

# 巨蛎属牡蛎遗传多样性研究

刘必谦 戴继勋

(青岛海洋大学海洋生物工程系, 266003)

**摘 要** 用 RAPD 方法获得的几种牡蛎间的遗传距离表明, 我国北方海域确实存在大连湾牡蛎 (*Crassostrea talienwhanensis*), 褶牡蛎 (*Crassostrea plicatula*) 和近江牡蛎 (*Crassostrea rivularis*) 三种自然种。它们同属巨蛎属 (*Crassostrea*)。大连湾牡蛎、褶牡蛎和太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 互为姊妹种, 近江牡蛎与它们互为非姊妹种。有无长牡蛎以及长牡蛎与上述三种牡蛎的关系有待进一步研究。同时也证实传统的分类方法对于形态特征典型的个体是能够进行准确区分的。

**关键词** 大连湾牡蛎, 褶牡蛎, 近江牡蛎, 太平洋牡蛎, 随机扩增多态 DNA, 遗传多样性

牡蛎是一种经济价值较高的贝类, 我国牡蛎的产量在贝类养殖业中居首位。牡蛎也是许多国家极为重视的养殖对象。随着牡蛎养殖业的发展, 对牡蛎养殖品种的遗传改良工作也在逐步进行[王如才等 1993, Barker 1996]。就是这样一个重要的养殖种类, 却在分类问题上存在严重分歧。我国巨蛎属的情况尤为突出[Buroker 等 1979a, 李孝绪 1995]。

长期以来, 分类主要是依靠形态进行的。但由于牡蛎形态变化大, 单靠形态分类指标, 有些种类和个体区分难度大或无法区分。于是, 人们寻求新的可解决这一问题的途径。几十种牡蛎的核型研究发现, 它们中除其中一种外, 其他都是  $2N=20$ , 且全是中部和近中部着丝点染色体, 无法提供分类信息[Ahmed 和 Sparks 1967, Menzel 1968]。Buroker 等[1979a, b] 对巨蛎属 (*Crassostrea*) 和小蛎属 (*Sassostrea*) 牡蛎的同工酶研究结果, 对原来国际上在牡蛎分类上的混乱做了一些澄清。但我国北方海区的牡蛎分类情况, 仍不容乐观。到目前为止同工酶研究尚未见有报道, 歧见仍旧存在。本文采用随机扩增多态 DNA (RAPD) 技术对有争论的几种牡蛎进行了研究分析。通过 RAPD 标记和通过遗传距离的对比, 找出几种被研究牡蛎之间的亲疏关系, 从而为解决牡蛎分类上存在的争论提供一些分子进化方面的资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

近江牡蛎、大连湾牡蛎购自青岛农贸市场; 太平洋牡蛎由青岛海洋大学水产学院王如才教授提供; 褶牡蛎采自青岛鲁迅公园。所有实验用的个体, 都按张 玺[1956] 和赵汝翼[1982] 记录的标准进行区分, 并经王如才教授鉴定。凡是形状上区分有困难的个体, 均不选用。

收稿日期: 1997-05-12

## 1.2 方法

### 1.2.1 DNA 提取

每个个体取约 0.1 克闭壳肌或外套膜肌肉, 剪碎。然后加入 500  $\mu\text{L}$  裂解液[ 10mmol Tris-HCl (pH 8.20), 1mmol EDTA-Na, 400mmol NaCl, 1%SDS 和 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  蛋白酶 K]。充分摇匀后置 37  $^{\circ}\text{C}$  保温 1 小时, 然后在 55  $^{\circ}\text{C}$  条件下过夜。变清的样品中加 150  $\mu\text{L}$  饱和 NaCl, 室温下 800r/min 离心 20 分钟。上清液中加入等体积异丙醇, 混匀, -20  $^{\circ}\text{C}$  下处理 30 分钟。14 000r/min 离心 10 分钟, 沉淀用 70% 乙醇洗涤。去乙醇, 加 500  $\mu\text{L}$ 、10mmol Tris-HCl, 1mmol EDTA)。溶液中加 10  $\mu\text{g}$  RNase A, 37  $^{\circ}\text{C}$  保温 30 分钟。然后加等体积苯酚: 氯仿: 异戊醇 (50:49:1) 提取 5 小时。上清液用氯仿: 异戊醇 (24:1) 抽提 5 小时。重复氯仿: 异戊醇抽提, 直至去掉全部蛋白质。上清液中加 1/3 体积 2.5mol  $\text{NH}_4\text{OAc}$  和 2.5 倍体积 95% 的乙醇。去溶液, 加 70% 的乙醇洗涤。去乙醇, 待 DNA 干燥后, 加约 200  $\mu\text{L}$  TE (10mmol Tris-HCl, 1mmol EDTA)。样品用 0.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 与 marker 比较确定样品中 DNA 的大致浓度。

### 1.2.2 PCR 反应

研究用引物购自 Operon 公司的商售随机引物试剂盒, kit G 和 Kit H 共 40 个引物。反应混合液 25  $\mu\text{L}$  中含 10mmol Tris-HCl (pH 9.0), 50mmol KCl, 2.5mmol  $\text{MgCl}_2$ , 0.001% 明胶, dNTP 每种 0.1mmol, 引物 15 ng, 基因组 DNA 25 ng, 1U Taq DNA 聚合酶 (购自美国 Promega 公司)。PE 公司 2400 型基因扩增仪扩增。共 36 个循环: 预变性 94  $^{\circ}\text{C}$  5 分钟; 前 4 个循环 94  $^{\circ}\text{C}$ 、34  $^{\circ}\text{C}$ 、72  $^{\circ}\text{C}$  各 3 分钟。后 32 个循环 94  $^{\circ}\text{C}$ 、34  $^{\circ}\text{C}$  各 1 分钟, 72  $^{\circ}\text{C}$  2 分钟。最后 72  $^{\circ}\text{C}$  保温 7 分钟。扩增产物用 1.4% 琼脂糖凝胶电泳分离 (胶中含终浓度为 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  溴化乙锭)。紫外透射仪观察并摄影。以 marker 为标准作曲线图。根据迁移距离, 从图上找出 RAPD 条带的分子量。

### 1.2.3 数据处理

遗传距离由分析软件“RAPD” (B Black 1994. Dept. of Microbiol., Colorado State University) 中的“RAPD PLOT 2.3”计算。公式为: 遗传距离 =  $1 - S$ ,  $S = 2NAB / (NA + NB)$ , NA 为个体 A 的全部带数, NB 为个体 B 的带数, NAB 为 A、B 两个体共享的片断数。得到的遗传距离矩阵被送入“PHYLP”软件包 (Phylogeny Inference Package, version 3.5C), 由程序 NEIGHBOR 中的 Neighbor-joining 和 UPGMA 法分别构建聚类图。

## 2 结果

先用 40 种引物 (KitG<sub>01~20</sub>, KitH<sub>01~20</sub>) 进行筛选, 发现 10 种引物可产生清晰、可重复的扩增带。用这 10 种引物 (OPG<sub>03</sub>, OPG<sub>04</sub>, OPG<sub>05</sub>, OPG<sub>09</sub>, OPG<sub>13</sub>, OPG<sub>14</sub>, OPG<sub>18</sub>, OPG<sub>19</sub>, OPH<sub>01</sub> 和 OPH<sub>18</sub>) 对 4 种牡蛎进行 PCR 扩增, 共得到 120 条带。扩增片断大小除 4 条外 (OPG<sub>03</sub> ~ 3630, OPG<sub>03</sub> ~ 4400, OPG<sub>04</sub> ~ 3100 和 OPH<sub>01</sub> ~ 4150), 其他在 750 ~ 2630bp 之间。其中有 4 条为 4 个物种共有; 大连湾牡蛎、褶牡蛎和太平洋牡蛎共享片断为 15 条 (还有两两之间的共带); 单一带近江牡蛎为 21 条, 太平洋牡蛎为 6 条, 大连湾牡蛎为 4 条, 褶牡蛎为 7 条。这些单一带可作为各物种的 RAPD 标记。图 1 是引物 OPG<sub>03</sub> 对 4 种牡蛎的扩增产物电泳图。每种牡蛎 4 个个体。图 2 是 4 种引物 (OPG<sub>04</sub>, OPG<sub>18</sub>, OPG<sub>19</sub> 和 OPH<sub>18</sub>) 的扩增产物电泳结果。图 1 中可见

同种个体之间个别的有些差异,但差异不大。大连湾牡蛎 4 个个体的扩增结果(用全部 10 个引物扩增),经统计计算,个体间差异低于 10%,不至影响研究结果[ 杨子恒 1995]。从图 1 和图 2 可看出,近江牡蛎与其他三种牡蛎的差异较大。大连湾牡蛎、太平洋牡蛎和褶牡蛎之间共享片断多,差异较小。

表 1 是 4 种牡蛎的种间遗传距离。图 3 和图 4 是表 1 的数据由邻接法 (Neighbor-joining)和类平均法(UPGMA)分别构建的系统树。两种方法构建的聚类图没有大的差异。



图 1 四种牡蛎 RAPD 产物电泳图

Fig.1 Profile of RAPD products on four oysters

褶牡蛎[ 1~4 道]; 大连湾牡蛎[ 5~8 道];  
太平洋牡蛎[ 9~12 道]; 近江牡蛎[ 13~16 道]。

M 为  $\lambda$ DNA/Hind III-EcoRI 分子量标记



图 2 四种牡蛎四引物 RAPD 产物电泳图

Fig.2 Profile of RAPD products by four primers on four oysters

引物 OPG<sub>04</sub>[ 1~4 道]; OPG<sub>18</sub>[ 5~8 道];  
OPG<sub>19</sub>[ 9~12 道]; OPH<sub>18</sub>[ 13~16 道]

每个引物从左至右依次为近江牡蛎、  
太平洋牡蛎、大连湾牡蛎和褶牡蛎

M 为  $\lambda$ DNA/Hind III-EcoRI 分子量标记

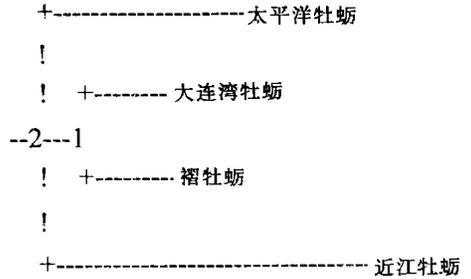


图 3 四种牡蛎邻接法聚类图

Fig.3 Dendrogram of four oysters by Neighbor-joining method

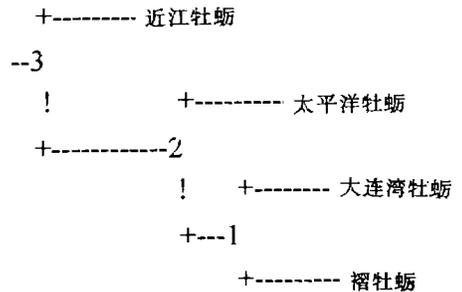


图 4 四种牡蛎类平均法聚类图

Fig.4 Dendrogram of four oysters by UPGMA method

表 1 四种牡蛎的遗传距离

Tab.1 Genetic distance of four oysters

种 类	遗 传 距 离			
近江牡蛎	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
太平洋牡蛎	0.7460	0.0000	0.0000	0.0000
大连湾牡蛎	0.8000	0.3560	0.0000	0.0000
褶牡蛎	0.7700	0.4000	0.3333	0.0000

### 3 讨论

自 Williams 等 1990 首创 RAPD 技术以来, RAPD 技术被广泛用于动植物种间、种内和

种群间系统发生的研究[ Waugh 等 1992]。近来又被用于与良种选育和遗传育种有关的研究中[ Garcia 和 Benzie 1995, 李汝刚等 1996]。要进行良种选育和遗传育种,对研究对象的遗传特性要有基本的了解,这样才能做到有的放矢,收到事半功倍的效果。随着海水养殖业的迅速发展,对养殖品种的遗传改良日益受到重视,牡蛎等的遗传育种就被列入今年起动的“863”项目之一。但在我国,对海水养殖品种的遗传背景知之甚少,与养殖业的发展很不相适应。例如牡蛎,分类上尚存在严重分歧,就更谈不上种质保护、遗传多样性、养殖品种遗传复壮和遗传育种等研究的顺利开展。Thorpe[ 1982] 就曾指出,当一个种群的分属地位用其他方法难以解决时,应使用遗传距离的信息。本文研究了不同牡蛎间的遗传距离,并用这些信息来解决存在已久的牡蛎分类的棘手问题。

Thorpe[ 1982] 通过分析研究后认为:遗传相似度  $I < 0.85$  (遗传距离  $D > 0.15$ ) 的两种群,不可能是同一物种。他给出同科属间  $I$  是  $0.1 \sim 0.5$  ( $D$  是  $0.5 \sim 0.9$ ); 同种种间  $I$  为  $0.2 \sim 0.8$  ( $D = 0.2 \sim 0.8$ ); 而同种种群间  $I = 0.8 \sim 0.97$  ( $D = 0.03 \sim 0.2$ )。Buroker 等[ 1979a, b] 用同工酶方法研究三个不同种群的日本长牡蛎 (*C. gigas*) 和一种葡萄牙牡蛎 (*C. angulata*) 后发现,熊本种群与石卷和广岛种群间的遗传距离分别是 0.1653 和 0.3637。而葡萄牙牡蛎与熊本、石卷和广岛种群间的遗传距离分别是 0.2144, 0.0408 和 0.0118。Thorpe 认为石卷与广岛种群为同物种长牡蛎 (*C. gigas*), 熊本种群为长牡蛎的非姊妹种 ( $D > 0.15$ )。这一结果支持了 Ahmed[ 1967] 的研究结果(他命名熊本种群为一新种 *C. sikamea*)。而葡萄牙牡蛎 *C. angulata* 与长牡蛎为同一物种。Buroker[ 1979b] 对来自菲律宾的 *Saccostrea malabonensis* 进行同工酶分析时发现这些贝壳形状上没有区别的个体(贝壳送回菲律宾被鉴定为同一种), 同工酶区带呈现二个分离的酶活性区, 二群间的遗传距离为 0.1696 (该属非姊妹种间的遗传距离是 0.264)。根据二群体个体在贝壳形状上没有区别、分布区域又重叠的情况, Buroker 定义它们为姊妹种。从表 1 可知, 大连湾牡蛎、褶牡蛎和太平洋牡蛎三者间的遗传距离在 0.3333~0.4000 之间, 远大于 Thorpe 提出的种间 0.15 的标准, 也大于 Buroker 研究 *C. sikamea* 与 *C. gigas* 之间的遗传距离。因而这三种牡蛎不可能为同一物种。根据三者形态特征接近, 分布又重叠的特点, 参照果蝇的标准, 把它们定为姊妹种较合适(果蝇姊妹种间  $D = 0.437$ , 非姊妹种间  $D = 0.648$ ; Buroker 得出的巨蛎属非姊妹种的遗传距离  $D = 0.644$ )。

以往文献中出现的大连湾牡蛎和褶牡蛎, 有些把它们归在牡蛎属 (*Ostrea*), 有些把它们归在巨蛎属 (*Crassostrea*)。从本研究中它们与太平洋牡蛎的关系看, 应归于巨蛎属。拉丁学名 *C. plicatula* (褶牡蛎) 和 *C. taliewhanensis* (大连湾牡蛎)。

本研究采用的 4 种类型的标本, 都是在外形上可以被区分来的典型个体。这一是为保证各群标本的同一性, 也为外形分类进行验证。在收集长牡蛎标本时, 由于外形上无法与太平洋牡蛎 (*C. gigas*) 进行区别, 加上各海区又大量养殖太平洋牡蛎, 所以无法判定哪些是太平洋牡蛎, 哪些是我国的自然种群长牡蛎。基于这一原因, 本研究无法对长牡蛎与太平洋牡蛎的关系进行探讨。从上面提及的 Buroker 对日本三种群牡蛎的研究结果看, 就是分布在日本沿海, 原认为是单一物种的长牡蛎, 现发现至少为 2 个不同的物种 *C. gigas* 和 *C. sikamea*。如果将来发现我国水域确实存在长牡蛎, 但是否与日本引进的太平洋牡蛎为同一物种, 还有待进一步研究。由于从日本引进牡蛎的地点不一, 不排除我国养殖的太平洋牡蛎为非单一物种的可能。

近江牡蛎由于生活在低盐度的江河入海口附近, 在漫长的进化过程中, 为适应生存环境, 而逐渐增加了与同属其他种类之间的遗传差异。Simpson[ 1949] 发现牡蛎的形态从它三迭纪

(约1亿94万年前)出现以来至今改变甚微,染色体组型上没有差异。Buroker[1979b]认为这种形态和染色体组型的一致性,表明牡蛎的进化只发生在染色体构成上,也就是现在讲的DNA结构上。同工酶研究和本文的RAPD结果都证明这种推测是正确的。

本研究得出如下结论:①我国水域确实存在大连湾牡蛎、近江牡蛎和褶牡蛎三个不同的物种,同属巨蛎属(有无长牡蛎,以及其与 *C. gigas* 和 *C. sikamea* 的关系,有待进一步研究);②本研究使用的4种不同牡蛎,在贝壳形态上,确实可以予以区分。但对于难以区分的个体,在进行研究和选育时,建议最好不要选用;③本研究也证明RAPD在种类鉴定方面,确实是一种十分有利的手段。而其所提供的信息,对养殖业和遗传育种也有重要作用。

国家自然科学基金重点项目资助,编号:39630260。

### 参 考 文 献

- 王如才,王昭萍,张建中. 1993. 海水贝类养殖学. 青岛:海洋大学出版社. 72~118.
- 李孝绪. 1995. 中国牡蛎的比较解剖学及系统分类和演化的研究. 海洋科学集刊, 35: 143~178.
- 李汝刚,范云六,Weeden N F. 1996. 豌豆种传花叶病毒抗毒基因 *sbm-1* 的RAPD标记. 科学通报, 41(18): 1712~1714.
- 张 玺. 1956. 中国牡蛎的研究. 动物学报, 8(1): 65~94.
- 杨子恒. 1995. 分子进化树的统计推断. 遗传, 17(增刊): 92~96.
- 赵汝翼. 1982. 大连海产软体动物志. 北京:海洋出版社.
- Ahmed M, Sparks A K. 1967. A preliminary study of chromosome of two species of oysters (*Ostrea lurida* and *Crassostrea gigas*). J Fish Res Board Can. 24: 2155~2159.
- Barker B. 1996. Building a better oyster. Bioscience, 46(4): 240~244.
- Buroker N E, Hershberger W K, Chew K K. 1979a. Population genetics of the family *Ostreidae*. I. Intraspecific studies of *Crassostrea gigas* and *Saxostrea commercialis*. Mar Biol, 54(2): 157~169.
- Buroker N E, Hershberger W K, Chew K K. 1979b. Population genetics of family *Oystreidae*. II. Interspecific studies of the genus *Crassostrea*. Mar Biol, 54(2): 171~174.
- Garcia D K, Benzie J A H. 1995. RAPD markers of potential use of in penaeid prawn (*Penaeus monodon*) breeding programs. Aquaculture, 130(2): 137~144.
- Menze J R W. 1968. Cytotonomy of species of clams (*Mercenaria*) and oysters (*Crassostrea ostrea*). Proc Symp Mollusca E-makulam Coch, 1(1): 75~84.
- Simpson G G. 1949. The meaning of evolution. New Haven and London, Yale University Press.
- Thorp J P. 1982. The molecular clock hypothesis: Biochemical evolution, genetic differentiation, and systematics. Am Rev Ecol Syst, 13(1): 139~168.
- Waugh R L. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. Trends in Biotech, 10(2): 186~191.
- Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res, 18(22): 6531~6535.

**STUDIES ON GENETIC DIVERSITY IN OYSTERS, *CRASSOSTREA***

LIU Bi-Qian, DAI Ji-Xun

*(Department of Marine Biotechnology, Ocean University of Qingdao, 266003)*

**ABSTRACT** The genetic distances made by RAPD technique on oysters demonstrated that there are actually three natural species, *C. talienwhanensis*, *C. plicatula* and *C. rivularis*, in northern sea waters of China. They all belong to the same genus, *Crassostrea*. *C. talienwhanensis*, *C. plicatula* and *C. gigas* are sibling species, but they are non-sibling species with *C. rivularis*. The result also proved that those individuals with typical characters of morphology could be distinguished by the method of traditional classification.

**KEYWORDS** *Crassostrea talienwhanensis*, *Crassostrea plicatula*, *Crassostrea rivularis*, *Crassostrea gigas*, RAPD, Genetic diversity