

DB21

辽宁省地方标准

DB21/T 3105-2019

中国蛤蜊（种质）

Species identification of *Macra chinensis*

2019-01-30 发布

2019-03-01 实施

辽宁省市场监督管理局 发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009《标准化工作导则 第1部分：标准化工作导则》给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由丹东市质量技术监督局提出。

本标准由辽宁省海洋与渔业厅归口。

本标准起草单位：丹东永明食品有限公司、中国科学院海洋研究所。

本标准主要起草人：张涛、宋浩、李永明、李朝辉、杨靖华、胡博、杨红生、周毅、张立斌。

中国蛤蜊（种质）

1 范围

本标准规范了中国蛤蜊*Mactra chinensis* (Philippi, 1846) 的名称与分类、分布、主要形态特征、生长与繁殖、遗传学特性、检测方法和判定规则。

本标准适用于辽宁地区中国蛤蜊种质检测与鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 18654.2 养殖鱼类种质检验 第2部分：抽样方法

GB/T 18654.12 养殖鱼类种质检验 第12部分：染色体组型分析

DB21/T 1958-2012 水产动物DNA鉴定线粒体COI基因序列法

3 名称与分类

3.1 名称

中国蛤蜊*Mactra chinensis* (Philippi, 1846)，别名黄蚬子、飞蛤、沙蛤、中华蛤蜊、凹线蛤蜊。

3.2 分类地位

软体动物门 (Mollusca)、双壳纲 (Bivalvia)、帘蛤目 (Veneroida)、蛤蜊科 (Mactrida)、蛤蜊属 (*Mactra*)。

4 分布

中国蛤蜊为暖温性种类。栖息于中潮区至水深60 m浅海的细砂中，以水深2 m~5 m处最多。主要分布在我国的辽宁、山东，日本、朝鲜也有分布。

5 主要形态特征

5.1 外部形态特征

5.1.1 贝壳外形

贝壳略呈三角形，壳较坚厚。壳长略大于壳高，两壳大小相等。壳面膨胀，无放射肋，但由壳顶至腹缘有宽度不等的浅黄色与黄褐色相间的放射带或放射条纹。壳面同心状，生长纹明显，愈近腹缘生长纹愈粗大。壳顶稍突出，略高出背缘，位于背缘中央稍偏前方，向内弯曲，不接触。小月面及楯面宽大。壳前后缘均圆形，背腹缘呈弧形。

5.1.2 色泽

壳面黄褐色。壳内面银白色，壳顶内面为蓝紫色，幼贝更加明显。

5.1.3 绞合部

左右两壳各具一主齿，左主齿呈“人”字形，右主齿呈“八”字形。左壳前后方各1齿，单片，右壳前后方齿为双片。内韧带槽位于壳顶基部，内嵌有褐色三角形的内韧带，位于主齿后方。

5.1.4 闭壳肌痕

后闭壳肌痕略大于前闭壳肌痕，在前后闭壳肌上方各有一缩足肌痕。

5.1.5 外套肌痕

外套窝深而钝。外套肌痕宽短。

中国蛤蜊外部形态见图1。

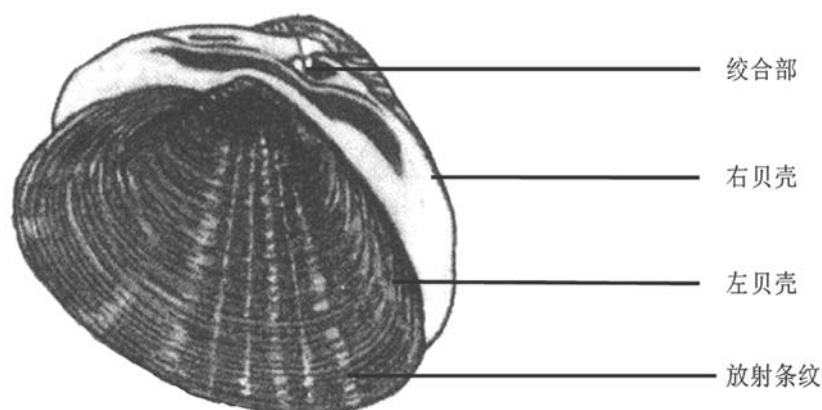


图1 中国蛤蜊形态特征

5.2 软体部

5.2.1 外套膜与水管

外套膜包围整个软体部，边缘厚，中央薄而透明，在背缘愈合，并在后缘愈合形成两个水管。水管短而粗，两个水管紧靠，但互不相通。出水管较进水管细而短，于进水管之上。

5.2.2 足

位于身体腹面，两侧扁平呈斧刀状，颜色为白色或淡红色。

5.2.3 闭壳肌

后闭壳肌大于前闭壳肌，略呈方柱形体，前闭壳肌近圆柱体，前后闭壳肌上方各有一缩足肌。

5.2.4 鳃

身体左右各有鳃两片，内外鳃形状不同，外鳃小于内鳃，内外鳃在背缘与内脏囊相连，内鳃的前端与唇瓣相接，两侧鳃的基部在身体后部末端愈合。

5.2.5 内脏团

由肝胰脏、心脏、生殖腺、胃等构成，被外套膜和鳃包围。

6 生长与繁殖

6.1 生长

自然条件下，1龄壳长可达20 mm~30 mm。4龄或5龄时，壳长可达50 mm~60 mm。中国蛤蜊年龄、壳长、体重之间的关系见表1。

表1 中国蛤蜊年龄、壳长、体重之间的关系

年龄(年)	壳长(mm)	体重(g)
1	< 30	< 3.0
2	30~50	3.0~20
3	~50	16.7~25
4	~60	38.46~50
5	~60	38.46~50

6.2 繁殖

6.2.1 性成熟年龄

最小生物学年龄为1年。

6.2.2 繁殖方式

雌雄异体，体外受精。极少数个体会发生性逆转，出现雌雄同体现象。

6.2.3 繁殖期

每年只有一个繁殖期，繁殖盛期为5月中旬~8月上旬。其繁殖季节随着地理区域不同而存在差异，主要受水温影响。

6.2.4 排精、产卵习性

水温14℃以上时，可以排精、产卵。排精和产卵时亲贝双壳微张，配子从出水管缓缓排出。精子乳白色呈烟雾状，卵子粉红色呈丝缕状。分批产卵，壳长45 mm的雌性个体，1次产卵量在70万粒~200万粒左右。卵沉性，排入水中的卵细胞不能立即自行散开。

6.2.5 精卵特征

卵子呈圆球状，核较小而居中。卵径46 μm~61 μm，卵核径20 μm左右。精子头部1.0 μm × 1.7 μm，尾部细长，为头部的1.0倍~1.5倍。受精后进行不等全卵裂，从四细胞起为螺旋卵裂。

7 遗传学特性

7.1 染色体数目

中国蛤蜊二倍体体细胞染色体数为：2n=38。

7.2 16S rRNA、ITS2 和 COI 基因片段分子特征

7.2.1 线粒体 16S rRNA 基因片段单倍型序列位点

片段长度为322bp，检测特征见图2，片段的单倍型序列位点为：

“TAGTAGCGCAATAAATTGTCCTTTAATTGGGGAAATGAATGAAAGGTTGACGAGGGGAAGCTATCTTTTTGGTATAGTTTG AAGTTTTCTTTTATGTGAAAAGACTTAGATTTTATAATTAGAAGAGAAGACCCCGCGAGCTTGTTAAGGGTTACTAAGTTGAGGTAAT TATTGATTTTTGTTGGGGCAACGCAAAGGGAAAAGAAGCTCCTTTGAGTTTTATAGGGATCCACTTAGAGTGAACAAAGCAAAGCTACC GCGGGGATAACAGCGCAATTTCTTCAGAGAGCTCATATCGAAGAGGAAGGTTGCGACCTCG”。

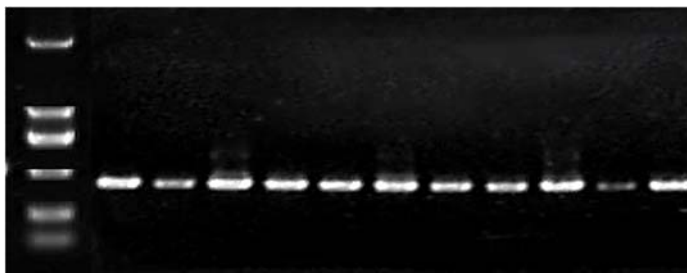


图2 中国蛤蜊肌肉组织 16S rRNA 基因片段凝胶电泳图谱

7.2.2 ITS2 基因片段单倍型序列位点

片段长度为590bp，检测特征见图3，片段的单倍型序列位点为：

“ATCGACATCTTGAACGCATATTGCGGCTCCGGCTCAATGCCGAAGCCCCGCTGTCCGAGGGTAGGCTAAACATAATCGCCCC TATCTGCCTGTCGAGGCACCGTTTCATTACGGTGAATCCAGCGCAGGGGCGACTTGGCGTTTTGCGCGAGCCTGTCTCGCCCGTTTCGCT CGAGCTCTCCGCTCTCCAGCAGGCCAACTCATTAGTGGCGCAGGGACTGGGCCGATCGGATCCAGTCTACCGTAGCTATCTGAAGG TCTCGCTGCGTTCTGCGCCGTCCTCTCGCTCTTCGTGAGGCTCGATCGAGGTTGATGGCCACGACTAGCGCAACCGGCTCGATGTA CAGCACTCTCACTGCGGTTACCAGCCGCGGAGGTCGAGGAGCACCAGTCCGCGGGGAGTAACCCGTTCTCGCTCACTAGTTTCGCTAG TAGCAGCTCGGGTTTGC GCGGTTCTGTGCTTGGGGCAAGGAGCGGGCACCAACCTATTCACTAGGTGAGTAGGCGGCGCACATAGTATA AAACAACCTACCTCGGATCAGACGAGACTACCCGCTGAATTTAAGCATATCAGTAAGCGGAG”。

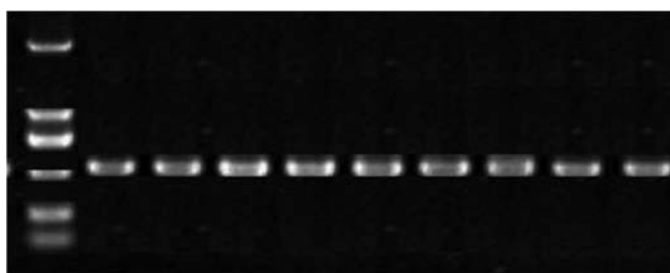


图3 中国蛤蜊肌肉组织 ITS2 基因片段凝胶电泳图谱

7.2.3 COI 基因片段分子特征

片段长度为627bp，检测特征见图3，片段的单倍型序列位点为：

CATAAAGATATTGGCACTCTTTATTTTCGCTTTTTCTTATTGGGCTGGGTTGGTAGGAACAGCTTTTAGCTCTATTATTCGTTTAG AGTTAGCTGTTCCCTGGTGAGAGTCTTTTAGATGGGCAGCTTTATAATTTAGTTGTGACGGCGCATGCTTTAGTTATAATTTTTTTTTTA GTGATGCCAATAATGATGGGGGTTTTGGGAATTGGTTAGTTTCTCTAATGTTAAAAGTTCCAGATATGAGGTTTCTCGTATGAACAA TATTAGGTTCTGACTTCTTCTGTTTCTATTTTACTTCTATTTGCTTCGGCCTATGTTGAAAGAGGGGCAGGAACTGGTTGAACCATT ATCCTCTCTGCTAGGCATATAGGACATCCTGGACCGGCTATGGATTATGTTATTTTTTCTCTCCACGTAGGTGGTCTTTCTTCGATC

CTAGCATCTATTAATTTCTTTACAACCTTCCTAAGGATACGACTAAAGGTGATGTCTTTATATCGGGTTCCTTTGTTTGTTGATGTAT
TGCTGTAAC TAGGTTCTTGTTAGTAGTTGCTATACCTGTTTTGGCTGGCGCTCTTACTATGTTGTTAACAGATCGGAATTTCAACTT
CTTTTTTT。

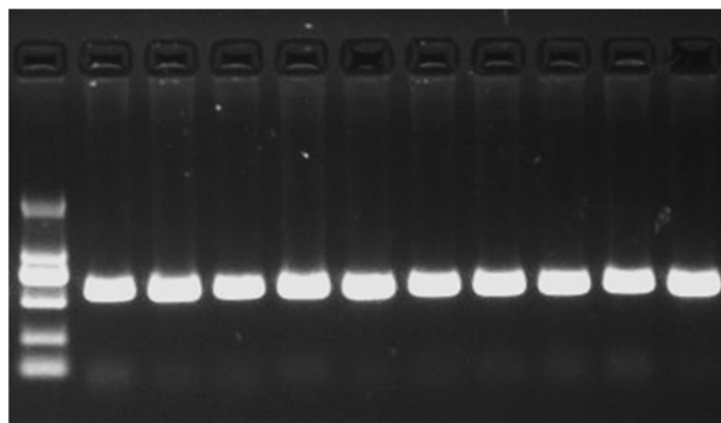


图4 中国蛤蜊肌肉组织 COI 基因片段凝胶电泳图谱

8 检测方法

8.1 抽样

按GB/T 18654.2的规定执行。

8.2 染色体和核型检测

8.2.1 染色体标本制备

参见GB/T 18654.12的规定执行。

8.2.2 核型分析

观察100个左右的分散良好的中期分裂相，记数确定二倍体数。从中挑选10个分散良好、形态清晰的中期分裂相进行显微摄影、放大、测量，按GB/T 18654.12的分类标准对染色体分类。

8.3 线粒体基因片段分子特征检测

COI基因片段分子特征检测参照DB21/T 1958-2012执行。

16S rRNA和ITS2基因片段分子特征检测如下。

8.3.1 DNA 提取

取足肌肉30 mg，剪碎至糜状，使用DNA提取试剂盒提取基因组DNA。

8.3.2 引物序列

以中国蛤蜊基因组DNA为模板，分别用无脊椎动物16S rRNA和ITS2基因序列通用引物进行扩增。引物序列见表1。

表1 引物序列

16S3L	5' -TGAGCGTGCTAAGGTAGC-3'
16S4H	5' -AGCCAACATCGAGGTCGC-3'
ITS2 forward primer	5' -CACACTGAACATCGACAGCTTG-3'
ITS2 reverse primer	5' -GTTTCTTTTCCTCCGCTTACTG-3'

8.3.3 PCR 反应体系

25 μ L PCR反应体系组分见表2、3。

表2 25 μ L 16SrRNA 基因 PCR 反应体系组分

PCR Mix	12.5 μ L
16S3L (10 μ M)	0.5 μ L
16S4H (10 μ M)	0.5 μ L
DNA 模板(100 ng/ μ L)	1 μ L
H ₂ O	10.5 μ L

表3 25 μ L ITS2 基因 PCR 反应体系组分

PCR Mix	12.5 μ L
ITS2 forward primer (10 μ M)	0.5 μ L
ITS2 reverse primer (10 μ M)	0.5 μ L
DNA 模板(100 ng/ μ L)	1 μ L
H ₂ O	10.5 μ L

8.3.4 PCR 程序

8.3.4.1 16S rRNA 基因 PCR 程序

95 $^{\circ}$ C 预变性5 min, 之后30个循环(95 $^{\circ}$ C 变性30 s, 50 $^{\circ}$ C 退火50 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸50 s), 经72 $^{\circ}$ C 延伸, 10 min后15 $^{\circ}$ C 保存。

8.3.4.2 ITS2 基因 PCR 程序

95 $^{\circ}$ C 预变性5 min, 之后30个循环(95 $^{\circ}$ C 变性50 sec, 48 $^{\circ}$ C 退火50 sec, 72 $^{\circ}$ C 延伸1 min), 经72 $^{\circ}$ C 延伸, 10 min后15 $^{\circ}$ C 保存。

8.3.5 琼脂糖凝胶电泳

8.3.5.1 TAE (凝胶缓冲液和电泳缓冲液) 的制备

Tris 242 g, Na₂EDTA·2H₂O 18.6 g, 800 mL去离子水, 57.1 mL的冰乙酸, 用NaOH调pH至8.3, 去离子水定容至1 L。使用时稀释50倍。

8.3.5.2 分析样品的制备

电泳前取2 μ L PCR产物与0.8 μ L 的上样缓冲液混合后备电泳用。

8.3.5.3 凝胶制备

加琼脂糖4 g和制胶缓冲液(TAE)400 mL,在三角烧瓶内混匀,加热至沸腾,然后注入制胶模具中。冷却后,保鲜膜密封保存备用。

8.3.5.4 电泳步骤

将Marker和PCR产物加入点样孔,上样完毕后,在室温条件下以120 V~150 V电压进行电泳,电泳时间依线粒体基因片段的不同而不同,当PCR产物跑至凝胶1/2~2/3处即可。

8.3.5.5 染色

电泳结束后,将琼脂糖凝胶水平置于盛有3 %EB的染色液的染色盒中进行染色,染色15 min左右。

8.3.5.6 摄影、扫描

用凝胶成像系统对谱带进行显像和拍照。

8.3.5.7 结果分析

将所得PCR产物进行纯化回收,采用双向测序并对测序结果进行人工校对。

9 判定规则

被检样品符合本标准的第5章、第6章和第7章要求的为合格样品。如果有一项不符合的可以复检,复检不合格的判定为不合格,复检合格的判定为合格。合格样品数与样品总数的比为合格率。
