

文章编号: 1000-0615(2018)03-0314-08

DOI: 10.11964/jfc.20161010566

## 基于3种线粒体基因的珠母贝属系统进化关系

肖宝华<sup>1,2</sup>, 廖宝林<sup>2</sup>, 刘楚吾<sup>1\*</sup>, 杨小东<sup>2</sup>, 谢子强<sup>2</sup>, 张武财<sup>2</sup>

(1. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524025;

2. 广东海洋大学深圳研究院, 广东 深圳 518108)

**摘要:** 为了研究珠母贝属的分类地位和系统演化情况, 通过聚合酶链式反应技术(PCR)扩增并直接测序出雷州半岛珠母贝属中的马氏珠母贝、大珠母贝、珠母贝、斑珠母贝和黑珠母贝的3种线粒体基因(12S *rRNA*、16S *rRNA*和CO I)部分序列, 分析其碱基组成和种间遗传距离。同时结合GenBank上发表的白珠母贝序列, 构建珠母贝属的分子系统树。结果显示, 5种珍珠贝的3种基因部分序列碱基AT含量大于GC含量, 与其他无脊椎动物线粒体DNA序列基本一致, 序列都处于高度饱和的状态。系统分析显示, 构建的分子系统树与传统的形态分类基本一致。在黑珠母贝和白珠母贝亲缘关系上, 3种线粒体DNA片段在碱基组成、种间遗传距离和系统进化树上都显示黑珠母贝和白珠母贝非常相近, 可以认为是同一种中的2个亚种。在斑珠母贝的亲缘关系上, 系统分析显示斑珠母贝与黑珠母贝和白珠母贝更为接近。研究表明, 大珠母贝和珠母贝在系统进化中较早的分离出来, 是一个比较原始的种类。3种分子标记对马氏珠母贝亲缘关系分析上存在一定差异, 根据现有的数据尚不足以得出结论, 需进一步做分子系统研究并结合形态特征和解剖结构进行分析。

**关键词:** 珠母贝属; 线粒体基因; 12S *rRNA*; 16S *rRNA*; CO I; 分子系统学

**中图分类号:** Q 785; S 917.4

**文献标志码:** A

分子系统学(molecular phylogenetics)是通过检测生物大分子包含的遗传信息, 定量描述、分析这些信息在分类、系统发育和进化上的意义, 从而在分子水平上解释生物的多样性、系统发育及进化规律的一门学科<sup>[1]</sup>。在过去的20年间, 分子系统学开始运用于双壳类的进化生物学研究, 解决了双壳类中形态学、生态学、解剖学及生化学等不能解决的系统进化问题, 结束了双壳类系统学研究停滞不前的局面<sup>[2]</sup>。近年来, 动物线粒体DNA(mtDNA)在进化遗传学方面的研究逐渐成为分子进化遗传学领域的热点, 线粒体基因组由于具有结构简单、分子量小、进化速度快、突变率高、母系遗传等遗传特点, 成为真核生物分子遗传学、发育生物学、分子系统进化研究中的重要模式体系<sup>[3]</sup>。目前在

分子系统学研究常用到的线粒体基因有12S *rRNA*、16S *rRNA*、18S *rRNA*、细胞色素氧化酶亚基家族(CO I、CO II和CO III)、细胞色素b(Cyt b)等。这些基因在贻贝<sup>[4]</sup>、扇贝<sup>[5]</sup>、鲍科<sup>[6]</sup>、蛤类<sup>[7]</sup>、珍珠贝<sup>[8]</sup>等双壳贝类的系统进化关系研究中得到了广泛的应用。

珠母贝属(*Pinctada*)属于双壳纲(Bivalvis), 异形亚纲(Pteriomorpha), 珍珠贝目(Pterioida), 珍珠贝科(Pteriidae Gray), 是一类暖水性软体动物, 只分布在世界热带和亚热带海域, 而且是珊瑚礁动物区系的主要组成部分<sup>[9]</sup>。在我国沿海, 主要分布在中国南海沿海, 只有少数种向北可随暖流进入到东海<sup>[10]</sup>。珠母贝属的种类除了具有肉味鲜美、营养丰富的食用价值外, 还

收稿日期: 2016-10-08 修回日期: 2017-07-07

资助项目: 国家科技支撑计划(2007BAD29B00)

通信作者: 刘楚吾, E-mail: liucw@gdou.edu.cn

能生产出宝贵的珍珠。因此珠母贝属的品种是我国非常重要的经济品种, 对我国经济发展起到相当重要的作用。目前, 国内外学者对珠母贝属中的物种进行了较为广泛的研究, 主要集中在养殖生产、遗传育种、病害防治等方面<sup>[11-13]</sup>。而在分子系统学方面, 国内外已有不少学者进行了研究。Arnaud-Haond等<sup>[14]</sup>使用2种线粒体基因和5种核基因作为分子标记, 研究中太平洋岛屿的珠母贝种群遗传关系。Regina等<sup>[15]</sup>用18S *rRNA*和CO I 2种基因对珠母贝属中的11个物种进行了系统进化分析, 同时结合形态学上的贝壳尺寸和有无铰合齿来分析珠母贝属类群分化关系。在国内, 喻达辉等<sup>[16-18]</sup>通过使用不同的分子标记分析了多个地区包括珠母贝属在内的珍珠贝科物种的系统进化关系。温海洋等<sup>[19]</sup>利用16S *rRNA*和*H3*基因对海南6个种45个珠母贝样品构建了系统发育树, 为分子分类鉴定体系奠定基础。

本实验通过聚合酶链式反应技术(PCR), 利用线粒体DNA中常用的3个分子标记(12S *rRNA*、16S *rRNA*和CO I), 对雷州半岛珠母贝属的马氏珠母贝(*P. martensii*)、大珠母贝(*P. maxima*)、珠母

贝(*P. margaritifera*)、斑珠母贝(*P. maculata*)和黑珠母贝(*P. nigra*)5个品种的系统进化关系进行了分析, 为探讨珠母贝属中主要物种的亲缘关系提供相关数据, 同时也为雷州半岛珠母贝属资源保护和经济开发奠定理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 基因组总DNA的提取

5个品种的样品采自雷州覃斗镇和雷州珍稀海洋生物国家级自然保护区, 形态学鉴定依照王祯瑞<sup>[9]</sup>的中国动物志无脊椎动物第十三卷珍珠贝亚目以及徐凤山等<sup>[10]</sup>的中国海产双壳类图志<sup>[1-2]</sup>, 取闭壳肌肌肉保存于无水乙醇中备用。DNA的提取参照标准酚—氯仿法进行<sup>[20-21]</sup>, 所提取的DNA置于4 °C保存备用。

### 1.2 引物设计合成

3种线粒体基因(12S *rRNA*、16S *rRNA*、CO I)的PCR引物均参考Arnaud-Haond等<sup>[14]</sup>和Sato等<sup>[22]</sup>对珠母贝和日本扇贝(*Patinopecten yessoensis*)的研究报道。引物由上海生工生物技术服务有限公司合成, 引物信息见表1。

表 1 三种线粒体基因的PCR引物

Tab. 1 List of PCR primers for 3 mtDNA

引物名称 primer name	上游引物(5'-3') upper prime	下游引物(5'-3') lower primer	退火温度/°C $T_m$
12S rRNA	GAAACCAGGATTAGATACCC	TTTCCCGCGAGCGACGGGCG	53
16S rRNA	GCCTGTTTATCAAAAACAT	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT	50
COI	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	55

### 1.3 PCR扩增和DNA测序

PCR反应体系反应总体积25  $\mu$ L: 10 $\times$ Buffer 2.5  $\mu$ L(MgCl<sub>2</sub> 15 mmol/L), dNTP 2  $\mu$ L(2.5 mmol/L), 上下游引物各1  $\mu$ L(4  $\mu$ mol/ $\mu$ L), Taq DNA聚合酶1U(TaKaRa公司)及DNA模板1  $\mu$ L(10~100 ng); 其余用去离子水补至25  $\mu$ L。PCR反应条件: 94 °C预变性5 min; 95 °C变性30 s, 50~55 °C退火30~60 s, 72 °C延伸30 s, 共35个循环; 72 °C延伸5 min。扩增产物在1.0%的琼脂糖凝胶中检测, 凝胶成像仪拍照记录。选取扩增条带单一、浓度较高的PCR产物送至上海生工生物技术公司进行测序, 获取各基因片段的序列信息。

### 1.4 序列分析及系统进化树的构建

测序所得序列用DNASTAR中的Editseq软件进行编辑、剪切、校正, 再将校正好的序列与NCBI的数据库进行比对, 确认样品的核酸序列。采用MEGA 5.0软件进行基因序列分析, 统计出3种线粒体基因组序列长度、碱基组成、简约信息位点等相关信息。同时根据简约信息位点, 计算出种间遗传距离。本研究3种线粒体基因的系统进化树使用MEGA 5.0软件基于Kimura双参数模型(Kimura 2-parameter, K2P), 只计算颠换(transversional substitutions only), 采用邻位连接法(neighbor-joining, NJ)和最小进化法(min-

imum-evolution, ME)构建。两种系统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1000。

## 2 结果

### 2.1 三种线粒体基因序列及碱基组成分析

5个物种的12S rRNA、16S rRNA以及CO I基因部分序列长度分别为356~437, 509~523, 684~1069 bp。从5个珠母贝属物种的12S rRNA、16S rRNA以及CO I基因部分序列的碱基组成比例分析,全部序列碱基AT含量大于GC含量,与目前已知的无脊椎动物mtDNA序列中AT含量大于GC含量的情况相同<sup>[15]</sup>。12S rRNA和16S rRNA基因片段中的A、T、C、G含量相差不大,但CO I基因片段具有较高的T碱基含量,较低的A碱基含量,3种基因片段的AT总含量相差不大,基因序列都处于高度饱和状态(表2)。

### 2.2 六种珍珠贝种间遗传距离

通过MEGA 5.0计算物种间简约信息位点的遗传距离,得到12S rRNA、16S rRNA以及CO I部

分序列间的平均距离为0.2080、0.2850和0.2671。在12S rRNA序列中,黑珠母贝和大珠母贝的种间遗传距离最大,为0.3352,而黑珠母贝和斑珠母贝的遗传距离最小,为0.1031(表3)。在16S rRNA序列中,珠母贝和马氏珠母贝的种间遗传距离最大,为0.4693,而黑珠母贝和斑珠母贝的遗传距离最小,为0.1375(表4)。在CO I序列中,黑珠母贝和马氏珠母贝的种间遗传距离最大,为0.3456,而大珠母贝和珠母贝的遗传距离最小,为0.1384(表5)。

### 2.3 基于3种线粒体基因序列对珠母贝属的NJ分析

以企鹅珍珠贝(*Pteria penguin*)为外群,结合GenBank上发表的白珠母贝(*P. albina*)序列,在MEGA 5.0软件中选择只计算颠换,分别采用邻接法构建7种珍珠贝的分子系统树,3种基因构建的系统进化树(图1、图2、图3)。

### 2.4 基于3种线粒体基因序列对珠母贝属的ME分析

以企鹅珍珠贝为外群,结合GenBank上发表

表 2 五种珍珠贝12S rRNA、16S rRNA以及CO I 基因片段的碱基组成比例  
Tab. 2 The base composition of 12S rRNA, 16S rRNA and CO I gene fragments of the five species of pearl oyster

物种 species	12S rRNA					16S rRNA					CO I				
	A	T	C	G	A+T	A	T	C	G	A+T	A	T	C	G	A+T
马氏珠母贝 <i>P. martensii</i>	32.1	26.2	16.2	25.5	58.3	26.4	30.0	15.4	28.2	56.4	19.0	36.1	15.4	29.5	55.1
大珠母贝 <i>P. maculata</i>	31.4	25.8	16.3	26.5	55.2	27.3	25.6	18.0	29.1	52.9	19.4	34.9	18.1	27.6	54.3
珠母贝 <i>P. margaritifera</i>	30.7	28.8	15.2	25.3	59.5	27.0	28.4	15.7	29.0	55.4	18.5	38.9	16.5	25.3	57.4
斑珠母贝 <i>P. maxima</i>	28.6	30.0	14.2	27.2	58.6	26.9	29.7	15.7	27.7	56.6	16.1	40.6	16.9	27.2	56.7
黑珠母贝 <i>P. nigra</i>	31.7	25.2	15.7	27.4	56.9	28.5	26.9	16.7	27.9	55.4	20.2	34.5	19.1	26.2	54.7

表 3 基于12S rRNA的5种珍珠贝种间遗传距离

Tab. 3 The pairwise Tamura-Nei genetic distances of 12S rRNA gene fragments among the the five species in *Pinctada*

物种 species	马氏珠母贝 <i>P. martensii</i>	大珠母贝 <i>P. maculata</i>	珠母贝 <i>P. margaritifera</i>	斑珠母贝 <i>P. maxima</i>	黑珠母贝 <i>P. nigra</i>
马氏珠母贝 <i>P. martensii</i>					
大珠母贝 <i>P. maculata</i>	0.152				
珠母贝 <i>P. margaritifera</i>	0.263	0.293			
斑珠母贝 <i>P. maxima</i>	0.273	0.314	0.114		
黑珠母贝 <i>P. nigra</i>	0.170	0.103	0.310	0.335	

表 4 基于16S rRNA的5种珍珠贝种间遗传距离

Tab. 4 The pairwise Tamura-Nei genetic distances of 16S rRNA gene fragments among the five species in *Pinctada*

物种 species	马氏珠母贝 <i>P. martensii</i>	大珠母贝 <i>P. maculata</i>	珠母贝 <i>P. margaritifera</i>	斑珠母贝 <i>P. maxima</i>	黑珠母贝 <i>P. nigra</i>
马氏珠母贝 <i>P. martensii</i>					
大珠母贝 <i>P. maculata</i>	0.433				
珠母贝 <i>P. margaritifera</i>	0.469	0.235			
斑珠母贝 <i>P. maxima</i>	0.426	0.251	0.138		
黑珠母贝 <i>P. nigra</i>	0.466	0.138	0.310	0.335	

表 5 基于CO I的5种珍珠贝种间遗传距离

Tab. 5 The pairwise Tamura-Nei genetic distances of CO I gene fragments among the the five species in *Pinctada*

物种 species	马氏珠母贝 <i>P. martensii</i>	大珠母贝 <i>P. maculata</i>	珠母贝 <i>P. margaritifera</i>	斑珠母贝 <i>P. maxima</i>	黑珠母贝 <i>P. nigra</i>
马氏珠母贝 <i>P. martensii</i>					
大珠母贝 <i>P. maculata</i>	0.300				
珠母贝 <i>P. margaritifera</i>	0.329	0.316			
斑珠母贝 <i>P. maxima</i>	0.342	0.328	0.138		
黑珠母贝 <i>P. nigra</i>	0.346	0.293	0.310	0.335	

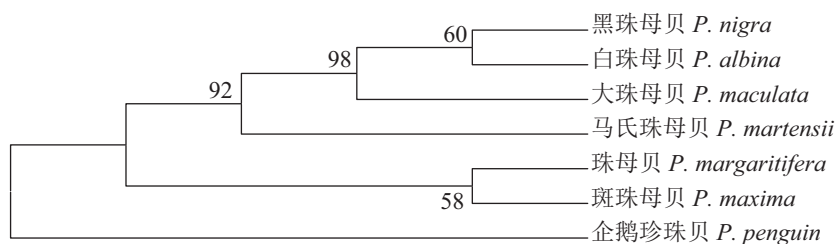


图 1 基于6种珠母贝和外群12S rRNA基因的NJ系统树

Fig. 1 The N-J tree based on 12S rRNA gene sequences of six species and outgroup

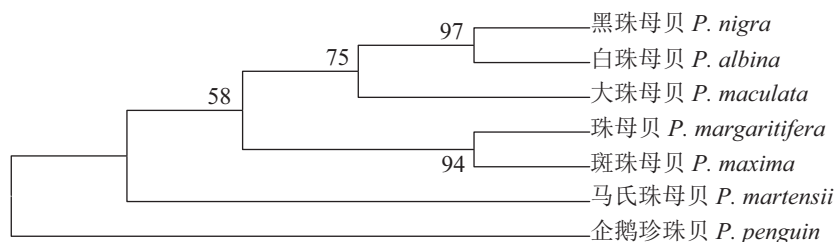


图 2 基于6种珠母贝和外群16S rRNA基因的NJ系统树

Fig. 2 The NJ tree based on 16S rRNA gene sequences of six species and outgroup

的白珠母贝(*P. albina*)序列, 在MEGA 5.0软件中选择只计算颠换, 分别采用最小进化法构建7种珍珠贝的分子系统树, 3种基因构建的系统进化树(图4、图5、图6)。

### 3 讨论

#### 3.1 珠母贝属3种基因遗传距离特点

喻达辉等<sup>[16-18]</sup>基于采用核糖体DNA内部转录

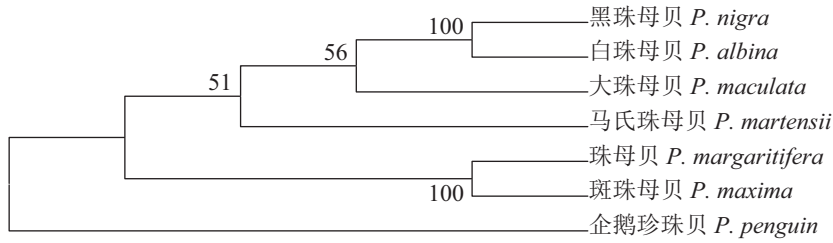


图 3 基于6种珠母贝和外群CO I 基因的NJ系统树

Fig. 3 The NJ tree based on CO I gene sequences of six species and outgroup

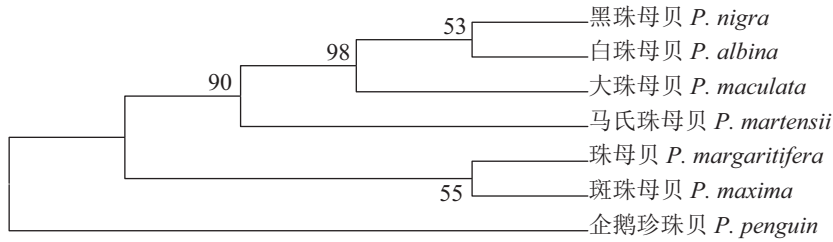


图 4 基于6种珠母贝和外群12S rRNA基因的ME系统树

Fig. 4 The Minimum-Evolution tree based on 12S rRNA gene sequences of six species and outgroup

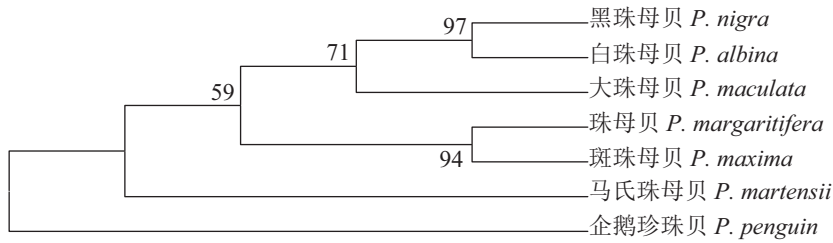


图 5 基于6种珠母贝和外群16S rRNA基因的ME系统树

Fig. 5 The Minimum-Evolution tree based on 16S rRNA gene sequences of six species and outgroup

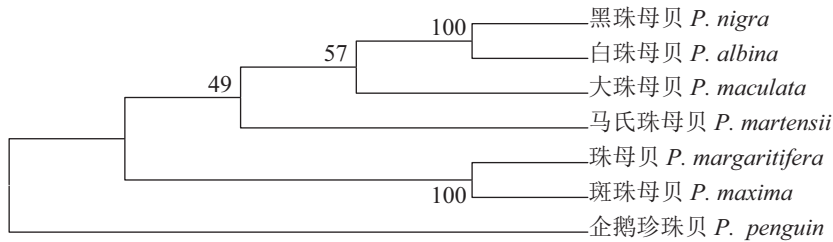


图 6 基于6种珠母贝和外群CO I 基因的ME系统树

Fig. 6 The Minimum-Evolution tree based on CO I gene sequences of six species and outgroup

间隔子1(ITS1)序列初步分析了珠母贝属8个种的亲缘关系。系统发育分析表明，所研究种类聚合成3个类群。类群 I 包括马氏母贝和覆瓦珠母贝(*P. imbricata*)。类群 II 包括白珠母贝、黑珠母贝、长耳珠母贝(*P. chemnitzii*)和射肋珠母贝(*P. radiata*)，其中前2个种聚合成1支，后两个种聚合成另一支，分别形成2个亚群类群 II A和类群

II B。类群 III 包括珠母贝和大珠母贝。本研究所获得5个物种基于3种基因所计算的遗传距离基本支持了喻达辉等<sup>[16-18]</sup>的研究结果。再结合GenBank上发表的白珠母贝3种基因的序列，类群 II 的白珠母贝和黑珠母贝之间的遗传距离较小(16S rRNA的遗传距离为0.024、12S rRNA的遗传距离为0.020、CO I 的遗传距离为0.026)，同样类

群Ⅲ的斑珠母贝和大珠母贝之间具有较小的遗传距离(16S *rRNA*的遗传距离为0.138、12S *rRNA*的遗传距离为0.114、COI的遗传距离为0.117)。类群Ⅱ和类群Ⅲ物种之间的遗传距离较大,类群Ⅲ与马氏珠母贝存在较大遗传距离。而斑珠母贝与类群Ⅱ的遗传距离更为接近。在马氏珠母贝的亲缘关系上,王桢瑞<sup>[9]</sup>认为与小型贝类如斑珠母贝等更为接近,本研究中12S *rRNA*和CO I基因构建的遗传距离结果与这一观点相一致。黑珠母贝和白珠母贝之间的遗传距离在3种基因中都有着最小的遗传距离,支持了Pouvreau等<sup>[23]</sup>的研究成果,推断白珠母贝和黑珠母贝很有可能为一个种中的2个亚种。

### 3.2 珠母贝属分子系统分析

将企鹅珍珠贝作为外群,结合GenBank上发表的白珠母贝序列,用MEGA 5.0软件对7个物种构建了NJ、ME的分子系统树。12S *rRNA*和CO I基因采用这2种方法所构建的系统进化树是完全一致的,两个大型贝(珠母贝和大珠母贝)聚合成一支,小型贝(黑珠母贝、白珠母贝和斑珠母贝)聚合成一支,其中黑珠母贝和白珠母贝聚在一起,然后再与斑珠母贝聚在一起。马氏珠母贝与小型贝亲缘关系更为接近再聚为一支。在国外,Regina等<sup>[15]</sup>利用CO I和18S *rRNA*基因构建的珠母贝属7个种的系统进化关系,在国内喻达辉等<sup>[16-18]</sup>利用核糖体DNA内部转录间隔区1(ITS1)和2(ITS2)序列对珠母贝属常见种类的系统发育和分类地位进行分析。这些研究报道的结果与本研究的12S *rRNA*和CO I基因构建的系统进化关系一致。系统进化树除了可以直观的反映物种间的亲缘关系外,也能探讨物种之间的历史渊源。从12S *rRNA*和CO I基因的分子系统树来看,大珠母贝和珠母贝较早分离出来,表明它们是一个比较原始类群,而小型贝比较晚形成的种类。但这一结果与Hynd<sup>[24]</sup>的观点完全不同。Hynd<sup>[24]</sup>认为铰合齿是一个比较原始的特征,因而认为具有铰合齿的小型贝类是比较原始的种类,而没有铰合齿的大珠母贝和珠母贝因认为是比较新的种类。而马氏珠母贝等小型珠母贝种类的铰合齿并不明显,表明珠母贝属铰合齿的有无不合作为进化研究的特征。从整个系统发育来看,大型贝最早分化,然后是马氏珠母贝、小型贝最晚分化出来。

16S *rRNA*基因采用这2种方法构建的系统进化树完全一致,但与其他2种基因构建的系统进化关系存在差异,这种差异主要体现在马氏珠母贝的进化关系上。基于16S *rRNA*基因片段的系统进化关系可看出,马氏珠母贝无论相对于大型贝或者小型贝都较早的从进化树上分离出来成为单独一支;基于12S *rRNA*和CO I基因片段构建的进化关系可看出马氏珠母贝与小型贝亲缘关系更近,先与黑珠母贝和白珠母贝聚为一支。在国内,温海洋等<sup>[19]</sup>采用16S *rRNA*基因对海南珠母贝属6个物种的系统进化关系进行分析,构建的NJ树同样显示白珠母贝和黑珠母贝聚为一支,珠母贝和大珠母贝聚为一支,但马氏珠母贝却未分离出来而与两种小型贝聚在一起,与本研究的12S *rRNA*和CO I基因构建的进化关系较为一致。关于马氏珠母贝的系统进化关系根据现有的数据尚不足以得出结论,需进一步做分子系统研究并结合形态特征和解剖结构进行分析。

### 参考文献:

- [1] 王莹,赵华斌,郝家胜.分子系统学的理论、方法及展望[J].安徽师范大学学报(自然科学版),2005,28(1):84-88.  
Wang Y, Zhao H B, Hao J S. Theory method and perspective of molecular phylogenetics[J]. Journal of Anhui Normal University (Natural Science), 2005, 28(1): 84-88(in Chinese).
- [2] Schneider J A. Bivalve systematics during the 20th century[J]. Journal of Paleontology, 2001, 75(6): 1119-1127.
- [3] Brown W M. Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1980, 77(6): 3605-3609.
- [4] Boore J L, Brown W M. Mitochondrial genomes and the phylogeny of mollusks[J]. The Nautilus, 1994, 108(S2): 61-78.
- [5] Matsumoto M, Hayami I. Phylogenetic analysis of the family pectinidae (bivalvia) based on mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I[J]. Journal of Molluscan Studies, 2000, 66(4): 477-488.
- [6] 杨建敏,郑小东,王如才,等.3种鲍16S rRNA基因片段序列的初步研究[J].青岛海洋大学学报,2003,33(1):

- 36-40.  
Yang J M, Zheng X D, Wang R C, *et al.* Comparative study on mtDNA 16S rRNA gene sequence of three species of abalone[J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 2003, 33(1): 36-40(in Chinese).
- [7] 程汉良, 夏德全, 吴婷婷, 等. 6种帘蛤科贝类及4个地理种群文蛤线粒体CO I 基因片段序列分析[J]. 海洋学报, 2007, 29(5): 109-116.  
Cheng H L, Xia D Q, Wu T T, *et al.* Sequence analysis of mitochondrial CO I gene fragment of six Veneridae clams (Mollusca: Bivalvia) and four populations of *Meretrix meretrix*[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2007, 29(5): 109-116(in Chinese).
- [8] Tëmkin I. Molecular phylogeny of pearl oysters and their relatives (Mollusca, Bivalvia, Pterioidea)[J]. BMC Evolutionary Biology, 2010, 10: 342.
- [9] 王祯瑞. 中国动物志无脊椎动物-第三十一卷: 软体动物门双壳纲珍珠贝亚目[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 65-68.  
Wang Z R. Fauna Sinica: Mollusca Bivalvia Pterioidea[M]. Beijing: Science Press, 2002: 65-68(in Chinese).
- [10] 徐凤山, 张素萍. 中国海产双壳类图志[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 64-71.  
Xu F S, Zhang S P. An Illustrated Bivalvia Mollusca Fauna of China Seas[M]. Beijing: Science Press, 2008: 64-71(in Chinese).
- [11] 邓陈茂, 黄海立, 符韶, 等. 珠母贝人工苗养殖研究[J]. 湛江海洋大学学报, 2006, 26(4): 26-30.  
Deng C M, Huang H L, Fu S, *et al.* Study on the culture for *Pinctada margaritifera* (Linne) artificial seed[J]. Journal of Zhanjiang Ocean University, 2006, 26(4): 26-30(in Chinese).
- [12] 刘永, 余祥勇, 邓陈茂, 等. 大珠母贝人工繁殖技术的研究[J]. 广东海洋大学学报, 2007, 27(3): 38-44.  
Liu Y, Yu X Y, Deng C M, *et al.* Study on Artificial Reproduction of *Pinctada maxima* (JAMESON)[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2007, 27(3): 38-44(in Chinese).
- [13] 陈皓文. 珠母贝的病害[J]. 水产养殖, 2005, 26(1): 34-37.  
Chen H W. Diseases, enemies and disasters of maricultured pearl oysters[J]. Journal of Aquaculture, 2005, 26(1): 34-37(in Chinese).
- [14] Arnaud-Haond S, Monteforte M, Blanc F, *et al.* Evidence for male-biased effective sex ratio and recent step-by-step colonization in the bivalve *Pinctada mazatlanica*[J]. Journal of Evolutionary Biology, 2003, 16(5): 790-796.
- [15] Cunha R L, Blanc F, Bonhomme F, *et al.* Evolutionary patterns in pearl oysters of the genus *Pinctada* (Bivalvia: Pteriiidae)[J]. Marine Biotechnology, 2011, 13(2): 181-192.
- [16] 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(4): 7-13.  
Yu D H, Chu K H. Study on ITS 2 molecular markers of six pearl oyster species in the genus *Pinctada*[J]. South China Fisheries Science, 2005, 1(4): 7-13(in Chinese).
- [17] 喻达辉, 李有宁, 吴开畅. 中国、日本和澳大利亚珍珠贝的ITS2序列特征分析[J]. 南方水产, 2005, 1(2): 1-6.  
Yu D H, Li Y N, Wu K C. Analysis on sequence variation of ITS 2 rDNA in *Pinctada fucata* from China, Japan and Australia[J]. South China Fisheries Science, 2005, 1(2): 1-6(in Chinese).
- [18] 喻达辉, 朱嘉濠, 贾晓平. 我国珠母贝属(*Pinctada*)主要种类亲缘关系的初步分析[J]. 海洋与湖沼, 2006, 37(3): 211-217.  
Yu D H, Chu K H, Jia X P. Preliminary analysis on genetic relationship of common pearl oysters of *Pinctada* in China[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2006, 37(3): 211-217(in Chinese).
- [19] 温海洋, 石耀华, 顾志峰, 等. 海南珠母贝属*Pinctada* 6个种的分类鉴定[J]. 热带生物学报, 2014, 5(1): 1-7.  
Wen H Y, Shi Y H, Gu Z F, *et al.* Classification and identification of six *Pinctada* species in Hainan province[J]. Journal of Tropical Biology, 2014, 5(1): 1-7(in Chinese).
- [20] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999.  
Lu S D. Current Protocols for Molecular Biology[M]. Beijing: Peking Union Medical College Press, 1999(in Chinese).
- [21] 萨姆布鲁克J, 拉塞尔D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002.  
Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. Huang P T, Trans. Beijing: Science Press, 2002(in Chinese).
- [22] Sato M, Nagashima K. Molecular characterization of a

- mitochondrial DNA segment from the Japanese scallop (*Patinopecten yessoensis*): Demonstration of a region showing sequence polymorphism in the population[J]. Marine Biotechnology, 2001, 3(4): 370-379.
- [23] Pouvreau S, Tiapari J, Gangnery A, *et al.* Growth of the black-lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, in suspended culture under hydrobiological conditions of Takapoto lagoon (French Polynesia)[J]. Aquaculture, 2000, 184(1-2): 133-154.
- [24] Hynd J S. A revision of the Australian pearl-shells, genus *Pinctada* (Lamelli-branchia)[J]. Marine and Freshwater Research, 1955, 6(1): 98-138.

## Phylogenetic relationships in *Pinctada* from Leizhou Peninsula based on 3 mtDNA genes

XIAO Baohua<sup>1,2</sup>, LIAO Baolin<sup>2</sup>, LIU Chuwu<sup>1\*</sup>, YANG Xiaodong<sup>2</sup>, XIE Ziqiang<sup>2</sup>, ZHANG Wucui<sup>2</sup>  
(1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China;  
2. Shenzhen Research Institute of Guangdong Ocean University, Shenzhen 518108, China)

**Abstract:** In order to reconstruct the molecular phylogeny of *Pinctada*, partial sequences of 3 mtDNA fragments (12S rRNA, 16S rRNA, CO I) from 5 species of *Pinctada* (*P. martensii*, *P. maxima*, *P. margaritifera*, *P. maculata*, *P. nigra*) were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and directly sequenced, and the samples were collected from Leizhou Peninsula. Base ratio and genetic distances were analyzed. At the same time, these sequences were compared with the published sequence of *P. albina*. Results showed that A+T contents of 3 mtDNA fragments from 5 species were higher than G+C obviously, in accordance with the other invertebrate mtDNA sequences. Data showed that the sequences of 3 mtDNA fragments had a high degree of saturation. Analysis showed that the molecular phylogenetic trees were basically constructed and well supported the traditional morphological taxonomy. In the relations of *P. nigra* and *P. albina*, 3 mtDNA fragments were very similar in nucleotide composition, genetic variability, genetic distance and molecular phylogenetic trees. So this suggests that *P. nigra* and *P. albina* represented two subspecies in the same species. About the taxonomy of *P. maculata*, the molecular phylogenetic trees showed that *P. maculata* was close to *P. nigra* and *P. albina*. Moreover, it revealed *P. margaritifera* and *P. maxima* were more primitive than the others. There was a little difference on the genetic relationship analysis about *P. martensii* by 3 mtDNA fragments, and no conclusion could be drawn from the existing data. It is necessary to do more study of molecular systems and morphological and anatomical structure.

**Key words:** *Pinctada*; mtDNA; 12S rRNA; 16S rRNA; CO I; molecular phylogenetics

**Corresponding author:** LIU Chuwu. E-mail: liucw@gdou.edu.cn

**Funding projects:** National Key Technology R & D Program of the Ministry of Science and Technology of China (2007BAD29B00)