

中国沿岸几种鲍线粒体 16S rRNA 基因片段序列比较及鲍属系统发育

王鹭骁^{1,2}, 柯才煊¹, 王志勇², 刘波¹, 蔡明爽¹, 王艺磊²

(1. 厦门大学海洋系, 海洋环境科学国家重点实验室, 福建 厦门 361005; 2. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

摘要:用 PCR 技术克隆耳鲍(*Haliotis asinina*)、羊鲍(*H. ovina*)和多变鲍(*H. varia*)的线粒体 16S rRNA 基因的片段, 并将 PCR 产物直接进行测序, 得到长度 530 bp 左右的片段。将这些序列与杂色鲍(*H. diversicolor diversicolor*)、九孔鲍(*H. diversicolor supertexte*)、大鲍(*H. gigantea*)、盘鲍(*H. discus discus*)、皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)等 5 种鲍的相应片段进行序列比较。结果表明, 不同种鲍间 16S rRNA 基因的序列同源性较高, 同源性范围为 87.36%~90.77%, 这说明鲍的这段基因片段在遗传过程中比较保守。序列的 A+T 含量约为 56.68%, G+C 含量约为 43.32%。8 种鲍序列的主要核苷酸变异位点集中在 1~25 bp、240~290 bp 和 320~370 bp 3 个区域。在序列的变异碱基中, 碱基的转换大大多于碱基的颠换, 转换与颠换之比达到 2.33:1, 遗传距离的范围为 0.002~0.128。用 UPGMA 法和 NJ 法绘制出 8 种鲍的系统发育树。结论认为, 大鲍、皱纹盘鲍和盘鲍之间的遗传差异水平为亚种间的差异水平, 台湾产的九孔鲍与大陆沿岸产的杂色鲍之间的差异仅仅是种群间的差异。[中国水产科学, 2006, 13(2): 167-173]

关键词:鲍; 16S rRNA 基因; 序列分析; 系统发育

中图分类号: S959.212 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2006)02-0167-07

线粒体 DNA (Mitochondrial DNA, mtDNA) 是动物体内的核外遗传信息载体, 系共价闭合的环状分子, 分子量小, 基因组中一般没有内含子、转座因子和间隔序列, 结构简单, 为严格的母系遗传, 几乎不发生倒位、易位等畸变与重组。因此, mtDNA 广泛地被应用于各种动物类群的系统进化研究。一般认为, 16S rRNA 基因是动物体内比较保守的基因, 其进化速率缓慢, 以替换为主, 又是生物必备的基因, 适合较高分类单元的系统发育进化的研究。目前, 已有学者应用 16S rRNA 基因对无脊椎动物和其他动物类群进行系统发育的研究工作。如黄艳艳等^[1]对中国蚌科 16S rRNA 的序列变异和系统发育进行了探讨; 印红等^[2]对蛸总科部分种类的系统发育进行了研究。但尚未见有关中国鲍属 16S rRNA 的研究报道。

鲍属原始腹足目 (Archaeogastropoda), 鲍科 (Haliotidae), 鲍属 (*Haliotis*)。鲍是中国重要的名贵海产动物。目前, 中国发现的鲍有 7 种^[3-4], 其中皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*)、杂色鲍 (*H. diversicolor*) 等是中国重要的养殖种类。随着

捕捞业和养殖业的快速发展以及海区污染的日益严重, 中国野生鲍资源遭到了严重破坏, 养殖种类的种质质量也在退化。为了解决这些问题, 不少养殖场从国外引进同种或不同种的亲鲍进行杂交, 养殖其杂交种。但这样做也有可能使鲍种质遭到遗传污染等不良后果。为满足鲍遗传资源管理和育种研究的需要, 急需运用分子生物学技术对中国鲍的种质资源及其鉴别技术开展深入研究。早期对鲍的系统分类研究主要是对其外部形态特征进行分析, 如鲍壳、齿舌、上足等。但随着对鲍形态研究的进一步深入, 发现鲍的某些形态特征不是稳定的, 同一种鲍在不同的环境条件下其外部形态也会有所不同^[5-6]。因此, 一些学者引入了分子生物学技术对鲍的核酸及蛋白质进行分析研究, 通过鲍的遗传特征来分析其系统发育^[7-8]。本研究对中国南海沿岸产的耳鲍 (*H. asinina*)、羊鲍 (*H. ovina*) 和多变鲍 (*H. varia*) 等常见种的 16S rRNA 基因片段进行 PCR 扩增和测序, 并探讨中国大陆沿岸产的主要鲍种的系统发育, 旨在为鲍的遗传多样性和遗传育种研究提供背景资料。

收稿日期: 2005-06-02; 修订日期: 2005-07-20。

基金项目: 国家“863”高技术研究发展计划项目资助 (2001AA621080)。

作者简介: 王鹭骁 (1979-), 男, 硕士研究生, 研究方向为海洋底栖无脊椎动物生态学。Tel: 0592-6031201; E-mail: wlxh@163.com

通讯作者: 柯才煊。Tel: 0592-2187420; E-mail: cbke@sina.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

耳鲍、羊鲍和多变鲍均取自海南岛陵水附近海域野生种,每个种取4个个体,鉴定后将活体放入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存待用。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 的抽提 取25 mg肌肉组织,在液氮中磨成粉末状,用华舜公司的小量组织DNA抽提试剂盒提取基因组DNA,TE溶解后 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.2 PCR 扩增 以基因组DNA为模板,用贝类16S rRNA基因片段的通用引物进行PCR扩增,引物序列为:16Sar:5'-CGCTGTTTATCAAAAACAT-3';16Sbr:5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'。PCR扩增在PTC-200型PCR仪(MJ Research, USA)上进行,25 μL 反应体系内含:10 \times PCR buffer plus Mg^{2+} 2.5 μL , dNTP 0.2 mmol/L, 每种引物各0.2 $\mu\text{mol/L}$, 模板DNA 50~100 ng, Taq 酶1单位(博亚公司)。PCR反应程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性3 min, 然后94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 45 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 80 s循环35次,最后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸5 min。PCR产物用1.2%的琼脂糖凝胶电泳,EB染色,凝胶成像系统观察,拍照。

1.2.3 PCR 产物纯化 25 μL 体系的PCR产物中加入15 μL 的20% PEG6000+2.5 mol/L NaCl,冰浴15 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 下15 000 r/min离心15 min,用75%乙醇清洗DNA一次,倒去乙醇后晾干10 min,TE

溶解DNA。

1.2.4 测序和数据分析 使用MegaBACE公司的DYEamicTM ET dye terminator kit和MegaBACE Long Read Matrix在MegaBACE 500型测序仪上进行测序。为了保证测序的准确性,每个样品都进行双向测序,测序后在Sequence Analyzer(MegaBACE公司)软件中进行校对、排序。然后用DNAMAN和MEGA 2.1软件进行所测序列的编辑、排序、系统发育和遗传学分析。采用Kimura双参数模型计算遗传距离,以腹足纲的一种小螺 *Tegula funebris* 作为外类群,分别用NJ法和UPGMA法构建系统树,用Max-mini Branch & bound法搜索最大简约树,对所得的系统树进行自展法检验(1 000次重复)。另从GenBank中查找皱纹盘鲍、盘鲍、大鲍、杂色鲍和九孔鲍的16S rRNA基因片段序列,作为比较资料。

2 结果

对耳鲍、羊鲍和多变鲍3种鲍线粒体16S rRNA进行PCR扩增和测序,3种鲍的线粒体16S rRNA序列长度存在差异,耳鲍、羊鲍、多变鲍序列长度分别为524 bp,530 bp,529 bp。在GenBank中进行同源序列查找,查找到皱纹盘鲍(AI146393)、盘鲍(AI146392)、大鲍(AI146395)、杂色鲍(AI146397)和九孔鲍(AI146396)的16S rRNA基因片段序列。取同源片段用DNAMAN软件进行分析。8种鲍AT含量的平均值相近,在54.82%~57.64%,明显高于GC含量(表1)。

表1 8种鲍的16S rRNA基因的碱基组成
Tab.1 Base composition of 16S rRNA gene fragments of eight species of abalone

种类 Species	A	T	G	C	A+T
耳鲍 <i>H. asinina</i>	25.19	31.87	26.72	16.22	57.06
羊鲍 <i>H. ovina</i>	24.15	30.94	28.49	16.42	55.09
多变鲍 <i>H. varia</i>	24.39	30.43	28.36	16.45	54.82
皱纹盘鲍 <i>H. discus hannai</i>	26.72	30.92	26.34	16.02	57.64
盘鲍 <i>H. discus discus</i>	26.72	30.73	26.34	16.22	57.45
大鲍 <i>H. gigantea</i>	26.53	30.73	26.34	16.41	57.26
杂色鲍 <i>H. diversicolor diversicolor</i>	25.52	31.57	26.84	16.07	57.09
九孔鲍 <i>H. diversicolor supertexte</i>	25.57	31.44	26.89	16.10	57.01

8种鲍的16S rRNA基因序列比较见图1。图1显示,8种鲍序列的差异主要集中在3个区域,其中1~25 bp区域约有16个碱基有差异;240~290 bp区域约有36个碱基差异;320~370 bp区域约有35

个碱基差异。而其他区域的碱基的差异很小,只有约15个碱基有差异。在这些碱基差异中,颠换(A \rightarrow C, A \rightarrow T, G \rightarrow C或G \rightarrow T)约占30%;转换(A \rightarrow G或C \rightarrow T)约占70%,转换与颠换之比达到2.33:1。

对 8 种鲍的 16S rRNA 基因序列进行同源性的比较分析(表 2 和图 1)。皱纹盘鲍与盘鲍、杂色鲍与九孔鲍 16S rRNA 基因序列高度一致,其相似度都达到 99.82% (仅 1 bp 碱基差异),甚至高于同一个种不同个体之间序列的相似度(98.31% -

99.43%);大鲍与皱纹盘鲍及盘鲍 16S rRNA 基因的同源性也极高,分别达到 99.1% (差异 4 bp)和 98.92% (差异 6 bp),也与种内差异相当。其余种间序列同源性为 87.15% - 91.30%, 差异度 8.70% - 12.85% (表 2)。

表 2 8 种鲍 16S rRNA 基因片段序列的同源性比较

Tab.2 Sequences of 16S rRNA gene fragments of eight species of abalone

	皱纹盘鲍 <i>H. discus hannai</i>	盘鲍 <i>H. discus discus</i>	大鲍 <i>H. gigantea</i>	杂色鲍 <i>H. diversicolor diversicolor</i>	九孔鲍 <i>H. diversicolor supertexte</i>	耳鲍 <i>H. asinina</i>	羊鲍 <i>H. ovina</i>	多变鲍 <i>H. varia</i>	%
皱纹盘鲍 <i>H. discus hannai</i>	—								
盘鲍 <i>H. discus discus</i>	99.82	—							
大鲍 <i>H. gigantea</i>	99.10	98.92	—						
杂色鲍 <i>H. diversicolor diversicolor</i>	90.94	90.76	91.32	—					
九孔鲍 <i>H. diversicolor supertexte</i>	90.93	90.74	91.30	99.82	—				
耳鲍 <i>H. asinina</i>	89.54	89.73	89.16	87.36	87.15	—			
羊鲍 <i>H. ovina</i>	90.02	89.83	89.45	89.81	89.62	90.77	—		
多变鲍 <i>H. varia</i>	89.25	89.43	89.43	90.00	90.17	87.95	89.43	—	

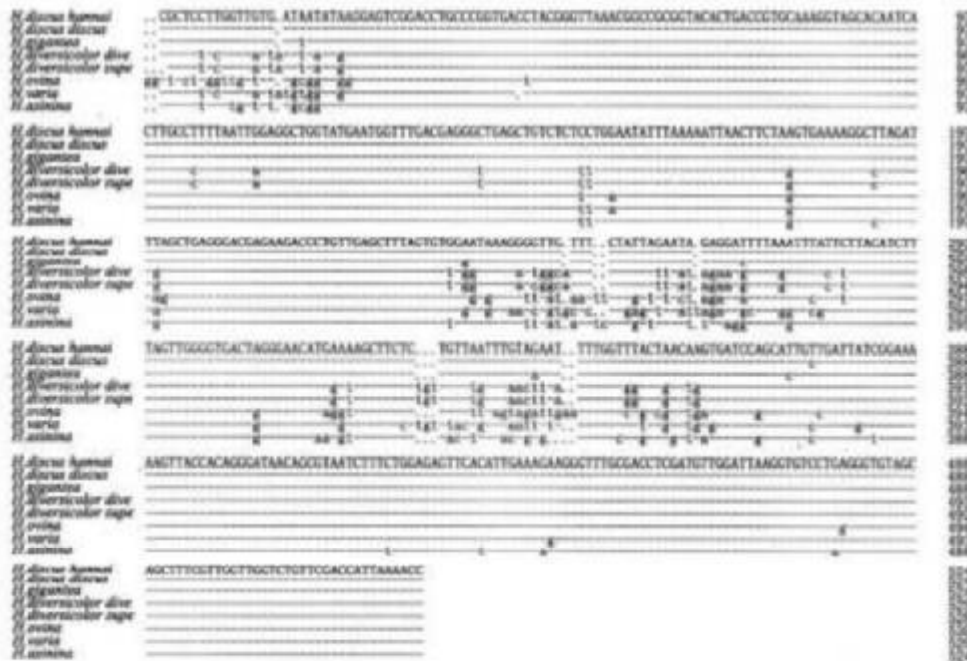


图 1 8 种鲍 16S rRNA 基因片段序列排序

"-"代表碱基相同,"."代表碱基缺失

Fig.1 Alignment for partial sequences of 16S rRNA gene of eight species of abalones

"-" identical; "." missing

利用 Kimura 双参数法计算了 8 种鲍种间的遗传距离,8 种鲍相互之间的遗传距离大部分分布在 0.094~0.128。只有皱纹盘鲍、盘鲍和大鲍之间以及杂色鲍与九孔鲍之间的遗传距离显著低于其他鲍遗传距离分布的范围。皱纹盘鲍、盘鲍和大鲍之间的遗传距离为 0.01~0.02;杂色鲍与九孔鲍之间的遗传距离最小,仅为 0.002(表 3)。

以遗传距离数据用 NJ 和 UPGMA 法构建分子

系统树(图 2),得出的分子树基本一致,只有少许的差异。首先是皱纹盘鲍和盘鲍以及杂色鲍和九孔鲍先分别聚在一个分支上,而后大鲍再和皱纹盘鲍与盘鲍的分支聚在一起,耳鲍、羊鲍、多变鲍等再与以上分支聚在一起,最后是外类群 *Tegula funebris*。这样可以很直观地看出,杂色鲍与九孔鲍亲缘关系最近;皱纹盘鲍、盘鲍和大鲍的亲缘关系也很接近;耳鲍、羊鲍和多变鲍等的亲缘关系都比较远。

表 3 8 种鲍的遗传距离

Tab.3 Distance matrix of the eight abalones based on partial 16S rRNA sequences

皱纹盘鲍 <i>H. discus hannai</i>	盘鲍 <i>H. discus discus</i>	大鲍 <i>H. gigantea</i>	杂色鲍 <i>H. diversicolor diversicolor</i>	九孔鲍 <i>H. diversicolor supertexte</i>	耳鲍 <i>H. asinina</i>	羊鲍 <i>H. ovina</i>	多变鲍 <i>H. varia</i>
—							
0.020	—						
0.010	0.011	—					
0.095	0.097	0.094	—				
0.096	0.098	0.094	0.002	—			
0.100	0.098	0.105	0.119	0.121	—		
0.126	0.128	0.128	0.120	0.122	0.109	—	
0.113	0.111	0.111	0.097	0.095	0.125	0.128	—

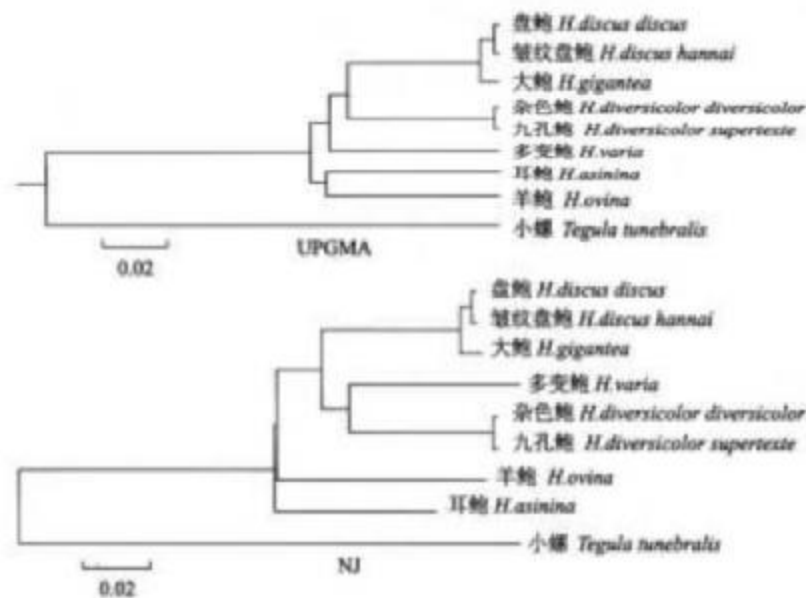


图 2 以序列数据用 UPGMA 法和 NJ 法计算出的 8 种鲍的分子系统树

Fig.2 UPGMA tree and NJ tree of eight species of abalone

3 讨论

3.1 8种鲍线粒体 16S rRNA 基因片段序列差异的比较

本研究通过对耳鲍、羊鲍和多变鲍的线粒体 DNA 中的 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增和直接测序,得到了耳鲍、羊鲍、多变鲍 3 种鲍序列长度分别为 524 bp、530 bp、529 bp 的目标片段。再通过 GenBank 查找到皱纹盘鲍、盘鲍、大鲍、杂色鲍和九孔鲍的 16S rRNA 基因片段序列。对这 8 种鲍进行序列对比,发现 8 种鲍 16S rRNA 基因片段序列差异较小,8 种鲍该基因片段同源性高达 87.15%~99.82%,表明鲍 16S rRNA 基因在进化过程中是比较保守的。此外,8 种鲍该基因片段的差异主要集中在 3 个区域,其中在 1~25 bp 区域约有 16 个碱基有差异;在 240~290 bp 区域约有 36 个碱基差异;在 320~370 bp 区域约有 35 个碱基差异。而在其他区域,碱基的差异很小。鲍属线粒体 16S rRNA 基因序列的这种高度同源且差异片段十分集中的特征对今后进行种质鉴别十分有利,可以利用这些差异性来设计 PCR 引物,将之发展成 STS (Sequence Target Site) 标记。

3.2 中国沿海几种鲍的系统发育

从图 2 的系统发育树中可以看出,皱纹盘鲍、盘鲍和大鲍位于同一个分支,它们的遗传关系比较接近。小林正裕^[9]、原素之^[6]等通过对皱纹盘鲍和盘鲍的观察,认为皱纹盘鲍和盘鲍只是同一个种的不同地理种群。但王志勇等^[10]对皱纹盘鲍和盘鲍的 DNA 进行了 AFLP 分析,认为二者为亚种关系。从表 3 和图 2 中可以看出,皱纹盘鲍和盘鲍间的遗传距离为 0.02,远远小于种间的遗传距离。皱纹盘鲍与盘鲍都分布于中国北方海域以及日本、朝鲜沿岸海域,分布区域有重叠的现象。小林正裕等^[9]报道在日本地理距离远的皱纹盘鲍与盘鲍形态差距显著,而地理距离近的则差异很小。综合以上的几种看法,可以认为皱纹盘鲍和盘鲍的亲缘关系应属于亚种关系,但它们之间可能存在着一定的基因流。此外,大鲍与皱纹盘鲍和盘鲍的遗传距离分别为 0.01 和 0.011,也大大小于其他鲍种间的遗传距离。大鲍的分布区域位于太平洋西北部,即日本和朝鲜沿岸海域,与皱纹盘鲍和盘鲍的分布区域也有重叠。因此认为,大鲍与皱纹盘鲍和盘鲍之间可能也存在着基因流,而且三者之间较小的遗传距离预示了未

来的进化趋势。

九孔鲍和杂色鲍之间的亲缘关系一直以来也是学者们争论的焦点之一,有学者认为九孔鲍是一个亚种^[11],而吕端华^[3]认为将杂色鲍分为两个亚种是比较困难的,但中国大陆沿岸产的杂色鲍有 2 个亚型,一是贝壳较扁、颜色多样的 *supertexta* 型;二是贝壳凸、颜色单一的 *diversicolor* 型;美国的 Geiger^[5]认为九孔鲍和杂色鲍完全是同物异名。本研究中,杂色鲍与九孔鲍位于系统发育树的同一个分支内,二者间的遗传距离很小,仅为 0.002,再结合笔者同工酶^[12]和 AFLP 的研究结果^[13],可以认为台湾省产的九孔鲍与内地沿岸产的杂色鲍之间的差异仅仅是种群间的差异。此外,分布于中国南海的耳鲍、羊鲍和多变鲍各单独处于一个分支,这 3 种鲍之间的遗传距离与它们同其他几种鲍的遗传距离相差不多,但多变鲍与其他几个鲍种的距离最大。

3.3 线粒体 DNA 在鲍属系统发育研究中的作用

mtDNA 是分子群体遗传学和分子系统学中十分重要的分子标记。本研究通过对耳鲍、羊鲍和多变鲍 16S rRNA 基因序列的测定,再加上皱纹盘鲍、盘鲍、大鲍、九孔鲍和杂色鲍共 8 种鲍的序列进行分析,认为该段 16S rRNA 基因片段能够较好地分辨出鲍种间水平和亚种水平的遗传差异。但无法区分亚种以下分类单元的遗传差异。这与 16S rRNA 基因在其他动物如鲤鱼 (*Cyprinus carpio* L. var.)^[14]、蚊虫^[15]等的研究结果一致。那么 mtDNA 是否能用于鲍种内亚种以下群体的分析呢?笔者认为是有可能的。线粒体 DNA 的不同区域有不同的变异能力,在 mtDNA 的 4 类基因中,rRNA 基因的进化速率最慢,tRNA 基因的进化速率比 rRNA 基因快,但比各种蛋白质基因的进化速率慢,而转录控制区 (D-loop) 具有最快的进化速率^[16]。Stabile 等^[17]通过 mtDNA 的 RFLP 分析和 D-loop 的序列分析成功地发现了分布于路易斯安那至佛罗里达的 8 个流域的湾鲷至少可以区分为 4 个地区或河流特异性地理型。此外,mtDNA 中的 COI 基因和 Cytb 基因也有较大的变异区域可以提供 DNA 变异的信息。为了搞清楚鲍的种群间遗传关系,可对其线粒体 DNA 的其他基因片段,如 COI 基因和 Cytb 基因等蛋白质基因进行测序分析。同时,还可以结合 RFLP、AFLP 等核基因标记技术来分析鲍属的遗传多样性和系统发育,以获得更加完整的遗传背景资料。

3.4 系统发育与杂交结果的对比

从本研究得到的8种鲍的系统发育树可以看出,杂色鲍与九孔鲍处于一个分枝中,遗传距离很小;盘鲍与皱纹盘鲍处于一个分枝中,大鲍与盘鲍和皱纹盘鲍的遗传距离也比较近。杂色鲍和九孔鲍由于属于同一个种,两者之间杂交的受精率很高,其受精率和他们自交的受精率相差无几。燕敬平等^[18]进行了皱纹盘鲍与盘鲍的杂交试验,其受精率盘鲍(♀)×皱纹盘鲍(♂)为70%;皱纹盘鲍(♀)×盘鲍(♂)为91%;皱纹盘鲍自交为95%;盘鲍自交为73%。两者的杂交和自交的受精率相差也不大。孙振兴等^[19]对大鲍和皱纹盘鲍进行了杂交实验,可惜只记录了杂交后90h幼体的成活率,没有记录受精率,因此无法进行对比。但通过90h幼体成活率也能看出一些基本趋势,其杂交组的成活率为78.3%,自交组的成活率为80.9%,两者基本相同。柯才焕等^[20]用杂色鲍与皱纹盘鲍和盘鲍进行了杂交实验。皱纹盘鲍(♂)×杂色鲍(♀)组合的受精率为3.5%~15.0%;皱纹盘鲍(♀)×杂色鲍(♂)组合的6个批次的受精率明显比皱纹盘鲍(♂)×杂色鲍(♀)组合低,仅为0~2.8%。而盘鲍(♂)×杂色鲍(♀)组合10个批次的受精率为1.0%~53.6%;盘鲍(♀)×杂色鲍(♂)组合的4个批次的受精率明显比皱纹盘鲍(♂)×杂色鲍(♀)组合低,仅为1.5%~4.0%。从上述结果可以看出,遗传距离越近的鲍杂交受精率越高,而遗传距离越远则杂交的受精率越低。但是在孙振兴等和燕敬平等的研究中,皱纹盘鲍、盘鲍和大鲍之间的杂交结果与其自交的结果差不多,这反映出3种鲍间具有或多或少的遗传联系和基因的交流,具体情况还有待更多的鲍属种间杂交结果的证实。

参考文献:

- [1] 黄艳艳,欧阳珊,吴小平,等. 中国蚌科线粒体16S rRNA序列变异及系统发育[J]. 水生生物学报, 2002, 27(3): 258-263.
- [2] 申红,张道川,毕智丽,等. 鲍总科部分种类16S rDNA的分子系统发育关系[J]. 遗传学报, 2003, 30(8): 766-772.
- [3] 吕端华. 中国近海鲍科的研究[J]. 海洋科学集刊, 1978, 14: 89-98.
- [4] 高绪生. 鲍鱼[M]. 沈阳: 辽宁科学出版社, 1995.
- [5] Geiger D L. Distribution and biogeography of the Halioidea (Gastropoda: Vetigastropoda) world-wide[J]. Biol J Linn Soc, 2000, 35: 57-120.
- [6] 原素之. 饲养温度条件皱纹盘鲍贝壳的形态变化[J]. 水产育种(日), 1992, 17: 49-53.
- [7] Brown L D. Biochemical genetics and species relationships within the genus *Halotis* (Gastropoda: Haliotidae) [J]. Mal Stud, 1993, 59: 429-444.
- [8] Lee Y H, Vacquier V D. Evolution and systematics in Halioidea (Mollusca, Gastropoda): inference from DNA sequences of sperm lysine[J]. Mar Biol, 1995, 124: 267-278.
- [9] 小林正祐,木岛明博,藤尾芳久. 日本沿岸皱纹盘鲍的地理分布[J]. 水产育种(日), 1992, 17: 39-48.
- [10] 王志勇,柯才焕,王艺磊,等. 从 AFLP 指纹和标记基因序列看我国养殖几种鲍的亲缘关系[J]. 高技术通讯, 2004(1): 93-98.
- [11] 曾文阳. 鲍鱼养殖学[M]. 高雄: 高雄前程出版社, 1991.
- [12] 王鹭晓,柯才焕,周时强,等. 不同地理种群杂色鲍的同工酶分析[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2005, 44(1): 98-101.
- [13] 王鹭晓. 中国沿海主要鲍(*Halotis*)种的亲缘关系及分子标记在鲍遗传变异研究中的应用[D]. 厦门: 厦门大学, 2004.
- [14] 董金菊,吴清江. 三个鲍品种线粒体基因片段序列保守性[J]. 水生生物学报, 2001, 25(1): 54-60.
- [15] 宋社吾,赵彤言,董言德,等. 几种软体动物线粒体 DNA 16S rRNA 序列及其相互关系的研究[J]. 动物分类学报, 2002, 27(4): 665-671.
- [16] 黄原. 分子系统学——原理、方法及应用[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [17] Stabile J, Waldman J R, Paronka F, et al. Stock structure and homing fidelity in Gulf of Mexico sturgeon base on restriction fragment length polymorphism and sequence analysis of mitochondrial DNA[J]. Genetics, 1995, 144: 767-775.
- [18] 燕敬平,孙慧玲,方建光,等. 日本盘鲍与皱纹盘鲍杂交育种技术研究[J]. 海洋水产研究, 1999, 20(1): 36-40.
- [19] 孙振兴,宋志乐,郑志芳,等. 日本大鲍与皱纹盘鲍杂交的研究[J]. 齐鲁渔业, 2001, 18(3): 25-27.
- [20] 柯才焕,田越,周时强,等. 杂色鲍与皱纹盘鲍、盘鲍杂交的初步研究[J]. 海洋科学, 2000, 24(11): 39-41.

Sequence analysis of mitochondrial 16S rRNA gene and molecular phylogeny of eight species of abalones in genus *Haliotis*

WANG Lu-xiao^{1,2}, KE Cai-huan¹, WANG Zhi-yong², LIU Bo¹, CAI Ming-yi¹, WANG Yi-lei²

(1. Department of Oceanography, State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: PCR method was adopted for amplification of mitochondrial 16S rRNA gene from three species of abalones (*Haliotis*), and all of amplicons were sequenced directly. Consequently, three mitochondrial 16S rRNA gene sequences with length of over 530 bp were obtained from the three species of abalones (*H. asinina*, *H. ovina*, *H. varia*). These three sequences were then multialigned and compared with the corresponding sequences of other five species of abalones (*H. discus hannai* AY146393; *H. discus discus* AY146392; *H. gigantea* AY146395; *H. diversicolor diversicolor* AY146397 and *H. diversicolor super-texte* AY146396) by GenBank. The results show high homologous among them (the homologous rate ranges from 87.36% to 90.77%). In the 530 bp sequence of mitochondrial 16S rRNA gene, A + T rate is about 56.68%, and G + C is about 43.32%. The variation of the sequences focuses on the three regions: 1–25 bp, 240–290 bp and 320–370 bp. The pattern of nucleotide substitutions favors transitions over transversions, yielding a transition/transversion ratio of 2.33/1. The genetic distances among the eight species of abalones were calculated and the phylogenetic tree was constructed using Mega 2.0. The results indicate that *H. discus hannai*, *H. discus discus* and *H. gigantea* are closely related and distinguished at subspecies level; *H. diversicolor diversicolor* and *H. diversicolor super-texte* are distinguished at population level. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(2): 167–173]

Key words: *Haliotis*; 16S rRNA gene; sequence analysis; phylogeny

Corresponding author: KE Cai-huan. E-mail: chke@xmu.edu.cn