基于种特异性 PCR 及线粒体基因标记的天津沿海牡蛎物种多样性研究

黄津伟[1], 张天喆[2], 高　燕[3], 吴　弘[1], 高　雨[1], 闫春财[1], 胡利莎[4]

(1. 天津师范大学生命科学学院 天津市动植物抗性重点实验室, 天津 300387; 2. 天津市宝坻区第一中学, 天津 301800; 3. 天津渤海水产研究所, 天津 300221; 4. 中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

摘要: 天津位于渤海湾西北部, 海岸线长, 牡蛎生物量大, 但是关于天津海区牡蛎种类组成未见有详细报道。为了解此地区牡蛎物种多样性情况, 本研究对天津沿海自南至北 5 个地点随机采集了约 230 个野生牡蛎, 结合形态学和分子生物学手段, 利用种特异性(Species-specific) PCR 分子标记及 COI 基因序列详细地分析了牡蛎物种组成。种特异性 PCR 可以快速鉴定并确认牡蛎种类, 结果表明天津沿海牡蛎优势种为北方常见种长牡蛎 *Crassostrea gigas gigas*, 另外一种不能通过种特异性 PCR 确定, 但经形态鉴定及 COI 基因片段的 Genbank Blast 比对, 确定其为猫爪牡蛎 *Crassostrea talonata*。综合形态学和分子生物学手段, 研究结果表明大神堂有长牡蛎和猫爪牡蛎两种牡蛎, 其余 4 个地点的牡蛎均为长牡蛎。总体来看, 天津沿海牡蛎物种多样性较低, 这与北方沿海潮间带牡蛎生长的生态环境如水温、盐度等有关。本研究采集的牡蛎个体普遍偏瘦小, 可能与沿海频繁的人为采捕有关, 此结果为我国天津沿海牡蛎的种类、分布及其他相关研究提供了参考, 为野生牡蛎的合理保护提供了依据。

关键词: 天津; 牡蛎; 种特异性分子标记; COI; 分布

中图分类号: Q959.215　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 1000-3096(2019)12-0089-08

DOI: 10.11759/hykx20190723001

牡蛎属于软体动物门、双壳纲、珍珠贝目、牡蛎超科、牡蛎科, 是世界性广布种类, 因其重要的经济价值和营养价值而被人们所熟知。由于牡蛎贝壳形态受环境影响极大, 使得单纯依靠形态特征进行牡蛎分类出现很多问题, 同物异名和异物同名现象非常严重。最初, 我国学者将北方潮间带常见的一种贝壳较小、通常分布在高潮线和低潮线间的牡蛎鉴定为僧帽牡蛎(*Ostrea cuccullata* Born 178)[1]。后期多位学者对我国北方这种牡蛎种类进行了研究, 名称有褶牡蛎(*Crassostrea plicatula*)[2]、巨牡蛎未定种(*C.* sp)[3]及长牡蛎(*C. gigas*)[4]。王海艳等[5-6]结合形态学和分子生物学方法(核基因 28SrRNA 和线粒体基因 16S rRNA、COI)对我国江苏、山东、辽宁等沿海典型海区潮间带的牡蛎进行了较为详细的研究, 结果表明这些海区的牡蛎与 *C. giga gigas* 聚为一支, 命名为长牡蛎, 支持李孝绪等[4]的结论。Wang 等[6]通过对长牡蛎和福建牡蛎进行比较分析, 认为福建牡蛎应为长牡蛎的亚种, 分别定名为长牡蛎(*C. gigas gigas*)和福建牡蛎(*C. gigas angulata*)[7]。

天津市地处渤海湾西北部, 海岸线长 153 公里, 滩涂面积 336 km^2, 该海域潮汐为非正规半日潮, 滩涂坡度平缓, 泥沙底质, 水质肥沃, 为理想的底栖贝类增殖场。在距今 5 000~6 000 年前的全新世时期, 在复杂的海陆变迁及河流的共同作用下, 产生了大量的沼泽、盐沼和泻湖, 并形成了天津独特的贝壳堤、牡蛎礁等自然景观[8]。天津曾是中国东部沿海平原贝类最为发达的地区之一, 其贝壳堤、牡蛎滩规模

收稿日期: 2019-07-23; 修回日期: 2019-09-19

基金项目: 国家自然科学基金项目, 41776179 号; 天津市自然科学基金, 18JCYBJC96100 号; 天津市科学技术普及项目, 19KPHDRC00110 号; 天津师范大学基金, 135305JF79, 043135205-GC54, 043135202-XK1706 号; 大学生创新创业训练计划项目, 201910065065 号

[Foundation: National Natural Science Foundation of China, No.41776179; Tianjin natural science foundation, No.18JCYBJC96100; Tianjin project of science and technology popularization, No.19KPHDRC00110; Foundation of Tianjin normal university, No. 135305JF79, No.043135205-GC54, No.043135202-XK1706; Innovation and entrepreneurship training program for college students, No.201910065065]

作者简介: 黄津伟(1997-), 女, 天津市人, 硕士, 主要从事水产生物分子生物学研究, E-mail: 13821295232@163.com; 同等贡献第一作者: 张天喆, E-mail: tianzhezhang@163.com; 闫春财, 通信作者, E-mail: skyycc@tjnu.edu.cn

大、连续性好，层次清晰，举世罕见，是天津海陆变迁的重要产物和有力佐证，为国际海洋学、地质学、地理学及生态环境的研究提供良好的环境材料，具有重要的科学研究价值[9-10]。天津海区的牡蛎生物量大，具有重要的经济及生态价值，但是其种类组成未见有详细报道。

为了解天津沿海牡蛎的物种多样性情况，本研究在天津沿海自南至北 5 个地点进行了系统采样，在形态和分子生物学分析相结合的基础上，对此海区牡蛎的种类组成和生物多样性进行了分析，明确了此地区牡蛎的种类和分布情况，以期为研究天津古牡蛎礁的种类组成、现生牡蛎资源状况及合理保护提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 样品采集与保存

牡蛎调查区域为天津沿海(图 1)，遵循随机原则采集潮间带及牡蛎礁样本，采样时不分大小。共采集约 230 个样品，样品采集后活体运回实验室进行形态学特征及分子生物学研究。

1.2 样品的初步鉴定

观察并记录贝壳的各部分特征，包括壳形、壳上鳞片情况、壳表面颜色、放射肋分布情况、韧带槽形状及大小、壳内面颜色、闭壳肌痕颜色及形状。通过形态特征对牡蛎进行初步鉴定。选取壳形态具有代表性的牡蛎样本，对其外壳与内壳形态分别记录。测量样品壳长、宽、高、壳重、总重等参数。

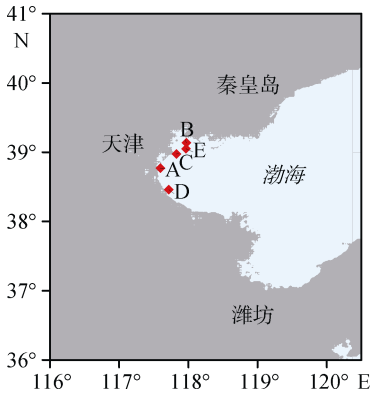


图 1 样品采集地点

Fig. 1 Map of sampling sites

注: A 唐家河; B 大神堂; C 东疆港区; D 季家堡村; E 北疆电厂防波堤

1.3 基因组 DNA 的提取和目的基因 PCR 扩增

从牡蛎闭壳肌中取出 100mg 组织，使用试剂盒 TIANamp 海洋动物 DNA 提取试剂盒(北京天根生物有限公司)，按照说明操作提取组织 DNA。

通过多重种特异性 PCR(聚合酶链式反应)鉴定物种[11]。扩增使用引物包括外引物即 COI 通用引物 LCO1490(5′-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3′)和 HCO2198(5′-AAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3′)[12]，及 5 种巨牡蛎属牡蛎特异性引物(表 1)。

表 1 5 种巨牡蛎属牡蛎特异性引物

Tab. 1 Species-specific PCR primers of 5 *Crassostrea* species

引物名称	特异性物种	引物序列	片段大小(bp)
LCO1490	All		
COCar183r	*C. ariakensis*	AAAAAAGATTATAACTAATGCATGTCG(T)G	183
COCan222r	*C. gigas angulata*	AGTTACCAAACCCCCCAATTATCAG©G	222
COCgi269r	*C.gigas gigas*	TCGAGGAAATTGCATGTCTGCTACA(T)A	269
COChk387r	*C. hongkongensis*	GGAGTAAGTGGATAAGGGTGGATAG	387
COCsi546r	*C. sikamea*	AAGTAACCTTAATAGATCAGGGAAC(A)C	546
HCO2198	All		697

PCR 反应体系为 25 μL，其中包括外引物 LCO1490 和 HCO2198 各 0.5 μL，5 种内引物各 0.4 μL，1.5μL DNA 模板，2×PCR master mix 12.5 μL，ddH_2O 8 μL 补足至 25μL。循环参数如下：

预变性：95℃，5 min

变性：95℃，30s

退火：48～51℃，1min } 30循环

延伸：70℃，1min

终延伸：72℃，10 min

PCR 产物经加有 Gelred 染料的 1%琼脂糖凝胶电泳, 然后用凝胶成像仪观察并拍照。

与已知牡蛎种类的基因条带在胶图中的位置进行比对, 将不能比对出结果的样品以及部分比对成功的样品进行重新 PCR, 扩增用通用引物 LCO1490 和 HCO2198。PCR 反应体系为 25 μL, LCO1490 和 HCO2198 各 0.5 μL, DNA 模板 1.5 μL, 2×PCR master mix 12.5 μL, ddH_2O 10 μL 补足至 25 μL, PCR 产物送生工生物科技有限公司进行序列测定。

1.4 数据统计及序列分析

DNA 序列结果由 CLUSTAL X 软件[13]采用默认参数比对, 然后经人工校对, 校对后的序列输入 NCBI 进行序列比对, 确定物种种类。自 NCBI 下载比对相近种的序列(表 2), 用于遗传距离和系统发育树的计算和构建。

模型 HKY+I+G 为 ModelTest 3.7[14]软件选择的最佳替代模型。该模型构建最大似然(ML)树和贝叶斯(BI)树, 将密鳞牡蛎 *Ostrea denselamellosa* 和 *Saccostrea kegaki* 作为外群。BI 树用 MrBayes3.2[15]软件构建, 采用 nst=6, rates=gamma 参数, 运行 1000 万代, 每 10000 代抽样一次, burn-in 设置为 25%, 根据剩余样本构建 BI 树。ML 树在线(http: //www.atgcmontpellier.fr/phyml/)构建, 参数值与 ModelTest3.7 的筛选结果一致。

表 2 自 NCBI 下载的相关牡蛎的 COI 序列信息

Tab. 2 Accession number of oyster COI sequences from GenBank used for sequence divergence and phylogenetic analysis

牡蛎种名	序列登记号
长牡蛎 *Crassostrea gigas gigas*	KP099018
福建牡蛎 *Crassostrea gigas angulata*	KP216805
熊本牡蛎 *Crassostrea sikamea*	HQ661018
电白牡蛎 *Crassostrea dianbaiensis*	LC120781
香港牡蛎 *Crassostrea hongkongensis*	KP734088
近江牡蛎 *Crassostrea ariakensis*	FJ743527
密鳞牡蛎 *Ostrea denselamellosa*	KP067908
猫爪牡蛎 *Talonostrea talonata*	KX364277
Saccostrea kegaki	KP067909

基因序列的碱基组成以及物种两两之间的 Kimura 2-parameter 遗传距离使用 Mega 7[16]计算。

2 结果与分析

2.1 形态分析结果

基于形态特征, 本次采集的样品初步鉴定为两种: 长牡蛎和猫爪牡蛎(图 2)。长牡蛎: 贝壳呈长条形;



图 2 天津地区牡蛎样品图

Fig. 2 Shell morphology of the specimens sampled from Tianjin

注: A: 长牡蛎样品, B: 猫爪牡蛎样品

背腹缘几乎平行, 壳长为壳高的3倍左右; 左壳深陷, 鳞片粗大, 壳顶固着面小; 右壳较平, 环生鳞片呈波纹状, 排列稀疏, 层次少, 放射肋不明显; 壳表面淡紫色、灰白色或黄褐色; 壳内面白色、瓷质样; 壳顶内面有宽大的韧带槽; 闭壳肌痕大, 马蹄形。猫爪牡蛎: 贝壳较小、呈扁平状, 壳质较薄; 左壳壳顶腔较深, 有 5~8 条放射肋, 在壳的边缘形成爪状, 肋上有少数棘; 贝壳内部边缘没有嵌合体。

天津牡蛎样品的形态学特征如表 3 所示。结果表明天津沿海长牡蛎相对呈中等大小、肉质偏瘦; 而猫爪牡蛎形态特征明显, 大小与我国南北沿海其他地区的猫爪牡蛎相一致。

表 3　样品形态学特征参数

Tab. 3　Morphological feature parameters of samples

地点	物种	长/cm	宽/cm	高/cm	总重/g	壳重/g	肉重/g
北疆电厂防波堤	长牡蛎	3.82	2.15	1.32	8.47	6.76	1.53
唐家河	长牡蛎	4.21	2.33	1.26	8.31	6.51	1.47
东疆港区	长牡蛎	4.62	3.02	1.46	9.32	7.20	1.67
季家堡村	长牡蛎	3.96	2.11	1.30	8.33	6.12	1.34
汉沽大神堂	长牡蛎	5.48	2.7	1.85	27.52	22.11	4.88
	猫爪牡蛎	1.25	0.46	2.25	3.11	2.01	0.79

2.2　种特异性 PCR 结果

利用种特异性 PCR 可以对巨蛎属几种常见牡蛎进行准确鉴别[11]。结果表明, 天津大神堂牡蛎有长牡蛎(图 3, 6~18)和未定种(即猫爪牡蛎, 图 3, 19-21), 其余采样点的牡蛎均为长牡蛎 *C. gigas gigas*。



图 3　天津地区牡蛎种特异性 PCR 图

Fig. 3　Species-specific PCR of the oysters sampled from Tianjin

注: M: marker; 1: 近江牡蛎; 2: 福建牡蛎; 3: 长牡蛎; 4: 香港牡蛎; 5: 熊本牡蛎; 6-21: 天津地区牡蛎

2.3　序列分析结果

对鉴定出的长牡蛎部分样品和所有猫爪牡蛎的样品进行 PCR 扩增及序列测定。所得序列人工校对后, 与 NCBI 比对, 结果表明所测牡蛎确实为长牡蛎和猫爪牡蛎, 支持种特异性 PCR 和形态学鉴定的结果。基于 COI 序列用 Mega7 软件计算的物种之间的遗传距离如表 3 所示, 结果表明, 一种牡蛎与长牡蛎之间的遗传距离为同一种内水平的差异, 支持种特异性 PCR 和形态学鉴定的结果。另一种牡蛎与猫爪牡蛎之间的遗传距离为同一种内水平的差异, 表明其为猫爪牡蛎, 与形态学初步鉴定的结果一致。长牡蛎与猫爪牡蛎种间遗传距离为 0.217~0.232, 种内、种间遗传距离未发生重叠, DNA 间隙明显。

3　讨论

3.1　天津沿海牡蛎物种多样性

经过贝壳形态特征和 COI 基因鉴定, 天津沿海分布的牡蛎有长牡蛎和猫爪牡蛎两种, 说明该海区牡蛎物种丰富度低。

长牡蛎为我国北方优势种, 且为天津沿海的优势种。目前研究发现长牡蛎分布的最南端至江苏省泰州海安县, 该种在潮间带及浅海的岩礁上天然分布, 以其左壳固定在岩石上, 栖息密度较高, 生长力强[5]。因其肉味鲜美、营养丰富, 而具有较高的经济价值, 是我国北方主要的海洋贝类养殖种之一[17], 已经在很多地区得到养殖, 如威海、青岛、日照、东营、唐山等沿海地区, 其中威海地区养殖规模较大。

猫爪牡蛎为广温广布种, 在我国北方沿海如青岛、辽宁[4]和南方沿海如广东、广西、海南[18-20]均有分布, 且在广西生物量大, 为牡蛎优势种之一。李孝绪等[4]根据解剖结构把猫爪牡蛎归为一单独的属—爪蛎属 *Talonostrea*。本研究通过对多种巨牡蛎属牡蛎和猫爪牡蛎的形态及分子遗传距离等分析, 表明猫爪牡蛎嵌合在亚洲的巨蛎属和美洲的巨蛎属之间, 应该归为巨蛎属, 这一结果与 Li 等[21]观点一致, 将猫爪牡蛎归为巨蛎属 *Crassostrea*, 拉丁名订正为 *Crassostrea talonata*。该牡蛎多固着于潮下带浅水区石块及养殖笼上, 因此除大神堂牡蛎礁外, 在其余 4 个潮间带海区未采集到。猫爪牡蛎在我国南北沿海均有分布, 且形态特征变化较大, 结合本次

表 4　基于 COI 基因序列计算的不同物种之间的遗传距离

Tab. 4　K2P distance between different species based on COI gene sequences

	物种	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	H1																				
2	H2	0.002																			
3	H3	0.002	0.003																		
4	H4	0.003	0.005	0.005																	
5	H5	0.002	0.003	0.003	0.005																
6	H6	0.005	0.007	0.007	0.008	0.007															
7	H7	0.002	0.003	0.003	0.005	0.003	0.007														
8	H8	0.002	0.003	0.003	0.005	0.003	0.007	0.003													
9	H9	0.003	0.005	0.005	0.007	0.005	0.008	0.005	0.005												
10	H10	0.002	0.003	0.003	0.005	0.003	0.007	0.003	0.003	0.005											
11	H11	0.219	0.217	0.222	0.224	0.222	0.227	0.219	0.217	0.219	0.222										
12	*C. gigas gigas*	0.002	0.003	0.003	0.005	0.003	0.007	0.003	0.003	0.005	0.000	0.222									
13	*C. gigas angulata*	0.029	0.031	0.027	0.029	0.031	0.034	0.031	0.031	0.032	0.031	0.225	0.031								
14	*C. ariakensis*	0.166	0.166	0.166	0.166	0.164	0.173	0.166	0.168	0.161	0.168	0.231	0.168	0.176							
15	*C.dianbaiensis*	0.194	0.194	0.192	0.194	0.192	0.192	0.192	0.192	0.199	0.196	0.215	0.196	0.192	0.165						
16	*C. sikamea*	0.118	0.118	0.116	0.118	0.116	0.121	0.116	0.121	0.118	0.116	0.200	0.116	0.110	0.169	0.181					
17	*C. hongkongensis*	0.142	0.142	0.144	0.142	0.144	0.148	0.142	0.144	0.142	0.144	0.206	0.144	0.151	0.152	0.177	0.152				
18	*T. talonata*	0.224	0.222	0.227	0.229	0.227	0.232	0.224	0.222	0.224	0.227	0.007	0.227	0.229	0.236	0.219	0.207	0.211			
19	*O. denselamellosa*	0.292	0.292	0.290	0.292	0.290	0.292	0.290	0.295	0.287	0.295	0.299	0.295	0.298	0.295	0.269	0.277	0.305	0.302		
20	*S. kegaki*	0.312	0.309	0.309	0.318	0.309	0.312	0.312	0.309	0.312	0.315	0.305	0.315	0.312	0.304	0.299	0.323	0.300	0.313	0.264	

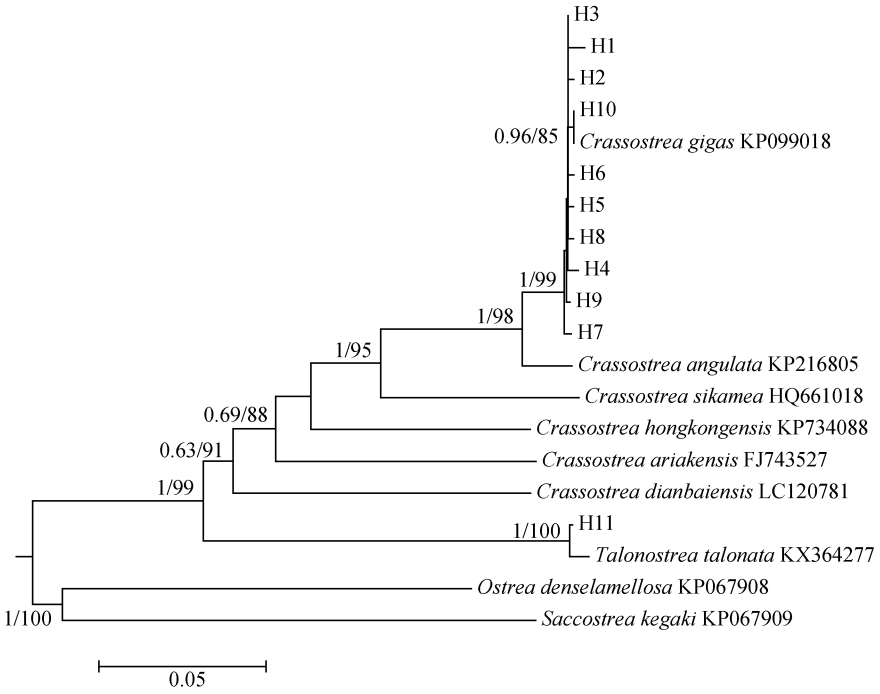


图 4　天津地区牡蛎及相关物种系统发育树

Fig. 4　Phylogeny tree of oysters from Tianjin and related species from GenBank

注: 图中所示为 BI 树结构, ML 树的拓扑结构与 BI 树基本一致。支上数值表示贝叶斯概率和后验概率值>0.5/50

采集的样品, 我们有必要对其地理分布及群体遗传学等进行深入地研究。

本研究调查的野生牡蛎个体相对都偏小、肉质较瘦。推测可能是因为采样区域环境变化及人类活动如过量采捕、堤坝构建、填海等对牡蛎的生长产生影响, 进而导致其生长发育受到影响。

3.2　种特异性 PCR 在天津沿海牡蛎研究中的应用

Wang 等[11]筛选的种特异性 PCR 引物对巨蛎属几种常见牡蛎, 即长牡蛎、福建牡蛎、香港牡蛎、近江牡蛎和熊本牡蛎可进行快速准确地鉴别, 但对于分类地位特殊的猫爪牡蛎不适用, 鉴于猫爪牡蛎在我国也是广分布种, 我们认为后期研究如果能够进一步筛选适合猫爪牡蛎的快速鉴定标记, 将会提高分子生物学在分类学研究中的作用。

3.3　牡蛎在生态环境中的作用

牡蛎作为潮间带常见的贝类, 通常会聚集生长, 形成一种特殊的海洋生境——牡蛎礁, 其在净化水体、提供栖息生境、促进渔业生产、保护生物多样性和耦合生态系统能量流动等方面均具有重要的生态功能[22]。牡蛎常被选择为环境污染的指示生物, 因为其会在软体部分积累高浓度的重金属和有机污染物[23]。有学者对天津大神堂浅海区的水下活牡蛎礁资源进行了调查[24], 结果表明该区活牡蛎资源由 3 个分散的礁体组成, 总面积仅约 3 km^2, 礁体最大厚度 1.2 m, 平均厚度 0.6 m; 调查区海底地形平坦, 水深介于 3.4~5.6 m 之间, 因受人类活动严重破坏, 仅在有礁体发育的局部范围内有高程约 1m 的起伏波动, 说明对保护牡蛎礁的保护迫在眉睫。本研究仅采集了沿岸的牡蛎, 发现牡蛎物种多样性单一。以前研究报道表明, 在牡蛎礁中有近江牡蛎的分布, 但是本次研究没有发现此种的存在, 因此我们认为进一步对牡蛎礁上物种种类进行详细调查分析, 能够更全面的反映当地牡蛎种类多样性。

4　结论

通过本研究, 发现天津沿海牡蛎的物种多样性比较低, 与前期研究结果相比没有发现近江牡蛎, 可能与人类活动影响密切相关。无论从本研究结果, 还是前期研究的发现, 我们可以看出, 人类活动对牡蛎的野生生境都产生了严重的影响, 呼吁大家在利用海洋资源的同时要更加注意对海洋资源的保护。

参考文献:

[1] 张玺, 楼子康. 中国牡蛎的研究[J]. 动物学报, 1956, 8(1): 65-94.
Zhang Xi, Lou Zikang. Studies of Chinese oysters[J]. Acta Zoologica Sinica, 1956, 8(1): 65-94.

[2] 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.
Zhao Ruyi, Cheng Jimin, Zhao Dadong. Fauna sinica of marine molluscs in Dalian[M]. Beijing: Ocean Press, 1982: 167.

[3] 徐凤山, 黄修明. 中国近海牡蛎超科的新记录[C]. 海洋科学集刊. 北京: 科学出版社, 1993: 175-179.
Xu Fengshan, Huang Xiuming. New records of Ostreacea from the China Seas[C]. Studia Marina Sinica. Beijing: Science Press, 1993: 175-179.

[4] 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[C]. 海洋科学集刊. 北京: 科学出版社, 1994: 143-178.
Li Xiaoxu, Qi Zhongyan. Studies on the comparative anatomy, systematic classification and evolution of Chinese oysters[C]. Studia Marina Sinica. Beijing: Science Press, 1994: 143-178.

[5] 王海艳. 中国近海常见牡蛎分子系统演化和分类的研究[D]. 山东青岛: 中国科学院海洋研究所(博士论文) , 2004: 39-62.
Wang Haiyan. Studies on the molecular phylogeny and taxonomy of common oysters in China seas[D]. Qingdao Shandong Province: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences (Doctoral Dissertation), 2004: 39-62.

[6] Wang H Y, Zhang G F, Liu X, et al. Classification of common oysters from North China[J]. Journal of Shellfish Research, 2008, 27(3): 495-503.

[7] 王海艳, 张涛, 马培振, 等. 中国北部湾潮间带现生贝类图鉴[M]. 北京: 科学出版社, 2016: 102-108.
Wang Haiyan, Zhang Tao, Ma Peizhen, et al. Molluska of the Intertidal Zone of Beibu Gulf, China[M]. Beijing: Science Press, 2016: 102-108.

[8] 张光玉, 汪苏燕. 天津湿地与古海岸遗迹[M]. 北京: 中国林业出版社, 2008: 1-8.
Zhang Guangyu, Wang Suyan. Tianjin wetland and ancient coast[M]. Beijing: China Forestry Press, 2008: 1-8.

[9] 苏振礼, 张全跃. 沧海桑田的历史见证: 天津古海岸遗迹[J]. 地图, 2004: 40-43.
Su Zhenli, Zhang Quanyue. Historical witness: Tianjin ancient coastal relics[J]. Map, 2004: 40-43.

[10] 林露菲. 天津古海岸与湿地自然保护区的保护与利用研究[D]. 天津: 天津大学(硕士论文), 2010: 1-72.
Lin Lufei. Study on protection and use in the nature reserve of the ancient coast and wetland of Tianjin[D]. Tianjin: Tianjin University (Master Dissertation), 2010: 1-72.

[11] Wang H Y, Guo X M. Identification of *Crassostrea ariakensis* and related oysters by multiplex species-specific PCR[J]. Journal of Shellfish Research, 2008, 27(3): 481-487.

[12] Folmer O, Black M, Hoeh W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates[J]. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 1994, 3(5): 294-299.

[13] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876-4882.

[14] Posada D, Buuckley T R. Model selection and model averaging in phylogenetics: Advantages of akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests[J]. Systematic Biology, 2004, 53(3): 793-808.

[15] Ronquist F, Huelsenbeck J P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models [J]. Bioinformatics, 2003, 19(12): 1572-1574.

[16] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874.

[17] 吕晓燕. 熊本牡蛎人工繁育与长牡蛎单体苗种培育技术研究[D]. 青岛: 中国海洋大学(硕士论文), 2013: 1-58.
Lü Xiaoyan. Studies on the techniques of artificial reproduction of the *Crassostrea sikamae* and cultivation of the cultchless spat of *Crassostrea gigas*[D]. Qingdao: Ocean University of China (Master Dissertation), 2013: 1-58.

[18] 袁秀珍. 北海涠洲岛潮间带底栖贝类调查[J]. 生物学通报, 1998, 33(6): 11-13.
Yuan Xiuzhen. Investigation of benthic shellfish in intertidal zone of Weizhou Island, Beihai[J]. The Biological Bulletin, 1998, 33(6): 11-13.

[19] 蔡英亚, 谢绍河. 广东的海贝[M]. 汕头: 汕头大学出版社, 2006: 271-276.
Cai Yingya, Xie Shaohe. Seashells of Guangdong [M]. Shantou: Shantou University press, 2006: 271-276.

[20] 李翠, 王海艳, 刘春芳, 等. 广西北部湾沿海牡蛎的种类及其分布[J]. 海洋与湖沼, 2013, 44(9): 1318-1324.
Li Cui, Wang Haiyan, Liu Chunfang, et al. Classification and distribution of oyster off coastal Guangxi, China[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2013, 44(9): 1318-

1324.
[21] Li C, Wang H Y, Guo X M. Classification and taxonomic revision of two oyster species from Peru: *Ostrea megodon* (Hanley, 1846) and *Crassostrea talonata* (Li & Qi, 1994)[J]. Journal of Shellfish Research, 2017, 36(2): 359-364.
[22] 全为民, 沈新强, 罗民波, 等. 河口地区牡蛎礁的生态功能及恢复措施[J]. 生态学杂志, 2006, 25(10): 1234-1239.
Quan Weimin, Shen Xinqiang, Luo Minbo, et al. Ecological function and restoration measures of oyster reef in estuaries [J]. Chinese Journal of Ecology, 2006, 25(10): 1234-1239.
[23] Mauro F R, Maria C R, Wolfgang C P. High Zn and Cd accumulation in the oyster *Crassostrea rhizophorae*, and its relevance as a sentinel species[J]. Marine Pollution Bulletin, 2003, 46: 1341-1358.
[24] 范昌福, 裴艳东, 田立柱, 等. 渤海湾西部浅海区活牡蛎礁调查结果及资源保护建议[J]. 地质通报, 2010, 29(5): 660-667.
Fan Changfu, Pei Yandong, Tian Lizhu, et al. Living oyster reefs and its resource conservation in western Bohai Bay, China [J]. Geological Bulletin of China, 2010, 29(5): 660-667.

Diversity of oyster species along coastal Tianjin based on Species-specific PCR and Mitochondrial genetic markers

HUANG Jin-wei[1], ZHANG Tian-zhe[2], GAO Yan[3], WU Hong[1], GAO Yu[1], YAN Chun-cai[1], HU Li-sha[4]

(1. College of Life Science, Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China; 2. No.1 Middle School of Tianjin Baodi District, Tianjin 301800, China; 3. Tianjin Bohai Fishery Research Institute, Tianjin 300221, China; 4. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Received: Jul. 23, 2019
Key words: Tianjin; oyster; Species-specific molecular markers; COI; distribution

Abstract: Tianjin is located in northwest of Bohai bay with long coastline and the large oysters biomass, but there is no detailed report on the composition of oyster species in Tianjin coastal area. To understand the diversity of oyster species in Tianjin coastal area, a total of 230 wild oysters were collected randomly, species-specific polymerase chain reaction (PCR) and COI (cytochrome oxidase gene subunit Ⅰ) gene sequences were used to recognize the collected oysters. Species-specific PCR could identify and confirm oyster species quickly. The results showed that *Crassostrea gigas gigas* was the dominant species in Tianjin coastal water. Another species which could not be confirmed by Species-specific PCR is identified as *Crassostrea talonata* by morphology and Blasting COI sequences in Genbank. Combining morphology and molecular biology, the analysis showed that two oysters *Crassostrea gigas gigas* and *Crassostrea talonata* were distributed in Dashentang, and only *C. gigas gigas* was distributed in other four sites. Overall, species diversity of oyster in Tianjin coastal area was very low, which may be related to the ecological environment of oyster growth, such as water temperature and salinity in the northern coastal intertidal zone. The oysters collected in our research were generally thin, which may be related to frequent artificial fishing. Results of our research provide a reference for the species diversity and distribution of oysters in Tianjin coastal water, for other related research, and a basis for conservation of the indigenous wild oysters.

(本文编辑: 赵卫红)