

广西茅尾海牡蛎天然种苗种类鉴定和群体组成的初步分析

钟方杰^{1,2}, 严雪瑜¹, 高 扬¹, 蒋钦杨¹, 贾 嶂¹, 李琼珍², 李文红¹, 陈 琴¹

(1. 广西大学 动物科学技术学院, 广西 南宁 530004; 2. 广西水产研究所, 广西 南宁 530021)

摘要: 了解广西茅尾海牡蛎种质资源现状, 有助于提高牡蛎采苗效果。通过在茅尾海采集常见 5 种牡蛎成体, 并在牡蛎不同繁殖高峰期分别采集牡蛎 D 型幼虫 D I、D II, 在不同附着期分别采集牡蛎幼苗 M I、M II、M III, 采用多重 PCR 技术对牡蛎成体、稚贝及幼虫进行种类鉴定。香港巨牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*) 在茅尾海牡蛎稚贝和幼虫高峰期均属于优势种; 稚贝中香港巨牡蛎、有明巨牡蛎(*Crassostrea ariakensis*) 和熊本牡蛎(*Crassostrea sikamea*) 3 个种类的平均比例分别为 88.3%、6.7% 和 5.0%, 香港巨牡蛎与熊本牡蛎、有名巨牡蛎相比差异显著($P < 0.05$), 熊本牡蛎与有明巨牡蛎差异不显著($P > 0.05$)。香港巨牡蛎是茅尾海牡蛎优势种, 7 月 12 日之前投放采苗器可采集到数量多、种类单一的香港巨牡蛎。7 月 12 日之后投放采苗器, 附着的稚贝中有明巨牡蛎和熊本牡蛎比例增加, 影响采苗效果及养殖生产。

关键词: 茅尾海; 牡蛎稚贝; D 型幼虫; 多重 PCR; CO I 基因

中图分类号: S93 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2014)03-0091-07

doi: 10.11759/hyxx20130204003

广西钦州是中国牡蛎之乡, 钦州茅尾海是国家级海洋公园保护区, 也是广西牡蛎养殖基地和中国最大的牡蛎天然采苗区^[1]。茅尾海牡蛎养殖户通过每年 6 月(农历)向海区投放水泥球片采苗器采集牡蛎天然苗, 最高年产牡蛎苗种约 1000 亿粒, 对广西、广东、福建和海南等地牡蛎养殖产业有重要贡献^[2]。当地养殖户根据牡蛎的贝壳外形、外套膜颜色和闭壳肌痕颜色将茅尾海牡蛎分为 5 个种, 俗称分别为“白眼蚝”、“红眼蚝”、“蚝砺”、“黑眼蚝”、“黄蚝”; 有关茅尾海天然牡蛎种质资源报道很少。茅尾海采苗区牡蛎幼虫数量监测发现, 每年有 4~5 个可以投放采苗器的牡蛎幼虫高峰期; 虽然不同种牡蛎存在繁殖期不同的生殖隔离现象^[3], 由于同种牡蛎具有分批产卵的繁殖特性, 导致无法准确判断茅尾海香港巨牡蛎幼虫高峰期出现次数和时间, 采苗效果受到影响, 不利于茅尾海牡蛎资源的保护以及合理开发利用。

结合生物形态学分类与分子生物技术的方法已成为鉴定牡蛎品种最为有效和广泛应用的方法之一^[4]。Wang 等^[5]利用多重 PCR 技术有效区分了巨蛎属的 5 个物种。近年基因测序、系统进化树分析等分子技术的发展, 已鉴定证实华南沿海的“白肉蚝”为香港巨牡蛎(*C. hongkongensis*), “红肉蚝”为日本有明巨牡蛎(*C. ariakensis*)^[6]; “赤蚝”可能是一个新种, 而“白蚝”含有香港巨牡蛎和有明巨牡蛎 2 个物种^[2]。2010

年宋忠魁等^[7]的分子鉴定结果发现广西茅尾海 3 种常见牡蛎分别是“白眼蚝”香港巨牡蛎、“红眼蚝”有明巨牡蛎、“蚝砺”熊本牡蛎(*C. sikamea*), 其中香港巨牡蛎是茅尾海主要养殖品种。李咏梅等^[8]通过序列特征、遗传距离和系统进化树分析结果表明, CO I 基因可用于牡蛎的种类鉴定和系统发育分析。以上研究结果表明 CO I 条形码技术和基于 CO I 条形码技术发展的 PCR-RFLP 及多重 PCR 等技术能对一些牡蛎种类进行快速鉴定。

本研究根据现有的成体牡蛎 CO I 条形码标记和 PCR 分子标记, 对茅尾海养殖户提供的 5 种成体牡蛎, 以及不同牡蛎繁殖高峰期采集的牡蛎 D 型幼虫和相应高峰期附着的稚贝进行种类鉴定, 以查明茅尾海牡蛎的种类和组成等种质资源情况, 为提高茅尾海牡蛎半人工采苗预报技术和制订养殖规划提供科学参考依据。

收稿日期: 2013-06-22; 修回日期: 2013-10-11

项目基金: 广西科技攻关项目(桂科攻 13470002-1); 广西科技攻关项目(桂科攻 11107012-2); 现代农业产业技术体系建设专项; 广西硕士研究生科研创新项目; 广西高校大学生创新计划项目

作者简介: 钟方杰(1988-), 男, 广西钦州人, 硕士研究生, 研究方向: 渔业, 电话: 13768372701, E-mail: zhongyu0713@126.com; 李文红, 通信作者, 教授, 电话: 15994479761, E-mail: whli66@163.com; 陈琴, 通信作者, 高级实验师, 电话: 18934721306, E-mail: c90757@sina.com

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 成体牡蛎的采集

试验所用的5个种类成体牡蛎由钦州茅尾海养殖户提供, 分别编号为样品 A、B、C、D、E。每个种类随机选取样本各 10 个, 分别采集贝壳肌 40 mg 于 1.5 mL 离心管中, 经液氮处理后, -40℃保存备用。

1.1.2 牡蛎 D 形幼虫的采集

采样地点设在钦州茅尾海牡蛎采苗区 (21°49.354'N, 108°33.065'E), 采样方法参照《海洋渔业调查规范》^[9]。2012 年 7 月 3 日和 7 月 13 日牡蛎繁殖高峰期分别采集水样, 水样浓缩后, 将不同牡蛎繁殖高峰期 D 型幼虫记为 D I、D II; 在解剖显微镜下分离单个 D 型幼虫, 各 40 个移入 0.2 mL PCR 管中, 加入 2 μL 无水乙醇固定, -40℃保存备用。

1.1.3 牡蛎稚贝的采集

2012 年 11 月初在钦州沙井养蚝专业合作社茅岭江牡蛎保苗区随机抽取 6 月 8~10 日、7 月 3~5 日、7 月 12~15 日幼虫高峰时附着的牡蛎稚贝; 各期分别随机选取牡蛎稚贝 40 个, 记为 M I、M II、M III, 所选牡蛎稚贝平均壳高和壳长分别为 2.03 cm 和 1.78 cm; 采集去除内脏的软体部置于 1.5 mL 离心管中, 经液

氮处理后, -40℃保存备用。试验样品详见表 1。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 的提取

牡蛎稚贝、牡蛎 D 型幼虫总 DNA 提取分别按 FOREGENE 公司的 Genomic DNA Isolation Kit 和 Genomic DNA Micro Kit 操作。

1.2.2 引物的设计与合成

根据 Folmer^[10]开发的线粒体基因组 CO 基因通用引物, 设计外引物 LCO-1490 和 HCO-2198, 参照 WANG^[5]设计的 Chk、Car、Csi 作为多重 PCR 特异性内引物, 并送至上海生工生物工程有限公司进行合成。引物序列如表 2 所示。

1.2.3 通用引物 PCR 扩增

PCR 反应体系: CWBIO 生物公司 Taq Master Mix 酶(Taq DNA Polymerase、Taq PCR Buffer、Mg²⁺、dNTP mix)7.5 μL, 成体牡蛎 DNA 模板 2 μL, 通用引物(LCO、HCO)终浓度为 0.6 μmol/L, 补足灭菌双蒸蒸馏水至 15 μL。

PCR 反应程序: 94℃预变性 2 min, 94℃变性 30 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 30 个循环, 72℃后延伸 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭 (EB)染色, 用凝胶图像及分析系统观察、照相。将 5

表 1 试验样品

Tab.1 The test samples

编号	采集时间	特征描述	数量(个)
成体白眼蚝 A	10 月 20 日	外套膜白色, 个体大, 外壳为狭长形, 耐低盐, 闭壳肌痕颜色较浅	10
成体红眼蚝 B	10 月 20 日	外套膜暗红色, 肉质柔软, 壳呈椭圆形	10
成体蚝砾 C	10 月 20 日	外套膜呈淡黄色, 个体小, 外壳边缘为“菊花”状	10
成体黑眼蚝 D	10 月 20 日	外套膜白色, 闭壳肌痕颜色较深, 呈黑色	10
成体黄蚝 E	10 月 20 日	外套膜呈淡黄色, 外壳则狭长形	10
D 型幼虫 D I	7 月 3 日	呈 D 字形, 大小约为 20~40 μm	40
D 型幼虫 D II	7 月 13 日	呈 D 字形, 大小约为 20~40 μm	40
稚贝 M I	11 月初	6 月 8~10 日附着	40
稚贝 M II	11 月初	7 月 3~5 日附着	40
稚贝 M III	11 月初	7 月 12~15 日附着	40

表 2 PCR 引物序列

Tab.2 The PCR primer sequences

引物	特异性	引物序列	大小(bp)
LCO	All	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'	
Chk	<i>C.hongkongensis</i>	5'-GGAGTAAGTGGATAAGGGTGGATAG-3'	387
Car	<i>C. ariakensis</i>	5'-AAAAAAGATTATAACTAATGCATGTCG(T)G-3'	183
Csi	<i>C. sikamea</i>	5'-AAGTAACCTTAATAGATCAGGGAAC(A)C-3'	546
HCO	All	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'	697

个种类牡蛎扩增得到的 PCR 产物分别送至深圳华大基因生物公司和英骏(上海)生物技术有限公司进行序列测定。

1.2.4 多重 PCR 鉴定

参照 Wang^[5]牡蛎鉴定多重 PCR 技术鉴别采集到的牡蛎成体、稚贝和分离得到的单个 D 型幼虫,并对所得结果进行统计分析。

多重 PCR 反应体系: Taq Master Mix 酶 7.5 μ L, DNA 模板 2 μ L, 两条外引物(LCO、HCO)终浓度为 0.8 μ mol/L, 3 条特异性内引物(Car、Chk、Csi)终浓度为 0.2 μ mol/L, 补足灭菌双蒸蒸馏水至 15 μ L。

PCR 反应程序同 1.2.3。PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭(EB)染色, 用凝胶图像及分析系统观察、照相。阴性对照组用灭菌双蒸蒸馏水代替模板 DNA。

1.2.5 数据统计及序列分析

试验数据采用 Excel 2003 和 SPSS 17.0 软件进行数据统计, 用 DNASTAR7.1 软件进行序列分析。

2 结果与分析

2.1 成体牡蛎多重 PCR 和测序结果

2.1.1 多重 PCR 结果

用两条通用外引物和 3 条特异性内引物对成体牡蛎进行多重 PCR 鉴定, 两条外引物在所有品种中均扩增得到大小约 700 bp 的片段, 而特异性引物仅在该品种中得到扩增; 电泳检测结果如图 1 所示。检测结果显示: 俗称“白眼蚝”和“黑眼蚝”的样品 A 和 D 扩增出现香港巨牡蛎(*C.hongkongensis*) 387 bp 特异目的片段; 俗称“红眼蚝”样品 B 扩增得到有明巨牡蛎(*C. ariakensis*)183 bp 特异目的片段; 俗称“蚝

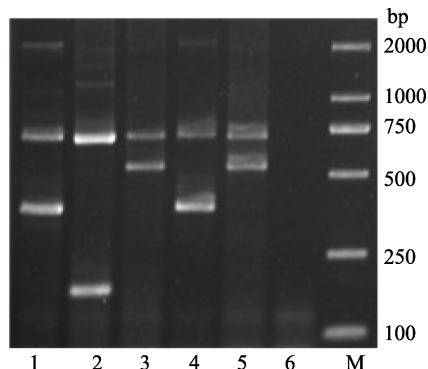


图 1 5 种成体牡蛎多重 PCR 扩增结果

Fig.1 Multiplex-PCR results of five oyster adults

M.DL 2000 标记; 泳道 1~5 分别为样品 A、B、C、D、E; 泳道 6 为阴性对照

M.DL 2000 Marker; Lane 1~5. sample A, B, C, D, E; Lane 6 Negative control

砺”和“黄蚝”的样品 C 和 E 扩增出现熊本牡蛎(*C.sikamea*)546 bp 特异目的片段。说明“红眼蚝”是有明巨牡蛎, “白眼蚝”和“黑眼蚝”是香港巨牡蛎, “蚝砺”和“黄蚝”是熊本牡蛎。

2.1.2 通用引物 PCR 扩增及测序结果

用通用引物 LCO-1490 和 HCO-2198, 对 5 种成体牡蛎进行 PCR 扩增, 将 PCR 产物于 1.5%琼脂糖凝胶进行电泳, 结果如图 2 所示, 可见大小约 700 bp 的条带, 与预期目的片段大小一致。

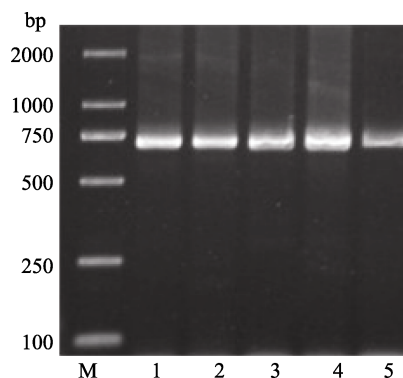


图 2 成体牡蛎通用引物 PCR 扩增结果

Fig.2 Universal primers-PCR results of oyster adults

M.DL 2000 标记; 泳道 1~5 分别为样品 A、B、C、D、E

M.DL 2000 Marker; Lane 1~5. sample A, B, C, D, E

2.1.2.1 同源性结果分析:

将 A、B、C、D、E 5 个样品测序得到的序列与 NCBI 上 GenBank 公布的几种牡蛎 CO I 基因部分序列用 DNASTAR 7.1 软件进行比对, 其中包括香港巨牡蛎(*C.hongkongensis*) (AY632556.1、FJ841963.1)、有明巨牡蛎(*C. ariakensis*)(AY632564、FJ841964.1)、熊本牡蛎(*C.sikamea*)(HQ661011、FJ841966.1)、长牡蛎(*C.gigas*)(AF152565.1、AF177226.1)、日本巨牡蛎(*C.nippona*)(AF300616.1、HM015198.1)、葡萄牙牡蛎(*C.angulata*)(AF152567、FJ841965.1)、美洲牡蛎(*C.virginica*)(AY905542)、欧洲平牡蛎(*O.edulis*)(AF120651.1)、黑齿牡蛎(*Saccostrea mordax*)(FJ841968.1)、西班牙牡蛎(*Crassostrea* sp.DB1)(JQ060958.1)。同源性分析结果显示: A、D 与香港巨牡蛎的同源性分别为 99.8%、100.0%; B 与有明巨牡蛎的同源性为 99.8%; C、E 与熊本牡蛎同源性分别为 99.8%、99.2%, 其进化关系分析结果见图 3。

2.1.2.2 测序结果分析:

将 PCR 产物测序得到的结果与通用引物 LCO-

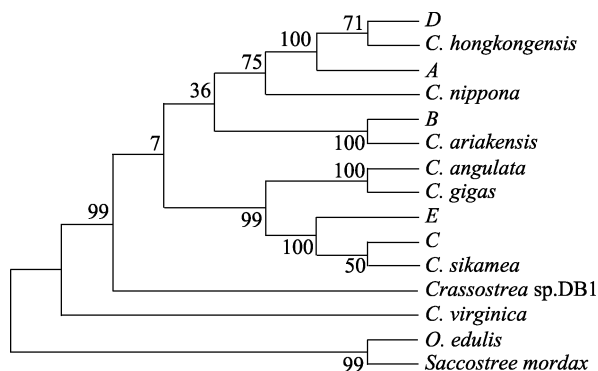


图3 试验获得的5个样品CO I基因部分序列与其他品种牡蛎序列的进化关系

Fig.3 Phylogenetic tree of CO I gene sequences of five test samples and other species of oyster

1490 和 HCO-2198 序列进行拼接, 得到5个样品CO I基因部分序列结果如图4所示。

综上所述, 序列分析结果与多重PCR结果一致, 样品B为有明巨牡蛎, 样品A和D为香港巨牡蛎, 样品C和E为熊本牡蛎。广西茅尾海成体牡蛎种类共3种, 结果与宋忠魁的研究结果一致。而样品A与D、C与E在形态上的差异可能是由于一些环境因素或者其它形态上的主效基因的不同所致。

2.2 牡蛎D型幼虫多重PCR鉴定结果

牡蛎D型幼虫多重PCR鉴定结果显示: D 高峰期所检测的40个D型幼虫中, 共检测出39个香港巨牡蛎, 特异目的片段大小为387 bp; 1个为有明巨牡蛎, 片段大小为183bp, 经统计得到D 期中香港巨牡蛎所占的比例为97.5%, 有明巨牡蛎的比例为2.5%, 而熊本牡蛎则为0。D 高峰期40个D型幼虫的检测结果为所检幼虫100%为香港巨牡蛎。统计结果如图5所示, 两个幼虫高峰期中, D型幼虫的种类以香港巨牡蛎为优势种。

2.3 牡蛎稚贝多重PCR鉴定结果

牡蛎稚贝多重PCR鉴定结果显示: M 牡蛎稚贝中香港巨牡蛎36个, 占90%, 有明巨牡蛎3个, 占7.5%, 熊本牡蛎1个, 占2.5%; M 牡蛎稚贝中香港巨牡蛎39个, 占97.5%, 有明巨牡蛎1个, 占2.5%; M 牡蛎稚贝中香港巨牡蛎31个, 占77.5%, 有明巨牡蛎4个, 占10.0%, 熊本牡蛎5个, 占12.5%。详见图6。

由图6可知, 在不同幼虫高峰期附着得到的牡蛎稚贝M、M、M中香港巨牡蛎、有明巨牡蛎、

熊本牡蛎均有出现, 香港巨牡蛎、有明巨牡蛎和熊本牡蛎3个种平均比例分别占88.3%、6.7%和5%; 通过配对样本t检验得到, 香港巨牡蛎与熊本牡蛎、有明巨牡蛎相比差异显著($P < 0.05$), 熊本牡蛎与有明巨牡蛎差异不显著($P > 0.05$)。由此得出: 牡蛎各繁殖期附着得到的稚贝均以香港巨牡蛎为优势种。

3 讨论

3.1 广西茅尾海常见牡蛎种类鉴定

目前, 关于我国沿海牡蛎的命名及分类是研究的热点^[11], Lam等^[12]2003年通过分子系统学和形态学分析将旧称“近江牡蛎”(O. rivularis)重新订名为香港巨牡蛎(C. hongkongensis); 宋忠魁等^[7]根据CO I条形码技术对成体养殖牡蛎鉴定, 推定香港巨牡蛎是钦州湾茅尾海优势种类, 并指出俗名“白眼蚝”为香港巨牡蛎, “红眼蚝”为有明巨牡蛎, “蚝砺”则为熊本牡蛎。广西茅尾海养殖的“黑眼蚝”的外部形态与“白眼蚝”相似, 但闭壳肌痕颜色较深, “蚝砺”和“黄蚝”外套膜颜色相近, 但外壳边缘为“菊花”状, 而“黄蚝”外壳则狭长型。本实验序列分析与多重PCR结果说明“红眼蚝”是有明巨牡蛎, “白眼蚝”和“黑眼蚝”是香港巨牡蛎, “蚝砺”和“黄蚝”是熊本牡蛎, 广西茅尾海成体牡蛎种类共3种, 与宋忠魁等^[7]的研究结果一致。“白眼蚝”与“黑眼蚝”、“蚝砺”与“黄蚝”可能分别是同一物种的不同品系, 它们在形态上的差异可能是由于一些环境因素或者其他形态上的主效基因的不同所致。牡蛎外部形态大小、外套膜颜色和闭壳肌痕颜色可作为表形性状用于品种选育评价, 但作为种类鉴定标准依据不足。

3.2 广西茅尾海牡蛎苗种的种类组成分析

在南海海区, 牡蛎的采苗一年可出现两次附着高峰, 夏秋各一次。因为夏苗比秋苗数量多、体质壮、生长快, 生产上一般都采用夏苗^[13]。实验结果发现茅尾海7月份发生的D型幼虫中香港巨牡蛎占97.5%以上, 分别在6月和7月初附着的稚贝M I、M II中香港巨牡蛎占90%以上, 说明6月和7月初海区的D型幼虫高峰期中香港巨牡蛎属于优势种, 茅尾海大规模的养殖牡蛎是采苗区幼虫的主要来源; 7月12日之前投放采苗器可采集到数量多、种类纯的香港巨牡蛎。7月12日之后投放采苗器, 香港巨牡蛎以外的牡蛎附着量增加, 影响采苗效果及养殖生产。苏天凤等^[2]研究结果认为, 钦州湾养殖的“白蚝”种群含

A. seq.	<u>GGTCAACAAATCATAAAGATATTCGAGGTTTACATAGTATTTGGATTCTGAGGGTTCTTCAGGAAGTACAGTTCAGATCTTTATTCGTTGAAGATT</u>	100
B. seq.	 A . A . . . T . G . G . . . T . . . C T .	100
C. seq.	 A T . . . G T G . G T . G GC	100
D. seq.		100
E. seq.	 A T . . . G T G . G T . G GC	100
<i>C. ariakensis</i>		
A. seq.	ATATAATCTGGAGCTAAGCTTTTACACCTGTAACTATAATGCAGTGTAACTAGCCATGCATTGGTTATAATTTTTCTTTGTTATGOCAGTAATA	200
B. seq.	G . . . CC . A . G C . . . T . . . <u>CAGACATGCATTAGTTATAATCTTTTT</u> A . G	200
C. seq.	. . . C . . . C . G . C T . A . G . T T A G G . . .	200
D. seq.	 T	200
E. seq.	. . . C . C . C . G . C T . A . G . T T G G G . . .	200
<i>C. hongkongensis</i>		
A. seq.	CACTTTATCTTATGCTTATATCTAATCTTGTGAAAGTGGAGTTGGGGCAGGATGGACAATCTATCCACCTTATCCACTTACTCTATCATGAGTCTG	400
B. seq.	 G A G . C A . . . T . C . T . T . . . A T G	400
C. seq.	 G A G G . A . . . T . C . T . T . G . G T T . . .	400
D. seq.		400
E. seq.	 G A G G . A . . . T . C . C . . . G . G T T . . .	400
<i>C. sikamea</i>		
A. seq.	GGCATTGTTAGCGCTATTTCATGATCTATTAAAGGTTACGTCATTCTGCTTTTGACTACTCTTCCAGTATTGGGGGGGGCTTACTATGCTTTTGA	600
B. seq.	. . G G C . A . C . A . . . T . A . . . A . A . C . . . G . . C . A . T . A . . . C	600
C. seq.	 A . G <u>GTTTCCTGATCTATTAAAGGTTACTT</u> . . . TC . A . . . A G . A . T . . C	600
D. seq.		600
E. seq.	 A . G . . . G . . . C T . . . TC . A . . . A G . A . T . . C	600
<i>C. hongkongensis</i>		
A. seq.	CTGATCGACATTTTAAATACATCTTTTTTGACCCCTGTTGGGGTGCTGATCTGTTTTATTTCAGCATTATTTCGATTTTGGTCAAGCTTGA	700
B. seq.	. . . C . G C . G T . . . C . A . G . A C	700
C. seq.	 T C . G T . . . A . G . G G	700
D. seq.		700
E. seq.	. . . C . T C . G T . . . A . G . G G	700

图 4 5 个样品 CO I 基因部分序列

Fig.4 Partial sequences of CO I gene of five samples

图中下划线部分表示通用引物; 阴影部分表示对应品种特异性引物

Underline part in the figure indicated universal outer primers; The hatched section showed the corresponding species-specific inner primers

有明巨牡蛎和香港巨牡蛎 2 个种, 其中有明巨牡蛎所占比例约为 27%。本实验 6 月和 7 月附着的 3 批稚贝中香港巨牡蛎、有明巨牡蛎和熊本牡蛎 3 个种平均分别为 88.3%、6.7%和 5%, 结果与宋忠魁等^[7]认为有明巨牡蛎和熊本牡蛎分别占茅尾海常见养殖牡蛎的 5%相似, 但有明巨牡蛎所占比例低于苏天凤等得到的 27%的结果。这可能与渔民在牡蛎养成过

程中有意剔除肉质较差的“红眼蚝”和个体小的“黄蚝”, 养殖群体中香港巨牡蛎比例逐年增加有关。

4 结论

本研究对广西茅尾海常见的几个种类的牡蛎, 利用 CO I 序列分析进行了分子鉴定, 同时, 针对 D 型幼虫和不同采苗期的牡蛎稚贝进行了鉴定和区分,

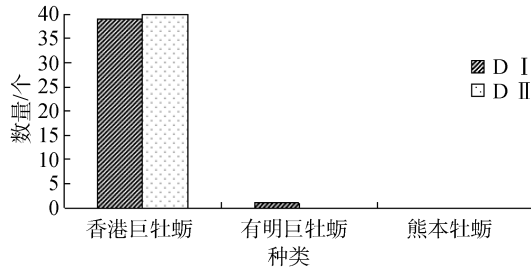


图5 牡蛎D型幼虫D I、D II多重PCR统计结果

Fig.5 The multiplex-PCR statistical results of oyster larvae D I and D II

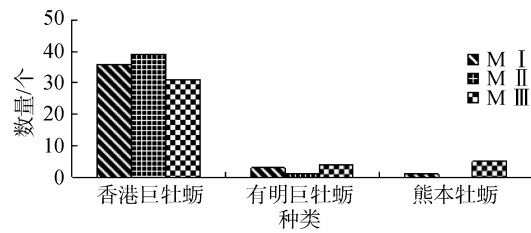


图6 牡蛎幼苗M I、M II、M III多重PCR统计结果

Fig.6 The multiplex-PCR statistical results of oyster juvenile M I, M II and M III

推定香港巨牡蛎始终是该海区的优势种，并初步了解牡蛎不同繁殖期苗种种类资源，为提高牡蛎半人工采苗效果提供理论依据。

参考文献:

- [1] 王如才. 牡蛎养殖技术[M]. 北京: 金盾出版社, 2004.
- [2] 苏天凤. 华南沿海养殖近江牡蛎的分类研究[J]. 南方水产, 2006, 2(6): 72-75.
- [3] 王如才, 王昭萍, 张建中. 海水贝类养殖学[M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 2008.

- [4] 巫旗生, 王晓清, 曾志南, 等. 中国牡蛎分类方法研究进展[J]. 福建水产, 2011, 33(1): 67-72.
- [5] Wang H Y, Guo X M. Identification of *Crassostrea ariakensis* and related oysters by multiplex species-specific PCR[J]. Shellfish Res, 2008, 27(3): 481-487.
- [6] Wang H Y, Guo X M, Zhang G F, et al. Classification of Jinjiang oysters *Crassostrea rivularis* (Gould, 1861) from China, based on morphology and phylogenetic analysis [J]. Aquaculture, 2004, 242(1-4):137-155.
- [7] 宋忠魁, 蔡小辉, 童潼, 等. 广西茅尾海常见牡蛎的分子鉴定[J]. 海洋科学, 2010, 34(8): 11-16.
- [8] 李咏梅, 陈秀荔, 彭敏等. 基于线粒体 COI 基因序列探讨广西钦州湾牡蛎的遗传分化[J]. 西北农林科技大学学报, 2009, 37(3): 60-65.
- [9] SC/T 9403-2012, 海洋渔业资源调查规范[S].
- [10] Folmer O, Black M, Hoeh W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates[J]. Mol Mar Biol Biotechnol, 1994, 3:294-299.
- [11] 阙华勇, 刘晓, 王海艳, 张素萍, 张国范, 张福绥. 中国近海牡蛎系统分类研究的现状和对策[J]. 动物学杂志, 2003, 38(4): 110-113.
- [12] Lam K, Morton B. Mitochondrial DNA and morphological identification of a new species of *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) cultured for centuries in the Pearl River Delta, Hong Kong, China[J]. Aquaculture, 2003, 228(1-4):1-13.
- [13] 劳赞. 近江牡蛎养殖技术[J], 水产科技, 2005, 1: 15-18.

Species identification species group structure analysis of the common oysters from the Maowei sea in Guangxi

ZHONG Fang-jie^{1, 2}, YAN Xue-yu¹, GAO Yang¹, JIANG Qing-yan¹, JIA Zheng¹, LI Qiong-zhen², LI Wen-hong¹, CHEN Qin¹

(1. College of Animal Science and Technology of Guangxi University, Nanning 530004, China; 2. Guangxi Institute of Fisheries, Nanning 530021, China)

Received: Jun., 22, 2013

Key words: Maowei Sea; oyster juvenile; oyster larvae; multiple PCR; cytochrome oxidase I gene

Abstract: The present study was conducted to learn the germplasm resource situation of oyster larvae and juveniles in Guangxi Maowei Sea, to improve the efficiency of oysters collecting. Five common oyster adults were collected from Maowei Sea, Two types of oyster D type larvae, named D₁ and D₂ were collected during different breeding peaks of mature oysters. Three types of oyster juvenile, named M₁, M₂ and M₃ were collected, during different attachment periods. Multiple PCR technology was used to identify the species of the oyster adults, juvenile and larvae. *C.hongkongensis* was the dominant species in breeding peaks of both mature oysters and oyster juvenile. The average proportion was 88.3%, 6.7% and 5% for *C.hongkongensis*, *C. ariakensis* and *C.sikamea* respectively in oyster juvenile. The quantity of *C.hongkongensis* was significant higher than that of *C.sikamea* and *C. ariakensis* ($P < 0.05$). There was no significant difference between *C.sikamea* and *C. ariakensis* ($P > 0.05$). *C.hongkongensis* was the dominant oyster in Maowei sea. In order to collect numerous *C.hongkongensis* with single species, oyster collectors should be placed before July 12. Otherwise, the proportion of oyster juvenile which adheres *C. ariakensis* and *C.sikamea* would increase, which would influence the collection and aquaculture production of Oyster.

(本文编辑: 梁德海)