

中国蚌科线粒体 16S rRNA 序列变异及系统发育

黄艳艳^{1,2} 欧阳珊¹ 吴小平¹ 刘焕章²

(1. 南昌大学生物科学工程系, 南昌 330047; 2 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要:首次测定了中国淡水贝类——蚌科(Unionidae) 13 个属代表种类的线粒体 16S rRNA 部分序列。用 Clustal X 排序软件进行 16S rRNA 序列的对位排列, 序列总长度为 305—320bp。通过 Mega 2.0 软件对所得线粒体 16S rRNA 片段序列进行比较, 共发现 108 个碱基存在变异, 其中包括 77 个简约信息位点, 并用“Pairwise distance”计算了各属间的相对遗传距离。以贻贝为外类群, 采用 Mega 2.0 软件中的“Neighbor Joining”法得到惟一一个分子系统树, 系统树各分支的置信度由“Bootstrap”1000 循环检验。结果表明: 分布于中国的蚌科形成三个明显的类群, 第一个类群, 包括帆蚌属、蛭蚌属、丽蚌属和尖锄蚌属; 第二个类群, 由矛蚌属、扭蚌属、裂脊蚌属、鳞皮蚌属、尖嵴蚌属、楔蚌属和珠蚌属组成; 第三个类群只包括无齿蚌和冠蚌两个属。由此可以看出, 它们有可能分别隶属于三个不同的亚科, 即小方蚌亚科(帆蚌属、蛭蚌属、丽蚌属和尖锄蚌属)、无齿蚌亚科(无齿蚌属和冠蚌属)和珠蚌亚科(矛蚌属、扭蚌属、裂脊蚌属、鳞皮蚌属、尖嵴蚌属、楔蚌属和珠蚌属), 由此证明小方蚌亚科在中国的存在, 并且, 对几个属的分类位置作了调整。其中鳞皮蚌属和蛭蚌属原来属于无齿蚌亚科, 根据线粒体 16S rRNA 的结果, 前者应该放在珠蚌亚科, 后者则归于小方蚌亚科; 帆蚌属、丽蚌属和尖锄蚌属原来都放在珠蚌亚科, 现把它们放在小方蚌亚科可能更为合适。

关键词:蚌科; 线粒体 DNA; 16S rRNA; 系统发育

中图分类号: Q959.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2003)03-0258-06

随着分子生物技术的发展 and 普及, 分子系统学已被广泛应用到各种动物的系统发育研究, 但研究主要集中在脊椎动物中的哺乳类、鱼类、鸟类^[1-5], 对无脊椎动物的系统发育研究国内报道较少。大量的资料说明, 线粒体 16S rRNA 能很好的用于系统发育研究。其中 Geller 等^[6]利用 16S rRNA 序列探讨了贻贝的系统发育问题。Lydeard 等^[7]通过 16S rRNA 序列研究了北美淡水贝类的系统发育关系。线粒体 16S rRNA 基因已被广泛应用到各类动物的系统发育中, 而中国淡水贝类的该项研究则是一个空白。

通过对 16S rRNA 序列变化的研究, 来探讨中国淡水蚌科的系统发育问题, 试图直接从遗传物质本身—DNA 序列的变化中寻找它们之间的亲缘关系, 为进一步研究淡水贝类, 尤其是中国淡水贝类的系统发育研究提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料来源 研究所用 13 个属代表蚌种样本均

采自江西鄱阳湖, 具体见表 1。所有标本活体带回实验室, 每个属取一个标本, 用 95% 的酒精固定, 待测序用。选用贻贝做外类群, 其序列从 GenBank 中下载所得(AF023571)。

1.2 基因组 DNA 提取 总 DNA 提取根据 Ausubel^[8]的方法加以修改。提取液含 1% 的 SDS, 1mg/mL proteinase K, 56℃消化过夜, 经过酚、酚-氯仿(氯仿: 异戊醇= 24: 1)和氯仿(氯仿: 异戊醇= 24: 1)分别抽提一次。无水乙醇沉淀, TE(pH= 8.0)溶解稀释后即可用于 PCR 反应。

1.3 PCR 扩增和序列测定 PCR 扩增使用常规方法, 所用引物为 16S3L(5'-TGAGCGTGCTAAGGTAGG-3'), 16S4H(5'-AGCCAACATCGAGGTCGG-3')^[7]。DNA 测序也使用这两个引物。PCR 反应使用大约 100ng 基因组 DNA 作为模板。反应总体积为 50μL, 其中 dNTPs, 0.2mmol/L, 引物 1μmol/L, MgCl₂, 4.0mmol/L, 10X 缓冲液, 5.0μL, Taq 酶 2 个单位。PCR 反应共 35 个循环, 循环前 94℃预变性 2min; 每

收稿日期: 2002-01-21; 修订日期: 2002-03-27

基金项目: 国家自然科学基金(No. 39760015); 中国科学院创新项目(KSCX2-SW-105); 江西省自然科学基金(No. 0130009)项目资助

作者简介: 黄艳艳(1977—), 女, 江西省鹰潭市人; 硕士; 从事软体动物分子系统学研究

一循环包括 94℃, 1min; 57℃, 30s; 72℃, 1min; 最后 72℃延伸 8min。用 2% 的琼脂糖电泳分离 PCR 产物片段, 在长波紫外灯下割下发光的电泳带回收即可,

回收采用 Biostar 的 glassmilk 试剂盒。基因测序由上海基康公司完成。所测序列已送 GenBank, 序列号为: AF389406 AF389418。

表 1 样本及其 16S rRNA 片段长度和核苷酸组成
Tab. 1 Specimens, the nucleotide percentage composition and length of 16S rRNA sequences

物 种	T	C	A	G	总 长 (bp)
圆顶珠蚌(<i>Unio douglasia</i>)	27.0	16.3	36.7	20.1	319
鱼尾楔蚌(<i>Cuneopsis pisciculus</i>)	25.2	19.5	34.6	20.8	318
短褶矛蚌(<i>Lanceolaria grayana</i>)	27.0	17.6	36.7	18.8	319
扭蚌(<i>Arconaia lanceolata</i>)	26.6	17.9	36.1	19.4	319
射线裂脊蚌(<i>Schistodesmus lampreyanus</i>)	28.1	16.6	35.6	19.7	320
高顶鳞皮蚌(<i>Lepidodesma languilata</i>)	26.3	17.9	36.7	19.2	308
卵形尖嵴蚌(<i>Acuticosta ovata</i>)	26.6	17.9	36.7	18.8	319
背角无齿蚌(<i>Anodonta woodiana woodiana</i>)	26.4	18.6	36.5	18.6	318
褶皱冠蚌(<i>Cristaria plicata</i>)	25.3	20.6	32.8	21.3	320
背瘤丽蚌(<i>Lamprotula leai</i>)	22.2	22.2	34.7	20.9	320
尖锄蚌(<i>Ptychorhynchus ptisteri</i>)	24.3	20.5	36.3	18.9	317
橄榄蛭蚌(<i>Solenia olivora</i>)	23.9	19.7	36.7	19.7	305
三角帆蚌(<i>Hyriopsis aumingii</i>)	20.8	23.0	35.3	20.8	317
平均值	25.4	19.1	35.8	19.7	316.8

1.4 数据分析方法 先用 Clustal X^[9] 排序软件对 16S rRNA 序列进行对位排列, 辅以手工校正。采用 Mega 2.0(Molecular Evolution Genetics Analysis)^[10] 中的“Neighbor-Joining”软件对所得 DNA 一级序列数据构建分子系统树, 系统树各分支的置信度由“Bootstrap”^[11] 1000 循环检验。相对遗传距离用 Mega 2.0 中的“Pairwise distance”计算。

2 结果

2.1 序列测定

通过双参数法, 用 Clustal X 程序对测定的序列进行对位排列, 辅以手工校正。并将基因库(GenBank)中所查到的序列读入 Clustal X 中, 经排序后生成了供系统发育分析的序列矩阵。表 1 显示了所有用于对比的蚌科 16S rRNA 序列长度和核苷酸组成。所测序列的长度为: 305bp 到 320bp, 平均碱基组成为: A: 35.8%; T: 25.4%; C: 19.1% G: 19.7%; 与北美淡水贝类的碱基含量相类似, A、T 的含量高于 G、C 的含量。在所有序列中, 有 108 个碱基存在变异, 其中 77 个简约信息位点。表 2 显示了蚌科各属间的相对遗传距离。

2.2 系统发育分析

用分子系统学软件 Mega 2.0 中的 NJ 法获得惟一的一个系统树, 其拓扑结构显示于图 1。Bootstrap 1000 给出了各支的置信度(只显示在 50% 以上的置信度), 最高值为 96%。研究的 13 种蚌类, 每个种分别代表一个属, 形成了三个明显的分支, 蛭蚌属、尖锄蚌属、丽蚌属和帆蚌属组成一支(BP= 89), 冠蚌属和无齿蚌属形成一个分支(BP= 86), 矛蚌属、扭蚌属、裂脊蚌属、楔蚌属、尖嵴蚌属、珠蚌属和鳞皮蚌属形成另外一个分支(BP= 69)。

3 讨论

3.1 蚌科的系统发育

长期以来, 蚌科的分类问题一直存在争议, 最早 Ortmann^[12] 将蚌科分为四个亚科, 后来 Hanniba^[13] 又把它分为两个亚科, 即无齿蚌亚科和珠蚌亚科, 其后不同的学者对蚌科亚科的划分观点各异。最近比较典型的是 Haas^[14] 和 Heard & Guckert^[15] 的分类系统, 前者分蚌科为: Unioninae、Quadrulinae、Anodotinae、Alasmidontinae、Lampsilinae 以及 Hyrianae 六个亚科, 后者将蚌科分为 Unioninae、Anodontinae、Pleurobeminae、

表 2 相对遗传距离(对角线以下是转换加颠换, 对角线以上是转换比颠换)
Tab.2 Pairwise distance matrix (below diagonal, transition+ transversion ratios; above diagonal, transition/ transversion)

物 种	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 贻贝		0.873	0.831	1.000	0.986	0.833	0.859	0.865	0.877	0.887	0.889	0.835	0.782	0.853
2 短褶矛蚌	0.442		3.250	2.375	1.889	1.250	1.000	2.600	1.400	1.933	0.867	0.923	0.923	1.500
3 扭蚌	0.432	0.053		2.625	1.818	1.800	1.000	2.600	1.353	1.867	0.967	0.929	1.000	1.550
4 射线裂脊蚌	0.452	0.085	0.091		2.714	1.400	1.071	4.333	1.615	2.727	1.071	1.080	1.208	1.684
5 高顶鳞皮蚌	0.479	0.085	0.101	0.084		1.909	1.615	5.400	2.083	2.800	1.231	1.042	1.429	1.529
6 卵形尖嵴蚌	0.439	0.085	0.088	0.075	0.104		0.867	1.667	1.250	2.077	0.893	0.857	1.250	2.063
7 圆顶珠蚌	0.439	0.094	0.107	0.091	0.110	0.088		1.636	1.667	1.867	0.710	0.963	0.920	1.579
8 鱼尾楔蚌	0.460	0.113	0.113	0.101	0.104	0.101	0.091		2.364	3.444	1.000	1.042	1.364	1.444
9 背角无齿蚌	0.457	0.114	0.126	0.107	0.121	0.114	0.126	0.117		4.800	1.111	1.500	1.476	3.364
10 褶纹冠蚌	0.444	0.138	0.135	0.129	0.123	0.126	0.135	0.126	0.091		1.143	1.750	1.182	2.500
11 背瘤丽蚌	0.452	0.177	0.186	0.182	0.189	0.167	0.167	0.177	0.180	0.189		1.211	1.095	0.870
12 尖锄蚌	0.483	0.159	0.171	0.165	0.161	0.165	0.168	0.156	0.159	0.174	0.132		1.056	0.909
13 橄榄蛭蚌	0.481	0.165	0.158	0.174	0.168	0.149	0.158	0.172	0.172	0.158	0.144	0.122		2.154
14 三角帆蚌	0.463	0.158	0.161	0.161	0.141	0.155	0.155	0.139	0.152	0.155	0.136	0.133	0.135	

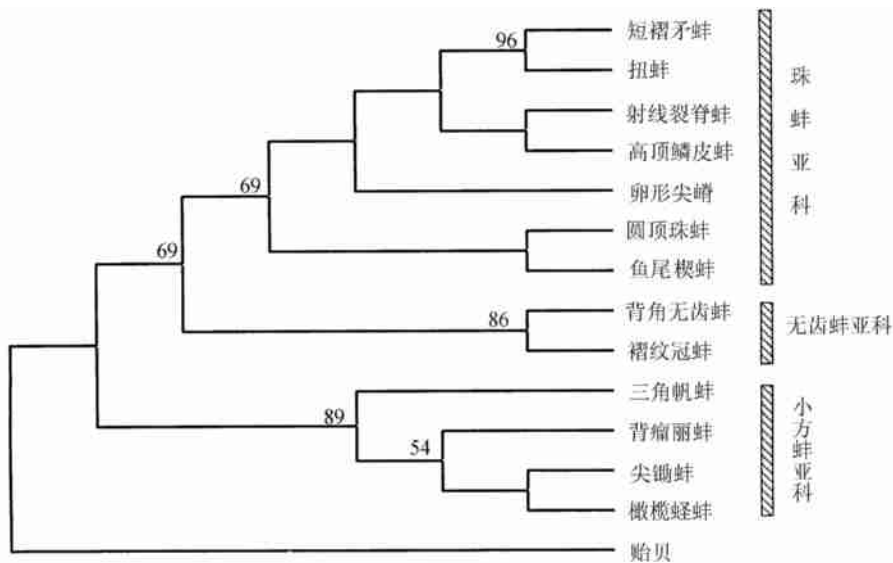


图 1 分子系统树, 枝上显示 Bootstrap 1000 个循环的置信度(只显示在 50% 以上的置信度)
Fig. 1 Molecular phylogenetic tree. The numbers represent the percentage of 1000 bootstrap replications (only above 50% showed)

Lampsilinae 和 Popenaiadinae 五个亚科。分布于我国的蚌科种类, 按传统的分类系统, 主要包括两个亚科: 珠蚌亚科 (Unioninae) 和无齿蚌亚科 (Anodontinae)^[16]。其中珠蚌亚科包括帆蚌属、丽蚌属、裂脊蚌属、尖嵴蚌属、珠蚌属、楔蚌属、尖锄蚌属、扭蚌属和矛蚌属等; 无齿蚌亚科包括无齿蚌属、冠蚌属、鳞皮蚌属和蛭蚌属等。段毅豪(资料) 应用等位基因同工酶分析方法对中国蚌科 8 属 16 种进行了系统分类研究, 但对于它们之间的系统发育关系尚缺乏系统研究。

根据线粒体 16S rRNA 序列分析(图 1) 的结果,

目前分布于中国的蚌科种类, 可能分别隶属于三个亚科, 而非形态分类中的两个亚科。其中由帆蚌属、蛭蚌属、丽蚌属和尖锄蚌属形成的这一支应从原来的两个亚科中独立出来, 归入另一个亚科, 即 Mod-ell^[17] 和 Brandt^[18] 分类系统中的小方蚌亚科 (Ambleminae)。冠蚌属和无齿蚌属归于无齿蚌亚科。矛蚌属、扭蚌属、裂脊蚌属、楔蚌属、尖嵴蚌属、珠蚌属和鳞皮蚌属划在珠蚌亚科。此外, 还有两个稀有属, 雕刻蚌属 (Parreysia) 和拟齿蚌属 (Pseudodon) 未能采到, 将在以后的研究中尽量补充。

3.2 蛭蚌属的分类位置

蛭蚌属是 Conrad(资料)以 *M. emarginatus* 作为模式种(采自泰国)建立的。他指出将 *M. emarginatus* 放在长足蚌属是错误的, 因为该种有侧齿。但 Fischer(资料)根据 Heude 的资料认为 Heude^[19] 报道的中国长足蚌有发达的纵长的足, 且生活方式为以前端插入泥底, 和南美的 *Mycetopoda* 相似, 因而亲缘关系很近, 应纳入长足蚌属(资料)。Simpson^[20] 也发现亚洲的长足蚌明显有纵长的侧齿, 而真正的长足蚌(分布于南美)是无齿的。因此亚洲的这一类群应为蛭蚌属。但关于本属在蚌科中的分类位置, 一直以来都存在很大的争议, 在 Haas^[21] 和 Moore^[22] 的分类系统中, 蛭蚌属被放在珠蚌亚科, 他们认为尽管蛭蚌属的侧齿退化, 但仍有侧齿痕迹。而刘月英^[16] 将其放在无齿蚌亚科。根据分子研究的结果(图 1), 蛭蚌属和帆蚌属、丽蚌属以及尖锄蚌属形成独立的一支, 置信度高达 89%, 处于中国淡水蚌科系统树的基部。Heard 和 Davis^[23] 将鳃的结构作为蚌超科中亚科甚至科的分类依据, 并认为蚌超科中珍珠蚌科的鳃结构最原始, 无真正的鳃水管和完整的隔膜, 隔膜成束状, 与鳃丝平行。吴小平(资料)曾对中国蚌科 21 个种的鳃进行了观察, 发现丽蚌属和蛭蚌属的种类与珍珠蚌科的鳃较为相似, 认为这两个属具有较原始的特性, 而且可能有亲缘关系。综合分子和形态的研究结果, 认为目前把蛭蚌属划归于无齿蚌亚科是没有系统发育上的意义的, 应该从无齿蚌亚科中划分出来, 和帆蚌属、尖锄蚌属以及丽蚌属一起归于另一个亚科, 既不放在无齿蚌亚科, 也不放在珠蚌亚科中, 而归属于小方蚌亚科。

3.3 帆蚌属及冠蚌属的分类位置

由于帆蚌属和冠蚌属种类成体贝壳非常相似, 所以对于它们的分类位置各家说法不一。Simpson^[24] 把这两个属归入珠蚌亚科, Haas、Moore、刘月英等则把帆蚌属和冠蚌属分别放在珠蚌亚科和无齿蚌亚科, 而 Model、Brandt 根据成体贝壳都具有背翼、育儿囊均为外鳃类的同生型而将它们放在小方蚌亚科。线粒体 16S rRNA 序列的结果表明: 冠蚌属和帆蚌属的亲缘关系较远, 不可能属于同一个亚科。其中冠蚌属和无齿蚌属形成了一个姐妹群, 置信度高达 86%。帆蚌属和丽蚌属、蛭蚌属以及尖锄蚌属形成了独特的一支 (BP= 89)。有的学者认为, 钩介幼虫有无壳钩是蚌科中属及属以上单元的重要分类依据^[17-21]。吴小平^[25-26] 研究了中国蚌科 10 种蚌类的钩介幼虫, 除丽蚌属和帆蚌属为无钩型外, 其他各

种都为有钩型, 他根据这个结果认为: 帆蚌属和丽蚌属可能是蚌科中比较独特的类群, 而且亲缘关系较近。综上所述, 冠蚌属应该放在无齿蚌亚科, 这和以往大多数学者的结论是一致的, 三角帆蚌则放在小方蚌亚科更为合适。

3.4 鳞皮蚌属的分类位置

鳞皮蚌属最早由 Heude 以 *L. languilata* 为模式种建立的, Heude 曾记述鳞皮蚌属一种及一变种, *Unio Languilata* 和 *U. languilata* Var. *aligerus*。Simpson 和 Haas 将其中的变种提升为种 *Laliger*, 认为该壳面上同心圆刻饰更精细, 后背嵴更强大且弯曲。从分子系统树上可以看出, 鳞皮蚌属和无齿蚌属的关系相距较远, 但和珠蚌亚科中的一些属的关系比较接近 (BP= 69)。刘月英曾指出将鳞皮蚌属放在无齿蚌亚科, 但其后的很多证据都不支持这种假说。段毅豪(资料)利用形态、蛋白质电泳和同工酶分析表明, 在形态分类上属于无齿蚌亚科的鳞皮蚌属, 明显地和无齿蚌亚科中的其他种类分开。吴小平(资料)在进行钩介幼虫分析时发现, 所有无齿蚌亚科幼虫壳表面, 除高顶鳞皮蚌外, 其他的种类均有孔, 而珠蚌亚科的大部分种类都属于无孔型。所以, 将鳞皮蚌属放在无齿蚌亚科是不适合的, 应该归属于珠蚌亚科。

作者首次对分布于中国的蚌科淡水贝类进行了分子系统发育研究, 并依据系统发育结果提出了不同的分类系统, 这将为世界淡水贝类的系统发育、生态学和生物地理学研究等提供依据。然而, 要建立蚌科所有种类间的系统发育关系, 尚需分子生物学、形态学、解剖学等多学科的综合分析以及多方面资料的证实, 才能得到较准确的结论。

参考文献:

- [1] He S P, The phylogeny of the Glyptostomoid fishes (Teleostei: Siluriformes, Sisoridae) [J]. *Cybum*, 1996, 20(2): 115—159
- [2] Wang W, He S P, NAKAJIMA T, The RAPD analysis for cyprinid fish (*APHOCYPRIS* AND *HEMIGRAMMOCYPRIS*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2001, 25(3): 358—361. [王伟, 何舜平, 中岛经夫. 日本产和中国产中华细鲫的 RAPD 分析. 水生生物学报, 2001, 25(3): 358—361]
- [3] Yi L, Wang W, Li M Y, et al, A study on the geographical differentiation of *Rhodius ocellatus* based on RAPD analysis [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2001, 25(3): 301—304. [易犁, 王伟, 李墨怡, 等. 基于 RAPD 分析的高体 地理分化研究. 水生生物学报, 2001, 25(3): 301—304]
- [4] Lü X M, Wang Y X, Zhang Y P, Divergence and phylogeny of mitochondrial cytochrome b gene from species in *Nycticebus* [J]. *Zoolog*

- ical Research*. 2001, **22**(2): 93—98. [吕雪梅, 王应祥, 张亚平. 蜂猴线粒体细胞色素b基因变异特点及系统发育分析. 动物学研究, 2001, **22**(2): 93—98]
- [5] Jiang H Y, Lu P H, Li Y M, Study of the relationship among five species of muscipidae by mtDNA sequence [J]. *Hereditas*. 2000, **22**(1): 21—24. [姜海英, 陆佩洪, 李悦民. 科五种鸟线粒体DNA序列变化与亲缘关系的研究. 遗传, 2000, **22**(1): 21—24]
- [6] Geller J B, Carlton J T, Powers D A. Interspecific and intrapopulation variation in mitochondrial ribosomal DNA sequences of *Mytilus* spp. (Bivalvia: Mollusca) [J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1993, **2**: 44—50
- [7] 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]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 1996, **351**(1347): 1593—1603
- [8] Auseul F M. Short protocols in Molecular Biology (2nd Ed) [M]. London: John Wiley & Sons. 1992
- [9] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, **25**(24): 4876—4882
- [10] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, *et al.* MEGA 2.0: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software [M]. Arizona State University, Tempe, Arizona, USA. 2001
- [11] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap [J]. *Evolution*, 1985, **39**: 783—791
- [12] Ortmann A E. Notes upon the families and genera of the Najades [J]. *Annals of the Carnegie Museum*, 1912, **8**: 222—365
- [13] Hannibal H A. synopsis of the Recent and Tertiary freshwater Mollusca of the California Province, based upon an ontogenic classification [J]. *Proceedings of the Malacological Society of London*, 1912, **10**: 112—211, pls. 5—8
- [14] Haas F. Superfamily Unionacea. In: Treatise on Invertebrate Paleontology, Part N, Mollusca, 6 (R. C. Moore, ed), Bivalvia: N411—N470 [M]. Geological Society of America, Inc., Boulder, Colorado. 1969b
- [15] Heard W H & Guckert R H. A reevaluation of the recent Unionacea (Pelecypoda) of North America [J]. *Malacologia*, 1971, **10**: 333—355
- [16] Liu Y Y, *Economic Fauna Sinica—Freshwater Mollusk* [M]. Beijing: Science Press 1979, 66—116. [刘月英. 中国经济动物志—淡水软体动物, 北京: 科学出版社, 1979, 66—116]
- [17] Modell H. Das natürliche system der najaden [J]. *Archiv für Molluskenkunde*, 1964, **93**: 71—106
- [18] Brandt R A M. The non marine aquatic Mollusca of Thailand [J]. *Archiv für Molluskenkunde*, 1974, **105**(F-IV): 1—423
- [19] Heude R P. Conchyliologie fluviatile de la province de Nanking [M]. Paris, 1875—1886
- [20] Simpson C T. Synopsis of the naiads, of pearly freshwater mussels [J]. *Proceedings of the U. S. National Museum*, 1990, **22**: 501—1075
- [21] Haas F. Superfamilia Unionacea [M]. In: Das tierreich (H. Wermuth, ed.), 1969a, 88: Berlin 1, Germany
- [22] Moore R C. Treatise on invertebrate Palaeontology [M]. Part N. 2. Mollusca 6 bivalvia. Geological Soc. Am. Inc. And Univ. Kansas, 1969
- [23] Davis G M. Genetic relationship among some North America Unionidae: sibling species, convergence, and cladistic relationships [J]. *Malacologia*, 1984, **25**(2): 629—648
- [24] Simpson C T. A descriptive catalogue of the naiades or pearly freshwater mussels [M]. Privately published by Bryant Walker, Detroit, Michigan, 1914
- [25] Wu X P, Liang Y L, Wang H Z. A comparative study on glochidial morphology of Unionidae (Bivalvia) I. *Unio douglasiae*, *Cuneopsis pisiculus*, *Acuticosta Chinensis* and *Acuticosta ovata* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1999, **23**(2): 141—145. [吴小平, 梁彦龄, 王洪铸. 蚌科钩介幼虫比较形态学研究, I 四个种幼虫的形态. 水生生物学报, 1999, **23**(2): 141—145]
- [26] Wu X P, Liang Y L, Wang H Z, Ouyang S. A comparative study on glochidial morphology of Unionidae (Bivalvia) II. *Lanceolata*, *Lamprotula*, *Hyriopsis* and *Cristaria* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2000, **24**(3): 252—256. [吴小平, 梁彦龄, 王洪铸, 欧阳珊. 蚌科钩介幼虫比较形态学研究, II 六个种幼虫的形态. 水生生物学报, 2000, **24**(3): 252—256]

PHYLOGENY OF THE UNIONIDAE BASED ON PARTIAL
MITOCHONDRIAL 16S rRNA SEQUENCES

HUANG Yarr-Yan^{1, 2}, OUYANG Shan¹, WU Xiao-Ping¹ and LIU Huan-Zhang²

(1. Department of Biology, Nanchang University, Nanchang 330047; 2. Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract: This study presents the mitochondrial 16S rRNA partial sequences representing 13 genera of Chinese freshwater mussel Unionidae. Alignments were conducted with the help of Clustal2X. After alignment, there were 305) 320 sites. Sequence variations were analyzed with Mega 2. 0 software, one hundred and eight sites were variable, among which there were seventy2sev2 en phylogenetically informative sites. / Pairwise distances0 were computed among the 13 genera with *Mytilus edulis* designated as outgroup. Only one molecular phylogenetic tree was obtained using Neighbore2Joining method of Mega 2. 0. The bootstrap analy2 ses (1000 replications) were performed to test the confidence of nodes. According to our results, Unionidae recorded from China group to three clades: a basal *Hyriopsis* + *Solenia* + *Lamprotula* + *Ptycharchynchus* clade, an *Acuticosta* + *Unio* + *Ar2 conaia* + *Cuneopsis* + *Lanceolaria* + *Schistodesmus* + *Arconaia* calde and an *Anodonta* + *Cristaria* clade. Therefore, Chi2 nese unionids should be divided into three subfamilies: Amblesminae(*Hyriopsis* + *Solenia* + *Lamprotula* + *Ptycharchynchus*), Anodontinae(*Anodonta* + *Cristaria*) and Unioninae (*Acuticosta* + *Unio* + *Arconaia* + *Cuneopsis* + *Lanceolaria* + *Schis2 todesmus* + *Arconaia*), which also demonstrates the existence of Amblesminae in China. Thereinto, the analysis of mitochondrial 16S rRNA indicates that *Solenia* and *Lepidodesna*, which were placed Anodontinae before, should be moved to the subfamily Amblesminae and Unioninae respectively. To more accurately reflect the phylogeny, *Hyriopsis*, *Lamprotula* and *Ptycharchynchus* should be moved to the subfamily Amblesminae.

Key words: Unionidae; Mitochondrial DNA; 16S rRNA; Phylogeny