

我国珠母贝属 (*Pinctada*) 主要种类亲缘关系的初步分析*

喻达辉 朱嘉濠 贾晓平

(中国水产科学研究院南海水产研究所 广州 510300;
香港中文大学生物系李福善海洋科学研究中心 沙田 香港)
(香港中文大学生物系李福善海洋科学研究中心 沙田 香港)
(中国水产科学研究院南海水产研究所 广州 510300)

提要 采用核糖体 DNA 内部转录间隔子 1 (ITS 1) 序列初步分析了珠母贝属 8 个种的亲缘关系。结果表明, ITS 1 长度范围分布在 402—474bp 之间, 大珠母贝的 ITS 1 序列最长, 黑珠母贝的最短。作为外群的企鹅珍珠贝 ITS 1 长 385bp。系统发育分析表明, 所研究种类聚合成 3 个类群。类群 I 包括合浦珠母贝 *Pinctada fucata* 和覆瓦珠母贝 *P. inbricata*。类群 II 包括白珠母贝 *P. albina*、黑珠母贝 *P. nigra*、长耳珠母贝 *P. chennitzi* 和射肋珠母贝 *P. radiata*, 其中前 2 个种聚合成 1 枝, 后两个种聚合成另一枝, 分别形成两个亚群: 类群 IIA 和类群 IIB。类群 III 包括珠母贝 *P. margaritifera* 和大珠母贝 *P. maxima*。类群 IIA 与类群 IIB 之间、类群 III 的大珠母贝与珠母贝之间的遗传距离较近 (0.080—0.100), 类群 I 与类群 II 之间遗传距离较远 (0.250—0.270), 类群 III 与类群 I 和类群 II 之间的遗传距离最大 (0.400—0.570)。类群 I 中我国的 *P. fucata* 和澳大利亚的 *P. inbricata* 之间遗传距离很小 (0.000—0.013), 而两者的种内遗传距离分别为 0.002—0.013 和 0.005。种内与种间遗传距离相重叠, 表明 *P. fucata* 和 *P. inbricata* 应为同种。类群 IIA 的 *P. albina* 与 *P. nigra* 之间的遗传距离为 0.013 可能为两个亚种。类群 IIB 中的 *P. radiata* 与 *P. chennitzi* 之间的遗传距离只有 0.005—0.007, 而本研究的 *P. chennitzi* 的 ITS 1 序列与 GenBank 中的 *P. chennitzi* 的 ITS 1 序列高度一致, 表明 *P. radiata* 的鉴别可能有误。

关键词 珠母贝属, 内部转录间隔子, 系统发育分析, 亲缘关系

中图分类号 Q179.4

珠母贝属 (*Pinctada*) 的种类分布范围很广, 在太平洋、印度洋和大西洋都有分布 (王祯瑞, 2002)。Ranson (1961) 对报道的种类进行了分类整理, 记载了 12 种。王祯瑞 (1978) 对我国近海珍珠贝科进行了比较详细的研究, 共记录了珠母贝属 7 个种, 即 *P. martensi*, *P. margaritifera*, *P. chennitzi*, *P. maxima*, *P. nigra*, *P. anon ioides* 和 *P. radiata*; 之后又描述了两种, 即 *P. albina* 和 *P. maculata*, 且将 *P. martensi* 更名为 *P. fucata martensii* 并认为 Ranson (1961) 所描述的 *P. shizuensis* 是

P. chennitzi 的同物异名 (王祯瑞, 2002)。而徐凤山 (1997) 只记载了除射肋珠母贝 (*P. radiata*) 外的 8 个种。*P. radiata* 是否存在尚有争议。珠母贝属的一些种类是我国生产海水珍珠的重要母贝。在 8 个种中 *P. martensi*, *P. margaritifera* 和 *P. maxima* 是重要的经济种类, 其中 *P. martensi* 是生产海水珍珠的主要贝种, 其余种类中 *P. anon ioides* 和 *P. maculata* 在近海已很少见到了。关于 *P. martensi* 的命名也非常混乱, 除合浦珠母贝 *P. fucata martensii* (王祯瑞, 2002) 外, 国内学者有的用马氏珠母贝 *P. martin-*

* 国家“863”重大项目, 2002AA603022 号; 广东省科技计划项目, 2002B2150101 号; 广东省自然科学基金项目, 037148 号。喻达辉, 副研究员, E-mail yudh23@21cn.com

收稿日期: 2005-01-06 收修改稿日期: 2005-06-06

sii (金启增, 1992), 有的用合浦珠母贝 *P. fucata* (蒙钊美等, 1996), 也有的用 *P. albina* (蔡英亚等, 1997)。蔡英亚等 (2001) 认为应该用马氏珠母贝 *P. martensi* 一名。但实际上 *P. martensi* 已很少用, 国内大部分学者也不用 *P. fucata martensii*。现在常用的是马氏珠母贝 *P. martensii* (Dunker 1872) 和合浦珠母贝 *P. fucata* (Gould 1850) 两个名称, 根据命名优先原则, 本文作者用合浦珠母贝 *P. fucata* 表示该种。日本学者则将 *P. martensii* 分为 *P. fucata martensii* 和 *P. fucata fucata* 两个亚种 (Kuroda et al. 1971) 并被应用 (Wada 1986; Wada et al. 1995)。这种分类和命名上的歧异不利于科学研究、学术交流和生产开发。

核糖体 DNA (rDNA) 的内部转录间隔子 1 (ITS 1) 在转录后被剪辑掉, 不具有通常意义的生物学功能, 受自然选择的作用小, 因此变异较大, 尤其种间的变异较大, 已广泛用于亲缘关系分析和近缘物种的鉴定 (Hedgecock et al. 1998; Chu et al. 2001)。丁小雷等 (2004) 对包括大珠母贝、射肋珠母贝、马氏珠母贝和企鹅珍珠贝在内的几种双壳类的 18S 和 ITS 1 序列进行了分析, 发现

ITS 1 序列变异位点信息量丰富, 适合该纲的种类鉴定和分类, 也适合属内种间、亚种和群体遗传多样性研究。He 等 (2005) 对我国珠母贝属 5 个种的 ITS 2 序列进行了分析, 发现大珠母贝和珠母贝、黑珠母贝和长耳珠母贝的遗传距离较近, 并认为 ITS 2 适合于系统发育研究和种类鉴别。喻达辉等 (2005a, b) 对合浦珠母贝的不同群体和珠母贝属的重要种类 ITS 2 序列特征进行了分析, 发现群体间的遗传多样性很丰富, 种间差异较大, 认为 ITS 2 适合作为种间和亚种的鉴别标记。何毛贤等 (2004) 对长耳珠母贝的 ITS 2 序列进行了分析, 未发现个体内变异。作者利用 ITS 1 序列分析对我国珠母贝属的 6 个种和澳大利亚的 2 个种的遗传差异进行研究, 探讨珠母贝属主要种类之间的亲缘关系, 也为解决该属内一些种的同物异名问题提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

研究的标本为野生种个体, 其种类、数量和采集地点详列于表 1。

表 1 样品种类和采集地点

Tab. 1 Specimen lists and collection localities

种类	代码	数量	DNA 序列来源	样品采集地点
合浦珠母贝 <i>Pinctada fucata</i>	Pfuc	3	AY 877512	海南三亚
			AY 877523	广西北海
			AY 877525	广东大亚湾
覆瓦珠母贝 <i>Pinctada imbricata</i>	Pimb	2	AY 877571	澳大利亚 Port Stephens
			AY 877569	
白珠母贝 <i>Pinctada albina</i>	Pab	2	AY 877498	澳大利亚 Port Stephens
			AY 877499	
珠母贝 <i>Pinctada margaritifera</i>	Pmar	2	AY 877500	海南三亚
			AY 877502	
长耳珠母贝 <i>Pinctada chonitzi</i>	Pche	2	AY 877496	广东大亚湾
			AY 877497	香港吐露港
大珠母贝 <i>Pinctada maxima</i>	Pmax	1	AY 172345 ^a	海南三亚
射肋珠母贝 <i>Pinctada radicata</i>	Prad	1	AY 144603 ^a	海南三亚
黑珠母贝 <i>Pinctada nigra</i>	Pnig	1	AY 192147 ^a	海南三亚
企鹅珍珠贝 <i>Pteria penguin</i>	Ptpen	2	AY 877503	海南三亚

注: 上角 a 表示序列来源于 GenBank

1.2 DNA提取、PCR扩增和测序

DNA提取所用组织为贝的闭壳肌,为95%乙醇保存的样品。用QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)试剂盒提取总DNA,操作步骤按试剂盒提供的方法进行。

用ITS1的通用引物(Chu *et al.* 2001)进行PCR扩增,正向引物序列为:5'-AAC AAG GTT TCC GTA GGT GA-3',反向引物序列为:5'-ATT TAG CTG CGG TCT TCA TC-3'。PCR反应体积为20 μ l含有1 \times PCR缓冲液[10mmol/L Tris-HCl (pH 9.0 25 $^{\circ}$ C), 50mmol/L KCl, 0.1% Triton X-100], 2.5mmol/L MgCl₂, 0.25mmol/L dNTP, 0.15 μ mol/L引物, 1U Taq DNA聚合酶(Promega)、DNA模板30-50ng。反应开始为93 $^{\circ}$ C变性4min之后30个循环:93 $^{\circ}$ C 40s 50 $^{\circ}$ C 40s 72 $^{\circ}$ C 1min最后为72 $^{\circ}$ C 5min。扩增产物全部上样到1.0%的琼脂糖凝胶进行电泳分离,用凝胶抽提试剂盒(Gel Extraction Kit QIAGEN)进行PCR产物纯化、回收。

纯化产物用于测序分析,测序反应用DNA测序试剂盒(ABI PRISM dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit PE Biosystems),反应体积为20 μ l包括引物3.2 μ mol Terminator Ready Reaction Mix 8.0 μ l PCR产物60-90ng。反应程序为96 $^{\circ}$ C 2min, 30个循环:

96 $^{\circ}$ C 30s, 50 $^{\circ}$ C 15s, 60 $^{\circ}$ C 4min。反应产物经乙醇-醋酸钠沉淀纯化后用于测序仪分析(测序仪为ABB100型)。

1.3 DNA序列分析与亲缘关系分析

用Sequence Editor (1.03) (Applied Biosystems)软件进行序列的校对和编辑。用ClustalX (1.83)软件(Thompson *et al.* 1997)进行多重比对分析,其参数用缺省设置。之后用MEGA 3 (Kumar *et al.* 2004)¹⁾进行遗传距离的计算、系统树重建和亲缘关系分析。

2 结果

2.1 ITS1的长度变异

珠母贝属主要种类的ITS1长度范围分布在402-474碱基对(bp)之间。其中:*P. fucata* 403-405bp, *P. inbricata* 402-405bp, *P. channitzi* 440-441bp, *P. radiata* 438bp, *P. albina* 412-416bp, *P. nigra* 402bp, *P. margaritifera* 449-450bp, *P. maxima* 474bp。作为外群(outgroup)的企鹅珍珠贝(珍珠贝属)的ITS1长385bp。

2.2 遗传距离分析

利用MEGA3软件计算了两种遗传距离,即p-distance和Kimura 2-parameter (k2p) distance (表2)。从表2可以看出,两种遗传距离反映的遗传关系是高度一致的,种内遗传距离远远小于种间遗传距离。大珠母贝与珠母贝、黑珠母贝及

表2 珠母贝属种内和种间遗传距离(%)分析

Tab. 2 Analysis of genetic distances (%) within and between species in *Pinctada*

种类	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 PfuGD	-	1.0	0.2	0.7	0.2	22.6	22.6	22.4	22.3	22.4	22.0	31.9	31.6	32.8
2 PfuHN	1.0	-	1.2	1.0	1.2	22.6	22.7	22.4	22.1	22.2	21.8	31.9	31.6	32.8
3 PfuGX	0.2	1.3	-	0.5	0.0	22.6	22.7	22.4	21.6	21.8	21.3	31.5	31.2	32.4
4 Pimb1	0.7	1.0	0.5	-	0.5	22.8	22.9	22.6	22.3	22.4	22.0	32.1	31.8	33.0
5 Pimb2	0.2	1.3	0.0	0.5	-	22.2	22.3	22.0	21.9	22.1	21.6	31.3	31.0	32.2
6 Pche	26.9	27.0	27.0	27.3	26.4	-	0.2	0.5	8.8	8.6	8.3	36.7	36.5	39.0
7 PchdHK	27.0	27.1	27.1	27.4	26.5	0.2	-	0.7	9.0	8.8	8.5	36.6	36.3	38.8
8 Prad	26.7	26.8	26.7	27.0	26.2	0.5	0.7	-	8.8	8.6	8.3	36.7	36.5	39.0
9 Pa1	26.4	26.2	25.5	26.5	26.0	9.3	9.6	9.3	-	0.0	1.3	34.6	34.6	37.7
10 Pa1b2	26.7	26.4	25.8	26.7	26.2	9.1	9.4	9.1	0.0	-	1.3	34.6	34.6	37.8

1) Kumar S, Tamura K, Nei M, 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. <http://www.megasoftware.net/>

续表

种类	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
11 Pn ig	26.0	25.7	25.1	26.0	25.5	8.8	9.0	8.8	1.3	1.3	-	34.0	34.0	37.2
12 Pm ar2	42.1	42.1	41.3	42.4	40.9	51.5	51.2	51.7	47.1	47.3	46.1	-	0.7	7.6
13 Pm ar3	41.6	41.6	40.8	41.9	40.4	51.0	50.7	51.2	47.1	47.3	46.1	0.7	-	7.6
14 Pm ax	43.8	43.8	42.9	44.1	42.6	56.5	56.2	56.7	53.7	53.9	52.8	8.1	8.0	-

注: 对角线以上为 p-distances, 对角线以下为 K inura 2-parameter distances

白珠母贝与长耳珠母贝之间的遗传距离较近 (k2p 0.088—0.096, p-distance 0.083—0.090), 合浦珠母贝及覆瓦珠母贝与其余小型珠母贝之间的遗传距离较远, 而大型珠母贝与小型珠母贝之间的遗传距离最大。但合浦珠母贝与覆瓦珠母贝、长耳珠母贝与射肋珠母贝以及白珠母贝与黑珠母贝之间的遗传距离非常小, 对它们的亲缘关系将在讨论部分进行着重分析。

2.3 系统树的构建

将 *Pteria penguin* 作为外群, 用 MEGA3 软件进行了最大简约法 (Maximum parsimony, MP)、邻结法 (Neighbor-joining, NJ) 和 UPGMA 法的系统树重建分析, 3种方法所得结果一致, Bootstrap 检测值也非常高。基于 k2p 的 NJ 树枝长 (Summary of Branch Length, SBL) 为 1.41, 而基于 p-distance 的 NJ 树枝长为 0.91。两种距离的 UPGMA 树的 SBL 分别为 1.45 和 0.92。MP 分析结果为: CI = 0.92, RI = 0.95, RCI = 0.87 (所有位点), CI = 0.88, RI = 0.95, RCI = 0.84 (简约信息位点), 树长 (Tree length) = 439。基于 k2p 遗传距离的 NJ 法系统树的拓扑结构见图 1, 两个大型珠母贝 *P. margaritifera* 与 *P. maxima* 聚合成一枝 (类群 III), 距离小型珠母贝最远; 小型珠母贝之间又形成两个大的分支, 其中 *P. fucata* 和 *P. imbricata* 形成独立一支 (类群 I), 其余种类组成另一支 (类群 II)。后者再分成两支, *P. albina* 与 *P. nigra* 聚合成一支 (类群 IIA), *P. channitzi* 与 *P. radiata* 聚合成另一支 (类群 IIB)。

类群 I 内部的平均遗传距离为 0.007 (0.000—0.013), 其中 *P. fucata* 种内平均为 0.008 (0.002—0.013) ($n=3$), *P. imbricata* 种内为 0.005 ($n=2$), *P. fucata* 与 *P. imbricata* 之间为 0.006 (0.000—0.013) ($n=6$)。

类群 IIA 内部, *P. albina* 种内距离为 0.000, *P. albina* 和 *P. nigra* 之间为 0.013 ($n=2$)。类群

IIB 内部遗传距离平均为 0.005 (0.002—0.007) ($n=3$), 类群 IIA 内部的遗传距离为 0.009 (0.000—0.013) ($n=3$), 都小于 0.010。类群 IIB 内部, *P. channitzi* 种内遗传距离为 0.002, *P. channitzi* 与 *P. radiata* 之间为 0.006 (0.005—0.007) ($n=2$)。但类群 IIA 与类群 IIB 之间的遗传距离平均为 0.009 (0.088—0.096) ($n=9$)。

在类群 III 内部, *P. margaritifera* 和 *P. maxima* 之间相距 0.080, *P. margaritifera* 种内距离为 0.007。因此, *P. margaritifera* 和 *P. maxima* 之间也相当于 2 个亚类群: IIIA 和 IIIB。

在各类群之间, 类群 I 与类群 II 之间平均相距 0.265 (0.251—0.274) ($n=30$), 类群 I 与类群 III 之间平均相距 0.422 (0.404—0.441) ($n=15$), 类群 II 与类群 III 之间平均相距 0.510 (0.461—0.567) ($n=18$)。

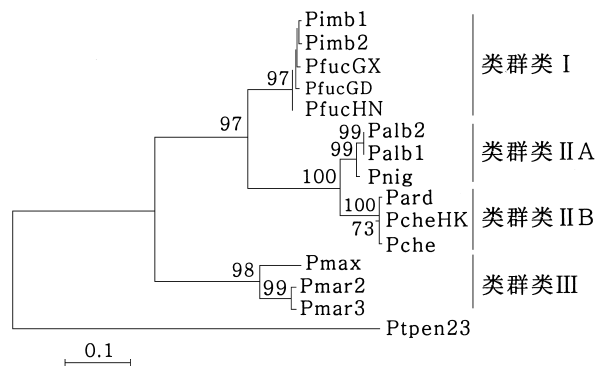


图 1 基于 ITS1 序列的邻结系统树

Fig 1 The neighbor-joining tree based on ITS1 sequences

注: 图中数字为 1000 个重复的 bootstrap 检测值, 小于 50% 的为给出。

HK: 香港, GD: 广东, GX: 广西, HN: 海南, 下同

3 讨论

系统发育 (Phylogenetics) 分析表明, 两种大型珠母贝 *P. margaritifera* 和 *P. maxima* 最早分支

出来,与小型珠母贝之间亲缘关系最远。所用小型珠母贝组成一个大组,其中,*P. fucata*和*P. imbricata*之间、*P. channitzi*与*P. radiata*之间、*P. albina*与*P. nigra*之间的遗传距离都在1.0%左右。*P. fucata*和*P. imbricata*之间的遗传距离更小于*P. fucata*种内遗传距离,表明它们可能是同种,人们一般也认为它们是同种,但缺乏形态学的比较和分子生物学证据。作者利用 AFLP 标记技术对*P. fucata*和*P. imbricata*的种群遗传学分析发现,它们之间的带型特征(Banding pattern)相同,而没有各自的独有带(Diagnostic band)(未发表资料),支持它们是同种。Coleman等(2002)用等位酶(allozyme)分析了澳大利亚的*P. imbricata*和日本的*P. fucata martensii*,表明它们是相同的一个种,而Atsumi等(2004)的等位酶分析和繁殖交配实验表明,日本的珍珠贝*P. fucata martensii*与中国、泰国、越南的珍珠贝*P. fucata*遗传距离很近,并可以繁殖,认为它们可能是同种,间接支持作者的观点。虽然生殖隔离在低等动物不像高等动物那么严格,但在贝类当中,种间遗传不亲和的报道较多(Banks et al, 1994; Hedgecock et al, 1998; Rawson et al, 2003; 姜卫国等, 1983),尤其是珠母贝属的合浦珠母贝、大珠母贝、长耳珠母贝的人工种间杂交的生化遗传证据表明,它们没有真正的杂交(李刚等, 1983),因此日本和中国等东南亚地区的珍珠贝能够正常地杂交、受精和孵化发育,表明它们没有产生生殖隔离。上述DNA、同工酶和繁殖试验的证据充分表明中国的*P. fucata*、日本的*P. fucata martensii*和澳大利亚的*P. imbricata*应为同种。由于澳大利亚的*P. imbricata*与大西洋的*P. imbricata*在细胞核核糖体DNA的intergenic spacer(IGS)和线粒体16S基因片段的酶切图谱不同(Masaoka et al, 2005),因此根据命名优先原则,其学名应用*P. fucata*。

在系统发育分析中,*P. channitzi*与*P. radiata*组成一个组,且它们之间的遗传距离只有0.005—0.007,表明它们可能亦为同种,或者说GenBank中的*P. radiata*的鉴定可能有误。作者所获得*P. channitzi*的序列与GenBank的*P. channitzi*的序列(AY144600)极为相似,表明本研究的*P. channitzi*样本的鉴定没有问题。实际上*P. radiata*是否存在是值得怀疑的。Hynd(1955)在对澳大利亚的珠母贝属种类的分类整理中认为*P. radiata*是*P. fucata*的同物异名,而Ranson(1961)则认为*P.*

*fucata*是*P. radiata*的次异名(junior synonym)。Beaumont等(1991)认为日本和澳大利亚的相应种与*P. radiata*是同一个种。王祯瑞(2002)对*P. fucata*和*P. radiata*的描述也是很难区分的。由此来看,*P. radiata*与*P. fucata*可能是同一个种,而与*P. channitzi*相差甚远。因此GenBank中的*P. radiata*应为*P. channitzi*而*P. radiata*是否存在有待进一步研究。

*P. albina*与*P. nigra*的聚类分析和遗传距离表明它们可能是亚种,它们的形态差别主要是颜色方面的差异(王祯瑞, 2002)。珠母贝也存在类似的情况,即壳内有红色和黑色两种类型,分别为两个亚种(Pouvreau et al, 2000)。为了进一步弄清*P. albina*与*P. nigra*的遗传关系,有必要结合形态特征开展更多的分子标记分析。

从系统发育和遗传距离分析来看,珠母贝属内亲缘关系较近的种,其种间遗传距离在0.090左右,如*P. albina*与*P. channitzi*之间(0.091—0.096)和*P. margaritifera*与*P. maxima*之间(0.080),稍远一点则达0.260左右(k2p),如*P. fucata*和*P. imbricata*与*P. albina*和*P. channitzi*之间(0.255—0.274),最远的是大型种与小型种之间(0.440—0.510),它们在形态上的差别也最大。此外,亲缘关系相近的种类其ITS1的长度也基本一致。这些结果表明,ITS1的序列分析能够很灵敏地区分形态相似的近缘种及亚种。

致谢 承蒙澳大利亚NSW Fisheries Port Stephens Fisheries Centre的Wayne O'Connor博士提供澳大利亚的珍珠贝样品,广西海洋研究所阎冰先生提供广西北海的样品,广东省珍珠养殖场黄碧光场长提供广东大亚湾的样品,谨致谢忱。

参 考 文 献

- 丁小雷,何毛贤,邓凤娇等,2004 双壳纲动物核糖体RNA 18S-ITS 1序列及其在分子系统发育研究中的应用. 遗传, 26(3): 319—324
- 王祯瑞, 1978 中国近海珍珠贝科的研究. 海洋科学集刊, 14: 101—117
- 王祯瑞编著, 2002 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. 北京: 科学出版社, 69—73
- 李刚,姜卫国,魏贻尧, 1983 合浦珠母贝、大珠母贝、长耳珠母贝的人工种间杂交 III 同工酶谱的比较研究. 热带海洋, 2(4): 321—328

- 何毛贤, 黄良民, 2004 长耳珠母贝核 rDNA 基因 ITS-2 序列分析. 热带海洋学报, 23(5): 81—84
- 金启增编著, 1992 珍珠贝种苗生物学. 北京: 海洋出版社, 1—196
- 姜卫国, 魏贻尧, 李刚, 1983 合浦珠母贝、长耳珠母贝和大珠母贝种间人工杂交的研究 II 受精过程和杂交后代的染色体观察. 热带海洋, 2(4): 316—320
- 徐凤山, 1997 中国海双壳类软体动物. 北京: 科学出版社, 1—333
- 喻达辉, 李有宁, 吴开畅, 2005a 中国、日本和澳大利亚珍珠贝的 ITS 2 序列特征分析. 南方水产, 1(2): 1—6
- 喻达辉, 朱嘉濠, 2005b 珠母贝属 6 个种的 ITS 1 分子标记研究. 南方水产, 1(4): 6—12
- 蔡英亚, 庄启谦, 2001 关于拉汉软体动物名称一些问题的商榷. 湛江海洋大学学报, 21(4): 84
- 蔡英亚, 张英, 魏若飞编著, 1997 贝类学概论. 基隆: 水产出版社, 1—582
- 蒙钊美, 李有宁, 邢孔武, 1996 珍珠养殖理论与技术. 北京: 科学出版社, 1—253
- A tsum i T, Kom au A, Okan oto C, 2004 Genetic relationship among the Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii* and other pearl oysters 水产育种, 33: 135—142
- Banks M A, M cgo lrick D J, Borgeson W *et al*, 1994 Genetic incompatibility and genetic divergence of pacific and kumamoto oysters *Crassostrea gigas* and *C. sikamea*. Mar Biol 121(1): 127—135
- Beaumont A R, Khandan S A A, 1991 Electrophoretic and morphometric characters in population differentiation of the pearl oyster *Pinctada radiata* (Leach), from around Bahrain J Moll Stud 57: 433—441
- Colgan D J, Ponder W F, 2002 Genetic discrimination of morphologically similar sympatric species of pearl oysters (Mollusca: Bivalvia: *Pinctada*) in eastern Australia Mar Freshw Res 53: 697—709
- Chu K H, Li C P, Ho H Y, 2001 The first internal transcribed spacer (ITS-1) of ribosomal DNA as a molecular marker for phylogenetic analyses in Crustacea Mar Biotechnol 3: 355—361
- He M, Huang L, Shi J *et al*, 2005 Variability of ribosomal DNA ITS-2 and its utility in detecting genetic relatedness of pearl oyster Mar Biotechnol 7(1): 40—45
- Hedgecock D, Li G, Banks M A *et al*, 1998 Occurrence of the Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea* in the Ariake Sea Japan Mar Biol 133: 65—68
- Hynd J S, 1955 A revision of the Australian pearl-shells genus *Pinctada* (Lamellibranchia). Australian Journal of Marine and Freshwater Research, 6: 98—137
- Kuroda T, Habe T, Oyanaka K, 1971 The Sea Shells of Sagami Bay Manuzen Tokyo 1—500
- Masaoka T, Kobayashi T, 2005 Species identification of *Pinctada imbricata* using intergenic spacer of nuclear ribosomal RNA genes and mitochondrial 16S ribosomal RNA gene regions Fish Sci 71: 837—846
- Pouvreau S, Tiapari J, Gangnery A *et al*, 2000 Growth of the black-lip pearl oyster *Pinctada margaritifera* in suspended culture under hydrobiological conditions of Takapoto lagoon (French Polynesia). Aquaculture 184: 133—154
- Ranson G, 1961 Les espèces d'huîtres perlères du genre *Pinctada* (biologie de quelques-unes d'entre elles). Institute Royal des Sciences Naturelles de Belgique Mémoires deuxième série fasc 67. 1—95, pl I—XLII
- Rawson P D, Slaughter C, Yund P O, 2003 Patterns of genetic incompatibility between the blue mussels *Mytilus edulis* and *M. trossulus*. Mar Biol 143: 317—325
- Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F *et al*, 1997 The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools Nucleic Acids Res 24: 4876—4882
- Wada K T, 1986 Genetic variability at four polymorphic loci in Japanese pearl oysters *Pinctada fucata martensii*, selected for six generations Aquaculture 59: 139—146
- Wada K T, Komau A, Ichimura Y *et al*, 1995 Spawning peak occurs during winter in the Japanese subtropical population of the pearl oyster *Pinctada fucata fucata* (Gould 1850). Aquaculture 133: 207—214

PRELIMINARY ANALYSIS ON GENETIC RELATIONSHIP OF COMMON PEARL OYSTERS OF *PINCTADA* IN CHINA

YU Da-Hui, CHU Ka-Hou, JIA Xiao-Ping

(The South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou, 510300)

Department of Biology, The Chinese University of Hong Kong, Shatin, Hong Kong)

(Department of Biology, The Chinese University of Hong Kong, Shatin, Hong Kong)

(The South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou, 510300)

Abstract Genetic relationship among common pearl oysters of *Pinctada* was addressed using the first internal transcribed spacer (ITS 1) of rDNA sequence. The sizes of ITS 1 range from 402 to 405bp with that of *P. maxima* being the longest and that of *P. nigra* being the shortest. The ITS 1 of outgroup *Pteria penguin* is 385bp long. Using *Pteria penguin* as outgroup, phylogenetic analysis indicated that the pearl oyster species are clustered into three groups. Group I includes *P. fucata* and *P. imbricata*. Group II includes *P. albina*, *P. nigra*, *P. channitzi* and *P. radiata*, among which the former two and latter two species form 2 distinct subgroups: Group IIA and IIB. Group III includes *P. margaritifera* and *P. maxima*. Among them, the genetic distances between Group IIA and Group IIB, and between *P. maxima* and *P. margaritifera* within Group III are shorter (0.080–0.100) as compared with that between Group I and Group II (0.250–0.270) whereas the genetic distance between Group III and the other two groups is the longest (0.400–0.570), suggesting that species within groups are more closely related than species among groups or subgroups. The interspecific (0.000–0.013) and intraspecific genetic distances for Chinese *P. fucata* (0.002–0.013) and Australian *P. imbricata* (0.005) within Group I are overlapped and very small, suggesting that they are likely to be conspecific. In addition, the small genetic distance between *P. albina* and *P. nigra* (0.013) suggests that they appear to be subspecies with their main difference in shell color. As for *P. channitzi* and *P. radiata*, they also appear to be conspecific with small genetic distance of 0.005–0.007 between them. The sequence of *P. channitzi* revealed in this study is consistent with that of *P. channitzi* in GenBank (AY144600), implying that our *P. channitzi* sample is correctly identified. Therefore, this suggests that the *P. radiata* sample with ITS 1 sequence registered in GenBank (AY144603) may be misidentified.

Key words *Pinctada*, ITS 1, Phylogenetic analysis, Genetic relationships