

文章编号: 1674-7054(2014)01-0001-07

海南珠母贝属 *Pinctada* 6 个种的分类鉴定

温海洋^{1,2}, 石耀华^{1,2}, 顾志峰^{1,2}, 战欣^{1,2}, 王爱民^{1,2}

(1. 海南大学 热带生物资源教育部重点实验室 海南 海口 570228;

2. 海南大学 海洋学院/海南省热带水生生物技术重点实验室 海南 海口 570228)

摘要: 通过测试海南省珠母贝属 *Pinctada* 6 个种的 45 个个体的 16S 和 *H3* 基因序列, 并与 GenBank 数据库中相同物种进行比对, 构建系统发育树对其进行分类, 同时根据简单、明确的贝壳形态学特征予以最终确认。此分类法不仅可以较准确、快速地进行珠母贝属的分类鉴定, 而且分类结果不易受被测试贝类生活环境的影响, 不易受分类鉴定人员水平的限制, 有利于发现杂交种和隐存种。

关键词: 珠母贝属; 16S; *H3*; 形态特征; 分类鉴定

中图分类号: Q 179.4 **文献标志码:** A

珠母贝属 *Pinctada* 分为白珠母贝 (*P. albina*)、黑珠母贝 (*P. nigra*)、马氏珠母贝 (*P. fucata marten-sii*)、解氏珠母贝 (*P. chemnitzii*)、斑珠母贝 (*P. maculata*)、珠母贝 (*P. margaritifera*)、拟金蛤珠母贝 (*P. anomioides*)、大珠母贝 (*P. maxima*) 和射肋珠母贝 (*P. radiata*) 等 9 个种^[1]。其中, 马氏珠母贝、大珠母贝和珠母贝等是培育海水珍珠的主要母贝, 也是研究生物矿化和珍珠质形成的常用种类。珠母贝属分类鉴定的主要依据包括贝壳大小和厚度、内壳珍珠层颜色, 以及壳表的放射带、生长纹、棘和壳表颜色等形态学特征。但是, 这种分类方法存在不容忽视的问题: 首先, 这些形态特征如贝类的壳色、壳形等性状易受周围环境影响, 变化较大; 其次, 形态学特征相似, 鉴定指标少, 描述模糊易混淆, 存在一定的局限性和主观性, 很难准确的区分形态相似的种类; 另外, 对于个体较小的稚贝来说, 其形态学特征没有成贝明显; 加之珠母贝属贝类的贝壳, 薄而易碎, 常影响形态分类结果的准确性^[2-5]。因此, 很多学者增加分子标记的测序信息, 为珠母贝属的分类提供了更多的参考依据。王小玉等^[6]和王嫣等^[7]利用 RAPD 标记对珠母贝属常见种进行初步鉴定和系统发育分析; CUNHA 等^[8]和 TEMKIN 等^[9]学者则采用相对保守的 ITS, 18SrRNA 多态性分析等分子标记, 进行珠母贝属的系统发育和进化模式的分析。但是, 上述研究并未明确提出珠母贝属的分类鉴定方法。在本研究中, 笔者期望通过线粒体 16S 基因和核 *H3* 基因片段的测序结果, 结合简单、明确的贝壳特征描述, 对海南省珠母贝属中采集的 6 个常见种进行分类鉴定研究, 旨在为建立起一套珠母贝属 6 个常见种的鉴定体系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品收集 珠母贝属样品均于 2012 年 6 月采自海南省三亚海区, 共收集样品 45 个, 保存样品的贝壳用于形态学分类鉴定, 将样品的闭壳肌组织保存于 $\varphi = 95\%$ 的酒精中, 用于 DNA 提取。

1.2 DNA 提取和 PCR 扩增 基因组 DNA 提取采取高盐法^[10-11] 提取的 DNA 保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。选取 16S 和 *H3* 2 个标记对收集的 45 个样品进行 PCR 扩增, 16S 基因正向引物序列为: CGCCTGTTTAT-CAAAAACAT, 反向引物序列为: CCGGTCTGAACTCAGATCACGT^[12], 目的片段长度为 460 bp。 *H3* 基因的

收稿日期: 2014-02-16

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2010CB126405); 海南省青年基金项目(313033); 海南大学科研启动基金资助项目(kyqd1216); 海南大学青年基金资助项目(qnj1227)

作者简介: 温海洋(1987-) 男, 海南大学海洋学院 2011 级硕士研究生。

通信作者: 王爱民. E-mail: aimwang@163.com; 战欣. E-mail: zhanxin@hainu.edu.cn

正向引物为: ATGGCTCGTACCAAGCAGACVGC ,反向引物为: ATATCCTTRGGCATRGTGAC^[13] ,目的片段长度为 350 bp。PCR 程序为: 94 °C 变性 4 min 后进入循环程序 ,每个循环包括 94 °C 变性 45 s /46 °C (16S 引物的退火温度) 或 54 °C (H3 引物的退火温度) 退火 30 s /72 °C 延伸 45 s ,共进行 30 个循环 ,最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 反应总体积为 50 μ L ,包括模板 DNA 100 ng ,1 \times PCR Buffer ρ . 8 μ L dNTPs (25 mmol \cdot L⁻¹) ,1 μ L 正反向引物 (10 mmol \cdot L⁻¹) ,ExTaq 酶 4U。PCR 产物经 $w = 1\%$ 的琼脂糖凝胶检测合格后 ,送到上海生工进行测序。

1.3 数据分析 利用 MEGA 4.0 软件对 45 个样品的测序结果与 GenBank 数据库中珠母贝属 6 个种 16S 和 H3 基因的测序结果进行进化树构建。进化树构建采用邻接法 (Neighbor-joining method ,NJ) 基于 Kimura 双参数模型 (Kimura 2-parameter ,K2P) 构建单倍型系统树 ,以企鹅珍珠贝 *Pteria penguin* 作为外群 ,进化树中节点的自举置信度水平由自引导值 (Bootstrap value) 估计 ,重复次数为 1 000。

2 结果与分析

2.1 珠母贝属 45 个个体的形态学分类 根据王祯瑞^[1]的珠母贝属各个种的形态学分类方法 ,将采集的 45 个个体进行分类 ,其中白珠母贝 *P. albina* 15 个 ,黑珠母贝 *P. nigra* 7 个 ,珠母贝 *P. margaritifera* 3 个 ,大珠母贝 *P. maxima* 5 个 ,解氏珠母贝 *P. chemnitzii* 2 个 ,马氏珠母贝 *P. fucata martensii* 9 个。从王祯瑞 (2002) 对珠母贝属各个种的贝壳形态学分类鉴定标准中 ,筛选出简单、明确的标准 ,用于珠母贝属这 6 个种的分类鉴定 (表 1)。在采集的 45 个个体中仍有 4 个个体根据形态学分类很难界定 ,分别为 *P. albina*-5 , *P. albina*-11 , *P. albina*-18 和 *P. chemnitzii*-3。

表 1 珠母贝属 6 个种贝壳的形态学特征
Tab.1 Shell features of six species of Pinctada

种 名 Species	贝壳颜色 Shell color	贝壳外表面 Exterior surface of shell	贝壳内面珍珠质层区 Inner nacreous layer
珠母贝 <i>P. margaritifera</i>	壳表绿褐色 ,黑绿色 或黑色 Shell color brown , dark green or black	多数具白色或灰色放射带 ,具明显的锯齿 状同心鳞片 Most individuals with white or grey rays; scales with tapering distal ends	
大珠母贝 <i>P. maxima</i>		贝壳腹缘处的鳞片明显 ,并超出贝壳腹 缘 鳞片末端常因翘起而脱落或磨损 Scales long , sparsely distributed , and be- yond the ventral border Scales often falling off due to curling up or abraded	珍珠质层厚 ,具白色珍珠质光 泽 ,多数在珍珠质层与棱柱层相 连接处呈金黄色 Interior nacreous layer thick with silvery nacreous luster; most with a rich golden rim along the macro- prismatic margin
解氏珠母贝 <i>P. chemnitzii</i>	后耳明显长于前耳 Posterior auricle longer than the anterior		
黑珠母贝 <i>P. nigra</i>	壳色为黑褐色或紫 褐色至黑色 Shell dark brown , puce or black		珍珠质呈银灰色 ,稍带蓝紫色光泽 Nacreous layer silvery grey with little Lyons blue luster
白珠母贝 <i>P. albina</i>	壳色为白色至浅黄 色 ,多数呈白色 Shell white to light yellow. Most white	贝壳薄 Shell thin	
马氏珠母贝 <i>P. fucata martensii</i>		沿绞合线下方 ,有 1 条长形齿片;壳表放 射鳞片从贝壳中部至腹缘多而明显 ,常延 伸呈小舌状 鳞片末端翘起 The hinge teeth well developed. The exterior surface with imbricating and tapering scales projecting from shell surface or slightly raised lamina at an oblique angle	

2.2 DNA 提取和 PCR 扩增结果 从图 1 可知, 提取的 45 个供试个体的基因组 DNA 条带清楚, 无拖尾。提取的 DNA 作为 PCR 实验的模板, 并利用 16S 和 *H3* 基因的引物分别进行 PCR 扩增, 获得了单一、清晰、符合目的片段大小的特异性条带。*H3* 基因的 PCR 扩增结果见图 2。

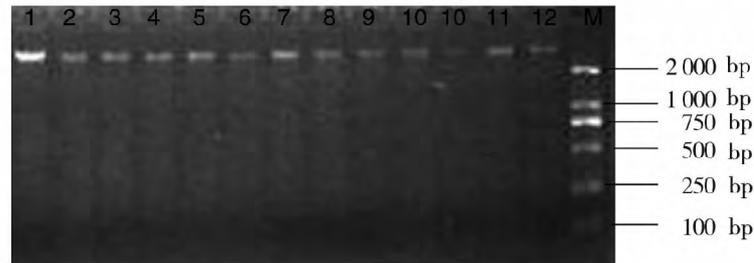


图 1 基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

M 为 DL 2 000 DNA marker; 1 ~ 12 为 12 个不同个体的基因组 DNA

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of genome DNA

M: DL 2 000 DNA marker; Number 1 - 12: twelve different DNA samples

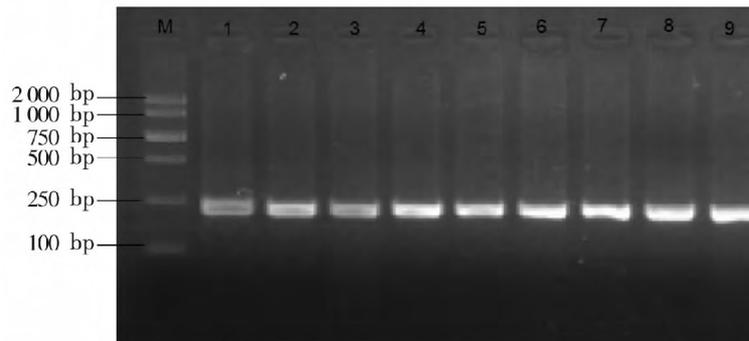


图 2 *H3* 基因片段的 PCR 扩增结果

M 为 DL 2 000 DNA marker; 1 ~ 9 为 9 个不同个体 *H3* 基因的 PCR 产物

Fig. 2 PCR amplifications of *H3* gene

M: DL 2000 DNA marker; Number 1 - 9: nine different PCR products of gene *H3*

2.3 珠母贝属 45 个个体 16S 基因的系统发育 45 个供试个体的 16S 序列通过与 NCBI 的 GenBank 数据库中下载的这 6 个物种的序列进行系统发育分析, 以企鹅珍珠贝作为外群, 构建的进化树见图 3。珠母贝属的个体分为两大支, 一支为贝壳较大的 *Pinctada*, 包括大珠母贝和珠母贝。另一分支为贝壳较小的 *Pinctada*, 包括白珠母贝、黑珠母贝、马氏珠母贝和解氏珠母贝。除了 *P. albina*-17 个体聚在大珠母贝分支外, 本研究中的 45 个个体的测序结果跟 GenBank 数据库中上传的相对应种的测序结果基本聚在相同的分支。

2.4 珠母贝属 6 个种 *H3* 基因的系统发育 跟 16S 基因聚类分析的结果类似, *H3* 基因的系统发育(图 4) 除了企鹅珍珠贝作为外群首先分支出来外, 珠母贝属的 6 个种也分为两大支, 一支为贝壳较大的 *Pinctada*, 同样包括大珠母贝和珠母贝; 另一分支贝壳较小的 *Pinctada* 也包括白珠母贝、黑珠母贝、马氏珠母贝和解氏珠母贝。所有个体均与各自从 GenBank 检索到的相同物种聚在一起。但是, *H3* 基因的聚类结果中, 有几处与 16S 基因系统发育分析结果和形态学分类结果不同的地方: 首先 *P. margaritifera*-3 和马氏珠母贝聚在一个分支, *P. albina*-5 和大珠母贝聚在同一分支, *P. chemnitzii*-3 和企鹅珍珠贝聚在同一分支。

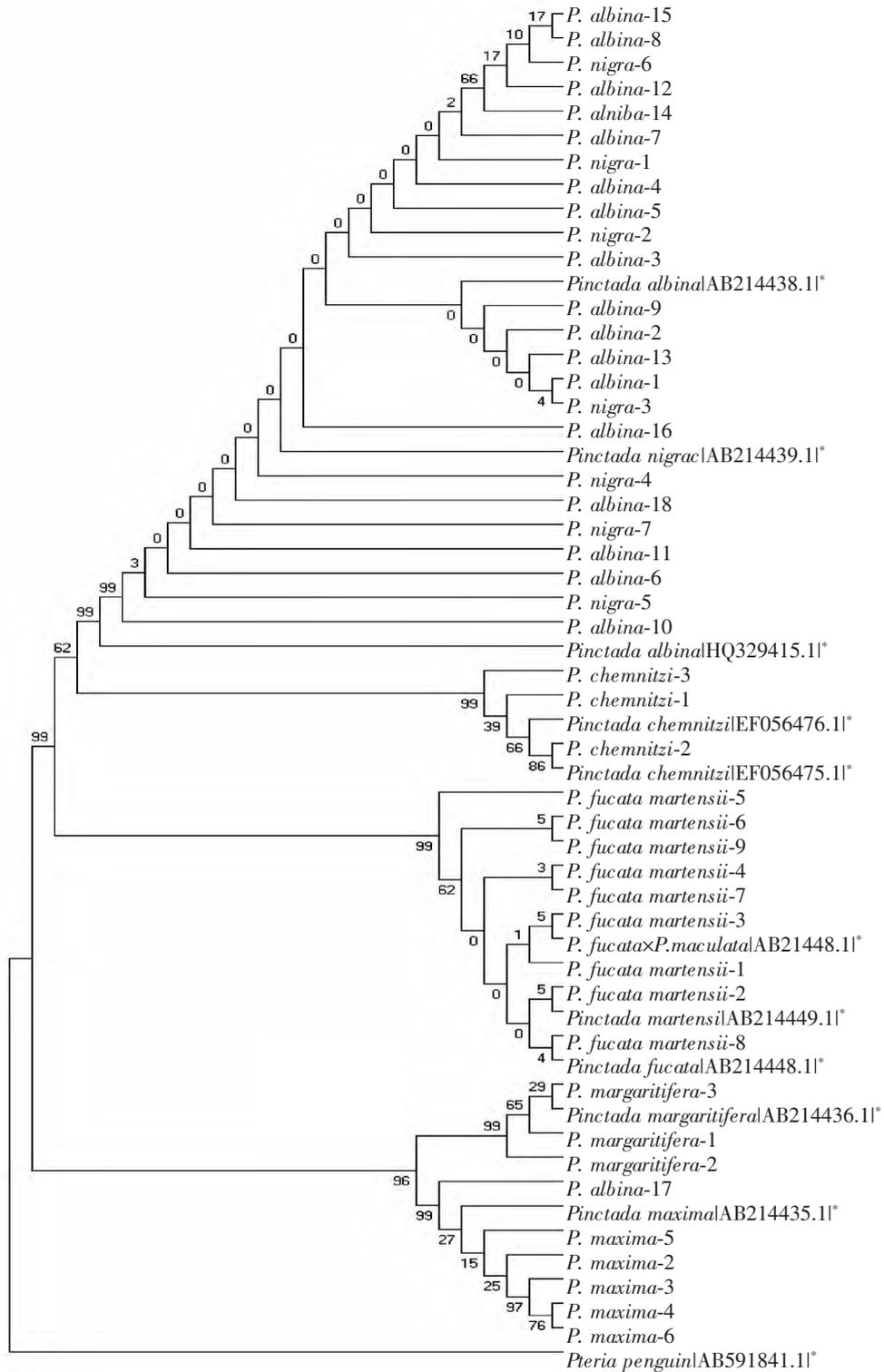


图3 基于 16S 基因构建的珠母贝属 6 个种的 NJ 树
带* 个体来自 GenBank 数据库

Fig. 3 NJ tree of six species of *Pinctada* based on gene 16S
Samples with an asterisk mark (*) are from GenBank database

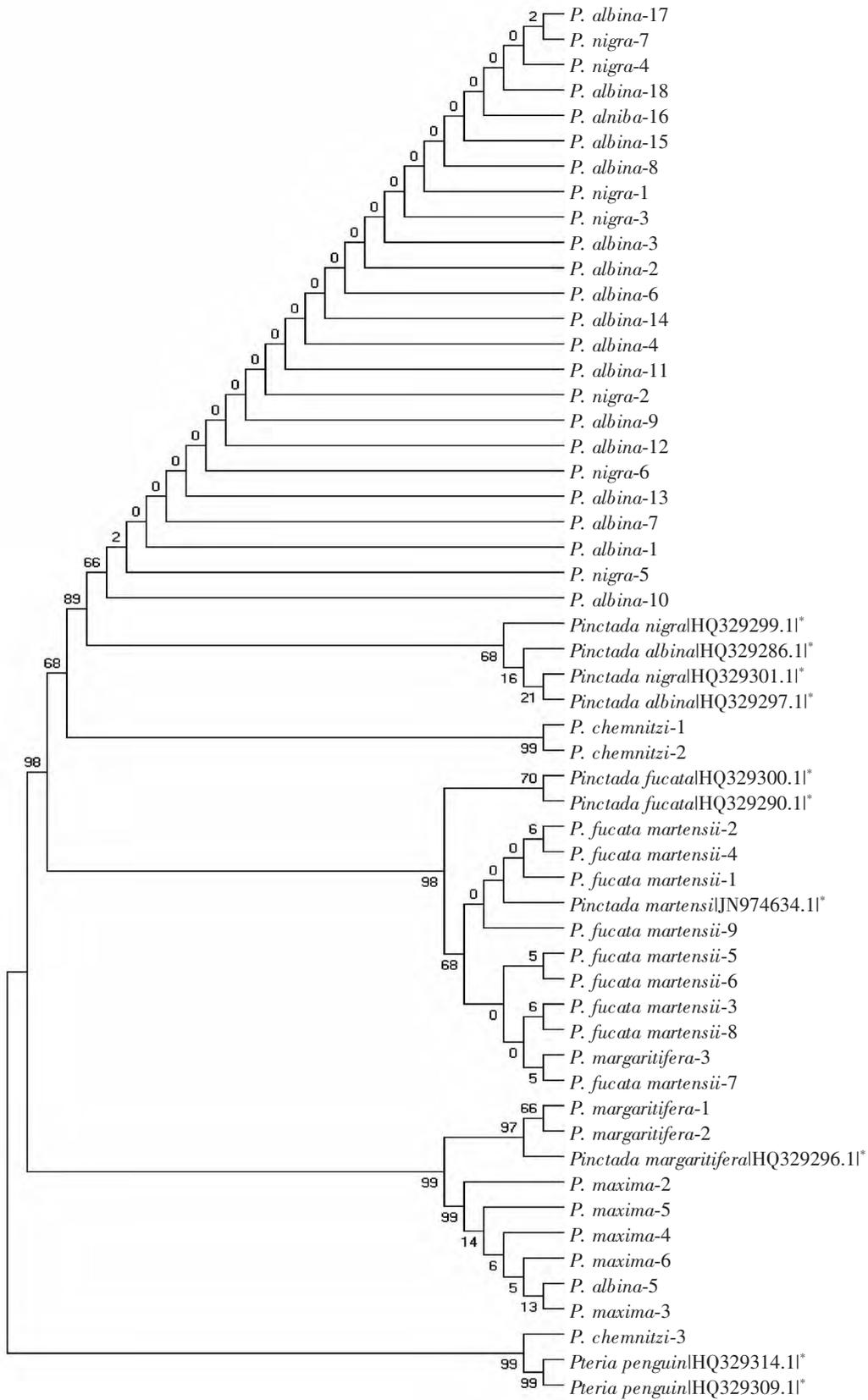


图 4 基于 *H3* 基因构建的珠母贝属 6 个种的 NJ 树

带* 个体来自 GenBank 数据库

Fig. 4 NJ tree of six species of *Pinctada* based on gene *H3*

Samples with an asterisk mark (*) are from GenBank database

3 讨论

依据外部形态特征对珠母贝属进行分类鉴定不仅受到贝类个体生长环境、分类人员鉴定过程中的主观因素等影响,同时,采集的野生个体是否为隐存种、是否存在杂交现象等问题均无法通过形态学鉴定发现,因此,本研究以海南省三亚海区采集的珠母贝属45个个体为对象,通过测试16S和H3基因的序列,并与GenBank数据库中相同物种进行比对,构建系统发育树,同时结合本研究筛选出的简单、明确的贝壳形态学分类特征,初步建立了海南省珠母贝属6个种的分类鉴定方法。

采用16S和H3基因序列构建的进化树均分为两个分支,一个分支为大型珠母贝型(大珠母贝和珠母贝),另一分支为解氏珠母贝型(解氏珠母贝、马氏珠母贝、白珠母贝和黑珠母贝),同一分支的珠母贝属各个种的亲缘关系较近^[7,14],REGINA等^[15]利用 $mtcox1$ 基因构建的珠母贝属7个种的系统进化关系得到与本研究类似的两个分支,REGINA等认为,这两个分支贝类的主要差异是贝壳大小和铰合齿有无,大型珠母贝型分支的贝类贝壳较大,但是无铰合齿;而解氏珠母贝型分支的贝类贝壳较小,具铰合齿。

在解氏珠母贝型的分支中,白珠母贝和黑珠母贝首先与解氏珠母贝聚在一起,之后再与马氏珠母贝聚为一支。各个种的个体均与同种的其他个体,包括GenBank数据库中下载的该物种的个体聚在一起,但是白珠母贝和黑珠母贝由于16S基因和H3基因的测序结果几乎完全相同,所以这两种标记都无法区分这两种珠母贝,采用ITS-2标记进行白珠母贝和黑珠母贝的序列测定也发现白珠母贝与黑珠母贝之间的碱基变异是这6种珠母贝中最少的^[16-17],由于这两种珠母贝的贝壳颜色差异显著,因此,在分类鉴定时结合形态学的方法(表1)即可区分^[18]。

根据16S基因和H3基因序列构建的NJ树,再结合形态学分类指标(表1)可以用于珠母贝属6个种的分类鉴定,但本鉴定方法仍存在尚未解决的问题:(1)无法明确分类鉴定的个体,如:*P. margaritifera*-3在16S基因构建的进化树中与其他*P. margaritifera*个体聚在同一分支,但是在H3基因序列构建的NJ树中,却与马氏珠母贝聚在一个分支,但形态学上完全符合*P. margaritifera*的特征;(2)无法明确鉴别的个体为*P. albina*-5,该个体在16S基因构建的进化树中与其他白珠母贝聚在相同类群,但是在H3基因构建的进化树中却和大珠母贝聚在同一分支,从形态学特征角度,其贝壳内面珍珠质层与棱柱层的比例明显大于其他白珠母贝;(3)与*P. albina*-5不同,*P. albina*-17在H3基因构建的NJ树中与其他白珠母贝个体聚在同一类群,但在16S基因构建的NJ树中却与大珠母贝聚在同一类群,而其形态学分类特征完全符合白珠母贝的种类鉴定标准。另外,*P. albina*-11和*P. albina*-18其16S和H3基因的测序结果均与其他白珠母贝基本相同,但是其贝壳较厚,不符合白珠母贝形态学分类特征。根据16S基因测序结果构建的进化树,*P. chemnitzii*-3和其他解氏珠母贝及GenBank数据库中的解氏珠母贝(登录号:EF056476和EF056476)聚在相同分支,但是在由H3基因序列构建的进化树中,*P. chemnitzii*-3不仅没有聚在解氏珠母贝类群,反而与企鹅珍珠贝聚在同一类群,而根据形态学特征无法明确其种名。与H3基因不同,16S基因的遗传属母性遗传,聚类结果的不同是否由此导致目前尚不明确。

因此,虽然通过分子标记和贝壳形态学特征(表1),可以将大多数珠母贝属受测试的45个个体进行分类鉴定,但是仍有无法明确分类地位的样本,导致这些样本无法准确分类的原因可能是对采样的野生个体生存环境和遗传背景不了解,特别是珠母贝属各个种之间是否存在天然杂交现象目前还不十分清楚,因此,要想完全解决珠母贝属这6个种个体的分类问题还需要进行大量的实验,如不同栖息环境对贝壳特征的影响,不同种之间在野外条件下是否存在杂交,杂交后代的成活率和形态学特征等。

参考文献:

- [1]王祯瑞. 中国动物志·软体动物门双壳纲:无脊椎动物(第31卷)[M]. 北京:科学出版社,2002.
- [2]MASAOKA T, KOBAYASHI T. Natural hybridization between *Pinctada fucata* and *Pinctada maculate* inferred from internal transcribed spacer regions of nuclear ribosomal RNA genes [J]. *Fishery Science* 2005, 71(4): 829-836.
- [3]WADA K T, TEMKIN I. The pearl oyster: Taxonomy and phylogeny [M]. The Netherlands: Elsevier 2008.
- [4]WANG Haiyan, GUO Ximing, ZHANG Guofan 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.

- [5] HOLLANDER J. Testing the grain-size model for the evolution of phenotypic plasticity [J]. *Evolution*, 2008, 62(6): 1381 – 1389.
- [6] 王小玉, 喻达辉, 郭奕惠, 等. 7 种珍珠贝 RAPD 鉴别标记的初步研究 [J]. *南方水产*, 2006(2): 18 – 22.
- [7] 王嫣, 石耀华, 顾志峰, 等. 5 种常见珍珠贝的系统发育和遗传多样性分析 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2009, 28(2): 293 – 300.
- [8] CUNHA R L, BLANC F, BONHOMME F, et al. Evolutionary patterns in pearl oysters of the genus *Pinctada* (Bivalvia: Pteriidae) [J]. *Marine Biotechnology*, 2010, 13(2): 181 – 192.
- [9] TËMKIN I. Molecular phylogeny of pearl oysters and their relatives (Mollusca, Bivalvia, Pterioidea) [J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2010(10): 342 – 371.
- [10] 战欣. 杂色鲍微卫星标记筛选、遗传连锁图谱构建及生长相关性状 QTL 定位研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2011.
- [11] 汪永庆, 王新国, 徐来祥, 等. 1 种动物基因组 DNA 提取方法的改进 [J]. *动物学杂志*, 2001(1): 27 – 29.
- [12] KESSING B, CROOM H, MARTIN A, et al. The simple fool's guide to PCR [M]. Hawaii: University of Hawaii press, 1989.
- [13] COLGAN D J, MCLAUCHLAN A, WILSON G D F, et al. Histone *H3* and *U2* snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution [J]. *Aust. J. Zool.*, 1998, 46(5): 419 – 437.
- [14] 胡亚平. 热带海洋研究: 中国珠母贝属幼虫形态的比较研究 [M]. 北京: 海洋出版社, 1984.
- [15] REGINA L C, FRANCOISE B, FRANCOIS B, et al. Evolutionary patterns in pearl oysters of the genus *Pinctada* (Bivalvia: Pteriidae) [J]. *Mar. Biotechnol.*, 2011, 13(2): 181 – 192.
- [16] 喻达辉, 朱嘉濠. 珠母贝属的系统发育: 核 rDNA ITS 序列证据 [J]. *生物多样性*, 2005, 13(4): 315 – 323.
- [17] 喻达辉, 朱嘉濠. 珠母贝属 6 个种的 ITS 2 分子标记研究 [J]. *南方水产*, 2005(1): 6 – 12.
- [18] TËMKIN I. Molecular phylogeny of pearl oysters and their relatives (Mollusca, Bivalvia, Pterioidea) [J]. *BMC Evol. Bio.*, 2010(10): 342.

Classification and Identification of Six *Pinctada* Species in Hainan Province

WEN Haiyang^{1,2}, SHI Yaohua^{1,2}, GU Zhifeng^{1,2}, ZHAN Xin^{1,2}, WANG Aimin^{1,2}

(1. Ministry of Education Key Laboratory of Tropical Bio-resources, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Ocean College/Hainan Key Laboratory of Tropical Hydrobiological Technology, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: A total of 45 individuals from six species of pearl oysters (*Pinctada* spp.) were sequenced based on gene 16S and gene *H3*. NJ trees were constructed by the 45 tested oysters and the individuals from the GenBank database using 16S and *H3* sequences. Most of the 45 tested oysters were clustered with the identical species from the GenBank database. With the help of simple and clear shell features, 6 species of *Pinctada* collected from Hainan Province were identified. This classification method could not only help identify quickly and precisely species of *Pinctada*, and avoid influences of environmental and human factors, but also could facilitate crossbreeding and discovery of cryptic species of *Pinctada*.

Key words: *Pinctada*; 16S; *H3*; shell feature; classification and identification