

中国近海牡蛎系统分类研究的现状和对策*

阙华勇 刘 晓 王海艳 张素萍 张国范 张福绥

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

摘要: 探讨了中国近海沿岸牡蛎分类的诸多疑难和热点问题,回顾了国内外包括贝类等动物的分子系统发生学研究的主要进展,分析了中国近海牡蛎系统分类目前存在的问题,重点阐述了利用分子标记等手段解决形态相似种的鉴定和种系发生关系等问题的巨大潜力,报道了利用分子标记进行牡蛎分类研究所取得的最新进展。预期经典分类学和分子系统发生学研究的交叉综合,将大力推动中国近海牡蛎的系统分类和系统发生研究的发展。

关键词: 牡蛎; 形态特征; 系统发生学; 分子标记

中图分类号: Q959.21, S968.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2003)04-110-04

Systematics of Oysters Along the Coast of China: Status and Countermeasures

QUE Hua-Yong LIU Xiao WANG Hai-Yan ZHANG Su-Ping
ZHANG Guo-Fan ZHANG Fu-Sui

(*Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China*)

Abstract: Due to the high variation in morphological characters of living species of Ostreidae, there remains considerable confusion over species identity and phylogenetic relationships among species found along the coast of China. There has been much progress in the molecular phylogenetics of mollusks and other animals. The potential of molecular marker sequence data, which have proved phylogenetically informative, to trace the evolutionary origin of oyster species is been addressed. In particular, the application of molecular marker techniques are expected to contribute to resolving the recognition of morphologically similar oyster species. The combination of morphological taxonomy with molecular phylogenetics will eventually benefit the development of systematics and phylogenetics of oysters along the coast of China.

Key words: Oyster; Morphological characters; Phylogenetics; Molecular marker

* 山东省博士基金资助项目(No.2000410);

第一作者介绍 阙华勇,33岁,博士,副研究员;主要从事贝类遗传育种和海洋生物技术研究;E-mail: hque@ms.qdio.ac.cn。

收稿日期:2003-04-20

1 牡蛎分类的现状和问题

牡蛎(Ostreidae)属软体动物门、双壳纲、珍珠贝目,为世界性广布种。牡蛎由于肉味鲜美,营养丰富,从远古时代就被人类所食用,具有很高的经济价值,是世界各国海水养殖业重要的养殖对象,也是目前我国乃至世界产量最大的经济贝类。由于牡蛎的广栖息性,在近海沿岸的各种生境下均能大量繁殖,外部形态常随着其生活环境的不同而发生极大的变化。因此牡蛎中多数种类单纯依靠贝壳的外部形态是很难区分的,这一直是困扰贝类分类学者的一个难题。

鉴于牡蛎的贝壳可塑性强,贝壳外部形态差异极大,研究人员积极寻求其他研究手段,以求解决牡蛎分类中存在的疑难问题。除个别报道外^[1],大部分学者认为牡蛎软体部的结构差异很小,可提供的分类证据少。绝大多数的牡蛎具有恒定的染色体数目($2n=20$),并且核型的差异甚微,无法为区别牡蛎物种提供证据^[2,3]。在借助生化手段方面,蛋白质和同工酶电泳技术被用于研究属间的遗传多样性分析以及对分布区重叠的种群间的种类鉴定^[4-6],但电泳分析结果应用于种类鉴别上的有效性,尚存在诸多争议。此外,地理分布常是牡蛎物种鉴定的主要依据之一,但有不少研究表明,一些具有不同地理分布而被界定为不同种的牡蛎,很容易杂交,产生可存活的并且具有繁育能力的后代^[7,8]。众所周知,生殖隔离(杂交不育)是鉴定物种的最基本的依据。因此,如果这些杂交可信的话,很有必要进一步研究,澄清这些生殖上高度亲和的类群究竟是不同的种,或仅是相同物种的不同地理群体(亚种)。由于缺少有效的研究手段,在相当长的一段时期内,牡蛎的种名混乱,同物异名和异物同名等现象十分严重。

在国外,对牡蛎的分类研究开展较早,到20世纪70年代初,世界上记载现生牡蛎达100余种,后来有不少学者根据古贝类、现生贝类的分类成果及牡蛎的繁殖方式和内部结构等特征不断修正牡蛎的分类系统,据Harry推测,这100多种牡蛎中大约有三分之二为同物异名^[9]。他将现生牡蛎分为2个科、4个亚科、24属、36种。但仍不可避免地存在着同物异名和异物同名的现象。

我国的牡蛎分类也存在严重分歧,根据形态特征、生态习性和分布特点等,张玺等将我国沿海自然分布的牡蛎分为24种和1变种^[10];李孝绪等把比较解剖学引进牡蛎的分类,将我国的牡蛎分为15种,并认为广东养殖的“红肉”和“白肉”属于不同的2个种,但未能完全解决其种名问题^[1];徐凤山则把牡蛎分为30种^[11]。不

同的专家,在不同的年代,根据不同分类依据得出不同的结论,更有许多相互矛盾之处。如有的专家认为在我国北方沿海存在一种重要的经济贝类大连湾牡蛎(*Crassostrea talienwanensis*) (Crosse),有的则认为它是长牡蛎(*C. gigas*) (Thunberg)的同物异名;青岛沿海常见的牡蛎,过去称之为“褶牡蛎(*Alectryonella plicatula*) (Gmelin)”,后经研究证明,该种不是褶牡蛎,但迄今未能确定其种名;我国南方养殖的红肉牡蛎和白肉牡蛎是否都属于近江牡蛎(*Crassostrea rivularis*) (Gould),目前争议很大。上述事实反映出我国牡蛎的系统分类存在诸多问题。

由于我国牡蛎养殖业的长足发展,异地引种养殖频繁,打破了牡蛎物种间的地理隔离,对我国的牡蛎种质资源造成了严重的影响,进一步加剧了现生牡蛎形态分类的难度。分类方面的混乱已严重影响到牡蛎的养殖和育种,特别是杂交育种工作的开展。因此,对我国近海自然分布的牡蛎开展深入细致的系统分类学研究,是当前一项非常迫切的任务。而在传统分类学方法的基础上,引进已广泛应用于其它物种中的成熟现代分子生物学技术,解决牡蛎的系统分类及系统演化关系等问题已势在必行。

2 分子标记技术在系统发生学上的应用

系统发生学研究的中心任务是将从共同祖先遗传下来的同源性(homology)和由于趋同进化从不同祖先演变而来的相似性(analogy)区分开来。这种相似性往往给分类造成麻烦,在相当程度上限制了传统的形态学分类。近年来发展的分子标记技术,作为一种崭新的辅助手段,越来越受到分类学者的重视。分子标记技术为揭示物种间的亲缘关系提供了可靠的依据。因此,将传统的形态解剖分类与分子标记技术结合,将较好地解决单纯依靠形态分类造成的局限,显著提高系统发生学的研究水平。

目前,用于系统发生学研究的分子标记技术主要有基因组的RFLP、RAPD、AFLP、核糖体内间区序列(ITS)和线粒体的16S rDNA等的序列分析。其中18S-28S核糖体的内转录间隔区ITS序列是核基因组中进化较快的DNA片段,已经成为生物系统与进化研究中的重要分子标记。ITS技术是目前用于分类和系统演化研究的最有应用前景的技术之一,可解决科以下不同分类阶元的系统发育和分类问题。在纤毛类动物如四膜虫^[12],线形动物如线虫^[13],软体动物如鲍鱼^[14],栉孔扇贝^[15]和牡蛎^[16,17],节肢动物如蝇类^[18],两栖与爬行动物^[19]等的分类、进化、种系发生、亲缘关系鉴定等方

面得到成功的应用。ITS 被广泛应用于分子系统发生研究有几个主要原因:其一,ITS-1 和 ITS-2 分别位于 18S-5.8S 与 5.8S-28S 之间,在真核生物中,从酵母到高等动植物的 18S、5.8S、28S 的编码区序列都是高度保守的,这对于设计 PCR 引物和进行 PCR 扩增都非常有利;其二,ITS 序列的进化速度较快,而且是重复序列、且不同 ITS 拷贝间的序列相近或完全一致,所以 ITS 的序列信息可以提供比较丰富的变异位点和信息位点;此外,16S rDNA 只能反映母系遗传信息,而 ITS 则可同时反映双亲的遗传信息。

3 牡蛎分类应用分子标记技术的进展

国外,分子生物学技术在牡蛎分类和系统演化研究中的应用已取得一定进展。Banks 等利用 16S rDNA 序列分析,区分出牡蛎 2 个近缘种(*Crassostrea gigas* 和 *C. sikamea*)^[20];Anderson 利用 ITS 序列分析,证明悉尼岩牡蛎 *Saccostrea commercialis* (Iredale et Roughley) 和 *S. glomerata* (Gould) 同物异名^[21];Littlewood 等对牡蛎属 (*Ostrea edulis*)、小蛎属 (*Saccostrea cucullata*, *S. commercialis*) 及巨蛎属 (*Crassostrea rivularis*, *C. belcheri*, *C. gigas*, *C. virginica*, *C. rhizophorae*) 共 8 种牡蛎的 28S rDNA 基因的部分片段的序列进行了比较分析,结合形态学特征,绘制出这 8 种牡蛎的进化树^[22];Foighil 等对美洲牡蛎 (*Crassostrea virginica*) 和亚洲的 2 种牡蛎 (*C. gigas*, 有明巨牡蛎 *C. ariakensis*) 的 16S rDNA 基因进行分析,发现美洲牡蛎 (*C. virginica*) 和亚洲的 2 种牡蛎 (*C. gigas* 和 *C. ariakensis*) 分别有 85.5% 和 84% 的相似性,而亚洲 2 种牡蛎之间相似性则高达 95.1%^[23];Foighil 等用 16S rDNA 序列研究了葡萄牙牡蛎 *Crassostrea angulata*, 表明该种起源于亚洲^[24]。

以上研究进展表明,牡蛎分子水平上的同源性所反映的进化关系,与传统形态分类所反映的遗传距离是一致的,应用分子生物学技术完全可以弥补传统分类学的不足之处,揭示现生牡蛎各个类群的亲缘关系,为探讨牡蛎的系统演化提供有力的证据。Gaffney 等研究证实,RFLP、16S rDNA、28S rRNA、ITS-1 和 ITS-2 等分子标记技术,可广泛应用于巨蛎属牡蛎的杂交和转基因育种、濒危种的保护以及外来种入侵的监控^[25]。

由于 ITS 序列的进化速率较快,和线粒体编码基因的进化速度相当,因此在科以下阶元的分类中有非常显著的优势。ITS 序列在牡蛎的种间鉴定等方面已有一定的应用,Que 等利用 ITS 标记,成功鉴定了长牡蛎与近江牡蛎的杂交种,表明 ITS 序列在牡蛎种间分类中具有显著的应用价值^[17]。孔晓瑜等对长牡蛎的 ITS-1

和 ITS-2 的序列进行了测定^[16]。此外,在软体动物鲍科的系统演化中,ITS 序列的聚类分析结果表明鲍科动物的进化树从基部就开始分成界限分明的 3 个类群,即北太平洋类群、欧洲类群、澳大利亚类群^[14];Yu 等对栉孔扇贝的 ITS 进行了研究,分别获得了 ITS-1 和 ITS-2 序列的一部分^[15]。

中国科学院海洋研究所的研究人员已经在利用 ITS 技术进行牡蛎分类上取得重要进展。已从部分牡蛎浸渍标本中成功提取了 DNA 并进行了 ITS 扩增^[26],在部分生活牡蛎标本中(包括长牡蛎、近江牡蛎等)已成功扩增出 ITS-1 和 ITS-2 基因片段。在这些基础上,相关工作将继续开展,利用中国科学院海洋生物标本馆收藏的丰富的牡蛎标本,获取形态上已经定名的浸渍标本的分子标记序列信息,以此为参比,同时研究典型生活标本的分子标记,力争在中国牡蛎的分子系统演化方面取得重要突破,为解决现生牡蛎的分类问题提供重要的科学证据。

总之,要解决关于中国牡蛎分类的诸多疑难之处,首先需要在经典分类学(以形态上和解剖上的相似性和差异性的总和为基础)方面开展系统的工作,包括重新修订模式种的分类资料,确定典型分布区内模式种的形态特征及其变化。在此基础上,结合对遗传分子基础等特征的研究,获取进化较快的基因序列信息(目前最具应用价值的是 ITS 和 16S rDNA 标记技术等),为形态和解剖特征相似的种类鉴别提供灵敏可信的遗传学证据,解决单纯依靠分类学传统技术迄今无法解决的一系列牡蛎分类难题。开展分子系统发生学研究,将为贝类分类学提供崭新的技术手段和重要科学依据。在综合分析经典分类学和分子系统发生学研究资料的基础上,有望完善中国近海沿岸牡蛎的分类系统,阐明种属间的系统演化关系。这对于贝类学的基础研究、资源开发和保护利用等都具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] 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. 海洋科学集刊, 1994, 35: 143 ~ 178.
- [2] Ahmed M. Cytogenetics of oysters. *Cytologia*, 1973, 28: 337 ~ 346.
- [3] Nakamura H K. A review of molluscan cytogenetic information based on the computerized index system for molluscan chromosomes: bivalve, polyplacophora and cephalopoda. *Venus*, 1985, 44: 193 ~ 225.
- [4] Hedgecock D, Okazaki N B. Genetic diversity within and between populations of American oysters (*Crassostrea*). *Malacologia*, 1984, 25: 535 ~ 549.

- [5] Buroker N E, Hershberger W K, Chew K K. Population genetics of the family Ostreidae. I. intraspecific studies of *Crassostrea gigas* and *Saccostrea commercialis*. *Mar Biol*, 1979, **54**: 157 ~ 169.
- [6] Buroker N E, Hershberger W K, Chew K K. Population genetics of the family Ostreidae. II. interspecific studies of the genera *Crassostrea* and *Saccostrea*. *Mar Biol*, 1979, **54**: 171 ~ 184.
- [7] Gaffney P M, Allen S K Jr. Hybridization among *Crassostrea* species: a critical reviews. *Aquaculture*, 1993, **116**: 1 ~ 13.
- [8] 周茂德, 高允田, 吴融. 太平洋牡蛎与近江牡蛎、褶牡蛎人工杂交的初步研究. 水产学报, 1982, **6**(3): 235 ~ 241.
- [9] Harry H W. Synopsis of the supraspecific classification of living oysters. *Veliger*, 1985, **28** (2): 121 ~ 158.
- [10] 张玺, 楼子康. 中国牡蛎的研究. 动物学报, 1956, **8** (1): 65 ~ 94.
- [11] 徐凤山. 中国海双壳类软体动物. 北京: 科学出版社, 1997.
- [12] 缪炜. 上海四膜虫和两株嗜热四膜虫的 rRNA 基因 ITS-1 序列及分子系统关系. 动物学研究, 2001, **22**(4): 265 ~ 269.
- [13] 廖金铃. 松材线虫 rDNA 的测序和 PCR-SSCP 分析. 植物病理学报, 2001, **31**(1): 84 ~ 89.
- [14] Coleman A W, Vacquier V D. Exploring the phylogenetic utility of ITS sequences for animals: a test case for abalone (*Haliotis*). *J Mol Evol*, 2002, **54**(2): 246 ~ 257.
- [15] Yu Z, Kong X, Zhuang Z, et al. Sequence study and potential uses of ribosomal DNA internal transcribed spacers in scallop *Chlamys farreri*. 中国水产科学, 2001, **8**(1): 6 ~ 9.
- [16] 孔晓瑜, 张留所, 喻子牛等. 太平洋牡蛎核糖体 DNA 转录间隔子和线粒体基因片段序列测定. 中国水产科学, 2002, **9**(4): 304 ~ 308.
- [17] Que H, Allen S K Jr. Hybridization of tetraploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) and diploid Suminoe oyster, *Crassostrea ariakensis* (Fujita). *J Shellfish Res*, 2002, **21** (1): 137 ~ 143.
- [18] 陈小爱. 根据 rRNA 基因 ITS-2 序列研究舌蝇属的种系发生. 中国科学 C 辑, 1999, **3**: 283 ~ 290.
- [19] 周开亚. 两栖爬行动物的分子系统发生. 动物学研究, 2001, **22**(5): 397 ~ 405.
- [20] Banks M A, Hedgecock D, Walters C. Discrimination between closely related Pacific oyster species (*Crassostrea*) via mitochondrial DNA sequences coding for large subunit rRNA. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1993, **2**(3): 129 ~ 136.
- [21] Anderson T J. Nucleotide sequence of a rDNA internal transcribed spacer supports synonymy of *Saccostrea commercialis* and *S. glomerata*. *J Moll Stud*, 1994, **60**: 196 ~ 197.
- [22] Littlewood D T. Molecular phylogenetics of cupped oysters based on partial 28S rRNA gene sequences. *Mol Phylogen Evol*, 1994, **3**(3): 221 ~ 229.
- [23] Foighil D O, Gaffney P M, Hilbish T J. Differences in mitochondrial 16S ribosomal gene sequences allow discrimination among American *Crassostrea virginica* (Gmelin) and Asian *C. gigas* (Thunberg), *C. ariakensis* Wakiya oyster species. *J Exp Mar Biol Ecol*, 1995, **192**: 211 ~ 220.
- [24] Foighil D O, Gaffney P M, Hilbish T J. The Portuguese oyster *Crassostrea angulata* is of Asian origin. *J Shellfish Res*, 1997, **16**(1): 329.
- [25] Gaffney P M, O'Beirn F X. Nuclear DNA markers for *Crassostrea* species identification. *J Shellfish Res*, 1996, **15**(2): 510 ~ 511.
- [26] 孙博, 张藜萍, 王海艳等. 几种海水贝类甲酯浸渍标本 DNA 的提取及 rRNA 基因 ITS 序列的扩增. 海洋通报, 2003(待刊).