

# 基于线粒体 *cox1* 片段序列的胶州湾 浮游动物 DNA 条形码分析\*

王敏晓<sup>1</sup> 程方平<sup>1,2</sup> 李超伦<sup>1</sup> 孙松<sup>1</sup>

(1. 中国科学院海洋研究所海洋生态与环境科学重点实验室 山东胶州湾海洋生态系统国家野外科学观测研究站  
青岛 266071; 2. 中国科学院研究生院 北京 100049)

**提要** 采用 *cox1* 基因特异扩增测序的方法, 分析了胶州湾 45 种常见海洋动物的 DNA 条形码序列 82 条, 联合 GenBank 中 28 条 *cox1* 序列的分析结果表明: 种内个体间遗传差异均值为 0.013 (0—0.11); 属内不同种间遗传差异均值为 0.265 (0.137—0.369), 是种内遗传差异的 20 多倍, 条形码间隙明显。在分子系统树中, 所有种类的不同个体都聚成一个单系枝; *cox1* 序列遗传差异在科、属水平发生重叠, 无法准确解析上述分类阶元的系统发育关系; 但在更高分类阶元, *cox1* 序列具有一定程度的解析能力。利用 DNA 条形码, 本研究订正了中国近海多个桡足类的命名。以上结果表明, 线粒体 *cox1* 基因可以作为 DNA 条形码实现浮游动物的准确鉴定。

**关键词** 胶州湾, 浮游动物, *cox1* 基因, DNA 条形码

**中图分类号** Q958

浮游动物是海洋生态系统中连接传统食物链和微食物环的节点, 处于物质、能量的枢纽环节(李少菁等, 2001), 是海洋生态系统中次级生产力的主要贡献者(李强等, 2010), 因此, 深入研究该类群的时空变化对于理解海区生态系统的结构功能具有重要意义(黄世玫, 1983)。

胶州湾位于山东半岛南岸, 水流交换频繁, 受到内陆和外海水系的影响, 海产动植物资源比较丰富。根据已有报道(孙松等, 2008; 黄世玫, 1983), 胶州湾浮游动物总计达 100 余种, 隶属于八个门; 另有幼虫、幼体 30 余类。由于涉及生物类群广泛, 传统基于形态的浮游动物分析专业技术性强, 操作费时、费力。此外, 幼体丰度和分布的变化是了解关键种群动力学的基础(Uye *et al.*, 2002); 然而部分浮游动物特别是幼体形态高度相似, 基于形态特征的种类鉴定存在困难。因此, 有必要建立起一套快速、准确、易

于标准化整合多种信息的中国近海浮游桡足类鉴定平台。

分子生物学的发展使得基于统一特定简单标记的物种鉴定成为可能。具备合适分化速率的基因即可成为物种鉴定的理想标签, 当种内变异速率远小于种间变异速率时, 两个分类单元在遗传种内和种间差异不会发生重叠, 形成条形码间隙(Barcoding gap), 这就是区分两个种类的理论依据(Meyer *et al.*, 2005)。线粒体编码的细胞色素氧化酶第一亚基(*cox1*)700bp 的片段序列目前被广泛应用于后生动物的种类鉴定中(Hebert *et al.*, 2003a; Frezal *et al.*, 2008; Stoeckle, 2003)。虽然海洋生物 DNA 条形码的工作开展较晚, 但近 10 年的工作表明 *cox1* 基因是多数海生动物种类鉴定的有效工具(Radulovici *et al.*, 2010; Bucklin *et al.*, 2010a; Jennings *et al.*, 2010)。本研究采用基于 *cox1* 序列的 DNA 条形码技术, 系统分析了胶州

\* 国家海洋局海洋公益性行业科研专项, 200805042 号; 国家重点基础研究发展计划(973)项目, 2011CB403601 号; 国家自然科学基金项目, 40821004 号; 中国科学院方向群项目, KZCX2-YW-Q07-05 号; 中国科学院对外合作重点项目, GJHZ200808 号。王敏晓, E-mail: wangminxiao@qdio.ac.cn

通讯作者: 孙松, 博士, 研究员, E-mail: sunsong@qdio.ac.cn

收稿日期: 2011-01-21, 收修改稿日期: 2011-06-26

湾及周边海域 58 种常见浮游动物(包括具浮游幼虫生活史阶段的其它海洋无脊椎动物)110 条 *cox1* 序列。通过比较该基因序列的种内和种间差异, 验证 *cox1* 序列在浮游动物种类鉴定领域的适用性; 同时, 作为中国近海浮游动物 DNA 条形码数据库建设项目的分支, 本研究将为该数据库积累数据, 为实现包括肠道内含物分析和幼体分析等领域的浮游动物快速分子鉴定奠定基础, 从而推动浮游动物的多样性和生态学研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集与鉴定

样品采集搭载 2006 年度胶州湾生态站月季调查航次以及 2006 年中国科学院近海开放航次, 主要采样站位如图 1 所示, 另有部分样品采自胶州湾外南黄海水域(121.22°E, 35.51°N)。浮游动物采集使用浅水 II 型浮游生物网进行从底至表垂直拖网, 采集的样品经过简单筛选迅速固定: 甲壳类等具备硬质外壳的分类单元沥干海水后固定在 95% 的酒精中, 酒精体积应为样品体积的 4—5 倍并定期更换酒精; 水母、箭虫等胶质类动物则使用 DMSO-NaCl 缓冲液固定; 样品保存在 -20 °C 冰箱中备用。

样品邀请各类群的分类专家完成鉴定, 使用蔡司图像分析系统记录样品关键分类特征的图像资料。挑出的样品分为两份, 一份保存于福尔马林海水中备份以便后期形态学的确认, 另外一份在 -80 °C 冰箱中低温保存, 准备进行分子生物学分析。

### 1.2 分子生物学分析

除了沙海蜇等体型较大的浮游动物, 本研究通常使用整只个体提取 DNA。为了避免外源生物污染, 提取前使用 Tris-EDTA-NaCl 缓冲液反复冲洗样品。使用微量组织样品试剂盒(Qiagen)提取基因组

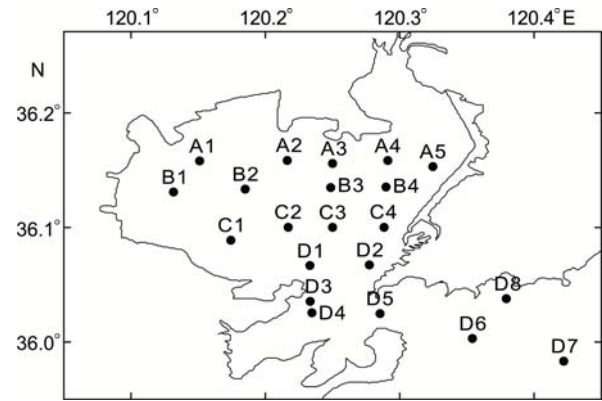


图 1 采样站位图

Fig.1 Sampling locations for the specimens collected in this study

DNA, 具体操作参照产品说明书。除了 Folmer 等(1994)的通用引物, 本研究还针对甲壳类和刺胞动物设计了通用引物以提高 PCR 扩增成功率。引物序列和退火温度见表 1。反应采用 50 $\mu$ l 体系, 条件如下: 94 °C 5min; 94 °C 1min, 42—47 °C 30s (表 1), 72 °C 1.5min, 36 个循环; 72 °C 10min。扩增产物经电泳验证后使用凝胶回收试剂盒进行纯化(Omega)。纯化产物由北京诺赛基因公司双向测序。

### 1.3 数据分析

使用 Phred 处理原始 ab1 峰图文件, 控制测序质量达到 30 以上(碱基错判概率小于 0.1%), 在默认参数下使用 Phrap 进行序列拼接(Ewing *et al.*, 1998a, b), 并用 Consed 人工校正。为了探讨 *cox1* 序列作为 DNA 条形码用于浮游动物种类鉴定的可行性, 本研究还从 GenBank 下载了 17 种海洋无脊椎动物共计 28 条序列, 相关信息见表 2。使用 Paup\*v4b10 计算 *cox1* 序列间的遗传差异, 不同分类单元间的共祖距离(patristic distances)则使用 PATRISTIC (Fourment *et al.*, 2006)软件根据最优贝叶斯树估算。为了比较种内、

表 1 本研究中所使用的引物  
Tab.1 Primers used in this study for PCR and sequencing

适用类群	引物	序列(5'—3')	长度	退火温度(°C)	来源
水母	cncoxf	TTTCTACTAATCATAARGAYATWGG	25		本研究
	cncoxr	GCTACTACATAATAWGTTRTCRTG	23	46	本研究
桡足类	crcoxf	GGTCCTGTAATCATAAAGAYATYGG	25		本研究
	crcoxrl	GCGACTACATAATAAGTRTCRTG	23	46	本研究
	crcoxr2	TCTATCCCAACTGTAAATATRTGRTG	26	47	本研究
其它	HCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	25		Folmer 等(1994)
	LCO2198	TAAACTTCAGCTGACCAAAAAATCA	26	42	Folmer 等(1994)

表2 本研究涉及种类的名称、系统分类地位(目、科)及对应的 GenBank 登录号  
 Tab.2 Specimen information for which DNA barcodes were analyzed for this study, including: phylogenetic position, species name, sample location and GenBank Accession Number

分类地位	种名	采样地点	GenBank 序列号	分类地位	种名	采样地点	GenBank 序列号
Arthropoda	<i>Alpheus japonicus</i>	胶州湾	HQ700926	Copepoda	<i>Centropages abdominalis</i>	胶州湾	EU599518
Decapoda	<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	胶州湾	HQ700930		<i>Centropages tenuiremis</i>	胶州湾	EU599519
	<i>Litopenaeus vannamei</i>	胶州湾	HQ700931		<i>Centropages tenuiremis</i>	胶州湾	EU599520
Euphausiacea	<i>Euphausia pacifica</i>	GenBank	<a href="#">AF177184</a>		<i>Sinocalanus sinensis</i>	胶州湾	HM045313
	<i>Euphausia pacifica</i>	南黄海	HQ700929		<i>Sinocalanus sinensis</i>	胶州湾	HM045315
	<i>Pseudeuphausia sinica</i>	GenBank	<a href="#">AY754819</a>		<i>Sinocalanus tenellus</i>	胶州湾	HM045320
	<i>Pseudeuphausia sinica</i>	GenBank	<a href="#">AY947488</a>		<i>Sinocalanus tenellus</i>	胶州湾	HM045321
	<i>Pseudeuphausia sinica</i>	GenBank	<a href="#">AY947491</a>		<i>Parvocalanus crassirostris</i>	胶州湾	HM045397
Mysidacea	<i>Iiella pelagicus</i>	南黄海	HM045339		<i>Parvocalanus crassirostris</i>	胶州湾	HM045396
	<i>Neomysis awatschensis</i>	胶州湾	HQ700927		<i>Paracalanus parvus</i>	胶州湾	EU856802
	<i>Neomysis orientalis</i>	胶州湾	HQ700928		<i>Paracalanus parvus</i>	胶州湾	EU856803
Cladocera	<i>Penilia avirostris</i>	胶州湾	HM045337		<i>Paracalanus parvus</i>	南黄海	EU856804
	<i>Penilia avirostris</i>	胶州湾	HM045341		<i>Labidocera euchaeta</i>	胶州湾	HM045391
Amphipoda	<i>Themisto gracilipes</i>	南黄海	HM053514		<i>Labidocera euchaeta</i>	南黄海	HM045392
Ostracoda	<i>Cypridina nana</i>	胶州湾	HM045340		<i>Labidocera rotunda</i>	GenBank	<a href="#">AB206442</a>
Copepoda	<i>Acartia bifilosa</i>	胶州湾	EU599500		<i>Labidocera rotunda</i>	GenBank	<a href="#">AY145428</a>
	<i>Acartia bifilosa</i>	胶州湾	EU599501		<i>Pseudodiaptomus marinus</i>	GenBank	<a href="#">AY145436</a>
	<i>Acartia bifilosa</i>	南黄海	EU599507		<i>Pseudodiaptomus poplesia</i>	GenBank	<a href="#">AF536521</a>
	<i>Acartia clausii</i>	南黄海	EU599495		<i>Scolecithricella nicobarica</i>	GenBank	<a href="#">AB380025</a>
	<i>Acartia clausii</i>	南黄海	EU599496		<i>Eurytemora pacifica</i>	GenBank	<a href="#">AY145427</a>
	<i>Acartia clausii</i>	南黄海	EU599499		<i>Tortanus derjugini</i>	胶州湾	HM045419
	<i>Acartia ohtsukai</i>	GenBank	<a href="#">DQ071176</a>		<i>Tortanus derjugini</i>	胶州湾	HM045418
	<i>Acartia ohtsukai</i>	胶州湾	EU599509		<i>Tortanus forcipatus</i>	GenBank	<a href="#">AF513649</a>
	<i>Acartia pacifica</i>	南黄海	HM045357		<i>Tortanus forcipatus</i>	GenBank	<a href="#">AY145431</a>
	<i>Acartia pacifica</i>	南黄海	HM045356		<i>Oithona similis</i>	胶州湾	EU599542
	<i>Calanus sinicus</i>	胶州湾	EU599514		<i>Oithona similis</i>	胶州湾	EU599543
	<i>Calanus sinicus</i>	胶州湾	EU599515		<i>Euterpina acutifrons</i>	胶州湾	EU599523
	<i>Centropages abdominalis</i>	胶州湾	EU599516		<i>Corycaeus affinis</i>	胶州湾	HQ718597
Copepoda	<i>Corycaeus affinis</i>	胶州湾	HQ718595	Hydrozoa	<i>Abylopsis tetragona</i>	胶州湾	HM053522
	<i>Corycaeus affinis</i>	胶州湾	HQ718596		<i>Abylopsis tetragona</i>	GenBank	<a href="#">GQ119938</a>
Chaetognatha	<i>Sagitta bedoti</i>	GenBank	<a href="#">DQ862795</a>		<i>Hippopodius hippopus</i>	胶州湾	HM053521
	<i>Sagitta bedoti</i>	GenBank	<a href="#">DQ862796</a>		<i>Varitentaculata yantaiensis</i>	胶州湾	HM053528
	<i>Sagitta bedoti</i>	GenBank	<a href="#">DQ862798</a>		<i>Varitentaculata yantaiensis</i>	胶州湾	HM053529
	<i>Sagitta bedoti</i>	GenBank	<a href="#">FJ648783</a>		<i>Varitentaculata yantaiensis</i>	胶州湾	HM053530
	<i>Sagitta crassa</i>	胶州湾	HQ700945		<i>Varitentaculata yantaiensis</i>	胶州湾	HM053531
	<i>Sagitta crassa</i>	胶州湾	HQ700946	Scyphozoa	<i>Nemopilema nomurai</i>	胶州湾	HQ700941
	<i>Sagitta crassa</i>	胶州湾	HQ700947		<i>Nemopilema nomurai</i>	胶州湾	HQ700940
	<i>Sagitta crassa</i>	胶州湾	HQ700935		<i>Rhopilema esculentum</i>	GenBank	<a href="#">EU373722</a>
	<i>Sagitta enflata</i>	GenBank	<a href="#">AP011547</a>		<i>Rhopilema esculentum</i>	GenBank	<a href="#">EU373723</a>
	<i>Sagitta enflata</i>	南黄海	HQ700936		<i>Rhopilema esculentum</i>	GenBank	<a href="#">EU373724</a>
	<i>Zonosagitta nagae</i>	GenBank	<a href="#">NC013810</a>		<i>Aurelia aurita</i>	南黄海	HM053523
Chordata	<i>Branchiostoma belcheri</i>	胶州湾	HQ700939	Echinodermata	<i>Asterias amurensis</i>	胶州湾	HQ700942
	<i>Oikopleura dioica</i>	胶州湾	<a href="#">AY116609</a>		<i>Asterias amurensis</i>	胶州湾	HQ700943

续表 2

分类地位	种名	采样地点	GenBank 序列号	分类地位	种名	采样地点	GenBank 序列号
Cnidaria	<i>Proboscoidactyla flavicirrata</i>	胶州湾	SF4 <i>cox1</i>		<i>Asterias amurensis</i>	胶州湾	HQ700944
Hydrozoa	<i>Rathkea octopunctata</i>	胶州湾	<u>FJ602540</u>		<i>Apostichopus japonicus</i>	胶州湾	HQ700926
	<i>Clytia hemisphaerica</i>	胶州湾	HM053515	Mollusca	<i>Venerupis philippinarum</i>	GenBank	<u>DQ399394</u>
	<i>Clytia hemisphaerica</i>	胶州湾	HM053516		<i>Venerupis philippinarum</i>	GenBank	<u>GQ855265</u>
	<i>Clytia hemisphaerica</i>	胶州湾	HM053517		<i>Crassostrea ariakensis</i>	胶州湾	HQ700934
	<i>Lovenella assimilis</i>	胶州湾	HM053520		<i>Crassostrea gigas</i>	GenBank	<u>AF280608</u>
	<i>Eirene ceylonensis</i>	胶州湾	HM053525		<i>Crassostrea gigas</i>	胶州湾	HM626169
	<i>Eirene ceylonensis</i>	胶州湾	HM053526		<i>Crassostrea gigas</i>	胶州湾	HQ718598
	<i>Eirene ceylonensis</i>	胶州湾	HM053527		<i>Crassostrea gigas</i>	胶州湾	HQ718599
	<i>Sugiura chengshanense</i>	胶州湾	HQ718600		<i>Argopecten irradians</i>	南黄海	HQ700932
	<i>Sugiura chengshanense</i>	胶州湾	HQ718594		<i>Chlamys farreri</i>	胶州湾	HQ700933
	<i>Obelia</i> sp.	胶州湾	HM053524		<i>Brachionus plicatilis</i>	胶州湾	HQ700937

注: 所有序列为 5'—3' 方向排列, 下划线的登录号表示该序列引自 GenBank

同属近缘种间以及更高分类阶元内 *cox1* 序列的遗传差异, 本研究使用 Perl 语言编写了数据分析脚本文件, 用以计算不同分类阶元水平下的平均遗传差异及其分布范围。使用 MEGA 4.1 根据最大似然距离构建邻接树(自举 500 次验证节点支持度), 使用 MrBayes 的 GTR+I+G 模型构建贝叶斯树。构建贝叶斯树时, 核苷酸序列根据其密码子位置分成两个独立的数据区域(partition 1,2: 密码子 1+2 和密码子 3)。同时运行两个蒙特卡洛分析, 使用四条马尔科夫链(1 条热链, 3 条冷链), 运行 1000000 代(每 100 代取样一次)后分歧频率的标准差趋于稳定。使用 Burnin 命令去除前 1000 个树后使用 sumt 获得合意树, 并统计贝叶斯后验概率(BPP)。

## 2 结果

### 2.1 序列特征

本研究共获得隶属于 6 个门 13 个类群共计 45 种海洋动物的 *cox1* 序列 82 条。不同生物 *cox1* 序列的扩增长度因引物的选择而异。使用通用引物的 PCR 反应扩增片段长度约为 700bp; 甲壳生物 *crcoxf* 和 *crcoxr1* 引物组合扩增长度约为 1060bp, *crcoxf* 和 *crcoxr2* 引物组合的扩增长度约为 830bp; 刺胞动物 *cncoxf* 和 *cncoxr* 引物组合扩增长度为 1060bp。所有序列比对后对长为 533bp 的共有序列进行分析显示, 可变位点 397 个, 插入缺失位点 30 个(indels), 简约信息位点 355 个。使用 Excel 绘制观察到的碱基替换(p-distance)与各分类单元的共祖距离的散点图(图 2), 从而比较不同密码子的变异速率及其突变饱和水平

(saturation)。不同位点突变饱和与其进化速率快慢密切相关, 进化速率越快突变饱和越明显。摆动密码子(wobble codons)变异速率最快, 突变饱和最为显著; 第一密码子次之, 第二密码子变异速率最慢, 其散点回归曲线接近直线, 突变饱和程度最低。

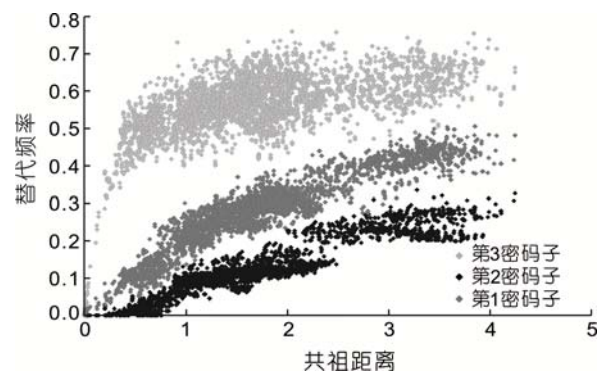


图 2 *cox1* 序列不同密码子的突变饱和和散点图

Fig.2 Mutation saturation scatter plots of different codons in *cox1*

注: Y 轴表示 *cox1* 序列的替代频率, X 轴表示对应分类单元的共祖距离

*cox1* 序列以及不同密码子核苷酸组成情况见图 3。在 110 条序列的比对结果中, 核苷酸 A、C、G、T 的平均含量分别为 25.8%、17.6%、19.6%和 7.0%, A+T 含量远高于 G+C 含量, 这符合线粒体基因组碱基组成的特点。不同密码子表现出各自的特征: 相对于其它密码子, 第一位密码子 AT 偏好并不明显, 接近中性。除了第一位密码子外, 其它两位密码子表现出一定程度的 T 偏好。与第二位密码子不同, 其它两位密码子表现出一定程度的 G 偏好。除摆动密码子外, 其

它密码子核苷酸组成各分类单元间差异不显著。不同类群 *cox1* 序列核苷酸组成差异主要是由于摆动密码子的异质性造成的, 第三位密码子的摆动性是造成该现象的根本原因(Campbell *et al.*, 2005)。

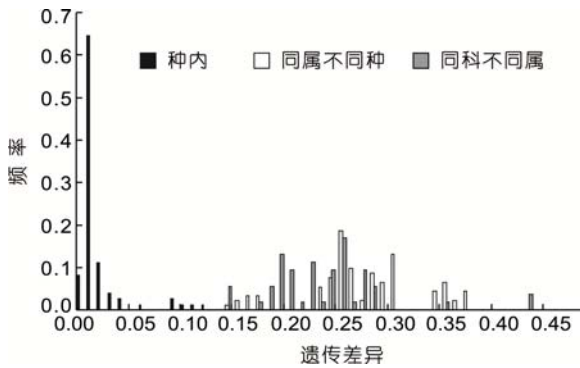


图3 胶州湾浮游动物 *cox1* 序列在不同分类阶元水平的遗传差异分布

Fig.3 Frequency distribution of K2P genetic distance for pairwise comparisons of individuals within the same species, different species within the same genera, and different genera within the same family

## 2.2 条形码间隙

条形码间隙的存在是 DNA 条形码有效的理论基础, 本研究比较不同种内与同属不同种个体的遗传差异(K2P 距离), 以探究 *cox1* 序列在浮游动物种类鉴定中的效能。基于 K2P 距离的比较结果显示, 本研究中海洋动物 *cox1* 序列遗传差异变化幅度较大, 从 0 到 0.85 不等。种内序列遗传差异较小, 在 0—0.11(百陶箭虫)之间, 平均值为 0.013 (SE = 0.003), 多数种类 (88%) 的种内遗传差异小于 0.02。同属不同种间的遗传差异则明显增大, 在 0.137—0.369 之间, 平均值为 0.265 (SE = 0.006); 种内、种间遗传差异显著 ( $P < 0.01$ ), 两者未发生重叠, DNA 间隙明显(图 3)。同一科内不同属间遗传差异从 0.135 到 0.429, 平均值为 0.227 (SE = 0.008), 该范围与同属不同种间遗传差异的分布范围重叠(图 3)。

## 2.3 分子系统树

最优贝叶斯树与邻接树的拓扑结构相似(图 4), 同一种的所有个体均聚成一个单系枝, 出现在进化树的末端(tips), 其对应节点的自举支持度(Bootstrap)和后验概率支持度均为 1。这些物种水平的单系枝的通常较短, 彼此间由长的进化枝连接。

相对于最大邻接树, 贝叶斯树中较高分类阶元

所在的节点得到了更好的解析, 节点支持度也更高。但即便在贝叶斯树中, 由于高阶分类单元内科和属水平的遗传差异发生重叠, *cox1* 序列无法准确解析科属水平浮游动物的系统分化。包括胸刺水蚤属 (*Centropages*), 唇角水蚤属 (*Labidocera*) 等属的单系性以及多数科的单系性都未得到准确解析。

就更高水平的分类阶元而言, 最优贝叶斯树的解析能力更强。本研究中共有 10 个大类的海洋动物覆盖了多个种, 最优贝叶斯树成功解析了其中 6 个大类(60%)的单系性: 分别是桡足类(Copepoda)、十足类(Decapoda)、棘皮类(Echinodermata)、钵水母类(Scyphozoa)、磷虾类(Euphausiacea)和毛颚类(Chaetognatha), 而且节点支持度较高(0.91—1)。而在邻接树中, 十足类的单系性没有得到解析, 其它大类单系枝的节点支持度也有所下降(0.66—0.96)。

## 3 讨论

浮游动物虽然个体普遍较小, 但该类群在海洋生态系统的正常运转以及渔业资源的补充中发挥着重要的作用(Harris *et al.*, 2000)。同时, 浮游动物的生活史相对较短, 其时空分布格局对于气候变动的响应格外敏感, 因此是研究全球变化的重要工具(Richardson, 2008)。准确的浮游动物种类鉴定是研究海洋生态系统的基础, 但由于基于形态特征的浮游动物研究对鉴定人员要求严格, 操作费时费力, 已经成为制约该领域发展的瓶颈(Bucklin *et al.*, 2010a)。DNA 条形码为浮游动物快速鉴定提供了新的方法。尽管有研究表明使用单一 *cox1* 片段序列无法实现某些刚分化种类的鉴定工作(Waugh, 2007), *cox1* 片段序列仍然是浮游动物 DNA 条形码的理想选择。本研究的结果中, 种内遗传差异显著小于同属不同种间遗传差异, 后者约为前者的 19 倍; 同一种类的不同个体均聚在一起, 形成一个高节点支持的单系枝。以条形码间隙作为种类界定依据的评判标准(Hebert *et al.*, 2003a, b), 本研究结果表明 *cox1* 序列可以实现胶州湾浮游动物种类的准确鉴定。同时, *cox1* 序列作为浮游动物种类鉴定工具的有效性得到了包括桡足类(王敏晓, 2010)<sup>1)</sup>、磷虾类(Bucklin *et al.*, 2007)、箭虫类(Jennings *et al.*, 2010)等浮游动物主要类群比较研究结果的证实。DNA 条形码技术已在北极海域以及印度洋马尾藻海浮游动物生物普查中实现了成功应用,

1) 王敏晓, 2010. 分子标记在中国近海浮游桡足类研究中的应用. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 164



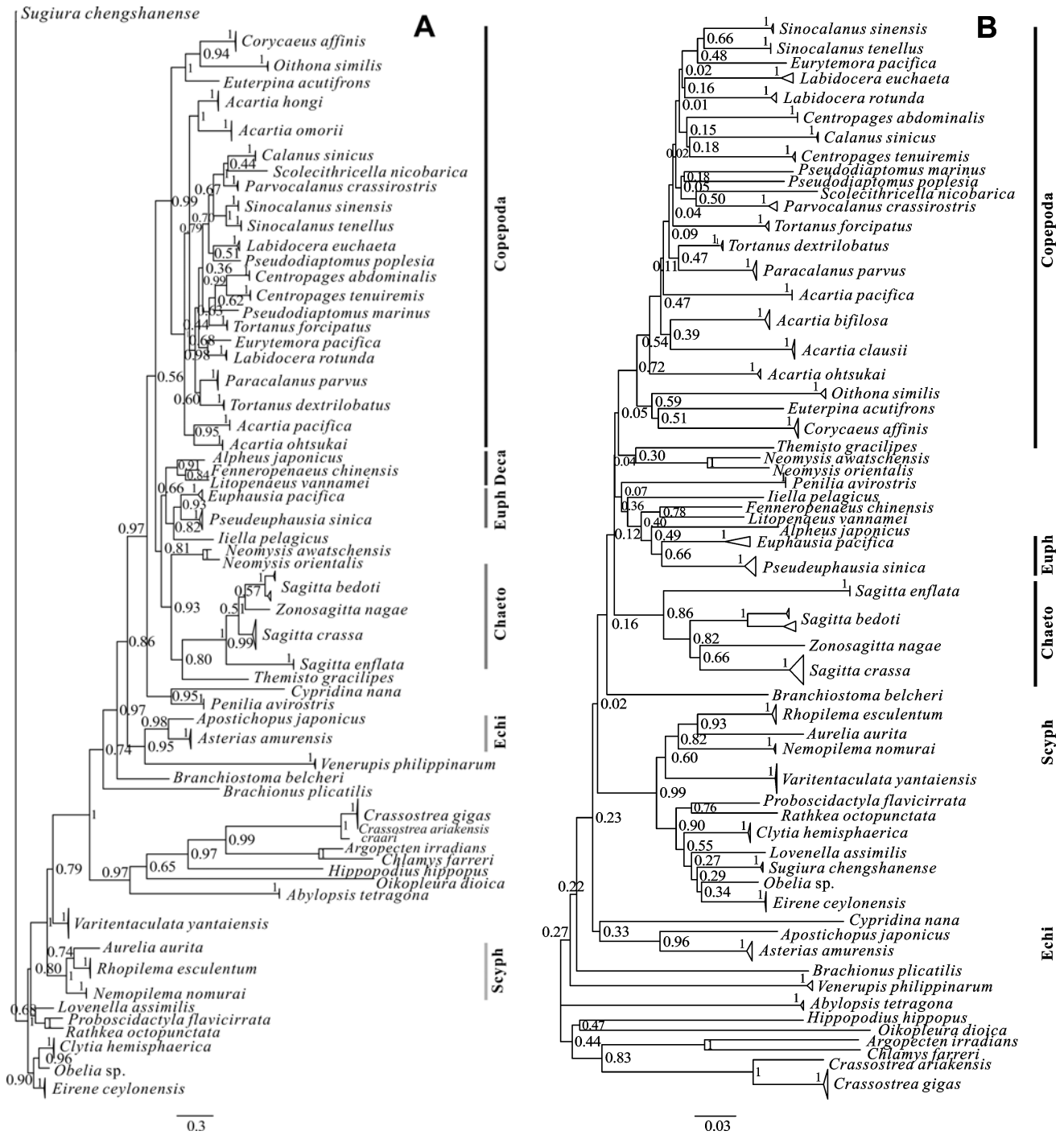


图 4 基于 *cox1* 基因构建的邻接树(A)和贝叶斯树(B)

Fig.4 Neighbour joining tree (A) and Bayesian inference tree (B) for 110 individuals of 58 common species in the Jiaozhou Bay based on *cox1* gene

邻接树自展 1000 次验证节点置信度, 贝叶斯树使用 GTR+I+G 模型, 前两位密码子和第三位密码子分成两个数据区分别估算参数。

Copepoda: 桡足类; Deca: 十足类; Euph: 磷虾类; Chaeto: 毛颚类; Scyph: 钵水母; Echi: 棘皮类

获取了大量 DNA 条形码标签(Bucklin *et al*, 2010a, b)。

然而, 通用引物在浮游动物诸多类群中扩增成功率偏低(Bucklin *et al*, 2010b), 许多重要种类的 DNA 条形码序列还是空白; 且在多数类群中, DNA

条形码标记的种类数不足已知种数的 10% (Radulovici *et al*, 2010), 大规模应用, 尚待相关研究的积累和突破。使用本研究针对各类群设计的通用引物样品一次扩增成功率达到 92%。搭配 Folmer 等(1994)

的通用引物,使用二次 PCR 或巢式 PCR 等技术,可以实现 99%以上浮游动物样品的成功扩增。高成功率的标准引物的设计与推广必将推动 DNA 条形码技术在浮游动物研究中的应用。

值得注意的是,本研究中部分种类表现出相当高的种内遗传差异,包括强壮箭虫(0.024)、真刺唇角水蚤(0.025)、太平洋磷虾(0.054)和百陶箭虫(0.072),均高于 0.02 的经验阈值(Waugh, 2007; Hebert *et al.*, 2003a)。其中与黄海水域太平洋磷虾遗传差异较大的另一样品数据来自 NCBI,采自美国阿拉斯加附近海域。由于磷虾具有一定抗衡海流的游泳能力,其不同种群间基因流较小,磷虾在大地理尺度上更易积累遗传分化(Papetti *et al.*, 2005)。已有研究表明中国近海太平洋磷虾发育途径与东太平洋该物种发育途径存在差别(陶振铨等, 2010)<sup>1)</sup>,但由于缺少具体的形态学研究,目前尚无法判断不同海域的太平洋磷虾是否存在亚种的分化。

真刺唇角水蚤分别取自河口咸水区(胶州湾)和盐度较高的黄海近岸水域(南黄海),两者生境存在一定差异。由于样品量较小,本研究尚无法就不同生境下该种是否发生遗传分化得出明确的结论,但小地理尺度咸水种遗传分化甚至隐存种分化的案例在桡足类中已有报道(Caudill *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2008)。下一步的研究中有必要扩大近岸咸水种采样范围和样本量,从而更好深入地理解中国近海浮游动物多样性的分布格局。

毛颚动物在本研究中显示出了非常高的种内遗传多样性,其中百陶箭虫分成两个分枝(节点支持度均为 1),且不同分枝间遗传差异为 0.093,远大于分枝内部遗传差异(0.006 和 0.027),因此,可能已经发生了亚种甚至隐存种的分化。隐存种分化在毛颚动物尤其是箭虫中比较普遍。强壮箭虫虽然种内遗传差异较大,但不同个体形成一个单系枝,据此推测以上遗传差异仍然是种内水平的。类似较高水平的种内遗传差异在其它箭虫(*Sagitta setosa* 等)相关研究也有报道(Peijnenburg *et al.*, 2005)。强壮箭虫根据其泡状组织的分布可以划分为 4 种亚型(王倩等, 2010),上述遗传差异是否对应于不同形态亚型仍有待进一步探讨。

胶州湾部分浮游动物种类的命名在不同文献中不尽相同(高倩等, 2008; 黄世玫, 1983; 刘瑞玉,

2008),本研究基于 DNA 条形码的结果为明晰这些疑问提供了新的证据。胶州湾文献中记载的双毛纺锤水蚤(*Acartia bifilosa*)与采自韩国水域的洪氏纺锤水蚤(*Acartia hongii*)序列一致(王敏晓等, 2010)<sup>2)</sup>,且形态特征与 Soh 等(2000)的描述一致,本研究结果支持胶州湾的 *Acartia bifilosa* 与韩国的 *Acartia hongii* 为同一种。胶州湾文献中记载的克氏纺锤水蚤(*Acartia clausi*)与沃氏纺锤水蚤(*Acartia omorii*)序列高度一致,本研究支持胶州湾报道的克氏纺锤水蚤应为沃氏纺锤水蚤,该结果也得到了最新文献的支持(刘瑞玉, 2008)。值得一提的是,早先文献中记录的太平洋纺锤水蚤(*Acartia pacifica*)在本研究中聚成了独立的单系群,且组内遗传差异远小于组间遗传差异,应该属于不同的种类。随后 Blast 比对结果显示,采自南黄海的太平洋纺锤水蚤与 Ueda 等(2006)提交的标准纺锤水蚤序列高度一致,为真正的太平洋纺锤水蚤。而胶州湾的“太平洋纺锤水蚤”则与 *Acartia ohtsukai* (Ueda *et al.*, 2006)序列高度一致,且生态习性和形态特征也与该种完全符合,因此本研究认为胶州湾记载的太平洋纺锤水蚤实际为 *Acartia ohtsukai*。

除了种类鉴定的有效工具,许多研究结果表明 *cox1* 序列中还包含更高分阶元系统演化的信息(Bucklin *et al.*, 2009; Machida *et al.*, 2006)。然而本研究的研究结果显示,由于遗传差异范围存在重叠,*cox1* 序列并不适合解析科属层次的系统发育关系。但在更高的分类阶元上,基于 *cox1* 序列的系统发育分析可以将包括桡足类、毛颚类等的六大类浮游动物分配到所属类群。这种解析能力对于未知序列所属生物分类地位的判定有重要意义(Bucklin *et al.*, 2010b)。

## 参 考 文 献

- 王 倩, 孙 松, 霍元子等, 2010. 胶州湾毛颚类生态学研究. 海洋与湖沼, 41(4): 639—644
- 刘瑞玉, 2008. 中国海洋生物名录. 北京: 科学出版社, 1267
- 孙 松, 周 克, 杨 波等, 2008. 胶州湾浮游动物生态学研究. 种类组成. 海洋与湖沼, 39(1): 1—7+2
- 李 强, 安传光, 徐霖林等, 2010. 崇明东滩潮沟浮游动物数量分布与变动. 海洋与湖沼, 41(2): 214—222
- 李少菁, 许振祖, 黄加祺等, 2001. 海洋浮游动物学研究. 厦门大学学报(自然科学版), 40(2): 574—585
- 高 倩, 徐兆礼, 庄 平, 2008. 长江口北港和北支浮游动物群落比较. 应用生态学报, 19(9): 2049—2055

1) 陶振铨, 李超伦, 孙 松等, 2010. 黄东海太平洋磷虾发育途径研究. 海洋与湖沼(待出版)

2) 王敏晓, 程方平, 孙 松等, 2010. 基于 DNA 条形码中国近海纺锤水蚤属的物种鉴定及种群遗传学研究. 海洋科学

- 黄世玫, 1983. 胶州湾的浮游动物. 山东海洋学院学报, 13(2): 43—60
- Bucklin A, Frost B W, 2009. Morphological and molecular phylogenetic analysis of evolutionary lineages within *Clausocalanus* (Copepoda: Calanoida). *Journal of Crustacean Biology*, 29(1): 111—120
- Bucklin A, Hopcroft R R, Kosobokova K N *et al*, 2010a. DNA barcoding of Arctic Ocean holozooplankton for species identification and recognition. *Deep-Sea Research Part II—Topical Studies in Oceanography*, 57(1—2): 40—48
- Bucklin A, Ortman B, Jennings R *et al*, 2010b. A “Rosetta Stone” for metazoan zooplankton: DNA barcode analysis of species diversity of the Sargasso Sea (Northwest Atlantic Ocean). *Deep-Sea Research Part II*, 57(24—26): 2234—2247
- Bucklin A, Wiebe P H, Smolenack S B *et al*, 2007. DNA barcodes for species identification of euphausiids (Euphausiacea, Crustacea). *Journal of Plankton Research*, 29(6): 483—493
- Campbell P, Smith A, Peters T, 2005. *Biochemistry illustrated: biochemistry and molecular biology in the post-genomic era*: Elsevier Churchill Livingstone, 268
- Caudill C C, Bucklin A, 2004. Molecular phylogeography and evolutionary history of the estuarine copepod, *Acartia tonsa*, on the Northwest Atlantic coast. *Hydrobiologia*, 511(1): 91—102
- Chen G, Hare M P, 2008. Cryptic ecological diversification of a planktonic estuarine copepod, *Acartia tonsa*. *Molecular Ecology*, 17(6): 1451—1468
- Ewing B, Green P, 1998a. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research*, 8(3): 186—194
- Ewing B, Hillier L, Wendl M C *et al*, 1998b. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, 8(3): 175—185
- Folmer O, Black M, Hoeh W *et al*, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3: 294—299
- Fourment M, Gibbs M J, 2006. PATRISTIC: a program for calculating patristic distances and graphically comparing the components of genetic change. *Bmc Evolutionary Biology*, 6: doi:10.1186/1471-2148-6-1
- Frezal L, Leblois R, 2008. Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects. *Infection Genetics and Evolution*, 8(5): 727—736
- Harris R, Wiebe P, Lenz J *et al*, 2000. ICES zooplankton methodology manual: Academic Press, San Diego, US, 684
- Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L *et al*, 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B—Biological Sciences*, 270(1512): 313—321
- Hebert P D N, Ratnasingham S, Dewaard J R, 2003b. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit I divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London Series B—Biological Sciences*, 270: S96—S99
- Jennings R M, Bucklin A, Pierrot-Bults A, 2010. Barcoding of Arrow Worms (Phylum Chaetognatha) from Three Oceans: Genetic Diversity and Evolution within an Enigmatic Phylum. *Plos One*, 5(3): e9949. doi:10.1371/journal.pone.0009949
- Machida R J, Miya M U, Nishida M *et al*, 2006. Molecular phylogeny and evolution of the pelagic copepod genus *Neocalanus* (Crustacea: Copepoda). *Marine Biology*, 148(5): 1071—1079
- Meyer C P, Paulay G, 2005. DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling. *Plos Biology*, 3(12): 2229—2238
- Papetti C, Zane L, Bortolotto E *et al*, 2005. Genetic differentiation and local temporal stability of population structure in the euphausiid *Meganyciophanes norvegica*. *Marine Ecology—Progress Series*, 289: 225—235
- Peijnenburg K T C A, Van Haastrecht E K, Fauvelot C, 2005. Present-day genetic composition suggests contrasting demographic histories of two dominant chaetognaths of the North-East Atlantic, *Sagitta elegans* and *S. setosa*. *Marine Biology*, 147(6): 1279—1289
- Radulovici A E, Archambault P, Dufresne F, 2010. DNA barcodes for marine biodiversity: Moving Fast Forward? *Diversity*, 2: 450—472
- Richardson A J, 2008. In hot water: zooplankton and climate change. *Ices Journal of Marine Science*, 65(3): 279—295
- Soh H Y, Suh H L, 2000. A new species of *Acartia* (Copepoda, Calanoida) from the Yellow Sea. *Journal of Plankton Research*, 22(2): 321—337
- Stoeckle M, 2003. Taxonomy, DNA, and the bar code of life. *Bioscience*, 53(9): 796—797
- Ueda H, Bucklin A C, 2006. *Acartia (Odontacartia) ohtsukai*, a new brackish-water calanoid copepod from Ariake Bay, Japan, with a redescription of the closely related A-Pacifica from the Seto Inland Sea. *Hydrobiologia*, 560: 77—91
- Uye S, Aoto I, Onbe T, 2002. Seasonal population dynamics and production of *Microsetella norvegica*, a widely distributed but little-studied marine planktonic harpacticoid copepod. *Journal of Plankton Research*, 24(2): 143—153
- Waugh J, 2007. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *Bioessays*, 29(2): 188—197



## DNA BARCODING OF ZOOPLANKTON IN THE JIAOZHOU BAY FOR SPECIES IDENTIFICATION

WANG Min-Xiao<sup>1</sup>, CHENG Fang-Ping<sup>1,2</sup>, LI Chao-Lun<sup>1</sup>, SUN Song<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Jiaozhou Bay Marine Ecosystem Research Station, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049)

**Abstract** Estimation of zooplankton diversity and distribution is important for understanding local marine ecosystem conditions, and may serve as sensitive indicators for climate-induced changes. The scarcity of taxonomists and subtle morphological variations in some groups pose a problem for the identification of zooplanktons, especially at their larval stages. DNA barcodes provide an alternative approach to accurate identification of zooplankton species. The efficiency of the mitochondrial *cox1* fragments for species reorganization in zooplanktons was evaluated in this study. The samples were collected from the Jiaozhou Bay and a station in the South Yellow Sea. 82 DNA barcodes were determined for 45 common species that belonged to six different phyla in the local region, including: Arthropoda, Chaetognatha, Chordata, Cnidaria, Echinodermata, and Mollusca. According to the saturation plot, the *cox1* gene was substitutionally saturated for the alignment, which was best illustrated by the wobble codons of the gene. The wobble codons quickly got saturated at around 0.2 substitution per site. K2P genetic distances between individuals within the same species ranged from 0 to 0.11, with an average of 0.013 (SE = 0.003); meanwhile, genetic distance between species within the same genera ranged from 0.137 to 0.369, with an average of 0.265 (SE = 0.002). Thus the genetic distance between species was at least 20 times larger than that of the within species, indicating a barcode gap, which ensured that *cox1* sequences can be used as reliable characters for species identification for the zooplankton assemblages. However, species with extremely large intraspecific divergences were still noticed in our study, which may be explained by population genetic divergence owing to ecological or geographical isolation, unidentified cryptic speciation, and mis-identification. The significant barcode gap and the long-branch isolated shallow tips topology for the *Sagitta bedoti* suggested a possible cryptic speciation for the species. According to the Bayesian and neighbor-joining trees, the monophyly of all the species was resolved, with the node confidence support value of 1. However, the genetic divergence at the level of genera and family overlapped, possibly owing to the substitutional saturation. The lack of gap precluded the utility of *cox1* sequence as the only molecular markers for phylogenetic issues at above levels. At higher taxonomic levels, *cox1* sequences exhibited some resolving power by clustering the species within the lineage for some groups, including Copepoda, Scyphozoa, and Chaetognatha. In addition, DNA barcodes allowed recognition of cryptic species and mis-identified species. Based on the analyses of DNA barcodes, species names of several copepods were revised. *Acartia hongii* and *Acartia omorii* were mislabeled as *Acartia bifilosa* and *Acartia clausi* in previous reports. *Acartia pacifica*, which had been considered as one species with an apparent ability to live at a very wide range of salinities, was actually comprised of two different species: *Acartia pacifica* present at high salinity and *Acartia ohtsukai* at low salinity. Consequently, DNA barcoding based on *cox1* fragments were confirmed to be an appealing tool for zooplankton investigations by identifying specimens during all life stages. A comprehensive DNA barcode database will allow rapid assessment of species diversity and distribution of zooplankton in the Chinese coastal regions.

**Key words** Jiaozhou Bay, Zooplankton, Cytochrome oxidase subunit 1 (*cox1*), DNA barcode