

利用 mtDNA 16S rRNA 序列差异鉴定江西青岚湖的河蚌物种

张 亮 黄艳艳 刘焕章

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要: 对从青岚湖采集的 10 属 14 种河蚌的 19 个样本进行了 16S rRNA 的序列测定, 并同 GenBank 中鄱阳湖流域相同物种河蚌的序列比较, 分析了基于 Kimura 2-parameter 模型参数得到的遗传距离, 并构建了它们的 UPGMA 树。结果显示, 所有用于比较的河蚌种间遗传距离变化范围在 0.0274—0.2290, 平均为 0.1325, 种内遗传距离在 0.0034—0.0068 之间, 平均为 0.0045, 种间遗传距离远大于种内距离。表明以 16S rRNA 作为遗传标记, 可以在物种水平上对青岚湖的河蚌进行准确的鉴定。

关键词: 青岚湖; 河蚌; 16S rRNA; 物种鉴定

中图分类号: S966.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2004)03-0294-05

蚌科(Unionidae)属于软体动物门(Mollusca)瓣鳃纲(Lamellibranchia)真瓣鳃目(Eulamellibranchia), 主要生活在淡水环境中。有关我国蚌科的分类, 在以往的记述中^[1], 大多以贝壳的形态(壳长、宽、高, 贝壳颜色、厚度, 壳面瘤状物的有无或多少, 主齿、侧齿的个数等)为依据。贝壳容易保存, 便于和化石种类比较, 在应用中较为方便; 然而贝壳的形态随环境的变化会有差异, 在许多种内变异很大或种间差异并不明显的情况下, 标本难以准确鉴定, 给研究工作带来了不便。近年来, 许多学者也试图从解剖学、生态学、生理学等不同角度来探讨淡水贝类的分类问题^[2,3], 积累了许多资料。随着分子生物学的飞速发展, 分子手段也被应用于贝类的系统发育研究^[4-6]。并且取得了很好的结果。如 Lydeard 等^[4]通过 16S rRNA 基因序列, 研究了北美洲淡水贝类的系统发育, 黄艳艳等^[5]也通过 16S rRNA 序列分析, 探讨了我国的蚌科的系统发育问题, 将我国的蚌科分为三个亚科, 较好地建立了蚌科的系统发育关系。

青岚湖位于江西省南昌县境内, 和鄱阳湖相通, 水质优良, 无污染, 各种水生生物资源丰富, 包括大量的鱼类和河蚌。本实验室在研究 鱼类与河蚌的协同进化过程中, 发现青岚湖的 产卵时大多选择丽蚌作为寄主, 但是这些丽蚌的形态差异大, 而且没

有明确的界限, 物种鉴定困难。因此, 作者尝试用 mtDNA 16S rRNA 序列差异来对采集到的青岚湖河蚌物种进行鉴定, 以探讨不同物种间和同物种不同个体间的差异程度, 并澄清青岚湖 产卵时所选择丽蚌的分类问题, 也为我国河蚌的分类鉴定工作积累资料。

1 材料与方法

1.1 实验样本 用于测序的标本(表 1)于 2002 年 4—6 月从江西青岚湖中采集, 以 95% 酒精保存, 现存于中国科学院水生所标本馆。每种河蚌选择 1—3 个不同样本, 在丽蚌中, 选择了 3 个不同个体, 其中一个外部瘤状物特征特别明显, 一个不明显, 另一个介于二者之间。另外从 GenBank 下载了一些鄱阳湖流域相同物种河蚌的 16S rRNA 序列用于比较。

1.2 实验条件 每个河蚌样本取闭壳肌 50mg, 按常规方法提取总 DNA。消化温度为 56℃, 时间为 12h, 平衡酚抽提去除蛋白质, PCR 扩增使用的是常规方法, 引物为 16S3L(5'-TGAGCGTGCTAAGGTAGC-3'), 16S4H(5'-AGCCAACATCGAGGTCGC-3')^[6]。PCR 反应以大约 100ng 基因组 DNA 作为模板。反应程序为: 94℃预变性 2min; 94℃变性 1min; 57℃退火 30s; 72℃延伸 1min。共进行 35 个循环, 最后 72℃延伸 8min。

收稿日期: 2003-06-28; 修订日期: 2003-11-14

基金项目: 中国科学院创新项目 KSCX 2-SW-105 资助

作者简介: 张 亮(1981—), 男, 河南温县人; 硕士; 现从事鱼类系统发育及物种间协同进化研究。杨金权和胡华明同学协助采集标本, 在此表示衷心感谢

通讯作者: 刘焕章, Email: hzliu@ihb.ac.cn

采用 Biostar 的 glassmilk 纯化试剂盒进行 PCR 产物的回收纯化, 并进行 DNA 测序(上海基康公司)。DNA 测序使用 16S3L 引物。所测得序列均送 GenBank, 序列号为 AY297463——AY297475。

表 1 研究中用于实验的河蚌样本
Tab. 1 The samples of mussel used in this study

编号	河蚌物种	样本个数	编号	河蚌物种	样本个数
1	微红楔蚌(<i>Cuneopsis rufescens</i>)	1	8	扭蚌(<i>Arocaia lanceolata</i>)	1
2	圆头楔蚌(<i>C. heudei</i>)	1	9	短褶矛蚌(<i>Lanceolaria grayana</i>)	3
3	巨首楔蚌(<i>C. apitata</i>)	1	10	褶皱冠蚌(<i>Cristaria plicata</i>)	1
4	鱼尾楔蚌(<i>C. pisciculus</i>)	1	11	背角无齿蚌(<i>Anadonta woodiana woodiana</i>)	2
5	圆顶珠蚌(<i>Unio douglasia</i>)	1	12	三角帆蚌(<i>Hyriopsis cuningii</i>)	1
6	射线裂脊蚌(<i>Schistodesmus lampreyanus</i>)	1	13	洞穴丽蚌(<i>Lamprotula caveata</i>)	3
7	棘裂脊蚌(<i>S. spinosus</i>)	1	14	中国尖嵴蚌(<i>Acuticosta chinensis</i>)	1

1.3 数据处理 利用 Clustal X 软件^[8]对基因序列进行排序并辅以手工校正。使用 MEGA (Version 2.1) 软件^[9]中 Kimura 2-Parameter 模型计算遗传距离, 并构建 UPGMA 树。

2 结果

2.1 青岚湖河蚌 16S rRNA 序列

实验得到 19 个样本的 16S rRNA 部分片段的核苷酸序列, 归为 16 个单倍型, 从正向引物后第 19 个碱基开始作为分析序列的起始, 终点到反向引物, 序列长度为 303 到 313 碱基。将它们与 GenBank 下载的鄱阳湖河蚌序列一起用 Clustal X 排序, 排序后有 306 个位点, 其中有 4 个序列与 GenBank 下载的鄱阳湖河蚌序列相同。306 个位点中有 103 个碱基存在变异, 约占 33.66%。得到的各物种 16S rRNA 基因片段中 A, T, C, G 碱基平均含量分别为 36.5%, 26.3%, 18.1%, 19.1%。其中 A+T 含量(61.8%)明显高于 C+G 含量(37.2%)。序列中的转换明显比颠换多, 转换发生的频率是颠换发生频率的 1.5 倍。

在第 123—161 位核苷酸序列中(39bp)检测到 32 个变异位点, 变异百分率高达 82.05%, 是变异频率最高的区段, 在第 201—242 位核苷酸序列中(43bp)检测到 30 个变异位点, 变异百分率高达 69.77%, 变异频率也比较高; 而在第 68—114 位核苷酸序列中(47bp)只检测到 5 个变异位点, 变异百分率只有 10.64%, 是一段较长的保守序列。

2.2 遗传距离分析

基于 Kimura 2-Parameter 模型的遗传距离(表 2)分析显示, 所有用于比较的河蚌种间的遗传距离变化范围在 0.0274—0.2290 之间, 平均为 0.1325, 种

内遗传距离在 0.0034—0.0068 之间, 平均为 0.0045, 二者差异悬殊, 平均种间距离与平均种内距离之比为 29.44。属内的最大种间距离出现在楔蚌属, 属内的种间距离变化范围在 0.0857—0.1262 之间, 平均为 0.1046, 是最大种内距离的 15.38 倍, 属内最小的种间距离为裂脊蚌属的 0.0274, 也是最大种内距离的 4 倍多。数据表明, 在青岚湖河蚌的鉴定中, 16S rRNA 序列在物种水平上可以进行准确的鉴定。试验得到丽蚌的两个基因单倍型(AY297474 和 AY297475), 它们之间的遗传距离为 0.0034。

2.3 基于算术平均不加权组对法(UPGMA)构建的系统树

基于算术平均不加权组对法(UPGMA)构建的树状图(图 1)显示, 同一物种不同个体间的遗传距离明显小于不同物种间的距离。较为直观地说明了根据 16S rRNA 基因序列的差异, 可以将河蚌在物种水平上给以分辨鉴定。

3 讨论

动物线粒体 DNA 是一种共价闭合、环状的双链 DNA 分子, 结构简单, 呈母系遗传, 且进化速度快, 不同的区域进化速度存在差异, 可以选择不同的区域进行不同时间尺度的进化分析。16S rRNA 基因是线粒体基因组中研究较多的基因, 基因序列中既含有保守序列, 又含有多变序列, 比较适合于分子系统学研究。这方面的报道很多, 在其他类别生物, 诸如细菌、蓝藻、绒螯蟹、鱼类、淡水豚类等的系统发育研究中, 16S rRNA 基因序列也都被广泛地应用, 刘珊等^[7]根据 16S rRNA 基因序列分析将现生淡水豚类的 4 个属归入 4 个不同的科, 较好的解决了现生淡水豚类的分类和系统发生中存在的问题。

表 2 基于 Kimura 2-parameter 模型计算的河蚌之间的遗传距离
Tab. 2 The genetic distances based on Kimura 2-parameter

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1 <i>A. woodiana woodiana</i> (AF389413) *																					
2 <i>C. plicata</i> (AF389414) *	0.1065																				
3 <i>L. grayana</i> (AF389408) §	0.1246	0.1633																			
4 <i>L. grayana</i> (AY297463)	0.1205	0.1589	0.0034																		
5 <i>L. grayana</i> (AY297464)	0.1165	0.1545	0.0068	0.0034																	
6 <i>A. lanceolata</i> (AY297465)	0.1450	0.1633	0.0599	0.0561	0.0599																
7 <i>A. lanceolata</i> (AF389409) §	0.1490	0.1629	0.0635	0.0597	0.0635	0.0034															
8 <i>A. chinensis</i> (AY297466)	0.1244	0.1505	0.0893	0.0855	0.0816	0.1014	0.1052														
9 <i>A. chinensis</i> (AY297467)	0.1285	0.1462	0.0932	0.0893	0.0855	0.0974	0.1012	0.0034													
10 <i>S. lamprovarius</i> (AF389410) *	0.1207	0.1469	0.0899	0.0860	0.0822	0.1059	0.1056	0.0820	0.0782												
11 <i>S. spinosus</i> (AY297468)	0.1171	0.1521	0.0939	0.0899	0.0860	0.1301	0.1298	0.0937	0.0967	0.0274											
12 <i>C. capitata</i> (AY297470)	0.1331	0.1340	0.0857	0.0819	0.0780	0.1217	0.1256	0.0976	0.0937	0.0862	0.0789										
13 <i>U. douglasiae</i> (AY297471)	0.1453	0.1542	0.1123	0.1084	0.1044	0.1244	0.1284	0.1085	0.1045	0.0969	0.0894	0.0782									
14 <i>U. douglasiae</i> (AF389406) §	0.1456	0.1545	0.1162	0.1122	0.1083	0.1284	0.1323	0.1007	0.0968	0.1007	0.0971	0.0857	0.0067								
15 <i>C. headi</i> (AY297472)	0.1465	0.1477	0.1465	0.1422	0.1379	0.1473	0.1512	0.1298	0.1256	0.1227	0.1068	0.0906	0.0972	0.1050							
16 <i>C. pascuensis</i> (AF389407) §	0.1633	0.1912	0.1331	0.1290	0.1248	0.1327	0.1366	0.1085	0.1045	0.1092	0.1097	0.0859	0.1162	0.1241	0.1304						
17 <i>C. pascuensis</i> (AY297469)	0.1589	0.1866	0.1290	0.1248	0.1207	0.1368	0.1408	0.1045	0.1006	0.1052	0.1056	0.0820	0.1122	0.1201	0.1262	0.0034					
18 <i>C. rufescens</i> (AY297473)	0.1132	0.1343	0.1210	0.1169	0.1128	0.1304	0.1301	0.1014	0.0974	0.0672	0.0748	0.0748	0.0816	0.0892	0.0909	0.0896	0.0857				
19 <i>H. cuningii</i> (AF389418) *	0.1829	0.1814	0.1923	0.1878	0.1832	0.1969	0.2012	0.1843	0.1889	0.1889	0.1843	0.1708	0.1927	0.1839	0.1664	0.2250	0.2202	0.1902			
20 <i>L. caretta</i> (AY297474)	0.2138	0.2229	0.2132	0.2086	0.2132	0.2226	0.2270	0.1997	0.1997	0.2095	0.2095	0.1956	0.1948	0.1991	0.2088	0.2182	0.2135	0.2290	0.1607		
21 <i>L. caretta</i> (AY297475)	0.2138	0.2229	0.2132	0.2086	0.2132	0.2226	0.2270	0.1997	0.1997	0.2095	0.2095	0.1956	0.1992	0.2036	0.2088	0.2182	0.2135	0.2290	0.1607	0.0034	

标* 者为青岚湖河蚌序列与 GenBank 下载序列相同。标 § 者为 GenBank 下载的河蚌序列。
* indicates the sequence of mussels in Qing Lan Lake is same as that downloaded from GenBank. § indicates the sequence downloaded from GenBank.

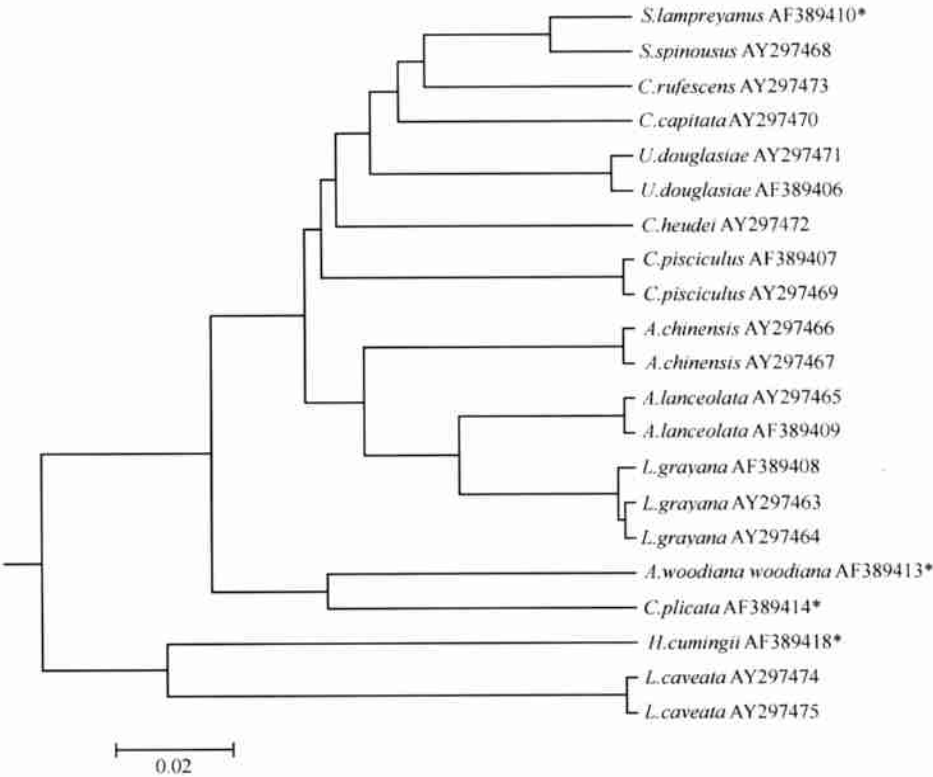


图 1 用算术平均不加权组对法(UPGMA)构建的树状图

Fig. 1 The dendrogram of unweighted pair group method with arithmetic mean based on Kimura 2 parameter distances. The scale bar represents distance.

Lam 和 Morton^[6]对采自香港、英国、澳大利亚等不同的海域的 6 种牡蛎的 16S rRNA 序列进行比较,发现除了香港的 *Sacostrea cucullata* 的种内距离为 0.036 外,其他 5 种牡蛎的种内距离都在 0.005 以内,远小于最小种间距离 0.104。在一定程度上也说明了 16S rRNA 序列差异可以应用在贝类的分类鉴定工作中。本研究在多数情况下,种内的遗传距离均较小(表 2),例如短褶矛蚌 3、4 和 5 之间(0.0034—0.0068),扭蚌 6 和 7 之间(0.0034),圆顶珠蚌 13 和 14 之间(0.0067),鱼尾楔蚌 15 和 16 之间(0.0034),洞穴丽蚌 20 和 21 之间(0.0034)。种内遗传距离(0.0034—0.0069)和种间遗传距离(属内 0.0857—0.1262,属间 0.0561—0.2290)差异显著,说明根据 16S rRNA 基因序列的差异,可以将河蚌在物种水平上给以分辨鉴定。

用分子标记方法来鉴定物种,目前在学术界也存在很多争议^[10—12],大家普遍认为以往依据形态学的分类方法简便、直观,节约时间和资金,但在很多需要确切的系统学资料情况下(例如在传染病病原生物的鉴定,农林业病虫害的生物防治,生物多样性调查研究等工作中),简单的形态分类不能够解决

问题,就需要借助于分子标记的研究。所以很多学者都认为,将分子标记和形态鉴定相结合,最大程度地、较好地建立物种间的系统发育关系,是解决物种分类和鉴定难题的必然途径。

本研究的初期,由于丽蚌的外部瘤状物特征较为明显,将它们鉴定为背瘤丽蚌,并将其序列送至 GenBank。但经过仔细研究后发现,瘤状物明显和不明显的样本 16S rRNA 基因序列差异极小,显示为同一物种。进一步的形态比较表明,它们应该归属洞穴丽蚌。本研究显示洞穴丽蚌的壳面瘤状物变异范围比较大。

根据青岚湖河蚌线粒体 16S rRNA 基因序列的结果,同时结合鄱阳湖流域相同物种河蚌序列进行分析,结果表明,青岚湖中有 14 种河蚌。为进一步研究鱼类与河蚌的协同进化关系打下基础。同时也为我国蚌科的分类鉴定和进化关系研究积累了资料。

参考文献:

[1] Liu Y Y, Wang Y X, Zhang W Z. Economic Fauna of China. Fresh water Mollusk[M]. Beijing: Science Press, 1976. [刘月英,王跃先,张文珍. 中国经济动物志——淡水软体动物. 北京: 科学出版社, 1976]

[2] Wei Q S, Fu C H, Wang Y F, Fu X F. Comparative studies on mor

- phology of glochidia of six mussel species(Mollusca:Unionidae)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1994, **18**(4): 303—309. [魏青山, 傅彩红, 王玉凤, 傅小飞. 珠蚌科六种蚌的钩介幼虫形态比较研究. 水生生物学报, 1994, **18**(4): 303—309]
- [3] Wu X P. Studies on freshwater mollusca in Mid lower reaches of Yangtze River[D]. Ph. D. thesis, Institute of Hydrobiology, CAS, 1998. [吴小平. 长江中下游淡水贝类的研究. 博士学位论文, 中科院水生生物研究所, 1998.]
- [4] Lydeard C, Mulvey M, Davis G M. Molecular systematics and evolution of reproductive traits of North American freshwater unionacean mussels(Mollusca: bivalvia) as inferred from 16S rRNA gene sequences [J]. *Biological Sciences*, 1996, **351**(1347): 1593—1603
- [5] Huang Y Y, Liu H Z, Wu X P, Ouyang S. Testing the relationships of Chinese freshwater unionidae(Bivalvia) based on analysis of partial mitochondrial 16S rRNA sequences[J]. *J. Moll. Stud.*, 2002, **68**: 359—363
- [6] Lan K, Morton B. Morphological, ecological and mitochondrial DNA 16S sequence distinctions between and within *Saccostrax* (Bivalvia: Ostreidae) populations in Hong Kong and Australia[J]. *Abstracts of World Congress of Malacology*, 2001, 184
- [7] Liu S, Yang G, Zhou K Y, *et al.* Phylogeny of river dophins based on partial DNA sequence from Mitochondrial 16S rRNA gene[J]. *Journal of Nanjing Normal University (natural science)*, 2000, **23**(4): 74—78. [刘珊, 杨光, 周开亚, 等. 淡水豚类 mtDNA 16S rRNA 基因的系统发生. 南京师大学报(自然科学版) 2000, **23**(4): 74—78]
- [8] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F. The Clustal- X windows interface: flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nud. , Acids Res. ,* 1997, **25**: 4876—4882
- [9] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, *et al.* MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Version 2.1[M]. Arizona: Arizona State University, 2001
- [10] Seberg O, Humphries C J, Knapp S, *et al.* Shortcuts in systematics? A commentary on DNA-based taxonomy[J]. *Trends in Ecology and Evolution*, 2003, **18**(2): 63—65
- [11] Lipscomb D, Plantnik N, Wheeler Q. The intellectual content of taxonomy: a comment on DNA taxonomy[J]. *Trends in Ecology and Evolution*, 2003, **18**(2): 65—66
- [12] Tautz D, Arctander P, Minelli A, *et al.* A plea for DNA taxonomy[J]. *Trends in Ecology and Evolution*, 2003, **18**(2): 70—74

THE SPECIES IDENTIFICATION OF MUSSELS IN QING LAN LAKE (JIANGXI PROVINCE) BASED ON SEQUENCE DIFFERENCES OF MITOCHONDRIAL 16S rRNA GENE

ZHANG Liang, HUANG Yarr Yan and LIU Huan Zhang

(*Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072*)

Abstract: Generally, the identification of freshwater mollusk is mainly based on shell differences, but shells are greatly variable under different environmental conditions and hence usually result in taxonomic confusion. To clarify these problems, many studies on morphology, ecology, anatomy and physiology have been carried out in the past years, such as the researches on marsupia, glochidium, sensory hairs and spines. However, they have not shown any conclusive evidence for definite identification. In order to identify the mussel species correctly, we employed the molecular systematic method. The mitochondrial 16S ribosomal RNA gene has been used in the phylogenetic studies of mussels successfully. In the present study, the 16S rRNA gene fragments were sequenced to 19 individuals of mussels, which belong to 14 species of 10 genera, and were from the Qing Lan Lake (Jiangxi province, where the water quality is excellent and the species of fishes and mussels are abundant). The target fragments of 16S rRNA were isolated by PCR amplification to the samples. Thirty five cycles of PCR(94 °C, 1min denaturing, 57 °C, 30s annealing, 72 °C, 1min extension) were performed. Some sequences of mussels from Poyang Lake were downloaded from GenBank for comparison. Alignments were manipulated using Clustal X and refined manually where necessary. Sequence analysis was performed using MEGA (Version 2.1) software. Genetic distances were calculated based on Kimura 2-parameter model. The largest intraspecific genetic distance is 0.0068, much lower than the average interspecific distance, which has a value of 0.1325, and still much lower than the shortest interspecific distance, 0.0274, suggesting that 16S rRNA is a useful genetic marker for identification of mussel species clearly.

Key words: Qing Lan Lake; Mussel; 16S rRNA; Species identification