haplotypes	3	6	6	1
单倍型多样性指数( <i>H</i> ) haplotype diversity	0.377 8 ± 0.032 9	0.778 0 ± 0.018 9	0.867 0 ± 0.007 2	0
核苷酸多样性指数( <i>P<sub>i</sub></i> ) nucleotide diversity	0.000 8 ± 0.000 0	0.003 9 ± 0.001 2	0.035 1 ± 0.023 5	0
平均核苷酸差异数( <i>K</i> ) average nucleotide differences	0.400	1.978	21.133	0

#### 2.4 斧文蛤、白壳文蛤与文蛤群体的形态差异

斧文蛤、白壳文蛤及文蛤 RD、BH 群体间形态参数变异的方差分析结果列于表 4, 结果显示, 在考察的 7 个形态变量中 SH/SL、SW/SL、SW/SH、SMW/TW、IW/TW 5 个形态参数在 4 个群体间的差异达到了极显著水平 ( $P < 0.01$ ), UA/UP 在各群体间差异达到显著水平 ( $P < 0.05$ ), 而 ELL/SL 在各群体间差异不显著。对这些形态学参数进行 Tukey 法多重比较显示

(表 5), 斧文蛤群体的 SH/SL 相对较小, 即壳长明显大于壳高, 且与文蛤、白壳文蛤群体差异显著 ( $P < 0.05$ ); 斧文蛤的贝壳和软体部均较坚实, 表现在 SMW/TW、IW/TW 都显著大于文蛤和白壳文蛤群体 ( $P < 0.05$ )。白壳文蛤的壳宽指数最大, 壳型相对较膨胀, SW/SL 和 SW/SH 值均最大, 与文蛤和斧文蛤群体差异显著 ( $P < 0.05$ ); 白壳文蛤的壳重指数小于斧文蛤而大于文蛤群体。

表 4 斧文蛤、白壳文蛤与文蛤群体 7 个形态指标的方差分析  
 Tab. 4 Analysis of variance for seven morphological traits of *M. lamarckii*, BW and *M. meretrix*

	$d_f$	SH/SL		SW/SL		ELL/SL		SW/SH	
		MS	F	MS	F	MS	F	MS	F
群体间 intergroup	3	0.020	20.495 **	0.047	107.786 **	0.020	0.538	0.044	41.234 **
群体内 intragroup	196	0.001		0.000		0.037		0.001	
总变异 total variation	199								

	$d_f$	UA/UP		SMW/TW		IW/TW	
		MS	F	MS	F	MS	F
群体间 intergroup	3	0.026	3.779 *	0.123	101.596 **	0.035	26.093 **
群体内 intragroup	196	0.007		0.001		0.001	
总变异 total variation	199						

$F_{0.05(3,196)} = 2.65$ ;  $F_{0.01(3,196)} = 3.88$

表 5 斧文蛤、白壳文蛤与文蛤群体 7 个形态指标的多重比较 (Tukey 法)  
 Tab. 5 Multiple comparisons for seven morphological traits of *M. lamarckii*, BW and *M. meretrix* (Tukey method)

群体 population	样本 容量	形态差异显著性 morphological difference (5%)						
		SH/SL	SW/SL	EL/SL	SW/SH	UA/UP	SMW/TW	IW/TW
RD	50	0.824 8 ±	0.486 2 ±	0.309 3 ±	0.590 7 ±	0.625 8 ±	0.544 2 ±	0.184 9 ±
		0.039 3 <sup>b</sup>	0.016 6 <sup>c</sup>	0.017 3 <sup>a</sup>	0.032 3 <sup>c</sup>	0.078 5 <sup>a</sup>	0.020 4 <sup>c</sup>	0.019 2 <sup>b</sup>
<i>M. lamarckii</i>	50	0.796 1 ±	0.491 1 ±	0.288 3 ±	0.617 1 ±	0.635 1 ±	0.643 1 ±	0.245 3 ±
		0.019 9 <sup>c</sup>	0.025 0 <sup>c</sup>	0.016 5 <sup>a</sup>	0.030 5 <sup>b</sup>	0.055 5 <sup>a</sup>	0.031 3 <sup>a</sup>	0.023 0 <sup>a</sup>
BH	50	0.842 0 ±	0.520 2 ±	0.335 5 ±	0.619 4 ±	0.613 4 ±	0.533 8 ±	0.203 3 ±
		0.042 2 <sup>a</sup>	0.021 4 <sup>b</sup>	0.381 9 <sup>a</sup>	0.040 8 <sup>b</sup>	0.121 3 <sup>ab</sup>	0.044 3 <sup>c</sup>	0.062 5 <sup>b</sup>
BW	50	0.835 0 ±	0.552 9 ±	0.301 8 ±	0.662 3 ±	0.582 4 ±	0.585 8 ±	0.196 5 ±
		0.016 0 <sup>ab</sup>	0.020 0 <sup>a</sup>	0.015 2 <sup>a</sup>	0.024 9 <sup>a</sup>	0.062 9 <sup>b</sup>	0.038 5 <sup>b</sup>	0.022 4 <sup>b</sup>

### 3 讨论

#### 3.1 文蛤属贝类的种间划分问题

双壳贝类传统的分类与鉴别主要依据壳型、壳色、贝壳铰合齿的形态及数目、韧带特征、闭壳肌的发育程度等形态特征,然而由于贝类进化水平较低,受环境影响种内变异广泛存在,造成有些种类的形态分类结果在学术界争议很大。已有的研究业已证明,文蛤可能是双壳贝类中变异最大的物种<sup>[17]</sup>,其贝壳形态和壳色花纹的复杂变化已经导致了严重的同种异名和异种同名现象。近年来,以 DNA 序列如核糖体 ITS 序列、线粒体 16S rRNA、CO I、Cyt b 基因序列为依据的分子分类方法在鱼类、贝类、甲壳类分类中被广泛应用和普遍认可<sup>[18-20]</sup>,基于这些 DNA 序列的文蛤属系统学分析认为<sup>[9-11]</sup>,文蛤、丽文蛤、短文蛤的亲缘关系很近,应划归为同一物种;琴文蛤与文蛤、丽文蛤、斧文蛤三者的分歧较早,遗传距离较大;广西白壳文蛤在不同壳色群体间变异很小,而与文蛤的遗传差异很大,应属于文蛤属又一新种<sup>[11]</sup>。

2010 年陈爱华等<sup>[21]</sup>对丽文蛤和文蛤 4 个地理群体可量性状的多元分析认为,丽文蛤和文蛤的形态差异显著。因此,文蛤、丽文蛤和短文蛤的系统关系究竟应是不同的种、亚种,抑或是同种异名,还值得商榷,亟需大量的实验数据支持。

本研究测定了苍南文蛤和白壳文蛤的 CO I 基因序列,并与 GenBank 中 5 种文蛤属贝类的相应序列进行比对,将苍南文蛤鉴定为斧文蛤,而把白壳文蛤认定为独立于其它 6 种文蛤之外的新种;通过系统进化树的构建,确定了 7 种文蛤的系统进化地位和相互间亲缘关系。

#### 3.2 苍南文蛤的分子鉴定与斧文蛤的分布区系

文蛤为广盐性贝类,能在较广泛的海水密度范围内正常生活,但主要分布于受淡水影响的河口近海及内湾<sup>[22]</sup>。温州瓯海、苍南有瓯江、鳌江入海口,滩涂面积广阔,水温、盐度合适,饵料生物丰富,适合文蛤的生存和养殖,早在 20 世纪 70 年代就曾多次从江苏省调运文蛤苗种进行滩涂底播养殖,以至在瓯海、苍南一带海区形成了一定的种群数量。近年来的贝类资源调查发现,在苍南海

区存在一种与江苏文蛤壳形、壳色差异较大的文蛤,研究采用线粒体 *CO I* 基因序列分析技术通过文蛤属种类基因序列同源性比较和分子系统聚类分析,发现苍南文蛤 CN1、CN2 与斧文蛤的同源性分别达到了 100.0% 和 99.2%, 而与其他文蛤的相似性只有 75.6% ~ 84.3%; 在依据遗传距离构建的系统进化树上, 2 个苍南文蛤与斧文蛤单独聚为一支, 据此可以将苍南文蛤确定为斧文蛤。

据文献资料记载, 斧文蛤为暖水性贝类, 主要分布于日本和中国南海, 在我国的广东、海南、广西等省份沿海均有分布, 埋栖于潮下带至水深 20 m 浅海的沙质海底<sup>[6,8,22]</sup>。依据“中国海软体动物区系区划的初步研究”<sup>[23]</sup>, 台湾南部和海南岛南端一线以南的南海诸岛属于热带动物区系, 年平均水温在 23.5 °C 以上, 该区系是印度尼西亚-马来西亚热带区的一部分, 区系内许多暖水性物种仅能向北分布到台湾海峡南部的澎湖和高雄一带, 而不能进入东海, 由于闽浙沿岸冬季的低温(最低 8 °C)是一些暖水种向北扩散不可逾越的天然屏障<sup>[8]</sup>。斧文蛤在台湾海峡以北的闽浙沿海分布情况在现有的《浙江动物志 软体动物门》<sup>[24]</sup> 及浙江沿海的贝类资源调查<sup>[25-27]</sup> 中均未见报道。本研究利用 *CO I* 基因序列分析技术将苍南文蛤确定为斧文蛤, 这将斧文蛤的分布区域向北扩展到了浙江南部沿海, 对于斧文蛤的动物区系分析、资源保护及开发利用具有非常重要的现实意义。

### 3.3 斧文蛤、白壳文蛤与文蛤群体的遗传多样性和形态差异比较

遗传多样性是生物种内不同种群或同一种群不同个体之间遗传变异的总和, 是生物生存适应和发展进化的基础。换言之, 一个物种或种群的遗传多样性越高, 它对环境变化的适应能力就越强。有关我国文蛤不同地理群体遗传多样性的研究报道已有不少<sup>[11-12,28-29]</sup>, 结果都发现广西群体的遗传多样性要比辽宁、江苏、山东等群体丰富得多, 存在大量稀有基因位点, 在育种中的遗传改良潜力更大。这与本研究考察文蛤广西北海群体和江苏如东群体 *CO I* 基因遗传多样性的结果一致, 在 626 bp 的基因序列中, 北海群体的变异位点数高达 40 个, 而如东群体的变异位点数仅有 2 个, 单倍型多样性指数和核苷酸多样性指数也同

样证明北海群体的遗传多样性比如东群体丰富得多。有关斧文蛤和白壳文蛤群体遗传多样性的报道很少, 仅见 CHEN 等<sup>[12]</sup> 对斧文蛤 *CO I* 基因序列进行了比对, 定义了 2 个单倍型; 林志华等<sup>[11]</sup> 通过 fAFLP 指纹图谱分析发现, 白壳文蛤的多态率和遗传多样性都明显低于文蛤广西群体和山东群体。本研究结果发现, 浙江苍南斧文蛤还保持较高的遗传多样性, 10 个个体中有 6 个单倍型, 614 bp 的基因序列中有 7 个变异位点。而白壳文蛤群体 10 个个体的 *CO I* 基因序列完全相同, 在 588 bp 序列中未发现任何核苷酸位点变异, 这说明其遗传多样性很低或遗传同质性较高, 究其成因可能由于白壳文蛤地理分布范围狭小、种群数量不大导致了随机遗传漂变和近交衰退, 而偏低的遗传多样性容易引起群体的适应性下降、生长速率降低等不利影响, 因此今后应加强对白壳文蛤的种质资源保护和遗传多样性恢复工作。

有关文蛤属贝类之间形态差异的研究, 仅在分类学书籍中见文字描述<sup>[5-8]</sup>, 而未见用形态度量方法进行详细量化分析的报道。本研究对斧文蛤、白壳文蛤及文蛤如东和北海群体间 7 个形态变量进行了方差分析, 结果有 5 个形态参数在 4 个群体间的差异达到了极显著水平 ( $P < 0.01$ ); Tukey 多重比较发现, 斧文蛤的主要形态特征是壳长明显大于壳高, 贝壳和软体部均较坚实, 壳高/壳长、壳湿重/总重、软体部重/总重 3 个参数与文蛤、白壳文蛤群体存在显著差异; 而白壳文蛤的形态特征是壳宽指数大、壳型膨胀, 壳宽/壳长和壳宽/壳高 2 个参数与文蛤和斧文蛤群体差异显著。通过这些形态差异分析, 可建立文蛤、斧文蛤、白壳文蛤的形态鉴别方法, 为文蛤属贝类种间鉴别、种质资源保护及系统进化研究提供理论依据。

### 参考文献:

- [1] DAUTZENBERG P. Contribution a la faune malacologique de l'Indo-Chine [J]. Journ Conchyliol, 1906, 54: 215-219.
- [2] JUKES-BROWNE A J. A synopsis of the family Veneridae Part I and II [J]. Proceedings Malacological Society of London, 1914, 11: 58-94.
- [3] FISCHER-PIETTE E. Revision des vivanuts de *Meretrix* s. s. du museum national d'histoire naturelle [J]. Journ Conchyliol, 1941, 84: 315-344.

- [4] HABE T. Systematics of mollusca in Japan. Bivalvia and Scaphopoda (in Japanese) [M]. Tokyo: Hokuryukan, 1977: 147-270.
- [5] 王如才. 中国水生贝类原色图谱[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1987: 194-195.
- [6] 庄启谦. 中国动物志 软体动物门 双壳纲 帘蛤科 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 229-236.
- [7] 张素萍. 中国海洋贝类图鉴[M]. 北京: 海洋出版社, 2008: 353-354.
- [8] 徐凤山, 张素萍. 中国海产双壳类图志[M]. 北京: 科学出版社, 2008.
- [9] 潘宝平, 吴琪, 张素萍, 等. 文蛤属 (*Meretrix*) 16S rRNA 基因及 ITS1 序列的系统学分析[J]. 海洋与湖沼, 2006, 37(4): 342-347.
- [10] CHEN A H, LI Z X, FENG G N. Phylogenetic relations of the Genus *Meretrix* (Mollusca: Veneridae) based on mitochondrial CO I gene sequences [J]. Zoological Research, 2009, 30(3): 233-239.
- [11] 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.
- [12] 程汉良, 夏德全, 吴婷婷, 等. 6 种帘蛤科贝类及 4 个地理种群文蛤线粒体 CO I 基因片段序列分析[J]. 海洋学报, 2007, 29(5): 109-116.
- [13] YU Z N, KONG X Y, ZHANG L S, et al. Taxonomic status of four *Crassostrea* oysters from China as inferred from mitochondrial DNA sequences [J]. Journal of Shellfish Research, 2003, 22(1): 31-38.
- [14] THERRIAULT T W, DOCKER M F, ORLOVA M I, et al. Molecular resolution of the family Dreissenidae (Mollusca: Bivalvia) with emphasis on Ponto-Caspian species, including first report of *Mytilopsis leucophaeata* in the Black Sea basin [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2004, 30(3): 479-489.
- [15] 苏天凤, 黄建华, 吴进锋, 等. 2 种东风螺线粒体基因序列多态性研究[J]. 中国水产科学, 2007, 14(3): 369-376.
- [16] CHO E S, JUNG C G, SOHN S G, et al. Population genetic structure of the ark shell *Scapharca broughtonii* Schrenck from Korea, China, and Russia based on CO I, gene sequences [J]. Marine Biotechnology, 2007(9): 203-216.
- [17] PRASHAD B. The Lamellibranchia of the Siboga Expedition. Systematic part [J]. Siboga-Expenditie. LIIIc, 1932: 212-264.
- [18] 冯建彬, 孙悦娜, 程熙, 等. 我国五大淡水湖日本沼虾线粒体 CO I 基因部分片段序列比较[J]. 水产学报, 2008, 32(4): 517-525.
- [19] 郑文娟, 朱世华, 邹记兴, 等. 基于 16S rRNA 部分序列探讨 12 种鲈科鱼类的分子系统进化关系[J]. 水产学报, 2008, 32(6): 847-854.
- [20] 张岩, 肖永双, 高天翔, 等. 两种黄盖鲈线粒体 DNA 部分片段比较分析[J]. 水产学报, 2009, 33(2): 201-207.
- [21] 陈爱华, 吴杨平, 姚国兴, 等. 丽文蛤与文蛤 4 个地理群体的形态差异分析[J]. 海洋渔业, 2010, 32(2): 125-131.
- [22] 王如才, 王昭萍. 海水贝类养殖学[M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 2008: 396-400.
- [23] 张玺, 齐钟彦, 张福绥, 等. 中国海软体动物区系区划的初步研究[J]. 海洋与湖沼, 1963, 5(2): 124-138.
- [24] 蔡如星, 黄惟灏. 浙江动物志 - 软体动物[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1991: 248-250.
- [25] 尤仲杰, 李建伟, 洪君超. 浙江沿岸的双壳类[J]. 浙江水产学院学报, 1985, 4(2): 133-143.
- [26] 尤仲杰, 孙建璋, 王一农. 南麂列岛的贝类. 南麂列岛国家级海洋自然保护区论文选(一) [C]. 北京: 海洋出版社, 1992: 34-54.
- [27] 尤仲杰, 徐善良, 谢起浪. 浙江沿岸的贝类资源及其增养殖[J]. 东海海洋, 2000, 18(1): 50-56.
- [28] 林志华, 董迎辉, 李宁, 等. 基于形态参数和 AFLP 标记的文蛤不同地理群体遗传变异分析[J]. 海洋与湖沼, 2008, 39(3): 245-251.
- [29] 张志伟, 陈爱华, 姚国兴, 等. 我国沿海不同地理原种文蛤 (*Meretrix meretrix*) 的 SRAP 分析[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(3): 429-434.

## Molecular classification and morphological traits of two species of *Meretrix* (Mollusca, Bivalvia)

DONG Ying-hui<sup>1</sup>, YAO Ding-yu<sup>1</sup>, LIN Zhi-hua<sup>1\*</sup>, YAO Han-han<sup>1</sup>, LU Rong-mao<sup>2</sup>  
(1. College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China;  
2. Zhejiang Mariculture Research Institute, Wenzhou 325005, China)

**Abstract:** Although many species of the genus *Meretrix* are commercially-important cultured bivalves, the taxonomy of *Meretrix* is still in argument over several discrepancies among scientists in the world. Compared with the groups of *Meretrix meretrix* (RD & BH), two groups of *Meretrix* clam (CN & BW), collected from Cangnan and Beihai, were phylogenetically analyzed and molecularly classified based on partial sequences of the mitochondrial *CO I* gene. The results indicated that the base sequence of CN group and *M. lamarckii* with similar composition was the highest in homology of 100.0% and 99.2%, respectively. Phylogenetic NJ and UPGMA tree of *Meretrix* based on genetic distance also showed that CN1 and CN2 were clustered together with *M. lamarckii* firstly. Therefore we classified CN group as *M. lamarckii*, which extended the geographic distribution of *M. lamarckii* from Taiwan to the southern coast of Zhejiang and corrected the existing document claims. But, the BW group shared low sequence homology (79.6%–85.3%) with other six species of *Meretrix* and formed much independently cluster beyond among groups. Number of polymorphic sites, indexes of haplotype diversity and nucleotide diversity revealed that the level of genetic diversity from high to low was BH > *M. lamarckii* > RD > BW. The *CO I* gene sequences of BW group showed very low genetic diversity and no nucleotide variation among 10 individuals. The morphological characters of *M. lamarckii*, BW and *M. meretrix* were analyzed using statistical analysis of AMOVA and Tukey's multiple comparisons for seven morphological traits. Three morphological parameters, including SH/SL, SMW/TW and IW/TW, of *M. lamarckii* differed significantly with *M. meretrix* and BW ( $P < 0.05$ ). BW with relatively expanded shell shape differed significantly with *M. meretrix* and *M. lamarckii* in parameters of SW/SL and SW/SH ( $P < 0.05$ ). These results can be expected to provide basic data for the studies of species identification, germplasm conservation and phylogeny.

**Key words:** *Meretrix*; *Meretrix lamarckii*; *CO I* gene; molecular classification; morphological traits

**Corresponding author:** LIN Zhi-hua. E-mail: zhihua9988@126.com