

4 种河蓝蛤线粒体 COI 和 16S rRNA 基因序列的种间遗传分析

孙 超^{1,2} 刘志鸿^{2*} 杨爱国² 周丽青² 吴 彪²
严加坤^{1,2} 侯 丫^{1,2} 董春光^{1,2}

(¹上海海洋大学水产与生命学院, 201306)

(²农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘 要 对光滑河蓝蛤 *Potamocorbula laevis*、黑龙江河蓝蛤 *P. amurensis*、焦河蓝蛤 *P. ustulata*、红肉河蓝蛤 *P. rubromuscula* 4 个野生种共 40 个个体的线粒体 COI 和 16S rRNA 基因片段进行了扩增和测序, 经过筛选和剪切, 得到长度为 650 bp 和 450 bp 的片段。序列分析显示, 序列的碱基组成中 G+C 含量较低, 16S rRNA 基因种间和种内的变异较低, COI 基因片段种内和种间的变异较高。以沙海螂 *Mya arenaria* 为外群, 用 MEGA 4.0 软件中的 NJ 法构建了系统进化树, 通过遗传距离和系统进化树可以看出, 4 种河蓝蛤未能达到不同种之间显著的遗传分化。

关键词 河蓝蛤; 线粒体; 16S rRNA; COI; 系统进化

中图分类号 S917.4 文献标志码 A 文章编号 1000-7075(2014)01-0082-09

Genetic analysis of mitochondrial COI and 16S rRNA gene fragments in four *Potamocorbula* species

SUN Chao^{1,2} LIU Zhi-hong^{2*} YANG Ai-guo² ZHOU Li-qing²
WU Biao² YAN Jia-kun^{1,2} HOU Ya^{1,2} DONG Chun-guang^{1,2}

(¹ College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, 201306)

(² Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

ABSTRACT The gene fragments of the mitochondrial COI and 16S rRNA in *Potamocorbula laevis*, *P. amurensis*, *P. ustulata* and *P. rubromuscula* were amplified and sequenced. Totally, 40 sequences of COI gene and 16S rRNA were obtained, and after trimming they were 650 bp and 450 bp respectively in length with low GC content. The results of sequence analysis showed that the intraspecific variation and interspecific variation were lower in 16S rRNA than those in COI gene. Ten mutation sites and seven haplotypes were detected in the gene fragments of 16S rRNA. Taking *Mya arenaria* as the out-group, the phylogenetic trees of COI and 16S rRNA

科技部基础工作专项“我国重要渔业生物 DNA 条形码信息采集及其数据库构建”(2013FY110700)和国家科技基础条件平台项目“黄渤海区水生生物种质资源标准化整理、整合与共享”共同资助

* 通讯作者。E-mail: liuzh@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85836340

收稿日期: 2013-03-06; 接受日期: 2013-04-01

作者简介: 孙 超(1987-), 男, 硕士研究生, 主要从事贝类遗传育种研究。E-mail: yuheng2008@163.com

were constructed by the neighbor-joining (NJ) method using software MEGA 4.0. Based on the genetic distance in NJ phylogenetic tree, we found that the four species of *Potamocorbula* failed to achieve significant genetic differentiation between species.

KEY WORDS *Potamocorbula*; mtDNA; 16S rRNA gene; COI; Molecular phylogenetics

河蓝蛤属贝类是生活在河流入海口处的一类小型贝类,在我国从南到北均有分布。河蓝蛤属贝类不仅是虾蟹的可口饵料,也可以作为食品供人类食用,具有很高的经济价值。随着虾蟹养殖业的大规模发展,大规模滥捕滥捞使我国河蓝蛤资源量大幅减少,目前能够进行大规模采捕的滩涂越来越少,亟需对河蓝蛤的种质资源进行研究与保护。

庄启谦(1964)曾采用形态特征作为分类依据区分河蓝蛤,认为在我国分布的主要有光滑河蓝蛤 *Potamocorbula laevis*、黑龙江河蓝蛤 *P. amurensis*、焦河蓝蛤 *P. ustulata* 和红肉河蓝蛤 *P. rubromuscula*。贝壳呈卵圆形或长卵圆形,壳较小,薄而轻,两壳不等,通常左壳小于右壳,右壳腹缘的中、后部明显卷包在左壳缘之上,壳面呈黄白色或黄褐色。其中,黑龙江河蓝蛤、焦河蓝蛤和红肉河蓝蛤成体个体大小接近,光滑河蓝蛤个体较小,壳面光滑(魏利平 1984),易于鉴别。光滑河蓝蛤和黑龙江河蓝蛤主要分布在我国北方地区,焦河蓝蛤在南北方均有分布,而红肉河蓝蛤则主要分布在广东潮汕地区,分布地区范围有限。

多细胞动物体线粒体 DNA 是共价闭合环状分子,长度在(14~17) kb 之间(Wolstenholme 1992)。由于它具有母系遗传、进化速度快、核苷酸替代率高(Brown *et al.* 1979; Whitmore *et al.* 1994)等特点,已经成为物种鉴定、种群遗传以及系统发育等研究的有效标记(Hallerman 2003)。线粒体 DNA 基因序列的差异在种内遗传多样性和种间系统学关系的研究中占有非常重要的地位(Kappner *et al.* 2006; Cannas *et al.* 2006)。

目前国内有关河蓝蛤属的相关研究资料较少,在分子方面研究尚未见报道。本研究对光滑河蓝蛤、黑龙江河蓝蛤、焦河蓝蛤和红肉河蓝蛤的线粒体 COI 和 16S rRNA 基因片段进行了测序分析,可为河蓝蛤的种质资源保护和分子系统学研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

4 种河蓝蛤的采集地点和时间如表 1 所示,样品保存于-80℃冰箱。

表 1 样品采集时间和地点
Table 1 Sample collecting site and time

物种 Species	采样地点 Sampling site	经纬度 Location	采集时间 Sampling time (Yr-Mo)
光滑河蓝蛤 <i>P. laevis</i>	山东东营	38°12'N, 117°42'E	2011-10
黑龙江河蓝蛤 <i>P. amurensis</i>	辽宁盘锦	40°38'N, 121°54'E	2011-12
焦河蓝蛤 <i>P. ustulata</i>	浙江舟山	29°59'N, 122°10'E	2012-05
红肉河蓝蛤 <i>P. rubromuscula</i>	广东汕头	23°16'N, 116°39'E	2012-05

1.2 基因组 DNA 提取

在每组样品中随机取 10 个个体,采用酚-氯仿-异戊醇常规方法抽提 DNA。取约 20 mg 河蓝蛤的肌肉组织,加入 400 μ l TEN 细胞裂解缓冲液(200 mmol/L NaCl, 100 mmol/L EDTA, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 9.0),剪碎,再分别加入 40 μ l SDS(10%) 和 8 μ l 蛋白酶 K(10 mg/ml),56℃ 水浴锅里消化至溶液澄清,然后用酚-氯仿抽提,再用异戊醇沉淀,然后用去离子超纯水溶解。提取的总基因组 DNA 定量后配成 20 ng/ μ l 的溶

液备用。

1.3 PCR扩增与电泳检测

所用 COI 基因引物序列为 AR(5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3')与 BR(5'-TAAACT-TCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'), 16S rRNA 基因片段扩增所用引物为 AR(5'-CGCCTGTTTAT-CAAAAACAT-3')、BR(5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACG-3')(Canapa *et al.* 2000), 引物由上海生工生物工程有限公司合成。在 Eppendorf 扩增仪上进行 PCR 反应, 设置 30 μ l 反应体系: 3 μ l PCR 10 \times Buffer (Mg²⁺ plus), 4 μ l dNTP(2 mmol/L), 10 μ mol/L 的引物各 2 μ l, 0.5 μ l Taq 酶(5 U/ μ l), 2 μ l DNA(20 ng/ μ l), 超纯水补足至 30 μ l。PCR 反应条件设置: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 44 $^{\circ}$ C(16 S)、55 $^{\circ}$ C(COI)退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 结束后取 3 μ l 扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳检测(1 \times TBE, 5V/cm 恒压), GenFinder 染色, 凝胶成像系统(UVP, BioImaging Systems)观察和拍照。

1.4 测序和数据处理

PCR 产物由北京华大基因测序。将测序得到的序列用 DNASTar 软件包里的 MegAlign 软件分析其同源性和遗传距离。用 MegAlign 软件对所获得的线粒体 COI 和 16S rRNA 基因片段序列进行序列比较, 确定同源性和差异位点。用 DnaSp 4.0 软件计算 4 个河蓝蛤群体的单倍型数(H)、平均核苷酸差异(K)及核苷酸多样性指数(Pi)。用 MEGA 4.0 软件计算 4 个群体线粒体 COI 和 16S rRNA 基因片段序列的碱基组成、变异位点及种间的 Kimura2-paramter 遗传距离, 以沙海螂 *Mya arenaria* 为外群, 用 NJ 法构建系统进化树, 系统树各节点的支持率以序列数据集 1 000 次重复抽样检验的自引导值(Boot-strap value)表示。

2 结果与分析

2.1 河蓝蛤 COI 和 16S rRNA 基因片段碱基组成

经过 PCR 扩增, 每个物种的 COI 和 16S rRNA 基因片段分别得到 10 个, 共 80 个清晰的扩增条带。经双向直接测序, 获得 COI 基因序列大约为 727 bp, 16S rRNA 基因序列大约为 520 bp。通过在线 BLAST 比较, 证实所得序列为 COI 和 16S rRNA 的基因片段。经过 ClutalX 同源比对后, 除去引物及部分杂合序列, 得到了 665 bp 的 COI 和 450 bp 的 16S rRNA 基因片段。

用 MEGA 4.0 软件分析 4 种河蓝蛤 COI 和 16S rRNA 基因片段的碱基组成。COI 基因片段碱基组成见表 2, 16S rRNA 基因片段碱基组成见表 3。通过表 2 可以看出, 光滑河蓝蛤 COI 基因片段的 GC 含量明显小于其他 3 种河蓝蛤的 GC 含量。通过表 3 可以看出, 光滑河蓝蛤的 GC 含量和其他 3 种河蓝蛤 GC 含量相似。4 种河蓝蛤的 GC 含量明显小于 AT 含量, 与缢蛏(牛东红等 2007)、栉孔扇贝(刘亚军等 2002)、近江牡蛎(苏天凤等 2005)研究中的 AT 含量高于 GC 含量的结果是相一致的。

表 2 河蓝蛤属 COI 基因片段的碱基组成

Table 2 The base composition of COI gene fragments of four *Potamocorbula* species

种名 Species	碱基组成 Base composition(%)				GC 含量 GC content(%)
	T	C	A	G	
光滑河蓝蛤 <i>P. laevis</i>	46.4	13.1	21.9	18.7	31.8
黑龙江河蓝蛤 <i>P. amurensis</i>	45.2	13.6	20.6	20.6	34.2
焦河蓝蛤 <i>P. ustulata</i>	45.2	13.6	20.7	20.4	34.0
红肉河蓝蛤 <i>P. rubromuscula</i>	45.5	13.6	20.9	20.0	33.6

表 3 河蓝蛤属 16s rRNA 基因的碱基组成

Table 3 The base composition of 16s rRNA gene fragments of four *Potamocorbula* species

种名 Species	碱基组成 Base composition(%)				GC 含量
	T	C	A	G	GC Content(%)
光滑河蓝蛤 <i>P. laevis</i>	30.17	24.29	31.31	14.23	38.52
黑龙江河蓝蛤 <i>P. amurensis</i>	29.60	24.48	31.88	14.04	38.52
焦河蓝蛤 <i>P. ustulata</i>	30.36	24.90	31.17	13.56	38.46
红肉河蓝蛤 <i>P. rubromuscula</i>	29.60	24.48	31.50	14.42	38.90

2.2 群体遗传多样性分析

对 4 个物种的序列用 ClustalX 比对后,对全部序列进行比较,利用 DnaSp 4.0 软件分析群体遗传多样性参数,结果见表 4 和表 5。

表 4 不同河蓝蛤群体线粒体 COI 基因片段的遗传多样性参数

Table 4 Genetic diversity parameters of COI gene fragments among four *Potamocorbula* species

种名 Species	样本数	单倍型数	单倍型多态性	平均核苷酸差异数	核苷酸多样性指数
	N	H	Hd	K	Pi
光滑河蓝蛤 <i>P. lalaevis</i>	10	7	0.933	5.356	0.008 21
黑龙江河蓝蛤 <i>P. amurensis</i>	10	8	0.956	6.222	0.009 43
焦河蓝蛤 <i>P. ulaustulata</i>	10	9	1	4.111	0.006 22
红肉河蓝蛤 <i>P. rubromuscula</i>	10	10	1	6.044	0.009 16
总计 Total	40	33	0.991	22.001	0.033 85

对 4 种河蓝蛤的 COI 基因片段进行分析,共检测到 84 个多态性位点,87 个变异位点,其中包括 26 个单一变异位点和 61 个简约信息位点。检测到转换位点 18 个,颠换位点 5 个,插入/缺失位点 15 个。碱基转换与颠换的平均比值 $R=3.67$ 。平均核苷酸差异数为 22.001,核苷酸多样性指数为 0.033 85。黑龙江河蓝蛤和红肉河蓝蛤有一个共有的单倍型,其他的均为每个物种独有。

表 5 不同河蓝蛤群体线粒体 16S rRNA 基因片段的遗传多样性参数

Table 5 Genetic diversity parameters of 16S rRNA gene fragments among four *Potamocorbula* species

种名 Species	样本数	单倍型数	单倍型多态性	平均核苷酸差异数	核苷酸多样性指数
	N	H	Hd	K	Pi
光滑河蓝蛤 <i>P. laevis</i>	10	2	0.356	2.489	0.005 53
黑龙江河蓝蛤 <i>P. amurensis</i>	10	3	0.622	0.711	0.001 58
焦河蓝蛤 <i>P. ustulata</i>	10	1	0	0	0
红肉河蓝蛤 <i>P. rubromuscula</i>	10	1	0	0	0
总计 Total	40	4	0.477	2.492	0.005 89

对 4 种河蓝蛤的 16S rRNA 基因片段进行分析,共检测到 9 个多态性位点、21 个变异位点,其中包括 1 个单一变异位点和 20 个简约信息位点。检测到转换位点 3 个、颠换位点 1 个、插入/缺失位点 27 个。碱基转换与颠换的平均比值 $R=1.8$ 。平均核苷酸差异数为 2.492,核苷酸多样性指数为 0.005 89。4 种河蓝蛤有一个共有的单倍型,焦河蓝蛤和红肉河蓝蛤只有一个单倍型。

由表 4 和表 5 可以看出,COI 基因片段序列变异稍大一些,物种间的遗传多样性参数较高。在 16S rRNA 基因片段中,焦河蓝蛤和红河蓝蛤的单倍型多态性和平均核苷酸差异数都为 0,表明这个基因片段在这 40 个河蓝蛤个体间没有显著差异。COI 基因片段序列和 16S rRNA 基因片段序列变异位点的分布如图 1 和图 2 所示。

PR(1)	TCTAGAAATA	TTGCTCATTG	IGGTCCAGCT	ATAGATTTIT	TAATTTTIGTC	TCTTCATTTA	GGGGTTTTGT	CTTCAATTAT	GGCT	4
PR(2)
PR(3)G.....
PR(4)C.....
PR(5)G.....
PR(6)G.....
PR(7)G.....
PR(8)G.....
PR(9)G.....
PR(10)G.....
PA(1)G.....
PA(2)G.....
PA(3)G.....
PA(4)G.....
PA(5)G.....
PA(6)G.....
PA(7)G.....
PA(8)G.....
PA(9)G.....
PA(10)G.....
PL(1)G.....
PL(2)G.....
PL(3)G.....
PL(4)G.....
PL(5)G.....
PL(6)G.....
PL(7)G.....
PL(8)G.....
PL(9)G.....
PL(10)G.....
PU(1)G.....
PU(2)G.....
PU(3)G.....
PU(4)G.....
PU(5)G.....
PU(6)G.....
PU(7)G.....
PU(8)G.....
PU(9)G.....
PU(10)G.....
PR(1)	TCTTGAAC	TTTATAGGAC	TTGGGGTAAT	AGTCGTTCTG	GTGTGCATAA	TTTTCTTCGT	GTTCCCTTIT	TCTGTAGATC	TTTA	504
PR(2)
PR(3)
PR(4)
PR(5)
PR(6)
PR(7)
PR(8)
PR(9)
PR(10)
PA(1)
PA(2)
PA(3)
PA(4)
PA(5)
PA(6)
PA(7)
PA(8)
PA(9)
PA(10)
PL(1)
PL(2)
PL(3)
PL(4)
PL(5)
PL(6)
PL(7)
PL(8)
PL(9)
PL(10)
PU(1)
PU(2)
PU(3)
PU(4)
PU(5)
PU(6)
PU(7)
PU(8)
PU(9)
PU(10)

图 1 河蓝蛤属 COI 基因片段序列变异位点

Fig. 1 Variation sites in COI fragments among *Potamocorbula* species

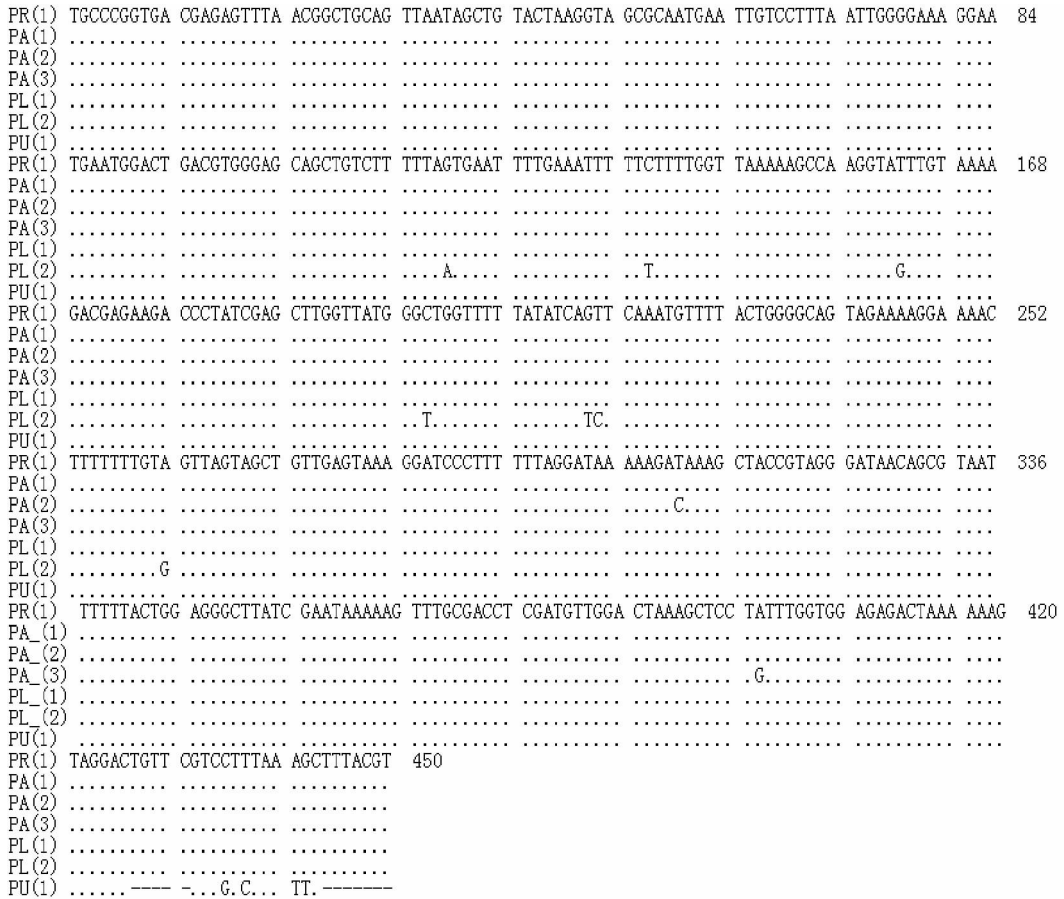


图 2 河蓝蛤属 16S rRNA 基因片段序列变异位点

Fig. 2 Variation sites in 16S rRNA fragments among *Potamocorbula* species

2.3 遗传距离与聚类分析

利用 MEGA 4.0 软件中的 Kumara2-parameter 模型,计算 4 种河蓝蛤之间的相对遗传距离,见表 6 和表 7。表 6 中,基于 COI 计算 4 种河蓝蛤种内和种间平均遗传距离,得出种内遗传距离介于 0.006~0.010 之间,种间的平均遗传距离为 0.008~0.047。表 7 中,基于每个物种间 16S rRNA 基因片段计算得出的平均遗传距离介于 0~0.009 之间,其中焦河蓝蛤和红肉河蓝蛤的平均遗传距离最小,为 0,黑龙江河蓝蛤和光滑河蓝蛤的平均遗传距离最大,为 0.009。

表 6 基于 COI 基因序列的 4 种河蓝蛤的 Kumara2-parameter 平均遗传距离

Table 6 Kumara2-parameter genetic average distances based on COI gene fragments of four *Potamocorbula* species

物种 Species	1	2	3	4
1 光滑河蓝蛤 <i>P. laevis</i>	0.008			
2 黑龙江河蓝蛤 <i>P. amurensis</i>	0.047	0.01		
3 焦河蓝蛤 <i>P. ustulata</i>	0.044	0.01	0.009	
4 红肉河蓝蛤 <i>P. rubromuscula</i>	0.045	0.008	0.008	0.006

可以看出,基于 16S rRNA 和 COI 基因片段的聚类结果具有一致性。图 3 显示,除光滑河蓝蛤之外的其他 3 种河蓝蛤首先聚在一起,然后和光滑河蓝蛤聚在一起,最后和沙海螂聚在一起。图 4 显示,4 种河蓝蛤首先聚在一起,然后和外群的沙海螂聚在一起,和图 3 不同的是,光滑河蓝蛤没有和其他 3 种河蓝蛤分开,同时,黑龙江河蓝蛤的 3 个单倍型个体聚在一起,没有出现和其他河蓝蛤优先聚合的情况,图 3 和图 4 的拓扑结构与传统分类学结果基本一致。

3 讨论

通过对动物线粒体 DNA 相应基因序列的比较显示,物种线粒体 DNA 上 Cyt B、COI、12S rRNA、16S rRNA 4 个基因最保守,同源性高,常被用于分析和探讨群体系统发生关系。12S rRNA 和 16S rRNA 比较适合种属间的系统关系研究,Cyt B、COI 适合分析种、亚种及地理种群之间的系统关系(李咏梅等 2009)。Boudry 等(1998)对葡萄牙牡蛎 *Crassostrea angulata* 的 16S rRNA 基因 PCR 产物用 9 种内切酶进行酶切,未发现变异的酶切位点;但用 4 种内切酶对同个体的 COI 基因 PCR 产物进行酶切,检测到了多个酶切位点;王青(2004)在巨蛎属牡蛎中研究发现,4 个不同地理群体牡蛎的 16S rRNA 基因没有变异,而 COI 基因片段序列却呈现出较为丰富的遗传变异。苏天凤等(2005)研究也认为,COI 基因更适用于牡蛎群体研究。本研究也得出了相似的结果。基于 COI 基因序列分析可以看出,4 种河蓝蛤中检测到 84 个多态性位点、87 个变异位点,共有 33 个单倍型,黑龙江河蓝蛤和红河蓝蛤共有 1 个单倍型,其他 32 种单倍型均为每个物种所独有。基于 16S rRNA 基因序列分析,4 种河蓝蛤 450bp 序列只检测出 9 个多态性位点、4 种单倍型,焦河蓝蛤和红河蓝蛤都只有 1 种共有的单倍型,这也证明了 16S rRNA 基因更为保守。COI 基因种内和种间的变异均高于 16S rRNA 基因,说明 COI 基因更适于河蓝蛤属贝类的遗传多样性研究,郭天慧等(2004)在对三疣梭子蟹的 COI 和 16S rRNA 基因片段序列的研究中也得到了相似的结论。

核苷酸多态性指数和单倍型间的平均遗传距离是衡量一个物种线粒体 DNA 遗传变异的两个重要指标,由于核苷酸多态性指数值考虑了各种线粒体 DNA 单倍型在群体中所占的比例,因此在反映一个群体的线粒体 DNA 遗传多样性时,核苷酸多态性指数要比遗传距离更精确(Zhou *et al.* 2006)。Grant 等(1998)通过对线粒体 DNA 序列的遗传变异分析,将不同核苷酸多样性指数和单倍型多态性间的组合分成 4 种类型:第 1 种类型是较低的核苷酸多样性($P_i < 0.005$)与较低的单倍型多态性($H_d < 0.5$);第 2 种类型是高的单倍型多样性与低的核苷酸多态性;第 3 种类型是低的单倍型多样性与高的核苷酸多态性;第 4 种类型是高的单倍型多样性与高的核苷酸多态性。基于 COI 基因序列可以看出,4 种河蓝蛤的遗传变异均属于第 4 种,从历史进化角度分析,这种高的单倍型多样性与高的核苷酸多态性的遗传多样性模式通常是由一个较小的有效种群经过长期快速增长成一个大的种群所引起的(Grant *et al.* 1998)。在这种群体的扩张过程中,可产生出许多新的突变,积累了丰富的单倍型多样性,有足够的时间积累核苷酸序列的多样化(Bowen *et al.* 1998),这说明取样地区的 4 种河蓝蛤资源比较丰富,有较长的生活史,种群规模大,产生了许多新的突变,积累丰富了单倍型多样性和足够的核苷酸序列,遗传多样性较高,遗传资源丰富。根据碱基变异情况来看,东营群体光滑河蓝蛤与其他 3 种河蓝蛤的碱基序列差异较大,进化速度和变异速度更快,这可能与该地区处黄海三角洲自然保护区,河蓝蛤受人为干扰作用相对较小有关。而焦河蓝蛤核苷酸多样性指数偏低,说明遗传资源虽然丰富,但是核苷酸变异积累受到了影响,这可能是由于采样地区位于杭州湾内,河蓝蛤在当地被采捕作为食物,种群规模恢复较慢,没有足够长的时间积累核苷酸的变异。可以看出人类活动对河蓝蛤自然资源的影响。

根据遗传距离和系统进化树可以看出,基于 COI 基因序列片段之间的种内遗传距离为 0.006~0.010,种间的平均遗传距离为 0.008~0.047。Hebert 等(2003)对动物界 11 门 13 320 个物种的线粒体 COI 基因序列比较分析后得出物种内的遗传距离很少有大于 0.020 的结论,大部分的种内遗传距离小于 0.010。他提出,利用 COI 基因序列鉴别物种的关键点在于种间的遗传距离必须大于种内的遗传距离,并且距离差异大约 10 倍。本研究中河蓝蛤属内的 4 种河蓝蛤之间的遗传距离小于它们种内的遗传距离的 10 倍,黑龙江河蓝蛤、焦河蓝蛤和红河蓝蛤种间的平均遗传距离为 0.008~0.010,属于种内的遗传距离。光滑河蓝蛤与这 3 种河蓝蛤之间的遗传距离为 0.044~0.047,超出了物种内的遗传距离。而根据 Thorp(1982)提出种群间 16S rRNA 的遗

传距离是 0.030~0.200, 4 种河蓝蛤 16S rRNA 基因之间的遗传距离为 0~0.009, 这个遗传距离甚至小于不同种群之间的遗传距离, 都没有达到显著的遗传分化, 系统进化树拓扑结构也支持这个结论。通过以上数据可见, 这 4 种河蓝蛤之间的亲缘关系很近, 尤其是黑龙江河蓝蛤、焦河蓝蛤和红河蓝蛤之间亲缘关系最为接近, 光滑河蓝蛤相对来说亲缘关系远些, 可以结合其他的基因分析手段来分析这 4 种河蓝蛤的亲缘关系以判断这 4 种河蓝蛤的亲缘关系是否和传统分类学一致。

本研究利用 COI 和 16S rRNA 两个基因片段对 4 种河蓝蛤的遗传多样性进行了分析, 并对 4 种河蓝蛤之间的亲缘关系展开了初步的讨论, 研究发现, 16S rRNA 基因在个体及物种间变异较小, COI 基因在个体和物种间变异较大。线粒体 DNA 中不同区域变异率有所差异, 遗传变异分析能力也不同, 因此检测的遗传多样性水平可能有些偏差, 要进行较全面的研究, 应再选择线粒体 DNA 其他不同的基因区域得到多组序列数据, 才能更加客观、全面地反映遗传多样性水平。

参 考 文 献

- 王 青. 2004. AFLP 技术和线粒体序列分析在我国巨蜆属牡蛎系统分类中的应用. 见: 中国海洋大学硕士研究生学位论文
- 牛东红, 李家乐, 汪桂玲, 姜志勇, 张文博, 沈玉帮, 冯冰冰. 2007. 缢蛭六群体 16S rRNA 基因片段序列的差异分析. 上海海洋大学学报, 16(1): 1-6
- 刘亚军, 喻子牛, 姜艳艳, 张留所, 孔晓瑜, 宋林生. 2002. 栉孔扇贝 16S rRNA 基因片段序列的多态性研究. 海洋与湖沼, 33(5): 477-483
- 庄启谦. 1964. 中国近海帘蛤科的研究. 海洋科学集刊, 5: 43-125
- 苏天凤, 江世贵, 周发林, 朱彩燕, 陈丕茂. 2005. 近江牡蛎 16S rRNA 基因片段序列变异分析. 高技术通讯, 15(2): 100-103
- 李咏梅, 陈秀荔, 赵永贞, 陈晓汉. 2009. 钦州湾牡蛎线粒体 16S rRNA 和 COI 基因片段的序列变异分析. 广东海洋大学学报, 29(3): 11-18
- 郭天慧, 孔晓瑜, 陈四清, 喻子牛. 2004. 三疣梭子蟹线粒体 DNA 16S rRNA 和 COI 基因片段序列的比较研究. 中国海洋大学学报, 34(1): 22-28
- 魏利平. 1984. 光滑河蓝蛤的生活习性及其人工育苗的初步试验. 海洋科学, (6): 32-34
- Boudry PS, Heurtebise S, Collet B and 2 others. 1998. Differentiation between populations of the Portuguese oyster, *Crassostrea angulata* (Lamarck) and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), revealed by mtDNA RFLP analysis. J Exp Mar Bio Eco 226(2): 279-291
- Brown WM, George MJr, Wilson AC. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. PNAS 76(4): 1967-1971
- Canapa A, Barucca M, Marinelli A and 1 other. 2000. Molecular data from the 16S rRNA gene for the phylogeny of Pectinidae (Mollusca: Bivalvia). J Mol Evol 50(1): 93-97
- Cannas R, Cau A, Deiana AM and 2 others. 2006. Discrimination between the Mediterranean spiny lobsters *Palinurus elephas* and *P. mauritanicus* (Crustacea: Decapoda) by mitochondrial sequence analysis. Hydrobiol 557(1): 1-4
- Grant WS, Bowen BW. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. J Hered 89(5): 415-426
- Hallerman EM. 2003. Population genetics: Principle and applications for fisheries scientist. Bethesda, MD: Am Fish Soc 5: 59-100
- Hebert PD, Cywinska A, Ball SL and 1 other. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proc Biol Sci 270(1512): 313-321
- Kappner I, Bieler R. 2006. Phylogeny of venus clams (Bivalvia: Venerinae) as inferred from nuclear and mitochondrial gene sequences. Mol Phylogenet Evol 40(2): 317-331
- Miller AD, Murphy NP, BurrIDGE CP and 1 other. 2005. Complete mitochondrial DNA sequences of the decapod crustacean *Pseudocarcinus gigas* (Menippidae) and *Macrobrachium rosenbergii* (Palaemonidae). Mar Biotechnol 7(4): 339-349
- Thorp JP. 1982. The molecular clock hypothesis: Biochemical evaluation, genetic differentiation and systematics. Annu Rev Ecol Syst 13(1): 139-168
- Whitmore DH, Thai TH, Craft CM. 1994. The largemouth bass cytochrome *b* gene. J Fish Biol 44 (4): 637-645
- Wolstenholme DR. 1992. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. Int Rev Cytol 141: 173-216
- Zhou H, Li DQ, Zang YG and 2 others. 2006. Study on mitochondrial DNA genetic diversity of Tibetan antelope. Hereditas 28(3): 299-305