

有棘无棘两种表型栉江珧 28S 和 COI 基因序列差异的比较

薛东秀^{1,2}, 张涛², 王海艳², 郑小东¹, 孟凡玉³

(1. 中国海洋大学, 山东 青岛 266003; 2. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071; 3. 江苏省赣榆县柘汪镇渔业指导站, 江苏 连云港 222113)

摘要:在形态学分析的基础上, 对有棘和无棘两种不同表型栉江珧(*Atrina pectinata*)的 28S rDNA 和 COI 基因片段进行序列分析比较。结果显示这两种表型的 DNA 序列差异很小, 28S rDNA(1 075 bp)无差异, 而 COI(659 bp)碱基差异最大为 1.5%, 不能提供这两种表型的栉江珧划分为两个种的证据。

关键词:栉江珧(*Atrina pectinata*); 棘; 28S rDNA; COI

中图分类号:Q954

文献标识码:A

文章编号:1000-3096(2009)10-0088-04

栉江珧(*Atrina pectinata*), 隶属于软体动物门(Mollusca), 双壳纲(Bivalvia), 贻贝目(Mytiloida), 江珧科(Pinnidae), 栉江珧属(*Atrina*), 是一种广泛分布于我国沿海的大型经济食用贝类, 以其后闭壳肌干制而成的“江珧柱”闻名于世。

栉江珧因受不同栖息海区环境等因素的影响, 形态变异较大, 在贝壳外形及器官组织结构上均有一定的差异。该种类在形态比较学分类上一直存在较大的分歧, 其中包括外壳上有棘和无棘的两种表型。王帧瑞^[1,2]认为栉江珧外壳上棘的有无和分布存在着明显的变异, 这种差异可能与贝龄和栖息环境有关, 不能构成建立种的依据。余祥勇等^[3~5]和王梅芳等^[6]也对有棘和无棘两种表型栉江珧的外套膜组织进行了 EST 和 SOD 同工酶比较研究, 结果显示这两种类型的酶谱表达有一定差异, 但同时也存在中间类型, 表明有棘和无棘的表型差异尚不能提供

它们应划分为两个种的充足证据。而日本学者横川浩治等^[7]利用同工酶技术对日本沿海栉江珧种内差异进行研究, 他们通过等位基因频率来计算不同类型间的遗传距离, 认为栉江珧应重新区分为有棘和无棘的两个种。

目前, 用 DNA 序列分析来研究物种的遗传差异和分类关系, 已在多种海洋贝类中得到应用^[8~10]。作者首次通过对有棘和无棘两种表型的 28S rDNA 和 COI 基因片段进行分析, 从分子水平探讨两种表型的序列差异性, 以期掌握更多的种内差异资料, 为栉江珧的分类提供更多的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验贝分别取自蓬莱、威海、连云港、深圳海域。

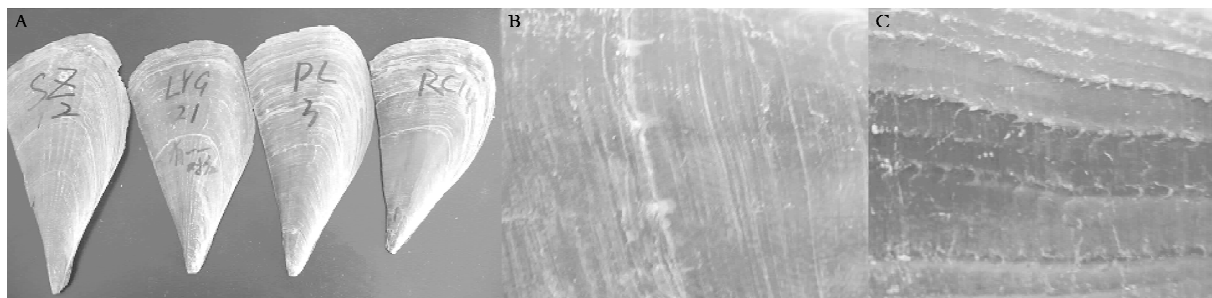


图 1 有棘和无棘两种表型的栉江珧贝壳形态

Fig. 1 Shell shapes of scaly and non-scaly types of *A. pectinata*

A: SZ, LYG, PL, RC(从左到右); B: 无棘; C: 有棘

A: SZ, LYG, PL, RC(From left to right); B: Non-scaly type; C: Scaly type

根据壳上棘的有无将贝分为有棘和无棘两种类型, 如图 1 所示。样品采集地、棘的有无、采集样品数及测序样品数等基本信息列于表 1。所有样品均活体运输到实验室进行解剖和有关形态性状的测量。每个样品取闭壳肌保存于无水酒精中, 用于 DNA 的提取; 贝壳用于形态数据的测量。

收稿日期: 2009-07-28; 修回日期: 2009-08-23

基金项目: 江苏省科技支撑计划项目(农业部分, 合同号: BE2008344);

国家海洋局公益性行业科研专项重点项目(200805069)

作者简介: 薛东秀(1987-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 养殖生态学; 张涛, 通信作者, 博士, 副研究员, E-mail: tzhang@ms.qdio.ac.cn

表 1 取样地点、棘的有无、采样时间及样品数

Tab. 1 Locations, with or without scaly, number of *Atrina pectinatas* and number of *A. pectinatas* sequenced

取样地点	缩写	棘的有无	样品数(个)	测序样品数(个)
山东蓬莱长岛	PL	无	44	6
山东威海荣成	RC	无	28	6
江苏连云港	LYG	有	30	6
广东深圳盐田	SZ	有	20	6

1.2 形态数据测量

栉江珧壳长(L_s)为壳顶至贝壳后缘最远点的距离,壳高(H_s)为贝壳腹缘与背缘之间的最大长度(图 2),壳宽(W_s)为左右两个贝壳间的最大长度^[2,11]。测量用游标卡尺,精确度为 0.1 mm。

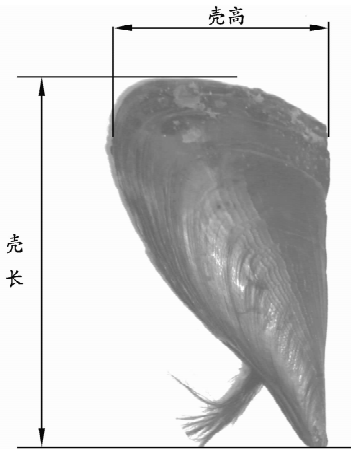


图 2 栉江珧测量

Fig. 2 The measure of *A. pectinata*

1.3 DNA 提取和 PCR 扩增反应

DNA 的提取以及纯化主要参照《分子克隆试验指南》(第 3 版)的方法(Sambrook 等,2001)。获得的 DNA 样品用 0.8% 的琼脂糖电泳和紫外分光光度计进行定量,无菌 ddH₂O 稀释到 100 mg/L。

部分序列扩增所用引物为: LCO1490 和 HCO2198^[12]用来扩增 COI 序列;28S 序列扩增采用 Park 等^[10]的引物序列(D1F 和 D6R),如表 2 所示。50 μ L 的 PCR 扩增体系为:1.5 mmol/L MgCl₂; 200 μ mol/L dNTP;0.2 μ mol/L 引物;100 ng 模板 DNA;2 U Taq 酶;5 μ L 的 10 \times buffer。COI 的 PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,之后进行 30 个循环,每个循环反应包括:95 $^{\circ}$ C/1 min,50 $^{\circ}$ C/1 min,72 $^{\circ}$ C/1min,72 $^{\circ}$ C 后延伸 5 min。28S 的反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min,加入 Taq 酶,之后进行 30 个循环(94 $^{\circ}$ C/40 s,60 $^{\circ}$ C/40 s,72 $^{\circ}$ C/1 min 15 s),72 $^{\circ}$ C 后延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳进行检测,将 PCR 扩增产物送北京三博远志生物技术有限

责任公司进行纯化回收,然后采用扩增引物在 ABI 测序仪上直接进行测序。

表 2 所用引物序列

Tab. 2 Sequences of used primers

引物	序列
COI-F (LCO1490)	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'
COI-R (HCO2198)	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'
28S-F(D1F)	5'-GGGACTACCCCTGAATTTAAGCAT-3'
28S-R(D6R)	5'-CCAGCTATCCTGAGGGAAACTTCG-3'

1.4 数据处理

1.4.1 壳形态数据分析

为消除栉江珧个体大小的影响,以个体尺性状的相对比值作为栉江珧形态判别和分析指标,考察了 L_s/H_s 、 L_s/W_s 、 H_s/W_s 等三个形态特征指标。采用 SPSS13.0 统计软件对各群体间壳形态特征指标的差异进行单因子方差分析(ANOVA)。

1.4.2 DNA 序列分析

用 DNA Star 和 BioEdit 等软件并结合 DNA 正反向序列图谱对 DNA 序列校正。用 DNA Star 软件包中的 MegAlign 软件对序列进行序列同源性和相似性分析。多重比对使用 BioEdit 的 ClustalX 进行分析。

2 结果与分析

2.1 栉江珧壳形测量数据的统计比较

栉江珧 4 种壳形的形态指标的方差分析结果列于表 3。结果显示,考察的 3 个形态学变量除 H_s/W_s 外均在两表型间的差异显著。有棘相对无棘较细长。

表 3 两种表型栉江珧的 3 个形态指标方差分析

Tab. 3 ANOVA analysis of three morphological parameters between two phenotypes of *A. pectinata*

SOV	df	L_s/H_s		L_s/W_s		H_s/W_s	
		MS	F	MS	F	MS	F
群体间	1	0.093	6.687*	0.884	7.558**	0.168	0.038
群体内	120	0.014		0.117		0.038	
总变异	121						

注: $F_{0.05}(1,120)=3.820$; $F_{0.01}(1,120)=6.851$; **表示差异极显著

2.2 核 28S rDNA 基因序列分析

对两种表型的 24 个栉江珧进行 28S rDNA 序列测定,序列长度为 1 075 bp。两种表型的栉江珧中

仅测得一个单倍型。此单倍型与 GenBank 上记载记录的 *A. pectinata* (DQ343846) 的序列完全相同。

2.3 线粒体 COI 基因序列分析

对两种表型的 24 个栉江珧进行 COI 序列测定, 序列长度为 659 bp。两种表型的栉江珧中测得 3 个单倍型。与 GenBank 上记载记录的 *A. pectinata* (AB059422) 的序列相比变异碱基位点及位点数如表 4 所示。

用 Bioedit 和 MegAlign 软件对两种表型的栉江珧的 COI 基因片段序列进行分析, 遗传距离和序列相似百分比见表 5。有棘和无棘之间的遗传距离在 0.007 7~0.013 9 之间, 遗传相似度在 98%~99% 之间。

表 4 两种表型栉江珧的变异碱基位点数及变异位点

Tab. 4 Number and sites of mutated nucleotide about two phenotypes of *A. pectinata*

类型	变异碱基位点数	变异位点
有棘	PL	3 453 509 630
	RC	0 —
无棘	LYG	5 282 651 652 653 654
	SZ	0 —

表 5 根据栉江珧 COI 部分序列构建的 Pairwise 遗传距离 (下三角) 和遗传相似性 (上三角)

Tab. 5 Pairwise sequence divergence (below diagonal) and genetic identity (above diagonal) for COI fragments from *Atrina pectinata*

	1	2	3	4	5
<i>A. pectinata</i>	—	98.0%	98.8%	97.9%	97.9%
无棘	PL	0.017 0	—	98.9%	98.5%
	RC	0.012 3	0.007 7	—	98.9%
有棘	LYG	0.018 5	0.012 3	0.007 7	—
	SZ	0.021 7	0.013 9	0.010 8	0.013 9

3 讨论

本研究所获得的有棘和无棘两种表型的栉江珧 28S 基因序列和 COI 基因序列与 GenBank 数据库中栉江珧的 28S 基因序列和 COI 基因序列相比较, 序列的同源性在 98% 以上, 可以排除测序所得到的 28S 基因序列片段和 COI 基因序列片段为假基因的可能性。两种表型的栉江珧 L_s/H_s , L_s/W_s 两个参数差异显著, 这与余祥勇等^[4] 研究结果基本一致。而两种表型的栉江珧 DNA 序列差别不大, 28S 序列完全一致, COI 序列碱基差异度最大仅为 1.5%。两

种表型栉江珧的形态学分析结果与 DNA 序列分析结果存在一定的差异。究其原因, 作者认为可能是形态差异是由遗传因子和环境因子相互作用而共同决定。而 DNA 水平差异主要由地理距离造成的遗传分化决定的。由于作者的结果不支持横川浩治^[7] 将栉江珧重新划分为两个种的结论, 因此作者赞同王祯瑞^[1,2]、余祥勇等^[3~5] 及王梅芳等^[6] 的观点, 有棘和无棘两种表型存在的原因主要是有不同海区的环境因子造成的。而且我推测我国和日本栉江珧出现这种差异的原因可能是日本和我国的栉江珧分布区域不同而造成, 或者是长期的地理隔离导致两国栉江珧各自积累与棘的表现相关的不同基因所致^[3,13], 今后可以对此进行进一步研究。

参考文献:

[1] 王祯瑞. 中国近海江珧科的初步研究 [A]. 中国科学院海洋研究所. 海洋科学集刊(4) [C]. 北京: 科学出版社, 1964. 30-42.

[2] 王祯瑞. 中国动物志: 软体动物门 双壳纲 贻贝目 [M]. 北京: 科学出版社, 1997. 214-239.

[3] 余祥勇, 王梅芳, 杨书婷, 等. 有棘和无棘两种表型江珧同工酶差异的比较 [J]. 湛江海洋大学学报, 1999, **19**(2): 6-8.

[4] 余祥勇, 王梅芳. 无裂栉江珧形态差异的比较研究 [J]. 广西科学, 2000, **10**(4): 309-311.

[5] 余祥勇, 王梅芳, 杨书婷, 等. 栉江珧同工酶多态性的分析 [J]. 华中农业大学学报, 2005, **24**(2): 203-206.

[6] 王梅芳, 余祥勇, 杨书婷, 等. 无裂栉江珧种内同工酶表型差异的比较研究 [J]. 热带海洋, 2000, **19**(4): 45-50.

[7] Yokogawa K. Genetic divergence in two forms of pen shell *Atrina pectinata* [J]. *Japanese Journal of Malacology*, **55**(1): 25-39.

[8] 毕相东, 杨雷, 侯俊利, 等. COI 基因在海洋动物分子系统学研究中的应用 [J]. 水产科学, 2008, **27**(2): 105-108.

[9] 程汉良, 夏德全, 吴婷婷, 等. 6 种帘蛤科贝类及 4 个地理种群文蛤线粒体 COI 基因片段序列分析 [J]. 海洋学报, 2007, **29**(5): 109-116.

[10] Kim S H, Lee S Y, Park D W, *et al.* Phylogenetic relationship among four species of Korean oysters based on mitochondrial 16S rDNA and COI gene [J]. *Korean J Biol Sci*, 2000, **16**(2): 203-211.

[11] 邱盛尧, 张锡佳, 王世信, 等. 山东北部近海栉江珧的年龄与生长 [J]. 水产学报, 1996, **20**(4): 301-306.

[12] Folmer O, Black M, Hoeh W, *et al.* DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrate [J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1994, **3**: 294-299.

[13] Yu X, Mao Y, Wang M, *et al.* Genetic heterogeneity analysis and RAPD marker detection among four

forms of *Atrina pectinata* Linnaeus [J]. *J Shellfish Res*, 2004, **23**(1): 165-171.

Comparative study on 28S rDNA and COI of scaly and non-scaly phenotypes in species of *Atrina pectinata*

XUE Dong-xiu^{1, 2}, ZHANG Tao², WANG Hai-yan², ZHENG Xiao-dong¹, MENG Fan-yu³

(1. Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 3. Fishery Direction Station of Zhewang, Lianyungang 222113, China)

Received: Jul. , 28, 2009

Key words: *Atrina pectinata*; Scaly; 28S rDNA; COI

Abstract: The ANOVA analysis was conducted to the length, height and width of shells of scaly and non-scaly phenotypes in species of *Atrina pectinata*. We use DNA sequence data from the nuclear 28S rDNA and mitochondrial cytochrome oxidase I (COI). The length of sequenced 28S rDNA genes is 1 075 bp, and COI's is 659 bp. There are little differences between the DNA sequences of the two types of *A. pectinata*. It is suggested that the two types of *A. pectinata* should belong to the same species.

(本文编辑:张培新)

(上接第 87 页)

Inter-specific hybridization between *Argopecten purpuratus* and *Argopecten irradians irradians*

WANG Chun-de¹, LIU Bao-zhong², LI Ji-qiang³, LIU Sheng-ping¹

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China; 2. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 3. Qingdao Fisheries Technology Promoting Station, Qingdao 266071, China)

Received: Aug. , 25, 2009

Key words: *Argopecten purpuratus*; *Argopecten irradians irradians*; inter-specific hybridization; heterosis

Abstract: The purple scallop (*Argopecten purpuratus*) and the bay scallop (*Argopecten irradians irradians*) are all fast-growing *Argopecten* scallops. The bay scallop has been introduced into China 1980 s and has now developed into a large industry in China. Now the authors reported the introduction of purple scallops from Peru into China and the inter-specific hybridization between the bay scallops and purple scallops. In this study, the hybrids were produced by hybridizing *A. purpuratus* eggs with *A. irradians irradians* sperm. The results showed that the *A. purpuratus* eggs can be fertilized with *A. irradians irradians* sperm, and the resulted embryos can develop normally. Faster growth was observed in the hybrids compared with the pure-bred bay scallops during both the larval and adult stages. The average shell height, shell length, shell width and whole weight of the hybrids are 27.3%, 25.2%, 19.3%, and 107.0% larger than that of the pure-bred bay scallops, indicating a significant heterosis in the hybrids.

(本文编辑:刘珊珊)