

# 基于线粒体 16S rRNA 基因序列对 3 种珍珠贝的鉴定

刘国强<sup>1</sup>, 刘 锐<sup>2</sup>, 魏春雷<sup>1</sup>, 张春华<sup>1</sup>

(1. 国家海洋局 北海海洋环境监测中心站, 广西 北海 536000; 2. 河北省邯郸市环境保护局, 河北 邯郸 056002)

**摘要:** 传统的形态鉴定主要依赖于分类者的经验和水平, 容易产生分类错误。为提高物种鉴定的准确性, 作者采用形态学与线粒体 16S rRNA 基因序列分析相结合的方式对广西北海涠洲岛采集的 3 种珍珠贝进行了鉴定。研究表明, 基于形态学可将 3 种珍珠贝分别鉴定为企鹅珍珠贝(*Pteria penguin*)、宽珍珠贝(*P. loveni*)和中国珍珠贝(*P. chinensis*), 但基于 16S rRNA 基因序列, 形态学鉴定为 *P. loveni* 的标本应为 *P. lata*。*P. loveni* 和 *P. lata* 是两个完全独立的种, 并非为同物异名。珍珠贝属 16S rRNA 基因序列的种间遗传距离明显大于种内遗传距离, 适宜作为该属种类鉴定的分子标记。在基于 16S rRNA 基因序列构建的系统树中, 相同种类的不同个体均形成单系群, 并获得很高的支持率。分布于中国沿海的珍珠贝属种类应包括 *P. lata*, 是否有 *P. loveni* 的分布尚需进一步证实。

**关键词:** 珍珠贝属(*Pteria*); 16S rRNA 基因; 种类鉴定

中图分类号: Q959.212 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2016)09-0018-05

doi: 10.11759/hyxx20150709003

珍珠贝属(*Pteria*)隶属珍珠贝目(Pterioida)、珍珠贝科(Pteriidae), 是一类具有重要经济价值的贝类, 中国沿海共分布有 12 种<sup>[1-2]</sup>。其中, 宽珍珠贝起初被王禎瑞<sup>[3]</sup>定为 *P. lata*, 但随后又将 *P. lata* 视为 *P. loveni* 的同物异名<sup>[2]</sup>, 此后国内许多学者<sup>[4-6]</sup>沿用了 *P. loveni* 这一种名。而 Tëmkin<sup>[7]</sup>认为 *P. lata* 和 *P. loveni* 为两个完全独立的种, 且能通过 DNA 序列加以区分。因此, 在中国分布的究竟是 *P. lata* 还是 *P. loveni*, 或是两者兼而有之, 还未有相关研究的证实。

当前, 贝壳形态特征仍然是贝类分类的主要依据。然而, 贝壳形态会随环境变化产生差异, 许多种内变异很大或一些种间差异并不明显, 进而导致标本难以准确鉴定<sup>[8]</sup>。分子生物学技术不仅广泛应用于贝类的系统发育研究<sup>[7, 9-10]</sup>, 在种类鉴定和区分上也具有重要应用价值<sup>[8, 10-12]</sup>。作者以采自广西涠洲岛海域的 3 种珍珠贝属种类为材料, 通过测定其线粒体 16S rRNA 基因序列对其进行鉴定, 并结合 GenBank 中下载的其他珍珠贝属种类序列分析了该属的系统发育关系, 以期为其他研究提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

作者所用的中国珍珠贝(*P. chinensis*)、*P. lata* 和企鹅珍珠贝(*P. penguin*) (图 1)采自广西涠洲岛海域,

样品数分别为 2、1 和 3 个。样品冷冻保存带回实验室后, 取其腹足肌保存于无水乙醇中, -20℃ 保存备用。

### 1.2 DNA 提取和 PCR 扩增

采用 CTAB 法提取样品总 DNA<sup>[13]</sup>, 使用引物 16sar-L(5'-CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT-3')和 16sbr-H(5'-CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T-3')<sup>[14]</sup>扩增线粒体 16S rRNA 基因片段。

PCR 反应体系总体积为 50 μL, 其中:10×buffer 5 μL, dNTP 200 μmol/L, 引物各 0.3 μmol/L, Taq 酶 1.5 U, 模板 DNA 1 μL, 加去离子水补足至 50 μL。PCR 反应条件为:94℃ 预变性 2 min; 94℃ 变性 30 s, 52℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 60 s, 共 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后回收纯化, 然后进行双向测序, 测序引物与扩增引物相同。

### 1.3 数据处理和系统树构建

采用 Bioedit 7.0.1 软件进行序列拼接, 并辅以

收稿日期: 2015-07-09; 修回日期: 2015-12-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(41306132)

[Foundation: National Natural Science Foundation of China, No. 41306132]

作者简介: 刘国强(1979-), 男, 山东昌邑人, 硕士, 高级工程师, 主要从事海洋生物多样性监测与评价研究, E-mail: liuguogiang0821@163.com

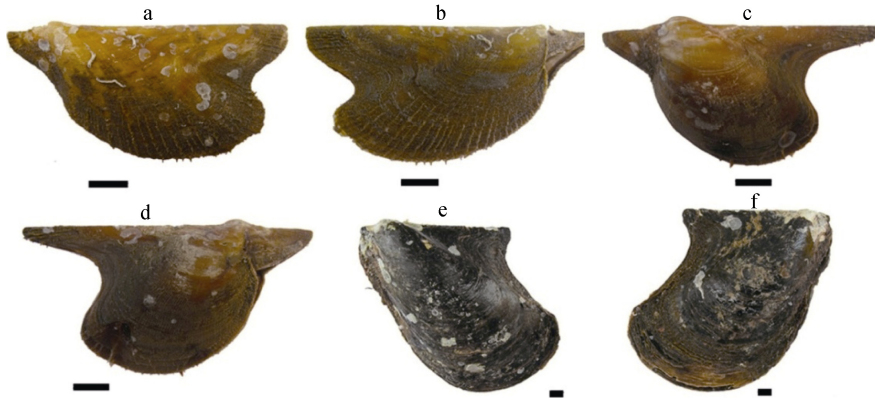


图 1 3 种珍珠贝属种类的贝壳形态

Fig. 1 Shell morphology of the three *Pteria* species  
a-b. 中国珍珠贝; c-d. *P. lata*; e-f. 企鹅珍珠贝; 比例尺=1 cm  
a-b. *Pteria chinensis*; c-d. *P. lata*; e-f. *P. penguin*; scale bar 1 cm

手工校对。合并从 GenBank 下载的数据, 利用 ClustalX1.8.3 软件对序列进行多重比对。采用 MEGA 5.10 分析序列的碱基组成以及基于 Kimura 双参数模型(Kimura 2-parameter, K2P)的遗传距离, 并利用该软件中的邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统进化树, 可靠性经过 1 000 次自展(bootstrap)检验。文中仅在系统树上标注出大于 50%的自展支持率。

## 2 结果

### 2.1 碱基组成

序列提交 GenBank, 获得登录号 KT205283-205288。3 种珍珠贝的序列长度为 495 bp ~529 bp (不包括引物区)。连同 GenBank 下载的 9 条珍珠贝属序列一起分析碱基组成, 珍珠贝属 16S rRNA 基因的 A、T、G、C 平均比例分别为 25.5%、28.6%、29.5% 和 16.4%, A+T 的比例较高。

### 2.2 遗传距离

珍珠贝属 16S rRNA 基因种内的平均遗传距离为 0~0.005(范围 0~0.011), 种间的平均遗传距离为 0.088~0.227, 种内与种间的遗传距离差异明显(表 1)。*P. lata* 和 *P. loveni* 之间的种间遗传距离最小, 为 0.008; *P. loveni* 和 *P. hirundo* 之间的种间遗传距离最大, 达 0.227。作者测得的 *P. lata* 序列与 GenBank 中已有的 *P. lata* 序列(登录号 HQ329435)完全相同。

### 2.3 系统学分析结果

以 *Pinctada longisquamosa* 为外群, 基于 16S rRNA 基因序列构建了 NJ 树(图 2), bootstrap 支持率高于 50%的标注在节点处。由图 2 可见, 所有相同种类的不同个体均形成单系, 并获得很高的支持率。珍珠贝属的种类在 NJ 树中明显可分为 2 个支系, 支系 包括 *P. penguin* 和 *P. hirundo*, 支系 包括 *P. colymbus*、

表 1 珍珠贝属种类的种内及种间平均遗传距离

Tab. 1 The average interspecific and intraspecific genetic distances of *Pteria* species

种类	1	2	3	4	5	6	7
<i>P. penguin</i>	0.005						
<i>P. lata</i>	0.143	0					
<i>P. loveni</i>	0.163	0.088	/				
<i>P. chinensis</i>	0.145	0.105	0.106	0			
<i>P. avicular</i>	0.167	0.098	0.079	0.086	/		
<i>P. hirundo</i>	0.163	0.204	0.227	0.182	0.207	0	
<i>P. colymbus</i>	0.161	0.147	0.161	0.141	0.171	0.181	/

注: “/” 表示仅 1 个个体, 无遗传距离

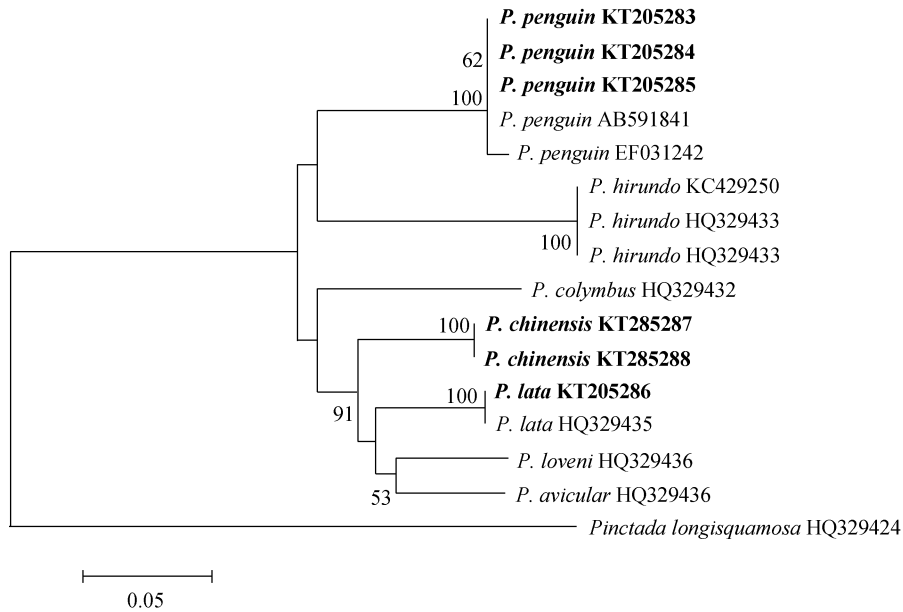


图 2 基于 16S rRNA 基因序列通过邻接法构建的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences using neighbor-joining method.

黑体显示的序列号为本研究测得

Accession numbers in bold are sequenced in this study

*P. chinensis*、*P. lata*、*P. loveni* 和 *P. avicular*，但两个支系获得的支持率较低(<50%)。

### 3 讨论

海洋贝类是种类十分丰富的一大类群，贝壳形态各异，颜色丰富多彩，鉴定难度较大。贝壳的壳形、壳色等是种类鉴定和区分的主要依据，但这些特征会因为形态可塑性、趋同进化、性别以及生长发育阶段的不同而出现变化，如蜘蛛螺属(*Lambis*)成体和幼体贝壳的形态差异很大<sup>[15]</sup>，脉红螺(*Rapana venosa*)也会因栖息海区和底质环境等因素的不同导致形态变异较大<sup>[16]</sup>。

作者采集到的 *P. lata* 标本与国内其他学者<sup>[2-6]</sup>所描述的 *P. lata* 或 *P. loveni* 在形态学上基本一致，可以断定它们应属于同一个种。作者的标本在腹缘上具有较多的小棘刺，这一特征在国内其他学者所描述的标本中并未见到。基于线粒体 16S rRNA 基因序列的分析结果表明，国内记录到的种类应为 *P. lata* 而非 *P. loveni*，中国沿海是否有 *P. loveni* 的分布尚需进一步证实。珍珠贝属 16S rRNA 基因序列的种间遗传距离明显大于种内遗传距离，适宜作为该属种类区分的标记。

形态鉴定是当前海洋生物多样性监测工作的主要手段，监测数据的质量直接取决于鉴定者的水平

和经验。而目前专业的分类人才极度匮乏，已成为监测工作的短板。中国已连续多年开展海洋生态监控区的生物多样性监测工作，取得了大量的数据，但是仍然缺少完整的生物物种组成准确名录与分布记录，不能满足多样性全面分析比较的需要<sup>[17]</sup>。不同鉴定者之间或是不同年份之间的数据可比性较差。传统的形态鉴定和分子生物学技术相结合，会极大地提高物种鉴定的准确性，提升生物多样性监测的水平。

#### 参考文献:

- [1] 刘瑞玉. 中国海洋生物名录[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 557.  
Liu Ruiyu. Checklist of marine biota of China seas[M]. Beijing: Science Press, 2008: 557.
- [2] 王祯瑞. 中国动物志[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 98-116.  
Wang Zhenrui. Fauna Sinica[M]. Beijing: Science Press, 2002: 98-116.
- [3] 王祯瑞. 中国近海珍珠贝科的研究[J]. 海洋科学集刊, 1978, 14: 101-115.  
Wang Zhenrui. A study of the Chinese species of the family Pteriidae (Mollusca)[J]. Studia Marina Sinica, 1978, 14: 101-115.
- [4] 徐凤山, 张素萍. 中国海产双壳类图志[M]. 北京: 科学出版社, 2008:66-67.  
Xu Fengshan, Zhang Suping. An illustrated bivalvia mollusca fauna of China Seas[M]. Beijing: Science

- Press, 2008: 66-67.
- [5] 杨文, 蔡英亚, 邝雪梅. 中国南海经济贝类原色图谱[M]. 北京: 中国农业出版社, 2012: 170-172.  
Yang Wen, Cai Yingya, Kuang Xuemei. Color atlas of economic mollusca from the South China sea[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2012: 170-172.
- [6] 郑小东, 曲学存, 曾晓起, 等. 中国水生贝类图谱[M]. 青岛: 青岛出版社, 2013: 399.  
Zheng Xiaodong, Qu Xuecun, Zeng Xiaohui, et al. Atlas of aquatic molluscs in China[M]. Qingdao: Qingdao Publishing House, 2013: 399.
- [7] Tëmkin I. Molecular phylogeny of pearl oysters and their relatives (Mollusca, Bivalvia, Pterioidea) [J]. BMC Evolutionary Biology, 2010, 10: 342.
- [8] 张亮, 黄艳艳, 刘焕章. 利用 mtDNA 16S rRNA 序列差异鉴定江西青岚湖的河蚌物种[J]. 水生生物学报, 2004, 28(3): 294-299.  
Zhang Liang, Huang Yanyan, Liu Huanzhang. The species identification of mussels in Qinglan Lake (Jiangxi Province) based on sequences of mitochondrial 16S Rrna gene[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2004, 3: 294-298.
- [9] Matsumoto M. Phylogenetic analysis of the subclass Pteriomorphia (Bivalvia) from mtDNA COI sequences[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2003, 27: 429-440.
- [10] 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 Dahui, Chu Kahou, Jia Xiaoping. Preliminary analysis on genetic relationship of common pearl Oysters of *Pinctada* in China[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2006, 37(3): 211-217.
- [11] 喻达辉, 朱嘉濠. 珠母贝属 6 个种的 ITS2 分子标记研究[J]. 南方水产, 2005, 1(4): 7-12.  
Yu Dahui, Chu Kahou. Study on ITS 2 molecular markers of six pearl oyster species in the genus *Pinctada*[J]. South China Fisheries Science, 2005, 1(4): 7-12.
- [12] 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 Haiyang, Shi Yaohua, Gu Zhifeng. Classification and identification of six *Pinctada* species in Hainan Province[J]. Journal of Tropical Biology, 2014, 5(1): 1-7.
- [13] Williams S T, Reid D G, Littlewood D T. A molecular phylogeny of the Littorininae (Gastropoda: Littorinidae): unequal evolutionary rates, morphological parallelism, and biogeography of the Southern Ocean[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2003, 28: 60-86.
- [14] Simom C, Frati F, Beckenbach A, et al. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers[J]. Annals of the Entomological Society of America, 1994, 87: 651-701.
- [15] 张素萍. 中国海洋贝类图鉴[M]. 北京, 海洋出版社, 2008: 86-87.  
Zhang Suping. Atlas of marine mollusks in China[M]. Beijing: Ocean Press, 2008: 86-87.
- [16] 班绍君, 薛东秀, 张涛, 等. 三种壳口颜色脉红螺(*Rapana venosa*)形态学和线粒体 16S rRNA 与 COI 基因片段差异比较分析[J]. 海洋与湖沼, 2012, 43(6): 1209-1217.  
Ban Shaojun, Xue Dongxiu, Zhang Tao, et al. Variance analysis of three color morphs of *Rapana venosa* based on morphological traits and mt16S rRNA and COI partial sequences[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2012, 43(6): 1209-1217.
- [17] 刘瑞玉. 中国海物种多样性研究进展[J]. 生物多样性, 2011, 19(6): 614-626.  
Liu Ruiyu. Progress of marine biodiversity studies in China seas[J]. Biodiversity Science, 2011, 19(6): 614-626.

# Species identification of three *Pteria* species based on mitochondrial 16S rRNA gene

LIU Guo-qiang<sup>1</sup>, LIU Rui<sup>2</sup>, WEI Chun-lei<sup>1</sup>, ZHANG Chun-hua<sup>1</sup>

(1. Marine Environmental Monitoring Center of Beihai, State Oceanic Administration, Beihai 536000, China;  
2. Handan Municipal Bureau of Environmental Protection, Handan 056002, China)

**Received:** Jul. 9, 2015

**Key words:** *Pteria*; 16S rRNA gene; species identification

**Abstract:** Species identification based on morphology highly relies on the ability of taxonomists. Some species can be easily misidentified based on morphological characteristics alone. To improve the accuracy of species identification, three *Pteria* species sampled from Weizhou Island, Guangxi, were identified based on shell morphology and mitochondrial 16S rRNA gene sequences. These three species were identified as *P. penguin*, *P. loveni* and *P. chinensis*, respectively, based on shell morphology. However, the specimen that was identified as *P. loveni* based on morphological characteristics was later identified as *P. lata* using 16S rRNA gene sequences. *P. loveni* and *P. lata* are two distinct species and are not synonyms. The genetic distances are much higher between species than within species, indicating that 16S rRNA gene is useful for species identification in the genus *Pteria*. *P. lata* is a valid species, and *P. loveni* exists in China, with no further confirmation required.

(本文编辑: 谭雪静)