

辽宁沿海巨蛎属牡蛎的分布

张娜^{1,2}, 刘晓², 许飞², 吴富村², 郭希明³, 李霞¹, 张国范²

(1.大连水产学院, 辽宁 大连 116023; 2.中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 3. Haskin Shellfish Research Laboratory, Rutgers University, NJ 08349, USA)

摘要: 作者采用多重种特异性 PCR (multiplex species-specific PCR) 技术, 研究了巨蛎属 (*Crassostrea*) 牡蛎在辽宁沿海的分布。从辽宁沿海的共 11 个采样点共采集 802 个牡蛎样本, 通过对 COI 基因的扩增, 随机检测了其中的 531 个牡蛎样本, 结果 517 个个体为长牡蛎 (*Crassostrea gigas*), 14 个为近江牡蛎 (*Crassostrea ariakensis*), 未发现其他巨蛎属牡蛎。结果表明, 辽宁沿海有长牡蛎和近江牡蛎等 2 种巨蛎属牡蛎分布, 其中长牡蛎为优势种, 分布于潮间带和潮下带, 近江牡蛎为稀有种, 分布于潮下带, 而且在黄海和渤海海域均有分布。

关键词: 巨蛎属 (*Crassostrea*); 牡蛎; 辽宁; COI 基因; 多重种特异性 PCR

中图分类号: Q15 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096 (2007) 09-0091-05

牡蛎是中国乃至世界产量最大的经济贝类, 其中中国已开展人工养殖的主要是巨蛎属 (*Crassostrea*) 牡蛎。2002 年中国牡蛎产量 362.5 万 t^[1], 占当年全国海洋贝类总产量的 37.6%。中国牡蛎资源丰富、种类繁多, 但牡蛎形态多变, 依靠单纯的形态分类已很难确认每个牡蛎的种属分类地位^[2]。因此目前对中国不同海区的牡蛎种类、分布等情况仍然了解不足。作者在辽宁所属不同海区采集牡蛎样本, 以线粒体基因组中的 COI 基因的长度多态性为鉴别依据, 分析确认每个牡蛎样本所属的物种, 以初步明确辽宁沿海巨蛎属牡蛎的种类及其分布。

1 材料与方法

1.1 活体样本采集

本研究的牡蛎样本采集地点见图 1。采集地分布于辽宁 11 个海区: 锦州的三角, 盘锦的荣兴, 营口的二道沟, 大连的大魏家、北海、黑石礁、金石滩、蛤蜊岛和海洋岛, 丹东的獐岛和小岛。样本采集时遵循随机原则, 在各采样点的潮间带和潮下带随机采集, 不分大小。

1.2 取样

将鲜活样本的贝壳表面清理干净后拍摄照片, 然

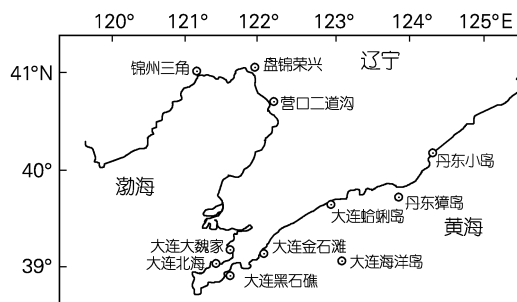


图 1 牡蛎样本采集地点

Fig. 1 Sampling sites of oysters

后用牡蛎刀撬开双壳, 尽量保持双壳完整, 取闭壳肌或其他组织 (如鳃等) 用 75% 的酒精固定备用。观察、记录壳内外的颜色、闭壳肌痕、放射肋、鳞片等特征。

收稿日期: 2007-06-19; 修回日期: 2007-07-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30671622, 39825121)

作者简介: 张娜 (1982-), 女, 辽宁海城人, 硕士研究生, 主要从事贝类分类与遗传学研究, 电话: 0532-82898726, E-mail: zhangnazona@yahoo.com.cn; 张国范, 通讯作者, 电话: 0532-82898701。

1.3 分子生物学分析

1.3.1 DNA 的提取

DNA 提取采用 Launey 等^[9] 和 Hubert 等^[10]改进的简便方法——Simple DNA Protocol for Oyster Biopsy 技术。主要步骤如下:

(1) 每个个体取 0.1~1.0 mg 的酒精固定样本; 切碎后置于 1 个 1.5 mL 的离心管内; (2) 在每个离心管中加入 50~100 μ L DNA 提取缓冲液(含 0.5%的吐温-20、100 μ g/mL 的蛋白酶 K 和 1 \times Tris-buffer); (3) 将混合物在 55 $^{\circ}$ C 消化 2 h, 然后在 95 $^{\circ}$ C 煮沸 30 min, 该步骤在 PCR 仪中进行; (4) 取 0.5~5 μ L 的上清液作为 PCR 反应的模板。

1.3.2 PCR 扩增

采用多重种特异性 PCR (multiplex species-Specific PCR) 技术扩增线粒体 COI 基因序列, 巨蛎属 5 种牡蛎的 PCR 引物序列均参照文献[5]。每个 PCR 反应含巨蛎属牡蛎 COI 基因 5'端外侧的通用引物、5 条位于 COI 基因 3'端内侧的种特异性引物。5 种牡蛎的种特异性引物与通用引物组合扩增得到的 PCR 产物长度不同。

PCR 扩增体系为 25 μ L (含 $MgCl_2$ 2.0 mmol/L, dNTP 150 μ mol/L, 通用引物 0.2 μ mol/L, 种特异性引物各 0.2 μ mol/L, DNA 模板 0.5~5 μ L, Taq 酶 1U, 10 \times PCR buffer 2.5 μ L)。PCR 的反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 95 $^{\circ}$ C 1 min, 51 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。每组 PCR 均设一个不加模板的反应作为对照。

1.3.3 琼脂糖凝胶电泳

PCR 产物通过 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 琼脂糖内加 0.2 μ g/mL 的 EB, 电泳完成后在凝胶成像系统 (BIORAD) 下观察电泳情况并储存。不同种类牡蛎的 PCR 产物的片断大小不同, 因此通过电泳结果即可知为何种牡蛎。

2 结果与分析

2.1 形态特征

图 2 是从辽宁沿海 6 个采样点采集的部分牡蛎样本的活体照片, 通过 COI 基因的鉴定知, 仅盘锦和营口各有 1 个近江牡蛎, 图中其余个体均为长牡蛎。

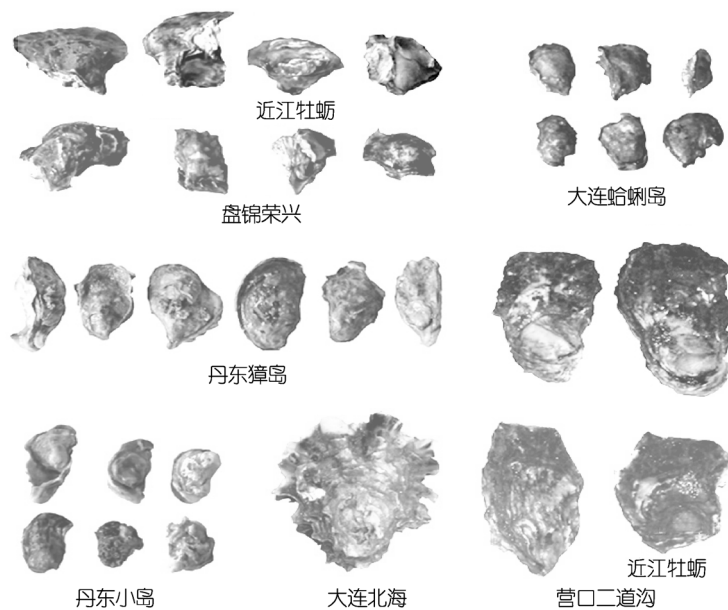


图 2 辽宁沿海几个点的巨蛎属牡蛎

Fig. 2 Oysters from several sites of Liaoning coast

除标明的 2 个个体为近江牡蛎外, 其余均为长牡蛎

Jinjiang oyster is marked, and the others are Pacific oysters

由图 2 可见, 辽宁沿海巨蛎属牡蛎外壳形态变化极大。从壳形态观察, 从辽宁不同海区采集的两种牡蛎分别有各自的形态特征。其中, 不同地点采集的长牡蛎均无栉齿、壳内面白色、闭壳肌痕呈紫色, 壳面颜色有些为褐色、部分夹杂有紫色条纹、有些壳面还具波纹状鳞片和放射肋, 长牡蛎壳表面形态的差异可能与其生长环境相关; 采集到的近江牡蛎也无栉齿、壳内面白色, 但闭壳肌痕为白色, 壳中型或大型, 壳形为圆形或椭圆形, 壳面带褐色条纹, 具波纹状鳞片和放射肋。

2.2 COI 序列扩增的 PCR 结果

本研究共分析了 531 个样本 (表 1), 经 COI 基因的多重特异性 PCR 扩增后共得到 269bp 和 183bp 等 2 种片段长度的产物 (图 3), 它们分别是长牡蛎和近江牡蛎的 PCR 产物长度。该结果表明辽宁沿海有长牡蛎和近江牡蛎 2 种巨蛎属牡蛎。

2.3 辽宁沿海牡蛎样本采集和分子鉴定结果

经鉴定, 辽宁沿海有 2 种巨蛎属牡蛎——长牡蛎和近江牡蛎。其中长牡蛎为优势种, 11 个采集点均有分布, 且数量多 (517 个, 占 97.4%), 潮间带和潮下带均有分布; 近江牡蛎数量少 (14 个, 占 2.6%),

且只在大连蛤蜊岛、营口二道沟和盘锦荣兴 3 个采集点有分布 (表 1), 仅分布于潮下带海区。

表 1 辽宁沿海牡蛎样本采集和分子鉴定结果

Tab. 1 Distribution of oysters in Liaoning coast				
采集地点	采集样	分析样	长牡蛎	近江牡蛎
	本数 (个)	本数 (个)	数量 (个)	数量 (个)
锦州三角	50	50	50	0
盘锦荣兴	17	17	16	1
营口二道沟	82	61	49	12
大连大魏家	100	50	50	0
大连北海	50	50	50	0
大连黑石礁	100	50	50	0
大连金石滩	80	50	50	0
大连海洋岛	100	50	50	0
大连蛤蜊岛	73	53	52	1
丹东獐岛	50	50	50	0
丹东小岛	100	50	50	0

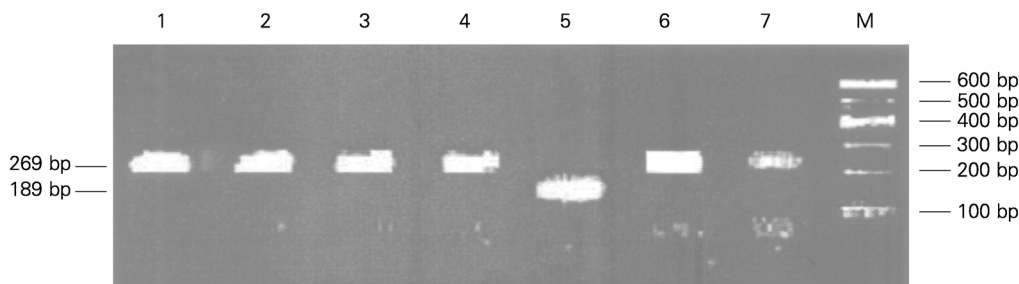


图 3 辽宁沿海牡蛎 COI 基因的种类特异性 PCR 分析结果

Fig. 3 Results of molecular identification

3 讨论

牡蛎的分类研究开始较早, 但直到林奈 (1758) 时期才正式提出牡蛎属 (*Ostrea*) 的命名。以后许多学者如 Lamarck (1819)、Sowerby (1870~1871)、Lamy (1929) 和 Thomson (1954) 等分别对牡蛎进行了较系统的分类研究, 提出了一些新的分类阶元^[6]。Hanley 于 1845 年最先描述了产于中国近海的牡蛎新

种 *Ostrea chemnitzii* sp.nov.^[7]。之后陆续有张玺^[8]、齐钟彦^[9]、徐凤山^[10]、李孝绪^[6]等众多学者先后研究了中国近海牡蛎的分类问题。但由于牡蛎的生长环境十分复杂多变, 导致外部形态变化很大, 难以通过贝壳等的外部形态特征与已订名种类进行比较从而对其进行准确分类, 再加上长期以来一直缺少准确而有效的研究手段, 致使不同学者之间的观点不一致, 因此加剧了中国牡蛎的同物异名和异物同名现象。

1956年,张玺等最早将中国北方沿海的牡蛎订名为僧帽牡蛎(*Ostrea cucullata*)^[8]。1982年,赵汝翼等曾将一种产于辽宁大连的牡蛎订名为褶牡蛎(*Alectryonella plicatula*)^[11]。此后“褶牡蛎”这个种名为许多学者所沿用,被用于称呼中国北方潮间带岩礁上自然生长分布的牡蛎;而徐凤山等则认为这是将一种巨蛎属(*Crassostrea* sp.)牡蛎误订为褶牡蛎^[10]。李孝绪等把比较解剖学引进中国牡蛎的分类,研究认为张玺等订名的僧帽牡蛎和赵汝翼等报道的褶牡蛎均应为长牡蛎^[6]。因为僧帽牡蛎左壳腹面观呈杯状或直角三角形,褶牡蛎则贝壳内面具独特的指纹,而长牡蛎的贝壳不具这些特征。

作者采用 COI 基因的种特异性引物,经过对辽宁沿海采集的 531 个牡蛎个体的逐一分析鉴定,确认辽宁沿海有长牡蛎和近江牡蛎等 2 种巨蛎属牡蛎分布(表 1)。2 种牡蛎在黄海海域和渤海海域均有分布,长牡蛎分布于潮间带和潮下带、近江牡蛎分布于潮下带。本研究的结果支持徐凤山^[10]、李孝绪^[6]等的观点,确认张玺等订名的僧帽牡蛎和赵汝翼等订名的褶牡蛎均为长牡蛎。即辽宁沿海潮间带岩礁上最常见的巨蛎属牡蛎是长牡蛎。

“近江牡蛎”的种名或者现在被订名为“近江牡蛎”的牡蛎物种,曾经经历过较多的演变和争论^[12]。基于分子生物学的研究结果,曾被称为“近江牡蛎”的牡蛎类群现已被明确区分成巨蛎属中的 2 个不同的种^[12],俗称白蚝的是 2003 年才被订名的香港巨牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)^[13]、俗称赤蚝的则是近江牡蛎(*Crassostrea ariakensis*)^[14]。本研究在辽宁沿海 3 个采样点采集到的近江牡蛎(表 1)就是俗称赤蚝的近江牡蛎(*C. ariakensis*)。

作者的研究结果表明,近江牡蛎在辽宁沿海的分布范围小、生物量低。采集到的近江牡蛎个体较大(壳长 13 cm 以上),均为成体,表明为往年繁育的个体,该结果提示,近年近江牡蛎的繁殖量低。近年来,庄河、英那河、辽河等河流的截流,导致陆地注入到相应海区的淡水减少,而近江牡蛎的繁育需要盐度较低的环境,长此发展下去,近江牡蛎在辽宁沿海的生物量可能还会越来越少,如若环境不适,甚至可能灭绝。因此,需要采取一定的措施,比如在近江牡蛎生物量相对较大的海区建立保护区,设法保证淡水的注入量,以加强近江牡蛎资源的保护。

4 结论

4.1 辽宁沿海有 2 种巨蛎属牡蛎,即长牡蛎(*Crassostrea gigas*)和近江牡蛎(*C. ariakensis*)。

4.2 长牡蛎为优势种,分布于黄海海域和渤海海域的潮间带和潮下带。

4.3 近江牡蛎在辽宁沿海的黄海海域与渤海海域均有分布,但为稀有种,且仅分布于潮下带。

参考文献:

- [1] 农业部渔业局主编,中国渔业年鉴.北京:中国农业出版社,2003,223.
- [2] 阙华勇,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.
- [3] Launey S and Hedgecock D. High Genetic Load in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Gene*, 2001, 159: 255-265.
- [4] Hubert S and Hedgecock D. Linkage maps of microsatellite DNA markers for the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Gene*, 2004, 168:351-362.
- [5] Wang, H, Guo X. Identification of *Crassostrea ariakensis* and related oysters by multiplex species-specific PCR[J]. *J Shell Res*, 2007 (In press).
- [6] 李孝绪,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.
- [7] Hanley S. A description of new species of *Ostrea*, in the collection of Hugh Cum-ming[J]. *Proc Zool Soc London*, 1845,13:105-107.
- [8] 张玺,楼子康.中国牡蛎的研究[J].动物学报,1956,8(1):65-94.
- [9] 齐钟彦,马绣同,王祯瑞,等.黄渤海的软体动物[M].北京:农业出版社,1989,176-179.
- [10] 徐凤山,黄修明.中国近海牡蛎超科的新纪录[J].海洋科学集刊,1993,34:175-179.
- [11] 赵汝翼,程济民,赵大东.大连海产软体动物志[M].北京:海洋出版社,1982,167.
- [12] 王海艳,郭希明,刘晓,等.中国近海“近江牡蛎”的分类和订名[J].海洋科学,2007,31(9):85-86.
- [13] Lam K, Morton B. Mitochondrial DNA and morphological identification of a new species of *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) cultured for centuries in the Pearl River Delta, Hong Kong, China [J]. *Aqua*, 2003, 228: 1-13.

- [14] Wang H, X Guo, G Zhang, F Zhang. Classification of China, based on morphology and phylogenetic analysis [J].
Jinjiang oysters *Crassostrea rivularis* (Gould, 1861) from **Aqua**, 2004, 242: 137-155.

Distribution of *Crassostrea* oysters in Liaoning coast

ZHANG Na^{1,2}, LIU Xiao², XU Fei², WU Fu-cun², GUO Xi-ming³, LI Xia¹, ZHANG Guo-fan³

(1.Dalian Fisheries University ,Dalian, Liaoning,116023; 2.Institute of Oceanology, Chinese Academy of Science, Qingdao, Shandong, 266071; 3.Haskin Shellfish Research Laboratory, Rutgers University, NJ 08349, USA)

Received: July, 19,2007

Key words: *Crassostrea*, oysters, Liaoning coast, COI gene, multiplex species-specific PCR,

Abstract: Classification and distribution of *Crassostrea* oysters in Liaoning province, China were studied using multiplex species-specific PCR. A total number of 802 individual oysters were randomly collected from 11 sites along Liaoning coast. Among them, 531 samples were subjected to a mitochondrial COI gene-based speciation analysis. Only two species were identified, in which Pacific oyster, *C. gigas* (517 samples) was the dominant species and distributed in both intertidal and subtidal zones, while Jingjiang oyster, *C. ariakensis* (14 samples) is less common and distributed only in the intertidal zone.

(本文编辑: 谭雪静)