

广西钦州湾养殖牡蛎线粒体 16S rRNA 基因片段序列变异分析

苏天凤, 江世贵, 朱彩艳, 周发林, 陈丕茂

(中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东广州 510300)

摘要:采用 PCR 技术对广西钦州湾水域的养殖牡蛎(传统上被认为是近江牡蛎 *Crassostrea ariakensis* Fujita)群体 26 个个体的线粒体 DNA 16S rRNA 基因片段序列进行扩增, 获得了大约 500 bp 的扩增产物。PCR 产物经纯化后进行序列测定, 经同源排序, 得到 415 bp 可供分析的核苷酸片段。26 个个体中共检测到 18 个变异位点, 包括 1 个碱基插入/缺失, 11 个转换位点及 6 个颠换位点。共有 6 种单倍型, 这 6 种单倍型又分为 2 大类单倍型。运用 MEGA 软件计算出不同个体间的遗传距离, 并构建了 UPGMA 和 NJ 系统树。26 个个体聚成明显的 2 支, 一支有 19 个个体, 占 73.08%; 另一支有 7 个个体, 占 26.92%; 2 支间序列差异为 3.54%。据此得出结论: 钦州湾养殖牡蛎应存在两大种群或是 2 个亚种, 其差异是否到了种间的分界限, 还需进一步研究证实。

关键词:牡蛎; 线粒体 DNA; 16S rRNA 基因; 种群

中图分类号: Q959.215 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2005)01-0001-04

牡蛎(*Crassostrea* sp.)俗称生蚝、大蚝, 是中国南方沿海养殖最主要的经济贝类, 也是中国传统的出口海产品, 输出地区主要为日本、香港和澳门。国内有关牡蛎的研究主要集中在养殖研究、三倍体研究以及作为石油污染的对象等方面。有关其分子水平研究, 仅见刘必谦等^[1]用 RAPD 方法研究几种牡蛎的遗传距离, 张其中等^[2]克隆了近江牡蛎(*Crassostrea ariakensis* Fujita)的 Hsc70 蛋白基因, Que 等^[3]利用 ITS 标记鉴定了长牡蛎(*Crassostrea gigas* Thunberg)与近江牡蛎的杂交种。由于牡蛎的贝壳可塑性强, 常随着其生活环境的不同而发生改变, 给传统的分类学带来极大的困难, 近几年国外相关研究都集中在利用分子标记进行牡蛎的分子系统研究^[4-6]及种的鉴定^[7]等方面。

本研究采用 PCR 产物直接测序技术对采自广西钦州湾养殖牡蛎的 mtDNA 16S rRNA 基因片段序列进行了分析, 以期对牡蛎的种质鉴定、物种保护及资源评价提供基础的遗传学资料。

1 材料与方法

1.1 材料

26 个牡蛎样品随机采自广西钦州湾采苗场。

这 26 个个体在传统分类上一直被认为是近江牡蛎。采样地点见图 1。运回实验室后即取其闭壳肌, 液氮研磨, 保存在超低温冰箱 -72℃ 备用。

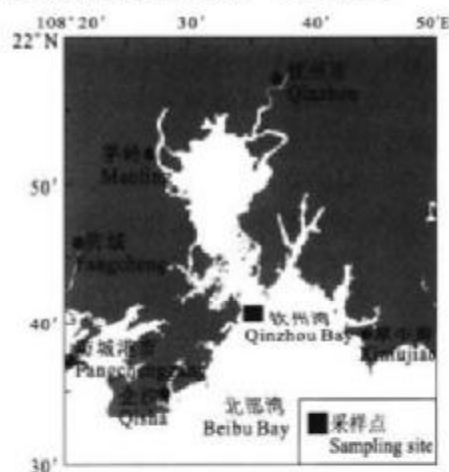


图 1 采样设置图

Fig.1 Sampling site sketch

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 称 1 g 经液氮研磨好的闭壳肌粉末加入 10 mL 细胞裂解液 (50 mmol/L Tris·HCl, pH 9.0, 100 mmol/L EDTA, 200 mmol/L

收稿日期: 2004-08-03; 修订日期: 2004-09-22.

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目 (2001AA627030); 广东省科学技术计划项目 (2002E2150102).

作者简介: 苏天凤 (1969-), 女, 副研究员, 现从事渔业生物多样性保护与种质资源保存研究.

通讯作者: 江世贵, E-mail: jiangsg@21cn.com

NaCl)。混匀后加入终质量浓度为2%的SDS和5 mg蛋白酶K,55℃保温过夜,等体积饱和酚抽提1次,等体积混合液(酚、氯仿、异戊醇体积比为25:24:1)抽提2次或多次直至中间无蛋白质层,氯仿抽提1次后加入1/10体积3 mol/L NaCl,2倍体积无水乙醇沉淀DNA,70%的乙醇洗涤多次,100%乙醇洗涤1次,55℃烘箱干燥后加入50 μ L超纯水溶解,-20℃保存,使用时稀释10倍。

1.2.2 PCR扩增 所用16S rRNA基因引物序列为:16SAR:5'-CGCCTGTTTAHYAAAAACAT3';16SBR:5'-CCGGTCTGAACTCAGMTCAG₃^[8]。扩增反应总体积50 μ L。其中包括10×扩增缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 9.0, 50 mmol/L KCl, 0.001%的明胶)5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 4 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 4 μ L, 引物10 pmol/L各1 μ L, 1 μ L模板,1U Taq DNA聚合酶,补足超纯水至终体积50 μ L。在扩增仪(德国bio-metra公司出品)上反应。扩增参数为:94℃预变性2 min,接着94℃ 45 s,50℃退火1 min,72℃延伸1 min,共运行35个循环;最后72℃延伸5 min。每次反应均设不含模板DNA的空白对照。

1.2.3 电泳观察 扩增产物用1.5% Agarose胶电泳分离(1×TBE,3V/cm恒压,约4 h),EB染色,凝胶成像系统观察和拍照。

1.3 测序和数据分析

PCR产物纯化后送上海联合基因科技有限公

司进行直接测序。使用Clustal X排定DNA序列并经人工核对、校正。MEGA软件计算个体间的遗传距离,并构建UPGMA和NJ系统树。

2 结果

2.1 16S rRNA基因序列特征及群体内的序列变异

PCR产物直接测序得到415 bp长度的碱基序列如图2所示(GenBank登录号为:AY510450)。

26个个体的mtDNA 16S rRNA基因片段序列,在除去引物及部分端部序列后,其碱基序列长度为415 bp。排序后检测到18个多态性核苷酸,共6种单倍型;其中,插入/缺失突变位点1个;发生转换突变的核苷酸位点数为11个,发生颠换突变的核苷酸位点数为6个。T、C、A、G 4种碱基在23个个体中的平均含量分别为30.2%(29.2%~30.4%),16.4%(16.2%~16.9%),29.5%(28.7%~29.5%),24.4%(24.2%~24.6%),AT含量(59.2%)高于GC含量(40.8%),这一结果与其他研究者在头足类、甲壳类、双壳贝类等的16S rRNA基因、12S rRNA基因和COI基因中观察到的结果相符^[8-13]。

16S rRNA基因序列变异位点在欧洲湾养殖牡蛎群体中的分布如表1。6种单倍型中,单倍型A拥有的个体最多,有15个,占总数的57.7%;单倍型B个体数其次,有6个,占总数的23.1%;单倍型C拥有2个,单倍型D、E、F均只在一个个体上出现。

```
001 TGTAAACGGC CGCCCTAGCG TGAGGGTGCT AAGGTAGCGA AATTCCTTGC CTTTGTATTG TAGGCCTGCA
071 TGAATGGTTT AACGAGGGTT TAACTGTCTC TAAATTTTIT ATTGAAATTG TACTGAAGGT GAAGATACTT
141 TCATTTAAAA GTTAGACAAA AAGACCCCGT GCAAC-TTTG AAAATTAAGT TTATTCAGAA GTAAAAGATT
211 TTTAGGTGGG CGGCCTAGAA AGTAAGTCTA ACCTTTCTGA ATAATTAGTT CTTTCGGAT TCGACCGAT
281 TATATTCGAT CATAGGAGAA GTTACGCCGG GGATAACAGG CTAATCCTTT AGTAGAGCTC GTATTGGCTA
351 AAGGGATTGG CACCTCGATG TTGAATCAGG GATGATAGCT TCAAGGCGTA GAGGCTTTGA GAGTA
```

图2 近江牡蛎的16S rRNA基因片段核苷酸序列(单倍型A)

Fig.2 Nucleotide sequence of 16S rRNA gene fragment of *Crassostrea ariakensis* (haplotype A)

表1 16S rRNA基因片段序列多态性核苷酸位点在26个近江牡蛎群体中的分布

Tab.1 Distribution of 16S rRNA gene fragment variable sites in 26 individuals of *Crassostrea ariakensis*

单倍型 Haplotype	变异位点 Variable sites																
	102	103	108	109	110	146	153	176	203	223	236	252	254	258	270	272	358
A	A	A	T	T	T	T	T	-	A	G	G	T	A	G	T	C	T
B	T	G	A	A	A	A	C	-	G	-	A	C	T	A	C	T	-
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A
E	T	G	A	A	A	A	C	-	G	A	C	T	A	C	T	C	-
F	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2.2 26 个个体间的遗传关系

应用 MEGA2 软件算出了 26 个个体间的遗传距离,其中遗传距离最大为 0.003 6,最小为 0。以 26 个个体的 16S rRNA 基因序列构建的 UPGMA 系统树和 NJ 系统树分别如图 3 和图 4 所示。从图 3 和

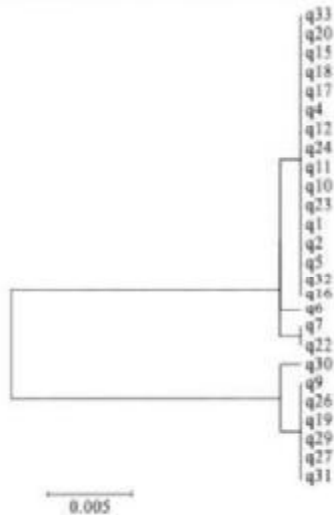


图 3 由 16S rRNA 基因部分序列得到的 UPGMA 系统树

Fig. 3 UPGMA phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences

图 4 中可以看出,2 种方法得到的系统树的拓扑结构基本一致,26 个个体大致形成了两大支,A、C、D、F 单倍型聚在一支,共有 19 个个体,占 73.08%;B、E 单倍型聚在一支,共有 7 个个体,占 26.92%。运用 MEGA2 计算出两支间的序列差异为 3.54%。

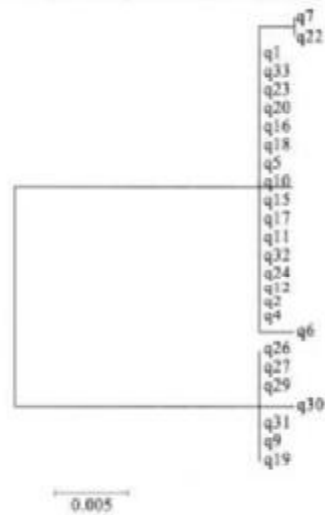


图 4 由 16S rRNA 基因部分序列得到的 NJ 系统树

Fig. 4 NJ phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences

3 讨论

目前我国牡蛎分类和命名呈现严重分歧和混乱状态^[14],这主要是由于牡蛎的贝壳可塑性强,贝壳外部差异很大,很难通过形态做出准确的结论,因而给分类工作带来了极大的困难。目前分类学家寄希望利用分子标记手段来解决形态相似种的鉴定问题。传统上命名的近江牡蛎(本实验所用),是华南沿海一带养殖主产种类,仅其外形就有长形、三角形、圆形和卵圆形几种^[15]。近江牡蛎的拉丁名也经历了一系列变化,最初为 *C. rivularis* (Gould),后又变更为 *O. rivularis* (Gould),接着又被认为是 *C. ariakensis* 的同种异名而被更名为 *C. ariakensis*^[16]。李孝绪等^[17]认为应将近江牡蛎分为红肉牡蛎和白肉牡蛎 2 个种,但未能解决其种名问题。本实验材料均为白肉牡蛎。近年来,香港大学的 Lam 等^[18-20]将珠江三角洲养殖的牡蛎定为一个新种 *C. hongkongensis*,本实验所取牡蛎材料有 73.08% 的 16S rRNA 基因序列与其极相似(99%~100%),有 26.92% 的 16S rRNA 基因序列与传统上认为的 *C. ariakensis* 极相似(99%~100%),明

显地分成两大支。因此有理由相信钦洲湾养殖牡蛎肯定存在单倍型 A 和单倍型 B 两大类群体。但两大群体的差异是否达到了种的分界线,还需要结合更多形态学资料进行进一步的比较分析及多个分子标记的进一步证明。

参考文献:

- [1] 刘必谦,戴继勋.巨蜥属牡蛎遗传多样性研究[J].水产学报,1998,22(3):193-198.
- [2] 张其中,吴信忠,高劲松,等.近江牡蛎 Hsc70 蛋白基因 cDNA 片段的克隆及 Southern 杂交和 RT-PCR 分析[J].动物学报,2003,49(5):708-712.
- [3] Que H Y, Allen S K Jr. Hybridization of tetraploid and diploid *Crassostrea gigas* (Thunberg) with diploid *C. ariakensis* (Fujita)[J]. J Shellfish Res, 2002, 21(1): 137-143.
- [4] Foighil D O, Gaffney P M, Wilbur A E, et al. Mitochondrial cytochrome oxidase I gene sequences support an Asian origin for the Portuguese oyster *Crassostrea angulata* [J]. Mar Bi, 1998, 131(3): 497-503.
- [5] Foighil D O, Gaffney P M, Hilbish T J. Differences in mitochondrial 16S ribosomal gene sequences allow discrimination among American (*Crassostrea virginica* Gmelin) and Asian (*C. gigas* Thunberg, *C. ariakensis* Wakiya) oyster species[J]. J Exp Mar

- Biol. Ecol., 1995, 192: 211–220.
- [6] Littlewood D T. Molecular phylogenetics of cupped oysters based on partial 28S rRNA gene sequences[J]. Molec. Phy. Evol., 1994, 3(3): 221–229.
 - [7] Hedgecock D, Li G, Banks M A, et al. Occurrence of the Kuroshio oyster *Crassostrea sikamae* in the Ariake Sea, Japan[J]. Mar. Bio., 1999, 133(1): 1 432–1 793.
 - [8] Anderson F E. Phylogeny and historical biogeography of the loliginid squids (Mollusca: Cephalopoda) based on mitochondrial DNA sequence data[J]. Molec. Phy. Evol., 2000, 15(2): 191–214.
 - [9] Zheng X D, Wang R C, Wang X F, et al. Genetic variation in population of the common Chinese cuttlefish *Sepiella maindroni* (Mollusca: Cephalopoda) using allozymes and mitochondrial DNA sequence analysis[J]. Shellfish Res., 2001, 20(3): 1 159–1 165.
 - [10] Howland D E, Hewitt G M. Phylogeny of the colepters based on mitochondrial cytochrome oxidase 1 sequence data[J]. Insect Mol. Bio., 1995, 4: 203–205.
 - [11] 孔晓瑜, 刘亚军, 喻子牛, 等. 褶孔扇贝和海湾扇贝线粒体 DNA16S rRNA 基因片段序列研究[A]. 贝类学论文集[C]. 北京: 海洋出版社, 2001. 9: 59–63.
 - [12] 高天翔, 张秀梅, 吉崎情朗, 等. 中华皱蜆蟹和日本皱蜆蟹线粒体 12S rRNA 基因序列研究[J]. 青岛海洋大学学报, 2000, 30(1): 43–47.
 - [13] 杨建敏, 郑小东, 王如才, 等. 3 种鲍 16S rRNA 基因片段序列的初步研究[J]. 青岛海洋大学学报, 2003, 33(1): 36–40.
 - [14] 陶华勇, 刘 晓, 王海艳, 等. 中国近海牡蛎系统分类研究的现状和对策[J]. 动物学杂志, 2003, 38(4): 110–113.
 - [15] 张 玺, 楼子康. 中国牡蛎的研究[J]. 动物学报, 1956, 8(1): 65–94.
 - [16] Torigoe K. Oysters in Japan[J]. Journal of Science-Hiroshima University Series B Division 1, 1981, 29: 291–481.
 - [17] 李孝雄, 齐钟彦. 中国牡蛎的比较解剖学及系统分类和演化的研究[J]. 海洋科学集刊, 1994, 35: 143–178.
 - [18] Lam K, Morton B. Mitochondrial DNA and morphological identification a new species of *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) cultured for centuries in the Pearl River Delta, Hong Kong, China[J]. Aquaculture, 2003, 228: 1–13.
 - [19] Boudry P, Haurébiac S, Lapeguc. Mitochondrial and nuclear DNA sequence variation of presumed *Crassostrea gifu* and *Crassostrea angulata* specimens: a new oyster species in Hong Kong[J]. Aquaculture, 2003, 228: 15–25.
 - [20] Lam K, Morton B, Boudry P, et al. Morphological and mitochondrial DNA characteristics of two cultured species of *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) in Hong Kong: towards a significant taxonomic name change[A]. Proceedings of Hong Kong Workshop Reunion Conference: Perspectives on Marine Environmental Change in Hong Kong[C]. Hong Kong: Hong Kong Univ Press, 2003. 331–346.

Genetic diversity of *Crassostrea* from Qinzhou Bay in Guangxi using mtDNA 16S rRNA gene fragment sequence analysis

SU Tian-feng, JIANG Shi-gui, ZHU Cai-yan, ZHOU Fa-lin, CHEN Pi-mao

(South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

Abstract: PCR technique was used to amplify the mtDNA 16S rRNA gene fragment in 26 individuals of southern oyster (called *Crassostrea Ariakensis* Fujita in tradition) from Qinzhou Bay in Guangxi Province, and 500 bp PCR products were gained approximately. The PCR products were purified and sequenced. As a result, 415 bp nucleotide sequences of partial 16S rRNA gene that could be analysed were obtained (the primer and some of the marginal sequences were excluded). By using Clustal X to align and compare the sequences of the 26 individuals with each other, 18 variation sites were observed, of which there were one insertion site, 11 transition sites and 6 transversion sites. The pairwise genetic distances were computed by MEGA and the UPGMA and NJ phylogenetic trees were obtained through the cluster analysis over the pairwise genetic distance. The phylogenetic trees showed that the 26 individuals were performed clearly to 2 clades, where one clade has 19 individuals occupying 73.08%, and the other has 7 individuals occupying 26.92%, and the sequences differentiation of the two clades were 3.54%. It was induced that there were really two subspecies in the Qinzhou Bay. Further study should be conducted to get more evidences to verify that they belong to two species or two subspecies.

Key words: *Crassostrea* sp.; mitochondrial DNA; 16S rRNA gene; species