

基于 16S rDNA 基因序列探讨引进物种紫扇贝 (*Argopecten purpuratus*)在海湾扇贝属 (*Argopecten*)中的分类地位*

胡丽萍^{1,2} 姜黎明³ 黄晓婷¹ 包振民¹

(1. 中国海洋大学海洋生物遗传学与育种教育部重点实验室 青岛 266003; 2. 烟台市水产研究所 烟台 264003;
3. 山东东方海洋科技股份有限公司 烟台 264000)

摘要 秘鲁紫扇贝(*Argopecten purpuratus*)于 2008 年被引进我国,与海湾扇贝(*Argopecten irradians irradians*)成功杂交。为探讨紫扇贝在海湾扇贝属中的分类地位及与相似种海湾扇贝的进化关系,随机选取紫扇贝和海湾扇贝各 10 个个体,利用通用引物进行 16S rDNA 基因片段扩增并双向测序。序列分析结果表明,紫扇贝和海湾扇贝扩增获得基因片段长度均为 542bp,碱基组成 A+T 所占比例分别为紫扇贝 54.2%和海湾扇贝 55.1%。紫扇贝和海湾扇贝种内分别有 6 和 10 个变异位点,种间有 41 个变异位点,且种内和种间变异均为转换或者颠换,无插入/缺失类型。结合 GenBank 同源序列信息,对海湾扇贝属物种进行遗传距离分析及分子系统树的构建。结果表明:海湾扇贝属 7 种扇贝[紫扇贝(*A. purpuratus*)、*A. irradians*、墨西哥湾扇贝(*A. i. concentricus*)、*A. i. irradians*、*A. nucleus*、*A. gibbus*和 *A. ventricosus*]在系统树上聚为 2 支,与紫扇贝亲缘关系最近的是 *A. ventricosus*,且该两种扇贝单独聚为一支。其余 5 种扇贝中,*A. irradians*、*A. i. concentricus* 和 *A. i. irradians* 最先聚为一支,支持 *A. i. concentricus* 和 *A. i. irradians* 为 *A. irradians* 两个亚种的结论;另外,*A. nucleus* 与以上三者也有很近的亲缘关系。该研究结果为海湾扇贝属物种进化、迁移及其遗传育种研究提供了理论基础。

关键词 紫扇贝; 海湾扇贝属; 16S rDNA; 系统发生; 杂交育种

中图分类号 S917.4 **doi:** 10.11693/hyhz20160600120

紫扇贝(*Argopecten purpuratus*, Lamarck, 1819)是原产于南太平洋的一种优质扇贝,具有出肉率高、味道鲜美、生长快速、抗逆性强、足丝发达等特点,当地生长 14—16 个月可达商品规格(9cm),经济价值高,其加工产品在美国和欧洲深受欢迎,智利和秘鲁等地已开展大规模的人工养殖。目前对该扇贝的研究主要集中在生理生态条件(Navarro *et al*, 2000, 2006; Díaz *et al*, 2006; Avendaño *et al*, 2008)、壳色遗传(Winkler *et al*, 2001)等方面,分子生物学的研究鲜有报道。青岛农业大学王春德教授于 2008 年从秘鲁引

进紫扇贝并繁育成功(王春德等, 2009)。但紫扇贝适宜养殖温度范围较窄(12—26℃),在我国北方海区无法越冬,山东以南海区不能度夏,这给该扇贝的养殖推广带来了困难。

海湾扇贝(*Argopecten irradians irradians*, Lamarck, 1819),原产于美国大西洋沿岸,于 1982 年从美国引进中国(张福绥等, 1986),以生长快著称,且耐温范围较广(-1—31℃),已成为我国主要扇贝养殖品种(张福绥等, 2000)。考虑到紫扇贝和海湾扇贝同属于海湾扇贝属(*Argopecten*),且两者存在互补性状,王

* 现代农业产业技术体系建设项目, CARS-48 号; 山东省农业良种工程重大课题; 山东省现代农业产业技术体系贝类产业创新团队建设项目, SDAIT-14-11 号。胡丽萍, 博士, 工程师, E-mail: liping.hu1985@163.com

通讯作者: 黄晓婷, 副教授, E-mail: xthuang@ouc.edu.cn

收稿日期: 2016-06-08, 收修改稿日期: 2016-07-13

春德等(2009)尝试将引进的紫扇贝和海湾扇贝杂交,成功获得具有显著杂种优势的杂交种,不仅生长迅速、抗逆性也明显增强,特别是在山东地区能够顺利度夏和越冬,显示了巨大的产业潜力。然而,对于这一全新引进的扇贝物种,对其遗传学及种质资源的评估资料仍处短缺状态。

线粒体 DNA(mtDNA)作为核外遗传物质,具有分子量小、结构简单、进化速度快等特点,适合于种群遗传分析及分子系统进化的研究(Meyer, 1993; Canapa *et al*, 2000; Sunetha *et al*, 2000; 辛俭等, 2014)。mtDNA 中的 16SrDNA 序列在种内遗传多样性和种间系统学关系的研究中占有重要的地位(Foighil *et al*, 1995; Schnelder *et al*, 1999; Lakra *et al*, 2009)。本研究通过测定紫扇贝和海湾扇贝 mtDNA 16S rDNA 基因片段序列,分析了紫扇贝在中国繁殖后代中的遗传变异趋势,并计算了两个扇贝物种的基因差异和遗传距离。结合 GenBank 中海湾扇贝属及我国本土扇贝物种——栉孔扇贝相应片段进行比较并进行系统进化分析,从分子水平上了解紫扇贝的遗传背景及其系统进化地位,以期扇贝种质资源保护及杂交育种策略提供基础性资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

紫扇贝和海湾扇贝均于2010年10月下旬取自山东省青岛市胶南扇贝养殖场,养殖水环境条件为:水温16℃,盐度30, pH8.2。每个物种各取10个个体,活体解剖取扇贝闭壳肌,于液氮冷冻后转-80℃超低温冰箱保存备用。其中紫扇贝为引种后繁殖的子一代个体,平均壳高4.81cm,平均体重27.36g,海湾扇贝是从当地养殖场中随机选取个体,平均壳高4.63cm,平均体重26.62g。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取和检测 取约100mg扇贝闭壳肌组织,采用标准的酚-氯仿方法(Sambrook *et al*, 1989)提取基因组 DNA,将乙醇沉淀后的基因组 DNA 溶解于100μL 的 TE 溶液中,用紫外分光光度计测定其浓度和纯度,然后将基因组 DNA 稀释至50ng/μL,4℃下保存备用。

1.2.2 16S rDNA 的序列扩增及序列测定 实验用16S rDNA 引物序列为:16SF (5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3')和16SR (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3') (Canapa *et al*, 2000),引物由上海生工公

司合成。PCR 反应总体积为50μL,体系中包括:1×PCR 缓冲液,1.5mmol/L 的 MgCl₂,0.2mmol/L 的 dNTP,1μmol/L 的正反向引物,1U 的 Taq DNA 聚合酶(TAKARA),100ng 的 DNA 模板。PCR 扩增反应程序:94℃,5min 预变性;然后30个循环,94℃,45s 变性,55℃,45s 退火,72℃,1min 延伸;最后72℃进行5min 延伸,置于4℃保存。

取5μL 扩增产物经1%的琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色后紫外观察拍照。剩余 PCR 产物采用 Sangon PCR 产物纯化试剂盒进行回收及纯化,具体方法按试剂盒说明书步骤进行。纯化后的 DNA 片段测序采用 ABI PRISM 3730XL 测序仪完成,测序引物为 PCR 扩增引物。

1.2.3 序列分析 用 BioEdit 软件去掉序列两端不可信部分,采用 Clustalx1.81 进行序列对齐排序,使用 Genedoc 软件进行人工校正。然后应用 MEGA5.1 软件计算分子变异参数如多态性位点,转换、颠换及插入缺失位点等,并根据 Kimura 双参数方法计算遗传距离。

1.2.4 序列下载 从 GenBank 下载7种海湾扇贝属扇贝以及外群栉孔扇贝的16S rDNA 同源序列,序列信息见表1。

1.2.5 系统发生分析 利用 MEGA5.1 软件并根据 Kimura 双参数模型计算遗传距离,以栉孔扇贝作外

表1 用于系统分析的扇贝物种及其 GenBank 注册号
Tab.1 Species used for the phylogenetic analysis and GeneBank accession number

种类	GenBank 序列号
<i>Argopecten irradians</i> (Lamarck,1819)	AF526235
<i>Argopecten irradians irradians</i> (Lamarck,1819)	AF362383
<i>Argopecten irradians concentricus</i> (Say, 1822)	AF362384
<i>Argopecten purpuratus</i> (Lamarck,1819)	EU379472
<i>Argopecten nucleus</i> (Born,1780)	EU379461
<i>Argopecten gibbus</i> (Linnaeus, 1758)	EU379443
<i>Argopecten ventricosus</i> (Sowerby, 1842)	AJ972429
<i>Chlamys farreri</i> (Jones et Preston, 1940)	GU119980

群, 分别采用邻接(neighbour-joining, NJ)法和最大似然(maximum-likelihood, ML)法对海湾扇贝属物种构建分子系统树, 采用重抽样法(Bootstrap)1000 检验系统树分枝的置信度。

2 结果

2.1 紫扇贝与海湾扇贝 DNA 序列组成及变异

经 PCR 扩增, 分别得到了两种扇贝清晰的 16S rDNA 基因片段扩增产物(图 1)。经序列测定, 大小均为 542bp(含引物序列)(图 2)。通过 MEGA5.1 对两种扇贝 16S rDNA 基因片段序列的平均 A、T、G、C 含量进行计算, 结果见表 2。紫扇贝与海湾扇贝的碱基组成差异不大, 相应碱基比例相当, 且 A+T 所占的比

例略大于 G+C, 分别为紫扇贝 54.2%和海湾扇贝 55.1%。

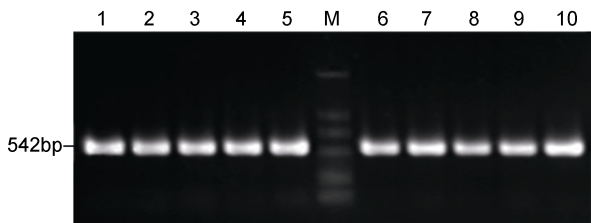


图 1 紫扇贝和海湾扇贝 16S rDNA 基因片段的 PCR 扩增产物

Fig.1 PCR amplified products of 16S rDNA gene fragment in *Argopecten purpuratus* and *Argopecten irradians irradians*
注: M: DL2000 Marker; 泳道 1—5: 紫扇贝; 泳道 6—10: 海湾扇贝

a	001	CGCCTGTTTA	TCAAAAACAT	GGCTCCTTGA	AATCATAAGG	AGTCGTGCCT	TCCCGGTGAG
	071	TTTAAACTTA	AACGGATGCG	GTAAAGCGTG	CTAAGGTAGC	TAAGTTATGG	CCTAGTTAAT
	121	TGTAGGCCCT	GTGAATGGTT	TGACGAGTTT	TCTTCTGTCT	CTAGCTTGTT	TTAGTGAAC
	181	TGAATTGGAT	GTGCAAATGC	TTCCTTGCGA	AAGAAAGACG	AGAAGACCCC	GTGAAGTTAG
	241	AAATCTATGT	GCGTGGAGGT	AGAAGGTTAC	TTCCCTTAGC	TTATGGTTTT	GGCTGGGGCA
	301	GCAAGGGGCG	AAAATTAGAC	CCCTTTATTC	TAAGTGCTGG	TGAGCAATGA	CCCATAGTTT
	361	TAGAGGGTAT	GATTAGTAGA	AGAAGTTACT	CCGGGGATAA	CAGCGTAATC	CGTCTTGACA
	421	GTTCTTATAG	ATGGGCGGGT	TTGCGACCTC	GATGTTGGCT	CTGGATGTCC	TGAAGCTGTA
	481	GGCGGTTTCA	AGGGTTGGTT	CGTTCGCCCA	TTAAATCCCA	ACGTGATCTG	AGTTCAGACC
	541	GG					
b	001	CGCCTGTTTA	TCAAAAACAT	GGCTCCTTGA	TAACATAAGG	AGTCGTGCCT	TCCCGGTGAG
	071	TTTAAACTTA	AACGGATGCG	GTAAAGCGTG	CTAAGGTAGC	TAAGTTATGG	CCTAGTTAAT
	121	TGTAGGCCCT	GTGAATGGTT	TGACGAGTTT	TCTTCTGTCT	CTAGCTTGTT	TAAGTGAAC
	181	TGAGTTGGAT	GTGCAAATGC	TTCCTTGGTA	AAGAAAGACG	AGAAGACCCC	GTGAAGTTAG
	241	AAATTAATGT	GCAGAATAGT	GGGAGGCTAC	TTTTTCTGCC	TTATAGTTTT	GGCTGGGGCA
	301	GCAAGGGGCG	AAAAGTAGAC	CCCTTAAAAT	TTAATTCTGG	TGAGTAATGA	CCCATAAGGT
	361	TTAAGGGTAT	GATTAGTAGA	AGAAGTTACT	CCGGGGATAA	CAGCGTAATC	CGCCTTGACA
	421	GTCCTTATAG	ATGGGTGGGT	TTGCGACCTC	GATGTTGGCT	CTGGATGTCC	TGAAGCTGTA
	481	GGCGGTTTCA	AGGGTTGGTT	CGTTCGCCCA	TTAAATCCCA	ACGTGATCTG	AGTTCAGACC
	541	GG					

图 2 紫扇贝(a)和海湾扇贝(b)的 16S rDNA 基因片段核苷酸序列(主导类型)

Fig.2 The nucleotide sequences of 16S rDNA gene fragments in *A. purpuratus* (a) and *A. i. irradians* (b)

表 2 两种扇贝 16S rDNA 基因片段长度及碱基组成

Tab.2 Base composition of 16S rDNA gene fragment in two scallop species

物种	实验个体数	单倍型数	片段长度(bp)	平均碱基含量(%)				
				T	C	A	G	A+T
紫扇贝(<i>A. purpuratus</i>)	10	6	542	29.7	18.1	24.5	27.7	54.2
海湾扇贝(<i>A. i. irradians</i>)	10	6	542	29.5	17.6	25.6	27.4	55.1

对紫扇贝 10 个个体, 海湾扇贝 10 个个体, 应用 ClustalX1.81 和 MEGA5.1 进行种内及种间序列的比对分析。种内序列分析表明, 紫扇贝和海湾扇贝种内不同个体序列间的变异均为转换和颠换导致, 且转换位点数多于颠换位点数, 无插入/缺失变异位点。紫扇贝种内序列排序后共检测到 6 个变异核苷酸位点,

其中转换核苷酸位点数为 4 个, 颠换位点数为 2 个; 共检测到 6 种单倍型, 其中主导类型 A 为 5 个个体共有, 其余类型仅为某一个体独有(表 3)。海湾扇贝种内共检测到 10 个变异核苷酸位点, 其中转换位点 7 个, 颠换位点 3 个; 检测到单倍型共 6 种, 其中主导类型 A 为 5 个个体共有, 其余类型仅为某一个体独有(表 4)。

表 3 紫扇贝 16S rDNA 序列多态性核苷酸位点及各单倍型分布情况
Tab.3 Distribution of variable nucleotides and haplotypes in 16S rDNA fragments of *A. purpuratus*

单倍型		A	B	C	D	E	F
核苷酸变异位点	41	A	.	.	.	G	G
	57	T	A	.	.	.	.
	262	G	.	.	A	A	A
	287	T	.	C	.	.	.
	474	A	.	.	.	.	T
	514	A	.	.	.	.	G
单倍型个体数		5	1	1	1	1	1

表 4 海湾扇贝 16S rDNA 序列多态性核苷酸位点及各单倍型分布情况
Tab.4 Distribution of variable nucleotides and haplotypes in 16S rDNA fragments of *A. i. irradians*

单倍型		A	B	C	D	E	F
核苷酸变异位点	184	G	A	A	.	A	A
	201	T	.	.	G	.	.
	209	T	C	.	.	.	.
	281	T	.	A	.	.	.
	285	A	G	G	.	G	G
	324	T	.	.	.	.	C
	397	A	.	.	.	.	G
	408	A	.	.	.	.	G
	410	C	.	.	T	.	.
	513	A	C	.	.	.	.
单倍型个体数		5	1	1	1	1	1

对紫扇贝和海湾扇贝两物种间的变异碱基进行统计, 共得到 41 个变异位点, 且为转换/颠换位点, 无插入/缺失变异。其中转换位点为 23 个, 颠换位点为 16 个, 既有转换又有颠换的位点为 2 个。两物种序列的同源性为 92.4%。

2.2 海湾扇贝属物种遗传分化

紫扇贝和海湾扇贝种内遗传距离范围分别为 0.000—0.009 和 0.000—0.013, 平均为 0.003 和 0.005。海湾扇贝属内种间遗传距离见表 5。所有物种间的遗传距离为 0.007—0.120。最小遗传距离出现在 *A. irradians* 和 *A. nucleus* 之间 (0.007), 而 *A. i. concentricus* 与 *A. ventricosus* 之间的遗传距离最大,

达到 0.120。与紫扇贝 *A. purpuratus* 遗传距离最小的是 *A. ventricosus*, 遗传距离为 0.031, 而与海湾扇贝 *A. i. irradians* 遗传距离最小的是 *A. nucleus*, 遗传距离为 0.008, 甚至在海湾扇贝种内遗传距离范围内 (0.000—0.013)。

2.3 系统发生关系

基于 16S rDNA 基因序列, 应用 NJ 和 ML 分别重建了系统发生树(图 3), 得到的海湾扇贝属物种系统发生树拓扑结构几近一致, 大分支节点的支持率很高。

除外群栉孔扇贝(*C. farrerii*)外, 7 个海湾扇贝属物种明显分为 2 个单系群, 其中一个单系群包括所有的紫扇贝 *A. purpuratus* 和扇贝 *A. ventricosus*, 且置信

表 5 海湾扇贝属不同种类间的遗传距离
Tab.5 Genetic distance based on 16S rDNA region among different species of genus *Argopecten*

	<i>A. irradians</i>	<i>A. i. concentricus</i>	<i>A. i. irradians</i>	<i>A. nucleus</i>	<i>A. gibbus</i>	<i>A. purpuratus</i>	<i>A. ventricosus</i>
<i>A. irradians</i>							
<i>A. i. concentricus</i>	0.011						
<i>A. i. irradians</i>	0.009	0.020					
<i>A. nucleus</i>	0.007	0.018	0.008				
<i>A. gibbus</i>	0.050	0.061	0.050	0.047			
<i>A. purpuratus</i>	0.088	0.100	0.088	0.085	0.088		
<i>A. ventricosus</i>	0.107	0.120	0.107	0.105	0.100	0.031	

度为 100%; 另一个单系群包括了其余 5 个海湾扇贝属物种 *A. irradians*、*A. i. concentricus*、*A. i. irradians*(包括供试 6 个海湾扇贝)、*A. nucleus* 和 *A. gibbus*。该单系群又分为两个分支, 一个分支仅包含 *A. gibbus* 一个种, 其余海湾扇贝属物种 *A. irradians*、*A. i. concentricus*、*A. i. irradians* 和 *A. nucleus* 聚为另一分支。在 NJ 树和 ML 树中, 均为 *A. irradians*、*A. i. concentricus* 和部分 *A. i. irradians* 个体序列首先聚为一支, 再与其余测试 *A. i. irradians* 个体以及 *A. nucleus* 聚类。

3 讨论

3.1 16S rDNA 序列在贝类遗传学研究中的应用

DNA 分子测序技术的快速发展, 使得线粒体(mtDNA)基因序列的多态性分析更为简单和方便。mtDNA 上不同基因因其进化速率不同, 遗传变异解析能力也不同, 如 16S rDNA 基因, 已被广泛应用于海洋贝类分子遗传多样性研究(Mahidol *et al.*, 2007)、种质鉴定(Kong *et al.*, 2009)及种属间的分子系统学研究(Saavedra *et al.*, 2006; Lakra *et al.*, 2009)等。Boulding 等(1993)通过对虾夷扇贝一个养殖群体和两个野生群体样品进行 16S rDNA 基因分析, 检测到了丰富的遗传变异; 刘亚军等(2002)和苏天凤等(2005)分别在不同栉孔扇贝地理种群和近江牡蛎中也检测到了较高的遗传变异。李霞等(2009)通过对海扇贝、虾夷扇贝、栉孔扇贝和海湾扇贝 16S rDNA 同源序列的比对发现, 它们分别存在 3、7、8、13 个差异位点, 核苷酸变异位点较为丰富, 且碱基颠换和插入变异比例大于碱基转换。本研究中, 对紫扇贝和海湾扇贝的 16S rDNA 基因同源序列检测分析表明, 两者种内分别存在 6 和 10 个差异位点, 核苷酸变异也较丰富。与李霞等(2009)结论不同的是, 本研究中的紫扇贝和海湾扇贝同源序列间的变异均来自转换或者颠换, 无插入/缺

失变异, 且转换位点多于颠换位点。这些变异位点可用于分子系统学和遗传学的分析。

3.2 扇贝 16S rDNA 碱基组成及变异分析

在紫扇贝和海湾扇贝检测样品中, 4 种碱基(A、T、G、C)在两个扇贝物种中的组成比例相当, 均为 C 碱基比例较低, 其余三种碱基含量较为接近。对本研究中海湾扇贝属所有扇贝物种的碱基组成分析后的结果与之一致, 且均表现为 A+T 含量高于 G+C 含量(A+T 占比 52.6%—55.5%), 这一结果与其他研究者在双壳贝类的 16S rDNA、12S rDNA 和 COI 基因碱基组成分析中观察到的结果一致(Boulding *et al.*, 1993; 孔晓瑜等, 2001; 李霞等, 2009)。另外, 在头足类(Anderson, 2000; Zheng *et al.*, 2001)和甲壳类(高天祥等, 2000)等的线粒体基因碱基组成分析中也发现有类似的现象。推测 mtDNA 具有较高的 A+T 含量可能在无脊椎动物中是一种普遍现象。

从遗传学角度来说, 一个物种种内核苷酸变异值的大小在一定程度上反映了物种的遗传多样性, 而一个物种遗传多样性水平的高低与其适应环境、生存及进化能力是紧密关联的(刘亚军等, 2002)。遗传多样性水平降低可能会导致物种的适应性和生存能力下降, 并最终导致物种种质的衰退。本研究对紫扇贝和海湾扇贝 16S rDNA 基因片段序列的种内变异分析结果表明, 紫扇贝的遗传变异水平较海湾扇贝低, 这可能是由于紫扇贝试验样本作为子一代, 仅由少数几个引进亲本近交繁育而来, 遗传背景相对单一导致。

mtDNA 上不同基因因其进化速率不同, 遗传变异解析能力也不同。在本研究中, 16S rDNA 基因在紫扇贝和海湾扇贝种内个体及种间检测到的遗传变异较小, 要进行更为准确和全面的研究, 需要结合 mtDNA 其他的基因(如 COI、Cytb 等)序列得到多组序列信息, 甚至可以把 mtDNA 序列数据与核基因组

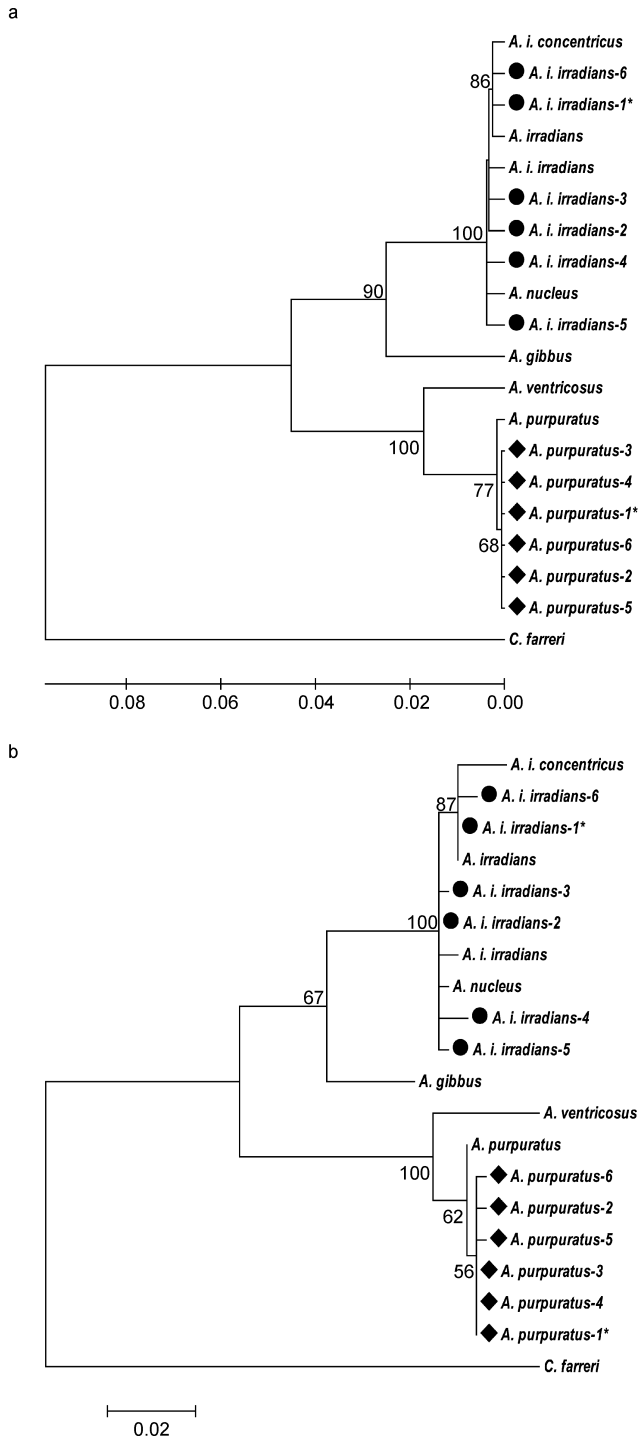


图3 应用 MEGA5.1 软件中邻接法(NJ, a)和最大似然法(ML, b)构建基于 16S rDNA 序列的海湾扇贝属系统发生树

Fig.3 The neighbor-joining phylogenetic tree (a) and maximum-likelihood phylogenetic tree (b) constructed based on 16S rDNA sequences of *Argopecten* species using MEGA5.1
注: 分支处数字为大于 50% 的 Bootstrap 值(1000 次重复); ● 标记本研究供试海湾扇贝; ◆ 标记本研究供试紫扇贝; * 表示包含 5 个完全相同序列的个体

DNA 数据结合起来, 共同用于对物种遗传变异的分析,

从而获得较为客观、全面的物种遗传多样性数据。

3.3 海湾扇贝属各物种间的亲缘关系

基于线粒体基因序列探讨物种亲缘关系的研究在双壳贝类研究中已非首例。Canapa 等(2000)通过对扇贝科 6 种扇贝 16S rDNA 基因序列的比较分析, 探讨了这些扇贝物种的系统发生关系。Barucca 等(2004)采用线粒体 16S 和 12S rDNA 基因序列的比较分析, 对多种扇贝科物种进行了亲缘关系分析, 其中涉及的海湾扇贝属物种仅有 *A. irradians*。在 Saavedra 等(2006)基于 16S 和 12S rDNA 基因序列对美国多种双壳贝类的系统发生关系研究中, 包含的海湾扇贝属物种也仅有 *A. purpuratus* 和 *A. ventricosus*。包含海湾扇贝属扇贝种类最多的是 Puslednik 等(2008)的研究, 该研究通过对两种线粒体基因(16S 和 12S rDNA)和一个核基因(H3 组蛋白)的序列分析, 对扇贝 46 个物种构建了 ML 系统发生树。其中涉及的海湾扇贝属 5 种扇贝被分为两个大支, 其中一支包含 *A. purpuratus* 和 *A. ventricosus*; 另外一支包含其余 3 个扇贝物种 *A. irradians*、*A. nucleus* 和 *A. gibbus*, 且 *A. irradians* 和 *A. nucleus* 首先聚为一组, 这与我们的研究结果一致。然而, 对本研究中 *A. i. irradians*(供试海湾扇贝)和 *A. i. concentricus* 的系统进化及分子遗传学分析在以往的研究中均无报道。

A. i. irradians(美国海湾扇贝)最早于 1982 年引进我国, 是原产于美国大西洋沿岸的一种海湾扇贝, 而 *A. i. concentricus*(墨西哥湾扇贝)同样属于美国大西洋沿岸的海湾扇贝亚种, 于 1991 年被引入中国并被成功养殖(张福绥等, 1994, 2000)。本研究中, 物种遗传距离分析结果表明, *A. i. irradians* 和 *A. i. concentricus* 与海湾扇贝 *A. irradians* 的遗传距离分别为 0.009 和 0.011, 均处于海湾扇贝的种内遗传距离范围(0.000—0.013)之内, 而 *A. i. irradians* 与 *A. i. concentricus* 之间的遗传距离(0.020)却大于海湾扇贝种内的最大遗传距离, 由此可以做出推测: *A. i. irradians* 与 *A. i. concentricus* 为海湾扇贝种(*A. irradians*)的两个不同地理种群, 因受不同环境条件影响而导致遗传物质发生改变, 从而分化为海湾扇贝的两个亚种。同样的, 从遗传距离角度考虑, *A. nucleus*(加勒比海扇贝)与 *A. irradians*、*A. i. irradians* 和 *A. i. concentricus* 的遗传距离分别为 0.007、0.008 和 0.018, 在系统树构建中, *A. nucleus* 与以上三者也最早聚在一起, 表现出与三种海湾扇贝具有非常近的亲缘关系, 仅从 16S rDNA 基因分析推测, *A.*

nucleus 还未达到种的分化程度,可将其归属海湾扇贝的一个亚种,然而该结论还需要更多的证据来证明。

3.4 杂交育种亲本的选择

杂交育种是贝类新品种选育的基本方法之一,也是培育优良品种的重要方法。迄今为止,国内外已有一些贝类杂交的研究报道,在获得优势杂种的工作中取得了一定成绩(Bower *et al.*, 1997; 常亚青等, 2002; 刘小林等, 2003)。在国内,很多学者对栉孔扇贝、虾夷扇贝、海湾扇贝以及华贵栉孔扇贝等多种经济扇贝物种进行了杂交尝试,并对杂交子代基因组的组成和变异进行了研究(刘宪杰等, 2006; Huang *et al.*, 2011)。杂交实验证明了扇贝间的杂交具有可行性,但是,获得的杂交子代却仅发育到早期幼虫阶段便夭折,一直未能获得可成活的杂种成体扇贝。然而,本研究中涉及的紫扇贝和海湾扇贝已被证实其杂交可获得具有明显杂种优势的子一代成体(Wang *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2013)。在杂交育种工作中,亲本的选配在很大程度上决定了育种计划的成败。当两亲本遗传分化太大时,可能会因为两者遗传物质不相容而无法成功获得杂交后代;而当两亲本遗传分化不明显时,又会无法产生杂种优势。已有的扇贝杂交试验也证实了这一点,对栉孔扇贝、虾夷扇贝、海湾扇贝以及华贵栉孔扇贝间的杂交均为属间杂交,两亲本的遗传分化较大;而紫扇贝和海湾扇贝的杂交尝试却为属内种间杂交,亲本遗传分化相对较小,两者遗传物质相容,并可稳定遗传给子代。

通过遗传分化及聚类分析可以看出,紫扇贝(*A. purpuratus*)和海湾扇贝(*A. i. irradians*)被分在两个不同的单系群中,且两者的遗传距离为 0.088,与之类似,遗传差异稍大的紫扇贝(*A. purpuratus*)和墨西哥湾扇贝(*A. i. concentricus*)(遗传距离为 0.100)已成功进行杂交试验,且杂种后代优势明显(南乐红等, 2012)。聚在同一个单系群中的扇贝遗传距离均小于紫扇贝和海湾扇贝的遗传距离(0.088),也即遗传分化较小。鉴于遗传差异小的亲本较易实现杂交,可考虑将聚在同一个单系群中的扇贝物种用作亲本进行杂交育种尝试。

4 结论

本研究利用线粒体 16S rDNA 序列分析了我国两种引进海湾扇贝属物种的遗传变异水平,并结合已发表相关序列信息对海湾扇贝属物种进行分子系统发生分析。研究结果为海湾扇贝属物种进化提供参考,

为海湾扇贝属物种的引种以及通过杂交手段开展育种工作提供依据。此外,为了更加准确地阐述紫扇贝和海湾扇贝这两个引进物种的进化关系以及遗传变异水平,综合利用多种序列和多种分析手段进行讨论将是我们下一步需要展开的工作。

参 考 文 献

- 王春德, 刘宝忠, 李继强等, 2009. 紫扇贝与海湾扇贝种间杂交的研究. 海洋科学, 33(10): 84—87, 91
- 孔晓瑜, 刘亚军, 喻子牛等, 2001. 栉孔扇贝和海湾扇贝线粒体 DNA 16S rRNA 基因片段序列研究. 见: 中国贝类学会主编. 贝类学论文集. 北京: 海洋出版社, 59—63
- 刘小林, 常亚青, 相建海等, 2003. 栉孔扇贝不同种群杂交效果的初步研究 I. 中国种群与俄罗斯种群的杂交. 海洋学报, 25(1): 93—99
- 刘亚军, 喻子牛, 姜艳艳等, 2002. 栉孔扇贝 16S rRNA 基因片段序列的多态性研究. 海洋与湖沼, 33(5): 477—483
- 刘宪杰, 常亚青, 2006. 扇贝种间杂交的可行性及幼体早期发育的初步研究. 大连水产学院学报, 21(4): 346—349
- 苏天凤, 江世贵, 周发林等, 2005. 近江牡蛎 16S rRNA 基因片段序列变异分析. 高技术通讯, 15(2): 100—103
- 李 霞, 秦艳杰, 初冠因等, 2009. 采用 16S rRNA 基因序列分析海扇贝与 3 种扇贝的亲缘关系. 大连水产学院学报, 24(3): 269—273
- 辛 俭, 张玉荣, 徐冬冬等, 2014. 基于线粒体 16S rDNA 和 COI 基因探讨中国近海黄姑鱼类的分子系统进化关系. 海洋与湖沼, 45(2): 307—313
- 张福绥, 何义朝, 元铃欣等, 1994. 墨西哥湾扇贝的引种和子一代苗种培育. 海洋与湖沼, 25(4): 372—377
- 张福绥, 何义朝, 刘祥生等, 1986. 海湾扇贝引种、育苗及试养. 海洋与湖沼, 17(5): 367—374
- 张福绥, 何义朝, 杨红生, 2000. 海湾扇贝引种工程及其综合效应. 中国工程科学, 2(2): 30—35
- 南乐红, 张金盛, 丰 玮等, 2012. 紫扇贝和墨西哥湾扇贝种间杂交的初步研究. 中国农学通报, 28(20): 131—135
- 高天祥, 张秀梅, 吉崎悟朗等, 2000. 中华绒螯蟹和日本绒螯蟹线粒体 12S rRNA 基因序列研究. 中国海洋大学学报, 30(1): 43—47
- 常亚青, 刘小林, 相建海等, 2002. 栉孔扇贝中国种群与日本种群杂交一代的早期生长发育. 水产学报, 26(5): 385—390
- Anderson F E, 2000. Phylogeny and historical biogeography of the Loliginid squids (Mollusca: Cephalopoda) based on mitochondrial DNA sequence data. Molecular Phylogenetics and Evolution, 15(2): 191—214
- Avendaño M, Cantillán M, Thouzeau G, 2008. Effects of water depth on survival and growth of *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) spat in northern Chile. Aquaculture International, 16(5): 377—391
- Barucca M, Olmo E, Schiaparelli S *et al.*, 2004. Molecular phylogeny of the family Pectinidae (Mollusca: Bivalvia) based on mitochondrial 16S and 12S rRNA genes. Molecular Phylogenetics and Evolution, 31(1): 89—95
- Boulding E C, Boom J D C, Beckenbach A T, 1993. Genetic

- variation in one bottlenecked and two wild populations of the Japanese scallop (*Patinopecten yessoensis*): empirical parameter estimates from coding regions of mitochondrial DNA. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50(6): 1147—1157
- Bower S M, Blackburn J, Meyer G R, 1997. A new and unusual species of *Perkinsus* pathogenic to cultured Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, in British Columbia, Canada. *Journal of Shellfish Research*, 16: 333
- Canapa A, Barucca M, Marinelli A *et al*, 2000. Molecular data from the 16S rRNA gene for the phylogeny of Pectinidae (Mollusca: Bivalvia). *Journal of Molecular Evolution*, 50(1): 93—97
- Díaz M A, Silva M C, Forner J P, 2006. Effect of immersion time of cultch on spatfall of the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819) in the Marine Reserve at La Riconada, Antofagasta, Chile. *Aquaculture International*, 14(3): 267—283
- Foighil D Ó, Gaffney P M, Hilbish T J, 1995. Differences in mitochondrial 16S ribosomal gene sequences allow discrimination among American [*Crassostrea virginica* (Gmelin)] and Asian [*C. gigas* (Thunberg) *C. ariakensis* Wakiya] oyster species. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 192(2): 211—220
- Hu L P, Huang X T, Mao J X *et al*, 2013. Genomic characterization of interspecific hybrids between the scallops *Argopecten purpuratus* and *A. irradians irradians*. *PLoS One*, 8(4): e62432
- Huang X T, Bi K, Hu L P *et al*, 2011. Fertilization and cytogenetic examination of interspecific reciprocal hybridization between the scallops, *Chlamys farreri* and *Mimachlamys nobilis*. *PLoS One*, 6(11): e27235
- Kong L F, Li Q, 2009. Genetic evidence for the existence of cryptic species in an endangered clam *Coelomacra antiquata*. *Marine Biology*, 156(7): 1507—1515
- Lakra W S, Goswami M, Gopalakrishnan A, 2009. Molecular identification and phylogenetic relationships of seven Indian Sciaenids (Pisces: Perciformes, Sciaenidae) based on 16S rRNA and cytochrome c oxidase subunit I mitochondrial genes. *Molecular Biology Reports*, 36(5): 831—839
- Mahidol C, Na-Nakorn U, Sukmanomon S *et al*, 2007. Mitochondrial DNA diversity of the Asian moon scallop, *Amusium pleuronectes* (Pectinidae), in Thailand. *Marine Biotechnology*, 9(3): 352—359
- Meyer A, 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. In: Mochachka P W, Mommsen T P eds. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Amsterdam: Elsevier, 2: 1—38
- Navarro J M, Fernández-Reiriz M J, Labarta U, 2006. Differential absorption of biochemical food components by the scallop *Argopecten purpuratus* exposed to different salinities and food concentrations. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 40(3): 455—466
- Navarro J M, Leiva G E, Martínez G *et al*, 2000. Interactive effects of diet and temperature on the scope for growth of the scallop *Argopecten purpuratus* during reproductive conditioning. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 247(1): 67—83
- Puslednik L, Serb J M, 2008. Molecular phylogenetics of the Pectinidae (Mollusca: Bivalvia) and effect of increased taxon sampling and outgroup selection on tree topology. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48(3): 1178—1188
- Saavedra C, Peña J B, 2006. Phylogenetics of American scallops (Bivalvia: Pectinidae) based on partial 16S and 12S ribosomal RNA gene sequences. *Marine Biology*, 150(1): 111—119
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T A, 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1061
- Schnelder J A, Foighil D Ó, 1999. Phylogeny of giant clams (Cardiidae: Tridacninae) based on partial mitochondrial 16S rDNA gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 13(1): 59—66
- Sunetha K B, Dagle G, Nevdal G, 2000. Analysis of mitochondrial DNA sequences from two *Maurolicus* taxa: evidence for separate species? *Journal of Fish Biology*, 57(6): 1605—1609
- Wang C D, Liu B Z, Li J Q *et al*, 2011. Introduction of the Peruvian scallop and its hybridization with the bay scallop in China. *Aquaculture*, 310(3—4): 380—387
- Winkler F M, Estévez B F, Jollán L B *et al*, 2001. Inheritance of the general shell color in the scallop *Argopecten purpuratus* (Bivalvia: Pectinidae). *Journal of Heredity*, 92(6): 521—525
- Zheng X, Wang R, Xiao S *et al*, 2001. Genetic variation in populations of the common Chinese cuttlefish *Sepiella maindroni* (Mollusca: Cephalopoda) using allozymes and mitochondrial DNA sequence analysis. *Journal of Shellfish Research*, 20(3): 1159—1165

PHYLOGENETIC POSITION OF *ARGOPECTEN PURPURATUS* IN GENUS *ARGOPECTEN* INFERRED BY MITOCHONDRIAL 16S rDNA GENE SEQUENCES

HU Li-Ping^{1,2}, JIANG Li-Ming³, HUANG Xiao-Ting¹, BAO Zhen-Min¹

(1. Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding (MGB), Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Yantai Fisheries Research Institute, Yantai 264003, China; 3. Shandong Oriental Ocean SCI-TECH CO., LTD, Yantai 264000, China)

Abstract Peruvian scallop *Argopecten purpuratus* was introduced to China in 2008 and was successfully hybridized with *A. irradians irradians*. The hybrid offspring exhibited extraordinary heterosis in growth in addition to some new features. To understand the phylogenetic position of *A. purpuratus* in genus *Argopecten*, as well as genetic relationship between *A. purpuratus* and *A. i. irradians*, 10 individuals were randomly sampled from *A. purpuratus* and *A. i. irradians*, and the partial sequences of 16S rDNA genes were amplified by universal primers and sequenced. Genetic information indexes, including nucleotide composition, sequence variation, inter- and intra-specific genetic distance were determined using a suite of biology software. With our native species *Chlamys farreri* as designated outgroup and available sequences from homologous regions of other *Argopecten* species registered in GenBank, phylogenetic trees were constructed based on the neighbor-joining (NJ) and maximum-likelihood (ML) methods. In total, 542bp nucleotide sequences of *A. purpuratus* and *A. i. irradians* were obtained, and the content of A+T was 54.2% and 55.1% in *A. purpuratus* and *A. i. irradians*, respectively. Sequences alignment analysis showed that there were 6 and 10 intraspecific variable nucleotide positions in *A. purpuratus* and *A. i. irradians*, respectively, as well as 41 interspecific variable nucleotide positions between the two species. All the intraspecific and interspecific variable positions were transitional and transversional, while no indels were detected. The genetic distance and phylogenetic trees demonstrate that *A. purpuratus*, *A. irradians*, *A. i. concentricus*, *A. i. irradians*, *A. nucleus*, *A. gibbus*, and *A. ventricosus* form into two clades, of which, *A. purpuratus* is genetically close to *A. ventricosus*, and they cluster as one clade. Among the other 5 species of genus *Argopecten*, *A. gibbus* is the most primitive. The genetic relationship among *A. irradians*, *A. i. concentricus*, and *A. i. irradians* are close, suggesting that *A. i. concentricus* and *A. i. irradians* are subspecies of *A. irradians*. Meanwhile, *A. nucleus* appears closely to these three species of *A. irradians*, *A. i. concentricus*, and *A. i. irradians*. This work provides basic information for future comparative study on species evolution, immigration, and breeding strategies of *Argopecten*.

Key words *Argopecten purpuratus*; genus *Argopecten*; 16S rDNA; phylogeny; hybridization breeding